

**Die NMR-Lösungsstruktur  
des Calmodulin/C20W-Komplexes**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Chemie (FB 14)  
der Johann Wolfgang Goethe Universität  
in Frankfurt am Main

von  
Bettina Elshorst  
aus München

Frankfurt am Main 2000

Vom Fachbereich Chemie (FB 14) der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität als  
Dissertation angenommen.

|               |                         |
|---------------|-------------------------|
| Dekan:        | Prof. Dr. J. Engels     |
| 1. Gutachter: | Prof. Dr. C. Griesinger |
| 2. Gutachter: | Priv.-Doz. Dr. J. Krebs |

Datum der Disputation: 20.12.2000

*Für David, Hannah und Katharina*

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von September 1995 bis Oktober 2000 unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. C. Griesinger am Institut für Organische Chemie der Johann Wolfgang Goethe Universität in Frankfurt am Main angefertigt.

Herrn Prof. Dr. C. Griesinger danke ich für die Überlassung des interessanten Themas und für die Bereitstellung der hervorragenden Arbeitsmöglichkeiten. Besonders herzlich bedanken möchte ich mich für die hervorragende Möglichkeit, Familie und Universität zu vereinbaren.

Herrn Priv.-Doz. Dr. J. Krebs und Herrn Prof. Dr. E. Carafoli (ETH Zürich) danke ich für die gute Zusammenarbeit und die Überlassung der Calmodulin/C20W-Proben.

Für die gute Zusammenarbeit an dem Calmodulin/C20W-Projekt, die Aufnahme der NMR-Spektren und die zahlreichen Diskussionen danke ich Herrn Prof. Dr. H. Schwalbe, Herrn Dr. H. Försterling, Herrn Dr. M. Hennig, Herrn Dr. M. Maurer und Herrn A. Diener.

Herrn Priv.-Doz. Dr. H. Sticht (Universität Bayreuth) danke ich für die freundschaftliche Unterstützung und Ratschläge bei den Moleküldynamikrechnungen.

Ich bedanke mich bei Herrn J. Junker, Herrn Dr. C. Richter, Herrn P. Gröschke, Herrn D. Bockelmann, Herrn R. Marx, Herrn J. Meiler und Herrn W. Peti für häufige Unterstützungen bei Computerproblemen.

Frau S. Lambert und Herrn W. Peti danke ich für die Korrekturen der Arbeit und die konstruktiven Verbesserungsvorschläge.

Dem gesamten Arbeitskreis danke ich für das gute Arbeitsklima und die freundschaftliche Atmosphäre.

Für finanzielle Unterstützung durch ein Wiedereinstiegsstipendium danke ich der Universität Frankfurt am Main.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei der Tagesmutter Frau S. Sahlmann, die auf liebevolle Weise meine beiden Kinder Hannah und Katharina betreut hat.

Für liebevolle Unterstützung und Geduld danke ich meinem Mann David.

## Abkürzungen und verwendete englische Begriffe

Die verwendeten Ein- und Dreibuchstabenabkürzungen für Aminosäuren entsprechen den Vorschlägen der IUPAC-IUB-Kommission für biochemische Nomenklatur (*Eur. J. Biochem.* **138**, 9 (1984); *J. Biol. Chem.* **247**, 977 (1972); *Biochemistry* **9**, 3471 (1970)).

|                     |     |   |
|---------------------|-----|---|
| A                   | Ala | L-Alanin  |
| C                   | Cys | L-Cystein   |
| D                   | Asp | L-Asparaginsäure  |
| E                   | Glu | L-Glutaminsäure   |
| F                   | Phe | L-Phenylalanin  |
| G                   | Gly | L-Glycin  |
| H                   | His | L-Histidin  |
| I                   | Ile | L-Isoleucin   |
| K                   | Lys | L-Lysin   |
| L                   | Leu | L-Leucin  |
| M                   | Met | L-Methionin   |
| N                   | Asn | L-Asparagin   |
| P                   | Pro | L-Prolin  |
| Q                   | Gln | L-Glutaminsäure   |
| R                   | Arg | L-Arginin   |
| S                   | Ser | L-Serin   |
| T                   | Thr | L-Threonin  |
| V                   | Val | L-Valin   |
| W                   | Trp | L-Tryptophan  |
| Y                   | Tyr | L-Tyrosin   |
| Å                   |     | Ångstrom  |
| ATP                 |     | <u>A</u> denosintriphosphat   |
| C'                  |     | Carbonylkohlenstoff   |
| C20W                |     | N-terminaler Teil der Calmodulinbindungsdomäne der Plasmamembran Ca <sup>2+</sup> -ATPase |
| C <sub>α,β,..</sub> |     | Kohlenstoffatome der Aminosäure   |
| CaM                 |     | Calmodulin  |
| CaMKI               |     | Calmodulinkinase I  |
| CaMKII <sub>α</sub> |     | Calmodulinkinase II <sub>α</sub>  |
| C <sup>arom</sup>   |     | Kohlenstoffatome in aromatischen Systemen   |
| C <sup>ali</sup>    |     | Kohlenstoffatome in aliphatischen Systemen  |

|                      |   |
|----------------------|---|
| <i>Constant time</i> | Klasse von Experimenten, bei denen die Modulation der Transferamplitude durch Evolution homonuklearer Kopplungen in einen Amplitudenfaktor überführt wird, da sie im Laufe des Experiments immer gleich weit evolviert wird |
| COSY                 | <i>Correlation Spectroscopy</i>   |
| <i>Delay</i>         | engl. für Wartezeit in einem NMR-Experiment   |
| DSS                  | 2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonat, Natriumsalz   |
| E.COSY               | <i>Exclusiv Correlation Spectroscopy</i>  |
| FID                  | <i>Free Induction Decay</i> , freier Induktionsabfall   |
| $G_z$                | Gepulster $B_0$ -Gradient   |
| $H^N$                | Amidproton  |
| HMBC                 | <i>Heteronuclear Multiple-Bond Correlation</i>  |
| HMQC                 | <i>Heteronuclear Multiple Quantum Coherence</i>   |
| HSQC                 | <i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>   |
| $^N J(a,b)$          | skalare Kopplungskonstante über N-Bindungen zwischen den Kernen a und b   |
| M13                  | Calmodulinbindungsdomäne von skMLCK   |
| MD                   | <i>Moleküldynamik</i>   |
| skMLCK               | <i>skeletal Myosin Light Chain Kinase</i>   |
| smMLCK               | <i>smooth muscle Myosin Light Chain Kinase</i>  |
| mM                   | millimolar  |
| N                    | Amidstickstoff  |
| NMR                  | <i>Nuclear Magnetic Resonance</i> ; Kernresonanzspektroskopie   |
| NOE                  | <i>Nuclear Overhauser Enhancement</i>   |
| NOESY                | <i>Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy</i>  |
| <i>Out-and-back</i>  | (engl.) Magnetisierungstransfer einer Multipulssequenz, in der Magnetisierung eines bestimmten Spins angeregt und am Ende wieder detektiert wird  |
| <i>peak</i>          | NMR-Signal im Spektrum, charakterisiert durch die chemischen Verschiebungen   |
| pH*                  | unkorrigierter pH-Wert in $D_2O$ -Lösungen  |
| ppm                  | <i>parts per million</i>  |
| R20                  | Calmodulinbindungsdomäne von smMLCK   |
| <i>refinement</i>    | Verfeinerung der Molekülstruktur  |
| <i>restraint</i>     | Nebenbedingung aufgrund experimentell bestimmter Daten  |
| rmsd                 | <i>root-mean-square deviation</i>   |

|  |   |
|--|---|
| ROESY  | <i><u>R</u>otating <u>F</u>rame <u>N</u>uclear <u>O</u>verhauser <u>E</u>nhancement <u>S</u>pectroscopy</i>   |
| SAXS   | <i><u>S</u>mall <u>A</u>ngle <u>X</u>-ray <u>S</u>cattering, Röntgenkleinwinkelstreuung</i>   |
| <i>simulated annealing</i>                       | Simuliertes Abkühlen  |
| States-TPPI                                      | Verfahren zur Vorzeichenselektion in phasen-empfindlichen NMR-Experimenten  |
| T <sub>1</sub>                                   | longitudinale Relaxationszeit   |
| T <sub>2</sub>                                   | transversale Relaxationszeit  |
| t <sub>1</sub> , t <sub>2</sub> , t <sub>3</sub> | Evolutionszeiten  |
| TACSY  | <i><u>T</u>ailored <u>C</u>orrelation <u>S</u>pectroscopy</i>   |
| TOCSY  | <i><u>T</u>otal <u>C</u>orrelation <u>S</u>pectroscopy</i>  |
| TPPI   | <i><u>T</u>ime <u>P</u>roportional <u>P</u>hase <u>I</u>ncrementation</i> ; Verfahren zur Vorzeichenselektion in phasenempfindlichen NMR-Experimenten |
| TR2C   | C-terminales Fragment von Calmodulin (Reste 78-148)   |

Griechische Buchstaben:

|                         |   |
|-------------------------|---|
| $\Delta$                | Wartezeit ( <i>delay</i> ) zur Entwicklung von Kopplung   |
| $\phi_i, \psi_i$        | Winkel des Proteinrückgrats der Aminosäure i              |
| $\phi_1, \phi_2, \dots$ | Phase eines Pulses im NMR-Experiment                      |
| $\phi_{\text{rec}}$     | Phase des Empfänger ( <i>receiver</i> ) im NMR-Experiment |
| $\chi_{n,i}$            | Seitenkettenwinkel der Aminosäure i                       |
| $\tau$                  | Wartezeiten in Pulssequenzen                              |
| $\tau_c$                | Korrelationszeit in Molekülen                             |
| $\omega_i$              | Resonanzfrequenz des Kernes i                             |

## Inhaltsverzeichnis

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| <b>1</b> | <b>Einleitung .....</b>  | <b>1</b>  |
| 1.1      | NMR-Spektroskopie zur Strukturbestimmung von Proteinen .....   | 1         |
| 1.2      | Calmodulin und Calcium.....  | 2         |
| 1.3      | Das Calciumsignal und die Ca <sup>2+</sup> -ATPase als Beispiel eines calmodulin-<br>bindendes Enzyms .....  | 4         |
| 1.4      | Die Struktur von Calmodulin .....  | 5         |
| 1.5      | Die Calmodulin-Peptid-Komplexe.....  | 7         |
| 1.6      | Die Calmodulin-Bindungsregion.....   | 8         |
| 1.7      | Die Plasmamembran Ca <sup>2+</sup> -ATPase und C20W .....  | 10        |
| 1.8      | Zielsetzung der Arbeit .....   | 14        |
| 1.9      | Literatur .....  | 15        |
| <br>     |  |           |
| <b>2</b> | <b>NMR-Spektroskopische Untersuchung des Calmodulin/C20W-<br/>Komplexes .....</b>  | <b>17</b> |
| 2.1      | NMR-Zuordnungsstrategien für Proteine.....   | 17        |
| 2.1.1.   | Zuordnung von kleineren, unmarkierten oder einfachmarkierten<br>Proteinen .....  | 17        |
| 2.1.2.   | Zuordnungsstrategien für doppeltmarkierte Proteine .....   | 18        |
| 2.2.     | NMR-Experimente zur Zuordnung des Calmodulins.....   | 21        |
| 2.2.1.   | <sup>1</sup> H, <sup>15</sup> N-HSQC des CaM/C20W-Komplexes .....  | 21        |
| 2.2.2.   | Zuordnung des Proteinrückgrats von Calmodulin .....  | 24        |
| 2.2.3.   | Zuordnung der aliphatischen Seitenketten von Calmodulin.....   | 27        |
| 2.2.4.   | Zuordnung der aromatischen Seitenketten von Calmodulin.....  | 32        |
| 2.2.5.   | Zuordnung der Methionine im Calmodulin .....   | 34        |
| 2.2.6.   | Auswertung der NOESY-Spektren und Gewinnung von<br>Abstandsinformationen .....   | 36        |
| 2.2.7.   | Temperaturkoeffizient der Amidprotonen .....   | 39        |
| 2.2.8.   | Bestimmung von <sup>3</sup> J <sub>H<sub>NH</sub>α</sub> - Kopplungskonstanten und Gewinnung der<br>Diederwinkel- <i>restraints</i> für Φ und Ψ .....                              | 41        |
| 2.2.9.   | Bestimmung der <sup>3</sup> J <sub>NCγ</sub> - Kopplungskonstanten von aromatischen<br>Aminosäureresten und Gewinnung der Diederwinkel- <i>restraints</i> für χ <sub>1</sub> ..... | 44        |
| 2.3      | NMR-Filterexperimente .....  | 47        |
| 2.4      | Zuordnung des unmarkierten Peptids C20W .....  | 51        |
| 2.5      | Auswertung der intermolekularen NOE's .....  | 58        |

|          |  |            |
|----------|--|------------|
| 2.6      | Strukturelle Informationen aus den NMR-Daten .....   | 59         |
| 2.6.1    | Sekundäre chemische Verschiebung.....  | 60         |
| 2.6.2    | Analyse der NOE-Kreuzresonanzen .....  | 65         |
| 2.7      | Literatur .....  | 68         |
| <b>3</b> | <b>Strukturrechnung des CaM/C20W-Komplexes.....</b>  | <b>71</b>  |
| 3.1      | Theorie der Moleküldynamik .....   | 71         |
| 3.1.1    | Moleküldynamik mit experimentellen Randbedingungen.....  | 72         |
| 3.1.2    | Algorithmen zur Simulation der Dynamik .....   | 75         |
| 3.1.3    | Simulated Annealing (SA).....  | 77         |
| 3.1.4    | Energieminimierung .....   | 78         |
| 3.2      | Moleküldynamik-Protokolle.....   | 79         |
| 3.2.1    | Generierung der Molekültopologie und der Startstruktur.....  | 80         |
| 3.2.2    | Simulated Annealing.....   | 81         |
| 3.3      | Der Datensatz .....  | 84         |
| 3.4      | Qualität der Strukturen .....  | 85         |
| 3.5      | Literatur .....  | 107        |
| <b>4</b> | <b>Die Struktur des CaM/C20W-Komplexes und Vergleich mit<br/>anderen CaM/Peptid-Komplexen.....</b> | <b>109</b> |
| 4.1      | Der Bindungsmodus des Peptids C20W.....  | 109        |
| 4.1.1    | Chemische Verschiebungsdifferenzen der Amidprotonen .....  | 110        |
| 4.1.2    | Chemische Verschiebungsdifferenzen der Methionine .....  | 111        |
| 4.1.3    | Intermolekulare NOE-Kontakte.....  | 113        |
| 4.2      | Die Sekundärstrukturelemente des CaM/C20W-Komplexes.....   | 113        |
| 4.3      | Vergleich mit anderen Calmodulin/Peptid-Komplexen .....  | 116        |
| 4.3.1    | Die Struktur des gebundenen Peptids .....  | 116        |
| 4.3.2    | Die unterschiedliche Seitenkettenkonformation .....  | 117        |
| 4.3.3    | Das Tryptophan.....  | 124        |
| 4.3.4    | Die Methionine .....   | 128        |
| 4.4      | Die Domänen und der flexible Linker.....   | 130        |
| 4.4.1    | Relaxationsmessungen.....  | 132        |
| 4.4.2    | Vergleich mit den SAXS-Daten.....  | 134        |
| 4.5      | Biologische Schlußfolgerungen aus den strukturellen Erkenntnissen.....                             | 137        |
| 4.6      | Literatur .....  | 140        |

|          |  |            |
|----------|--|------------|
| <b>5</b> | <b>Zusammenfassung.....</b>  | <b>141</b> |
| <b>6</b> | <b>Anhang .....</b>  | <b>143</b> |
| 6.1      | Probenpräparation.....   | 143        |
| 6.1.1    | Expression von $^{13}\text{C}$ , $^{15}\text{N}$ -markiertem Calmodulin .....            | 143        |
| 6.1.2    | Synthese des Peptids C20W.....   | 143        |
| 6.1.3    | Bildung des CaM/C20W-Komplexes .....   | 143        |
| 6.2      | NMR-Experimente .....  | 144        |
| 6.3      | Resonanzzuordnung des Calmodulin/C20W-Komplexes .....                                    | 146        |
| 6.3.1    | $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ , $^{15}\text{N}$ -Resonanzzuordnung des Calmodulins..... | 146        |
| 6.3.2    | $^1\text{H}$ -Resonanzzuordnung des Peptides C20W .....                                  | 153        |
| 6.4      | Resonanzzuordnung von CaM .....  | 154        |
| 6.5      | Resonanzzuordnung des CaM/M13-Komplexes.....   | 155        |
| 6.6      | X-PLOR Protokolle .....  | 156        |
| 6.6.1    | generate_cam.inp .....   | 156        |
| 6.6.2    | camsequence.dat .....  | 156        |
| 6.6.3    | generate_template_cam.inp.....   | 156        |
| 6.6.4    | param.ca .....   | 158        |
| 6.6.5    | topo.ca .....  | 158        |
| 6.6.6    | ca_psf.inp .....   | 158        |
| 6.6.7    | ca.psf .....   | 159        |
| 6.6.8    | ca.pdb .....   | 159        |
| 6.6.9    | make_dimer.inp .....   | 159        |
| 6.6.10   | generate_c20w.inp.....   | 160        |
| 6.6.11   | c20wsequence.dat.....  | 160        |
| 6.6.12   | sa_lal.inp.....  | 160        |
| 6.6.13   | read_aldata.xplor .....  | 163        |
| 6.6.14   | sa_l_randomchain.xplor .....   | 163        |
| 6.6.15   | sa_l_hightemp.xplor .....  | 165        |
| 6.6.16   | sa_l_reduced.xplor.....  | 166        |
| 6.6.17   | sa_l_initial_values.xplor.....   | 166        |
| 6.6.18   | setup_swapnew.xplor .....  | 167        |
| 6.6.19   | swap15v.xplor .....  | 167        |
| 6.6.20   | sa_l_cool1.xplor .....   | 169        |
| 6.6.21   | sa_l_cool2.xplor .....   | 170        |
| 6.6.22   | print_coorheader.xplor .....   | 171        |

|       |                                   |     |
|-------|-----------------------------------|-----|
| 6.7   | Daten.....                        | 172 |
| 6.7.1 | Calcium.upl.....                  | 172 |
| 6.8   | Felix-Makros und C-Programme..... | 173 |
| 6.8.1 | mkstrip.mac.....                  | 173 |
| 6.8.2 | xpk_hgt_vol3d.mac.....            | 174 |
| 6.8.3 | baxie.c.....                      | 177 |
| 6.9   | Publikation.....                  | 178 |
| 6.10  | Literatur.....                    | 179 |

# 1 Einleitung

## 1.1 NMR-Spektroskopie zur Strukturbestimmung von Proteinen

Eines der wichtigsten Ziele der biochemischen Forschung ist es, den Zusammenhang zwischen Struktur und Funktion von Biopolymeren zu ermitteln. Mit dieser Kenntnis erlangt man beispielsweise Einblick in den Ablauf und die Regulation von Enzymreaktionen auf molekularer Ebene. Dies ist zum einen für die biochemische Grundlagenforschung wichtig, zum anderen kann dieses Wissen beispielsweise zur Entwicklung maßgeschneiderter Medikamente (*rational drug design*) eingesetzt werden. Um die dreidimensionale Struktur von Proteinen und Nukleinsäuren in atomarer Auflösung zu ermitteln, stehen zur Zeit verschiedene Methoden zur Verfügung, wobei die bedeutendsten Methoden die Röntgenstrukturanalyse und die Kernresonanz-Spektroskopie (engl. *nuclear magnetic resonance* - NMR) sind. Für die Röntgenstrukturanalyse benötigt man Einkristalle des zu untersuchenden Biopolymers. Abgesehen von den experimentellen Schwierigkeiten der Kristallisation von Biopolymeren ist die Röntgenstrukturanalyse eine leistungsfähige Methode, mit der die dreidimensionale Struktur von Proteinen und Nukleinsäuren von praktisch jeder beliebigen Größe bestimmt werden kann. Die NMR-Spektroskopie zur Strukturbestimmung bietet hingegen den Vorteil, daß die Untersuchung an einer Lösung des zu untersuchenden Stoffes vorgenommen werden kann, die allerdings möglichst hochkonzentriert sein sollte. Die so ermittelte Struktur ist nicht durch Kristallpackungskräfte beeinflusst und kommt daher der Struktur bei physiologischen Bedingungen wesentlich näher. Ein gutes Beispiel für die Wichtigkeit der NMR-spektroskopischen Untersuchung ist das Protein Calmodulin, daß in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde. Die Röntgenstrukturanalyse ermittelte für Calmodulin eine starre Hantelstruktur mit zwei Domänen. Erst durch NMR-Experimente konnte bewiesen werden, daß Calmodulin in Lösung nicht als starre Hantel vorliegt, sondern daß die beiden Domänen durch einen flexiblen Linkerbereich verbunden sind und sich unabhängig voneinander bewegen.

Ein weiterer Vorteil der NMR-Spektroskopie ist durch die Möglichkeit gegeben, die Dynamik von Proteinstrukturen und Wechselwirkungen zwischen Protein und Ligand untersuchen zu können. Die Strukturbestimmung wird jedoch - genau wie bei der Röntgenstrukturanalyse - mit zunehmender Größe des Makromoleküls immer schwieriger. Durch die Steigerung der Leistungsfähigkeit der NMR-Spektrometer,

durch verfeinerte spektroskopische Methoden wie TROSY (1) und durch ausgefeilte Markierungstechniken wie die Verwendung von vollständig  $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ -isotopenmarkierten Proteinen gelingt es jedoch, die Grenze der Größe und Komplexität, bis zu der Moleküle spektroskopiert werden können, immer weiter nach oben zu verschieben, so daß Proteine bis zu 64 kDa (2) strukturell charakterisiert werden können.

Wichtige Entwicklungen in der NMR-Spektroskopie seit der Entdeckung der Kernmagnetischen Resonanz durch F. Bloch und E.M. Purcell (Nobelpreis für Physik 1952) im Jahre 1946 (3,4) sind die Einführung der Fourierspektroskopie durch R.R. Ernst und W.A. Anderson (5,6), die aufgrund gesteigerter Empfindlichkeit zu verkürzten Meßzeiten und einem geringeren Substanzbedarf führte, und die 1976 von R.R. Ernst (Nobelpreis für Chemie 1991) entwickelte zweidimensionale NMR-Spektroskopie (7,8), mit der eine Auflösung überlagerter Resonanzen erreicht wurde und so eine Untersuchung von komplexen System wie Peptiden oder Oligonukleotiden möglich wurden. Durch die Einführung der mehrdimensionale NMR-Spektroskopie (9,10,11,12) und die Verwendung von  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -Markierung von Biomakromolekülen (13,14) wurde die Aufnahme von heteronuklearen 3D- und 4D-NMR-Experimenten möglich, die einen weiteren Auflösungsgewinn von überlagerten Protonenresonanzen durch die Korrelation mit einem Heterokern erbrachten. Durch die Verbesserung der Relaxationseigenschaften aufgrund der Verringerung der Protonenspindichte durch Deuterierung (15,16) erreicht man einen weiteren Empfindlichkeitsgewinn, der für die Untersuchung immer größerer Biomakromoleküle entscheidend ist.

## 1.2 Calmodulin und Calcium

Extrazelluläre Signale, wie zum Beispiel die Bindung eines Hormons an seinen membranständigen Rezeptor oder ein ankommender Nervenimpuls, führen im Cytosol der Zelle häufig zu einem vorübergehenden Anstieg der Calciumionen-Konzentration. Die Calciumionen übertragen als *second messenger* das Signal auf eine ganze Reihe an Effektorenzymen, die verschiedene biochemische Prozesse der Zelle regulieren. Zu den Calcium-gesteuerten Prozessen gehören unter anderen die Kontraktion glatter Muskeln, der Glykogenabbau, die Synthese und Freisetzung von Neurotransmittern (Exocytose) (17,18). Die Signalwirkung der Calciumionen wird zum größten Teil durch das Calcium-bindende Protein Calmodulin (CaM) vermittelt, das Bestandteil aller eukaryontischen Zellen ist. Durch die Bindung von vier Calciumionen ändert sich die Konformation des CaMs und geht in die aktive Form über. In dieser aktiven Form bindet CaM an eine Reihe von Enzymen und moduliert dadurch deren enzymatische Aktivität (19). Durch diese Übertragungskette wird das ursprüngliche Signal amplifiziert. Einige Beispiele für calmodulin-abhängige Enzyme sind die Adenylatcyclase, die cyclische Nucleotid-Phosphodiesterase, die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase der

Plasmamembran, die Phosphorylase-Kinase, die Myosin-Light-Chain-Kinase (MLCK) und andere Proteinkinasen (Abbildung 1). Weitere für die Signaltransduktion wichtige Zielmoleküle sind Calcineurin, Spectrin und Histone. CaM spielt zudem eine Rolle in der DNA-Replikation (20) und bei der DNA-Reparatur (21).

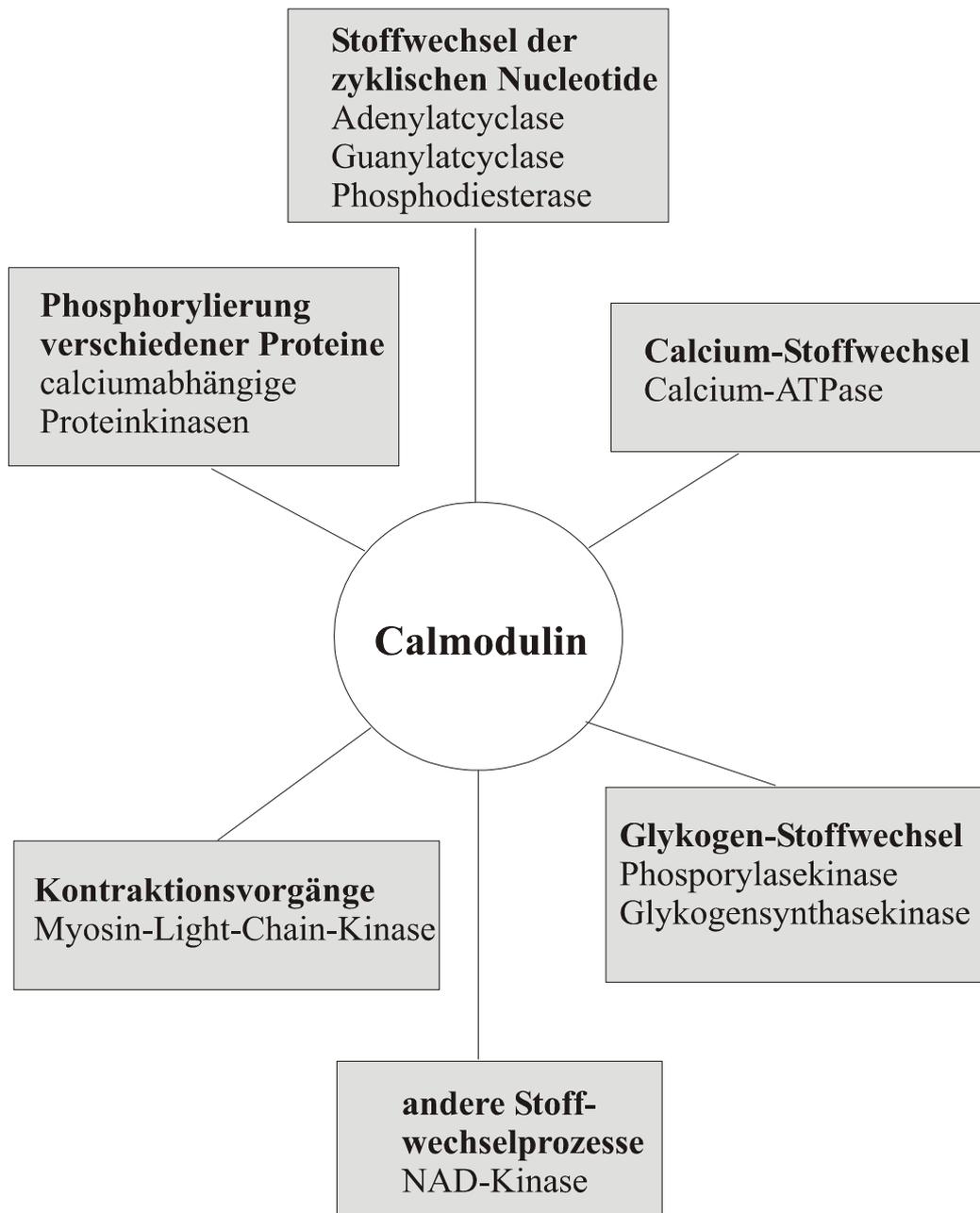


Abbildung 1: CaM übermittelt die Signalwirkung von Calciumionen auf viele Enzyme, die verschiedene biochemische Reaktionen steuern.

### 1.3 Das Calciumsignal und die $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase als Beispiel eines calmodulin-bindendes Enzyms

Bei einer ruhenden Zelle ist die Konzentration an Calciumionen im Cytosol in der Größenordnung von 50-100 nM und liegt damit um vier Größenordnungen niedriger als im extrazellulären Raum. Dieser steile Konzentrationsgradient ist eine wichtige Voraussetzung für die Signalübertragung durch Calciumionen. Bei einem ankommenden Signal, zum Beispiel das Andocken eines Hormons an seinen Rezeptor, öffnen sich  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle der Plasmamembran oder einer intrazellulären Membran von Calciumspeichern, so daß der cytosolische Calciumspiegel sprunghaft bis zu 1-10  $\mu\text{M}$  ansteigt (Abbildung 2). Über aktiviertes CaM erfolgt die Signalübertragung zu verschiedenen Effektorenzymen. Die Beendigung des Calciumsignals wird ebenfalls durch CaM vermittelt. CaM in seiner aktiven Form bindet an die membranständige  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (Calciumpumpe), wodurch diese aktiviert wird. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase pumpt daraufhin Calciumionen aktiv aus dem Cytosol in den extrazellulären Raum, wobei ATP zur Energiegewinnung hydrolysiert wird. Wenn der Calciumspiegel im Cytosol wieder ausreichend abgenommen hat, dissoziieren die gebundenen Calciumionen von CaM ab, wodurch die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase deaktiviert wird (22). Durch diesen Rückkopplungsmechanismus wird sichergestellt, daß das Calcium-Signal nach einer bestimmten Zeit beendet ist.

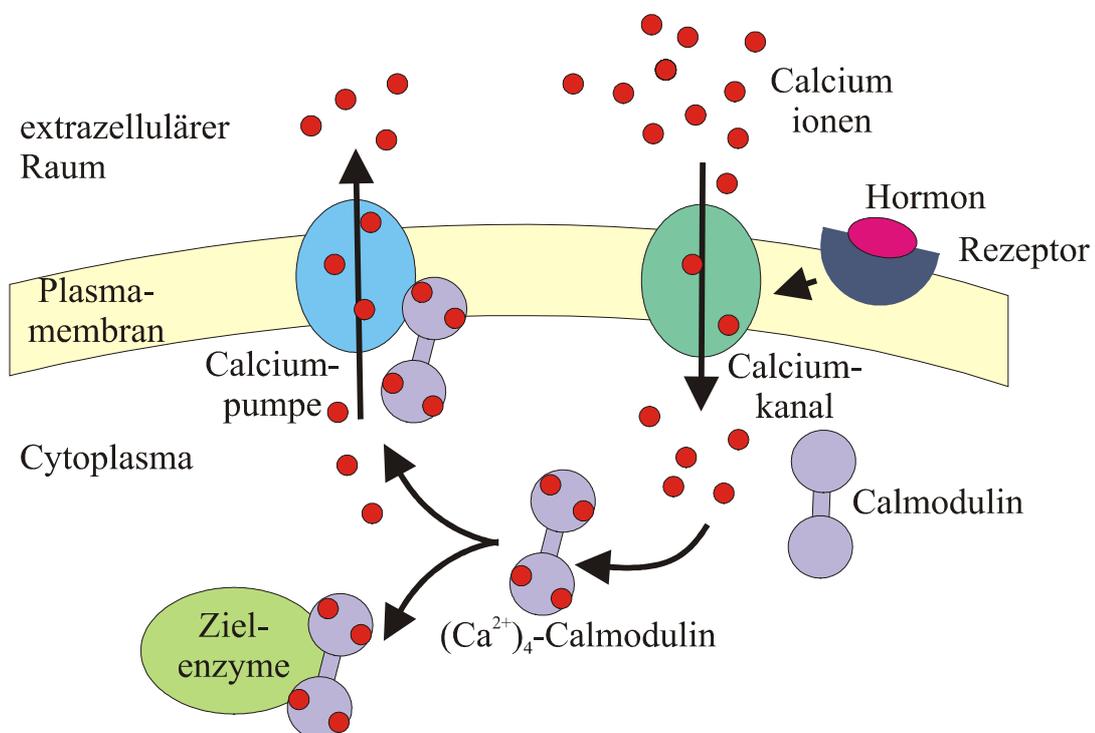
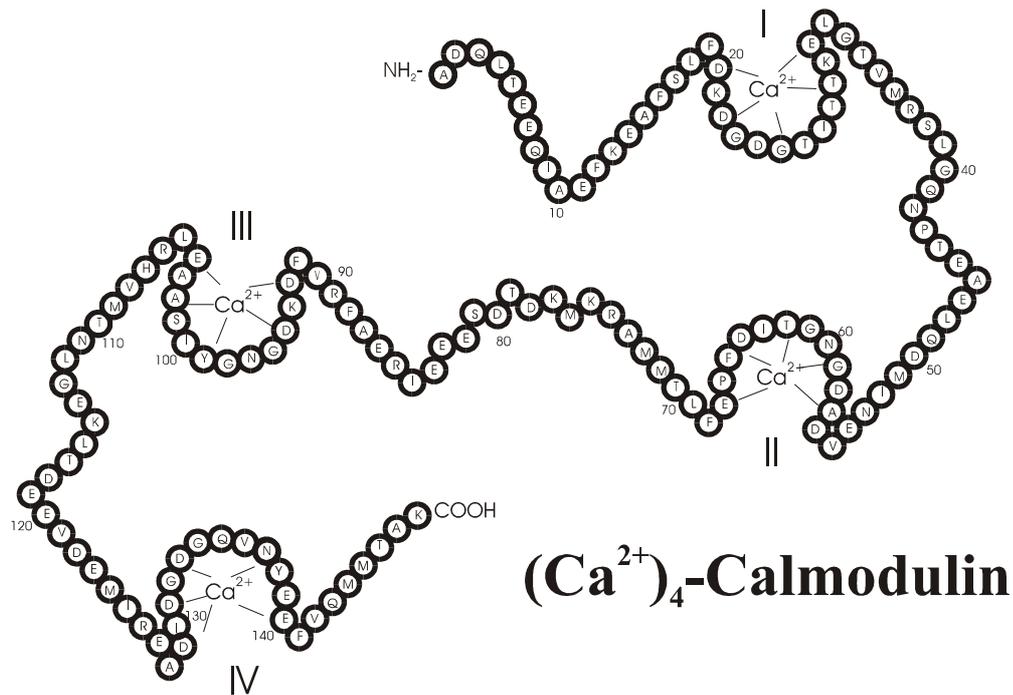


Abbildung 2: Das Calciumsignal und CaM. Durch die Aktivierung von CaM und die Bindung an die Calciumpumpe wird das Calciumsignal beendet.

## 1.4 Die Struktur von Calmodulin

CaM ist ein kleines, aus 148 Aminosäureresten aufgebautes, saures Protein mit einem Molekulargewicht von 16,7 kDa und einem  $pK_a$ -Wert von 4,3, das in allen eukaryontischen Zellen vorkommt. Die Aminosäuresequenz von CaM aus genetisch weit entfernten Organismen ist sehr stark konserviert (17).



### $(Ca^{2+})_4$ -Calmodulin

Abbildung 3: Die Aminosäuresequenz von CaM. Die vier Bindungsstellen für Calciumionen sind eingezeichnet.

Die Röntgenkristallstruktur von CaM in seiner aktiven Form wurde bereits 1985 von Babu et al. ermittelt (23). Danach hat CaM einen hantelförmigen Aufbau. Es besitzt zwei globuläre Domänen, die durch eine zentrale  $\alpha$ -Helix mit sieben Windungen verbunden sind (Abbildung 4).

Die globulären Domänen enthalten ihrerseits je zwei homologe, hochaffine  $Ca^{2+}$ -Bindungsdomänen. Diese werden jeweils durch zwei senkrecht aufeinander stehenden  $\alpha$ -Helices gebildet, die eine  $Ca^{2+}$ -Bindungsschleife (*loop*) aus 12 Aminosäuren miteinander verbindet. Dieses Strukturprinzip, das in allen calciumbindenden Proteinen wiederkehrt, wird als EF-Hand bezeichnet (24,25). Die Namensgebung bezieht sich auf die Helix E und F des calciumbindenden Moleküls Parvalbumin, bei dem die  $Ca^{2+}$ -Bindungsdomäne zum ersten Mal entdeckt wurde und deren Struktur durch eine rechte Hand symbolisiert werden kann (Abbildung 5). Das Calciumion wird in jeder der Bindungsstellen von Sauerstoffatomen des Proteinrückgrats und der Seitenketten (Asp, Glu) der Schleife und einem proteinassoziierten Wassermolekül pentagonal-bipyramidal koordiniert.

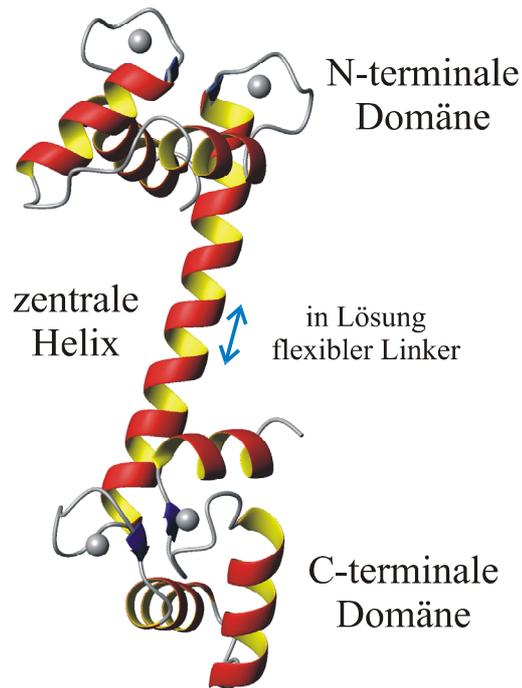


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Kristallstruktur von CaM. Die N- und die C-terminale Domäne werden durch eine zentrale  $\alpha$ -Helix mit sieben Windungen verbunden. Die vier gebundenen Calciumionen sind als graue Kugeln dargestellt.

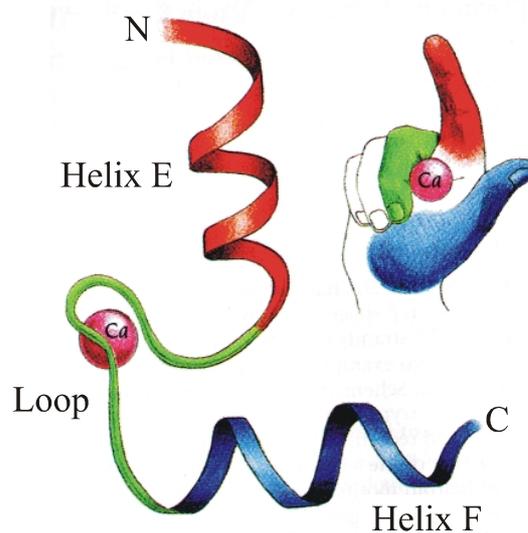


Abbildung 5: Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsdomäne, die als EF-Hand bezeichnet wird, lässt sich mit einer rechten Hand symbolisieren. Helix E (rot) läuft entlang des Zeigefingers, Helix F (blau) entlang des Daumens und der calciumbindende Loop (grün) entspricht dem abgebojene Mittelfinger. Die Abbildung stammt aus (26).

Durch Röntgenkleinwinkelstreuexperimente (*small-angle X-Ray scattering* - SAXS) an CaM (27,28) wurde allerdings gezeigt, daß das Molekül in Lösung kompakter sein muß

als in der Kristallstruktur.  $^{15}\text{N}$ -Relaxationsmessungen an isotopenmarkiertem CaM in Lösung (29) ergab eine erhöhte Flexibilität in der Mitte der zentralen Helix, von Lys77 bis Ser81. Auch Wasserstoff-Austauschraten und chemische Verschiebungen ergaben eine Unterbrechung der  $\alpha$ -Helix in diesem Bereich (30). In Lösung verhält sich CaM also nicht wie eine starre Hantel, sondern besteht aus zwei Domänen, die sich unabhängig voneinander bewegen können. Dafür sprechen auch die ermittelten Rotations-Korrelationszeiten, die mit 7.1 ns für die aminoterminal Domäne und 6.3 ns für die carboxyterminale Domäne (29) zu klein sind, um mit einem starren, hantelförmigen Protein von 16.7 kDa zu korrespondieren.

## 1.5 Die Calmodulin-Peptid-Komplexe

Beim Andocken an ein Zielenzym treten beide Domänen von CaM mit der jeweiligen Calmodulin-Bindungsstelle in Wechselwirkung, wobei die Calmodulin-Bindungsstelle in eine helicale Struktur übergeht und sich beide Calmodulindomänen um diese Helix herumwickeln (31).

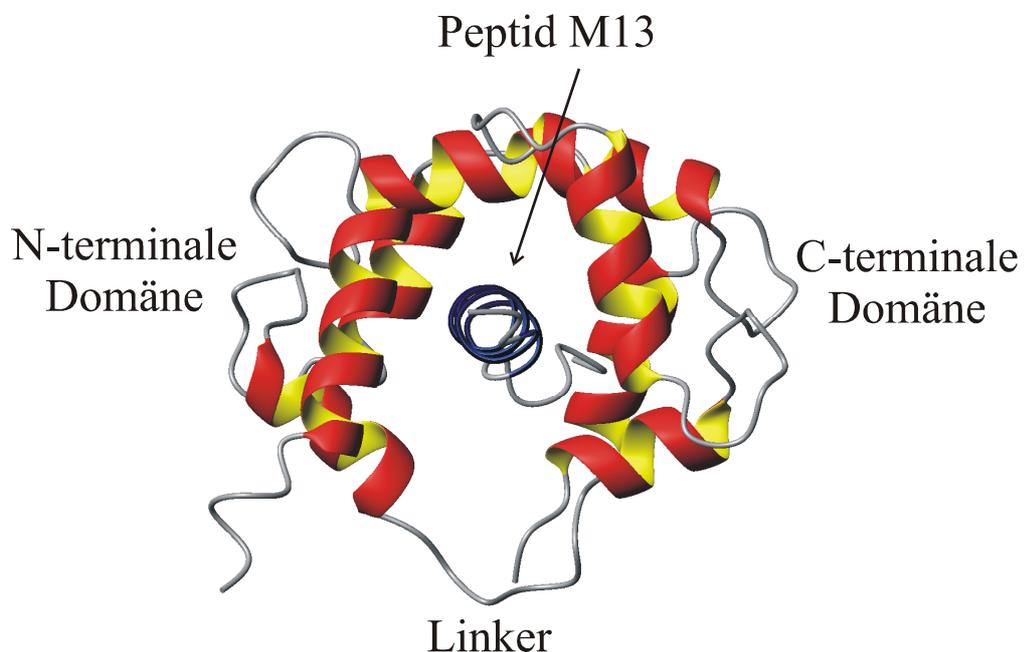


Abbildung 6: Die NMR-Lösungsstruktur des Komplexes aus CaM und M13, einem Peptid aus der Bindungsregion der skMLCK.

Dieser Bindungsmechanismus wurde postuliert, nachdem Ikura et al. 1992 die NMR-Struktur eines Komplexes aus CaM mit dem Peptid M13 (32) veröffentlichte. Das synthetische Peptid M13 umfaßt 26 Aminosäurereste und stellt die Calmodulin-Bindungsregion der skeletalen Myosinkinase skMLCK (*skeletal Myosin Light Chain Kinase*) dar. Bei der Komplexbildung knickt der flexible Mittelteil der zentralen Helix im CaM ab, wobei sich die beiden globulären Domänen aufeinander zubewegen und das Peptid komplexieren (Abbildung 6). Die dreidimensionale Struktur des Proteinerückgrats der Domänen wird dabei kaum verändert, die Komplexbildung erfolgt vorwiegend über hydrophobe Wechselwirkungen der Protein-Seitenketten mit dem Peptid. Das Peptid, das frei in Lösung unstrukturiert (*random coil*) vorliegt, ist im Komplex  $\alpha$ -helical. Die Röntgenstrukturen der Komplexe von CaM mit den Bindungs-Peptiden, die sich von der Myosinkinase des glatten Muskels smMLCK (*smooth muscle Myosin Light Chain Kinase*) (33) und der Calmodulinkinase CaMKII $\alpha$  (34) ableiten, ergaben analoge Strukturen (35), bei denen beide Calmodulindomänen zusammen mit dem helicalen Peptid eine globulären Komplex formen. In der kürzlich veröffentlichten NMR-Struktur eines Komplexes aus CaM mit dem Bindungs-Peptid der Calmodulin-abhängigen Kinase Kinase (CaMKK) tritt die Besonderheit auf, daß das helicale Peptid in der Mitte einen *hairpin-loop* aufweist (36).

## 1.6 Die Calmodulin-Bindungsregion

Die Bindung von  $(Ca^{2+})_4$ -CaM an eine große Vielzahl von Zielenzymen ist ein einzigartiger Fall von molekularer Erkennung, da die Calmodulin-Bindungssequenzen sehr unterschiedlich sind und CaM trotzdem mit so hoher Affinität an die Zielenzyme bindet, daß die Dissoziationskonstanten im nanomolaren Bereich liegen. Die Bindungssequenzen zeigen eine extrem große Variabilität in der Primärsequenz, haben aber die folgenden übereinstimmenden Eigenschaften: Sie sind zwischen 14 – 26 Aminosäuren lang, bestehen aus vorwiegend hydrophoben und basischen Aminosäuren und haben die Tendenz, amphiphile  $\alpha$ -Helices zu bilden (37). Sie werden daher salopp als „BAA“-Helices (*basic, amphiphilic, alpha-helical*) bezeichnet. In Abbildung 7 sind die verschiedenen Bindungs-Sequenzen aus einer Reihe von Zielenzymen gezeigt. Dabei zeigt es sich, daß es immer zwei hydrophobe Aminosäurereste gibt, die entweder 8 oder 12 Reste voneinander entfernt sind und die eine Schlüsselposition bei der Interaktion mit CaM spielen. Der erste dieser Reste ist sehr oft ein Tryptophan. In der NMR-Struktur des CaM/M13-Komplexes zeigte sich, daß dieses Tryptophan (W4) mit der C-terminalen Domäne eine Vielzahl an hydrophoben Wechselwirkungen eingeht. Die zweite hydrophobe „Anker“-Aminosäure, ein Phenylalanin (F17), wechselwirkt hingegen mit der N-terminalen Domäne (32). Neben diesen beiden Haupt-Ankerpositionen gibt bei M13 noch zwei weitere Positionen (F8 und V11), an denen auch das Auftreten von hydrophoben Aminosäuren konserviert ist und die ebenfalls eine

Reihe von hydrophoben Wechselwirkungen mit CaM eingehen – F8 nur mit der C-terminalen Domäne und V11 mit beiden Domänen.

Die Position der konservierten hydrophoben Aminosäuren wird zur Einteilung der Calmodulin-Bindungssequenzen herangezogen. Danach kann man das 1-5-8-14 Bindungsmotiv von skMLCK, Ca<sup>2+</sup>-Pumpe, Calspermin, Calcineurin, Mastaporan, Mellitin unterscheiden von dem 1-8-14 Bindungsmotiv von smMLCK, Mastporan X, Caldesmon, Titin und dem 1-5-10 Bindungsmotiv von CaMKII und CaMKI (38). Ein neues Bindungsmotiv wurde kürzlich für die Calmodulin-abhängige Kinase Kinase (CaMKK) gefunden, bei der in der Calmodulin-Bindungsdomäne die hydrophoben Ankerreste 14 Reste voneinander entfernt sind (36).

### 1-5-8-14 Motiv

|                              | 1   | 5 | 8 | 14 |
|------------------------------|---|---|---|----|
| skMLCK(M13)                  | K R R <b>W</b> K K N <b>F</b> I A <b>V</b> S A A N R <b>F</b> K K I S S S G A L |   |   |    |
| Ca <sup>2+</sup> -Pump(C20W) | L R R G Q I L <b>W</b> F R G <b>L</b> N R <b>I</b> Q T Q I K                    |   |   |    |
| Ca <sup>2+</sup> -Pump(C24W) | Q I L <b>W</b> F R G <b>L</b> N R <b>I</b> Q T Q I R <b>V</b> V N A F S S S     |   |   |    |
| Calspermin                   | A R R K <b>L</b> K A A <b>V</b> K A <b>V</b> V A S S R <b>L</b> G S             |   |   |    |
| Calcineurin                  | A R K E V <b>I</b> R W K <b>I</b> R A <b>I</b> G K M A R <b>V</b> S F V L       |   |   |    |
| Mastaporan                   | <b>I</b> N L K <b>A</b> L A <b>A</b> L A K K I <b>L</b>                         |   |   |    |
| Mellitin                     | G I G A V <b>L</b> K V L <b>T</b> T G <b>L</b> P A L I S <b>W</b> I K R K R Q Q |   |   |    |

### 1-8-14 Motiv

|              | 1  | 8 | 14 |
|--------------|--|---|----|
| smMLCK(R20)  | A R R K <b>W</b> Q K T G H A <b>V</b> R A I G R <b>L</b> S S |   |    |
| Mastaporan X | <b>I</b> N W K G I A <b>A</b> M A K K L <b>L</b>             |   |    |
| Caldesmon    | A E G <b>V</b> R N I K S M <b>W</b> E K G N V <b>F</b> S S P |   |    |
| Titin        | H T L <b>I</b> K K D L N M <b>V</b> V S A A R <b>I</b> S C G |   |    |

### 1-5-10 Motiv

|        | 1  | 5 | 10 |
|--------|--|---|----|
| CaMKII | L K K F N A R R K <b>L</b> K G A <b>I</b> L T T M <b>L</b> A T R N F S |   |    |
| CaMKI  | A K S K <b>W</b> K Q A <b>F</b> N A T A <b>V</b> V R H M               |   |    |

Abbildung 7: Sequenzalignment von Calmodulin-Bindungssequenzen aus verschiedenen Zielenzymen. Die konservierten, hydrophoben „Anker“-Aminosäuren sind entweder 12 oder 8 Reste voneinander entfernt, wobei der rot eingezeichnet Rest mit der C-terminalen Domäne und der blau eingezeichnete Rest mit der N-terminalen Domäne von CaM wechselwirkt. Neben den beiden Hauptankern gibt es noch weitere Positionen mit hydrophoben Aminosäuren (grün), die ebenfalls viele Wechselwirkungen mit CaM eingehen (32,38)

CaM besitzt zwei wichtige Eigenschaften, die ermöglichen, daß es an so viele verschiedene Sequenzen binden kann. Zum einen können sich die Domänen durch die Flexibilität des Linkers zwischen den beiden Domänen an den jeweiligen Abstand der Anker-Aminosäuren anpassen. Dies zeigt sich in dem CaM-Komplex mit dem Peptid aus der CaM-Kinase II, bei dem die hydrophoben Anker-Aminosäuren nur 8 Reste voneinander entfernt sind. In diesem Komplex sind die CaM-Domänen dank des flexiblen Linkers in einer etwas unterschiedlichen Orientierung (34) verglichen zu dem CaM/M13 (32) oder CaM/R20-Komplex (33), bei dem die Ankerabstände 12 Reste betragen (Abbildung 8).

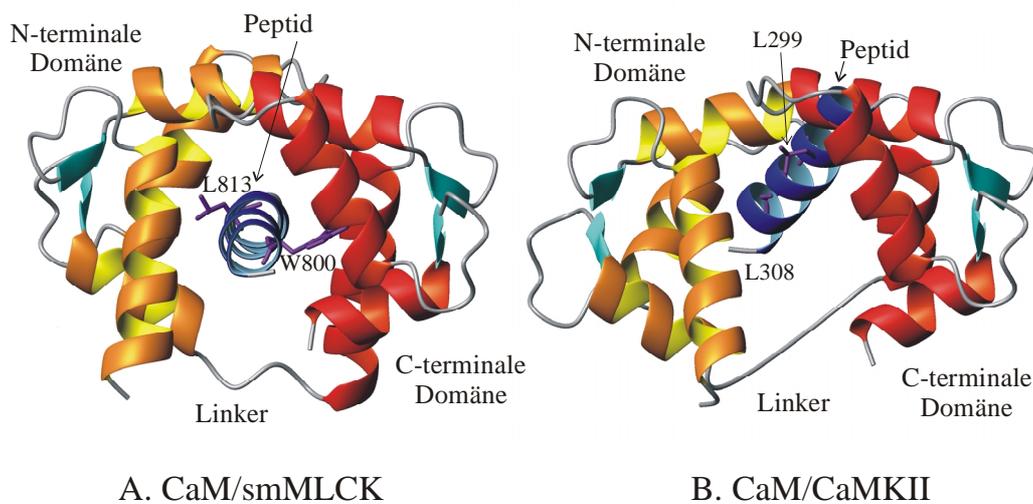


Abbildung 8: Kristallstruktur des CaM/smMLCK-Komplexes (33) und des CaM/CaMKII-Komplexes (34). Die Orientierung der C-terminalen Domäne von CaM (rot) ist in beiden Strukturen identisch, wobei ein Rmsd-Wert von  $0.75\text{\AA}$  über das Proteinrückgrat auftrat. Die Orientierung der N-terminalen Domäne (gelb) und des gebundenen Peptids (blau) sind unterschiedlich, da der Abstand der Hauptankeraminosäuren (magenta) im ersten Fall 12 Aminosäuren und im zweiten Fall nur 8 Aminosäuren beträgt. Bei der CaM/CaMKII-Strukturen fehlen die Aminosäuren 74-83 aus dem flexiblen Linkerbereich, so daß in der Abbildung die Reste 73 und 84 direkt verbunden wurden.

Zum anderen werden die unterschiedlichen Sequenzen gebunden, indem sich die Proteinseitenketten von langen und hydrophoben Aminosäuren von CaM an die Topologie der Zielstruktur anpassen, wobei das Proteinrückgrat von CaM kaum seine Struktur ändert. Dabei ist der besonders hohe Gehalt an Methioninen in CaM wichtig. 46% der zugänglichen Oberfläche in den hydrophoben Bereichen von CaM werden von Methioninen beigetragen. Dieser Prozentsatz ist außergewöhnlich hoch, da normalerweise die Methionine nur zu 0,2% an der zugänglichen Oberfläche einer typischen Proteinoberfläche vertreten sind (37). Die unverzweigten Methionin-Seitenketten sind besonders flexibel und die C-S-Bindung ermöglicht freie Rotation um den  $\chi_3$ -Torsionswinkel. Außerdem kann Schwefel mit einer höheren Polarisierbarkeit als Kohlenstoff stärkere Van-der-Waals-Wechselwirkungen eingehen (39). Die optimale Wechselwirkung mit der Bindungssequenz wird also durch die Feinjustierung der Seitenkettenkonformation von acht der insgesamt neun Methionine ermöglicht.

## 1.7 Die Plasmamembran $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase und C20W

Die Plasmamembran  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase ist ein membranständiges Enzym mit einem Molekulargewicht von ca. 140 kDa. Es tritt in verschiedenen Isoformen auf, die durch alternatives Splicing der mRNA von mindestens vier Genen gebildet werden (40).

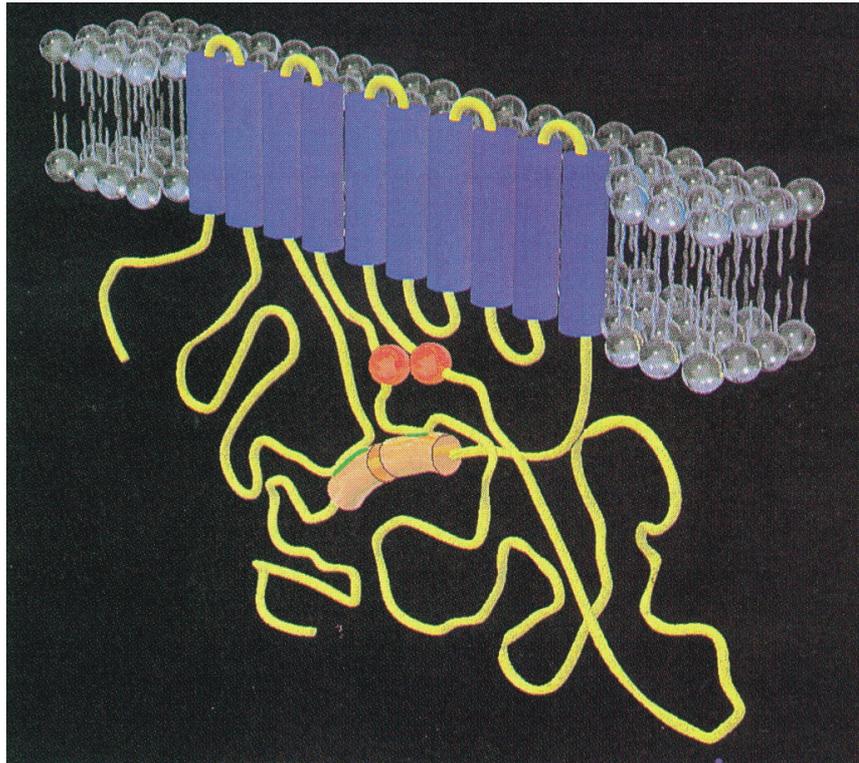


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Plasmamembran  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. Zehn transmembrane Domänen (blau) verankern das Enzym in der Membran. Die Calmodulin-Bindungsdomäne (oranger Zylinder) bindet an zwei Rezeptorstellen nahe des aktiven Zentrums (rote Kugeln) der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase.

Die Calmodulin-Bindungsdomäne dieses Enzyms hat eine Länge von ungefähr 30 Aminosäuren, beispielsweise AA<sub>1100-1127</sub> in hPMCA1b (41), befindet sich nahe am C-terminalen Ende der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase und zeigt die erwartete Tendenz, eine amphiphile  $\alpha$ -Helix aus basischen und hydrophoben Aminosäuren zu bilden. In seiner Funktion einer autoinhibierenden Domäne bindet die Calmodulin-Bindungsdomäne an zwei Rezeptorstellen nahe an dem aktiven Zentrum der  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpe (Abbildung 9). Die N-terminale Region der Calmodulin-Bindungsdomäne interagiert mit einem Bereich zwischen dem Aspartat D<sub>475</sub>, das phosphoryliert werden kann, und der FITC-(ATP)-Bindungsstelle K<sub>609</sub>. Der C-terminale Teil interagiert mit der cytoplasmatischen Schleife zwischen der Transmembrandomäne 2 und 3, korrespondierend zu der *transduction unit* von P-type ATPasen (40). Durch die Bindung von CaM wird die Calmodulin-Bindungsdomäne abgelöst, das aktive Zentrum ist nun frei zugänglich und die  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpe ist damit aktiviert.

Ein überraschender Befund war, daß die Aktivierung der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase auch schon mit einem C-terminalen Fragment von CaM, das durch Trypsin-Spaltung am flexiblen Linkerbereich gewonnen wird und nur die C-terminale Domäne enthält, erfolgen kann. Mit dem N-terminalen Fragment wurde die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase jedoch nicht aktiviert (42). Bei anderen CaM-Zielenzymen erfolgt mit isolierten Domänen-Fragmenten entweder keine Aktivierung (43,44) oder es waren sowohl die N-terminale als auch die C-terminale

Hälfte von CaM notwendig, um eine Aktivierung zu erreichen (45,46). In diesem Zusammenhang ist es interessant zu erfahren, daß es eine alternative *splicing site* in der Mitte der Calmodulin-Bindungsstelle gibt, die dazu führt, daß nur der N-terminale Teil der Bindungsdomäne in allen Isoformen identisch ist (47) (Abbildung 10).

|           |                               |           |              |           |                |      |
|-----------|-------------------------------|-----------|--------------|-----------|----------------|------|
| hPMCA1a   | *****<br>RELRRGQILWFRGLNRIQTQ | MDV       | VNAFQSGSSI   | QGALRRQP  | PSIASQHHDV     | 1118 |
| rPMCA1a   | RELRRGQILWFRGLNRIQTQ          | MDV       | VNAFQSGSSI   | QGALRRQP  | PSIASQHHDV     | 1118 |
| hPMCA1b   | RELRRGQILWFRGLNRIQTQ          | -         | -            | -         | -              | 1096 |
| hPMCA1c   | RELRRGQILWFRGLNRIQTQ          | MDV       | VNAFQSGSSI   | QGALRRQP  | PSIASQHHD-     | 1125 |
| hPMCA1d   | RELRRGQILWFRGLNRIQTQ          | MDV       | VNAFQSGSSI   | QGALRRQP  | PSIASQHHDV     | 1134 |
| hPMCA2    | RELRRGQILWFRGLNRIQTQ          | -         | -            | -         | -              | 975  |
| rPMCA2    | RELRRGQILWFRGLNRIQTQ          | -         | -            | -         | -              | 1074 |
| rPMCA3(a) | RELRRGQILWFRGLNRIQTQ          | MEV       | VSTFKRSGSF   | QGAVRRRSS | VLSQLHDV       | 1101 |
| hPMCA4a   | RELRRGQILWFRGLNRIQTQ          | IDV       | INTFQTGAS    | FKGVLRRQN | MG--QHLDV      | 1112 |
| hPMCA4b   | RELRRGQILWFRGLNRIQTQ          | -         | -            | -         | -              | 1082 |
|           |                               |           |              |           |                |      |
| hPMCA1a   | TNISTPTHVVFSSSTASTTVG         | -         | -            | -         | -              | 1168 |
| rPMCA1a   | TNVSTPTHVVFSSSTASTPVG         | -         | -            | -         | -              | 1168 |
| hPMCA1b   | -                             | IRV       | VNAFRSSLYE   | GLEKPE    | SRSSIHNFMT     | 1146 |
| hPMCA1c   | -                             | IRV       | VNAFRSSLYE   | GLEKPE    | SRSSIHNFMT     | 1175 |
| hPMCA1d   | TNISTPTH-                     | IRV       | VNAFRSSLYE   | GLEKPE    | SRSSIHNFMT     | 1184 |
| hPMCA2    | -                             | IRV       | VKAFRSSLYE   | GLEKPE    | SRSSIHNFMA     | 1025 |
| rPMCA2    | -                             | IRV       | VKAFRSSLYE   | GLEKPE    | SRSSIHNFMA     | 1124 |
| rPMCA3(a) | TNLSPTHTVTL SAAKPTS AAG-      | -         | -            | -         | -              | 1151 |
| hPMCA4a   | KLVPSSSYVAVAVPKSSPTTSV        | PAV-      | -            | -         | -              | 1162 |
| hPMCA4b   | -                             | IKV       | VKAFFHSSLHES | I         | QKPYNQKSIHSFMT | 1132 |
|           |                               |           |              |           |                |      |
| hPMCA1a   | -                             | -         | -            | -         | -              | 1126 |
| rPMCA1a   | -                             | -         | -            | -         | -              | 1126 |
| hPMCA1b   | HPEFRIEDSEPHIPLIDDDTDAEDDAPT  | KRNSSPP   | PPSP-        | -         | -              | 1180 |
| hPMCA1c   | HPEFRIEDSEPHIPLIDDDTDAEDDAPT  | KRNSSPP   | PPSP-        | -         | -              | 1199 |
| hPMCA1d   | HPEFRIEDSEPHIPLIDDDTDAEDDAPT  | KRNSSPP   | PPSP-        | -         | -              | 1208 |
| hPMCA2    | HPEFRIEDSEPHIPLIDDDTLEEDAALKQ | NSSPPSSL- | -            | -         | -              | 1049 |
| rPMCA2    | HPEFRIEDSEPHIPLIDDDTLEEDAALKQ | NSSPPSSL- | -            | -         | -              | 1148 |
| rPMCA3(a) | -                             | -         | -            | -         | -              | 1109 |
| hPMCA4a   | -                             | -         | -            | -         | -              | 1120 |
| hPMCA4b   | HPEFAIEEELPRTPLLEDEEEEN-      | PKASKF    | GTRVLL       | LDGEV     | TPYANTN        | 1155 |
|           |                               |           |              |           |                |      |
| hPMCA1a   | -                             | -         | -            | -         | -              | 1176 |
| rPMCA1a   | -                             | -         | -            | -         | -              | 1176 |
| hPMCA1b   | NNAVDSGIHLTIEMNKSA            | TSSSPG    | SPLHS        | LETSL     |                | 1220 |
| hPMCA1c   | NNAVDSGIHLTIEMNKSA            | TSSSPG    | SPLHS        | LETSL     |                | 1249 |
| hPMCA1d   | NNAVDSGIHLTIEMNKSA            | TSSSPG    | SPLHS        | LETSL     |                | 1258 |
| hPMCA2    | NSAIDSGINLTDTSKSA             | TSSSPG    | SPLHS        | LETSL     |                | 1099 |
| rPMCA2    | NSAIDSGINLTDTSKSA             | TSSSPG    | SPLHS        | LETSL     |                | 1198 |
| rPMCA3(a) | -                             | -         | -            | -         | -              | 1159 |
| hPMCA4a   | -                             | -         | -            | -         | -              | 1170 |
| hPMCA4b   | NNAV D - - - - - CNQVQLPQS-   | -         | -            | -         | -              | 1205 |

Abbildung 10: Alignment des C-terminalen Endes der Aminosäuresequenz von verschiedenen mammalian  $Ca^{2+}$ -ATPase Isoformen (h, human; r Ratte; PMCA, Plasma Membrane Calcium Pumpe). Aminosäurereste, die in allen Isoformen identisch sind, sind durch ein Sternchen markiert. Die alternative splice site ist durch einen Kasten dargestellt. Die erste Ankeraminosäure, ein Tryptophan, ist in rot markiert. Die zweite Ankeraminosäure, ein Valin, das sich zum Teil in der alternativen splice site befindet, ist in blau markiert.

Dieser N-terminale Teil der Bindungsdomäne steht bei der Bindung an CaM in Wechselwirkung mit der C-terminalen Domäne von CaM. Der C-terminale Teil der Bindungsdomäne jedoch ist in den verschiedenen Isoformen sehr divergent (Abbildung 10). Für die Bindung von CaM an die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase und deren Aktivierung scheint also die zweite Ankeraminosäure eine untergeordnete Rolle zu spielen. Um diesen interessanten Bindungsmechanismus von CaM an die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase zu studieren, wurden daher die Komplexe von CaM mit Peptiden unterschiedlicher Länge aus der Calmodulin-Bindungsdomäne untersucht. Die Sequenz der unterschiedlich langen Bindungspeptide ist in Abbildung 11 dargestellt.

|      | splice site   |
|------|---|
|      | 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18↓19 20 21 22 23 24 25 26 27 28          |
| C20W | L R R G Q I L <b>W</b> F R G <b>L</b> N R <b>I</b> Q T Q I K                        |
| C21W | <b>W</b> F R G <b>L</b> N R <b>I</b> Q T Q I R <b>V</b> V N A F S S S               |
| C24W | Q I L <b>W</b> F R G <b>L</b> N R <b>I</b> Q T Q I R <b>V</b> V N A F S S S         |
| C28W | L R R G Q I L <b>W</b> F R G <b>L</b> N R <b>I</b> Q T Q I R <b>V</b> V N A F S S S |

Abbildung 11: Sequenzen von verschieden langen Peptiden aus der Calmodulin-Bindungsdomäne der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. Die erste Ankeraminosäure (rot) bindet an die C-terminale Domäne und die zweite (blau) an die N-terminale Domäne. Der Pfeil deutet die splice site an (zwischen Q18 und I19), wobei nur der N-terminale Teil der Calmodulin-Bindungsdomäne in den verschiedenen Isoformen der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase identisch ist, der C-terminale Teil differiert.

Die Bindungskonstante von CaM an diese Peptide ist etwa genauso groß wie an die gesamte  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (Tabelle 1). Das Peptid C20W hat die Besonderheit, daß die Sequenz gerade vor der Position der zweiten Ankeraminosäure abbricht. Dieses Peptid entspricht damit dem konservierten N-terminalen Teil der Bindungsdomäne, die in allen Isoformen identisch ist.

Tabelle 1: Affinitätskonstanten für die Bindung von CaM an Peptide, die unterschiedlich langen Sequenzen der Calmodulin-Bindungsdomäne der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase entsprechen, und an das gesamte Enzyme  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (49)

| Bindungspartner von CaM  | $K_D$ [nM] |
|--------------------------|------------|
| $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase | 5          |
| C20W                     | 11         |
| C28W                     | < 1        |

An Komplexen von CaM mit den Peptiden C20W und C24W wurden Röntgenkleinwinkelstreuexperimente (SAXS) durchgeführt (48). Die Ergebnisse zeigten, daß

der CaM/C24W-Komplex, bei dem das Peptid beide Ankeraminosäuren enthält, analog zu dem CaM/M13-Komplex eine globuläre Gestalt hat, bei dem beiden Calmodulin-domänen mit dem Peptid wechselwirken. Der CaM/C20W-Komplex hingegen ist in seiner Gestalt sehr ähnlich zu freiem CaM in Lösung, bei dem beide Domäne sich unabhängig voneinander bewegen und im Mittel eine gestrecktere Konformation aufweisen. Dieses Ergebnis führt zu der Vermutung, daß das Peptid C20W nur an die C-terminale Domäne von CaM bindet. Mit zweidimensionalen, homonuklearen NMR Experimenten an einer unmarkierten CaM/C20W-Probe wurde bereits 1990 diese Vermutung erhärtet (49).

