

**NMR-spektroskopische Untersuchung  
von Bindungspartnern kleiner GTPasen:  
Bindedomänen von RalGDS und RanBP2**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der naturwissenschaftlichen Fakultät III

– Biologie und vorklinische Medizin

der Universität Regensburg

vorgelegt von

**Rolf Döker aus Köln**

Februar 2002

Promotionsgesuch eingereicht am: 30.01.2002

Die Arbeit wurde angeleitet von Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer.

Prüfungsausschuß:

Vorsitzender: Prof. Dr. B. Darnhofer-Demar

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. H. R. Kalbitzer

2. Gutachter: Prof. Dr. G. Hauska

3. Prüfer: Prof. Dr. E. Brunner

## Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen eines Forschungsprojekts zu Struktur und Funktion kleiner GTPasen und ihrer Bindungspartner angefertigt.

Mit Methoden der hochauflösenden, mehrdimensionalen Kernspinresonanzspektroskopie wurde die räumliche Struktur der zweiten von vier ranbindenden Domänen des menschlichen Kernporenpoteins RanBP2 (Nup358) in Lösung aufgeklärt. Das untersuchte Proteinkonstrukt umfaßt die Aminosäurereste Glycin 2028 bis Prolin 2154 von RanBP2 und lag einheitlich mit  $^{15}\text{N}$  bzw.  $^{13}\text{C}$  und  $^{15}\text{N}$  markiert vor. Zwei, aus vier und drei  $\beta$ -Strängen bestehende, antiparallele  $\beta$ -Faltblätter bilden ein „ $\beta$ -barrel“ aus, das durch die einzige vorhandene, dazu querliegende Helix wie mit einem Deckel abgeschlossen wird. Insgesamt ergibt sich das Faltungsmotiv von Pleckstrin homologen Domänen, wobei sich die einzelnen  $\beta$ -Stränge über folgende Aminosäurereste erstrecken: 2034-2045 (Strang 1), 2054-2064 (Strang 2), 2071-2077 (Strang 3), 2085-2087 (Strang 4), 2095-2096 (Strang 5), 2103-2112 (Strang 6), 2117-2126 (Strang 7). Die C-terminale Helix besteht aus den Resten 2129-2145. Mittels des Ramachandran-Diagramms wurde für den gefalteten Teil der Hauptkette die Auflösung der Struktur abgeschätzt, die demnach bei 0,25 nm liegt. Das Vorhandensein des fünften  $\beta$ -Strangs scheint vom jeweiligen Funktionszustand der Domäne, frei oder im Komplex mit Ran, abzuhängen. Dies legt zumindest ein Vergleich mit der Kristallstruktur der ersten Ranbindedomäne im Komplex mit Ran-GppNHp nahe, in der dieser Strang fehlt. Für die hier vorgestellte Lösungsstruktur der freien zweiten Bindedomäne ist seine Existenz aufgrund der vorgefundenen typischen chemischen Verschiebungen gesichert. Anhand der gemessenen und in Tabellenform vorliegenden Resonanzfrequenzen lassen sich künftig auch Studien zum Bindungsverhalten der Domäne mit NMR-spektroskopischen Techniken durchführen.

Das zur Untersuchung der Rasbindedomäne von RasGDS (Mensch) verwendete Protein war einheitlich mit  $^{15}\text{N}$  markiert und umfaßte die Aminosäurereste Aspartat 798 bis Threonin 884 von RasGDS. Die longitudinalen und transversalen Relaxationsraten sowie der heteronukleare Kernoverhauserereffekt für die Stickstoffkerne im Proteinrückgrat wurden am 500-MHz-Spektrometer gemessen. Anhand der erhaltenen Daten wurden nach dem sogenannten „modellfreien Ansatz“ von G. Lipari und A. Szabo die zur Relaxation durch Dipol-Dipol-Wechselwirkung und Anisotropie der chemischen Verschiebung beitragenden spektralen Dichten bestimmt. Die zugehörigen Ordnungsparameter weisen neben dem C-Terminus der Domäne vier weitere Bereiche als besonders flexibel aus. Dies betrifft die Amidgruppen der Reste 808-814,

839-841, 853-855 und 873 bis 875 von RasGDS, die sämtlich in „loop-Regionen“ liegen. Eine Korrelation von Beweglichkeit in der freien Domäne und direktem Kontakt mit Ras in der komplexierten Domäne ließ sich dagegen nicht nachweisen.

Schließlich wird eine neue Methode zur Bestimmung von Mittelwert und Standardabweichung zyklischer Daten vorgestellt. Für diese statistischen Parameter werden Definitionen angegeben, die mit denjenigen für nicht-zyklische Größen soweit als möglich übereinstimmen. Der Grundgedanke ist, Sätze zyklischer Daten, etwa von Winkeln, in denjenigen Koordinatensystemen zu beschreiben, in welchen die Standardabweichung minimal ist. Ein Algorithmus zur Wahl des jeweils optimalen Systems wird angegeben. Beispiele verdeutlichen die erfolgreiche Umsetzung in ein C-Programm, und anhand der Hauptkettentorsionswinkel von RasGTP und RasGDP wird die Eignung der Methode zum lokalen Vergleich von Molekülstrukturen aufgezeigt. Die Unterschiede beider Konformere insbesondere in den „switch-Regionen“ I und II treten deutlich hervor.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b>	<b>iii</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>v</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>1</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>3</b>
1.1 Proteine	3
1.2 Methoden zur Strukturaufklärung	3
1.3 Dynamik	6
1.4 Vor- und Nachteile der NMR	6
1.5 Kleine G-Proteine	7
1.6 RalGDS	9
1.7 Durch Ran kontrollierter Kerntransport	11
1.8 RanBP2	14
1.9 Ziele und Inhalt der Arbeit	15
<b>2 Struktur der Ranbindedomäne</b>	<b>16</b>
2.1 Material und Methoden	16
2.1.1 Material	16
2.1.2 Methoden	21
2.2 Ergebnisse	33
2.2.1 Startbedingungen	33
2.2.2 Zur Qualität der ersten Datensätze	33
2.2.3 Variation der Lösungsbedingungen	36
2.2.4 TOCSY-Mischzeiten	37
2.2.5 Zusammenfassung der bisherigen Ergebnisse	38
2.2.6 Verkürzung der Domäne	39
2.2.7 Zweidimensionale Spektren der verkürzten Bindedomäne	43
2.2.8 Sequenzspezifische Zuordnung	49
2.2.9 Das <sup>15</sup> N-HSQC	49
2.2.10 Strukturelevante Parameter	51
2.2.11 Die Faltblattstruktur von RanBP2 <sup>RanBD2AN</sup>	55
2.2.12 Chemische Verschiebungen	60
2.2.13 Restraints	62
2.2.14 Strukturrechnung	63
2.3 Diskussion	68
2.3.1 Die Qualität der Struktur	68
2.3.2 Die Topologie der Ranbindedomäne	71
2.3.3 Strukturvergleich: RanBP2 <sup>RanBD2AN</sup> und RanBP2 <sup>RanBD1</sup> •RanGppNHp	73
2.3.4 Zusammenfassung	75
2.3.5 Ausblick	75
<b>3 Dynamik der Rasbindedomäne von RalGDS</b>	<b>78</b>
3.1 Material	78
3.1.1 Geräte, Datenbank	78
3.1.2 Software	78
3.1.3 Proteinkonstrukt	78
3.1.4 Pufferbedingungen	79

3.2	Methoden	79
3.2.1	Dynamik von Molekülen – Konzepte des „Modelfree“-Ansatzes	79
3.2.2	Experimente	83
3.2.3	Auswertung der Spektren	83
3.2.4	Verwendung des Programms „Modelfree“	84
3.3	Ergebnisse	86
3.3.1	Relaxationsdaten	86
3.3.2	Rotationsdiffusionszeit und Isotropie der Molekülbewegung	88
3.3.3	Isotropie der Bewegung des gesamten Moleküls	88
3.3.4	Abschätzung von $\tau_c$	88
3.3.5	Ergebnis der Modellwahl	89
3.3.6	Die berechneten Ordnungsparameter	89
3.4	Diskussion	93
3.4.1	Die gemessenen Daten	93
3.4.2	Die berechneten Daten: Ordnungsparameter	93
3.4.3	Korrelation von Molekülstruktur und Flexibilität	95
<b>4</b>	<b>Mittelwert und Standardabweichung dihedraler Winkel</b>	<b>97</b>
4.1	Einführung	97
4.2	Mittelwert und Standardabweichung von zyklischen Größen	97
4.2.1	Das Problem der Definition	97
4.2.2	Lösungsvorschläge	99
4.2.3	Eindeutigkeit des Mittelwerts und obere Grenze der Standardabweichung	101
4.3	Das Programm CYCLIST und der zugrundeliegende Algorithmus	104
4.3.1	Das Programm	104
4.3.2	Der Algorithmus	105
4.3.3	Funktionstests	108
4.3.4	Erste Anwendungen	110
4.4	Diskussion	112
4.4.1	Zusammenfassung	114
	<b>Literatur</b>	<b>115</b>
	<b>Anhang A</b>	<b>122</b>
	<b>Anhang B</b>	<b>141</b>
	<b>Anhang C</b>	<b>149</b>
	<b>Dank</b>	<b>154</b>

## Abkürzungsverzeichnis

1D, 2D, 3D	ein-, zwei-, dreidimensional
Abb.	Abbildung(en)
Å	$10^{-10}$ Meter
<b><i>B</i>, <i>B</i><sub>0</sub></b>	äußeres (statisches) Magnetfeld
COSY	Correlation Spectroscopy
CPMG	Carr-Purcell-Maiboom-Gill, Pulsfolge: Spinecho-Experiment
CSA	Anisotropie der chemischen Verschiebung
CSI	Das Programm CSI
csi	chemical shift index, chemischer Verschiebungsindex
Da, kDa, MDa	Dalton, 1000 Dalton, 1000 000 Dalton (Molekülmasse)
D <sub>2</sub> O	<sup>2</sup> H <sub>2</sub> O
DSS	2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonsäure
DTE	Dithioerythritol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat (Natriumsalz)
FID	Free Induction Decay, im NMR-Experiment gemessenes Signal
g	Erdbeschleunigung ( $9,81 \text{ m s}^{-2}$ )
$\gamma_i$	gyromagnetisches Verhältnis eines Kerns <i>i</i> , Einheit: $\text{T}^{-1}\text{s}^{-1}$
GAP	GTPase Activating Protein
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GDS	GDP Dissociation Stimulator
GEF	Guanine nucleotide Exchange Factor
Gl., Gln.	Gleichung, Gleichungen
GppNHp	Guanosin-5'-( $\beta,\gamma$ -imido)triphosphat
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
HPr	Histidine-containing phosphocarrier Protein
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence, 2D Experiment
Hz, MHz	Hertz, $10^6$ Hertz
<i>h</i>	Plancksches Wirkungsquantum ( $6,626 \cdot 10^{-34} \text{ kg m}^2 \text{ s}^{-1}$ )
$\hbar$	$h / 2\pi$
<i>I</i>	Kernspin, Spinquantenzahl
INEPT	Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer, Experiment zum Magnetisierungstransfer von Protonen auf andere Kerne
KP <sub>i</sub>	Kaliumphosphatpuffer
M	Magnetisierung, molar
mM	$10^{-3}$ molar
NES	Nuclear Export Signal
NLS	Nuclear Localization Signal

NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NOE	Nuclear Overhauser Effect/Enhancement, Signal im NOESY-Spektrum
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
NOESY-Kontakt	Signal im NOESY-Spektrum
NPC	Nuclear Pore Complex
PDB	Protein Data Bank
PH-Domäne	Pleckstrin Homologe Domäne
ppm	part per million, $10^{-6}$
$R_1, R_2$	longitudinale, transversale Relaxationsrate
RalGDS	Ral GDP Dissociation Stimulator
RalGDS <sup>RasBD</sup>	Rasbindedomäne von RalGDS
Ran	Ras-related nuclear protein
RanBDi	i-te Ran bindende Domäne
RanBP	Ranbindeprotein, Ran Binding Protein (1 oder 2)
RanBP2 <sup>RanBD2</sup>	zweite der vier Ranbindedomänen von RanBP2
RanBP2 <sup>RanBD1</sup> •RanGppNHp	Komplex aus der ersten Ranbindedomäne von RanBP2 und RanGppNHp
RanBP2 <sup>RanBD2ΔN</sup>	zweite der vier Ranbindedomänen von RanBP2, N-terminal verkürzt
RanGAP	GAP für Ran
RanGTP	Ran im Komplex mit GTP
Ras•GppNHp	Ras im Komplex mit GppNHp
RasBD	Rasbindedomäne
RMSD	Root Mean Square Deviation
$r$	Abstand zweier (Atom-)kerne
$S$	Spinquantenzahl, Ordnungsparameter
SDS	Dodecylsulfat-Natriumsalz
$T_1, T_2$	Relaxationszeit für die longitudinale, transversale Magnetisierung
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
$\tau_c$	Rotationskorrelationszeit

SI-Einheiten, sowie die üblichen Ein- und der Dreibuchstabenkodes für Aminosäuren werden ohne weitere Erläuterung verwendet. Sonstige Abkürzungen, die bei Gebrauch an Ort und Stelle erklärt sind, wurden hier nicht aufgeführt.



## 1 Einleitung

### 1.1 Proteine

Proteine bilden die vielseitigste Klasse biologischer Makromoleküle, sie sind essentieller Bestandteil alles Lebendigen. Als Transporter für viele Stoffe, Steuerelemente für Transkription und Wachstum, als Antikörper und vor allem als Enzyme erfüllen sie ihre Aufgaben im Organismus. Proteine festigen das Skelett und sind die aktiv beweglichen Elemente der Muskeln. Der Vielfalt dieser und weiterer Aufgaben [Str96] entspricht eine Formenvielfalt, die durch die Verknüpfung von im wesentlichen 20 verschiedenen Aminosäuren in unterschiedlicher Reihenfolge zu langen Ketten ermöglicht wird. Für das genaue Verständnis der Funktionsweise eines Proteins ist es notwendig, seine dreidimensionale Struktur, d.h. die räumliche Anordnung aller Atome des Moleküls, zu kennen. Obwohl die dreidimensionale Struktur in einem richtig gefalteten Protein allein durch die Aminosäuresequenz bestimmt ist [Anf66], läßt sie sich bis heute nicht sicher aus dieser vorhersagen. Die Struktur muß experimentell bestimmt werden.

### 1.2 Methoden zur Strukturaufklärung

Hierzu stehen zwei prinzipiell verschiedene Methoden zur Verfügung. Zum einen sind das die optischen bzw. Beugungstechniken. Bei diesen ist die maximal erreichbare räumliche Auflösung der Wellenlänge der verwendeten Sonde (Strahlung) umgekehrt proportional. Dazu gehören die Röntgenkristallographie, die Elektronenkristallographie und Elektronenmikroskopie (EM). Aufgrund der Ruhemasse der Elektronen sollte die Technik der Elektronenbeugung besonders hohe Auflösungen ermöglichen. Tatsächlich existieren bislang wenige damit erhaltene Strukturdatensätze, ihre Auflösung liegt bei 3,0 Å bis 3,7 Å. Die Elektronenmikroskopie liefert Bilder mit Auflösungen bis zu 7,5 Å<sup>1</sup>. Bei beiden Techniken ist der Präparationsaufwand für die Herstellung der dünnen Proben („zweidimensionale Kristalle“) hoch, und während ihrer Vermessung können leicht Strahlenschäden auftreten [Fra96]. Die Elektronenmikroskopie erlaubt einen guten Überblick über Form und Maße großer Molekülkomplexe, wie beispielsweise der Poren in der Zellkernmembran [Ake93, Hin92, Kis98, Pan94], bietet aber keine atomare Auflösung. Röntgenkristallographie ist die meistgebrauchte Methode zur Strukturaufklärung. Von rund 15 600 in der Protein Data Bank (PDB) hinterlegten, experimentell bestimmten Proteinstrukturen wurden knapp 13 100 mittels Röntgenbeugung aufgeklärt. Hierfür muß die

---

<sup>1</sup> Quelle: Einträge in der Protein Data Bank (PDB), Stand: Februar 2002

Probe als Einkristall vorliegen. Diese Technik bietet je nach Qualität des Kristalls mit Kantenlängen in der Größenordnung von 0,1 mm [Can80] eine Auflösung bis unter 1 Å.

Die zweite Methode, die Kernspinresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie, **N**uclear **M**agnetic **R**esonance), mit der bislang ca. 2 100 Proteinstrukturen aufgeklärt wurden, ist von der Auflösung her vergleichbar. Hierbei wird die Proteinprobe, meist in wässriger Lösung, in ein starkes homogenes Magnetfeld gebracht. Die magnetischen Momente der Atomkerne richten sich aus; man erhält eine feldabhängige Gleichgewichtsmagnetisierung. Es werden Radiowellen eingestrahlt, die in Resonanz, wenn also die Photonenenergie mit der Energiedifferenz der Kernspinzustände im Magnetfeld übereinstimmt, von der Probe absorbiert werden. Die resultierende Störung der Magnetisierung wird als elektrisches Signal beobachtet. Dabei gehen die benutzten Wellenlängen von ungefähr einem halben Meter auf Grund der sehr geringen genannten Energiedifferenzen (ca.  $10^{-25}$  Joule) um Größenordnungen über die Maße der aufzulösenden Strukturen hinaus.

Röntgenkristallographie und NMR-Spektroskopie ergänzen einander mit ihren jeweiligen Vor- und Nachteilen. Während im Fall der NMR die Wasserstoffatome im Molekül die Hauptinformationsquelle sind, erhält man bei der Röntgenstrukturanalyse die Positionen der schwereren Atome, hauptsächlich Kohlenstoff und Stickstoff. Die Orte der Wasserstoffatome werden nachträglich berechnet. Läßt sich das jeweilige Protein kristallisieren, zur Lösung des Phasenproblems [Dre94] evtl. zusätzlich als Schweratomderivat, so können mittels Röntgenbeugung die Strukturen auch sehr großer Proteine oder Proteinkomplexe aufgeklärt werden. Bis 1997 [Per97, Sal98] galt diesbezüglich bei der NMR-Spektroskopie in der Praxis eine Obergrenze von rund 30 kDa für das Molekulargewicht. Inzwischen ist man in die Größenordnung von 100 kDa vorgestoßen [Zah99, Rie00], dies ist allerdings wegen des hohen damit verbundenen Aufwands noch kein Standard. Der Aufbau vieler größerer Proteine aus Domänen [Bla84] erweist sich in dieser Hinsicht als günstig. Domänen sind Untereinheiten der Polypeptidkette, die oft selbst weitgehend eigenständig, kompakt gefaltet sind wie globuläre Proteine. Einzelne Domänen übernehmen häufig bestimmte Teilfunktionen wie etwa die Bindung eines speziellen Interaktionspartners. Sie bestehen aus bis zu einigen hundert Aminosäureresten und eignen sich von ihrer Größe her oft für die Untersuchung mittels NMR-Spektroskopie. Eine weitere Voraussetzung dafür ist die Kenntnis der Primärstruktur, der Aminosäuresequenz der Peptidkette. Man erhält sie meist durch die Sequenzierung ihres kodierenden Gens [San77].

Der Hauptvorteil der Kernresonanzspektroskopie ist die Möglichkeit der Strukturuntersuchung von Proteinen *in Lösung*. Sie ist die einzige Methode, die dies in Kombination mit atomarer Auflösung bietet. Trotz der benötigten hohen Proteinkonzentrationen, ungefähr 1 mM in wenigstens ca. 300  $\mu$ l Probenvolumen, sind die Randbedingungen denen *in vivo* ähnlicher als im Kristall. Dort führt die relativ dichte Packung der Moleküle möglicherweise zu veränderten funktionellen Eigenschaften, etwa im dynamischen Verhalten und bei der Ausbildung verschiedener Konformationen. Diese Eigenschaften, wie auch die Bindung von Substraten, lassen sich zudem in Lösung und mit der NMR leichter im Detail beobachten.

Das Hauptergebnis von NMR-Experimenten zur Strukturaufklärung ist zunächst Information über die Abstände von Wasserstoffkernen im Molekül zueinander: Beim NOESY-Experiment (Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy, [Neu89]) erhält man für je zwei Protonen ein abstandsabhängiges Signal im Spektrum. Die Signalintensität ist in erster Näherung der 6. Potenz des Kernabstands umgekehrt proportional; es sind Abstände bis zu ca. 5 Å beobachtbar. Die Struktur wird dann mittels „molecular dynamics“ bestimmt: Ausgehend von der ausgestreckten Polypeptidkette und gewählten Anfangsgeschwindigkeiten der einzelnen Atome, wird deren Bewegung in kurzen Zeitintervallen (Größenordnung: 1 fs) berechnet. Die zugehörigen Bewegungsgleichungen sind durch die Newtonschen Axiome und molekülspezifische Randbedingungen festgelegt. Letztere sind durch chemische Bindungen, Van-der-Waals-Radien sowie elektrostatische Wechselwirkungen gegeben und gehen als Potentiale in die Rechnung ein. In deren Verlauf werden die angenommene Temperatur, damit die Geschwindigkeit der Atome, gesenkt („simulated annealing“, [Kir83, Ric94]) und die aus NMR-Experimenten bekannten, ebenfalls als Potentiale („Pseudopotentiale“) beschriebenen, Protonenabstände immer stärker gewichtet. Die Simulation wird mehrfach mit unterschiedlichen Startgeschwindigkeiten wiederholt und konvergiert bei qualitativ und quantitativ ausreichend guten Abstandsinformationen meist gegen die gleiche Anordnung der Atome, die räumliche Struktur des Moleküls. Die wesentlichen inneren Freiheitsgrade der Peptidkette sind Torsionen um Einfachbindungen. Sie ermöglichen die „korrekte“ Faltung des Proteins *in natura* und sind letztlich auch die variablen Parameter bei der Strukturberechnung. Die Hauptketten-Torsionswinkel  $\phi$ ,  $\psi$  und  $\omega$  [Ken70] bestimmen die Sekundärstruktur des Proteins vollständig [Ram63].

### 1.3 Dynamik

Wie weiter oben schon angedeutet, läßt sich mit Hilfe der NMR-Spektroskopie auch das dynamische Verhalten von Makromolekülen untersuchen. Ein gefaltetes Protein beispielsweise ist natürlich kein starrer Körper. Die beobachtete Struktur ist also ein zeitlicher Mittelwert. Eingeschränkt sind etwa Torsionen um Einfachbindungen möglich, auch Bindungslängen und –winkel sind zeitlich nicht ganz konstant. Die entsprechenden (molekül)internen Bewegungen, aber auch solche des Moleküls als Ganzes, beeinflussen die Wechselwirkung jedes Kerns mit seiner Umgebung. Meßbar ist dies anhand der Relaxationsraten, die das Abklingen der im Experiment beobachtbaren Magnetisierung beschreiben, sowie anhand von Intensitätsänderungen der Signale in NOE-Experimenten. Überdurchschnittlich starre oder bewegliche Bereiche eines Proteins können so identifiziert werden; die Schnelligkeit der Bewegungen läßt sich abschätzen. Hierzu werden meistens nur die Amidgruppen der Hauptkette herangezogen [Lef96, Dos00, Kay98].

### 1.4 Vor- und Nachteile der NMR

Kurz zusammengefaßt sind die wichtigsten Vorteile der NMR-Spektroskopie: Es ist keine Kristallisation notwendig. Diese gelingt nicht bei jedem Protein bzw. ist oft schwierig. Die Meßbedingungen in Lösung sind naturnäher und können leichter variiert bzw. einer Fragestellung entsprechend optimiert werden. Nachdem die benötigten Signale den Kernen, von denen sie herrühren, zugeordnet wurden, sind Bindungsstudien sowie Untersuchungen der Moleküldynamik möglich. Der Aufwand für Experimente mit unterschiedlichen Bindungspartnern ist relativ gering; die Struktur muß nicht notwendigerweise vorher bestimmt werden. Schließlich erlaubt die NMR-Spektroskopie inzwischen den direkten Nachweis von Wasserstoffbrücken. Nachteile sind die geringe Empfindlichkeit der Methode, die Größenbeschränkung für untersuchte Moleküle und der Zeitaufwand für die Zuordnung der beobachteten Resonanzen.

## 1.5 Kleine G-Proteine

Die Gruppe der kleinen G-Proteine ist in allen Eukaryoten vertreten. Es handelt sich um Proteine, die Guanosintriphosphat (GTP) binden und die Hydrolyse zu Guanosindiphosphat (GDP) katalysieren; das Diphosphat bleibt gebunden. Im Gegensatz zu den länger bekannten großen (heterotrimeren) G-Proteinen bestehen die kleinen GTPasen aus nur einer Untereinheit von um die 200 Aminosäuren. Die beiden je nach dem Bindungspartner (GTP oder GDP) angenommenen unterschiedlichen Konformationen heißen auch die GTP-Form bzw. die GDP-Form des Proteins. Weil die intrinsische GTPase-Aktivität sehr gering ist (Größenordnung:  $10^{-3}\text{s}^{-1}$  [Gey97a]), sind beide Formen stabil. Erst im Verbund mit einem zusätzlichen Protein, einem für das G-Protein spezifischen GAP (GTPase-Activating Protein), wird GTP effektiv gespalten, die Aktivität wird um das ca.  $10^5$ fache erhöht. Umgekehrt ist auch für den Austausch von GDP gegen GTP ein GEF (Guanine nucleotide Exchange Factor) bzw. GDS (GDP Dissociation Stimulator)<sup>2</sup> notwendig. GEFs erhöhen – wie GAPs proteinspezifisch – die Dissoziationsrate für GDP in derselben Größenordnung. In Verbindung mit einem etwa 30fachen Überschuss von GTP gegenüber GDP in der Zelle [Tra87] resultiert ein wirkungsvoller Austausch. Es ergibt sich das Bild des GTPase-Zyklus [Bou91] in Abbildung 1.1.

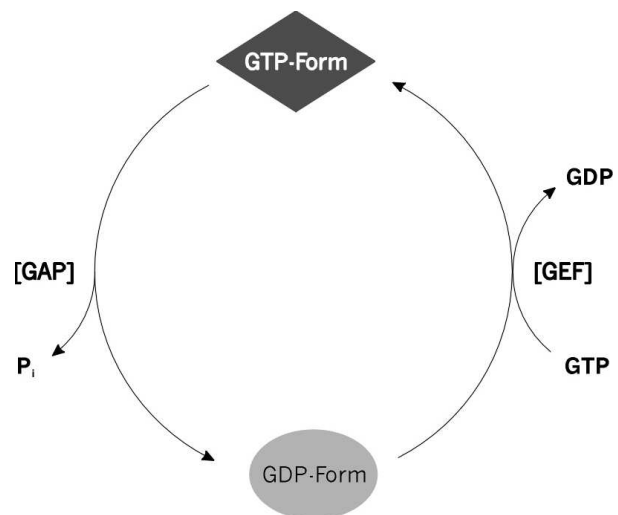


Abbildung 1.1. Der GTPase-Zyklus

Der bekannteste Vertreter der kleinen G-Proteine ist Ras (von **Rat Sarcoma**), anhand dessen zunächst einige Charakteristika dieser Proteingruppe erläutert werden. Das menschliche Ras unterscheidet sich jeweils nur durch eine Punktmutation von viralen Ras-Varianten, die zuerst in Krebszellen von Ratten gefunden wurden. Anfang der 1980er Jahre wurde festgestellt, daß solche Mutationen auch in rund 25 % aller menschlichen Tumoren auftreten. So wurden die Struktur und die Wirkungsweise von Ras, sowie sein Aufgabenfeld in der Zelle, Gegenstand intensiver Forschung. Ras wurde zum Prototyp der mit ihm verwandten kleinen GTPasen.

<sup>2</sup> GEF: Bezeichnung der Austauschfaktoren allgemein, GDS: Bezeichnung des einzelnen Vertreters

Es ist als molekularer Schalter mit den Zuständen GDP-Form und GTP-Form in verschiedene Signalleitungsprozesse, vor allem im Zusammenhang mit Zellwachstum und -differenzierung, eingebunden. Durch Signale von Rezeptoren in der Zellmembran wird es aktiviert, d.h. in die GTP-Form gebracht. Proteine, die Ras bevorzugt in der GTP-Form binden (und so ihrerseits aktiviert werden), heißen Effektoren von Ras [Wit96]. RalGDS z.B. ist ein wichtiger solcher Effektor und, wie der Name zeigt, gleichzeitig ein GEF, der Ral (**R**as **l**ike protein), eine weitere kleine GTPase, aktiviert. Im Zusammenspiel mit seinen GAPs hydrolysiert Ras das gebundene GTP und wird so deaktiviert. Die onkogenen Mutanten von Ras (z.B. G12V) sind dazu nicht in der Lage [Wit97]. Sie bleiben deshalb dauernd aktiv, wodurch die Zelle auch ohne das Vorhandensein entsprechender extrazellulärer Reize/Botenstoffe zum Wachstum angeregt wird [Hal00]. Die mit dem Mechanismus der Hydrolyse verbundene Wirkungsweise als Schalter haben alle G-Proteine gemeinsam.

Neben Ras wurde eine Reihe weiterer kleiner G-Proteine gefunden. Zusammen bilden sie die sogenannte Superfamilie der Ras verwandten Proteine. Sie ist in die Unterfamilien Ras, Rho, Rab, Arf und Ran (**R**as-related **n**uclear protein) unterteilt, deren Mitglieder untereinander jeweils besonders ähnliche Aminosäuresequenzen aufweisen bzw. ähnliche Funktionen in der Zelle haben. Soweit bislang bekannt ist, sind alle kleinen GTPasen im wesentlichen auch gleich gefaltet [Hal00]. Die Abfolge der Sekundärstrukturelemente ist  $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta\alpha\beta\alpha$ , wobei  $\beta$  für  $\beta$ -Stränge,  $\alpha$  für  $\alpha$ -helikale Bereiche steht. Dazwischen befinden sich jeweils loop-Regionen, die das Bindungsverhalten des Proteins zum Teil wesentlich mitbestimmen.

Die ersten bekannten dreidimensionalen Strukturen kleiner GTPasen waren, gemäß dem besonderen Interesse an Ras, diejenigen von RasGTP und RasGDP [Pai89, Mil90, Gey97a]. Wie an ihnen zu erkennen ist, sind die entscheidenden Konformationsunterschiede der beiden Formen hauptsächlich in zwei Bereichen der Peptidkette lokalisiert, die deshalb auch switch I und switch II genannt werden [Mil90]. Switch I liegt im Bereich der zweiten loop und des zweiten  $\beta$ -Strangs, switch II in dem der vierten loop sowie der darauf folgenden zweiten Helix. Die zweite loop heißt auch Effektor-loop. Sie enthält einen konservierten Threoninrest (in Ras: T35) und ist ansonsten auf die Bindung der jeweiligen spezifischen Effektoren zugeschnitten. Speziell in diesem Bereich ist die sequentielle Ähnlichkeit innerhalb der Unterfamilien höher als zwischen diesen. Außer dem Threonin in switch I gibt es weitere Consensusmotive, die bei allen Verwandten von Ras vorhanden sind. Sie sind direkt an der Bindung und/oder Hydrolyse

des Guaninnukleotids beteiligt [Hal00]. Schließlich tragen fast alle kleinen G-Proteine der Ras-Superfamilie aufgrund einer posttranslationalen Modifikation C-terminal eine Lipidgruppe (Prenylgruppe), die der Verankerung an Membranen dient. Die einzige bisher bekannte Ausnahme stellt Ran dar; es wird nicht modifiziert [Hal00]. Trotz der grundsätzlich gleichen Wirkungsweise und sehr ähnlicher Strukturen stellen die Mitglieder der Ras-Superfamilie eine vielseitige Gruppe von Proteinen dar, die an zahlreichen unterschiedlichen Steuerungsprozessen in der Zelle beteiligt ist.

Die beiden im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Proteine<sup>3</sup> RalGDS und RanBP2 stehen als Effektoren in enger Beziehung zu den kleinen G-Proteinen Ral und Ras bzw. Ran. Weitere benutzte Daten stammen von Ras selbst und von HPr (**h**istidine-containing phosphocarrier **p**rotein), sie dienen zum Testen bzw. als Anwendungsbeispiele für neue Software.

## 1.6 RalGDS

RalGDS (auch: RalGEF) wurde oben schon als Effektor von Ras erwähnt. Es ist zugleich ein Effektor von Rap und aktiviert als zugehöriger spezifischer Austauschfaktor natürlich Ral, dessen Gen (das der Isoform RalA) 1986 entdeckt wurde [Cha86]. Über RalBP1 und über weitere kleine GTPasen (Cdc42, Rac, Rho) wird von Ral die Organisation des Cytoskeletts mitgesteuert [Wit96]. Ein weiterer Signalweg im Zusammenhang mit Zelldifferenzierung und -wachstum führt von RasGTP über Raf, MEK und ERK. So ergibt sich der in Abb. 1.2 stark vereinfacht dargestellte Zusammenhang der Signalketten [Hor01]. Dabei sind die Regulationsmechanismen und die beteiligten Moleküle bisher nicht im Detail bekannt. Ras ist an der Plasmamembran, Ral außerdem auch an innerzellulären Membranen verankert. RalGDS ist Bestandteil des Cytosols und kommt an der Zellmembran durch die Wechselwirkung mit Ras verstärkt in Kontakt mit RalGDP [Nak99a]. Damit ist es das Bindeglied der Signalwege von Ras und Ral. Neben RalGDS sind Rlf, Rgl und Rgl2 als Austauschfaktoren von Ral bekannt, kürzlich wurde RalGEF2 gefunden, das C-terminal eine PH-Domäne [Sar95] besitzt, die wohl der Lokalisierung an Membranen dient [Bru00]. RalGDS (aus der Maus) wurde 1993 nach seiner Entdeckung bei der gezielten Suche nach GEFs kleiner G-Proteine erstmals charakterisiert [Alb93]. Es hat eine Masse von 113 kDa und gehört zur Familie der Cdc25 (Hefe) ähnlichen GEFs, die mit der switch-II-Region der zugehörigen GTPase wechselwirken.

---

<sup>3</sup> Untersucht wurden die jeweiligen Bindungsdomänen.

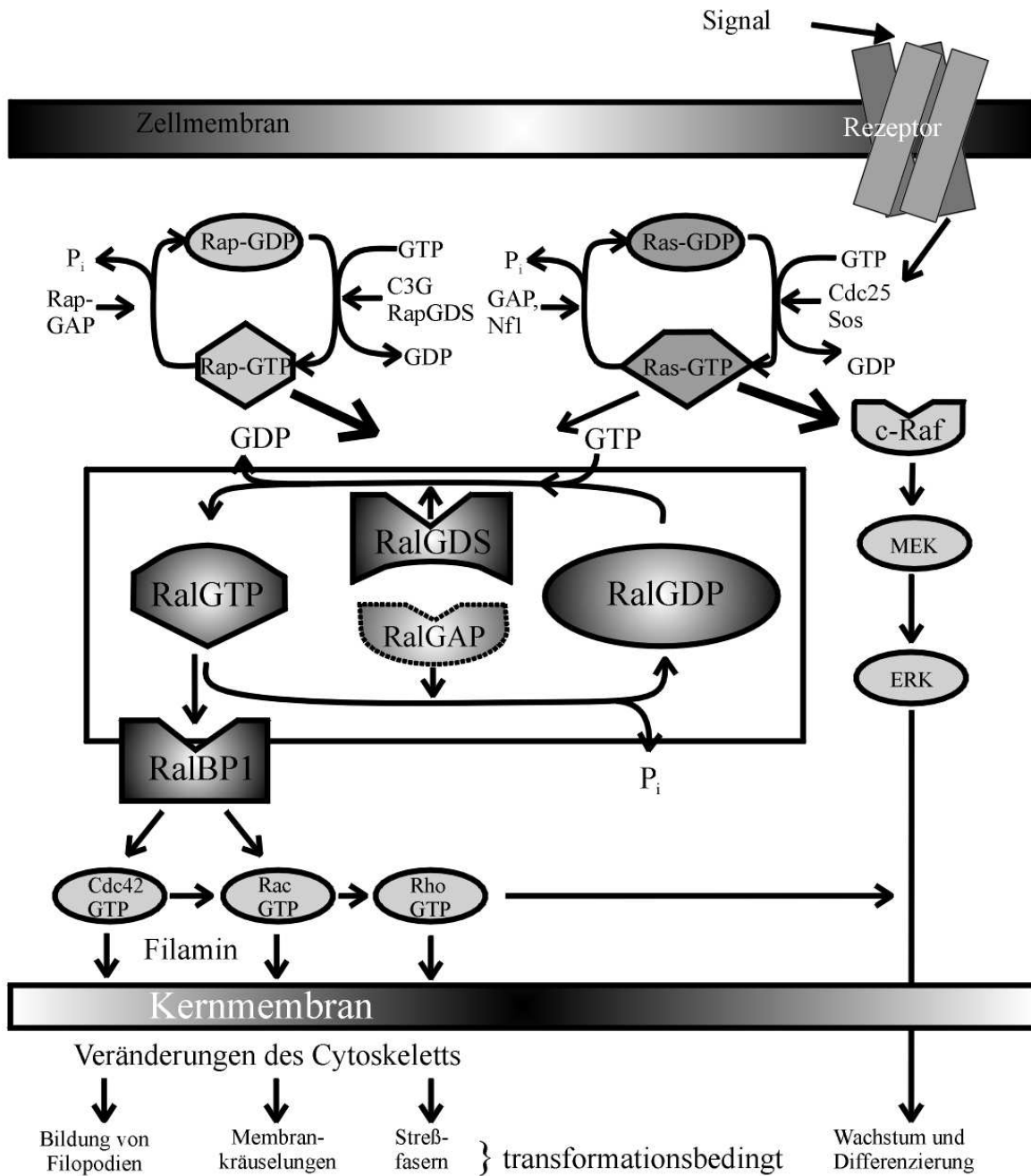


Abbildung 1.2. RalGDS im Rahmen der Signalketten von Ras und Rap (vereinfacht aus Hor01)

Die menschliche Form wurde 1994 bei der Suche nach an Ras bindenden Proteinen gefunden [Spa94]. RalGDS besitzt N-terminal die GEF-Domäne, C-terminal eine Ras bindende Domäne (RasBD). Diese besteht aus ca. 95 Aminosäuren, ihre Sequenzen sind bei Maus und Mensch zu 90 % identisch. Sowohl die Bindedomäne allein als auch das ganze Protein binden GTP-abhängig an Ras und Rap [Hor01]. Die RasBD lässt sich in *E. coli* gut exprimieren und ihre Faltung ist vom N-terminalen Rest des Moleküls unabhängig [Her96]. Ihre Lösungsstruktur



[Gey97b, Mue99], wie auch die Kristallstruktur [Hua97, Hua98] haben den sogenannten Ubiquitin-superfold, den auch Byr2 [McC96, Gro01], das MEK-Analogon aus *Schizosaccharomyces pombe*, aufweist. Ergänzende Kernspin-Relaxationsdaten existierten bislang nicht.

## 1.7 Durch Ran kontrollierter Kerntransport

Eukaryotische Zellen sind durch die Ausbildung membranumschlossener, spezialisierter Abteilungen, insbesondere des Zellkerns, gekennzeichnet. Die Doppellipidschicht der Kernmembran ist für (biologische) Makromoleküle undurchlässig; im Kern benötigte Proteine wie Transkriptionsfaktoren werden durch Poren importiert, RNA-Protein-Komplexe exportiert [Fel72, Pai75, All00, Nak99b, Nig97]. In die Membran eingebettete Proteine bilden das Gerüst für flexible Kanäle mit einem Durchmesser von bis zu 36 nm [Pan00]. Der detaillierte Aufbau der Poren, insbesondere das Vorhandensein eines Zentralkörpers, wird kontrovers diskutiert [Pan94, Bay00]. Zum Porenkomplex (NPC, **N**uclear **P**ore **C**omplex) mit seiner achtzähligen Symmetrie gehören kernseitig eine korbähnliche Erweiterung („nuclear basket“) sowie ca. 35-50 nm weit ins Cytoplasma ragende Filamente, zu deren Bestandteilen RanBP2 („**R**an **B**inding **P**rotein **2**“, auch: Nup358) gehört [Del97, Vet99a]. Insgesamt besteht ein solcher Komplex artabhängig aus rund 30 bis 100 Proteinen, den Nukleoporinen, mit einer Masse von zusammen ca. 60-125 MDa [All00, Ohn98, Rab01]. Diffusion als passiver Transportmechanismus spielt beim Kerntransport größerer Moleküle keine Rolle, selbst kleine Proteine mit Massen unter 60 kDa, wie Histon1 (20,7 kDa), werden hauptsächlich aktiv – und damit kontrolliert – mit Hilfe spezieller Transportrezeptoren durch die Poren befördert [Bre90, Jäk99]. Der aktive Transport erfordert eine Kennzeichnung des Transportsubstrats mit NLS bzw. NES (**N**uclear **L**ocalization/**E**xport **S**ignals), oft Aminosäurenkombinationen, die als feste Bestandteile funktionstüchtiger Proteine nach erfolgtem Transport nicht entfernt werden [Nig97, Mat98a]. Bislang ist ungeklärt, wie im einzelnen Träger dieser Signale die Poren passieren, weil der Nachweis der Transportprozesse nur an großen, komplexen Systemen möglich ist: vollständigen Zellkernen mit intakten Membranen und NPCs. Ganze Zellen, deren Plasmamembranen mit Digitonin durchlässig gemacht wurden, erlauben das Entfernen oder gezielte (wieder) Hinzufügen verschiedener Cytosolbestandteile und das Einbringen von fluoreszent markiertem Imports substrat. Über dessen Verteilung in Zelle und Kern läßt sich dann der Transport mikroskopisch beobachten.

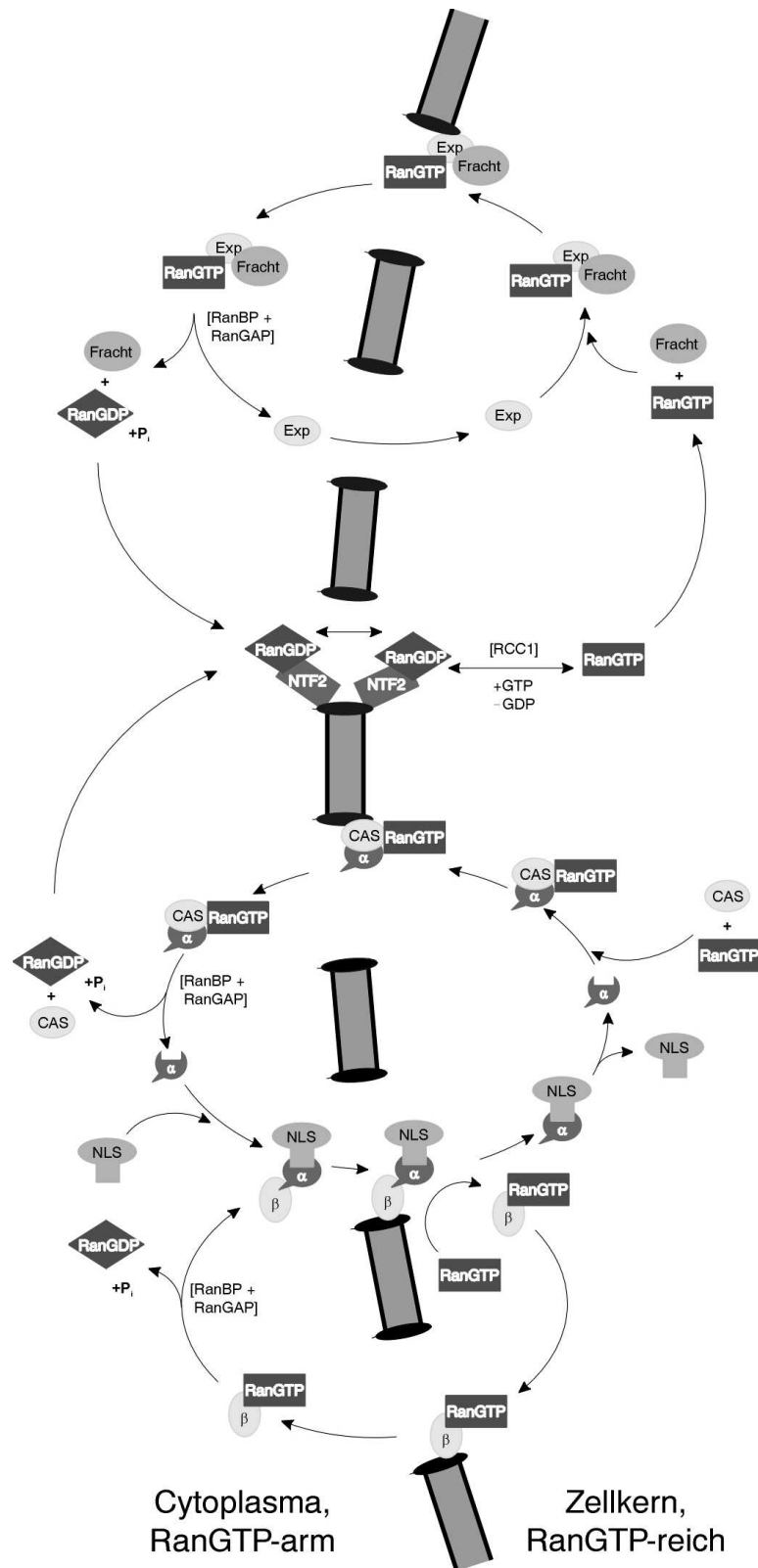


Abbildung 1.3. Schema des aktiven Kerntransports einfacher Proteine (Kernporen nicht maßstäblich): Der durch den Konzentrationsgradienten von RanGTP zwischen Cytosol und Zellkern aufrechterhaltene RanGTPase-Zyklus steuert die Transportprozesse. Transportrezeptoren (Exportine, Importin  $\beta$ , NTF2) passieren die Kernporen abhängig von ihrer Bindung an RanGTP respektive Substrat in der entsprechenden Richtung. (Exp: Exportrezeptor; Fracht: Exportsubstrat, Träger von NES;  $\alpha$ : Importin  $\alpha$ ;  $\beta$ : Importin  $\beta$ ; NLS: Träger von NLS; RanBP: RanBP1 oder RanBP2; P<sub>i</sub>: Phosphatgruppe)

Auf diese Weise und via Bindungsstudien [Ada90, Rex95, New86, Shu96] wurde die essentielle Beteiligung von Ran [Mel93, Moo93, Moo94a, Dri90, Bis91a], Importin  $\beta$  [Ada94, Rad95a], NTF2 (Nuclear Transport Factor 2) [Moo94b, Pas95] und Importin  $\alpha$  [Ada94, Mor95]<sup>4</sup> am Import klassischer NLS [Kal84] erkannt. Abbildung 3 zeigt in Grundzügen die Stoffkreisläufe; beschränkt auf den Transport einfacher Proteine. Die Darstellung ist mit leichten Änderungen dem Übersichtsartikel von Görlich und Kutay [Gör99b] entlehnt. Es ergibt sich folgendes Bild: Die kurz als „Fracht“ bzw. „NLS“ bezeichneten Substrate sowie RanGDP treten mit Hilfe ihrer jeweils zuständigen Transportrezeptoren Exp(ortin), (Importin)  $\beta$  oder NTF2 durch die Kernporen hindurch. Nicht alle Importrezeptoren benötigen wie das dargestellte Importin  $\beta$  zur Bindung ihres Substrats ein Adaptermolekül (hier Importin  $\alpha$ ). Dieses hat einen eigenen Exportrezeptor, in diesem Fall CAS (Cellular Apoptosis Susceptibility gene) [Kut97]. Transportrezeptoren können die Poren in beiden Richtungen passieren. Der Vorgang wird durch ihre Wechselwirkung mit Nukleoporinen getragen. Einzelheiten dazu sind kaum bekannt, die in einigen Nukleoporinen häufigen FG-Motive [Fab94, Rou94, Mor95] bilden aber Bindeplätze für Transportrezeptoren [Fin87, Rad95b, Pas95] und spielen eine wesentliche Rolle [Ohn98, Bay00, Rou00, Rab01, Rib01]. Letzteres gilt auch für RanGTP, das die Richtung der Passage festlegt: An RanGTP gebundene Rezeptoren werden in der Regel exportiert, RanGTP-freie Transportrezeptoren wandern in den Kern [Gör96a, Iza97]<sup>5</sup>. Zudem kann RanGTP Komplexe aus Importsubstrat und Importinen dissoziieren [Rex95, Gör96a], und die Bindung von Exportsubstraten an ihre Rezeptoren wird durch RanGTP erleichtert oder erst möglich [For97, Kut97, Art98]. So beendet die Bindung von RanGTP Import-, seine Hydrolyse im Cytosol Exportprozesse, und werden die Transportkreisläufe über den GTPase-Zyklus von Ran gesteuert. Der notwendige Konzentrationsgradient von RanGTP [Iza97, Gör96b] wird durch RanGAP1 [Bis94, Bis95a] im Cytosol einerseits und den chromatinassoziierten [Oht89] Austauschfaktor RCC1 (**R**egulator of **C**hromosome **C**ondensation **1**) [Oht87, Bis91b] im Zellkern andererseits aufrechterhalten; *in vitro* ermöglicht seine Umkehr anscheinend den Wechsel auch der Transportrichtungen für NES und NLS [Nac99]. NTF2 bringt die GDP-Form von Ran in den Kern zurück [Pas95, Rib98, Smi98]. Der GTPase-Zyklus mit dem Hydrolyseschritt im Cytosol ist die einzige bislang sicher bekannte Energiequelle des aktiven

<sup>4</sup> Die Proteine haben alternative Namen, zu finden u.a. in [Gör99b, Nak99b]; Ran insbesondere ist auch als TC4 bekannt.

<sup>5</sup> Kose et al. [Kos99] beschreiben allerdings den RanGTP-unabhängigen Export von Importin  $\beta$ .

Kerntransports, bei dem die rund 200 nm lange Strecke zwischen nuclear basket und cytosolischen Filamenten möglicherweise zumindest von einem Teil der Transportkomplexe ohne weitere Energiezufuhr zurückgelegt wird [Eng98, Sch98, Rib99, Tal99, Rab01].

Während die Hydrolyse von RanGTP allein durch RanGAP1 effektiv katalysiert wird, ist sie im Komplex mit Transportrezeptoren zunächst blockiert [Flo95]. Das im Cytosol gelöste Protein RanBP1 (**Ran Binding Protein 1**) ist ein Kofaktor von RanGAP1: Es wird vermutet, daß es RanGTP aus dem Komplex löst, um es transient selbst zu binden und dabei der Einwirkung von RanGAP1 zugänglich zu machen [Bis95b, Bis97, Keh99]. Dazu ist das Vorhandensein allein der Ran bindenden Domäne hinreichend [Keh99, Nov99].

## 1.8 RanBP2

Das 358 kDA-Nukleoporin RanBP2/Nup358<sup>6</sup> wurde erstmals 1995 beschrieben [Yok95, Wu95]. Es ist Teil der ins Cytosol ragenden Filamente [Wil95, Wu95, Yok95, Yas99b, Vet99a, Del97] an den Kernporen und weist einige bekannte Motive auf: eine für Nups typische leucinreiche Region und mehrere FxFG-Motive werden durch vier, zu der von RanBP1 homologe, Ran-Bindedomänen [Bed95, Har95, Din95], acht Zinkfinger motive und eine cyclophilinähnliche Domäne ergänzt. Diese scheint als Chaperon für Opsine zu dienen [Fer96]. Die vier ranbindenden Domänen, deren zweite Hauptgegenstand dieser Arbeit ist, können anstelle von RanBP1 die Aufgabe als Koaktivatoren von RanGAP1 übernehmen [Vil98, Keh99, Nov99, Yas99a, Vil00]. Zusammen mit über SUMO1 (Small Ubiquitin related **MO**difier) [Mat96, Mah97, Mat98b] an RanBP2 gebundenem RanGAP1 und mit den eigenen FG-Bindestellen bildet RanBP2 anscheinend ein System, das stabile Exportkomplexe am Ausgang der Kernporen geradezu abfangen und effizient dissoziieren kann. Von besonderer Bedeutung ist wahrscheinlich, daß RanBP2 als Nukleoporin schon bei der Formation von NPCs seinen Platz im Cytosol einnimmt [Gör99b, Har00]. So könnte es, zusammen mit dem ans Chromatin gebundenen RCC1, nach einer Zellteilung den Konzentrationsgradienten von RanGTP etablieren, ausreichend um zunächst RanGAP1 und RanBP1 aus dem Zellkern zu entfernen und mittels ihres Exportrezeptors CRM1 (**Chromosome Region Maintenance**) ins Cytosol zu bringen. Ein Hinweis darauf ist das Vorkommen von RanBP2 und seiner Analoga nur in Arten mit offener Mitose [Gör99b].

---

<sup>6</sup> Nukleoporine werden als Nup bezeichnet, ein einzelner Vertreter zusätzlich durch seine Masse.

## **1.9 Ziele und Inhalt der Arbeit**

Zu Beginn war die Faltung der oben erwähnten Ran bindenden Domänen völlig unbekannt. Die Lösungsstruktur einer der Bindedomänen von RanBP2 sollte bestimmt werden. Von der Rasbindedomäne in RalGDS sind strukturelle Eigenschaften, wie die Einbindung einzelner Aminosäurereste in Sekundärstrukturelemente oder in die Kontaktfläche zu RasGTP, bekannt. In diesem Zusammenhang war abzuklären, wie sie sich in der Beweglichkeit der Hauptkette widerspiegeln. Schließlich stellte sich die Frage, ob ein Bündel von Molekülstrukturen die Berechnung mittlerer dihedraler Winkel erlaubt. Dazu war ein Algorithmus zu erarbeiten und zu testen, mithin als Programm zur Verfügung zu stellen.

Damit gliedert sich die vorliegende Arbeit in drei Teile. Die Strukturuntersuchung der zweiten Ranbindedomäne von RanBP2 ist das Thema des folgenden Teils. Im Anschluß werden Relaxationsdaten der Ras bindenden Domäne von RalGDS vorgestellt, zuletzt folgt die Beschreibung des entwickelten C-Programms.

## 2 Struktur der Ranbindedomäne

### 2.1 Material und Methoden

#### 2.1.1 Material

##### 2.1.1.1 Chemikalien und Enzyme

β-Mercaptoethanol (2-Thioethanol), Dimethylsulfoxid (DMSO), di-Kaliumhydrogenphosphat, Dodecylsulfat-Natriumsalz (SDS), Essigsäure, Ethanol, Ethylendiamintetraacetat (Natriumsalz) (EDTA, „Titriplex-III“), Glycerin (87 %), Harnstoff, Kaliumdihydrogenphosphat, Magnesiumchlorid, Natriumazid, Natriumchlorid, Natriumhydroxid, Natriumsulfat, Phosphorsäure (85 %), 2-Propanol, Salzsäure (1M) und Kalibrierpuffer wurden von Merck bezogen.

Ammoniumpersulfat, Bromphenolblau, Dithioerythritol (DTE), Trishydroxymethyl-aminomethan (TRIS); Herkunft: USB

Ammoniumpersulfat; Herkunft: Serva

Coomassie Brilliantblau G 250, R 250; Quelle: Sigma

Glycin, deuteriert: synthetisiert von Herbert Zimmermann, Max-Planck-Institut für medizinische Forschung, Heidelberg

1,4-Dioxan-d8, 2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonsäure (DSS); bezogen von: Cambridge Isotope Laboratories

Acrylamid 30 %, Bisacrylamid 0,8 % - gebrauchsfertige Stammlösung „rotiphorese Gel 30“, N, N, N', N'-Tetramethyl-ethylen-diamin (TEMED); Herkunft: Roth

1,4-Dithioerythrol (DTE), Guanidinhydrochlorid, Rinderserumalbumin (BSA); Quelle: Gerbu  
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF); Herkunft: Fluka

Deuteriumoxid, (99,9 %), Fa. Deutero, Kastellaun

Bradford-Reagenz Uptima Coo Assay Reagent UPF 86420: Uptima/Interchim

Molekulargewichtsmarker: Dalton Mark VII-L, Sigma

Trypsin: Merck

Das verwendete Wasser wurde mit dem „Millipore Milli-Q Reagent Water System“ filtriert.

### **2.1.1.2 Sonstiges Verbrauchsmaterial**

Küvetten:

Quarzglasküvetten, Suprasil, Bezeichnung 104.0023-QS (Hellma)

Kunststoffküvetten, Re. 67.742 (Sarstedt, Nürnberg)

Sterilfilter 0,45 mm, Bezeichnung FP 030/2 (Schleicher & Schuell)

Amicon Ultrafiltrationsmembranen YM3, NMWL3.000, Durchmesser 44,5 mm, Rührzelle 8050

Zentrifugationsfilter Ultrafree Biomax 5k, Bezeichnung UFV2BCC40 (Millipore)

Säule NAP-10 (Pharmacia Biotech)

### **2.1.1.3 Geräte**

NMR-Spektrometer: Avance DMX500, DRX600, DRX800 mit den zugehörigen Tripelresonanz-Probenköpfen (Bruker)

Zentrifugen:

Tischzentrifuge Biofuge „pico“ mit Rotor 7500 3324 (Heraeus Instruments)

Tischzentrifuge Universal 30 RF (Hettich)

Vakuumpzentrifuge RC10.10. mit Kühlfalle RCT60 (Jouan)

UV/Vis Spektrophotometer DU 640, Beckman

PH-Meter, Elektroden:

„Φ32 pH-Meter“, Elektrode 39848 (Beckman)

„pH-Meter 761“ (Knick) mit Elektrode: Typ Spintrode, 3mm Durchmesser (Hamilton)

Elektrophoreseapparaturen (cti), Netzteile PowerPac 300 (Bio-Rad)

Geldokumentationssystem (Herolab)

### **2.1.1.4 Datenbank**

Protein Data Bank: <http://www.rcsb.org/pdb/> [Ber77]

### 2.1.1.5 Software

Aurelia [Nei95]	Auswertung von NMR-Spektren
Auremol*	Auswertung von Spektren, Rückrechnung von Spektren, Erstellen von Listen struktureinschränkender Bedingungen
Clustal X / W [Tho97, Tho94]	Sequenzalignment
CNS [Bru98]	Strukturberechnung
CNSSTAT [Ste01]	Dokumentation der Verletzung von Abstandsbedingungen
CorelDraw 9.0 (Fa. Corel)	Erstellen von Abbildungen
CSI v1.1 [Wis94]	Berechnung von chemischen Verschiebungsindizes
Dyana [Gün97]	Strukturberechnung (Homologiestruktur)
GSview 4.0 (Ghostgum Software)	Umformatierung von Texten und Graphiken
GRASP [Nic91]	Darstellung des elektrostatischen Potentials auf Moleküloberflächen
Compute pI/Mw #	Bestimmung Molekülmasse/pI aus einer Aminosäuresequenz
Molmol 2.6 und 2K.1 [Kor96]	Darstellung, Bewertung von Proteinstrukturen
Office97 (Fa Microsoft)	Tabellenkalkulation, Textverarbeitung
Origin, Versionen 4.1 und 6.0 (Fa. Microcal)	Kurvenanpassungen, Darstellung von Meßdaten
Permol <sup>+</sup>	Erstellen von Restraint-Listen für die Berechnung einer Homologiestruktur
PROCHECK-NMR [Las96]	Bewertung von Proteinstrukturen
Relax [Gör97, Gör99a]	Modul in Auremol: Rückrechnung von Spektren
Rfac [Gro00]	Bewertung von Proteinstrukturen
Talos [Cor99]	Gewinnung von Einschränkungen der Hauptkettentorsionswinkel
XWINNMR (Fa. Bruker)	Aufnahme und Bearbeitung von NMR-Spektren

\* Ganslmeier, B., Gronwald, W., Kirchhöfer, R., Ried, A., Trenner, J., Nasser, A., Fischer, C., Neidig, K.-P. und Kalbitzer, H. R., unveröffentlicht

<sup>+</sup> Möglich, A., Weinfurter, D., Döker, R., Maurer, T., Kalbitzer, H. R., unveröffentlicht

# [www.expasy.ch/tools](http://www.expasy.ch/tools)



### 2.1.1.6 Proteinkonstrukte

Die verwendeten Proteine wurden am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund hergestellt, der ursprüngliche Klon dazu kam von T. Nishimoto (Kyushu-Universität, Fukuoka, Japan). Das Konstrukt umfaßt die Reste 1996-2154 von RanBP2, eingebettet in einen pGEX-2T-Vektor (Pharmacia). Die Expression und Reinigung ist in [Vil98] beschrieben. Das unmarkierte Protein hat eine Molekülmasse von 18739,8 kDa, einen theoretischen isoelektrischen Punkt von 5,01 und folgende Sequenz:

RanBP2<sup>RanBD2</sup>:

```
GSFEKDDDAY KTEDSDDIHF EPVVQMPEKV ELVTGEEDEK VLYSQRVKLF RFDAEVSQWK
ERGLGNLIL KNEVNGKLRM LMRREQVLKV CANHWITTTM NLKPLSGSDR AWWLASDFS
DGDAKLEQLA AKFKTPELAE EFKQKFEECQ RLLLDIPLQT P
```

Dabei stammt das führende Dipeptid Gly-Ser aus dem Vektor (Thrombinschnittstelle). Die fertigen Proben wurden in Phosphatpuffer (Puffer 1, 1b, s.u.) vermessen.

Das gekürzte Konstrukt wurde von Christine Nowak und Xiaodong Zhao (Arbeitsgruppe Jürgen Kuhlmann, Abteilung Prof. A. Wittinghofer) in einen pGEX-2T-Vektor kloniert und in *E. coli* BL21(DE3) [Stu86] exprimiert. Die Kultur wuchs bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 heran und wurde über Nacht bei 30 °C mit 0,2 mM Isopropyl-β-D-thiogalactosid (IPTG) inkubiert. Die Zellen wurden sedimentiert, in Kaliumphosphatpuffer (20 mM, pH = 7,4) aufgenommen und mit Ultraschall aufgeschlossen, das Lysat auf einer Glutathion-Sepharose-Säule (XK26, Pharmacia Biotech) gereinigt und mit Ammoniumsulfat (3 M) gefällt. Anschließend wurde das Fusionsprotein in 20 mM Tris/Cl bei pH = 7,6 mit 100 mM NaCl, 100 mM KCl, 1 mM ATP und 1 mM β-Mercaptoethanol gelöst. Während der folgenden 17-stündigen Inkubation bei 25 °C mit 20 U Thrombin pro Milligramm des Fusionsproteins wurde die GST-Domäne abgeschnitten, dann auf einer zweiten Glutathion-Sepharose-Säule aus der Lösung entfernt. Durch Ultrafiltration wurde das Protein (RanBP2<sup>RanBD2ΔN</sup>) schließlich in Puffer 2 oder Puffer 3 (s.u.) auf bis zu 30 mg/ml aufkonzentriert. Das Konstrukt umfaßt die Reste 2028-2154 von RanBP2; N-terminal wieder das Dipeptid Gly-Ser sowie einen zusätzlichen C-terminalen Lysinrest aus dem Vektor. Unmarkiert hat das Molekül eine Masse von 15,1 kDa, der theoretische isoelektrische Punkt liegt bei 8,6. Explizit lautet die Sequenz:

RanBP2<sup>RanBD2ΔN</sup>:

```
GSGEDEKVL YSQRVKLFRF DAEVSQWKER GLGNLILKN EVNGKLRMLM RREQVLKVCA
NHWITTTMNL KPLSGSDRAW MWLASDFS DGDAKLEQLAAK FKTPELAE EF EFKQKFEECQRL
LLDIPLQTPK
```

### 2.1.1.7 Massenspektrometrische Daten der verkürzten Domäne

Die Molekülmassen der aufgereinigten Domänen wurden mittels Elektrospray-Ionisation an einem Spektrometer vom Typ LCQ (Fa. Finnigan, Bremen) bestimmt. Bei den Messungen, die Frau Dr. P. Janning in Dortmund durchgeführt hat, wurden jeweils 2-12 µg des Proteins eingesetzt (persönliche Mitteilung, Xiaodong Zhao).

Markierung	gemessener Wert / Da
ohne	15115 ± 4
nur <sup>15</sup> N	15296 ± 4
<sup>13</sup> C und <sup>15</sup> N	15955 ± 4

Tabelle 2.1. Meßwerte zur Masse der verkürzten Bindedomäne RanBP2<sup>RanBD2AN</sup>.

Abbildung 2.1 zeigt links das eigentliche Massenspektrum einer mit <sup>13</sup>C und <sup>15</sup>N doppelt markierten Probe, rechts die Häufigkeitsverteilung der daraus berechneten Molekülmassen. Das stärkste Signal stammt vom gewünschten Protein. Dies gilt entsprechend auch für die Signale in den Massenspektren der unmarkierten oder mit <sup>15</sup>N angereicherten Proben.

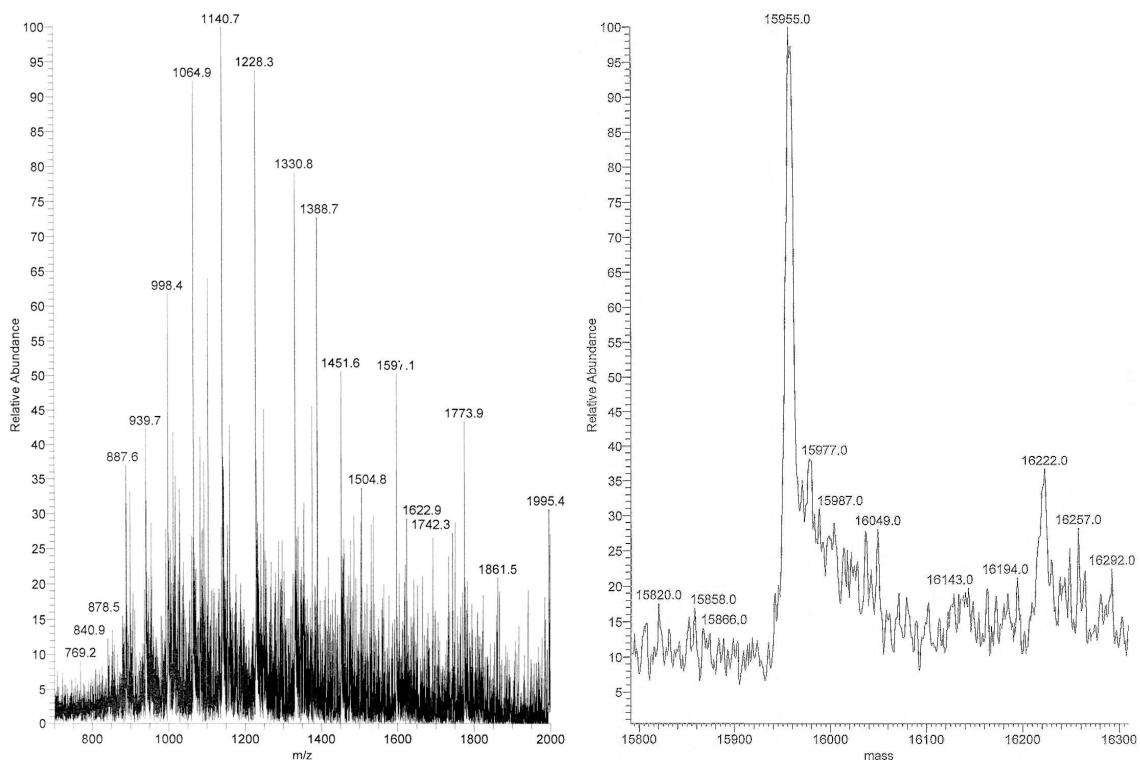


Abbildung 2.1. Massenspektrum des doppelt markierten Proteins. Links das Spektrum selbst, es zeigt die Häufigkeit von Ionen in Abhängigkeit ihres Masse-Ladungs-Verhältnisses m/z. Rechts die daraus bestimmte Häufigkeitsverteilung für die Ionenmassen.

## 2.1.2 Methoden

### 2.1.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese wurde die Methode von Laemmli [Lae70] verwendet.

Zusammensetzung des Sammelgels (Mengen für 3 Gele):

1,3 ml Acrylamid-Stammlösung, 30 %, 2,5 ml Sammelgelpuffer, 6,2 ml H<sub>2</sub>O, 100 µl Ammoniumpersulfatlösung, 10 %, 10 µl TEMED.

Sammelgelpuffer: 0,5 M Tris/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> bei pH = 6,8; 0,4 % SDS.

Zusammensetzung des Trenngels (Mengen für 3 Gele):

7,5 ml Acrylamid-Stammlösung, 30 %, 3,75 ml Trenngelpuffer, 3,7 ml H<sub>2</sub>O, 200 µl Ammoniumpersulfatlösung, 10 %, 10 µl TEMED.

Trenngelpuffer: 1,5 M Tris/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> bei pH = 8,8; 0,4 % SDS.

Ladepuffer (4fach konzentriert) [Sam89]:

20 mM Tris/HCl, pH = 6,8, 400 mM DTE, 8 % SDS, 0,4 % Bromphenolblau, 40 % Glycerin.

Laufpuffer (10fach konzentriert): 1,92 M Glycin, 0,25 M Tris/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> bei pH = 8,5, 2 % SDS.

Vor dem Auftragen wurde das Protein im Ladepuffer bei 95 °C (5 min) denaturiert, für den Lauf wurde eine konstante Stromstärke von 40 mA eingestellt. Anschließend wurden das Gel mit einer Lösung von 40 % Ethanol, 0,3 % Coomassie G-250 und 0,3 % Coomassie R-250 gefärbt, dann bis auf die Proteinbanden in 20 % Ethanol und 10 % Essigsäure entfärbt.

### 2.1.2.2 Konzentrieren von Proteinlösungen und Pufferwechsel

Proteinlösungen wurden mit Zentrifugationsfiltern bei 4000 g bis 1500 g konzentriert oder umgepuffert. Dazu wurde die Tischzentrifuge (Hettich) verwendet. Größere Volumina wurden zunächst mittels Druckdialyse über eine Zellulosemembran (YM3, Amicon) in der Rührzelle aufkonzentriert und dabei auf ein Volumen von 20-30 ml eingeengt. In beiden Fällen wurde bei einer Temperatur von 4 °C gearbeitet. In Einzelfällen wurden Proben bei Raumtemperatur auf einer Säule umgepuffert.

### 2.1.2.3 Puffer

Für alle Lösungen wurde gefiltertes Wasser (Millipore Milli-Q Reagent Water System) verwendet, Stammlösungen wurden sterilfiltriert.

Puffer 1:

8,5 mM  $KP_i$ , pH = 7,0, 4,3 mM DTE, 138 mM Glycin (deuteriert), 0,2 mM DSS, 4,3 mM  $NaN_3$ , 0,9 mM EDTA, 7 %  $D_2O$ .

Puffer 1b:

2,4 mM  $KP_i$ , pH = 7,0, 4,8 mM DTE, 43 mM Glycin (deuteriert), 0,05 mM DSS, 1,2 mM  $NaN_3$ , 0,25 mM EDTA, 5 %  $D_2O$ .