## **1.8 Zielsetzung der Arbeit**

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur des CaM/C20W-Komplexes mit Hilfe von heteronuklearen, dreidimensionalen NMR-Experimenten. Der neuartige Bindungsmodus des Peptids C20W an CaM verglichen zu den bereits bekannten CaM/Peptid-Komplexen sollte untersucht und charakterisiert werden. Mit der Bestimmung der strukturellen Unterschiede zwischen den verschiedenen CaM/Peptid-Komplexen erhält man neue, wichtige Informationen, die zum Verständnis von molekularer Erkennung beitragen.

## 1.9 Literatur

---

1. Pervushin, K., Riek, R., Wider, G., and Wüthrich, K. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 12366.
2. Shan, X., Gardner, K.H., Muhandiram, D.R., Rao, N.S., Arrowsmith, C.H., and Kay, L.E. (1996) *J. Am. Chem. Soc.* 118, 6570.
3. Bloch, F., Hansen, W.W., and Packard, M. (1946) *Phys. Rev.* 70, 474.
4. Purcell, E.M., Torrey, H.C., and Pound, R.V. (1946) *Phys. Rev.* 69, 37.
5. Ernst, R.R., and Anderson, W.A. (1966) *Rev. Sci. Instrum.* 37, 93.
6. Ernst, R.R. (1966) *Adv. Mag. Reson.* 2, 1.
7. Jeener, J. (1971) *Ampere Summer School*, Basko Polje, Yugoslavia.
8. Aue, W.P., Bartholdi, E., and Ernst, R.R. (1976) *J. Chem. Phys.* 64, 2229.
9. Griesinger, C., Sørensen, O.W., and Ernst, R.R. (1987) *J. Magn. Reson.* 73, 574.
10. Vuister, G.W., Boelens, R., and Kaptein, R. (1988) *J. Magn. Reson.* 80, 176.
11. Griesinger, C., Sørensen, O.W., and Ernst, R.R. (1989) *J. Magn. Reson.* 84, 14.
12. Kay, L.E., Clore, G.M., Bax, A., and Gronenborn, A.M. (1990) *Science* 249, 411.
13. Oh, B.H., Westler, W.M., Derba, P., and Markley, J.L. (1988) *Science* 240, 908.
14. Muchmore, D.C., Harpold, L.P., Russel, C.P., Anderson, D.E., and Dahlquist, F.W. (1989) *Methods Enzymol.* 117, 44.
15. Brush, C.K., Stone, M.P., and Harris, T.M. (1988) *Biochemistry* 27, 115.
16. Lemaster, D.M. and Richards, F.M. (1988) *Biochemistry* 27, 142.
17. Cheung, W.Y. (1982) *Spektrum der Wissenschaft* 8, 36-45.
18. Carafoli, E., and Penniston, J.T. (1986) *Spektrum der Wissenschaft* 1, 76-85.
19. Cohen, P., and Klee, C.B., eds. (1988) in *Calmodulin. Molecular Aspects of Cellular Regulation*, Vol. 5. Elsevier, Amsterdam.
20. Charp, P.A., and Regan, J.O. (1985) *Biochem. Biophys. Acta* 824, 34.
21. Serrataro, J., Pujel, M.J., Becks, D., and Carafoli, E. (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 150, 1162.
22. Voet, D., and Voet, J.G. (1994) in *Biochemie*, VCH Verlagsgesellschaft Weinheim.
23. Babu, Y.S., Sack, J.S., Greenhough, T.J., Bugg, C.E., Means, A.R., and Cook, W.J. (1985) *Nature* 315, 37-40.
24. Kretsinger, R.H. (1976) *Annu. Rev. Biochem.* 45, 239.
25. Kretsinger, R.H. (1980) *CRC Crit. Rev. Biochem.* 8, 119.
26. Branden, Carl, and Tooze, John (1999) *Introduction to Protein Structure, Second Edition*, Garland Publishing, Inc., New York.
27. Seaton, B.A., Head, J.F., and Richards, F.M. (1985) *Biochemistry* 24, 6740-6743.
28. Heidorn, D.B., and Trewella, J. (1988) *Biochemistry* 27, 909-915.

- 
29. Barbato, G., Ikura, M., Kay, L.E., Pastor, R. W., and Bax, A. (1992) *Biochemistry* 31, 5269-5278.
  30. Ikura, M., Spera, S., Barbato, G., Kay, L.E., Krinks, M., and Bax, A. (1991) *Biochemistry* 30, 9216.
  31. Clore, G.M., Bax, A., Ikura, M., and Gronenborn, A.M. (1993) *Curr. Opinion in Struct. Biol.* 3, 838.
  32. Ikura, M., Clore, G.M., Gronenborn, A.M., Zhu, G., Klee, C.B., and Bax, A. (1992) *Science* 256, 632.
  33. Meador, W.E., Means, A.R., and Quioco, F.A. (1992) *Science* 257, 1251-1255.
  34. Meador, W.E., Means, A.R., and Quioco, F.A. (1993) *Science* 263, 1718-1721.
  35. Crivici, and Ikura, M. (1995) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Structur* 24, 85-116.
  36. Osawa, M., Tokumitsu, H., Swindells, M.B., Kurihara, H., Orita, M., Shibamura, T., Furuya, T., and Ikura, M. (1999) *Nat. Struc. Biol.* 6, 819-824.
  37. O'Neil, K.T., and DeGrado, W.F. (1990) *Trends Biochem. Sci.* 15, 59-64.
  38. Rhoads, A.R., and Friedberg, F. (1997) *FASEB J.* 11, 331-340.
  39. Gellman, S.H. (1991) *Biochemistry* 30, 6633-6626.
  40. Carafoli, E. (1994) *FASEB J.* 8, 993-1002.
  41. Verma, A.K., Filoteo A.G., Stanford, D.R., Wieben, E.D., Penniston, J.T., Strehler, E.E., Fischer, R., Heim, R., Vogel, G., Mathews, S., Strehler-Page, M.-A., James, P., Vorherr, T., Krebs, J., and Carafoli, E. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 14152-14159.
  42. Guerini, D., Krebs, J., and Carafoli, E. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 15172-15177.
  43. Newton, D.L., Oldewurtel, M.D., Krinks, M.H., Shiloach, J., and Klee, C.B. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 4419-4426.
  44. Barth, A., Martin, S.R., and Bayley, P.M. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 2174-2183.
  45. Klumpp, S., Guerini, D., Krebs, J., and Schultz, J. E. (1987) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 142, 857-864.
  46. Kuznicki, J., Grabarek, Z., Brzeska, H., Drabikowski, W., and Cohen, P., (1981) *FEBS Lett.* 130, 141.
  47. Strehler, E.E. (1991) *J. Membrane Biol.* 120, 1-15.
  48. Kataoka, M., Head, J.F., Vorherr, T., Krebs, J., and Carafoli, E. (1991) *Biochemistry* 30, 6247-6251.
  49. Vorherr, T., James, P., Krebs, J., Enyedi, A., McCormick, D.J., Penniston, J.T., and Carafoli, E. (1990) *Biochemistry* 29, 355-365.

## **2 NMR-Spektroskopische Untersuchung des Calmodulin/C20W-Komplexes**

### **2.1 NMR-Zuordnungsstrategien für Proteine**

Bei der Strukturaufklärung von Proteinen mit Hilfe der NMR-Spektroskopie ist die Größe des Proteins immer der limitierende Faktor. Mit der von Wüthrich eingeführten Zuordnungsstrategie (50) mit zweidimensionalen NMR-Spektren können Proteine mit einem Molekulargewicht von ca. 10 kDa sequenziert und Strukturen von kleineren, globulären Proteinen in Lösung bestimmt werden. Erst durch die Einführung von drei- und multidimensionalen NMR-Experimenten und der Zugänglichkeit von isotopenmarkierten Proteinen ist es möglich geworden, Proteine bis zu einem Molekulargewicht von ca. 50 kDa NMR-spektroskopisch zu untersuchen und strukturell zu charakterisieren.

#### **2.1.1 Zuordnung von kleineren, unmarkierten oder einfachmarkierten Proteinen**

Die Zuordnungsstrategie für unmarkierte Peptide und Proteinen beruht auf der kombinierten Auswertung von homonuklearen  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -Korrelationsexperimenten wie COSY (51,52), TOCSY (53) und NOESY (54), bzw. ROESY (55,56) Experimenten. Mit Hilfe der beiden ersten Experimente lassen sich die skalar gekoppelten Spinsysteme der Aminosäurereste identifizieren und anschließend mit Hilfe der beiden letzten Experimente, die Protonen-Protonen-Abstandsinformationen liefern, entlang des Proteinrückgrats sequenziell zuordnen (Abbildung 12a) (50).

Mit zunehmendem Molekulargewicht steigt bei einem Protein die Anzahl der vorhandenen Protonen und damit die Anzahl an Resonanzen in einem NMR-Spektrum. Außerdem vergrößert sich auch die Linienbreite der Signale in erster Näherung linear mit der Molekülmasse, da sich die globalen Reorientierungszeiten verlängern. Beide Effekte führen zu einer massiven Überlagerung der Signale in den zweidimensionalen, homonuklearen Spektren, die eine Auswertung unmöglich macht. Durch die Einführung von NMR-aktiven Isotopen wie  $^{15}\text{N}$  oder  $^{13}\text{C}$ , die eine Spinquantenzahl  $m = \frac{1}{2}$  besitzen, in ein Protein mit Hilfe von geeigneten Expressionssystemen (57,58) kann man eine Aufspaltung der überlagerten Resonanzen in einer oder mehrerer weiteren Dimensionen

erreichen. Bei  $^{15}\text{N}$ -markierte Proteine, die mit geringem Kostenaufwand hergestellt werden können, erreicht man durch einfache Kombinationsexperimente wie 3D TOCSY- $^{15}\text{N}, ^1\text{H}$ -HSQC (59) und 3D NOESY- $^{15}\text{N}, ^1\text{H}$ -HSQC (60) einen Auflösungsgewinn, bei denen die potentiell überlagerten Protonenresonanzen mit Hilfe des  $^{15}\text{N}, ^1\text{H}$ -Korrelationsexperiment (HSQC) durch die chemische Verschiebungsdispersion des Amidstickstoffs in die dritte Dimension aufgelöst werden (Abbildung 12b).

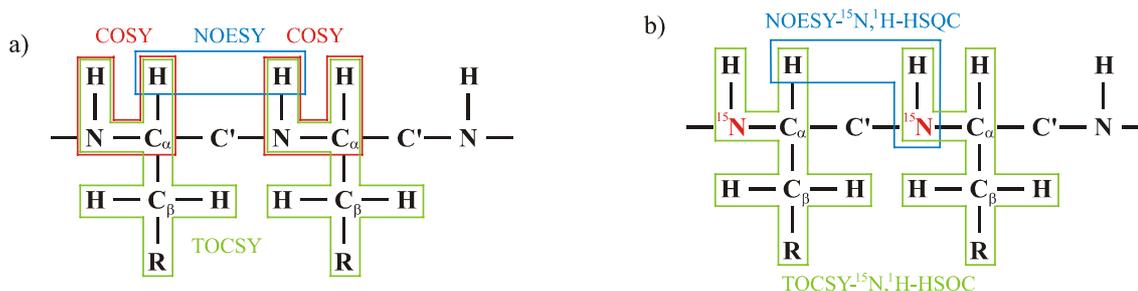


Abbildung 12: a) Klassische Zuordnungsstrategie für nicht markierte Proteine nach Wüthrich. Mit COSY und TOCSY-Experimenten werden die skalar gekoppelten Spinsysteme der Aminosäurereste identifiziert. Die sequentielle Verknüpfung erfolgt über  $H_{\alpha}(i)H^N(i+1)$  Korrelationen im NOESY Spektrum. b) Für  $^{15}\text{N}$ -markierte Proteine erreicht man durch die chemische Verschiebungsdispersion des Amidstickstoffs eine Dispersion der  $^1\text{H}$ -Verschiebungen in der dritten Dimension.

### 2.1.2 Zuordnungsstrategien für doppelmarkierte Proteine

Bei den bisher beschriebenen Zuordnungsstrategien erfolgt die sequentielle Verknüpfung der Spinsysteme über den NOE-Effekt, der allerdings von der jeweiligen Konformation des Proteins abhängig ist. Da die Konformation aber gerade nicht bekannt ist, können bei der Zuordnung des Proteins Fehler auftreten. Auch die Konformationsabhängigkeit von  $^3\text{J}$ -Kopplungskonstanten, die für den Magnetisierungstransfer in COSY- und TOCSY-Experimenten ausgenutzt werden, kann die Zuordnung erschweren, da beispielsweise Signale zwischen Kernen mit kleiner  $^3\text{J}$ -Kopplung fehlen können.

Bei doppelt  $^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ -markierten Proteinen hingegen eröffnen sich eine ganze Reihe neuer, mehrdimensionaler Experimente, die eine Fülle von Zuordnungsstrategien ermöglichen und die die genannten Probleme der Überlagerung und geringen Empfindlichkeit umgehen. Bei diesen heteronuklearen Tripelresonanzexperimente (61,62,63,64,65,66,67) erfolgt der Magnetisierungstransfer ausschließlich über  $^1\text{J}$  und  $^2\text{J}$ -Kopplungskonstanten, die zum einen weitgehend konformationsunabhängig und zum anderen wesentlich größer als die  $^3\text{J}$ -Kopplungskonstanten sind, wodurch der Magnetisierungstransfer viel effizienter verläuft. In Abbildung 13 ist das Spinsystem eines Aminosäurerestes in einem Protein mit den Kopplungskonstanten gezeigt, die für

den Magnetisierungstransfer in heteronuklearen Tripelresonanzexperimenten ausgenutzt werden können.

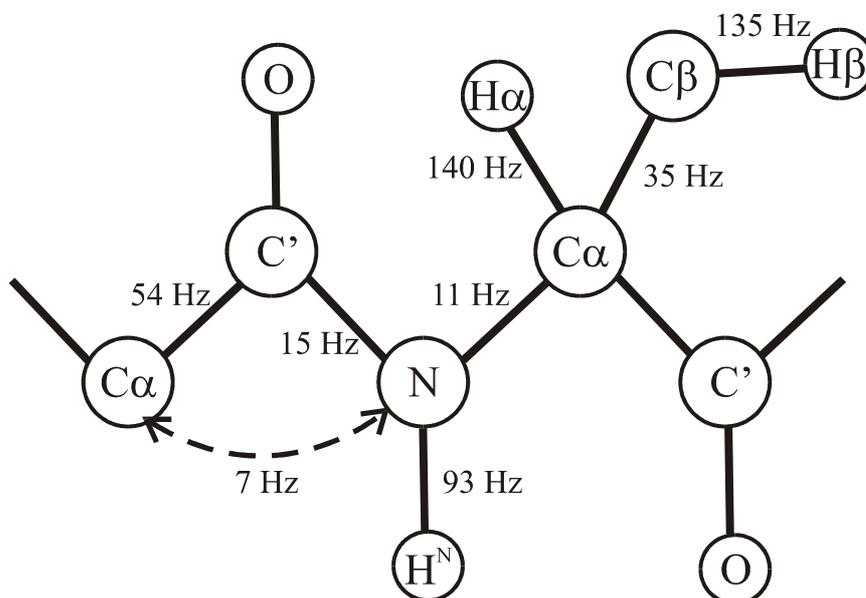


Abbildung 13: Spinsystem eines Aminosäurerestes mit  $^1J$ - und  $^2J$ -Kopplungskonstanten, die für den Magnetisierungstransfer in heteronuklearen Tripleresonanzexperimenten ausgenutzt werden.

Die heteronuklearen Tripelresonanzexperimente, die zur Zuordnung des Proteinrückgrats herangezogen werden, korrelieren die verschiedenen NMR-aktiven Kerne des Proteinrückgrats  $^1H^N$ ,  $^{15}N$ ,  $^{13}C_\alpha$ ,  $^1H_\alpha$  und  $^{13}C'$ . Darüber hinaus werden die Seitenketten spins  $^1H_\beta$  und  $^{13}C_\beta$  zur Sequenzierung herangezogen. Die Nomenklatur der Tripelresonanzexperimente leitet sich von den am Magnetisierungstransferweg beteiligten Spins ab. Kernspins, die keine chemische Verschiebung während des Experimentes entwickeln, werden in Klammern angegeben. Beispielsweise wird bei dem HNCO Experiment die Magnetisierung vom Amidproton ( $H^N$ ) über den Amidstickstoff (N) bis zum direktgebundenen Carbonylkohlenstoff (CO) transferiert und auch jeweils auf den angegebenen Kernen evolviert bzw. detektiert. Wird die Magnetisierung jedoch noch weiter bis zum benachbarten C $\alpha$ -Kohlenstoff (CA) transferiert und dort evolviert, heißt das Experiment HN(CO)CA, wobei der Carbonylkohlenstoff (CO) nicht evolviert wird.

Mit Hilfe der vier Experimente HNCO (68), HN(CA)CO (69), HNCA (68) und HN(CO)CA (70) läßt sich eine sequentielle Zuordnung der Proteinrückgratotope über die überlappende Zuordnung des Amidprotons, des Amidstickstoffs, des C $\alpha$ - und des Carbonylkohlenstoffs erzielen (Abbildung 14a).

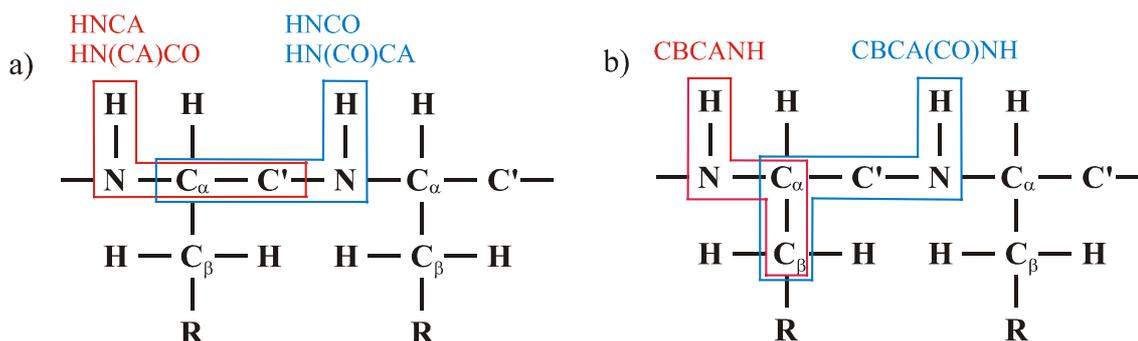


Abbildung 14: Zuordnungsstrategien für  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ -markierte Proteine. a) Kombination der Spektren HNCO, HN(CA)CO, HNCA, HN(CO)CA. b) Kombination von CBCA(CO)NH und CBCANH.

Bei einer anderen Zuordnungsstrategie, die mit nur zwei dreidimensionalen Spektren auskommt, greift man auf eine Kombination der Experimente CBCA(CO)NH (71) und CBCANH (72) bzw. HNCACB (73) zurück (Abbildung 14b). Durch die Hinzunahme der  $\text{C}_\beta$ -Kohlenstoff-Resonanzen ist dann eine bessere Spinsystemerkennung möglich, da die  $^{13}\text{C}$ -chemische Verschiebungen der  $\text{C}_\alpha$ - und  $\text{C}_\beta$ -Resonanzen charakteristisch für den jeweiligen Aminosäuretyp sind. Mit dieser Information gelingt es, den jeweiligen zugeordneten Aminosäurerest in der bekannten Primärsequenz des Proteins zu finden. Das HNCACB Experiment liefert als *out and back*-Version des CBCANH dieselbe Korrelation, jedoch mit höherer Empfindlichkeit, so daß dieses Experiment dem CBCANH vorzuziehen ist.

Nach der sequentielle Zuordnung der Proteinrückgratresonanzen werden NMR-Experimente zur Zuordnung der  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Seitenkettenresonanzen aufgenommen. Bewährt haben sich dabei die Experiment HBHA(CO)NH, (H)CC(CO)NH, H(CC)(CO)NH und HCCH-TOCSY, die in Kapitel 2.2.3 beschrieben werden. Nach abgeschlossener Zuordnung aller Resonanzen erfolgt die Auswertung von NOESY-Experimenten (Kapitel 2.2.6), deren Information zur Erstellung von Abstands-*restraints* führt. Zusammen mit experimentell bestimmten Torsionswinkel-*restraints* und weiteren experimentellen Randbedingungen kann durch Moleküldynamikrechnungen (Kapitel 3) die dreidimensionale Struktur des Proteins ermittelt werden.

Eine weitere Fortentwicklung der beschriebenen heteronuklearen NMR-Spektroskopie stellt die Einführung von Deuterium anstelle von Protonen in Proteine dar (15,16). Dadurch wird die transversale Relaxationszeit der aliphatischen Kohlenstoffe signifikant gesteigert (74,75), so daß ein Empfindlichkeitsgewinn in den Tripelresonanzexperimenten resultiert. Die sequentielle Zuordnung von volldeutierten Proteinen ist dabei prinzipiell sehr ähnlich zu den beschriebenen Zuordnungsstrategien für doppeltmarkierte Proteine. Die H/D-Substitution der Amidprotonen in wässrigen Medium führt dazu, daß die Amidprotonen nicht durch Deuterium ersetzt sind und für die Tripelresonanzexperimente als Anregungs- und Detektionsspin zur Verfügung stehen, die als *out-and-back*-Versionen durchgeführt werden. Mit Hilfe von  $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ -isotopenmarkierten Verbindungen wurden Proteine mit einem Molekulargewicht bis zu 64 kDa NMR-spektroskopisch untersucht (2).

## 2.2 NMR-Experimente zur Zuordnung des Calmodulins

Um die Struktur des CaM/C20W-Komplexes mit Hilfe der NMR-Spektroskopie zu ermitteln, wurde eine Probe aus  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ -markiertem CaM und unmarkiertem Peptid C20W hergestellt, wobei diese unterschiedliche Markierungsweise gewählt wurde, um die beiden Komponenten des Komplexes NMR-spektroskopisch unterscheiden zu können. Die größere Komponente des Komplexes, das Protein  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ -CaM mit 16,7 kDa, kann nun mit Hilfe von dreidimensionalen, heteronuklearen Tripelresonanzexperimenten untersucht werden. Die kleinere Komponente, das unmarkierte Peptid C20W mit einem Molekulargewicht von 2495,99 Da, läßt sich mit Hilfe von NMR-Filterexperimenten beobachten, wobei die Resonanzen von  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ -CaM unterdrückt werden. Man erhält zweidimensionale, homonukleare Spektren, die nach der Strategie von unmarkierten Proteinen (Kapitel 2.1.1) ausgewertet werden können. Schließlich kann auch noch die Kontaktfläche zwischen den beiden Komponenten bestimmt werden, wobei durch die Anwendung von Halbfilterexperimenten nur NOE-Kontakten zwischen CaM und C20W detektiert werden (Kapitel 2.5).

Für die NMR-spektroskopischen Untersuchungen wurden von der Arbeitsgruppe von Dr. Joachim Krebs und Prof. Dr. Ernesto Carafoli (ETH Zürich) zwei Proben zur Verfügung gestellt, deren Präparation im Anhang beschrieben ist (Kapitel 6.1). Die Zusammensetzung der Proben betrug 1.7 mM CaM/C20W, 140mM KCl und 7 mM  $\text{CaCl}_2$  in  $\text{H}_2\text{O}$  bzw.  $\text{D}_2\text{O}$ . Der pH/pH\*-Wert der Proben betrug 6,5, wobei bei der  $\text{D}_2\text{O}$ -Probe der Isotopeneffekt nicht berücksichtigt wurde.

Die im folgenden beschriebenen NMR-Experimente, die zur Strukturbestimmung des CaM/C20W-Komplex notwendig waren, wurden von Prof. Dr. Harald Schwalbe, Dr. Mirko Hennig und Dr. Marcus Maurer aufgenommen. Die Prozessierung der Spektren und anschließende Auswertung wurden im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit durchgeführt. Eine Tabelle mit allen getroffenen Resonanzzuordnungen für CaM und für das Peptid C20W findet sich im Anhang (Kapitel 6.3). Die Daten wurden außerdem in die Datenbank BioMagResBank mit der Nummer 4284 abgelegt und sind dort über das Internet <http://www.bmrb.wisc.edu/> frei verfügbar.

### 2.2.1 $^1\text{H}$ , $^{15}\text{N}$ -HSQC des CaM/C20W-Komplexes

Zu Beginn der NMR-spektroskopischen Untersuchung von  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ -CaM im Komplex mit C20W wurde ein  $^{15}\text{N}$ ,  $^1\text{H}$ -HSQC Experiment mit hoher Auflösung aufgenommen. Dieses zweidimensionale Spektrum (Abbildung 15) korreliert die chemische Verschiebung der Amidprotonen  $\text{H}^{\text{N}}$  mit der des Amidstickstoffs N und wird als Ausgangspunkt für jede weitere Auswertung von dreidimensionalen Spektren verwendet. Die relativ geringe Dispersion der Signale kommt zum einen durch den

hohen Anteil an  $\alpha$ -helicalen Bereichen zustande und zum anderen durch die vierfache interne Sequenzhomologie des CaMs (Kapitel 1.4).

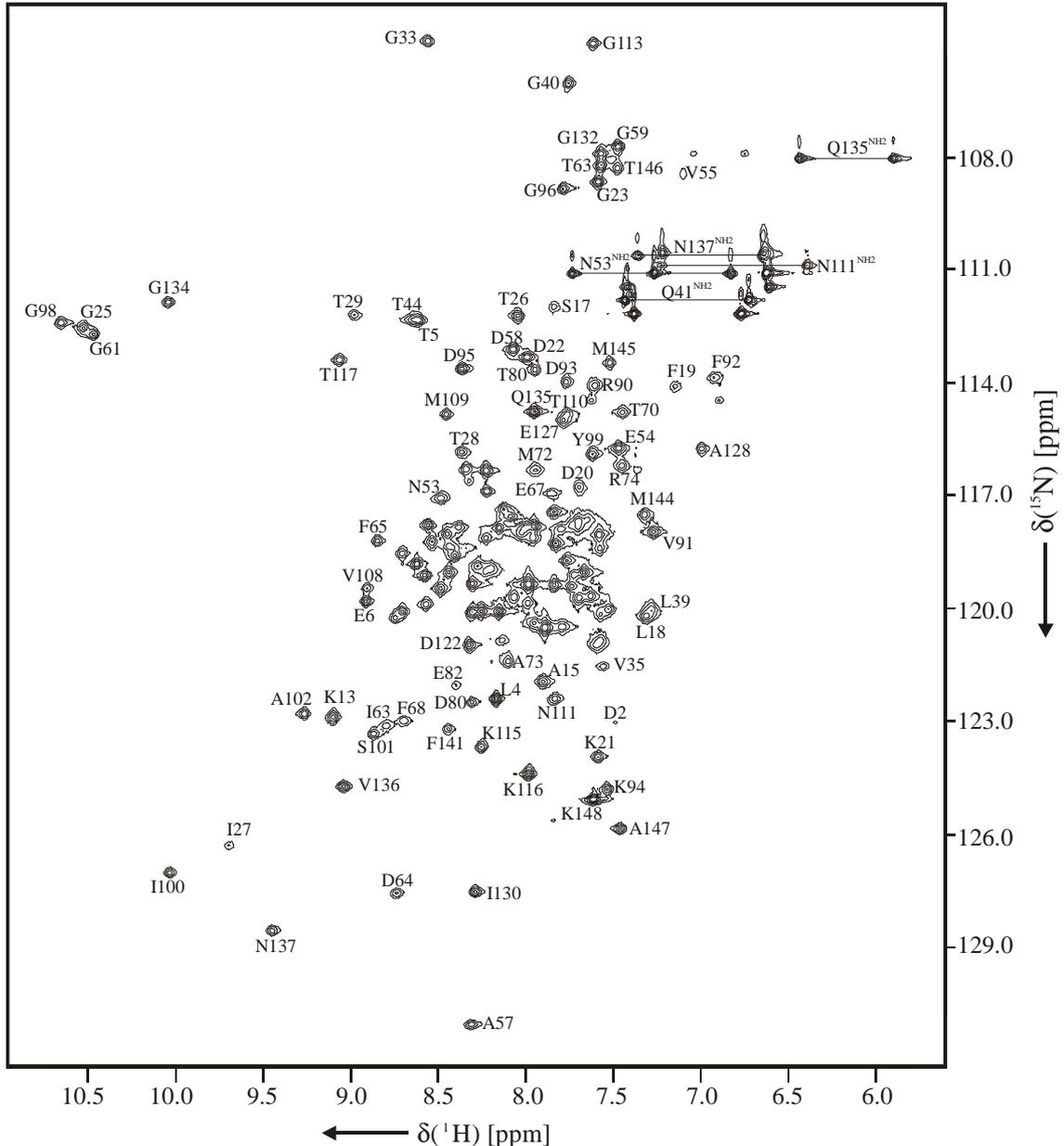


Abbildung 15:  $^{15}\text{N}, ^1\text{H}$ -HSQC des  $^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ -CaM/C20W-Komplexes. Die Zuordnung der Resonanzen ist eingezeichnet.

Die Zuordnung der Signale, die mit Hilfe der im folgenden Kapitel 2.2.2 beschriebenen Spektren getroffen wurde, ist in Abbildung 15 eingezeichnet. Der besonders stark überlagerte Bereich ist noch mal mit den entsprechenden Zuordnungen in Abbildung 16 dargestellt. Ein charakteristisches Merkmal des  $^{15}\text{N}, ^1\text{H}$ -HSQC-Spektrums sind die Resonanzen der vier Glycine G25, G61, G98 und G134, die in der Protonendimension

besonders tieffeldig verschoben sind, da sich diese Glycine in den Calcium-bindungsschleifen befinden.

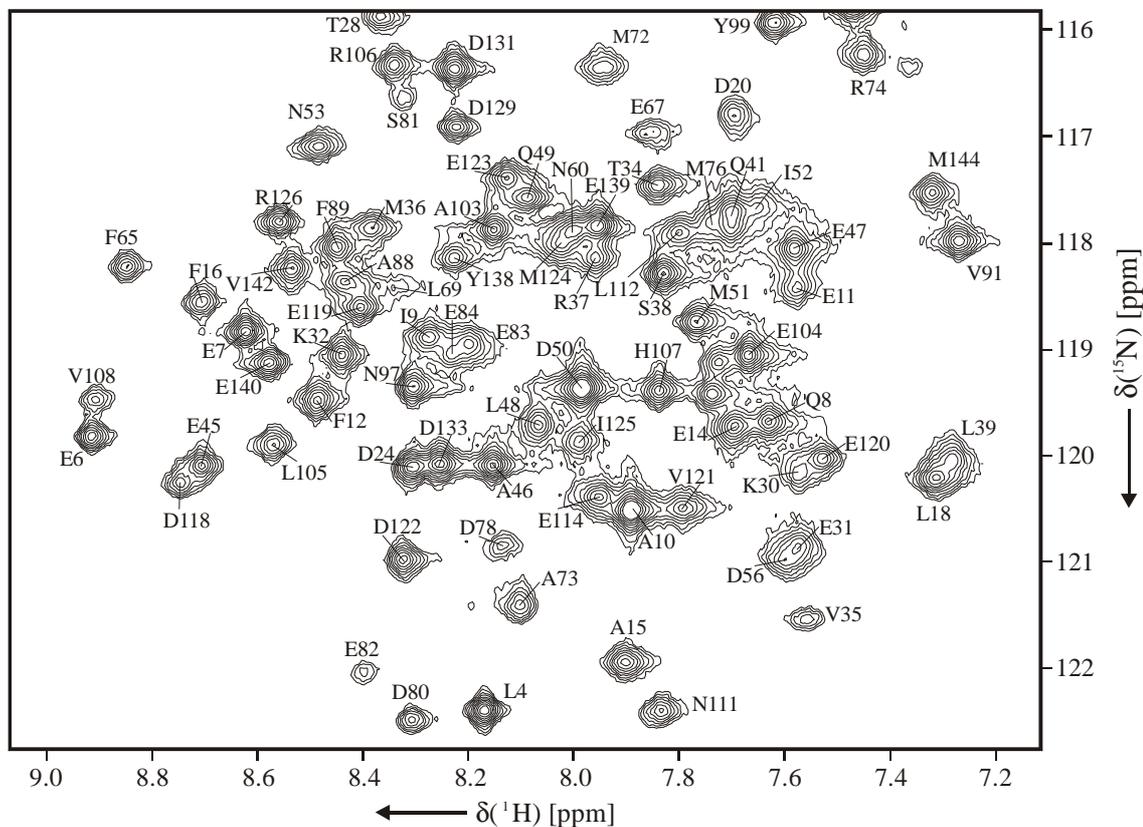


Abbildung 16: Stark überlagerter Bereich des  $^{15}\text{N}, ^1\text{H}$ -HSQC Spektrums mit den getroffenen Zuordnungen.

Eine deutlich stärkere Überlagerung der Signale findet man im  $^{13}\text{C}, ^1\text{H}$ -HSQC-Spektrum, das in Abbildung 17 gezeigt ist. Eine Beschriftung der Resonanzen ist aufgrund der starken Überlagerung nicht mehr möglich.

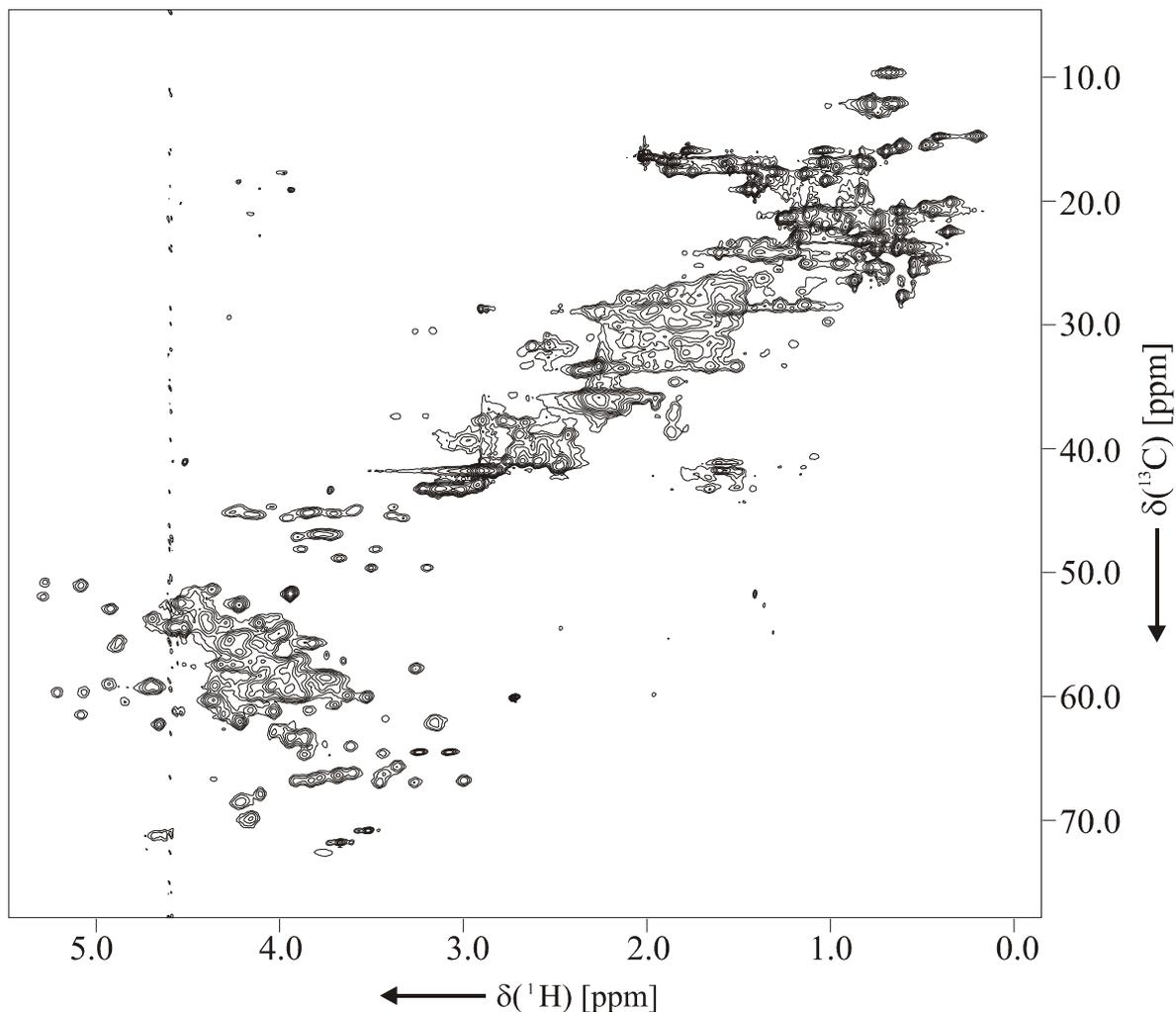


Abbildung 17:  $^{13}\text{C}, ^1\text{H}$ -HSQC des  $^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ -CaM/C20W-Komplexes.

### 2.2.2 Zuordnung des Proteinrückgrats von Calmodulin

Die Resonanzen des Proteinrückgrats von CaM im Komplex mit C20W wurden mit der Zuordnungsstrategie von CBCA(CO)NH/CBCANH zugeordnet (Kapitel 2.1.2). Im CBCA(CO)NH-Experiment werden die chemischen Verschiebung  $C_{\alpha}(i)$  und  $C_{\beta}(i)$  mit den Resonanzen der nachfolgenden Aminosäure  $N(i+1)$  und  $H^N(i+1)$  korreliert. Im CBCANH-Experiment sind die  $C_{\alpha}(i)$  und  $C_{\beta}(i)$  Resonanzen mit den Resonanzen  $N(i)$  und  $H^N(i)$  der eigenen Aminosäure verknüpft. Durch Vergleich der Frequenzpaare  $C_{\alpha}(i)$ ,  $C_{\beta}(i)$  in beiden Experimenten kann nun eine sequentielle Verknüpfung der Aminosäuren  $i$  und  $i+1$  etabliert werden. Dieser Vergleich wurde bei der Zuordnung des CaM/C20W-Komplexes auf visuellem Wege mit Hilfe des Programms FELIX (MSI, San Diego, CA) vorgenommen. Durch die charakteristischen  $C_{\alpha}$ - und  $C_{\beta}$ - chemischen Verschiebungen erhält man einen ersten Hinweis auf den Aminosäuretyp. In Tabelle 2 sind die chemischen Verschiebungsbereiche für Protonen und Kohlenstoffe in Proteinen

zusammengefaßt. Die Werte stammen aus Messungen an kleinen, ungefalteten Peptiden (90). In gefalteten Proteinen können je nach Sekundär- und Tertiärstruktur größere Abweichungen von den angegebenen Werten auftreten, besonders bei den Protonenverschiebungen. Zur Spinsystemerkennung eignen sich daher die Kohlenstoffverschiebungen besser. Besonders eindeutig zu erkennen ist Glycin, bei dem nur eine  $C_{\alpha}$ -Resonanz bei 42-48 ppm zu finden ist, aber keine  $C_{\beta}$ -Resonanz, Alanin mit einer hochfeldigen  $C_{\beta}$ -Resonanz bei 18-24 ppm und Serin bzw. Threonin mit einer besonders tieffeldigen  $C_{\beta}$ -Resonanz bei 61-67 ppm bzw. 66-73 ppm.

Tabelle 2: Random coil chemische Verschiebungen in ppm für  $^1H$  und  $^{13}C$  für die 20 gewöhnlichen Aminosäuren, referenziert auf den internen Standard DSS (2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonat, Natriumsalz) bei 25°C und pH-5.0 (90)

| AS      | $H^N$                           | $H_{\alpha}$<br>$C_{\alpha}$ | $H_{\beta}$<br>$C_{\beta}$ | restliche Seitenketten H<br>restliche Seitenketten C   |
|---------|---------------------------------|------------------------------|----------------------------|--|
| Gly (G) | 8.33                            | 3.96<br>45.1                 |                            |  |
| Ala (A) | 8.24                            | 4.32<br>52.5                 | 1.39<br>19.1               |  |
| Ser (S) | 8.31                            | 4.47<br>58.3                 | 3.89, 3.87<br>63.8         |  |
| Thr (T) | 8.15                            | 4.35<br>61.8                 | 4.24<br>69.8               | 1.21 ( $\gamma$ )<br>21.5 ( $\gamma$ )   |
| Val (V) | 8.03                            | 4.12<br>62.2                 | 2.08<br>32.9               | 0.94, 0.93 ( $\gamma_1, \gamma_2$ )<br>21.1, 20.3 ( $\gamma_1, \gamma_2$ )   |
| Leu (L) | 8.16                            | 4.34<br>55.1                 | 1.62, 1.62<br>42.4         | 1.59 ( $\gamma$ ); 0.92, 0.87 ( $\delta_1, \delta_2$ )<br>26.9 ( $\gamma$ ); 24.9, 23.3 ( $\delta_1, \delta_2$ )                         |
| Ile (I) | 8.00                            | 4.17<br>61.1                 | 1.87<br>38.8               | 1.44, 1.16 ( $\gamma_1$ ); 0.91 ( $\gamma_2$ ); 0.86 ( $\delta$ )<br>27.2 ( $\gamma_1$ ); 17.4 ( $\gamma_2$ ); 12.9 ( $\delta$ )         |
| Lys (K) | 8.29<br>7.81 ( $\zeta$ )        | 4.32<br>56.2                 | 1.84, 1.75<br>33.1         | 1.44, 1.44 ( $\gamma$ ); 1.68, 1.68 ( $\delta$ ); 2.99, 2.99 ( $\epsilon$ )<br>24.7 ( $\gamma$ ); 29.0 ( $\delta$ ); 41.9 ( $\epsilon$ ) |
| Arg (R) | 8.23<br>8.07 ( $\epsilon$ )     | 4.34<br>56.0                 | 1.86, 1.76<br>30.9         | 1.63, 1.63 ( $\gamma$ ); 3.20, 3.20 ( $\delta$ )<br>27.1 ( $\gamma$ ); 43.3 ( $\delta$ )   |
| Pro (P) | -                               | 4.42<br>63.3                 | 2.29, 1.94<br>32.1         | 2.02, 2.02 ( $\gamma$ ); 3.63, 3.63 ( $\delta$ )<br>27.2 ( $\gamma$ ); 49.8 ( $\delta$ )   |
| Glu (E) | 8.42                            | 4.35<br>56.6                 | 2.06, 1.96<br>29.9         | 2.31, 2.31 ( $\gamma$ )<br>35.6 ( $\gamma$ )   |
| Gln (Q) | 8.32<br>7.52, 6.85 ( $\delta$ ) | 4.34<br>55.7                 | 2.12, 1.99<br>29.4         | 2.36, 2.36 ( $\gamma$ )<br>33.7 ( $\gamma$ )   |
| Met (M) | 8.28                            | 4.48<br>55.4                 | 2.11, 2.01<br>32.9         | 2.60, 2.54 ( $\gamma$ ); 2.10 ( $\epsilon$ )<br>32.0 ( $\gamma$ ); 16.9 ( $\epsilon$ )   |
| Phe (F) | 8.30                            | 4.62<br>57.7                 | 3.14, 3.04<br>39.6         | 7.28 ( $\delta$ ), 7.38 ( $\epsilon$ ), 7.32 ( $\zeta$ )<br>131.9 ( $\delta$ ), 131.5 ( $\epsilon$ ), 129.9 ( $\zeta$ )                  |

| AS               | H <sup>N</sup>          | H <sub>α</sub><br>C <sub>α</sub> | H <sub>β</sub><br>C <sub>β</sub> | restliche Seitenketten H<br>restliche Seitenketten C  |
|------------------|-------------------------|----------------------------------|----------------------------------|---|
| Tyr (Y)          | 8.12                    | 4.55<br>57.9                     | 3.03, 2.98<br>38.8               | 7.14 (δ), 6.84 (ε)<br>133.3 (δ), 118.2 (ε), 157.3 (ζ)   |
| His (H)          | 8.42                    | 4.73<br>55.0                     | 3.29, 3.16<br>29.0               | 8.58 (ε1), 7.29 (δ2)<br>136.2 (ε1), 120.1 (δ2)  |
| Trp (W)          | 8.25                    | 4.66<br>57.5                     | 3.29, 3.27<br>29.6               | 7.27 (δ1), 7.65 (ε3), 7.18 (ζ3), 7.25 (η2),<br>7.50 (ζ2)<br>127.4 (δ1), 122.2 (ε3), 124.8 (ζ3), 121.0<br>(η2), 114.7 (ζ2) |
| Cys (C)          | 8.32                    | 4.55<br>58.2                     | 2.93, 2.93<br>28.0               |   |
| Cys (C)<br>(S-S) | 8.43                    | 4.71<br>55.4                     | 3.25, 2.99<br>41.1               |   |
| Asp (D)          | 8.34                    | 4.64<br>54.2                     | 2.72, 2.65<br>41.1               |   |
| Asn (N)          | 8.40<br>7.59, 6.91 (δ2) | 4.74<br>53.1                     | 2.83, 2.75<br>38.9               |   |

In Abbildung 18 ist die Vorgehensweise der Zuordnung für die Aminosäurereste Ile100 bis Glu104 dargestellt. Die gezeigten Ausschnitte aus den dreidimensionalen Spektren sind Schnitte entlang der jeweiligen <sup>15</sup>N-Verschiebung, so daß über der jeweiligen H<sup>N</sup>-Verschiebung die beiden Resonanzen von C<sub>α</sub> und C<sub>β</sub> der eigenen Aminosäure (CBCANH, rechts) bzw. der vorherfolgenden Aminosäure (CBCA(CO)NH, links) zu sehen sind. Im CBCANH-Experiment sind die Resonanzen von C<sub>α</sub> und C<sub>β</sub> um 180° phasenverschoben, daher sind die C<sub>β</sub> Signale in Abbildung 18 in rot dargestellt. Dies erleichtert die korrekte Zuordnung besonders bei den Aminosäuretypen Serin und Threonin, bei denen die C<sub>α</sub> und C<sub>β</sub> chemischen Verschiebungen im selben Bereich liegen. Die C<sub>α</sub>-Resonanz von Glycin weist dieselbe Phase wie C<sub>β</sub>-Resonanzen der restlichen Aminosäuren auf. Da die <sup>2</sup>J(C<sub>α</sub>(i-1),N(i))-Kopplung mit 7 Hz in derselben Größenordnung wie die <sup>1</sup>J(C<sub>α</sub>(i),N(i))-Kopplung mit 11 Hz, die für den Magnetisierungstransfer herangezogen wird, liegt (siehe Abbildung 13) erhält man in dem CBCANH-Experiment neben der Korrelation der Kerne H<sup>N</sup>(i), N(i) mit C<sub>α</sub>(i), C<sub>β</sub>(i) auch noch eine Korrelation von H<sup>N</sup>(i), N(i) mit C<sub>α</sub>(i-1) und C<sub>β</sub>(i-1). Das bedeutet, daß in einem rechtem Ausschnitt wie in Abbildung 18 maximal 4 Signale zu sehen sind, ein Paar stärkerer Signale von C<sub>α</sub> und C<sub>β</sub> von der eigenen Aminosäure (i) und ein Paar schwächere Signale C<sub>α</sub> und C<sub>β</sub> von der vorherfolgenden Aminosäure (i-1). Das schwächere Signalpaar wurde jedoch öfters nicht im Spektrum gefunden, wie beispielsweise bei Aminosäure Ser101.

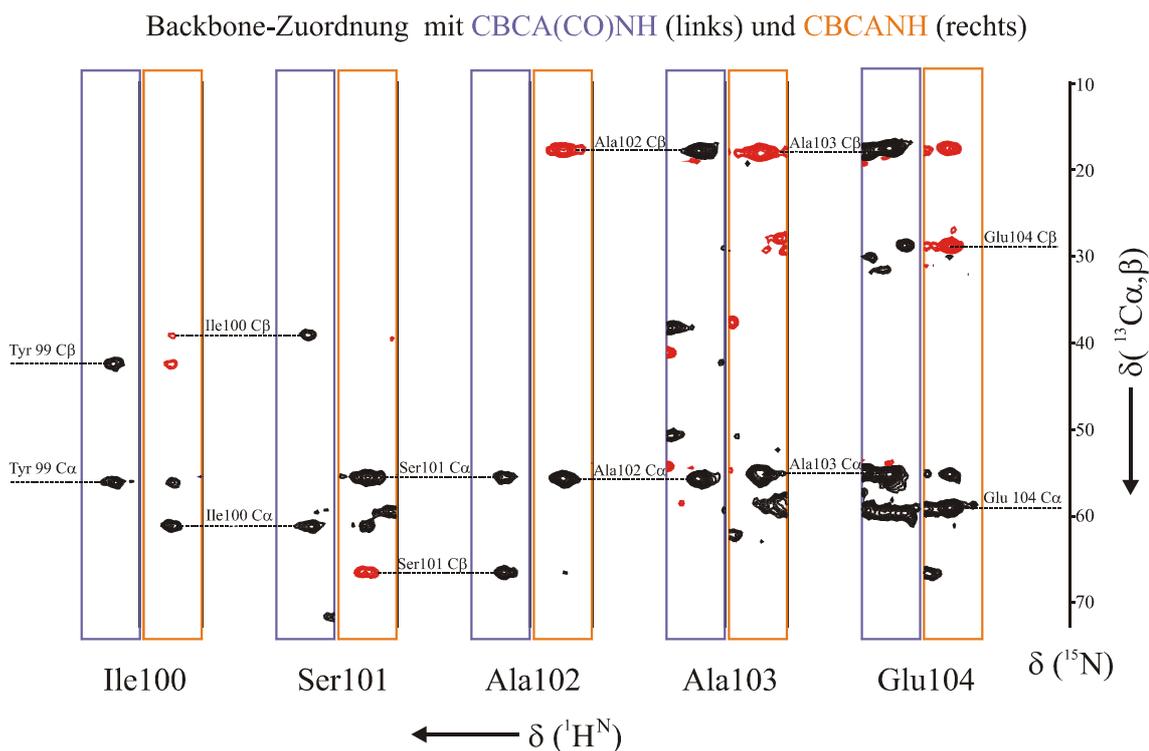


Abbildung 18: Sequentielle Zuordnung des Proteinrückgrats von Ile100 bis Glu104 von CaM im Komplex mit C20W mit Hilfe von CBCACONH (links) und CBCANH (rechts).

Mit Hilfe dieser Vorgehensweise war es möglich, 95% der Resonanzen des Proteinrückgrats ( $H^N$ , N,  $C_\alpha$ , C $\beta$ ) von CaM zuzuordnen.

### 2.2.3 Zuordnung der aliphatischen Seitenketten von Calmodulin

Zur eindeutigen Spinsystemerkennung der Aminosäuren und zur vollständigen Zuordnung aller Protonen- und Kohlenstoffresonanzen von CaM im Komplex mit C20W wurden weitere NMR-Experimente aufgenommen.

Durch einfache Modifikation des CBCA(CO)NH-Experimentes, wobei die erste Evolutionszeit auf den Protonen  $H_\alpha$  und  $H_\beta$  erfolgt, erhält man das HBHA(CO)NH-Experiment (76) (Abbildung 19a). Die Protonenresonanzen  $H_\alpha$  und  $H_\beta$  werden mit dem Amidstickstoff N(i+1) und dem Amidproton  $H^N(i+1)$  der nachfolgenden Aminosäure korreliert. Dies ermöglicht eine meist eindeutige Zuordnung der Protonen  $H_\alpha$  und  $H_\beta$ , die für die weitere eindeutige Zuordnung der Seitenkettenprotonen sehr hilfreich ist.

Bei dem (H)CC(CO)NH Experiment (77,78), bei dem die Magnetisierung mit Hilfe eines homonuklearen  $^{13}C$ - $^{13}C$  TOCSY-Transfers über das gesamte Spinsystem verteilt wird, erhält man eine Korrelation von allen aliphatischen Kohlenstoffen des Spinsystems CX(i) mit den Resonanzen der nachfolgenden Aminosäure N(i+1) und  $H^N(i+1)$  (Abbildung 19b). Beim H(CC)(CO)NH-Experiment (77) läßt man die

chemische Verschiebung auf den aliphatischen Protonen anstelle auf den aliphatischen Kohlenstoffen evolviert und erhält damit eine Korrelation von allen aliphatischen Protonen  $HX(i)$  des Spinsystems mit  $N(i+1)$  und  $H^{N(i+1)}$  (Abbildung 19c). Mit Hilfe dieser beiden Experimente ist im Prinzip die vollständige Zuordnung der aliphatischen Seitenketten-Protonen und Kohlenstoffe möglich, bis auf die Aminosäuren, die N-terminal zu Prolinen liegen. Proline enthalten kein Amidproton und daher fehlen die Resonanzen in den bisher genannten Experimenten. Schwierigkeiten bereitet auch die exakte Zuordnung der Protonen besonders bei langkettigen Aminosäuren, da die chemischen Verschiebungsbereiche überlappen. Hierfür ist die Aufnahme eines HCCH-TOCSY-Experimentes (79) notwendig, das sämtliche aliphatische Protonen innerhalb einer Seitenkette mit allen Kohlenstoffen desselben Spinsystems korreliert und damit eine eindeutige Zuordnung der Protonen ermöglicht (Abbildung 19d). Dieses Spektrum wurde an der  $D_2O$ -Probe aufgenommen, da keine Amidprotonen detektiert werden. Die Aufnahme des Spektrums an der  $D_2O$ -Probe liefert bessere Ergebnisse, da keine Pulse zur Unterdrückung des Wassersignals notwendig sind.

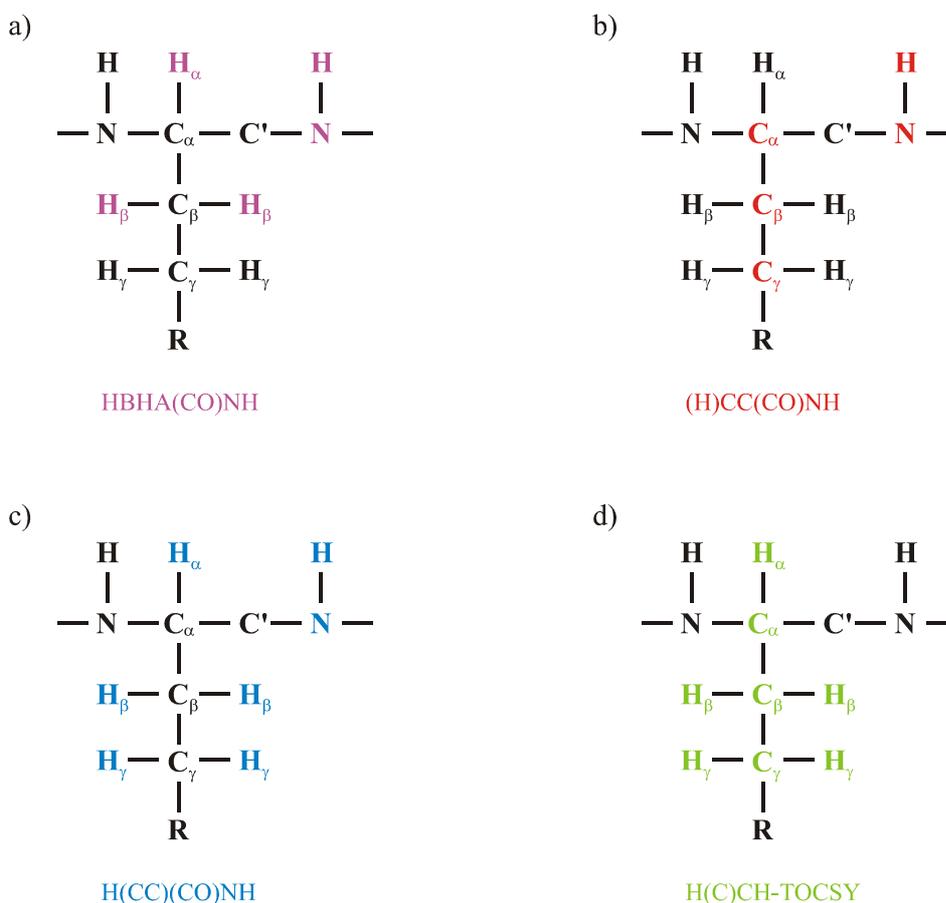


Abbildung 19: Zuordnungsexperimente für  $^1H$ - und  $^{13}C$ -Seitenkettenresonanzen. Im  $(H)CC(CO)NH$  (b) und  $H(CC)(CO)NH$  (c) Experiment werden die bereits zugeordneten  $N(i+1)$  und  $HN(i+1)$  Resonanzen mit den aliphatischen Kohlenstoffen  $CX(i)$  bzw. Protonen  $HX(i)$  der Seitenkette korreliert. Zusammen mit dem  $H(C)CH-TOCSY$  (d)-Experiment ist eine vollständige und exakte Zuordnung der aliphatischen Seitenketten möglich. Die Zuordnung von aromatischen Protonen kann mit Hilfe des  $(HB)CB(CC\text{arom})H$  (e) Experimentes erfolgen.

In Abbildung 20 sind einige Ausschnitte aus dem (H)CC(CO)NH Experiment gezeigt und die Zuordnung der verschiedenen  $^{13}\text{C}$ -Resonanzen markiert. Aufgrund der raschen Relaxation von transversaler  $^{13}\text{C}$ -Magnetisierung bei dem Protein CaM mit dem Molekulargewicht von 16,7 kDa, erhält man ein Signal-zu-Rausch-Verhältnis, bei dem einige der Resonanzen nicht mehr zu sehen sind.

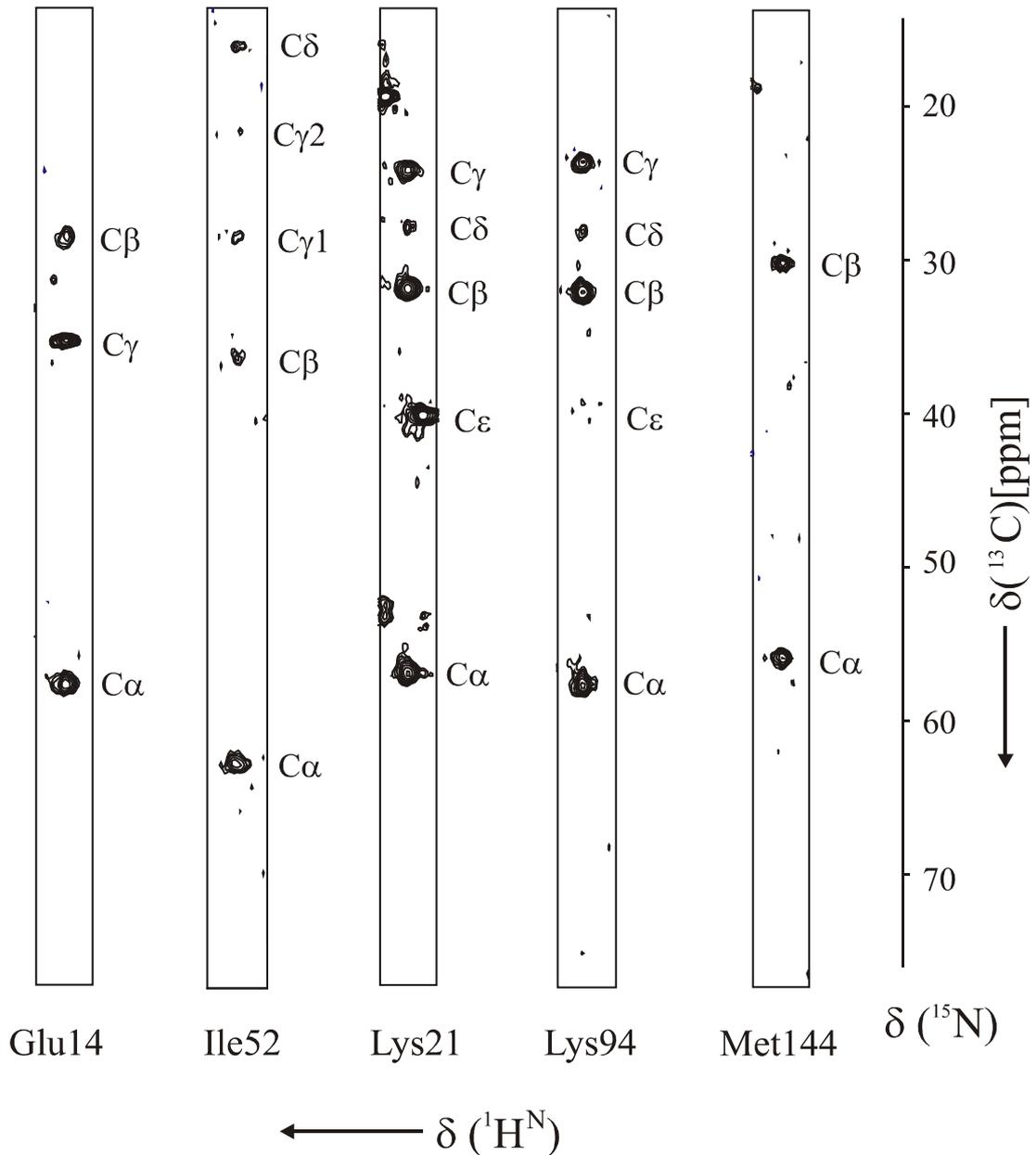


Abbildung 20: Zuordnung der  $^{13}\text{C}$ -Seitenkettenresonanzen im (H)CC(CO)NH Experiment.

Beispielsweise ist die  $\text{C}\epsilon$ -Resonanz von Lys94 kaum noch zu erkennen und die  $\text{C}\gamma$ -Resonanz von Met144 fehlt völlig. Neben der raschen Relaxation spielt dabei auch die Mischzeit für den homonuklearen  $^{13}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}$ -TOCSY-Transfer eine entscheidene Rolle,

die nicht für alle Kopplungstopologien gleich optimal gewählt werden kann. Dieselben Gründe führen auch bei  $H(CC)(CO)NH$ -Experiment (Abbildung 21) dazu, daß Resonanzen fehlen. Bei der Aminosäure Lys94 fehlen sowohl  $H_\delta$  als auch  $H_\epsilon$  Resonanzen und bei Met144 fehlt die  $H_\gamma$  Resonanz. Bei der Protonenzuordnung ist eine eindeutige Identifizierung erschwert, da sich die chemischen Verschiebungsbereiche stark überlappen und durch Sekundär- und Tertiärstruktur manchmal ungewöhnliche Verschiebungen zu finden sind. Für die exakte Zuordnung der Protonen war es daher hilfreich, vorher das  $HBHA(CO)NH$  Experiment auszuwerten, bei dem bereits die Zuordnung von  $H_\alpha$  und  $H_\beta$  meist eindeutig erfolgt.

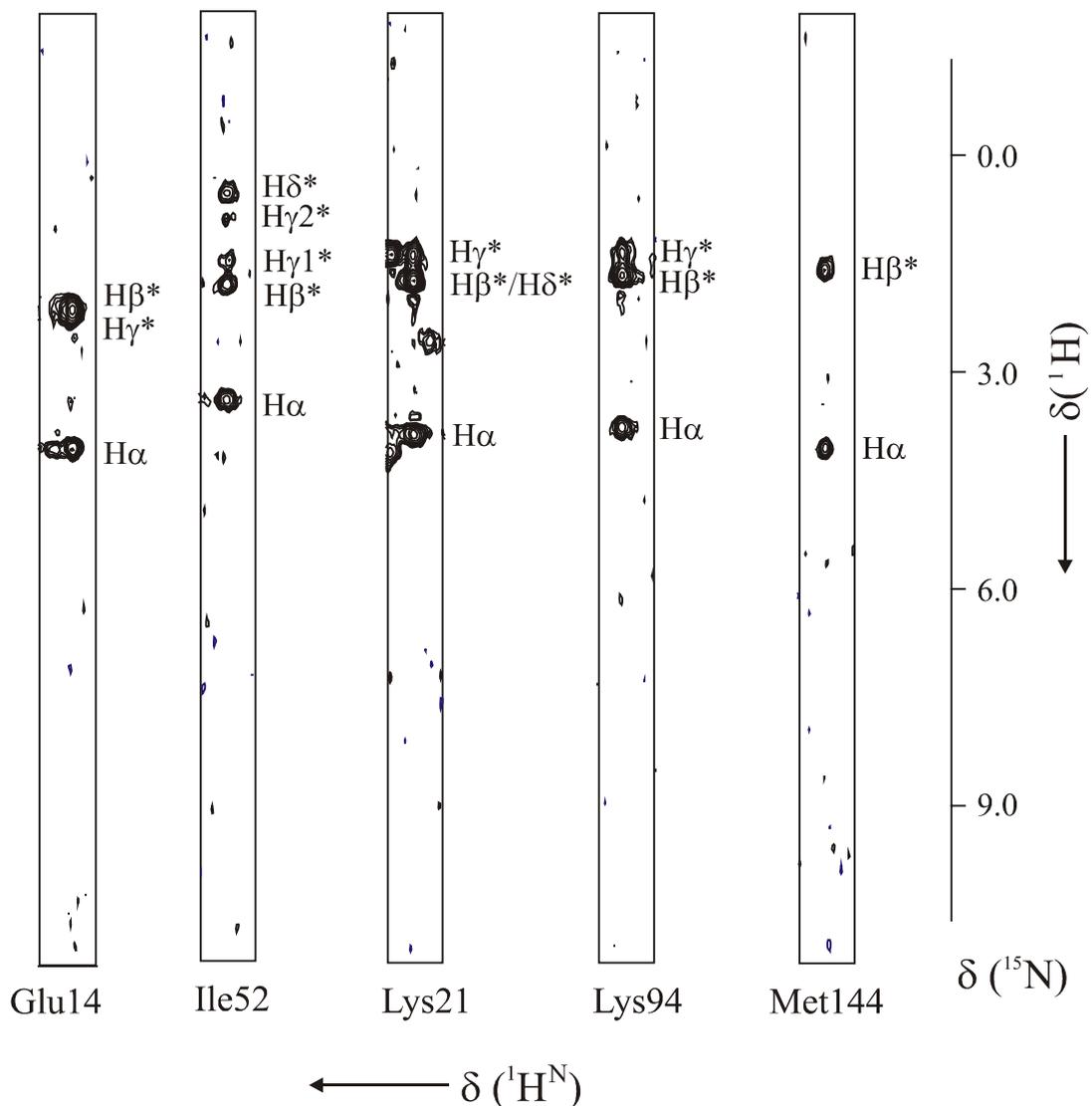


Abbildung 21: Zuordnung der  $^1H$ -Seitenkettenresonanzen im  $H(CC)(CO)NH$  Experiment.

Für die Zuordnung der restlichen Seitenkettenprotonen war jedoch die Aufnahme eines  $HCCH$ -TOCSY notwendig. Dieses Spektrum birgt einen hohen Informationsgehalt, da

es eine Korrelation von allen aliphatischen Kohlenstoffen mit allen aliphatischen Protonen gewährleistet. Dies führt allerdings auch zu einer massiven Überlagerung der Signale. Die Auswertung dieses Spektrum war daher nur mit der vorher gewonnenen Information aus (H)CC(CO)NH, H(CC)(CO)NH und HBHA(CO)NH möglich und wurde nur zur Vervollständigung der Zuordnung herangezogen. Am Beispiel von Aminosäure Valin 35 soll der Informationsgehalt des Spektrum demonstriert werden (Abbildung 22).