Puffer 2:

18,5 mM Tris/HCl, pH = 7,4, 5-10 mM DTE, 4,6 mM  $MgCl_2$ , 0,18 mM DSS, 4,4 mM  $NaN_3$ , 1,1 mM EDTA, 7,5 %  $D_2O$ .

Puffer 3:

9,2 mM  $KP_i$ , pH = 6,5, 138 mM  $Na_2SO_4$ , 9,2 mM DTE, 0,1 mM DSS, 1 mM  $NaN_3$ , 0,5 mM EDTA, 7,6 %  $D_2O$ .

Für Messungen in  $D_2O$  als Lösungsmittel wurden Proben gefriergetrocknet und mit  $D_2O$  zum ursprünglichen Volumen ergänzt.

### 2.1.2.4 Konzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in den Proben diente der Bradfordtest: Beim Zusetzen nicht zu großer Mengen eines Proteins ändert sich das Absorptionsvermögen einer sauren Lösung von Coomassie Blau (Brilliantblau G 250) für Licht von 595 nm Wellenlänge annähernd proportional mit der zugegebenen Masse. (Bei der Komplexierung mit Proteinen verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 465 nm nach 595 nm.) Unter der Annahme, daß der Effekt für alle Proteine auch quantitativ derselbe ist, läßt sich, im Vergleich mit bekannten Mengen von Rinderserumalbumin als Standardsubstanz, die Konzentration anderer Proteinlösungen abschätzen. Für eine entsprechende Extinktionsmessung wurden 2  $\mu$ l der zu testenden Lösung eingesetzt und mit 998  $\mu$ l der Farbstofflösung gemischt. Eine Fehlerabschätzung für

die erhaltenen Konzentrationen ist schwierig, die Abweichung der in Regensburg und der in Dortmund bestimmten Werte voneinander lag bei einem Faktor von 1,6 bis 2,5.

Eine alternative (und genauere) Methode wäre die Messung der Absorption bei 280 nm. Bei dieser Wellenlänge absorbieren von den Standardamino­säuren nur Tryptophan und Tyrosin, außerdem Disulfidbrücken; Beiträge von Phenylalanin sind vernachlässigbar gering [Ede67, Sch97]. Anhand der bekannten Primärstruktur läßt sich der Absorptionskoeffizient für das denaturierte Protein einfach berechnen. Der Hauptnachteil der Methode ist die einzusetzende Menge der Proteinlösung. Im Vergleich zum Bradfordtest wird etwa das 10fache benötigt. Das Verfahren erfordert die Denaturierung des Proteins bzw., wegen der kurzen benutzten Wellenlänge, gegebenenfalls Streulichtkorrekturen. Da die mögliche größere Meßgenauigkeit keine praktischen Konsequenzen für den Einsatz der Proben bei der NMR-Spektroskopie gehabt hätte, wurde meist der Bradfordtest bevorzugt. Konzentrationsänderungen während längerer Experimente lassen sich auch anhand flankierender 1D NMR-Messungen verfolgen.

#### **2.1.2.5 Lagerung**

Die Proben wurden zwischen nicht direkt aufeinanderfolgenden Messungen im Meßröhrchen bei 4 °C aufbewahrt. Für längere Meßpausen wurden die Proben in Eppendorfgeläße gefüllt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei –20 °C gelagert.

#### **2.1.2.6 Rückfaltung des Proteins**

Das Protein wurde zunächst vollständig denaturiert. Dazu wurden, bezogen auf das *ursprüngliche* Probenvolumen von 1 ml, 8 M Harnstoff und 6 M Guanidiniumchlorid eingesetzt. Beide Stoffe wurden trocken gemischt und in ein angekipptes Becherglas gegeben. Die Probe wurde hineingeträufelt, anschließend wurden 0,75 µl β-Mercaptoethanol (1M in Wasser) hinzupipettiert. Nach einer Stunde Lagerung bei Raumtemperatur wurden zu der den Boden des aufrecht gestellten Glases nicht vollständig bedeckenden Lösung 300 ml frischen Puffers (Puffer 2, 1,09fach konzentriert) gegossen. Auf diese Weise war eine schnelle Verdünnung von Harnstoff und Guanidinhydrochlorid gewährleistet. Schließlich wurde die Proteinlösung zunächst über die Zellulosemembran in einer Rührzelle (Amicon/Millipore), dann in der Zentrifuge, aufkonzentriert.

### 2.1.2.7 Proteinstrukturuntersuchung mittels mehrdimensionaler NMR-Spektroskopie

Ziel ist es, die Tertiärstruktur eines Proteins zu erhalten, also die Abstände der Atome im Molekül untereinander zu bestimmen und zusammenzufassen. Der Weg dahin läßt sich, wenn die benötigten Proteinproben geeignet vorliegen, grob in drei Schritte unterteilen: Im ersten werden NMR-Spektren aufgenommen und die darin enthaltenen Signale den jeweils verursachenden Atomkernen zugeordnet, idealerweise also die Resonanzfrequenzen aller Kerne bestimmt. Im zweiten Schritt werden, soweit nicht schon geschehen, sogenannte Kreuzsignale, die durch die physikalische Kopplung der Spins mehrerer Kerne hervorgerufen sind, ebenfalls den beteiligten Kernen zugeordnet. Aus Frequenzdifferenzen solcher Signale, ihren chemischen Verschiebungen (bzw. Resonanzfrequenzen) und vor allem ihrer Stärke werden strukturelevante Daten, meist Atomabstände und Torsionswinkel, berechnet bzw. abgeschätzt. Diese gehen im dritten Schritt in die Berechnung der Tertiärstruktur des Proteins ein.

#### 2.1.2.7.1 NOESY als Experiment zur Abstandsmessung

Die Dipol-Dipol-Wechselwirkung stellt den für Protonen wichtigsten Relaxationsmechanismus dar. Der dadurch verursachte Magnetisierungstransfer zwischen verschiedenen Kernen führt im 2D NOESY-Experiment [Neu89, Jee79] zu Kreuzsignalen für jedes Spinpaar im Kernensemble. Meßbare Signale treten in der Praxis meist nur bis zu Kernabständen  $r$  von ca. 0,5 nm auf, weil ihre Stärke, wegen der Abstandsabhängigkeit der Dipol-Dipol-Wechselwirkung, der 6. Potenz von  $r$  umgekehrt proportional ist. Diese Abhängigkeit gilt grundsätzlich nur bei kurzen Mischzeiten<sup>7</sup>  $\tau_M$  und, beispielsweise weil  $r$  zeitlich nicht konstant ist, nur näherungsweise. In der Regel ist aber eine für die anschließende Strukturrechnung genügend genaue Abschätzung der Kernabstände möglich.

Die zu beobachtenden NOESY-Kontakte (kurz auch „NOEs“) lassen sich danach unterteilen, ob die miteinander wechselwirkenden Protonen zum selben Rest, zu sequentiell (direkt) benachbarten oder zu sequentiell weit auseinanderliegenden Aminosäureresten gehören. Signale der letztgenannten Gruppe, Fern-NOEs, sind für die globale Festlegung der Proteinstruktur besonders wichtig.

---

<sup>7</sup> Typische Werte liegen etwa um  $\tau_M = 100$  ms.

### 2.1.2.7.2 Sequenzspezifische Zuordnung

Die Einbettung einer Aminosäure in ein bestimmtes Sekundärstrukturelement (Faltblatt, Helix) geht oft mit typischen sequentiellen NOEs einher. Diese erlauben es in Verbindung mit Signalen aus TOCSY-Spektren [Bra83] auch, die beobachteten Spinsysteme gegebenenfalls als in der Peptidkette direkt benachbart zu erkennen und ihre sequentielle Abfolge zu bestimmen. Das Aneinanderreihen der Spinsysteme in (zunächst kurzen) Ketten heißt sequentielle Zuordnung. Das Festlegen der genauen Position einer solchen Kette oder eines einzelnen Spinsystems in der Primärstruktur wird als sequenzspezifische Zuordnung bezeichnet. Sie ist die Voraussetzung für eine möglichst vollständige Zuordnung aller in den Spektren vorhandenen Protonensignale. Bei größeren Proteinen mit Molekülmassen über 10-15 kDA werden für die sequenzspezifische Zuordnung vorwiegend 3D Spektren verwendet. Besonders nützlich sind in dieser Hinsicht Tripelresonanzexperimente, welche die chemischen Verschiebungen einer Amidgruppe mit der eines weiteren Kerns im selben Rest und der seines sequentiellen

Pendants verknüpfen. Sie beruhen wie das TOCSY-Experiment auf der durch chemische Bindungen vermittelten skalaren J-Kopplung. Wegen der Übereinstimmung mindestens einer der korrelierten Resonanzfrequenzen bei benachbarten Amidgruppen erlauben diese Experimente im Prinzip die direkte sequentielle Zuordnung der ganzen Peptidkette. Abbildung 2.2 verdeutlicht die Vorgehensweise am Beispiel des HNCA-Experiments. Aufgrund seiner Empfindlichkeit und der Korrelation von intraresidualen  $C^\alpha$ -Atomen mit sequentiellen

$C^\alpha$ -Atomen ist es das wichtigste der Tripelresonanzexperimente. Pro Aminosäurerest zeigt es ein Doppelsignal. Welcher der beiden Kontakte sequentiell ist, kann mit Hilfe eines zweiten Spektrums festgestellt werden; im Fall des HNCA durch das HN(CO)CA. Die Signalkette ist allerdings bei Prolinresten unterbrochen, und auch eine gleiche chemische Verschiebung mehrerer  $C^\alpha$ -Kerne (Entartung) kann die Zuordnung erschweren. Dann ist zusätzliche Information, beispielsweise über die  $C^\beta$ -Frequenzen sehr nützlich. Für einige der 20

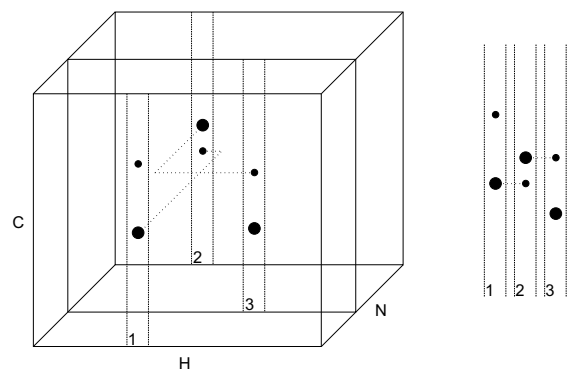


Abbildung 2.2. Darstellung der sequentiellen Zuordnung aufeinander folgender Amidgruppen anhand des HNCA. Eine Projektion der Signale auf die Bodenfläche des Quaders sähe aus wie das zugehörige  $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum ohne Seitenketten-signale. Die aus den einzelnen Ebenen ausgeschnittenen Streifen rechts zeigen deutlicher die Verkettung über gleiche Kohlenstofffrequenzen.

Standardamino­säuren ist die Kombination der Resonanzfrequenzen von  $C^\alpha$  und  $C^\beta$  charakteristisch und deshalb bei der sequenzspezifischen Zuordnung sehr hilfreich.

### 2.1.2.8 Die verwendeten experimentellen Techniken

Im folgenden werden die benutzten Experimente kurz aufgeführt. Ausführliche Darstellungen der Methoden bietet die Literatur [Abr61, Der87, Gol88, Neu89, Hau91, Ven95, Cav96]. Alle Messungen ohne explizite Temperaturangabe wurden bei  $(298 \pm 3)$  K durchgeführt.

Hochaufgelöste zweidimensionale TOCSY- [Bra83] und NOESY-Spektren [Jee79] wurden am 800-MHz-Spektrometer aufgenommen. Zur Vermeidung des anderen Signals überdecken­den Wassersignals wurden jeweils zusätzlich auch Proben mit  $D_2O$  statt  $H_2O$  als Lösungsmittel vermessen. Die Spektren dienen zum einen der Signalzuordnung, zum anderen im Fall des NOESY-Spektrums auch der Bestimmung räumlicher Abstände von Wasserstoffkernen. TOCSY-Experimente zur Beurteilung des Zustands der Proben und zur Optimierung der Lösungsbedingungen wurden auch am 600-MHz-Spektrometer durchgeführt. Denselben Zweck hatten  $^{15}N$ -HSQC-Spektren, die regelmäßig neben den für die Zuordnung benötigten dreidimensionalen Spektren aufgenommen wurden. Zu diesen gehören  $^{15}N$ -NOESY-HSQC,  $^{15}N$ -TOCSY-HSQC und HCCH-TOCSY. Letzteres dient der sicheren Zuordnung von Seitenkettensignalen, das NOESY-HSQC liefert außerdem Abstandsinformation. Die zur Zuordnung der Resonanzen von  $RanBP2^{RanBD2\Delta N}$  verwendeten Tripelresonanzexperimente (beobachtete Kerne:  $^1H$ ,  $^{13}C$  und  $^{15}N$ ) sind in Abbildung 2.3 mit einem Schema der jeweiligen Pfade des Magnetisierungstransfers aufgeführt. Dabei ist die Nomenklatur wie folgt: Alle für den Transfer benutzte Kerne werden nacheinander aufgelistet und dabei, sofern die Resonanzfrequenzen nicht gemessen werden, in Klammern gesetzt. Beim HNCO wird die Magnetisierung beispielsweise vom Amidproton über den Amidstickstoff eines Aminosäurerests auf den Carbonylkohlenstoff des vorhergehenden Rests übertragen, dann in umgekehrter Reihenfolge über dieselben Atome zurück; alle Frequenzen werden auch gemessen.



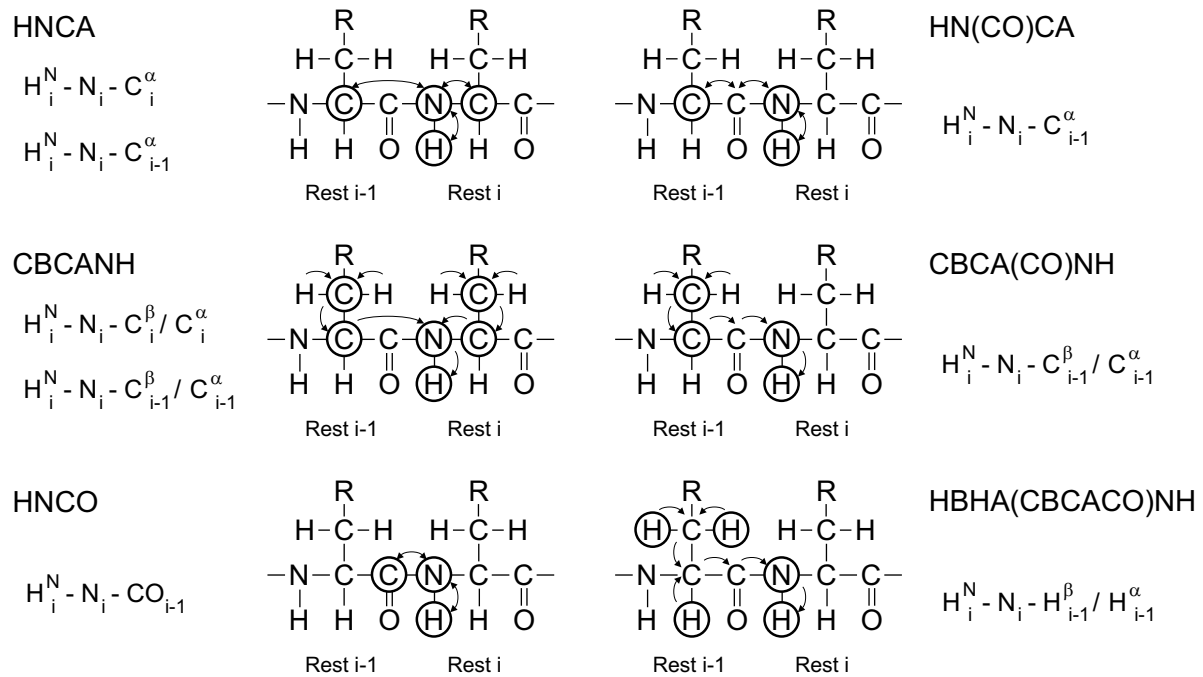


Abbildung 2.3. Liste aller durchgeführten Tripelresonanzexperimente. Es sind jeweils der Name des Experiments angegeben und die Kerne, deren Resonanzfrequenzen im zugehörigen Spektrum korreliert sind. Dabei bezeichnen  $i$  und  $i-1$  die Positionen der Aminosäurereste in der Primärstruktur. Pfeile kennzeichnen jeweils Weg und Richtung des Magnetisierungstransfers. Kerne, deren Resonanzfrequenzen gemessen werden, sind von einem Kreis umschlossen. Nur Magnetisierung, die auf dem Amidproton des  $i$ -ten Rests detektiert wird, ist berücksichtigt. (Verzweigungen des Transferwegs setzen ähnliche Kopplungskonstanten entlang beider Zweige voraus.)

### 2.1.2.9 Prozessierung und Referenzierung der Spektren von RanBP2<sup>RanBD2ΔN</sup>

Alle Spektren wurden mit dem Programm XWINNMR (Fa. Bruker) in der jeweils aktuellen Fassung prozessiert. Meist wurde für alle Dimensionen die Interpolationstechnik des „Zero-filling“ angewandt. In der Regel wurden die FIDs vor der Fouriertransformation zur Apodisation mit einem quadrierten Cosinus als Fensterfunktion multipliziert. Der Cosinus wurde bei der Messung von Austauschraten oder von Linienbreiten in HSQC-Spektren durch eine Exponentialfunktion ersetzt. Bei NOESY-HSQC, TOCSY-HSQC und HCCH-TOCSY wurde in den indirekten Dimensionen die Methode der „linear prediction“ verwendet. Für alle ausgewerteten Spektren sind die experimentellen und die Prozessierungsparameter im Anhang aufgeführt.

Protonensignale wurden auf den internen Frequenzstandard DSS (2,2-Dimethyl-2-silapentanon-5-sulfonsäure) direkt referenziert, Signale von  $^{15}\text{N}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Kernen indirekt [Mar98]. Dazu wurden Frequenzverhältnisse von 1, 0,25144930 und 0,101329118 für  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  bzw.  $^{15}\text{N}$  angenommen.

### 2.1.2.10 Sequenzspezifische Zuordnung von RanBP2<sup>RanBD2ΔN</sup>

Für die sequenzspezifische Zuordnung wurden parallel alle zur Verfügung stehenden Informationen genutzt: Das TOCSY-<sup>15</sup>N-HSQC in Kombination mit den sequentiellen Kontakten im NOESY-<sup>15</sup>N-HSQC ebenso wie alle oben aufgeführten Tripelresonanzspektren, darin gemessene charakteristische chemische Verschiebungen und die auffällig starken Signale der terminalen Aminosäuren. Nach der Veröffentlichung der Kristallstruktur von RanBP2<sup>RanBD1</sup> im Komplex mit RanGppNHp [Vet99a] wurden auch die dort gefundenen Sekundärstrukturelemente als Hinweise vorsichtig in die Zuordnung einbezogen. Das HBHA(CBCACO)NH diente zum Absichern der Resultate für C<sup>α</sup>-Atome bzw. dazu, die Resonanzfrequenzen auch der H<sup>β</sup>-Kerne und einiger H<sup>α</sup>-Kerne zu erhalten. Das HNCO lieferte entsprechend die chemischen Verschiebungen der meisten Carbonylkohlenstoffkerne im Rückgrat.

### 2.1.2.11 Homologiestrukturberechnung

Für die Berechnung der Homologiestruktur von RanBP2<sup>RanBD2ΔN</sup> zur Kristallstruktur der komplexierten Domäne RanBP2<sup>RanBD1</sup> wurde das Programm Permol benutzt. Nach einem Sequenzalignment (ClustalX [Tho97]) wurden für die in beiden Sequenzen identischen Aminosäurereste die Abstände der Amidstickstoffkerne berechnet. Permol bestimmt auch die Torsionswinkel  $\phi$  und  $\psi$  aller Reste sowie die Abstände wahrscheinlich an Wasserstoffbrücken beteiligter Atome. Diese Restraints<sup>8</sup> werden dann in zur Verwendung mit dem Moleküldynamik-Programm Dyana 1.3 [Gün97] geeignete Listen geschrieben. Dabei wurden in diesem Fall Abweichungen von den berechneten Werten um 10 % in jede Richtung erlaubt, ansonsten die Standardeinstellungen von Permol verwendet. Die Homologiestruktur wurde mit Dyana berechnet. Für die  $\alpha$ -Kohlenstoffe einerseits der Reste E7 bis E116 in dieser Struktur, andererseits der Reste E37-E146<sup>9</sup> in der Kristallstruktur, ergab sich ein RMSD<sup>10</sup> von 0,91 Å.

### 2.1.2.12 Rückrechnung von NOESY-Spektren

Die von der Homologiestruktur her zu erwartenden NOESY-Spektren wurden mit dem Programmmodul Relax aus Auremol\_SGI\_v0.6 [Gör97] berechnet („rückgerechnet“). Dabei wurden folgende Parameter verwendet: keine Berechnung von Signalen für Kernabstände über

<sup>8</sup> vgl. „Strukturrechnung“

<sup>9</sup> Eintrag “1RRP”, Molekül B in der Protein Data Bank,

<sup>10</sup> s. „Qualitätskriterien“.

0,5 nm, 25 Hz Linienverbreiterung in allen Dimensionen, Linienform: Gauß, simulierte Mischzeit von 100 ms bei einem Feld von 600,13 MHz. Das simulierte 3D Spektrum enthält 1024 mal 256 mal 128 Datenpunkte, bei der Rechnung wurden Heterokerne berücksichtigt. Das 2D Spektrum besteht aus 512 mal 1024 Punkten.

### 2.1.2.13 Erstellung von NOE-Restraint-Listen

Im NOESY-<sup>15</sup>N-HSQC-Spektrum und im 2D NOESY-Spektrum (Probe in D<sub>2</sub>O) wurde je ein Signal gewählt, das von zwei Protonen mit bekanntem Abstand herrührt. Im Vergleich zu diesem läßt sich allen Signalvolumina des Spektrums der jeweilige Abstand der beteiligten Kerne zuordnen. Voraussetzung ist dabei die Annahme annähernd derselben Abstandsabhängigkeit des Volumens für *alle* beobachteten Signale. Mit dem Programm Auremol konnten viele Volumina bestimmt, unter Angabe des Eichsignals automatisch in Abstandswerte umgewandelt und als Liste für die Strukturrechnung mit CNS herausgeschrieben werden. Für die Volumina wurde dazu eine umgekehrte Proportionalität zur sechsten Potenz des Kernabstands angenommen. Zur Kalibrierung wurde im 2D Spektrum das Signal H<sup>β</sup><sub>1</sub>(117)/H<sup>β</sup><sub>2</sub>(117) bei 2,98 ppm ( $\omega_1$ ) und 2,51 ppm ( $\omega_2$ ), mit einem Kernabstand von 0,175 nm, verwendet; außerdem im 3D Spektrum das Kreuzsignal der Protonen einer Aminogruppe bei 6,92 ppm ( $\omega_1$ ), 110,3 ppm ( $\omega_2$ ) und 6,57 ppm ( $\omega_3$ )<sup>11</sup>. Um durch chemischem Austausch verursachte Fehler zu vermeiden, wurde ein relativ intensives Aminogruppensignal gewählt; der angenommene Kernabstand ist 1,74 nm. Einander überlagernde Signale sind nicht automatisch integrierbar. Der zugehörige Abstand wurde in diesem Fall anhand ähnlich starker Signale geschätzt und von Hand in eine eigene Restraint-Liste eingetragen. Die gewählten Toleranzen sind gegeben durch Mindestwerte von 0,18 nm einerseits und maximale Abweichungen vom Sollwert um 30 % andererseits.

### 2.1.2.14 Berechnung der Tertiärstruktur

Zur Strukturberechnung wurde das Programm CNS 1.0 [Bru98] verwendet, das auf dem Verfahren des „simulated annealing“ [Kir83] beruht. Dabei werden alle bekannten strukturellen Eigenschaften des Proteins durch Potentiale beschrieben, die bei Erfüllung der geforderten Randbedingungen verschwinden, sonst aber zu entsprechenden rücktreibenden Kräften auf die

---

<sup>11</sup> Für  $\omega_2$  und  $\omega_3$  sind die genaueren Werte aus dem <sup>15</sup>N-HSQC-Spektrum angegeben, die sich von denen im korrekt referenzierten NOESY-<sup>15</sup>N-HSQC-Spektrum etwas unterscheiden.

betroffenen Atome führen:

$$\vec{F}_i = -\nabla E_{pot,i}. \quad (2.1)$$

Die gesamte potentielle Energie enthält als empirische Potentiale bezeichnete Terme zur Beschreibung der Bindungslängen und -winkel, sowie von van-der-Waals- und elektrostatischen Wechselwirkungen. Über Diederwinkel werden die Planarität aromatischer Kohlenstoffringe und günstige Torsionswinkel beschrieben:

$$E_{empirisch} = E_{Bindg} + E_{Winkel} + E_{vdW} + E_{elektr} + E_{Dieder}. \quad (2.2)$$

Die genannten Beiträge sind allein durch die Primärstruktur festgelegt. Zusätzlich gehen die experimentellen Daten ein: Abstände aus NOESY-Spektren und für Wasserstoffbrücken sowie auf Grund der chemischen Verschiebungen abgeschätzte Torsionswinkel. Sie können durch mit J-Kopplungsexperimenten gemessene dihedrale Winkel [Aue76, Kar59] ergänzt werden. Auch Restdipolkopplungen in anisotropen Lösungen können berücksichtigt werden. Insgesamt gilt

$$E_{NMR} = E_{Abstand} + E_{Torsion} (+ E_{Orientierung}). \quad (2.3)$$

Die angenommenen Potentiale sind i.a. harmonisch. Ausnahmen sind die Lennard-Jones-Potentiale der van-der-Waals-Wechselwirkungen, Coulombpotentiale für die elektrostatischen Wechselwirkungen und die Potentiale für NMR-Daten. Der experimentellen Ungenauigkeit wird durch trogförmige Potentiale Rechnung getragen, die für innerhalb der Fehlergrenzen des Sollwerts bleibende Abweichungen verschwinden. Außerhalb dieses Bereichs sind sie zunächst harmonisch, im Fall der Abstandseinschränkungen aber bei großen Abweichungen von den Sollwerten nur noch linear abstandsabhängig.

Von einer gestreckten oder kurz energieminierten Startstruktur ausgehend, werden die Newton'schen Bewegungsgleichungen

$$\vec{F}_i = m_i \frac{d^2 \vec{r}_i(t)}{dt^2} = -\vec{\nabla} E_{pot,i}, \text{ mit } E_{pot,i} = E_{empirisch,i} + E_{NMR,i}, \quad (2.4)$$

für jedes Atom  $i$  und rund alle  $10^{-14}$  s ausgewertet, das heißt, Position und Geschwindigkeit werden unter Berücksichtigung der Potentiale aktualisiert. Zu Anfang wird dem System eine Temperatur von mehreren tausend Kelvin gegeben. Der Maxwell-Verteilung entsprechend haben die Atome dann hohe mittlere Geschwindigkeiten. Mit der zugehörigen kinetischen Energie kann das Molekül die Barrieren zwischen lokalen Minima der potentiellen Energie überwinden, so daß ihm einige Pikosekunden lang der gesamte Konformationsraum zur Verfü-

gung steht. Im Anschluß an diese Hochtemperaturphase wird die Temperatur langsam gesenkt, zusätzlich werden die experimentellen Potentiale immer stärker gewichtet. Nach jedem Kühlschritt kann sich das System in dem dann noch zur Verfügung stehenden Teil des Konformationsraums unter dem Einfluß der Potentiale entwickeln [Hol98]. Am Ende erhält man eine Struktur niedriger Energie. Der ganze Prozeß wird vielfach mit jeweils veränderten Startbedingungen – etwa zufällig gewählten Anfangsgeschwindigkeiten – wiederholt. Aus hundert oder mehr so erhaltenen Strukturen werden letztlich die zehn bis fünfzig besten behalten. Diese „Familie von Strukturen“ ist das Ergebnis der Rechnung.

Damit die Strukturen dem globalen Energieminimum möglichst nahekommen und einander entsprechend ähnlich sind, das Verfahren also konvergiert, werden ausreichend viele strukturschränkende Abstands- bzw. Winkeldaten benötigt. Ihre Anzahl, es sind 15-18 solcher „Restrains“ pro Aminosäurerest erwünscht, ist dabei wichtiger als die Präzision der Werte. Ganz falsche, auf Grund unsicherer NOE-Zuordnungen eingeführte Restraints führen meist zu Widersprüchen mit anderen Randbedingungen. Diese äußern sich dann in entsprechend hohen Energiebeiträgen durch das zugehörige Potential. Das Programm CNS protokolliert diese Beiträge, mit deren Kenntnis die Abstandsdaten iterativ optimiert werden können.

Bei der Strukturaufklärung von RanBP2<sup>RanBD2ΔN</sup> wurden sie für  $E_{Abstand}$  mit dem Programm „CNSSTAT“ [Ste01] aus der CNS-Protokolldatei extrahiert.

Für die Strukturberechnung wurden folgende Parameter verwendet (Tabelle 2.2):

Phase	hohe Temperatur	Abkühlen 1	Abkühlen 2	Energie-minimierung
Methode	Torsionswinkel-dynamik	Torsionswinkel-dynamik	kartesische Dynamik	Powell
Schrittzahl	1000	1000	3000	200
Schrittweite / fs	15	15	5	--
Anfangstemperatur / K	50000	50000	3000	--
Schrittweite / K	--	250	25	--
Kraftkonstante ( $E_{NOE}$ ) / $\text{kJ mol}^{-1} \text{nm}^{-2}$	6,30	6,30	6,30	3,15
Kraftkonstante ( $E_{Winkel}$ ) / $\text{kJ mol}^{-1} \text{rad}^{-2}$	420	840	840	1680

Tabelle 2.2. Zusammenfassung wichtiger Parameter der Strukturberechnung mit CNS.

Während der Hochtemperatur- und der ersten Abkühlungsphase waren nur die Torsionswinkel freigegeben, die anderen Strukturparameter, wie Bindungslängen und -winkel, blieben fixiert. Ansonsten wurden Standardeinstellungen benutzt. Das bedeutet insbesondere: Bis zur ersten Abkühlphase einschließlich blieben elektrostatische Wechselwirkungen unberücksichtigt, ebenso van-der-Waals-Wechselwirkungen mit, bzw. zwischen, Wasserstoffatomen. Für andere

Atome wurde ein vereinfachtes, rein abstoßendes Potential verwendet, wirksam nur bei Abständen bis zu 0,3 nm. Während der zweiten Abkühlphase wurden alle Bewegungen zugelassen und das vereinfachte abstoßende durch ein Lennard-Jones-Potential mit einer Reichweite von 1,05 nm ersetzt. Erst bei der abschließenden Energieminimierung wurden elektrostatische Wechselwirkungen überhaupt und van-der-Waals-Kräfte auch für Wasserstoffatome berücksichtigt. Um die Energieerhaltung sicherzustellen, sind generell alle Potentiale stetig und differenzierbar. Das gilt insbesondere für abstandsabhängig ein- bzw. ausgeschaltete Wechselwirkungen sowie den Wechsel zur konstanten Rückstellkraft für stärkere Abweichungen<sup>12</sup> vom Sollwert bei NOE-Abständen.

### 2.1.2.15 Qualitätskriterien

Zur Qualitätsbeurteilung der schließlich erhaltenen Strukturfamilie standen die Programme Molmol [Kor96], ProcheckNMR [Las96] und Rfac [Gro00] zur Verfügung. Mit Molmol läßt sich über den RMSD-Wert der Strukturen die Konvergenz der Rechnung beschreiben.

Der RMSD-Wert zweier Strukturen  $A$  und  $B$  ist über die Positionen von je  $N$  Atomen definiert:

$$RMSD(A, B) = \frac{1}{N} \sqrt{\sum_{i=1}^N |\vec{a}_i - \vec{b}_i|^2}, \quad (2.5)$$

Dabei sind hier die Ortsvektoren  $\vec{a}_i$ ,  $\vec{b}_i$  der  $i$ -ten Atome aus  $A$  bzw.  $B$  in kartesischen Koordinaten beschrieben, und umfaßt  $N$  nicht notwendigerweise alle Atome der beiden Moleküle. Bei optimalem Übereinanderlegen der Strukturen erhält man als Maß für ihre Unterschiedlichkeit den Minimalwert des RMSD, der allgemein ebenfalls kurz als RMSD bezeichnet wird. Im Fall mehrerer Strukturen wird jede einzeln mit der gemittelten Struktur verglichen und dann der Mittelwert der erhaltenen RMSD-Werte berechnet.

ProcheckNMR erlaubt eine Abschätzung der Auflösung von NMR-Strukturen und gibt mit Ramachandran-Diagrammen einen Überblick über die Hauptketten-Torsionswinkel  $\phi_i$  und  $\psi_i$ . Rfac schließlich liefert ein Maß für die Übereinstimmung des experimentellen 2D NOESY-Spektrums mit einem von der gefundenen Struktur her zu erwartenden Spektrum. Letzteres läßt sich mit dem Program Relax [Gör97] bzw. Auremol berechnen.

<sup>12</sup> Überschreitung des oberen Toleranzwerts um 0,05 nm

## 2.2 Ergebnisse

### 2.2.1 Startbedingungen

Wie in der Einleitung erläutert, war das Hauptziel dieser Arbeit, die Struktur einer der vier Ran bindenden Domänen aus RanBP2 aufzuklären. Auf Grund der großen sequentiellen Ähnlichkeit der Domänen mit einer mittleren paarweisen Identität von 49 % konnte für alle vier eine im wesentlichen gleiche Struktur erwartet werden. Dabei zeigten die der Aminosäuresequenz nach ersten beiden Domänen anscheinend eine etwas höhere Bindungsaffinität für RanGTP als die letzten beiden [Yok95]. Die Kristallstruktur der ersten Ranbindedomäne von RanBP2 [Vet99a] war noch nicht bekannt, ebensowenig die Koaktivatorfunktion der Domänen für RanGAP1. Nach praktischen Gesichtspunkten, nämlich anhand der erzielten Ausbeute bei der Expression und Reinigung des jeweiligen Proteinkonstrukts [Vil98] einerseits und vorbereitender spektroskopischer Untersuchungen von Dr. Werner Kremer andererseits, war im Vorfeld die zweite Domäne zur weiteren Untersuchung ausgewählt worden. Das Konstrukt umfaßt die Aminosäurereste 1996-2154 von RanBP2 mit dem zusätzlichen N-terminalen Dipeptid Gly-Ser. Die zugehörigen eindimensionalen und die TOCSY-Spektren zeigten im Vergleich der Domänen untereinander die meisten und stärksten Signale, RanBD1 neigte stärker zur Aggregation als RanBD2. Allerdings mußten auch die Proben der zweiten Bindedomäne mit 140 mM deuteriertem Glycin stabilisiert werden (persönl. Mitteilung, Werner Kremer). Die damit verbundene höhere Viskosität der Lösung führt zu entsprechend größeren Linienbreiten und einem geringeren Signal-zu-Rausch-Verhältnis (vgl. Kap. 3). Zu Anfang der Arbeit waren die Pufferbedingungen der Proben zunächst festgelegt, es lagen schon sowohl homonukleare 2D-Spektren (NOESY, TOCSY), als auch 3D-Spektren einer mit  $^{15}\text{N}$  markierten Probe (HSQC, NOESY-HSQC, TOCSY-HMQC) vor. Außerdem stand eine noch nicht vermessene mit  $^{13}\text{C}$  und  $^{15}\text{N}$  doppelt markierte Probe zur Verfügung. Begonnen wurde mit der Aufnahme eines HNCA(-Spektrums) am 800-MHz-Spektrometer in Frankfurt.

### 2.2.2 Zur Qualität der ersten Datensätze

Die sequentielle Zuordnung der Signale in diesem Spektrum scheiterte, auch bei Kombination mit den Resonanzen aus dem HN(CO)CA-Experiment sowie den oben genannten  $^{15}\text{N}$ -editierten 3D Spekten gelang sie nicht. Hauptgründe sind geringe Signal-zu-Rausch-Verhältnisse

und, trotz der 3D Techniken, das Überlappen von Signalen, die zu dicht beieinander liegen, um sich voneinander unterscheiden zu lassen.

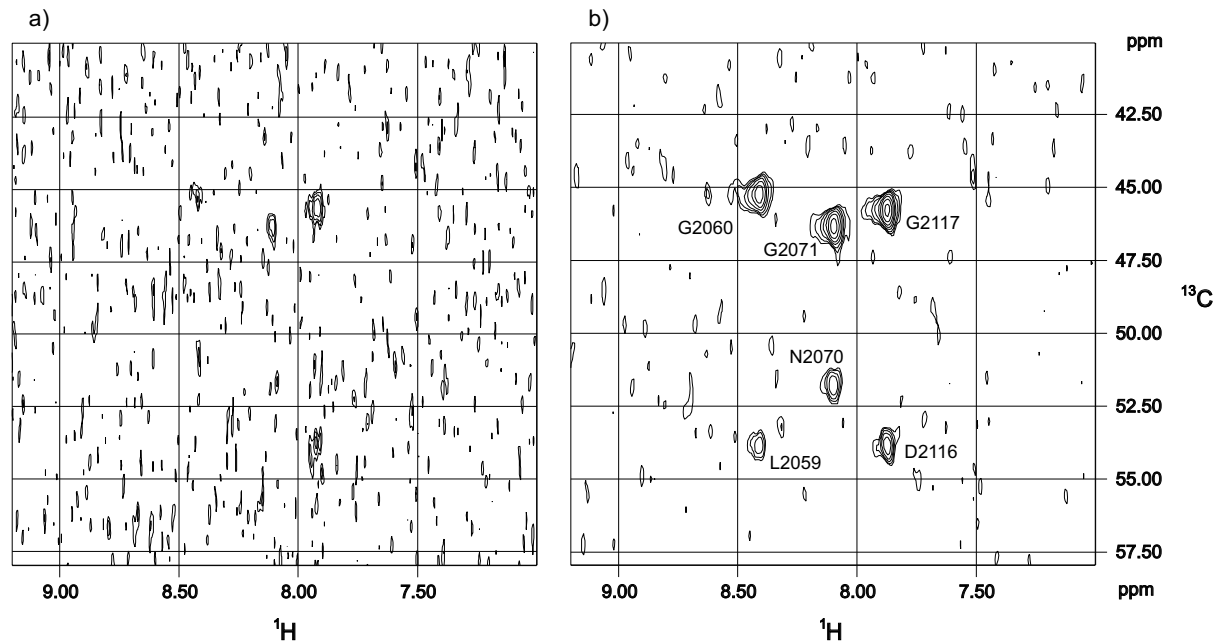


Abbildung 2.4. Vergleich einer Ebene aus dem HNCA-Spektrum der vollständigen Ranbindedomäne in Puffer 1 (a) mit der entsprechenden Ebene des Spektrums der verkürzten, in Puffer 3 gelösten, Domäne (b).

Geringe Signal-zu-Rausch-Verhältnisse führen zum Fehlen vieler eigentlich erwarteter Signale, von schwachen Resonanzlinien läßt sich die Frequenz nur relativ ungenau bestimmen. Die Ursachen schlechter Signal-zu-Rausch-Verhältnisse können eine bei instabiler Probe reduzierte Proteinkonzentration in der Lösung oder aber relaxationsbedingt große Linienbreiten sein. Letztere können einen ausreichenden, kontrollierten Magnetisierungstransfer zwischen den Kernen unterbinden. Abbildung 2.4 a) zeigt eine Ebene aus dem oben genannten HNCA. Die Signale stammen von drei Glycinresten. In Abbildung 2.4 b) ist zum Vergleich die entsprechende Ebene aus dem HNCA der N-terminal um 31 Reste verkürzten Domäne in Puffer 3 (s. „Material und Methoden“) dargestellt. In diesem Fall haben die Kohlenstoffkerne unter beiden Bedingungen praktisch dieselben chemischen Verschiebungen. Die deutlich bessere Qualität des zweiten Spektrums ist klar zu erkennen; auch die in Bild 2.4 a) fehlenden Resonanzen der Glycinvorgänger Leu2059, Asn2070 und Asp2116 sind vorhanden. Das neuere Spektrum war essentiell für die sequenzspezifische Zuordnung (s. „Material und Methoden“).



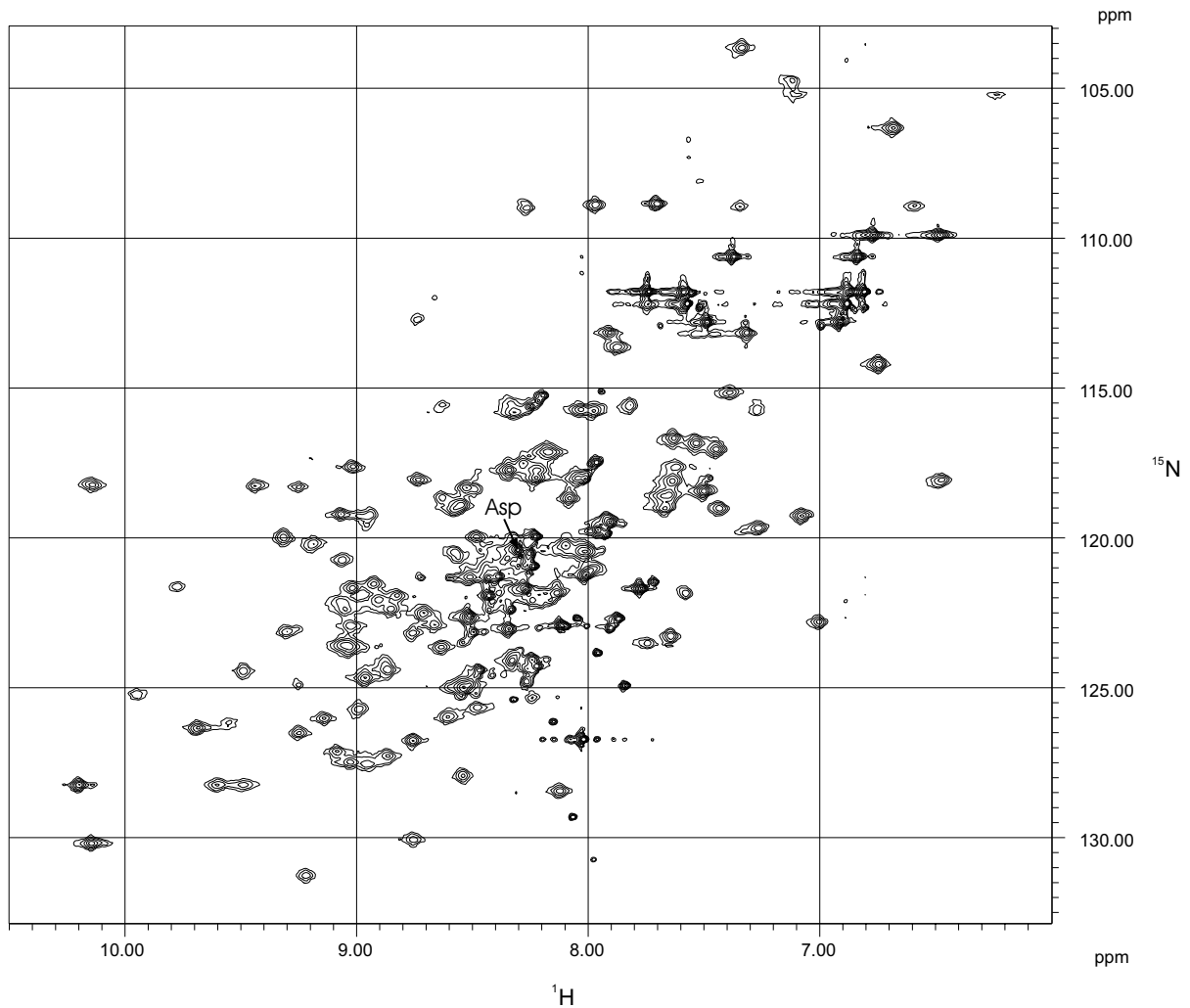


Abbildung 2.5. Das HSQC-Spektrum weist besonders um 8,2 ppm/122 ppm einander stark überlagernde Signale auf. Ihre Häufung in dieser Region deutet auf ungeordnete Bereiche in der Peptidkette hin. An der mit „ASP“ markierten Stelle liegen die Signale mindestens dreier Aspartatreste übereinander. (Messung in Puffer 1)

Das Problem überlagerter Signale ist am HSQC in Abbildung 2.5 zu erkennen. Besonders in der mit der Kennzeichnung „Asp“ und einem Pfeil markierten Region liegen mehrere Signale direkt übereinander, mindestens die der Reste Asp2009-Asp2011. Dies weist hier auf einen ungeordneten N-Terminus hin, für den damit eine Häufung der chemischen Verschiebungswerte im Bereich der entsprechenden „random-coil“-Werte zu erwarten ist. Random-coil bezeichnet für in Peptidketten eingebundene Aminosäurereste den Zustand freier, nicht durch die Wechselwirkung mit anderen Resten gehinderter Beweglichkeit in ihrem Konformationsraum. Die zugehörigen chemischen Verschiebungen werden an definierten Modellpeptiden gemessen [Bun79, Wis95] oder durch statistische Durchschnittswerte für möglichst viele und verschiedene bekannte Strukturen abgeschätzt [Gro88].

### 2.2.3 Variation der Lösungsbedingungen

Auf Grund der erwähnten Probleme wurde versucht, die Meßbedingungen zu verbessern. Dazu konnten zunächst Temperatur und pH-Wert geändert oder auch weitere Pufferzusätze verwendet werden. Die Glycinkonzentration war schon optimiert, die des Proteins ließ sich nicht stark variieren: Nach oben ist die benötigte Menge des markierten Materials begrenzend. Bei instabilen, aggregierenden Proben, wie sie hier vorlagen, ließe sich wohl auch keine weiter erhöhte Menge dauerhaft in Lösung bringen. Wegen der grundsätzlich geringen Empfindlichkeit der NMR-Spektroskopie sollte die Konzentration bei den notwendigen 3D Experimenten andererseits wenigstens ca. 1 mM sein.

Um die variierbaren Parameter zu testen, wurden HSQCs bei deutlich geringerer Proteinkonzentration aufgenommen. Eine Temperaturerhöhung auf 308 K ergab keine deutliche Verbesserung der Spektren; die Linienbreiten unterscheiden sich nicht wesentlich von denjenigen bei 298 K. Die in Abbildung 2.6 a) bis c) dargestellten Ausschnitte aus HSQC-Spektren stammen von einer stark verdünnten Probe in Puffer 1b bei pH = 7,1, bei pH = 8,5 und nach dem erneuten Einstellen des pH auf 7,0. Anhand der besonders schwachen Signale in Teil b) der Abbildung läßt sich lediglich die reversible Deprotonierung der Amidgruppen bei hohem pH-Wert deutlich erkennen. Eine vom isoelektrischen Punkt<sup>13</sup> stärker abweichende Einstellung des pH-Werts brachte damit ebenfalls nicht den erhofften Erfolg. Unabhängig von der beobachteten Deprotonierung blieb die Probe auch getrübt. Abbildung 2.6 d) schließlich zeigt ein nach der Zugabe von 6% deuteriertem 1,4-Dioxan aufgenommenes HSQC. Dioxan ist ein seltener genutztes Additiv [Bag01], das im Fall des Proteins YfiD aus *E. coli* eine Dimerisierung verhindert [Bom99]. Es wurde hier eingesetzt, weil die großen Linienbreiten und das Auftreten zweier Signale der Amidgruppe von Tyr2003 im HSQC auf eine mögliche Dimerisierung von RanBP2<sup>RanBD2</sup> hindeuteten. Eine entsprechende Wirkung auch bei RanBP2<sup>RanBD2</sup> wäre allerdings zufällig gewesen.

<sup>13</sup> hier 5,08, berechnet aus der Primärstruktur mit Compute pI/Mw ([http://www.expasy.org/tools/pi\\_tool.html](http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html))

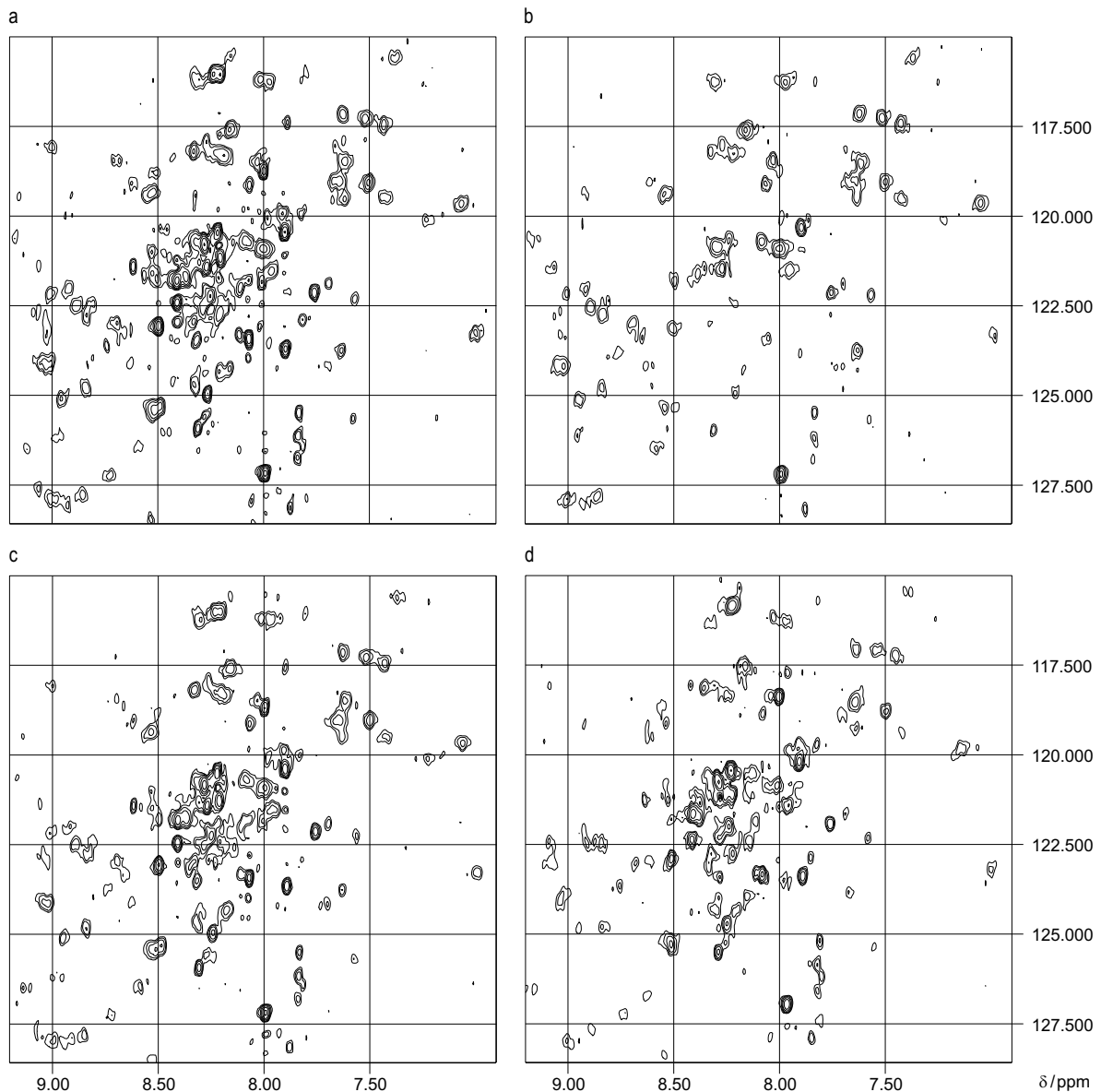


Abbildung 2.6. HSQC-Spektren von RanBP2<sup>RanBD2</sup> in Puffer 1b bei pH = 7,1 (a), pH = 8,5 (b) und nach dem erneuten Einstellen von pH = 7,0 (c). Teil d) zeigt das Spektrum nach Zugabe von 6 % Dioxan. Es ergeben sich keine wesentlichen Änderungen. Gut zu erkennen ist die reversible Deprotonierung in den Teilen a) bis c).

### 2.2.4 TOCSY-Mischzeiten

TOCSY-Spektren können wegen der darin erwarteten aminosäuretypischen Signalgruppen bei der sequenzspezifischen Zuordnung der Spinsysteme sehr nützlich sein. Wie im gezeigten HNCA (Abb. 2.4 a) waren auch im vorhandenen 3D TOCSY-Spektrum einige Signale sehr schwach, die meisten zu Seitenkettenprotonen gehörigen fehlten vollständig. Vor diesem Hintergrund wurde in entsprechenden 2D Experimenten die Mischzeit  $\tau_M$  variiert. Abbildung 2.7 zeigt jeweils denselben Bereich aus vier Spektren, aufgenommen mit Mischzeiten von 35 ms,

45 ms, 50 ms und 55 ms. Längere  $\tau_M$  ermöglichen prinzipiell, entlang der Seitenketten „weiter zu sehen“, also gemeinsame Kreuzsignale auch durch eine größere Zahl chemischer Bindungen getrennter Wasserstoffkerne zu erhalten. Die relaxationsbedingte, zeitlich annähernd exponentielle Abnahme der meßbaren Magnetisierung steht dabei der Wahl zu langer Mischzeiten entgegen. Im Fall von RanBP2<sup>RanBD2</sup> liegt der optimale Wert bei rund 55 ms: In der Folge a) bis d) zeigt Bild 2.7 immer stärker werdende Signale im Bereich zwischen 0 ppm und 3 ppm, einem für Seitenkettenprotonen typischen Bereich. Dabei wirkt sich die Änderung von 50 ms zu 55 ms nur wenig aus. Bei späteren TOCSY-Experimenten wurde stets eine Mischzeit von 55 ms gewählt.

### 2.2.5 Zusammenfassung der bisherigen Ergebnisse

Die gemessenen Spektren der Bindedomäne RanBP2<sup>RanBD2</sup> reichten für eine sequenzspezifische Zuordnung nicht aus. Hauptgründe sind das Zusammenfallen vieler Signale und ein schlechtes Signal-zu-Rausch-Verhältnis. Der erste Punkt deutet auf einen teilweise unstrukturierten N-Terminus hin, der zweite auf große Linienbreiten, Folge von chemischem Austausch oder großen Rotationskorrelationszeiten (vgl. Kapitel 3). Die Ursache für letztere wiederum kann eine erhöhte Viskosität der Lösung (Beimischung von deuteriertem Glycin) sein, oder eine Dimerisierung des Proteins bzw. die Bildung noch größerer Aggregate. Daran könnte ein ungeordneter N-Terminus von 20-30 Aminosäuren Länge einen entscheidenden Anteil haben. Das gilt auch für die Instabilität der Proben, manifestiert durch Eintrübung und mit der Zeit zunehmenden Bodensatz bzw. das Ausflocken von Teilen der Probe während längerer Messungen. Keiner der Versuche, die Lösungsbedingungen zu verändern, hatte das gewünschte Ergebnis, nämlich eine stabile Probe und gut aufgelöste Spektren mit großem Signal-zu-Rausch-Verhältnis.

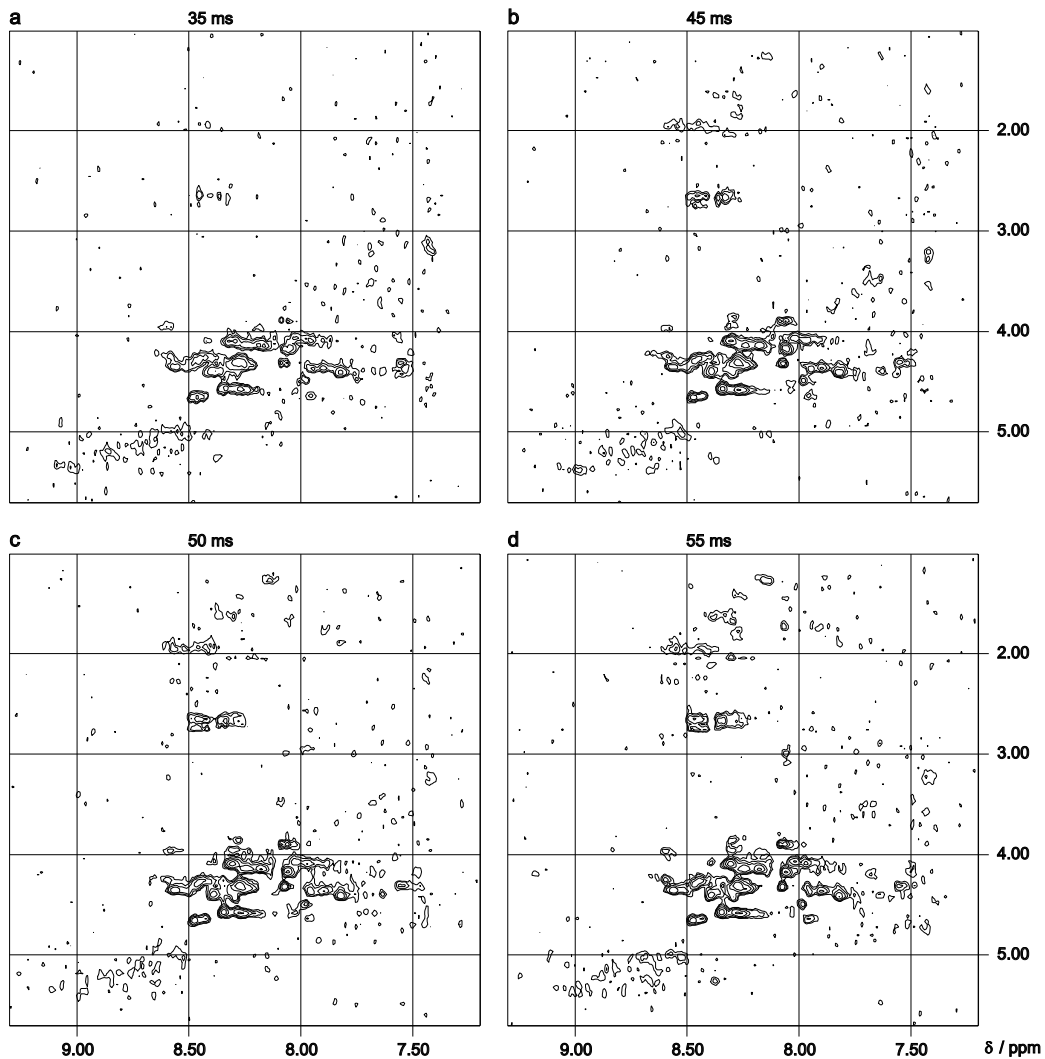


Abbildung 2.7. TOCSY-Spektren mit verschiedenen Mischzeiten von 35 ms (a), 45 ms (b), 50 ms (c) und 55 ms (d). Mit längerer Mischzeit werden die Signale zwischen 0 ppm und 2 ppm stärker. Die Unterschiede zwischen den Teilen c) und d) der Abbildung sind relativ gering. (Puffer 1)

## 2.2.6 Verkürzung der Domäne

### 2.2.6.1 Trypsinverdau

Die bisherigen Ergebnisse führten zum Entschluß, zunächst mit einem N-terminal verkürzten Protein weiterzuarbeiten. Es war schon bekannt, daß eine gekürzte im Vergleich zur vollständigen Domäne RanGTP zumindest sehr viel schwächer bindet [Vil98]. Die Bindungsfähigkeit bleibt aber spezifisch auf RanGTP beschränkt (Zhao et al., in Vorbereitung). Im Fall der ersten Bindungsdomäne (RanBP2<sup>RanBD1</sup>) ist es möglich, den N-Terminus mit Hilfe von Trypsin abzuschneiden und ein stabiles Fragment von 15,7 kDA zu erhalten [Vil98]. Dies wurde nun

auch mit RanBP2<sup>RanBD2</sup> versucht. Der folgende Absatz zeigt die Sequenzen beider Domänen<sup>14</sup>. Bei der zweiten Domäne sind Arginin- und Lysinreste, nach denen Trypsin die Peptidkette prinzipiell schneiden kann, hervorgehoben, bei der ersten lediglich der Lysinrest, welcher dem von Frau Dr. Villa Braslavsky erhaltenen 15,7 kDa-Fragment vorangeht. Ziel war es, möglichst den grau unterlegten Teil der zweiten Domäne am Stück zu erhalten, eventuell um die letzten 10 Reste gekürzt. Diese Fragmente hätten Massen von 15,4 kDa bzw. 14,3 kDa und theoretische isoelektrische Punkte bei einem pH von 6,8 respektive 7,9.

```

RanBD1  ---TDGSSAH  GDDDDDGPHF  EPVVPLPDKI  EVKTGEEDEE  EFFCNRAKLF  RFDVESKEWK
RanBD2  GSF EKDDDAY  KTEDSDDIHF  EPVVQMPEKV  ELVTGEEDEK  VLYSQRVKLF  RFDAEVSQWK

RanBD1  ERGIGNVKIL  RHKTSGKIRL  LMRREQVLKI  CANHYISPDM  KLTPNAGSDR  SFVWHALDYA
RanBD2  ERGLGNLKIL  KNEVNGKLRM  LMRREQVLKV  CANHWITTTM  NLKPLSGSDR  AWMWLASDFS

RanBD1  DELPKPEQLA  IRFKTPPEAA  LFKCKFEEAQ  SILKAPGTNV  AMA  SNQAVR
RanBD2  DGDAKLEQLA  AKFKTPELAE  EFKQKFEECQ  RLLLDIPLQT  P
    
```

Einer 700 µl NMR-Probe von RanBP2<sup>RanBD2</sup> (ca. 0,7 mM) in Puffer 1 wurden 35 µl MgCl<sub>2</sub>-Lösung (0,1 mM in Wasser) zugegeben und zunächst 2 µl einer Lösung von 3mg/ml Trypsin. 70 min und 155 min nach der Trypsinzugabe wurden jeweils Proben von 30 µl entnommen, denen zum Stoppen der Proteolysereaktion 1 µl PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid, 20 mg pro ml in 2-Propanol) hinzupipettiert wurde.

Nach 170 min wurden zusätzliche 8 µl der Trypsinlösung eingesetzt; nach 275 min und dann weitere 13 h später erneut Proben entnommen. In diesem Zeitraum wurden 10 eindimensionale Spektren gemessen. Der genaue zeitliche Ablauf des Experiments ist im Anhang wiedergegeben. Abbildung 2.8 zeigt das Polyacrylamidgel auf welches die dem NMR-Röhrchen entnommenen Proben aufgetragen wurden. Die linke Spur ist die des Markers, daneben die einer Probe ohne Trypsin. Weiter rechts sind in der Reihenfolge ihrer Entnahme die nach der

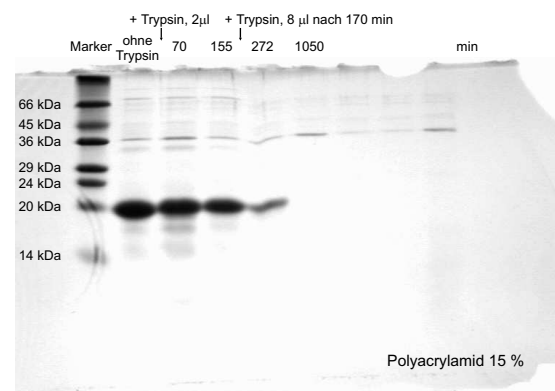


Abbildung 2.8. Dokumentation der Verdaureaktion. Linke Spur: Marker, daneben: unverdautes Protein. Weiter rechts: nacheinander genommene Proben. Der Zeitpunkt ihrer Entnahme ist in Minuten angegeben (oben). Er bezieht sich auf die erste Trypsinzugabe (2 µl, linker Pfeil). Nicht beschriftete Spuren: Verdau war bei Probenentnahme schon abgeschlossen.

<sup>14</sup> RanBD1 nach [Vil98], RanBD2 wie hier verwendet

Zugabe von Trypsin genommenen Proben aufgetragen. Nur die unverdaute und sowie die erste anverdaute Probe weisen Banden um 14 kDa auf, sie sind bei den weiter rechts liegenden Spuren verschwunden. Bild 2.9 zeigt einige der NMR-Spektren, und zwar von unten nach oben das der unverdauten Probe, das 261 Minuten nach der ersten Zugabe von Trypsin aufgenommen und ein nach knapp 18h (1065 min) gemessenes. Besonders auffällig ist in den beiden oberen Spektren die geringe Dispersion der chemischen Verschiebungen im Amidprotonbereich zwischen 10 ppm und 6,5 ppm. Dies ist ein Zeichen für fehlende gut definierte Sekundärstrukturelemente. Auch die für Methylgruppen in gefalteten Proteinen typischen Signale um 0 ppm verschwinden. Übrig bleibt an dieser Stelle das Signal des Frequenzstandards DSS (2,2-dimethyl-2-silapentan-5-sulfonsäure). Die stärksten Veränderungen treten schon im zweiten gezeigten Spektrum auf, das zeitlich etwa der 272-Minuten-Spur auf dem Gel entspricht. Das Protein ist schon fast vollständig zerschnitten; die Fragmente sind für den Nachweis auf dem Gel zu klein. Im oberen Spektrum ist der Endzustand erreicht, spätere Experimente zeigten keine weiteren Veränderungen mehr.

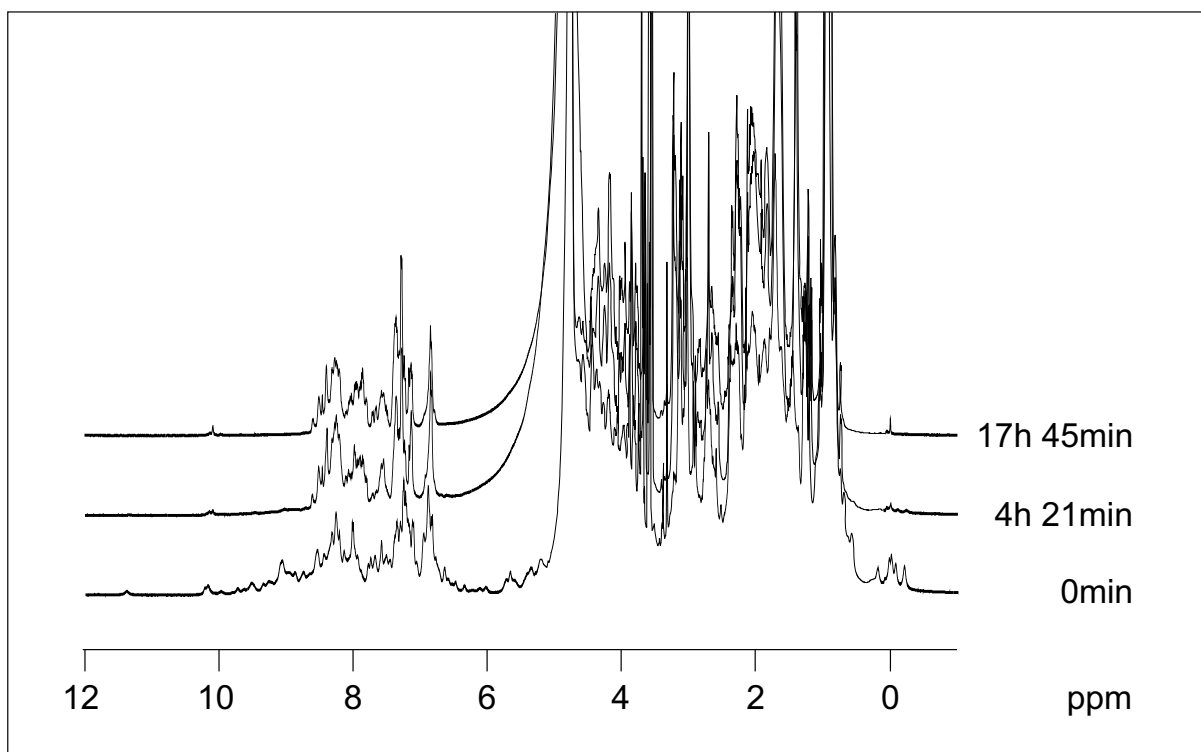


Abbildung 2.9. Drei Spektren der mit Trypsin verdauten Probe. Unten: vor dem Verdau, darüber ein 4 Stunden und 20 min nach der Zugabe von Trypsin aufgenommenes Spektrum; oben: das Spektrum nach rund 18 Stunden.

Bei der Proteolyse mit Trypsin wurde kein für die weitere Strukturuntersuchung geeignetes, das heißt genügend großes und stabiles, Fragment der zweiten Ranbindedomäne erhalten.

### 2.2.6.2 Das neue Konstrukt

In der Folge wurde das direkte Klonieren einer verkürzten Bindedomäne, RanBP2<sup>RanBD2ΔN</sup>, beschlossen. Diese Arbeiten, einschließlich der Expression in *E. coli*, gegebenenfalls der Markierung mit den Isotopen <sup>15</sup>N oder <sup>13</sup>C sowie der Aufreinigung des neuen Konstrukts wurden freundlicherweise von Xiaodong Zhao und Christine Nowak übernommen. Sie gehören der Arbeitsgruppe um Jürgen Kuhlmann in Prof. A. Wittinghofers Abteilung am Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie in Dortmund an. Die Sequenz und weitere Daten von RanBP2<sup>RanBD2ΔN</sup> sind im Teil „Material und Methoden“ wiedergegeben.

#### 2.2.6.2.1 Massenspektrometrie

Mit Hilfe der vom Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund erhaltenen massenspektrometrischen Daten konnte der Markierungsgrad der isotope markierten Bindungsdomäne RanBP2<sup>RanBD2ΔN</sup> bestimmt werden. Der Erwartungswert für die Molekülmasse des unmarkierten Proteins liegt unter Berücksichtigung der natürlichen Häufigkeiten von <sup>13</sup>C (1,1 %) und <sup>15</sup>N (0,37 %) bei 15115,46 kDa<sup>15</sup>. Aus der Anzahl der Stickstoffatome (186) und der Kohlenstoffatome (674) im Molekül ergeben sich die in Tabelle 2.3 aufgeführten entsprechenden Erwartungswerte für das zu 100 % mit <sup>15</sup>N respektive <sup>15</sup>N und <sup>13</sup>C markierte Protein. Die experimentellen Werte stehen in der rechten Spalte der Tabelle.

Markierung	Erwartungswert / Da	gemessener Wert / Da
ohne	15115,46	15115 ± 4
nur <sup>15</sup> N	15300,77	15296 ± 4
<sup>13</sup> C und <sup>15</sup> N	15967,37	15955 ± 4

Tabelle 2.3. Markierung von RanBP2<sup>RanBD2ΔN</sup>; Erfolgskontrolle anhand der gemessenen Proteinmassen und ihrer Erwartungswerte für das zu 100 % markierte Protein.

Der Vergleich der Werte bestätigt, daß das gewünschte Protein exprimiert wurde. Aus den Meßwerten ergibt sich weiterhin ein Markierungsgrad von rund 98 % für <sup>15</sup>N; im Fall von <sup>13</sup>C sind es fast 99 %. In Hinsicht auf ihre Markierung erfüllten damit alle Proben des gekürzten Proteinkonstrukts die Voraussetzungen für erfolgreiche heteronukleare NMR-Experimente.