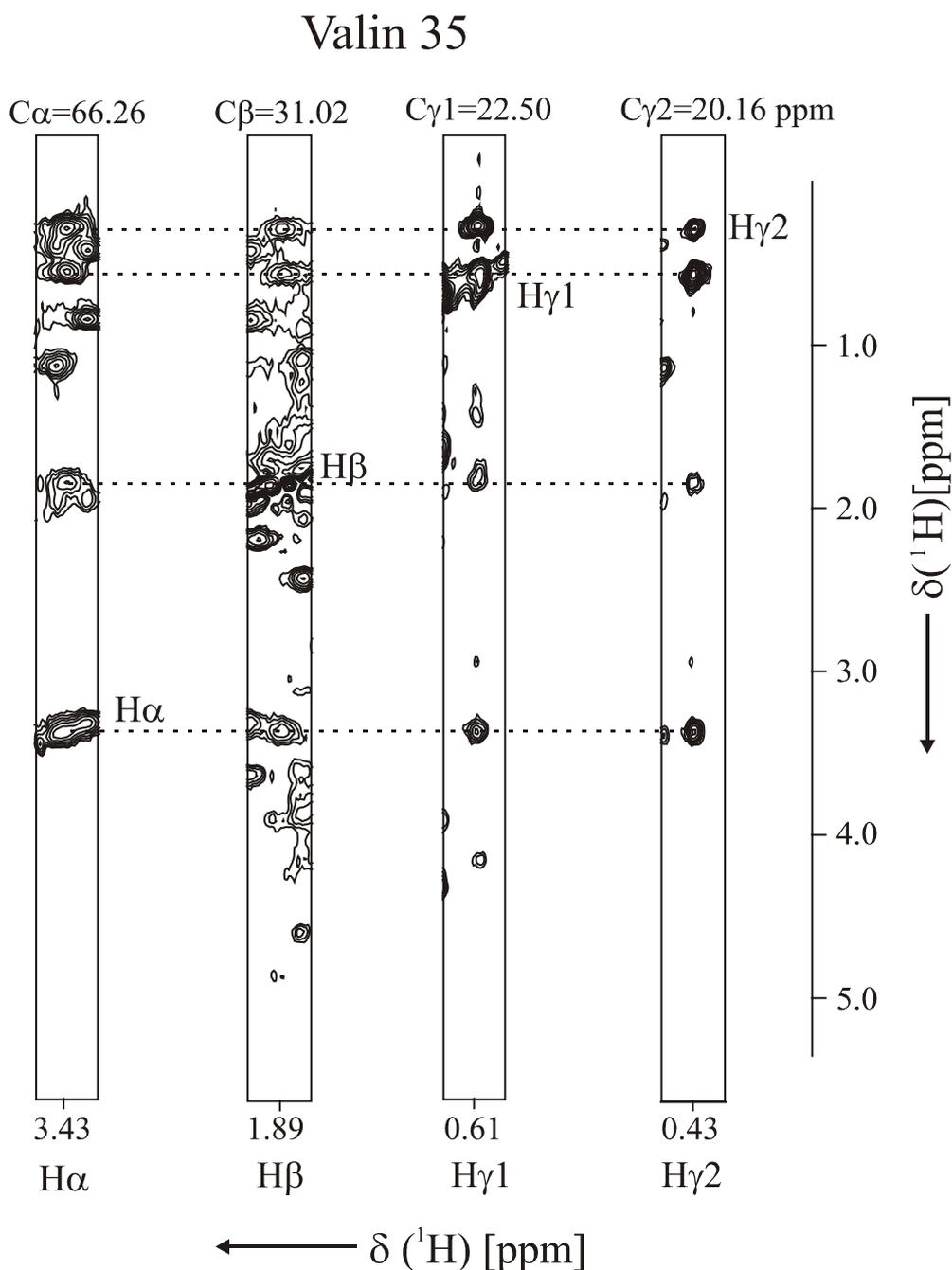


Abbildung 22:  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Zuordnung im  $\text{H}(\text{C})\text{CH}$ -TOCSY Spektrum. Als Beispiel ist das Spinsystem von Valin 35 dargestellt, das sich bei den verschiedenen  $^{13}\text{C}$  Ebenen, die  $C_\alpha$ ,  $C_\beta$ ,  $C_{\gamma1}$  und  $C_{\gamma2}$  entsprechen, wiederfinden läßt.

Gezeigt sind vier Ebenen aus dem dreidimensionalen Spektrum, die den vier Seitenkettenkohlenstoffen ( $C_\alpha$ ,  $C_\beta$ ,  $C_{\gamma 1}$  und  $C_{\gamma 2}$ ) des Valins entsprechen. Bei der Protonenfrequenz, die dem Proton entspricht, das an dem jeweiligen Kohlenstoff direkt gebunden ist, findet sich das gesamte Protonenspinsystem. Die Resonanz des direktgebundenen Protons liegt auf der Diagonalen und ist damit gut zu erkennen.

### 2.2.4 Zuordnung der aromatischen Seitenketten von Calmodulin

Um auch die  $^1\text{H}$  und  $^{13}\text{C}$  Seitenketten-Resonanzen der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin, Histidin und Tryptophan zuordnen zu können, ist die Aufnahme von speziellen NMR-Experimenten notwendig. Ein mögliches Experiment, das in der Arbeitsgruppe von Prof. Griesinger weiter entwickelt und im Rahmen dieser Arbeit angewendet wurde, ist das zweidimensionale (HB)CB(CCarom)H (80), bei dem die aromatischen Protonen mit der  $C_\beta$  chemischen Verschiebung korreliert werden. Der Magnetisierungstransfer von  $C_\beta$  auf  $C_\gamma$  erfolgt durch eine PLUSH-TACSY-Sequenz (81). Die Zuordnung der aromatischen Protonen ist besonders wichtig, da die Aromaten meistens in hydrophoben Taschen liegen und durch eine Vielzahl an Van-der-Waals-Wechselwirkungen die Tertiärstruktur eines Proteins stabilisieren. Im NOESY-Experiment weisen die aromatischen Protonen somit viele langreichweitige NOE-Kontakte auf, die für die Strukturbestimmung des Proteins besonders wertvoll sind.

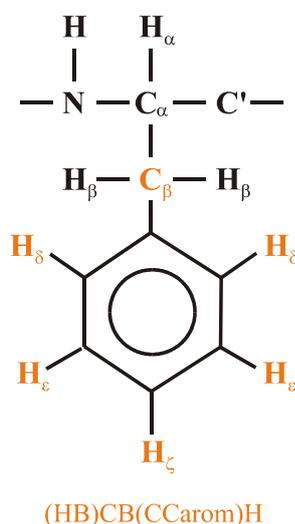


Abbildung 23: Korrelation des (HB)CB(CCarom)H-Experimentes zur Zuordnung von aromatischen Seitenketten.

In Abbildung 24 ist ein Ausschnitt des resultierenden Spektrums von CaM im Komplex mit C20W dargestellt und die vorgenommenen Zuordnungen eingezeichnet.

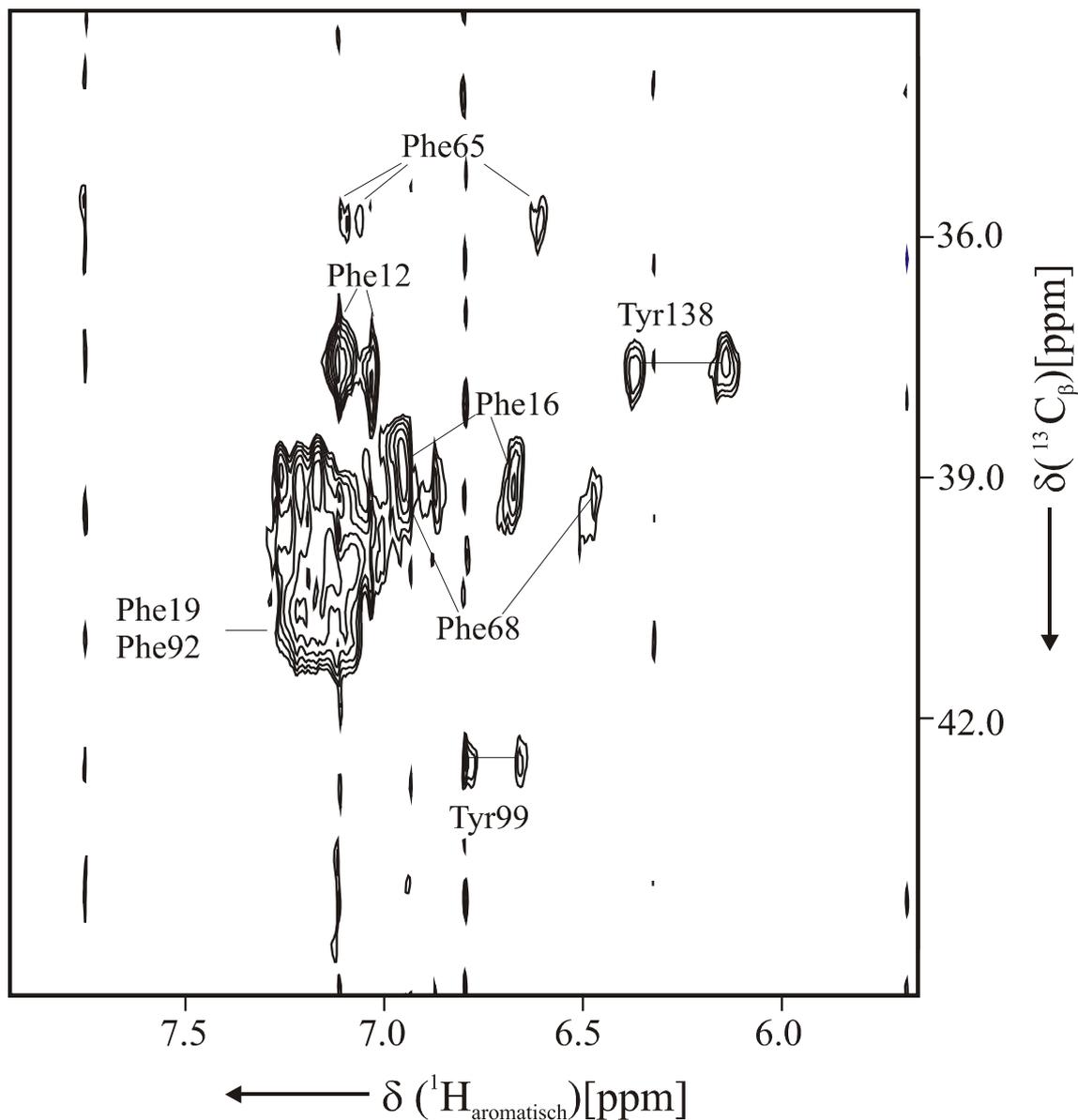
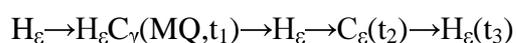


Abbildung 24: Zuordnung der aromatischen Protonen mittels des zweidimensionalen  $(HB)CB(CC_{arom})H$  Spektrums.

Die Resonanz des  $H_{\delta 2}$  Protons des einzigen Histidins His107 konnte nicht gefunden werden, da in dem entsprechenden Spektrumsausschnitt bei  $C_{\beta} = 30,44$  ppm keinerlei Signale zu sehen waren. Eindeutig gelang die Zuordnung der Protonen der beiden Tyrosine Tyr99 und Tyr138 und der beiden Phenylalanine Phe12 und Phe65. Bei den Phenylalaninen Phe16, Phe19, Phe68 und Phe92 bereitete die Überlagerung der  $C_{\beta}$  chemischen Verschiebung und die schlechte Auflösung der Signale Schwierigkeiten bei der Zuordnung. Mit Hilfe von weiteren Informationen aus den NOESY- $^1H, ^{13}C$ -HSQC war dann nur eine teilweise Zuordnung der aromatischen Protonen möglich. Phenylalanin Phe89 konnte gar nicht zugeordnet werden.

### 2.2.5 Zuordnung der Methionine im Calmodulin

Auch die  $\epsilon$ -Methylgruppen der Methionine sind oft in die Struktur des Proteins eingebunden und somit ist deren Zuordnung von Interesse für die Strukturbestimmung. In der vorliegenden Arbeit wurde hierfür ein dreidimensionales HMBC-HSQC (82) und ein LRCC (*long range*  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  correlation) Experiment (82) aufgenommen. Das HMBC-HSQC-Experiment, dessen Pulssequenz in Abbildung 25 dargestellt ist, korreliert die  $^1\text{H}_\epsilon$  und  $^{13}\text{C}_\epsilon$ -Resonanz über den Schwefel hinweg mit der  $^{13}\text{C}_\gamma$  Resonanz (Abbildung 26a). Der Magnetisierung wird dabei wie folgt transferiert:



wobei im ersten Schritt heteronukleare  $\text{H}_\epsilon\text{C}_\gamma$  Multiquanten(MQ)-Kohärenz angeregt wird und die Magnetisierung auf dem  $\text{C}_\gamma$  evolviert. Der erste Teil des Experiment entspricht damit einem HMBC (*heteronuclear multiple-bond correlation*) (83) und darauf folgt ein *constant-time* HSQC (*heteronuclear single quantum coherence*) Experiment (84,85,86).

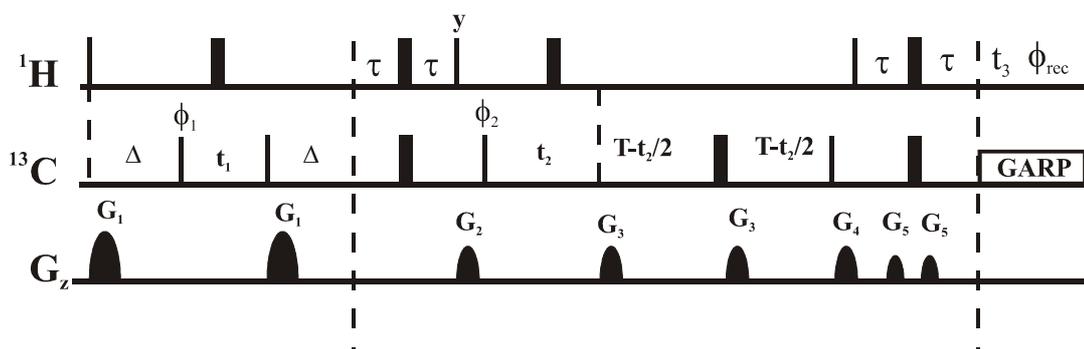


Abbildung 25: Pulssequenz des 3D HMBC-HSQC Experimentes. In dem ersten HMBC Schritt wird heteronukleare  $\text{H}_\epsilon\text{C}_\gamma$  Multiquanten(MQ)-Kohärenz angeregt.  $90^\circ$  bzw.  $180^\circ$  Pulse werden durch schmale bzw. breite Rechtecke symbolisiert, deren Phase, wenn nicht anders angegeben,  $x$  ist. Verwendete Delays:  $\Delta = 28.4$  ms (optimiert auf  $^1J(\text{C}_\epsilon\text{H}_\epsilon) = 140.8$  Hz);  $\tau = 1.75$  ms;  $T = 7.5$  ms;  $G_{1,2,3,4,5} = 1.6, 2.5, 0.5, 0.3, 0.1$  ms. Phasenzyklus:  $\Phi_1 = x, -x$ ;  $\Phi_2 = x, x, -x, -x$ ; Receiver =  $x, -x, -x, x$ . Die Phasen  $\Phi_1, \Phi_2$  werden entsprechend der States-TPPI-Methode (87) inkrementiert, um Quadraturdetektion während  $t_1$  und  $t_2$  zu ermöglichen.

Bei dem LRCC Experiment erfolgt die Korrelation von  $^1\text{H}_\epsilon$  und  $^{13}\text{C}_\epsilon$ - Resonanzen noch weiter bis zur  $^{13}\text{C}_\beta$ -Resonanz (Abbildung 26b).

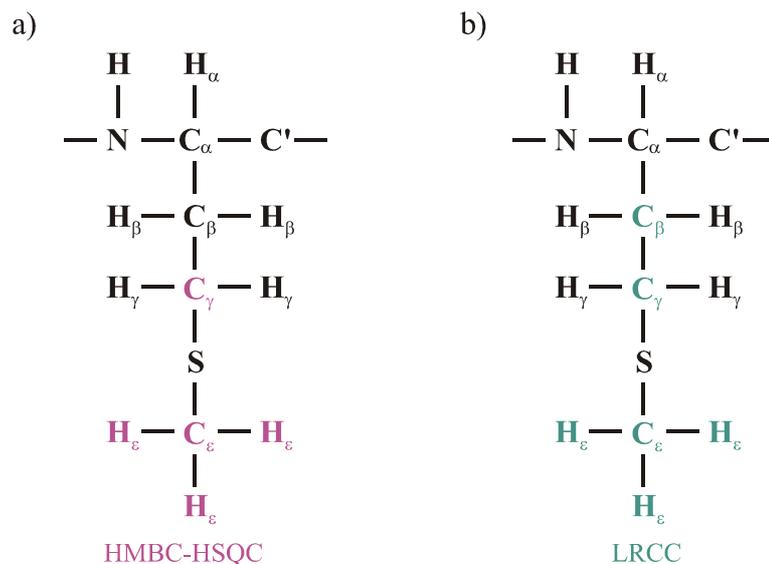


Abbildung 26: Zuordnungsexperimente für die  $\epsilon$ -Methylgruppe von Methioninen.

Wie bereits in Kapitel 1.6 erwähnt, besitzt CaM eine außergewöhnlich hohe Anzahl an Methioninen, die für die Bindung von CaM an verschiedene Zielenzyme wichtig sind. Die Zuordnung der  $\epsilon$ -Methylgruppen der neun Methionine war daher von entscheidender Bedeutung, da von ihnen ausgehend viele NOE Kontakte zu dem Peptid C20W beobachtet werden konnten. Mit den bisher beschriebenen Experimenten läßt sich jedoch keine Zuordnung erreichen, da in diesen Experimenten kein Magnetisierungstransfer über den Schwefel hinweg erfolgt. In Abbildung 27 ist das Spektrum der zweidimensionalen  $^1\text{H}_\epsilon$ ,  $^{13}\text{C}_\epsilon$ -Korrelation des HMBC-HSQC-Experimentes des CaM/C20W-Komplexes gezeigt, und die entsprechende Zuordnung der neun  $\epsilon$ -Methylgruppen der Methionine ist eingezeichnet.

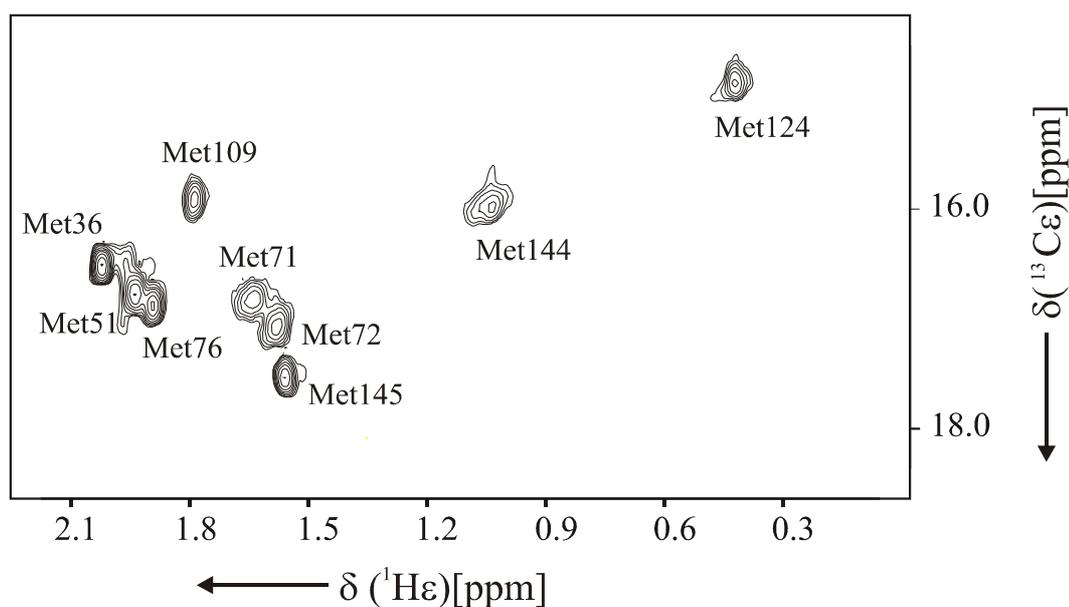


Abbildung 27:  $^1\text{H}_\epsilon$ ,  $^{13}\text{C}_\epsilon$ -Korrelation des HMBC-HSQC-Experimentes. Die neun Methionine von CaM sind zugeordnet.

Eine große Schwierigkeit bei der korrekten Zuordnung war die geringe Dispersion der  $^{13}\text{C}_\gamma$  chemischen Verschiebung, wie deutlich in Abbildung 28 zu sehen ist. Deshalb wurde zusätzlich ein LRCC-Experiment aufgenommen, in dem zusätzlich zur  $\text{H}_\alpha/\text{C}_\beta/\text{C}_\gamma$  Korrelation eine Korrelation zu  $\text{C}_\beta$  vorhanden ist, welches aber ein schlechtes Signal-zu-Rausch-Verhältnis aufwies. Mit dieser zusätzlichen Information und weiteren Informationen aus dem NOESY- $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC war schließlich die gesamte Zuordnung der Resonanzen möglich.

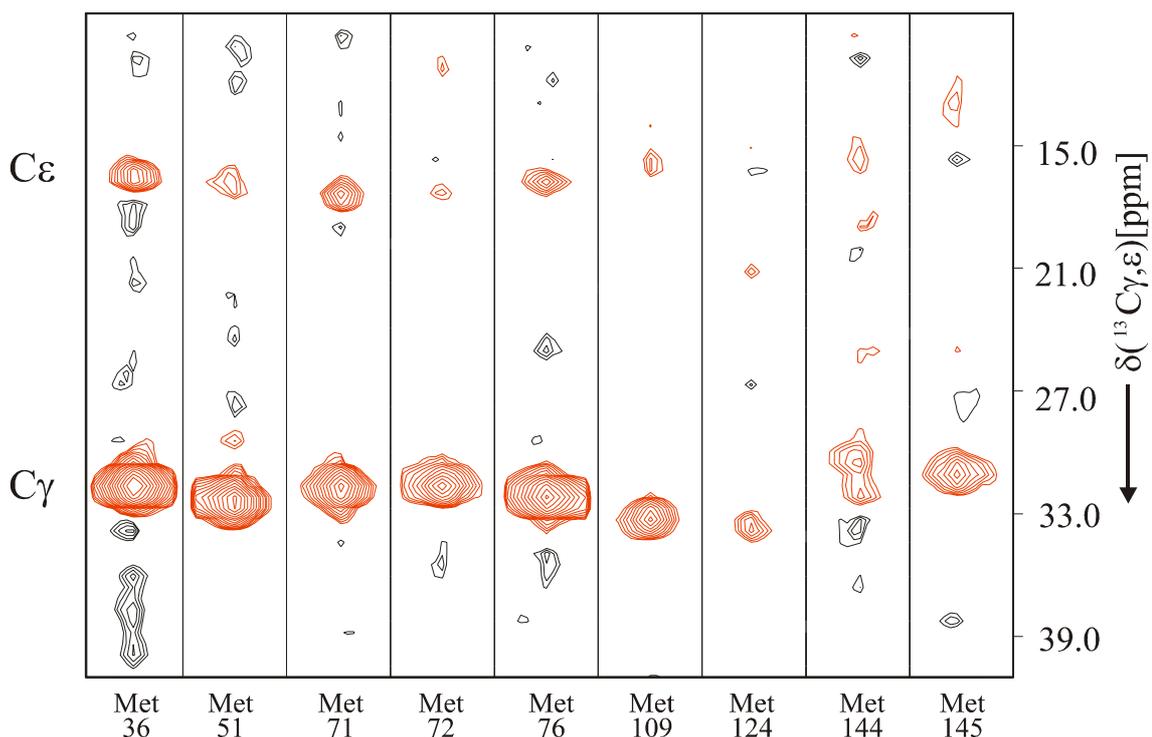


Abbildung 28: Streifenplot des dreidimensionalen HMBC-HSQC. Die Ebenen sind entlang den entsprechenden  $^{13}\text{C}_\epsilon$ -chemischen Verschiebung aus dem dreidimensionalen Spektrum dargestellt. Bei der entsprechenden  $^1\text{H}_\epsilon$ -chemischen Verschiebung findet man die Resonanzen von  $\text{C}_\epsilon$  und  $\text{C}_\gamma$ .

## 2.2.6 Auswertung der NOESY-Spektren und Gewinnung von Abstandsinformationen

Nachdem die Zuordnung der Rückgrat- und Seitenkettenresonanzen von CaM abgeschlossen war, wurde zunächst das 3D NOESY- $^{15}\text{N}$ ,  $^1\text{H}$ -HSQC und anschließend das 3D NOESY- $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ -HSQC ausgewertet und die zugeordneten NOE's in Abstandsinformationen für die Strukturrechnung (*restraints*) übertragen.

Für die Zuordnung der NOE-Kreuzsignale in dem NOESY- $^{15}\text{N}$ ,  $^1\text{H}$ -HSQC Spektrum wurde aus dem dreidimensionalen Spektrum mit Hilfe des FELIX-Macros *mkstrip.mac* (Anhang 6.8) eine zweidimensionale Stripmatrix erstellt, um die zeitaufwendige

Auswertung des dreidimensionalen Spektrums zu vermeiden. Hierzu wurde jeweils die Ebene bei der entsprechenden  $^{15}\text{N}$ -chemischen Verschiebung aus dem dreidimensionalen Spektrum herausgeholt und um die entsprechende  $^1\text{H}$ -chemische Verschiebung ein Streifen herausgeschnitten, in dem sämtliche NOE-Kreuzresonanzen ausgehend von dem Amidproton des dazugehörigen Spinsystems zu sehen sind. Diese Streifen wurden der Sequenz von CaM entsprechend aneinandergereiht. Ein Ausschnitt dieser Stripmatrix ist in Abbildung 29 zu sehen. Diese Darstellung ermöglicht eine rasche und übersichtliche Auswertung des dreidimensionalen Spektrums. Die sequentiellen und mittelreichweitigen NOE-Kreuzsignale können sofort erkannt werden.

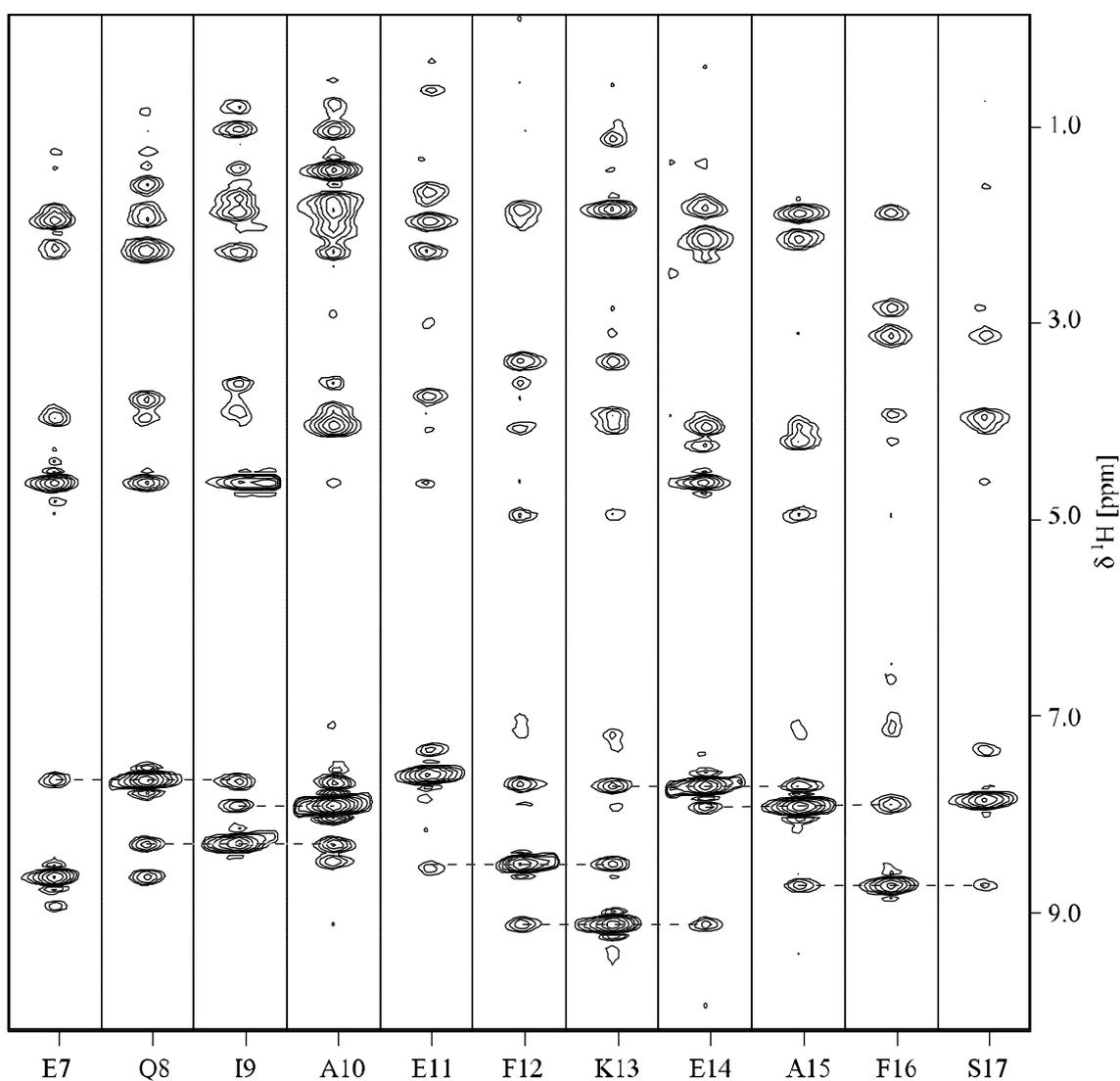


Abbildung 29: Stripmatrix des 3D NOESY- $^{15}\text{N}$ ,  $^1\text{H}$ -HSQC. Im  $^1\text{H}$ -Bereich sind sequentielle NOE-Kreuzsignale durch gestrichelte Linien angedeutet.

Für die Auswertung des 3D NOESY- $^{13}\text{C}$ , $^1\text{H}$ -HSQC war die Erstellung einer Stripmatrix nicht vorteilhaft, da das  $^{13}\text{C}$ , $^1\text{H}$ -HSQC sehr starke Überlagerung aufweist (Kapitel 2.2.1). Daher mußte direkt das dreidimensionale NOESY- $^{13}\text{C}$ , $^1\text{H}$ -HSQC-Spektrum systematisch ausgewertet werden, was mit einem erheblich größeren Zeitaufwand verbunden war.

Für die manuelle Auswertung der NOE-Kreuzresonanzen bietet das Programm FELIX ein Auswahlmenue an, in dem alle Zuordnungsmöglichkeiten innerhalb einer wählbaren Toleranzgrenze angegeben werden, wenn die vollständige Zuordnung in der programmeigenen Datenbank vorliegt. Mit dieser Vorgehensweise wurden sämtliche NOE-Kreuzresonanzen überprüft und bei einer eindeutigen Zuordnung entsprechend markiert und in einer Peakliste erfaßt. Mit Hilfe dieser Liste, die die Zuordnung und die Integrale der NOE's enthielt, wurde eine *restraint*-Liste erstellt, wobei eine Einteilung der NOE's nach stark, mittel und schwach entsprechend der Integrale der Peaks vorgenommen wurde.

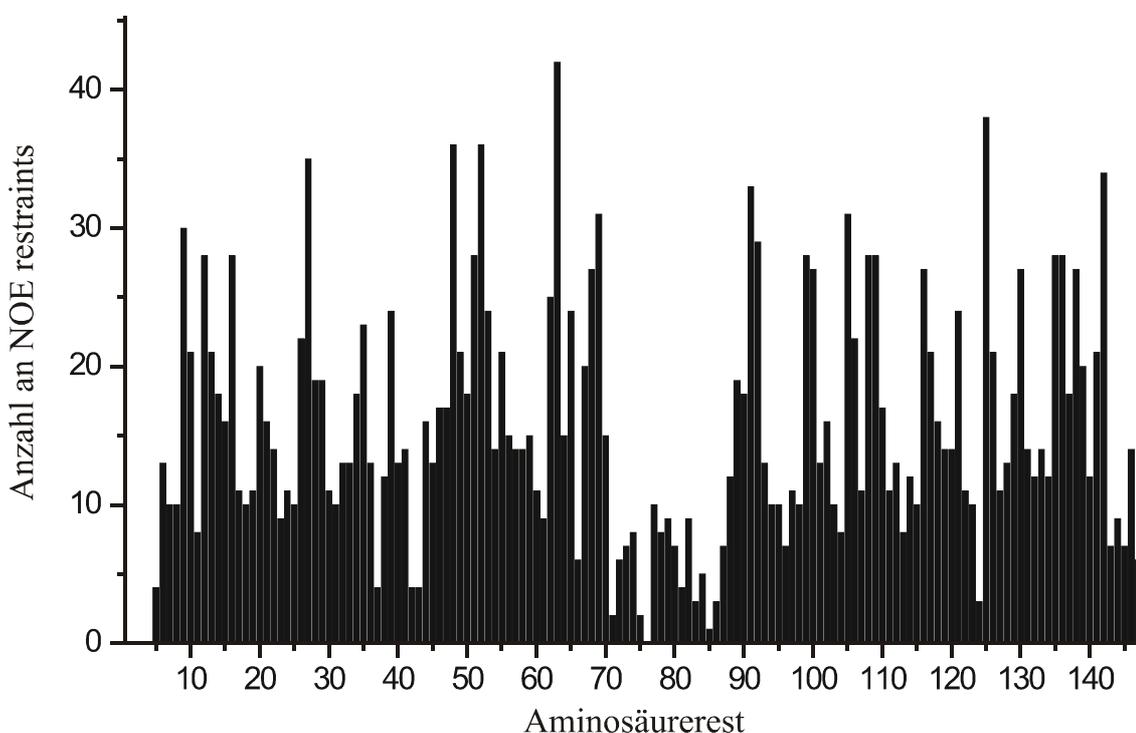


Abbildung 30: Anzahl der NOE restraints pro Aminosäure für CaM.

Mit diesen ersten, eindeutigen NOE *restraints* wurden Strukturrechnungen nur von CaM, ohne das Peptid C20W, durchgeführt, die eine grobe Faltung und erste Anzeichen der Sekundärstrukturelemente ergaben. Mit Hilfe dieser Grobstruktur als Distanzfilter wurden dann weitere Zuordnungen von NOE's getroffen, die zu einer Verbesserung der Struktur in den Rechnungen führte. Mit diesen besser definierten Strukturen wurden wiederum neue Zuordnungen möglich. Dieser Prozeß wurde mehrfach wiederholt, so daß letztendlich insgesamt 1645 NOE *restraint* (15,6 NOE's pro Aminosäurerest) bestimmt werden konnten, die sich in 794 intraresiduale, 387 sequentielle, 311

mittelreichweitige (bis zu 5 Aminosäurereste Abstand) und 153 langreichweitige *restraints* unterteilen. Für die Strukturrechnung sind dabei die langreichweitigen NOE's am wichtigsten, die die dreidimensionale Faltung der Proteinkette bestimmen. Die sequentiellen und mittelreichweitigen NOE's definieren vor allem die Sekundärstruktur und die intraresidualen NOE's die Konformation der Aminosäureseitenketten. Die Anzahl der NOE's sollte entlang des Proteinrückgrats keine Lücken aufweist. In Abbildung 30 erkennt man, das eine kontinuierliche Anzahl an NOE's pro Aminosäurerest gegeben ist, bis auf den flexiblen Bereich zwischen den beiden Domänen von CaM (Arg74-Glu84). Hier sinkt die Anzahl der NOE's ab und weist auch eine Lücke auf, da in diesem Bereich die Zuordnung der Resonanzen und die NOE-Auswertung stark erschwert war. Die Resonanzen der Aminosäuren in diesem Bereich sind sehr breit, da die erhöhte Flexibilität zu einer schnelleren Relaxation der Magnetisierung führt.

### 2.2.7 Temperaturkoeffizient der Amidprotonen

Für die Strukturbestimmung von Proteinen ist die Ermittlung der Wasserstoffbrücken wichtig, die die verschiedenen Sekundärstrukturelemente stabilisieren. In  $\alpha$ -Helices findet man eine Verbrückung zwischen der N-H-Gruppe der Aminosäure (i) zu dem Carbonylsauerstoff der Aminosäure (i-4).  $\beta$ -Faltblätter werden hingegen durch Wasserstoffbrücken zwischen verschiedenen Strängen hinweg stabilisiert. Die Austauschraten der Amidprotonen, die in Wasserstoffbrücken involviert sind, sind deutlich niedriger als bei den Amidprotonen, die dem Lösungsmittel Wasser frei zugänglich sind. Durch die Bestimmung der Austauschraten lassen sich somit die Donoren der Wasserstoffbrücken identifizieren. Durch erste Strukturrechnungen oder durch das Erstellen des chemischen Verschiebungsindex (88,89,90) (Kapitel 2.6.1) sind die Sekundärstrukturelemente im ersten Ansatz bekannt, so daß man mit guter Genauigkeit den Akzeptor der Wasserstoffbrücke bestimmen und dann diese Information als *restraint* in der folgenden Strukturrechnung verwendet werden kann.

Die Bestimmung der Austauschrate der Amidprotonen ist durch die Messung des H/D-Austausches möglich (50). Hierzu wird das Protein lyophilisiert und anschließend in reines D<sub>2</sub>O eingebracht. Lösungsmittelzugängliche Protonen werden dabei rasch durch Deuterium ersetzt, wohingegen Protonen in Wasserstoffbrücken oder in lösungsmittelunzugänglicher Umgebung erst nach einiger Zeit (Stunden bis Tage) ersetzt werden, so daß diese Protonen beispielsweise in einem <sup>1</sup>H,<sup>15</sup>N-HSQC beobachtet werden können. Ist der Wechsel des Lösungsmittels nicht ohne Schwierigkeiten möglich, kann auch der Einfluß von pH-Wert- oder Temperaturänderung auf die chemische Verschiebung der Amidprotonen zur Bestimmung der Wasserstoffbrückendonoren herangezogen werden (91,92). Je größer die Austauschrate des

Amidprotonen mit dem Wasser ist, desto größer ist auch die Änderung der chemischen Verschiebung des Amidprotonen mit Variation von pH-Wert oder Temperatur.

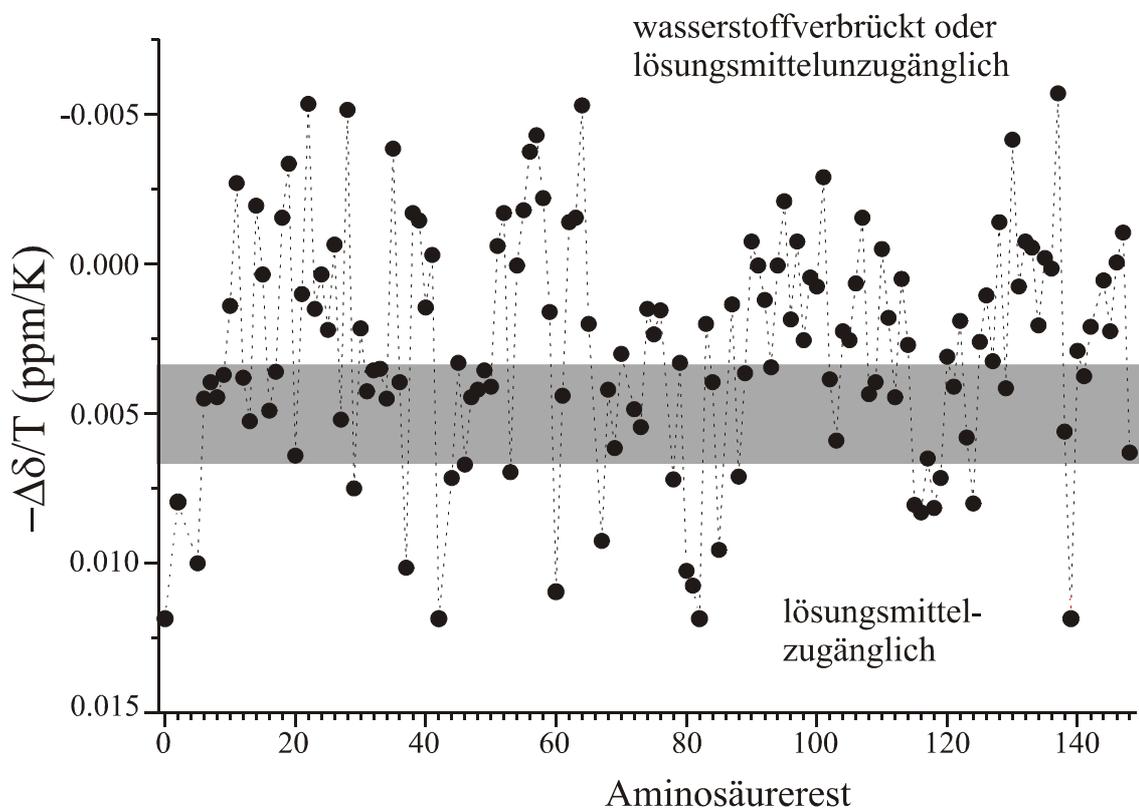


Abbildung 31: Temperaturkoeffizienten der Amidprotonen von CaM im Komplex mit C20W. Werte kleiner als  $0.003$  ppm/K deuten auf Wasserstoffbrücken oder auf eine lösungsmittelzugängliche Umgebung hin.

Bei dem CaM/C20W-Komplex war die Messung des H/D-Austausches unmöglich, da der Komplex bei dem Lyophilisieren irreversibel ausfällt und nicht mehr in Lösung gebracht werden kann. Daher wurden eine Reihe von  $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HSQC's bei fünf verschiedenen Temperaturen (301, 303, 305, 307, und 309 K) aufgenommen und daraus der Temperaturkoeffizient der chemischen Verschiebung der Amidprotonen bestimmt (Abbildung 31). War der Temperaturkoeffizient kleiner als  $-0.003$  ppm/K, wurde überprüft, ob das Amidproton in einer Wasserstoffbrücke vorliegt, indem in den vorläufigen Strukturen des Komplexes nach räumlich benachbarten Akzeptoren gesucht wurde. Mit Hilfe dieses Verfahrens gelang es, 52 Wasserstoffbrücken innerhalb des CaMs eindeutig zu identifizieren, wobei 48 Wasserstoffbrücken in den acht verschiedenen  $\alpha$ -Helices zu finden waren und 4 Wasserstoffbrücken die kurzen  $\beta$ -Faltblätter stabilisieren.

Kürzlich entwickelte NMR-Experimente erlauben inzwischen die direkte Bestimmung von Wasserstoffbrücken in Proteinen durch die direkte Messung der interresidualen  $^3\text{h}J_{\text{NC}}$ -Kopplung über die Wasserstoffbrücke hinweg (93,94,9591a,b,c).

### 2.2.8 Bestimmung von $^3J_{\text{HNH}\alpha}$ - Kopplungskonstanten und Gewinnung der Diederwinkel-restraints für $\Phi$ und $\Psi$

Neben den Abstandsinformationen, die aus NOE's gewonnen werden, und den Wasserstoffbrücken ist für die Strukturrechnung von Proteinen der Einsatz von Diederwinkel-restraints wichtig. Wertvolle strukturelle Information über die Konformation des Proteinrückgrats liefern die Winkel  $\Phi$  und  $\Psi$ , die entsprechend der IUPAC-IUB-Konvention (96,97) entlang der Atome  $\text{C}'_{i-1}-\text{N}_i-\text{C}_{\alpha i}-\text{C}'_i$  bzw.  $\text{N}_i-\text{C}_{\alpha i}-\text{C}'_i-\text{N}_{i+1}$  definiert sind (Abbildung 32). Da die Peptidbindung planar ist und vorzugsweise in der trans-Konformation vorliegt, wird der Torsionswinkel  $\omega$  ( $\text{C}_{\alpha i-1}-\text{C}'_{i-1}-\text{N}_i-\text{C}_{\alpha i}$ ) in der Strukturrechnung standardmäßig auf  $180^\circ$  gesetzt. Eine cis/trans-Isomerisierung der Peptidbindung tritt nur bei der Aminosäure Prolin auf. Die Seitenkettenkonformation der Aminosäurereste wird definiert durch die Torsionswinkel  $\chi_1, \chi_2$  usw.

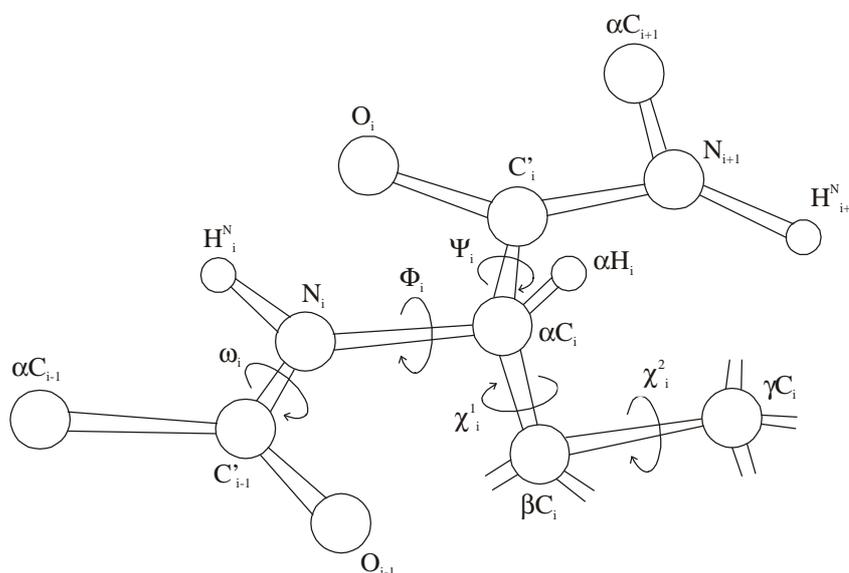


Abbildung 32: Ausschnitt aus einer Polypeptidkette mit der Standardnomenklatur für die Atome und die Diederwinkel (96).

Die Größe der Torsionswinkel kann durch die Messung der jeweiligen Kopplungskonstanten bestimmt werden, wobei der Zusammenhang zwischen der skalaren Kopplungskonstanten und dem Diederwinkel durch die Karplus-Beziehung gegeben ist (98,99).

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

Die dimensionslosen Karplus-Koeffizienten A, B und C müssen semiempirisch bestimmt werden. Für die Kopplungskonstante  $^3J_{\text{HNH}\alpha}$  zwischen dem Amidproton  $\text{H}^{\text{N}}$

und dem  $H_{\alpha}$ -Proton, die standardmäßig für die Strukturbestimmung von Proteinen bestimmt wird, wurden folgende Werte gefunden (100).

$${}^3J_{\text{HNH}\alpha} = 7,09 \cos^2\Theta - 1,42 \cos\Theta + 1,55 \quad \text{mit } \Theta = |\Phi - 60^\circ|$$

Der Proteinrückgratwinkel  $\Phi$  nimmt in den typischen Sekundärstrukturelementen von Proteinen folgende Werte an (101):

$$\begin{array}{lll} \alpha\text{-Helix:} & \Phi = -64.7^\circ \pm 12.6^\circ & {}^3J_{\text{HNH}\alpha} = 4.8 \text{ Hz} \\ \beta\text{-Faltblatt:} & \Phi = -112.6^\circ \pm 41.4^\circ & {}^3J_{\text{HNH}\alpha} = 8.5 \text{ Hz} \end{array}$$

Für die Bestimmung von Kopplungskonstanten stehen verschiedene Methoden zur Verfügung, z. B. quantitative J-Korrelationsexperimente (102,103), E.COSY-Experimente (104,105,106) oder Doppelquanten-Nullquanten-(DQ-ZQ)-Experimente (107). In quantitativen J-Korrelationsexperimenten wird die Kopplungskonstante aus Signalintensitäten bestimmt, die durch die Kopplungskonstante moduliert sind. Bei dem E.COSY-Prinzip (*Exclusive Correlation Spectroscopy*) erfolgt eine Aufspaltung des Signalmultipletts mit einer großen, skalaren Kopplung, so daß ein genaues Auslesen der interessierenden, kleinen Kopplung möglich wird.

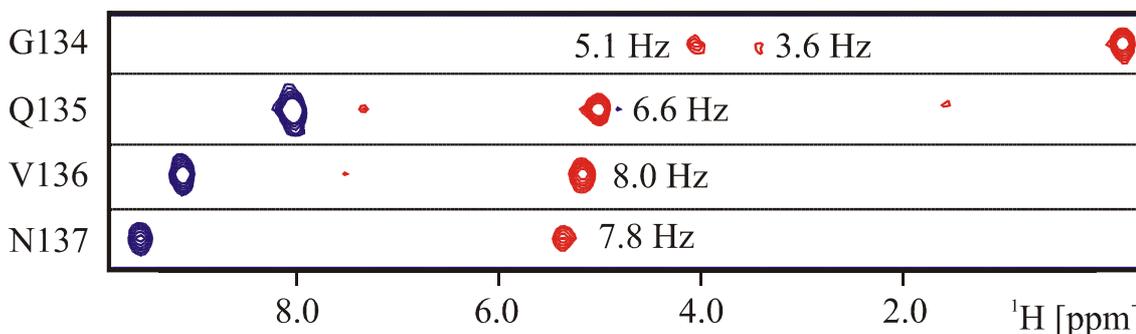


Abbildung 33: Ausschnitte aus dem quantitativen 3D HNHA-Spektrum für die Aminosäurereste Gly134 bis Asn137. Diagonalsignale (blau) sind mit  $\cos^2(\pi J_{\text{IS}\tau})$  und Kreuzsignale (rot) mit  $-\sin^2(\pi J_{\text{IS}\tau})$  moduliert und besitzen daher umgekehrtes Vorzeichen. Aus dem Verhältnis der Intensitäten des Diagonalpeaks zum Kreuzpeak läßt sich die Kopplungskonstante  ${}^3J_{\text{HNH}\alpha}$  ermitteln, die eingezeichnet ist.

Für die Bestimmung der  ${}^3J_{\text{HNH}\alpha}$ -Kopplungskonstanten von CaM im Komplex mit C20W wurde ein HNHA-Experiment (108,109) aufgenommen, bei dem die Extraktion der Kopplungskonstante nach dem quantitativen J-Korrelations-Prinzip erfolgt. Das HNHA-Experiment entspricht einer Überlagerung eines  ${}^1\text{H}, {}^{15}\text{N}$ -HMQC-Experimentes mit einem COSY-artigen  ${}^1\text{H}^{\text{N}}\text{-}{}^1\text{H}_{\alpha}$  Transfers, so daß man eine Korrelation von  ${}^1\text{H}^{\text{N}}, {}^{15}\text{N}$

und  $^1\text{H}_\alpha$  in den drei Dimensionen des Spektrums erhält. Eine genaue Beschreibung des Experimentes mit der Pulssequenz und einer Beschreibung der Spinoperatoren findet sich in (108,109,110).

Aus dem Verhältnis der Signalintensitäten von Kreuz- und Diagonalpeak,  $I_K$  und  $I_D$ , läßt sich nach folgender Gleichung die  $^3J_{\text{HNH}\alpha}$ -Kopplungskonstante ermitteln, wobei  $\xi = 13,4$  ms dem Refokussierungs-Delay entspricht:

$$I_K/I_D = -\tan^2(2\pi\xi \cdot ^3J_{\text{HNH}\alpha})$$

Die so bestimmten  $^3J_{\text{HNH}\alpha}$ -Kopplungskonstanten sind aufgrund des  $\text{H}_\alpha$  *spin flip* Effekts systematisch zu klein, so daß die Werte mit einem uniformen Korrekturfaktor multipliziert werden müssen. Bei der Annahme von einer Relaxationszeit  $T_1 \approx 100$  ms für die  $\text{H}_\alpha$ -Protonen ergibt sich in erster Näherung ein Faktor von 1.11 (108).

In Abbildung 33 sind Ausschnitte aus dem HNHA-Spektrum für die Aminosäurereste Gly134 bis Asn137 gezeigt, wobei die Ebenen für die entsprechenden  $^{15}\text{N}$ -chemischen Verschiebungen in  $\omega_2$  dargestellt sind und ein Ausschnitt um die entsprechende  $\text{H}^{\text{N}}$ -chemische Verschiebung in  $\omega_3$  gezeigt ist. In  $\omega_1$  findet man dann jeweils einen Diagonalpeak bei der  $\text{H}^{\text{N}}$ -chemischen Verschiebung und einen Kreuzpeak bei der  $\text{H}_\alpha$  Verschiebung. Diagonalsignale sind mit  $\cos^2(\pi J_{\text{IS}}\tau)$  und Kreuzsignale mit  $-\sin^2(\pi J_{\text{IS}}\tau)$  moduliert und besitzen daher entgegengesetztes Vorzeichen. Bei Glycin 134 findet man zwei Kreuzpeaks für die beiden  $\text{H}_\alpha$ -Protonen, so daß man zwei  $^3J_{\text{HNH}\alpha}$ -Kopplungskonstanten ermitteln kann. Da die  $\text{H}_\alpha$ -Protonen jedoch nicht stereospezifisch zugeordnet sind, läßt sich aus den beiden Werten kein Diederwinkel-*restraint* für die Strukturrechnung gewinnen.

Für die Bestimmung der  $^3J_{\text{HNH}\alpha}$ -Kopplungskonstanten aus dem HNHA-Spektrum des CaM/C20W-Komplexes wurden die Kreuz- und Diagonalpeaks manuell im Programm FELIX zugeordnet und die Intensitäten und Voluminas der Signale mit dem Macro *xpk\_hgt\_vol3d.mac* (Anhang 6.8) ausgelesen. Die Umrechnung der Signalintensitäten in die entsprechende Kopplungskonstante wurde mit Hilfe des C-Programms *baxie.c* (Anhang 6.8) vorgenommen. Abschließend wurden die Werte mit dem Korrekturfaktor 1.11 multipliziert. Es konnten 96  $^3J_{\text{HNH}\alpha}$ -Kopplungskonstanten bestimmt werden (Abbildung 34), wobei die übrigen 52 Kopplungskonstanten wegen Überlagerung der Signale und bei Glycinen fehlen.

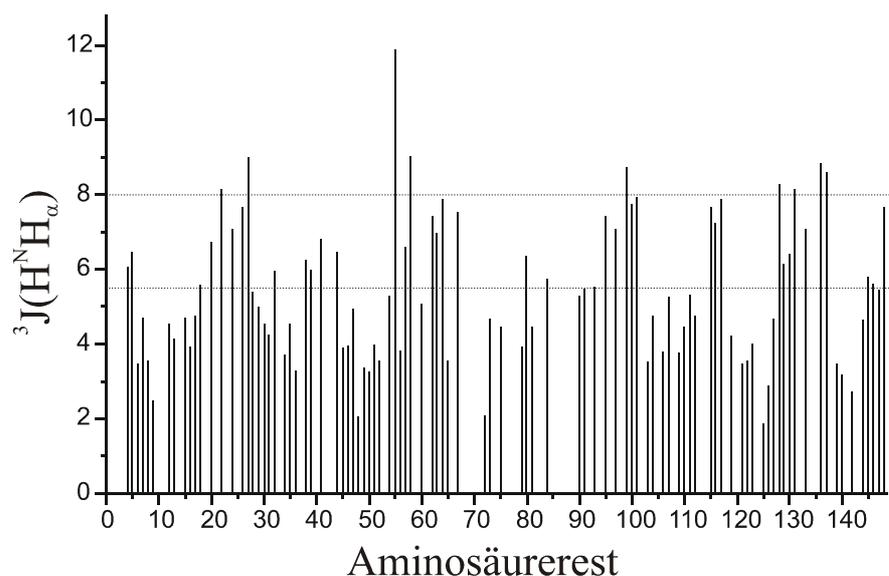


Abbildung 34: Auftragung der gemessenen  ${}^3J_{\text{HNH}\alpha}$ -Kopplungskonstanten gegen die Sequenzposition der Aminosäurereste. Werte größer als 8 Hz deuten auf  $\beta$ -Faltblattstrukturen hin, Werte kleiner als 5.5 Hz auf  $\alpha$ -Helices.

Aus den ermittelten  ${}^3J_{\text{HNH}\alpha}$ -Kopplungskonstanten wurden Torsionswinkel-*restraints* für die Strukturrechnung des CaM/C20W-Komplexes bestimmt, wobei diese erst in der späteren Phase der Strukturrechnung hinzugenommen wurden, nachdem die Lage der Sekundärstrukturelemente im CaM schon bekannt war und diese Information bei der Auswahl der Torsionswinkel-*restraints* berücksichtigt wurden. Für  ${}^3J_{\text{HNH}\alpha}$ -Kopplungskonstanten kleiner als 5,5 Hz, die typisch für  $\alpha$ -helicale Bereiche sind, wurde der Torsionswinkel  $\Phi$  auf  $-65^\circ (\pm 25^\circ)$  beschränkt. Für  ${}^3J_{\text{HNH}\alpha}$ -Kopplungskonstanten größer als 8 Hz, die charakteristisch für  $\beta$ -Faltblattstrukturen sind, wurde der Torsionswinkel  $\Phi$  auf  $-120^\circ (\pm 30^\circ)$  beschränkt (III). Somit erhielt man 62 *restraints* für den Winkel  $\Phi$ . Da der Rückgratwinkel  $\Psi$  in den Sekundärstrukturelemente ebenfalls definierte Werte annimmt, wurden in der letzten Phase der Strukturrechnung zusätzlich *restraints* für den Winkel  $\Psi$  eingeführt, wobei die folgenden Werte verwendet wurden. In  $\alpha$ -helicale Bereichen mit  ${}^3J_{\text{HNH}\alpha} > 8$  Hz wurde  $\Psi = -40^\circ (\pm 25^\circ)$  und für  $\beta$ -Faltblattstrukturen mit  ${}^3J_{\text{HNH}\alpha} < 5,5$  Hz wurde  $\Psi = 120^\circ (\pm 30^\circ)$  gesetzt (III). Somit kam man letztendlich zu 62  $\Phi$ -*restraints* und 62  $\Psi$ -*restraints*.

### 2.2.9 Bestimmung der ${}^3J_{\text{NC}\gamma}$ -Kopplungskonstanten von aromatischen Aminosäureresten und Gewinnung der Diederwinkel-*restraints* für $\chi_1$

Für den Seitenketten-Torsionswinkel  $\chi_1$ , der die Rotation um die  $\text{C}_\alpha\text{-C}_\beta$  Bindung beschreibt und definitionsgemäß zwischen den Atomen  $\text{N-C}_\alpha\text{-C}_\beta\text{-X}$  auftritt (96,97), gibt es drei gestaffelte Rotamere, die in Abbildung 35 in der Newman-Projektion gezeigt

sind. Das *trans*-Rotamer ist gegenüber den beiden *gauche*-Rotameren energetisch begünstigt.

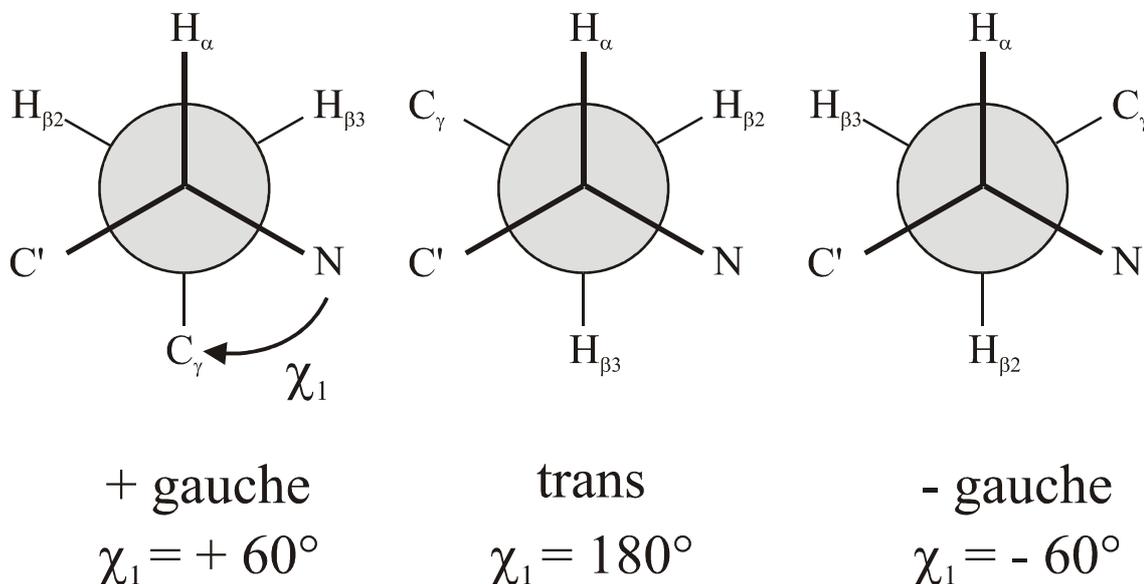


Abbildung 35: Newman-Projektion der drei gestaffelten *trans*- und *gauche*-Rotamere um den Seitenketten-Torsionswinkel  $\chi_1$ .

Durch die Bestimmung der  ${}^3J_{\text{NC}\gamma}^{\text{arom}}$ -Kopplungskonstanten läßt sich der Torsionswinkel  $\chi_1$  von aromatischen Aminosäureresten bestimmen und als Diederwinkel-*restraints* in der Strukturrechnung verwenden. Im Falle des CaM/C20W-Komplexes wurde hierfür ein  ${}^{15}\text{N}\{-{}^{13}\text{C}_\gamma^{\text{arom}}\}$ -Spinecho-Differenz  ${}^1\text{H}, {}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum aufgenommen (112). Eine genaue Beschreibung der Pulssequenz findet sich in (112,110). Neben einem Referenzexperiment a wird ein Experiment b aufgenommen, dessen Intensität um den Faktor  $\cos(\pi J(\text{N}, \text{C}_\gamma^{\text{arom}})\delta)$  gegenüber der Referenzintensität abgeschwächt ist. Damit ergibt sich die Größe der zu bestimmenden vicinalen Kopplungskonstanten aus der relativen Intensitätsdifferenz der beiden Spektren a und b:

$${}^3J_{\text{NC}\gamma}^{\text{arom}} = \cos^{-1}(I_b/I_a)/\pi\delta$$

wobei die optimale Sensitivität erreicht wird, wenn der Spinecho-Delay  $\delta \approx T_2$  entspricht. Im Falle des CaM/C20W-Komplexes wurde ein Delay von 50 ms verwendet.

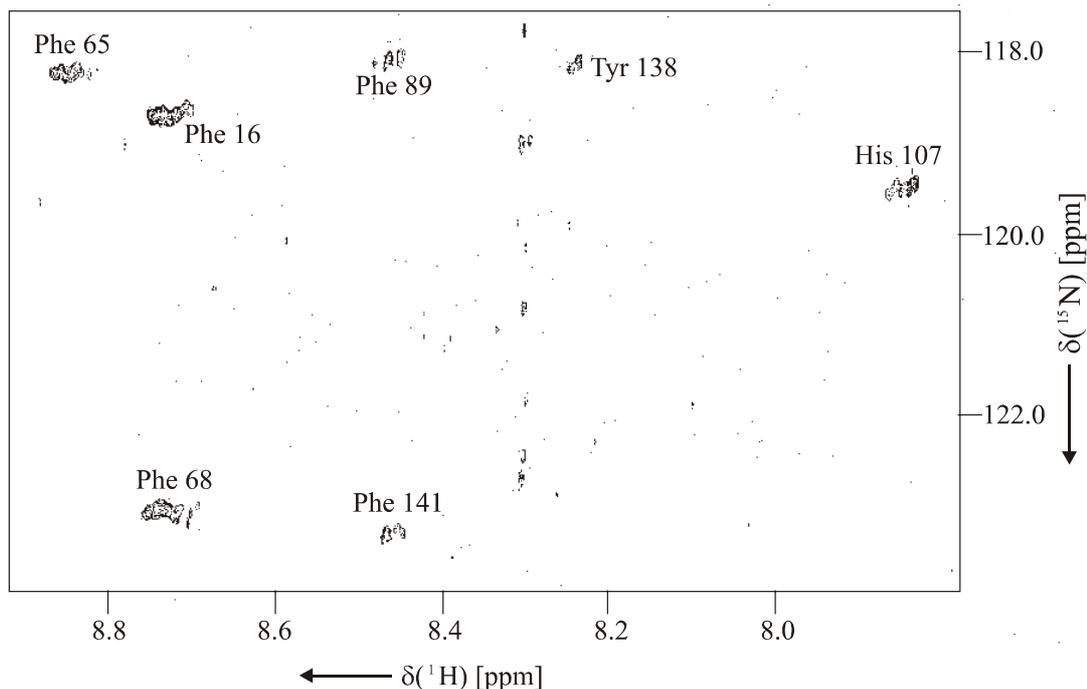


Abbildung 36: 2D- $\{^{13}\text{C}_{\gamma}^{\text{arom}}\}$ -Spinecho Differenz  $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -CT-HSQC zur Bestimmung der  $^3\text{J}_{\text{NC}\gamma}^{\text{arom}}$ -Kopplungskonstanten. Es werden nur Signale von Resten mit einer signifikanten  $^3\text{J}_{\text{NC}\gamma}^{\text{arom}}$ -Kopplung beobachtet, wobei die Zuordnung der aromatischen Aminosäurereste eingezeichnet ist.

Tabelle 3: Ermittelten  $^3\text{J}_{\text{NC}\gamma}^{\text{arom}}$ -Kopplungskonstanten aus dem 2D- $\{^{13}\text{C}_{\gamma}^{\text{arom}}\}$ -Spinecho Differenz  $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -CT-HSQC Spektrum

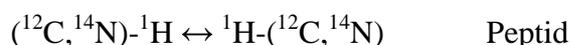
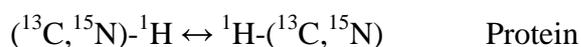
| Aminosäurerest | $^3\text{J}_{\text{NC}\gamma}^{\text{arom}}$ [Hz] |
|----------------|---|
| Phe 16         | 2.7   |
| Phe 65         | 2.3   |
| Phe 68         | 2.4   |
| Phe 89         | 2.2   |
| His 107        | 2.3   |
| Tyr 138        | 2.4   |
| Phe 141        | 2.5   |

In Abbildung 36 ist das 2D- $\{^{13}\text{C}_{\gamma}^{\text{arom}}\}$ -Spinecho Differenz  $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -CT-HSQC-Spektrum des CaM/C20W-Komplexes mit der entsprechenden Zuordnung gezeigt. Es tauchen nur Signale von Resten mit einer signifikanten  $^3\text{J}_{\text{NC}\gamma}^{\text{arom}}$ -Kopplung auf. Die ermittelten Kopplungskonstanten sind in Tabelle 3 zusammengetragen. Diese großen  $^3\text{J}_{\text{NC}\gamma}^{\text{arom}}$ -Kopplungskonstanten sind indikativ für einen Torsionswinkel  $\chi_1 = 180^\circ$ , also für die *trans*-Rotamere. Dem entsprechend wurden für diese aromatischen Aminosäurereste Diederwinkel-*restraints* von  $\chi_1 = 180^\circ \pm 30^\circ$  in den Strukturrechnungen verwendet.

## 2.3 NMR-Filterexperimente

Für die strukturelle Untersuchung von binären Protein/Peptid- oder Protein/Protein-Komplexen wird eine der beiden Komponenten mit NMR-aktiven Isotopen markiert, die andere Komponente bleibt unmarkiert, so daß eine Unterscheidung der Resonanzen von den beiden Komponenten getroffen werden kann. Beispielsweise lassen sich bei einem Komplex aus einem  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ -markiertem Protein und einem unmarkiertem Peptid, zum Beispiel der  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ -CaM/C20W-Komplex, die verschiedenen intra- und intermolekularen NOE-Kontakte selektiv beobachten:

### intramolekulare NOE-Kontakte



### intermolekulare NOE-Kontakte

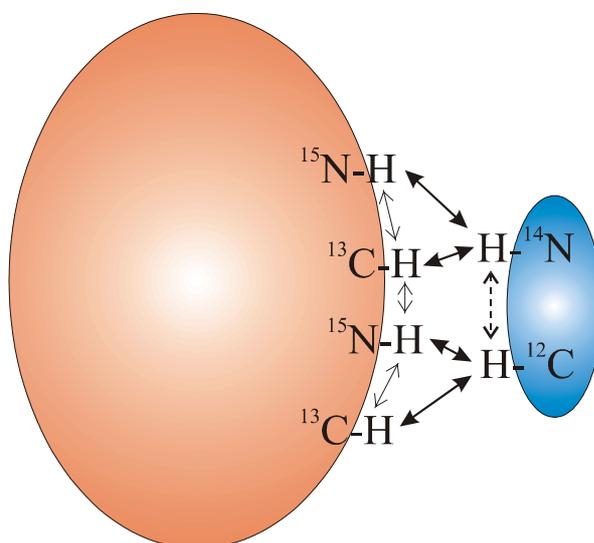
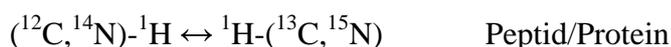
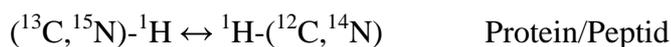


Abbildung 37: Schematische Darstellung eines Protein/Peptid-Komplexes, bei dem das Protein mit  $^{13}\text{C}$  und  $^{15}\text{N}$  markiert ist. Intramolekulare NOE-Kontakte innerhalb des Proteins sind durch dünne Pfeile, intramolekulare NOE-Kontakte innerhalb des Peptids durch einen durchbrochenen Pfeil dargestellt. Die intermolekularen NOE-Kontakte zwischen dem Protein und dem Peptid (dicke Pfeile) definieren die Kontaktfläche der beiden Komponenten.

Durch die Anwendung von NMR-Filterexperimenten, die auf den heteronuklearen  $^1J(^{13}\text{C}, ^1\text{H})$ - und  $^1J(^{15}\text{N}, ^1\text{H})$ -Kopplungen beruhen, lassen sich diese verschiedenen NOE-Klassen separieren (113,114,115). Ein Übersichtsartikel über die isotopengefilterten NMR-Experimente findet sich in (116).