<sup>15</sup> berechnet aus den Massen der einzelnen Aminosäurereste nach [Cre93]



## 2.2.7 Zweidimensionale Spektren der verkürzten Bindedomäne

### 2.2.7.1 Übereinstimmung der Strukturen von langer und kurzer Domäne

Das Protein wurde zunächst in dem von Xiaodong Zhao vorgeschlagenen Puffer Trispuffer vermessen. Der verwendete Puffer bestand aus 18,5 mM Tris/HCl bei pH 7,4, 4,6 mM MgCl<sub>2</sub> und 5 mM DTE, außerdem 7,5 % D<sub>2</sub>O (<sup>2</sup>H<sub>2</sub>O), 1,1 mM EDTA (Ethyldiamintetraacetat), 4,4 mM NaN<sub>3</sub> und 0,18 mM DSS als Frequenzstandard.

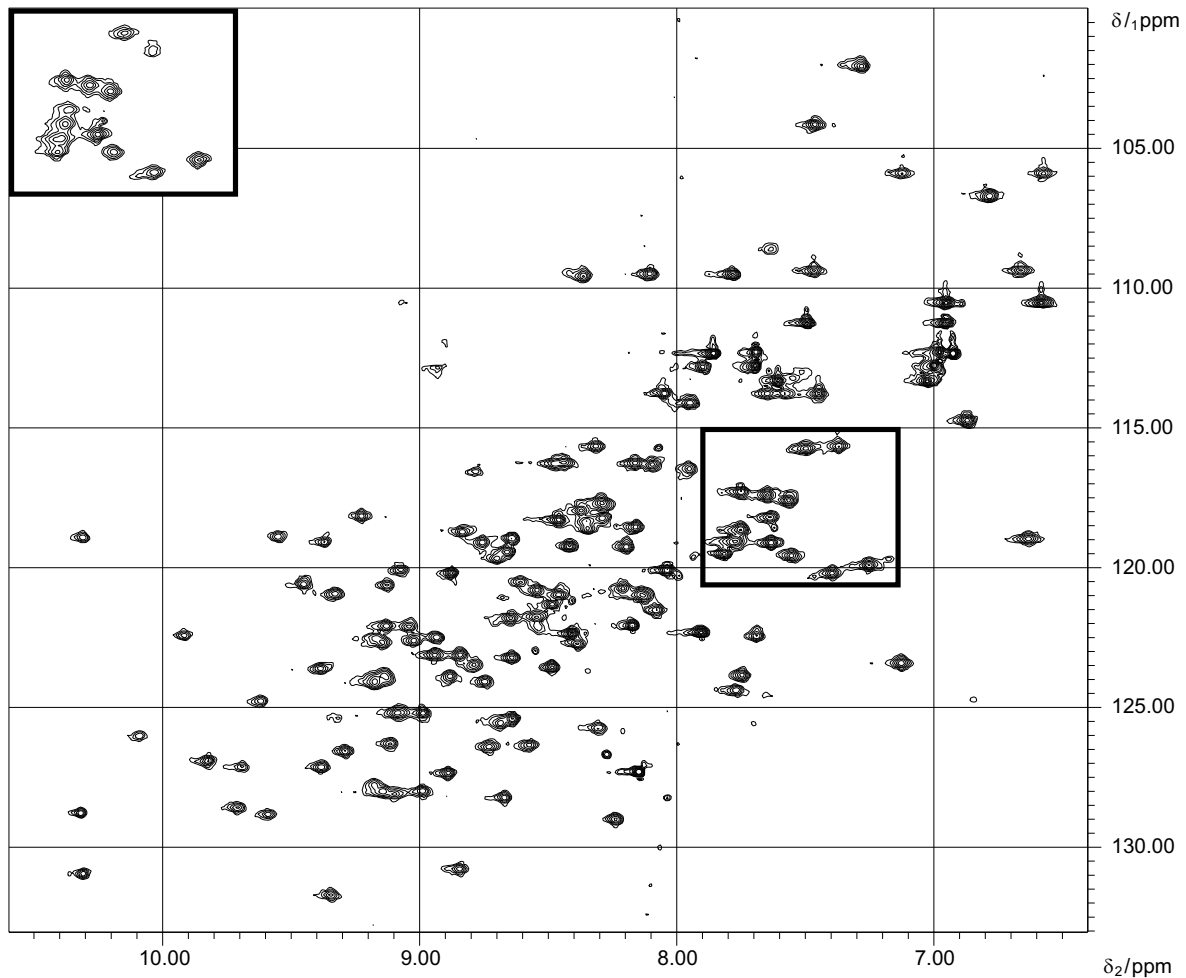


Abbildung 2.10. Das <sup>15</sup>N-HSQC der verkürzten Domäne in Puffer 2. Es ist dem der vollständigen Domäne sehr ähnlich, ein Nachweis für die weitgehende Übereinstimmung der Tertiärstrukturen. Zu dem als Beispiel markierten Bereich (Mitte rechts) ist links oben noch einmal der entsprechende Ausschnitt aus Abbildung 2.9 (HSQC der vollständigen Domäne) gezeigt.

In Abbildung 2.10 ist das <sup>15</sup>N-HSQC von RanBP2<sup>RanBD2ΔN</sup> dargestellt. Die Signale der N-terminal entfernten Aminosäuren fehlen, andere sind im Vergleich zum in Abbildung 2.5 gezeigten Spektrum verschoben. Im großen und ganzen läßt sich aber dieselbe Gruppierung der Resonanzen erkennen. Als Beispiel wurde eine dem Buchstaben „π“ ähnelnde Gruppe von Signalen markiert, der entsprechende Ausschnitt aus Abbildung 2.5 ist oben links noch einmal

gezeigt. Das Spektrum zeigt also, daß beide Domänen, die vollständige und die gekürzte, im wesentlichen gleich gefaltet sind. Eindimensionale Experimente zeigen durchaus auch Veränderungen im Detail, insbesondere unterschiedliche chemische Verschiebungen von Methylgruppen. Insgesamt verursacht das Fehlen des N-Terminus keine größeren strukturellen Änderungen im Rest der Domäne.

### 2.2.7.2 Rückfaltung des Proteins

Die NMR-Proben waren unter den neuen Bedingungen (verkürztes Protein, anderer Puffer) zunächst unterschiedlich – und in Durchschnitt weniger – stabil als die der vollständigen Domäne. Teilweise fielen schon bei der ersten 3D Messung beträchtliche Anteile des Proteins aus, so daß anschließend das Signal-zu-Rausch-Verhältnis selbst für 2D Experimente zu gering war. Andererseits konnten an einer der mit  $^{15}\text{N}$  markierten Proben direkt nacheinander das NOESY- und das TOCSY-HSQC gemessen werden. Abbildung 2.11 zeigt Spektren einer doppelt markierten Probe. Teil a) stellt das vor einem HNCA-Experiment, Teil b) das im Anschluß daran gemessene  $^{15}\text{N}$ -HSQC dar. Die Probe hatte ursprünglich eine Konzentration von 0,8 mmol/l (Puffer 2; 9,2 mM DTE). Sie wurde, um sie weiter vermessen zu können, erst vollständig denaturiert, dann zurückgefaltet. Das in Abbildung 2.11 c) gezeigte, nachfolgend aufgenommene Spektrum bestätigt im Vergleich mit denen aus Bild 2.11 a) und 2.11 b) die erfolgreiche Rückfaltung. Neue, meist sehr schwache, Signale weisen dabei auf das Vorhandensein weiterer Konformationen hin, die ursprünglich relativ schwächer oder überhaupt nicht in Erscheinung getreten waren. Das stärkste dieser Signale, bei (5,85 ppm, 121,0 ppm) stammt von einem Seitenkettenproton.

Nach dem Aufkonzentrieren hatte die zurückgefaltete Probe eine Proteinkonzentration von ca. 0,4 mmol/l. Trotz der Verluste lieferte sie anschließend im CBCA(CO)NH-Experiment das erste wirklich gute heteronukleare  $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$ -Spektrum von RanBP2<sup>RanBD2ΔN</sup>. Nach dieser Messung war das Protein erneut weitgehend ausgefallen. Bei den eingestellten Lösungsbedingungen waren die Proben offensichtlich zu instabil für die weiteren Experimente.

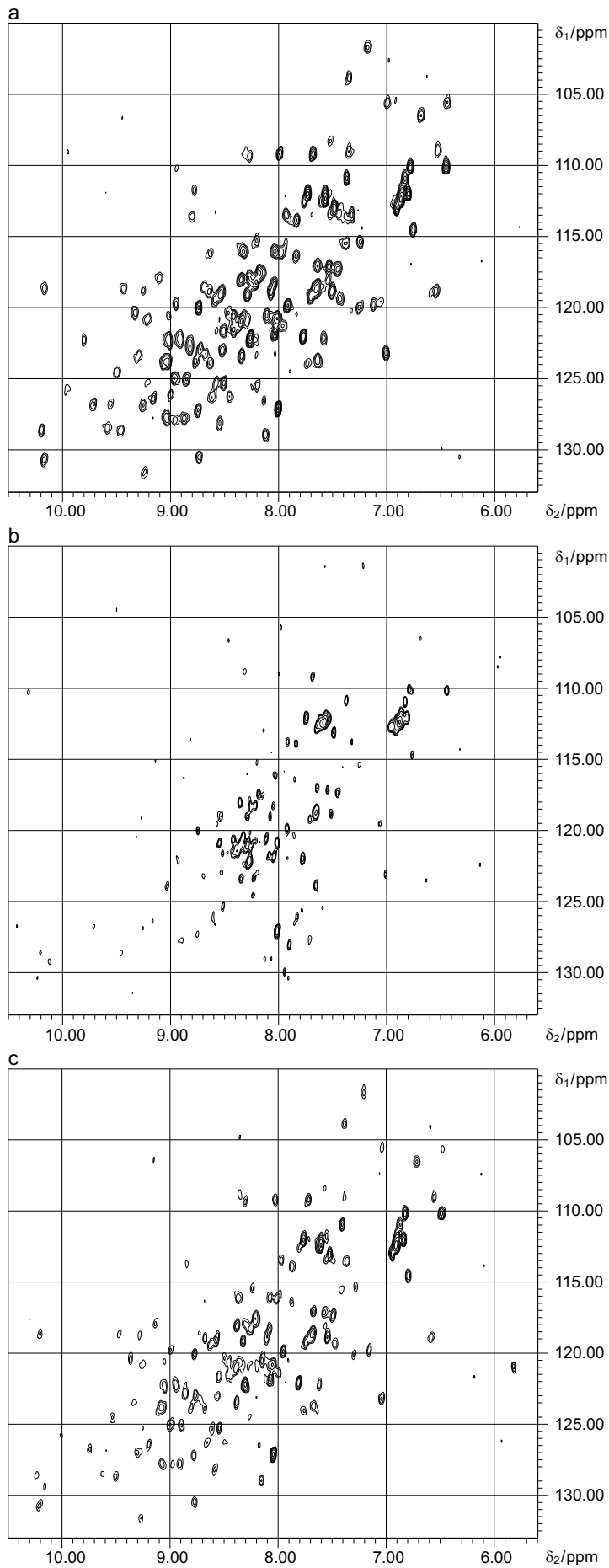


Abbildung 2.11.

Rückfaltung einer doppelt markierten Probe:

- a) HSQC vor Aufnahme eines HNCA.
- b) Nach dem 3D Experiment.
- c) Nach Denaturierung und Rückfaltung.

### 2.2.7.3 Wahl eines neuen Puffers – pH – Probenstabilität

Die Pufferbedingungen wurden wieder verändert. Inzwischen war die Kristallstruktur der ersten Ranbindedomäne RanBP2<sup>RanBD1</sup> bekannt [Vet99a]. Die Ranbindedomänen sind PH-Domänen (Pleckstrin Homology), die hauptsächlich aus einem sogenannten  $\beta$ -barrel oder  $\beta$ -sandwich mit C-terminaler  $\alpha$ -Helix bestehen [Sar95]. NMR-Proben der PH-Domäne von UNC-89 aus *C. elegans* lassen sich mit 10-15 % DMSO (Dimethylsulfoxid) stabilisieren [Blo99]. Dies ist für RanBP2<sup>RanBD2 $\Delta$ N</sup> nicht der Fall.

Magnesiumchlorid, das in Hinblick auf mögliche Bindungsexperimente mit RanGTP in Puffer 2 enthalten war, wurde nicht weiter verwendet.

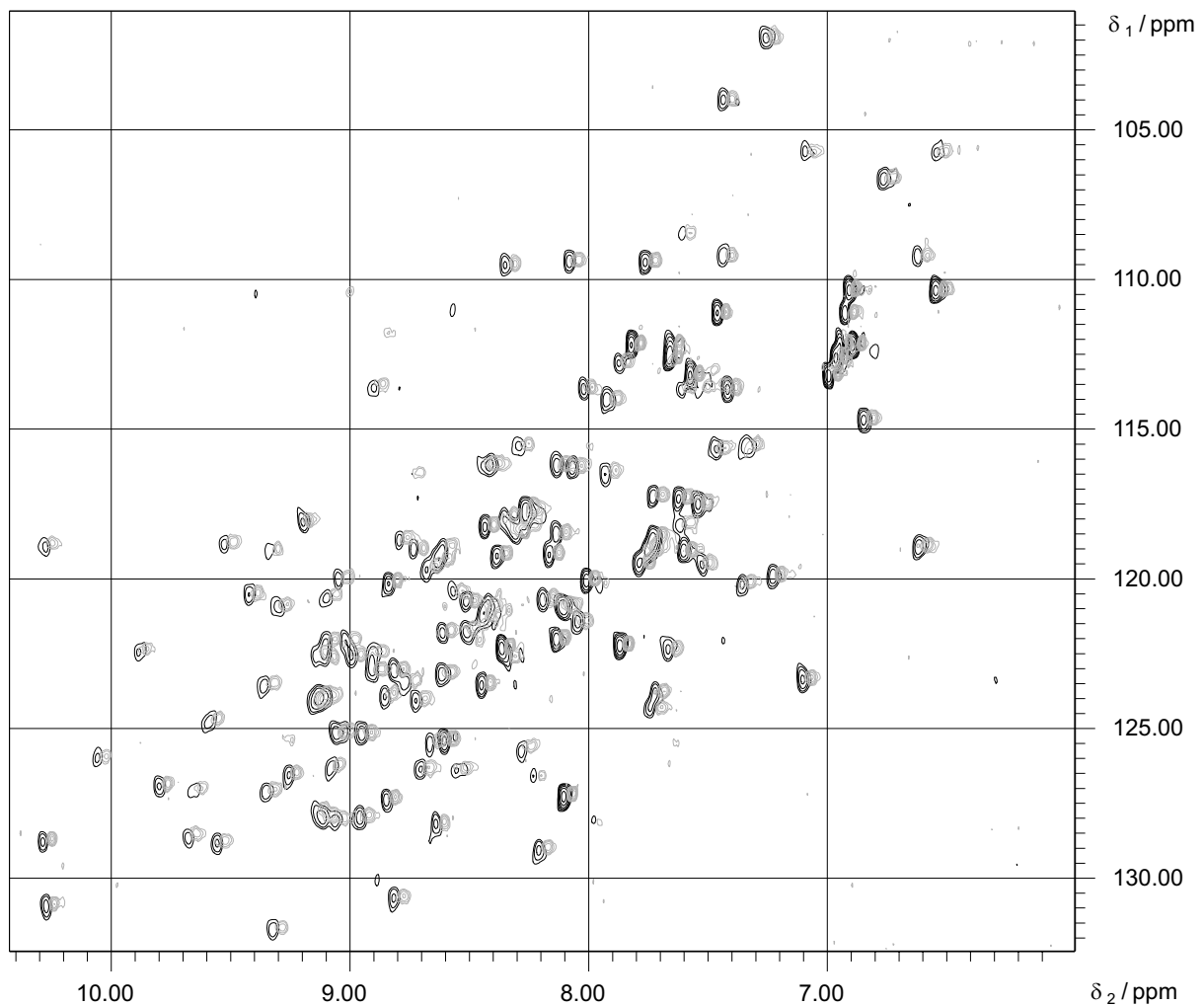


Abbildung 2.12. Übereinandergelegte <sup>15</sup>N-HSQC-Spektren einer Probe bei pH = 7,1 (schwarze Zeichnung, Proteinkonzentration 0,8 mM, Puffer 2) und bei pH = 6,4 (graue Zeichnung, Proteinkonzentration 0,3 mM). Beide Spektren unterscheiden sich nur wenig voneinander, die meisten Signalzuordnungen wären von einem auf das andere Spektrum direkt übertragbar.

Eine Änderung des pH, vom angenommenen isoelektrischen Punkt weg in den sauren Bereich, veränderte das  $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum nur wenig (Abbildung 2.12). Die schmalen Linien in dem bei  $\text{pH} = 6,4$  gemessenen Spektrum sind durch die bessere Feldhomogenität und anders gewählte Aufnahmeparameter bedingt; die Probe wurde zur Titration stark verdünnt. Bei dieser Messung war auch die Proteinkonzentration um einen Faktor 0,4 geringer als während derjenigen bei  $\text{pH} = 7,1$ .

Um Additive zu testen, wurden jeweils  $10\ \mu\text{l}$  einer unmarkierten NMR-Probe (Puffer 2) in Eppendorfgläser gegeben und alternativ  $1,8\ \mu\text{l}$  des Puffers oder einmolarer Glycin-, Natriumsulfat- bzw. Kochsalzlösung dazupipettiert. Die Lösungen wurden nach eintägiger Aufbewahrung bei Raumtemperatur kurz gemeinsam mit  $3000\text{g}$  zentrifugiert (Biofuge), dann 12 Stunden später noch einmal. Die Größe der erhaltenen Pellets wurde nach Augenschein verglichen, der Überstand jeweils mit  $200\ \mu\text{l}$  des Puffers verdünnt. Anschließend wurde die Extinktion bei  $280\ \text{nm}$  in immer derselben Quarzglaszelle gemessen. Dazu wurde das Protein nicht denaturiert. Die Ergebnisse sind mit ihren Standardfehlern in der unten stehenden Tabelle eingetragen.

	rel. Extinktion bei $280\ \text{nm} / \text{cm}^{-1}$	minimales Pellet
nur Puffer	$0,5073 \pm 0,0045$	
+ <b>140 mM Glycin</b>	$0,3832 \pm 0,0032$	
+ <b>140 mM <math>\text{Na}_2\text{SO}_4</math></b>	$0,478 \pm 0,015$	x
+ <b>140 mM NaCl</b>	$0,3579 \pm 0,0001$	

Tabelle 2.4. Extinktionsmessungen zur Beurteilung Probenstabilität in Trispuffer.

In Verbindung mit der Pelletgröße schien der Trispuffer allein oder mit  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  als Additiv am günstigsten zu sein. Der Test wurde dann ähnlich mit zwei gleich konzentrierten Lösungen des Proteins ( $0,38\ \text{mM}$ ) in Trispuffer ( $20\ \text{mM}$ ,  $\text{pH} = 7,4$ ) und in  $10\ \text{mM}$  Kaliumphosphatpuffer bei  $\text{pH} = 6,5$  durchgeführt, je einmal mit und einmal ohne Zusatz von Natriumsulfat ( $140\ \text{mM}$ ):

Lösung	Tris	Tris + $\text{Na}_2\text{SO}_4$	$\text{KP}_i$	$\text{KP}_i + \text{Na}_2\text{SO}_4$
rel. Extinktion $/\text{cm}^{-1}$ ( $280\ \text{nm}$ )	$0,0935 \pm 0,0002$	$0,2208 \pm 0,0004$	$0,1495 \pm 0,0006$	$0,3851 \pm 0,0002$

Tabelle 2.5. Extinktionsmessungen zur Probenstabilität in Tris- und Phosphatpuffer.

Der Referenzwert wurde mit dem jeweiligen Puffer allein gemessen. Die Puffer selbst unterschieden sich in ihrer Absorption um höchstens  $0,002\ \text{cm}^{-1}$  voneinander.

Daraufhin wurden zwei NMR-Proben ( $491\ \mu\text{l}$ , Protein  $0,35\ \text{mM}$ ) im Phosphat- bzw. Trispuffer (Puffer 3 bzw. 2) hergestellt und TOCSY-Experimente durchgeführt. Weil zu wenig

Material für vier Proben zur Verfügung stand, wurden die Messungen mit denselben Proben nach der Zugabe von je 10,5 mg  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (150mM) wiederholt. Abbildung 2.13 zeigt Ausschnitte der erhaltenen Spektren und macht deutlich, daß der Phosphatpuffer der für weitere Messungen geeignetere ist. Das Signal-zu-Rausch-Verhältnis ist im Trispuffer geringer. In den mit Phosphatpuffer gemessenen Spektren ist das Signal-zu-Rausch-Verhältnis im Bereich der Seitenkettenprotonen ohne  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  etwas besser, für die Rückgratprotonen ( $\text{H}_\alpha$ ) ist es umgekehrt. Unter Berücksichtigung der Sedimentierungsversuche wurde der Zusatz von  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  für alle späteren Experimente beibehalten. Die für die sequenzspezifische Zuordnung entscheidenden Messungen wurden in folgendem Puffer durchgeführt (Puffer 3): 9,2 mM  $\text{KP}_i$  bei  $\text{pH} = 6,5$ , 138 mM  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 9,2 mM DTE, 7,6 %  $\text{D}_2\text{O}$ , 1 mM  $\text{NaN}_3$ , 0,5 mM EDTA, 0,1 mM DSS. Mit einer neuen, doppelt markierten Probe in diesem Puffer konnten nacheinander sechs 3D Experimente erfolgreich durchgeführt werden: HNCA, HN(CO)CA, CBCA-NH, HBHA(CBCACO)NH, HNCO und CBCA(CO)NH. Die nach dem Gefriertrocknen und Lösen der Probe in  $\text{D}_2\text{O}$  aufgenommenen Spektren, HCCH-TOCSY und  $^{13}\text{C}$ -NOESY-HSQC, waren kaum verwertbar. Auch in Puffer 3 sind die Proben nicht wirklich stabil, aber doch wesentlich haltbarer als in Puffer 2. Es ist nicht sicher, ob die Probe die belastenden Spinlock-Pulse des zuerst gemessenen HCCH-TOCSY oder eventuell schon das Gefriertrocknen nicht überstanden hat. Andere Proben waren vorher aber problemlos lyophilisiert worden.

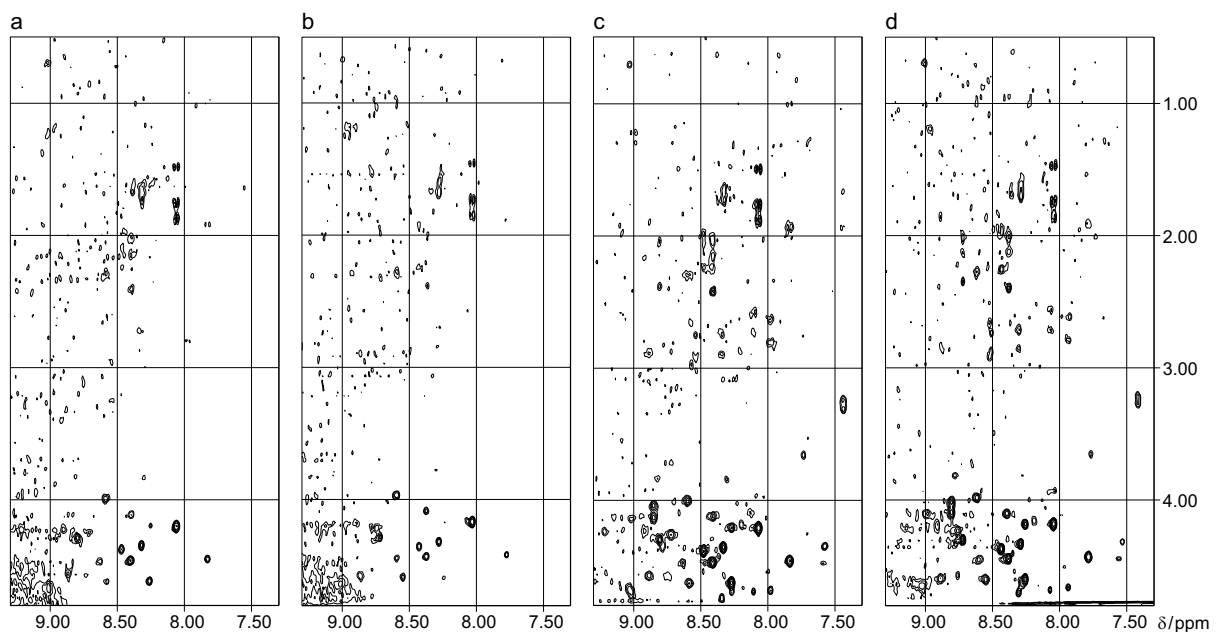


Abbildung 2.13. TOCSY-Spektren zur Beurteilung der Probenstabilität. a) Trispuffer bei  $\text{pH} = 7,4$ , b) Trispuffer mit  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , c) Kaliumphosphatpuffer bei  $\text{pH} = 6,5$ , d) Phosphatpuffer und  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . (Meßdauer jeweils ca. 7 h 52 min)

### 2.2.8 Sequenzspezifische Zuordnung

Die sequenzspezifische Zuordnung für das Proteinrückgrat wurde durchgeführt wie im Teil „Materialien und Methoden“ erläutert; soweit möglich hauptsächlich anhand der Tripelresonanzspektren HNCA, CBCA(CO)NH und CBCANH. Besonders intensive Signale von N- und C-terminalen Resten deuten im HNCA auf die erhöhte Flexibilität dieser Bereiche hin. Abbildung 2.14 zeigt als Beispiel für vier aufeinanderfolgende Amidprotonen die korrelierten Signale im  $^{15}\text{N}$  editierten NOESY-HSQC und im HNCA. Die starken Kontakte zwischen  $\text{H}^{\alpha}_{i-1}$  und  $\text{H}^{\text{N}}_i$  im NOESY-HSQC sind auf für  $\beta$ -Stränge typische Abstände dieser Kerne zurückzuführen.

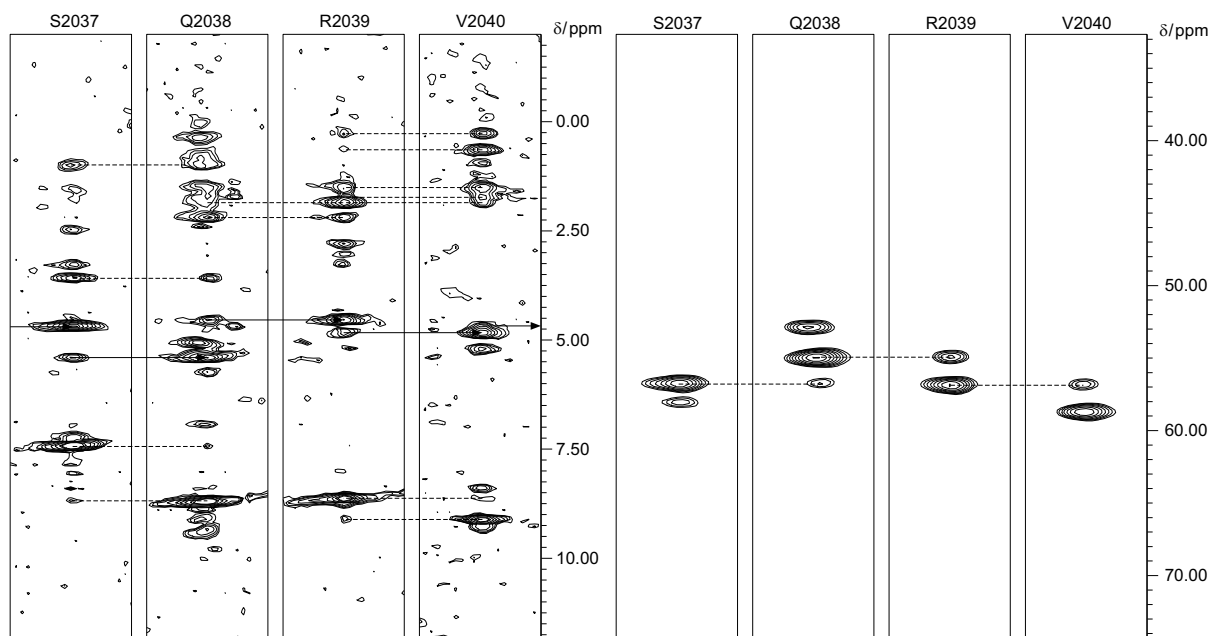


Abbildung 2.14. Links sequentielle NOE-Kontakte im NOESY- $^{15}\text{N}$ -HSQC. Durchgezogene horizontale Linien verbinden  $\text{H}^{\alpha}_i/\text{H}^{\text{N}}_i$ -Signale mit den für  $\beta$ -Stränge typischen, starken  $\text{H}^{\alpha}_{i-1}/\text{H}^{\text{N}}_{i-1}$ -Signalen. Weitere Kontakte sind mit unterbrochenen Linien gekennzeichnet und nicht notwendig sequentiell. Rechts sind sequentielle Kontakte aus dem HNCA gezeigt: Die schwächeren Signale sind interresidual ( $\text{C}^{\alpha}_i/\text{H}^{\text{N}}_{i+1}$ ), die stärkeren intraresidual ( $\text{C}^{\alpha}_i/\text{H}^{\text{N}}_i$ ). Dabei bezeichnen  $i$  und  $i+1$  die Position der Aminosäurereste in der Primärstruktur.

### 2.2.9 Das $^{15}\text{N}$ -HSQC

Als Ergebnis der sequenzspezifischen Zuordnung sind zunächst die chemischen Verschiebungen der Protonen und der Stickstoffkerne fast aller Amidgruppen im Proteinrückgrat bekannt. Die Signale der ersten beiden Reste Gly-Ser, die kein Bestandteil der eigentlichen Bindedomäne sind, wurden nicht gefunden. Abbildung 2.15 zeigt das bei rund 18,7 Tesla aufgenommene  $^{15}\text{N}$ -HSQC von RanBP2Ran<sup>BD2AN</sup> in Puffer 3 mit den beschrifteten Signalen der

Amidgruppen. Aus Platzgründen wurde hier die Numerierung auf die Sequenz des Proteinkonstrukts bezogen statt auf RanBP2 insgesamt. Die Reste sind also von 1 bis 130 durchnummeriert, Gly2028 in RanBP2 ist hier der 3. Rest und heißt G3. Im folgenden werden beide Notationen nebeneinander verwendet. Nicht zugeordnet sind die Seitenkettensignale, insbesondere gilt das für diejenigen der 12 Aminogruppen von Glutamin- und Asparaginresten sowie die von Amidgruppen in den Indolringen der 4 Tryptophanreste. Eines der Tryptophan-Seitenkettensignale liegt bei 11,4 ppm/131,0 ppm, außerhalb des gezeigten Spektrums. Insgesamt sind im Spektrum alle zu erwartenden Signale (bis auf die der schon erwähnten beiden N-terminalen Reste) auch vorhanden. Zusätzlich treten 15-20 Signale auf, die nicht zugeordnet werden konnten und auch in den Tripelresonanzspektren nicht wiederzufinden sind. Es könnte sich dabei um in das HSQC hineingefaltete Seitenkettensignale (His, Arg, Lys) handeln, deren Stickstoffverschiebungen eigentlich außerhalb des Spektrums liegen. Schwach besetzte zusätzliche Konformationen des Proteins könnten ebenfalls die Ursache sein.

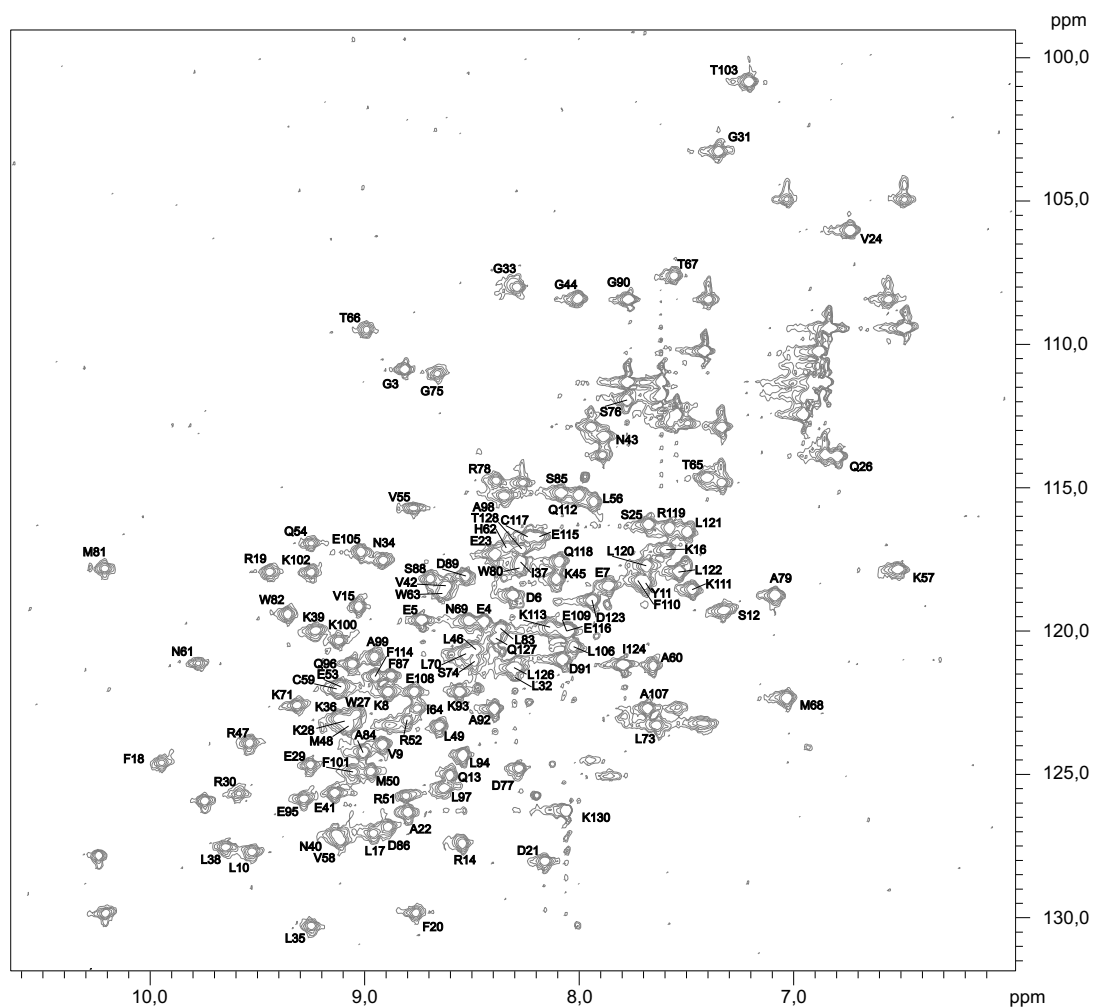


Abbildung 2.15.  $^{15}\text{N}$ -HSQC der verkürzten Domäne in Puffer 3, aufgenommen am 800-MHz-Spektrometer.



## 2.2.10 Strukturelevante Parameter

### 2.2.10.1 Unverbrückte Cysteinreste

Ein Resultat der Hauptkettenzuordnung in Verbindung mit den Tripelresonanzspektren betrifft die beiden in RanBP2<sup>RanBD2ΔN</sup> vorhandenen Cysteinreste. Diese könnten prinzipiell eine Disulfidbrücke ausbilden. Da sich die chemischen Verschiebungen der C<sup>β</sup>-Kerne von oxidierten und reduzierten Cysteinresten deutlich voneinander unterscheiden, läßt sich dies, zum Beispiel anhand des CBCA(CO)NH, direkt ausschließen. Tabelle 2.6 zeigt die relevanten Werte.

Chem. Verschiebung (C <sup>β</sup> ) / ppm	Erwartungswerte <sup>16</sup>		gemessene Werte	
	Cys, oxidiert	Cys, reduziert	Cys2084	Cys2142
	41,1	28,0	30,4±0,6	25,8±0,6

Tabelle 2.6. Die gemessenen chemischen Verschiebungen zeigen, dass beide Cysteinreste reduziert vorliegen.

### 2.2.10.2 Sekundärstruktur

#### 2.2.10.2.1 Chemische Verschiebungen

Die Dispersion der chemischen Verschiebungen in gefalteten Proteinen zeigt deutlich sekundärstrukturabhängige Tendenzen. Beispielsweise sind Tieffeldverschiebungen (d.h. Verschiebungen zu hohen Frequenzen) von α-Protonen und Amidstickstoffkernen sowie Hochfeldverschiebungen der Kohlenstoffkerne in der Hauptkette typisch für β-Stränge. In α-helikalen Strukturen sind umgekehrt gerichtete Abweichungen von den random-coil-Werten zu erwarten [Wis91, Wis94]. Daher sind die chemischen Verschiebungen gute Indikatoren für die vorhandenen Sekundärstrukturelemente. Ein Maß dafür ist der chemische Verschiebungsindex (chemical shift index, csi), der für einzelne Kerne [Wis92] oder die Kombination der Resonanzfrequenzen mehrerer Kerne eines Rests [Wis94] definiert werden kann. Abbildung 2.16 zeigt die mit dem Programm CSI, v1.1 [Wis94] bestimmten und gegen die Sequenz aufgetragenen Verschiebungsindizes von RanBP2<sup>RanBD2ΔN</sup>. Eingangswerte sind die Resonanzfrequenzen der Rückgratkohlenstoffe, der C<sup>β</sup>- und der H<sup>α</sup>-Kerne. Zum Vergleich sind auch die für den Kristallkomplex von RanBP2<sup>RanBDI</sup> mit RanGppNHp bekannten Strukturelemente [Vet99a] eingetragen<sup>17</sup>. Positive csi deuten auf β-Stränge hin, negative csi auf helikale Bereiche. Für weite Bereiche der Sequenz stimmen die von den csi her erwarteten Sekundärstrukturelemente mit denen der Kristallstruktur überein.

<sup>16</sup> aus [Wis95], Referenzsubstanz: DSS bei 25 °C, pH = 5,0

<sup>17</sup> Das benötigte Sequenzalignment wurde von Vetter et al. [Vet99a] übernommen.

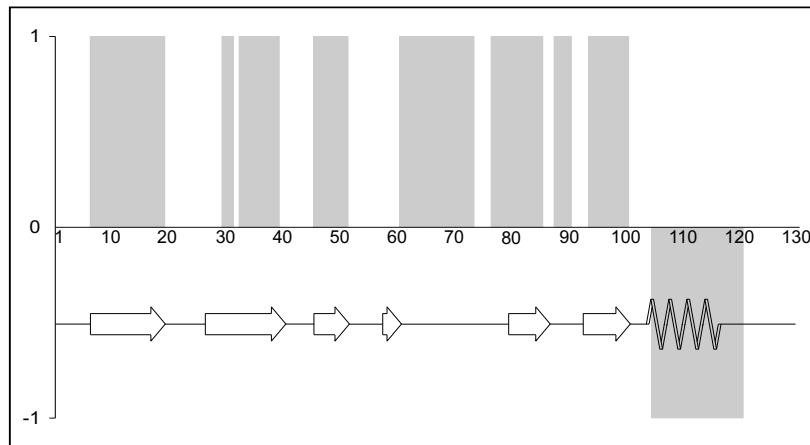


Abbildung 2.16. Chemische Verschiebungsindizes von  $\text{RanBP2}^{\text{RanBD2}\Delta\text{N}}$  in Lösung, aufgetragen gegen die aus der Kristallstruktur von  $\text{RanBP2}^{\text{RanBD1}}$  mit  $\text{RanGppNHp}$  bekannten Sekundärstrukturelemente. Die Aminosäurereste wurden von 1 bis 130 durchnummeriert, dabei entsprechen die Nummern 3-129 den Positionen 2028-2154 im vollständigen  $\text{RanBP2}$ . Die  $\text{csi}$  der Reste 10-19, 30-13, 33-39, 46-51, 61-73, 77-85, 88-90 und 94-100 sind positiv, die der Reste 105 bis 120 negativ.

Eine weitere Möglichkeit, den chemischen Verschiebungen Sekundärstrukturinformation zu entnehmen, bietet das Programm Talos [Cor99]. Es baut auf einem Datensatz schon bekannter NMR-Strukturen auf und nutzt neben den von CSI verwendeten Werten zusätzlich die Amidstickstofffrequenzen. Zu jeder Aminosäure werden, unter Berücksichtigung auch der beiden Nachbarreste, die zehn bezüglich chemischen Verschiebungen und Sequenz ähnlichsten Reste in der Datenbank gesucht. Die Mittelwerte der zugehörigen Hauptkettentorsionswinkel  $\phi$  und  $\psi^{18}$  werden als Erwartungswerte auch in der zu bestimmenden Struktur betrachtet. Abhängig von der Verteilung der je 10 zusammengehörigen Punkte im Ramachandran-Diagramm wird entschieden, welche der so erhaltenen Winkel in spätere Strukturrechnungen eingehen. Bei  $\text{RanBP2}^{\text{RanBD2}\Delta\text{DN}}$  waren das 156 Winkel. Sie wurden durch das Programm Talos als gut klassifiziert und sind im Anhang aufgeführt.

<sup>18</sup>  $\phi$  beschreibt Drehungen um die Bindung zwischen N und  $\text{C}^\alpha$  eines Rests,  $\psi$  diejenige um die Bindung von  $\text{C}^\alpha$  und Carbonylkohlenstoff. Ramachandran et al. [Ram63] haben als erste sterisch erlaubte Kombinationen beider Winkel berechnet. Im Ramachandran-Diagramm entspricht jeder Punkt einer Kombination von  $\phi$  und  $\psi$ .

### 2.2.10.2.2 NOE-Kontakte zwischen benachbarten Resten

Da die Sekundärstruktur eines Proteins durch die Konformation der Hauptkette festgelegt ist, sind mit regulären Strukturelementen charakteristische Abstände insbesondere der Amid- und  $\alpha$ -Protonen sequentiell benachbarter – aber nicht unbedingt direkt aufeinanderfolgender – Reste verbunden. Sie sind im NOESY-Spektrum durch das Auftreten bzw. die Intensität typischer Kontakte zu erkennen. Beispielsweise ist der mittlere Abstand zwischen einem  $\alpha$ -Proton und dem Amidproton des nächsten Rests kleiner als 0,36 nm [Wüt86] und in der Regel durch einen deutlichen NOE gekennzeichnet. Im  $\beta$ -Strang liegt der Abstand beider Kerne unter 0,27 nm, besonders starke Kreuzsignale sind die Folge (vgl. auch Abb. 2.18 links). In Abbildung 2.17 sind diese Kontakte als „ $d_{\alpha N}$ “ eingetragen, die Strichstärke ist ein Maß für die Signalintensität. Mit „ $d_{NN}$ “ sind die Abstände sequentiell direkt aufeinanderfolgender Amidprotonen bezeichnet; die zugehörigen Signale sind bei loops, turns und Helizes besonders stark.  $d_{NN}$  ist in Helizes meist kleiner als 0,3 nm [Wüt86]. Beobachtete Kontakte zwischen nicht *direkt* benachbarten Aminosäureresten sind in Abbildung 2.17 unabhängig von der Intensität der zugehörigen Signale mit einheitlicher Strichdicke eingetragen. Diese Signale treten in  $\beta$ -Strängen nicht auf.

Die meisten der in der Abbildung aufgeführten Kontakte wurden dem NOESY- $^{15}\text{N}$ -HSQC entnommen. Sie bestätigen insbesondere das Vorhandensein der C-terminalen Helix sehr deutlich und weisen sie auch als  $\alpha$ -Helix aus.

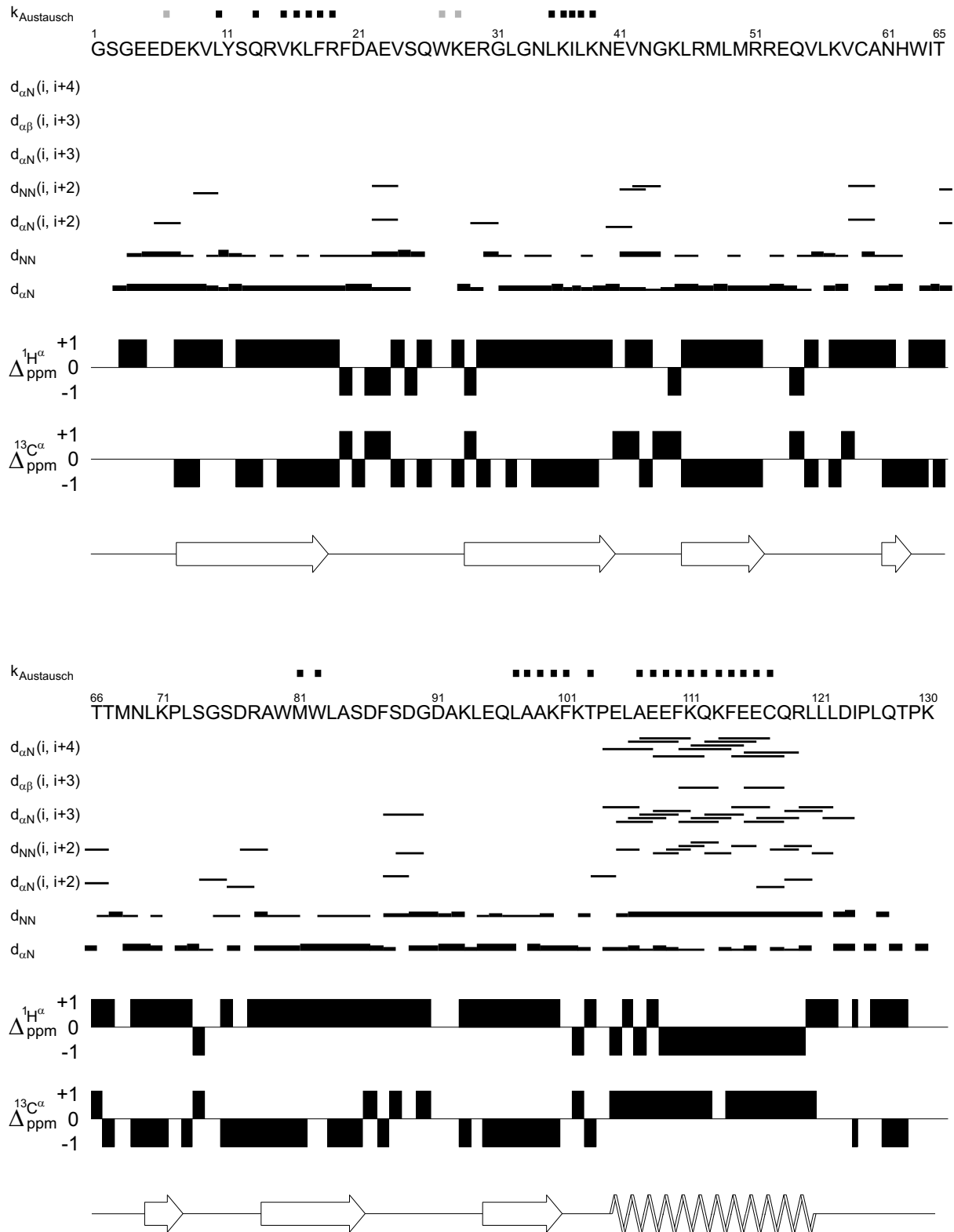


Abbildung 2.17. Darstellung der NOE-Kontakte zwischen benachbarten Aminosäureresten und der Austauschraten von Amidprotonen. Schwarze Rechtecke über der Sequenz bezeichnen Austauschraten von Amidprotonen in  $\text{D}_2\text{O}$ , sofern sie geringer als  $2 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  sind. Für D6 sowie W27 bzw. K28 (grau) ist die Signalzuordnung nicht ganz gesichert.  $d_{xy}(i,j)$  bezeichnet den Kontakt zwischen den Kernen  $x$  und  $y$  der Reste an den Positionen  $i$  und  $j$ . Im engeren Sinn sequentielle Kontakte, d.h. solche mit  $j = i+1$ , sind kurz  $d_{xy}$  geschrieben. Nur bei ihnen spiegelt die Strichstärke die geschätzte Signalintensität wieder. Unten sind die csi für  $\alpha$ -Protonen und  $\alpha$ -Kohlenstoffkerne gezeigt, ganz unten die bei einer Rechnung erhaltenen Sekundärstrukturelemente.

### 2.2.10.3 Fern-NOEs

Während NOE-Kontakte zwischen benachbarten Aminosäureresten teilweise schon für die sequentielle Zuordnung benötigt werden oder nebenbei erkannt werden können, sind Fern-NOEs weniger leicht zu identifizieren. Dabei halfen anfangs einzelne auffällige, schon bekannte chemische Verschiebungen. Später wurde aus der Kristallstruktur von Vetter *et al.*<sup>19</sup> eine Homologiestruktur von RanBP2<sup>BD2ΔN</sup> bestimmt. Die von dieser Struktur her zu erwartenden NOESY-Spektren wurden berechnet („rückgerechnet“). Im Vergleich mit ihnen war es möglich, in den experimentellen Spektren eine Reihe weiterer Signale zu identifizieren. Die meisten der bekannten langreichweitigen NOEs wurden auf diese Weise zugeordnet.

## 2.2.11 Die Faltblattstruktur von RanBP2<sup>RanBD2ΔN</sup>

### 2.2.11.1 NOE-Kontakte

Anhand der Homologiestruktur konnte gezielt nach typischen NOE-Kontakten und Hinweisen auf Wasserstoffbrücken zwischen den erwarteten antiparallelen  $\beta$ -Strängen gesucht werden. Die Kreuzsignale zwischen  $\alpha$ -Protonen aus benachbarten  $\beta$ -Strängen sind auf Grund geringer Abstände von rund 0,23 nm besonders stark und sehr nützlich um die gegenseitige Anordnung vorhandener  $\beta$ -Stränge herauszufinden. Sie treten allerdings nur im 2D NOESY-Spektrum auf.  $H^N/H^N$ - und  $H^\alpha/H^N$ -Kontakte zwischen  $\beta$ -Strängen wurden im 3D NOESY-<sup>15</sup>N-HSQC identifiziert. Insgesamt wurden 68 für regelmäßige Faltblätter typische und 23 weitere strangübergreifende NOEs gefunden.

### 2.2.11.2 Austauschraten von Amidprotonen

Schwer zugängliche und/oder in Wasserstoffbrücken eingebundene Amidprotonen stehen in relativ langsamem Austausch mit Wasserstoffkernen aus dem Lösungsmittel. Um herauszufinden, welche Reste das in RanBP2<sup>RanBD2ΔN</sup> betrifft, wurde folgendes Experiment durchgeführt: Eine mit <sup>15</sup>N markierte Probe (in Puffer 3) wurde nach dem Gefriertrocknen in D<sub>2</sub>O gelöst. Anschließend wurde über drei Tage eine Reihe von HSQC-Spektren gemessen. Die meisten Signale verschwanden im Lauf der Zeit infolge des Austauschs der Amidprotonen gegen Deuteronen. Aus den Intensitätsänderungen konnten die zugehörigen Austauschraten bestimmt werden.

---

<sup>19</sup> PDB-Eintrag "1RRP", Kette B

Als Kompromiß zwischen gewünschtem Signal-zu-Rausch-Verhältnis und der möglichen Zahl der Messungen während der ersten Stunden wurde eine Meßdauer von 19 min pro Spektrum gewählt. Weil sich die chemischen Verschiebungen mit der Temperatur ändern und die Zuordnung auch durch das Fehlen der Signale schon ausgetauschter Kerne erschwert wird, wurde die Temperatur von 298 K auch für diese Messungen beibehalten. (Die bei geringerer Temperatur niedrigeren Austauschraten wären besser meßbar und für den Vergleich untereinander ebenso zu gebrauchen.) Viele Signale fehlten schon im ersten Spektrum.

Während der ersten beiden Messungen waren Teile der Probe ausgefallen, was sich durch zeitabhängige Feldinhomogenitäten (Schwankungen des Deuterium-Lock-Signals) bemerkbar gemacht hatte. In beiden Spektren waren anschließend auch die Intensitäten fast aller Signale deutlich geringer als in den später aufgenommenen. Sie wurden daher bei der Bestimmung der Austauschraten nicht berücksichtigt. Um den zeitlichen Verlauf der Intensität zu beschreiben, wurde für jedes Signal  $i$  eine Exponentialfunktion der Form

$$I_i(t) = I_{i,0} \cdot e^{-R_i t} \quad (2.7)$$

an die übrigen Meßdaten angepaßt, wobei  $I_i$  die Intensität,  $t$  die Zeitvariable und  $R_i$  die jeweilige Austauschrate ist. Dazu wurde das Programm Origin in den Versionen 4.1 und 6.0 benutzt, die freien Parameter waren  $I_{i,0}$  und  $R_i$ .

Abbildung 2.18 a) zeigt als Beispiel fünf der so erhaltenen Kurven einschließlich der zugehörigen Meßwerte. Trotz der durch das relativ geringe Signal-zu-Rausch-Verhältnis (teilweise schon im 2. Spektrum kleiner als 5) bedingten Streuung der Werte werden signifikante Unterschiede zwischen den Austauschraten verschiedener Protonen deutlich. Von den beobachteten Signalen klingt dasjenige von Q127 im C-Terminus mit am schnellsten ab. Der Rest A107 in der vorhergehenden Helix dagegen bildet eine Wasserstoffbrücke zu P104 aus. Sein Signal verschwindet daher nur langsam. Die extremen gemessenen Austauschraten sind die des Amidprotons im Rest S25 ( $3,4 \cdot 10^{-4} \text{s}^{-1}$ ) und die desjenigen von L97 ( $2,0 \cdot 10^{-6} \text{s}^{-1}$ ). Schwarze Quadrate über der Sequenz symbolisieren in Abbildung 2.17 Austauschraten unter  $2 \cdot 10^{-5} \text{s}^{-1}$ . Im Anhang sind alle Werte tabelliert.

Abbildung 2.18 b) zeigt die gegen die Sequenz aufgetragenen Schutzfaktoren nach Bai *et al.* [Bai93] (dort: „slowing factors“). Unter Berücksichtigung der sequentiell nächsten Nachbarn wird jedem Rest ein Erwartungswert für die Tauschrate des Amidprotons in ungeordneter Umgebung zugemessen. Das Verhältnis der experimentell bestimmten Rate zu diesem Wert

wird als Schutzfaktor bezeichnet. Es sind alle beobachteten und zugeordneten Werte dargestellt. Die Signale von E109 und E116 fallen in den Spektren praktisch zusammen und ließen sich nicht auflösen. Wegen der Streuung der Meßwerte wurde nicht versucht, an diese eine biexponentielle Kurve anzupassen. Beide Reste liegen in der C-terminalen  $\alpha$ -Helix, es wurde beiden derselbe Schutzfaktor zugeschrieben. Der für W27 eingetragene Wert ist möglicherweise auch dem Rest K28 oder beiden Resten zuzuordnen.

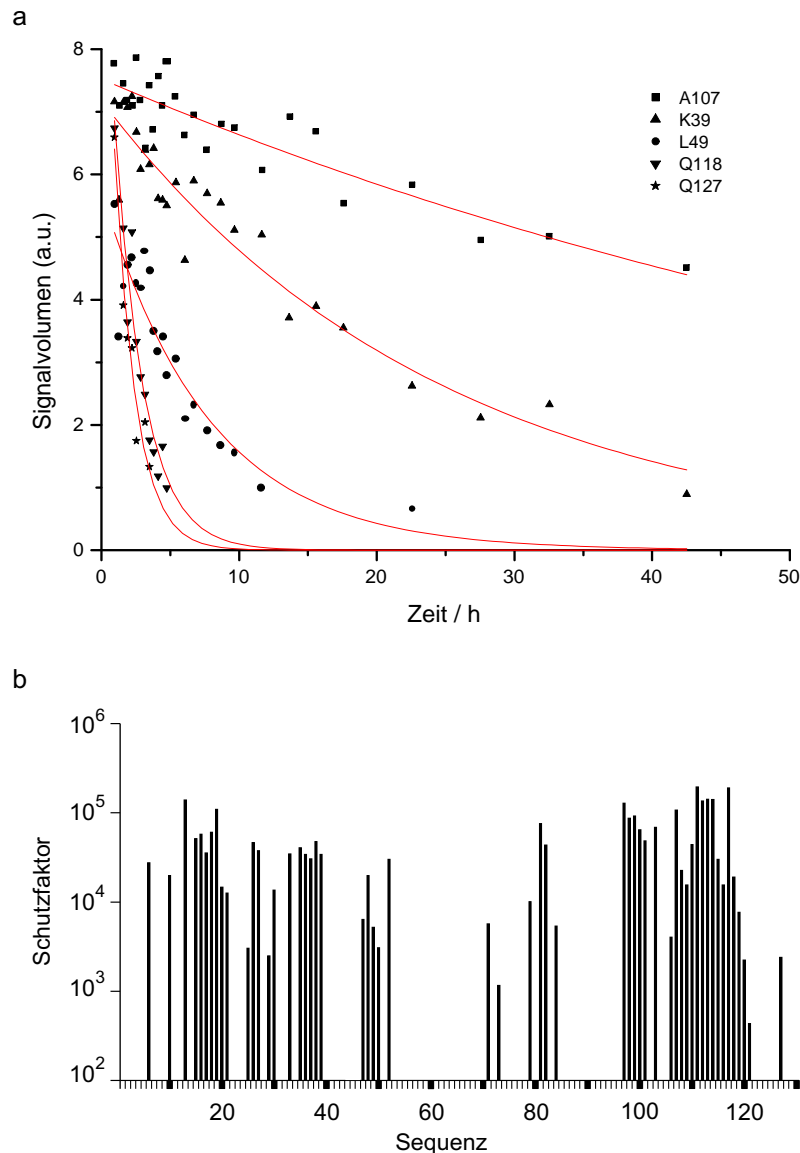


Abbildung 2.18. a) Meßwerte und daran angepaßte Kurven zur Bestimmung der Austauschraten. Die ausgewählten Signale geben die Bandbreite der gemessenen Raten wieder. Rest A107 liegt in einer Helix, das Amidproton ist in eine Wasserstoffbrücke eingebunden. Die Reste K39 und L49 liegen im  $\beta$ -Faltblatt, Q118 folgt auf die Helix, und Q127 gehört zum C-Terminus. b) Die Schutzfaktoren nach Bai *et al.* sind ein Maß für die Verringerung der Austauschraten gegenüber einem sekundärstrukturunabhängigen Erwartungswert [Bai93]. Sie wurden hier gegen die Aminosäuresequenz aufgetragen.

### 2.2.11.3 Überblick

Die gesammelten Informationen zur Faltblatt-Topologie sind in Abbildung 2.19 zusammengefaßt. Alle gefundenen NOE-Kontakte sind als blaue Pfeile dargestellt, die aus Gründen der Übersichtlichkeit zum Teil mit unterbrochenen Linien gezeichnet wurden. Graue Pfeile symbolisieren möglicherweise vorhandene, aber nicht sicher aufgelöste NOEs. Unterbrochene graue Pfeile stehen für Kontakte, deren Vorhandensein eher *unwahrscheinlich* ist, aber aus Auflösungsgründen wegen anderer vorhandener Signale nicht ausgeschlossen werden kann. Vier rote Balken bezeichnen Wasserstoffbrücken, bei denen zu beiden Seiten auch die erwarteten NOEs beobachtet werden, und die mit einer Austauschrate des eingebundenen Protons von weniger als  $2 \cdot 10^{-5} \text{s}^{-1}$  verbunden sind. Vermutete Wasserstoffbrücken, bei denen aber nicht beide Kriterien erfüllt sind, wurden grau eingetragen. Mit Ausnahme derjenigen zwischen den Resten 20 und 96 wurden alle eingezeichneten Wasserstoffbrücken auch bei der Strukturbeurteilung berücksichtigt.



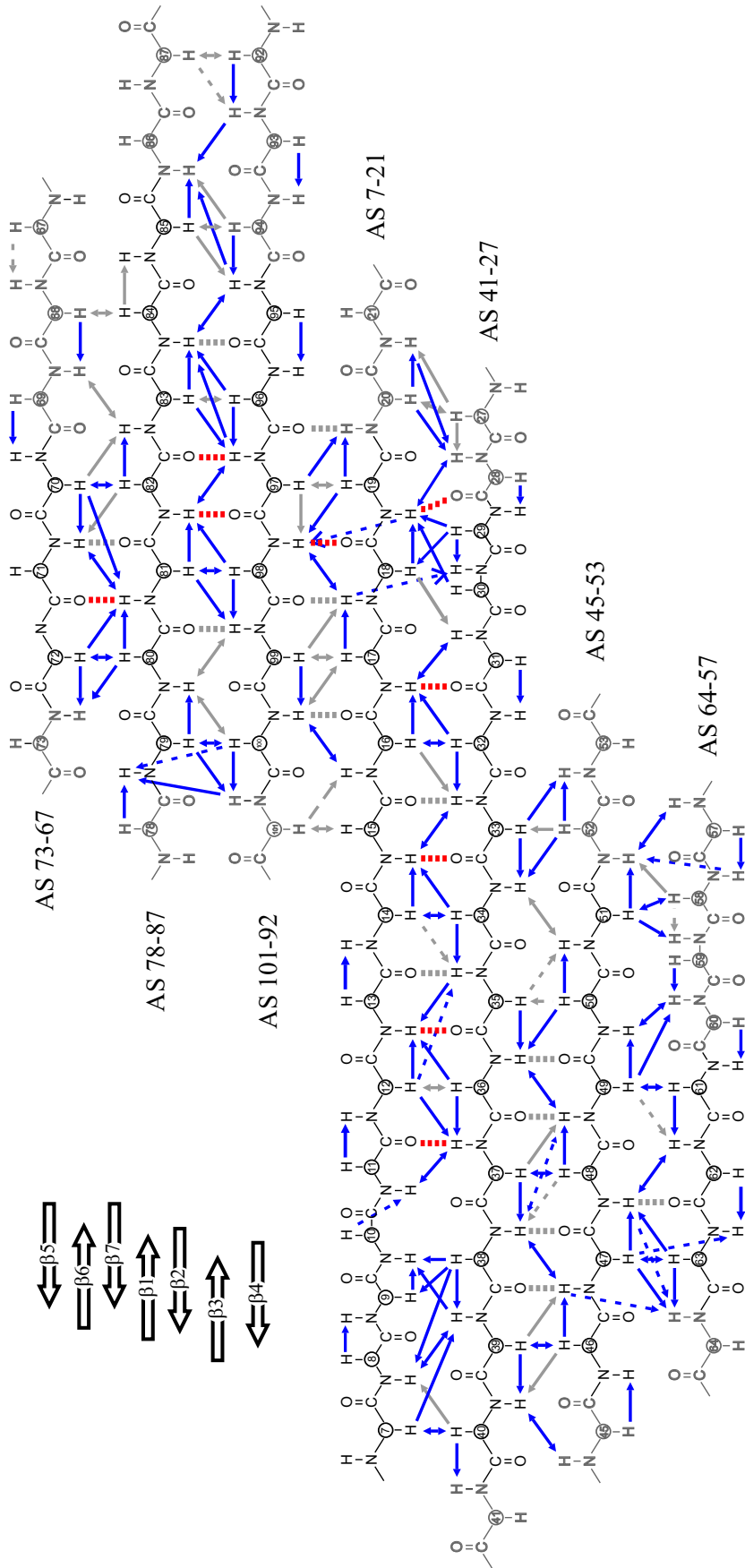


Abbildung 2.19. Faltblatt-Topologie. Die in den Spektren identifizierten NOE-Kontakte sind als blaue Pfeile dargestellt; der Übersichtlichkeit halber zum Teil mit unterbrochenen Linien. Nicht sicher aufgelöste, aber möglicherweise vorhandene, NOEs werden durch graue Pfeile repräsentiert. Unterbrochene graue Pfeile deuten Kontakte an, deren Vorhandensein in den Spektren nicht wahrscheinlich erscheint, aber auch nicht auszuschließen ist (Signalüberlapp). Wasserstoffbrücken sind durch vier kurze Balken dargestellt. Sie wurden rot eingetragen, wenn die Austauschrate des beteiligten Amidprotons unter  $2 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  liegt und zusätzlich die zu erwartenden NOEs zu beiden Seiten beobachtet werden. Graue Balken deuten vermutete Wasserstoffbrückenbindungen an, bei denen diese Kriterien nicht erfüllt sind.

## 2.2.12 Chemische Verschiebungen

Die Sammlung der jetzt bekannten chemischen Verschiebungen in RanBP2Ran<sup>BD2ΔN</sup> ist ein wichtiges Zwischenergebnis: Mit Hilfe dieser Daten lassen sich Bindungsstudien durchführen, bei denen zunächst zu klären ist, wo sich ein anderes Molekül an das Protein spezifisch anlagert. Im Bereich der Kontaktfläche zum Bindungspartner ändern sich die chemischen Verschiebungen dabei normalerweise stärker als in anderen Teilen des Proteinmoleküls. Oft lassen sich die betroffenen Aminosäurereste so im <sup>15</sup>N-HSQC-Spektrum direkt erkennen. Die bislang zugeordneten Resonanzfrequenzen sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Zuordnung der Resonanzen von RanBP2<sup>RanBD2ΔN</sup> bei pH = 6,5 und 298 K, Werte in ppm.

Rest	<sup>13</sup> CO	<sup>15</sup> N	<sup>1</sup> H <sup>N</sup>	<sup>13</sup> C <sup>α</sup>	<sup>13</sup> C <sup>β</sup>	<sup>1</sup> H <sup>α</sup>	<sup>1</sup> H <sup>β</sup>	andere Protonen
G1								
S2	175,1	--	--	58,6	63,7	--	--	
G3	174,6	110,8	8,81	45,6	--	4,16; 4,11	--	
E4	177,1	119,6	8,44	57,0	30,1	4,45	2,05	H <sup>γ</sup> 2,05
E5	176,4	119,6	8,73	57,3	30,0	4,38	2,21; 2,10	H <sup>γ</sup> 2,43
D6	175,7	118,7	8,30	54,8	41,3	4,79	2,94; 2,77	
E7	175,7	118,4	7,86	55,5	32,9	5,05	2,06; 1,95	
K8	176,0	122,1	8,89	54,4	34,9	4,69	1,92	
V9	176,6	123,9	8,91	63,3	31,8	4,26	2,20	H <sup>γ</sup> 1,11; 0,95
L10	177,1	127,7	9,53	55,3	42,7	4,59	1,79; 1,63	
Y11	172,9	118,3	7,69	58,1	42,1	4,65	3,30; 2,44	
S12	172,9	119,3	7,32	56,8	64,5	5,41	3,59; 3,28	
Q13	173,4	125,0	8,60	55,0	35,1	4,54	2,20	
R14	175,7	127,4	8,54	56,9	30,5	4,81	1,86	
V15	173,9	119,1	9,03	58,7	36,7	4,74	1,72	H <sup>γ</sup> 0,63; 0,27
K16	174,2	117,1	7,59	55,7	35,1	4,87	1,70	
L17	175,6	127,1	8,96	53,1	45,9	5,46	1,67; 1,26	
F18	173,7	124,6	9,94	56,4	44,7	5,44	3,28; 2,90	
R19	175,2	117,9	9,44	54,4	34,8	5,76	1,93; 1,71	
F20	173,8	129,8	8,76	58,9	39,2	3,88	2,36; 0,98	
D21	175,7	128,0	8,16	52,3	41,8	4,71	2,87; 2,36	
A22	178,9	126,3	8,79	53,7	18,7	3,89	1,61	
E23	178,4	117,3	8,39	59,2	29,6	4,19	2,30; 2,20	
V24	175,1	106,0	6,73	60,1	32,1	4,55	2,41	H <sup>γ</sup> 0,92; 0,77
S25	173,5	116,3	7,68	58,8	60,9	4,08	3,59	
Q26	174,7	113,9	6,79	53,5	33,9	4,76	2,06; 1,59	
W27	173,8	122,9	9,04	57,9	29,7	4,76	3,21; 2,97	
K28	176,2	123,1	9,09	54,3	35,4	5,01	2,03	
E29	176,3	124,6	9,25	58,2	30,3	3,66	1,94	
R30	175,4	125,7	9,59	54,9	31,8	4,70	1,68	
G31	169,7	103,2	7,34	45,6	--	4,32; 4,10	--	
L32	176,2	121,6	8,30	53,9	40,9	5,30	1,60	
G33	170,9	108,0	8,29	45,2	--	4,65; 4,08	--	
N34	173,6	117,5	8,91	52,9	38,5	5,19	2,84; 2,42	
L35	174,4	130,3	9,25	54,8	44,7	4,76	2,11; 1,54	
K36	175,5	123,1	9,12	54,4	36,9	5,74	1,92	
I37	175,4	117,5	8,27	61,1	39,5	5,09	1,76	
L38	175,5	127,5	9,65	53,7	45,7	5,50	1,87; 1,65	
K39	175,1	120,0	9,23	54,2	36,9	5,28	1,87; 1,64	
N40	176,3	127,1	9,13	53,5	39,2	4,97	3,61; 3,00	
Fehler	0,17	0,17	0,02	0,4	0,6	0,11	0,11	0,11

Struktur der Ranbindedomäne

Rest	<sup>13</sup> C <sup>O</sup>	<sup>15</sup> N	<sup>1</sup> H <sup>N</sup>	<sup>13</sup> C <sup>α</sup>	<sup>13</sup> C <sup>β</sup>	<sup>1</sup> H <sup>α</sup>	<sup>1</sup> H <sup>β</sup>	andere Protonen
E41	177,0	125,6	9,14	58,3	30,4	4,32	2,31; 2,09	
V42	177,4	118,4	8,62	64,8	32,1	4,07	2,36	H <sup>γ</sup> 2,10
N43	177,0	113,2	7,88	51,8	39,3	4,97	3,15; 2,69	
G44	174,1	108,4	8,00	46,4	--	4,19; 3,83	--	
K45	176,2	118,2	8,10	57,9	34,1	4,14	1,71	
L46	176,1	120,6	8,48	53,3	46,9	5,80	1,89; 1,46	
R47	--	123,9	9,54	54,7	36,4	5,29	1,88	
M48	173,9	123,2	9,07	54,2	35,3	5,43	1,42	
L49	175,1	123,3	8,65	53,0	47,7	5,11	1,57; 1,41	
M50	174,3	124,9	8,97	55,5	37,6	5,26	1,94	
R51	175,5	125,7	8,81	54,3	32,6	5,11	1,76; 1,53	
R52	176,6	123,1	8,80	56,6	32,2	4,31	2,09; 1,76	
E53	178,1	122,0	9,13	57,2	30,0	4,32	2,20	
Q54	177,2	116,9	9,25	61,0	28,0	3,94	2,48	
V55	176,3	115,7	8,78	62,3	32,8	4,30	2,27	H <sup>γ</sup> 1,10; 0,88
L56	175,7	115,4	7,93	56,4	38,5	4,25	2,12; 1,57	
K57	176,4	117,9	6,51	55,5	34,6	4,54	1,77	
V58	176,2	127,3	9,11	64,3	32,0	4,30	2,26	H <sup>γ</sup> 1,20; 1,14
C59	172,6	121,9	9,11	57,4	30,4	4,93	3,04; 2,52	
A60	175,5	121,2	7,66	52,9	21,2	4,81	1,38	
N61	172,3	121,1	9,77	52,4	37,6	5,29	2,63; 2,28	
H62	173,4	117,1	8,34	54,3	31,6	4,62	3,55; 3,22	
W63	178,0	118,6	8,64	56,1	30,3	5,73	3,72	
I64	175,2	122,7	8,75	62,6	38,3	4,64	1,78	
T65	176,4	114,6	7,40	59,2	71,7	5,24	4,86	H <sup>γ</sup> 1,51
T66	175,3	109,5	8,99	64,4	68,7	4,55	4,19	H <sup>γ</sup> 1,44
T67	175,0	107,6	7,55	61,5	68,9	4,54	--	H <sup>γ</sup> 1,37
M68	174,5	122,3	7,03	57,0	35,3	4,59	2,42	
N69	173,1	119,6	8,51	52,4	41,7	5,17	2,92; 2,82	
L70	176,8	120,7	8,53	54,3	42,1	5,03	1,18	H <sup>γ</sup> 0,97; H <sup>δ</sup> -0,01; -0,16
K71	--	122,5	9,32	53,2	34,8	5,31	1,89; 1,71	
P72	176,4	--	--	63,2	31,7	4,63	2,32; 1,89	
L73	--	123,2	7,64	53,9	43,4	4,32	1,51; 0,68	
S74	175,5	121,1	8,49	59,7	62,5	3,89	--	
G75	173,7	111,0	8,66	45,3	--	4,18; 3,81	--	
S76	174,1	111,9	7,78	57,1	64,9	4,76	3,72; 3,48	
D77	176,2	124,8	8,28	52,8	40,6	4,74	3,12; 2,73	
R78	172,5	114,7	8,38	53,9	28,7	4,53	1,74; 1,21	
A79	176,4	118,7	7,08	51,3	24,4	5,78	1,19	
W80	174,0	117,7	8,27	54,5	36,5	5,68	3,72; 3,14	
M81	174,8	117,8	10,21	53,9	37,3	6,17	2,39; 1,86	
W82	177,5	119,4	9,36	57,8	32,2	5,30	3,18	
L83	176,7	119,9	8,37	53,7	44,5	5,33	1,73	
A84	175,6	124,2	9,00	50,8	22,6	4,71	0,77	
S85	172,7	115,2	8,08	56,9	61,3	4,82	4,04; 3,85	
D86	176,2	126,8	8,89	55,1	46,0	5,09	2,96; 2,36	
F87	177,3	121,5	8,88	56,4	38,4	5,29	3,50; 2,96	
S88	175,0	118,2	8,69	63,4	--	5,30	4,10; 3,70	
D89	176,0	118,1	8,53	53,8	41,6	5,08	2,98; 2,74	
G90	173,0	108,4	7,76	45,8	--	4,54; 3,72	--	
D91	175,3	121,0	8,07	53,8	41,9	4,77	2,80; 2,64	
A92	177,6	122,7	8,39	52,7	18,8	4,38	1,38	
K93	174,9	122,1	8,55	55,0	35,6	4,70	1,92; 1,60	
L94	176,7	124,3	8,54	55,6	41,7	4,87	1,70	
E95	174,3	125,8	9,28	54,4	33,7	4,97	2,07; 1,63	
Q96	173,8	121,1	9,05	55,1	30,4	5,07	2,09; 1,92	
L97	174,9	125,4	8,63	52,9	45,5	5,47	0,81; 0,37	
A98	175,4	115,3	8,35	51,0	24,0	5,42	0,69	
A99	174,4	120,9	8,95	49,9	22,1	5,48	1,27	
K100	175,5	120,4	9,12	55,1	35,9	5,03	2,07; 1,66	
F101	176,8	124,9	9,05	57,2	42,7	4,70	3,32; 3,01	
Fehler	0,17	0,17	0,02	0,4	0,6	0,11	0,11	0,11

Rest	<sup>13</sup> C <sup>O</sup>	<sup>15</sup> N	<sup>1</sup> H <sup>N</sup>	<sup>13</sup> C <sup>α</sup>	<sup>13</sup> C <sup>β</sup>	<sup>1</sup> H <sup>α</sup>	<sup>1</sup> H <sup>β</sup>	andere Protonen
K102	177,2	117,9	9,25	59,5	33,7	4,21	2,14	
T103	--	100,8	7,21	57,4	70,3	5,19	4,90	H <sup>γ</sup> 1,37
P104	178,8	--	--	65,1	32,3	4,43	2,65; 2,06	
E105	180,2	117,2	9,02	61,0	28,7	4,19	2,30; 2,07	
L106	179,9	120,5	8,03	57,6	41,9	4,37	1,92	
A107	181,1	122,7	7,68	54,9	17,1	2,95	1,38	
E108	178,3	122,1	8,77	59,4	29,1	4,42	2,27	
E109	178,5	120,0	8,06	59,5	29,6	4,14	2,33	
F110	175,6	118,3	7,69	61,3	39,6	3,88	3,40; 2,63	
K111	177,5	118,6	7,47	59,2	32,2	3,15	1,82; 0,94	
Q112	179,2	115,3	8,00	58,8	28,1	4,05	2,19	
K113	178,5	119,8	8,13	57,1	30,4	4,08	1,69; 1,36	
F114	177,0	121,6	8,95	62,3	39,1	3,45	2,66	
E115	179,6	116,7	8,19	59,5	28,9	3,95	2,15; 2,02	
E116	179,4	120,0	8,06	59,6	29,9	4,01	2,28	
C117	176,3	116,7	8,23	63,6	25,8	4,08	2,99; 2,51	
Q118	177,9	117,5	8,09	59,3	29,4	3,61	1,81	
R119	178,6	116,4	7,57	59,1	29,7	4,10	2,02	
L120	179,2	117,7	7,68	56,7	41,6	4,30	2,11; 1,71	H <sup>γ</sup> 1,98; H <sup>δ</sup> 0,90
L121	178,0	116,5	7,49	55,9	42,2	4,30	2,00; 1,65	
L122	177,0	117,9	7,53	55,5	42,4	4,35	1,86; 1,67	
D123	173,0	118,9	7,94	54,3	41,0	4,74	2,88; 2,68	
I124	--	121,1	7,79	59,3	38,6	4,51	1,98	H <sup>γ1</sup> 1,67; 1,27; H <sup>γ2</sup> 1,05; H <sup>δ</sup> 0,98
P125	176,8	--	--	63,2	32,1	4,54	2,39; 1,96	
L126	172,2	121,3	8,30	55,3	42,4	4,40	1,76	
Q127	175,7	120,3	8,39	55,5	29,7	4,54	2,22; 2,09	H <sup>γ</sup> 2,47
T128	--	117,1	8,27	59,8	69,6	4,71	4,27	H <sup>γ</sup> 1,38
P129	176,0	--	--	63,4	32,0	4,54	2,41; 2,03	
K130	--	126,2	8,06	57,7	33,1	4,26	1,94; 1,83	
Fehler	0,17	0,17	0,02	0,4	0,6	0,11	0,11	0,11

Tabelle 2.8. Zusammenfassung der gemessenen Resonanzfrequenzen.

Während die Verschiebungen vieler Seitenkettenprotonen noch unbekannt sind, konnten über 95 % aller beobachtbaren Resonanzen aus der Hauptkette und 99 % derjenigen der  $\beta$ -Kohlenstoffkerne identifiziert werden. Im einzelnen sind die Resonanzfrequenzen von 94 % der Carbonylkohlenstoffkerne, 99 % der  $\alpha$ -Kohlenstoffe und je 98 % der  $\alpha$ -Protonen und der Amidgruppenkerne bekannt.

### 2.2.13 Restraints

Bevor die Strukturberechnung mit ihren Resultaten dargestellt wird, soll ein kurzer Überblick über die dabei verwendeten Restraints (struktureinschränkende Bedingungen) als weiteres Zwischenergebnis gegeben werden.

Dabei sind an 662 (knapp 80 %) der NOE-Einschränkungen nur Hauptkettenkerne beteiligt, oder sie sind intraresidual. Nur 11 der Kontakte besteht allein zwischen Seitenkettenprotonen. Damit sind die Daten insgesamt stark hauptkettenbezogen und wegen der fehlenden Informa-

tion über die Seitenketten des Proteins bei weitem nicht vollständig. Unter hohem Zeitaufwand lassen sie sich im Wechsel mit Strukturrechnungen und der Zuordnung weiterer Resonanzen ergänzen bzw. korrigieren.

intraresiduale NOEs	272
sequentielle NOEs	313
NOEs mittlerer Reichweite	106
Fern-NOEs	139
Winkelschränkungen	156
vermutete Wasserstoffbrücken (11 davon helikal)	29
Summe aller Einschränkungen	1015
Einschränkungen pro Rest, Mittelwert	7,8

Tabelle 2.9. Übersicht über die Zahl der gefundenen und in die Strukturberechnung einbezogenen struktureinschränkenden Bedingungen.

Abbildung 2.20 gibt eine Übersicht über die Zahl der bisher bekannten NOE-Kontakte jedes Aminosäurerests.

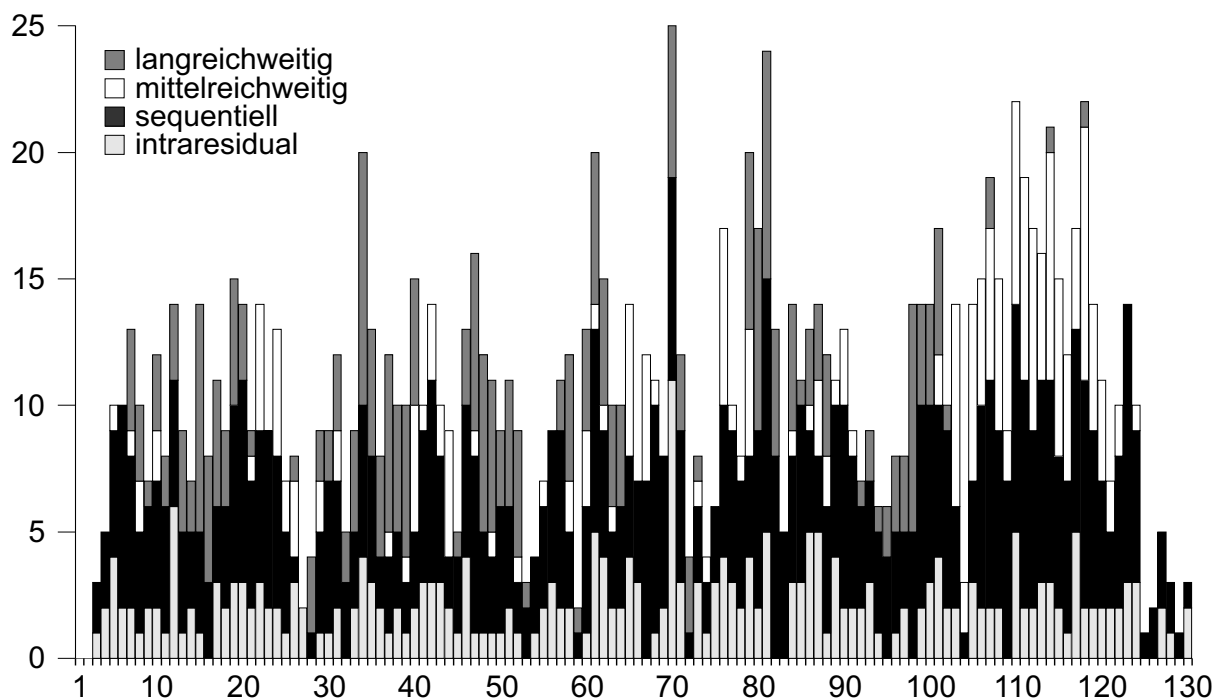


Abbildung 2.20. Zu jedem Rest ist die Zahl der bekannten NOE-Kontakte dargestellt. Als sequentiell sind Kontakte zwischen direkt benachbarten Resten bezeichnet (Positionen  $i, i+1$ ). Kontakte in einer Kette von maximal 5 benachbarten Resten ( $i, \dots, i+4$ ) sind als Kontakte mittlerer Reichweite, sonstige Kontakte als langreichweitig bezeichnet.

### 2.2.14 Strukturrechnung

Die Strukturrechnung wurde mit den oben genannten und im Anhang aufgelisteten Restraints durchgeführt. Dazu wurde das Programm CNS [Bru98] verwendet. Abbildung 2.21 zeigt eine der 10 energetisch besten von 200 berechneten Strukturen in zwei verschiedenen Ansichten.

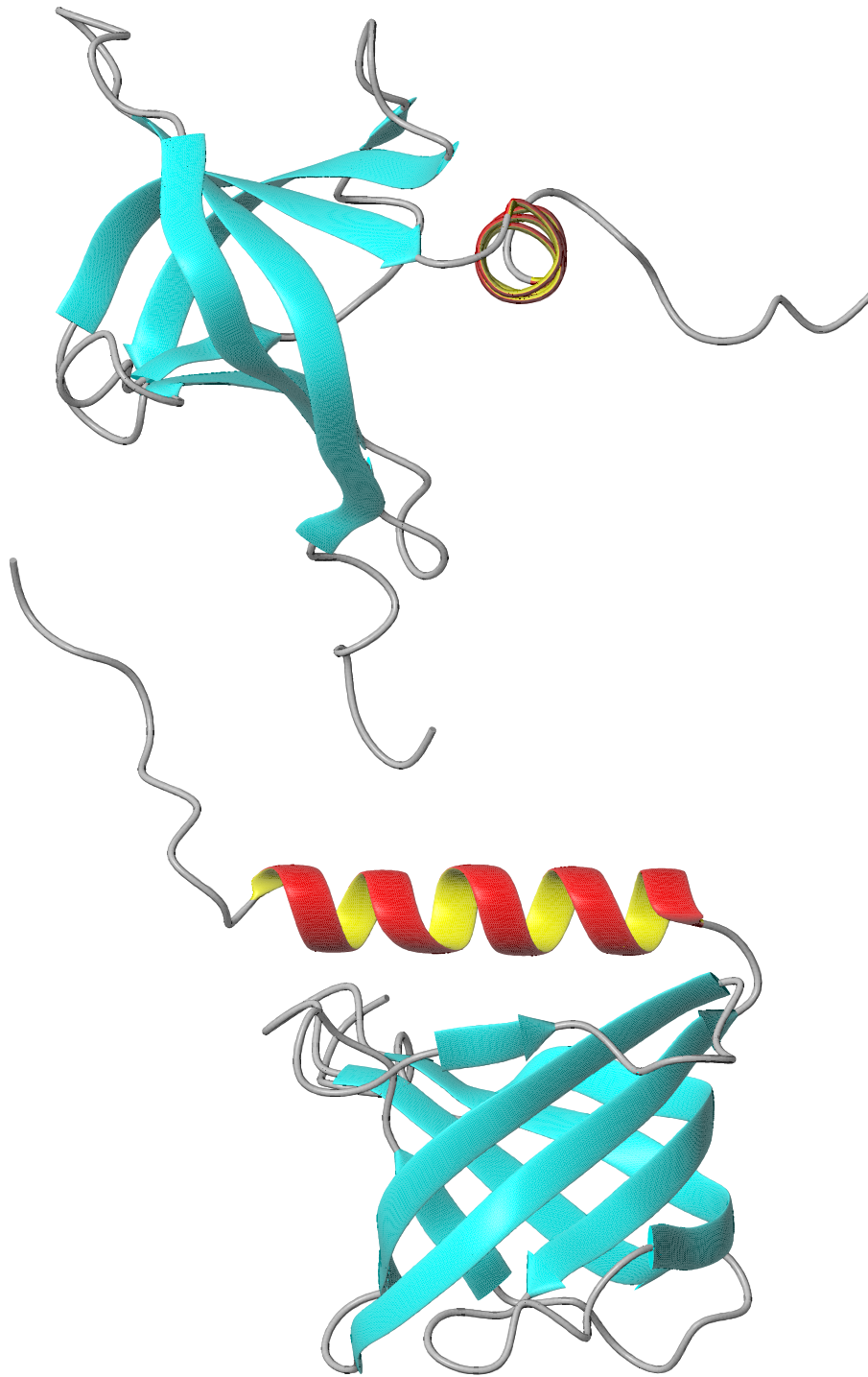


Abbildung 2.21. Die energetisch beste von 200 berechneten Strukturen in zwei Ansichten, Bänderdarstellung. Blau:  $\beta$ -Stränge, rot und gelb: C-terminale  $\alpha$ -Helix.

Die vorhandenen  $\beta$ -Stränge sind als blaue Bänder mit Pfeilspitzen, die  $\alpha$ -Helix ist als rot-gelbes Band dargestellt. Insgesamt besteht die Ranbindedomäne aus einem „ $\beta$ -barrel“ bzw. „orthogonal sandwich“ mit C-terminaler, deckelartig aufliegender  $\alpha$ -Helix. Das „Faß“ wird da bei von zwei 4- und 3-strängigen Faltblättern gebildet. Der mittlere RMSD-Wert aller zehn Struk-

turen ist 0,37 nm, ohne die 6 N-terminalen und 13 C-terminalen Reste 0,25 nm. Für die C<sup>α</sup>-Atome allein liegt er bei 0,30 nm bzw. 0,15 nm. Die mit PROCHECK-NMR abgeschätzte räumliche Auflösung der Strukturfamilie liegt zwischen 0,24 nm und 0,39 nm. Das Programm Rfac gibt für eine der 10 besten Strukturen und das 2D NOESY-Spektrum einen R-Wert von 0,79; ohne die Berücksichtigung nicht zugeordneter Signale liegt er je nach der betrachteten Gruppe von Signalen (von intraresidualen bis zu Fern-NOEs) zwischen 20 % und 30 %. Die mittleren Energiebeiträge in der Strukturfamilie sind unten tabelliert (Tabelle 2.10).

Statistik für die zehn besten von 200 berechneten Strukturen		
Beitrag / kJmol <sup>-1</sup>	Mittelwert	Fehler
E <sub>gesamt</sub>	13223	± 773
E <sub>NOE</sub>	6043	± 473
E <sub>Torsion</sub>	896	± 169
E <sub>Bindg</sub>	1005	± 25
E <sub>Winkel</sub>	2652	± 266
E <sub>vdW</sub>	1885	± 196
E <sub>Dieder</sub>	741	± 125
NOE-Verletzungen > 0,02 nm	18	± 3
RMSD / nm, Reste 7-117		± 0,25

Tabelle 2.10. Statistik zur Strukturrechnung: Energien.

Abbildung 2.22 zeigt das Ramachandran-Diagramm einer der Strukturen. Die mit Hilfe des Programms GRASP [Nic91] erstellte Abbildung 2.23 schließlich stellt das elektrostatische Potential an der Moleküloberfläche dar. Die Ansicht ist dieselbe, wie diejenige im oberen Teil der Abbildung 2.21. In der Bildmitte oben ist deutlich ein Bereich mit positivem Potential (blau) zu erkennen. An Bereiche dieses „basic patch“ bindet möglicherweise der saure C-Terminus von Ran in der GTP-Form [Vet99a, Nil01].

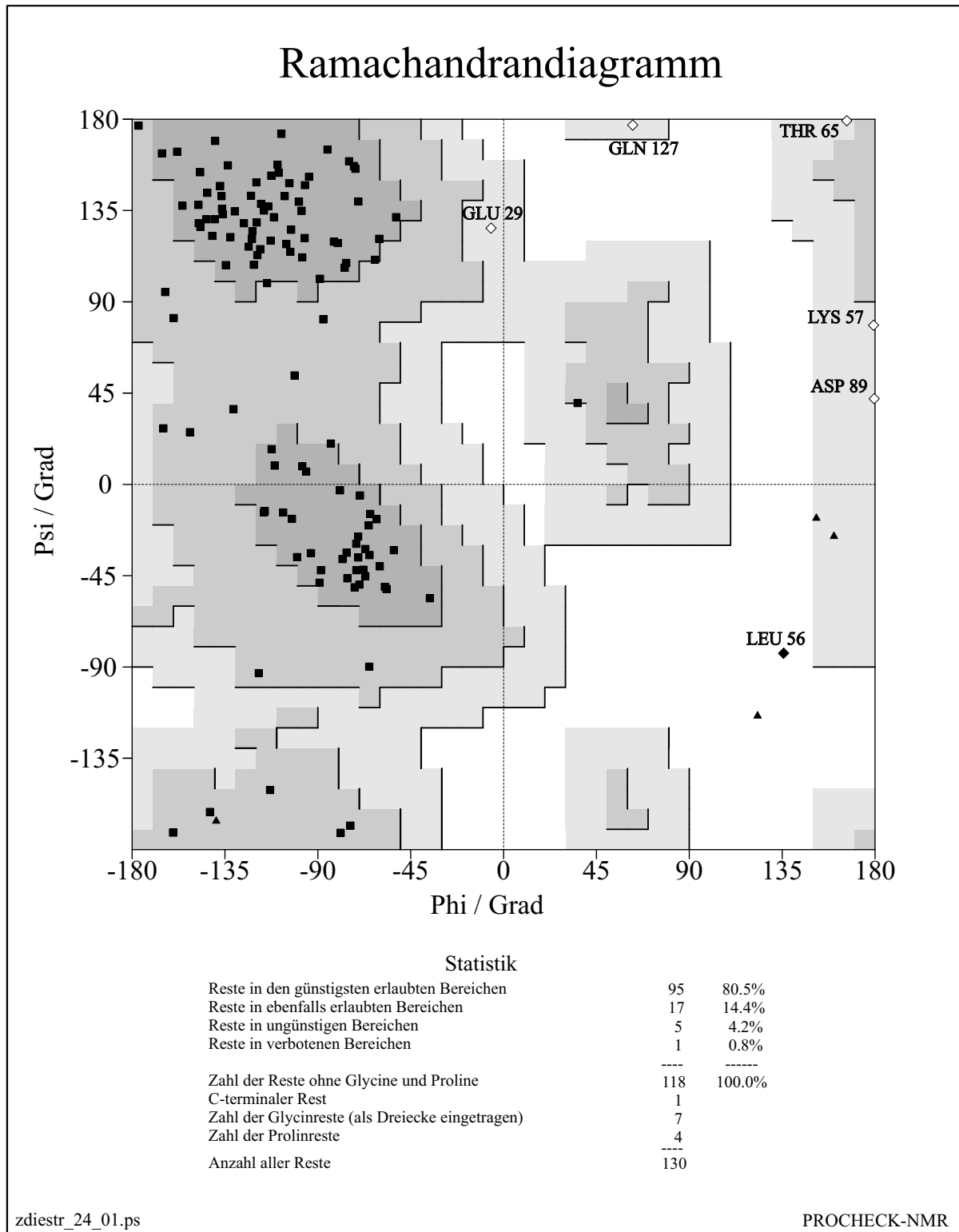


Abbildung 2.22. Das mit PROCHECK-NMR erstellte Ramachandran-Diagramm für die schon in Abbildung 2.21 gezeigte Struktur.



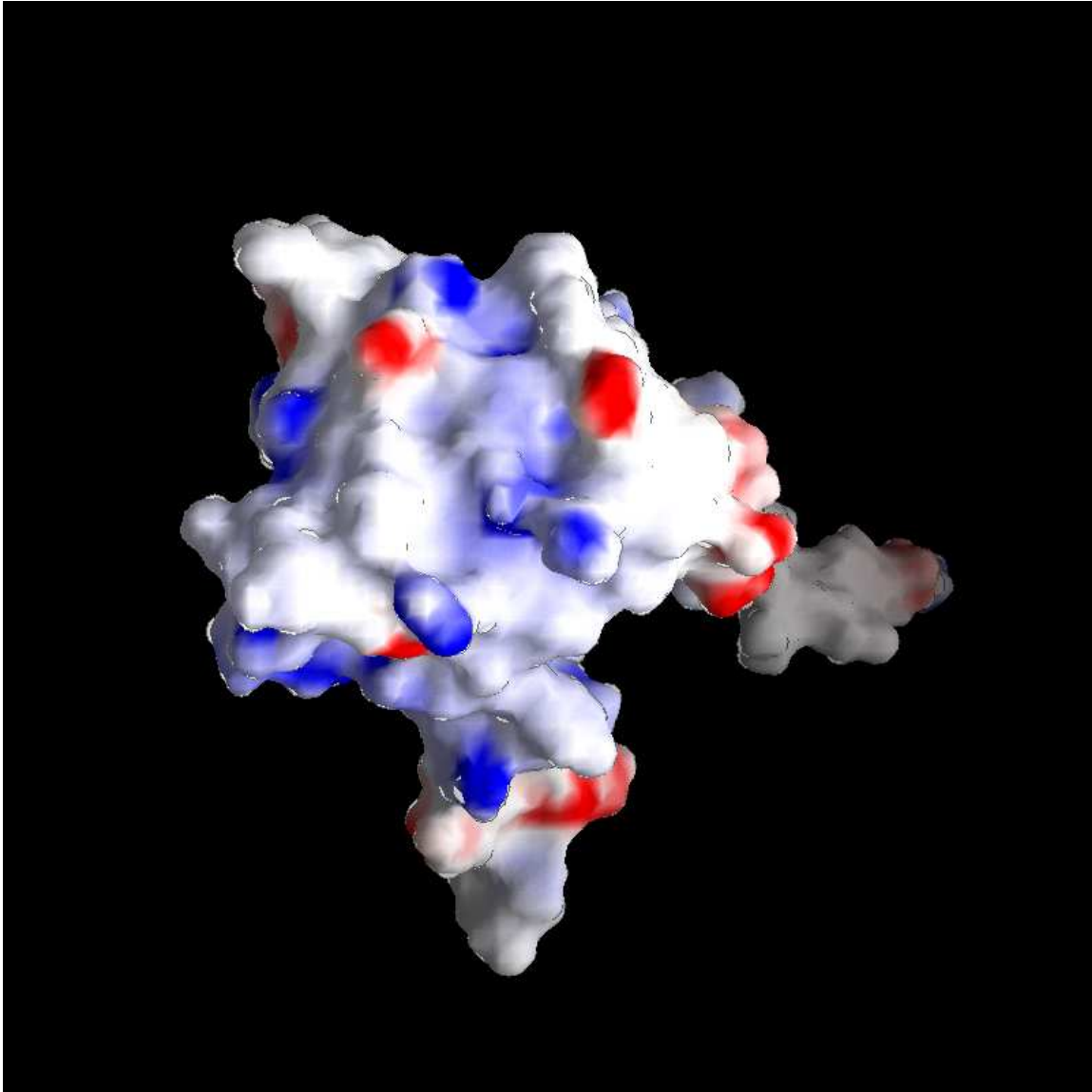


Abbildung 2.23. Oberflächenpotential von RanBP2<sup>RanBD2ΔN</sup>, Ansicht wie in Abbildung 2.21 oben. Blau gefärbte Flächen zeigen ein positives, rote ein relativ negatives elektrostatisches Potential an.

## 2.3 Diskussion

### 2.3.1 Die Qualität der Struktur

#### 2.3.1.1 Auflösung und Vollständigkeit der Signalzuordnung

Die Werte der im Teil „Material und Methoden“ als Qualitätskriterien bezeichneten Größen sind für die errechnete Struktur<sup>20</sup> von RanBP2<sup>RanBD2ΔN</sup> bislang nicht optimal. Ein R-Wert unter 0,3, besser um 0,2, wäre erwünscht. Allerdings ist der Wert von fast 0,8 in diesem Fall weniger ein direktes Maß für die Qualität der Struktur als eines für die Unvollständigkeit der Seitenkettenzuordnung. Deren Auswirkung auf die Konvergenz der Strukturrechnung wird an den mit ProcheckNMR gewonnenen Schätzwerten für die Auflösung deutlich. In den größeren der beiden in Kapitel 2.2.14 angegebenen Werte (0,39 nm) gehen Standardabweichungen von Torsionswinkeln der Seitenketten ein, der kleinere Wert (0,24 nm) berücksichtigt die Verteilung der Reste im Ramachandrandiagramm, also Hauptkettentorsionswinkel. Die Betonung des Proteinrückgrats in den experimentellen Struktureinschränkungen spiegelt sich auch in den mit Molmol berechneten RMSD-Werten der 10 Strukturen wieder: Ohne Berücksichtigung der N- und C-terminalen Reste liegen sie bei 0,25 nm für alle Atome und 0,15 nm für die Hauptkette allein. An den unstrukturierten Termini ist die Lage der Kette wenig präzise definiert. Das ist in Abbildung 2.24 dargestellt, welche die übereinandergelegten Hauptketten der Strukturfamilie zeigt. Für die bedingte Konvergenz der Rechnung auf eine einheitliche Struktur hin sind in diesem Bereich wohl nicht nur fehlende NOE-Kontakte, sondern auch eine tatsächlich erhöhte Beweglichkeit der Peptidkette verantwortlich. Nachweisen ließe sich das anhand von Relaxa-

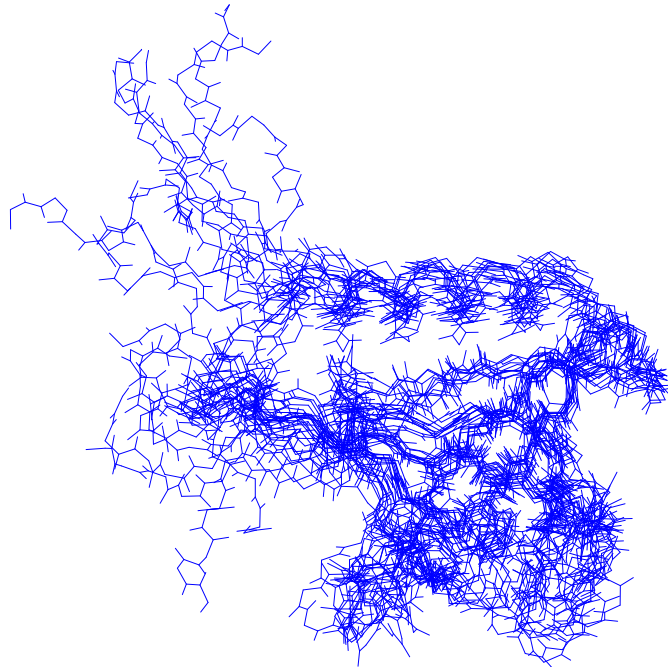


Abbildung 2.24. Darstellung der übereinandergelegten Hauptketten der Strukturfamilie (10 von 200 Strukturen). Oben die Helix, links daran der C-Terminus, daunter der N-Terminus.

<sup>20</sup> eigentlich: die Familie der zehn energetisch günstigsten von 200 berechneten Strukturen

tionszeitmessungen für die Amidgruppen.

Der strukturierte Teil des Rückgrats wird nicht unwesentlich durch Wasserstoffbrücken und die mit dem Programm Talos geschätzten Torsionswinkel mitbestimmt. Diese Struktureinschränkungen beruhen mittelbar auf den experimentellen Daten. Austauschraten lassen, in Verbindung mit entsprechenden NOEs, weitgehend zuverlässig, wenn auch nicht absolut sicher, auf Wasserstoffbrücken schließen. Talos verwendet statistische Informationen über schon bekannte Strukturen. Der direkte Nachweis von Wasserstoffbrücken ist im Fall der Ranbindedomäne auf Grund der Größe des Proteins wahrscheinlich nur in wenigen Fällen möglich; die Bestimmung von Torsionswinkeln mit dem J-Kopplungsexperiment COSY (Correlation Spectroscopy) hat, zumindest im ursprünglich verwendeten Trispuffer, nicht funktioniert. Nachdem zwischen dem ersten HNCA-Experiment an der vollständigen Domäne und dem für die Zuordnung schließlich verwendbaren HNCA der verkürzten Domäne knapp 2 Jahre und 10 Monate lagen, wurde auf eine Wiederholung vorerst verzichtet. Sinnvoller und effektiver für die Optimierung der Strukturrechnung wäre zunächst auch die Zuordnung weiterer Seitenkettensignale. Diese ist wegen der Überlagerung sehr vieler Signale und wegen der Unterschiede zwischen den in 3D und in 2D Protonenspektren gemessenen Frequenzen sehr zeitaufwendig. Die Differenzen zwischen den Spektren sind hauptsächlich auf experimentell bedingte Temperaturunterschiede bei den einzelnen Messungen zurückzuführen; teilweise auch auf die geringere Auflösung der 3D Spektren. Um RMSD-Werte unter 0,1 nm zu erhalten, ist es aber letztlich notwendig, die Resonanzfrequenzen eines Großteils aller Seitenkettenprotonen zu kennen. Bislang ist die Lage der  $\alpha$ -Helix nur durch zwei NOE-Kontakte festgelegt, und auch zur Überprüfung struktureller Details werden weitere Resonanzfrequenzen benötigt. Ob Proline hauptsächlich in trans- oder cis-Konformation vorliegen, läßt sich zum Beispiel durch NOE-Kontakte ihrer  $\delta$ -Protonen feststellen.

Betrachtet man die tabellierten Energiebeiträge zur berechneten Struktur (Tabelle 2.10), so fällt auf, daß Bindungslängen und -winkel, aber auch van-der-Waals-Radien verletzt werden. Wahrscheinlich sind die aus den NOE-Volumina abgeschätzten Abstände insgesamt eher kurz bemessen. In dieser Hinsicht wäre möglicherweise die Verwendung der Kontakte weiter voneinander entfernter Protonen als Kalibriersignale vorteilhaft.

### 2.3.1.2 Rückrechnung

Kritischer Beachtung bedarf die Verwendung der Homologiestruktur zur schon bekannten ersten Ranbindedomäne bei der NOE-Zuordnung. Bei dieser Vorgehensweise wird die Strukturberechnung scheinbar von vornherein durch das zu erwartende Ergebnis beeinflusst.

Der erste Gebrauch von der Kristallstruktur wurde im Verlauf der sequenzspezifischen Zuordnung gemacht. Die zu erwartenden Sekundärstrukturelemente wurden als Hinweise in die Zuordnung einbezogen. Ein Beispiel ist der Versuch, Spinsysteme mit ausgeprägten, auf eine helikale Umgebung hindeutenden NOE-Kontakten womöglich zunächst C-terminal in die Sequenz einzupassen. Am Ende durften dann aber keine der gemessenen chemischen Verschiebungen, beispielsweise von  $C^\alpha$ - und  $C^\beta$ -Kernen, im Widerspruch zu denen der angenommenen Nachbarn stehen. Da eine vollständig zusammenhängende Kette gefunden wurde, und weil keine zwei Spinsysteme durchweg dieselben Frequenzen aufweisen, ist die Zuordnung der Hauptkettensignale weitgehend abgesichert und im Ergebnis unabhängig von der Kristallstruktur. Geringe Unsicherheiten bestehen auf Grund der Auflösung der 3D Spektren, eventuell auch wegen nicht zugeordneter Resonanzen im  $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum. Die Amidgruppen der Reste W27 und K28 haben annähernd dieselben chemischen Verschiebungen. Ihre Signale sind nicht voneinander zu trennen, die Positionen in HNCA und NOESY-HSQC erscheinen sogar miteinander vertauscht. Da die Reste sequentiell direkte Nachbarn sind, ist das Problem lokal eng begrenzt; es ist anzunehmen, daß hier das HNCA die zuverlässigere Information bietet. Die „überzähligen“ Signale im HSQC sind wohl nicht der Hauptkette zu zuordnen; Pendants in den Tripelresonanzspektren fehlen. Es bleibt also der zweite, nicht beobachtete Rest, S2, als Unsicherheitsfaktor. Die Strukturrechnungen geben keinen Hinweis auf das Vertauschen zweier Reste. In Hinblick auf die Hauptkettenzuordnung hat die sehr eingeschränkte Verwendung der Kristallstruktur sicher nicht zu einem Zirkelschluß geführt.

Nach der Zuordnung der Amidgruppenresonanzen des Rückgrats standen praktisch sofort die chemischen Verschiebungsindizes, Schätzwerte für dihedrale Winkel (Talos) sowie ein Überblick über die meisten der sequentiellen NOEs zur Verfügung. Diese Daten bestätigen nun weitgehend die Übereinstimmung der Sekundärstrukturelemente einerseits im Kristall und bei der nicht komplexierten, gekürzten Domäne in Lösung andererseits. Beide Domänen sind einander also strukturell sehr ähnlich. Damit erschien es gerechtfertigt, auch weiterhin auf die Homologiestruktur zurückzugreifen. Das geschah in zweierlei Hinsicht: Zum einen wurden,

wie im Teil „Material und Methoden“ schon erwähnt, die rückgerechneten NOESY-Spektren mit den experimentellen verglichen. Im Fall von nicht zugeordneten, aber aufgelösten Signalen, deren Frequenzen in beiden Spektren übereinstimmen, wurde die Hypothese aus dem rückgerechneten Spektrum als Zuordnung des experimentellen Signals übernommen. Zum anderen wurde dabei gezielt nach NOE-Kontakten gesucht, welche die Topologie der  $\beta$ -Faltblätter beschreiben. Dies betrifft insbesondere Kontakte zwischen  $H^\alpha$ -Kernen aus verschiedenen  $\beta$ -Strängen. Dabei reicht in regelmäßigen Faltblättern ein gefundener solcher Kontakt aus, um alle weiteren gezielt suchen bzw. vorhersagen zu können.

Bei diesem Vorgehen war die Auswertung der Daten klar an der Homologiestruktur orientiert, letzten Endes muß aber auch ein auf diese Weise gefundenes Strukturmodell zu den experimentellen Daten passen. Die Bestimmung der Abstände blieb auf die Berechnung oder Schätzung der experimentellen Signalvolumina gegründet. Bei der Zuordnung von  $H^\alpha/H^\alpha$ -Kontakten wurde immer auch nach weiteren Möglichkeiten gesucht, ein bestimmtes experimentelles Signal zu erklären. Anhand der bei den Kontakten  $H^\alpha(81)/H^\alpha(98)$  und  $H^\alpha(81)/H^N(99)$ <sup>21</sup> auftretenden charakteristischen chemischen Verschiebung konnte insbesondere die relative Lage der Stränge Nr. 6 und Nr. 7 zueinander unabhängig von der Kristallstruktur festgelegt werden.

Schließlich wurden deutliche Anhaltspunkte für das Vorhandensein eines siebten  $\beta$ -Strangs (sequentiell Strang Nr. 5) gefunden, der in der Kristallstruktur fehlt.

Die Ähnlichkeit der beiden Bindungsdomänen zu nutzen hat die Strukturberechnung für RanBP2<sup>RanBD2 $\Delta$ N</sup> also nicht verfälscht; es wurde hingegen viel Zeit gespart. Zur Zuordnung weiterer Signale kann die aktuelle Struktur der zweiten Bindedomäne selbst für Rückrechnungen verwendet werden.

### 2.3.2 Die Topologie der Ranbindedomäne

Im Teil „Ergebnisse“ wurde schon, ohne eine Definition der einzelnen vorhandenen  $\beta$ -Stränge, ein Überblick zur Topologie des  $\beta$ -barrel gegeben. Die Grundlage dafür bildeten NOE-Kontakte zwischen den Strängen, sequentielle Kontakte und Austauschraten von Amidprotonen. Auch die chemischen Verschiebungen stehen für das Erkennen von Sekundärstrukturelementen zur Verfügung: in Form von Verschiebungsindizes bzw. in Form von geschätzten dihedralen Winkeln (Talos), die auch direkt in die Strukturrechnung eingingen. Diese Daten erge-

---

<sup>21</sup> Die Positionen der zugehörigen Reste sind in Klammern angegeben.

ben in Hinblick auf die Termini und die Länge der  $\beta$ -Stränge kein ganz einheitliches, eindeutiges Bild.

Die sequentiellen Kontakte  $d_{\alpha N}$  (2.21) sind im Bereich der Helix und von loops meist schwach, in  $\beta$ -Strängen relativ stark ausgeprägt. Dies gilt aber nicht generell. Obwohl der N-Terminus unstrukturiert erscheint, sind diese Kontakte dort sehr stark. So läßt sich eher anhand von NOEs mittlerer Reichweite auf loops zwischen den  $\beta$ -Strängen schließen, als daß die Stränge selbst durch spezifische NOEs gekennzeichnet sind.

Da die Stränge im  $\beta$ -barrel andererseits deutlich gekrümmt, teilweise in sich verdreht sind, finden sich solche NOEs mittlerer Reichweite allerdings nicht exklusiv in den Bereichen von loops und Helix. Sie markieren aber die Helix besonders deutlich; um Rest 104 beginnend und bis zum Rest L120 reichend. Die für  $\alpha$ -Helizes typischen Kontakte  $d_{\alpha N}(i, i+4)$  sind dabei nur bis zum Rest C117 zu beobachten.

Dies stimmt mit den beobachteten Austauschraten gut überein. Relativ langsame Tauschraten der Amidprotonen ( $< ca. 10^{-5} s^{-1}$ ) dürften meist auf Wasserstoffbrücken hinweisen. Die Werte liegen für die Reste L106, A107, C117 und Q118 bei  $2 \cdot 10^{-5} s^{-1}$ ,  $4 \cdot 10^{-6} s^{-1}$ ,  $10^{-5} s^{-1}$  und  $10^{-4} s^{-1}$ . Der Wert für E105 konnte nicht gemessen werden und sollte also über  $3 \cdot 10^{-4} s^{-1}$  liegen. Das Amidproton von Q118 ist, ebenso wie diejenigen der C-terminal folgenden Reste, nicht mehr in eine Wasserstoffbrücke eingebunden. Die Helix erstreckt demnach stabil vom Rest E105 bis nach C117 (Glu2130-Cys2142).

Die bei Betrachtung auch der chemischen Verschiebungen und strangübergreifenden NOEs zu erwartenden Sekundärstrukturelemente wurden in Tabelle 2.11 zusammengefaßt. Ihnen sind die der energetisch günstigsten berechneten *Einzelstruktur* gegenübergestellt.

	Strang 1	Strang 2	Strang 3	Strang 4	Strang 5	Strang 6	Strang 7	Helix 1
<b>erwartet</b>	2032-2044	2053-2065	2071-2076	2086-2088	2095-2097	2104-2111	2118-2125	2130-2142
<b>berechnet</b>	2034-2045	2054-2064	2071-2077	2085-2087	2095-2096	2103-2112	2117-2126	2129-2145

Tabelle 2.11. Die Verteilung der Sekundärstrukturelemente, beschrieben durch die Positionen der beteiligten Reste in RanBP2. Oben: Hypothese nach Sichtung der Daten. Unten: Ergebnis einer von 200 Strukturrechnungen.

Da auch die zehn besten Strukturen sich nicht unwesentlich voneinander unterscheiden (RMSD = 2,5 Å), sind Länge und Lage der  $\beta$ -Stränge nicht genau festzulegen. Einer der Stränge fehlt bei 3 der zehn Strukturen sogar ganz, wird also durch das Programm Molmol

nicht als solcher erkannt bzw. akzeptiert. Es handelt sich dabei um den fünften Strang, der möglicherweise nicht sehr stabil ist. Während die chemischen Verschiebungen in diesem Bereich für  $\beta$ -Stränge typisch sind, spricht der nicht ganz schwache Kontakt zwischen den Amidprotonen der Reste K70 und L71 vielleicht gegen das Vorhandensein eines  $\beta$ -Strangs. Die Intensität dieses NOE ist eventuell aber auch auf Spindiffusionseffekte gegründet. Fern-NOEs zwischen den Resten 70-72 einerseits und 80-82 andererseits sowie eine Wasserstoffbrücke zwischen den Resten 71 und 81 sprechen dagegen für den  $\beta$ -Strang. Da die chemischen Verschiebungen in der Regel sehr zuverlässige Indikatoren für die Sekundärstruktur sind, kann seine Existenz als gesichert gelten.

### 2.3.3 Strukturvergleich: RanBP2<sup>RanBD2 $\Delta$ N</sup> und RanBP2<sup>RanBD1</sup>•RanGppNHp

Vergleicht man die Strukturen der beiden RanGTP bindenden Domänen, so fällt zunächst eben das Auftreten des genannten fünften  $\beta$ -Strangs allein in der zweiten Domäne auf. Er ist auch fester Bestandteil anderer PH-Domänen [Vet99a]. In der Ranbindedomäne erscheint er vergleichsweise kurz und ist wohl das am wenigsten stabile der bei den Berechnungen gefundenen Sekundärstrukturelemente. Nachdem die beiden Domänen einander grundsätzlich so sehr ähnlich sind, ist dieser Unterschied zwischen ihnen eventuell auf das Vorliegen der ersten Bindedomäne im Komplex mit RanGppNHp zurückzuführen. Der von der zweiten Domäne abgeschnittene N-Terminus ist als Ursache allerdings ebenfalls nicht völlig auszuschließen. Damit wird hier möglicherweise eine funktionell bedingte Strukturänderung beobachtet. Ein weiterer Unterschied betrifft den vorhergehenden  $\beta$ -Strang (Nr. 4), der in der Lösungsstruktur um zwei Positionen zum C-Terminus hin verschoben ist. Die geringen, aber vorhandenen, Differenzen in Position und Ausdehnung der Sekundärstrukturelemente beider Domänen sind nicht spezifisch mit der Konservierung von Aminosäureresten korreliert. Insbesondere wechseln sich im Bereich des fünften  $\beta$ -Strangs konservierte und nicht übereinstimmende Reste ab. Einen Überblick dazu bietet Abbildung 2.25. Sehr deutliche Differenzen gibt es bei den elektrostatischen Potentialen auf den Moleküloberflächen. Diese sind, ebenso wie die genaue äußere Gestalt der Moleküle, stark von der Anordnung der Seitenketten abhängig. Wegen der in dieser Hinsicht sehr unvollständigen NMR-Abstandsdaten wäre der Versuch, Korrelationen von Bindungszuständen und Potentialen festzustellen aber sehr spekulativ. Die deutlichen Unterschiede von Form und Oberflächenpotentialen sind nicht auf den Bereich um

den vermuteten fünften Strang beschränkt. Ein Vergleich der Bänderdarstellung beider Moleküle zeigt, daß das „barrel“ der zweiten Bindedomäne eingeschnürt erscheint (Abb. 2.26, Ansicht wie in Abb. 2.21 oben). Diese Unterschiede in der Hauptkettenkonformation sollten sich auch stark auf die Moleküloberfläche auswirken.



Abbildung 2.25. Sequenzen und beobachtete Sekundärstrukturelemente der beiden Ranbindedomänen BD1 und BD2 von RanBP2 im Vergleich (Ausschnitt). Unter der im Einbuchstabenkode wiedergegebenen Sequenz ist jeweils die zugehörige Sekundärstruktur gezeigt. Oben: BD1, direkt darunter BD2, beide weiter unten fortgesetzt. Im Fettdruck: konservierte Reste, bei Übereinstimmung in allen vier Bindedomänen zusätzlich unterstrichen. Pfeile symbolisieren  $\beta$ -Stränge, eine Zickzacklinie die Helix. Der nicht grau ausgefüllte Teil der Helix am C-Terminus von BD2 ist durch typische NOE-Kontakte im NOESY-Spektrum, aber fehlende Wasserstoffbrücken, gekennzeichnet. Der nicht ausgefüllte Pfeil markiert den bei BD1 nicht vorhandenen, aber in einer PH-Domäne erwarteten  $\beta$ -Strang. Schwarze Quadrate über der Sequenz der BD1 markieren in der Kristallstruktur gefundene Kontakte zu RanGppNHp. Der hier nicht dargestellte N-Terminus weist weitere solche Kontakte auf [Vet99a].

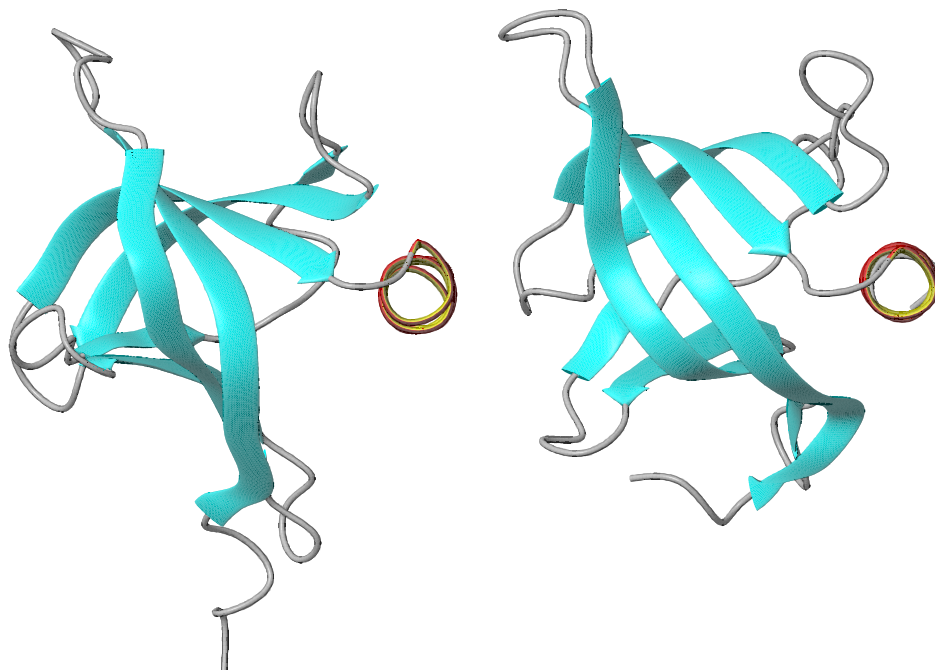


Abbildung 2.26. Bänderdarstellung der Strukturen von RanBP2<sup>RanBD2AN</sup> (links) und von RanBP2<sup>RanBD1</sup> (rechts). Links erscheint das von den Faltblättern gebildete „Faß“ eingeschnürt.



### 2.3.4 Zusammenfassung

Die N-terminal verkürzte Ranbindedomäne RanBP2<sup>RanBD2ΔN</sup> wurde mit NMR-spektroskopischen Methoden untersucht; Ziel war die Bestimmung ihrer Lösungsstruktur. Es wurde eine – für die Hauptkette des Proteins weitgehend vollständige – Liste der Resonanzfrequenzen zusammengestellt, die direkt einfache Bindungsstudien ermöglicht. Die gesammelten Daten zeigen eine weitgehende strukturelle Übereinstimmung mit der ersten Ranbindedomäne von RanBP2 auf, deren Kristallstruktur im Komplex mit RanGppNHp seit 1999 bekannt ist. Im Detail sind deutliche Unterschiede festzustellen. Sie hängen möglicherweise tatsächlich mit Bindungs- bzw. Funktionszustand des Moleküls zusammen, dies ist anhand der bisher vorliegenden Daten allerdings nicht sicher nachzuweisen.

### 2.3.5 Ausblick

Der vorangehende Teil der Diskussion hat deutlich gemacht, daß für eine präzisere Strukturberechnung zunächst weitere NOE-Kontakte zugeordnet werden müssen. Einige der verwendeten Einschränkungen sind noch zu modifizieren. Zu gering erscheinende Abstände verzerren die Struktur teilweise. Dies ist zum Beispiel in der Bänderdarstellung an der Helix zu erkennen. Ihre Form ist in der zweiten Hälfte nicht ganz regelmäßig, Folge eines zu eng gewählten Restraints, der noch nicht korrigiert wurde.

Um die Zuordnung vervollständigen zu können ist die Wiederholung der Experimente NOE-SY-<sup>13</sup>C-HSQC und HCCH-TOCSY mit einer frischen Probe geplant. Auch der direkte Nachweis von Wasserstoffbrücken sollte wohl versucht werden. Dr. Werner Kremer hat unterdessen Restdipolkopplungen der Amidgruppen gemessen; die 25 resultierenden zusätzlichen Restraints bewirken keine deutliche Änderung der berechneten Strukturen.

Mit Hilfe der älteren Spektren können die Signale der später abgeschnittenen N-terminalen Aminosäurereste eventuell noch identifiziert werden. Diese Reste sind für die Bindung an RanGppNHp essentiell, und Bindungsstudien etwa mit RanGTP bzw. RanGppNHp daher ohne Kenntnis des N-Terminus nur von eingeschränktem Nutzen. Abbildung 2.27 gibt ein grobes, von strukturellen Details unabhängiges, Schema für die Koaktivierung von RanGAP durch ein Ranbindeprotein wieder [Gör99b]. Die Kristallstrukturen von Importin β und RanGppNHp [Vet99b] sowie RanGppNHp und RanBP2<sup>RanBD1</sup> [Vet99a] lassen erwarten, daß der N-Terminus der Bindedomäne an der dargestellten Lockerung oder Lösung der Bindung

zwischen Exportrezeptor und RanGTP entscheidend beteiligt sein könnte [Vet99b]. In der Arbeitsgruppe um Dr. I. Vetter und Prof. A. Wittinghofer wurde kürzlich auch die Röntgenstruktur von RanGAP im Komplex mit RanGppNHp und RanBP2<sup>RanBD1</sup> gelöst, die Veröffentlichung steht kurz bevor. Möglicherweise ist damit das Zusammenspiel der Proteine zur Termination des Kernexports weitgehend verstanden. Mit der NMR-Spektroskopie können eventuell Beiträge zur Aufklärung von Details geleistet werden. Voraussetzung ist das Gelingen der Signalzuordnung im N-Terminus der Ranbindedomäne. Diese muß auch nach bindungsbedingten Konformationsänderungen gewährleistet sein, die in der an sich weitgehend unstrukturierten Peptidkette mit deutlichen Änderungen chemischer Verschiebungen verbunden sein dürften.

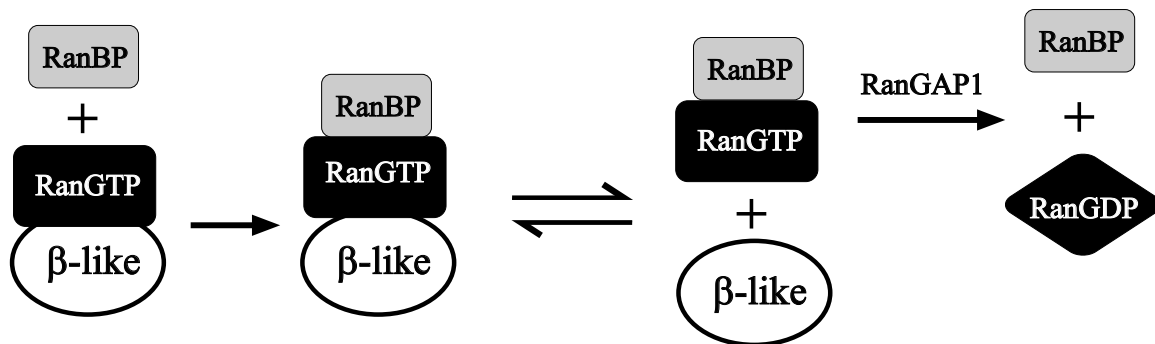


Abbildung 2.27. Zur Koaktivierung von RanGAP durch RanBP1 oder RanBP2. Transientes Lösen oder Lockern der Bindung zwischen RanGTP und importinartigem Exportrezeptor, Hydrolyse durch RanGAP. (In Anlehnung an Gör99b.)

Eine weitere Aufgabe für die NMR-Spektroskopie liegt in der Überprüfung und gegebenenfalls Bestätigung auf die Kristallstrukturen gegründeter Hypothesen. So ist C-Terminus von Ran mit dem Motiv DEDDDL für die Bindung an eine Ranbindedomäne ebenso wichtig wie deren N-Terminus. Es soll sich je nach dem Bindungszustand der GTPase an einen positiv geladenen Teil der Oberfläche („basic patch“) von Ran selbst (Reste 139-142) oder von RanBP2<sup>RanBD1</sup> anlagern [Nil01, Vet99a]. Erste Titrationsversuche mit dem kurzen Peptid DEDDDL und RanBP2<sup>RanBD2ΔN</sup> haben die stärksten Veränderungen der <sup>15</sup>N-HSQC-Spektren im Bereich der Reste 2119, 2120 und 2122 gezeigt, nicht aber im erwarteten Bereich (Reste 2039, 2041, 2103, 2125, 2127). Hier stehen weitere Experimente aus, zunächst beispielsweise mit längeren Peptiden.

Unabhängig von Strukturuntersuchungen bieten auch die biochemischen Methoden weiterhin immer neue Aspekte zu RanBP2. So wurde kürzlich eine Domäne in RanBP2 (Rind) gefun-

den, die gewebeabhängig bestimmte Kinesine bindet [Cai01]. RanBP2 ist also nicht nur ein mögliches Chaperon für Opsine und am Kerntransport beteiligt, sondern erfüllt weitere Aufgaben. Möglicherweise ist auch die Gruppierung von 4 Ranbindedomänen in diesen Zusammenhang zu stellen und dient nicht allein zur Erhöhung der Effizienz des Kerntransportsystems.

### 3 Dynamik der Rasbindedomäne von RalGDS

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Geräte, Datenbank

NMR-Spektrometer: Avance DMX500, mit Tripelresonanz-Probenkopf (Bruker)

Protein Data Bank: <http://www.rcsb.org/pdb/> [Ber77]

##### 3.1.2 Software

Aurelia [Nei95]	Auswertung von NMR-Spektren
Clustal X / W [Tho97, Tho94]	Sequenzalignment
CorelDraw 9.0 (Fa. Corel)	Erstellen von Abbildungen
GSview 4.0 (Ghostgum Software)	Umformatierung von Texten und Graphiken
Modelfree 4.0, 4.10* [Pal91, Man95]	Auswertung von Relaxationsdaten
Molmol 2.6 und 2K.1 [Kor96]	Darstellung, Bewertung von Proteinstrukturen
Office97 (Fa. Microsoft)	Tabellenkalkulation, Textverarbeitung
Origin, Version 4.1 (Fa. Microcal)	Kurvenanpassungen, Darstellung von Meßdaten
PDBINERTIA *	Trägheitstensorberechnung aus PDB-Datei
TMEST *	Abschätzung von Rotationsdiffusionskonstanten aus Relaxationsraten
XWINNMR (Fa. Bruker)	Aufnahme und Bearbeitung von NMR-Spektren

\* von Prof. Arthur G. Palmer, III. via Internet der Allgemeinheit zur Verfügung gestellt:  
<http://cpmcnet.columbia.edu/dept/gsas/biochem/labs/palmer>

##### 3.1.3 Proteinkonstrukt

Das verwendete Protein wurde in der Arbeitsgruppe von Dr. Christian Herrmann am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund hergestellt. Es umfaßt die Aminosäurereste 798-884 von RalGDS (Mensch) mit einem Molekulargewicht von 10039,7 Da (bei <sup>15</sup>N-Markierung: 10157,7 Da). Die Sequenz lautet:

```
DCCIIRVSLD VDNGNMYKSI LVTSQDKAPA VIRKAMDKN LEEEEPEDYE LLQILSDDRK
LKIPENANVF YAMNSTANYD FVLKKRT
```

Im folgenden sind diese Rest von 11 bis 97 durchnummeriert. Diese Zählung bezieht sich auf die zur Rasbindedomäne von RalGDS gehörenden Reste. Die zehn N-terminalen Reste fehlen.

### 3.1.4 Pufferbedingungen

20 mM  $KP_i$ , pH = 6,9, 3 mM DTE, 0,5 mM  $NaN_3$ , 0,5 mM EDTA, 0,1 mM DSS, 5-8 %  $D_2O$   
 Die Proteinkonzentration der verwendeten Probe lag zwischen 1 mM und 1,2 mM.

## 3.2 Methoden

In der Einleitung wurde der Zusammenhang von molekularer Bewegung und meßbaren Relaxationszeiten sowie NOEs angedeutet. Er wird hier zunächst knapp skizziert, bevor die entsprechenden, an den Hauptkettenamidgruppen der Ras bindenden Domäne von RalGDS (Mensch) durchgeführten, Messungen vorgestellt werden. Ausführliche Darstellungen bietet die Literatur [Gol88, Cav96, Ven95].

### 3.2.1 Dynamik von Molekülen – Konzepte des „Modelfree“-Ansatzes

#### 3.2.1.1 Relaxationsmechanismen

Im folgenden wird nur die Relaxation von Amidstickstoffkernen betrachtet. Die wichtigsten Relaxationsmechanismen von Proteinen in Lösung sind dann die Dipol-Dipol-Wechselwirkung der Spins untereinander sowie die Anisotropie der chemischen Verschiebung (CSA). Dabei ist vorausgesetzt, daß keine Wechselwirkungen mit ungepaarten Elektronen und keine Quadrupol-Wechselwirkungen zwischen Kernen mit Spinquantenzahlen  $I > 1/2$  auftreten, die sonst dominant wären. Relaxation durch skalare Kopplung wird in der Regel vernachlässigt. Wegen der Elektronenkonfiguration des Wasserstoffs spielt die CSA als Relaxationsmechanismus für Protonen zwar eine untergeordnete Rolle, ist aber für Stickstoffkerne nicht vernachlässigbar.

#### 3.2.1.2 Meßbare Größen

Die Relaxationsraten  $R_1$  und  $R_2$  sowie das „Nuclear Overhauser Enhancement“ für Amidstickstoffkerne lassen sich als Funktion der spektralen Dichte  $J(\omega)$ , auf die weiter unten eingegangen wird, schreiben [Cav96]:

$$R_1 = d/4 [J(\omega_H - \omega_N) + 3 J(\omega_N) + 6 J(\omega_H + \omega_N)] + c J(\omega_N), \quad (3.1)$$

$$R_2 = d/8 [4 J(0) + J(\omega_H - \omega_N) + 3 J(\omega_N) + 6 J(\omega_H) + 6 J(\omega_H + \omega_N)] \\ + c/6 [4 J(0) + 3 J(\omega_N)] + R_{ex}, \quad (3.2)$$

$$NOE = 1 + d/(4 R_1) \gamma_H/\gamma_N [6 J(\omega_H + \omega_N) - J(\omega_H - \omega_N)]. \quad (3.3)$$

Dabei ist  $d = (\mu_0 / 4\pi)^2 \hbar^2 \gamma_H^2 \gamma_N^2 r_{HN}^{-6}$  und  $c = (\sigma_{\parallel} - \sigma_{\perp})^2 \omega_N^2 / 3$ , wobei  $\mu_0$  die magnetische Feldkonstante,  $\hbar$  das  $1/2\pi$ -fache des Planckschen Wirkungsquantums ist.  $\gamma_i$  sind die gyromagnetischen Verhältnisse von Proton und Stickstoff,  $\omega_i$  die zugehörigen Larmor-Frequenzen, und  $r$  ist der mittlere Abstand beider Kerne in Amidgruppen.  $(\sigma_{\parallel} - \sigma_{\perp})$  ist die Anisotropie der chemischen Verschiebung<sup>22</sup>. Der zusätzliche Term  $R_{ex}$  in Gl. 3.2 beschreibt durch chemischen Austausch bedingte Anteile von  $R_2$ , alle anderen Terme rühren von CSA und Dipol-Dipol-Wechselwirkung her. In den Gleichungen 3.1 bis 3.2 ist vorausgesetzt, daß die Relaxation des Stickstoffkerns durch die Wechselwirkung mit dem Amidproton dominiert wird, eine Beteiligung weiterer Kerne wird vernachlässigt.

$R_1$  und  $R_2$  sind makroskopisch (etwa durch die Blochschen Gleichungen<sup>22</sup>) definiert. Es bleibt das „Nuclear Overhauser Enhancement“ zu definieren:  $NOE$  in Gl. 3.3 ist das Verhältnis der unterschiedlichen longitudinalen Magnetisierungen des Stickstoffkerns, einerseits bei dauernder Sättigung allein des Protonenübergangs, andererseits im thermodynamischen Gleichgewicht. Diese Definition läßt sich anhand der Solomon-Gleichung für zwei Spins  $I$  und  $S$  erläutern: Für die  $z$ -Komponenten (d.h. zum äußeren Magnetfeld parallelen Komponenten) der durch den Spin  $I$  hervorgerufenen Magnetisierung gilt die Solomon-Gleichung [Sol55]:

$$\frac{d\Delta M_{zI}}{dt} = -\Delta M_{zI} \rho_I - \Delta M_{zS} \sigma_{IS}. \quad (3.4)$$

Dabei bezeichnet  $\Delta M_{zi}$  die Differenz zur Gleichgewichtsmagnetisierung für den Kern  $i$ .  $\rho_I$  auf der rechten Seite heißt Autorelaxationsrate. Der zweite Term, mit der Kreuzrelaxationsrate  $\sigma_{IS}$ , ist für den Kernoverhauserereffekt (NOE) verantwortlich. Eine entsprechende Gleichung gilt für die zeitliche Änderung von  $\Delta M_S$ . Mögliche zusätzliche, von der Kopplung der Spins  $I$  und  $S$  unabhängige Relaxationswege [Hau91] sind in Gl. 3.4 nicht berücksichtigt. Für das Gleichgewicht im Sättigungsfall gilt

$$\frac{d\Delta M_{zN}}{dt} = -(M_{zN} - M_{0N}) \rho_N + M_{0H} \sigma_{NH} = 0. \quad (3.4b)$$

Hierbei sind  $M_{0N}$  und  $M_{0H}$  die Magnetisierungen von Stickstoff bzw. Proton im thermodynamischen Gleichgewicht,  $M_{zN}$  die des Stickstoffs bei Sättigung der Protonenresonanz,  $M_{zH} = 0$  die entsprechende, verschwindende, Magnetisierung des Protons. Nach Division durch  $M_{0N}$  erhält man:

<sup>22</sup> s. Anhang B

$$NOE \equiv \frac{M_{zN}}{M_{0N}} = 1 + \frac{\gamma_H}{\gamma_N} \cdot \frac{\sigma_{NH}}{\rho_N}. \quad (3.5)$$

Die Gleichungen 3.1, 3.2 und 3.3 verknüpfen meßbare Größen mit der spektralen Dichtefunktion, die wiederum von der Molekülbewegung abhängt.

### 3.2.1.3 Korrelationsfunktion und spektrale Dichtefunktion

Der Begriff der Bewegung ist hier stets im Zusammenhang mit einer Umorientierung des Verbindungsvektors von Amidstickstoff und Amidproton zu sehen. Diese erfolgt für alle Amidgruppen gemeinsam gegenüber dem äußeren Magnetfeld, bei molekülinterner Beweglichkeit der einzelnen Gruppe auch zusätzlich gegenüber einem molekülfesten Bezugssystem. Der Zusammenhang der Orientierungen zu verschiedenen Zeitpunkten wird, gemittelt über ein Ensemble vieler Moleküle, durch die Korrelationsfunktion  $G(\tau)$  beschrieben,  $\tau$  ist dabei die betrachtete zeitliche Differenz. Der Realteil der Fouriertransformierten von  $G(\tau)$  heißt spektrale Dichte(funktion)  $J(\omega)$ . Ihre einfache, explizite Frequenzabhängigkeit ist nur für die Molekülbewegung in isotropen Flüssigkeiten bei genügend hoher Temperatur (etwa Raumtemperatur) gegeben [Cav96].

### 3.2.1.4 Spektrale Dichtefunktionen

Für die isotrope rotatorische Diffusion eines starren Kugelkreisels ist die Korrelationsfunktion  $G(\tau)$  gegeben durch:

$$G(\tau) = \frac{1}{5} \exp(-\tau / \tau_c), \quad (3.6)$$

wobei die rotatorische Korrelationszeit  $\tau_c$  die Zeit ist, welche das Molekül durchschnittlich für eine Drehung um 1 Radiant benötigt [Cav96]. Die zugehörige spektrale Dichte ist

$$J(\omega) = \frac{2}{5} \frac{\tau_c}{(1 + \omega^2 \tau_c^2)}. \quad (3.7)$$

Für ein längliches, axialsymmetrisches Molekül, das nicht isotrop diffundiert, hat Woessner die spektrale Dichte angegeben [Woe62]. Sie hängt von zwei Korrelationszeiten ab, derjenigen für Drehungen um die Längsachse und derjenigen für Drehungen quer zu dieser Achse. Zusätzlich geht die Lage der Verbindungsachse von Proton und Stickstoffkern bzw. die Lage der Hauptachsen des Tensors der Anisotropie der chemischen Verschiebung relativ zur Längsachse des Moleküls ein.

Für nicht starre, aber isotrop oder annähernd isotrop diffundierende Moleküle läßt sich die Korrelationsfunktion als Produkt der Korrelationsfunktion  $G_{intern}(\tau)$  für molekülinterne Bewegungen und derjenigen für das starre Molekül (Gl. 3.6) schreiben [Cav96]. Lipari und Szabo haben für  $G_{intern}(\tau)$  folgenden Ansatz verwendet [Lip82a, Lip82b]:

$$G_{intern}(\tau) = S^2 + (1 - S^2) e^{-\tau/\tau_e}. \quad (3.8)$$

$\tau_e$  ist dabei die effektive Korrelationszeit für die interne Bewegung. Der „generalisierte Ordnungsparameter“  $S$  kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen und beschreibt die räumliche Einschränkung der internen Bewegung im molekülfesten Bezugssystem. Anschaulich beschrieben hat  $S$  etwa bei fixierter Lage des Verbindungsvektors von Wasserstoff und Stickstoff den Wert 1, bei seiner freien Bewegung im Raumwinkel  $4\pi$  den Wert 0. Während ein großer Wert von  $S$  sicher auf die räumliche Einschränkung der Bewegung hinweist, kann  $S$  allerdings für spezielle Bewegungen trotz eines eingeschränkten überstrichenen Raumwinkels den Wert 0 annehmen [Lip82a].

Aus dem Produkt-Ansatz mit den Gln. 3.6 und 3.8 erhält man als spektrale Dichtefunktion

$$J(\omega) = \frac{2}{5} \left( \frac{S^2 \tau_c}{1 + (\omega \tau_c)^2} + \frac{(1 - S^2) \tau}{1 + (\omega \tau)^2} \right), \text{ mit } \tau^{-1} = \tau_c^{-1} + \tau_e^{-1}. \quad (3.9)$$

Der Ansatz von Lipari und Szabo verwendet keine explizite Modellvorstellung für die Art und Weise der mikroskopischen Bewegung und ist deshalb unter der Bezeichnung „model-free approach“ bekannt. Mit der Erweiterung um einen zusätzlichen Ordnungsparameter zur Beschreibung der Überlagerung zweier interner Bewegungsmodi mit deutlich voneinander verschiedenen Zeitskalen [Clo90] wird aus Gl. 3.9:

$$J(\omega) = \frac{2}{5} S_f^2 \left( \frac{S_s^2 \tau_c}{1 + (\omega \tau_c)^2} + \frac{(1 - S_s^2) \tau}{1 + (\omega \tau)^2} \right), \text{ mit } \tau^{-1} = \tau_c^{-1} + \tau_s^{-1}. \quad (3.10)$$

Die Indizes  $s$  und  $f$  stehen für die relativ langsamere respektive schnellere Bewegung. Umgekehrt vereinfacht sich Gl. 3.9 bei einheitlicher und genügend schneller interner Bewegung ( $\tau_e \rightarrow 0$ ) zu

$$J(\omega) = \frac{2}{5} \cdot \frac{S^2 \tau_c}{1 + (\omega \tau_c)^2}. \quad (3.11)$$

Wegen der  $J(0)$  proportionalen Summanden in Gl. 3.2 haben die oben angegebenen Ausdrücke für die spektrale Dichtefunktion bei großen  $\tau_c$  mit  $\omega \tau_c \gg 1$  eine mit  $\tau_c$  monoton steigende Relaxationsrate  $R_2$  zur Folge. Dies begründet die in der Einleitung sowie in Kapitel 2 erwähnten



mit der Molekülgröße wachsenden Linienbreiten.