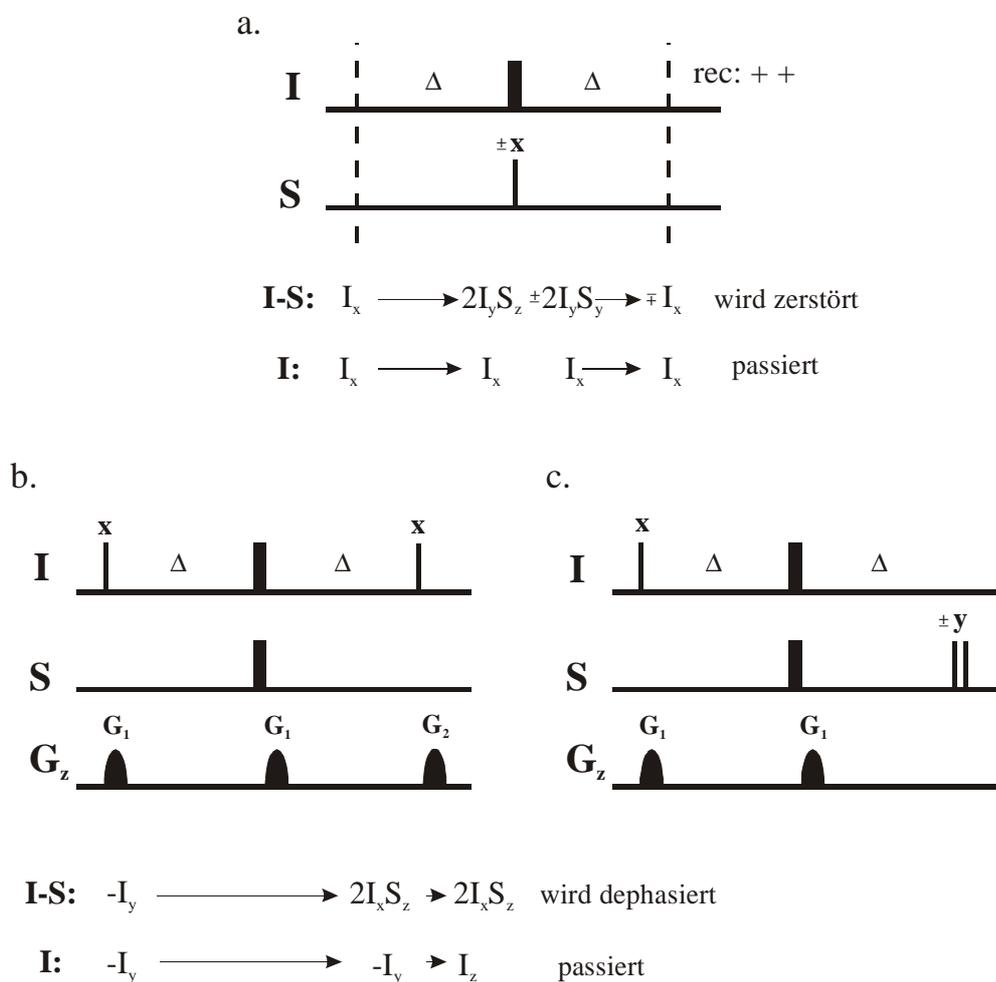


Abbildung 38: Verschiedene Varianten eines low pass J-Filters erster Ordnung. (a) einfachste Implementierung. Die Signale der an den Heterokern S gebundenen Spins I werden unterdrückt, wenn  $\Delta$  gerade  $1/2J_{IS}$  entspricht, da die sich entwickelnde Antiphasenmagnetisierung durch einen  $90^\circ$  S-Puls mit dem Phasenzzyklus x, -x in  $\pm 2I_y S_z$  übergeführt wird. Am Ende der Filtersequenz liegt dann  $\pm I_x$  Magnetisierung vor, die sich zu Null addiert, da der Phasenzzyklus des Receivers x,x ist. Spins, die keinen heteronuklearen Kopplungspartner besitzen, werden von dem  $90^\circ$  S-Puls nicht berührt. Deren chemische Verschiebung wird refokussiert und liegt am Ende wieder als  $I_x$  vor. (b) Kürzere Implementierung mit  $\Delta=1/4J_{IS}$ . Für Spins, die an den Heterokern S gebunden sind, entwickelt sich startend von  $-I_y$  Antiphasenmagnetisierung  $2I_x S_z$ , die von dem zweiten  $90^\circ$  Puls nicht berührt und anschließend von dem z-Gradient  $G_2$  dephasiert wird. Protonen, die keinen heteronuklearen Kopplungspartner besitzen, liegen nach  $2\Delta$  immer noch als  $-I_y$  Magnetisierung vor, die von dem zweiten  $90^\circ$  Puls in  $I_z$  übergeführt wird. Der z-Gradient  $G_2$  dephasiert die longitudinale Magnetisierungskomponente nicht. Das Gradientenpaar  $G_1$  kompensiert Pulsimperfectionen der Inversionspulse  $180^\circ(I,S)$ . (c) Hier wird die entstandene Antiphasenmagnetisierung  $2I_x S_z$  durch das  $90^\circ_{\pm y}(S), 90^\circ(S)$  Pulspaar in nicht detektierbare Doppel- und Nullquantenkohärenzen vom Typ  $2I_x S_x$  konvertiert. Der zweite  $90^\circ(S)$  Puls kompensiert off-resonance Effekte des ersten  $90^\circ_{\pm y}(S)$ -Pulses, die zu unvollständiger Konvertierung führen.

Verschiedene binäre Protein/Peptid-Komplexe wurden mit Hilfe dieser Filterexperimente untersucht, darunter der Komplex von Cyclophilin mit Cyclosporin A (117,118,119,120) oder der Komplex von CaM mit dem Peptid M13 (121), das der Calmodulin-Bindungsregion von skMLCK entspricht (siehe Kapitel 1.6).

Die Filterbausteine in den verschiedenen publizierten Experimenten basieren auf dem sogenannten *low pass* J-Filter (114). Hier werden die Signale von den Protonen, die an einen markiertem Heterokern ( $^{13}\text{C}$  oder  $^{15}\text{N}$ ) gebunden sind, unterdrückt. In Abbildung 38 sind verschiedene Implementierungen des J-Filters dargestellt. In dem einfachen *low pass* J-Filterexperiment (Abbildung 38a) werden durch die Anwendung eines  $90^\circ(\text{S})$ -Pulses mit dem Phasenzyklus  $x, -x$  nach einem Delay  $\Delta$  die Signale der an S-gebundenen I-Spins unterdrückt, wenn  $\Delta$  gerade  $1/2J_{\text{IS}}$  entspricht und die Phase des Receivers  $x, x$  ist. Die Magnetisierung von Spins I, die nicht an einen Heterokern S gebunden sind, wird von diesem Puls nicht berührt und liegt am Ende der Filtersequenz wieder als  $I_x$ -Magnetisierung vor. Entspricht der  $90^\circ(\text{S})$ -Puls jedoch nicht exakt  $90^\circ$ , sondern einem Winkel  $\Theta$  und entspricht der Delay  $\Delta$  nicht exakt der Kopplung, dann überlebt die I-S Magnetisierung den Filter mit dem Faktor  $\cos(\pi J_{\text{IS}}\Delta)\cos\Theta$ . Da nur für eine Kopplung  $J_{\text{IS}}$  optimale Filtereffizienz erreicht wird, spricht man von einem Filter erster Ordnung.

In Abbildung 38b und c sind zwei andere Implementierungen des J-Filters erster Ordnung mit der Anwendung von Gradientenpulsen  $G_z$  abgebildet, die sich durch eine kürzere Dauer des Delays  $\Delta = 1/4J_{\text{IS}}$  auszeichnen und daher einen geringeren Empfindlichkeitsverlust durch transversale Protonenrelaxation aufweisen. Diese beiden Filtervarianten wurden bei den Pulssequenzen verwendet, die bei dem  $^{15}\text{N},^{13}\text{C}$ -CaM/C20W-Komplex zur Bestimmung von intramolekularen Peptid/Peptid-NOE-Kontakten in  $\text{D}_2\text{O}$  und  $\text{H}_2\text{O}$  bzw. homonuklearer J-Korrelationen innerhalb des unmarkierten Peptids in  $\text{D}_2\text{O}$  herangezogen wurden (Abbildung 39). Durch den Einbau der Filterelemente vor der  $t_1$ -Zeit und vor der Akquisitionszeit werden in diesen Experimenten nur Signale von Protonen des unmarkierten Peptids beobachtet.

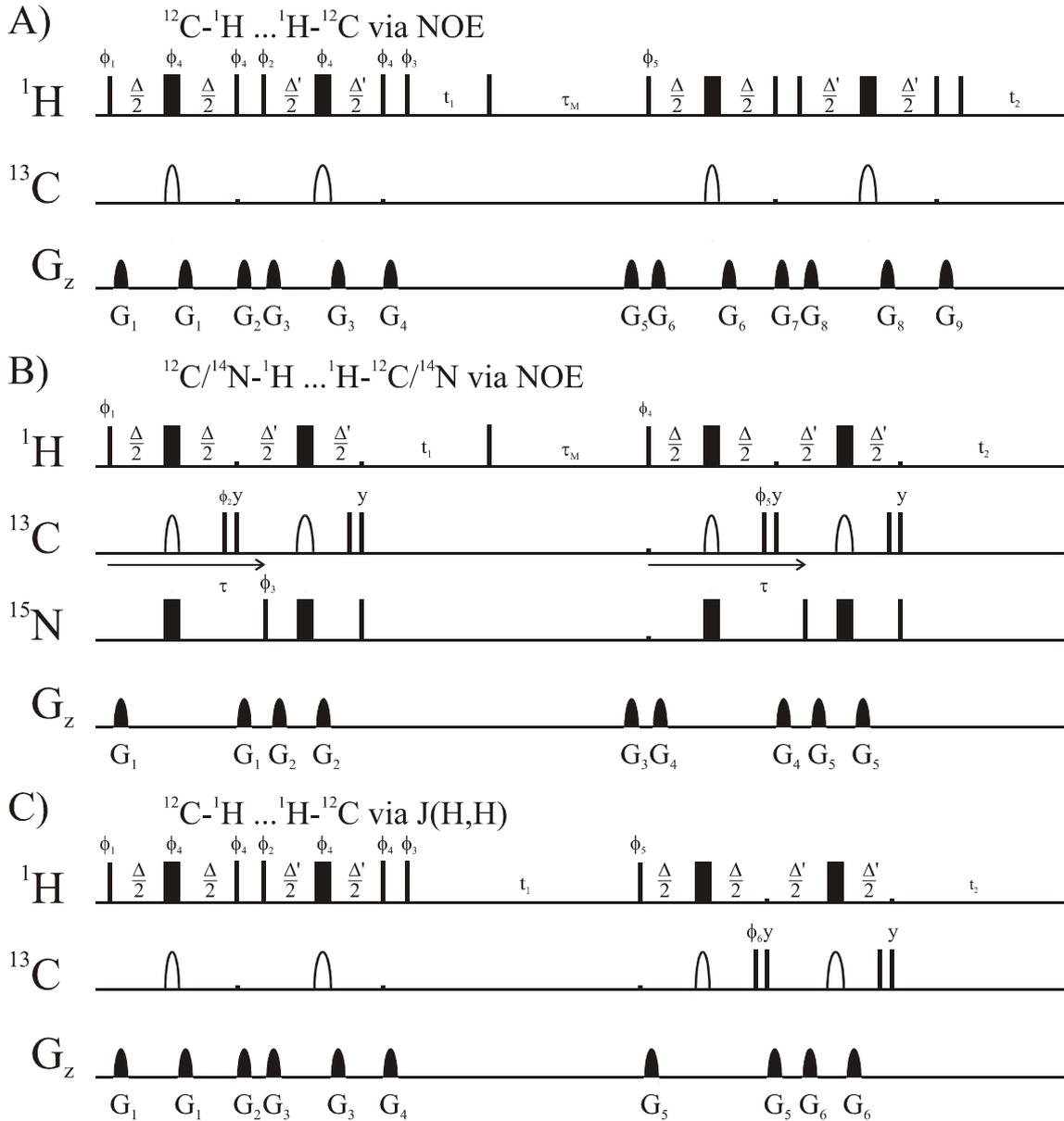


Abbildung 39: Doppeltgefilterte homonukleare Korrelationsexperimente zur Untersuchung des unmarkierten Peptids C20W im Komplex mit  $^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ -markiertem CaM. (A)  $\omega_1, \omega_2$ - $^{12}\text{C}$ -gefiltertes 2D-NOESY Experiment zur Identifizierung von intramolekularen NOE-Kontakten in  $\text{D}_2\text{O}$ . (B)  $\omega_1, \omega_2$ - $^{12}\text{C},^{14}\text{N}$ -gefiltertes 2D-NOESY Experiment zur Identifizierung von intramolekularen NOE-Kontakten in  $\text{H}_2\text{O}$ . (C)  $\omega_1, \omega_2$ - $^{12}\text{C}$ -gefiltertes 2D-COSY Experiment zur Detektion homonuklearer J-Korrelationen in  $\text{D}_2\text{O}$ . Verwendete Delays:  $\Delta=4.4$  ms,  $\Delta'=4.0$  ms,  $\tau=5.4$  ms,  $\tau_M=100$  ms. Die adiabatischen  $^{13}\text{C}$ -Inversionspulse (CHIRP) sind durch nicht ausgefüllte Bögen dargestellt. Eine genaue Beschreibung aller Parameter findet sich in (110).

Im Gegensatz zu den  $^1\text{J}_{\text{HN}}$ -Kopplungen variieren die  $^1\text{J}_{\text{HC}}$ -Kopplungen in Proteinen in Abhängigkeit von der Hybridisierung des Kohlenstoffs, so daß die Bedingung  $\Delta = 1/4\text{J}_{\text{HX}}$  nicht simultan für alle  $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -Spinsysteme erfüllbar ist. Deshalb wurden zum einen jeweils zwei Filterbausteine mit leicht unterschiedlichen Delays  $\Delta$  und  $\Delta'$  hintereinander verwendet. Zum anderen wurde durch die Verwendung von

adiabatischen Inversionspulsen (122,123), die in Abbildung 39 durch nicht ausgefüllte Bögen symbolisiert sind, die Effizienz der J-Filterelemente gesteigert (124).

Für die Detektion intermolekularer NOE-Kontakte zwischen dem  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ -markiertem CaM und dem unmarkierten Peptid C20W wurde ein Halbfilter-Experiment verwendet, das durch einfache Modifikation aus den beschriebenen Doppelfilterexperimenten abgeleitet werden kann. Durch Substitution des zweiten Filterelements, das der Akquisitionszeit vorgeschaltet ist, durch ein  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ -HSQC-Element erhält man ein  $\omega_1$ - $^{12}\text{C}$ ,  $^{14}\text{N}$ -gefiltertes,  $\omega_2$ - $^{13}\text{C}$ -editiertes 3D-NOESY- $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ -HSQC Korrelationsexperiment (Abbildung 40), in dem nur NOE-Kontakte zwischen Protonen des Peptids und Protonen des markierten CaMs detektiert werden (124). Diese intermolekularen NOE's definieren die Kontaktfläche zwischen beiden gebundenen Moleküle.

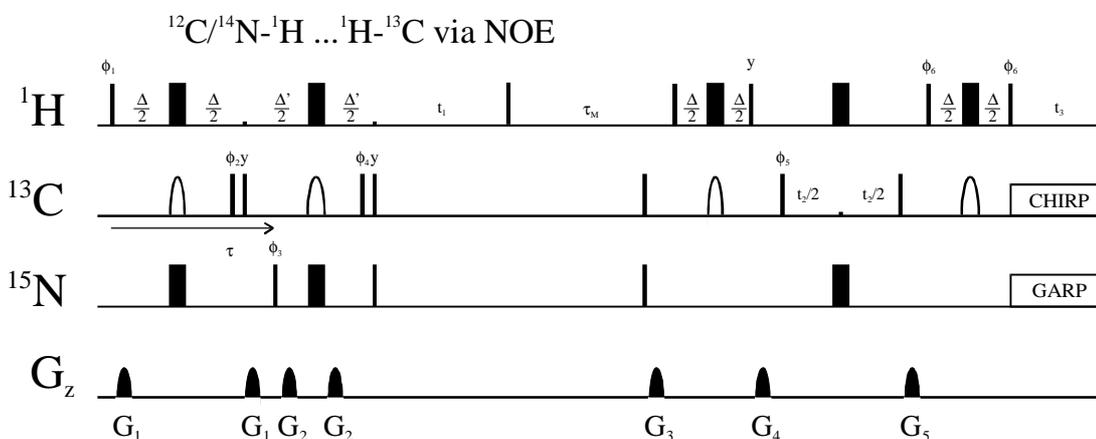


Abbildung 40:  $\omega_1$ - $^{12}\text{C}$ ,  $^{14}\text{N}$ -gefiltertes,  $\omega_2$ - $^{13}\text{C}$ -editiertes 3D-NOESY- $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ -HSQC-Korrelations-experiment zur Untersuchung intermolekularer NOE-Kontakten zwischen dem  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ -markiertem CaM und dem unmarkierten Peptid C20W. Verwendete Delays:  $\Delta=4.4$  ms,  $\Delta'=4.0$  ms,  $\tau=5.4$  ms,  $\tau_M=100$  ms. Eine genaue Beschreibung aller Parameter findet sich in (110).

## 2.4 Zuordnung des unmarkierten Peptids C20W

Um die Resonanzen des unmarkierten Peptids C20W im Komplex mit  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ -markiertem CaM zuzuordnen, wurden verschiedene  $\omega_1, \omega_2$ - $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ -gefilterte, homonukleare Korrelationsexperimente (Kapitel 2.3) aufgenommen, in denen nur die Signale des Peptids zu beobachten sind. Die Effizienz der Filtersequenzen läßt sich durch den Vergleich eines konventionellen 1D- $^1\text{H}$ -Spektrums mit der 1D-Version des  $\omega_1, \omega_2$ - $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ -gefilterten NOESYs erkennen (Abbildung 41).

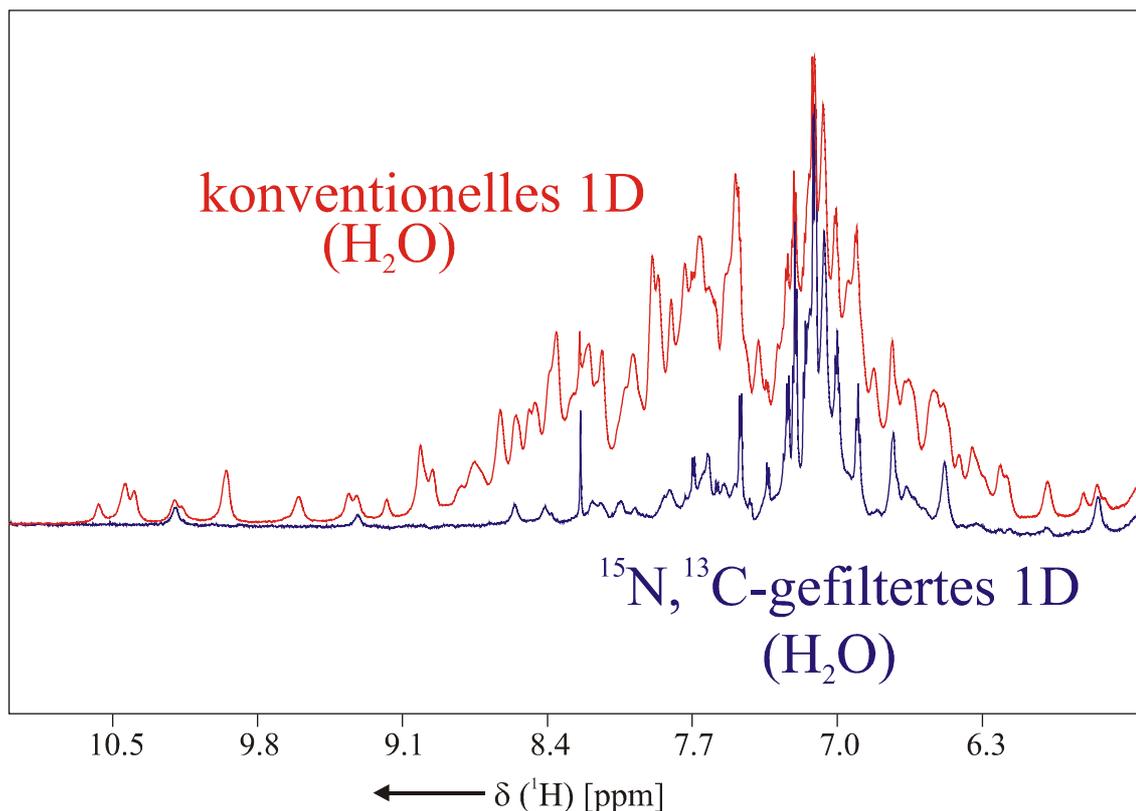


Abbildung 41: Vergleich eines konventionellen 1D- $^1\text{H}$ -Spektrums des CaM/C20W-Komplexes (rot) mit der 1D-Version des  $\omega_1, \omega_2$ - $^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ -gefilterten NOESYs (blau).

Bei der Analyse der isotopengefilterten Spektren kam jedoch eine große Schwierigkeit zu Tage. In der Probe liegt ein Überschuss an Peptid C20W vor, so daß neben komplexiertem C20W auch noch freies, unkomplexiertes Peptid zu finden ist. Dies läßt sich bereits an der 1D-Version des  $\omega_1, \omega_2$ - $^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ -gefilterten NOESY-Experimentes feststellen. Das Vorliegen von unkomplexiertem Peptid ist an den scharfen Resonanzlinien zu erkennen.

In dem  $\omega_1, \omega_2$ - $^{13}\text{C}$ -gefilterten COSY Spektrum des CaM/C20W-Komplexes in  $\text{D}_2\text{O}$  findet man im Aromatenbereich für das Tryptophan 8 des Peptids C20W zwei Signalsätze, einen hochfeldigen des komplexierten Peptids und einen tieffeldigen von freiem Peptid (Abbildung 42a). Aus dem Verhältnis der Integrale der separierten  $^1\text{H}_{\beta 3}$ -Resonanzen läßt sich ein Verhältnis von 1:4 von freiem zu komplexiertem Peptid abschätzen. Eine Auswertung dieses Spektrums war deshalb unmöglich. Ebenso war die Analyse des isotopengefilterten TOCSY-Experiments nicht möglich.

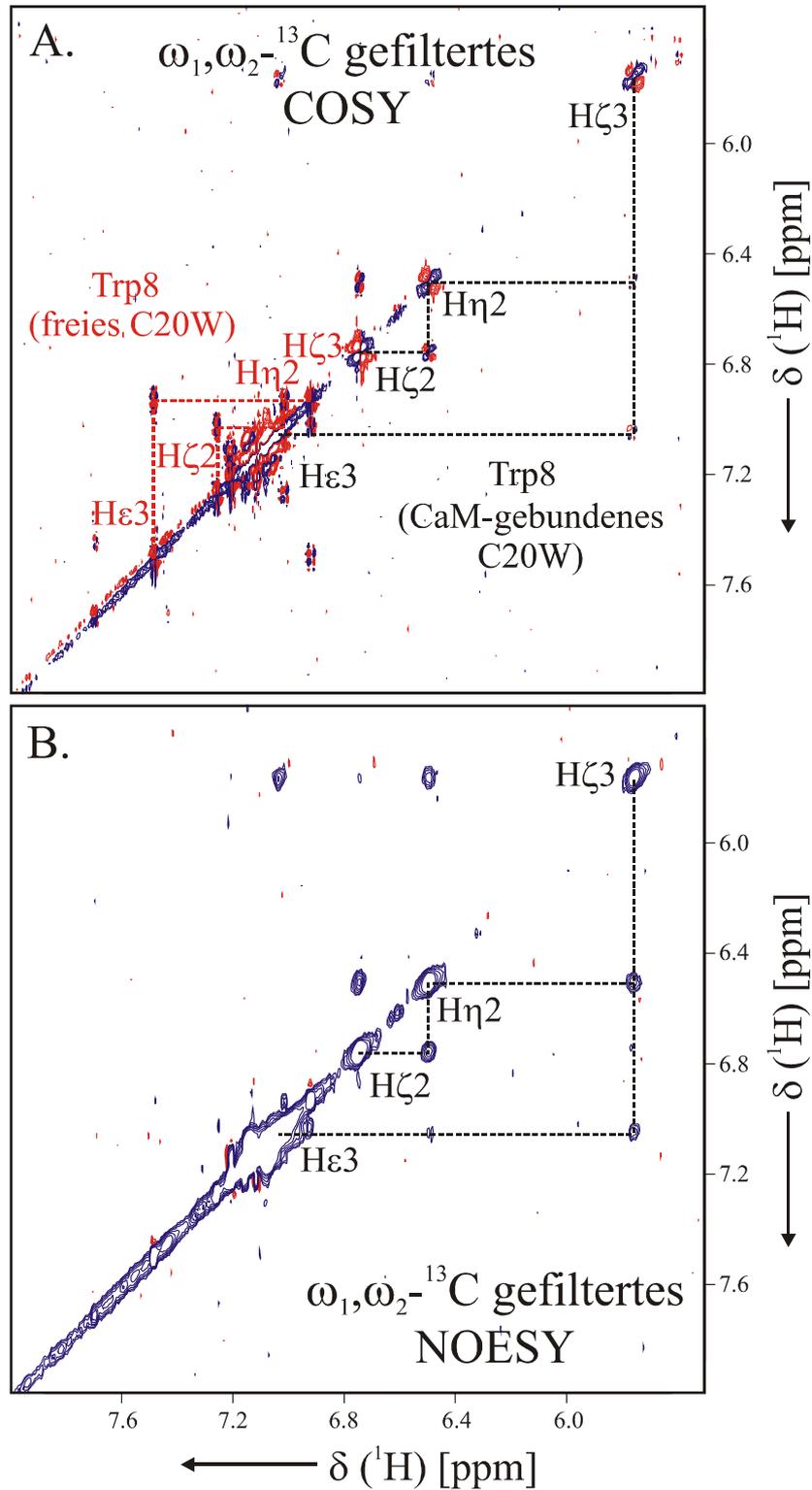


Abbildung 42: A) Aromatenbereich des  $\omega_1, \omega_2$ - $^{13}\text{C}$ -gefilterten 2D-COSY-Experiments von CaM/C20W in  $\text{D}_2\text{O}$ . Für den Tryptophanindolring findet man zwei Signalsätze, einmal von komplexiertem C20W und einmal von freiem. B) Aromatenbereich des  $\omega_1, \omega_2$ - $^{13}\text{C}$ -gefilterten 2D-NOESY-Experiments von CaM/C20W in  $\text{D}_2\text{O}$ . Im Gegensatz zum COSY-Spektrum finden sich hier nur noch die Resonanzen des komplexierten C20W. Grund dafür ist die kurze Korrelationszeit des freien Peptids, so daß der NOE-Effekt gerade im Nulldurchgang ist.

Hingegen findet man in dem  $\omega_1, \omega_2$ - $^{13}\text{C}$ -gefilterten 2D-NOESY Spektrum nur noch die Resonanzen des komplexierten Peptids. Das freie C20W hat eine so geringe Korrelationszeit, daß sich der NOE-Effekt gerade bei seinem Nulldurchgang befindet und daher finden sich keine Resonanzen des freien Peptids im isotopengefilterten NOESY-Spektrum. Für die Zuordnung des komplexierten Peptids stand somit nur das  $\omega_1, \omega_2$ - $^{13}\text{C}$ -gefilterte 2D-NOESY Experiment an der  $\text{D}_2\text{O}$ -Probe und das  $\omega_1, \omega_2$ - $^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ -gefilterte 2D-NOESY Experiment an der  $\text{H}_2\text{O}$ -Probe zur Verfügung. Damit wurden die Protonenresonanzen von C20W bis auf die ersten drei N-terminalen Aminosäuren (Leu1, Arg2, Arg3) und die C-terminale Aminosäure (Lys20) durchgehend zugeordnet, was einem Prozentsatz von 74% der gesamten Protonenresonanzen entspricht. Die Zuordnungstabelle findet sich im Anhang (Kapitel 6.3.2).

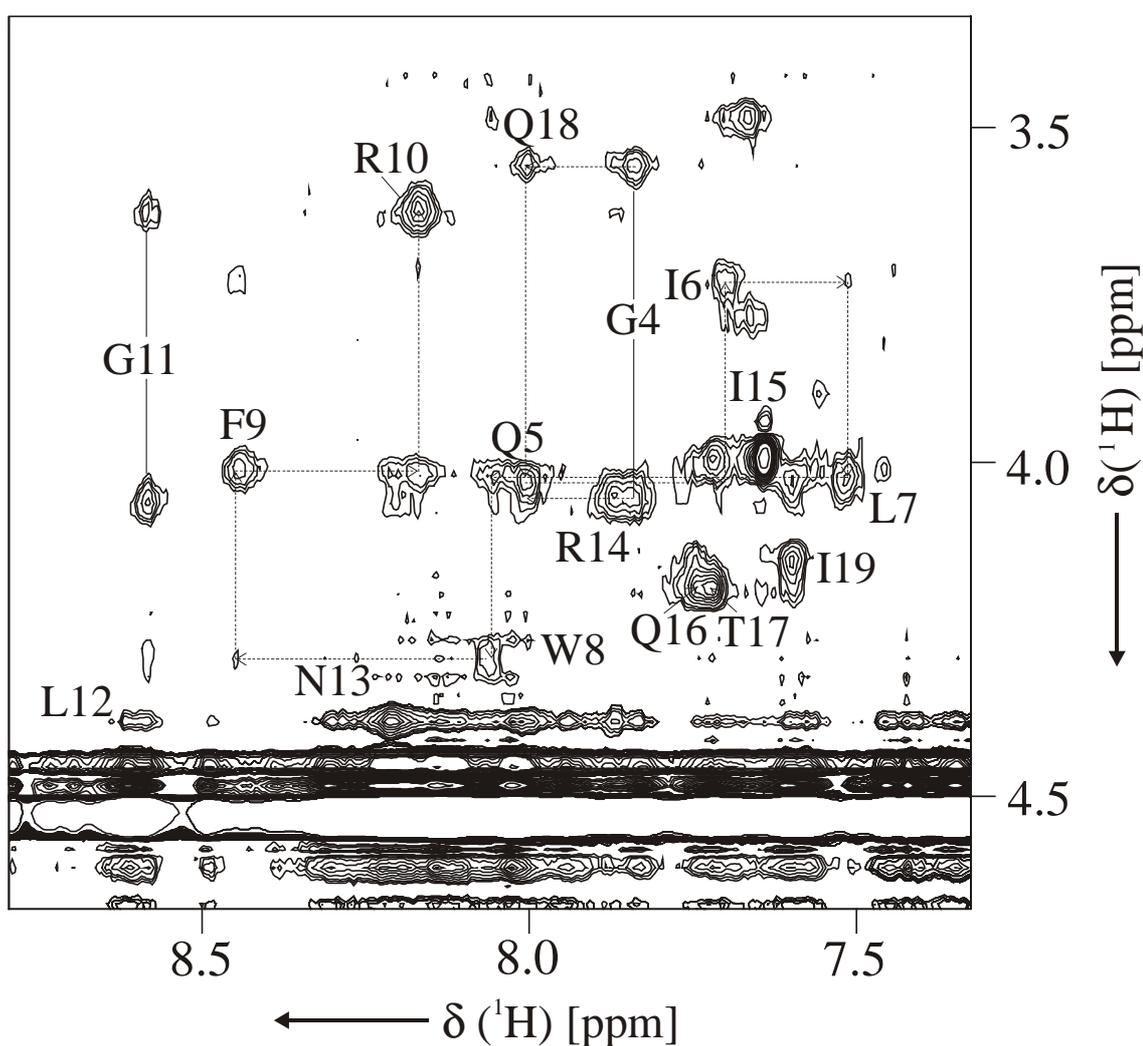


Abbildung 43: Fingerprintbereich des  $\omega_1, \omega_2$ - $^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ -gefiltertes-2D-NOESY von CaM/C20W in  $\text{H}_2\text{O}$  mit der getroffenen Zuordnung der  $\text{H}^{\text{N}}\text{H}^{\alpha}$ -Resonanzen. Das chaintracing von Glycin 4 bis Arginin 10 ist durch gestrichelte Linien dargestellt.

In Abbildung 43 ist die charakteristische *fingerprint*-Region des  $\omega_1, \omega_2$ - $^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ -gefilterten-2D-NOESY der  $\text{H}_2\text{O}$ -Probe dargestellt und die Zuordnung der  $\text{H}^{\text{N}}\text{H}_\alpha$  Resonanzen eingezeichnet. Da bekannt war, daß C20W im Komplex mit CaM  $\alpha$ -helical vorliegt, konnte die sequentielle Verknüpfung der Spinsystem über schwache  $\alpha\text{N}(i,i+1)$ -NOE's im *fingerprint*-Bereich und starke  $\text{NN}(i,i+1)$ -NOE's im  $\text{H}^{\text{N}}\text{H}^{\text{N}}$ -Bereich erfolgen (50). In Abbildung 43 ist die sequentiellen Verknüpfung über die  $\alpha\text{N}(i,i+1)$ -NOE's, das sogenannte *chaintracing*, von Glycin 4 bis Arginin 10 durch gestrichelte Linien eingezeichnet. Die daran anschließende Korrelation von Arginin 10 bis Isoleucin 19 ist in Abbildung 44 dargestellt.

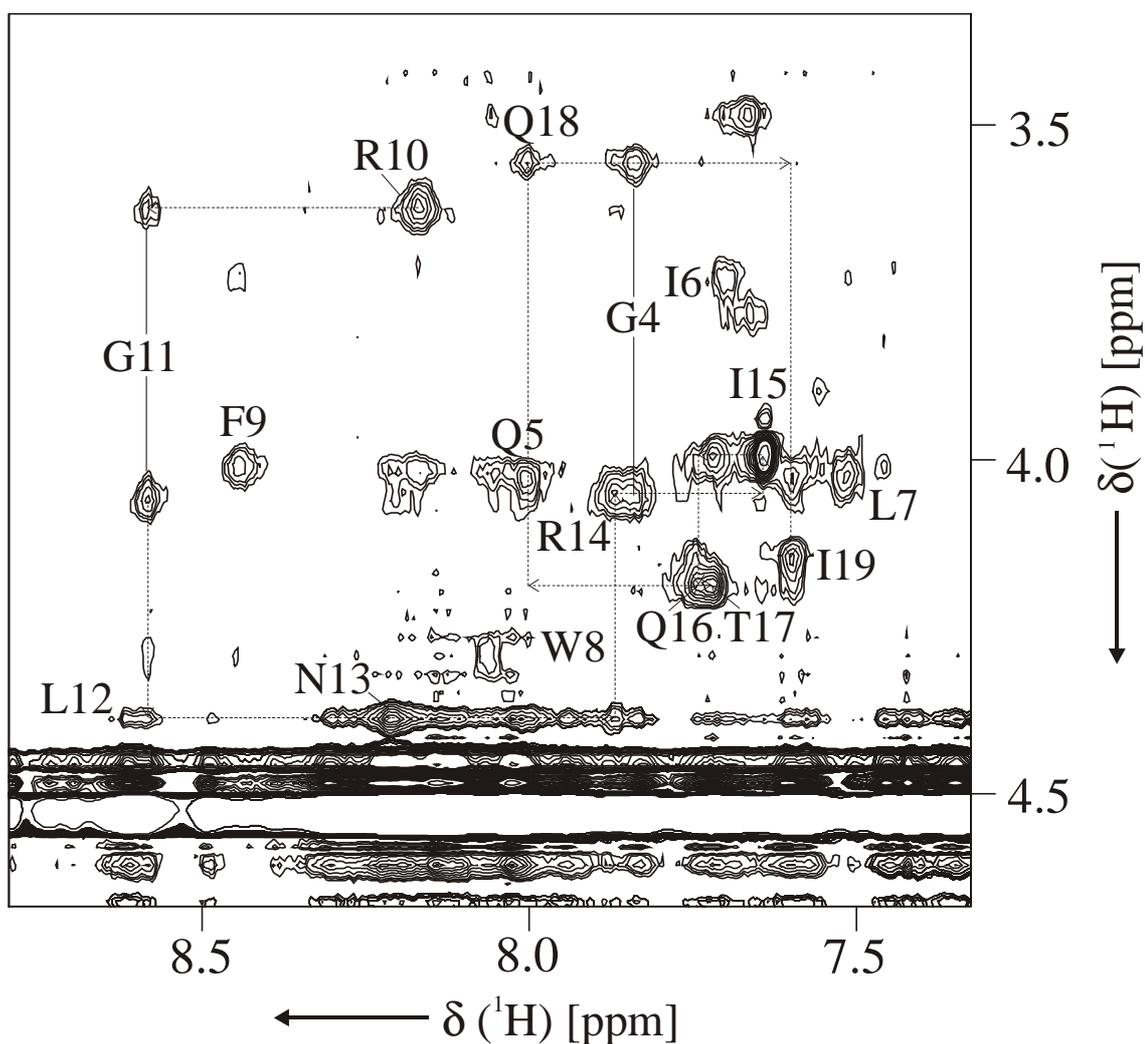


Abbildung 44: Fingerprintbereich des  $\omega_1, \omega_2$ - $^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ -gefiltertes-2D-NOESY von CaM/C20W in  $\text{H}_2\text{O}$  mit der getroffenen Zuordnung der  $\text{H}^{\text{N}}\text{H}_\alpha$ -Resonanzen. Das *chaintracing* von Arginin 10 bis Isoleucin 19 ist durch gestrichelte Linien dargestellt.

Die Verknüpfung über die NN(i,i+1)-NOE's über die gesamte zugeordnete Peptidkette ist in Abbildung 45 dargestellt. Der Aromatenbereich des Spektrums mit der Zuordnung des aromatischen Indolrings von Tryptophan 8 ist in Abbildung 46 gezeigt.

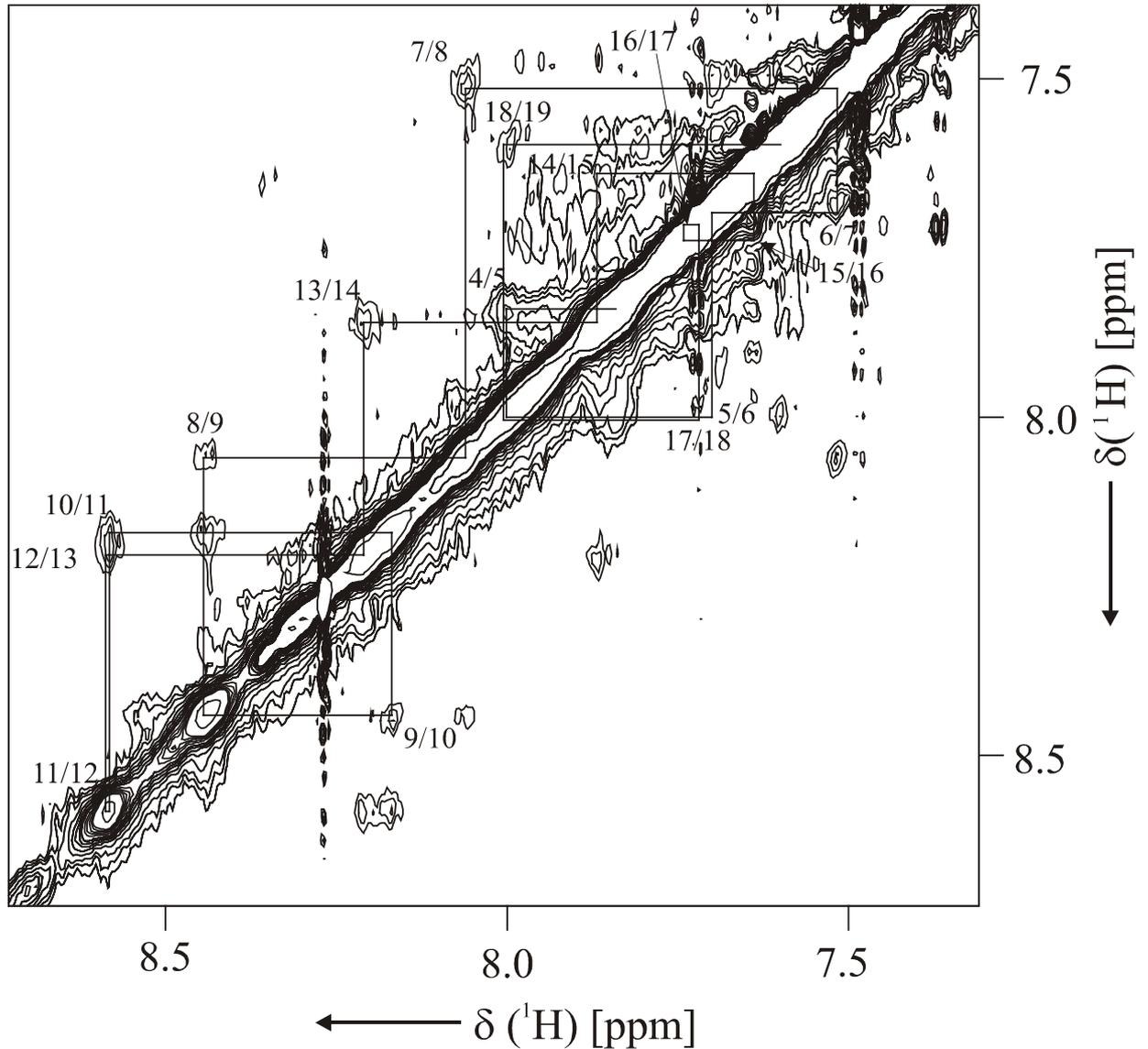


Abbildung 45:  $H^N H^N$ -Bereich des  $\omega_1, \omega_2$ - $^{13}C, ^{15}N$ -gefiltertes-2D-NOESY von CaM/C20W in  $H_2O$  mit der getroffenen Zuordnung der sequentiellen NN(i,i+1)-NOE's. Ausgehend von Gly4 läßt sich das ganze Rückgrat von C20W mit starken, helix-typischen NN(i,i+1)-NOE's sequenzieren.

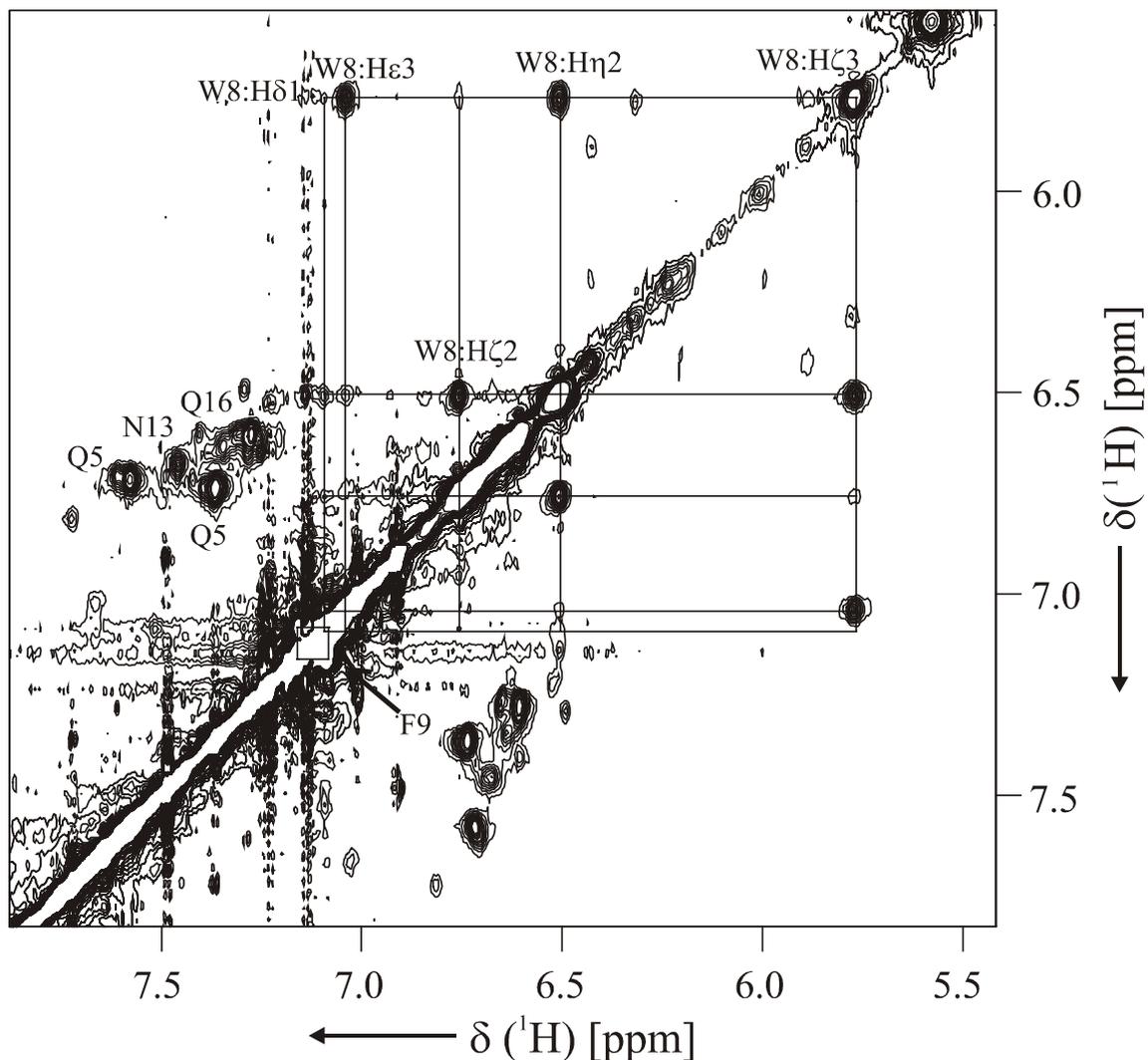


Abbildung 46: Aromatenbereich des  $\omega_1, \omega_2$ - $^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ -gefiltertes-2D-NOESY von CaM/C20W in  $\text{H}_2\text{O}$ . Das aromatische Spinsystem von Tryptophan 8 ist eingezeichnet.

Nach der Zuordnung der Peptidresonanzen, die mit dem Programm NDee (Spin Up, Lünen, Deutschland) erfolgt war, wurden die NOE's des  $\omega_1, \omega_2$ - $^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ -gefiltertes-2D-NOESY von CaM/C20W in  $\text{H}_2\text{O}$  ausgewertet. Das Programm NDee bietet durch die visuelle Darstellung der Spinsysteme eine einfache Methode, die Zuordnung der NOE Resonanzen vorzunehmen. Durch Anwählen des Menüpunktes *XPLORrestraint* erhält man ein Auswahlmenue mit den möglichen Zuordnungen, wobei die Einteilung in stark, mittel und schwach gewählt werden kann. Die eindeutig zugeordneten NOE *restraints* wurden in einer Strukturrechnung von dem Peptid C20W allein, ohne CaM, verwendet. Die erhaltenen, groben Strukturen wurden als Distanzfilter für die weitere Zuordnung von NOE-Resonanzen eingesetzt und dieser Vorgang wurde ebenfalls mehrfach wiederholt, so daß letztendlich 163 NOE *restraints* für das Peptid C20W zugeordnet werden konnten. Diese Gesamtzahl teilt sich in 102 intraresiduale, 32 sequentielle und 29 mittelreichweitige NOE-*restraints*. Langreichweitige NOE's konnten nicht

beobachtet werden. In Abbildung 47 ist die Anzahl an NOE-restraints für jeden Aminosäurerest von C20W dargestellt.

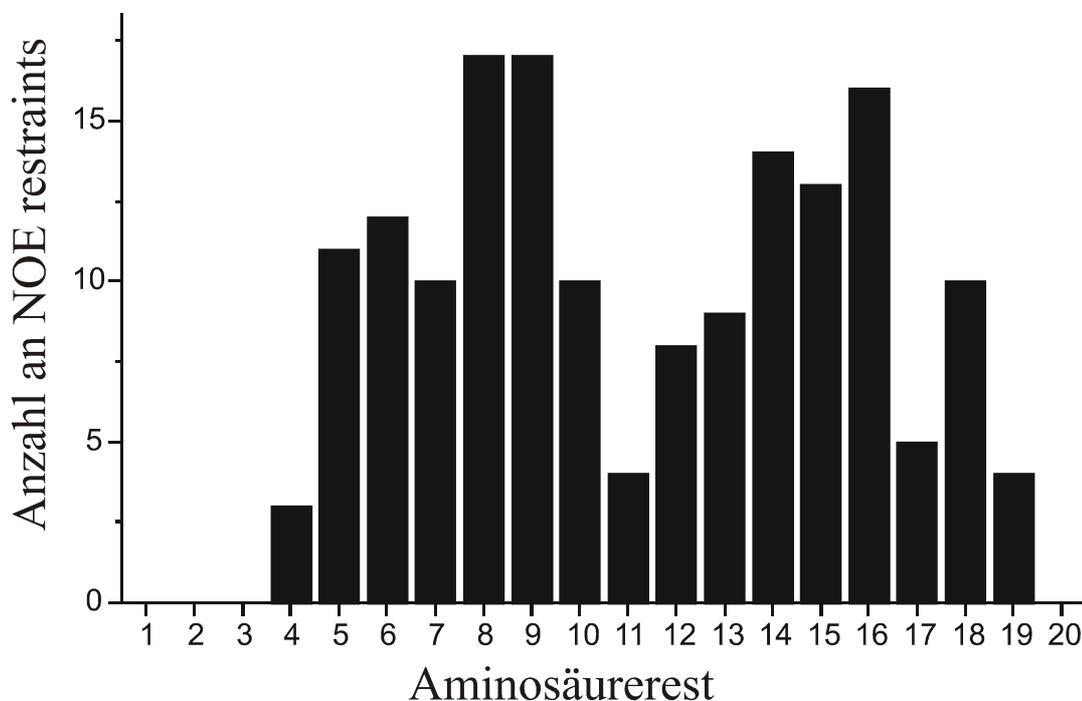


Abbildung 47: Anzahl an NOE restraints pro Aminosäurerest für C20W.

## 2.5 Auswertung der intermolekularen NOE's

Für die Zuordnung der intermolekularen NOE's, die die Kontaktfläche zwischen CaM und dem Peptid C20W definieren, wurde das dreidimensionale  $\omega_1$ - $^{12}\text{C}$ ,  $^{14}\text{N}$ -gefilterte,  $\omega_2$ - $^{13}\text{C}$ -editierte 3D-NOESY- $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ -HSQC (Kapitel 2.3) manuell mit dem Programm FELIX (MSI, San Diego, CA) ausgewertet. Es konnten insgesamt 49 NOE Kontakte eindeutig zugeordnet werden, wobei nur NOE's ausgehend von der C-terminalen Domäne von CaM zum Peptid C20W identifiziert werden konnten. Eine zweidimensionale *skyline*-Projektion des Spektrum ist in Abbildung 48 dargestellt, wobei einige Zuordnungen eingezeichnet sind. Die aromatische Seitenkette des Tryptophans 8 von C20W zeigt eine Vielzahl an NOE's zu den Methylgruppen von Ile100, Leu105, Met124, Ile125, Ala128, Val136 und Met144 von CaM.

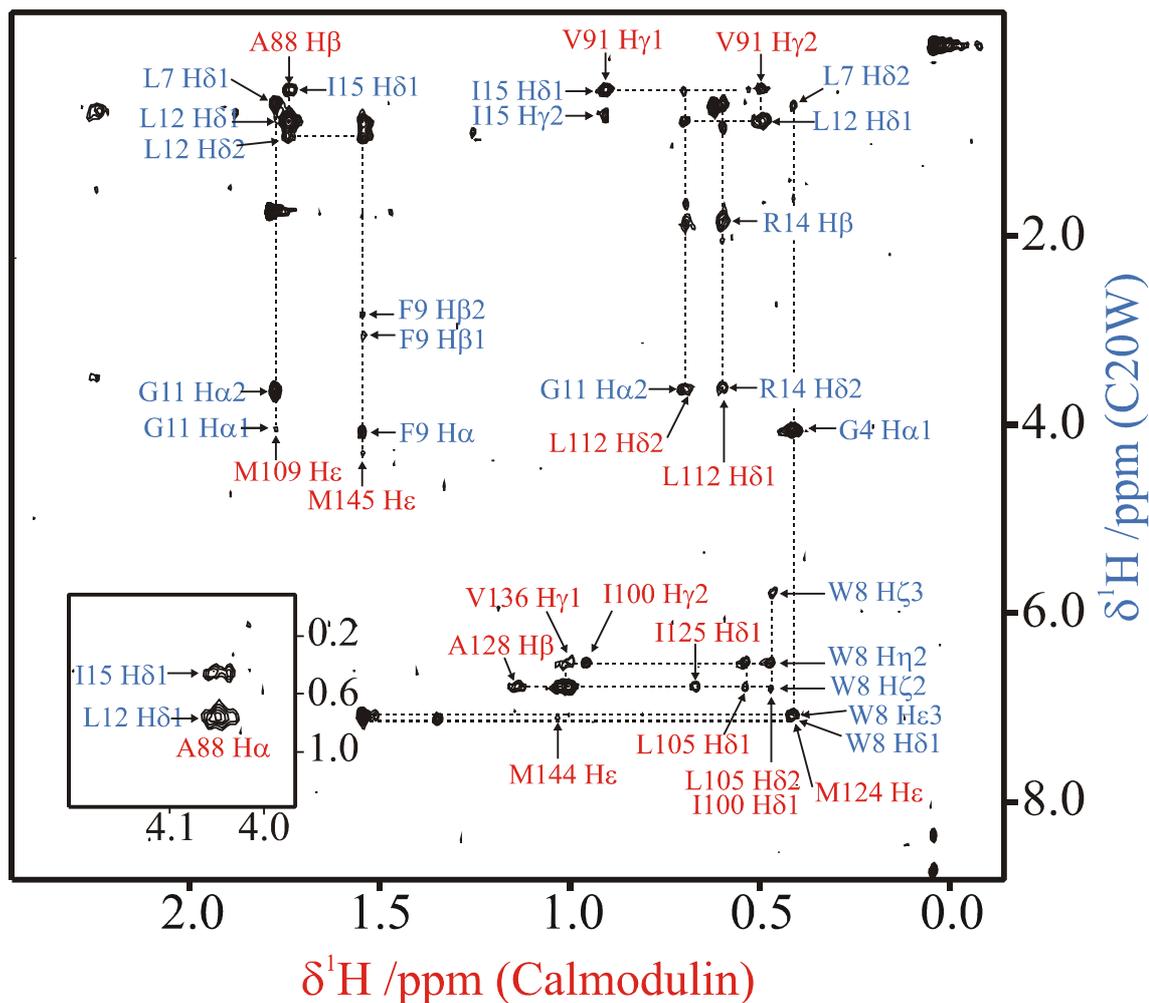


Abbildung 48:  $^1\text{H},^1\text{H}$ -Projektion des  $\omega_1$ - $^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ -gefilterten 3D NOESY- $^{13}\text{C},^1\text{H}$ -HSQC. Das Spektrum enthält nur intermolekulare NOE's zwischen CaM (rot) und dem Peptid C20W (blau). Die Zuordnung von einigen NOE's ist eingezeichnet.

## 2.6 Strukturelle Informationen aus den NMR-Daten

Erste Informationen über die Sekundärstruktur von CaM wurde nach erfolgreicher Zuordnung des Proteinrückgrats (Kapitel 2.2.2) mit Hilfe sogenannter sekundärer chemischer Verschiebungen gewonnen. Nach der Auswertung der NOESY-Spektren (Kapitel 2.2.6) erhielt man weitere strukturelle Informationen aus der Analyse der NOE's. Auch die gemessenen  $^3J_{\text{HNH}\alpha}$ -Kopplungskonstanten (Kapitel 2.2.8) sind indikativ für die Lage der Sekundärstrukturelemente.

### 2.6.1 Sekundäre chemische Verschiebung

Die sekundäre chemische Verschiebung für einen Spin in einem bestimmten Aminosäurerest ist definiert als die Abweichung der chemischen Verschiebung in ppm vom der Verschiebung für diesen Spin in unstrukturierten Peptiden ( $\Delta\delta = \delta_{\text{Protein}} - \delta_{\text{random coil}}$ ). Sekundäre chemische Verschiebungen der Proteinrückgratresonanzen sind charakteristisch für die jeweilige Sekundärstruktur des Proteins. Eine systematische Analyse der  $H_{\alpha}$ -chemischen Verschiebungen von 12 bekannten Proteinen (88,89) zeigte, daß in  $\alpha$ -helicalen Bereichen die Resonanzen zu höherem Feld und in  $\beta$ -Faltblättern zu tieferem Feld gegenüber den entsprechenden Werten in ungeordneten Strukturen (*random coil*) verschoben sind. In Kapitel 2.2.2, Tabelle 2 sind die *random coil*-Werte für  $H_{\alpha}$ -chemische Verschiebungen angegeben. Die sekundäre chemische Verschiebung der  $H_{\alpha}$ -Resonanzen von CaM im Komplex mit C20W ist in Abbildung 49A dargestellt.

Um eine Vorhersage über die Art und Lage der Sekundärstrukturelemente treffen zu können, führt man nach Wishart den chemischen Verschiebungsindex ein. Hierzu berechnet man die Differenz zwischen der jeweiligen experimentell beobachtete  $H_{\alpha}$ -chemischen Verschiebung und den entsprechenden *random coil*-Werten. Ist diese Differenz größer als +0,1 ppm, so wird diesem Rest der Verschiebungsindex +1 zugeordnet. Bei einer Differenz kleiner als -0,1 ppm, erhält die Aminosäure den Index -1. Allen übrigen Resten wird der Index 0 zugeordnet. Für einen Sequenzabschnitt aus vier oder mehr Aminosäuren mit jeweils dem Verschiebungsindex -1 kann eine  $\alpha$ -helicale Sekundärstruktur vorhergesagt werden. Bei mindestens drei aufeinanderfolgenden Resten mit +1 wird ein  $\beta$ -Faltblattstrang erwartet. Mit dieser Methode läßt sich die Sekundärstruktur mit einer Genauigkeit von 90-95% angeben (89).

Bei der Auftragung des chemischen Verschiebungsindex für CaM (Abbildung 49B) trifft man auf eine gute Übereinstimmung der Wishart-Vorhersage mit der Lage der Sekundärstrukturelemente in den berechneten Strukturen (Kapitel 4.2). Besonders die Lage der  $\beta$ -Faltblattstränge stimmt exakt überein.

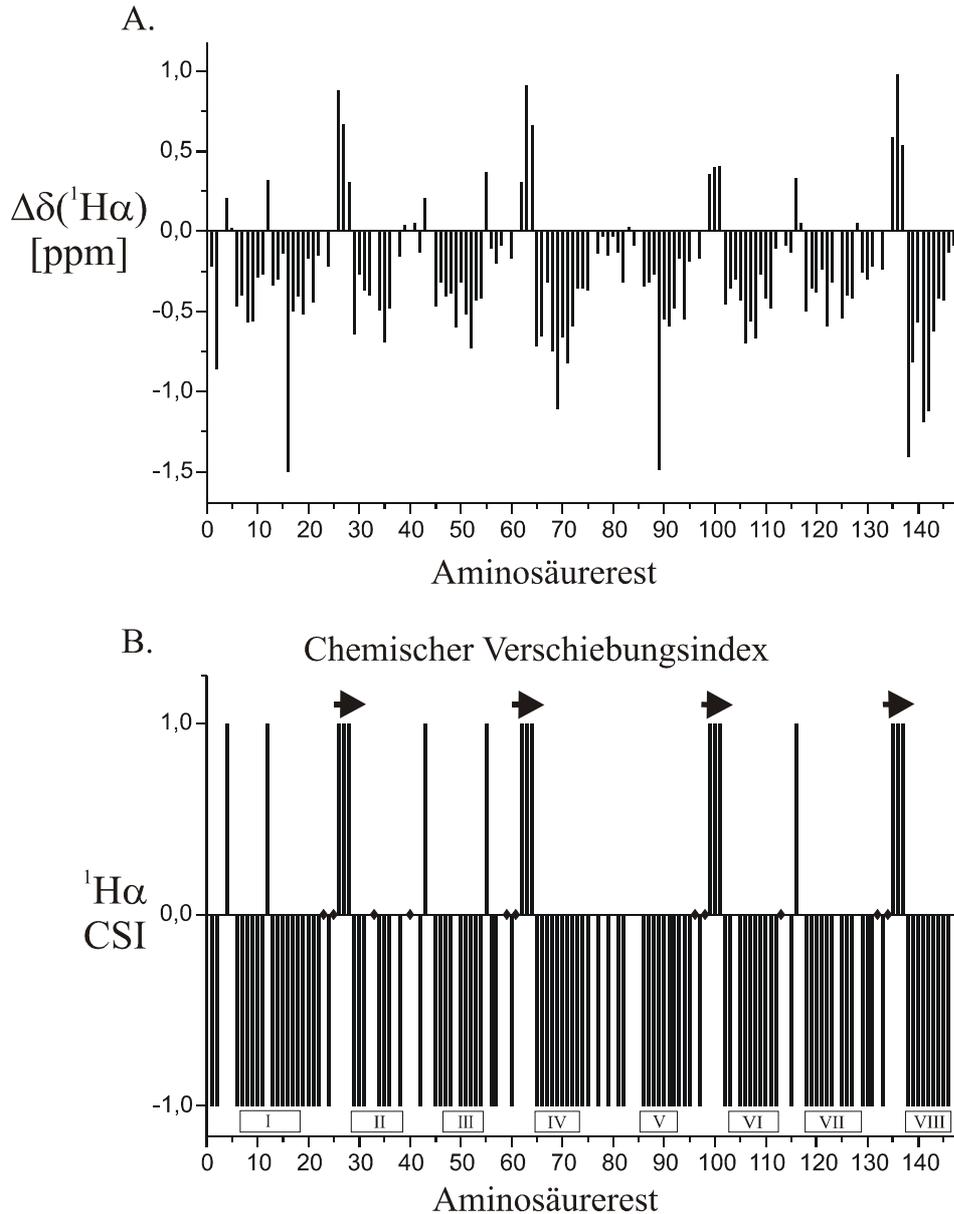


Abbildung 49: A. Sekundäre chemische Verschiebung der  $^1\text{H}_\alpha$ -Resonanzen von CaM. B. Chemischer Verschiebungsindex nach Wishart. Die Lage der  $\alpha$ -Helices ist durch Rechtecke symbolisiert, die  $\beta$ -Faltblätter durch Pfeile. Rauten symbolisieren Glycine, für die kein chemischer Verschiebungsindex erstellt werden kann.

Für die Identifikation der Sekundärstrukturelemente sind auch die  $^{13}\text{C}$  sekundären chemischen Verschiebungen der Proteinrückgratresonanzen  $\text{C}_\alpha$ ,  $\text{C}_\beta$  und  $\text{C}'$  aussagekräftig (125). Die Resonanzen von  $\text{C}_\alpha$  und  $\text{C}'$  sind tieffeldverschoben, wenn sie in einer  $\alpha$ -Helix lokalisiert sind, und hochfeldverschoben, wenn sie in einem  $\beta$ -Faltblattstrang liegen (126,88). Die Resonanzen von  $\text{C}_\beta$  verhalten sich gerade entgegengesetzt (127). Die *random coil*-Werte für die  $\text{C}_\alpha$ -,  $\text{C}_\beta$ - und  $\text{C}'$ -chemische Verschiebung, die aus kleinen, ungefalteten Peptiden ermittelt wurden, sind in Kapitel 2.2.2, Tabelle 2 zusammengefasst. In Abbildung 50 sind die sekundären chemischen Verschiebungen von  $\text{C}_\alpha$ ,  $\text{C}_\beta$  und  $\text{C}'$  von CaM im Komplex mit C20W aufgetragen.

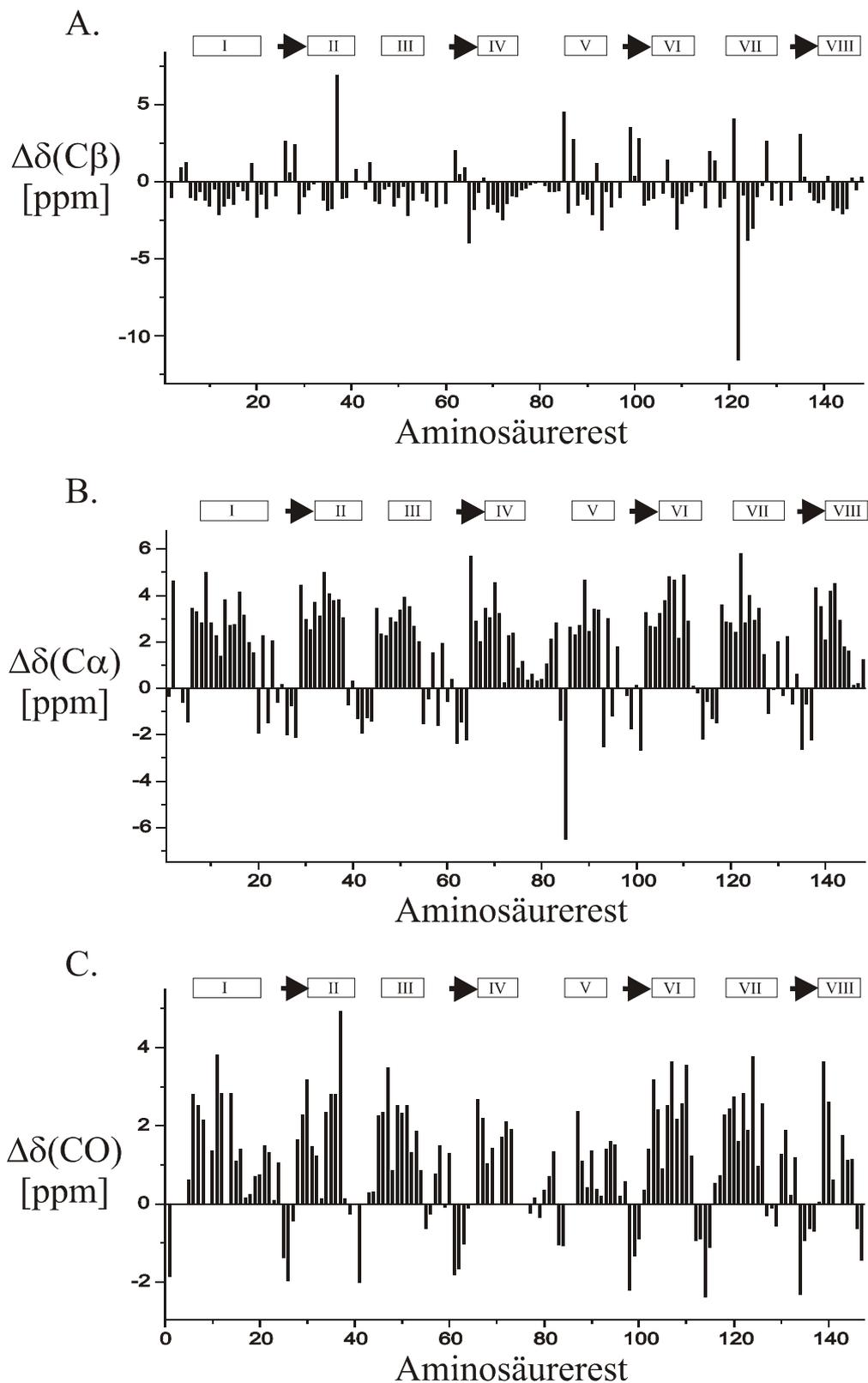


Abbildung 50: Sekundäre chemische Verschiebung der  $^{13}\text{C}_\beta$  (A),  $^{13}\text{C}_\alpha$  (B) und  $^{13}\text{C}'$  (C)-Resonanzen des Proteinrückgrats von CaM. Die Lage der  $\alpha$ -Helices ist durch Rechtecke symbolisiert, die  $\beta$ -Faltblätter durch Pfeile.

Zur genauen Angabe der Sekundärstrukturelemente kann man auch für  $C_\alpha$  und  $C'$  einen chemischen Verschiebungsindex erstellen (125). Der Differenzbereich liegt dabei für  $C_\alpha$  bei  $\pm 0.7$  ppm, für  $C'$  bei  $\pm 0.5$  ppm. Wie bei dem  $^1H_\alpha$  Verschiebungsindex kann für einen Sequenzabschnitt aus vier oder mehr Aminosäuren mit dem Verschiebungsindex -1 eine  $\alpha$ -Helix vorhergesagt werden. Bei mindestens drei aufeinanderfolgenden Resten mit +1 wird ein  $\beta$ -Faltblattstrang erwartet. Die Vorhersage trifft bei den ermittelten Werten gut mit der Sekundärstruktur aus den berechneten Strukturen (Kapitel 4.2) überein (Abbildung 51).