### 3.2.2 Experimente

Zur Bestimmung der Werte  $R_1$ ,  $R_2$  und des heteronuklearen NOE für die  $^{15}\text{N}$ -Kerne in den Rückgratamidgruppen der Rasbindedomäne wurden gemeinsam mit Dr. Till Maurer die von Farrow beschriebenen 2D Experimente [Far94] durchgeführt. Das Kernstück der Messung von  $R_1$  ist das bekannte „Inversion-Recovery-Experiment, hier in Verbindung mit INEPT und inversem INEPT zur Magnetisierungsübertragung. Für die Messung von  $R_2$  findet eine CPMG-Pulsfolge Verwendung (Spinecho-Experiment). Beim NOE-Experiment wird per INEPT die Magnetisierung von  $^{15}\text{N}$  auf  $^1\text{H}$  übertragen, dies im Wechsel mit und ohne vorherige Sättigung der Protonenresonanzen. Das abwechselnde Aufnehmen und anschließende Trennen der Datensätze stellt gleiche Aufnahmebedingungen für beide Spektren sicher.

Die in allen Fällen vor dem letzten INEPT-Schritt eingefügte Evolutionszeit führt zu zweidimensionalen Spektren; es werden die für  $^{15}\text{N}$ -HSQCs typischen Signale beobachtet. Im Fall von  $R_1$  und  $R_2$  wird jeweils eine Reihe von Einzelexperimenten mit verschiedenen Relaxationszeitspannen durchgeführt. Aus der Änderung der Signalintensitäten von einem Spektrum zum nächsten werden die Relaxationszeiten bestimmt.

Die durchgeführten Experimente sind mit den verwendeten Parametern in Anhang B aufgeführt.

### 3.2.3 Auswertung der Spektren

Die Signale in den Spektren wurden anhand eines bereits vorhandenen, von Dr. Till Maurer gemessenen und beschrifteten  $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrums identifiziert. Im Anhang ist die Zuordnung gezeigt. Die benötigten Signalvolumina wurden durch Integration mit dem Programm Aurelia gewonnen [Gey95]. Dazu wurden folgende Parameter verwendet: 30 Iterationen, Integrationsgrenze 0,5, maximales Intervall von je 30 Hz für  $\omega_1$  und  $\omega_2$ .

An die aus den Spektren zur Messung von  $R_1$  und  $R_2$  erhaltenen Volumina wurden, wie bei der Bestimmung der Protonenaustauschraten von RanBP2<sup>RanBD2 $\Delta$ N</sup>, exponentiell abfallende Kurven angepaßt und so die Relaxationsraten bestimmt. Einzelne, von einer sonst anscheinend sinnvoll angepaßten Funktion deutlich abweichende Werte wurden verworfen. Die NOE-Werte wurden durch Division der Signalvolumina aus beiden zur NOE-Messung aufgenommenen Spek-

tren berechnet. Soweit eng beieinanderliegende Signale nicht voneinander aufgelöst waren, wurde versucht, an entsprechende 1D Schnitte durch ein 2D Spektrum zwei Lorentzkurven anzupassen, um das Verhältnis der Volumina zu bestimmen.

### 3.2.4 Verwendung des Programms „Modelfree“

#### 3.2.4.1 Überblick

An die erhaltenen Relaxationsdaten wurden mit dem Programm „Modelfree“ [Pal91, Man95] spektrale Dichtefunktionen der durch die Gln. 3.9, 3.10 und 3.11 gegebenen Form angepaßt. (Die Funktionen sind weiter unten explizit angegeben.) Zunächst wurde dazu mit dem Programm TMEST aus dem mittleren Verhältnis von  $R_2$  und  $R_1$  die Rotationsdiffusionskonstante  $\tau_c$  abgeschätzt [Kay89]. Nach dem Verfahren von Mandel [Man95] wurden dann die Relaxationsmodelle ausgewählt, also jeder Amidgruppe die dann anhand der jeweiligen freien Parameter ( $S$ ,  $\tau_e$ ,  $R_{ex}$ , ...) zu optimierende spektrale Dichtefunktion zugeteilt. Schließlich wurden diese Parameter, ebenfalls mit „Modelfree“, bestimmt. Das Programm minimiert dazu folgende Zielfunktion:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^N \left\{ \frac{(R_{1i} - \hat{R}_{1i})^2}{\sigma_{R_{1i}}^2} + \frac{(R_{2i} - \hat{R}_{2i})^2}{\sigma_{R_{2i}}^2} + \frac{(NOE_i - \hat{NOE}_i)^2}{\sigma_{NOE_i}^2} \right\}. \quad (3.12)$$

$N$  ist dabei die Gesamtzahl der betrachteten Kerne (Amidgruppen),  $R_{ji}$  der gemessene,  $\hat{R}_{ji}$  der bei den gewählten Parametern aus den Gln. 3.1-3.3 erhaltene Wert der Relaxationsrate des  $i$ -ten Kerns, entsprechendes gilt für die NOE-Werte.  $\sigma^2$  bezeichnet den jeweiligen Fehler (vom Konzept her eigentlich die Varianz) der Meßdaten. Sind Meßdaten für mehrere Magnetfelder vorhanden, so ist die Summation entsprechend auszuweiten.

#### 3.2.4.2 Wahl der Modelle für die spektralen Dichtefunktionen

Zum Anpassen an die gemessenen Größen  $R_1$ ,  $R_2$  und  $NOE$  stehen in „Modelfree“ folgende fünf spektrale Dichtefunktionen zur Verfügung:

$$\text{Modell 1: } J(\omega) = \frac{2}{5} \cdot \frac{S^2 \tau_c}{1 + (\omega \tau_c)^2} \text{ mit } R_{ex} = 0 \text{ in Gl. 3.2} \quad (3.11b)$$

freier Parameter:  $S^2$

$$\text{Modell 2: } J(\omega) = \frac{2}{5} \left( \frac{S^2 \tau_c}{1 + (\omega \tau_c)^2} + \frac{(1 - S^2) \tau}{1 + (\omega \tau)^2} \right), \text{ mit } \tau^{-1} = \tau_c^{-1} + \tau_e^{-1}, R_{ex} = 0 \quad (3.9b)$$

freie Parameter:  $S^2, \tau_e$

$$\text{Modell 3: } J(\omega) = \frac{2}{5} \cdot \frac{S^2 \tau_c}{1 + (\omega \tau_c)^2}, R_{ex} \text{ frei} \quad (3.11c)$$

freie Parameter:  $S^2, R_{ex}$

$$\text{Modell 4: } J(\omega) = \frac{2}{5} \left( \frac{S^2 \tau_c}{1 + (\omega \tau_c)^2} + \frac{(1 - S^2) \tau}{1 + (\omega \tau)^2} \right), \text{ mit } \tau^{-1} = \tau_c^{-1} + \tau_e^{-1}, R_{ex} \text{ frei} \quad (3.9c)$$

freie Parameter:  $S^2, \tau_e, R_{ex}$

$$\text{Modell 5: } J(\omega) = \frac{2}{5} S_f^2 \left( \frac{S_s^2 \tau_c}{1 + (\omega \tau_c)^2} + \frac{(1 - S_s^2) \tau}{1 + (\omega \tau)^2} \right), \text{ mit } \tau^{-1} = \tau_c^{-1} + \tau_s^{-1}. \quad (3.10b)$$

freie Parameter:  $S_s, S_f, \tau_s$

Für jeden Stickstoffkern ist grundsätzlich ein Modell zu wählen, das mit möglichst wenigen freien Parametern – maximal drei bei drei gemessenen Größen – die Relaxationsraten möglichst gut beschreibt. Für RalGDS<sup>RasBD</sup> wurden Vorgehensweise und Auswahlkriterien dazu weitgehend von Mandel übernommen, der die Modellwahl mit einem Flußdiagramm beschrieben hat [Man95]. Abweichend davon wurde für  $\tau_e$  außerdem ein geschätzter relativer Fehler von unter 100 % gefordert. Bei der Modellwahl nach Mandel werden die zur Verfügung stehenden Modelle durchprobiert und anhand statistischer Tests akzeptiert oder verworfen [Man95, Pal91]. Die erforderlichen statistischen Größen und quadratischen Fehler liefert das Programm. Sowohl für die Modellwahl als auch für die endgültige Rechnung wurde ein Kernabstand von 0,102 nm in den Amidgruppen angenommen; für CSA wurde der Wert  $\sigma_{\parallel} - \sigma_{\perp} = -160$  ppm verwendet (s. z.B. Kay89). Die verwendeten programmspezifischen Parameter sind im Anhang aufgeführt. Dem jeweils benutzten Modell entsprechend wurde  $\tau_e$  zwischen 0 ps und 10000 ps,  $R_{ex}$  zwischen 0 s<sup>-1</sup> und 20 s<sup>-1</sup> freigegeben. Die Ordnungsparameter  $S_x$  wurden definitionsgemäß auf das Intervall [0, 1] beschränkt. Weiterhin wurden für in den Relaxationsdaten fehlende Meßwerte zunächst Durchschnittswerte eingesetzt.

### 3.3 Ergebnisse

#### 3.3.1 Relaxationsdaten

Anhand der in Abbildung 3.1 gezeigten Auszüge aus den Spektren soll zunächst die Meßreihe zu den Relaxationsraten  $R_2$  vorgestellt werden. Das Abklingen der Signale mit zunehmender Relaxationsdauer ist gut zu erkennen. Für die longitudinale Relaxation ist das Verhalten in Abbildung 3.2 graphisch dargestellt, der Übersichtlichkeit halber nur für zwei Signale. Die Einzelwerte weichen augenscheinlich weniger von den idealen Exponentialfunktionen ab als dies beim Protonenaustausch in Kapitel 2 der Fall ist. Abbildung 3.3 schließlich zeigt die gegen die Aminosäuresequenz aufgetragenen Werte aller drei gemessenen Größen. Die Werte sind auch im Anhang aufgeführt. Da jede Messung nur einmal durchgeführt wurde, sind mögliche systematische und statistische Fehler nicht gut abzuschätzen. Für die NOE-Messungen beträgt der anhand des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses grob abgeschätzte relative Fehler für die Integration 5 %, damit für den NOE 10 %. Den Fehlerangaben für die Relaxationsraten liegen allein die Abweichungen der Datenpunkte von der angepaßten Exponentialfunktion zugrunde. Die relativen Fehler liegen für  $R_1$  meist bei ca. 2 %, für  $R_2$  bei rund 5 %.

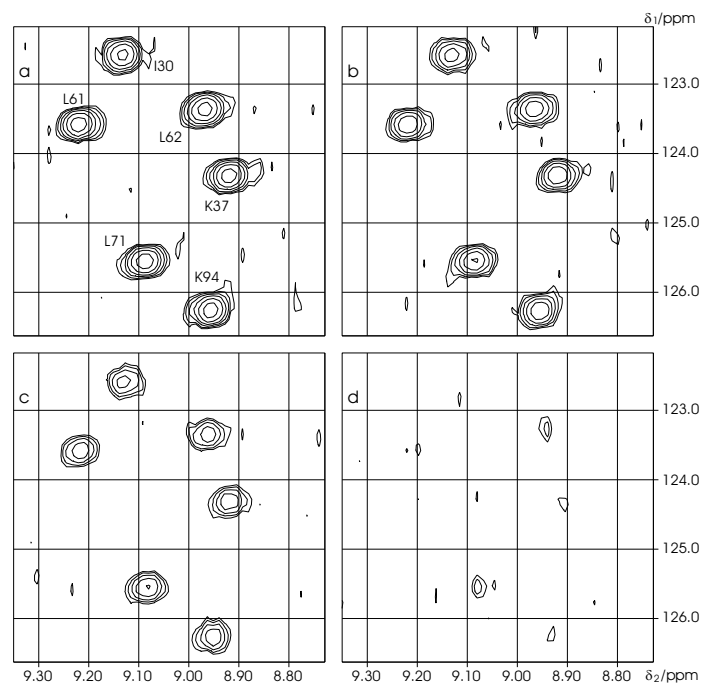


Abbildung 3.1. Die Teile a) bis d) der Abbildung zeigen Ausschnitte aus den zur Bestimmung der transversalen Relaxationsraten gemessenen Spektren, und zwar denen mit 23,6 ms, 62,9 ms, 125,7 ms und 314,2 ms Relaxationsdauer (Experimente 11, 13, 15 und 17 in Anhang B). Das Abklingen der Signale, oben links wird auch ihre Zuordnung wiedergegeben, ist gut zu erkennen.

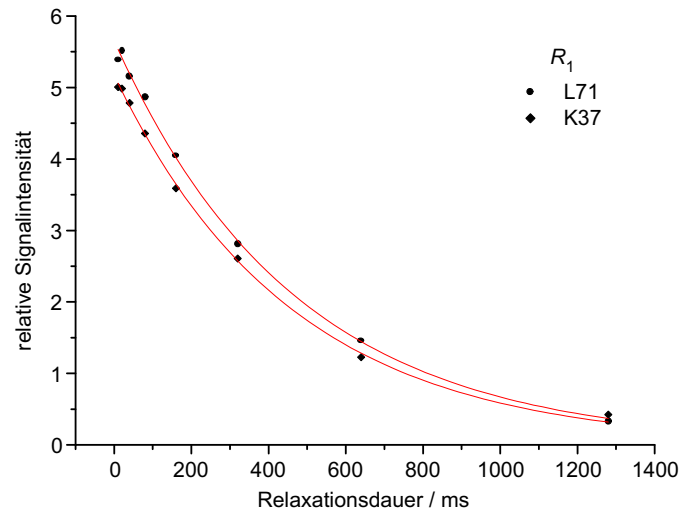


Abbildung 3.2. Graphische Darstellung der Daten zur longitudinalen Relaxation für zwei Amidgruppen.

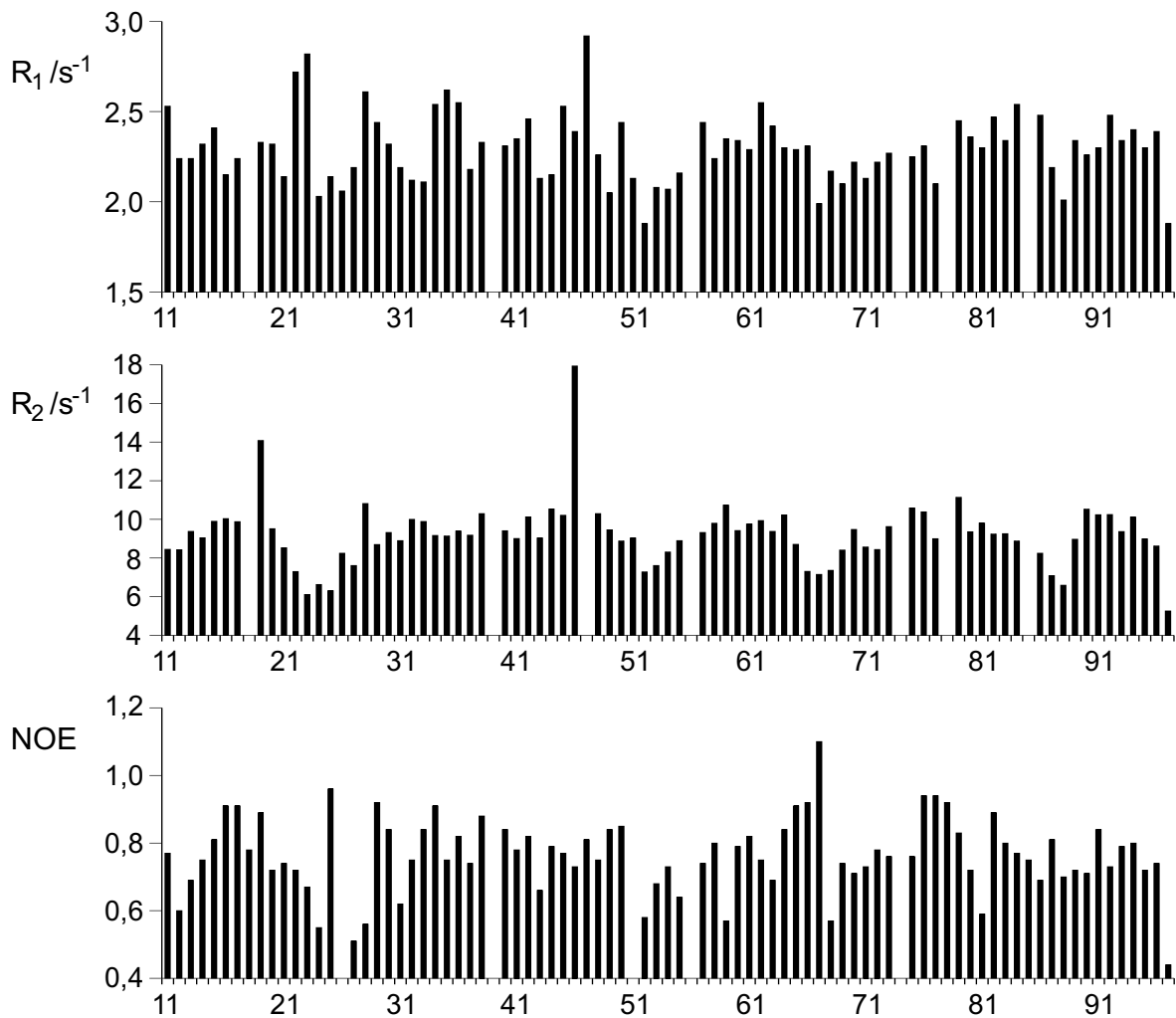


Abbildung 3.3. Darstellung der gemessenen Relaxationsdaten. Oben sind die longitudinalen, in der Mitte die transversalen Relaxationsraten, unten schließlich die  $NOE$ -Werte der Amidstickstoffkerne gegen die Sequenz aufgetragen.

### 3.3.2 Rotationsdiffusionszeit und Isotropie der Molekülbewegung

Für die weitere Auswertung der Daten mit dem Programm „Modelfree“ wurde angenommen, daß sich das einzelne Molekül als Ganzes annähernd isotrop bewegt, daß also eine Zeitkonstante  $\tau_c$  zur Beschreibung ausreicht. Diese gehört zu den notwendigen Eingangsdaten für das Programm und war somit abzuschätzen.

### 3.3.3 Isotropie der Bewegung des gesamten Moleküls

Die Annahme, daß sich die Bewegung des gesamten Moleküls näherungsweise mit einer einzigen Rotationsdiffusionskonstante beschreiben läßt, ist auf folgende Überlegung gegründet [Fen98]: Das Programm PDBINERTIA ermöglicht bei bekannter Molekülstruktur die Berechnung der relativen Hauptträgheitsmomente. Sie verhalten sich demnach wie 1,00 : 0,96 : 0,69. Diesen Verhältnissen liegt der Eintrag „2RGF“ [Gey97b] der PDB zu grunde<sup>23</sup>. Das Molekül wird in guter Näherung als symmetrisch betrachtet, und die räumlichen Achsen eines entsprechenden oblaten Rotationsellipsoids verhalten sich etwa wie 1,00 : 0,62. Nach Cantor und Schimmel [Can80], Kapitel 10-2, sollte das Verhältnis der Hauptwerte des Rotationsdiffusionstensors damit bei 1,21 liegen. Schurr [Sch94] schätzt für diesen Fall die Fehler der Quadrate der Ordnungsparameter,  $S^2$ , in Gleichung 3.8 bzw. 3.9 ab. Sie liegen für rein monomer vorliegende Moleküle mit einer Rotationskorrelationszeit von 8,5 ns unter Verwendung der spektralen Dichte aus Gleichung 3.11 bei rund 5 %. Die Verwendung einer einheitlichen Rotationsdiffusionskonstante als Grundlage der im folgenden getroffenen Aussagen zur internen Beweglichkeit von RalGDS<sup>RasBD</sup> erscheint damit praktikabel.

### 3.3.4 Abschätzung von $\tau_c$

Mit Hilfe der gemessenen Relaxationsraten und des Programms TMEST läßt sich die Korrelationszeit für das gesamte Molekül,  $\tau_c$ , abschätzen [Kay89]: Dabei wird Gleichung 3.11 in den Quotienten der Gleichungen 3.2 und 3.1 eingesetzt. Bei der Berechnung des mittleren Verhältnisses  $R_2 / R_1$  wurden nur diejenigen Werte  $R_1$  bzw.  $R_2$  berücksichtigt, für welche die Differenz zum Mittel aller Werte maximal eine Standardabweichung beträgt. Aus dem so erhaltenen Verhältnis von 4,05 ergibt sich  $\tau_c = 6,66$  ns.

---

<sup>23</sup> Struktur Nr. 5 aus der Familie willkürlich gewählt, protoniert, N-terminal bis auf Rest D11 gekürzt

### 3.3.5 Ergebnis der Modellwahl

Damit ergab sich folgendes Bild: 71 von 84 Rückgrat-Amidstickstoffkernen wurde Modell 1 zugeordnet. Für K44 scheint Modell 3 am geeignetsten zu sein. Den Resten E54, L71 und F80 läßt sich nach Mandel am besten Modell 2 zuweisen, dabei liegen die geschätzten Fehler für  $\tau_e$  aber deutlich über 100 %. Neun der Amidgruppen werden durch keines der zur Verfügung stehenden Modelle befriedigend beschrieben. Dies betrifft die Reste L19, D22, N23, G24, Y27, S29, V79 sowie R96 und T97 am C-Terminus.

Im Zweifelsfall sind möglichst einfache Modelle zu wählen. So wurde für die abschließende Rechnung einheitlich Modell 1 (Gl. 3.11b) mit  $S^2$  als einzigem solchem Parameter verwendet.

Im Fall von K44 führt Modell 3 zu den Werten  $R_{ex} = (1,8 \pm 0,4) \text{ s}^{-1}$  und  $S^2 = 0,91 \pm 0,02$ . Mit Modell 1 berechnet ist  $S^2 = 0,95 \pm 0,02$ . Die einheitliche Wahl der einfachsten zur Verfügung stehenden spektralen Dichtefunktion erlaubt am ehesten einfache Aussagen zur Dynamik auch der durch kein Modell gut beschriebenen Amidgruppen.

### 3.3.6 Die berechneten Ordnungsparameter

Abbildung 3.4 stellt das Ergebnis der abschließenden Rechnung dar. Sie zeigt die gegen die Sequenz von RalGDS<sup>RasBD</sup> aufgetragenen Quadrate der Ordnungsparameter. Mit diesen Werten läßt sich abschätzen, an welchen Stellen die Hauptkette eher starr und wo sie flexibel ist.

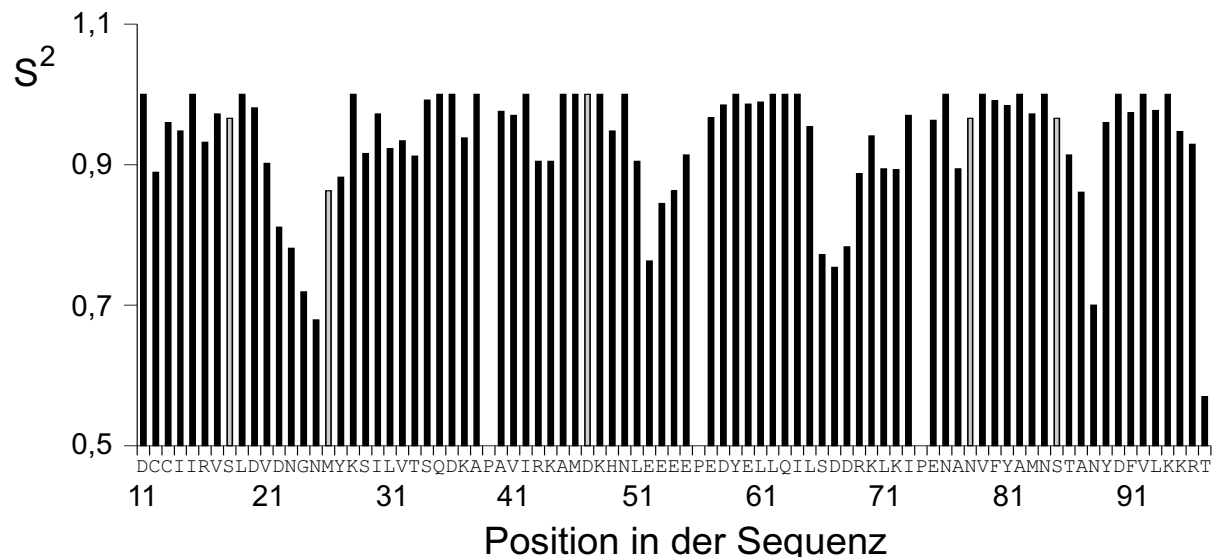


Abbildung 3.4. Darstellung der mit Modelfree berechneten Quadrate der Ordnungsparameter. Die drei Lücken entsprechen den Prolinresten P39, P56 und P74. Graue Säulen kennzeichnen diejenigen  $S^2$ , für deren Berechnung fehlende Relaxationsdaten durch mittlere Werte ergänzt wurden.

Abbildung 3.5 auf der folgenden Seite zeigt die Projektion der Ordnungsparameter auf das Molekül, oben links die Bänderdarstellung der Sekundärstruktur, rechts ein Kalottenmodell. Reste, für deren Hauptkettenamidgruppe  $S^2 \leq 0,9$  gilt, wurden gelb eingefärbt, die übrigen (auch Proline) dunkelblau. Darunter zeigt ein weiteres Kalottenmodell ebenso die Beteiligung der Reste bei der Rasbindung nach Geyer et al. [Gey97b]. Dieser Quelle wurde auch die Information zur Sekundärstruktur von RalGDS<sup>RasBD</sup> entnommen. Ganz unten sind schließlich alle drei Darstellungen um 180° gedreht.



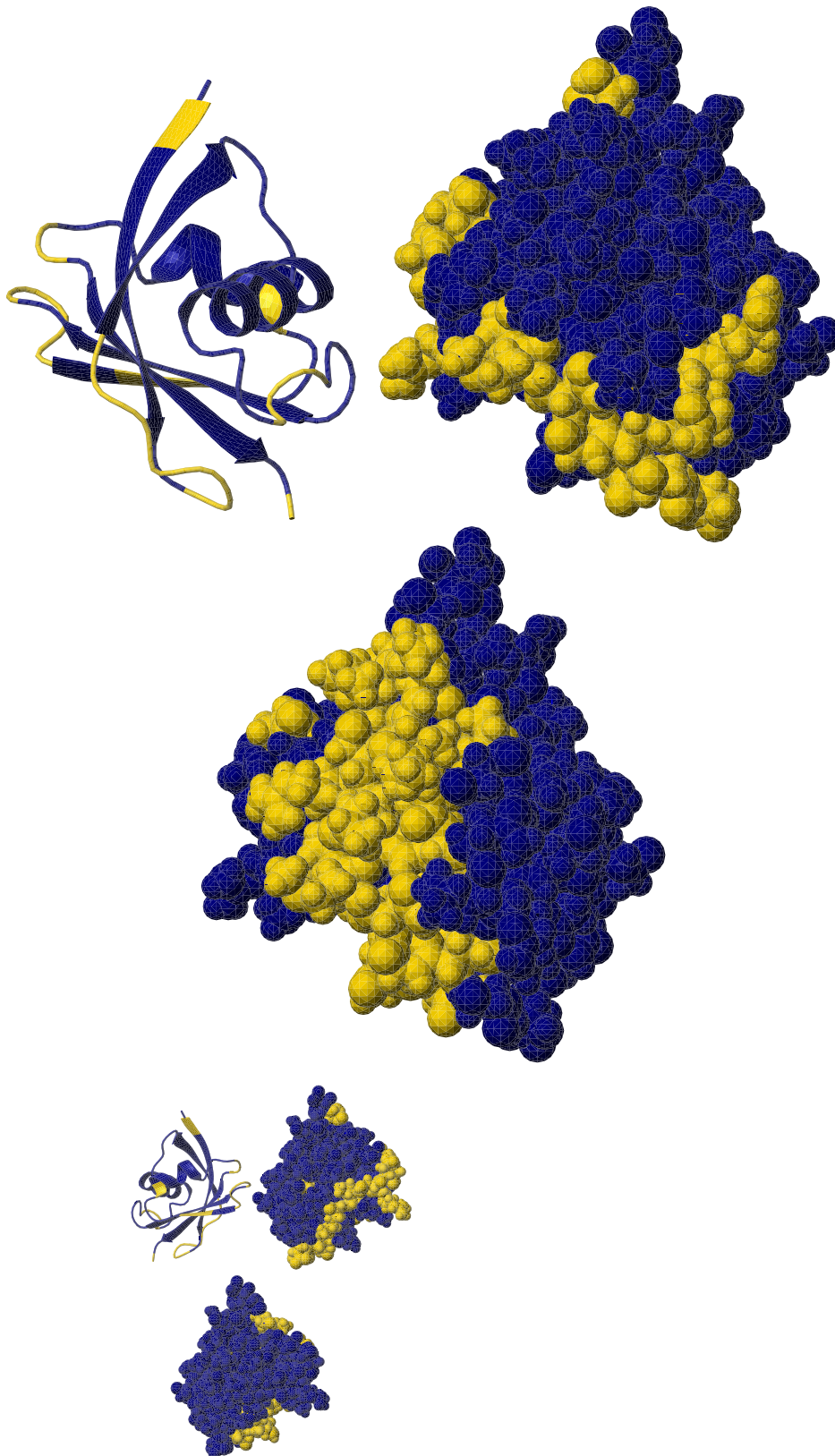


Abbildung 3.5. Projektion der Ordnungsparameter auf das Molekül. Ganz oben: Reste mit  $S^2 \leq 0,9$  sind gelb, die übrigen blau gefärbt; links das Bänder-, rechts ein Kalottenmodell. Im Modell darunter wurden die an der Bindung von Ras beteiligten Reste gelb markiert. Ganz unten sind alle drei Darstellungen um  $180^\circ$  gedreht und verkleinert wiedergegeben.

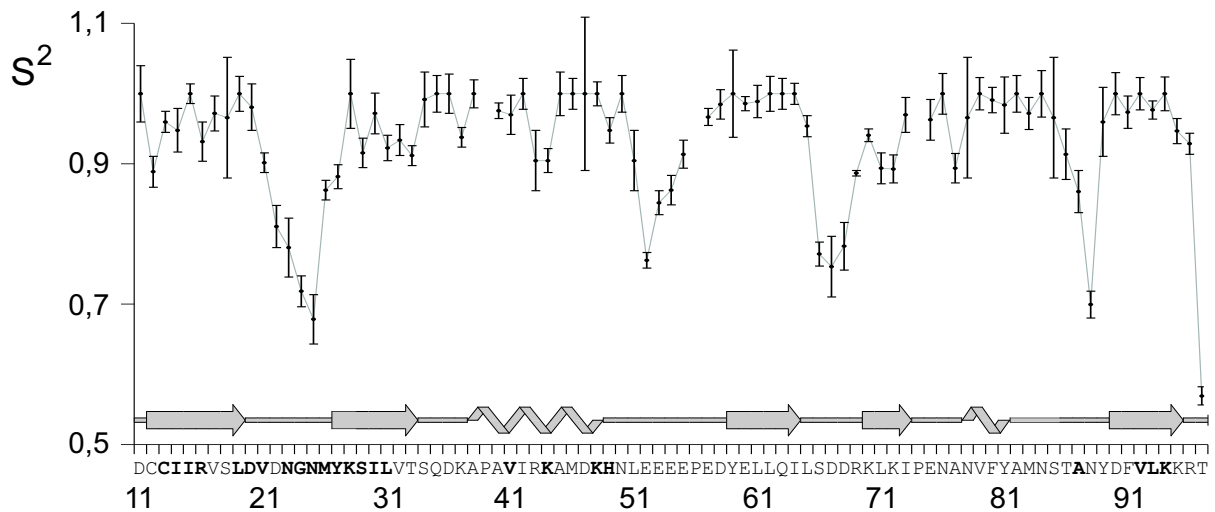


Abbildung 3.6. Die Verteilung von Ordnungsparametern und Sekundärstrukturelementen über der Primärstruktur. Letztere ist im Einbuchstabenkode dargestellt; an der Bindung von Ras beteiligte Reste [Gey97b] sind durch Fettschrift hervorgehoben.

Abbildung 3.6 gibt die Daten noch einmal schematisch wieder. Es ist zu erkennen, daß die vier beweglichen Bereiche ( $S^2 \leq 0,9$ ) weitgehend mit „loop“-Regionen übereinstimmen. Der C-Terminus erscheint flexibler als der N-Terminus. Dynamisches Verhalten und Bindungsfläche scheinen dagegen nicht zu korrelieren. Die Amidgruppen der an der Bindung beteiligten Reste sind meist eher wenig beweglich, mit den Ausnahmen A87, und N23-Y27, eventuell auch K44. Abbildung 3.5 macht deutlich, daß die beweglicheren der Reste auf der Moleküloberfläche weiter verteilt erscheinen als die an der Bindung von Ras beteiligten. Auch sie bilden aber eine weitgehend zusammenhängende Fläche aus, die einen weniger mobilen Bereich umschließt. Obwohl die weitaus meisten Amidprotonen der als flexibel gekennzeichneten Reste tatsächlich an der Moleküloberfläche liegen, darf bei dieser Darstellung nicht übersehen werden, daß die berechneten Ordnungsparameter nicht eigentlich die vollständigen Reste, sondern nur die Amidgruppen in der Hauptkette beschreiben.

Bis auf V79 liegen diejenigen Reste, denen kein gutes Modell für die spektrale Dichte zugeordnet werden konnte, alle im C-Terminus oder im Bereich der Gegend der sequentiell ersten beweglichen Region.

## 3.4 Diskussion

### 3.4.1 Die gemessenen Daten

In diesem Teil der Arbeit sollte festgestellt werden, ob die interne Beweglichkeit von RasGDS-Ras<sup>BD</sup> mit der Sekundärstruktur oder der Beteiligung von Aminosäureresten bei der Bindung an Ras•GppNHp korreliert ist. Beteiligung an der Bindung bedeutet hier zunächst, daß die gemessenen chemischen Verschiebungen der betroffenen Amidgruppen vom Bindungszustand abhängen [Gey97b]. Beweglichkeit heißt, daß die aus den Relaxationsdaten berechneten Ordnungsparameter ( $S^2$ ) auf innerhalb eines molekülfesten Bezugssystems zeitlich veränderliche Orientierungen der Amidbindungen hindeuten. Daraus lassen sich allerdings praktisch keine Rückschlüsse auf die genaue Form der Bewegung ziehen. Man erhält nach dem Konzept des „Model-free“-Ansatzes, dessen Anwendung einige vereinfachende Annahmen zugrunde liegen, also qualitative, wenig detaillierte Informationen. Vor diesem Hintergrund war auch der Aufwand bei der Datengewinnung gering zu halten. Eine Vorgabe war, die etwas langwierigen Messungen nur einmal und nur bei einer magnetischen Flußdichte (am 500 MHz-Spektrometer) durchzuführen. Dies erlaubt keine genaue Fehlerabschätzung, und die Messung von Austauschraten  $R_{ex}$  erfordert eigentlich mehrere Messungen bei verschiedenen Feldern [Far95]. Die NOEs sind, da sie jeweils aus nur zwei Signalintensitäten berechnet wurden, die am wenigsten präzise bestimmten Werte. Bei ihnen kommt hinzu, daß die Messung der Gleichgewichtsmagnetisierungen eigentlich längere als die verwendeten Relaxations- bzw. Sättigungswartezeiten erfordert. An die Daten der Meßreihen zu  $R_1$  und  $R_2$  ließen sich problemlos die entsprechenden Exponentialfunktionen mit geringen Fehlern anpassen. Unter der Annahme, daß sich eventuell auftretende systematische Fehler auf alle Signale gleichmäßig auswirken, erlauben die vorliegenden Daten damit Aussagen zur relativen Beweglichkeit der Amidgruppen im Vergleich untereinander.

### 3.4.2 Die berechneten Daten: Ordnungsparameter

An den berechneten Ordnungsparametern fällt auf, daß deren viele den Wert 1 annehmen, insgesamt sind die Werte relativ hoch. Mit ein Grund können die oben gemachten Annahmen über den Tensor der CSA des Amidstickstoffs sein. Dessen Hauptachse ist in der Regel nicht kollinear mit der Amidbindung, und die Anisotropie der chemischen Verschiebung kann Werte zwischen -125 ppm und -216 ppm annehmen [Fus98, Fus99]. Möglicherweise wird dadurch

die Schätzung der Korrelationszeit  $\tau_c$  aus dem mittleren Verhältnis der Relaxationsraten  $R_2 / R_1$  beeinflusst. Tests ergaben eine deutliche Abhängigkeit des Mittelwerts der Ordnungsparameter vom angenommenen Wert für die Korrelationszeit  $\tau_c$ , ohne daß sich aber das Gesamtbild der (im wesentlichen vier) beweglichen Bereiche in der Sequenz dabei änderte. Bestimmt man  $\tau_c$  anhand der Stokes-Einstein-Relation [Can80], so erhält einen Wert, der um 3,5 ns liegt und in der Folge insgesamt kleinere  $S^2$ . Zur Bestimmung des Tensors der CSA oder für Tests zur Konsistenz der Relaxationsraten müßten Messungen bei mehreren Feldern erfolgen. Der mit kleineren magnetischen Flußdichten sinkende Einfluß der Anisotropie der chemischen Verschiebung begründet die Messungen beim niedrigsten zur Verfügung stehenden Feld.

Abbildung 3.7 zeigt die deutliche Korrelation von Ordnungsparametern und transversalen Relaxationsraten (schwarze Kurven). Beide wurden gegen die Position in der Aminosäuresequenz aufgetragen, die Graphen haben einen sehr ähnlichen Verlauf. Dies gilt auch für die graue Kurve, sie zeigt die Werte  $S'^2$ , wie sie mittels „spectral density mapping“ [Pen92] und mit  $\tau_c = 6,66$  ns berechnet wurden [Far95, Lef96, Bra99]. Bei dieser Methode werden die spektralen Dichtefunktionen nicht durch Anpassen eines Modells an die Meßdaten gefunden. Es werden vielmehr nur einige spezielle Werte der  $J(\omega)$ , etwa bei den Kreisfrequenzen 0 und  $\omega_N$ , berechnet. Daraus lassen sich dann die den Ordnungsparametern  $S$  ähnlichen Größen  $S'$  bestimmen [Lef96, Bra99]:

$$S'^2 = \frac{5(J(0) - J(\omega_N))(1 + \omega_N^2 \tau_c^2)}{2\omega_N^2 \tau_c^3}. \quad (3.13)$$

Diese sind aber nicht notwendig auf das Intervall  $[0, 1]$  beschränkt, wie auch Abbildung 3.7 erkennen läßt. Trotz der stellenweise deutlichen Unterschiede zwischen den Werten von  $S$  und  $S'$  besteht insgesamt doch eine deutliche Ähnlichkeit, und die Interpretation der gemessenen Daten führt für RalGDS<sup>RasBD</sup> nach beiden Methoden zum selben Ergebnis. Dies ist eine Bestätigung der Wahl des einfachsten Modells für die Rechnungen mit „Modelfree“: Die Korrelationszeiten für den Hauptanteil der molekulinternen Bewegungen liegen bei Werten, die um einiges kleiner sind als  $\tau_c$ , mithin im Sub-Nanosekundenbereich.

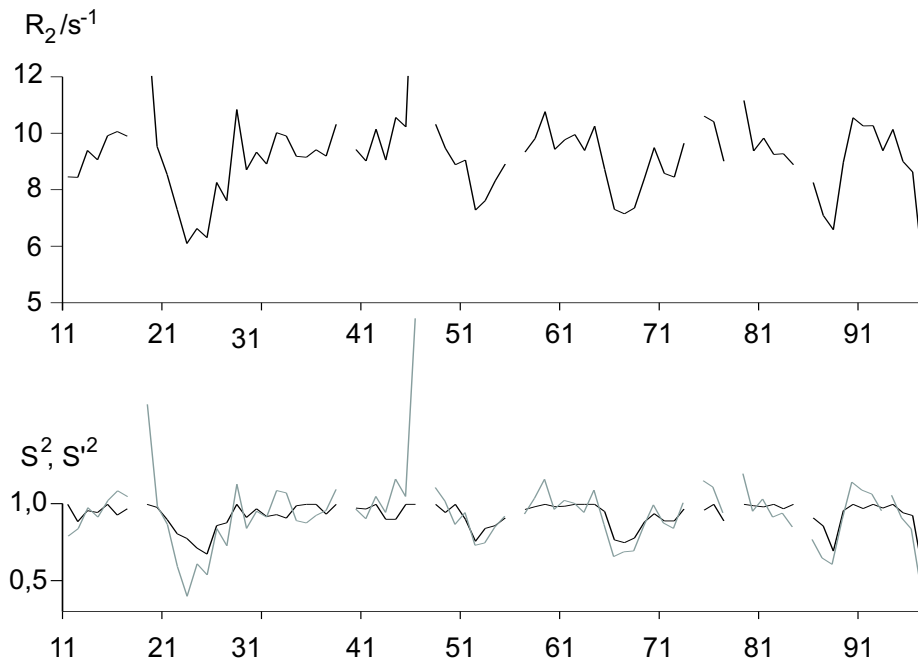


Abbildung 3.7. Oben: Relaxationsraten  $R_2$  in der Rasbindedomäne von RalGDS, aufgetragen gegen die Positionen in der Aminosäuresequenz. Unten: Die Quadrate der zugehörigen Ordnungsparameter (schwarze Linie) und die der analogen Parameter  $S'$  (graue Linie).

### 3.4.3 Korrelation von Molekülstruktur und Flexibilität

Die Abbildungen im Teil „Ergebnisse“ dieses Kapitels machen deutlich, daß flexiblere und eher starre Regionen, manifestiert an den Amidgruppen, sich nicht einfach den vorhandenen Sekundärstrukturelementen „eins zu eins“ zuordnen lassen. Erst recht gilt das für die Beweglichkeit und die Änderungen chemischer Verschiebungen bei der Bindung an Ras. Auch die anhand der Röntgenstruktur gefundenen Seitenkettenkontakte zwischen RalGDS<sup>RasBD</sup> (*rattus norvegicus*) und Ras(E31K)GppNHp [Hua98] bzw. diejenigen im Komplex von RalGDS<sup>RasBD</sup> (Mensch) und RasGppNHp [Vet99c] beschränken sich nicht allein auf bewegliche oder allein auf wenig bewegliche Teile der Bindungsdomäne. Hier ist zunächst kein klarer Zusammenhang festzustellen. Ein Grund ist sicherlich der, daß sich das Maß für Beweglichkeit ( $S^2$ ) nur auf die Hauptkette bezieht. Andererseits muß aber auch zwischen direktem Kontakt von Kernen zum Bindungspartner und Strukturänderungen bei der Bindung unterschieden werden. Beide können Änderungen chemischer Verschiebungen zur Folge haben. Die Reste, welche in direktem Kontakt zu Ras stehen [Hua98, Vet99c], sind tatsächlich nicht durchweg mit denjenigen identisch, deren chemische Verschiebungen sich bei der Bindung verändern [Gey97b]. Die Aktivierung von RalGDS durch RasGTP geht möglicherweise mit strukturellen Veränderungen

auch außerhalb der Bindungsdomäne einher; Strukturinformationen sind bislang allerdings nur für die Bindungsdomäne allein bekannt.

Zwischen Sekundärstruktur und Ordnungsparametern besteht dagegen ein zwar nicht einheitlicher, aber deutlicher Zusammenhang. Nicht alle, aber fast nur „loops“ erscheinen als beweglich. Dies betrifft diejenigen Reste, die nach dem Kriterium „ $S^2 \leq 0,9$ “ als flexibel eingestuft wurden. Sie gehören auch zu den weniger genau definierten Bereichen in der Lösungsstruktur [Gey97b]. Hier bedingt die Flexibilität des Moleküls die Präzision der berechneten Struktur. Hinsichtlich der Relation von Struktur und Dynamik sind auch die Ergebnisse von Messungen bei hohen Drucken von bis zu 200 MPa [Ino00] interessant. Unter hohem Druck verliert RalGDS<sup>RasBD</sup> seine native Struktur, wobei sich sich mit steigendem Druck zunächst nur Teile des Proteins entfalten. Davon sind neben den Resten S35, Q35, N78 und F80 insbesondere die „loops“ zwischen dem ersten und zweiten sowie dem dritten und vierten  $\beta$ -Strang betroffen, außerdem die sequentiell zwischen der zweiten Helix und dem letzten  $\beta$ -Strang liegenden Reste. Dies sind drei der auffallend beweglichen Bereiche. Die 3D Struktur des Proteins weist zudem in der Umgebung dieser Reste Hohlräume auf, die möglicherweise die Entfaltung unter Druck sowie interne Bewegungen erleichtern [Ino00].

Einen Zusammenhang von Funktion und Dynamik läßt vielleicht der zweite  $\beta$ -Strang erkennen, der an der Bindung von Ras wesentlich beteiligt ist und insgesamt relativ beweglich erscheint. Auch die Reste R43 und K44 in der ersten Helix fallen durch niedrige Parameter  $S^2$  auf. Im Kristall mit der Ras-Mutante bildet die Seitenkette von K44 eine Salzbrücke zum Rest E63 in der switch-II-Region von Ras aus [Hua98], die allerdings von Vetter et al. [Vet99c] nicht beobachtet wurde.

Es liegt nahe, die Relaxationsdaten auch für einen Komplex von RalGDS<sup>RasBD</sup> mit RasGppNHp zu messen und mit den vorliegenden Daten zu vergleichen. Zusätzliche Messungen bei verschiedenen magnetischen Flußdichten würden die Berechnung der CSA für die einzelnen Amidstickstoffkerne ermöglichen. Vergleichbare Relaxationsdaten einer anderen Rasbindedomäne stehen bislang nicht zur Verfügung.

## 4 Mittelwert und Standardabweichung dihedraler Winkel

### 4.1 Einführung

Als charakteristische Parameter sind die Hauptkettentorsionswinkel nützlich zur Beschreibung von Proteinstrukturen, seien diese röntgenkristallographisch oder mittels NMR-Spektroskopie bestimmt. Weil Bindungslängen und -winkel bekannt sind und kaum variieren, ist die Sekundärstruktur allein durch diese dihedralen Winkel gegeben. Umgekehrt können den sterisch möglichen Kombinationen insbesondere der Winkel  $\phi$  und  $\psi$  die entsprechenden Sekundärstrukturelemente zugeordnet werden [Ram63]. Damit sind sie für den Vergleich von Proteinstrukturen besonders interessant; ihre Definition ist in [Ken70] gegeben. Beide Torsionswinkel erlauben einerseits die von den kartesischen Koordinaten der Atome unabhängige Definition einer einzelnen Struktur, andererseits kann ein Strukturbündel, das aus NMR-Abstandsdaten berechnet wurde, mit Hilfe ihrer Mittelwerte und Standardabweichungen weiter beurteilt werden. Schließlich lassen sich auch homologe Proteine bezüglich ihrer strukturellen Ähnlichkeit vergleichen. Besonders für lokale Unterschiede ist die Standardabweichung der dihedralen Winkel ein geeignetes Maß. Wegen der zyklischen Natur der Winkel ist sie aber, ebenso wie der Mittelwert, eigentlich nicht eindeutig definiert [Mar72]. Beide hängen von der Wahl des Bezugssystems und des Wertebereichs für die Winkel ab. Dies wird im folgenden erläutert.

### 4.2 Mittelwert und Standardabweichung von zyklischen Größen

#### 4.2.1 Das Problem der Definition

Oben wurde festgestellt, daß es einerseits nützlich wäre, dihedrale Winkel mit ihren Mittelwerten und Standardabweichungen zu beschreiben, daß diese Größen aber andererseits nicht wohldefiniert sind, wenn man versucht, die üblichen Gleichungen:

$$\bar{w} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N w_i \quad (4.1)$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (w_i - \bar{w})^2}{N}} \quad (4.2)$$

anzuwenden. Hierbei bezeichnet  $w_i$  die Einzelwerte,  $N$  deren Anzahl. Das Problem ist an einem einfachen Beispiel leicht zu erkennen: Angenommen, es sind auf einer von  $0^\circ$  bis  $360^\circ$  reichenden Skala zwei Werte vor-

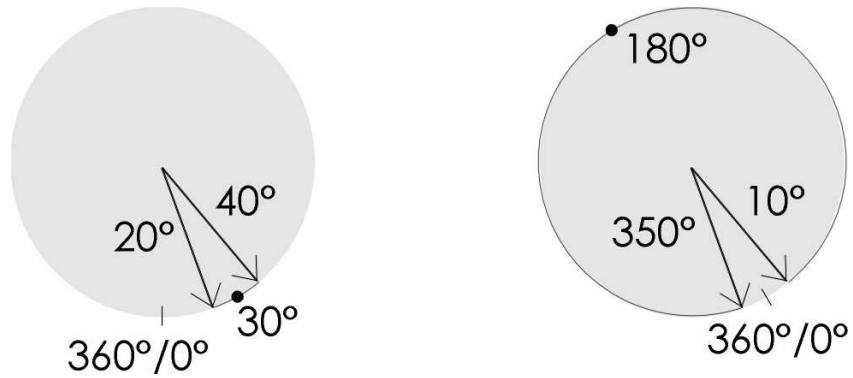


Abbildung 4.1. Zwei Winkel, dargestellt als Pfeile im Einheitskreis. Der Mittelwert ist als Punkt eingetragen, der zugehörige Kreisbogen ist hervorgehoben. Ein Strich markiert den Skalenustrang.

gegeben, zum Beispiel  $20^\circ$  und  $40^\circ$ . Nach den Gleichungen 4.1 und 4.2 ist der Mittelwert  $30^\circ$ . Die Differenz beider Werte beträgt  $20^\circ$ , ihre Standardabweichung  $10^\circ$ . Wird nun allein die *Skala*, deren Nullpunkt ja zunächst beliebig festgelegt werden kann, gedreht, so daß die Werte  $350^\circ$  und  $10^\circ$  lauten, so ist die Lage beider Winkel auf dem Einheitskreis zueinander noch dieselbe, es liegen  $20^\circ$  dazwischen. Rechnerisch gesehen ist die Differenz allerdings nun  $340^\circ$ , mit einem Mittelwert von  $180^\circ$  und daher einer scheinbaren Standardabweichung von  $170^\circ$ .  
 Noch einmal: Von einer Position ( $20^\circ$  bzw.  $350^\circ$ ) auf dem Einheitskreis gehe man im mathematisch positiven Sinn um  $20^\circ$  weiter. Die neue Position ist eindeutig festgelegt, wird aber je nach Lage der Skala anders beschrieben, im oben gegebenen Beispiel als  $40^\circ$  oder als  $10^\circ$ . Nach den Gleichungen 4.1 und 4.2 liegt der Mittelwert im einen Fall auf dem kurzen Kreisbogen zwischen beiden Einzelerten, im anderen Fall aber auf dem längeren Bogen. Dies ist ein echter qualitativer Unterschied, nicht allein dem Wert nach. Sowohl die Standardabweichung als auch die Position des Mittelwerts bezüglich der Einzelwerte hängen also von der benutzten Skala, vom Koordinatensystem, ab. Nun ist im Beispiel oben leicht ersichtlich, daß vielleicht doch  $0^\circ$  statt  $180^\circ$  der sinnvollere Mittelwert wäre. Für mehr und weit gestreute Werte ist ein sinnvoller Mittelwert nicht so einfach festzulegen. Diese Situation kommt aber für die dihedralen Winkel von Proteinen in experimentellen Daten durchaus vor [Mac93, Mar98].



### 4.2.2 Lösungsvorschläge

Ein Lösungsvorschlag zur Beschreibung dihedraler Winkel stammt von Hyberts [Hyb92]. Er definiert einen Ordnungsparameter  $S$ , der auch ein Maß für die Varianz eines Satzes von  $N$  Winkeln ist. Um  $S$  zu erhalten werden die Einzelwerte als Vektoren auf dem Einheitskreis betrachtet. Ihre Summe wird durch  $N$  dividiert; die Länge des resultierenden Vektors  $\bar{W}$  ist dann der Ordnungsparameter  $S$  mit  $0 \leq S \leq 1$ . Je stärker die Einzelwerte streuen, desto kleiner ist  $S$ .  $1-S$  ist der Varianz des linearen Falls ähnlicher, wächst mit der Streuung der Werte und

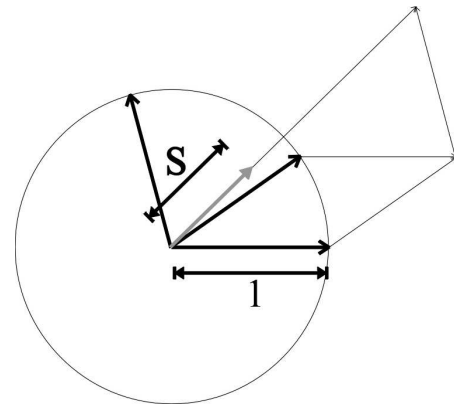


Abbildung 4.2. Illustration der Bestimmung des Ordnungsparameters  $S$  nach Hyberts. Gezeigt sind drei Winkel, repräsentiert durch Pfeile im Einheitskreis, der Summenvektor, und als heller Pfeil ein Vektor der Länge  $S$ .

wurde schon 1972 als „zyklische Varianz“ vor geschlagen [Mar72], wird aber seltener benutzt. Die Relation zur Varianz (z.B. einer Gaußverteilung über den Einheitskreis<sup>24</sup>) ist in beiden Fällen etwas kompliziert und nur mit einer empirischen Näherungsformel beschrieben [Hyb92]. Richtung und Orientierung des Vektors  $\bar{W}$  liefern i.a. auch keinen Gl. 4.1 entsprechenden Mittelwert:

$$\cos\left(\frac{1}{N} \cdot \sum_{i=1}^N w_i\right) \cdot \bar{e}_1 + \sin\left(\frac{1}{N} \cdot \sum_{i=1}^N w_i\right) \cdot \bar{e}_2 \neq \frac{1}{N} \cdot \sum_{i=1}^N \cos(w_i) \cdot \bar{e}_1 + \frac{1}{N} \cdot \sum_{i=1}^N \sin(w_i) \cdot \bar{e}_2 = \bar{W}, \quad (4.3)$$

wobei  $w_i$  die Einzelwerte und  $\bar{e}_i$  die Basisvektoren im zur Berechnung von  $\bar{W}$  bzw.  $S$  notwendigen kartesischen Koordinatensystem sind.

Der folgende, neue Lösungsweg nutzt trotz der beschriebenen Probleme im wesentlichen die Gleichungen 4.1 und 4.2. Damit liefert er statistische Parameter, die denen für nicht-zyklische Größen sehr nahekommen.

Jeder Winkel kann durch eine reelle Maßzahl beschrieben werden, wobei eine Addition von Vielfachen von  $360^\circ$  am betrachteten Winkel nichts ändert. Die nach Gleichung 4.2 berechnete Varianz bleibt dabei allerdings nur dann unverändert, wenn dasselbe Vielfache zu *allen* Einzelwerten addiert wird. Das heißt, der Wertebereich muß auf ein (halboffenes) Intervall  $I$  von  $360^\circ$  beschränkt werden. Damit ist das Ergebnis aus 4.2 aber noch nicht eindeutig bestimmt, da es noch von Verschiebungen des gewählten  $360^\circ$ -Intervalls  $I$  abhängt.

<sup>24</sup> zunächst ebenfalls nicht klar definiert, weiter unten erläutert

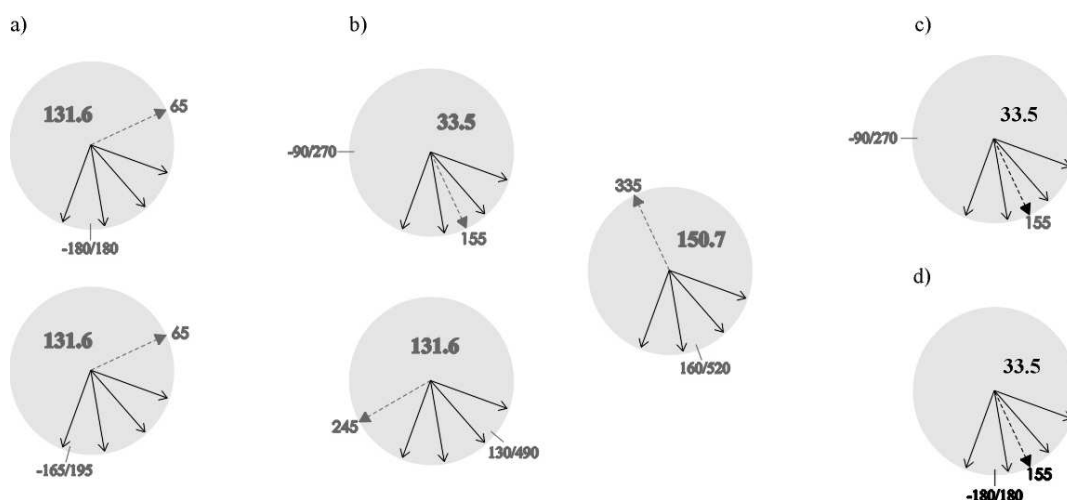


Abbildung 4.3. Zur Bestimmung von  $s_c$  und des zugehörigen Mittelwerts. Einzelwerte sind als Pfeile dargestellt, bei Mittelwerten mit unterbrochener Linie. Das entsprechende Intervall  $I$  ist durch seine beiden begrenzenden Werte zusammen mit einem Strich auf dem Kreis markiert. Die fettgedruckten Zahlen in den Kreisen sind die jeweiligen Standardabweichungen. Alle Werte sind in Grad angegeben.

- a) Zwei gleichwertige Darstellungen derselben Situation. Oben die Originalskala, unten ein anderes Intervall, Mittelwert an derselben Position auf dem Kreis, dasselbe  $s$ .
- b) Repräsentanten der drei weiteren qualitativ wirklich unterschiedlichen Möglichkeiten,  $I$  zu wählen.
- c) Das gewählte Optimum,  $s = s_c$ . Hier ist nun der Mittelwert zu bestimmen. In a) und b) wurden die Mittelwerte nur eingezeichnet, um ihre Lageveränderung bei einer Verschiebung des Intervalls  $I$  deutlich zu machen.
- d) Werte und Mittelwert, beschrieben im ursprünglichen Intervall.

(Dieser möglichen Verschiebung ist eine Drehung des Skalenursprungs gleichwertig.) Für  $I$  muß also eine weitere Randbedingung festgelegt werden. Es erscheint sinnvoll,  $I$  so zu legen, daß die Standardabweichung  $s$  minimal wird. Für jedes einzelne  $I$  minimiert der nach Gl. 4.1 berechnete Mittelwert  $s$  schon<sup>25</sup>, von diesen Minima wird das absolute gewählt. Dafür reicht es aus, eine Verschiebung des Intervalls  $I' \equiv [-180^\circ, 180^\circ)$  innerhalb des Intervalls  $[-180^\circ, 540^\circ)$  zuzulassen, es also wiederum um maximal  $360^\circ$  zu verschieben. (Äquivalent dazu: Der Skalenursprung kann um bis zu  $360^\circ$  gedreht werden, also jede Position auf dem Einheitskreis annehmen.) Es gilt demnach  $I = [-180^\circ + c, 180^\circ + c)$  mit  $c \in [0^\circ, 360^\circ)$ . Mit den auf  $I(c)$  beschränkten Werten,  $c$  so gewählt, daß  $s$  minimal ist, kann über Gleichung 4.1 indirekt der Mittelwert  $\bar{w}_c$  definiert werden. Während  $s_c$  durch das absolute Minimum aller  $s$  immer eindeutig definiert ist, ist das für  $c$  und  $\bar{w}_c$  nicht notwendigerweise der Fall. Für einen endlichen Satz von Werten – experimentell gewonnene Datensätze sind immer endlich und damit diskret verteilt – gibt es stets viele  $c$ , die dieselbe Varianz liefern. Das ist für den kleinsten Wert  $w_1$  in

<sup>25</sup> aufgrund der Definition des Mittelwerts

$I'$  leicht zu sehen: Für alle  $c \in [0^\circ, w_1 + 180^\circ)$  erhält man dieselbe Varianz und denselben Mittelwert. Entsprechendes gilt für alle der Größe nach geordneten  $w_i$  mit  $w_i \leq w_{i+1}$ . Solange die Intervallgrenze von  $I$  nicht über einen Einzelwert hinaus verschoben wird, ändert sich nichts. Damit existieren für  $N$  Werte höchstens  $N$  wirklich verschiedene Möglichkeiten, das Intervall  $I$  mit  $w_i + 180^\circ \leq c < w_{i+1} + 180^\circ$  festzulegen. So ist es auch praktisch möglich, für alle relevanten Repräsentanten der Skalendrehungen ( $c_i = w_i + 180^\circ$ ) die zugehörigen Varianzen zu berechnen. Für das  $c_i$  mit minimaler Varianz wird der Mittelwert berechnet und zusammen mit allen Einzelwerten in das ursprüngliche Intervall  $I'$  projiziert, also auf der ursprünglichen Skala beschrieben. Auf diese Weise kann für einen beliebigen endlichen Satz von Werten eine wohldefinierte Standardabweichung angegeben werden. In einigen Spezialfällen, auf die noch eingegangen wird, z.B. eine gleichmäßige Verteilung der Werte über volle  $360^\circ$ , gibt es mehr als einen optimalen Repräsentanten  $c_i$  und damit mehrere mögliche  $\bar{w}_c$ . Für nichtperiodische Größen entspräche dieses Beispiel einem unendlichen Satz von Werten mit konstanter Differenz aller direkt benachbarten Werte; auch dafür existiert kein eindeutig definierter Mittelwert.

Allen und Johnson hatten zur Definition eines Mittelwerts ebenfalls das Drehen des Koordinatensystems vorgeschlagen [All91]. Sie legten den Ursprung in die größte zwischen auf dem Einheitskreis direkt benachbarten Einzelwerten vorhandene Lücke. Daß diese Vorgehensweise der hier beschriebenen nicht äquivalent ist, wird weiter unten gezeigt. Zunächst werden im folgenden Eigenschaften und Grenzen der oben definierten Größen beschrieben und wird der Algorithmus zu ihrer Berechnung vorgestellt.

### 4.2.3 Eindeutigkeit des Mittelwerts und obere Grenze der Standardabweichung

Es gibt (diskrete) Winkelverteilungen, zu denen kein eindeutiger und vom Koordinatensystem unabhängiger Mittelwert angegeben werden kann. Als Beispiele sind in den Abbildungen 4.4 und 4.5 einige symmetrische Datensätze gezeigt. Für den Spezialfall genau zweier möglicher Mittelwerte  $M_1$  und  $M_2$  glei-

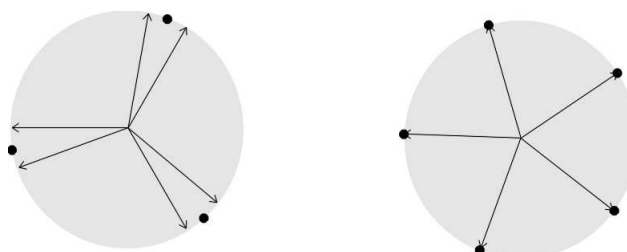


Abbildung 4.4. Darstellung zweier symmetrischer Datensätze für die kein eindeutiger Mittelwert angegeben werden kann.

cher Qualität ist es Ansichtssache, ob man auch hier auf eine Entscheidung verzichtet, oder ob wiederum der Mittelwert  $M_3$  von  $M_1$  und  $M_2$  als Optimum betrachtet wird. Liegen  $M_1$  und  $M_2$  um  $180^\circ$  auseinander, so ist eine solche erneute Mittelwertbildung jedenfalls sinnlos. Sonst liegen beide um bis zu  $120^\circ$  auseinander, und abhängig von dieser Differenz kann die Entscheidung getroffen werden.

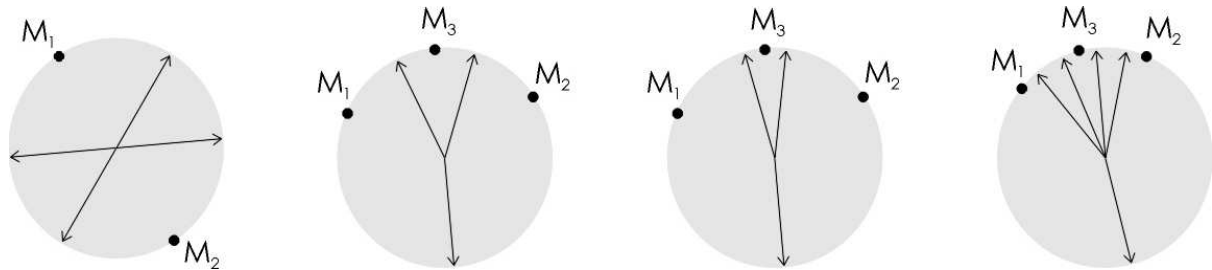


Abbildung 4.5. Darstellung weiterer symmetrischer Datensätze. Hier existieren jeweils zwei mögliche Mittelwerte mit zugehöriger minimaler Standardabweichung. Je nach Skalendrehung ist  $M_1$  oder  $M_2$  der resultierende Mittelwert. Wo beide nicht um  $180^\circ$  voneinander abweichen, ist ihr Mittelwert  $M_3$  eingetragen.

Da sie nicht mit einer minimalen Varianz begründet werden kann, ist sie etwas willkürlich. Trifft man sie und setzt  $M_3$  für  $\bar{w}$  in Gl. 4.2 ein, so erhält man  $s'$ . Dabei ist  $s'$  stets größer als die Standardabweichungen für die einzelnen Mittel  $M_1$  und  $M_2$ . Das Auftreten exakt symmetrischer Verteilungen in Meßdaten ist aber eher unwahrscheinlich.

Auch ohne direkte Symmetrie, wie bei den in den Abbildungen 4.4 und 4.5 gezeigten Fällen, kann es vorkommen, daß der Mittelwert nicht wohldefiniert ist. Abb. 4.6 zeigt einen solchen Fall. Hier liegt zwar keine Gleichverteilung, aber eine sehr gleichmäßige Verteilung vor. Sie weist je nach Drehung der Skala drei Mittelwerte mit jeweils derselben minimalen Standardabweichung auf. Die Eigenschaften einer solchen Verteilung werden im folgenden beschrieben.

Angenommen, es gibt zwei Mittelwerte  $M_1$  und  $M_2$  mit derselben zugehörigen Standardabweichung  $s$ . Ihre Differenz sei  $a$ . Wie oben erwähnt, gibt es für jeden solchen Mittelwert (endlich

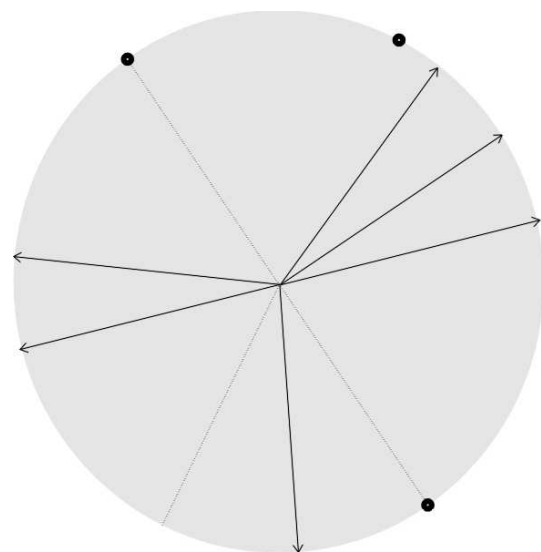


Abbildung 4.6. Darstellung eines weiteren Datensatzes ohne eindeutigen Mittelwert. Die einzelnen Winkel sind wie oben durch Pfeile dargestellt. Die Grenzen des Intervalls  $I$  in seinen drei möglichen optimalen Lagen sind durch unterbrochene Linien gekennzeichnet. Punkte markieren die zugehörigen Mittelwerte.

gibt es für jeden solchen Mittelwert (endlich

viele Winkel vorausgesetzt) eine ganze Schar von Drehungen der Skala, die dazu die kleinste Standardabweichung liefern. Ein Repräsentant dieser für die Beschreibung eines Mittelwerts optimalen Koordinatensysteme ist dasjenige, bei dem Skalenumstetigkeit und Mittelwert einander auf dem Einheitskreis genau gegenüberliegen (Beweis im Abschnitt 4.3.2.2). Mit einer von  $-180^\circ$  bis  $180^\circ$  reichenden Skala, das ist hier die geeignetste, hat jeder Mittelwert also auf *seiner* optimal gedrehten Skala den Wert  $0^\circ$ . Es ist demnach  $\bar{w} = M_1 = 0^\circ$  mit  $s_1$ , und die Skala kann so gedreht werden, daß im neuen System  $\bar{w}' = M_2 = 0^\circ$  gilt, mit  $s_2 = s_1$ . Was passiert bei der Drehung? Letztlich wachsen alle Werte  $w_i$  auf  $w_i + a$  (damit ist hier die Drehrichtung entsprechend gewählt, sonst hieße es:  $w_i \rightarrow w_i - a$ ). Außerdem werden vielleicht  $p$  Werte, also die  $p$  ursprünglich größten der aufsteigend sortierten Werte, über die Unstetigkeitsstelle der Skala hinweggedreht. Für sie gilt  $w_i \rightarrow w_i + a - 360^\circ$ . Der Mittelwert ändert sich folgendermaßen:

$$\bar{w} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N w_i \quad \text{wird zu} \quad \bar{w}' = \frac{1}{N} \left[ \sum_{i=1}^N (w_i + a) - p \cdot 360^\circ \right]. \quad \text{Es gilt also} \quad \bar{w}' = \bar{w} + a - \frac{p}{N} \cdot 360^\circ.$$

Dies ist, wie schon  $\bar{w}, 0^\circ$ . Damit ist

$$N \cdot a = p \cdot 360^\circ, \quad \text{oder} \quad \frac{p}{a} = \frac{N}{360^\circ}. \quad (4.4)$$

Das heißt, die  $w_i$  müssen, wenn nicht lokal, so doch global, gleichmäßig über den Einheitskreis verteilt liegen. Auf dem über die Unstetigkeit hinweg gedrehten Kreisbogen müssen  $p = N \cdot a / 360^\circ$  Werte liegen. Nach dem Mittelwert wird jetzt die Standardabweichung betrachtet: Es gilt Gleichung 4.2. Dabei ist  $N$  konstant, die Wurzelfunktion ist streng monoton. Für den Vergleich zweier Standardabweichungen reicht es deshalb aus, den Zähler des Radikanden zu betrachten. Er wird  $Ns^2$  genannt. Damit ist:  $Ns^2 = \sum_{i=1}^N w_i^2$ .

$$\text{Mit der Drehung wird daraus} \quad Ns'^2 = \sum_{i=1}^q (w_i + a)^2 + \sum_{i=q+1}^N (w_i + a - 360^\circ)^2.$$

Es wurden  $p$  Werte über  $-180^\circ/180^\circ$  hinaus gedreht, die Anzahl der übrigen Werte ist  $q$ , mit  $p + q = N$ . Die Differenz  $Ns'^2 - Ns^2$  ist  $(0^\circ)^2$ , und ausgeschrieben, teilweise schon zusammengefaßt, lautet sie:

$$Ns'^2 - Ns^2 = N \cdot a^2 + p \cdot (360^\circ)^2 - 2 \cdot a \cdot \sum_{i=1}^N w_i - 2 \cdot 360^\circ \cdot \sum_{i=q+1}^N w_i - 2 \cdot 360^\circ \cdot p \cdot a = (0^\circ)^2.$$

Weil der Mittelwert im alten System  $0^\circ$  war, ist der dritte Term  $(0^\circ)^2$  und entfällt. Mit

Gleichung 4.4 wird das zu  $p \cdot (360^\circ)^2 - N \cdot a^2 - 2 \cdot 360^\circ \cdot \sum_{i=N-p+1}^N w_i = (0^\circ)^2$ . Es folgt

$$\tilde{w} \equiv \frac{\sum_{i=N-p+1}^N w_i}{p} = \frac{360^\circ - a}{2}. \quad (4.5)$$

Der Mittelwert der  $p$  Werte muß also mit der Mitte des über das Skalende hinaus gedrehten Kreisbogens zusammenfallen. Die Gleichungen 4.4 und 4.5 enthalten die in den Abbildungen 4.4 und 4.5 gezeigten spiegel- bzw. rotationssymmetrischen Spezialfälle.