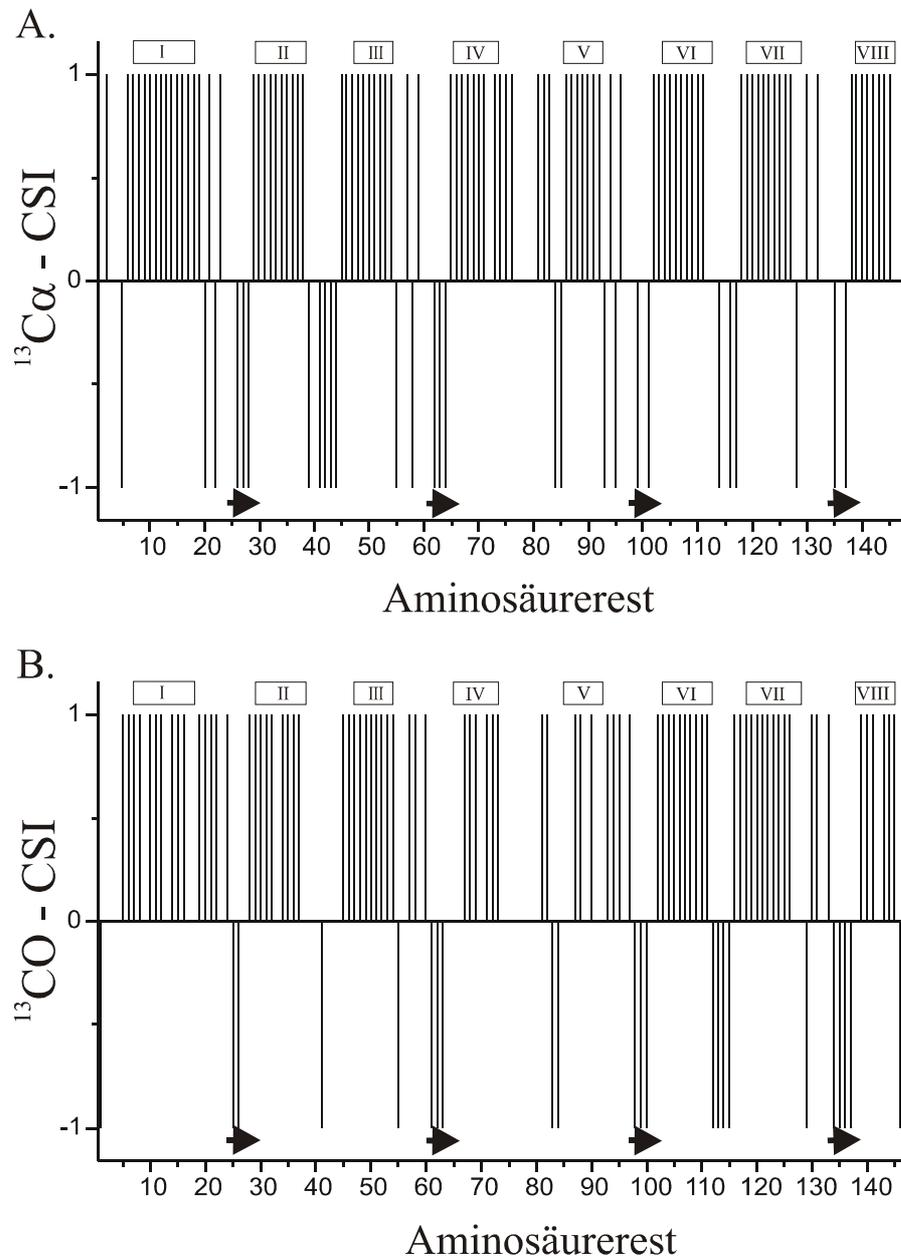


Abbildung 51: Chemischer Verschiebungsindex für (A)  $^{13}C_\alpha$ - und (B)  $^{13}C'$ -Resonanzen nach Wishart.

Von dem Peptid C20W, dessen Resonanzen in dem gefilterten NOESY-Experiment zugeordnet wurden (Kapitel 2.4), weisen die sekundären chemischen Verschiebungen der  $H_\alpha$ -Resonanzen auf eine  $\alpha$ -helicale Struktur des Peptides hin (Abbildung 52 A). Erstellt man den chemischen Verschiebungsindex (Abbildung 52 B), so findet man eine Vorhersage einer durchgängigen Helix von Gln 5 bis Gln 18. Dies stimmt gut mit der Lage der Helix (Gln 5 bis Gln 16) überein, die in den berechneten Strukturen (Kapitel 4.2) gefunden wurden.

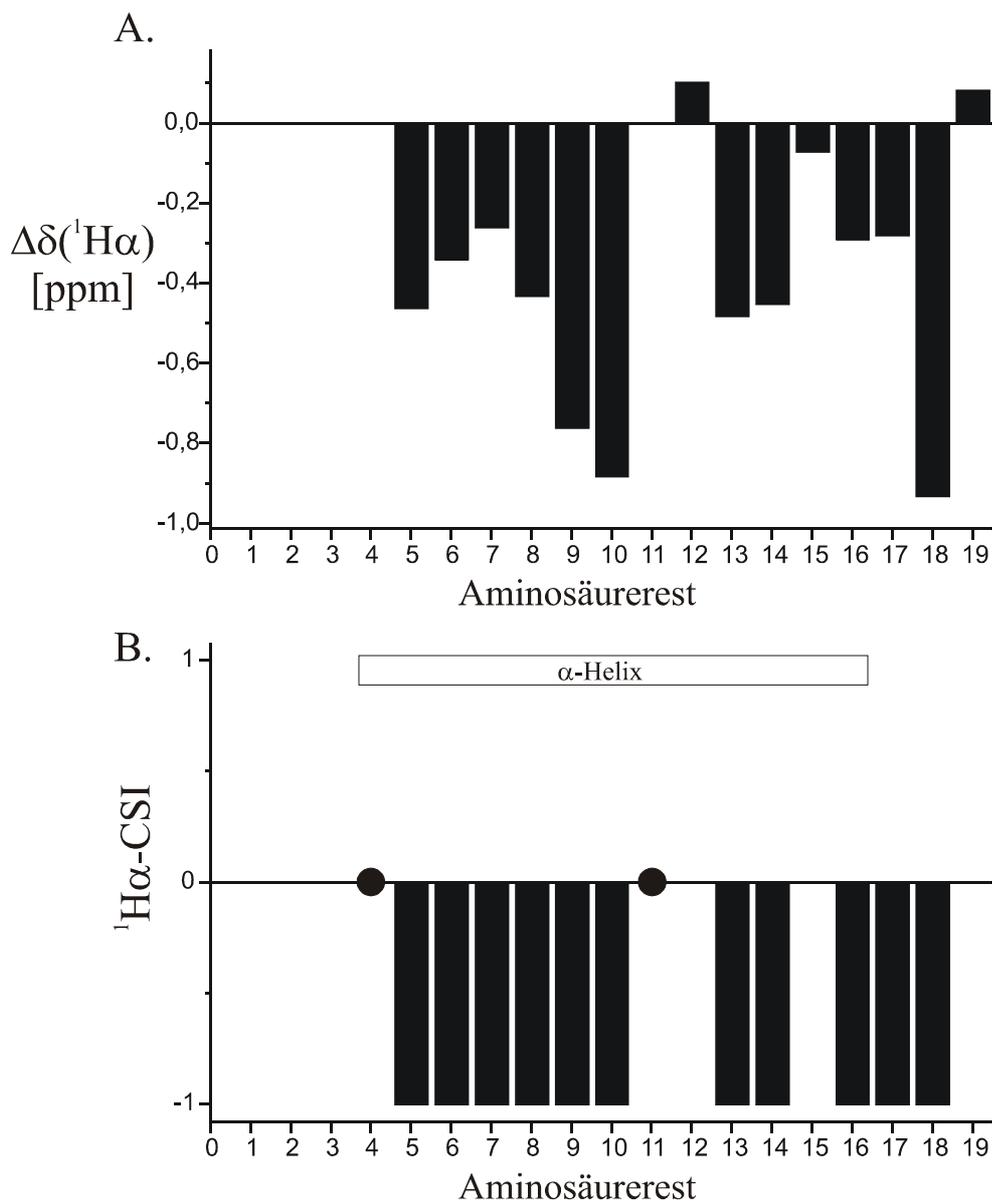
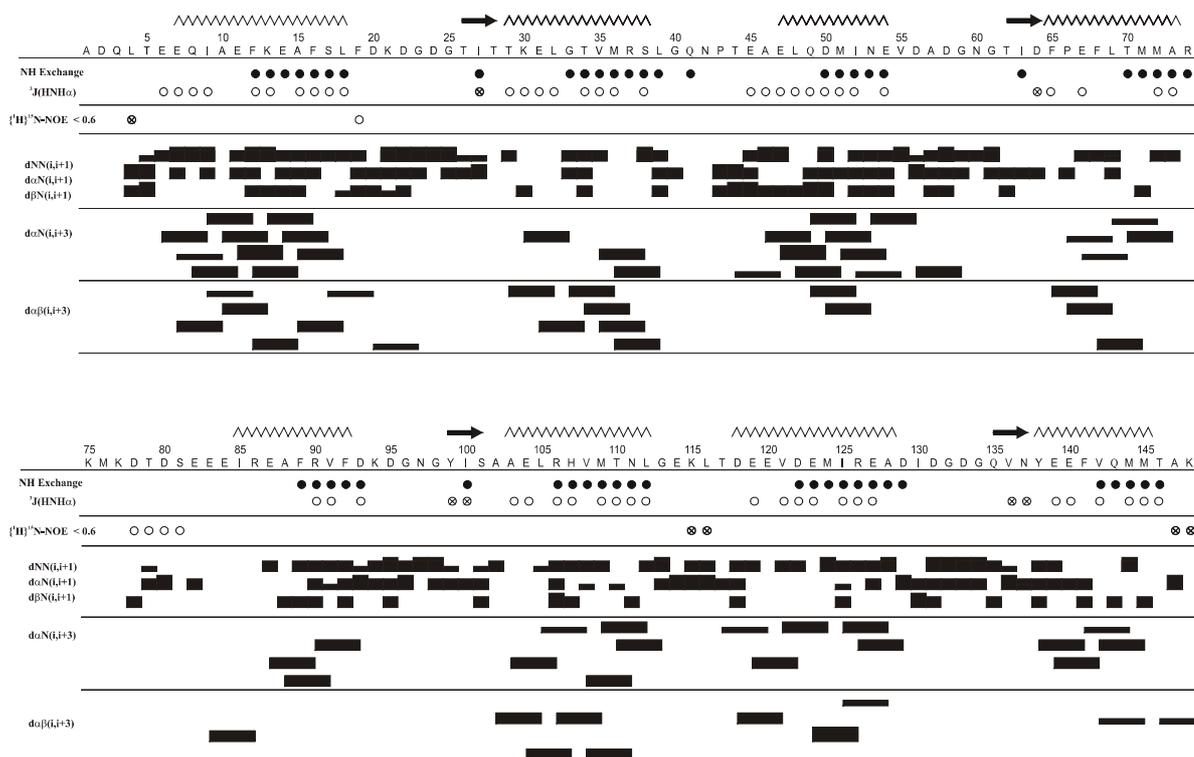


Abbildung 52: A. Sekundäre chemische Verschiebung der  $^1H_\alpha$  Resonanzen von C20W. B. Chemischer Verschiebungsindex nach Wishart. Glycine sind durch Kreise symbolisiert. Die  $\alpha$ -Helix erstreckt sich von Gln5 bis Gln16.

## 2.6.2 Analyse der NOE-Kreuzresonanzen

In den verschiedenen Sekundärstrukturelementen wie  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblätter haben die Protonen untereinander charakteristische Abstände, die zu einem typischen Muster an sequentiellen und mittelreichweitigen NOE's führen (50).

### A. Calmodulin



### B. C20W

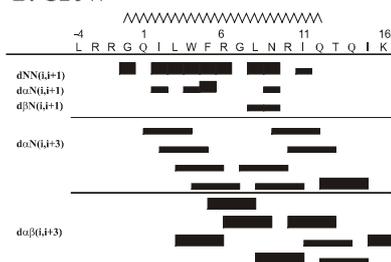


Abbildung 53: Balkendiagramm für verschiedene strukturetypische NOE-Kontakte für CaM (A) und C20W (B). Die Dicke der Balken entspricht der Intensität der NOE's. Über der Aminosäuresequenz ist die Lage der Sekundärstrukturelemente symbolisiert: zickzack-Linie für  $\alpha$ -Helices, Pfeile für  $\beta$ -Faltblätter.

Beispielsweise sind starke NOE-Resonanzen zwischen den Amidprotonen benachbarter Aminosäuren charakteristisch für  $\alpha$ -Helices, da die beiden Protonen  $H^N(i)$  und  $H^N(i+1)$  einen Abstand von ca. 2,8 Å aufweisen. Außerdem findet man helixtypische NOE's

zwischen  $H_{\alpha}(i)$  und  $H^{N}(i+3)$  bzw.  $H_{\alpha}(i)$  und  $H_{\beta}(i+3)$ , da sich Reste, die in der Primärsequenz um drei Reste voneinander entfernt liegen, durch die Helixwindung nahe kommen. In  $\beta$ -Faltblätter hingegen finden sich starke NOE-Resonanzen zwischen  $H_{\alpha}(i)$  und  $H^{N}(i+1)$  (Abstand 2,2 Å) und charakteristische NOE-Kontakte zwischen den einzelnen Strängen des Faltblatt, wohingegen die  $H^{N}(i)$ ,  $H^{N}(i+1)$  NOE's relativ schwach sind (Abstand 4,2-4,3 Å) (50). Trägt man die sequentiellen und mittelreichweitigen NOE-Kontakte in einem Balkendiagramm (Abbildung 53) auf, wobei die Dicke der Balken der Intensität der NOE's gemäß der Einteilung in stark, mittel und schwach entspricht, läßt sich die Art und Lage der Sekundärstrukturelemente gut erkennen. Es finden sich für CaM acht  $\alpha$ -Helices und vier kurze  $\beta$ -Faltblätter. Das Peptid C20W zeigt eine durchgängige  $\alpha$ -Helix.

In Abbildung 53 sind auch die Werte der gemessenen  $^3J_{\text{HNH}\alpha}$ -Kopplungen (Kapitel 2.2.8) eingetragen, die indikativ für Sekundärstrukturelemente sind und die in den Strukturrechnungen für Diederwinkel-*restraints* verwendet wurden.  $^3J_{\text{HNH}\alpha}$ -Kopplungen, die kleiner als 5,5 Hz sind, sind charakteristisch für  $\alpha$ -Helices und wurden durch offene Kreise symbolisiert.  $^3J_{\text{HNH}\alpha}$ -Kopplungen, die größer als 8 Hz sind, sind typisch für  $\beta$ -Faltblattstrukturen und sind als Kreise mit einem Kreuz dargestellt.

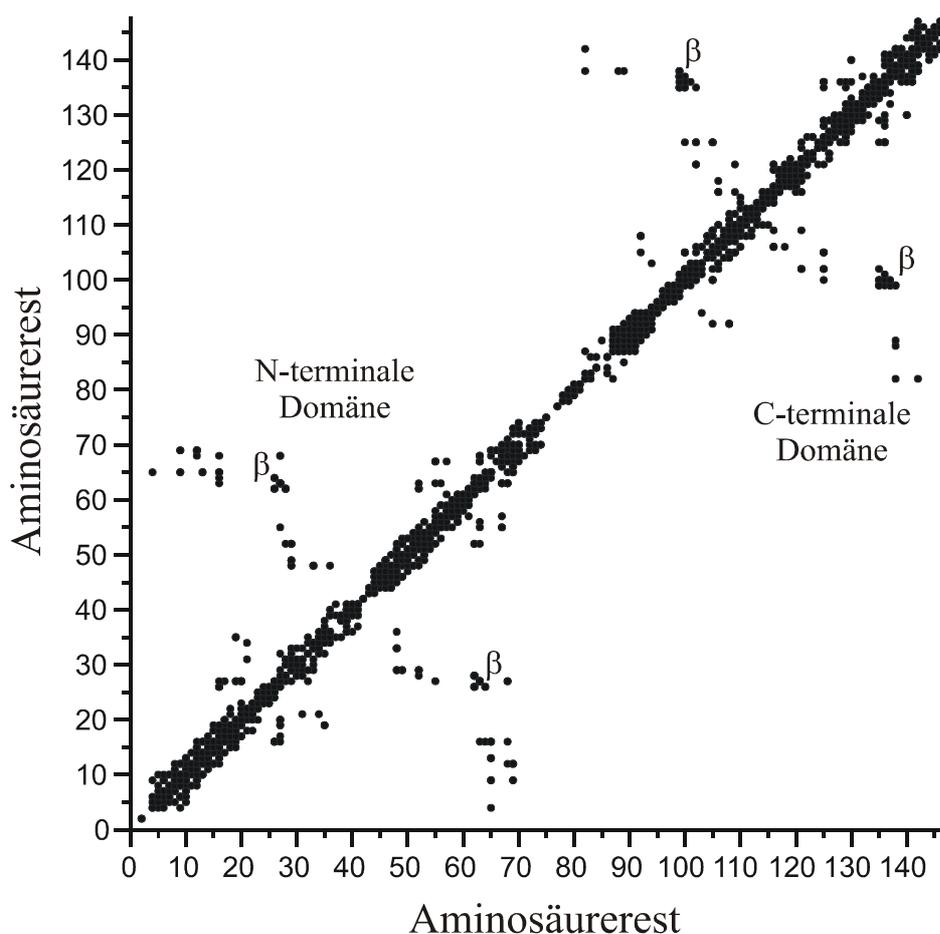


Abbildung 54: NOE-Kontaktendiagramm für CaM.

Außerdem wurden die langsam austauschenden Amidprotonen durch ausgefüllte Kreise markiert, die durch die Messung des Temperaturkoeffizienten bestimmt wurden (Kapitel 2.2.7) und in die Strukturrechnungen als Wasserstoffbrücken-*restraints* eingegangen sind. Die langsam austauschenden Amidprotonen befinden sich alle in Sekundärstrukturelementen.

Mit Hilfe eines NOE-Kontaktdiagramm, bei dem sämtliche NOE's zwischen zwei Aminosäuren als Punkt in dem Diagramm dargestellt werden, lassen sich auch erste Aussagen über die Tertiärstruktur eines Proteins treffen. In Abbildung 54 ist das NOE-Kontaktdiagramm von CaM gezeigt. Neben den intraresidualen NOE's, die auf der Diagonalen des Diagramms liegen, finden sich die sequentiellen und mittelreichweitigen NOE's, die die acht  $\alpha$ -helicalen Sequenzabschnitte charakterisieren. Die langreichweitigen NOE's, die zwischen den kurzen  $\beta$ -Faltblattsträngen auftreten, deuten auf ein antiparalleles Faltblatt zwischen dem Strang Thr26-Thr28 und dem Strang Thr62-Asp64 in der N-terminalen Domäne und auf ein antiparalleles Faltblatt zwischen dem Strang Tyr99-Ser101 und dem Strang Gln135-Asn137 in der C-terminalen Domäne hin. Zwischen beiden Domänen treten überhaupt keine NOE-Kontakte auf, so daß man zwei voneinander unabhängige Domänen erwartet.

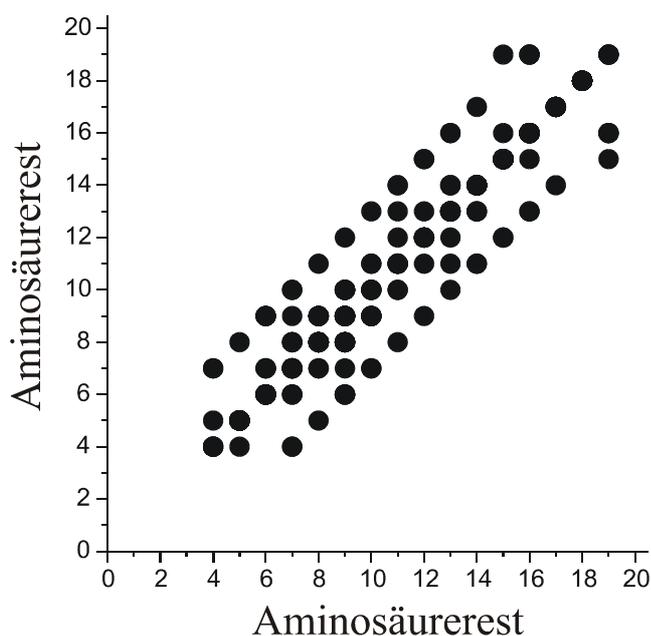


Abbildung 55: NOE-Kontaktdiagramm für das Peptid C20W.

Das NOE-Kontaktdiagramm von dem Peptid C20W weist nochmal auf die  $\alpha$ -helicale Struktur hin, wobei keine langreichweitigen NOE's beobachtet wurden (Abbildung 55).

## 2.7 Literatur

---

50. Wüthrich, K. (1986) *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, John Wiley & Sons, New York.
51. Jeener, J. (1971) *Ampère Summer School*, Basko Polje (Yugoslavia).
52. Aue, W.P., Bartholdi, and E., Ernst, R.R. (1976) *J. Chem. Phys.* 64, 2229.
53. Braunschweiler, L., and Ernst, R.R. (1983) *J. Magn. Reson.* 53, 521.
54. Jeener, J., Meier, B.H., Bachmann, P., and Ernst, R.R. (1979) *J. Chem. Phys.* 71, 4546.
55. Bothner-By, A.A., Stephans, R.L., Lee, J.-M., Warren, C.D., and Jeanloz, R.W. (1984) *J. Am. Chem. Soc.* 106, 811.
56. Bax, A., and Davis, D.G. (1985) *J. Magn. Reson.* 63, 207.
57. MacIntosh, L.P., and Dahlquist, F.W. (1990) *Quart. Rev. Biophys.* 23, 1.
58. LeMaster, D.M. (1994) *Prog. NMR Spectrosc.* 26, 371.
59. Marion, D., Driscoll, P.C., Kay, L.E., Wingfield, P.T., Bax, A., Gronenborn, A.M., and Clore, G.M. (1989) *Biochemistry* 28, 6150.
60. Fesik, S.W., and Zuiderweg, E.R.P. (1988) *J. Mag. Reson.* 78, 588.
61. Griesinger, C., Sørensen, O.W., and Ernst, R.R. (1989) *J. Magn. Reson.* 84, 14.
62. Kay, L.E., Clore, G.M., Bax, A., and Gronenborn, A.M. (1990) *Science* 249, 411-414.
63. Ikura, M., Kay, L.E., and Bax, A. (1990) *Biochemistry* 29, 4659-4667.
64. Fesik, S.W., and Zuiderweg, E.R.P. (1990) *Quart. Rev. Biophys.* 23, 97.
65. Clore, G.M., and Gronenborn, A.M. (1991) *Prog. NMR Spectrosc.* 23, 43.
66. Bax, A., and Grzesiek, S. (1993) *Acc. Chem. Res.* 26, 131.
67. Sattler, M., Schleucher, J., and Griesinger, C. (1999) *Prog. NMR Spec.* 34, 93-158.
68. Ikura, M., Kay, L.E., and Bax, A. (1990) *Biochemistry* 29, 4659.
69. Clubb, R.T., Thanabal, V., and Wagner, G. (1992) *J. Magn. Reson.* 97, 213.
70. Bax, A., and Ikura, M. (1991) *J. Biomol. NMR* 1, 99.
71. Grzesiek, S., and Bax, A. (1992) *J. Am. Chem. Soc.* 114, 6291.
72. Grzesiek, S., and Bax, A. (1992) *J. Magn. Reson.* 99, 201.
73. Wittekind, M., and Mueller, L. (1993) *J. Magn. Reson. Ser. B* 101, 201.
74. Grzesiek, S., Anglister, J., Ren, H., and Bax, A. (1993) *J. Am. Chem. Soc.* 115, 4369.
75. Kushlan, D.M., and LeMaster, D.M. (1993) *J. Biomol. NMR* 3, 701.
76. Grzesiek, S., and Bax, A. (1993) *J. Biomol. NMR* 3, 185.
77. Montelione, G.T., Lyons, B.A., Emerson, S.D., and Tashiro, M. (1992) *J. Am. Chem. Soc.* 114, 10974.
78. Grzesiek, S., and Bax, A. (1993) *J. Am. Chem. Soc.* 115, 12593.
79. Bax, A., Clore, G.M., and Gronenborn, A.M. (1990) *J. Magn. Reson.* 88, 425.
80. Yamazaki, T. Forman-Kay, J., and Kay, L.E. (1993) *J. Am. Chem. Soc.* 115, 11054

- 
81. Carlomagno, T., Maurer, M., Sattler, M., Schwendinger, M.G., Glaser, S.J., and Griesinger, C. (1996) *J. Biomol. NMR* 8, 161-170.
82. Bax, A., Delaglio, F., Grzesiek, S., and Vuister, G. W. (1994) *J. Biomol. NMR* 4, 787-797.
83. Bax, A., and Summers, M.F. (1986) *J. Am. Chem. Soc.* 108, 2093-2094.
84. Santoro, J., and King, G.C. (1992) *J. Magn. Reson.* 97, 202-207.
85. Van de Ven, F.J.M., and Philippens, M.E.P. (1992) *J. Magn. Reson.* 97, 637-644.
86. Vuister, G.W., and Bax, A. (1992) *J. Magn. Reson.* 98, 428-435.
87. Marion, D., Ikura, M., Tschudin, R., and Bax, A. (1989) *J. Magn. Reson.* 85, 393-399.
88. Wishart, D.S., Sykes, B.D., and Richards, F.M. (1991) *J. Mol. Biol.* 222, 311-333.
89. Wishart, D.S., Sykes, B.D., and Richards, F.M. (1992) *Biochemistry* 31, 1647-1651.
90. Wishart, D.S., Bigam, C.G., Holm, A., Hodges, R.S., and Sykes, B.D. (1995) *J. Biomol. NMR* 5, 67-81.
91. Deslauriers, R., and Smith, I.C.P. (1980) in *Biological Magnetic Resonance* (Berliner, L.J., and Reuben, J., Ed.), vol. 2, pp286-288, Plenum Press, New York.
92. Baxter, N.J., Williamson, M.P. (1997) *J. Biomol. NMR* 9, 359-369.
93. Cordier, F., and Grzesiek, S. (1999) *J. Am. Chem. Soc.* 121, 1601-1602.
94. Cornilescu, G., Hu, J.-S., and Bax, A. (1999) *J. Am. Chem. Soc.* 121, 2949-2950.
95. Cornilescu, G., Ramirez, B.E., Frank, M.K., Clore, G.M., Gronenborn, A.M., and Bax, A. (1999) *J. Am. Chem. Soc.* 121, 6275-6279.
96. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (1970) *J. Mol. Biol.* 52, 1-17.
97. IUPAC Recommendations (1998) *Pure & Appl. Chem.* 70, 117-142.
98. Karplus, M. (1959) *J. Chem. Phys.* 30,11.
99. Karplus, M. (1963) *J. Am. Chem. Soc.* 85, 2870.
100. Hu, J.-S., Grzesiek, S., and Bax, A. (1997) *J. Am. Chem. Soc.* 119, 1803.
101. Smith, L.J., Bolin, K.A., Schwalbe, H., MacArthur, M.W., Thornton, J.M., Dobson, C.M. (1996) *J. Mol. Biol.* 255, 494.
102. Bax, A., Max, D., and Zax, D. (1992) *J. Am. Chem. Soc.* 114, 6923.
103. Bax, A., Vuister, G.W., Grzesiek, S., Delaglio, F., Wang, A.C., Tschudin, R., and Zhu, G. (1994) *Methods Enzymol.* 239, 79.
104. Griesinger, C., Sørensen, O.W., and Ernst, R.R. (1985) *J. Am. Chem. Soc.* 107, 6394.
105. Griesinger, C., Sørensen, O.W., and Ernst, R.R. (1986) *J. Chem. Phys.* 85, 6837.
106. Griesinger, C., Sørensen, O.W., and Ernst, R.R. (1987) *J. Magn. Reson.* 75, 474.
107. Rexroth, A. Schmidt, P., Szalma, S., Geppert, T., Schwalbe, H., and Griesinger, C. (1995) *J. Am. Chem. Soc.* 117, 10389.
108. Vuister, G.W., and Bax, A. (1993) *J. Am. Chem. Soc.* 115, 7772.
109. Kubinowa, H., Grzesiek, S., Delaglio, F., and Bax, A. (1994) *J. Biomol. NMR* 4, 871.

- 
110. Hennig, M. (1999) *NMR-Spektroskopische Untersuchungen zur dynamischen Konformation von Proteinen*, Dissertation, Johann-Wolfgang-Goethe-Universität, Frankfurt am Main.
111. Osawa, M., Swindells, M.B., Tanikawa, J., Tanaka, T., Mase, T., Furuya, T., and Ikura, M. (1998) *J. Mol. Biol.* 276, 165-176.
112. Hu, J.-S., Grzesiek, S., and Bax, A. (1997) *J. Am. Chem. Soc.* 119, 1803-1804.
113. Otting, G., and Wüthrich, K. (1990) *Q. Rev. Biophys.* 23, 39.
114. Griesinger, C., Schwalbe, H., Schleucher, J., and Sattler, M (1994) In „*Two-Dimensional NMR Spectroscopy*“ (Croasmun, W.R. & Carlson, R.M.K., eds.), 2<sup>nd</sup> edition, VCH, New York.
115. Sattler, M. (1995) *Entwicklung und Anwendung neuer mehrdimensionaler, heteronuklearer NMR-Spektroskopischer Methoden mit verbesserter Empfindlichkeit für Biomakromoleküle*, Dissertation, Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt am Main.
116. Breeze, A.L. (2000) *Prog. NMR Spec.* 36, 323-372.
117. Wider, G., Weber, C., Traber, R., Widmer, H., and Wüthrich, K. (1990) *J. Am. Chem. Soc.* 112, 9015.
118. Wider, G., Weber, C., and Wüthrich, K. (1991) *J. Am. Chem. Soc.* 113, 4676.
119. Weber, C., Wider, G., von Freyberg, B., Traber, R., Braun, W., Widmer, H., and Wüthrich, K. (1991) *Biochemistry* 30, 6563.
120. Fesik, S.W., Gampe Jr., R.T., Eaton, H.L., Gemmecker, G., Olejniczak, E.T., Neri, P., Holzman, T.F., Egan, D.A., Edalji, R., Simmer, R., Helfrich, R., Hochlowski, J., and Jackson, M. (1991) *Biochemistry* 30, 6574.
121. Ikura, M., and Bax, A. (1992) *J. Am. Chem. Soc.* 114, 2433.
122. Böhlen, J.-M., and Bodenhausen, G. (1993) *J. Magn. Reson. Ser. A* 102, 293.
123. Kupče, Ě., and Freeman, R. (1995) *J. Magn. Reson. Ser. A* 115, 273.
124. Zwahlen, C., Legault, P., Vincent, S.J.F., Greenblatt, J., Konrat, R., and Kay, L.E. (1997) *J. Am. Chem. Soc.* 119, 6711.
125. Wishart, D.S., and Sykes, B.D. (1994) *J. Biomol. NMR* 4, 171-180.
126. Saito, H. (1986) *Magn. Reson. Chem.* 24, 835-845.
127. Spera, S., and Bax, A. (1991) *J. Am. Chem. Soc.* 113, 5490-5492.

### 3 Strukturrechnung des CaM/C20W-Komplexes

Die Auswertung der verschiedenen NMR-Experimente liefert eine Vielzahl an Informationen über die Konformation des Proteins. Um die ermittelten Daten in die dreidimensionale Struktur des Proteins umsetzen zu können, wird neben der Distanzgeometrie (128,129,130,131,132) die Methode der Moleküldynamik (133,134) herangezogen, die auch in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde. Im folgenden Abschnitt sollen die Grundlagen der Moleküldynamik-Simulationen kurz erläutert werden.

#### 3.1 Theorie der Moleküldynamik

Mit der Methode der Moleküldynamik wird versucht, die Bewegungen eines Moleküls im Verlauf der Zeit zu simulieren. Dazu ist die Kenntnis der Energie des Systems in Abhängigkeit von den Atomkoordinaten notwendig. Für kleine Moleküle bestimmt man die Energie des Systems mit Hilfe der Quantenmechanik. Für Makromoleküle ist die Anzahl der Atome und damit der Wechselwirkungen jedoch so groß, daß nur empirische Funktionen zur Verfügung stehen, die die auftretenden Wechselwirkungen auf klassischem Wege beschreiben. Energiefunktionen, die für Systeme mit einer Vielzahl an Atomen verwendet werden, setzen sich aus verschiedenen Termen zusammen, die die kovalenten und nicht-kovalenten Wechselwirkungen zwischen den Atomen widerspiegeln. Ein Beispiel ist die CHARMM-Energiefunktion (135,136,137).

Gleichung 1:

$$E_{\text{empirisch}}(\mathbf{R}) = \sum_{\text{Bindung}} K_b (b - b_0)^2 + \sum_{\text{Bindungs-}} K_\Theta (\Theta - \Theta_0)^2 \\ + \sum_{\text{Dihedrale \&}} K_\Phi [1 + \cos(n\Phi - \delta)] + \sum_{\text{"Improper" Winkel}} \left( \frac{A}{r_{ij}^{12}} - \frac{B}{r_{ij}^6} + \frac{q_i q_j}{D \cdot r_{ij}} \right)$$

Die potentielle Energie  $E_{\text{empirisch}}(\mathbf{R})$  des Systems ist abhängig von dem kartesischen Koordinatensatz  $\mathbf{R}$ , der die Positionen der Atome beschreibt. Bindungslängen  $b$ ,

Bindungswinkel  $\Theta$ , dihedrale Winkel  $\Phi$  und atomare Abstände  $r$  lassen sich leicht aus den Koordinaten der Atome berechnen. Die ersten beiden Terme der Energiefunktion beschreiben Abweichungen der Bindungslängen  $b$  und Bindungswinkel  $\Theta$  von den idealen Werten  $b_0$  und  $\Theta_0$ , wobei näherungsweise ein harmonisches Potential mit der Kraftkonstanten  $K_b$  bzw.  $K_\Theta$  angenommen wird. Der dritte Term beschreibt die potentielle Energie für die Rotation um eine Bindung. Die Energie ändert sich mit dem Torsionswinkel periodisch und wird daher durch eine Cosinus-Funktion angenähert.  $K_\Phi$  ist die entsprechende Kraftkonstante und  $\delta$  der Winkel, bei dem die Energie maximal wird. Neben diesen Energietermen, die aus den kovalenten Bindungen zwischen den Atomen resultieren, beschreibt der letzte Energiebeitrag die Summe über die nichtkovalenten Wechselwirkungen zwischen Atompaaren  $(i,j)$ . Diese Wechselwirkung ist zusammengesetzt aus einem abstoßenden Potential, das durch die Überlappung der Elektronenhüllen der Atome bei kleinen Abständen zustande kommt, einem anziehenden Potential, das auf fluktuierende Dipole zurückzuführen ist (Van der Waals-Wechselwirkungen), und einem elektrostatischen Potential, das je nach Vorzeichen der atomaren Partialladungen  $q_i$  und  $q_j$  abstoßend oder anziehend sein kann. Die Stärke der elektrostatischen Wechselwirkung ist dabei entscheidend von der effektiven Dielektrizitätskonstante  $D$  des Mediums abhängig.

Unter der Annahme, daß die native Struktur eines Proteins die Konformation mit der geringsten freien Energie darstellt, sollte es durch Berechnung des globalen Energieminimums möglich sein, diese Konformation des Proteins zu finden. Mit der oben dargestellten Energiefunktion ist es in der Praxis jedoch nicht möglich, aus einer ungefalteten Aminosäurekette die richtige dreidimensionale Struktur zu berechnen. Dies liegt zum einen an den vielen Annahmen und Näherungen, die für das Aufstellen der obigen Energiefunktion gemacht wurden, und zum anderen an der geringen Stabilisierungsenthalpie (ca. 0,04 kJ pro Atom), die beim Übergang des ungefalteten Proteins in den gefalteten Zustand frei wird.

### 3.1.1 Moleküldynamik mit experimentellen Randbedingungen

Stehen strukturelle Daten aus NMR-Experimenten zur Verfügung, können diese in die Moleküldynamik-Simulation mit einbezogen werden (*restrained molecular dynamics*, RMD). Hierfür wird die Energiefunktion  $E_{\text{empirisch}}(\mathbf{R})$  um Potentialterme erweitert, die die Abweichungen zwischen den beobachteten und den berechneten Eigenschaften des Systems berücksichtigen und dann null werden, wenn alle experimentellen Randbedingungen erfüllt werden. Die Gewichtung der experimentellen Potentialterme erfolgt über einen Skalierungsfaktor  $\omega$ .

Gleichung 2: 
$$E_{\text{RMD}}(\mathbf{R}) = E_{\text{empirisch}}(\mathbf{R}) + \omega \cdot E_{\text{experimentell}}(\mathbf{R})$$

Die experimentellen Terme beinhalten die aus der Intensität der NOE's ermittelten Abstands-*restraints* ( $E_{\text{NOE}}$ ), die aus den Kopplungskonstanten abgeleiteten dihedralen Winkel-*restraints* ( $E_{\text{CDIH}}$ ) und eine Reihe weiterer experimentellen Daten, wie J-Kopplungen, chemische Verschiebung.

Die NOE-Abstands-*restraints* werden in Form eines quadratischen Potentials mit einem flachen Boden (*square-well potential function*) in die Berechnungen eingeführt (Gleichung 3). Dabei ist  $r$  der tatsächliche Abstand der Protonen,  $r_l$  und  $r_u$  legen die Unter- und Obergrenze (*lower and upper limit*) des erlaubten Distanzintervalls fest.

Gleichung 3:

$$\begin{aligned} E_{\text{NOE}}(\mathbf{R}) &= \sum_{\text{NOE's}} K_{\text{NOE}} (r - r_u)^2 && \text{für } r_u < r \\ E_{\text{NOE}}(\mathbf{R}) &= 0 && \text{für } r_l < r < r_u \\ E_{\text{NOE}}(\mathbf{R}) &= \sum_{\text{NOE's}} K_{\text{NOE}} (r_l - r)^2 && \text{für } r < r_l \end{aligned}$$

Für Abstände  $r$ , die größer als  $r_u$  sind, spricht man von einer Verletzung des entsprechenden NOE's, die sich in einem hohen positiven Energiebeitrag widerspiegelt. Da dies in frühen Stadien der Strukturberechnung für die meisten NOE-Distanzwerte der Fall ist, wurde von Nilges ein erweitertes Potential (*soft square-well potential function*) eingeführt, das bei einem Abstand  $r_{\text{switch}}$  von der quadratischen in eine lineare Form übergeht (Gleichung 4) und damit bei starken NOE-Verletzungen kleinere Energiebeiträge liefert (138).

Gleichung 4:

$$E_{\text{NOE}}(\mathbf{R}) = \sum_{\text{NOE's}} K_{\text{NOE}} \left[ c(r - r_u) + a + \frac{b}{(r - r_u)} \right] \quad \text{für } r > r_{\text{switch}}$$

Während der Strukturberechnung kann  $r_{\text{switch}}$  und die Steigung  $c$  der Geraden so verändert werden, daß auch zu Beginn der Simulation stark verletzte NOE's erfüllt werden können. In Abbildung 56 ist der Verlauf des *soft square-well* Potentials gezeigt.

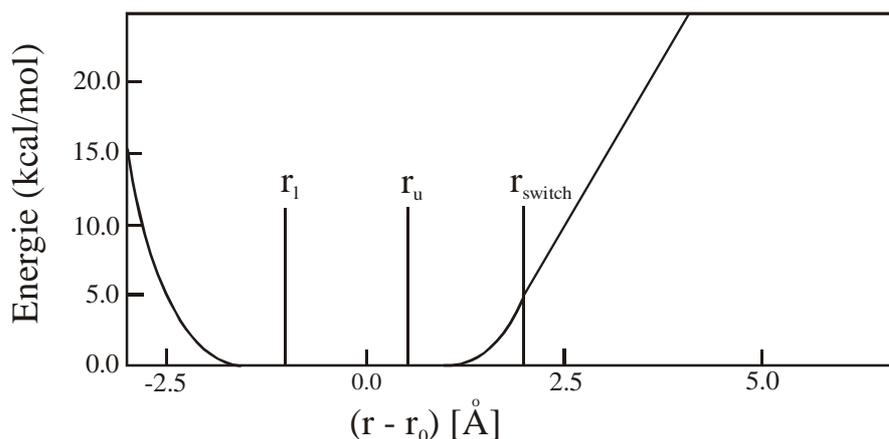


Abbildung 56: Verlauf des Soft Square Potentials für NOE Abstandsrestraints. Zwischen  $r_l$  und  $r_u$  ist das Potential null, für  $r < r_l$  und  $r > r_u$  steigt das Potential quadratisch an, für  $r > r_{switch}$  nimmt es linear zu.

Zur Berücksichtigung der experimentell gemessenen Dihedralwinkel wird ebenfalls ein Potential ( $E_{CDIH}$ ) eingeführt, daß bei Überschreitung des erlaubten Intervalls ( $\Theta_{min}$ ;  $\Theta_{max}$ ) quadratische Form annimmt (Gleichung 5).

Gleichung 5:

$$\begin{aligned}
 E_{CDIH}(\mathbf{R}) &= \sum_{\substack{\text{dihedrale} \\ \text{Winkel}}} K_{CDIH} (\Theta - \Theta_{max})^2 && \text{für } \Theta > \Theta_{max} \\
 E_{CDIH}(\mathbf{R}) &= 0 && \text{für } \Theta_{min} < \Theta < \Theta_{max} \\
 E_{CDIH}(\mathbf{R}) &= \sum_{\substack{\text{dihedrale} \\ \text{Winkel}}} K_{CDIH} (\Theta_{min} - \Theta)^2 && \text{für } \Theta < \Theta_{min}
 \end{aligned}$$

Bei vielen Moleküldynamik-Simulationen wird zur Einsparung an Rechenzeit der Potentialterm der nicht-kovalenten Wechselwirkungen von  $E_{empirisch}(\mathbf{R})$  folgendermaßen vereinfacht. Das elektrostatische Potential wird vernachlässigt und das Lennard-Jones-Potential wird durch eine abstoßende *repel*-Funktion ersetzt (138,139).

Gleichung 6:

$$\begin{aligned}
 E_{repel}(\mathbf{R}) &= \sum_{\text{Paare}(i,j)} K_{repel} (s^2 \cdot r_{min}^2 - r^2) && \text{für } r < s \cdot r_{min} \\
 E_{repel}(\mathbf{R}) &= 0 && \text{für } r > s \cdot r_{min}
 \end{aligned}$$

Dabei ist  $K_{repel}$  eine Kraftkonstante,  $r_{min}$  die Summe der Van-der-Waals-Radien,  $r$  der aktuelle Abstand und  $s$  ein Skalierungsfaktor. Mit dieser Vereinfachung werden die

Atome als harte Kugeln betrachtet, die sich bei Berührung stark abstoßen. Anziehende Kräfte zwischen den Atomen werden in der Berechnung nur durch das fiktive Potential  $E_{\text{NOE}}$  dargestellt.

### 3.1.2 Algorithmen zur Simulation der Dynamik

Mit der Kenntnis einer Energiefunktion für das System ist es nun möglich, die Konformation des Moleküls im Verlauf der Zeit zu ermitteln. Dazu wird für die Simulation von einer beliebigen, aber möglichst gestreckten Konformation mit der richtigen kovalenten Verknüpfung aller Atome des Moleküls ausgegangen. Für jedes Atom ist damit die Position  $r_i$  zum Startpunkt  $t_0$  bekannt. Nach einem Zufallsmechanismus werden den Atomen dann Geschwindigkeiten  $v_i(t_0)$  zugewiesen, die nach einer Maxwell-Funktion verteilt sind. Die Temperatur des Systems ist dabei mit der Geschwindigkeit der Atome über folgende Gleichung korreliert.

*Gleichung 7:*

$$E_{\text{kin}} = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N m_i v_i^2 = \frac{3}{2} NkT$$

Dabei ist  $E_{\text{kin}}$  die kinetische Energie des Systems,  $m_i$  die Masse des Atoms  $i$  mit der Geschwindigkeit  $v_i$ ,  $N$  die Anzahl der Atome,  $k$  die Boltzmann-Konstante und  $T$  die absolute Temperatur.

Bei allen Algorithmen erfolgt die Berechnung der Atomkoordinaten  $x_i$  des Systems in Abhängigkeit von der Zeit auf der Basis der Newtonschen Bewegungsgleichung.

*Gleichung 8:*

$$F_i = m_i \frac{\partial^2 x_i}{\partial t^2}$$

Um die Temperatur des Moleküls kontrollieren zu können, wird das System an ein externes virtuelles Wärmebad gekoppelt (140). Hierzu wird die Newtonsche Bewegungsgleichung um einen Reibungsterm mit einem skalierbaren Reibungskoeffizienten  $b_0$  (139) erweitert.

Gleichung 9:

$$F_i - b m_i \frac{\partial x_i}{\partial t} = m_i \frac{\partial^2 x_i}{\partial t^2} \quad \text{mit } b = b_0 (T/T_{\text{aktuell}} - 1)$$

T ist die gewünschte Temperatur,  $T_{\text{aktuell}}$  die momentane Temperatur und b der neu skalierte Reibungskoeffizient.

Die Kraft  $F_i(t_0)$ , die zur Zeit  $t_0$  auf ein Atom i des Systems wirkt, erhält man durch partielle Differentiation der Potentialfunktion.

Gleichung 10:

$$F_i(t_0) = - \frac{\partial E_{\text{RMD}}(\mathbf{R})}{\partial r_i}$$

Für das gesamte System mit N Atomen erhält man damit einen Satz an 3N gekoppelten Differentialgleichungen. Unter der Annahme, daß die Kräfte im System über ein Zeitintervall  $\Delta t$  konstant sind, können die Gleichungen mit Hilfe der numerischen Integration gelöst werden (141). Als ersten Ansatzpunkt für die verschiedenen Algorithmen (142,143,144), die zur Lösung der Differentialgleichungen herangezogen werden, dient eine Taylor-Reihe, mit der die Position jedes Atoms i nach einem kleinen Zeitintervall  $\Delta t$  genähert werden kann.

Gleichung 11:

$$x_i(t_0 + \Delta t) = x_i(t_0) + \frac{\partial x_i(t_0)}{\partial t} \cdot \Delta t + \frac{1}{2} \cdot \frac{\partial^2 x_i(t_0)}{\partial t^2} \cdot \Delta t^2 + \dots$$

mit  $v_i = \frac{\partial x_i(t_0)}{\partial t}$  und  $a_i = \frac{\partial^2 x_i(t_0)}{\partial t^2}$

Die Länge des Zeitintervalls  $\Delta t$  muß dabei kurz sein im Vergleich zu den betrachteten Bewegungen mit der höchsten Frequenz. Da bei der Potentialfunktion  $E(\mathbf{R})$  die Vibrationsschwingungen der Atome ( $\nu = 10^{13} - 10^{14} \text{ s}^{-1}$ ) berücksichtigt werden, ist ein Zeitschritt  $\Delta t = 0,5 - 1 \times 10^{-15} \text{ s}$  sinnvoll (145). Wird die obige Bewegungsgleichung für alle Atome des Systems gelöst, erhält man die Konformation des Moleküls nach dem Zeitschritt  $\Delta t$ . Mit Hilfe von Computern läßt sich dieser Schritt so oft wiederholen, bis die Potentialfunktion ein Minimum erreicht und die Konformation sich global nicht mehr ändert.

### 3.1.3 Simulated Annealing (SA)

Von der nativen Struktur des Proteins wird angenommen, daß sie die energieärmste Konformation darstellt. Das Auffinden eines derartigen globalen Energieminimums ist jedoch erheblich durch die Existenz vieler lokaler Energieminima erschwert (Abbildung 57).

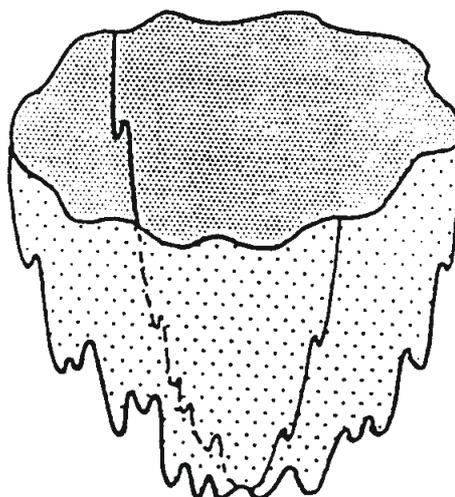


Abbildung 57: Schematische Darstellung der Potentialfläche eines biologischen Makromoleküls. Jedes der zahlreichen lokalen Minima spiegelt dabei eine unterschiedliche Konformation des Moleküls wieder (aus 137).

Bei der Strukturberechnung steht man daher vor dem Problem, daß globale Minimum der Potentialfunktion, die von sehr vielen Parametern abhängt, zu finden. Eine Lösung für ein derartig komplexes, nicht-lineares Optimierungsproblem stellt die Methode des *Simulated Annealing* (SA) (146) dar. Strategien, die den Einsatz von SA-Algorithmen in Moleküldynamik-Simulationen ermöglichen, wurden von Clore et al. (147) und Brünger et al. (148) entwickelt.

Diesen Strategien folgend werden auf dem Weg zum Energieminimum mit einer endlichen Wahrscheinlichkeit auch energetisch ungünstige Strukturen zugelassen. Von einem Simulationsschritt zum nächsten muß die potentielle Energie daher nicht zwingend abnehmen, sondern kann auch ansteigen. Eine energetisch ungünstigere Struktur tritt dabei mit der Wahrscheinlichkeit  $\exp(-\Delta E/kT)$  auf, wobei  $\Delta E$  die Potentialänderung während des Simulationsschritts,  $k$  die Boltzmannsche Konstante und  $T$  die Temperatur des Systems ist. Für ein erfolgreiches Verlassen eines globalen Energieminimums muß die Energiebarriere in einem energetisch ansteigenden Simulationsschritt überwunden werden. Um dies zu gewährleisten, führt man die Simulation zu Beginn bei hoher Temperatur (1000 - 2000 K) durch. Dann wird das System schrittweise abgekühlt. Bei jeder Temperatur muß die Simulation so lange durchgeführt werden, bis sich ein Gleichgewichtszustand eingestellt hat.

Eine hohe Erfolgsrate wird durch ein dreiphasiges SA erzielt, das von einer gestreckten Proteinkette (138) oder von zufälligen Koordinaten (149) startet. Die erste Phase, die Hochtemperaturphase, dient einem möglichst vollständigem Absuchen des Konformationsraums, wobei die Temperatur und der Gewichtungsfaktor  $\omega$  (siehe Gleichung 2) konstant gehalten werden. Eine Reduzierung der Van der Waals-Radien ermöglicht, daß sich die Atome leichter aneinander vorbeibewegen können und verhindert so falsch gefaltete Strukturen (148). In der zweiten Phase wird eine NOE-Potentialfunktion mit steilerer Asymptote verwendet, um eine bessere Erfüllung der experimentellen Daten zu gewährleisten. In der dritten Phase wird das System abgekühlt. Dabei werden die Van der Waals Radien auf ihren tatsächliche Wert erhöht und eine quadratische Potentialfunktion für den NOE-Term verwendet.

Eine weitere Verbesserung der Struktur kann durch ein zusätzliches *refinement* erreicht werden. Die Berechnung erfolgt analog zur dritten Phase der oben beschriebenen Strategie, aber mit stärkerer Gewichtung der kovalenten Geometrie.

Um zu überprüfen, ob man mit dem *simulated annealing* tatsächlich eine Konformation des Proteins erzeugt hat, die nahe am globalen Minimum liegt, wird die Simulation für mehrere, verschiedene Startstrukturen durchgeführt. Weichen die so erhaltenen Endstrukturen nur wenig voneinander ab, dann ist die Wahrscheinlichkeit hoch, daß man eine Konformation des Proteins gefunden hat, die die experimentellen Daten erfüllt und die der nativen Konformation entspricht. Findet man jedoch nicht konvergierende Strukturen, so standen entweder zu wenig experimentelle Daten zur Verfügung oder das untersuchte Protein besitzt keine eindeutig definierte Struktur.

### 3.1.4 Energieminimierung

Nach einer Moleküldynamikrechnung mit *simulated annealing* schließt sich ein Energieminimierungsschritt an, mit der das nächstgelegene Minimum auf der Energiehyperfläche erreicht wird, so daß innere Spannungen des Moleküls abgebaut werden. Die Algorithmen der Energieminimierung nutzen dabei die gleiche Potentialfunktion wie die Moleküldynamik, wobei vor allem zwei Methoden zum Einsatz kommen, das *Steepest Descent*- (150,151) und das *Conjugate Gradient*-Verfahren (152,153). Beide Algorithmen errechnen die neuen Koordinaten  $x_k$  des Systems aus den ursprünglichen Koordinaten  $x_{k-1}$  nach folgender Gleichung:

Gleichung 12:

$$x_k = x_{k-1} + \lambda_k s_k$$

wobei  $s_k$  die Abstiegsrichtung und  $\lambda_k$  die Schrittweite festlegt.

Beim *Steepest Descent*-Algorithmus ergibt sich die Abstiegsrichtung direkt aus der Richtung des steilsten Gradienten ( $s_k = -g_k$ ), so daß nur das nächstgelegene lokale Minimum der Potentialfläche gefunden werden kann. Der Hauptnachteil dieser Methode ist die langsame Konvergenz der berechneten Strukturen in der Nähe des Minimums.

Im Gegensatz dazu wird beim *Conjugate Gradient*-Algorithmus neben der Richtung des aktuellen Gradienten  $g_k$  auch die bisherige Minimierungsrichtung  $s_{k-1}$  berücksichtigt.

Gleichung 13:

$$s_k = -g_k + \beta s_{k-1}$$

Der Gewichtungsfaktor  $\beta$  errechnet sich dabei aus dem Verhältnis zwischen aktuellem Gradienten und dem Gradienten im letzten Schritt.

Gleichung 14:

$$\beta = \frac{|g_k|^2}{|g_{k-1}|^2}$$

Der Vorteil des Algorithmus liegt in seiner besseren Konvergenz, da mehrere Richtungen auf der Potentialfläche durchsucht werden, wobei aber ein erhöhter Rechenaufwand nötig ist. Vorteilhaft ist daher eine Kombination beider Algorithmen, wobei man mit dem *Steepest Descent*-Verfahren das Molekül in die Nähe des Minimums bringt, um dann mit dem *Conjugate Gradient*-Verfahren fortzufahren.

## 3.2 Moleküldynamik-Protokolle

Für alle Moleküldynamikrechnungen des CaM/C20W-Komplexes wurde das Programmpaket X-PLOR in der Version 3.851 verwendet (139). Alle beschriebenen Protokolle und Dateien finden sich im Anhang (Kapitel 6.6).

### 3.2.1 Generierung der Molekültopologie und der Startstruktur

Für alle Berechnungen wurde die Parameter-Datei *parallhdg.pro* verwendet, die Teil des X-PLOR Programmpakets ist. Die Parameter in *parallhdg.pro* basieren auf dem CHARMM-Kraftfeld (135). Die Datei enthält die Informationen über die kovalente und nicht-kovalente Geometrie der Peptidkette (Bindungslängen, Bindungswinkel, Van der Waals Radien, usw.), sowie skalierbare Kraftkonstanten für alle Potentialterme (siehe Kapitel 3.1.1).

Mit Hilfe des Standardprotokolls *generate\_cam.inp*, das auf die Aminosäuresequenz von CaM in der Datei *camsequence.dat* zurückgreift, wurde als erster Schritt das Topologiefile *cam.psf* (Abk. für *protein structure file*) erzeugt, in dem alle Atome von CaM mit einer Atomnummer, -name und -typ, Partialladung, Masse und Nummer und Typ des Aminosäurerestes enthalten sind. Für die Definition der Topologie der Aminosäurereste, sowie für die Atommassen und -ladungen wird die Standarddatei *topallhdg.pro* eingelesen. Die Topologie der Peptidbindung ist definiert in der Datei *toph19.pep*, die ebenfalls eingelesen wird. Die Atome von CaM erhielten den Zusatz „segid B“, um sie von den Atomen des Peptids C20W zu unterscheiden, die den Zusatz „segid A“ tragen.

Im nächsten Schritt wurde mit dem Protokoll *generate\_template\_cam.inp* ein Strukturfile *cam.pdb* (Abk. für *protein data base*) erzeugt, in dem CaM als gestreckte Proteinkette vorliegt. Das Protokoll führt 100 Schritte Energieminimierung, 50 fs Moleküldynamik, 100 Schritte Energieminimierung, 2,5 ps Moleküldynamik und abschließend 200 Schritte Energieminimierung durch, um eine gestreckte Proteinkette zu erzeugen, die eine korrekte lokale Geometrie und keine Verletzungen der Van der Waals-Radien aufweist.

Für die Einführung der vier Calciumatome wurde ein Parameterfile *param.ca* erstellt, in dem die Größe des Van der Waals-Radius des zweifach positivgeladenen Calciumions enthalten ist. Der Wert wurde aus der Datei *parallh22x.pro* entnommen, die ebenfalls auf dem CHARMM-Kraftfeld (135) beruht. Das Topologiefile für die Calciumionen *topo.ca* enthält die Atommasse von 40.08 Da und die zweifach positive Ladung. Mit dem Protokoll *ca\_psf.inp* wurde nun ein Topologiefile für vier unverknüpfte Calciumionen (*ca.psf*) erstellt. Das dazugehörige Strukturfile *ca.pdb* wurde mit einem Protokoll erzeugt, daß analog zu *generate\_template\_cam.inp* abläuft.

Mit Hilfe des Protokolls *make\_cluster.inp* (154) wurden die Files für CaM (*cam.psf* und *cam.pdb*) und die Files für die Calciumionen (*ca.psf* und *ca.pdb*) verknüpft zu einem einheitlichen Topologiefile (*cam\_mit\_ca.psf*) und der Startstruktur (*cam\_mit\_ca.pdb*), die als Ausgangspunkt für die Strukturrechnung diente. Ein Ausschnitt aus der gestreckten Kette, der N-Terminus von CaM und die vier Calciumionen ist in Abbildung 58 zu sehen.

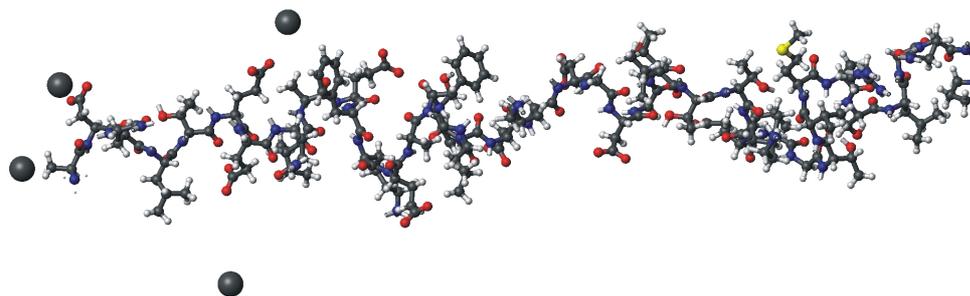


Abbildung 58: N-Terminus der gestreckten Proteinkette von CaM mit vier Calciumionen. Diese Startstruktur dient als Ausgangspunkt für die Strukturrechnung.

Für das Peptid C20W wurde mit dem Protokoll *generate\_c20w.inp*, das die Aminosäuresequenz des Peptids aus der Datei *c20wsequence.dat* einliest, ein Topologiefile *c20w.psf* erstellt, wobei die Topologieparameter aus den Dateien *topallhdg.pro* und *toph19.pep* verwendet wurden. Die Atome von C20W erhielten den Zusatz „segid A“, um sie von den Atomen von CaM zu unterscheiden. Das dazugehörige Strukturfile *c20w.pdb*, in dem C20W als eine gestreckte Peptidkette vorliegt, wurde mit einem Protokoll erzeugt, daß analog zu *generate\_template\_cam.inp* abläuft.

### 3.2.2 Simulated Annealing

Für die Strukturrechnung des CaM/C20W-Komplexes wurde das *simulated annealing*-Protokoll *sa\_lal.inp* (155,156) von Michael Nilges verwendet. Zu Beginn des Protokolls werden die Topologiefiles (*cam\_mit\_ca.psf* und *c20w.psf*), die Startstrukturen (*cam\_mit\_ca.pdb* und *c20w.pdb*) und die Parameterfiles (*parallhdg.pro* und *param.ca*) eingelesen. Durch Aufrufen der Unterdatei *read\_aldata.xplor* werden die experimentellen Daten (Abstands-*restraints* und Winkel-*restraints*) und die Parameter, die die Form der Potentiale für die experimentellen Daten definieren, eingelesen.

Zu Beginn der Strukturrechnung wird mit Hilfe der Unterdatei *sa\_l\_randomchain.xplor* eine randomisierte Startstruktur erzeugt, wobei die Rückgratwinkel  $\Phi$  und  $\Psi$  um zufällig gewählte Beträge gedreht werden. Damit startet jeder *simulated annealing*-Lauf von einer anderen Startstruktur, so daß ein Absuchen des gesamten Konformationsraums gewährleistet ist. Nun schließt sich eine kurze Energieminimierung von 50 Schritten an, die zum Abbau der durch die Randomisierung der Rückgratwinkel entstandenen Spannungen dient.

In der folgenden Hochtemperaturphase von 32.5 ps (*sa\_l\_hightemp.xplor*) bei konstant 2000 K faltet sich die gestreckte Proteinkette nun in eine dreidimensionale Struktur, die durch die experimentellen Daten definiert wird. Die Energierterme von Bindungslängen, Bindungswinkeln und uneigentlichen Dihedralwinkeln sind bereits von Anfang an wirksam. Die Energiekonstante der Abstands-*restraints* wird in fünf Schritten von 3.125 kcal mol<sup>-1</sup> Å<sup>-2</sup> auf einen Endwert von 50 kcal mol<sup>-1</sup> Å<sup>-2</sup> erhöht. Van der Waals-Wechselwirkungen werden nur für die C<sub>α</sub>-Atome und für je ein Schweratom in der Seitenkette berücksichtigt, das in der Unterdatei *sa\_l\_reduced.xplor* definiert ist. Die Energiekonstante für diese van der Waals-Wechselwirkungen entspricht zu Beginn der Hochtemperaturphase 0.2% der Energiekonstante der Abstandsrestraints und wird parallel zu dieser erhöht. Durch dieses Verfahren wird zum einen Rechenzeit eingespart. Zum anderen wird mit dieser Vorgehensweise der Konformationsraum besser abgesucht, da die Atome einander durchdringen können und Rotationen um Bindungen nicht behindert werden (157). Die Definition aller Anfangs- und Endwerte für die Energiekonstanten findet sich in der Unterdatei *sa\_l\_initial\_values.xplor*.

Da für die diastereotopen Protonen in Methylgruppen und für die diastereotopen Methylgruppen in Leucinen und Valinen keine stereospezifische Zuordnung getroffen wurde, wird von jedem der fünf Dynamikschritten in der Hochtemperaturphase das *Floating Chirality*-Verfahren (*swap15v.xplor*) angewendet. Hierzu werden die Protonen bzw. Methylgruppen, die in der Unterdatei *setup\_swapnew.xplor* definiert sind, gegeneinander ausgetauscht und dann wird überprüft, ob die Abstandsrestraints so besser erfüllt werden (158).

Magnetisch äquivalente Protonen werden durch sogenannte Pseudoatome ersetzt, deren Lage durch den Schwerpunkt der zu ersetzenden Protonen definiert wird. Damit die Abstands-*restraints* zu so einem Pseudoatom die entsprechende Länge haben, wird eine Korrektur auf die obere Grenze des Abstands-*restraints* hinzugerechnet. In der vorliegenden Arbeit wurden für die Pseudoatome von Methylgruppen eine Korrektur von 0.5 Å addiert (159).

An die Hochtemperaturphase schließen sich zwei Abkühlphasen an. In der ersten Kühlphase (*sa\_l\_cool1.xplor*) wird während der Dauer von 25 ps die Temperatur in 50 K Schritten von 2000 auf 1000 K gesenkt. Nun sind auch die Dihedralwinkel-*restraints* wirksam und die Energiekonstante der van der Waals-Wechselwirkungen wird schrittweise auf den Endwert von 4 kcal mol<sup>-1</sup> Å<sup>-2</sup> erhöht. Weiterhin wird das *Floating Chirality*-Verfahren alle 1.25 ps durchgeführt.

Zu Beginn der zweiten Kühlphase (*sa\_l\_cool2.xplor*) haben die Energiekonstanten für alle Wechselwirkungen ihren Endwert erreicht. Nun wird das System für die Dauer von 10 ps von 1000 auf 100 K in 50 K Schritten abgekühlt. Regelmäßig wird die Prochiralität durch das *Floating Chirality*-Verfahren optimiert. Mit einer abschließenden Energieminimierung von 200 Schritten endet das *simulated annealing*-Protokoll. Die Unterdatei *print\_coorheader.xplor* fügt zu den Koordinaten der Endstruktur die Gesamtenergie, die Beiträge der einzelnen Energierterme,

Abweichungen von den Sollwerten sowie Verletzungen der Abstands- und Dihedralwinkel-*restraints* dazu.

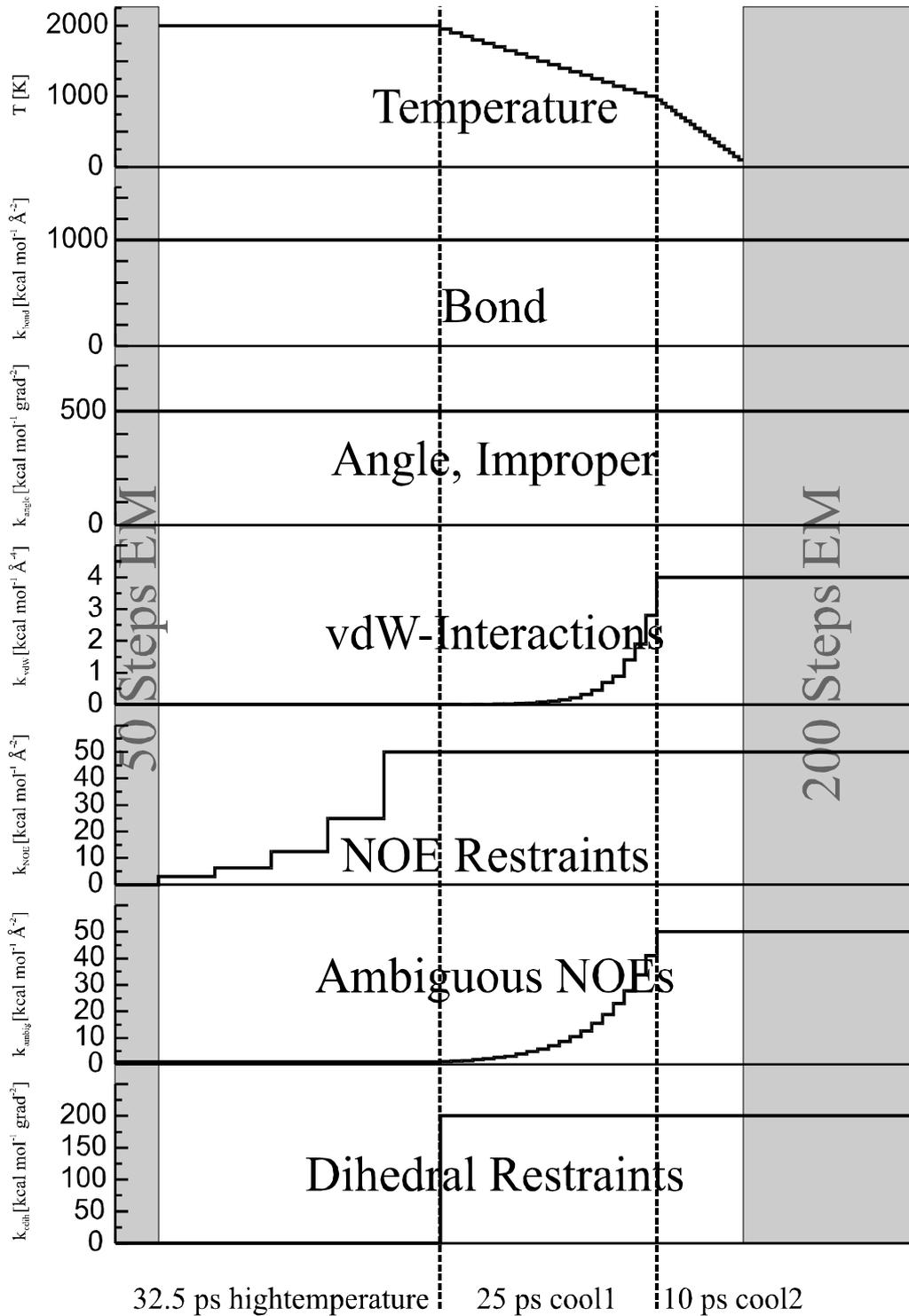


Abbildung 59: Verlauf der verschiedenen Parameter des simulated annealing-Protokolls.

Das Protokoll wird nun so oft wiederholt, daß die gewünschte Anzahl an Endstrukturen berechnet werden. Der Verlauf der verschiedenen Parameter des *simulated annealing*-Protokolls ist zusammenfassend in Abbildung 59 dargestellt.

### 3.3 Der Datensatz

Für die Strukturrechnung des CaM/C20W-Komplexes wurde ein Datensatz verwendet, der in Abbildung 60 zusammengefaßt ist.

#### **1645 intramolekulare NOE Restraints von Calmodulin**

794 intraresiduale NOEs  
387 sequentielle NOEs  
311 mittelreichweitige NOEs  
153 langreichweitige NOEs

#### **163 intramolekulare NOE Restraints von C20W**

102 intraresiduale NOEs  
32 sequentielle NOEs  
29 mittelreichweitige NOEs  
- langreichweitige NOEs

#### **49 intermolekulare NOE Restraints zwischen Calmodulin and C20W**

#### **61 Wasserstoffbrücken-Restraints**

52 Wasserstoffbrücken in Calmodulin  
9 Wasserstoffbrücken in C20W

#### **129 Dihedralwinkel Restraints von Calmodulin**

62  $\Phi$ -Restraints  
62  $\Psi$ -Restraints  
5  $\chi_1$ -Restraints von Aromaten

#### **24 Restraints für die Calcium-Ionen**

abgeleitet aus der Kristallstruktur  
von Calmodulin

Abbildung 60: Zusammenfassung aller experimenteller Daten für die Strukturrechnung des CaM/C20W-Komplexes.