Bevor der Algorithmus zur Berechnung von Standardabweichung und Mittelwert beschrieben wird, ist als wichtige Eigenschaft der neu definierten zyklischen Varianz noch zu erwähnen, daß sie im Gegensatz zum üblichen linearen Vorbild nicht unendlich groß werden kann. Die obere Grenze erhält man für eine Gleichverteilung der – im Grenzfall kontinuierlichen – Größe  $w$ :

$$s_{\max} = \sqrt{\frac{\int_{-180^\circ}^{180^\circ} (w - 0^\circ)^2 dw}{\int_{-180^\circ}^{180^\circ} 1 dw}} = \sqrt{\frac{2 \int_0^{180^\circ} w^2 dw}{2 \int_0^{180^\circ} 1 dw}} = 60 \cdot \sqrt{3}^\circ \quad (4.6)$$

Hier wurde ohne Beschränkung der Allgemeinheit  $\bar{w} = 0^\circ$  angenommen und zur Beschreibung das Intervall  $I = I' = [-180^\circ, 180^\circ)$  gewählt. Im Anhang wird bewiesen, daß der in Gleichung 4.6 für die kontinuierliche Gleichverteilung angegebene Wert von  $s$  tatsächlich auch der Grenzwert für diskrete Verteilungen ist.

## 4.3 Das Programm CYCLIST und der zugrundeliegende Algorithmus

### 4.3.1 Das Programm

Das C-Programm CYCLIST (für Cyclical Statistics), berechnet in der bestehenden Form Standardabweichungen und Mittelwerte von bis zu 10 verschiedenen Winkeln<sup>26</sup> für maximal 10 000 Datensätze. Der Algorithmus wird im folgenden kurz beschrieben.

<sup>26</sup> maximal 10 Torsionswinkel reichen zur Beschreibung der Aminosäure-Seitenketten aus

## 4.3.2 Der Algorithmus

### 4.3.2.1 Grundlegende Beschreibung

Prinzipiell könnten für alle zu betrachtenden Repräsentanten der Drehungen des Koordinatensystems die Standardabweichungen und Mittelwerte direkt nach den Gleichungen 4.1 und 4.2 berechnet und verglichen werden. CYCLIST kommt mit einem geringeren Rechenaufwand (Zahl der Multiplikationen) aus.

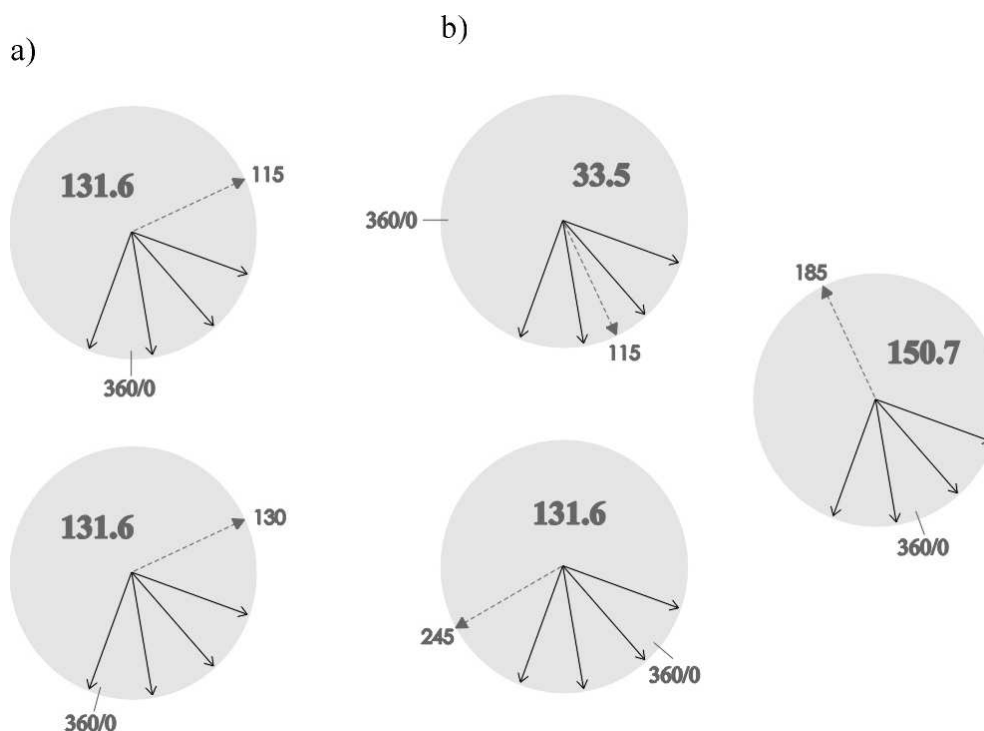


Abbildung 4.7. Zur Abhängigkeit der Standardabweichung  $s$  und des zugehörigen Mittelwerts von der Drehung der Skala. Einzelwerte sind als Pfeile dargestellt, Mittelwerte mit unterbrochener Linie. Der Skalenursprung ist durch seine beiden begrenzenden Werte zusammen mit einem Strich auf dem Kreis markiert. Die fettgedruckten Zahlen in den Kreisen sind die jeweiligen Standardabweichungen. Alle Werte sind in Grad angegeben (vgl. Abbildung 4.3).

a) Zwei gleichwertige Darstellungen derselben Situation. Oben die Originalskala, unten eine leicht gedrehte.  $s$  bleibt erhalten, der Mittelwert hat dieselbe Position auf dem Kreis, solange der Ursprung nicht über mindestens einen Wert hinweggedreht wird.

b) Repräsentanten der drei weiteren qualitativ wirklich unterschiedlichen Möglichkeiten die Skala zu drehen.

Abbildung 4.7 macht deutlich, wie sich beim Drehen der Skala der Mittelwert der als Radien eingezeichneten Einzelwerte ändert. Dabei bleibt seine Position relativ zu diesen gleich. Nur wenn der Skalenursprung ( $0^\circ/360^\circ$ ) über (wenigstens) einen Wert hinweggedreht wird, ändert sich auch die relative Position des Mittelwertes<sup>27</sup>. Genau damit ändert sich auch die Standardabweichung, die im aktuellen Koordinatensystem nach Gleichung 4.2 definiert ist. Bei  $N$  ge-

<sup>27</sup> Die hier geeignete Skala von  $0^\circ$  bis  $360^\circ$  wird im gesamten Kapitel 4.3.2 benutzt.

gebenen Einzelwerten gibt es also nur maximal  $N$  wirklich unterschiedliche Möglichkeiten, das System zu drehen; bei einer  $360^\circ$ -Drehung passiert der Skalenursprung  $N$  Werte. Dies wurde oben schon erwähnt. Dreht man nun Schritt für Schritt die Skala einmal im Kreis herum und beachtet, wie sich Mittelwert und Standardabweichung dabei ändern, so findet man den Algorithmus von CYCLIST, der zur minimalen Standardabweichung führt. Es werden die auf der Skala von  $0^\circ$  bis  $360^\circ$  nach wachsendem Wert sortierten Winkel  $w_1$  bis  $w_N$  und ihre Differenzen  $\Delta_i = w_i - w_{i-1}$  ( $\Delta_1 = w_1 - w_N + 360^\circ$ ) benutzt. Zunächst wird die Skala so gedreht, daß  $w_N = 0^\circ$  ist. Dies ist die

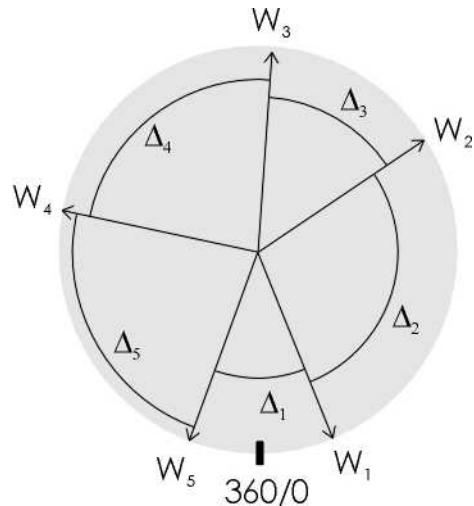


Abbildung 4.8. Ein Datensatz aus fünf Winkeln, dargestellt als Pfeile im Einheitskreis. Der Skalenursprung ist durch einen Strich markiert. Die einzelnen Werte sind ebenso wie ihre als Bögen dargestellten Differenzen durchnummeriert wie im Haupttext beschrieben.

Startposition,  $\bar{w}_N$  und  $s_N$  werden berechnet. Anschließend wird die Skala weitergedreht, so daß die Werte jeweils von  $w_{i\text{alt}}$  auf  $w_{i\text{neu}}$  anwachsen, bis  $w_{N-1\text{neu}} = 360^\circ$  ist. Dabei wächst auch  $\bar{w}$ :  $\bar{w}_{\text{neu}} = \bar{w}_{\text{alt}} + \Delta_N$ . Wird jetzt der Skalenursprung auf die andere Seite von  $w_{N-1\text{neu}}$  gelegt, das heißt  $w_{N-1\text{neu}} = 0^\circ$ , so ist der neue Mittelwert durch Gleichung 4.7 gegeben:

$$\bar{w}_{\text{neu}} = \bar{w}_{\text{alt}} + \Delta_N - 360^\circ/N \quad (4.7)$$

Wie hier für  $w_N$  und  $w_{N-1}$  kann dies für alle Werte  $w_i$  zwischen  $0^\circ$  und  $360^\circ$  weitergeführt werden. Auf diese Weise erhält man sukzessive die Mittelwerte für alle interessanten Drehungen der Skala. (Die Repräsentanten sind hier so gewählt, daß ein Wert bei  $0^\circ$  liegt.) Die Standardabweichungen sind nach Gleichung 4.2 als

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (w_i - \bar{w})^2}{N}} \quad (4.2)$$

definiert. Der Einfachheit wegen wird wie schon oben vorerst nur der Zähler des Radikanden betrachtet und mit  $Ns^2$  bezeichnet. Damit ist



$$Ns^2 = \sum_{i=1}^N (w_i - \bar{w})^2 = \sum_{i=1}^N w_i^2 - N \cdot \bar{w}^2. \quad (4.8)$$

Um zu sehen, wie sich  $Ns^2$  ändert, wenn zunächst ein beliebiger Wert  $w_k = 0^\circ$  ist, und dann das System gedreht wird, so daß  $w_{k-1} = 0^\circ$  (und  $w_k = 0^\circ + \Delta_k$ ), wird die Differenz der zu den beiden Skalenpositionen gehörenden Werte  $Ns_k^2$  und  $Ns_{k-1}^2$  betrachtet. Es ist mit Gl. 4.8

$$Ns_k^2 = \sum_{i=1}^N w_i^2 - N \cdot \left( \frac{\sum_{i=1}^N w_i}{N} \right)^2, \quad (4.9)$$

$$Ns_{k-1}^2 = \sum_{i=1}^N (w_i + \Delta_k)^2 - (360^\circ)^2 - N \cdot \left( \frac{\sum_{i=1}^N w_i}{N} + \Delta_k - \frac{360^\circ}{N} \right)^2. \quad (4.10)$$

Nach kurzer Rechnung erhält man für die Differenz der beiden Gleichungen

$$Ns_{k-1}^2 - Ns_k^2 = 720^\circ \cdot \left[ \bar{w}_k + \Delta_k - 180^\circ \cdot \left( 1 + \frac{1}{N} \right) \right]. \quad (4.11)$$

Hat man einen Mittelwert und eine Standardabweichung berechnet, z.B.  $\bar{w}_N, s_N$ , so können die übrigen demnach mit Hilfe der Gleichungen 4.7 und 4.11 bestimmt werden. Natürlich ist die Summe der  $N$  Differenzen  $(0^\circ)^2$ . Auf diese Weise wird das bei direktem Gebrauch der Gleichungen 4.1 und 4.2 notwendige häufige Quadrieren und Summieren aller Einzelwerte  $w_i$  vermieden, was die Rechenzeit verringert. Das schließlich gefundene minimale  $Ns_m^2$  ist noch durch  $N$  zu dividieren und zu radizieren um die Standardabweichung  $s_c$  zu erhalten. Weil  $N$  konstant und die Wurzelfunktion streng monoton ist, ist mit  $Ns^2$  auch  $s$  minimal. Dies rechtfertigt den einfacheren Gebrauch von  $Ns^2$  für die Rechnungen. Abschließend ist der gefundene optimale Mittelwert noch auf der ursprünglichen, das heißt ungedrehten, Skala zu beschreiben.

#### 4.3.2.2 Mehrfaches Auftreten von Einzelwerten

Falls ein Wert  $w_i$  im Datensatz mehrfach, etwa  $p$ -mal, vorkommt, so ist es sinnvoll, den Skalenursprung in einem Schritt direkt über die ganze Schar dieser  $p$  Einzelwerte hinwegzudrehen, sie also alle gleichzeitig auf  $0^\circ$  zu setzen<sup>28</sup>. Es läßt sich leicht nachrechnen, wie Gl. 4.11 dafür abzuändern ist:

$$Ns_{k-1}^2 - Ns_k^2 = 720^\circ \cdot p \cdot \left[ \bar{w}_k + \Delta_k - 180^\circ \cdot \left( 1 + \frac{p}{N} \right) \right]. \quad (4.12)$$

<sup>28</sup>  $p$  ist ein anderes als in 4.2.3, dort war es die Zahl der in einem Intervall enthaltenen Werte, hier ist es der Entartungsgrad eines Wertes.

Das erspart  $p-1$  Rechenschritte. Dazu ist noch zu zeigen, daß die Zwischenschritte wirklich stets uninteressant sind, also übergangen werden können. Zunächst wird gezeigt, daß bei optimaler Drehung der Skala kein Wert weiter als  $180^\circ$  vom Mittelwert entfernt liegt. Anders ausgedrückt: Ist die Position des optimalen Mittelwerts bekannt (Lage bezüglich der Einzelwerte), so ist eine der möglichen Drehungen, die zu diesem Wert führen, diejenige, für die die Unstetigkeitsstelle der Skala genau auf der gegenüberliegenden Seite des Einheitskreises liegt. Dies erwartet man auch intuitiv. Dazu sei folgende Situation angenommen: Es ist  $\bar{w}' = \bar{w}_k + \Delta_k$  der Mittelwert nach der Rotation des Werts  $w_{k-1}$  auf  $360^\circ$  (noch nicht  $0^\circ$ ), und es sei  $\bar{w}' \leq 180^\circ$ . Dann gilt für das Herüberbringen von  $w_{k-1}$  nach  $0^\circ$  (Gl. 4.11):

$$\Delta N s^2 \leq 720^\circ \cdot \left[ 180^\circ - 180^\circ \left( 1 + \frac{1}{N} \right) \right] = -\frac{720^\circ \cdot 180^\circ}{N} < (0^\circ)^2 \quad (4.13)$$

Das bedeutet, daß  $Ns^2$  noch nicht minimal war, und  $\bar{w}'$  nicht der optimale Mittelwert. Soweit zum Fall  $\bar{w}' < 180^\circ < w_{k-1} = 360^\circ$ . Aus Symmetriegründen gilt entsprechendes für den Fall  $\bar{w}' > 180^\circ > w_k = 0^\circ$ . Demnach ist es stets sinnvoll, ganz am Skalenende liegende Werte auf diejenige Seite zu legen, auf der ihre Differenz zum aktuellen Mittelwert am geringsten ist. Dies gilt natürlich auch bei mehrfachem Auftreten, was den Gebrauch von Gl. 4.12 begründet. Nach der Optimierung wird der Mittelwert auf dem Einheitskreis letztlich dem Skalenursprung gegenüberliegen. In diesem System liegt nach Gleichung 4.13 kein Wert genau bei  $0^\circ$  oder  $360^\circ$ .

### 4.3.3 Funktionstests

#### 4.3.3.1 Methoden

Für die erste Erprobung wurde eine Testversion des Programms benutzt, die das manuelle Einlesen von kleinen Datensätzen erlaubte. So konnte das grundsätzliche Funktionieren kontrolliert werden. Auch Spezialfälle wie die oben erwähnten symmetrischen Verteilungen und das mehrfache Auftreten eines oder mehrerer Einzelwerte ließen sich damit austesten. An größeren Datensätzen mit bekannten Parametern  $\bar{w}$ ,  $s$  wurde deren Erhaltung überprüft. Dies geschah abhängig von den Originalwerten und der Größe (Zahl der Einzelwerte) des jeweiligen Datensatzes.

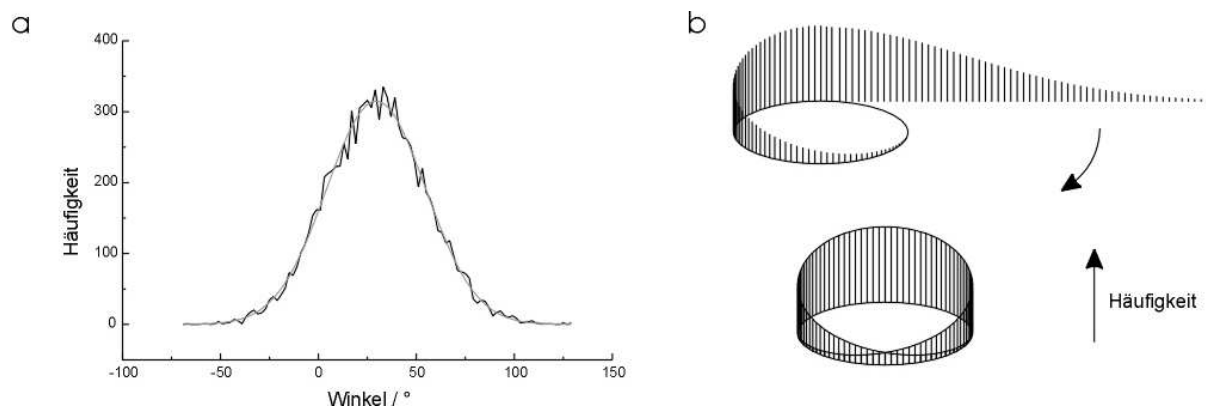


Abbildung 4.9.

a) Datensatz von 100 000 annähernd gaußverteilten Winkelwerten, schwarz der mit dem Zufallsgenerator erzeugte Datensatz, grau die darangepaßte Gaußkurve, Mittelwert  $30^\circ$ , Standardabweichung ca.  $25^\circ$ .

b) Übertragung einer breiteren Gaußverteilung auf den Einheitskreis, im Überlappungsbereich der Linienflügel werden die Häufigkeiten addiert.

Ein kleines Hilfsprogramm lieferte dazu Zufallswerte mit annähernd gaußförmiger Wahrscheinlichkeitsverteilung. Abbildung 4.9 a) zeigt einen solchen Datensatz von 100 000 Einzelwerten. Abb. 4.9 b) illustriert, wie die Werte auf den Einheitskreis verteilt wurden. Die berechnete Standardabweichung mußte von nachträglichen Drehungen des gesamten Datensatzes und vom ursprünglichen Mittelwert unabhängig sein. Um die Erhaltung des Mittelwerts durch das Programm CYCLIST prüfen zu können, wurden die Gaußverteilungen symmetrisiert: Schon der Gebrauch des Zufallsgenerators erlaubt natürlich bei einer endlichen Zahl von Einzelwerten im zu erstellenden Datensatz Abweichungen des Mittelwerts von seinem Sollwert. Diese wurden vermieden, indem zu jedem Wert auch der bezüglich des vorgesehenen Mittelwerts genau gespiegelte Wert in den Datensatz aufgenommen wurde. Schließlich wurde das Eingabeformat weitgehend an das entsprechende Ausgabeformat des Programms AURELIA [Nei95] angepaßt, das korrekte Einlesen sowie die Ausgabe der Ergebnisse wurden getestet.

### 4.3.3.2 Ergebnisse

Mittelwert	$s_{Soll}$	$s_c$
149,99	5	5,00
150,01	10	10,02
149,98	15	15,10
149,92	20	20,01
149,98	25	25,11
149,93	30	30,23
149,95	35	35,33
149,98	40	40,34
150,04	45	45,51
150,09	50	50,63
150,01	55	55,65
150,08	60	60,42
149,90	65	65,26
150,20	70	69,22
150,43	75	73,93
149,62	80	77,28
150,05	85	80,62
149,65	90	83,83
149,06	95	86,53
151,36	100	88,74
149,70	105	91,62
149,26	110	93,39
150,08	115	95,02
151,75	120	96,90
149,41	125	97,82
150,33	130	99,17
150,40	135	99,86
151,00	140	101,00
143,37	145	101,52
150,76	150	102,27
147,04	155	102,45
148,05	160	102,80
151,61	165	103,06
152,08	170	103,25
152,26	175	103,36
153,37	180	103,19

Tabelle 4.1  
Gaußverteilte Zufalls-  
werte,  $s_{Soll}$  und  $s_{ist}$ .

Alle Tests des Programms in seiner aktuellen Fassung verliefen durchweg positiv. Die für kleine Datensätze von Hand gefundenen Erwartungswerte von Mittelwert und Standardabweichung stimmten mit den von Cyclist berechneten überein;  $s_c$  blieb bei nachträglichen Drehungen erhalten. Die symmetrisierten Gaußverteilungen lieferten bei kleinen Standardabweichungen exakt den gewünschten Mittelwert. Bei größeren Standardabweichungen ab ca.  $60^\circ$  überlappten die Flügel der Verteilung so stark, daß auch der auf der gegenüberliegenden Seite des Einheitskreises liegende Wert als Mittelwert auftrat. Dementsprechend streuten bei den nicht symmetrisierten Gaußverteilungen mit Standardabweichungen ab rund  $95^\circ$  die erhaltenen Mittelwerte um mehr als  $1^\circ$ . Besonders interessant war das Verhalten der zyklischen Standardabweichung als Funktion der Varianz ( $s_{Soll}$ ) der Gaußverteilung. Die in Tabelle 4.1 gezeigten Daten weisen eine systematische Abweichung des berechneten  $s_c$  vom ursprünglichen  $s_{Soll}$  auf. Für  $s_{Soll} < 70^\circ$  sind die erhaltenen Werte systematisch zu groß, für größere  $s_{Soll}$  systematisch kleiner als  $s_{Soll}$ . Eine graphische Darstellung der Daten aus Tabelle 4.1 befindet sich aus Platzgründen im Anhang.

### 4.3.4 Erste Anwendungen

Um die Anwendbarkeit der neu definierten Größen zu demonstrieren, wird zunächst eine Gruppe von strukturell und funktional ähnlichen, von der Sequenz her aber recht unterschiedlichen Proteinen betrachtet. Es sind HPrs (**H**istidine-containing phosphocarrier **P**roteins) aus verschiedenen Organismen, die bei relativ geringen sequentiellen Ähnlichkeiten (30-40 %) doch annähernd gleiche Tertiärstrukturen aufweisen. Wo stimmen die Strukturen auch lokal überein, wo nicht?

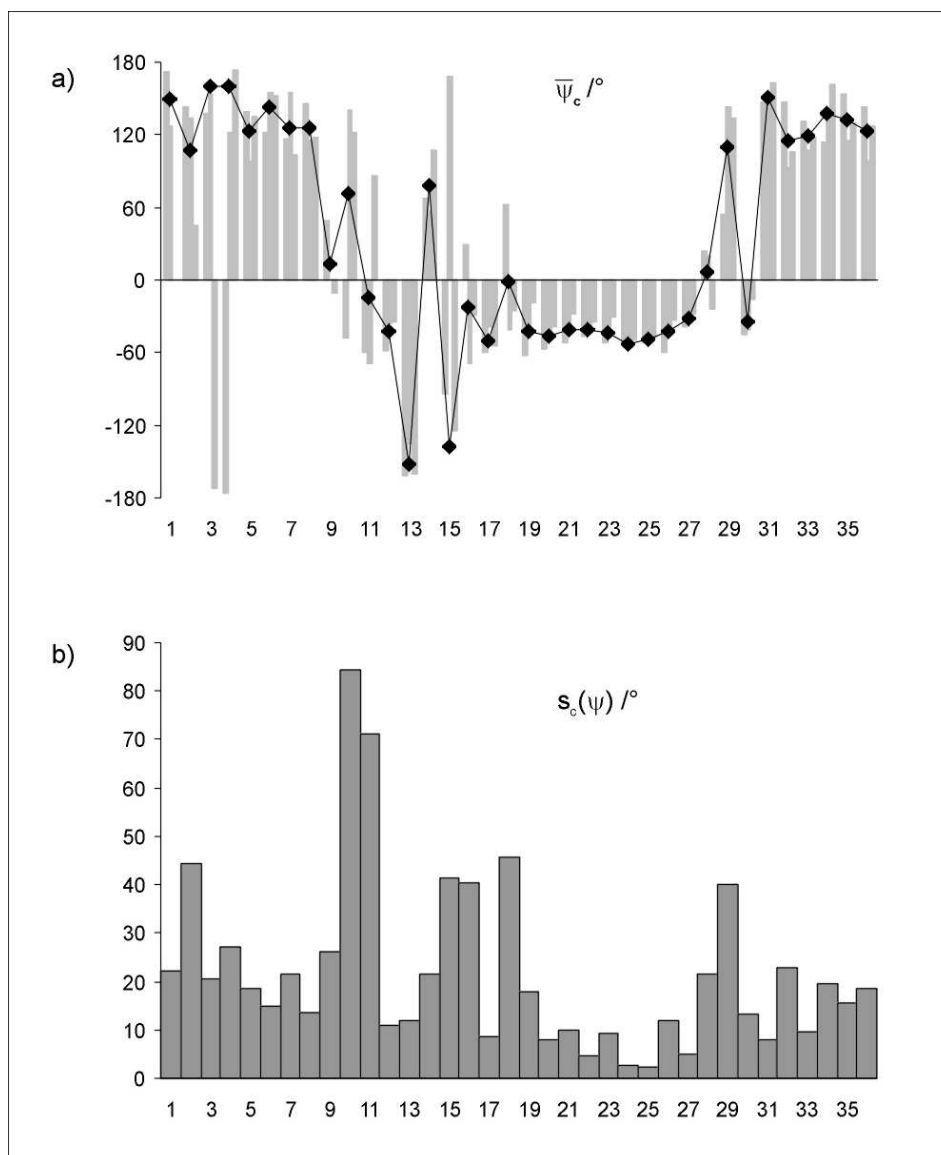


Abbildung 4.10. Vergleich der NMR-Strukturen von *S. aureus*, *B. subtilis* und *E. faecalis*

a) Werte von  $\psi_i$  für die ersten 36 Aminosäurereste, dargestellt als graue Säulen; als schwarze Linie die entsprechenden Mittelwerte

b)  $s_{min}(\psi_i)$

Für die Betrachtung dihedraler Hauptkettenwinkel spielt der Aminosäuretyp keine Rolle, was den Vergleich von Strukturen verschiedener Proteine miteinander ermöglicht.

Abbildung 4.10 a) zeigt die ersten 36 Werte von  $\psi$  für die drei Strukturen von HPr aus *S. aureus* [Kal93], *B. subtilis* [Wit92] und *E. coli* [Nul95] zusammen mit ihren Mittelwerten. Insbesondere für die Reste 3, 4 und 15 ist zu sehen, daß positive und negative Winkel um  $180^\circ$  sich nur um kleine Winkel unterscheiden, nicht etwa um  $360^\circ$ . Der Betrag der resultierenden Mittelwerte ist entsprechend groß. Abb. 4.10 b) zeigt  $s_c$  für denselben Sequenzausschnitt.

Strukturell ähnliche Regionen und solche, die sich weniger ähneln oder flexibler sind, lassen sich klar unterscheiden. Relativ große Werte für die Reste 10, 11 und 29 entsprechen loop-Regionen, um Rest 16 herum liegt das aktive Zentrum.

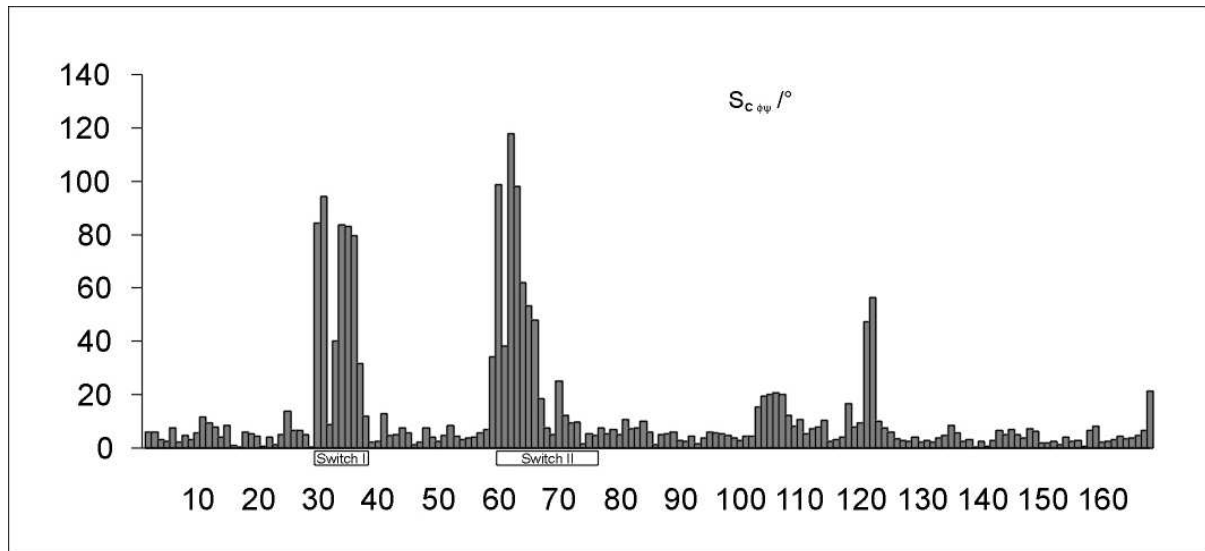


Abbildung 4.11. Darstellung von  $s_{c\phi\psi}$  für die Reste 2 bis 168 von RasGTP und RasGDP. Zugrundgelegt sind die Strukturen 4Q21 und 6Q21 der PDB.

Als zweites Beispiel dienen die Strukturen des Wildtyps von Ras in der GTP-Form und in der GDP-Form. Die in der PDB ausgewählten Strukturen stammen vom selben Autor [Mil90]. Sie sollten sich hauptsächlich in den als switch I (Reste 30-38) und switch II (Reste 60-67) bekannten Regionen unterscheiden. Dies ist in Abbildung 4.11 deutlich zu erkennen. Sie zeigt für die Reste 2 bis 168 die aus den beiden Strukturen berechnete Größe  $s_{c\phi\psi}$  mit

$$s_{c\phi\psi} \equiv \sqrt{s_c^2(\phi) + s_c^2(\psi)}. \quad (4.14)$$

Ihr Wert ist in der Region um Aminosäure 106 erhöht, ebenso um Aminosäure 122, direkt benachbart zur G4-Region (Reste 117-120), die direkt an der Nukleotidbindung beteiligt ist. Besonders auffällig sind tatsächlich die Werte in den switch-Regionen.

#### 4.4 Diskussion

Die Testergebnisse zeigen ebenso wie die Anwendungen, daß das Programm CYCLIST funktioniert. Bild 4.10 a) insbesondere zeigt, daß hier das Problem der Skalenunstetigkeit keine Rolle mehr spielt. Die Schwankungen des Mittelwerts um den Sollwert der unsymmetrischen Datensätze, bzw. das Auftreten des um  $180^\circ$  verschobenen Werts bei den symmetri-

schen, haben zwei Ursachen. Eine ist das Verhalten des Zufallsgenerators, der keine gleichverteilten Werte liefert. Erst mit dem „Aufwickeln“ der annähernd gaußverteilten Daten auf den Einheitskreis erhält man das entscheidende Überlappen der Flanken der Verteilung. Die Kombination beider Effekte verursacht die Schwankungen der berechneten Mittelwerte. Die Konsequenz ist letztlich, daß für mit Rauschen behaftete oder kleine Datensätze, denen eine breite Gaußverteilung zugrundeliegt, die Angabe des Mittelwerts grundsätzlich problematisch wird. Die tatsächliche Varianz hängt von den bei der Datengewinnung auftretenden zufälligen Fehlern ab. Diese, hier durch den Zufallsgenerator eingeführt, führen auch zu den zunächst systematisch zu großen Werten der zyklischen Standardabweichung. Der relative Fehler (Abweichung von der Gleichverteilung) der vom Generator gelieferten Werte, denen dann die Gaußfunktion aufgeprägt wird, steigt mit der Größe des zu füllenden Intervalls (Breite der Gaußkurve, bei den Tests  $[-4s, 4s]$ ) an. Ab Werten um  $70^\circ$  dominiert der Überlappungseffekt auf dem Kreis (Tabelle 4.1). Mit wachsendem  $s_{\text{Soll}}$  werden nun die zyklischen Standardabweichungen systematisch kleiner als der „Sollwert“. Der in Teil 4.2.3 oben angegebene Grenzwert wird im Rahmen der zufälligen Fehler bestätigt. Diese könnten durch eine höhere Anzahl eingehender Werte ( $N > 100\,000$ ) verringert werden, das würde den Aufwand an Rechenzeit drastisch erhöhen. Auch so werden aber die Merkmale der zyklischen statistischen Größen deutlich.

Die Methode, die Skala grundsätzlich einmal um volle  $360^\circ$  zu drehen, ist nicht elegant. Sie sichert aber das Auffinden des absoluten Minimums und vor allem *aller* möglichen optimalen Koordinatensysteme.

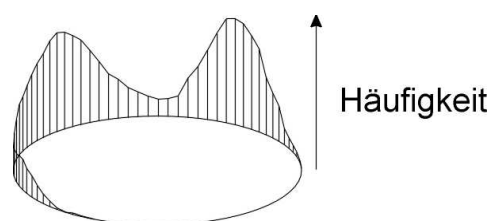


Abbildung 4.12.  
Wahrscheinlichkeitsverteilung auf dem Einheitskreis mit mehreren Maxima

Datensätze, wie der in Abbildung 4.12 dargestellte, dessen Verteilungsfunktion mehrere Häufungspunkte aufweist, sind problematisch. Hier gibt es nun einen klar definierten Mittelwert, der aber weit von beiden Häufungspunkten entfernt liegt. Das Programm CYCLIST setzt konzeptionell voraus, daß es nur einen Häufungspunkt gibt, die Verteilung also unimodal ist. Daten mit komplizierteren zugrunde liegenden Verteilungen werden i.a. nicht sinnvoll interpretiert. Dies ist aber keine programmspezifische Frage, sondern bei der Angabe eines arithmetischen Mittels grundsätzlich der Fall.

Schließlich soll kurz auf die von Allen [All91] vorgeschlagene Drehung des Koordinatensystems eingegangen werden. Demnach würde der Ursprung bzw. die Unstetigkeit der Skala im betrachteten Datensatz zwischen die am weitesten voneinander entfernten der einander direkt benachbarten Einzelwerte gelegt. In Abbildung 4.8 etwa läge sie zwischen  $w_1$  und  $w_2$ . Diese Wahl der Skala erscheint bei genauer Betrachtung etwas willkürlich. Auch hierbei soll im Prinzip wohl die Standardabweichung minimiert werden. Da dies allerdings nicht konsequent geschieht, ist das Ergebnis nicht notwendig dasselbe wie beim oben erläuterten neuen Verfahren. Abbildung 4.13 gibt ein Beispiel. Für als Pfeile dargestellten Winkel erhält man bei der gezeigten Lage der Skalenunstetigkeit einen Mittelwert von rund  $110^\circ$ . Nach Teil 4.3.2.2 ist die Skala also nicht optimal, die resultierende Standardabweichung wird nicht minimiert.

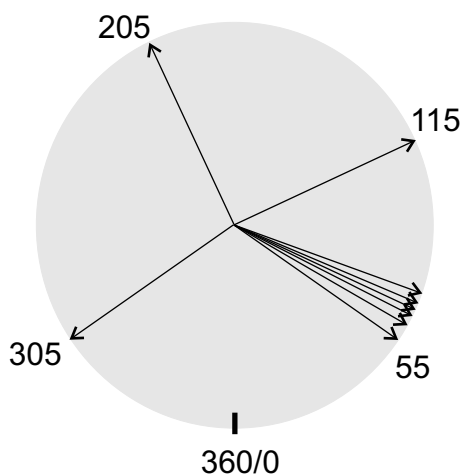


Abbildung 4.13. Darstellt ist ein Datensatz von 9 Winkeln. Für vier der Winkel ist die Lage im Einheitskreis durch die Maßzahl in Grad angegeben, die übrigen fünf Winkel wurden gleichmäßig um  $65^\circ$  herum verteilt. Der Skalenursprung liegt hier auf dem längsten freien Kreisbogen, der Mittelwert liegt bei ca.  $110^\circ$ . Damit ist die Lage der Skala nicht ideal; Ursprung und Mittelwert sollten einander auf dem Einheitskreis gegenüberliegen.

#### 4.4.1 Zusammenfassung

Es wurde eine neue Methode<sup>29</sup> zur Bestimmung der statistischen Parameter Mittelwert und Standardabweichung zyklischer Daten beschrieben. Sie eignet sich für den (lokalen) Vergleich von Molekülstrukturen anhand der Torsionswinkel. Besonders nützlich könnte sie zur Beschreibung struktureller Unterschiede verschiedener Konformationen eines Proteins sein (Lokalisierung der beweglichen „Gelenke“). Anwendungsbeispiele wurden vorgestellt und wichtige Eigenschaften der Parameter sowie Grenzen des Konzepts aufgezeigt.

<sup>29</sup> veröffentlicht: [Dök99]



## Literatur

- Abr61 Abragam, A.; The Principles of Nuclear Magnetism. Auflage von 1999, Oxford University Press, Oxford 1961.
- Ada90 Adam, S. A., Sterne Marr, R. und Gerace, L. (1990). *The Journal of Cell Biology*, **111**, 807-816.
- Ada94 Adam, E. J. H. und Adam, S. A. (1994). *The Journal of Cell Biology*, **125** (3), 547-555.
- Ake93 Akey, C. W. und Radermacher, M. (1993). *The Journal of Cell Biology*, **122**, 1-19.
- Alb93 Albright, C. F., Giddings, B. W., Liu, J., Vito, M. und Weinberg, R. A. (1993). *The EMBO Journal*, **12** (1), 339-347.
- All91 Allen und F. H., Johnson, O. (1991). *Acta Crystallographica*, **B47**, 62-67.
- All00 Allen, T. D., Cronshaw, J. M., Bagley, S., Kiseleva, E. und Goldberg, M. W. (2000). *Journal of Cell Science*, **113**, 1651-1659.
- Anf66 Anfinson, C. B. (1966). *Harvey Lectures*, **91**, 95-115.
- Art98 Arts, G.-J., Kuersten, S., Romby, P., Ehresmann, B. und Mattaj, I. W. (1998). *The EMBO Journal*, **17** (24), 7430-7441.
- Aue76 Aue, W. P., Bartholdi, E. und Ernst, R. R. (1976). *The Journal of Chemical Physics*, **64** (5), 2229-2246.
- Bai93 Bai, Y., Milne, J. S., Mayne, L. und Englander, S. W. (1993). *Proteins: Structure, Function and Genetics*, **17**, 75-86.
- Bag01 Bagby, S., Tong, K. I. und Ikura, M. (2001) *Methods in Enzymology*, **339**, 20-41.
- Bax85 Bax, A. und Davies, D. G. (1985). *Journal of Magnetic Resonance*, **65**, 355-360.
- Bax90 Bax, A., Ikura, M., Kay, L. E., Torchia, D. A. und Tschudin, R. (1990). *Journal of Magnetic Resonance*, **86**, 304-318.
- Bay00 Bayliss, R., Corbett, A. H. und Stewart, M. (2000). *Traffic*, **1**, 448-456.
- Bed95 Beddow, A. L., Richards, S. A., Orem, N. R. und Macara, I. G. (1995) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **92**, 3328-3332.
- Ber77 Bernstein, F. C., Koetzle, T. F., Williams, G. J., Meyer Jr., E. E., Brice, M. D., Rodgers, J. R., Kennard, O., Shimanouchi, T., Tasumi, M. (1977). *Journal of Molecular Biology*, **112**, 535-542.
- Bis91a Bischoff, F. R. und Postingl, H. (1991). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **88**, 10830-10834.
- Bis91b Bischoff, F. R. und Postingl, H. (1991). *Nature*, **354**, 80-82.
- Bis94 Bischoff, F. R., Klebe, C., Kretschmer, J., Wittinghofer, A. und Postingl, H. (1994). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **91**, 2587-2591.
- Bis95a Bischoff, F. R., Krebber, H., Kempf, T., Hermes, I. und Postingl, H. (1994). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **92**, 1749-1753.
- Bis95b Bischoff, F. R., Krebber, H., Smirnova, E., Dong, W. und Postingl, H. (1995). *The EMBO Journal*, **14** (4), 705-715.
- Bis97 Bischoff, F. R. und Görlich, D. (1997). *FEBS Letters*, **419**, 249-254.
- Bla84 Blake, C. C. F. und Johnson, L. N. (1984). *Trends in Biochemical Sciences*, **9**, 147-151.
- Blo99 Blomberg, N., Sattler, M. und Nilges, M. (1999) *Journal of Biomolecular NMR*, **15**, 269-270.
- Bom99 Bomke, J.; Das YfiD-Protein als Modell der Glycylradikaldomäne der Pyruvat-Formiat-Lyase. Isolierung des rekombinanten Proteins und Strukturuntersuchungen mit heteronuklearer NMR-Spektroskopie. Dissertation, Universität Heidelberg, 1999.
- Bou91 Bourne, H. R., Sanders, D. A. und McCormick, F. (1991). *Nature*, **349**, 117-127.
- Bra83 Braunschweiler, L. und Ernst, R. R. (1983). *Journal of Magnetic Resonance*, **53**, 521-528.
- Bra99 Bracken, C., Carr, P. A., Cavanagh, J. und Palmer, A. G. III (1999). *Journal of Molecular Biology*, **285**, 2133-2146.
- Bre90 Breeuwer, M. und Goldfarb, D. S. (1990). *Cell*, **60**, 999-1008.

- Bro91 Bronstein, I. N. und Semendjajew, K. A.; Taschenbuch der Mathematik. 25. Aufl., Verlag Teubner, Stuttgart 1991.
- Bru86 Brunger, A. T., Clore, G. M., Gronenborn, A. M. und Karplus, M. (1986). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **83**, 3801-3805.
- Bru98 Brunger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J.-S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N. S., Read, R. J., Rice, L. M., Simonson, T., and Warren, G. L. (1998). *Acta Crystallographica*, **D54**, 905-921.
- Bru00 de Bruyn, K. M. T., de Rooij, J., Wolthuis, R. M. F., Rehmann, H., Wesenbeek, J., Cool, R. H., Wittinghofer, A., Bos, J. L. (2000). *The Journal of Biological Chemistry*, **275** (38), 29761-29766.
- Bun79 Bundi, A. und Wüthrich, K. (1979). *Biopolymers*, **18**, 285-297.
- Cai01 Cai, Y, Singh, B. B., Aslanukov, A., Zhao, H. und Ferreira, P. A. (2001). *The Journal of Biological Chemistry*, **276**, 41594-41602.
- Can80 Cantor, C. R. und Schimmel, P. R.; Biophysical Chemistry Part II: Techniques for the study of biological structure and function. Freeman, 11. Aufl., New York 1998.
- Cav96 Cavanagh, J., Fairbrother, W. J., Palmer, A. G. III, Skelton, N. J.; Protein NMR Spectroscopy. Principles and Practice. Academic Press, San Diego 1996.
- Clo90 Clore, G. M., Szabo, A., Bax, A., Kay, L. E., Driscoll, P. C. und Gronenborn, A. M. (1990). *Journal of the American Chemical Society*, **112**, 4989-4991.
- Cha86 Chardin, P. und Tavitian, A. (1986). *The EMBO Journal*, **5**, 2203-2208.
- Coo95 Cooper, A. A. und Stevens, T. H. (1995). *Trends in Biochemical Sciences*, **20**, 351-356.
- Cor99 Cornilescu, G., Delaglio, F. und Bax, A. (1999). *Journal of Biomolecular NMR*, **13**, 289-302.
- Cor99a Cordier, F. und Grzesiek, S. (1999). *Journal of the American Chemical Society*, **121**, 1601-1602.
- Cre93 Creighton, T.E.; Proteins. Structures and Molecular Properties. 2<sup>nd</sup> edition, Freeman, New York, 1993.
- Dav92 Davies, A. L., Keeler, J., Laue, E. D. und Moskau, J. (1992). *Journal of Magnetic Resonance*, **98**, 207-216.
- Del97 Delphin, C., Guan, T., Melchior, F. und Gerace, L. (1997). *Molecular Biology of the Cell*, **8**, 2379-2390.
- Der87 Derome, A. E.; Modern NMR Techniques for Chemistry Research. Auflage 1995, Pergamon Press, Oxford 1987.
- Din95 Dingwall, C, Kandels-Lewis, S. und Séraphin, B. (1995). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **92**, 7525-7529.
- Din98 Dingley, A. J. und Grzesiek, S. (1998). *Journal of the American Chemical Society*, **120**, 8293-8297.
- Dök99 Döker, R., Maurer, T., Kremer, W., Neidig, K.-P. und Kalbitzer, H. R. (1999). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **257**, 348-350.
- Dos00 Dosset, P., Hus, J.-C., Blackledge, M. und Marion, D. (2000). *Journal of Biomolecular NMR*, **16**, 23-28.
- Dre94 Drenth, J.; Principles of protein x-ray crystallography. Springer, 2. Aufl., New York 1995.
- Dri90 Drivas, G. T., Shih, A., Coutavas, E., Rush, M. G. und D'Eustachio, P. (1990). *Molecular and Cellular Biology*, **10**, 1793-1798.
- Ede67 Edelhoich, H. (1967). *Biochemistry* **6** (7), 1948-1954.
- Eng98 Englmeier, L., Olivo, J.-C. und Mattaj, I. W. (1998). *Current Biology*, **9**, 30-41.
- Ern66 Ernst, R. R. und Anderson, W. A. (1966). *The Review of Scientific Instruments*, **37** (1), 93-102.
- Fab94 Fabre, E. und Hurt, E. C. (1994). *Current Opinion in Cell Biology*, **6**, 335-342.
- Far94 Farrow, N. A., Muhandiram, R., Singer, A. U., Pascal, S. M., Kay, C. M., Gish, G., Shoelson, S. E., Pawson, T., Forman-Kay, J. D. und Kay, L. E. (1994). *Biochemistry*, **33**, 5984-6003.
- Far95 Farrow, N. A., Zhang, O., Szabo, A., Torchia, D. A. und Kay, L. E. (1995), *Journal of Biomolecular NMR*, **6**, 153-162.
- Fel72 Feldherr, C. M. (1972). *Advances in Cell and Molecular Biology*, **2**, 173-307.

- Fen98 Feng, W., Tejero, R., Zimmerman, D. E., Inouye, M. und Montelione, G. T. (1998). *Biochemistry*, **37**, 10881-10896.
- Fer96 Ferreira, P. A., Nakayama, T. A., Pak, W. L. und Travis, G. H. (1996). *Nature*, **383**, 637-640.
- Fin87 Finlay, D. R., Newmeyer, D. D., Price, T. M. und Forbes, D. J. (1987). *The Journal of Cell Biology*, **104**, 189-200.
- Flo95 Floer, M. und Blobel, G. (1995). *The Journal of Biological Chemistry*, **271** (10), 5313-5316.
- For97 Fornerod, M., Ohno, M., Yoshida, M. und Mattaj, I. W. (1997). *Cell*, **90**, 1051-1060.
- Fra96 Frank, J.; Three-Dimensional Electron Microscopy of Macromolecular Assemblies, Academic Press, San Diego 1996.
- Fus98 Fushman, D., Tjandra, N. und Cowburn, D. (1998). *Journal of the American Chemical Society*, **120** (42), 10947-10952.
- Fus99 Fushman, D. und Cowburn, D. (1999). *Journal of Biomolecular NMR*, **13**, 139-147.
- Gey95 Geyer, M., Neidig, K.-P. und Kalbitzer, H. R. (1995). *Journal of Magnetic Resonance. Series B*, **109**, 31-38.
- Gey97a Geyer, M. und Wittinghofer, A. (1997). *Current Opinion in Structural Biology*, **7** (6), 786-792.
- Gey97b Geyer, M., Herrmann, C., Wohlgemuth, S., Wittinghofer, A. und Kalbitzer, H. R. (1997). *Nature Structural Biology*, **4** (9), 694-699.
- Gör96a Görlich, D., Panté, N., Kutay, U., Aebl, U. und Bischoff, F. R. (1996). *The EMBO Journal*, **15** (20), 5584-5594.
- Gör96b Görlich, D., Kraft, R., Kostka, S., Vogel, F., Hartmann, E., Laskey, R. A., Mattaj, I. W. und Izaurralde, E. (1996). *Cell*, **87**, 21-32.
- Gör97 Görler, A. und Kalbitzer, H. R. (1997). *Journal of Magnetic Resonance*, **124**, 177-188.
- Gör99a Görler, A., Gronwald, W., Neidig, K.-P. und Kalbitzer, H. R. (1999). *Journal of Magnetic Resonance*, **137**, 39-45.
- Gör99b Görlich, D. und Kutay, U. (1999). *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, **15**, 607-660.
- Gol88 Goldman, M.; Quantum Description of High-Resolution NMR in Liquids. korrigierte Auflage von 1995 (paperback), Oxford University Press, Oxford 1988.
- Gro88 Groß, K.-H. und Kalbitzer, H. R. (1988). *Journal of Magnetic Resonance*, **76**, 87-99.
- Gro00 Gronwald, W., Kirchhöfer, R., Görler, A., Kremer, W., Neidig, K.-P. und Kalbitzer, Hans Robert (2000). *Journal of Biomolecular NMR*, **17**, 137-151.
- Gro01 Gronwald, W., Huber, F., Grünwald, P., Spörner, M., Wohlgemuth, S., Herrmann, C. und Kalbitzer, H. R. (2001). *Structure*, **9**, 1029-1041.
- Grz92 Grzesiek, S. und Bax, A. (1992). *Journal of Magnetic Resonance*, **96**, 432-440.
- Gün97 Güntert, P., Mumenthaler, C. und Wüthrich, K. (1997). *Journal of Molecular Biology*, **273**, 283-298.
- Hal00 Hall, A. (Hrsg.); GTPases, in der Serie 'Frontiers in Molecular Biology', Oxford University Press, Oxford 2000.
- Har95 Hartmann, E. und Görlich, D. (1995). *Trends in Cell Biology*, **5**, 192-193.
- Har00 Haraguchi, T., Koujin, T., Hayakawa, T., Kaneda, T., Tsutsumi, C., Imamoto, N., Akazawa, C., Sukegawa, J., Yoneda, Y. und Hirapka, Y. (2000). *Journal of Cell Science*, **113**, 779-794.
- Hau91 Hausser, K. H. und Kalbitzer, H. R.; NMR in Medicine and Biology. Structure Determination, Tomography, In Vivo Spectroscopy. Springer, Berlin 1991.
- Hav84 Havel, T. F. und Wüthrich, K. (1984). *Bulletin of Mathematical Biology*, **46**, 673-698.
- Her96 Herrmann, C., Horn, G., Spaargaren, M. und Wittinghofer, A. (1996). *The Journal of Biological Chemistry*, **271** (12), 6794-6800.
- Hin92 Hinshaw, J. E., Carragher, B. O. und Milligan, R. A. (1992). *Cell*, **69**, 1133-1141.
- Hol98 Holak, T. A., Mühlhahn, P. und Schirra, H. J.; NMR-Spektroskopie von Biomolekülen. In Lottspeich, F. und Zorbas, H. (Hrsgb.); Bioanalytik, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 1998.
- Hor01 Horn, G., Maurer, T. und Kalbitzer, H. R.; The small GTPase Ral. In Creighton, T. E. (ed); Encyclopedia of Molecular Medicine, Wiley, New York 2001.

- Hua97 Huang, L., Weng, X., Hofer, F., Martin, G. S. und Kim, S. H. (1997). *Nature Structural Biology*, **4**, 609ff.
- Hua98 Huang, L., Hofer, F., Martin, G. S. und Kim, S. H. (1998). *Nature Structural Biology*, **5**, 422ff.
- Hyb92 Hyberts, S. G., Goldberg, M. S., Havel, T. F. und Wagner, G. (1992). *Protein Science*, **1**, 736-751.
- Ino00 Inoue, K., Yamada, H., Akasaka, K., Herrmann, C., Kremer, W., Maurer, T., Döker, R. und Kalbitzer, H. R. (2000). *Nature Structural Biology*, **7** (7), 547-550.
- Iza97 Izaurralde, E., Kutay, U., von Kobbe, C., Mattaj, I. W. und Görlich, D. (1997). *The EMBO Journal*, **16** (21), 6535-6547.
- Jäk99 Jäkel, S., Albig, W., Kutay, U., Bischoff, F. R., Schwamborn, K., Doenecke, D. und Görlich, D. (1999). *The EMBO Journal*, **18** (9), 2411-2423.
- Jee79 Jeener Jeener, J., Meier, B. H., Bachmann, P. und Ernst, R. R. (1979). *The Journal of Chemical Physics*, **71** (11), 4546-4553.
- Kai97 Kainosho, M. (1997). *Nature Structural Biology*, **4**, 858-861.
- Kal84 Kalderon, D., Richardson, W. D., Markham, A. F. und Smith, A. E. (1984). *Nature*, **311**, 33-38.
- Kal93 Kalbitzer, H. R. und Hengstenberg, W. (1993). *European Journal of Biochemistry*, **216**, 205-214.
- Kar59 Karplus, M. (1959). *The Journal of Chemical Physics*, **30**, 11-15.
- Kay89 Kay, L. E., Torchia, D. A. und Bax, A. (1989). *Biochemistry*, **28**, 8972-8979.
- Kay92 Kay, L. E., Keifer, P. und Saarinen, T. (1992)., *Journal of the American Chemical Society*, **114**, 10663-10665.
- Kay93 Kay, L. E., Xu, G. Y., Singer, A. U., Muhandiram, D. R. und Forman-Kay, J. D. (1993). *Journal of Magnetic Resonance B*, **101**, 333-337.
- Kay94 Kay, L. E., Xu, G. Y. und Yamazaki, T. (1994). *Journal of Magnetic Resonance A*, **109**, 129-133.
- Kay98 Kay, L. E. (1998). *Nature Structural Biology*, **5**, 513-517.
- Keh99 Kehlenbach, R. H., Dickmanns, A., Kehlenbach, A., Guan, T. und Gerace, L. (1999). *The Journal of Cell Biology*, **145** (4), 645-657.
- Ken70 Kendrew, J. C., Klyne, W., Lifson, S., Miyazawa, T., Némethy, G., Phillips, D. C., Ramachandran, G. N. und Scheraga, H. A. (1970). *Biochemistry*, **9** (18), 3471-3479.
- Kir83 Kirkpatrick, S., Gelatt, C. D. und Vecchi, Jr., M. P. (1983). *Science*, **220**, 671-680.
- Kis98 Kiseleva, E., Goldberg, M., Allen, T. D. und Akey, C. W. (1998). *Journal of Cell Science*, **111**, 223-236.
- Kor96 Koradi, R., Billeter, M., und Wüthrich, K. (1996). *Journal of Molecular Graphics*, **14**, 51-55.
- Kos99 Kose, S., Imamoto, N., Tachibana, T., Yoshida, M. und Yoneda, Y. (1999). *The Journal of Biological Chemistry*, **274** (7), 3946-3952.
- Kut97 Kutay, U., Bischoff, F. R., Kostka, S., Kraft, R. und Görlich, D. (1997). *Cell*, **90**, 1061-1071.
- Lae70 Laemmli, U. K. (1979). *Nature*, **227**, 680-685.
- Las96 Laskowski, R. A., Rullmann, J. A. C., MacArthur, M. W., Kaptein, R. und Thornton, J. (1996). *Journal of Biomolecular NMR*, **8**, 477-486.
- Lef96 Lefevre, J.-F., Dayie, K. T., Peng, J. W. und Wagner, G. (1996). *Biochemistry*, **35**, 2674-2686.
- Lip82a Lipari, G. und Szabo, A. (1982). *Journal of the American Chemical Society*, **104** (17), 4546-4559.
- Lip82b Lipari, G. und Szabo, A. (1982). *Journal of the American Chemical Society*, **104** (17), 4559-4570.
- Mac93 MacArthur, M. W. und Thornton, J. M. (1993). *Proteins*, **17**, 232-251.
- Mah97 Mahajan, R., Delphin, C., Guan, T., Gerace, L. und Melchior, F. (1997). *Cell*, **88**, 97-101.
- Man95 Mandel, A. M., Akke, M. und Palmer, A. G. III (1995). *Journal of Molecular Biology*, **246**, 144-163.
- Mar72 Mardia, K. V.; *Statistics of Directional Data*. Academic Press, London, 1972.
- Mar98 Markley, J. L., Bax, A., Arata, Y., Hilbers, C. W., Kaptein, R., Sykes, B. D., Wright, P. E. und Wüthrich, K. (1998). *Pure and Applied Chemistry*, **70**, 117-142.
- Mat96 Matunis, M. J., Coutavas, E. und Blobel, G. (1996). *The Journal of Cell Biology*, **135** (6), 1457-1470.
- Mat98a Mattaj, I. W. und Englmeier, L. (1998). *Annual Review of Biochemistry*, **67**, 265-306.

- Mat98b Matunis, M. J., Wu, J. und Blobel, G. (1996). *The Journal of Cell Biology*, **140** (3), 499-509.
- McC96 McCormick, F. und Wittinghofer, A. (1996). *Current Opinion in Biotechnology*, **7**, 449-456.
- Mel93 Melchior, F., Paschal, B., Evans, J. und Gerace, L. (1993). *Journal of Cell Biology*, **123** (6), 1649-1659.
- Mil90 Milburn, M. V., Tong, L., deVos, A. M., Brünger, A., Yamaizumi, Z., Nishimura, S. und Kim, S.-H. (1990). *Science*, **247**, 939-945.
- Moo93 Moore, M. S. und Blobel, G. (1993). *Nature*, **365**, 661-663.
- Moo94a Moore, M. S. und Blobel, G. (1994). *Trends In Biochemical Sciences*, **19**, 211-216.
- Moo94b Moore, M. S. und Blobel, G. (1994). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **91**, 10212-10216.
- Mor79 Morris, G. A. und Freeman, R. (1979). *Journal of the American Chemical Society*, **101**, 760-762.
- Mor95 Moroianu, J., Hijikata, M., Blobel, G. und Radu, A. (1995). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **92**, 6532-6536.
- Mue99 Mueller, T. D., Handel, L., Schmieder, P., Oschkinat, H. (1999). PDB-Eintrag „IRAX“, to be published.
- Muh94 Muhandiram, D. R. und Kay, L. E. (1994). *Journal of Magnetic Resonance B*, **103**, 203-216.
- Nac99 Nachury, M. V. und Weis, K. (1999). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **96**, 9622-9627.
- Nak99a Nakashima, S., Morinaka, K., Koyama, S., Ikeda, M., Kishida, M., Okawa, K., Iwamatsu, A., Kishida, S. und Kikuchi, A. (1999). *The EMBO Journal*, **18** (13), 3629-3642.
- Nak99b Nakielny, S. und Dreyfuss, G. (1999). *Cell*, **99**, 677-690.
- Nei95 Neidig, K.-P., Geyer, M., Görler, A., Antz, C., Saffrich, R., Beneicke, W. und Kalbitzer, H. R. (1995). *Journal of Biomolecular NMR*, **6**, 255-270.
- Neu89 Neuhaus, D., Williamson, M. P., The nuclear Overhauser effect in structural and conformational analysis. VCH, New York 1989.
- New86 Newmeyer, D. D., Finlay, D. R. und Forbes, D. J., (1986). *The Journal of Cell Biology*, **103**, 2091-2102.
- Nic91 Nicholls, A., Sharp, K. und Honig, B. (1991). *Proteins: Structure, Function and Genetics*, **11** (4), 281-296.
- Nig97 Nigg, E. A. (1997). *Nature*, **386**, 779-787.
- Nil01 Nilsson, J., Askjaer, P. und Kjems, J. (2001). *Journal of Molecular Biology*, **305** (2), 231-243.
- Nov99 Novoa, I., Rush, M. G. und D'Eustachio, P. (1999), *Molecular Biology of the Cell*, **10**, 2175-2190.
- Nul95 van Nuland, N. A. J., Boelens, R., Scheek, R. M., Robillard und G. T. (1995). *Journal of Molecular Biology*, **246**, 180-193.
- Ohn98 Ohno, M., Fornerod, M. und Mattaj, I. W. (1998). *Cell*, **92**, 327-336.
- Oht87 Ohtsubo, M., Kai, R., Furuno, N., Sekiguchi, T., Sekiguchi, M., Hayashida, H., Kuma, K., Miyata, T., Fukushige, S., Murotsu, T., Matsubara, K. und Nishimoto, T. (1987). *Genes & Development*, **1**, 585-593.
- Oht89 Ohtsubo, M., Okazaki, H. und Nishimoto, T. (1989). *The Journal of Cell Biology*, **109**, 1389-1397.
- Pai75 Paine, P. L., Moore, L. C. und Horowitz, S. B. (1975). *Nature*, **254**, 109-114.
- Pai89 Pai, E. F., Kabsch, W., Krengel, U., Holmes, K. C., John, J. und Wittinghofer, A. (1989). *Nature*, **341**, 209-214.
- Pal91 Palmer, A. G. III, Rance, M. und Wright, P. D. (1991). *Journal of the American Chemical Society*, **113** (12), 4371-4380.
- Pal91a Palmer, A. G. III, Cavanagh, J., Wright, P. D. und Rance, M. (1991). *Journal of Magnetic Resonance*, **93**, 151-170.
- Pan94 Panté, N. und Aebi, U. (1994). *Current Opinion in Structural Biology*, **4**, 187-196.
- Pan00 Pante, N. und Kann, M. (2000). *Molecular Biology of the Cell*, **11**, 151a-152a.
- Pas95 Paschal, B. M. und Gerace, L. (1995). *The Journal of Cell Biology*, **109**, 1389-1397.
- Pen92 Peng, J. W. und Wagner, G. (1992). *Journal of Magnetic Resonance*, **98**, 308-332.

- Per97 Pervushin, K., Riek, R., Wider, G. und Wüthrich, K. (1997). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **94**, 12366-12371.
- Per98 Perler, F. B. (1998). *Cell*, **92**, 1-4.
- Rab01 Rabut, G. und Ellenberg, J. (2001). *Current Biology*, **11** (14), R551-R554.
- Rad95a Radu, A., Blobel, G. und Moore, M. S. (1995). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **92**, 1769-1773.
- Rad95b Radu, A., Moore, M. S. und Blobel, G. (1995). *Cell*, **81**, 215-222.
- Ram63 Ramachandran, G. N., Ramakrishnan, C. und Sasisekharan, V. (1963). *Journal of Molecular Biology*, **7**, 95-99.
- Rex95 Rexach, M. und Blobel, G. (1995). *Cell*, **83**, 683-692.
- Rib98 Ribbeck, K., Lipowsky, G., Kent, H. M., Stewart, M. und Görlich, D. (1998). *The EMBO Journal*, **17** (22), 6587-6598.
- Rib99 Ribbeck, K., Kutay, U., Paraskeva, E. und Görlich, D. (1999). *Current Biology*, **9**, 47-50.
- Rib01 Ribbeck, K. und Görlich, D. (2001). *The EMBO Journal*, **20** (6), 1320-1330.
- Ric94 Rice, L. M. und Brünger, A. T. (1994). *Proteins: Structure, Function and Genetics*, **19**, 277-290.
- Rie00 Riek, R., Pervushin, K. und Wüthrich, K. (2000). *Trends In Biochemical Sciences*, **25**, 462-468.
- Rou00 Rout, M. P., Aitchison, J. D., Suprapto, A., Hjertaas, K., Zhao, Y. und Chait, B. T. (2000). *The Journal of Cell Biology*, **148** (4), 635-651.
- Rou94 Rout, M. P. und Wente, S. R. (1994). *Trends in Cell Biology*, **4**, 357-365.
- Sal98 Salzmann, M., Pervushin, K., Wider, G., Senn, H. und Wüthrich, K. (1998). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **95**, 13585-13590.
- Sam89 Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T.; Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2. Auflage, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York 1989.
- San77 Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **74**, 5463-5467.
- Sar95 Saraste, M. und Hyvönen, M. (1995). *Current Opinion in Structural Biology*, **5**, 403-408.
- Sat99 Sattler, M., Schleucher, J. und Griesinger, C. (1999). *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, **34**, 93-158.
- Sch93a Schleucher, J., Sattler, M. und Griesinger, C. (1993). *Angewandte Chemie International Edition*, **32**, 1489-1491.
- Sch93b Schleucher, J., Sattler, M. und Griesinger, C. (1993). *Angewandte Chemie*, **105** (10), 1518-1521.
- Sch94 Schurr, J. M., Babcock, H. P. und Fujimoto, B. S. (1994). *Journal of Magnetic Resonance, Series B*, **105**, 211-224.
- Sch94a Schleucher, J., Schwendinger, M., Sattler, M., Schmidt, P., Schedletzky, O., Glaser, S. J., Sorensen, O. W. und Griesinger, C. (1994). *Journal of Biomolecular NMR*, **4**, 301-306.
- Sch97 Schmid, F. X.; Optical spectroscopy to characterize protein conformation and conformational changes. In Creighton, T. E. (ed.); Protein Structure. A Practical Approach. 2<sup>nd</sup> edition, Oxford University Press, New York, 1997.
- Sch98 Schwoebel, E. D., Talcott, B., Cushman, I. und Moore, M. S. (1998). *The Journal of Biological Chemistry*, **273** (52), 35170-35175.
- Shu96 Shulga, N., Roberts, P., Gu, Z., Spitz, L., Tabb, M. M., Nomura, M. und Goldfarb, D. S. (1996). *The Journal of Cell Biology*, **135** (2), 329-339.
- Smi98 Smith, A., Brownawell, A. und Macara, I. G. (1998). *Current Biology*, **8**, 1403-1406.
- Sol55 Solomon, I. (1955). *The Physical Review*, **99**, 559-565.
- Spa94 Spaargaren, M. und Bischoff, J. R. (1994). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **91**, 12609-12613.
- Ste01 Steiner, G.; NMR-Untersuchungen zur Struktur und Dynamik kleiner GTPasen und ihrer Effektoren, Dissertation, Regensburg 2001.
- Str96 Stryer, L.; Biochemie, Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg 1996.

- Stu86 Studier, F. W. und Moffatt, B. A. (1986), *Journal of Molecular Biology*, **189**, 113-130.
- Tal99 Talcott, B. und Moore, M. S. (1999). *Trends in Cell Biology*, **9**, 312-318.
- Tho94 Thompson, J. D., Higgins, D. H. und Gibson, T. J. (1994). *Nucleic Acids Research*, **22**, 4673-4680.
- Tho97 Thompson, KJ. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. und Higgins, D. G. (1997). *Nucleic Acids Research*, **25** (24), 4876-4882.
- Tja97 Tjandra, N. und Bax, A. (1997). *Science*, **278**, 1111-1114.
- Tra87 Trahey, M. und McCormick, F. (1987). *Science*, **238**, 542-545.
- Ven95 van de Ven, F. J. M.; *Multidimensional NMR in Liquids. Basic Principles and Experimental Methods.* VCH Publishers, New York 1995.
- Vet99a Vetter, I., Nowak, C., Nishimoto, T., Kuhlmann, J. und Wittinghofer, A. (1999). *Nature*, **398**, 39-46.
- Vet99b Vetter, I. R., Arndt, A., Kutay, U., Görlich, D. und Wittinghofer, A. (1999). *Cell*, **97**, 635-646.
- Vet99c Vetter, I. R., Linnemann, T., Wohlgenuth, S., Geyer, M., Kalbitzer, H. R., Herrmann, C. und Wittinghofer, A. (1999). *FEBS Letters*, **451**, 175-180.
- Vil98 Villa Braslavsky, C. I., Dissertation: Die GTPase Ran und ihre Interaktionspartner Biochemische Studien der Transportmechanismen an der Kernpore. Ruhr-Universität Bochum 1998.
- Vil00 Villa Braslavsky, C. I., Nowak, C., Görlich, D., Wittinghofer, A. und Kuhlmann, J. (2000). *Biochemistry*, **39**, 11629-11639.
- Wid99 Wider, G. und Wüthrich, K. (1999). *Current Opinion in Structural Biology*, **9**, 594-601.
- Wis91 Wishart, D. S., Sykes, B. D. und Richards, F. M. (1991). *Journal of Molecular Biology*, **222**, 311-333.
- Wis92 Wishart, D. S., Sykes, B. D. und Richards, F. M. (1992). *Biochemistry*, **31**, 1647-1651.
- Wis94 Wishart, D. S. und Sykes, B. D. (1994). *Journal of Biomolecular NMR*, **4**, 171-180.
- Wis95 Wishart, D. S., Bigam, C. G., Holm, A., Hodges, R. S. und Sykes, B. D. (1995). *Journal of Biomolecular NMR*, **5**, 67-81.
- Wit92 Wittekind, M., Rajagopal, P., Branchini, B. R., Reizer, J., Saier, M. H. und Klevit, R. E. (1992). *Protein Science*, **1**, 1363-1376.
- Wit96 Wittinghofer, A. und Nassar, N. (1996). *TIBS*, **212**, 488-491.
- Wit97 Wittinghofer, A., Scheffzek, K. und Ahmadian, M. R. (1997). *FEBS Letters*, **410**, 63-67.
- Wüt82 Wüthrich, K., Wider, G., Wagner, G. und Braun, W. (1982). *Journal of Molecular Biology*, **155**, 311-319.
- Wüt86 Wüthrich, K.; *NMR of Proteins and Nucleic Acids.* John Wiley and Sons, Inc., New York 1986.
- Wu95 Wu, J., Matunis, M. J., Kraemer, D., Blobel, G. und Coutavas, E. (1995). *Journal of Biological Chemistry*, **270**, 14209-14213.
- Yam98 Yamazaki, T., Otomo, T., Oda, N., Kyogoku, Y., Uegaki, K., Ito, N., Ishino, Y. und Nakamura, H. (1998). *Journal of the American Chemical Society*, **120**, 5591-5592.
- Yas99a Yaseen, N. R. und Blobel, G. (1999). *The Journal of Biological Chemistry*, **274** (37), 26493-26502.
- Yas99b Yaseen, N. R. und Blobel, G. (1999). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **96**, 5516-5521.
- Yok95 Yokoyama, N., Hayashi, N., Seki, T., Panté, N., Ohba, T., Nishii, K., Kuma, K., Hayashida, T., Miyata, T., Aebi, U., Fukui, M. und Nishimoto, T. (1995). *Nature*, **376**, 184-188.
- Zah99 Zahn, R., Liu, A., Lührs, Th., Roiek, R., v. Schroetter, C., López Garcia, F., Billeter, M., Calzolari, L., Wider, G. und Wüthrich, K. (1999). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **97**, 145-150.