Neben den experimentell ermittelten Daten (Kapitel 2) wurden außerdem Abstands-*restraints* für die vier Calciumionen eingesetzt, die aus der Kristallstruktur von calciumbeladenen CaM (23) abgeleitet wurden. Das verwendete *restraint*-file (Calcium.upl) findet sich im Anhang (Kapitel 6.7.1).

### 3.4 Qualität der Strukturen

Mit dem oben beschriebenen Datensatz wurden insgesamt 200 Strukturen mit dem *simulated annealing*-Protokoll berechnet. Der Verlauf der Gesamtenergie über alle berechneten Strukturen, sortiert nach der Gesamtenergie, zeigt einen langsamen stetigen Anstieg in der Energie für die ersten 120 Strukturen, so daß von einer korrekten Faltung in diesen Strukturen ausgegangen werden kann. Bei den restlichen 80 Strukturen sind die Energien so hoch, daß sie eindeutig als falsch gefaltete Strukturen verworfen werden müssen. Um die dreidimensionale Struktur des CaM/C20W-Komplexes gut beschreiben zu können, wurden 26 Strukturen ausgewählt, die die niedrigste Gesamtenergie aufwiesen und die für die weitere Analyse verwendet wurden. Dieser Satz an 26 Strukturen wurde auch in die Brookhaven Protein Datenbank unter dem PDB ID-Code 1CFF abgelegt. Sie sind dort über das Internet <http://www.rcsb.org> frei zugänglich.

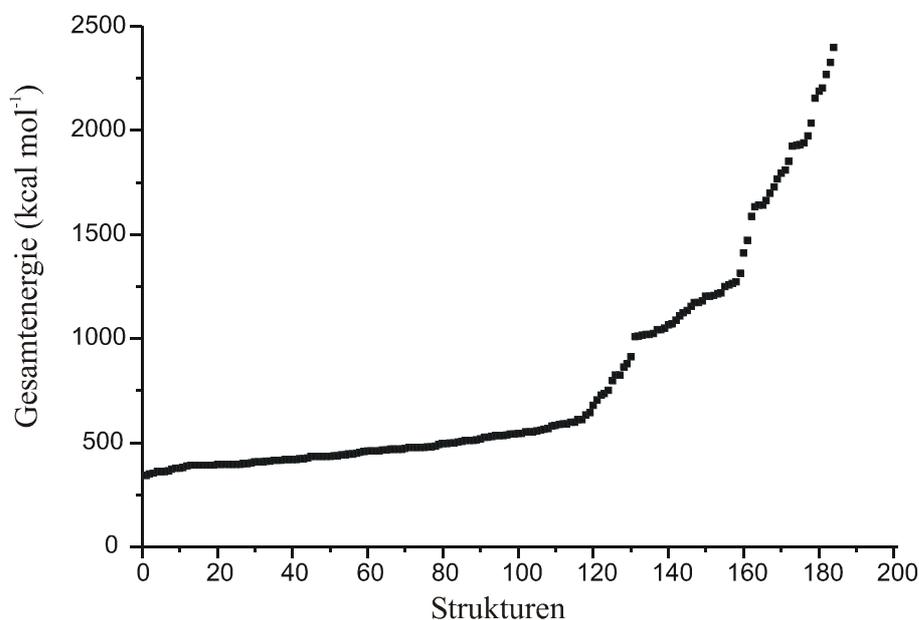


Abbildung 61: Verlauf der Gesamtenergie über die berechneten 200 Strukturen.

Die 26 ausgewählten Strukturen stehen in guter Übereinstimmung mit den experimentellen Daten. In keiner der Strukturen trat eine Verletzung der NOE Abstands-*restraints* über 0.5 Å auf und alle Verletzungen der experimentellen Dihedralwinkel

lagen unter 5°. Aber auch die ideale kovalente Geometrie wird von den 26 Strukturen gut erfüllt (Tabelle 4). Einen Überblick über die gemittelten Energiebeiträge von Bindungen, Winkeln, Van der Waals-Wechselwirkungen und experimentellen *restraints* gibt Tabelle 4.

Tabelle 4: Überblick über die Ergebnisse der Moleküldynamikrechnung. Alle Werte sind Mittelwerte über das Ensemble von 26 Strukturen. Die Werte in Klammern geben die Standardabweichung von diesen Mittelwerten an.

|   |                        |
|---|------------------------|
| <b>Standardabweichung von der idealen kovalenten Geometrie</b>      |                        |
| Bindungslängen (Å)  | 0.0027 ( $\pm$ 0.0001) |
| Bindungswinkel (°)  | 0.483 ( $\pm$ 0.009)   |
| Improper Winkel (°)   | 10.3 ( $\pm$ 1.2)      |
| <b>Standardabweichung von den experimentellen <i>restraints</i></b> |                        |
| NOE Abstände (Å)  | 0.031 ( $\pm$ 0.001)   |
| Dihedralwinkel (°)  | 0.67 ( $\pm$ 0.11)     |
| <b>Durchschnittliche Energien (kcal mol<sup>-1</sup>)</b>           |                        |
| E <sub>total</sub>  | 381 ( $\pm$ 17)        |
| E <sub>Bindung</sub>  | 20 ( $\pm$ 2)          |
| E <sub>Winkel</sub>   | 170 ( $\pm$ 6)         |
| E <sub>Improper</sub>   | 29 ( $\pm$ 2)          |
| E <sub>vdW</sub>  | 63 ( $\pm$ 6)          |
| E <sub>NOE</sub>  | 96 ( $\pm$ 9)          |
| E <sub>CDIH</sub>   | 4 ( $\pm$ 1)           |

Neben der Energie und der Erfüllung der experimentellen *restraints* ist der RMSD-Wert (*Root Mean Square Deviation*) entscheidend, um die Qualität der berechneten Strukturen beurteilen zu können. Hierzu wurden die Strukturen mit Hilfe des Programms MOLMOL (167) überlagert und die Standardabweichung der einzelnen Struktur zu einer gemittelten Struktur berechnet. Da der CaM/C20W-Komplex aus zwei Domänen aufgebaut ist, die durch ein flexibles Verbindungsstück verknüpft sind, kann nur jede Domäne separat überlagert werden. Berechnet wurden zum einen die Standardabweichung für die Atome des Proteinrückgrats und zum anderen für allen schweren Atome (C, N, O, S) einschließlich der Seitenketten. Die Werte, die in Tabelle 5 zusammengefaßt sind, zeigen, daß das Proteinrückgrat und die Seitenketten des Komplexes in beiden Domänen sehr gut definiert sind. Eine noch bessere Übereinstimmung erhält man bei Überlagerung der Strukturen nur bezogen auf die Sekundärstrukturelemente.

*Tabelle 5: Zusammenfassung der RMSD-Werte der ausgewählten 26 Strukturen bezogen auf eine gemittelte Struktur.*

| <b>RMSD-Werte der 26 Strukturen (Å)</b>  |      |
|--|------|
| <b>N-Terminale Domäne von CaM (Leu4-Ala73)</b>   |      |
| Proteinrückgrat  | 0.75 |
| Alle schweren Atome  | 1.17 |
| Superposition der Sekundärstrukturelemente<br>(7-18, 26-38, 47-54, 62-74)                  |      |
| Proteinrückgrat  | 0.56 |
| Alle schweren Atome  | 1.08 |
| <b>C-Terminale Domäne von CaM (I85-T145)<br/>and C20W (G4-Q16)</b>                         |      |
| Proteinrückgrat  | 0.53 |
| Alle schweren Atome  | 1.06 |
| Superposition der Sekundärstrukturelemente<br>(85-92, 99-112, 118-128, 135-145; C20W 4-16) |      |
| Proteinrückgrat  | 0.50 |
| Alle schweren Atome  | 1.07 |

Ein weiteres Kriterium, das die Qualität der Strukturen ermittelt, ist ein Ramachandran-Plot (160), bei dem die Rückgratwinkel  $\Phi$  und  $\Psi$  in einem Diagramm aufgetragen werden. Aus sterischen Gründen sind nur bestimmte Werte für die  $\Phi$ - und  $\Psi$ -Winkel aller Aminosäuren außer Glycinen energetisch günstig. Die in Abbildung 62 eingezeichneten farbigen Bereiche stellen die erlaubten Konformationsbereiche dar, die mit den verschiedenen Sekundärstrukturelementen korreliert werden können (A für  $\alpha$ -Helix, B für  $\beta$ -Faltblatt). Für Glycine, die in Abbildung 62 als Dreiecke symbolisiert sind, ist der erlaubte Konformationsbereich aufgrund der nicht vorhandenen Seitenkette wesentlich größer als für die anderen Aminosäuren.

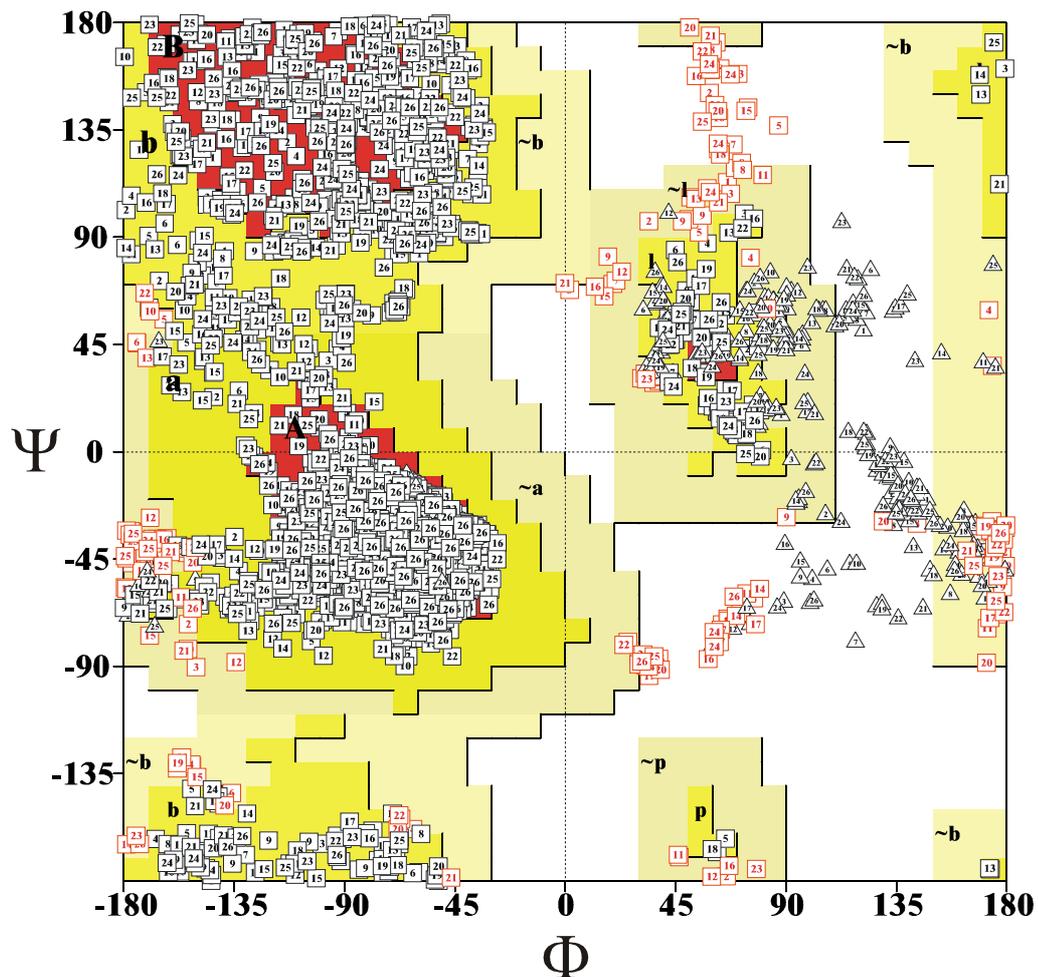


Abbildung 62: Ramachandran-Plot für die 26 ausgewählten Strukturen des CaM/C20W-Komplexes. Winkelpaare, die für Glycine ermittelt wurden, sind als Dreiecke dargestellt. Quadrate stehen für Winkelpaare aller übrigen Aminosäuren. Die Symbole tragen die Nummer der jeweiligen Struktur. Der bevorzugte Konformationsbereich für Nicht-Glycin ist in rot eingezeichnet, der zusätzlich erlaubte Bereich in gelb und der großzügig erlaubte Bereich in hellgelb. Winkelpaare, die außerhalb des bevorzugten und zusätzlich erlaubten Bereichs liegen, sind in rot markiert. Die Abbildung wurde mit dem Programm PROCHECK (161) erstellt.

Eine Analyse der  $\Phi, \Psi$ -Winkelpaare mit Hilfe der Programme AQUA und PROCHECK (161) zeigt, daß 73.7% aller Wertepaare in den bevorzugten Konformationsbereichen und weitere 21.1% in den zusätzlich erlaubten Bereichen liegen. Nur 1.5% liegen in verbotenen Bereichen. Eine Zusammenfassung der Ramachandran-Statistik der 26 Strukturen gibt Tabelle 6 wieder.

Tabelle 6: Statistik zum Ramachandran-Plot der 26 ausgewählten Strukturen:  $A, a = \alpha$ -Helix,  $B, b =$  antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt,  $L, l = \alpha_L$ -Helix,  $p =$  paralleles  $\beta$ -Faltblatt

|  |      |       |
|--|------|-------|
| Reste in bevorzugten Bereichen (A, B, L)   | 2855 | 73.7% |
| Reste in zusätzlich erlaubten Bereichen (a, b, l, p)                                 | 818  | 21.1% |
| Reste in großzügig erlaubten Bereichen ( $\sim a$ , $\sim b$ , $\sim l$ , $\sim p$ ) | 144  | 3.7%  |
| Reste in verbotenen Bereichen  | 57   | 1.5%  |
| Anzahl der Reste (außer Glycin und Prolin)   | 3874 | 100%  |
| Anzahl Glycine   | 338  |       |
| Anzahl Proline   | 52   |       |
| Aminosäure N- und C-Terminus   | 104  |       |
| Anzahl Aminosäuren insgesamt   | 4368 |       |

Da die Analyse des Ramachandran-Plots des gesamten CaM/C20W-Komplexes schnell unübersichtlich wird, kann auch ein Ramachandran-Plot für jede einzelne Aminosäure erstellt werden (Abbildung 63). Mit dieser Darstellung erkennt man, daß die Rückgratwinkel von Aminosäurereste in Sekundärstrukturelementen sehr gut definiert sind, wobei vorwiegend die bevorzugten Konformationsbereiche des Ramachandran-Plots eingenommen werden und eine geringe Streuung der Werte festzustellen ist. Aminosäurereste, die im N- und C-Terminus sowohl von CaM als auch von C20W liegen, zeigen hingegen keine definierte Struktur. Eine erhöhte Flexibilität findet sich auch in dem Verbindungstück Arg74 bis Glu84 zwischen den beiden Domänen. Diese flexiblen Bereich sind dafür verantwortlich, daß in der Statistik zum Ramachandran-Plot (Tabelle 6) 1.5% der Reste in den verbotenen Bereichen auftreten.

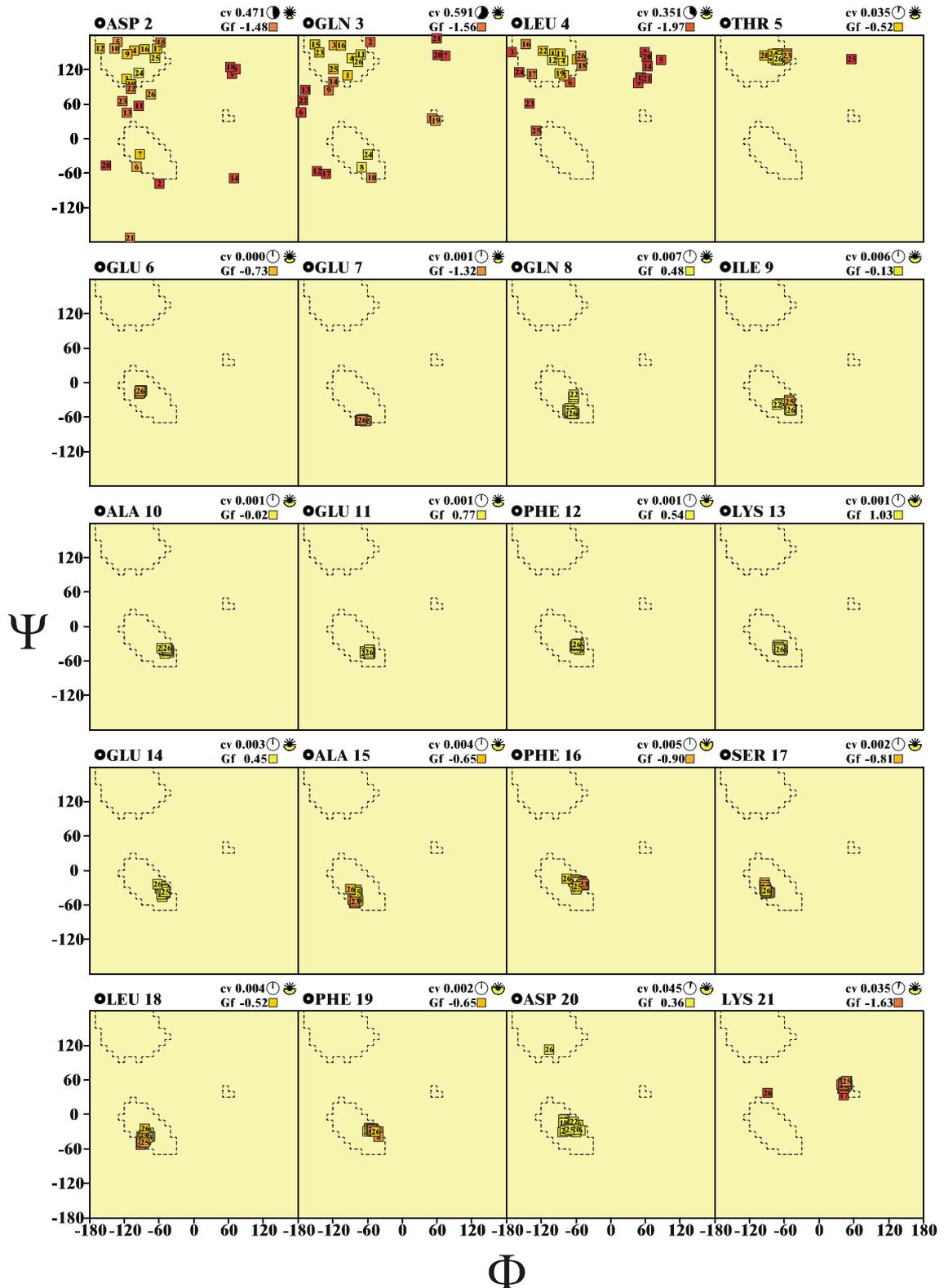
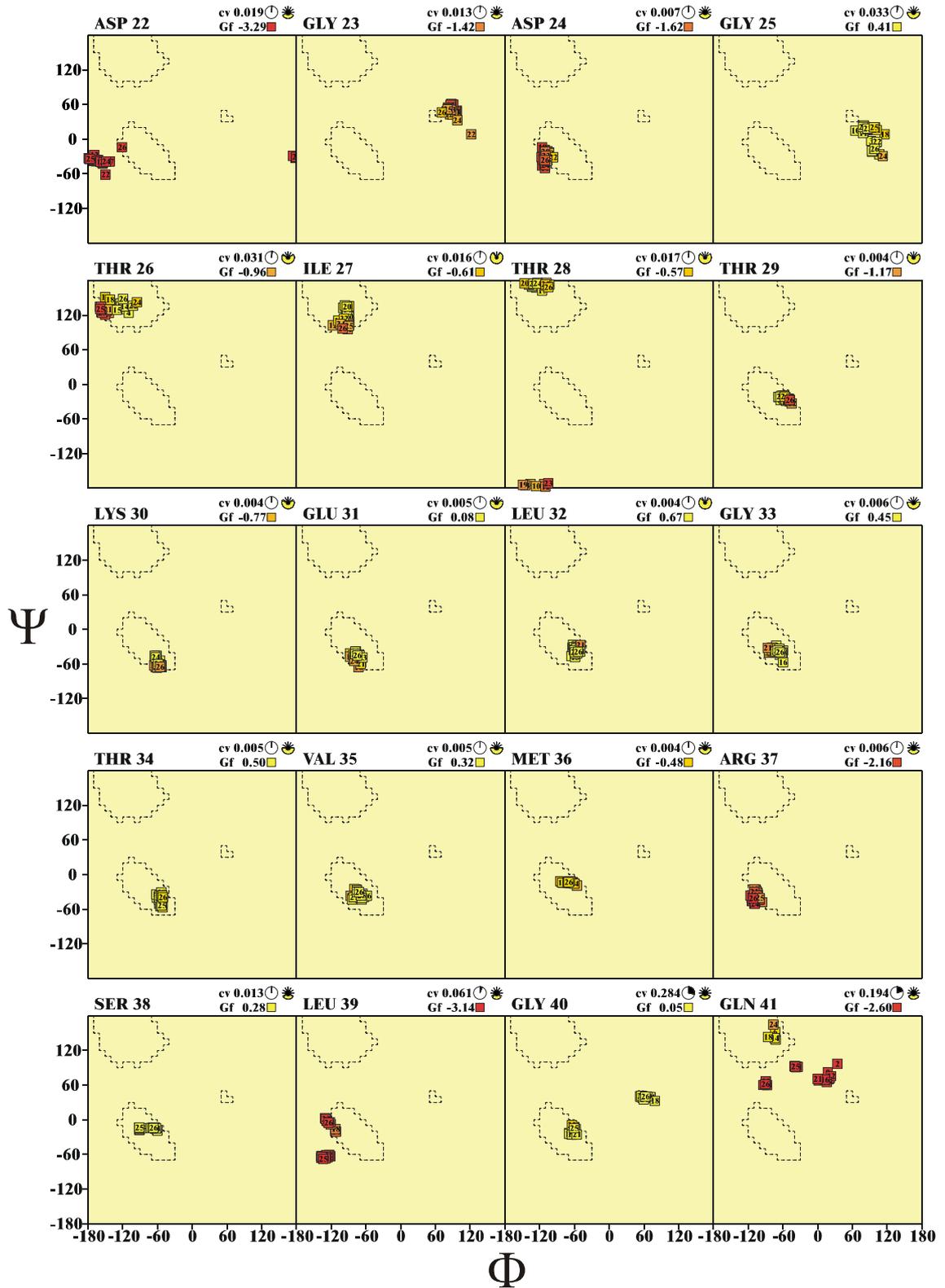
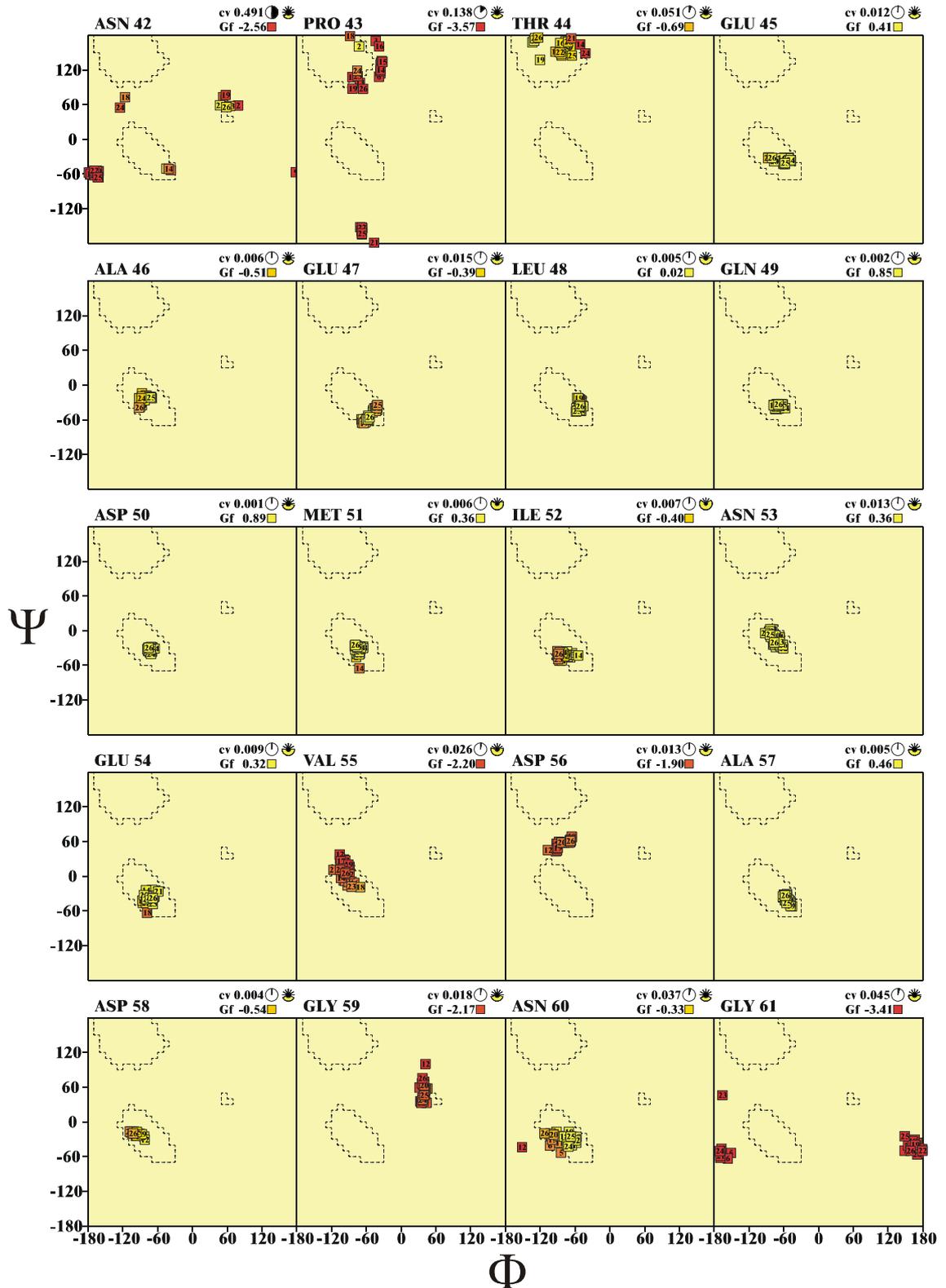
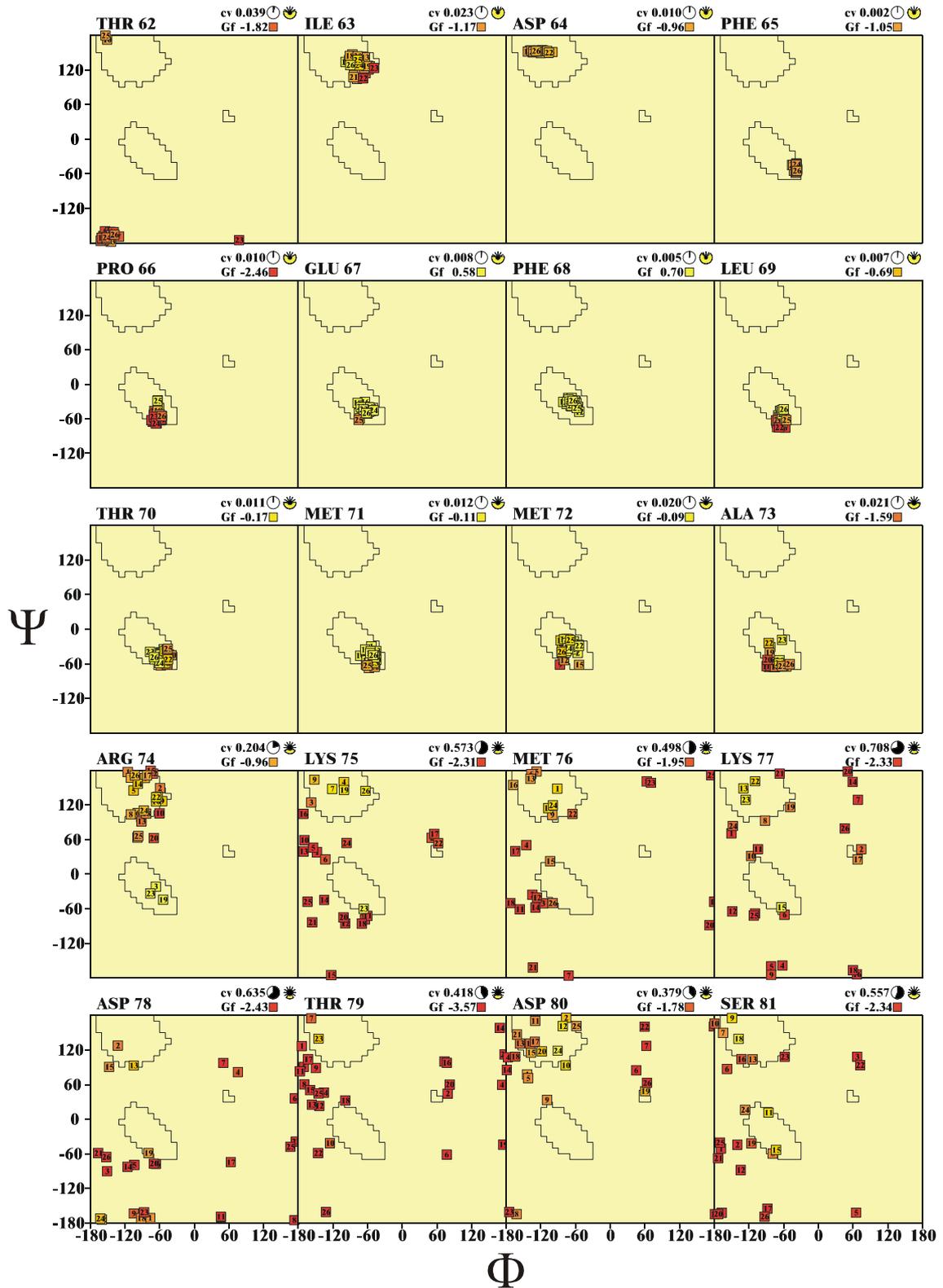
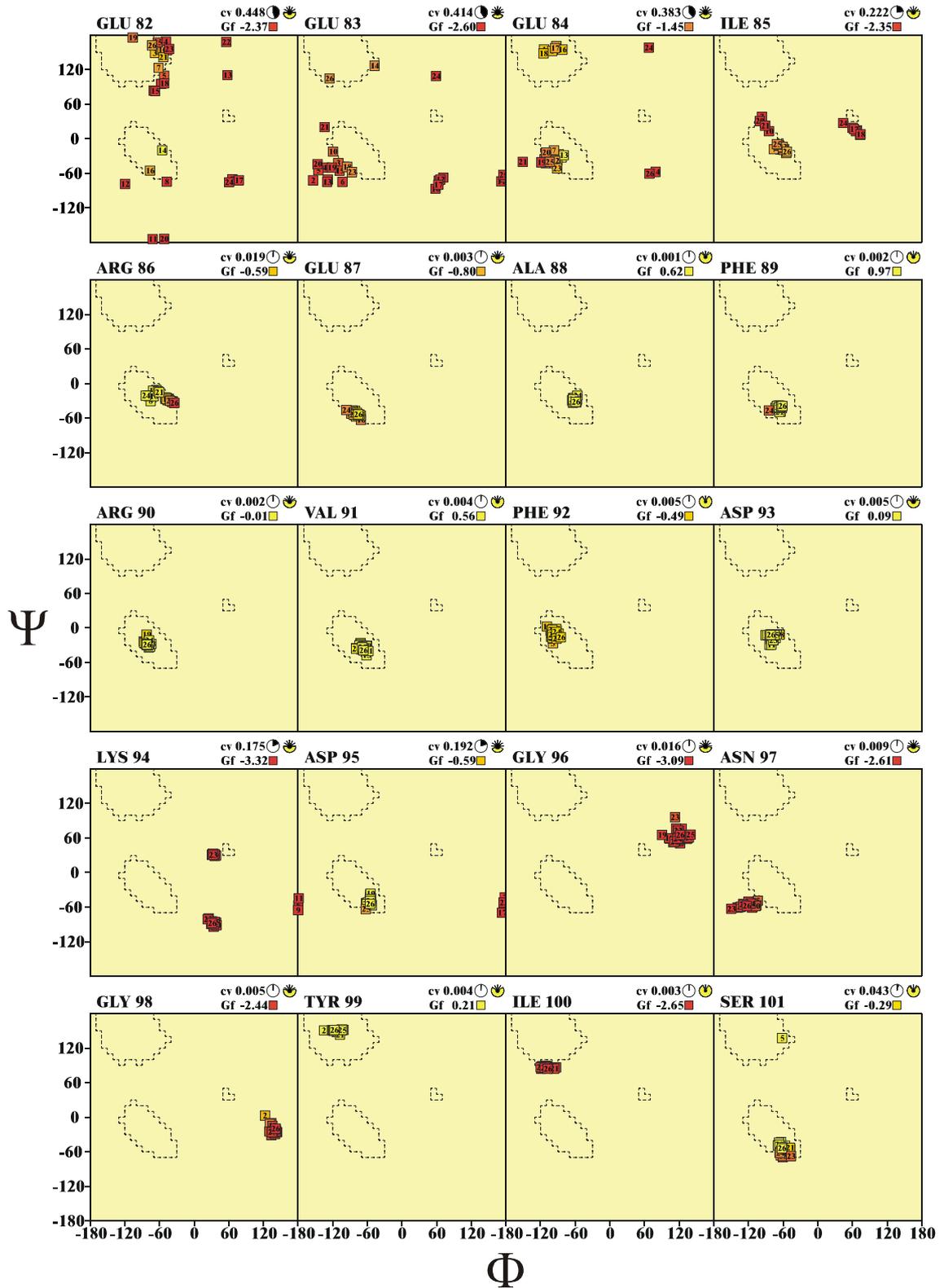


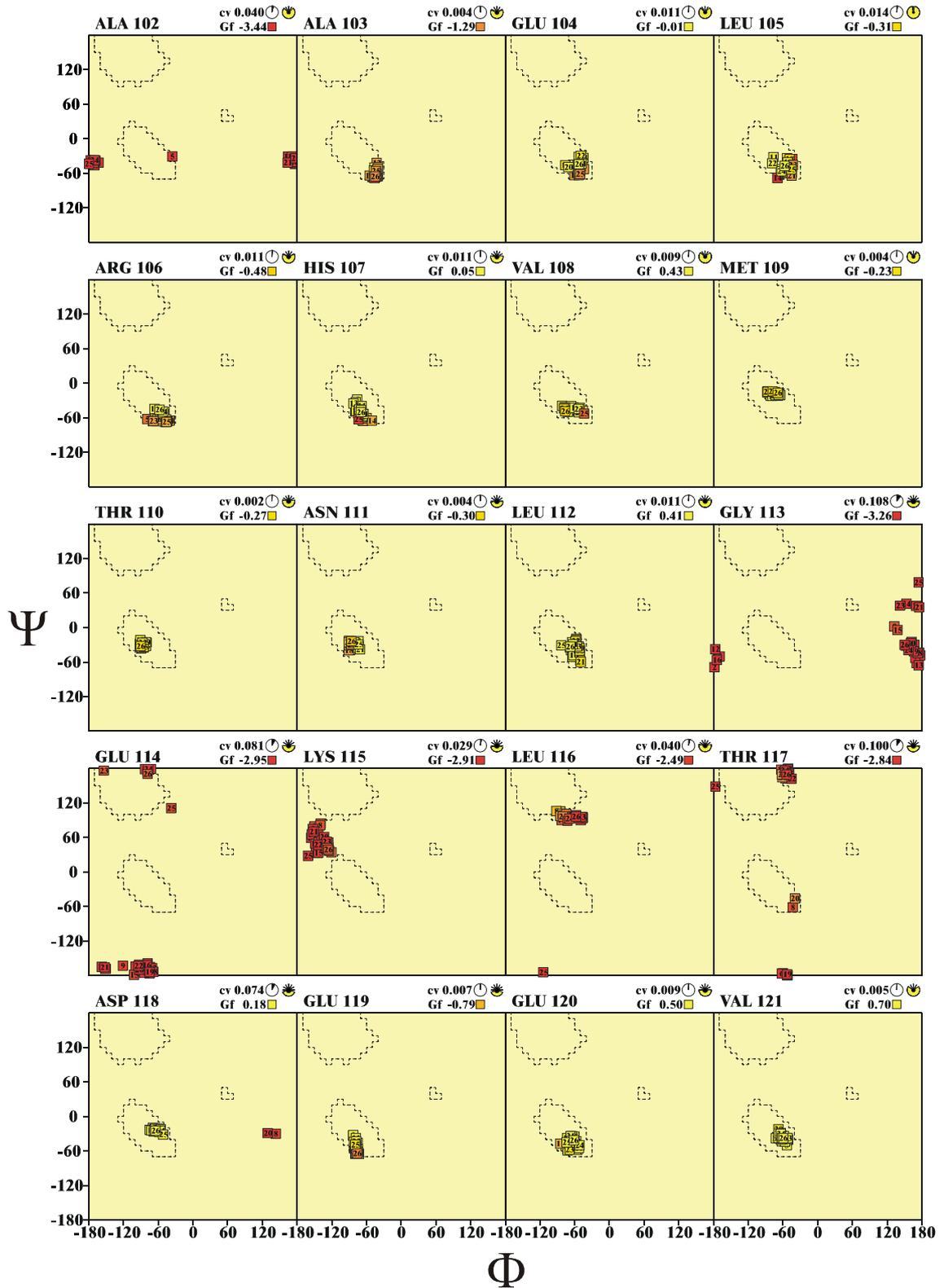
Abbildung 63: Ramachandran-Plot aufgeschlüsselt nach Aminosäureresten in den 26 Strukturen des CaM/C20W-Komplexes. Die Abbildung wurde mit dem Programm PROCHECK (161) erstellt.

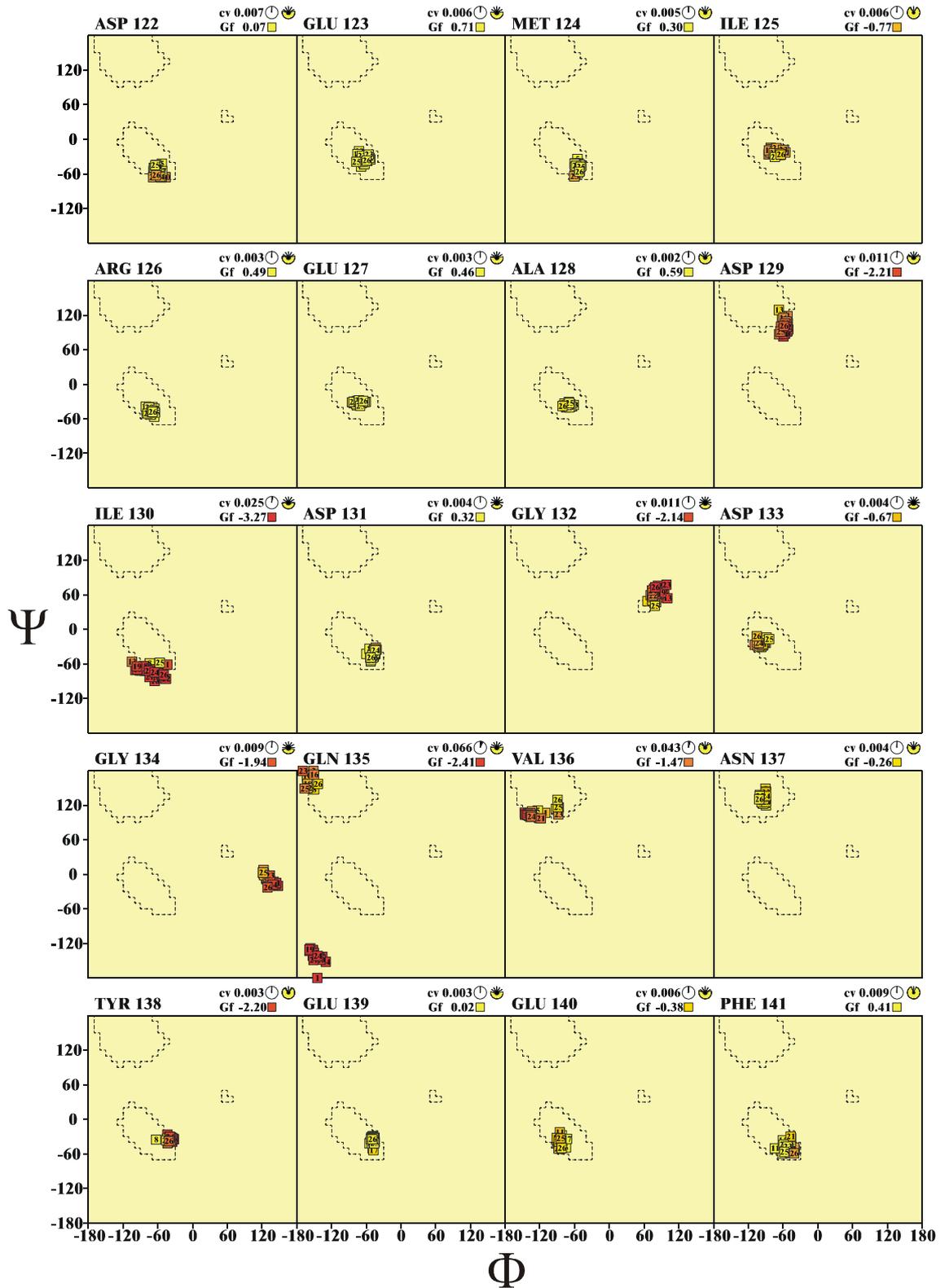


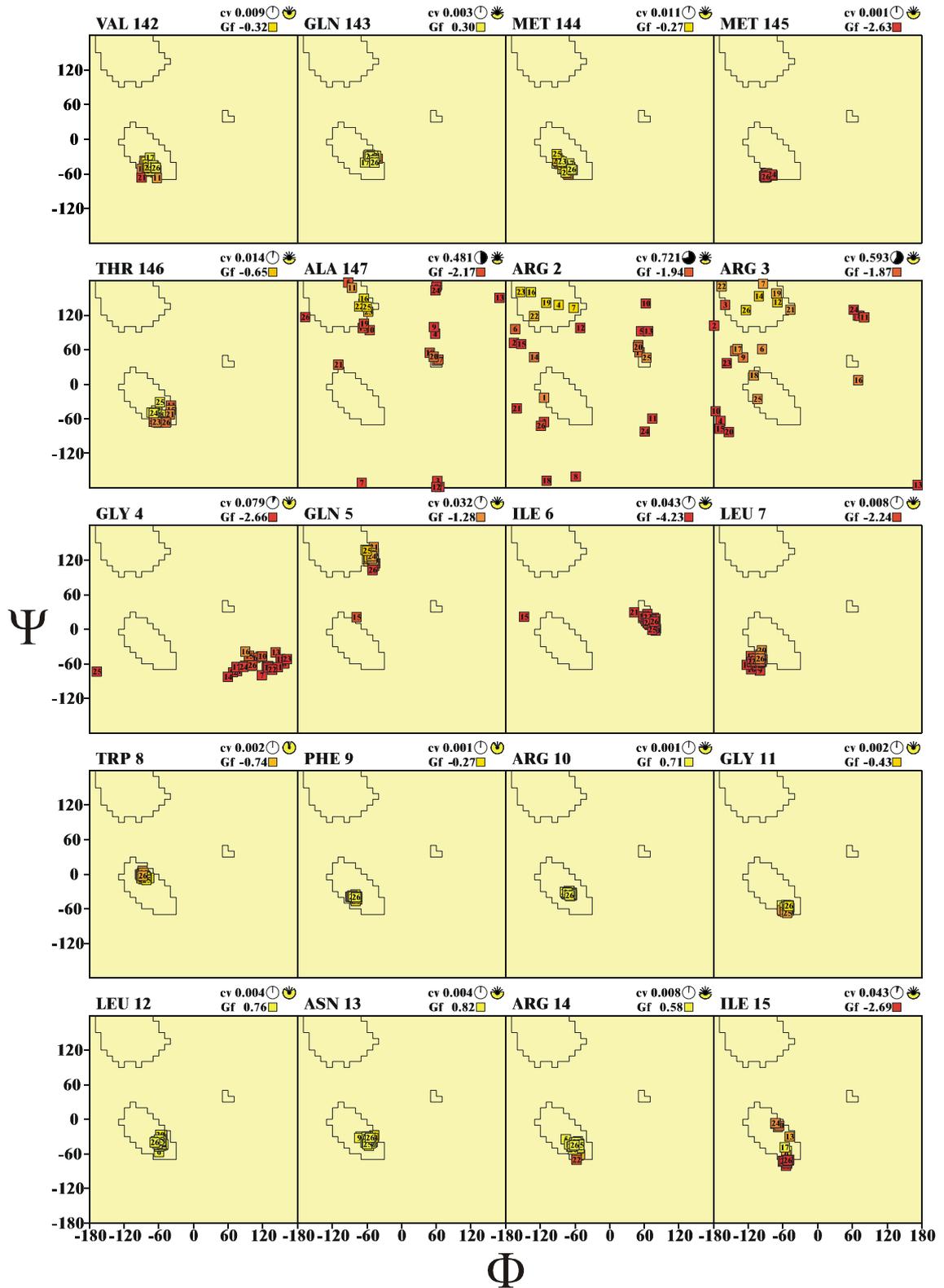


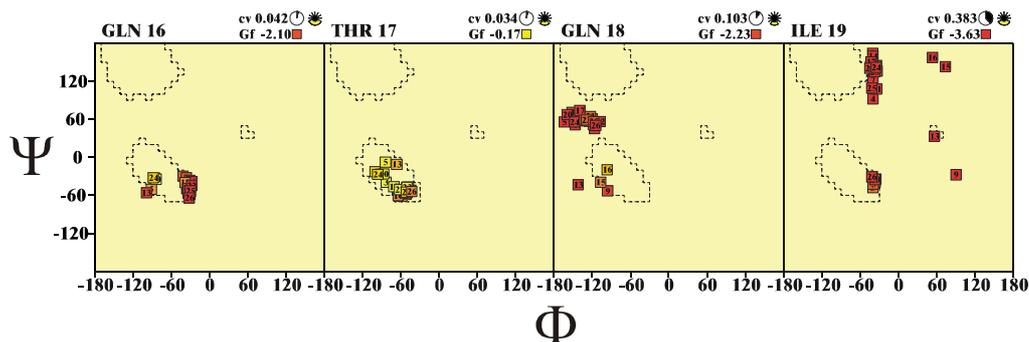












cv = Circulare Varianz (geringe Werte deuten auf geringe Streuung der Datenpunkte hin)

\* lösungsmittelzugänglich    ● lösungsmittelunzugänglich

Gf = Durchschnittlicher G-Faktor für den Rest basierend auf der Analyse von hochaufgelösten Kristallstrukturen (je höher der Wert, desto bevorzugter die Konformation)

■ Farbcodierung bezüglich des G-Faktors (gelb bevorzugt, rot nicht bevorzugt)

Neben der Analyse der Proteinrückgratwinkel  $\Psi$  und  $\Phi$  ist auch die Verteilung der Seitenkettenwinkel  $\chi_1$  und  $\chi_2$  für die Qualität der berechneten Strukturen aussagekräftig, wobei die Konformationen gauche(-), trans und gauche(+) energetisch bevorzugt sind. In Abbildung 64 und Abbildung 65 erkennt man, daß in den 20 Strukturen des CaM/C20W-Komplexes die energetisch günstigen Konformationen der Seitenkettenwinkel zum überwiegenden Teil eingenommen werden.

Eine Überlagerung des Proteinrückgrats der 26 berechneten Strukturen ist in Abbildung 66 dargestellt. Beide Domänen von CaM sind getrennt dargestellt, da sie aufgrund der hohen Flexibilität des Linkerbereichs zwischen den Domänen (Kapitel 4.4) nicht gleichzeitig überlagert werden können. Für die N-terminale Domäne des CaM wurden die Reste 4-73 überlagert. Für die C-terminale Domäne des CaM mit dem Peptid C20W wurden die Reste 85-145 von CaM und die Reste 4-16 von C20W überlagert. Der N-Terminus (Rest 1-3), der C-Terminus (Rest 146-148) und die Linkerregion (Rest 74-84) von CaM sind durch NMR-Daten unterbestimmt und erscheinen daher ungeordnet. Auch der N-Terminus (Rest 1-3) und der C-Terminus (Rest 17-20) des Peptids C20W sind ungeordnet.

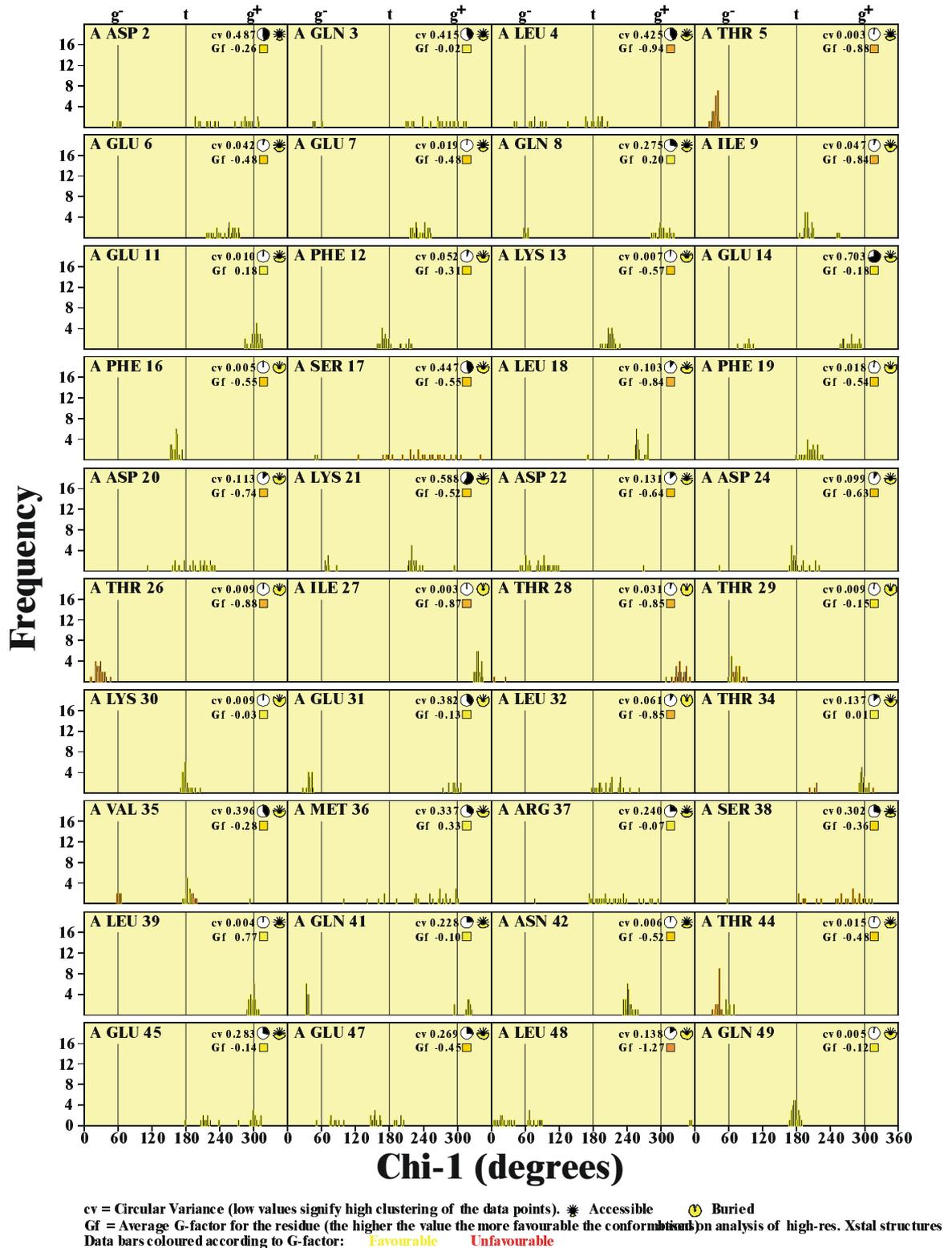
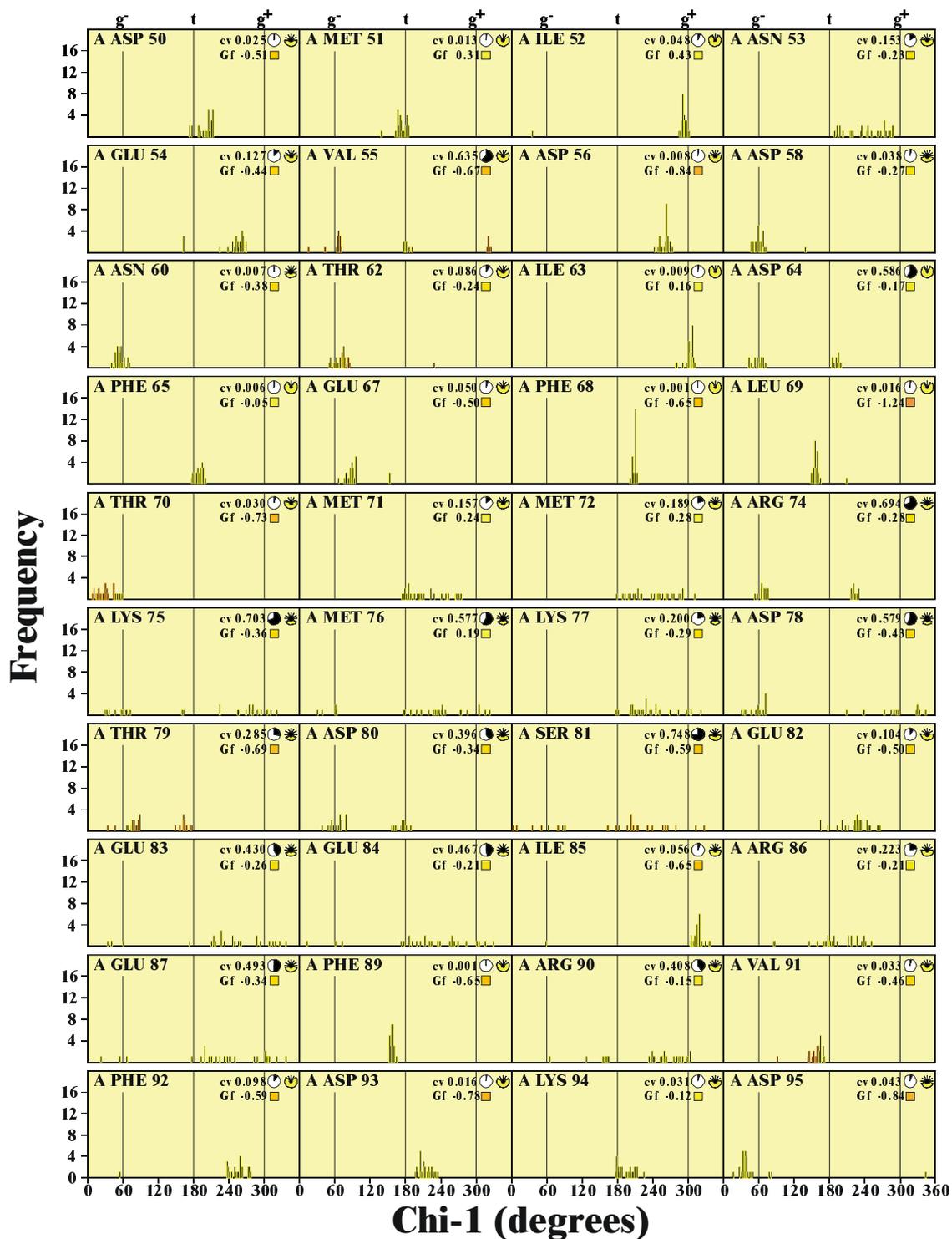


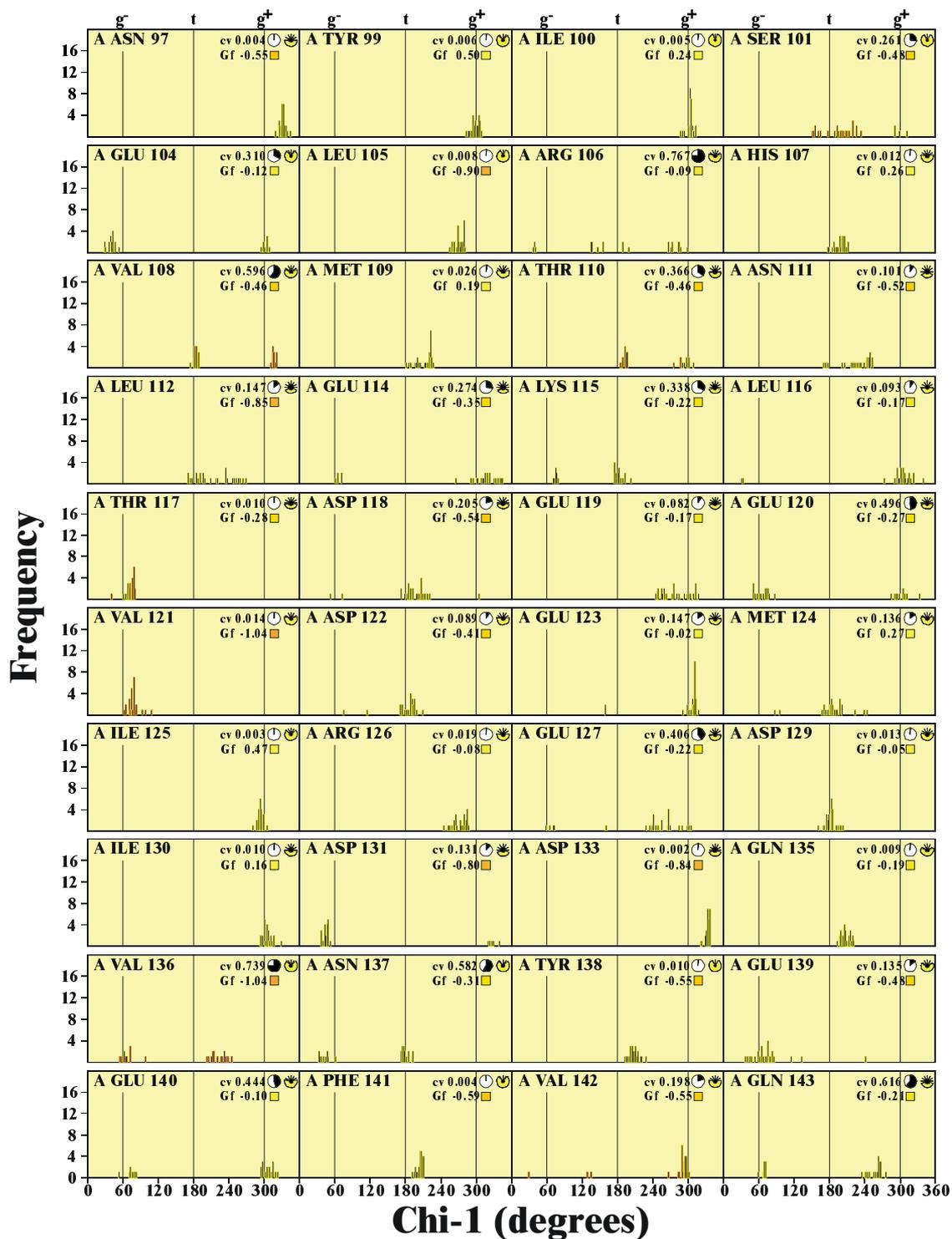
Abbildung 64: Verteilung des Seitenkettenwinkels  $\chi_1$  in den 26 Strukturen des CaM/C20W-Komplexes. Die Abbildung wurde mit dem Programm PROCHECK (161) erstellt.



cv = Circular Variance (low values signify high clustering of the data points). \* Accessible ☺ Buried

Gf = Average G-factor for the residue (the higher the value the more favourable the conformation) (analysis of high-res. Xstal structures)

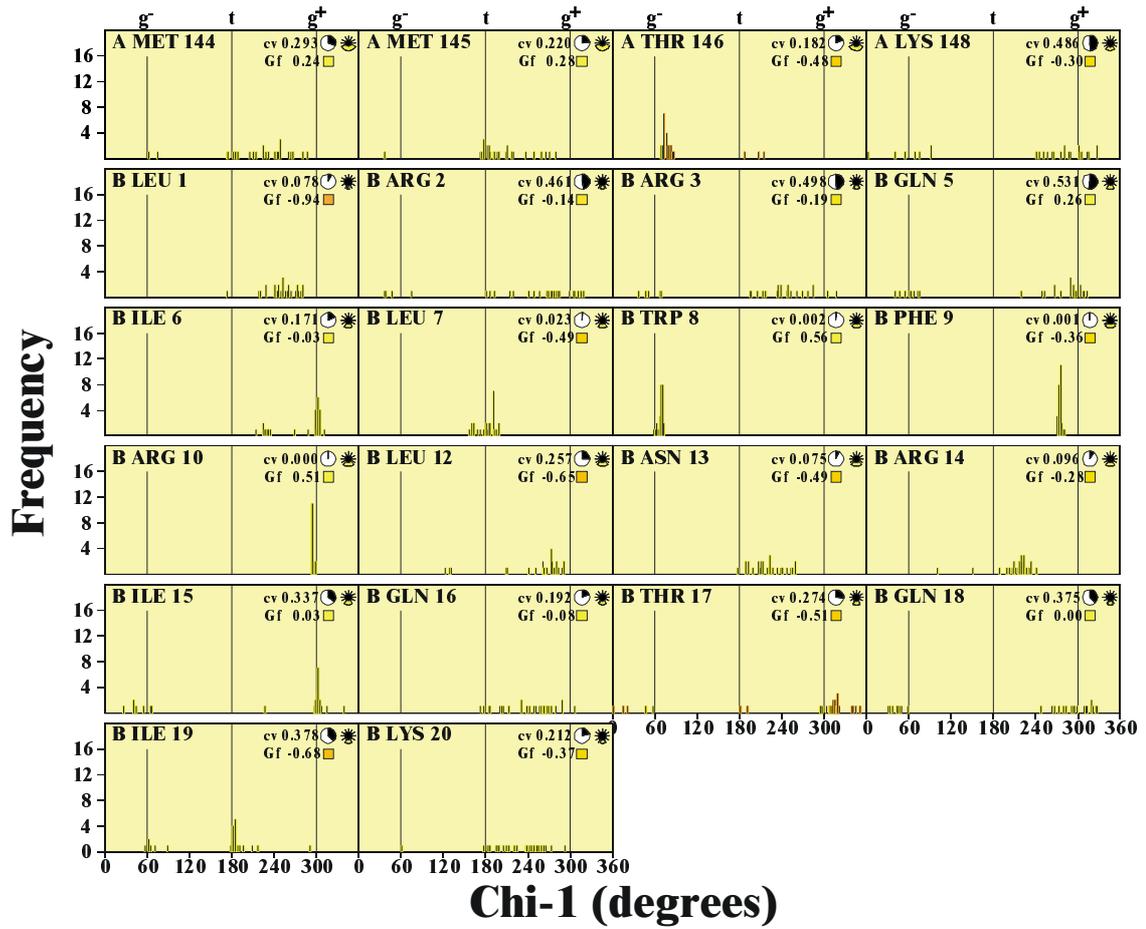
Data bars coloured according to G-factor: Favourable Unfavourable



cv = Circular Variance (low values signify high clustering of the data points). \* Accessible ☺ Buried

Gf = Average G-factor for the residue (the higher the value the more favourable the conformation) (analysis of high-res. Xstal structures)

Data bars coloured according to G-factor: Favourable Unfavourable



cv = Circular Variance (low values signify high clustering of the data points). ✱ Accessible ☉ Buried  
 Gf = Average G-factor for the residue (the higher the value the more favourable the conformation) on analysis of high-res. Xstal structures  
 Data bars coloured according to G-factor: Favourable Unfavourable

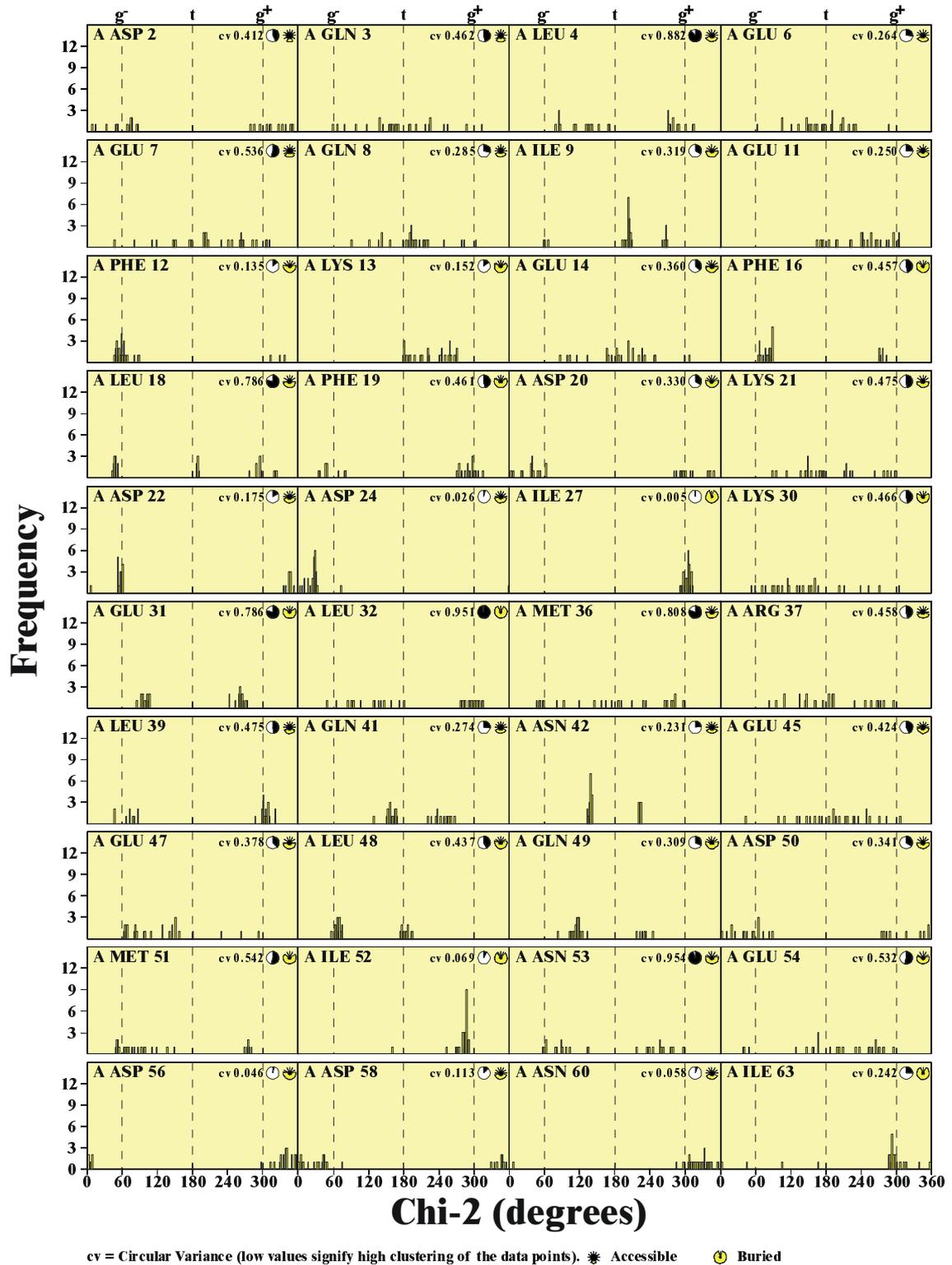
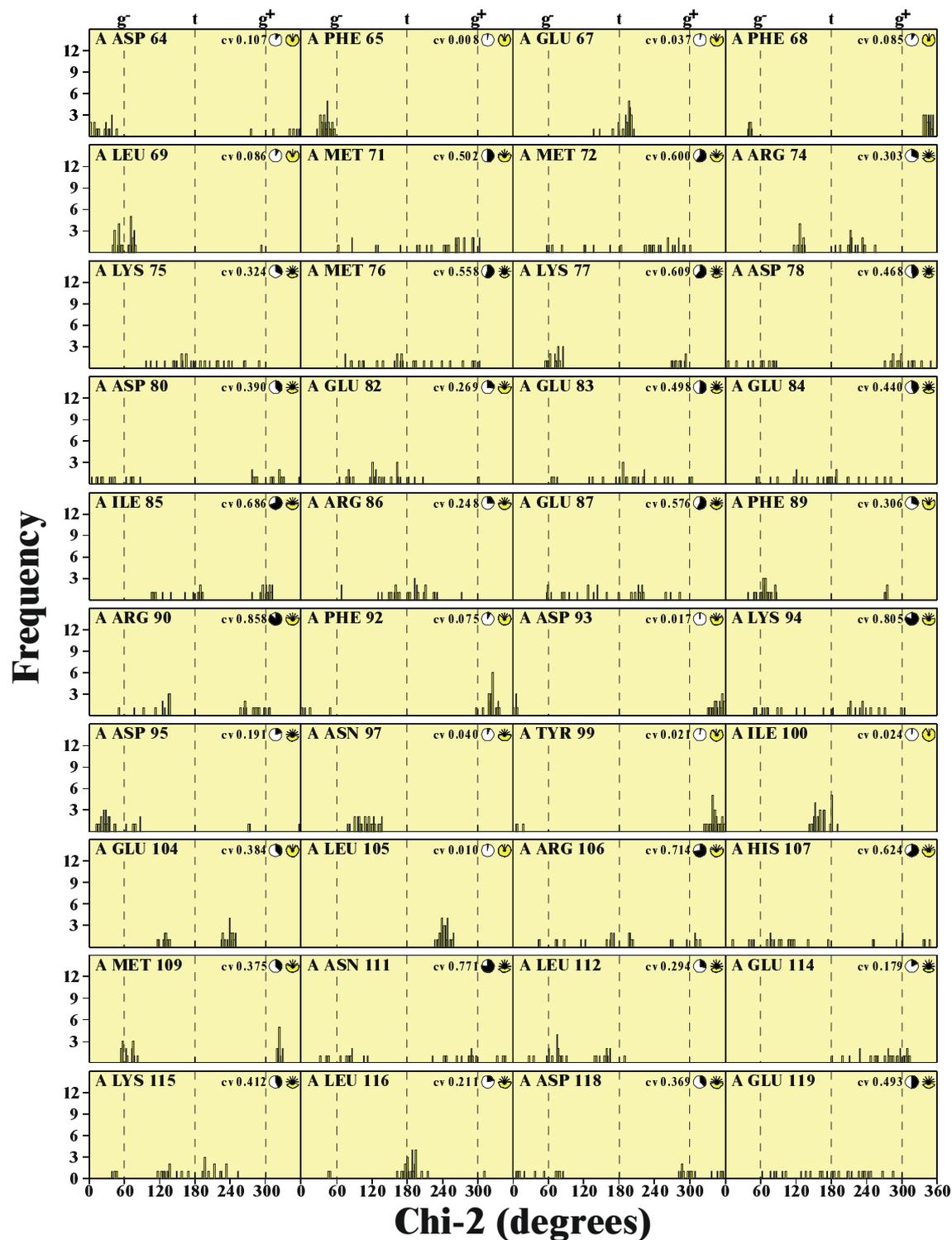
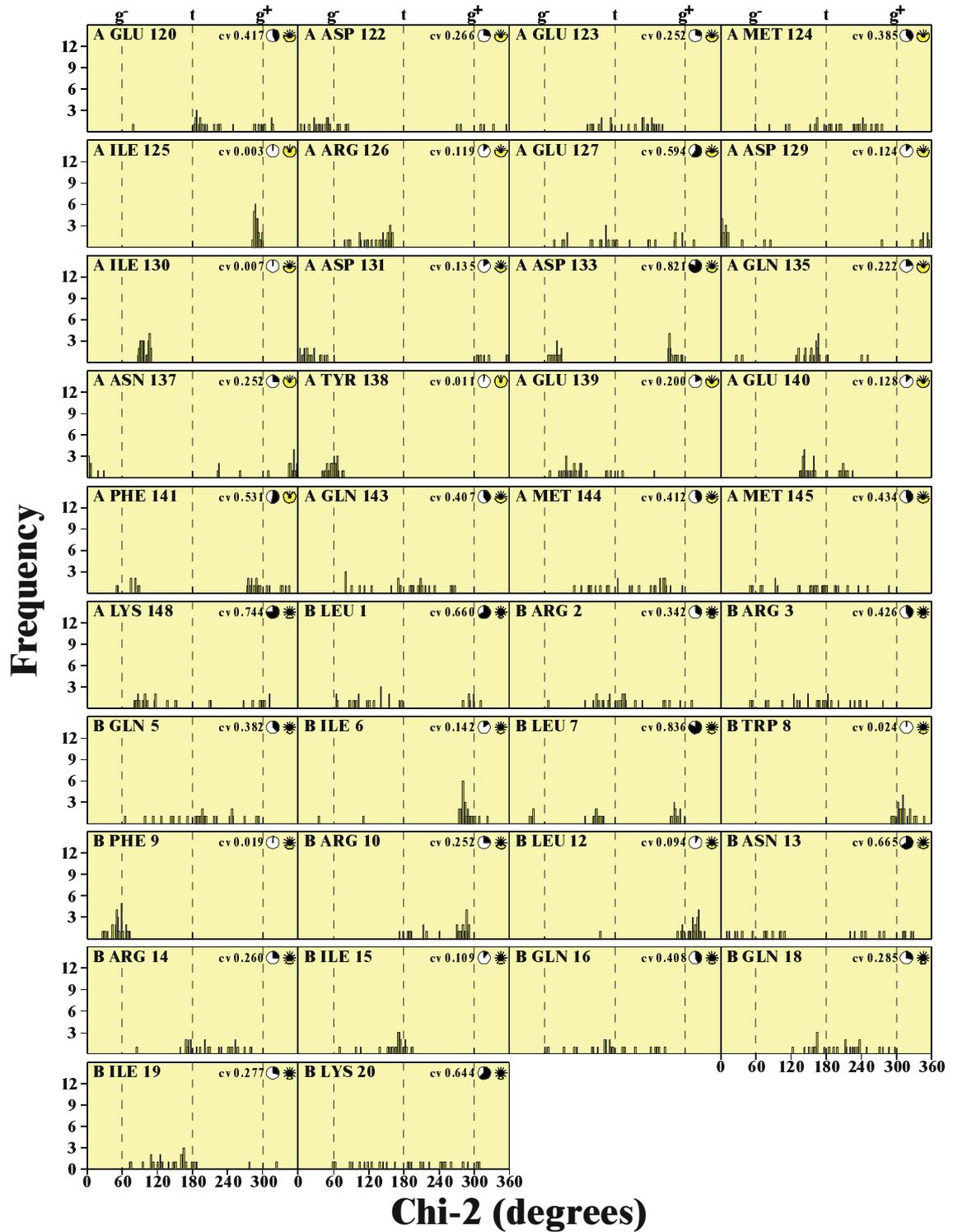


Abbildung 65: Verteilung des Seitenkettenwinkels  $\chi_2$  in den 26 Strukturen des CaM/C20W-Komplexes. Die Abbildung wurde mit dem Programm PROCHECK (161) erstellt.



cv = Circular Variance (low values signify high clustering of the data points). \* Accessible ☺ Buried



cv = Circular Variance (low values signify high clustering of the data points). ☀ Accessible ☾ Buried

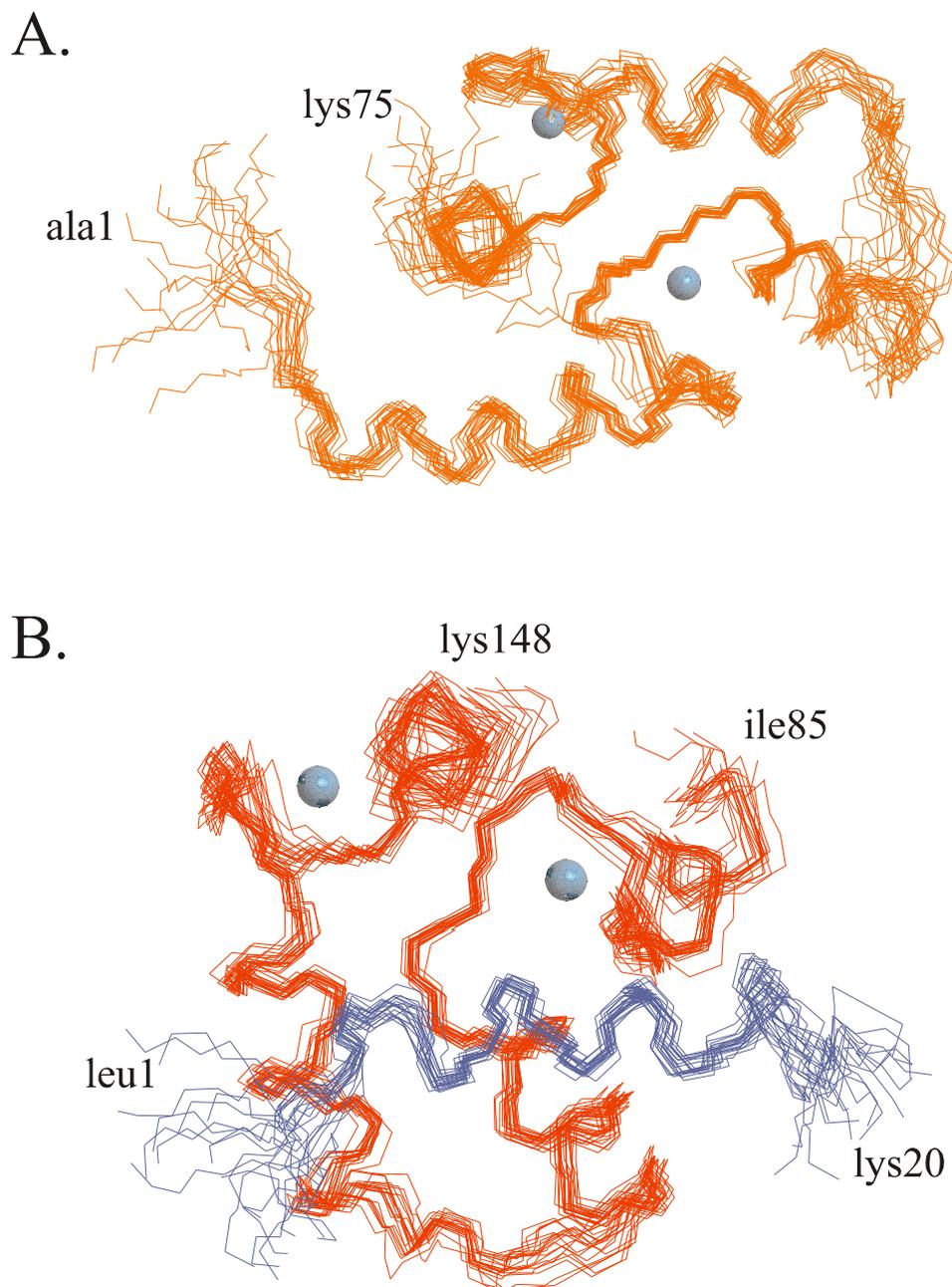


Abbildung 66: Überlagerung des Proteinrückgrats der 26 ausgewählten Strukturen. A. N-terminale Domäne von CaM (orange). B. C-terminale Domäne von CaM (rot) mit dem gebundenen Peptid C20W (blau). Die Calciumionen sind als Kugeln dargestellt.

### 3.5 Literatur

---

128. Blumenthal, M.J.J. (1970) *Theory and Application of Distance Geometry*, Chelsea, New York.
129. Crippen, G.M., and Havel, T.F. (1978) *Acta Cryst. A* 34, 282.
130. Havel, T.F. (1986) *DISGEO, Quantum Chemistry Exchange Programm Exchange No. 507*, Indiana University.
131. Havel, T.F. (1991) *Prog. Biophysics Molec. Biol.* 56, 43.
132. Crippen, G.M., and Havel, T.F. (1988) *Distance Geometry and Molecular Conformation*, Research Studies Press, Taunton, Somerset, England.
133. van Gunsteren, W.F., and Berendsen, H.J.C. (1990) *Angew. Chemie* 102, 1020.
134. J. M. Haile (1992) *Molecular Dynamics Simulation, Elementary Methods*, John Wiley & Sons, New York.
135. Brooks, B. R., Bruccoleri, R. E., Olafson, B. D., States, D. J., Swaminathan, S., and Karplus, M. (1983) *J. Comput. Chem.* 4, 187 – 217.
136. McCammon, J.A., and Harvey, S.C. (1987) *Dynamics of proteins and nucleic acids*, Cambridge University Press, Cambridge.
137. Karplus, M., and Petsko, G.A. (1990) *Nature* 347, 631.
138. Nilges, M., Gronenborn, A.M., Brünger, A.T., and Clore, G.M. (1988) *Protein Eng.* 2, 27-38.
139. Brünger, A.T. (1993) *X-PLOR Version 3.1*, Howard Hughes Medical Institute & Yale University, New Haven, CT.
140. Berendsen, H.J.C., Postma, J.P.M., van Gunsteren, W.F., DiNiola, A., and Haak, J.R. (1984) *J. Chem. Phys.* 81, 3684-3690.
141. Haneef, I. (1990) in: *Supercomputational Science* (Evans, R.G. & Wilson, S., Eds.), 243-250, Plenum Press, New York.
142. Verlet, L. (1967) *Phys. Rev.* 159, 98-103.
143. Beeman, D. (1976) *J. Comput. Phys.* 20, 130-139.
144. Gear, C.W. (1971) *Numerical Initial Value Problems in Ordinary Differential Equations*, Prentice Hall, New York.
145. de Vlieg, J., and van Gunsteren, W.F. (1991) *Methods Enzymol.* 202, 268-300.
146. Kirkpatrick, S., Gelatt, C.D., and Vecchi, M.P. (1983) *Science* 220, 671-680.
147. Clore, G.M., Gronenborn, A.M., Brünger, A.T., and Karplus, M. (1985) *J. Mol. Biol.* 186, 435-455.
148. Brünger, A.T., Clore, G.M., Gronenborn, A.M., and Karplus, M. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 3801-3805.
149. Nilges, M., Clore, G.M., and Gronenborn, A.M. (1988) *FEBS Lett.* 239, 129-136.
150. Wiberg, K.B. (1965) *J. Am. Chem. Soc.* 87, 1070-1078.

- 
151. Burkert, U., and Allinger, N.L. (1982) *Molecular Mechanics*, ACS Monograph 177, American Chemical Society, Washington D.C.
152. Williams, J.E., Stang, P.J., and Schleyer, P.V.R. (1968) *Ann. Rev. Phys. Chem.* 19, 531-558.
153. Powell, M.J.D. (1977) *Mathemat. Progr.* 12, 241-254.
154. Heinrich Sticht (1995) *Dissertation*, Universität Bayreuth.
155. Nilges, M. (1994) *J. Mol. Biol.* 245, 645.
156. Nilges, M., and O'Donoghue, S.I. (1998) *Prog. NMR Spec.* 32, 107.
157. Nilges, M., Clore, G.M., and Gronenborn, A.M. (1988) *FEBS Lett.* 229, 317.
158. Weber, P.L., Morrison, R., and Hare, D. (1988) *J. Mol. Biol.* 204, 483.
159. Clore, G., Gronenborn, A., Nilges, M., and Ryan, C. (1987) *Biochemistry* 26, 8012-8023.
160. Ramachandran, G.N., Ramakrishnan, C., and Sasisedharan, V. (1963) *J. Mol. Biol.* 7, 95-99.
161. Laskowski, R.A., Rullmann, J.A.C., MacArthur, M.W., Kaptein, R., and Thornton, J.M. (1996) *J. Biomol. NMR* 8, 477-486.

## 4 Die Struktur des CaM/C20W-Komplexes und Vergleich mit anderen CaM/Peptid-Komplexen

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse, die sich aus den berechneten 26 Strukturen des CaM/C20W-Komplexes ableiten lassen, zusammengestellt und ein Vergleich dieser Komplexstruktur mit den bereits bekannten CaM/Peptid-Komplexen angestellt.

### 4.1 Der Bindungsmodus des Peptids C20W

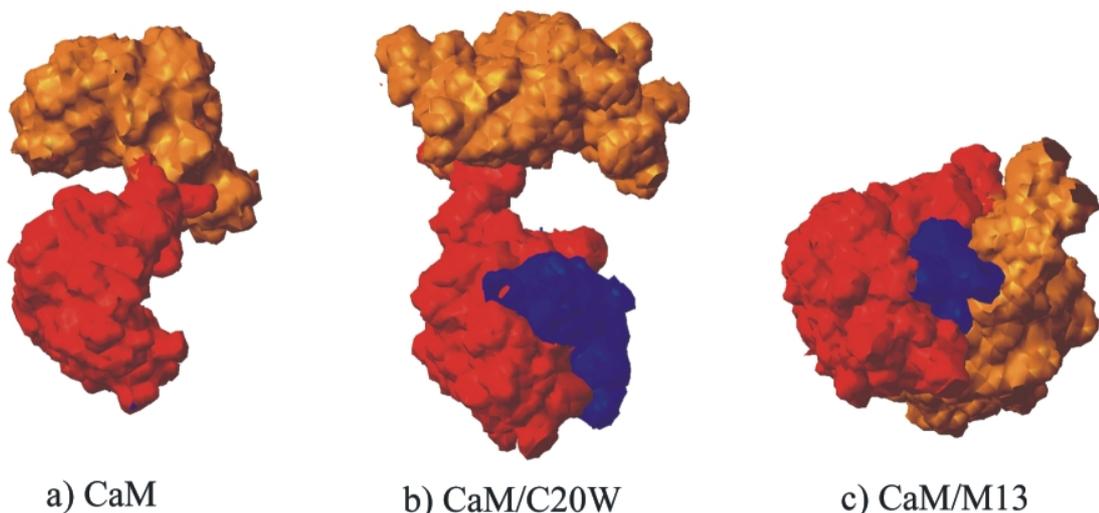


Abbildung 67: Oberflächendarstellung von  $(Ca^{2+})_4$ -CaM und die verschiedenen Bindungsmodi an Peptide, die der Calmodulin-Bindungsdomäne von Zielenzymen entsprechen. Die N-terminale Domäne von CaM (Rest 1-78) ist in orange, die C-terminale Domäne (Rest 79-148) in rot und die Peptide in blau dargestellt. Die Orientierung der C-terminalen Domäne von CaM ist in den drei Bildern gleich. Die Struktur von  $(Ca^{2+})_4$ -CaM und von dem CaM/M13-Komplex basieren auf Koordinaten, die aus der Brookhaven Protein Data Base bezogen wurden (Einträge 3CLN bzw. 2BBM). Die dargestellte CaM/C20W Struktur ist die energieärmste der 26 berechneten Strukturen. a. Oberflächendarstellung der Kristallstruktur von  $(Ca^{2+})_4$ -CaM. b. Bei dem CaM/C20W-Komplex bindet das Peptid C20W nur an die C-terminale Domäne von CaM. c. Im globulären CaM/M13-Komplex wird das Peptid M13 von beiden Domänen gebunden.

Wie bereits in der Einleitung (Kapitel 1.7) dargestellt, konnte aufgrund der Voruntersuchungen vermutet werden, daß das Peptid C20W an die C-terminale Domäne des CaMs bindet, nicht aber an die N-terminale Domäne. Darauf deuteten zum einen Überlegungen bezüglich der Primärsequenz des Peptids. Bei C20W fehlt gerade die zweite Ankeraminosäure, die bei den anderen Bindungspeptiden mit der N-terminalen Domäne interagiert (Kapitel 1.6). Zum anderen sprachen die Ergebnisse der SAXS-Experimente dafür, daß der CaM/C20W-Komplex in einer elongierten Struktur vorliegt und damit nicht in die globuläre Struktur der bisher bekannten CaM/Peptid-Komplexe übergeht (48). Diese Vermutung wurde durch die Strukturbestimmung des CaM/C20W-Komplexes bestätigt. Das Peptid C20W bindet nur an die C-terminale Domäne des CaMs. Damit wurde zum ersten Mal ein neuartiger Bindungsmodus entdeckt, der sich von dem bisher bekannten CaM/Peptid-Bindungsmodus unterscheidet (Abbildung 67).

In den folgenden Unterkapiteln sind die Ergebnisse zusammengestellt, durch die der neuartige Bindungsmodus des Peptids C20W festgestellt wurde.

#### 4.1.1 Chemische Verschiebungsdifferenzen der Amidprotonen

Den ersten Hinweis, daß das Peptid C20W nur mit der C-terminalen Domäne von CaM interagiert, erhielt man bereits nach der Zuordnung der chemischen Verschiebung der Amidprotonen von CaM im Komplex mit C20W. Betrachtet man die Differenzen der chemischen Verschiebung der Amidprotonen des CaM/C20W-Komplexes bezüglich der chemischen Verschiebung der Amidprotonen von unkomplexiertem  $(\text{Ca}^{2+})_4\text{-CaM}$  (63), erkennt man deutliche Unterschiede in der C-terminalen Domäne, die durch die Bindung des Peptids zustande kommen, aber kaum Unterschiede in der N-terminalen Domäne (Abbildung 68 A). Dies steht im klaren Gegensatz zu dem CaM/M13-Komplex (162), bei dem deutliche Unterschiede in beiden Domänen gefunden werden, da das Peptid M13 von beiden Domänen komplexiert wird (Abbildung 68 B). Die Abweichungen in den chemischen Verschiebungen liegen dabei deutlich über den Differenzwerten, die man aufgrund der unterschiedlichen Temperaturen, bei denen die chemischen Verschiebungen in den verschiedenen CaM-Systemen bestimmt wurden, erwarten würde. Die NMR-Experimente an dem unkomplexierten  $(\text{Ca}^{2+})_4\text{-CaM}$  wurden bei 320 K (47°C), an dem CaM/C20W-Komplex bei 303 K (30°C) und an dem CaM/M13-Komplex bei 309 K (36°C) gemessen. Die Tabellen mit den Zuordnungswerten von unkomplexiertem  $(\text{Ca}^{2+})_4\text{-CaM}$  und des CaM/M13-Komplexes sind im Anhang (Kapitel 6.4 und 6.5) beigelegt.

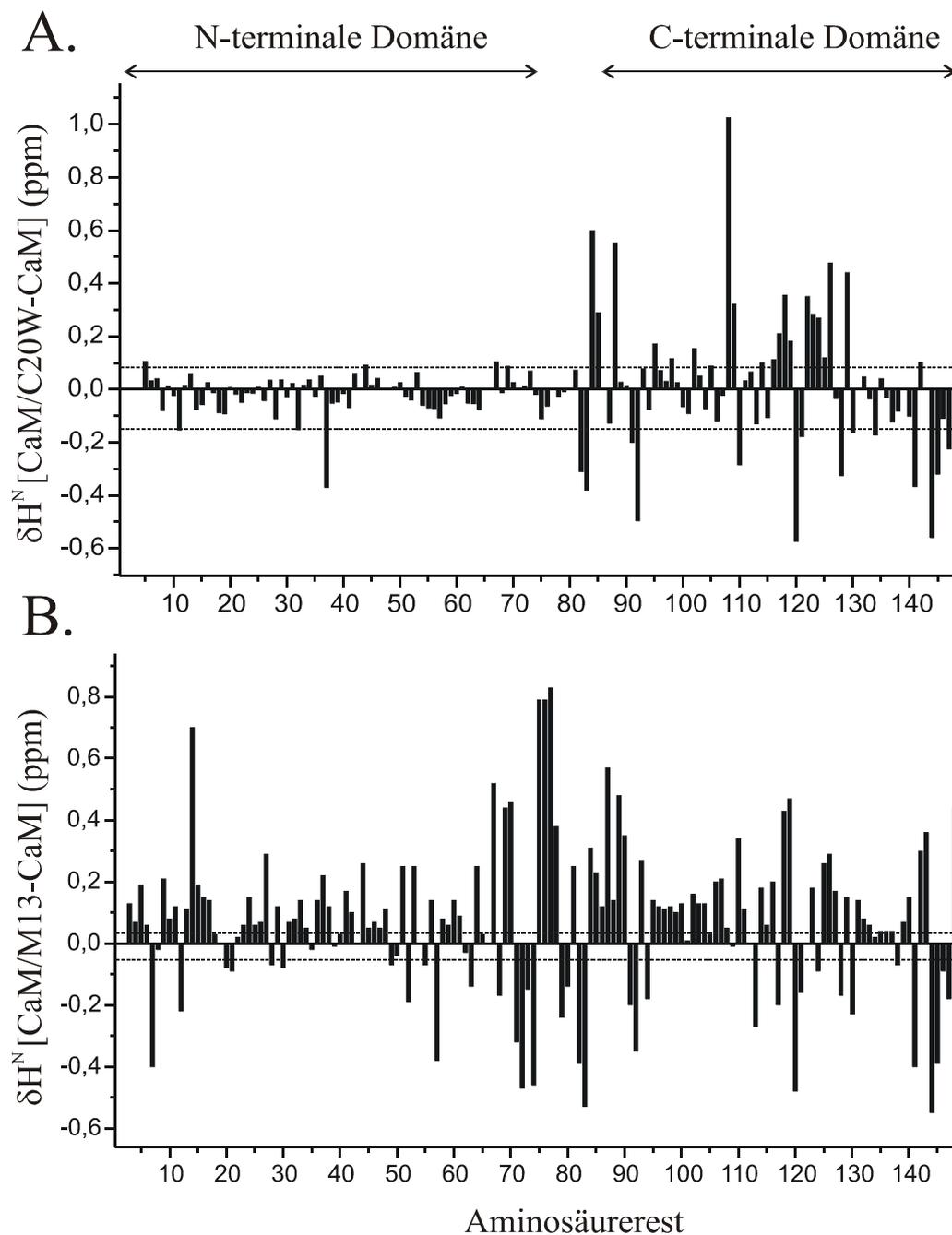


Abbildung 68: Differenzen der chemischen Verschiebung der Amidprotonen von dem CaM/C20W-Komplex (A) und von dem CaM/M13-Komplex (B) bezüglich den chemischen Verschiebungen der Amidprotonen von unkomplexiertem ( $Ca^{2+}$ )<sub>4</sub>-CaM. Die gestrichelte Linie markiert die Verschiebungsdifferenz, die aufgrund der verschiedenen Temperaturen, bei dem die NMR-Experimente der verschiedenen CaM-Systeme gemessen wurden, induziert wird.

#### 4.1.2 Chemische Verschiebungsdifferenzen der Methionine

Einen weiteren Hinweis auf den neuartigen Bindungsmodus von C20W an CaM erhielt man beim Auswerten der chemischen Verschiebungen der  $\epsilon CH_3$ -Gruppen der

Methioninreste von CaM. Da bekannt ist, daß die Methionine eine entscheidene Rolle bei der Bindung von CaM an seine Zielenzyme spielen (Kapitel 1.6) und daher die chemische Verschiebung der Methionine ein sensibler Indikator für die Bindung des Peptides sein sollte, wurde die chemischen Verschiebungen der Methionin- $\epsilon\text{CH}_3$ -Gruppen des CaM/C20W-Komplexes mit denen von unkomplexiertem  $(\text{Ca}^{2+})_4\text{-CaM}$  und mit denen des CaM/M13-Komplexes verglichen. In Abbildung 69 sind dazu schematische  $^{13}\text{C}, ^1\text{H}$ -HSQC-Spektren der verschiedenen CaM-Systeme überlagert und die unterschiedlichen Verschiebungen durch Pfeile markiert. Bei dem Vergleich zwischen dem CaM/C20W-Komplex und unkomplexiertem  $(\text{Ca}^{2+})_4\text{-CaM}$  fällt auf, daß nur die Methionine aus der C-terminalen Domäne (Met109, Met124, Met144, Met145) große Verschiebungsdifferenzen aufweisen (durchgezogene Pfeile), wohingegen die Methionine aus der N-terminalen Domäne (Met36, Met51, Met71, Met72) kaum Verschiebungsdifferenzen zeigen (gestrichelte Pfeile). Dies läßt sich durch die Bindung des Peptids C20W an die C-terminale Domäne des CaMs erklären, die die chemischen Verschiebungsdifferenzen hervorruft. Die N-terminale Domäne bleibt unbeeinflusst, daher sind die chemischen Verschiebungen sehr ähnlich. Im Unterschied dazu finden sich beim Vergleich der chemischen Verschiebungen der Methionin- $\epsilon\text{CH}_3$  Gruppen des CaM/M13-Komplexes mit denen von unkomplexiertem  $(\text{Ca}^{2+})_4\text{-CaM}$  große Verschiebungsdifferenzen bei Methioninen sowohl aus der N-terminalen, als auch aus der C-terminalen Domäne. Dies steht im Einklang zum Bindungsmodus des Peptids M13 an beide Domänen des CaMs.

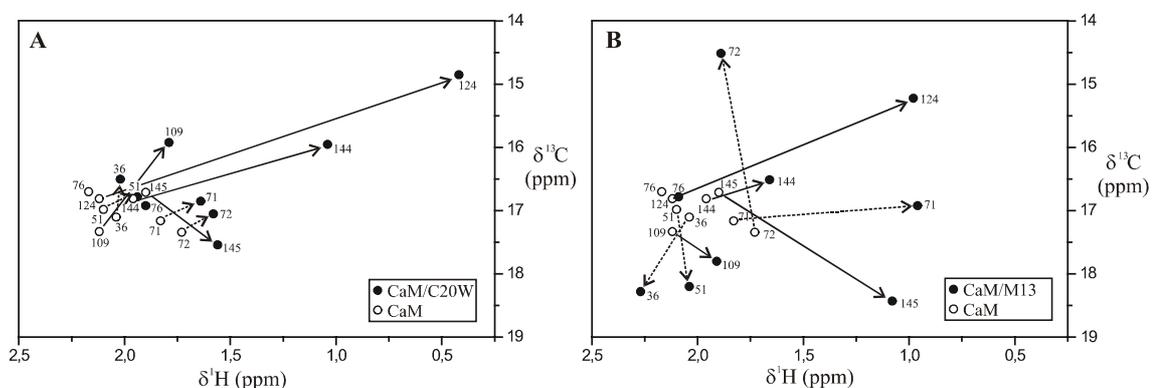


Abbildung 69: Überlagerung von schematischen  $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC Spektren der  $\epsilon\text{CH}_3$  Gruppen der Methioninreste in unkomplexiertem  $(\text{Ca}^{2+})_4\text{-CaM}$  (163), in dem CaM/C20W-Komplex und dem CaM/M13-Komplex (163). Chemische Verschiebungsdifferenzen von Methioninen in der C-terminalen Domäne von CaM (Met109, Met124, Met144, Met145) sind durch durchgezogene Pfeile markiert. Die Verschiebungsdifferenzen von Methioninen in der N-terminalen Domäne von CaM (Met36, Met51, Met71, Met72) sind durch gestrichelte Pfeile dargestellt. Met76 ist ein Rest aus der flexiblen Linker-Region.

### 4.1.3 Intermolekulare NOE-Kontakte

Neben den Hinweisen, die man aus den chemischen Verschiebungen gewinnen konnte, gelang der eindeutige Beweis für den beschriebenen Bindungsmodus des Peptids C20W durch die Zuordnung der intermolekularen NOE-Kontakte zwischen CaM und dem Peptid C20W (Kapitel 2.5). Es konnten nur NOE's zugeordnet werden, die zwischen Resten der C-terminalen Domäne von CaM zu dem Peptid C20W auftraten. Kein NOE-Kontakt konnte zwischen dem Peptid und Resten der N-terminalen Domäne gefunden werden. In Abbildung 70 sind die Restepaare eingezeichnet, die die intermolekularen NOE-Kontakte hervorrufen. Dabei erkennt man, daß die Aminosäurereste von C20W, die sich in den Ankerpositionen befinden (Trp8, Leu12, Ile15) und durch eine Vielzahl an hydrophoben Wechselwirkungen die Bindung an CaM stabilisieren, besonders viele NOE-Kontakte eingehen.

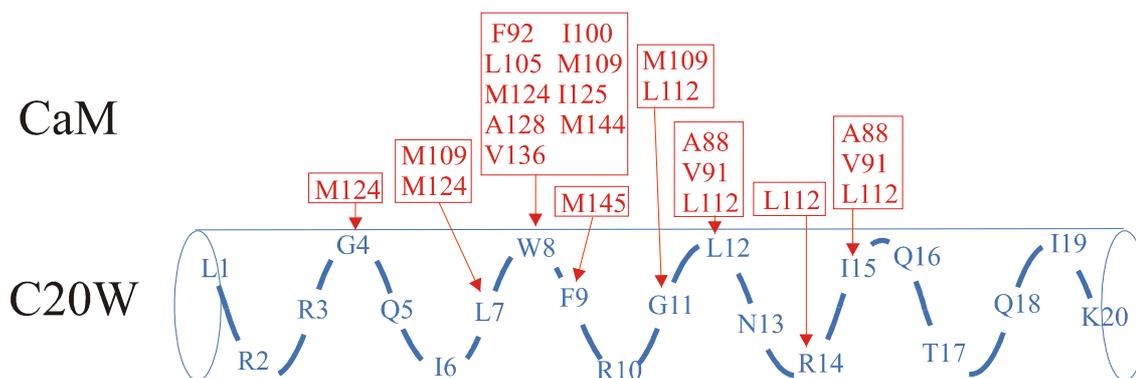


Abbildung 70: Schematische Darstellung der intermolekularen NOE-Kontakte, die zwischen Aminosäureresten aus der C-terminalen Domäne des CaMs (rot) und dem Peptid C20W (blau) beobachtet wurden.

## 4.2 Die Sekundärstrukturelemente des CaM/C20W-Komplexes

Die Struktur des CaM/C20W-Komplexes zeigt die folgenden Sekundärstrukturelemente für das CaM (Abbildung 71): Insgesamt acht  $\alpha$ -Helices wurden identifiziert zwischen Glu7 bis Leu18 ( $\alpha$ 1), Thr29 bis Ser38 ( $\alpha$ 2), Glu47 bis Glu54 ( $\alpha$ 3), Phe65 bis Ala73 ( $\alpha$ 4) in der N-terminalen Domäne und zwischen Ile85 bis Phe92 ( $\alpha$ 5), Ala103 bis Leu112 ( $\alpha$ 6), Asp118 bis Ala128 ( $\alpha$ 7), Tyr138 bis Met145 ( $\alpha$ 8) in der C-terminalen Domäne. Ein kurzes antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt verbindet die Stränge Thr26 bis Thr28 ( $\beta$ 1) und Thr62 bis Asp64 ( $\beta$ 2) in der N-terminalen Domäne und ein kurzes antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt verbindet die Stränge Tyr99 bis Ser101 ( $\beta$ 3) und Gln135 bis Asn137 ( $\beta$ 4) in der C-terminalen Domäne. Beide Domänen werden durch eine flexible Linkerregion von Arg74 bis Glu84 verbunden.

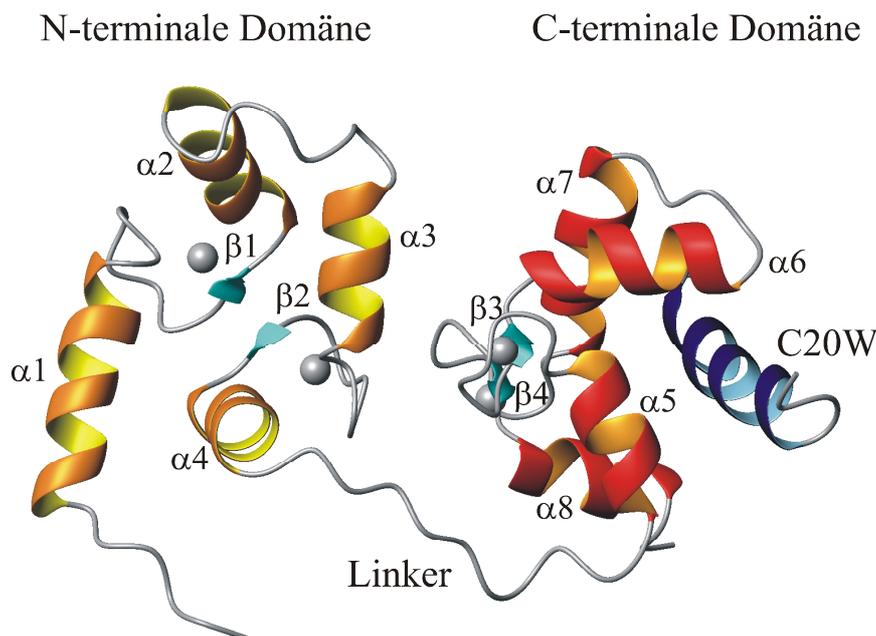


Abbildung 71: Ribbondarstellung des CaM/C20W-Komplexes. Die acht  $\alpha$ -Helices und vier  $\beta$ -Faltblattstränge des CaMs sind durch Bänder bzw. Pfeile dargestellt. Das  $\alpha$ -helicale Peptid C20W (blau) bindet an die C-terminale Domäne (rot) des CaMs. Die beiden Domänen sind durch einen flexiblen Linker verbunden.

Die Konformation des Proteinrückgrats und die Lage der Sekundärstrukturelemente im CaM verändern sich durch die Bindung des Peptids C20W kaum. Dies wird an dem geringen RMSD-Wert zwischen der CaM/C20W-Struktur und der Struktur des unkomplexierten  $(\text{Ca}^{2+})_4$ -CaM deutlich, der für die N-terminale Domäne (Reste 7-73) 1.57 Å und für die C-terminale Domäne (Reste 85-145) 1.56 Å über die Proteinrückgrat-atome beträgt. Für die Bindung des Peptids tritt offensichtlich nur eine Konformationsänderung der Seitenketten des CaMs ein (siehe Kapitel 4.3.2). Dies wurde auch bei den anderen bekannten CaM/Peptid-Komplexen (32,33,34) und bei einem Komplex von CaM mit einem kleinem organischen Molekül (N-(6-Aminoethyl)-5-chloro-1-naphthalensulfonamid) (111) beobachtet.

Das Peptid C20W, das frei in Lösung keine Struktur (*random coil*) zeigt, nimmt durch die Bindung an die C-terminale Domäne des CaMs eine  $\alpha$ -helicale Struktur an. Die Helix reicht von Gly4 bis Gln16 und hat amphiphatische Eigenschaften. Die hydrophobe Seite der Helix (Trp8, Leu12, Ile15) bindet an die C-terminale Domäne und geht eine Vielzahl an hydrophoben Wechselwirkungen ein, die die Bindung an das CaM stabilisieren (Abbildung 72). Die hydrophile Seite des helicalen Peptids, auf der einige basischen Aminosäuren (Arg2, Arg10, Arg14) vorhanden sind, ist für die umgebenden Wassermoleküle gut zugänglich.

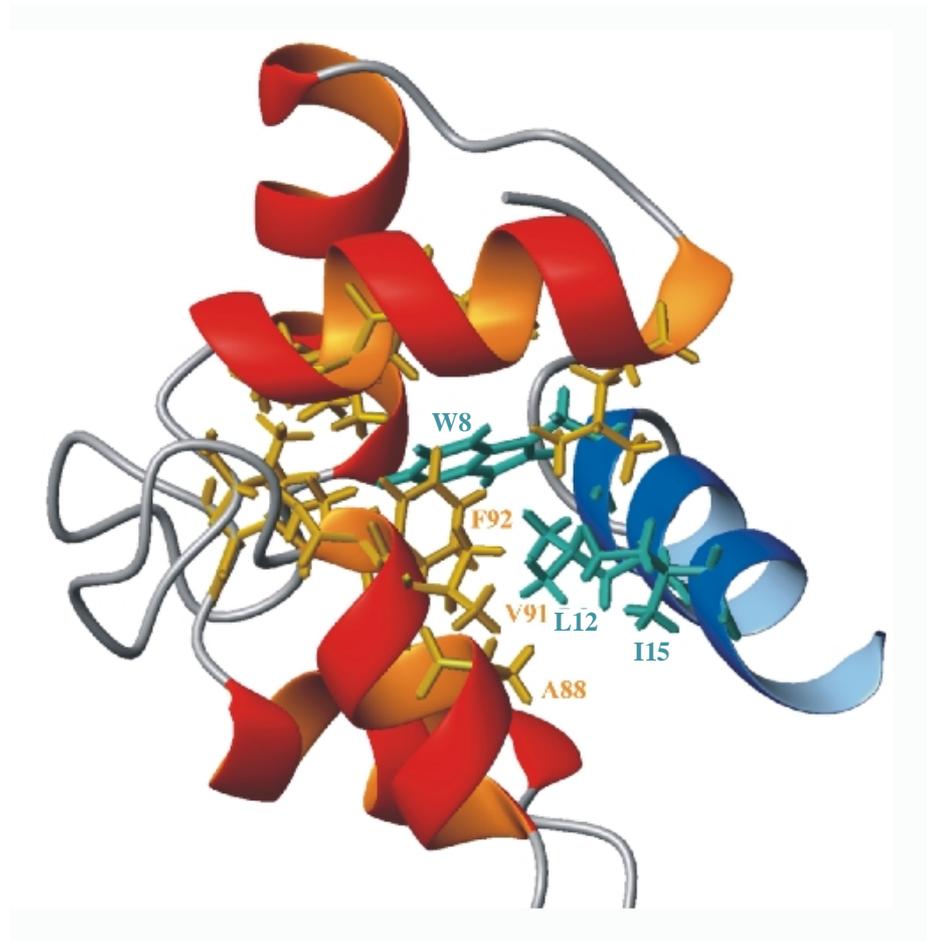


Abbildung 72: Ribbondarstellung der C-terminalen Domäne von CaM (rot) mit dem gebundenen Peptid C20W (blau). Die Bindung des Peptids wird durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Trp8, Leu12 und Ile15 des Peptids mit Seitenketten von CaM, von denen einige in der Abbildung dargestellt sind, stabilisiert.

### 4.3 Vergleich mit anderen Calmodulin/Peptid-Komplexen

Der größte Unterschied, der in der CaM/C20W-Struktur verglichen zu den bisher bekannten CaM/Peptid-Komplexen auftritt, ist der neuartige Bindungsmodus des Peptids nur an die C-terminale Domäne (Kapitel 4.1). Neben diesem globalen Unterschied lassen sich auch noch lokale, strukturelle Unterschiede in den Komplexstrukturen identifizieren.

#### 4.3.1 Die Struktur des gebundenen Peptids

Das Peptid C20W zeigt eine  $\alpha$ -helicale Struktur von Gly4 bis Gln16, wobei die Helix um eine Windung in Richtung des N-Terminus verlängert und um zwei Windungen in Richtung des C-Terminus verkürzt ist, verglichen zu der  $\alpha$ -helicale Struktur des Peptids M13, die von Trp4 bis Ser21 reicht (Abbildung 73).

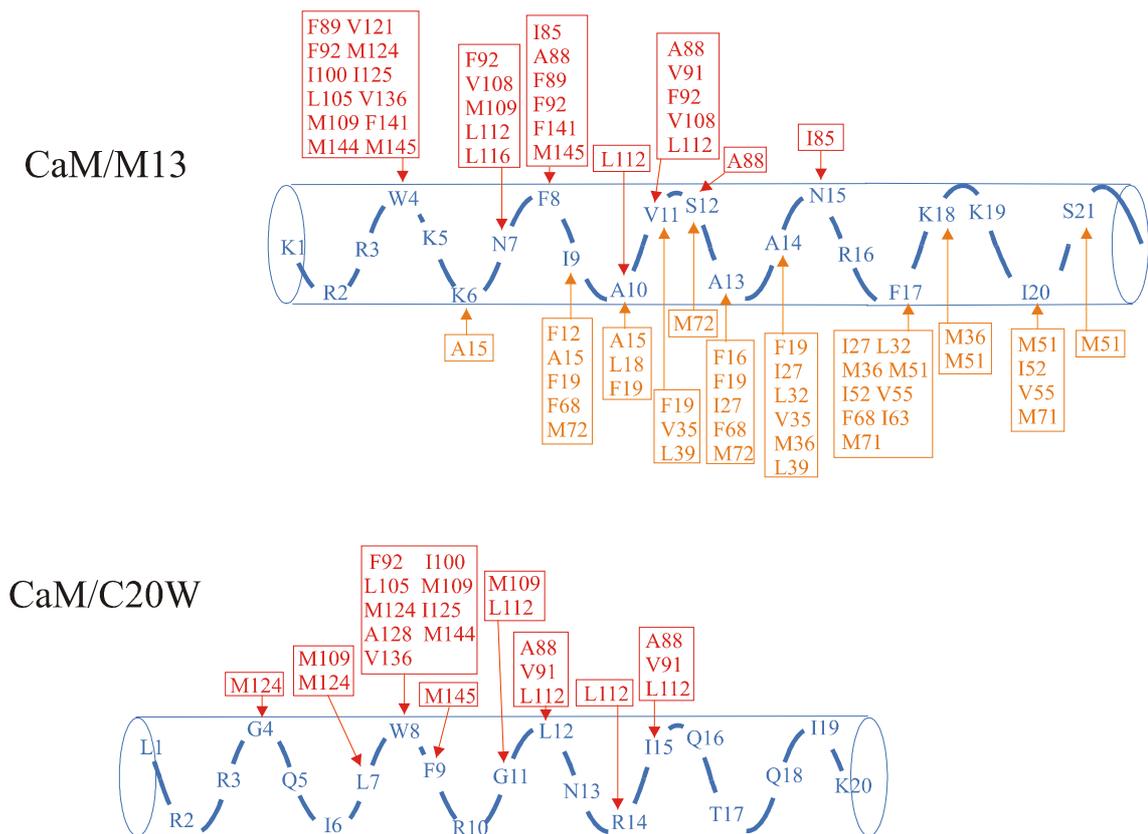


Abbildung 73: Vergleich der intermolekularen NOE's im CaM/M13-Komplex und im CaM/C20W-Komplex. Aminosäurereste aus der C-terminalen Domäne von CaM sind in rot, Reste aus der N-terminalen Domäne in orange dargestellt. Die Peptide M13 und C20W sind blau.

Durch die Helixverlängerung in N-terminaler Richtung sind bei C20W zusätzliche Wechselwirkungen zu Met124 und Met109 von CaM möglich. Die zusätzliche N-terminale Helixwindung findet sich auch bei den Peptiden R20, das der Bindungsregion von smMLCK entspricht (33) und bei einem Peptid, das der Bindungsregion von CaMKII entspricht (34). In beiden Fällen kann auch ein Kontakt zu Met124 beobachtet werden.

Ein weiterer Unterschied betrifft Phe92 von CaM, das in der CaM/C20W-Struktur nur mit Trp8 wechselwirkt, aber in CaM/M13 mit Trp4, Asn7, Phe8 und Val11 interagiert. Offensichtlich nimmt Val11 in dem Peptid M13 eine kritische Position ein, da es mit beiden CaM-Domänen in Wechselwirkung tritt, wobei das korrespondierende Ile15 im Peptid C20W nur mit Resten aus der C-terminalen Domäne (Ala88, Val91, Leu112) interagiert. Der zweite Rest, der im M13 Kontakte zu beiden Domänen zeigt (Ala10), ist im C20W durch ein Arginin ersetzt (Arg14), welches nur einen Kontakt zur C-terminalen Domäne zeigt.

### 4.3.2 Die unterschiedliche Seitenkettenkonformation

Die unterschiedliche Bindung der beiden Peptide an CaM wird durch die Feinjustierung der Seitenkettenkonformation ermöglicht. Daher finden sich bei dem Vergleich der Seitenkettenwinkel  $\chi_1$  und  $\chi_2$  in den Strukturen der Komplexe CaM/C20W und CaM/M13 in beiden Domänen oft unterschiedliche Werte (Abbildung 74 und Abbildung 75). Interessant sind dabei besonders die Aminosäurereste, die in direkter Wechselwirkung zu dem gebundenen Peptid stehen (siehe Abbildung 73). Für die N-terminale Domäne besteht bei der CaM/C20W Struktur keine Bindung zum Peptid C20W, wohingegen bei der CaM/M13 Struktur die N-terminale Domäne das Peptid M13 bindet. Es finden sich für die N-terminale Domäne große Unterschiede in dem  $\chi_1$ -Winkel bei den Resten F12, A15, F16 und L18 und in dem  $\chi_2$ -Winkel bei den Resten L18, L32 und M71. Aber auch bei Aminosäureresten, die nicht direkt in die Bindung des Peptids involviert sind, zeigen sich teilweise große Differenzen in den  $\chi_1$ -Winkeln (A10, E14, D24, T34, Q41, N42, A46, E47, L48, D56, D58, D64, F65, E67, L69) und in den  $\chi_2$ -Winkeln (S38, N42, L69).

Bei der C-terminalen Domäne, bei der der Unterschied zwischen der CaM/C20W und der CaM/M13-Struktur in dem unterschiedlich gebundenen Peptid liegt, erkennt man große Unterschiede in dem  $\chi_1$ -Winkel bei A88, M124, A128 und M145 und in dem  $\chi_2$ -Winkel bei L105 und M109. Aber auch hier finden sich große Unterschiede in den  $\chi_1$ -Winkeln (S101, A103, E104, L105, V108, K115, E120, V121, E123, D133, Q135, E139, V142, A147) und in den  $\chi_2$ -Winkeln (N97, E114, E120, R126) bei Aminosäureresten, die nicht in direkter Wechselwirkung zu dem gebundenen Peptid liegen.

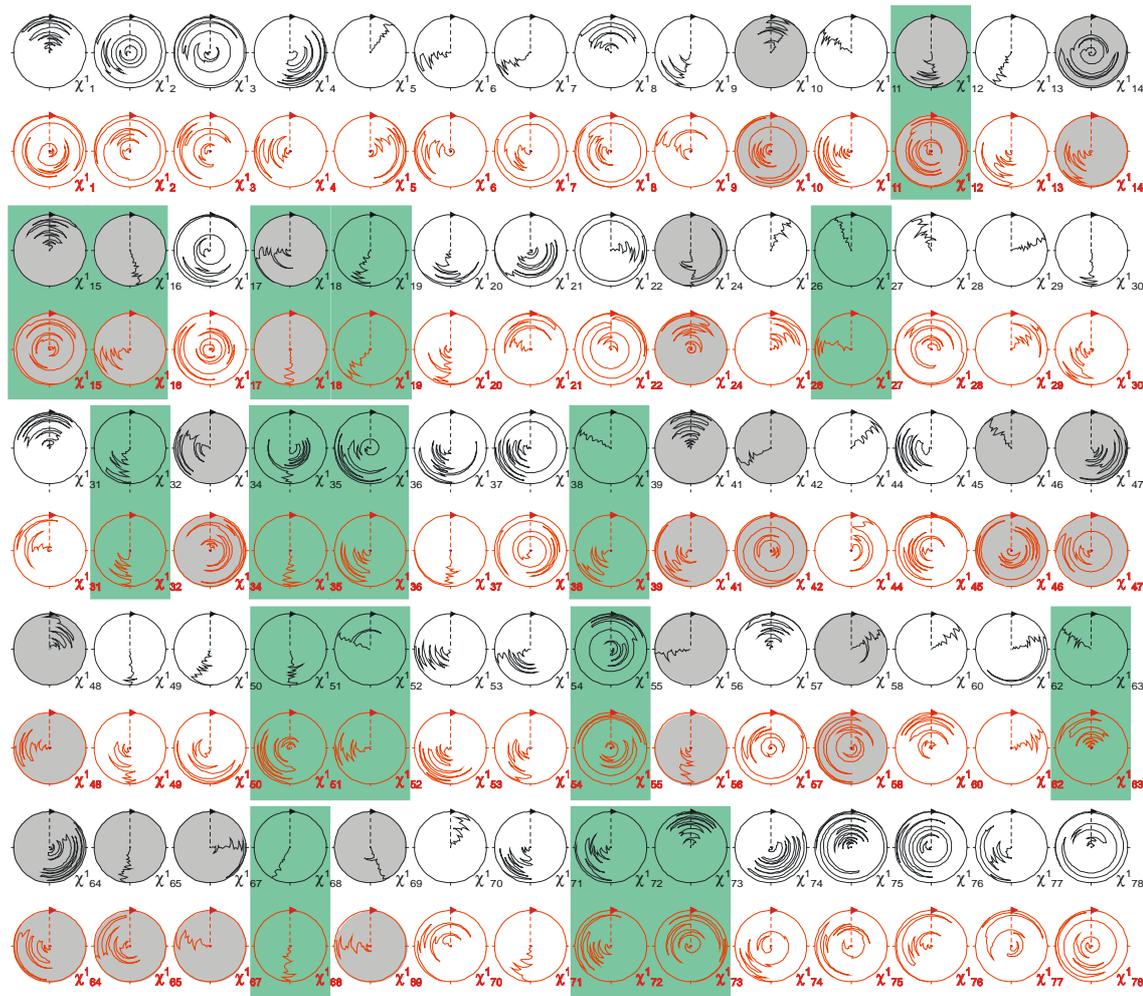


Abbildung 74: Vergleich des Seitenkettenwinkels  $\chi_1$  in Kreisdiagrammen in den Strukturen des CaM/C20W-Komplexes (schwarze Kreise) und des CaM/M13-Komplexes (rote Kreise). Aminosäurereste, die in die Bindung des Peptids M13/C20W involviert sind, sind blau hinterlegt. Bei stark unterschiedlicher Orientierung sind die Kreise grau unterlegt. Die gestrichelte Linie in den Kreisen entspricht 0°. 60° entspricht gauche(-), 180° trans- und 300° gauche(+)-Konformation. Die Abbildung wurde mit dem Programm MOLMOL (167) erstellt.

Die Bindung des Peptids hat also nicht nur Auswirkungen auf die Seitenkettenkonformation von Resten, die direkt an der Bindung beteiligt sind, sondern die Konformationsänderung setzt sich weiter fort auf Seitenketten, die nicht in direktem Kontakt zu dem Peptid stehen. Die unterschiedlichen Konformationen bei Resten, die nicht direkt an der Bindung des Peptids beteiligt sind, kann aber auch von der Tatsache kommen, daß solche Reste an der Oberfläche des Proteins liegen und daß daher deren Konformation nicht alleine durch die NOE's bestimmt wird, sondern auch durch Effekte der Strukturrechnung. Beispielsweise liegen die Reste E114 und K115 in einem Loop-Bereich zwischen Helix  $\alpha_6$  (Ala103 - Leu112) und  $\alpha_7$  (Asp118 - Ala128), der für das Lösungsmittel Wasser sehr zugänglich ist (Abbildung 76). Die unterschiedliche Konformationen des  $\chi_1$ -Winkels von K115 und des  $\chi_2$ -Winkels von E114 in den Strukturen CaM/C20W und CaM/M13 ist in diesem Fall wahrscheinlich ein Resultat aus unterschiedlichen Parametern bei der Strukturrechnung. Dies ist besonders deshalb

wahrscheinlich, da die benachbarten Reste in den beiden Strukturen gleiche Seitenkettenwinkel aufweisen, sogar der Rest L112, der an das Peptid bindet. Demgegenüber sind die unterschiedlichen  $\chi_1$ -Winkel der Reste A103 und E104 in den Strukturen des CaM/C20W und des CaM/M13-Komplexes wahrscheinlich auf die Konformationsänderung des Restes L105 in  $\chi_1$  und  $\chi_2$  zurückzuführen, der an der Bindung des Peptids C20W bzw. M13 beteiligt ist. Die Reste A103 bis L105 liegen in einem für das Lösungsmittel schwer zugänglichen Bereich, so daß deren Konformation durch die NOE's gut bestimmt ist (Abbildung 76).

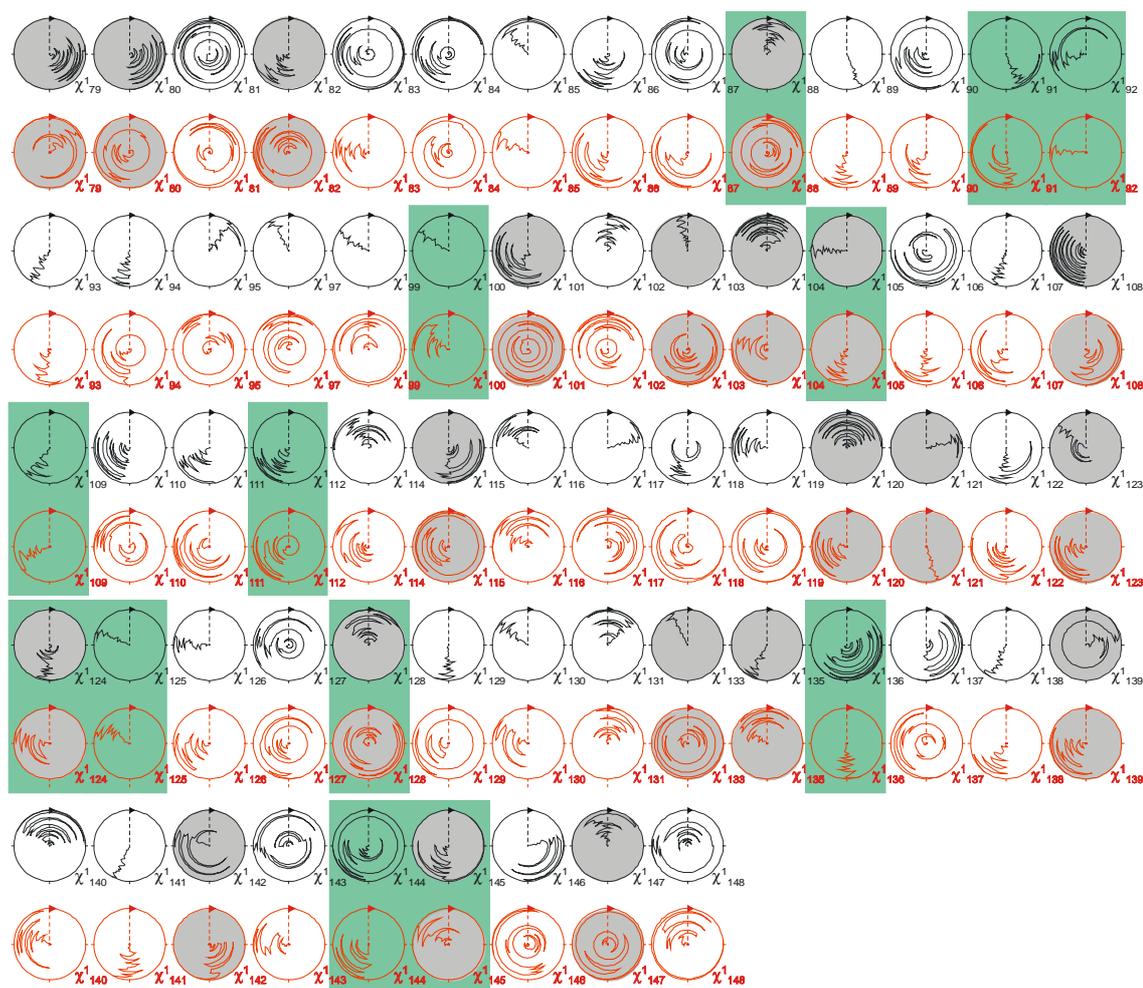


Abbildung 74 (Fortsetzung): Vergleich des Seitenkettenwinkels  $\chi_1$  in Kreisdiagrammen in den Strukturen des CaM/C20W-Komplexes (schwarze Kreise) und des CaM/M13-Komplexes (rote Kreise). Aminosäurereste, die in die Bindung des Peptids M13/C20W involviert sind, sind blau hinterlegt. Bei stark unterschiedlicher Orientierung sind die Kreise grau unterlegt. Die gestrichelte Linie in den Kreisen entspricht 0°. 60° entspricht gauche(-), 180° trans- und 300° gauche(+)-Konformation. Die Abbildung wurde mit dem Programm MOLMOL (167) erstellt.

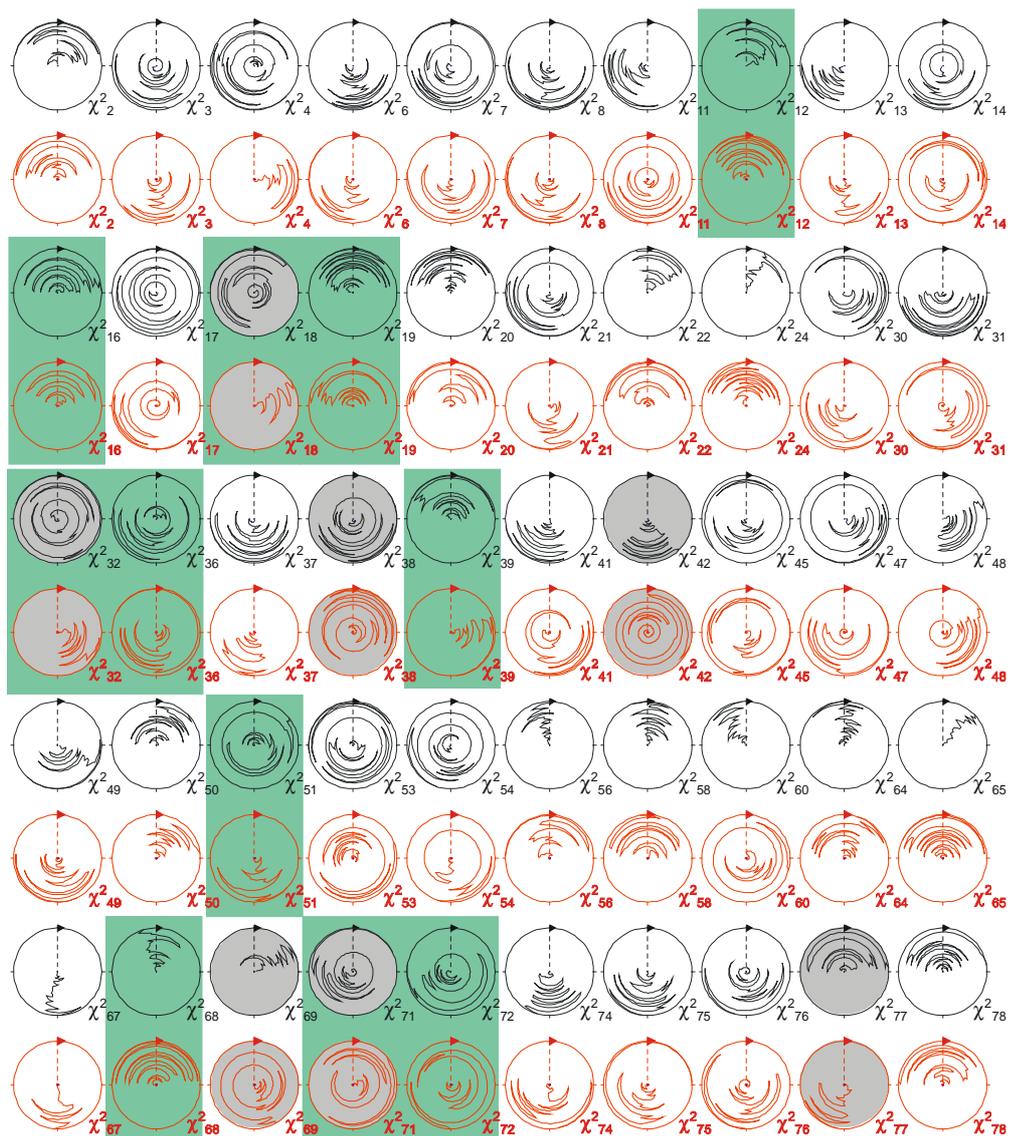


Abbildung 75: Vergleich des Seitenkettenwinkels  $\chi_2$  in Kreisdiagrammen in den Strukturen des CaM/C20W-Komplexes (schwarze Kreise) und des CaM/M13-Komplexes (rote Kreise). Aminosäurereste, die in die Bindung des Peptids M13/C20W involviert sind, sind blau hinterlegt. Bei stark unterschiedlicher Orientierung sind die Kreise grau unterlegt. Die gestrichelte Linie in den Kreisen entspricht  $0^\circ$ .  $60^\circ$  entspricht gauche(-),  $180^\circ$  trans- und  $300^\circ$  gauche(+)-Konformation. Die Abbildung wurde mit dem Programm MOLMOL (167) erstellt.

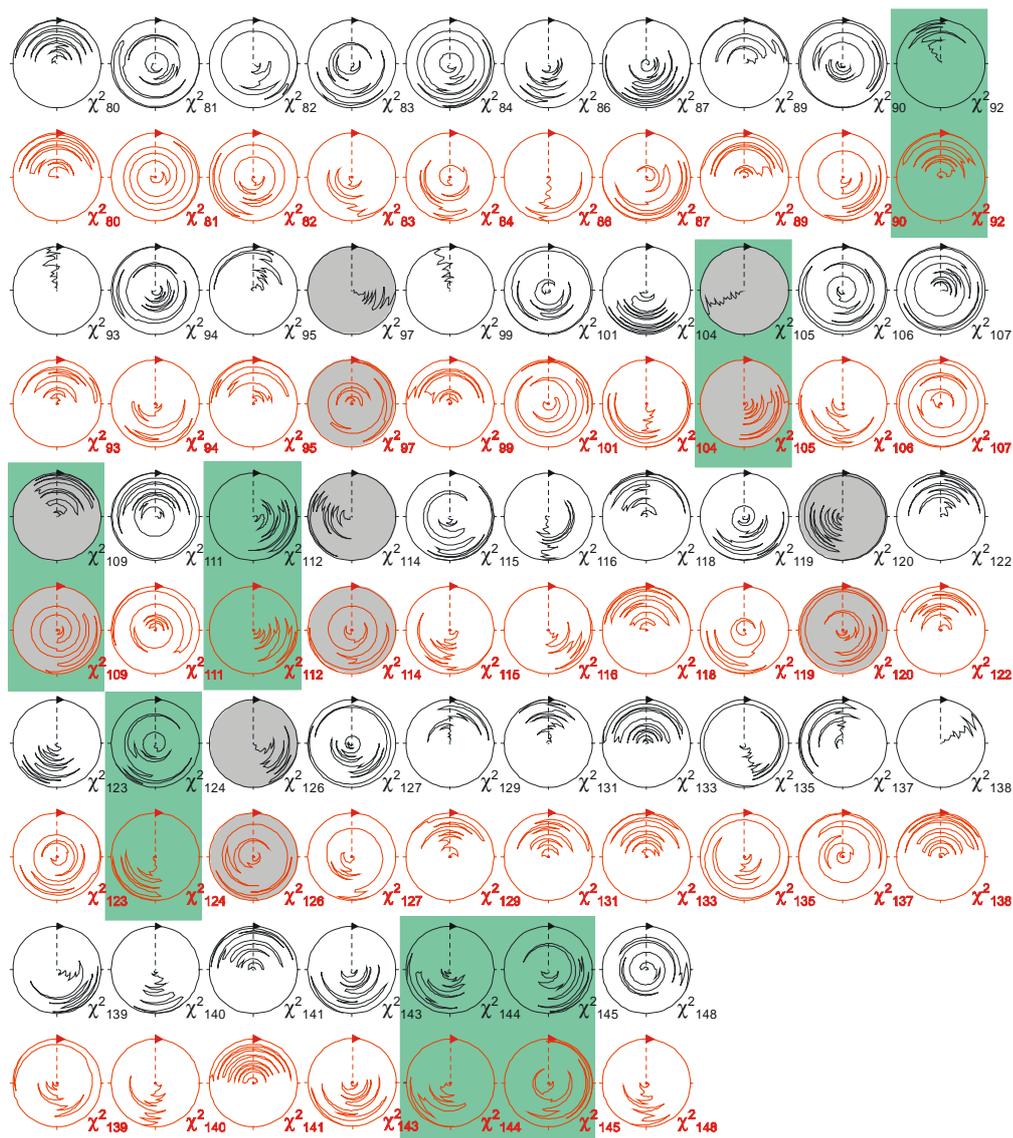


Abbildung 75 (Fortsetzung): Vergleich des Seitenkettenwinkels  $\chi_2$  in Kreisdiagrammen in den Strukturen des CaM/C20W-Komplexes (schwarze Kreise) und des CaM/M13-Komplexes (rote Kreise). Aminosäurereste, die in die Bindung des Peptids M13/C20W involviert sind, sind blau hinterlegt. Bei stark unterschiedlicher Orientierung sind die Kreise grau unterlegt. Die gestrichelte Linie in den Kreisen entspricht 0°. 60° entspricht gauche(-), 180° trans- und 300° gauche(+)-Konformation. Die Abbildung wurde mit dem Programm MOLMOL (167) erstellt.

## CaM

\* \* \* \* \*  
 A D Q L T E E Q I A E F K E A F S L F D K D G D G T I T T K E L G T V M R S L G Q N P T E A E L Q D M I N E V D A D G N  
 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60

\* \* \* \* \*  
 G T I D F P E F L T M M A R K M K D T D S E E E I R E A F R V F D K D G N G Y I S A A E L R H V M T N L G E K L T D E E  
 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115 120

C20W  
 \* \* \* \* \*  
 V D E M I R E A D I D G D G Q V N Y E E F V Q M M T A K L  
 125 130 135 140 145  
 \* \* \* \* \*  
 R R G Q I L W F R G L N R I Q T Q I K  
 2 10 15 20

\* zugänglich ● unzugänglich

Abbildung 76: Lösungsmittelzugänglichkeit der einzelnen Aminosäuren von CaM (rot) und C20W (blau).