## Anhang A

### Überblick über die Ranbindedomänen in RanBP2

Abbildung A.1 gibt einen Überblick über RanBP2 mit den Positionen der RanGTP bindenden Domänen. Das Protein enthält weitere unterschiedliche Bindungsmotive und Domänen, die nicht alle eingetragen sind. In einer der jüngsten Veröffentlichungen wird das Segment zwischen der zweiten und der dritten Ranbindedomäne von RanBP2 aus dem Rind als spezifischer Bindungsort für zwei Kinesine beschrieben und damit auf bisher nicht bekannte, mögliche Funktionen des Proteins hingewiesen [Cai01]. Ganz unten ist das Sequenzalignment der Ran bindenden Domänen aus RanBP1 und RanBP2 des Menschen wiedergegeben.

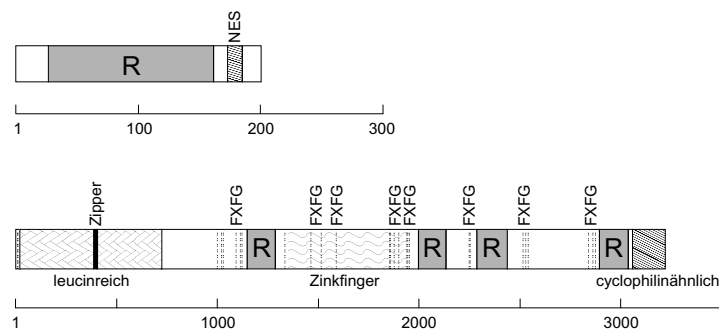


Abbildung A.1. Darstellung der Topologie von RanBP1 und RanBP2. R bezeichnet die RanGTP bindenden Domänen, NES ein Nuclear Export Signal. Weiterhin sind FXFG-Motive und ein Leucin-Zipper-Motiv in RanBP2 eingetragen, ebenso die leucinreiche Region, die Zinkfingerregion mit 8 Zinkfingermotiven sowie die C-terminale Cyclophilin ähnliche Domäne. Die ungefähren Positionen in der Primärstruktur lassen sich an den beiden Skalen ablesen. (In Anlehnung an Hal00.)

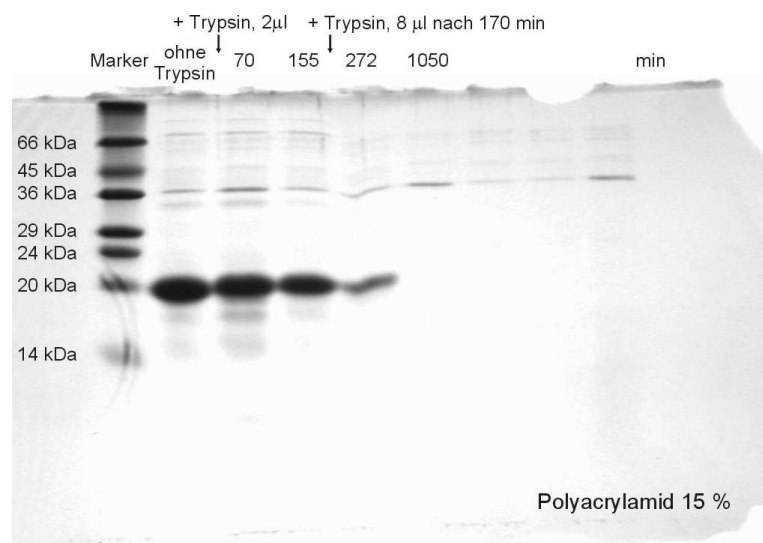
RanBP2 <sup>RanBD1</sup>	-TDGGSAGHD	DDDDGPHFEP	VVPLPKIEV	KTGEEDEEEF	FCNRAKLFRF
RanBP2 <sup>RanBD2</sup>	FEKDDDAYKT	EDSDDIHFEF	VVQMPEKVEL	VTGEEDEKVL	YSQRVKLFRF
RanBP2 <sup>RanBD3</sup>	-DEESDVTQE	EERDGQYFEP	VVPLPDLVEV	SSGEEENEQVV	FSHRAKLYRY
RanBP2 <sup>RanBD4</sup>	EDEDGSDEEV	VHNEDIHFEF	IVSLPE-VEV	KSGEEDEEIL	FKERAKLYRW
RanBP1 <sup>RanBD</sup>	--DTSTENTD	ESNHDPQFEP	IVSLPEQ-EI	KTLEEEDEEEL	FKMRAKLFRF
RanBP2 <sup>RanBD1</sup>	DVESK--EWK	ERGIGNVKIL	RHKTSGKIRL	LMRREQVLKI	CANHYISPDM
RanBP2 <sup>RanBD2</sup>	DAEVS--QWK	ERGLGNLKIL	KNEVNGKLRM	LMRREQVLKV	CANHWITTTM
RanBP2 <sup>RanBD3</sup>	DKDVG--QWK	ERGIGDIKIL	QNYDNKQVRI	VMRRDQVLKL	CANHKITPDM
RanBP2 <sup>RanBD4</sup>	DRDVS--QWK	ERGVGDIKIL	WHTMKNYRI	LMRRDQVFKV	CANHVITKTM
RanBP1 <sup>RanBD</sup>	ASENDLPEWK	ERGTGDVKLL	KHKEKGAIRL	LMRRDKTLKI	CANHYITPMM
RanBP2 <sup>RanBD1</sup>	KLTPNAGSDR	SFVWHAL-DY	ADELPKPEQL	AIRFKTPPEEA	ALFKCKFEEA
RanBP2 <sup>RanBD2</sup>	NLKPLSGSDR	AWMWLAS-DF	SDGDAKLEQL	AAKFKTPPELA	EEFKQKFEEC
RanBP2 <sup>RanBD3</sup>	TLQNMKGTER	VWLWTAC-DF	ADGERKVEHL	AVRFKLQDVA	DSFKKIFDEA
RanBP2 <sup>RanBD4</sup>	ELKPLNVSNN	ALVWTAS-DY	ADGEAKVEQL	AVRFKTKEVA	DCFKKTFEEC
RanBP1 <sup>RanBD</sup>	ELKPNAGSDR	AWVWNTHADF	ADECPKPELL	AIRFLNAENA	QKFKTKFEEC
RanBP2 <sup>RanBD1</sup>	QSILKAPGTN	VAMASNQAVR			
RanBP2 <sup>RanBD2</sup>	QRLLLDIPLQ	TP			
RanBP2 <sup>RanBD3</sup>	KTAQEKD				
RanBP2 <sup>RanBD4</sup>	QQNL				
RanBP1 <sup>RanBD</sup>	R				



## Trypsinverdau von RanBP2<sup>RanBD2</sup>

Der zeitlichen Ablauf des Experiments (Kapitel 2.2.6.1) ist in der folgenden Tabelle dokumentiert, in der auch die vorn in der Arbeit nicht gezeigten Spektren aufgeführt sind. Die im Vergleich zur Zeitspanne während der das Protein abgebaut wurde sehr lange Dauer der Meßreihe sollte gegebenenfalls die Kontrolle der Stabilität eines größeren auftretenden Fragments ermöglichen. Das Protein war ca. 0,7 mM in Puffer 1 zuzüglich 35 µl 4,7 mM MgCl<sub>2</sub> gelöst, anfangs insgesamt 735 µl. Die Temperatur lag zwischen 298 K während der Messungen und Raumtemperatur in längeren Pausen. Jedes 1D Experiment aus 256 FIDs dauerte 5 Minuten, in der Tabelle ist jeweils der auf die erste Trypsinzugabe bezogene Startzeitpunkt angegeben. Die benutzte Lösung enthielt 3 mg/ml Trypsin, die entnommenen Proben hatten Volumina von 30 µl und wurden sofort mit jeweils 1 ml von 20 mg/ml PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) in 2-Propanol versetzt und eingefroren.

Teil des Versuchs	Zeitpunkt	Bemerkung
Spektrum 1, Probe entnommen		2. Spur des Gels (rechts der Markerspur)
Spektrum 2 nach Zugabe von MgCl <sub>2</sub>		sehr schwache Signale
Zugabe von Trypsin (2 µl)	0 min	
Spektrum 3	19 min	Signalintensitäten etwas geringer als in Spektrum 1
Spektrum 4	55 min	
Probe entnommen	70 min	3. Spur des Gels
Spektrum 5	90 min	
Spektrum 6	2h 21min	
Probe entnommen	2h 35min	4. Spur des Gels
Zugabe von Trypsin (8 µl)	2h 50min	
Spektrum 7	3h 16min	
Spektrum 8	4h 21min	vorher Programm „gradshim“ ausgeführt
Probe entnommen	4h 32min	sehr trüb, Spur 5 auf dem Gel
Spektrum 9	4h 42min	
Spektrum 10	5h 22min	
Spektrum 11	17h 10min	
Probe entnommen	17h 30min	2 Phasen, Spur 6 des Gels
Spektrum 12	17h 45min	
Zugabe von Trypsin (10 µl)	17h 58min	
Spektrum 13	18h 11min	
Spektrum 14	35h 28min	
Spektrum 15	44h 29min	
Probe entnommen	44h 52min	7. Spur des Gels
Spektrum 16	44h 59min	
Spektrum 17	60h 29min	
Probe entnommen	60h 54min	8. Spur des Gels
Spektrum 18	61h 1min	
Spektrum 19	81h 10min	
Probe entnommen	ca. 81h 15min	9. Spur des Gels



## Liste der NMR-Experimente

Erläuterung der eingetragenen experimentellen Parameter: Probe: lang bzw. kurz meint die vollständige oder die gekürzte Ranbindedomäne. d1: Relaxationswartezeit in Sekunden. ns: „number of scans“; rg: receiver gain. p1: 90°-Protonenpuls (Rechteck). SW: Spektrale Weite bei der Messung. TD: Zahl der Meßpunkte. SI: Zahl der Punkte im prozessierten Spektrum. Fenster: Apodisationsfunktion, SSB, LB: zugehörige Parameter. Proz.: Prozessierungsart. lin. pred: ggf. Art der „linear prediction“; NCOEFF, LPBIN: zugehörige Parameter.

Die Experimente 1, 36 und 52 wurden jeweils zusätzlich mit der Fensterfunktion „em“ prozessiert, ansonsten mit denselben Parametern wie denen von Experiment 52 unten. 1D Experimente sind in der Regel nicht aufgeführt.

**Experiment 1: HSQC** **zum Pulsprogramm: [Bax90]**

**Probe:** lang, <sup>15</sup>N, 0,9 mM **Puffer:** 1 **Frequenz:** 800 MHz **Temperatur:** 298 K

**d1:** 1,5 **ns:** 16 **rg:** 2k (2048) **p1:** 15,5 µs, - 4 dB **Vorsättigung:** ja, anschließende Dephasierung

Kern	SW / ppm	TD	SI	Fenster	SSB	LB	Proz.	lin. pred.	NCOEFF	LPBIN
N	30	256	1k	qsine	3	--	tppi	--	--	--
H	12,5	2k	1k	qsine	3	--	direkt	--	--	--

**Experiment 2: NOESY-HSQC,  $\tau_{\text{mix}} = 100$  ms** **zum Pulsprogramm: [Bax90]**

**Probe:** lang, <sup>15</sup>N, 0,9 mM **Puffer:** 1 **Frequenz:** 800 MHz **Temperatur:** 298 K

**d1:** 1,2 **ns:** 16 **rg:** 256 **p1:** 15,5 µs, - 4 dB **Vorsättigung:** ja

Kern	SW / ppm	TD	SI	Fenster	SSB	LB	Proz.	lin. pred.	NCOEFF	LPBIN
H	12,5	128	256	qsine	2	--	tppi	lpfr	64	256
N	30	64	128	qsine	3	--	tppi	lpfr	32	128
H	12,5	2k	2k	qsine	2	--	direkt	--	--	--

**Experiment 3: TOCSY-HMQC,  $\tau_{\text{mix}} = 51$  ms** **zum Pulsprogramm: ohne Quellenangabe**

**Probe:** lang, <sup>15</sup>N, 0,9 mM **Puffer:** 1 **Frequenz:** 800 MHz **Temperatur:** 298 K

**d1:** 1,2 **ns:** 16 **rg:** 256 **p1:** 15,5 µs, - 4 dB **Vorsättigung:** ja

Kern	SW / ppm	TD	SI	Fenster	SSB	LB	Proz.	lin. pred.	NCOEFF	LPBIN
H	12,5	128	256	qsine	2	--	tppi	lpfr	64	256
N	30	64	128	qsine	3	--	tppi	lpfr	32	128
H	12,5	2k	1k	qsine	2	--	direkt	--	--	--

**Experiment 4: HNCA** **zum Pulsprogramm: [Grz92]**

**Probe:** lang, <sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N, 0,85 mM **Puffer:** 1 **Frequenz:** 800 MHz **Temperatur:** 298 K

**d1:** 1,2 **ns:** 16 **rg:** 800 **p1:** 20,0 µs, - 4 dB **Vorsättigung:**

Kern	SW / ppm	TD	SI	Fenster	SSB	LB	Proz.	lin. pred.	NCOEFF	LPBIN
N	49,73	64	128	qsine	2	--	tppi	--	--	--
H	40,08	128	256	qsine	2	--	tppi	--	--	--
H	8,01	2k	2k	qsine	2	--	direkt	--	--	--

**Experiment 5, 6: HSQC, Temperatur variiert** **zum Pulsprogramm: invigstp (Bruker)**

**Probe:** lang, <sup>15</sup>N, 0,3 mM **Puffer:** 1b, pH = 7 **Frequenz:** 600 MHz **Temperatur:** 308 K, 298 K

**d1:** 1,0 **ns:** 32 **rg:** 1k **p1:** 10,2 µs, 0 dB **Vorsättigung:**

Kern	SW / ppm	TD	SI	Fenster	SSB	LB	Proz.	lin. pred.	NCOEFF	LPBIN
N	32	128	256	em	--	1	tppi	--	--	--
H	12,07	1k	2k	em	--	1	direkt	--	--	--

**Experiment 7: HSQC** **zum Pulsprogramm: invigstp (Bruker)**

**Probe:** lang,  $^{15}\text{N}$ , 0,3 mM **Puffer:** 1b, pH = 7,1 **Frequenz:** 600 MHz **Temperatur:** 298 K

**d1:** 1,0 **ns:** 32 **rg:** 512 **p1:** 10,6  $\mu\text{s}$ , 0 dB **Vorsättigung:**

Kern	SW / ppm	TD	SI	Fenster	SSB	LB	Proz.	lin. pred.	NCOEFF	LPBIN
N	32	128	512	em	--	1	tppi	--	--	--
H	12,07	1k	2k	em	--	1	direkt	--	--	--

**Experiment 8: HSQC** **zum Pulsprogramm: invigstp (Bruker)**

**Probe:** lang,  $^{15}\text{N}$ , 0,3 mM **Puffer:** 1b, pH = 8,5 **Frequenz:** 600 MHz **Temperatur:** 298 K

**d1:** 1,0 **ns:** 32 **rg:** 1k **p1:** 11,1  $\mu\text{s}$ , 0 dB **Vorsättigung:**

Kern	SW / ppm	TD	SI	Fenster	SSB	LB	Proz.	lin. pred.	NCOEFF	LPBIN
N	32	128	512	em	--	1	tppi	--	--	--
H	12,07	1k	2k	em	--	1	direkt	--	--	--

**Experiment 9: HSQC** **zum Pulsprogramm: invigstp (Bruker)**

**Probe:** lang,  $^{15}\text{N}$ , 0,3 mM **Puffer:** 1b, pH = 7,0 **Frequenz:** 600 MHz **Temperatur:** 298 K

**d1:** 1,0 **ns:** 32 **rg:** 512 **p1:** 12,1  $\mu\text{s}$ , 0 dB **Vorsättigung:**

Kern	SW / ppm	TD	SI	Fenster	SSB	LB	Proz.	lin. pred.	NCOEFF	LPBIN
N	32	128	512	em	--	1	tppi	--	--	--
H	12,07	1k	2k	em	--	1	direkt	--	--	--

**Experiment 10: HSQC** **zum Pulsprogramm: invigstp (Bruker)**

**Probe:** lang,  $^{15}\text{N}$ , 0,3 mM **Puffer:** 1b, +6 % Dioxan **Frequenz:** 600 MHz **Temperatur:** 298 K

**d1:** 1,0 **ns:** 32 **rg:** 1k **p1:** 11,9  $\mu\text{s}$ , 0 dB **Vorsättigung:**

Kern	SW / ppm	TD	SI	Fenster	SSB	LB	Proz.	lin. pred.	NCOEFF	LPBIN
N	32	128	512	em	--	1	tppi	--	--	--
H	12,07	1k	2k	em	--	1	direkt	--	--	--

**Experiment 11-14: TOCSY,  $\tau_{\text{mix}}$  variiert, s.u.** **zum Pulsprogramm: mlevprtp, [Bax85]**

**Probe:** lang,  $^{15}\text{N}$ , 0,5 mM **Puffer:** 1 **Frequenz:** 600 MHz **Temperatur:** 298 K

**d1:** 1,5 **ns:** 16 **rg:** 2k **p1:** 9,71  $\mu\text{s}$ , 0 dB **Vorsättigung:**

Kern	SW / ppm	TD	SI	Fenster	SSB	LB	Proz.	lin. pred.	NCOEFF	LPBIN
H	13,98	512	5126	qsine	2	--	tppi	--	--	--
H	13,98	2k	2k	qsine	2	--	direkt	--	--	--

Mischzeiten 35, 45, 51 u. 55 ms

**Experiment 15-33: 1D Trypsinverdau** **zum Pulsprogramm: zgpr**

**Probe:** lang, 0,7 mM **Puffer:** 1 (b. Start d. Meßreihe) **Frequenz:** 500 MHz **Temperatur:** 298 K

**d1:** 2,0 **ns:** 256 **rg:** 128 **p1:** 9,5  $\mu\text{s}$ , 0 dB **Vorsättigung:** ja

Kern	SW / ppm	TD	SI	Fenster	SSB	LB	Proz.	lin. pred.	NCOEFF	LPBIN
H	16	4k	32k	qsine	2	--	direkt	--	--	--

**Experiment 34: NOESY-HSQC,  $\tau_{\text{mix}} = 100$  ms**

zum Pulsprogramm: [Bax90]

Probe: kurz,  $^{15}\text{N}$ , 1,2 mM

Puffer: 2

Frequenz: 800 MHz

Temperatur: 298 K

d1: 1,5

ns: 16

rg: 32

p1: 11,75  $\mu\text{s}$ , -4 dB

Vorsättigung: ja

Kern	SW / ppm	TD	SI	Fenster	SSB	LB	Proz.	lin. pred.	NCOEFF	LPBIN
H	13,95	128	256	qsine	2	--	tppi	lpfr	64	256
N	40	64	128	qsine	3	--	tppi	lpfr	32	128
H	13,95	2k	1k	qsine	2	--	direkt	--	--	--

**Experiment 35: TOCSY-HSQC,  $\tau_{\text{mix}} = 56$  ms**

zum Pulsprogramm: [Bax85, Dav92, Pal91a, Kay92, Sch93b]

Probe: kurz,  $^{15}\text{N}$ , 1,2 mM

Puffer: 2

Frequenz: 800 MHz

Temperatur: 298 K

d1: 1,3

ns: 24

rg: 512

p1: 11,75  $\mu\text{s}$ , -4 dB

Vorsättigung:

Kern	SW / ppm	TD	SI	Fenster	SSB	LB	Proz.	lin. pred.	NCOEFF	LPBIN
H	13,95	128	256	qsine	2	--	tppi	lpfr	64	256
N	40	64	128	qsine	3	--	ea	lpfr	32	128
H	13,95	2k	1k	qsine	2	--	direkt	--	--	--

**Experiment 36: HSQC**

zum Pulsprogramm: invigstp (Bruker)

Probe: kurz,  $^{15}\text{N}$ , 1,2 mM

Puffer: 2

Frequenz: 800 MHz

Temperatur: 298 K

d1: 1,3

ns: 64

rg: 512

p1: 11,75  $\mu\text{s}$ , -4 dB

Vorsättigung:

Kern	SW / ppm	TD	SI	Fenster	SSB	LB	Proz.	lin. pred.	NCOEFF	LPBIN
N	40	256	1k	qsine	3	--	tppi	--	--	--
H	13,95	2k	1k	qsine	5	--	direkt	--	--	--

**Experiment 37-38: HSQC, vor bzw. nach HNCA\***

zum Pulsprogramm: invigstp (Bruker)

Probe: kurz,  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ , 0,8 mM

Puffer: 2

Frequenz: 600 MHz

Temperatur: 298 K

d1: 1,0

ns: 8

rg: 256

p1: 13,33  $\mu\text{s}$ , 0 dB

Vorsättigung:

Kern	SW / ppm	TD	SI	Fenster	SSB	LB	Proz.	lin. pred.	NCOEFF	LPBIN
N	40	128	512	qsine	3	--	tppi	--	--	--
H	12,07	1k	2k	qsine	3	--	direkt	--	--	--

\* Das HNCA-Spektrum war nicht verwertbar und ist hier nicht aufgeführt.

**Experiment 39: HSQC, nach Rückfaltung**

zum Pulsprogramm: invigstp (Bruker)

Probe: kurz,  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ , 0,4 mM

Puffer: 2\*

Frequenz: 600 MHz

Temperatur: 298 K

d1: 1,0

ns: 8

rg: 256

p1: 14,38  $\mu\text{s}$ , 0 dB

Vorsättigung:

Kern	SW / ppm	TD	SI	Fenster	SSB	LB	Proz.	lin. pred.	NCOEFF	LPBIN
N	40	128	512	qsine	3	--	tppi	--	--	--
H	12,07	1k	2k	qsine	3	--	direkt	--	--	--

\* Puffer nach Rückfaltung, mit Harnstoff- u. Guanidiniumchloridanteilen

**Experiment 39: CBCA(CO)NH**

zum Pulsprogramm: [Grz92, Muh94]

Probe: lang,  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ , 0,4 mM

Puffer: 2\*

Frequenz: 600 MHz

Temperatur: 298 K

d1: 1,0

ns: 32

rg: 1k (1024)

p1: 13,4  $\mu\text{s}$ , 0 dB

Vorsättigung:

Kern	SW / ppm	TD	SI	Fenster	SSB	LB	Proz.	lin. pred.	NCOEFF	LPBIN
C	66,27	116	256	sine	2	--	states	--	--	--
N	40	64	128	sine	2	--	ea	--	--	--
H	11,97	1k	1k	qsine	2	--	direkt	--	--	--

\* Puffer nach Rückfaltung, mit Harnstoff- u. Guanidiniumchloridanteilen

**Experiment 40: HSQC**

zum Pulsprogramm: invigstp (Bruker)

Probe: kurz,  $^{15}\text{N}$ , 0,8 mM

Puffer: 2 (pH = 7,1)

Frequenz: 600 MHz

Temperatur: 298 K

d1: 1,0		ns: 8	rg: 1k	p1: 12,69 $\mu\text{s}$ , 0 dB			Vorsättigung:			
Kern	SW / ppm	TD	SI	Fenster	SSB	LB	Proz.	lin. pred.	NCOEFF	LPBIN
N	40	128	512	qsine	3	--	tppi	--	--	--
H	12,07	1k	2k	qsine	3	--	direkt	--	--	--

**Experiment 41: HSQC**

zum Pulsprogramm: invigstp (Bruker)

Probe: kurz,  $^{15}\text{N}$ , 0,4 mM

Puffer: 2\* (pH = 6,5)

Frequenz: 600 MHz

Temperatur: 298 K

d1: 1,5		ns: 96	rg: 1k	p1: 12,2 $\mu\text{s}$ , 0 dB			Vorsättigung:			
Kern	SW / ppm	TD	SI	Fenster	SSB	LB	Proz.	lin. pred.	NCOEFF	LPBIN
N	40	256	1k	qsine	3	--	tppi	--	--	--
H	12,07	2k	1k	qsine	3	--	direkt	--	--	--

\* Probe aus Exp. 40 auf ca. 45 % verdünnt (Vorsättigung!), HCl

**Experiment 42: TOCSY,  $\tau_{\text{mix}} = 54$  ms**

zum Pulsprogramm: mlevprtp, [Bax85]

Probe: kurz, 0,45 mM

Puffer: 2

Frequenz: 600 MHz

Temperatur: 298 K

d1: 1,5		ns: 32	rg: 128	p1: 13,2 $\mu\text{s}$ , 0 dB			Vorsättigung:			
Kern	SW / ppm	TD	SI	Fenster	SSB	LB	Proz.	lin. pred.	NCOEFF	LPBIN
H	13,98	512	1k	sine	2	--	tppi	--	--	--
H	13,98	2k	2k	qsine	2	--	direkt	--	--	--

**Experiment 43: TOCSY,  $\tau_{\text{mix}} = 54$  ms**

zum Pulsprogramm: mlevprtp, [Bax85]

Probe: kurz, 0,45 mM

Puffer: 2 + 150 mM  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 

Frequenz: 600 MHz

Temperatur: 298 K

d1: 1,5		ns: 32	rg: 128	p1: 14,25 $\mu\text{s}$ , 0 dB			Vorsättigung:			
Kern	SW / ppm	TD	SI	Fenster	SSB	LB	Proz.	lin. pred.	NCOEFF	LPBIN
H	13,98	512	1k	sine	2	--	tppi	--	--	--
H	13,98	2k	2k	qsine	2	--	direkt	--	--	--

**Experiment 44: TOCSY,  $\tau_{\text{mix}} = 55$  ms**

zum Pulsprogramm: mlevprtp, [Bax85]

Probe: kurz, 0,45 mM

Puffer: 3

Frequenz: 600 MHz

Temperatur: 298 K

d1: 1,5		ns: 32	rg: 128	p1: 13,35 $\mu\text{s}$ , 0 dB			Vorsättigung:			
Kern	SW / ppm	TD	SI	Fenster	SSB	LB	Proz.	lin. pred.	NCOEFF	LPBIN
H	13,98	512	1k	sine	2	--	tppi	--	--	--
H	13,98	2k	2k	qsine	2	--	direkt	--	--	--

**Experiment 45: TOCSY,  $\tau_{\text{mix}} = 55$  ms**

zum Pulsprogramm: mlevprtp, [Bax85]

Probe: kurz, 0,45 mM

Puffer: 3 + 150 mM  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 

Frequenz: 600 MHz

Temperatur: 298 K

d1: 1,5		ns: 32	rg: 128	p1: 14,55 $\mu\text{s}$ , 0 dB			Vorsättigung:			
Kern	SW / ppm	TD	SI	Fenster	SSB	LB	Proz.	lin. pred.	NCOEFF	LPBIN
H	13,98	512	1k	sine	2	--	tppi	--	--	--
H	13,98	2k	2k	qsine	2	--	direkt	--	--	--

**Experiment 46: HNCA**

zum Pulsprogramm: [Grz92, Muh94, Kay94]

<b>Probe:</b> kurz, $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ , 0,6 mM				<b>Puffer:</b> 3			<b>Frequenz:</b> 600 MHz		<b>Temperatur:</b> 298 K		
<b>d1:</b> 1,0	<b>ns:</b> 32	<b>rg:</b> 256		<b>p1:</b> 20,8 $\mu\text{s}$ , 0 dB			<b>Vorsättigung:</b>				
<b>Kern</b>	<b>SW / ppm</b>	<b>TD</b>	<b>SI</b>	<b>Fenster</b>	<b>SSB</b>	<b>LB</b>	<b>Proz.</b>	<b>lin. pred.</b>	<b>NCOEFF</b>	<b>LPBIN</b>	
C	42	116	256	qsine	2	--	states	--	--	--	
N	40	64	128	qsine	2	--	ea	--	--	--	
H	8,01	1k	1k	qsine	2	--	direkt	--	--	--	

**Experiment 47: HN(CO)CA**

zum Pulsprogramm: [Grz92, Kay94]

<b>Probe:</b> kurz, $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ , 0,6 mM				<b>Puffer:</b> 3			<b>Frequenz:</b> 600 MHz		<b>Temperatur:</b> 298 K		
<b>d1:</b> 1,0	<b>ns:</b> 32	<b>rg:</b> 256		<b>p1:</b> 20,8 $\mu\text{s}$ , 0 dB			<b>Vorsättigung:</b>				
<b>Kern</b>	<b>SW / ppm</b>	<b>TD</b>	<b>SI</b>	<b>Fenster</b>	<b>SSB</b>	<b>LB</b>	<b>Proz.</b>	<b>lin. pred.</b>	<b>NCOEFF</b>	<b>LPBIN</b>	
C	42	116	256	qsine	2	--	states	--	--	--	
N	40	64	128	qsine	2	--	ea	--	--	--	
H	8,01	1k	1k	qsine	2	--	direkt	--	--	--	

**Experiment 48: CBCANH**

zum Pulsprogramm: [Sat99]

<b>Probe:</b> kurz, $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ , 0,6 mM				<b>Puffer:</b> 3			<b>Frequenz:</b> 600 MHz		<b>Temperatur:</b> 298 K		
<b>d1:</b> 1,1	<b>ns:</b> 16	<b>rg:</b> 512		<b>p1:</b> 20,2 $\mu\text{s}$ , 0 dB			<b>Vorsättigung:</b>				
<b>Kern</b>	<b>SW / ppm</b>	<b>TD</b>	<b>SI</b>	<b>Fenster</b>	<b>SSB</b>	<b>LB</b>	<b>Proz.</b>	<b>lin. pred.</b>	<b>NCOEFF</b>	<b>LPBIN</b>	
N	40	64	256	sine	2	--	ea	--	--	--	
C	66,26	116	128	sine	2	--	states-tpi	--	--	--	
H	14	1k	1k	qsine	2	--	direkt	--	--	--	

**Experiment 49: HB(CB)HA(CA)(CO)NH**

zum Pulsprogramm: [Sat99]

<b>Probe:</b> kurz, $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ , 0,6 mM				<b>Puffer:</b> 3			<b>Frequenz:</b> 600 MHz		<b>Temperatur:</b> 298 K		
<b>d1:</b> 1,0	<b>ns:</b> 16	<b>rg:</b> 1k		<b>p1:</b> 14,0 $\mu\text{s}$ , -6 dB			<b>Vorsättigung:</b>				
<b>Kern</b>	<b>SW / ppm</b>	<b>TD</b>	<b>SI</b>	<b>Fenster</b>	<b>SSB</b>	<b>LB</b>	<b>Proz.</b>	<b>lin. pred.</b>	<b>NCOEFF</b>	<b>LPBIN</b>	
N	40	64	128	sine	2	--	states-tpi	--	--	--	
H	11,87	128	256	sine	2	--	ea	--	--	--	
H	13,98	1k	1k	qsine	2	--	direkt	--	--	--	

**Experiment 50: HNCO**

zum Pulsprogramm: [Grz92, Sch93a, Kay94]

<b>Probe:</b> kurz, $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ , 0,6 mM				<b>Puffer:</b> 3			<b>Frequenz:</b> 600 MHz		<b>Temperatur:</b> 298 K		
<b>d1:</b> 1,0	<b>ns:</b> 16	<b>rg:</b> 1k		<b>p1:</b> 14,0 $\mu\text{s}$ , -6 dB			<b>Vorsättigung:</b>				
<b>Kern</b>	<b>SW / ppm</b>	<b>TD</b>	<b>SI</b>	<b>Fenster</b>	<b>SSB</b>	<b>LB</b>	<b>Proz.</b>	<b>lin. pred.</b>	<b>NCOEFF</b>	<b>LPBIN</b>	
C	22,09	128	256	qsine	2	--	states-tpi	--	--	--	
N	41,11	64	128	qsine	2	--	ea	--	--	--	
H	13,98	1k	1k	qsine	2	--	direkt	--	--	--	

**Experiment 51: CBCA(CO)NH**

zum Pulsprogramm: [Grz92, Muh94]

<b>Probe:</b> kurz, $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ , 0,6 mM				<b>Puffer:</b> 3			<b>Frequenz:</b> 600 MHz		<b>Temperatur:</b> 298 K		
<b>d1:</b> 1,0	<b>ns:</b> 32	<b>rg:</b> 1k		<b>p1:</b> 20,5 $\mu\text{s}$ , 0 dB			<b>Vorsättigung:</b>				
<b>Kern</b>	<b>SW / ppm</b>	<b>TD</b>	<b>SI</b>	<b>Fenster</b>	<b>SSB</b>	<b>LB</b>	<b>Proz.</b>	<b>lin. pred.</b>	<b>NCOEFF</b>	<b>LPBIN</b>	
C	66,27	116	256	sine	2	--	states	--	--	--	
N	40	64	128	sine	2	--	ea	--	--	--	
H	13,98	1k	1k	qsine	2	--	direkt	--	--	--	

<b>Experiment 52: HSQC</b>				<b>zum Pulsprogramm: invieags (Bruker)</b>						
<b>Probe:</b> kurz, $^{15}\text{N}$ , 0,8 mM				<b>Puffer:</b> 3			<b>Frequenz:</b> 800 MHz		<b>Temperatur:</b> 298 K	
<b>d1:</b> 1,0	<b>ns:</b> 96	<b>rg:</b> 512		<b>p1:</b> 17,1 $\mu\text{s}$ , -4 dB			<b>Vorsättigung:</b>			
<b>Kern</b>	<b>SW / ppm</b>	<b>TD</b>	<b>SI</b>	<b>Fenster</b>	<b>SSB</b>	<b>LB</b>	<b>Proz.</b>	<b>lin. pred.</b>	<b>NCOEFF</b>	<b>LPBIN</b>
N	40	256	512	qsine	2	--	ea	lpfc	64	256
H	13,02	2k	1k	qsine	2	--	direkt	--	--	--
<b>Experiment 53: HCCH-TOCSY, <math>\tau_{\text{mix}} = 7,7</math> ms</b>				<b>zum Pulsprogramm: [Kay93]</b>						
<b>Probe:</b> kurz, $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ , 0,6 mM				<b>Puffer:</b> 3 in $\text{D}_2\text{O}$			<b>Frequenz:</b> 600 MHz		<b>Temperatur:</b> 298 K	
<b>d1:</b> 1,5	<b>ns:</b> 16	<b>rg:</b> 4k		<b>p1:</b> 19,7 $\mu\text{s}$ , 0 dB			<b>Vorsättigung:</b>			
<b>Kern</b>	<b>SW / ppm</b>	<b>TD</b>	<b>SI</b>	<b>Fenster</b>	<b>SSB</b>	<b>LB</b>	<b>Proz.</b>	<b>lin. pred.</b>	<b>NCOEFF</b>	<b>LPBIN</b>
H	7	128	256	qsine	2	--	states-tpi	lpfc	64	0
C	64	64	128	qsine	2	--	states-tpi	--	--	--
H	7	1k	2k	qsine	2	--	direkt	--	--	--
<b>Experiment 54: HSQC</b>				<b>zum Pulsprogramm: [Pal91a, Sch94a, Kay94]</b>						
<b>Probe:</b> kurz, $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ , 0,6 mM				<b>Puffer:</b> 3 in $\text{D}_2\text{O}$			<b>Frequenz:</b> 600 MHz		<b>Temperatur:</b> 298 K	
<b>d1:</b> 1,5	<b>ns:</b> 32	<b>rg:</b> 2k		<b>p1:</b> 19,7 $\mu\text{s}$ , 0 dB			<b>Vorsättigung:</b>			
<b>Kern</b>	<b>SW / ppm</b>	<b>Td</b>	<b>SI</b>	<b>Fenster</b>	<b>SSB</b>	<b>LB</b>	<b>Proz.</b>	<b>lin. pred.</b>	<b>NCOEFF</b>	<b>LPBIN</b>
C	26	512	512	qsine	3	--	ea	lpfc	64	0
H	7	2k	2k	qsine	4	--	direkt	--	--	--
<b>Experiment 55: NOESY-HSQC, <math>\tau_{\text{mix}} = 100</math> ms</b>				<b>zum Pulsprogramm: [Dav92, Pal91a, Kay92, Sch93b]</b>						
<b>Probe:</b> kurz, $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ , 0,6 mM				<b>Puffer:</b> 3 in $\text{D}_2\text{O}$			<b>Frequenz:</b> 600 MHz		<b>Temperatur:</b> 298 K	
<b>d1:</b> 1,1	<b>ns:</b> 16	<b>rg:</b> 4k		<b>p1:</b> 19,7 $\mu\text{s}$ , 0 dB			<b>Vorsättigung:</b>			
<b>Kern</b>	<b>SW / ppm</b>	<b>TD</b>	<b>SI</b>	<b>Fenster</b>	<b>SSB</b>	<b>LB</b>	<b>Proz.</b>	<b>lin. pred.</b>	<b>NCOEFF</b>	<b>LPBIN</b>
H	8,01	128	256	qsine	2	--	tpi	lpfc	32	256
C	70	90	128	qsine	2	--	ea	lpfc	32	128
H	8,01	1k	2k	qsine	2	--	direkt	--	--	--
<b>Experiment 56: HCCH-TOCSY, <math>\tau_{\text{mix}} = 7,7</math> ms</b>				<b>zum Pulsprogramm: [Kay93]</b>						
<b>Probe:</b> kurz, $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ , 0,6 mM				<b>Puffer:</b> 3 in $\text{D}_2\text{O}$			<b>Frequenz:</b> 600 MHz		<b>Temperatur:</b> 298 K	
<b>d1:</b> 1,5	<b>ns:</b> 16	<b>rg:</b> 4k		<b>p1:</b> 19,7 $\mu\text{s}$ , 0 dB			<b>Vorsättigung:</b>			
<b>Kern</b>	<b>SW / ppm</b>	<b>TD</b>	<b>SI</b>	<b>Fenster</b>	<b>SSB</b>	<b>LB</b>	<b>Proz.</b>	<b>lin. pred.</b>	<b>NCOEFF</b>	<b>LPBIN</b>
H	7	128	256	qsine	2	--	states-tpi	lpfc	32	250
C	64	96	256	qsine	2	--	states-tpi	lpfc	32	180
H	7	1k	1k	qsine	2	--	direkt	lpfc	32	256
<b>Experiment 57: HSQC</b>				<b>zum Pulsprogramm: invieags (Bruker)</b>						
<b>Probe:</b> kurz, $^{15}\text{N}$ , 1,4 mM				<b>Puffer:</b> 3			<b>Frequenz:</b> 800 MHz		<b>Temperatur:</b> 298 K	
<b>d1:</b> 1,0	<b>ns:</b> 8	<b>rg:</b> 256		<b>p1:</b> 17,65 $\mu\text{s}$ , -4 dB			<b>Vorsättigung:</b>			
<b>Kern</b>	<b>SW / ppm</b>	<b>TD</b>	<b>SI</b>	<b>Fenster</b>	<b>SSB</b>	<b>LB</b>	<b>Proz.</b>	<b>lin. pred.</b>	<b>NCOEFF</b>	<b>LPBIN</b>
N	40	128	512	qsine	2	--	ea	--	--	--
H	13	2k	1k	qsine	2	--	direkt	--	--	--

<b>Experiment 58: NOESY-HSQC, <math>\tau_{\text{mix}} = 100</math> ms</b>				<b>zum Pulsprogramm: [Bax90]</b>						
<b>Probe:</b> kurz, $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ , 1,4 mM			<b>Puffer:</b> 3			<b>Frequenz:</b> 800 MHz		<b>Temperatur:</b> 298 K		
<b>d1:</b> 1,5	<b>ns:</b> 16	<b>rg:</b> 64	<b>p1:</b> 17,65 $\mu\text{s}$ , - 4 dB			<b>Vorsättigung:</b> ja				
<b>Kern</b>	<b>SW / ppm</b>	<b>TD</b>	<b>SI</b>	<b>Fenster</b>	<b>SSB</b>	<b>LB</b>	<b>Proz.</b>	<b>lin. pred.</b>	<b>NCOEFF</b>	<b>LPBIN</b>
H	13,95	128	256	qsine	2	--	tppi	lpfc	64	128
N	40	64	128	qsine	2	--	tppi	lpfc	32	64
H	13,95	2k	1k	qsine	2	--	direkt	--	--	--
<b>Experiment 59: TOCSY-HSQC, <math>\tau_{\text{mix}} = 53,5</math> ms</b>				<b>zum Pulsprogramm: [Bax85, Dav92, Pal91a, Kay92, Sch93b]</b>						
<b>Probe:</b> kurz, $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ , 1,4 mM			<b>Puffer:</b> 3			<b>Frequenz:</b> 800 MHz		<b>Temperatur:</b> 298 K		
<b>d1:</b> 1,0	<b>ns:</b> 24	<b>rg:</b> 512	<b>p1:</b> 18,4 $\mu\text{s}$ , - 4 dB			<b>Vorsättigung:</b>				
<b>Kern</b>	<b>SW / ppm</b>	<b>TD</b>	<b>SI</b>	<b>Fenster</b>	<b>SSB</b>	<b>LB</b>	<b>Proz.</b>	<b>lin. pred.</b>	<b>NCOEFF</b>	<b>LPBIN</b>
H	13,95	128	256	qsine	2	--	tppi	lpfc	64	128
N	40	64	128	qsine	2	--	ea	lpfc	32	64
H	13,95	2k	1k	qsine	2	--	direkt	--	--	--
<b>Experiment 60: NOESY, <math>\tau_{\text{mix}} = 100</math> ms</b>				<b>zum Pulsprogramm: noesyprtp (Bruker)</b>						
<b>Probe:</b> kurz, $^{15}\text{N}$ , 1 mM			<b>Puffer:</b> 3			<b>Frequenz:</b> 800 MHz		<b>Temperatur:</b> 298 K		
<b>d1:</b> 1,4	<b>ns:</b> 96	<b>rg:</b> 64	<b>p1:</b> 16,8 $\mu\text{s}$ , - 4 dB			<b>Vorsättigung:</b> ja				
<b>Kern</b>	<b>SW / ppm</b>	<b>TD</b>	<b>SI</b>	<b>Fenster</b>	<b>SSB</b>	<b>LB</b>	<b>Proz.</b>	<b>lin. pred.</b>	<b>NCOEFF</b>	<b>LPBIN</b>
H	13,95	512	1k	qsine	2	--	tppi	--	--	--
H	13,95	4k	4k	qsine	2	--	direkt	--	--	--
<b>Experiment 61: TOCSY, <math>\tau_{\text{mix}} = 54,7</math> ms</b>				<b>zum Pulsprogramm: mlevprtp, [Bax85]</b>						
<b>Probe:</b> kurz, $^{15}\text{N}$ , 1 mM			<b>Puffer:</b> 3			<b>Frequenz:</b> 800 MHz		<b>Temperatur:</b> 298 K		
<b>d1:</b> 1,4	<b>ns:</b> 80	<b>rg:</b> 256	<b>p1:</b> 17,25 $\mu\text{s}$ , - 4 dB			<b>Vorsättigung:</b>				
<b>Kern</b>	<b>SW / ppm</b>	<b>TD</b>	<b>SI</b>	<b>Fenster</b>	<b>SSB</b>	<b>LB</b>	<b>Proz.</b>	<b>lin. pred.</b>	<b>NCOEFF</b>	<b>LPBIN</b>
H	13,95	512	1k	qsine	2	--	tppi	--	--	--
H	13,95	4k	4k	qsine	2	--	direkt	--	--	--
<b>Experiment 62: NOESY, <math>\tau_{\text{mix}} = 100</math> ms</b>				<b>zum Pulsprogramm: noesyprtp (Bruker)</b>						
<b>Probe:</b> kurz, $^{15}\text{N}$ , 1 mM			<b>Puffer:</b> 3 in $\text{D}_2\text{O}$			<b>Frequenz:</b> 800 MHz		<b>Temperatur:</b> 298 K		
<b>d1:</b> 1,4	<b>ns:</b> 96	<b>rg:</b> 128	<b>p1:</b> 16,6 $\mu\text{s}$ , - 4 dB			<b>Vorsättigung:</b> ja				
<b>Kern</b>	<b>SW / ppm</b>	<b>TD</b>	<b>SI</b>	<b>Fenster</b>	<b>SSB</b>	<b>LB</b>	<b>Proz.</b>	<b>lin. pred.</b>	<b>NCOEFF</b>	<b>LPBIN</b>
H	13,95	512	1k	qsine	2	--	tppi	--	--	--
H	13,95	4k	4k	qsine	2	--	direkt	--	--	--
<b>Experiment 63: TOCSY, <math>\tau_{\text{mix}} = 54,2</math> ms</b>				<b>zum Pulsprogramm: mlevprtp, [Bax85]</b>						
<b>Probe:</b> kurz, $^{15}\text{N}$ , 1 mM			<b>Puffer:</b> 3 in $\text{D}_2\text{O}$			<b>Frequenz:</b> 800 MHz		<b>Temperatur:</b> 298 K		
<b>d1:</b> 1,4	<b>ns:</b> 96	<b>rg:</b> 2k	<b>p1:</b> 16,8 $\mu\text{s}$ , - 4 dB			<b>Vorsättigung:</b>				
<b>Kern</b>	<b>SW / ppm</b>	<b>TD</b>	<b>SI</b>	<b>Fenster</b>	<b>SSB</b>	<b>LB</b>	<b>Proz.</b>	<b>lin. pred.</b>	<b>NCOEFF</b>	<b>LPBIN</b>
H	13,95	512	1k	qsine	2	--	tppi	--	--	--
H	13,95	4k	4k	qsine	2	--	direkt	--	--	--



**Experiment 64: HSQC**

zum Pulsprogramm: invigeassi, [Pal91a, Kay92, Sch93b]

Probe: kurz,  $^{15}\text{N}$ , 0,8 mM

Puffer: 3

Frequenz: 600 MHz

Temperatur: 298 K

d1: 1,0    ns: 16    rg: 2k

p1: 12,6  $\mu\text{s}$ , 0 dB

Vorsättigung:

Kern	SW / ppm	TD	SI	Fenster	SSB	LB	Proz.	lin. pred.	NCOEFF	LPBIN
N	36	128	512	qsine	2	--	ea	--	--	--
H	14,37	1k	2k	qsine	2	--	direkt	--	--	--

**Experiment 65-93: HSQC**

zum Pulsprogramm: invigstp (Bruker)

Probe: kurz,  $^{15}\text{N}$ , 0,8 mMPuffer: 3 in  $\text{D}_2\text{O}$ 

Frequenz: 600 MHz

Temperatur: 298 K

d1: 1,0    ns: 8    rg: 2k

p1: 23,45  $\mu\text{s}$ , 0 dB

Vorsättigung:

Kern	SW / ppm	TD	SI	Fenster	SSB	LB	Proz.	lin. pred.	NCOEFF	LPBIN
N	36	128	256	em	--	5	tppi	--	--	--
H	14,37	1k	2k	em	--	3	direkt	--	--	--

## Messung von Austauschraten

Verlauf der Meßreihe:

Zugabe von D<sub>2</sub>O zur getrockneten Probe, 9 Minuten später Start der ersten 2D Messung; Dauer der HSQC-Experimente je 19 Minuten. Zunächst 15 direkt aufeinander folgende 2D Experimente. Dann abwechselnd 1D- und HSQC- Messungen, 1Ds verschieden lang:

3 mal: 1D von 20 Minuten Dauer, anschließend je ein HSQC

3 mal: 1D von 40 Minuten Dauer, anschließend je ein HSQC

4 mal: 1D von 100 Minuten Dauer, anschließend je ein HSQC

3 mal: 1D von 4 Stunden und 40 Minuten Dauer, anschließend je ein HSQC

1 mal: 1D von 9 Stunden und 40 Minuten Dauer, anschließend je ein HSQC

Die 2D Spektren sind oben (Anhang A) als Experimente 65 bis 93 aufgeführt, daraus resultierende Austauschraten der Hauptketten-Amidprotonen in der folgenden Tabelle zusammengefaßt. Die Austauschraten, ihre Fehler und die Kovarianz wurden mit Origin bestimmt, unter „Werte“ ist die jeweils verwendete Zahl von Meßwerten eingetragen. Diese wurden durch Integration der Signalvolumina mit dem Programm Aurelia gewonnen [Gey95]. Die dabei verwendeten Parameter sind: 100 Iterationen, Integrationsgrenze 0,2, maximale Intervalle von 250 Hz und 200 Hz für  $\omega_1$  bzw.  $\omega_2$ .

Rest-Nr.	Rate / s <sup>-1</sup>	Fehler / s <sup>-1</sup>	Werte	Kovarianz	Rest-Nr.	Rate / s <sup>-1</sup>	Fehler / s <sup>-1</sup>	Werte	Kovarianz
6*	8,9E-06	9,6E-07	27	0,86	79	1,0E-04	3,0E-05	14	0,63
10	5,9E-06	8,5E-07	26	0,75	81	6,1E-06	8,5E-07	27	0,77
13	1,0E-05	2,3E-06	22	0,73	82	7,0E-06	5,6E-07	27	0,91
15	3,9E-06	4,8E-07	27	0,77	84	7,0E-05	2,0E-05	15	0,64
16	7,0E-06	9,1E-07	27	0,79	97	2,0E-06	1,2E-06	27	0,12
17	6,0E-06	8,2E-07	27	0,76	98	4,3E-06	5,0E-07	27	0,80
18	3,6E-06	1,1E-06	27	0,35	99	6,6E-06	6,1E-07	27	0,88
19	7,7E-06	1,2E-06	27	0,70	100	8,6E-06	1,2E-06	27	0,79
20	4,0E-05	6,2E-06	19	0,79	101	9,6E-06	1,5E-06	27	0,76
21	3,0E-05	3,5E-06	22	0,85	103	1,0E-05	1,0E-06	27	0,95
25	3,4E-04	6,0E-05	3	0,98	106	3,0E-05	4,4E-06	20	0,79
26	3,0E-05	2,8E-06	23	0,92	107	3,5E-06	3,8E-07	27	0,81
27*	1,0E-05	9,3E-07	27	0,90	108	9,2E-06	6,9E-07	27	0,93
29	1,1E-04	7,8E-06	12	0,96	109 <sup>+</sup>	1,0E-05	2,5E-06	26	0,57
30	4,0E-05	1,0E-05	18	0,57	110	6,0E-06	3,9E-07	27	0,93
33	2,0E-05	2,2E-06	27	0,86	111	3,3E-06	4,3E-07	27	0,74
35	8,3E-06	1,0E-06	27	0,83	112	6,8E-06	8,1E-07	27	0,81
36	1,0E-05	8,2E-07	26	0,91	113	6,2E-06	3,7E-07	27	0,94
37	4,9E-06	9,1E-07	27	0,59	114	3,3E-06	5,6E-07	27	0,64
38	2,0E-06	5,5E-07	27	0,39	115	8,0E-06	9,4E-07	27	0,82
39	1,0E-05	9,3E-07	27	0,92	116 <sup>+</sup>	1,0E-05	2,5E-06	26	0,57
47	7,0E-05	6,6E-06	17	0,92	117	1,0E-05	2,7E-06	23	0,73
48	5,0E-05	2,0E-05	13	0,34	118	1,3E-04	1,0E-05	13	0,93
49	4,0E-05	4,6E-06	21	0,86	119	1,5E-04	3,0E-05	13	0,75
50	1,2E-04	1,0E-05	8	0,92	120	1,2E-04	5,0E-05	11	0,50
52*	4,0E-05	7,7E-06	13	0,80	121	2,3E-04	5,0E-05	4	0,91
71	6,0E-05	1,0E-05	16	0,68	127	1,8E-04	2,0E-05	7	0,95
73	8,0E-05	8,6E-06	15	0,91					

\* Zuordnung nicht ganz sicher; bei Rest 27: Evtl. trägt auch oder nur Rest 28 zu den beobachteten Signalen bei.

<sup>+</sup> nicht aufgelöst: Reste 109, 116

### Aus den Austauschraten der Amidprotonen bestimmte Schutzfaktoren

Rest	Nr.	Tauschrate	Schutzfaktor	Rest	Nr.	Tauschrate	Schutzfaktor
D	6*	8,90E-06	27552	A	79	1,00E-04	10109
L	10	5,90E-06	19842	M	81	6,10E-06	75928
Q	13	1,00E-05	139393	W	82	7,00E-06	43611
V	15	3,90E-06	51486	A	84	7,00E-05	5365
K	16	7,00E-06	57490	L	97	2,00E-06	128058
L	17	6,00E-06	35505	A	98	4,30E-06	87342
F	18	3,60E-06	60608	A	99	6,60E-06	92288
R	19	7,70E-06	109155	K	100	8,60E-06	64594
F	20	4,00E-05	14681	F	101	9,60E-06	48591
D	21	3,00E-05	12634	T	103	1,00E-05	68934
S	25	3,40E-04	3042	L	106	3,00E-05	4030
Q	26	3,00E-05	46464	A	107	3,50E-06	107305
W	27*	1,00E-05	37557	E	108	9,20E-06	22640
E	29	1,10E-04	2496	E	109 <sup>+</sup>	1,00E-05	15585
R	30	4,00E-05	13595	F	110	6,00E-06	44127
G	33	2,00E-05	34746	K	111	3,30E-06	194673
L	35	8,30E-06	40678	Q	112	6,80E-06	135575
K	36	1,00E-05	34252	K	113	6,20E-06	142003
I	37	4,90E-06	30514	F	114	3,30E-06	141356
L	38	2,00E-06	47578	E	115	8,00E-06	30110
K	39	1,00E-05	34252	E	116 <sup>+</sup>	1,00E-05	15585
R	47	7,00E-05	6402	C	117	1,00E-05	189983
M	48	5,00E-05	19805	Q	118	1,30E-04	19087
L	49	4,00E-05	5204	R	119	1,50E-04	7679
M	50	1,20E-04	3066	L	120	1,20E-04	2235
R	52*	4,00E-05	30154	L	121	2,30E-04	433
K	71	6,00E-05	5709	Q	127	1,80E-04	2396
L	73	8,00E-05	1162				

\* Zuordnung nicht ganz sicher; bei Rest 27: Evtl. trägt auch oder nur Rest 28 zu den beobachteten Signalen bei.

<sup>+</sup> nicht aufgelöst: Reste 109, 116

## Winkelrestraints (Hauptkettentorsionswinkel)

Rest	Nr.	$\phi$	$\delta\phi$	$\psi$	$\delta\psi$	Rest	Nr.	$\phi$	$\delta\phi$	$\psi$	$\delta\psi$
G	1	--	--	--	--	T	66	--	--	--	--
S	2	-99	13	6	11	T	67	--	--	--	--
G	3	--	--	--	--	M	68	--	--	--	--
E	4	--	--	--	--	N	69	-115	25	144	13
E	5	--	--	--	--	L	70	-94	19	124	13
D	6	--	--	--	--	K	71	--	--	--	--
E	7	-106	17	134	16	P	72	--	--	--	--
K	8	--	--	--	--	L	73	-81	21	127	24
V	9	-85	23	130	7	S	74	--	--	--	--
L	10	--	--	--	--	G	75	--	--	--	--
Y	11	-135	20	142	12	S	76	-96	22	135	20
S	12	-96	19	127	10	D	77	--	--	--	--
Q	13	-123	21	133	21	R	78	-106	29	166	17
R	14	-93	12	128	9	A	79	-129	23	145	17
V	15	--	--	--	--	W	80	-135	20	149	15
K	16	-120	16	121	18	M	81	-120	21	133	23
L	17	-116	11	125	14	W	82	-118	17	130	18
F	18	-134	18	151	14	L	83	-113	9	131	19
R	19	-120	26	129	19	A	84	-127	15	143	18
F	20	--	--	--	--	S	85	-95	22	121	17
D	21	--	--	--	--	D	86	-104	31	137	18
A	22	--	--	--	--	F	87	--	--	--	--
E	23	-69	11	-26	8	S	88	--	--	--	--
V	24	-104	12	1	13	D	89	--	--	--	--
S	25	--	--	--	--	G	90	--	--	--	--
Q	26	--	--	--	--	D	91	-92	20	138	21
W	27	-88	11	120	13	A	92	--	--	--	--
K	28	--	--	--	--	K	93	-112	19	143	14
E	29	--	--	--	--	L	94	-89	21	126	11
R	30	--	--	--	--	E	95	-124	20	141	13
G	31	--	--	--	--	Q	96	-114	15	131	15
L	32	-112	30	141	21	L	97	-119	9	148	14
G	33	--	--	--	--	A	98	-126	20	149	18
N	34	--	--	--	--	A	99	-124	11	124	17
L	35	-109	25	126	10	K	100	-117	16	124	17
K	36	-111	13	140	15	F	101	-99	19	147	25
I	37	-124	13	131	17	K	102	-82	16	-18	18
L	38	-123	17	137	12	T	103	--	--	--	--
K	39	-120	14	122	20	P	104	--	--	--	--
N	40	-100	29	124	15	E	105	-67	5	-38	5
E	41	--	--	--	--	L	106	-69	7	-41	5
V	42	-77	18	-26	14	A	107	-63	5	-43	8
N	43	-99	17	3	14	E	108	-68	7	-37	11
G	44	--	--	--	--	E	109	-66	5	-35	13
K	45	--	--	--	--	F	110	-68	6	-41	9
L	46	-124	13	134	19	K	111	-60	7	-43	7
R	47	-132	13	136	19	Q	112	-62	4	-39	8
M	48	-118	16	129	12	K	113	-68	6	-38	8
L	49	-131	13	137	21	F	114	-66	9	-43	6
M	50	-128	22	133	20	E	115	-63	4	-37	8
R	51	--	--	--	--	E	116	-66	7	-41	6
R	52	-88	27	134	13	C	117	-66	5	-42	5
E	53	--	--	--	--	Q	118	-66	6	-43	7
Q	54	--	--	--	--	R	119	-67	6	-35	13
V	55	-90	15	0	15	L	120	--	--	--	--
L	56	--	--	--	--	L	121	-80	15	-11	16
K	57	--	--	--	--	L	122	--	--	--	--
V	58	-89	23	121	12	D	123	--	--	--	--
C	59	--	--	--	--	I	124	-101	23	114	22
A	60	-124	25	135	11	P	125	--	--	--	--
N	61	-101	21	128	21	L	126	-102	33	122	28
H	62	-100	25	144	13	Q	127	--	--	--	--
W	63	-100	20	129	18	T	128	--	--	--	--
I	64	--	--	--	--	P	129	-69	16	138	9
T	65	--	--	--	--	K	130	--	--	--	--

## Wasserstoffbrücken

Nr.	Atom 1	Rest	Atom 2	Rest	Abstand	$\delta^-$	$\delta^+$	Atom 3	Rest	Atom 2	Rest	Abstand	$\delta^-$	$\delta^+$
1	HN	13	O	35	1,9	0,3	0,4	N	13	O	35	2,9	0,6	0,3
2	HN	15	O	33	1,9	0,3	0,4	N	15	O	33	2,9	0,6	0,3
3	HN	17	O	31	1,9	0,3	0,4	N	17	O	31	2,9	0,6	0,3
4	HN	18	O	98	1,9	0,3	0,4	N	18	O	98	2,9	0,6	0,3
5	HN	19	O	28	1,9	0,3	0,4	N	19	O	28	2,9	0,6	0,3
6	HN	33	O	15	1,9	0,3	0,4	N	33	O	15	2,9	0,6	0,3
7	HN	35	O	13	1,9	0,3	0,4	N	35	O	13	2,9	0,6	0,3
8	HN	36	O	49	1,9	0,3	0,4	N	36	O	49	2,9	0,6	0,3
9	HN	37	O	11	1,9	0,3	0,4	N	37	O	11	2,9	0,6	0,3
10	HN	47	O	38	1,9	0,3	0,4	N	47	O	38	2,9	0,6	0,3
11	HN	49	O	36	1,9	0,3	0,4	N	49	O	36	2,9	0,6	0,3
12	HN	71	O	81	1,9	0,3	0,4	N	71	O	81	2,9	0,6	0,3
13	HN	81	O	71	1,9	0,3	0,4	N	81	O	71	2,9	0,6	0,3
14	HN	82	O	97	1,9	0,3	0,4	N	82	O	97	2,9	0,6	0,3
15	HN	97	O	82	1,9	0,3	0,4	N	97	O	82	2,9	0,6	0,3
16	HN	98	O	18	1,9	0,3	0,4	N	98	O	18	2,9	0,6	0,3
17	HN	99	O	80	1,9	0,3	0,4	N	99	O	80	2,9	0,6	0,3
18	HN	100	O	16	1,9	0,3	0,4	N	100	O	16	2,9	0,6	0,3
19	HN	107	O	103	1,9	0,3	0,4	N	107	O	103	2,9	0,6	0,3
20	HN	108	O	104	1,9	0,3	0,4	N	108	O	104	2,9	0,6	0,3
21	HN	109	O	105	1,9	0,3	0,4	N	109	O	105	2,9	0,6	0,3
22	HN	110	O	106	1,9	0,3	0,4	N	110	O	106	2,9	0,6	0,3
23	HN	111	O	107	1,9	0,3	0,4	N	111	O	107	2,9	0,6	0,3
24	HN	112	O	108	1,9	0,3	0,4	N	112	O	108	2,9	0,6	0,3
25	HN	113	O	109	1,9	0,3	0,4	N	113	O	109	2,9	0,6	0,3
26	HN	114	O	110	1,9	0,3	0,4	N	114	O	110	2,9	0,6	0,3
27	HN	115	O	111	1,9	0,3	0,4	N	115	O	111	2,9	0,6	0,3
28	HN	116	O	112	1,9	0,3	0,4	N	116	O	112	2,9	0,6	0,3
29	HN	117	O	113	1,9	0,3	0,4	N	117	O	113	2,9	0,6	0,3

## NOE-Restraints

r: Abstand der Kerne

Atom	Rest	Atom	Rest	r	Atom	Rest	Atom	Rest	r	Atom	Rest	Atom	Rest	r			
HA#	3	⇒	HN	3	2,7	HN	16	⇒	HN	100	2,9	HB2	26	⇒	HN	26	2,7
HA#	3	⇒	HN	4	2,6	HA	17	⇒	HN	17	2,5	HB1	26	⇒	HN	26	2,4
HN	4	⇒	HN	3	2,9	HB1	17	⇒	HN	17	2,3	HB2	27	⇒	HN	27	2,3
HA	4	⇒	HN	4	2,6	HB2	17	⇒	HN	17	2,2	HB1	27	⇒	HN	27	2,2
HB2	4	⇒	HN	4	2,3	HA	17	⇒	HN	18	2,3	HN	28	⇒	HN	19	2,9
HN	5	⇒	HN	4	2,4	HB2	17	⇒	HN	18	2,8	HA	28	⇒	HN	29	2,2
HG2	5	⇒	HN	5	2,5	HN	17	⇒	HN	30	2,7	HA	29	⇒	HN	19	3,4
HB#	5	⇒	HN	5	2,3	HN	17	⇒	HN	31	2,9	HA	29	⇒	HN	29	2,8
HN	5	⇒	HN	6	2,6	HB1	17	⇒	HN	31	2,7	HB2	29	⇒	HN	30	2,4
HA	5	⇒	HN	6	2,2	HB2	18	⇒	HN	18	3,1	HA	29	⇒	HN	30	2,5
HB#	5	⇒	HN	6	2,6	HB1	18	⇒	HN	18	2,8	HB2	29	⇒	HN	31	2,3
HA	5	⇒	HN	7	2,8	HA	18	⇒	HN	19	2,4	HA	29	⇒	HN	31	2,9
HN	6	⇒	HN	5	2,7	HB1	18	⇒	HN	19	2,8	HA	30	⇒	HN	19	3,2
HA	6	⇒	HN	6	2,3	HN	18	⇒	HN	98	2,7	HN	30	⇒	HN	29	3,0
HB#	6	⇒	HN	6	2,5	HB1	19	⇒	HN	19	2,3	HB2	30	⇒	HN	30	2,4
HA	6	⇒	HN	7	2,2	HA	19	⇒	HN	19	3,1	HB2	30	⇒	HN	31	2,2
HN	6	⇒	HN	7	2,4	HB2	19	⇒	HN	19	2,5	HN	30	⇒	HN	31	2,4
HB1	6	⇒	HN	7	2,7	HB2	19	⇒	HN	20	2,4	HN	31	⇒	HN	17	3,2
HN	7	⇒	HN	6	2,4	HA	19	⇒	HN	20	2,3	HN	31	⇒	HN	30	2,6
HA	7	⇒	HN	7	2,6	HN	19	⇒	HN	20	3,0	HA1	31	⇒	HN	31	2,5
HB#	7	⇒	HN	7	2,3	HB1	19	⇒	HN	20	2,4	HA2	31	⇒	HN	31	2,6
HN	7	⇒	HN	8	3,8	HN	19	⇒	HN	28	2,6	HA1	31	⇒	HN	32	2,2
HA	7	⇒	HN	39	3,1	HA	19	⇒	HN	98	2,8	HN	32	⇒	HN	31	3,1
HB2	7	⇒	HN	40	2,5	HN	20	⇒	HN	19	3,6	HA	32	⇒	HN	33	2,3
HN	8	⇒	HN	7	3,1	HB2	20	⇒	HN	20	2,6	HN	33	⇒	HN	15	3,0
HA	8	⇒	HN	8	2,6	HA	20	⇒	HN	20	2,9	HA2	33	⇒	HN	33	2,8
HB2	8	⇒	HN	9	2,3	HB1	20	⇒	HN	20	2,4	HA1	33	⇒	HN	33	2,7
HA	8	⇒	HN	9	2,0	HN	20	⇒	HN	21	3,0	HA1	33	⇒	HN	34	2,4
HN	8	⇒	HN	10	3,5	HB1	20	⇒	HN	21	2,8	HN	33	⇒	HN	34	3,5
HN	8	⇒	HN	39	2,7	HA	20	⇒	HN	21	2,2	HA	34	⇒	HN	14	3,5
HB	9	⇒	HN	9	2,2	HA	20	⇒	HN	28	2,7	HA	34	⇒	HN	15	2,7
HA	9	⇒	HN	9	2,7	HB1	20	⇒	HN	96	2,7	HB1	34	⇒	HN	34	2,5
HA	9	⇒	HN	10	2,3	HB2	20	⇒	HN	96	2,6	HB2	34	⇒	HN	34	2,5
HN	10	⇒	HN	8	2,7	HB2	21	⇒	HN	21	2,4	HA	34	⇒	HN	34	2,8
HN	10	⇒	HN	9	3,1	HA	21	⇒	HN	21	2,4	HB1	34	⇒	HN	35	2,9
HA	10	⇒	HN	10	2,7	HA	21	⇒	HN	22	2,0	HB2	34	⇒	HN	35	3,2
HA	10	⇒	HN	11	2,6	HB2	21	⇒	HN	22	3,1	HA	34	⇒	HN	35	2,3
HN	10	⇒	HN	11	2,3	HB1	21	⇒	HN	25	2,6	HN	35	⇒	HN	13	2,5
HN	11	⇒	HN	10	2,5	HA	22	⇒	HN	22	2,5	HN	35	⇒	HN	34	3,0
HA	11	⇒	HN	12	2,0	HB#	22	⇒	HN	22	2,2	HA	35	⇒	HN	35	2,6
HB2	11	⇒	HN	12	3,1	HB#	22	⇒	HN	23	2,7	HB2	35	⇒	HN	35	2,5
HN	11	⇒	HN	37	2,7	HN	22	⇒	HN	23	2,4	HB1	35	⇒	HN	35	2,5
HA	12	⇒	HN	12	2,9	HA	22	⇒	HN	23	2,9	HA	35	⇒	HN	36	1,9
HB1	12	⇒	HN	12	2,8	HA	22	⇒	HN	24	3,2	HA	36	⇒	HN	13	3,0
HB2	12	⇒	HN	12	2,5	HN	22	⇒	HN	24	3,3	HB#	36	⇒	HN	36	2,2
HA	12	⇒	HN	13	2,1	HB#	22	⇒	HN	24	3,3	HA	36	⇒	HN	36	2,7
HN	12	⇒	HN	13	3,7	HN	23	⇒	HN	22	2,5	HA	36	⇒	HN	37	2,1
HN	12	⇒	HD22	34	1,9	HA	23	⇒	HN	23	2,3	HA	63	⇒	HN	48	2,6
HA	12	⇒	HN	35	3,4	HB#	23	⇒	HN	23	2,1	HN	36	⇒	HN	49	2,9
HA	13	⇒	HN	13	2,7	HA	23	⇒	HN	24	2,7	HN	37	⇒	HN	10	3,5
HA	13	⇒	HN	14	2,2	HN	23	⇒	HN	24	2,3	HN	37	⇒	HN	11	2,5
HN	13	⇒	HD22	34	2,7	HN	24	⇒	HN	23	2,2	HA	37	⇒	HN	37	2,7
HN	13	⇒	HD22	34	3,2	HA	24	⇒	HN	24	2,5	HA	37	⇒	HN	38	2,3
HB2	14	⇒	HN	14	2,2	HG2#	24	⇒	HN	25	2,7	HG2#	37	⇒	HN	39	2,6
HA	14	⇒	HN	14	2,7	HA	24	⇒	HN	25	2,7	HG2#	37	⇒	HN	47	2,7
HN	14	⇒	HN	15	3,3	HN	24	⇒	HN	25	2,0	HD1#	37	⇒	HN	48	2,6
HN	15	⇒	HN	14	3,6	HB	24	⇒	HN	26	2,4	HA	38	⇒	HN	8	3,7
HG1#	15	⇒	HN	15	3,1	HG2#	24	⇒	HN	26	2,5	HA	38	⇒	HN	10	2,9
HG1#	15	⇒	HN	16	2,9	HN	25	⇒	HN	22	3,4	HA	38	⇒	HN	38	2,7
HG1#	15	⇒	HN	33	3,5	HB2	25	⇒	HN	25	2,1	HB2	38	⇒	HN	38	2,3
HN	15	⇒	HN	33	2,6	HN	25	⇒	HN	26	2,4	HN	38	⇒	HN	49	2,9
HB	15	⇒	HN	35	2,8	HN	26	⇒	HN	21	2,7	HN	39	⇒	HN	8	2,4
HG1#	15	⇒	HN	35	3,0	HN	26	⇒	HN	22	3,3	HN	39	⇒	HN	10	3,8
HA	16	⇒	HN	17	2,2	HA	26	⇒	HN	26	2,4	HN	39	⇒	HN	38	3,5

Atom	Rest		Atom	Rest	r	Atom	Rest		Atom	Rest	r	Atom	Rest		Atom	Rest	r
HA	39	⇒	HN	39	2,8	HB1	50	⇒	HN	51	2,4	HA	63	⇒	HN	63	3,2
HA	39	⇒	HN	40	2,2	HA	50	⇒	HN	51	2,2	HB2	63	⇒	HN	63	2,4
HA	40	⇒	HN	40	2,6	HN	50	⇒	HN	51	2,4	HA	63	⇒	HN	64	2,4
HB2	40	⇒	HN	40	2,5	HA	51	⇒	HN	51	2,3	HB2	63	⇒	HN	64	3,0
HA	40	⇒	HN	41	2,2	HB2	51	⇒	HN	51	2,1	HD1#	64	⇒	HN	64	2,6
HB1	40	⇒	HN	41	3,2	HB1	51	⇒	HN	52	2,4	HA	64	⇒	HN	64	3,0
HA	40	⇒	HN	42	3,0	HB2	51	⇒	HN	58	2,2	HA	64	⇒	HN	65	2,2
HB2	40	⇒	HN	43	3,6	HB1	51	⇒	HN	58	2,5	HD1#	64	⇒	HN	65	2,6
HN	40	⇒	HN	44	3,3	HA	51	⇒	HN	59	2,6	HG2#	65	⇒	HN	65	3,1
HB1	40	⇒	HN	44	2,9	HA	52	⇒	HN	34	3,1	HA	65	⇒	HN	65	2,9
HB2	40	⇒	HN	44	2,5	HA	52	⇒	HN	52	2,4	HA	65	⇒	HN	66	2,6
HN	40	⇒	HN	45	3,1	HN	52	⇒	HN	53	3,0	HB	65	⇒	HN	66	2,7
HN	40	⇒	HN	47	3,4	HN	52	⇒	HN	57	3,0	HB	65	⇒	HN	67	3,0
HB2	41	⇒	HN	41	2,2	HB2	53	⇒	HN	34	3,1	HB	65	⇒	HN	67	3,0
HB1	41	⇒	HN	41	2,2	HB2	53	⇒	HN	54	2,3	HG2#	65	⇒	HN	67	2,9
HA	41	⇒	HN	41	2,6	HA	54	⇒	HN	54	2,3	HA	65	⇒	HN	67	3,2
HN	41	⇒	HN	42	2,5	HN	54	⇒	HN	55	3,1	HG2#	66	⇒	HN	66	2,8
HB2	41	⇒	HN	42	2,6	HG1#	55	⇒	HN	52	2,7	HB	66	⇒	HN	66	2,9
HA	41	⇒	HN	42	3,0	HG2#	55	⇒	HN	55	3,2	HA	66	⇒	HN	66	3,0
HN	42	⇒	HN	41	2,7	HG1#	55	⇒	HN	55	2,6	HN	66	⇒	HN	67	3,1
HG1#	42	⇒	HN	42	2,4	HN	55	⇒	HN	56	2,5	HN	67	⇒	HN	66	2,9
HA	42	⇒	HN	42	2,4	HN	56	⇒	HN	55	2,7	HN	67	⇒	HN	68	2,2
HB	42	⇒	HN	42	2,2	HB2	56	⇒	HN	56	2,4	HG2#	67	⇒	HN	68	3,2
HN	42	⇒	HN	43	2,2	HA	56	⇒	HN	56	2,1	HB	67	⇒	HN	68	3,1
HB	42	⇒	HN	43	2,2	HB1	56	⇒	HN	56	2,3	HB1	68	⇒	HN	65	2,5
HA	42	⇒	HN	43	2,7	HB2	56	⇒	HN	57	3,1	HB1	68	⇒	HN	67	2,9
HN	42	⇒	HN	44	2,7	HB1	56	⇒	HN	57	2,3	HN	68	⇒	HN	67	2,4
HB	42	⇒	HN	44	3,0	HN	56	⇒	HN	57	2,9	HA	68	⇒	HN	68	2,3
HN	43	⇒	HN	41	3,2	HN	57	⇒	HN	52	3,2	HA	68	⇒	HN	69	2,1
HN	43	⇒	HN	42	2,3	HN	57	⇒	HN	56	2,7	HB1	68	⇒	HN	69	2,5
HB2	43	⇒	HN	43	2,8	HA	57	⇒	HN	57	2,8	HN	68	⇒	HN	69	2,9
HB1	43	⇒	HN	43	2,5	HB2	57	⇒	HN	57	2,1	HN	69	⇒	HN	68	3,1
HA	43	⇒	HN	43	3,4	HA	57	⇒	HN	58	2,2	HA	69	⇒	HN	69	2,4
HB1	43	⇒	HN	44	3,6	HN	58	⇒	HN	52	2,8	HB#	69	⇒	HN	69	2,6
HA2	44	⇒	HN	44	2,3	HN	58	⇒	HN	57	3,0	HA	69	⇒	HN	70	2,1
HA1	44	⇒	HN	44	2,2	HA	58	⇒	HN	57	2,6	HG	70	⇒	HN	70	1,9
HA1	44	⇒	HN	45	2,6	HA	58	⇒	HN	58	2,7	HB1	70	⇒	HN	70	2,0
HB2	45	⇒	HN	45	2,0	HB	58	⇒	HN	58	2,3	HD1#	70	⇒	HN	70	2,4
HA	45	⇒	HN	46	2,0	HA	58	⇒	HN	60	2,8	HD1#	70	⇒	HN	71	2,8
HB1	46	⇒	HN	46	2,5	HB#	60	⇒	HN	50	2,6	HG	70	⇒	HN	71	2,6
HA	46	⇒	HN	46	2,9	HN	60	⇒	HN	50	3,1	HA	70	⇒	HN	71	2,2
HB2	46	⇒	HN	46	2,1	HN	60	⇒	HN	59	2,5	HB1	70	⇒	HN	71	2,8
HB2	46	⇒	HN	47	2,4	HB#	60	⇒	HN	60	3,0	HA	70	⇒	HN	81	3,0
HA	46	⇒	HN	47	2,2	HB#	60	⇒	HN	61	3,0	HN	71	⇒	HN	70	2,9
HB1	46	⇒	HN	47	2,6	HA	60	⇒	HN	61	2,4	HA	71	⇒	HN	71	2,6
HB2	47	⇒	HN	38	2,4	HN	60	⇒	HN	61	3,5	HB2	71	⇒	HN	71	2,5
HN	47	⇒	HN	46	3,7	HB#	60	⇒	HN	62	2,7	HB1	71	⇒	HN	71	2,3
HA	47	⇒	HN	47	2,7	HA	60	⇒	HN	88	3,3	HN	71	⇒	HN	81	2,7
HN	47	⇒	HN	48	2,6	HN	61	⇒	HN	60	2,7	HA	72	⇒	HN	73	2,1
HB2	47	⇒	HN	48	2,0	HB1	61	⇒	HN	61	3,2	HA	72	⇒	HN	81	2,9
HA	47	⇒	HN	48	2,3	HB2	61	⇒	HN	61	3,2	HB2	73	⇒	HN	73	2,3
HB2	47	⇒	HN	49	2,8	HA	61	⇒	HN	61	3,2	HB1	73	⇒	HN	73	2,3
HA	47	⇒	HN	63	3,1	HN	61	⇒	HN	62	3,2	HA	73	⇒	HN	73	2,4
HA	47	⇒	HN	64	2,7	HB2	61	⇒	HN	62	3,1	HA	73	⇒	HN	74	2,1
HB2	48	⇒	HN	48	2,1	HA	61	⇒	HN	62	2,1	HB2	73	⇒	HN	76	3,0
HA	48	⇒	HN	49	2,2	HD21	61	⇒	HN	63	3,1	HA	74	⇒	HN	74	2,3
HN	48	⇒	HN	62	2,6	HN	61	⇒	HN	88	2,9	HA	74	⇒	HN	76	3,1
HN	49	⇒	HN	36	2,9	HB2	61	⇒	HN	88	3,1	HA1	75	⇒	HN	75	2,2
HA	49	⇒	HN	49	2,6	HN	62	⇒	HN	48	3,0	HA2	75	⇒	HN	75	2,4
HB2	49	⇒	HN	50	2,4	HN	62	⇒	HN	61	3,3	HN	75	⇒	HN	76	3,0
HA	49	⇒	HN	50	2,2	HA	62	⇒	HN	62	2,7	HA1	75	⇒	HN	76	2,7
HA	49	⇒	HN	60	2,9	HB2	62	⇒	HN	62	3,4	HN	76	⇒	HN	75	2,9
HA	50	⇒	HN	36	2,7	HB1	62	⇒	HN	62	3,3	HA	76	⇒	HN	76	2,6
HB1	50	⇒	HN	50	2,4	HA	62	⇒	HN	63	2,4	HB1	76	⇒	HN	76	2,4

Atom	Rest	Atom	Rest	r	Atom	Rest	Atom	Rest	r	Atom	Rest	Atom	Rest	r			
HB2	76	⇒	HN	76	2,5	HN	87	⇒	HN	61	4,0	HN	99	⇒	HN	80	2,5
HN	76	⇒	HN	77	3,4	HB1	87	⇒	HN	87	2,5	HN	99	⇒	HN	98	3,0
HB1	76	⇒	HN	77	3,1	HA	87	⇒	HN	87	2,8	HB#	99	⇒	HN	99	2,5
HB2	76	⇒	HN	77	3,3	HB2	87	⇒	HN	87	2,7	HA	99	⇒	HN	100	2,2
HA	76	⇒	HN	78	2,6	HN	87	⇒	HN	88	2,5	HB#	99	⇒	HN	100	2,7
HB2	76	⇒	HN	79	3,3	HA	87	⇒	HN	88	2,8	HN	100	⇒	HN	16	2,7
HB1	76	⇒	HN	79	3,7	HA	87	⇒	HN	89	3,3	HN	100	⇒	HN	99	2,4
HB1	77	⇒	HN	77	2,9	HA	87	⇒	HN	90	3,0	HB1	100	⇒	HN	100	2,4
HB2	77	⇒	HN	77	2,6	HB1	87	⇒	HN	90	2,9	HA	100	⇒	HN	100	2,9
HA	77	⇒	HN	77	2,1	HB2	87	⇒	HN	93	3,1	HB2	100	⇒	HN	100	2,8
HB1	77	⇒	HN	78	3,7	HB2	88	⇒	HN	61	3,1	HB2	100	⇒	HN	101	2,6
HA	78	⇒	HN	77	3,1	HB2	88	⇒	HN	88	2,5	HA	100	⇒	HN	101	2,4
HB1	78	⇒	HN	78	2,9	HN	88	⇒	HN	89	2,8	HB1	100	⇒	HN	101	2,6
HA	78	⇒	HN	78	2,7	HN	88	⇒	HN	90	3,2	HA	101	⇒	HN	101	2,3
HN	78	⇒	HN	79	2,3	HN	88	⇒	HN	91	2,8	HB1	101	⇒	HN	101	2,8
HN	79	⇒	HN	77	3,4	HB2	89	⇒	HN	89	2,6	HB2	101	⇒	HN	101	2,7
HN	79	⇒	HN	78	2,5	HB1	89	⇒	HN	89	2,4	HA	101	⇒	HN	102	2,3
HB#	79	⇒	HN	79	2,5	HA	89	⇒	HN	89	2,5	HB1	101	⇒	HN	102	3,0
HA	79	⇒	HN	79	2,7	HA	89	⇒	HN	90	2,6	HB2	101	⇒	HN	102	2,9
HA	79	⇒	HN	80	2,1	HN	89	⇒	HN	90	2,4	HB2	101	⇒	HN	103	3,0
HB#	79	⇒	HN	80	2,5	HA1	90	⇒	HN	89	2,7	HB1	101	⇒	HN	103	2,9
HA	79	⇒	HN	101	2,8	HN	90	⇒	HN	89	2,4	HA	102	⇒	HN	102	2,6
HB#	79	⇒	HN	101	2,6	HA2	90	⇒	HN	90	2,3	HB2	102	⇒	HN	102	2,2
HB2	80	⇒	HN	71	3,2	HA1	90	⇒	HN	90	2,2	HA	102	⇒	HN	103	2,9
HA	80	⇒	HN	73	2,6	HA2	90	⇒	HN	91	2,3	HB2	102	⇒	HN	103	2,2
HB1	80	⇒	HN	80	3,1	HN	90	⇒	HN	91	2,5	HN	102	⇒	HN	103	2,7
HB2	80	⇒	HN	80	2,8	HA1	90	⇒	HN	91	2,4	HN	103	⇒	HN	102	2,7
HN	80	⇒	HN	81	3,2	HN	91	⇒	HN	90	2,6	HG2#	103	⇒	HN	103	2,5
HB1	80	⇒	HN	81	2,8	HA	91	⇒	HN	91	2,4	HA	103	⇒	HN	103	3,0
HB2	80	⇒	HN	81	2,9	HB#	91	⇒	HN	91	2,5	HA	103	⇒	HN	105	2,9
HA	80	⇒	HN	81	2,3	HB#	91	⇒	HN	92	2,8	HB	103	⇒	HN	105	2,9
HN	81	⇒	HN	71	2,7	HA	91	⇒	HN	92	2,0	HG2#	103	⇒	HN	105	3,1
HN	81	⇒	HN	80	3,4	HA	92	⇒	HN	92	2,5	HN	103	⇒	HN	106	3,1
HB2	81	⇒	HN	81	2,8	HB#	92	⇒	HN	92	2,3	HA	104	⇒	HN	105	3,1
HA	81	⇒	HN	81	3,1	HB#	92	⇒	HN	93	2,6	HA	105	⇒	HN	105	2,4
HB1	81	⇒	HN	81	2,7	HA	92	⇒	HN	93	2,1	HB1	105	⇒	HN	105	2,2
HA	81	⇒	HN	82	2,3	HN	93	⇒	HN	86	2,8	HB2	105	⇒	HN	105	2,2
HB1	81	⇒	HN	82	2,6	HB2	93	⇒	HN	93	2,6	HN	105	⇒	HN	106	2,7
HB2	81	⇒	HN	82	2,5	HB1	93	⇒	HN	93	2,4	HN	105	⇒	HN	108	2,7
HN	81	⇒	HN	82	3,0	HA	93	⇒	HN	93	2,6	HA	105	⇒	HN	108	2,7
HA	81	⇒	HN	99	2,7	HA	93	⇒	HN	94	2,0	HN	106	⇒	HN	103	3,0
HA	82	⇒	HN	81	3,2	HB1	93	⇒	HN	94	2,3	HB2	106	⇒	HN	103	2,2
HA	82	⇒	HN	83	2,1	HB2	94	⇒	HN	85	3,2	HN	106	⇒	HN	105	2,8
HN	82	⇒	HN	83	3,3	HA	94	⇒	HN	94	2,6	HB2	106	⇒	HN	106	2,0
HN	82	⇒	HN	97	2,5	HB2	94	⇒	HN	95	2,3	HA	106	⇒	HN	106	2,6
HN	83	⇒	HN	82	3,3	HA	94	⇒	HN	95	2,1	HN	106	⇒	HN	107	2,5
HN	83	⇒	HN	84	3,4	HN	95	⇒	HN	86	3,0	HA	106	⇒	HN	107	2,6
HB2	83	⇒	HN	84	2,3	HA	95	⇒	HN	96	2,2	HB2	106	⇒	HN	107	2,6
HA	84	⇒	HN	84	2,4	HA	96	⇒	HN	84	2,3	HB#	107	⇒	HN	79	2,8
HB#	84	⇒	HN	84	2,6	HN	96	⇒	HN	95	2,7	HB#	107	⇒	HN	101	2,7
HA	84	⇒	HN	85	2,0	HB2	96	⇒	HN	96	2,2	HN	107	⇒	HN	106	2,5
HB#	84	⇒	HN	85	2,6	HA	96	⇒	HN	97	2,2	HB#	107	⇒	HN	106	2,6
HB#	84	⇒	HN	86	2,9	HN	96	⇒	HN	97	2,8	HA	107	⇒	HN	107	2,5
HN	85	⇒	HN	84	3,5	HN	97	⇒	HN	82	2,9	HB#	107	⇒	HN	107	2,4
HB2	85	⇒	HN	85	2,2	HN	97	⇒	HN	84	3,5	HB#	107	⇒	HN	108	2,6
HB1	85	⇒	HN	85	2,3	HB1	97	⇒	HN	97	2,5	HN	107	⇒	HN	108	2,6
HN	85	⇒	HN	86	3,4	HB1	97	⇒	HN	98	2,6	HA	107	⇒	HN	108	3,3
HB1	85	⇒	HN	86	2,7	HN	98	⇒	HN	18	3,0	HA	107	⇒	HN	110	3,3
HA	85	⇒	HN	86	2,1	HB#	98	⇒	HN	80	3,0	HN	108	⇒	HN	107	2,5
HB2	85	⇒	HN	86	2,7	HB#	98	⇒	HN	82	3,4	HB2	108	⇒	HN	108	2,4
HB2	86	⇒	HN	62	3,5	HB#	98	⇒	HN	99	2,8	HA	108	⇒	HN	108	2,5
HA	86	⇒	HN	86	2,9	HA	98	⇒	HN	99	2,2	HA	108	⇒	HN	109	2,6
HB1	86	⇒	HN	86	2,5	HN	98	⇒	HN	99	2,5	HN	108	⇒	HN	109	2,5
HB2	86	⇒	HN	86	2,6	HB#	99	⇒	HN	16	2,8	HA	108	⇒	HN	111	2,7



Atom	Rest	Atom	Rest	r	Atom	Rest	Atom	Rest	r	Atom	Rest	Atom	Rest	r			
HN	109	⇒	HN	108	2,4	HA	123	⇒	HN	123	2,3	HA	70	⇒	HD2#	70	3,1
HB2	109	⇒	HN	110	2,2	HB2	123	⇒	HN	123	2,5	HG	70	⇒	HD2#	70	2,1
HN	109	⇒	HN	110	2,6	HB1	123	⇒	HN	123	2,3	HB1	70	⇒	HD1#	70	2,4
HN	110	⇒	HN	109	2,4	HA	123	⇒	HN	124	2,2	HB1	70	⇒	HD2#	70	2,7
HB2	110	⇒	HN	110	2,3	HB2	123	⇒	HN	124	3,1	HG	70	⇒	HD1#	70	2,2
HA	110	⇒	HN	110	2,7	HB1	123	⇒	HN	124	3,1	HA	70	⇒	HA	82	2,1
HB1	110	⇒	HN	110	2,4	HG2#	124	⇒	HN	123	2,8	HA	71	⇒	HD1#	70	3,1
HB1	110	⇒	HN	111	3,1	HA	124	⇒	HN	124	2,5	HA	72	⇒	HA	80	2,4
HN	110	⇒	HN	111	2,8	HG11	124	⇒	HN	124	2,3	HA2	75	⇒	HA1	75	1,8
HA	110	⇒	HN	111	3,1	HB	124	⇒	HN	124	2,2	HB1	76	⇒	HA	76	2,3
HB2	110	⇒	HN	111	2,7	HA	125	⇒	HN	126	2,0	HB2	76	⇒	HB#	79	2,5
HB2	111	⇒	HN	111	2,3	HG2	127	⇒	HN	127	2,9	HB1	76	⇒	HB#	79	2,9
HA	111	⇒	HN	111	2,6	HB2	127	⇒	HN	127	2,5	HB#	79	⇒	HA	79	2,4
HA	111	⇒	HN	112	3,3	HA	127	⇒	HN	128	2,3	HA	79	⇒	HB#	79	2,5
HN	111	⇒	HN	112	2,7	HA	128	⇒	HN	128	2,9	HA	79	⇒	HA	100	2,3
HB2	111	⇒	HN	112	2,4	HA	129	⇒	HN	130	2,3	HB1	80	⇒	HD1#	70	3,3
HA	111	⇒	HN	114	2,9	HA	130	⇒	HN	130	2,8	HB1	80	⇒	HD1#	70	2,7
HN	112	⇒	HN	111	2,6	HB1	130	⇒	HN	130	2,9	HA	80	⇒	HA	72	2,4
HA	112	⇒	HN	112	2,3	HA	121	⇒	HN	124	4,5	HA	81	⇒	HB2	81	2,7
HB2	112	⇒	HN	112	2,1	HB2	5	⇒	HA	5	1,9	HA	81	⇒	HB1	81	3,4
HB2	112	⇒	HN	113	2,2	HG2	5	⇒	HA	5	2,3	HA	81	⇒	HA	98	2,2
HB2	112	⇒	HN	114	2,9	HA	7	⇒	HA	40	1,8	HA	82	⇒	HA	70	1,9
HB2	113	⇒	HN	113	2,3	HA	10	⇒	HN	10	2,8	HA	84	⇒	HB#	84	2,2
HA	113	⇒	HN	113	2,3	HB1	11	⇒	HB2	11	2,0	HB1	85	⇒	HA	85	2,4
HB1	113	⇒	HN	113	2,3	HB2	12	⇒	HA	12	2,1	HB1	86	⇒	HB2	86	1,8
HA	113	⇒	HN	114	2,9	HA	12	⇒	HB1	12	2,3	HA	86	⇒	HB1	86	2,3
HB1	113	⇒	HN	114	2,3	HA	12	⇒	HB2	12	2,2	HA	87	⇒	HB1	87	2,1
HB2	113	⇒	HN	114	2,5	HB2	12	⇒	HD21	34	2,3	HB1	87	⇒	HA	87	2,1
HN	114	⇒	HN	113	2,5	HA	14	⇒	HA	34	2,3	HB1	87	⇒	HB#	92	3,9
HB2	114	⇒	HN	114	2,4	HG1#	15	⇒	HN	16	3,0	HA	89	⇒	HB1	89	2,3
HA	114	⇒	HN	114	2,5	HA	16	⇒	HA	32	3,9	HB1	97	⇒	HB2	97	2,0
HA	114	⇒	HN	115	3,1	HA	22	⇒	HB#	22	2,2	HB#	98	⇒	HA	81	2,9
HN	114	⇒	HN	115	2,6	HA	24	⇒	HG2#	24	2,5	HA	98	⇒	HA	81	2,3
HA	114	⇒	HN	117	3,0	HA	29	⇒	HA	18	2,1	HA	98	⇒	HB2	81	2,6
HN	115	⇒	HN	114	2,3	HA	32	⇒	HA	16	2,4	HB#	99	⇒	HA	17	2,3
HB#	115	⇒	HN	115	2,2	HA	34	⇒	HG1#	15	4,1	HB#	99	⇒	HA	99	2,7
HA	115	⇒	HN	115	2,3	HA	34	⇒	HB1	34	2,1	HA	100	⇒	HA	79	2,4
HB2	115	⇒	HN	118	2,0	HB1	35	⇒	HG1#	15	2,8	HB1	110	⇒	HA	110	2,5
HA	116	⇒	HN	116	2,0	HA	37	⇒	HN	38	2,1	HA	110	⇒	HN	110	2,6
HB2	117	⇒	HN	117	2,3	HA	37	⇒	HA	48	2,4	HA	110	⇒	HB2	113	3,8
HB1	117	⇒	HN	117	2,3	HA	38	⇒	HA	9	2,4	HB#	114	⇒	HD##	70	2,7
HB1	117	⇒	HN	118	2,9	HA	39	⇒	HA	46	2,2	HA	114	⇒	HN	114	2,5
HB2	117	⇒	HN	118	2,4	HA	40	⇒	HA	7	2,1	HA	115	⇒	HB2	118	2,5
HA	118	⇒	HN	118	2,2	HA	46	⇒	HA	39	2,1	HB2	117	⇒	HA	117	2,2
HB2	118	⇒	HN	118	1,9	HA	46	⇒	HB2	46	2,2	HB1	117	⇒	HB2	117	1,8
HB2	118	⇒	HN	119	1,8	HA	47	⇒	HA	63	2,3	HA	117	⇒	HB2	117	2,1
HA	118	⇒	HN	119	3,2	HA	48	⇒	HA	37	2,1	HB2	118	⇒	HA	115	2,5
HN	118	⇒	HN	119	2,5	HA	49	⇒	HA	61	2,0	HN	123	⇒	HN	124	2,9
HA	118	⇒	HN	120	3,6	HA	51	⇒	HA	58	2,0	HN	101	⇒	HN	79	5,0
HN	119	⇒	HN	118	2,5	HA	52	⇒	HA2	33	2,9	HN	95	⇒	HN	84	2,3
HB2	119	⇒	HN	119	1,9	HA	58	⇒	HA	51	2,0	HD1	101	⇒	HN	101	2,7
HA	119	⇒	HN	120	2,2	HA	61	⇒	HA	49	1,9	HN	13	⇒	HN	12	5,0
HB2	120	⇒	HN	120	1,8	HA	61	⇒	HB1	61	2,1	HN	55	⇒	HN	54	5,0
HA	120	⇒	HN	120	2,1	HA	61	⇒	HB2	61	2,8	HN	65	⇒	HN	67	3,3
HN	120	⇒	HN	121	2,2	HB2	62	⇒	HA	62	2,3	HN	48	⇒	HN	64	5,0
HA	121	⇒	HN	121	2,3	HB2	62	⇒	HB#	84	3,1	HD#	64	⇒	HN	118	5,0
HB2	121	⇒	HN	121	2,1	HB1	62	⇒	HB#	84	2,9	HN	101	⇒	HN	79	5,0
HA	122	⇒	HN	122	2,2	HA	63	⇒	HA	47	2,2	HN	45	⇒	HN	46	5,0
HB#	122	⇒	HN	122	2,1	HA	65	⇒	HB	65	1,8	HB2	77	⇒	HN	78	5,0
HA	122	⇒	HN	123	2,2	HB	65	⇒	HA	65	2,1	HN	58	⇒	HN	60	5,0
HB1	122	⇒	HN	123	2,3	HA	69	⇒	HD1#	70	3,9	HN	107	⇒	HN	105	4,9
HN	122	⇒	HN	123	2,4	HD1#	70	⇒	HD2#	70	2,3	HN	73	⇒	HN	74	5,0
HB2	122	⇒	HN	123	2,3	HA	70	⇒	HD1#	70	2,5	HB#	107	⇒	HN	111	5,0
HN	123	⇒	HN	122	2,5	HD2#	70	⇒	HD1#	70	2,3	HA	100	⇒	HN	99	5,0

---

Atom	Rest		Atom	Rest	r
HN	89	⇒	HN	88	2,7
HN	88	⇒	HN	87	3,3
HB1	46	⇒	HN	64	3,3
HG2	127	⇒	HN	128	3,3
HA	15	⇒	HN	102	3,8
HN	127	⇒	HN	126	3,3
HA	105	⇒	HN	106	3,6
HA	104	⇒	HN	107	3,0
HN	105	⇒	HN	107	4,9
HA	104	⇒	HN	108	2,9
HA	106	⇒	HN	109	3,8
HN	111	⇒	HN	109	5,0
HA	106	⇒	HN	110	4,3
HN	108	⇒	HN	110	4,9
HN	112	⇒	HN	110	3,5
HN	111	⇒	HN	110	2,8
HA	109	⇒	HN	110	3,8
HA	107	⇒	HN	111	4,9
HN	113	⇒	HN	111	4,8
HA	108	⇒	HN	112	4,9
HN	110	⇒	HN	112	4,7
HN	114	⇒	HN	112	5,0
HN	113	⇒	HN	112	3,0
HA	110	⇒	HN	113	3,7
HN	111	⇒	HN	113	4,9
HN	112	⇒	HN	113	3,3
HA	110	⇒	HN	114	4,7
HN	112	⇒	HN	114	4,2
HN	116	⇒	HN	114	4,2
HN	113	⇒	HN	114	3,1
HA	111	⇒	HN	115	3,9
HA	112	⇒	HN	115	3,0
HN	116	⇒	HN	115	3,1
HA	112	⇒	HN	116	3,7
HN	114	⇒	HN	116	4,6
HN	115	⇒	HN	116	2,8
HN	117	⇒	HN	116	2,8
HA	115	⇒	HN	116	4,3
HA	113	⇒	HN	117	3,7
HN	119	⇒	HN	117	4,6
HN	116	⇒	HN	117	2,8
HN	118	⇒	HN	117	2,8
HA	116	⇒	HN	117	3,3
HA	116	⇒	HN	118	4,0
HA	114	⇒	HN	118	4,6
HA	115	⇒	HN	118	3,8
HN	120	⇒	HN	118	3,8
HN	117	⇒	HN	118	2,8
HA	117	⇒	HN	118	3,8
HA	119	⇒	HN	119	3,0
HA	115	⇒	HN	119	4,7
HA	116	⇒	HN	119	3,4
HN	117	⇒	HN	119	4,9
HN	120	⇒	HN	119	2,8
HN	118	⇒	HN	120	4,7
HN	119	⇒	HN	120	3,0
HN	121	⇒	HN	120	2,7
HA	118	⇒	HN	121	3,8
HA	119	⇒	HN	122	3,8
HN	120	⇒	HN	122	3,2
HA	121	⇒	HN	122	3,5
HN	124	⇒	HN	123	2,9

## Anhang B

### Relaxationsraten, chemische Verschiebung und CSA

Das Verhalten der mit einem Spinensemble verbundenen (makroskopischen) Magnetisierung kann halbklassisch durch die Blochschen Gleichungen beschrieben werden (Magnetfeld parallel zur z-Achse):

$$\frac{dM_{x,y}}{dt} = \gamma(\vec{M} \times \vec{B})_{x,y} - \frac{M_{x,y}}{T_2} \quad (\text{B.1})$$

$$\frac{dM_z}{dt} = \gamma(\vec{M} \times \vec{B})_z + \frac{M_0 - M_z}{T_1}. \quad (\text{B.2})$$

Dabei sind  $M_x$ ,  $M_y$  und  $M_z$  die jeweiligen momentanen Komponenten der Magnetisierung und  $M_0$  die der Gleichgewichtsmagnetisierung.  $T_1$  ist die longitudinale oder Spin-Gitter-Relaxationszeit,  $T_2$  die transversale oder Spin-Spin-Relaxationszeit. Beide Zeitkonstanten beschreiben, wie schnell das Spinensemble dem Gleichgewichtszustand zustrebt. Ihre Werte hängen insbesondere in Lösung von der Beweglichkeit des betrachteten Moleküls ab, für Protonen liegt  $T_2$  im Bereich von 10-500 ms,  $T_1$  bei einer bis einigen Sekunden [Hol98]. Die reziproken Werte,  $R_1$  und  $R_2$ , heißen Relaxationsraten.

Wie das Kreuzprodukt in den ersten Termen auf der rechten Seite der Gln. B.1 und B.2 zeigt, präzediert eine in der xy-Ebene liegende Magnetisierungskomponente (bei Vernachlässigung der Relaxation) um das äußere Feld  $\vec{B}$ . Diese zeitliche Änderung der Magnetisierung läßt sich mit einer geeigneten Spule als induzierte Spannung (Größenordnung:  $10^{-6}$ - $10^{-1}$  V) nachweisen, man erhält ein Signal, das durch die Relaxation stark gedämpft wird. Die Larmor-Frequenz (Präzessionsfrequenz) für das ungedämpfte Signal ist ohne Berücksichtigung der chemischen Umgebung gegeben durch

$$\vec{\omega} = \gamma \vec{B}. \quad (\text{B.3})$$

Die chemische Umgebung führt zu lokal leicht unterschiedlichen magnetischen Flußdichten. Die dadurch bestimmte Resonanzfrequenz eines Kerns kann als

$$\vec{\omega} = \gamma \vec{B}(\hat{1} - \hat{\sigma}) \quad (\text{B.4})$$

geschrieben werden.  $\hat{\sigma}$  heißt Tensor der chemischen Verschiebung und läßt sich in der Praxis als symmetrische, im Hauptachsensystem diagonale, Matrix schreiben ( $\hat{1}$  ist dann die Einheitsmatrix):

$$\hat{\sigma} = \begin{pmatrix} \sigma_{11} & 0 & 0 \\ 0 & \sigma_{22} & 0 \\ 0 & 0 & \sigma_{33} \end{pmatrix} = \hat{\sigma}_{ISO} + \hat{\sigma}_{CSA} = \begin{pmatrix} \sigma_{iso} & 0 & 0 \\ 0 & \sigma_{iso} & 0 \\ 0 & 0 & \sigma_{iso} \end{pmatrix} + \hat{\sigma}_{CSA}. \quad (\text{B.5})$$

Die chemische Verschiebung läßt sich, wie in Gl. B.5 geschehen, in zwei Teile zerlegen, den isotropen Anteil und den Tensor der *Anisotropie der chemischen Verschiebung* (CSA). In Lösungen wird nur der isotrope Anteil beobachtet, Gleichung B.4 wird zu

$$\vec{\omega} = \gamma \vec{B}(1 - \sigma_{iso}). \quad (\text{B.4b})$$

Nach Gl. B.4 ist die Differenz zweier Resonanzfrequenzen dem Betrag der Flußdichte  $\vec{B}$  proportional. Je größer dieser ist, desto näher beieinander liegende Signale lassen sich noch auflösen, d.h. deutlich von-

einander unterscheiden. Durch Bezugnahme auf eine Standardfrequenz<sup>30</sup>  $\omega_s$  bzw. die entsprechende chemische Standardverschiebung  $\sigma_s$  lassen sich Resonanzfrequenzen über den Ausdruck

$$\delta = \frac{\omega - \omega_s}{\omega_s} \cdot 10^6 \text{ ppm} = (\sigma_s - \sigma) \cdot 10^6 \text{ ppm} \quad (\text{B.6})$$

feldunabhängig angeben. Weil Resonanzfrequenz und chemische Verschiebung  $\sigma_{iso}$  so eng miteinander verknüpft sind, werden beide Begriffe in den Kapiteln 2 und 3 etwas unpräzise wie Synonyme nebeneinander verwendet. (Auch Kreisfrequenz  $\omega$  und Frequenz  $\nu = \omega / 2\pi$  werden nicht explizit unterschieden.)

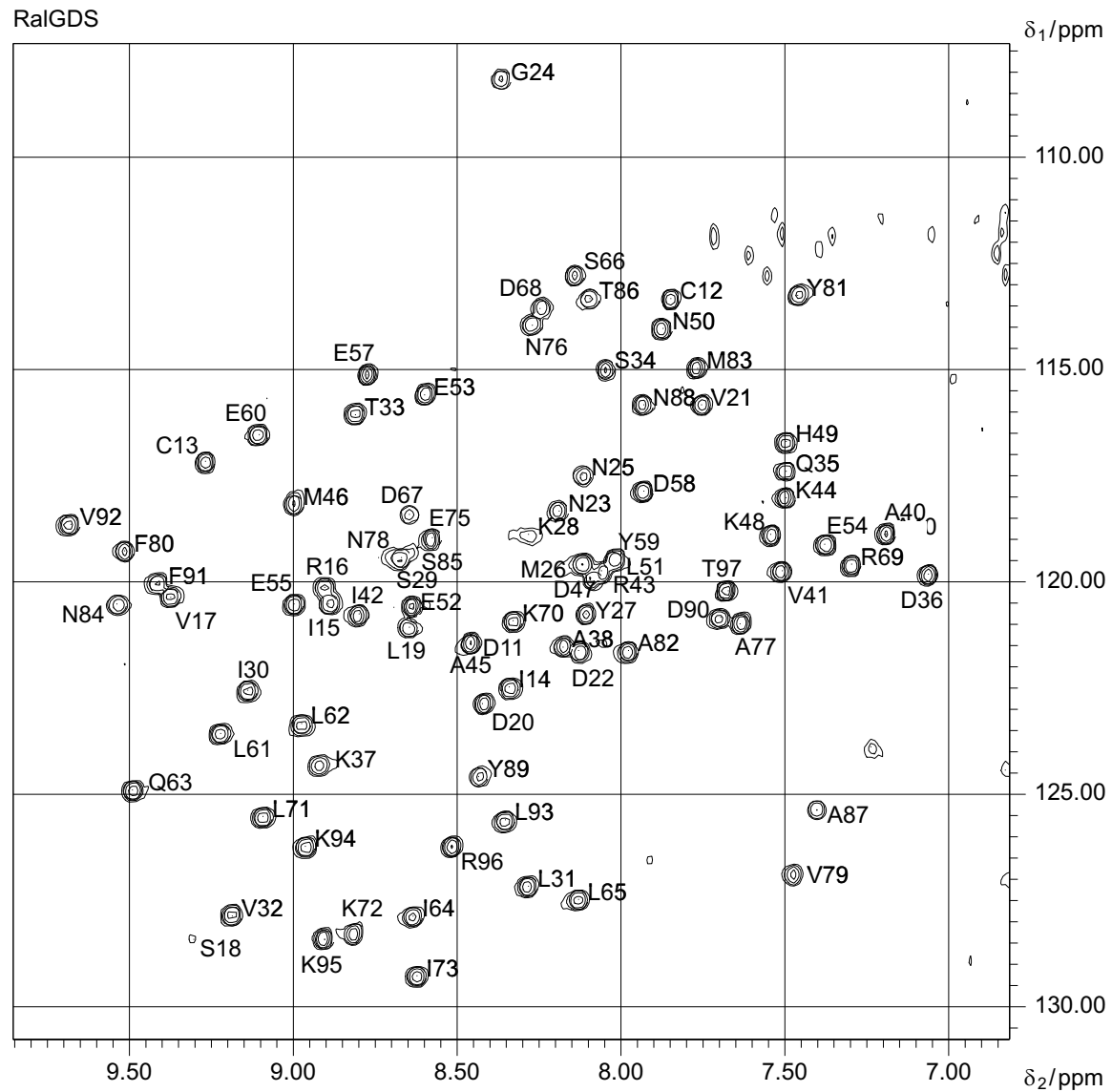
Abschließend soll noch die Schreibweise  $\sigma_{\parallel} - \sigma_{\perp}$  für die Anisotropie der chemischen Verschiebung erläutert werden. Für den Spezialfall zweier gleicher Hauptwerte  $\sigma_{\perp}$  kann der Tensor der chemischen Verschiebung auch geschrieben werden wie folgt:

$$\hat{\sigma} = \begin{pmatrix} \sigma_{\perp} & 0 & 0 \\ 0 & \sigma_{\perp} & 0 \\ 0 & 0 & \sigma_{\parallel} \end{pmatrix} = \frac{1}{3} \begin{pmatrix} \sigma_{\parallel} + 2\sigma_{\perp} & 0 & 0 \\ 0 & \sigma_{\parallel} + 2\sigma_{\perp} & 0 \\ 0 & 0 & \sigma_{\parallel} + 2\sigma_{\perp} \end{pmatrix} + \hat{\sigma}_{CSA}, \quad (\text{B.5b})$$

mit

$$\hat{\sigma}_{CSA} = \frac{1}{3} \begin{pmatrix} -(\sigma_{\parallel} - \sigma_{\perp}) & 0 & 0 \\ 0 & -(\sigma_{\parallel} - \sigma_{\perp}) & 0 \\ 0 & 0 & 2(\sigma_{\parallel} - \sigma_{\perp}) \end{pmatrix}. \quad (\text{B.7})$$

<sup>30</sup> Resonanzlinie einer Standardsubstanz

Zuordnung der Signale von RalGDSRasBD im  $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum

## Liste der NMR-Experimente an der Rasbindedomäne von RalGDS

Erläuterung der eingetragenen experimentellen Parameter: d1: Präparationswartezeit in Sekunden. ns: „number of scans“. rg: receiver gain. p1: 90°-Protonenpuls (Rechteck). SW: Spektrale Weite bei der Messung. TD: Zahl der Meßpunkte. SI: Zahl der Punkte im prozessierten Spektrum. Fenster: Apodisationsfunktion, SSB, LB: zugehörige Parameter. Proz.: Prozessierungsart. lin. pred: ggf. Art der „linear prediction“, NCOEFF, LPBIN: zugehörige Parameter. Alle Messungen wurden bei 298 K am 500-MHz-Spektrometer durchgeführt.

**Experiment 1-8:** Messung von  $R_1$  **zum Pulsprogramm:** t1\_15n\_sefb.bv, [Far94]

d1: 2	ns: 16	rg: 256			p1: 9,5 $\mu$ s, 0 dB		Vorsättigung:				
Kern	SW / ppm	TD	SI	Fenster	SSB	LB	Proz.	lin. pred.	NCOEFF	LPBIN	
N	40	256	512	qsine	3,5	--	ea	--	--	--	
H	12	2k	1k	qsine	3,5	--	direkt	--	--	--	

**Experiment 9-18:** Messung von  $R_2$  **zum Pulsprogramm:** t2\_15n\_sefb.al, [Far94]

d1: 2	ns: 16	rg: 256			p1: 9,5 $\mu$ s, 0 dB		Vorsättigung:				
Kern	SW / ppm	TD	SI	Fenster	SSB	LB	Proz.	lin. pred.	NCOEFF	LPBIN	
N	40	256	512	qsine	3,5	--	ea	--	--	--	
H	12	2k	1k	qsine	3,5	--	direkt	--	--	--	

Die Zeit zwischen zwei 180°-Pulsen der CPMG-Sequenz war 940,9  $\mu$ s, die Anzahl dieser Perioden war 8 oder ein Vielfaches davon, je nach gewählter Relaxationsdauer.

**Experiment 19:** NOE **zum Pulsprogramm:** invinoegpsi.tm, [Far94]

d1: 2	ns: 32	rg: 4k (4096)			p1: 9,0 $\mu$ s, 0 dB		Vorsättigung:				
Kern	SW / ppm	TD	SI	Fenster	GB	LB	Proz.	lin. pred.	NCOEFF	LPBIN	
N	25	256	512	EM	--	1	ea	--	--	--	
H	12	2k	4k	GM	0	-8	direkt	--	--	--	

Die Zeit für die Vorsättigung der Protonenresonanzen im NOE-Experiment ist d1.

Die für die Relaxationsdauer gewählten Zeitspannen waren für die Messung von  $R_1$ :

10 ms, 20 ms, 40 ms, 80 ms, 160 ms, 320 ms, 640 ms und 1,28 s.

Die für die Relaxationsdauer gewählten Zeitspannen waren für die Messung von  $R_2$ :

7,86 ms, 15,71 ms, 23,57 ms, 39,28 ms, 62,85 ms, 94,27 ms, 125,70 ms, 118,54 ms, 314,24 ms und 785,60 ms.

Relaxationsraten und NOEs für RalGDS<sup>RasBD</sup>

Rest	$R_1 / s^{-1}$	Fehler ( $R_1$ ) / $s^{-1}$	$R_2 / s^{-1}$	Fehler ( $R_2$ ) / $s^{-1}$	NOE	Fehler (NOE)
D11*	2,53	0,10	8,45	1,38	0,77	0,39
C12	2,24	0,11	8,43	0,24	0,60	0,06
C13	2,24	0,05	9,38	0,19	0,69	0,07
I14	2,32	0,14	9,05	0,36	0,75	0,08
I15*	2,41	0,04	9,90	0,24	0,81	0,12
R16*	2,15	0,07	10,04	0,63	0,91	0,14
V17	2,24	0,07	9,88	0,42	0,91	0,09
S18					0,78	0,08
L19	2,33	0,07	14,08	0,60	0,89	0,09
D20	2,32	0,10	9,52	0,50	0,72	0,07
V21	2,14	0,03	8,53	0,43	0,74	0,07
D22	2,72	0,19	7,30	0,31	0,72	0,07
N23	2,82	0,19	6,11	0,47	0,67	0,07
G24	2,03	0,12	6,63	0,24	0,55	0,06
N25	2,14	0,26	6,31	0,36	0,96	0,10
M26	2,06	0,05	8,25	0,20		
Y27	2,19	0,05	7,61	0,30	0,51	0,05
K28	2,61	0,30	10,82	0,51	0,56	0,06
S29*	2,44	0,14	8,70	0,21	0,92	0,14
I30	2,32	0,10	9,32	0,41	0,84	0,08
L31	2,19	0,06	8,90	0,27	0,62	0,06
V32	2,12	0,06	10,00	0,40	0,75	0,08
T33	2,11	0,04	9,89	0,36	0,84	0,08
S34	2,54	0,16	9,17	0,47	0,91	0,09
Q35	2,62	0,08	9,14	0,38	0,75	0,08
D36	2,55	0,08	9,40	0,46	0,82	0,08
K37	2,18	0,06	9,18	0,18	0,74	0,07
A38	2,33	0,06	10,30	0,36	0,88	0,09
P39						
A40	2,31	0,03	9,41	0,41	0,84	0,08
V41	2,35	0,08	9,01	0,46	0,78	0,08
I42	2,46	0,11	10,13	0,24	0,82	0,08
R43*	2,13	0,11	9,04	1,02	0,66	0,13
K44	2,15	0,04	10,54	0,28	0,79	0,08
A45*	2,53	0,10	10,21	0,46	0,77	0,12
M46	2,39	0,05	17,94	0,82	0,73	0,07
D47*	2,92	0,31			0,81	0,16
K48	2,26	0,08	10,30	0,20	0,75	0,07
H49	2,05	0,08	9,46	0,20	0,84	0,08
N50	2,44	0,07	8,88	0,48	0,85	0,09
L51	2,13	0,11	9,04	1,02		
E52	1,88	0,06	7,28	0,13	0,58	0,06
E53	2,08	0,05	7,61	0,28	0,68	0,07
E54	2,07	0,10	8,31	0,23	0,73	0,07
E55	2,16	0,06	8,90	0,32	0,64	0,06
P56						
E57	2,44	0,14	9,32	0,12	0,74	0,07
D58	2,24	0,08	9,80	0,27	0,80	0,08
Y59	2,35	0,20	10,74	0,86	0,57	0,06
E60	2,34	0,02	9,42	0,49	0,79	0,08

Rest	$R_1 / s^{-1}$	Fehler ( $R_1$ ) / $s^{-1}$	$R_2 / s^{-1}$	Fehler ( $R_2$ ) / $s^{-1}$	NOE	Fehler (NOE)
L61	2,29	0,08	9,76	0,30	0,82	0,08
L62	2,55	0,29	9,94	0,25	0,75	0,07
Q63	2,42	0,06	9,38	0,39	0,69	0,07
I64	2,30	0,15	10,23	0,15	0,84	0,08
L65	2,29	0,04	8,71	0,33	0,91	0,09
S66	2,31	0,16	7,31	0,17	0,92	0,09
D67	1,99	0,28	7,15	0,45	1,10	0,11
D68	2,17	0,22	7,36	0,36	0,57	0,06
R69	2,10	0,01	8,41	0,44	0,74	0,07
K70	2,22	0,02	9,48	0,31	0,71	0,07
L71	2,13	0,07	8,57	0,33	0,73	0,07
K72	2,22	0,09	8,44	0,23	0,78	0,08
I73	2,27	0,07	9,63	0,46	0,76	0,08
P74						
E75	2,25	0,07	10,59	0,95	0,76	0,08
N76	2,31	0,08	10,39	0,48	0,94	0,09
A77	2,10	0,06	9,00	0,44	0,94	0,09
N78					0,92	0,46
V79	2,45	0,09	11,14	0,29	0,83	0,08
F80	2,36	0,05	9,36	0,37	0,72	0,07
Y81	2,30	0,12	9,81	0,67	0,59	0,06
A82	2,47	0,07	9,24	0,43	0,89	0,09
M83	2,34	0,08	9,26	0,30	0,80	0,08
N84	2,54	0,10	8,88	0,47	0,77	0,08
S85*					0,75	0,15
T86	2,48	0,15	8,25	0,42	0,69	0,07
A87	2,19	0,09	7,09	0,50	0,81	0,08
N88	2,01	0,14	6,59	0,20	0,70	0,07
Y89	2,34	0,16	8,97	0,69	0,72	0,07
D90	2,26	0,09	10,53	0,49	0,71	0,07
F91	2,30	0,06	10,24	1,07	0,84	0,08
V92	2,48	0,07	10,25	0,37	0,73	0,07
L93	2,34	0,05	9,37	0,16	0,79	0,08
K94	2,40	0,09	10,12	0,30	0,80	0,08
K95	2,30	0,07	8,99	0,23	0,72	0,07
R96	2,39	0,07	8,62	0,18	0,74	0,07
T97	1,88	0,10	5,26	0,14	0,44	0,04

In der Regel standen 8 Signale zur Berechnung von  $R_1$  und 10 Signale für  $R_2$  zur Verfügung. Fehlende Werte in der Tabelle oben sind durch nicht verwertbare Signale in den Spektren begründet. Das kann heißen, Signale fehlten ganz, oder an die Daten ließ sich keine Exponentialfunktion sinnvoll anpassen. Die Signale von D11 und A45 sowie von R43 und L51 konnten bei der Messung von  $R_1$  nicht voneinander getrennt werden. Es wurde jeweils beiden Amidstickstoffen derselbe Wert zugerechnet. Bei mit \* gekennzeichneten Resten waren die Signale im NOE-Experiment kaum aufgelöst. Es wurden dann relative Fehler zwischen 15 % und 50 % angenommen.

Die Durchschnittswerte von  $R_1$ ,  $R_2$  und  $NOE$  sind  $2,3 s^{-1}$ ,  $9,2 s^{-1}$  und 0,76. Bei ihrer Verwendung wurden Fehler von 10 %, 20 % und 50 % angenommen.



**Liste der programmspezifischen Parameter für Rechnungen mit Modelfree**

<b>Parameter</b>	<b>Einstellung</b>
optimization	tval
search	grid
diffusion	isotropic
algorithm	fix
simulations	pred
iterations	500
trim_level	0
selection	none
sim_algorithm	fix

ein Feld: 500,13 MHz

Die Angaben oben beziehen sich auf die endgültige Rechnung. Zur Modellwahl wurde der Parameter „iterations“ auf „100“ gesetzt, der Parameter „selection“ bei Bedarf auf „ftest“

Tabelle der berechneten Ordnungsparameter

Rest	S <sup>2</sup>	Fehler	Rest	S <sup>2</sup>	Fehler
D11	1,00	0,04	E55	0,91	0,02
C12	0,89	0,02	P56	--	--
C13	0,96	0,02	E57	0,97	0,01
I14	0,95	0,03	D58	0,99	0,02
I15	1,00	0,01	Y59	1,00	0,06
R16	0,93	0,03	E60	0,99	0,01
V17	0,97	0,03	L61	0,99	0,02
S18	0,97	0,09	L62	1,00	0,03
L19	1,00	0,03	Q63	1,00	0,02
D20	0,98	0,03	I64	1,00	0,02
V21	0,90	0,01	L65	0,95	0,02
D22	0,81	0,03	S66	0,77	0,02
N23	0,78	0,04	D67	0,75	0,04
G24	0,72	0,02	D68	0,78	0,03
N25	0,68	0,04	R69	0,89	0,00
M26	0,86	0,01	K70	0,94	0,01
Y27	0,88	0,02	L71	0,89	0,02
K28	1,00	0,05	K72	0,89	0,02
S29	0,92	0,02	I73	0,97	0,03
I30	0,97	0,03	P74	--	--
L31	0,92	0,02	E75	0,96	0,03
V32	0,93	0,02	N76	1,00	0,03
T33	0,91	0,01	A77	0,89	0,02
S34	0,99	0,04	N78	0,97	0,09
Q35	1,00	0,03	V79	1,00	0,02
D36	1,00	0,03	F80	0,99	0,02
K37	0,94	0,01	Y81	0,98	0,04
A38	1,00	0,02	A82	1,00	0,03
P39	--	--	M83	0,97	0,02
A40	0,98	0,01	N84	1,00	0,03
V41	0,97	0,03	S85	0,97	0,09
I42	1,00	0,02	T86	0,91	0,04
R43	0,91	0,04	A87	0,86	0,03
K44	0,91	0,02	N88	0,70	0,02
A45	1,00	0,03	Y89	0,96	0,05
M46	1,00	0,02	D90	1,00	0,03
D47	1,00	0,11	F91	0,97	0,02
K48	1,00	0,02	V92	1,00	0,02
H49	0,95	0,02	L93	0,98	0,01
N50	1,00	0,03	K94	1,00	0,02
L51	0,91	0,04	K95	0,95	0,02
E52	0,76	0,01	R96	0,93	0,02
E53	0,85	0,02	T97	0,57	0,01
E54	0,86	0,02			

Es sind die mit dem Programm „Modelfree“ erhaltenen Daten wiedergegeben.

## Anhang C

### Beweis des Grenzwerts für die zirkulare Standardabweichung

Nach Abschnitt 4.3.2.2 beträgt die Differenz jedes Einzelwerts zum Mittelwert maximal  $180^\circ$ . Daher gibt es eine obere Schranke für die zyklische Standardabweichung  $s_c$ . Um zu zeigen, daß Gleichung (4.6) den Grenzwert  $s_{max}$  für eine endliche Zahl von Werten liefert, wird zunächst gezeigt, daß dieser Maximalwert nur für auf dem Einheitskreis genau gleichverteilte Wertesätze erreicht werden kann. Dann wird  $s_c$  für solche diskreten Gleichverteilungen berechnet. Das Ergebnis ist stets kleiner als der Grenzwert aus Gl. (4.6).

Angenommen, mit einer gegebenen Verteilung von  $N$  Werten wird das Maximum  $s_{max}$  erreicht. Das heißt, für die im Sinne von Kapitel 4 günstigste(n) Drehung(en) der Skala wird  $s = s_{max}$  erhalten, für alle anderen Drehungen ist  $s$  größer oder gleich  $s_{max}$ . Egal, welche Drehung der Skala jeweils betrachtet wird, wo auf dem Einheitskreis also die Skalenunstetigkeit liegt, der Ursprung ( $0^\circ$ ) der von  $-180^\circ$  bis  $180^\circ$  reichenden Skala werde so gewählt, daß er mit dem Ort des nach Gl. (4.1) berechneten Mittelwerts übereinstimmt. Damit wird aus

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (w_i - \bar{w})^2}{N}} \quad (\text{C.3})$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N w_i^2}{N}}. \quad (\text{C.1b})$$

Wie in Kapitel 4.3 wird im folgenden stattdessen  $Ns^2$  betrachtet. Es ist also

$$Ns^2 = \sum_{i=1}^N w_i^2. \quad (\text{C.2})$$

Nun werde ein Koordinatensystem \* mit  $s^* > s_{max}$  betrachtet. Man ändere die der Skalenunstetigkeit (und darüber hinweg auch einander) direkt benachbarten Werte  $w_x$  und  $w_y$  (sei  $w_x < 0^\circ$ ,  $w_y > 0^\circ$ ) zu  $w_x + \delta$  und  $w_y - \delta$ , dabei sei  $\delta$  positiv. Dann bleibt der Mittelwert erhalten, und mit  $(w_x + \delta)^2 < w_x^2$ ,  $(w_y - \delta)^2 < w_y^2$  wird  $Ns^2$  für dieses System kleiner (Abb. C.1 a).

In *allen* anderen Systemen, d.h. in denen die Skalenunstetigkeit zwischen anderen Werten  $w_i$ ,  $w_j$  liegt, nimmt  $Ns^2$  zu:

Der Mittelwert bleibt in *jedem* Koordinatensystem erhalten, da  $w_x$  und  $w_y$  um denselben Betrag  $\delta$  in unterschiedliche Richtungen versetzt werden.

Für ein System, in dem der Mittelwert direkt zwischen den ja benachbarten Werten  $w_x$  und  $w_y$  liegt (sei wieder  $w_x < 0^\circ$ ,  $w_y > 0^\circ$ ), gilt  $(w_x - \delta)^2 > w_x^2$  und  $(w_y + \delta)^2 > w_y^2$ . Die anderen Werte bleiben konstant, damit wird  $Ns^2$  größer (Abb. C.1 b).

In allen sonstigen Systemen sind  $w_x$  und  $w_y$  beide kleiner als  $0^\circ$  oder beide größer als  $0^\circ$ . Diese Fälle sind aus Symmetriegründen gleichwertig. Seien hier also beide Werte größer als  $0^\circ$ , und liege  $w_x$  näher am Mittelwert, habe also den kleineren Betrag. Dann wird  $(w_x, w_y$  werden „auseinanderbewegt“)  $w_x$  zu  $w_x - \delta$ ,  $w_y$  zu  $w_y + \delta$ . Wegen  $w_y > w_x$  gilt nun:

$$(w_x - \delta)^2 + (w_y + \delta)^2 = w_x^2 + w_y^2 + 2\delta^2 + 2\delta w_y - 2\delta w_x > w_x^2 + w_y^2.$$

Da wieder die anderen Summanden in Gl. (C.2) nicht verändert werden, wird auch hier  $Ns^2$  größer (Abb. C.1 c).

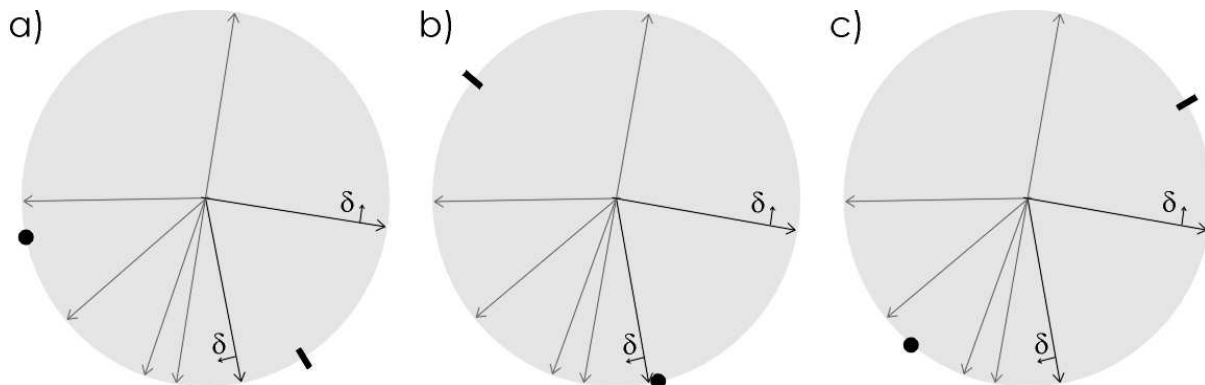


Abbildung C.1. Derselbe Datensatz dargestellt für drei verschiedene Skalendrehungen. Die konstant gehaltenen Winkel sind als graue, die beiden veränderten als schwarze Pfeile gezeichnet. Ebenfalls schwarz markiert: der Mittelwert als Punkt, die Skalenumstetigkeit als Strich.  
 a) Skalenumstetigkeit zwischen den beiden um  $d$  versetzten Werten,  $Ns^2$  nimmt ab.  
 b) Mittelwert zwischen den beiden Werten gelegen,  $Ns^2$  nimmt zu.  
 c) Sonstige Situationen,  $Ns^2$  nimmt zu.

Das heißt, auch im ursprünglich optimalen System mit  $s = s_{max}$  ist nun  $s > s_{max}$ . Ist auch in System \* noch  $s > s_{max}$ , so war  $s_{max}$  nicht der wahre Wert von  $s_{max}$ .

Dafür muß oben nur  $\delta$  klein genug gewählt werden: Im System \* änderte sich ja  $Ns^2$  um

$$\Delta Ns^2 = (w_x + \delta)^2 - w_x^2 + (w_y - \delta)^2 - w_y^2 = 2\delta^2 + 2\delta w_x - 2\delta w_y.$$

Ist  $\delta$  klein genug, so ist  $\Delta Ns^2$  kleiner als  $(0^\circ)^2$ , und weil der zugehörige Betrag der Änderung von  $s$ ,  $\Delta s$ , stetig von  $\delta$  abhängt, kann also  $\Delta s$  beliebig klein gewählt werden, insbesondere so, daß  $s^* - \Delta s > s_{max}$ .

Das bedeutet, für *kein* Koordinatensystem (keine Skalendrehung) kann  $s > s_{max}$  sein. Also ist  $s = s_{max}$  für *jedes* System, wenn nur in einem  $s_{max}$  erreicht wird. Mit Gl. (4.4) folgt, daß die Werte  $w_i$  dann gleichverteilt sind. Damit bleibt noch  $s_c$  von Gleichverteilungen zu berechnen. Betrachtet wird wieder eine Skala von  $-180^\circ$  bis  $180^\circ$ . Nach 4.3.2.2 kann die Skala so gedreht werden, daß der Mittelwert für  $N$  Werte  $w_i$   $0^\circ$  ist. Ist nun  $N$  ungerade, so wird ein Wert mit dem Mittelwert zusammenfallen (Abb. C.2), zu beiden Seiten folgen in Abständen von  $360^\circ/N$  die restlichen Werte.

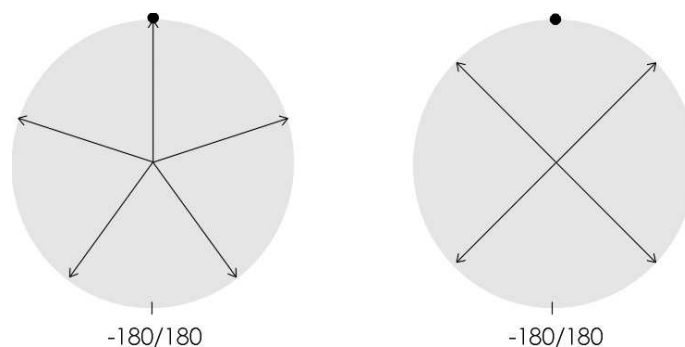


Abbildung C.2. Die optimale Lage gleichverteilter Werte im Intervall  $[-180, 180)$ . Links ungerade, rechts gerade Anzahl von Werten.

Damit läßt sich  $s_c$  schreiben als

$$s_{c\text{ungerade}} = \sqrt{\frac{2}{N} \sum_{k=1}^{(N-1)/2} \left(\frac{360^\circ}{N}\right)^2 k^2}. \quad (\text{C.3})$$

Mit Hilfe der Formel<sup>1</sup>  $\sum_{k=1}^n k^2 = \frac{1}{6}n(n+1)(2n+1)$  für natürliche Zahlen  $n$  erhält man aus Gl. C.3 nach kurzer Rechnung

$$s_c = 60\sqrt{3}^\circ \cdot \sqrt{\frac{N^2 - 1}{N^2}}. \quad (\text{C.4})$$

Für eine gerade Zahl  $N$  liegt der Mittelwert  $0^\circ$  genau zwischen zwei Werten (Abb. C.2).  $s_c$  läßt sich dann schreiben:

$$s_{c\text{gerade}} = \sqrt{\frac{2}{N} \sum_{k=1}^{N/2} \left[\left(\frac{360^\circ}{2N}\right)(2k-1)\right]^2}. \quad (\text{C.5})$$

Auch dies ergibt nach kurzer Umformung wieder genau Gleichung (C.4). Damit ist  $s_c$  immer kleiner oder gleich  $60\sqrt{3}^\circ$ . Dies ist der Grenzwert von Gl. (C.4) für große  $N$ .

---

<sup>1</sup> s. z.B. [Bro91]

## Gaußverteilung auf dem Einheitskreis

Das folgende Programm erzeugt einen Satz von 100 000 annähernd gaußverteilten Zufallswerten, hier mit dem Mittelwert 30 und einer Varianz von ca. 25. Die Werte sind in einem Intervall vom 8fachen der gewählten Varianz verteilt, hier also im Intervall  $30 \pm 100$ . Für Teilintervalle der Länge 2 wird anschließend die Anzahl der darin enthaltenen Werte in eine Tabelle geschrieben. Mit dieser läßt sich dann ein Histogramm erzeugen, ähnlich dem in Abb. 4.9 a). Je weniger die vom Zufallsgenerator gelieferten Werte von einer Gleichverteilung abweichen, desto besser reproduziert der Datensatz die gewünschten Parameter der aufgeprägten Verteilung. Skizze des Algorithmus:

- 1) Zufallszahl im gewünschten Intervall erzeugen.
- 2) Wie groß bei der zugrundegelegten normierten Verteilung die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten des erzeugten Werts?
- 3) Zufallszahl im Intervall  $[0, 1]$  erzeugen. Ist sie größer als die unter 2) festgestellte Wahrscheinlichkeit, so wird der in 1) erzeugte Wert verworfen. Sonst wird er akzeptiert.
- 4) Wiederholung von 1) bis 3), solange bis gewünschte Zahl von akzeptierten Werten vorliegt.

```
#include<ctype.h>
#include<stdio.h>
#include<string.h>
#include<stdlib.h>
#include<math.h>
#define PI 3.1415926
#define MAXWERTEZAHL 150000

int X;
struct winkel{
    double echtwert;
    double wert;
    double differenz;
    double mittelwert;
    double s2;
}W[MAXWERTEZAHL];

void
gausszuf(int n, double m, double s)
{
    int z, k;
    double b, p, q, r;
    k=1;
    while (k<=n){
        z=rand(); b=(double)z/RAND_MAX*8*s-4*s+m;
        r=(double)(-0.5)*((b-m)*(b-m)/s/s); p=exp(r)/(s*sqrt(2*PI));
        z=rand(); q=(double)z/RAND_MAX;
        if (q<=p){
            W[k].echtwert=b;
            W[k].wert=b;
            k++;
        }
    }
    W[0].wert=0;
}
```

```

main(int argc, char* argv[])
{
int i, j, k;
double x, y, a, b, s;
FILE *R;

X=atof(argv[1]);
srand(X);
b=0; s=25;
gausszuf(100000, 30, s);
R=fopen("erztest", "a");
if (R==NULL){
printf("Fehler b Oeffn\n");
return;
}
x=(30-4*s); y=(x+2); a=(x+y)/2;
for (a=((30-4*s)+1); a<=(30+4*s); a+=2){
for (i=1; i<=100000; i++){
if ( (x<=W[i].wert) && (y>W[i].wert) ) b+=1;
}
fprintf(R,"%f\t%f\n", a, b);
b=0; x+=2; y+=2;
}
fclose(R);
return;
}

```

Legt man so erzeugte Verteilungen entsprechend Abbildung 4.9 b) auf den Einheitskreis und berechnet die zugehörigen zyklischen Standardabweichungen  $s_c$ , läßt sich  $s_c$  als Funktion der Varianz  $s_{soll}$  der ursprünglichen (Gauß-)Verteilung darstellen. Für die Daten aus Tabelle 4.1 sieht das so aus:

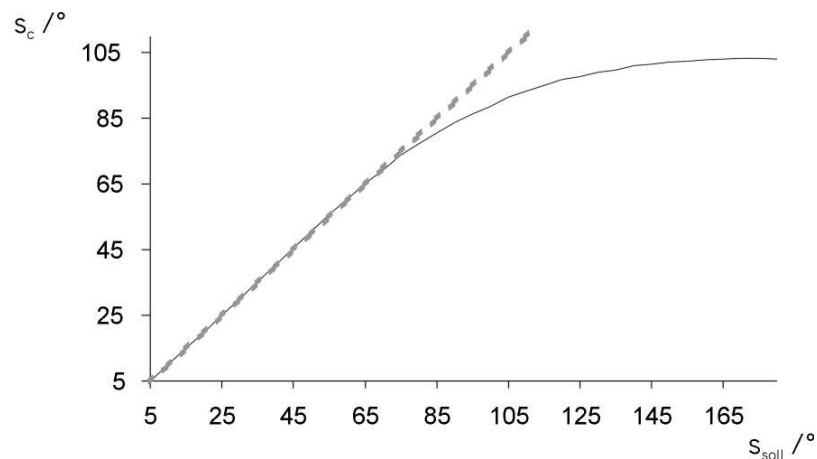


Abbildung C.3.:  $s_c$  als Funktion von  $s_{soll}$  bei Zugrundelegen von Gaußverteilungen (Daten aus Tabelle 4.1).

## Dank

Mein erster herzlicher Dank gilt Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer, der die Arbeit ermöglicht und als Betreuer mit Ideen, gutem Rat und seinem Vertrauen in das Gelingen begleitet hat. Trotz zahlreicher Verpflichtungen hat er immer Zeit zur Diskussion gefunden und auch für Fragen und Probleme ein offenes Ohr gehabt.

Dr. Werner Kremer hat mich mit NMR-Spektrometern und Labortechniken vertraut gemacht. Die ersten Messungen hat er selbst durchgeführt und mich dann weiterhin nach Kräften unterstützt.

Dr. Till Maurer und Dr. Wolfram Gronwald waren ebenfalls engagierte Helfer, insbesondere im Hinblick auf die NMR-Spektroskopie und als Administratoren der Unix-Rechner. Für seine freundliche Bereitschaft zu Diskussionen und für die Beantwortung vieler Fragen danke ich Prof. Dr. Eike Brunner.

Sehr zu Dank verpflichtet bin ich auch Prof. Dr. A. Wittinghofer, Dr. Jürgen Kuhlmann, Xiaodong Zhao und Dr. Carolina Ines Villa Braslavsky sowie Dr. Christian Herrmann vom Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund. Sie haben mir sämtliche Proteinproben, deren Herstellung viel Mühe und Zeit gekostet hat, zur Verfügung gestellt.

Herrn Prof. Dr. G. Hauska danke ich für seine Bereitschaft zur Begutachtung der Arbeit und Prof. Dr. K. Akasaka für interessante Diskussionen während seines Aufenthalts in Regensburg. Robert Gail hat mir die Herstellung und Verwendung von SDS-Gelen gezeigt. Dr. Gudrun Horn, Emmi Fuchs und ihm habe ich zu danken, daß auch im Biochemie-Labor guter Rat nicht teuer war.

Dr. Guido Steiners Programme und Perl-Skripte habe ich je öfter desto lieber genutzt. Dr. Harry Kany verdanke ich viele gute Tips und Hilfe beim Umschiffen der in der Textverarbeitung verborgenen Klippen. Michael Spörner wußte, es kam eine Menge Fragen auf ihn zu, wenn es hieß: „Hey, du bist doch Biologe...“; und er hat (fast) alle beantwortet. Peter Geyer danke ich für die Auswertung der ersten Spektren zur Bindung kleiner Peptide an die Ranbindedomäne. Bernhard Ganslmeier verbessert „sein Programm“ Auremol immer weiter und hat dazu auch bereitwillig als „lebende Hilfsfunktion“ hergehalten. Ihm und Andi Möglich sowie Stefan Harrieder, meinen Zimmernachbarn, bin ich für ihre Kollegialität, Hilfsbereitschaft und Freundschaft besonders verbunden. An Renate Kirchhöfer, Michael Wenzler und Dr. Fritz Huber hatte ich weitere Diskussionspartner, Ratgeber und Freunde.

Sehr herzlich möchte ich auch Uta Schubel, Jones Wolf und Dr. Jörg Bomke sowie Anja Esser und Thomas Regnath für ihre Freundschaft danken.

Für die angenehme Atmosphäre sei auch den hier nicht namentlich genannten, derzeitigen wie ehemaligen, Mitgliedern der Lehrstuhlgemeinschaft Dank gesagt.

Meinen Eltern danke ich für die mir geschenkte Zuneigung, die Möglichkeiten, die sie mir eröffnet haben und ihre dauernde Unterstützung in jeder Hinsicht. Sie und meine Geschwister gaben und geben mir einen zuverlässigen, festen Rückhalt.

Danke!