Bei dem Vergleich der Seitenkettenkonformation des CaM/C20W-Komplexes mit freiem, calciumbeladenen CaM erwartet man kaum Unterschiede in der Seitenkettenkonformation in der N-terminalen Domäne, aber starke Unterschiede in der C-terminalen Domäne, vor allem bei den Aminosäureresten, die in die Bindung des Peptids C20W involviert sind. Für den Vergleich wurde eine kürzlich veröffentlichte, hochaufgelöste Röntgenstruktur von  $(\text{Ca}^{2+})_4\text{-CaM}$  herangezogen, die aufgrund sorgfältiger Auswertung die Flexibilität von Seitenketten berücksichtigt (164). Eine NMR-Struktur von freiem  $(\text{Ca}^{2+})_4\text{-CaM}$  wurde bisher nicht veröffentlicht. In der 1.0 Å Röntgenstruktur wurden 36 Seitenketten ermittelt, die in zwei Konformationen vorliegen. Diese Seitenketten liegen vornehmlich in der zentralen Helix von CaM und in den hydrophoben Bindungstaschen der beiden Domänen. Viele von den flexiblen Seitenketten in den Bindungstaschen des CaMs sind Reste, die in der CaM/C20W- und der CaM/M13-Struktur direkt in die Bindung des Peptids involviert sind (N-terminal: F12, M36, L39, I52, V55, F68, L71, M72; C-terminal: V91, F92, I100, I125, I136, F141, M144). Ein Vergleich der Seitenkettenwinkel  $\chi_1$  und  $\chi_2$  der Röntgenstruktur des freien CaMs mit der Struktur des CaM/C20W-Komplexes zeigt deutliche Unterschiede sowohl in der N-terminalen als auch in der C-terminalen Domäne. Hierbei muß man wieder berücksichtigen, daß bei Aminosäureresten, die an der Oberfläche des Proteins liegen (Abbildung 76), Unterschiede auftreten können, da hier eine NMR-Struktur mit einer Röntgenstruktur verglichen werden, wobei bei der Röntgenstruktur Kristallpackungseffekte die Oberfläche des Proteins beeinflussen können. Neben diesen artifiziellen Konformationsunterschieden in der N-terminalen Domäne kann aber auch bei diesem Vergleich eine fortsetzende Konformationsänderung von an der Peptidbindung beteiligten Seitenketten zu Seitenketten, die nicht in direktem Kontakt zum Peptid stehen, beobachtet werden. Der Rest L105 aus der hydrophoben Bindungstasche zeigt durch die Bindung des Peptids C20W eine Änderung des  $\chi_1$  und  $\chi_2$ -Winkels. Diese Konformationsänderung setzt sich auf den benachbarten Rest R106 fort, bei dem sich der  $\chi_1$ -Winkel ändert.

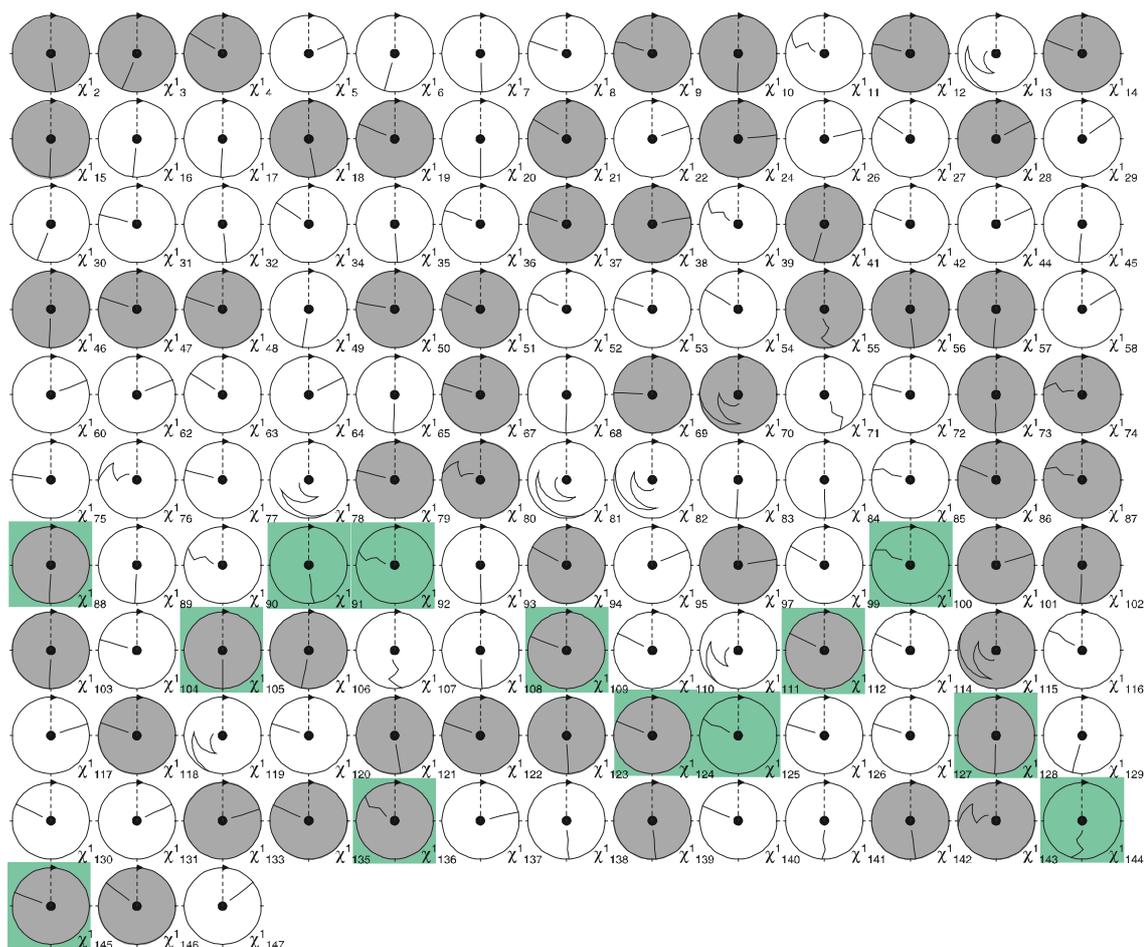


Abbildung 77: Seitenkettenwinkel  $\chi_1$  in Kreisdiagrammen in der hochaufgelösten Röntgenstruktur von freiem  $(\text{Ca}^{2+})_4$ -CaM (164, PDB-ID 1EXR). Bei 36 Seitenkettenresten treten zwei Konformationen auf. Bei großen Unterschieden zu der CaM/C20W-Struktur sind die Kreise grau unterlegt. Aminosäurereste, die in der CaM/C20W-Struktur in die Bindung des Peptids involviert sind, sind blau hinterlegt. Die gestrichelte Linie in den Kreisen entspricht  $0^\circ$ .  $60^\circ$  entspricht gauche(-),  $180^\circ$  trans- und  $300^\circ$  gauche(+)-Konformation. Die Abbildung wurde mit dem Programm MOLMOL (167) erstellt.

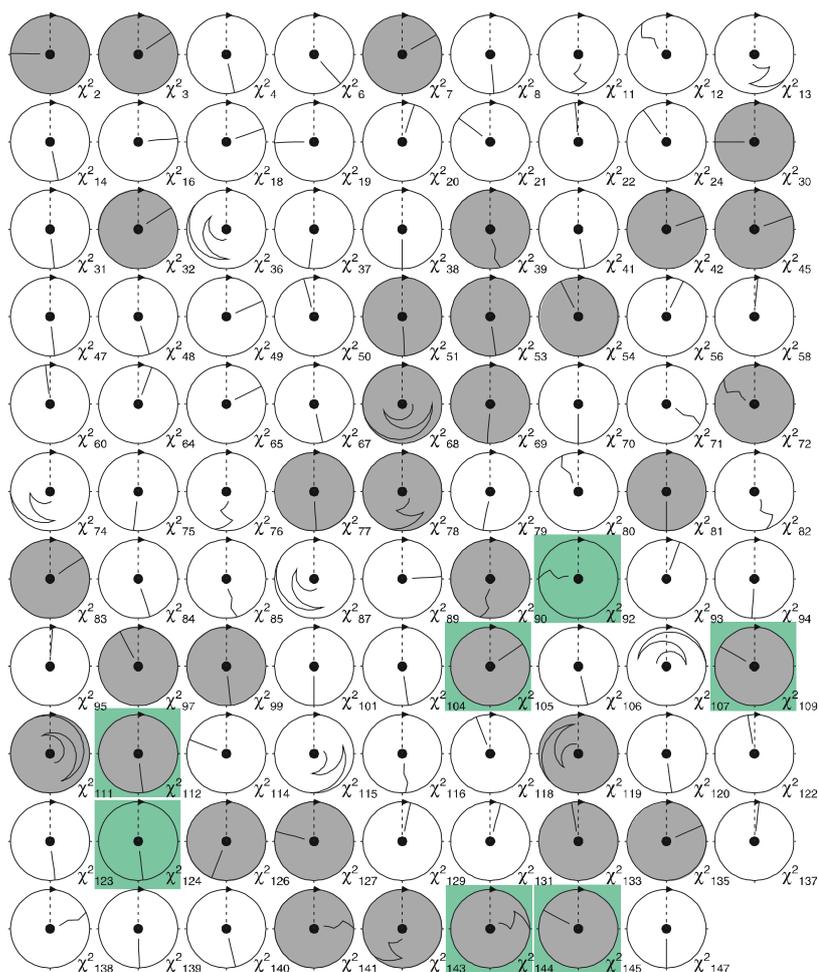


Abbildung 78: Seitenkettenwinkel  $\chi_2$  in Kreisdiagrammen in der hochaufgelösten Röntgenstruktur von freiem  $(Ca^{2+})_4$ -CaM (164, PDB-ID 1EXR). Bei 36 Seitenkettenresten treten zwei Konformationen auf. Bei großen Unterschieden zu der CaM/C20W-Struktur sind die Kreise grau unterlegt. Aminosäurereste, die in der CaM/C20W-Struktur in die Bindung des Peptids involviert sind, sind blau hinterlegt. Die gestrichelte Linie in den Kreisen entspricht  $0^\circ$ .  $60^\circ$  entspricht gauche(-),  $180^\circ$  trans- und  $300^\circ$  gauche(+)-Konformation. Die Abbildung wurde mit dem Programm MOLMOL (167) erstellt.

### 4.3.3 Das Tryptophan

Eine besonders interessante Beobachtung beim Vergleich des CaM/C20W-Komplexes mit der CaM/M13-Struktur ist die unterschiedliche topologische Orientierung des Tryptophans Trp8 bzw. Trp4 der beiden Peptide, welches die Hauptankeraminoäure darstellt und für die Bindung der Peptide an das CaM von entscheidender Bedeutung ist. In der CaM/C20W-Struktur ist der Indolring des Tryptophans um ca.  $90^\circ$  gegenüber der Orientierung in der CaM/M13-Struktur gedreht (Abbildung 79). Diese unterschiedliche Orientierung des Indolrings spiegelt sich in den unterschiedlichen Seitenkettenwinkel  $\chi_1$  und  $\chi_2$  wieder, wobei im CaM/C20W-Komplex  $\chi_1$  in gauche(-) und  $\chi_2$  in gauche(+)

Konformation vorliegt. Im CaM/M13-Komplex hingegen steht der Winkel  $\chi_1$  des Tryptophans in gauche(+) und  $\chi_2$  in gauche(-) Konformation.

Für die unterschiedliche Orientierung der Tryptophanseitenkette muß die fehlende Wechselwirkung der N-terminalen Domäne im CaM/C20W-Komplex verantwortlich sein. Für diese Vermutung spricht die Tatsache, daß in einem Komplex aus dem C-terminalen Fragment von CaM (TR2C, Reste 78-148) mit dem Peptid C20W, sehr ähnliche chemische Verschiebungen für die Indolringprotonen beobachtet wurden. In einem homonuklearen 2D-NOESY-Experiment, das von der Gruppe von Prof. Carafoli und Dr. Krebs an einem TR2C/C20W-Komplex aufgenommen und ausgewertet wurde, konnten die Resonanzen des Tryptophans zugeordnet werden. Die Präparation der TR2C/C20W-Probe ist im (165) beschrieben. In Abbildung 80B wird das NOESY-Spektrum des TR2C/C20W-Komplexes gezeigt und mit dem  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ -gefilterten NOESY-Spektrums des CaM/C20W-Komplexes (Abbildung 80A) verglichen, wobei die interessierenden Resonanzen der Indolringprotonen von Trp8 zugeordnet sind. Die chemischen Verschiebungen der Indolringprotonen sind fast identisch. Damit kann man annehmen, daß in dem Komplex der C-terminalen Domäne alleine mit dem Peptid C20W das Tryptophan dieselbe Orientierung hat wie in dem CaM/C20W-Komplex, so daß ein Einfluß der N-terminalen Domäne auf die Bindung des Peptids C20W ausgeschlossen werden kann.

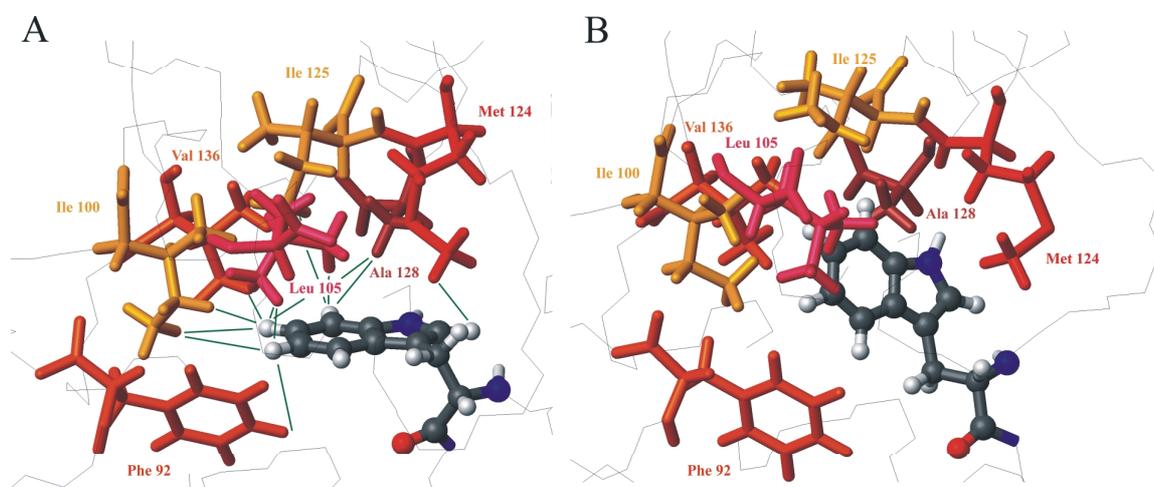


Abbildung 79: Vergleich der Bindungstasche des Tryptophans in dem CaM/C20W-Komplex (A) und in dem CaM/M13-Komplex (B). Die Orientierung des Indolrings des Tryptophans ist um ca. 90° in den beiden Komplexstrukturen verdreht.

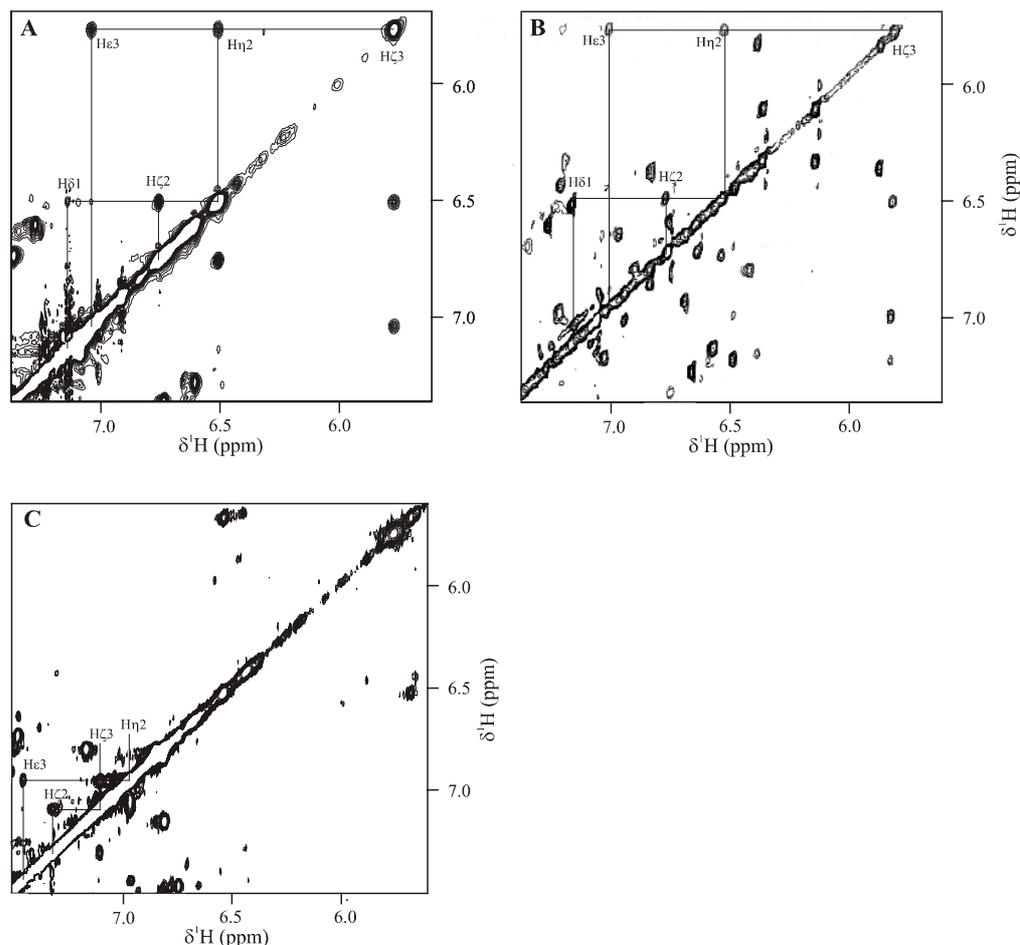


Abbildung 80: Vergleich der Resonanzen der Indolringprotonen des Tryptophans in dem  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ -gefilterten NOESY des CaM/C20W-Komplexes (A) mit den entsprechenden Resonanzen in dem homonuklearen NOESY-Spektrum des TR2C/C20W-Komplexes (B). In (C) ist das  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ -gefilterte NOESY des CaM/C21W-Komplexes gezeigt, der analog zum CaM/M13-Komplex eine globuläre Struktur aufweisen soll.

Interessant ist auch der Vergleich der chemischen Verschiebungen des Tryptophans mit denen von einem Komplex aus CaM und dem Peptid C21W. C21W ist ebenfalls ein Peptid aus der Bindungsdomäne der Calciumpumpe und besitzt beide Hauptankeraminosäuren (Kapitel 1.6). Der CaM/C21W-Komplex sollte daher eine globuläre Struktur besitzen, wobei das Peptid C21W analog zu M13 von beiden Domänen des CaMs gebunden wird. Der CaM/C21W-Komplex wurde von Dr. Holger Försterling in der Arbeitsgruppe von Prof. Griesinger NMR-spektroskopisch untersucht, wobei die Zuordnung des Proteinrückgrats von CaM und teilweise die Zuordnung des Peptids gelang. Die Resonanzen des Tryptophans sind deutlich verschoben zu den Resonanzen im CaM/C20W-Komplex und im TR2C/C20W-Komplex (Abbildung 80C). Die chemischen Verschiebungswerte sind dabei denen aus dem CaM/M13-Komplex deutlich ähnlich (Abbildung 81), so daß auf eine gleiche Orientierung des Tryptophans in den beiden globulären Komplexen geschlossen werden kann.

## CaM/C20W, TR2C/C20W, CaM/M13, CaM/C21W

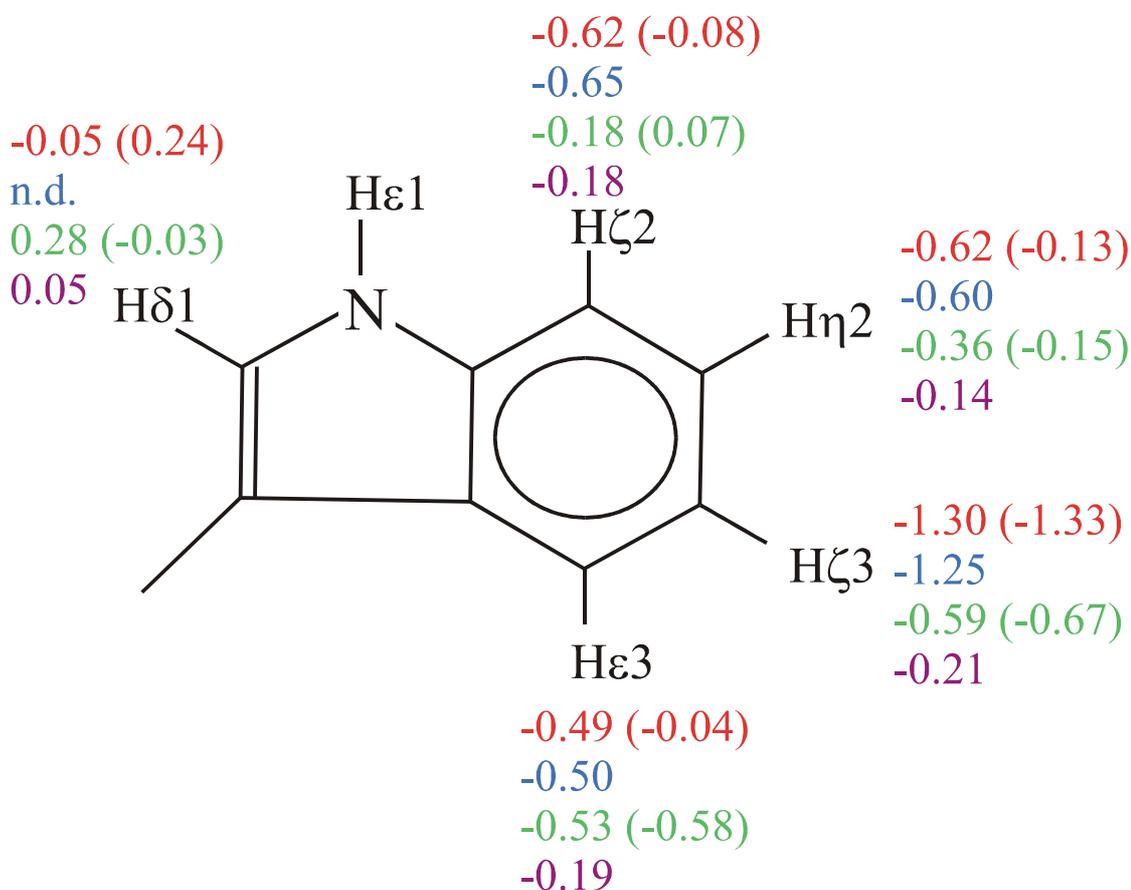


Abbildung 81: Experimentelle sekundäre chemische Verschiebung der Tryptophanindolprotonen der CaM-gebundenen Peptide in CaM/C20W, TR2C/C20W, CaM/M13 und CaM/C21W. Im CaM/C20W und im TR2C/C20W Komplex zeigt das H $\zeta$ 3-Proton eine extreme Hochfeldverschiebung gegenüber dem random coil-Wert, wohingegen im CaM/M13-Komplex und im CaM/C21W-Komplex nur eine geringe Hochfeldverschiebung beobachtet wird. In Klammern sind die berechneten Werte für den CaM/C20W und den CaM/M13-Komplex angegeben.

Um sicher zu gehen, daß die beschriebene Orientierung des Tryptophans in den berechneten Strukturen mit der Realität übereinstimmt, wurden die sekundären chemischen Verschiebungen der Indolringprotonen nach der Methode von Case (166), die in dem Programm MOLMOL (167) implementiert ist, berechnet. Dabei wurden nur die Beiträge des Ringstromeffekts benachbarter Phenylgruppen berücksichtigt. Die berechneten, gemittelten Werte für die 26 Strukturen des CaM/C20W-Komplexes bzw. der 21 Strukturen des CaM/M13-Komplexes (PDB ID 2BBN) sind in Abbildung 81 in Klammern angegeben, wobei eine gute Übereinstimmung mit den experimentellen sekundären chemischen Verschiebungen festgestellt werden kann. Damit stimmt die berechnete Struktur mit den experimentellen Daten überein. Der besonders starke Hochfeldshift des H $\zeta$ 3-Protons des Tryptophans wird dabei vorwiegend von den Ringstromeffekt des naheliegenden Phe92 des CaMs verursacht, wobei die C-H $\zeta$ 3 Bindung direkt auf das Zentrum des aromatischen Ring von Phe92 deutet

(Abbildung 79). Das in der Primärsequenz des Peptids nachfolgende Phe9 leistet hingegen kaum einen Beitrag zu der starken Verschiebung des H $\xi$ 3-Protons. Somit ist die hohe chemische Verschiebungsdifferenz des H $\xi$ 3-Protons auf die Bindung des Tryptophans in der beschriebenen Orientierung, um 90° gedreht zu der Orientierung im CaM/M13-Komplex, zurückzuführen und kann nicht durch den Einfluß des Phe9 erklärt werden, das in dem Peptid M13 durch ein Lysin ersetzt ist.

#### 4.3.4 Die Methionine

Die Bindung von CaM an strukturell unterschiedliche Bindungsdomänen wird durch die Feineinstellung der Seitenkettenkonformation von langkettigen, hydrophoben Aminosäuren bewerkstelligt. Dabei spielen vor allem die flexiblen Methionin-Seitenketten in der Bindungstasche des CaMs eine bedeutende Rolle (Kapitel 1.6). Ein Vergleich der Konformation der Methionine in der C-terminalen Domäne (Met109, Met124, Met144, Met145) zeigt große Unterschiede zwischen der CaM/C20W-Struktur und der CaM/M13-Struktur (Abbildung 82).

Die  $\epsilon$ CH<sub>3</sub>-Gruppe von Met109, die im CaM/M13-Komplex direkt über dem aromatischen Ringsystem des Tryptophans von M13 liegt, steht im CaM/C20W in Nachbarschaft zu den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Protonen des Tryptophans, wobei sich die Konformation der gesamten Seitenkette von Met109 nur geringfügig ändert. Die Seitenkettenwinkel  $\chi_1$  und  $\chi_3$  von Met109 sind in den beiden Komplexen recht ähnlich. Der Winkel  $\chi_2$  nimmt in dem CaM/C20W-Komplex entweder ca. 60° (gauche+) oder ca. 300° (gauche-) Werte an. Im CaM/M13-Komplex hingegen liegt der Winkel  $\chi_2$  entweder bei ca. 60° (gauche+) oder bei ca. 180° (trans).

Dem gegenüber ändert sich die Seitenkettenkonformation von Met124 in beiden Komplexen stark, wobei die  $\epsilon$ CH<sub>3</sub>-Gruppe jeweils in Kontakt zu dem aromatischen Ring des Tryptophans steht. Der  $\chi_1$ -Winkel liegt in der CaM/C20W-Struktur vorwiegend in trans-Konformation, in der CaM/M13-Struktur vorwiegend in gauche(+)-Konformation vor. Der  $\chi_3$ -Seitenkettenwinkels weist ebenfalls große Unterschiede in beiden Komplexen auf.

Ebenso zeigt die Seitenkettenkonformation von Met144 und Met145 große Unterschiede, aber in beiden Komplexen befindet sich die jeweilige  $\epsilon$ CH<sub>3</sub>-Gruppe in der Nähe des Tryptophanrings. Bei Met144 sind die Werte des  $\chi_3$ -Seitenkettenwinkels sehr unterschiedlich. Bei Met145 liegt der  $\chi_1$ -Winkel in der CaM/C20W-Struktur vorwiegend in trans-Konformation, in der CaM/M13-Struktur vorwiegend in gauche(+)-Konformation vor.

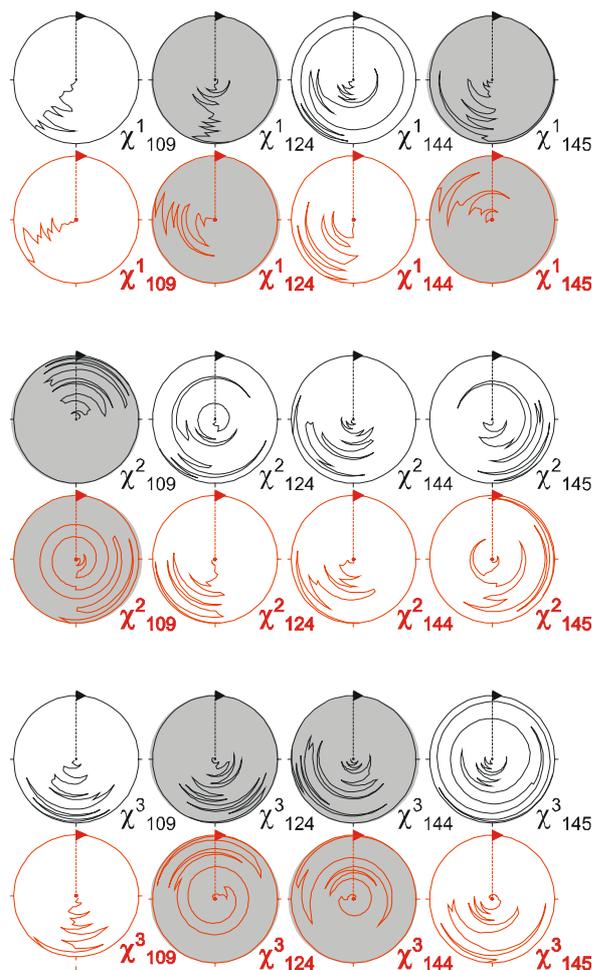


Abbildung 82: Zirkulare Varianzen der Seitenkettenwinkel  $\chi_1$ ,  $\chi_2$  und  $\chi_3$  der Methioninereste Met109, Met124, Met144 und Met145 in den 26 Strukturen des CaM/C20W-Komplex (schwarz) und in den 21 Strukturen des CaM/M13-Komplex (rot) (PDB ID 2BBN). Die gestrichelte Linie in den Kreisen entspricht 0°. 60° entspricht gauche(-), 180° trans- und 300° gauche(+)-Konformation. Bei signifikant unterschiedlichen Winkelstellungen sind die Kreise grau unterlegt.

Die beschriebenen konformationellen Unterschiede zeigen sich auch bei dem Vergleich der chemischen Verschiebungen der  $\epsilon\text{CH}_3$ -Gruppen der Methionine in den Komplexen CaM/C20W und CaM/M13. In Abbildung 83 sind die schematischen  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC-Spektren der  $\epsilon\text{CH}_3$ -Gruppen von beiden Komplexen übereinander gelegt. Die Methionine der C-terminalen Domäne zeigen große Verschiebungsdifferenzen zwischen den beiden Komplexen (durchgezogene Pfeile), die die unterschiedlichen Konformationen widerspiegeln. Die Methionine aus der N-terminalen Domäne zeigen ebenfalls große Verschiebungsdifferenzen (gestrichelte Pfeile), wobei die Resonanzen in dem CaM/C20W-Komplex eine geringe Dispersion der chemischen Verschiebungen, verglichen zu denen im CaM/M13-Komplex, zeigen, da hier keine Bindung des Peptids eingegangen wird. Die Werte liegen sehr nahe bei dem *random coil*-Wert. Im CaM/M13 zeigen die Methionine der N-terminalen Domäne aufgrund der Bindung des Peptids eine große Dispersion der chemischen Verschiebung.

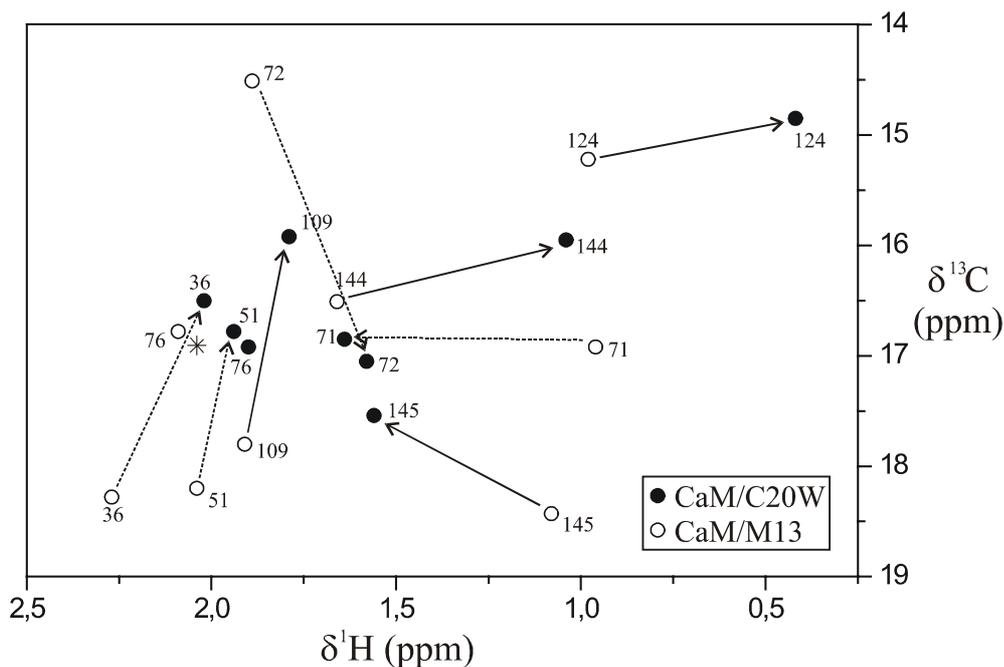


Abbildung 83: Schematische  $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HSQC Spektren der  $\epsilon\text{CH}_3$  Gruppen der Methioninreste in den Komplexen CaM/C20W und CaM/M13. Der random coil Wert für eine  $\epsilon\text{CH}_3$  Gruppe ist mit einem Stern markiert.

Durch Oxidationsexperimente an den Methioninresten von CaM wurde bereits 1987 auf die entscheidene Rolle von Met124 bei der Aktivierung der Calcumpumpe durch CaM hingewiesen (168). Offensichtlich spielt Met124 aber auch bei der Aktivierung anderer Zielenzyme eine wichtige Rolle. Durch die Experimente von Chin et al. (169) wurde die Wichtigkeit der Interaktion zwischen Met124 und dem Tryptophan der Bindungsregion der Calmodulin-abhängigen Kinase CaMKI (Trp303) für die Aktivierung dieser Kinase bestätigt, da die Punktmutation M124Q (Met124 wurde ausgetauscht gegen ein Gln) zu einem 60-fachen Anstieg in der Aktivierungskonstante von CaM führte.

#### 4.4 Die Domänen und der flexible Linker

Zwischen der N-terminalen und der C-terminalen Domäne des CaMs im Komplex mit C20W konnten keine NOE Kontakte gefunden werden (Kapitel 2.5). Daher ist die Orientierung der Domänen zueinander nicht festgelegt und in den 26 berechneten Strukturen finden sich große, zufällige Variationen in der Domänenorientierung. Dies zeigt sich deutlich, wenn eine Überlagerung über eine Domäne vorgenommen wird (Abbildung 84). Damit steht fest, daß die beiden Domäne auf einer Zeitskala, bei der NOE-Interaktionen beobachtet werden können, nicht miteinander in Wechselwirkung treten.

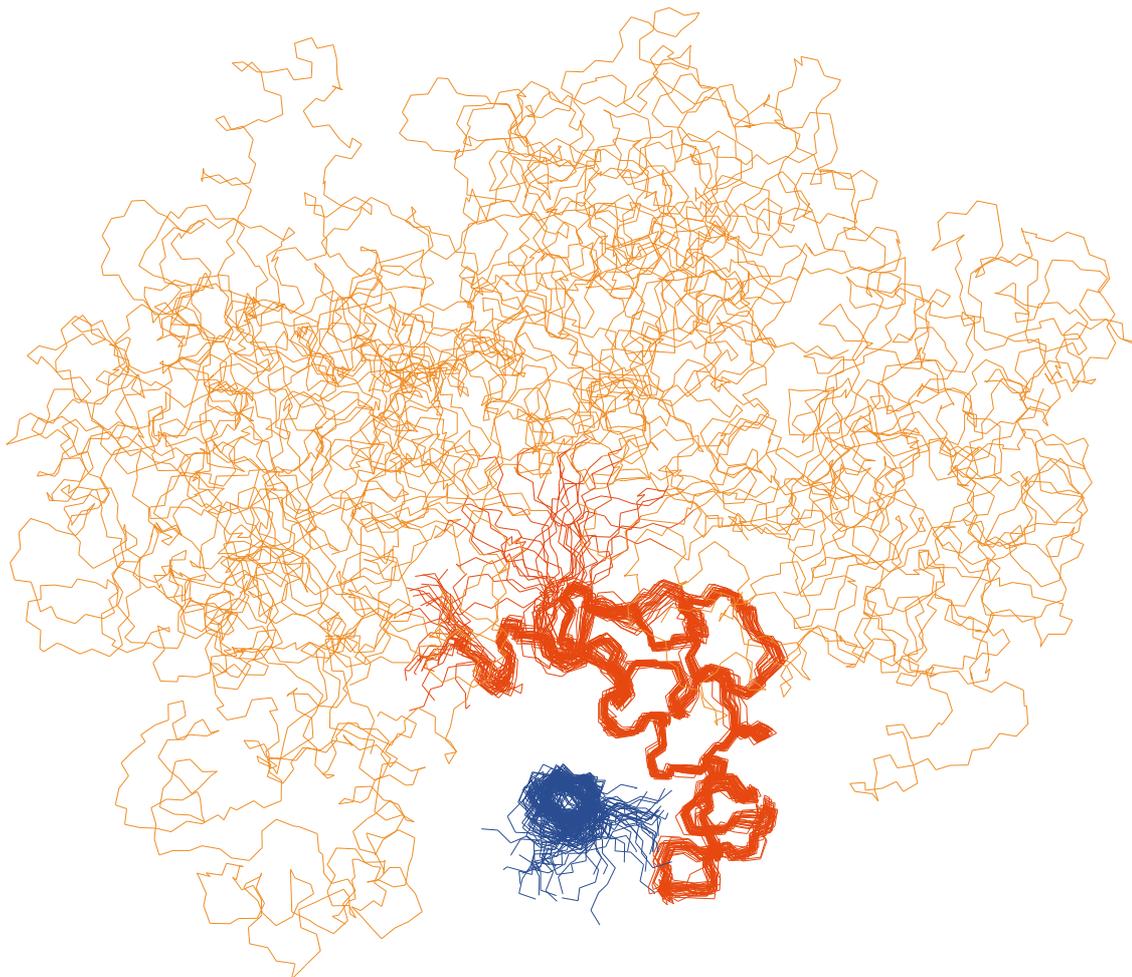


Abbildung 84: Überlagerung des Proteinrückgrats der 26 berechneten Strukturen über die C-terminale Domäne (Reste 85-145) und das Peptid C20W (Reste 4-16). Die N-terminale Domäne nimmt alle möglichen Orientierungen an, da zwischen den Domänen keine NOE-Kontakte gefunden wurden.

Zwischen den beiden Domäne gibt es eine flexible Linkerregion, die sich von Arg74 bis Glu84 erstreckt. Für diese Region gibt es keine NMR-spektroskopischen Hinweise auf Sekundärstruktur. Es finden sich keine mittelreichweitigen NOE's, die auf eine  $\alpha$ -helicale Struktur schließen ließen (Kapitel 2.6.2, Abbildung 53). Die Zuordnung der Resonanzen der Linkerregion war besonders schwierig, da die Signale in den NMR-Spektren besonders breit waren. Dies läßt sich mit einer erhöhten Flexibilität des Bereichs erklären.

Bei unkomplexiertem  $(\text{Ca}^{2+})_4$ -CaM gibt es ebenfalls eine flexible Linkerregion zwischen den beiden Domänen, deren erhöhte Flexibilität durch NMR-Daten, Austauschgeschwindigkeiten der Amidprotonen des Proteinrückgrats (30) und durch  $^{15}\text{N}$ -NMR-Relaxationsmessungen (29) nachgewiesen wurden. Die Linkerregion erstreckt sich allerdings nur über die Reste Lys77 bis Ser81 und ist damit kleiner als bei dem CaM/C20W-Komplex.

#### 4.4.1 Relaxationsmessungen

Die Flexibilität des CaM/C20W-Komplexes wurde von Dr. Holger Försterling im Rahmen seiner Tätigkeit im Arbeitskreis von Prof. Griesinger durch  $^{15}\text{N}$ -NMR-Relaxationsmessungen untersucht, wobei  $T_1$ ,  $T_2$  und  $\{^1\text{H}\}^{15}\text{N}$ -heteronukleare NOE-Daten gemessen und analysiert wurden.

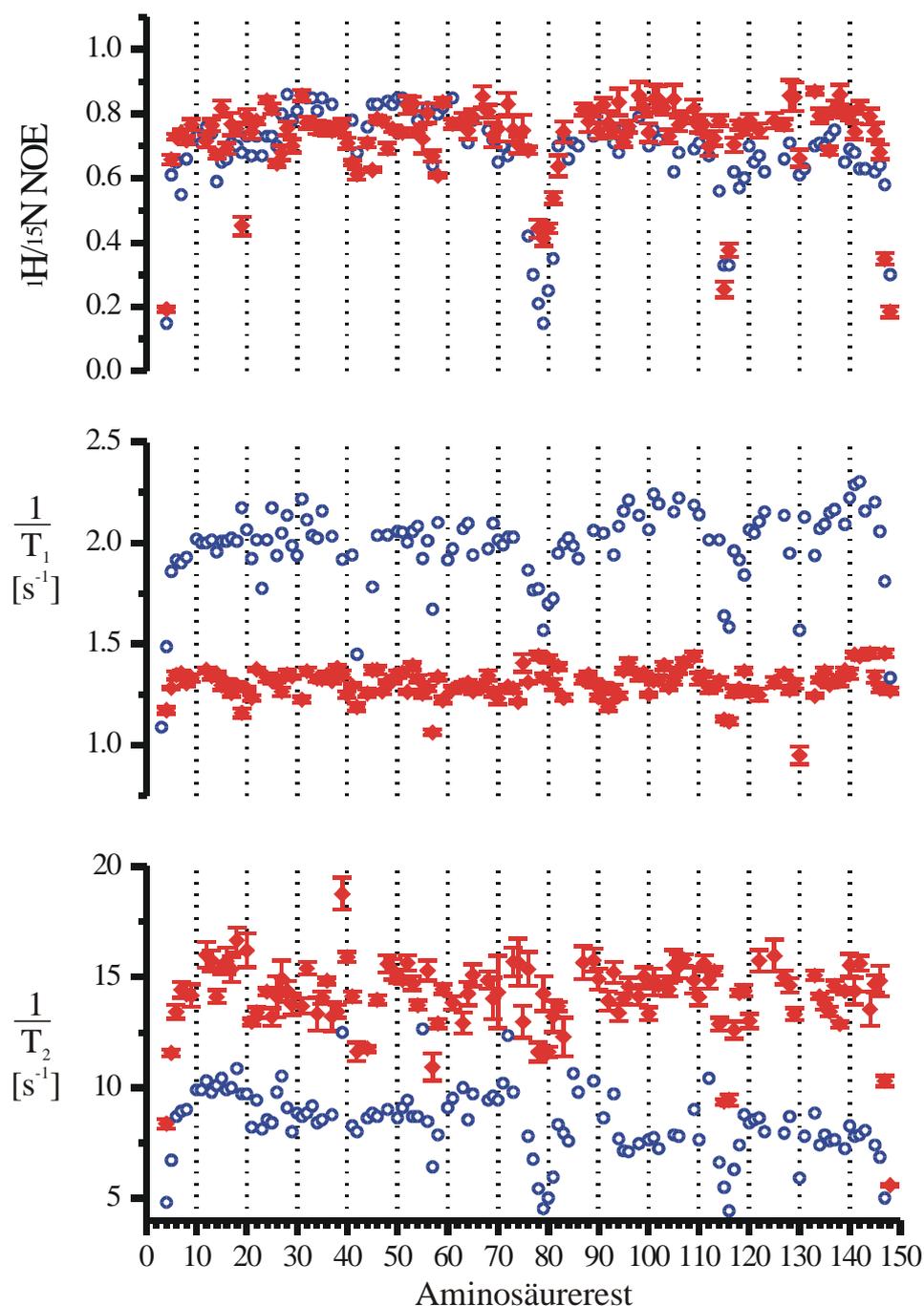


Abbildung 85: Heteronukleare  $\{^1\text{H}\}^{15}\text{N}$ -NOE,  $T_1$  und  $T_2$  Daten von unkomplexiertem  $(\text{Ca}^{2+})_4$ -CaM (blaue Kreise) (29) und von dem CaM/C20W-Komplex (rote Rauten).

Ein Vergleich der  $\{^1\text{H}\}^{15}\text{N}$ -heteronuklearen NOE,  $T_1$  und  $T_2$  Daten zwischen unkomplexiertem  $(\text{Ca}^{2+})_4\text{-CaM}$  (29) und dem CaM/C20W-Komplex ist in Abbildung 85 gezeigt. Obwohl die Messungen an den beiden CaM-Systemen bei unterschiedlicher Temperatur (CaM bei 308K; CaM/C20W bei 303K) und Viskosität der Lösung durchgeführt wurden und daher ein Vergleich der absoluten Werte schwierig ist, erkennt man für die Linkerregion Arg74 bis Glu84 im CaM/C20W-Komplex eine reduzierte Flexibilität, da hier die heteronuklearen NOE-Werte größer sind als im unkomplexierten  $(\text{Ca}^{2+})_4\text{-CaM}$ . Hingegen ist die Flexibilität der Reste Lys115 und Leu116, die sich in der *loop*-Region Gly113 bis Thr117 befinden, in beiden Systemen gleich groß.

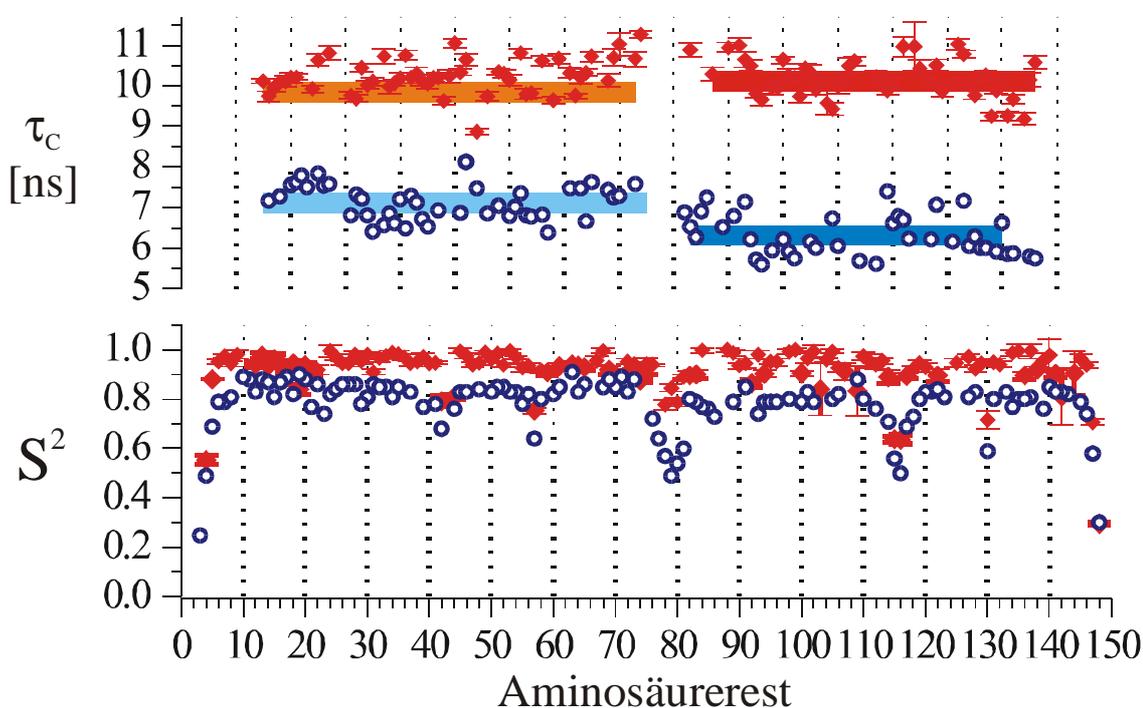


Abbildung 86: Rotationskorrelationszeit  $\tau_c$  und Ordnungsparameter  $S^2$  von unkomplexiertem  $(\text{Ca}^{2+})_4\text{-CaM}$  (blaue Kreise) (29) und von dem CaM/C20W-Komplex (rote Rauten).

Für unkomplexiertes  $(\text{Ca}^{2+})_4\text{-CaM}$  wurden für die beiden Domänen folgende Korrelationszeiten  $\tau_c$  gefunden, die eine unabhängige Bewegung der Domänen voneinander widerspiegeln:  $\tau_c^{\text{N-CaM}} = 7.12$  ns;  $\tau_c^{\text{C-CaM}} = 6.30$  ns (Abbildung 86, blaue Balken; Tabelle 7). Die sehr unterschiedlichen Werte (12% Unterschied) sind mit einer geringeren Größe von 8 Aminosäureresten der C-terminalen (Rest 82-147) gegenüber der N-terminalen Domäne (Rest 4-77) zu erklären (29).

Eine Analyse der gemessenen  $^{15}\text{N}$ -Relaxationsdaten des CaM/C20W-Komplexes mit dem Programm MODELFREE (170,171,172,173) führte zu Korrelationszeiten, die für beide Domänen ungefähr gleich groß sind (3% Unterschied):  $\tau_c^{\text{N-CaM}} = 9.8$  ns;  $\tau_c^{\text{C-CaM/C20W}} = 10.1$  ns (Abbildung 86, rote Balken; Tabelle 7). Dies läßt sich zum einen

durch die zunehmende Größe der C-terminalen Domäne durch das gebundene Peptid erklären. Zum anderen ist dies ein Hinweis darauf, daß sich die beiden Domänen nicht mehr völlig unabhängig voneinander bewegen.

Tabelle 7: Korrelationszeiten  $\tau_C$  der N- und C-terminalen Domäne von unkomplexiertem  $(Ca^{2+})_4$ -CaM (29) und von dem CaM/C20W-Komplex.

| $\tau_C$ [ns]      | N-terminale Domäne | C-terminale Domäne |
|--------------------|--------------------|--------------------|
| $(Ca^{2+})_4$ -CaM | 7.12               | 6.30               |
| CaM/C20W           | 9.8                | 10.1               |

Die Werte für den Ordnungsparameter  $S^2$  für die NH-Vektoren in dem CaM/C20W-Komplex sind vergleichbar zu den Werten in unkomplexiertem CaM (Abbildung 86), wobei aber auch hier eine reduzierte Flexibilität des Linkerbereichs in CaM/C20W verglichen zu unkomplexiertem CaM erkennbar ist.

#### 4.4.2 Vergleich mit den SAXS-Daten

Die Vorstellung, daß sich die Calmodulindomänen nicht völlig unabhängig voneinander bewegen, sondern in Korrelation treten, wäre im Einklang mit den SAXS-Daten, die für den CaM/C20W-Komplex eine Zwischenstellung zwischen der elongierten Struktur des unkomplexierten CaM und der globulären Struktur eines CaM/Peptid-Komplexes, bei dem beide Domänen das Peptid binden, finden (48). In Abbildung 87 ist die interatomare Längenverteilungsfunktion  $P(r)$  von unkomplexiertem CaM, von dem CaM/C20W-Komplex und dem CaM/C24W-Komplex gezeigt. Unkomplexiertes CaM zeigt dabei ein Maximum bei 20 Å, das die interatomaren Abstände innerhalb jeweils einer Domäne repräsentiert, und eine Schulter bei ungefähr 45 Å, die den Abstand zwischen den Domänen darstellt und damit die elongierte Hantelstruktur des CaMs bestätigt. Die maximale Länge liegt bei 63 Å. Der CaM/C20W-Komplex hat eine Verteilungsfunktion mit einem ähnlichen Aussehen, so daß auf eine Hantelstruktur geschlossen werden kann, aber die maximale Länge beträgt nur rund 58 Å. Damit sollte der CaM/C20W kompakter als unkomplexiertes CaM sein. Demgegenüber hat der Komplex aus CaM mit dem Peptid C24W, in dem beide Hauptankeraminosäuren vorhanden sind, eine völlig andere Verteilungsfunktion. Das Vorhandensein von nur einem Maximum ohne Schulter repräsentiert einen globulären Komplex, bei dem beide Calmodulindomänen das Peptid binden.

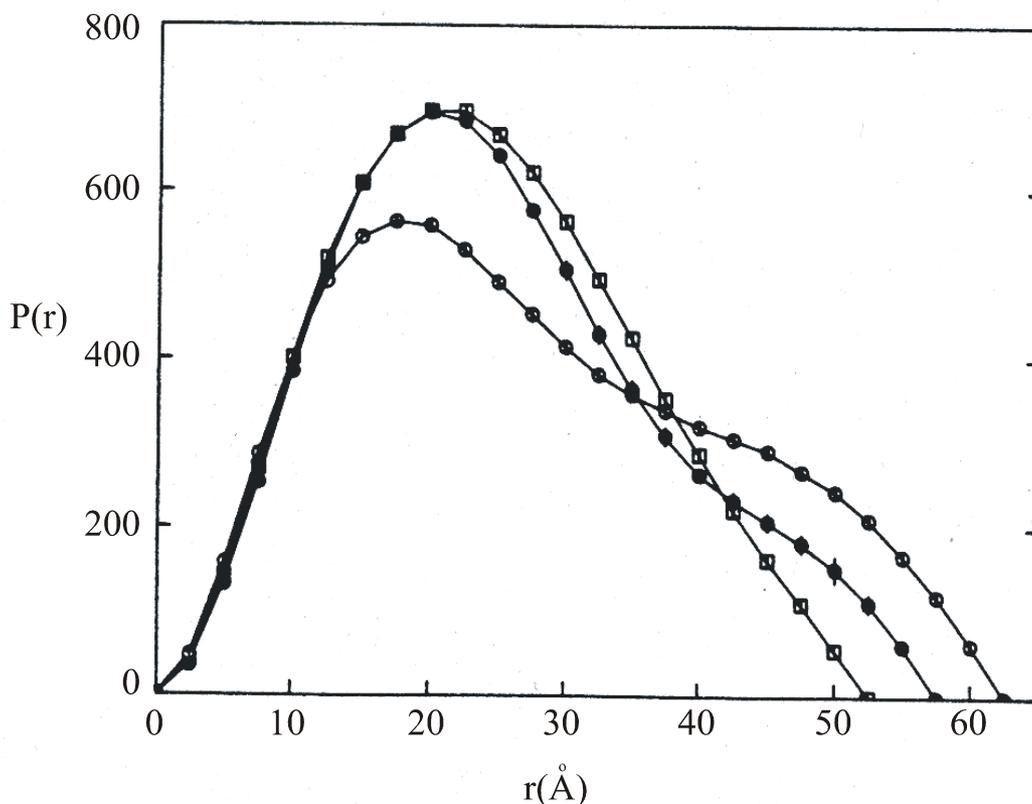


Abbildung 87: Interatomare Längenverteilungsfunktion  $P(r)$  von unkomplexiertem CaM (offene Kreise), von dem CaM/C20W-Komplex (ausgefüllte Kreise) und von dem CaM/C24W-Komplex (offene Quadrate), die anhand von SAXS-Experimenten erstellt wurden. Die Abbildung stammt von Kataoka et al. (48).

Um zu überprüfen, ob die berechneten 26 Strukturen des CaM/C20W-Komplexes die SAXS-Daten erfüllen, wurde mit Hilfe des Programms CALCROT (174) ausgehend von den Strukturen die interatomare Längenverteilungsfunktion  $P(r)$  berechnet. Das Ergebnis der Berechnung für den CaM/C20W-Komplex, wobei über die 26 Strukturen gemittelt wurde, ist in Abbildung 88 gezeigt. Zum besseren Vergleich wurden die Verteilungsfunktionen auch für unkomplexiertes CaM aus der Kristallstruktur (PDB ID 3CLN) und für den CaM/M13-Komplex berechnet, wobei hier die gemittelte NMR-Struktur verwendet wurde (PDB ID 2BBM). Für den CaM/C20W-Komplex findet man eine Kurve mit einem Maximum bei ca. 18 Å und einer Schulter bei ca. 40 Å, die der Funktion von unkomplexiertem CaM sehr ähnlich ist. Die maximale Länge des CaM/C20W-Komplexes ist jedoch mit ca. 75 Å größer als bei unkomplexiertem CaM mit ca. 68 Å. Diese größere maximale Länge kommt durch das zusätzlich gebundene Peptid zustande. Es findet sich also keine kompaktere Struktur als bei unkomplexiertem CaM. Dies war auch nicht zu erwarten, da in der NMR-Struktur des CaM/C20W-Komplexes keine NOE-Kontakte zwischen den Domänen gefunden werden und die Domäne daher in den berechneten Strukturen keine Bezug zueinander haben.

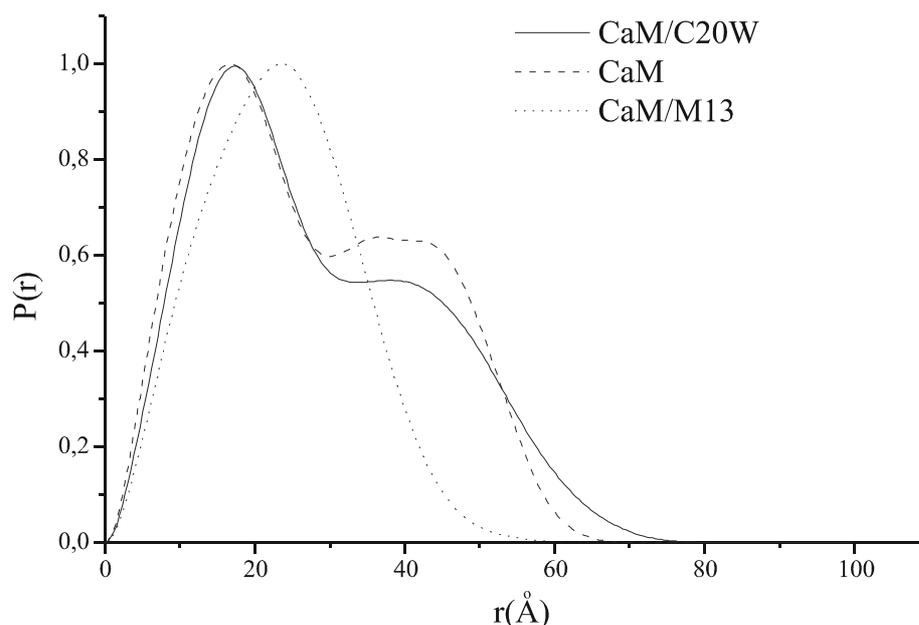


Abbildung 88: Berechnete interatomare Längenverteilungsfunktion  $P(r)$  von unkomplexiertem CaM (gestrichelte Linie), von dem CaM/C20W-Komplex (durchgezogene Linie) und von dem CaM/M13-Komplex (gepunktete Linie). Die Werte wurden anhand der Strukturdaten mit dem Programm CALCROT berechnet.

Um zu untersuchen, ob in Realität die Domänen des CaM/C20W-Komplexes eine Orientierung zueinander aufweisen oder nicht, müssen weitere Experimente durchgeführt werden, da durch NOE-Kontakte keine Orientierung beobachtet werden konnte. Hierfür wurden im Rahmen der Doktorarbeit von Ariane Tüchelmann Versuche unternommen, an einem CaM/C20W-Komplex, der am N-Terminus des Peptids einen paramagnetischen Marker (DTPA-Yb<sup>3+</sup>) trägt, dipolare Kopplungen und Pseudokontaktshifts zu messen, die langreichweitige Strukturinformationen liefern können. Durch die paramagnetische Suszeptibilitätsanisotropie des DTPA-Yb<sup>3+</sup>-Markers erfolgt eine partielle Orientierung des CaM/C20W-Komplexes, aufgrund derer man dipolare Kopplungen messen kann. Erste Ergebnisse dieser Versuche führten zur Berechnung von Orientierungstensoren für beide Domänen, wobei eine stärkere Orientierung der C-terminalen Domäne mit dem gebundenen Peptid gegenüber der flexibleren N-terminalen Domäne festgestellt wurde (175). Eine genaue Aussage über die relative Orientierung der Domänen gegeneinander war jedoch mit den vorhandenen Daten nicht möglich. Deshalb werden weitere Versuche im Rahmen der Doktorarbeit von Jens Meiler durchgeführt, wobei dipolare Kopplungen an dem CaM/C20W-DTPA-Komplex mit verschiedenen anderen Lanthanoiden (Eu<sup>3+</sup>, Dys<sup>3+</sup>, Pr<sup>3+</sup>) gemessen und ausgewertet werden (176).

## 4.5 Biologische Schlußfolgerungen aus den strukturellen Erkenntnissen

Durch die ermittelte Struktur des CaM/C20W-Komplexes läßt sich die Tatsache erklären, daß die Plasmamembran  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase bereits durch die C-terminale Hälfte von CaM aktiviert werden kann (Kapitel 1.7). Für die Aktivierung der Calciumpumpe ist es notwendig, daß sich durch die Bindung von CaM die Calmodulin-Bindungsdomäne ablöst und so die ATP-Bindungsstelle freigegeben wird. Bei allen anderen Calmodulin-Zielenzymen wird davon ausgegangen, daß die Calmodulin-Bindungsdomäne von CaM mit seinen beiden Domänen gebunden werden muß, um sich abzulösen und die ATP-Bindungsstelle freizugeben. Bei diesen Zielenzymen erfolgt bei der Zugabe von isolierten CaM-Fragmenten entweder nur eine Bindung und keine Aktivierung, oder es müssen die N-terminale und die C-terminale Hälfte gleichzeitig vorhanden sein, um eine Aktivierung zu erreichen. Bei der Calciumpumpe reicht aber offensichtlich schon die Bindung der C-terminale Domäne von CaM aus, um die Calmodulin-Bindungsdomäne abzulösen und die Calciumpumpe zu aktivieren. Es läßt sich daher postulieren, daß im autoinhibitorischen Zustand die hydrophoben Ankeraminosäuren Leu12 und Ile15 durch hydrophobe Kontakte die Calmodulin-Bindungsdomäne an die Calciumpumpe binden, die bei Zugabe von CaM an deren C-terminale Hälfte binden und somit die Calmodulin-Bindungsdomäne abgelöst werden kann. Die Hauptankeraminosäure Trp8 jedoch sollte keine hydrophoben Kontakte zur Calciumpumpe aufweisen, sondern frei zugänglich sein, damit die Bindung an die C-terminale Domäne von CaM initiiert werden kann. Dieses hypothetische Strukturmodell der CaM-Bindungsdomäne der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase wurde in Analogie zur der kürzlich ermittelten Kristallstruktur der Calmodulinkinase CaMKI in Abwesenheit von CaM (177) ermittelt, bei der das Tryptophan der CaM-Bindungsdomäne eine exponierte, dem Lösungsmittel freizugängliche Stellung einnimmt.

In Abbildung 89 wurde die Struktur der Calmodulin-Bindungsdomäne der CaMKI auf die Calciumpumpe übertragen und die entsprechenden Aminosäurereste modifiziert, wobei tatsächlich die hydrophoben Reste Leu12 und Ile15 in Kontakt zu der Calciumpumpe treten. Auch der Aminosäurerest Gly4 hält die Calmodulin-Bindungsdomäne fest an der Calciumpumpe, der ebenfalls in der CaM/C20W-Struktur an die C-terminale Domäne bindet und damit ebenfalls durch die Bindung an die C-terminale Domäne abgelöst wird. Bei der CaMKI hingegen können die hydrophoben Ankeraminosäurereste Phe12, Val17 und Met21, die die Calmodulin-Bindungsdomäne an die ATP-Bindungsdomäne binden, nur durch die Bindung an beide Calmodulin-domänen abgelöst werden, so daß für eine Aktivierung beide Domänen notwendig sind. In diesem Zusammenhang ist es interessant, daß die ATP-Bindungsdomäne der CaMKI eine hydrophobe Sequenz enthält, die große Ähnlichkeit zu einer Sequenz in der Nähe des katalytischen Zentrums der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase zeigt, die die Akzeptorstelle für die Calmodulin-Bindungsdomäne darstellt:  $\text{C}_{537}\text{ALLGFVT}_{544}$  (178).

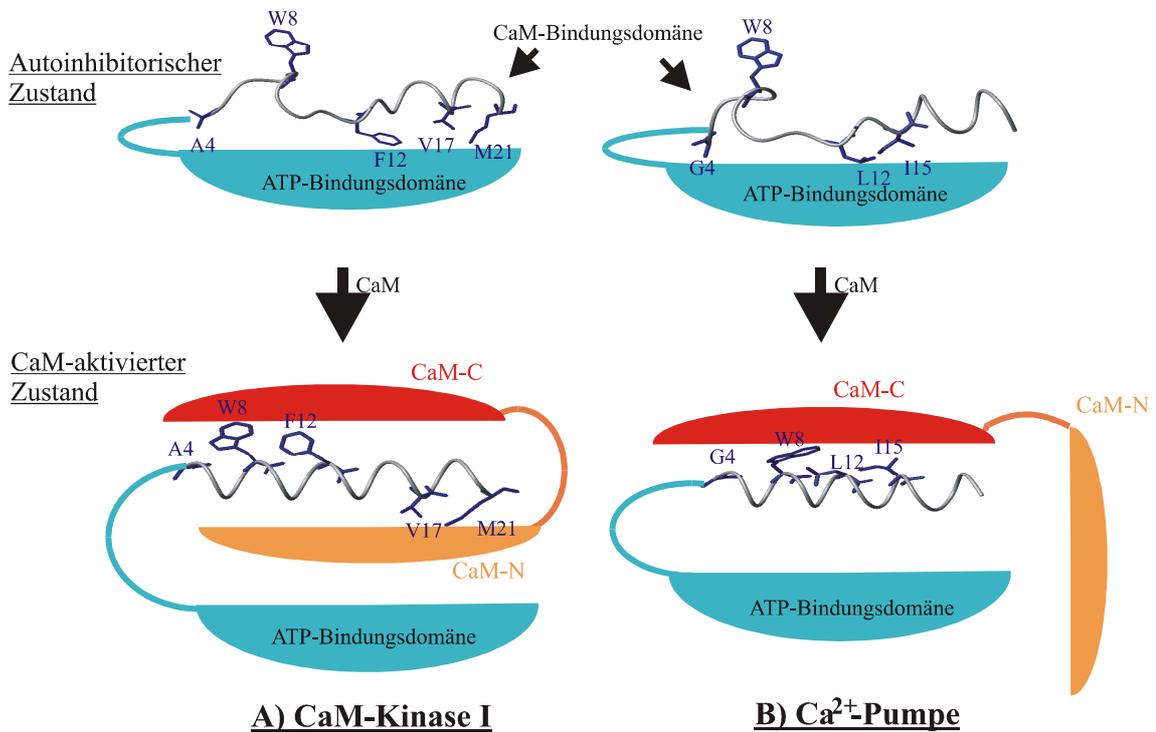


Abbildung 89: Schematische Darstellung der Aktivierung von (A) der Calmodulinkinase CaMKI und (B) der Calcumpumpe durch die Bindung von CaM. (A) In der Abwesenheit von CaM ist die CaM-Bindungsdomäne an die ATP-Bindungsdomäne der CaMKI gebunden, so daß ein autoinhibitorischer Zustand resultiert (oben). In der Kristallstruktur von diesem Zustand steht die Ankeramino-säure Trp 8 nach außen, so daß sie für eine erste Interaktion mit CaM gut zugänglich ist. Die CaM-Bindungsdomäne geht dabei unter großen strukturellen Veränderungen in eine  $\alpha$ -helicale Struktur über, die zur Ablösung der hydrophoben Aminosäuren Phe12, Val17 und Met21 führt, die dann von beiden CaM-Domänen gebunden werden und die ATP-Bindungsdomäne freigeben (unten). (B) Für den autoinhibitorischen Zustand der Ca<sup>2+</sup>-ATPase läßt sich ein analoges Strukturmodell postulieren (oben). Nach der einleitenden Wechselwirkung von Trp8 mit der C-terminalen CaM-Domäne erfolgt die Ablösung der hydrophoben Reste Leu12 und Ile15 und Bindung an die C-terminale Domäne, so daß eine Aktivierung der Calcumpumpe erfolgt (unten).

Ein Grund für diesen außergewöhnlichen Aktivierungsmechanismus könnte die Tatsache sein, daß die Calcumpumpe schon bei sehr niedrigen Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen aktiviert werden muß. Bei sehr niedrigen Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen treten (Ca<sup>2+</sup>)<sub>2</sub>-CaM-Komplexe auf, wobei die C-terminale Domäne von CaM eine höhere Affinität für Ca<sup>2+</sup>-Ionen hat als die N-terminale Domäne und innerhalb einer Domäne die Calciumbindung kooperativ erfolgt, so daß keine (Ca<sup>2+</sup>)<sub>1</sub>- oder (Ca<sup>2+</sup>)<sub>3</sub>-CaM-Komplexe vorliegen (179,19). Die C-terminale Domäne wird also zuerst mit zwei Ca<sup>2+</sup>-Ionen besetzt und kann dann bereits die Calcumpumpe aktivieren, da für die Aktivierung die N-terminale Domäne nicht notwendig ist. Diese Vorstellung stimmt mit der Beobachtung überein, daß die hoch-affine Bindung von C20W an CaM bereits bei einer Stöchiometrie von 2 Ca<sup>2+</sup>/CaM erfolgt, wobei die Ca<sup>2+</sup>-Konzentration von 200 nM vergleichbar mit der

cytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration einer ruhenden Zelle ist (180). Ein weiterer Befund, der für die Richtigkeit der getroffenen Aussage spricht, ist, daß intakte  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstellen in der C-terminalen Domäne von CaM essentiell für die Aktivierung der Calciumpumpe sind (181).

Da sich halbbeladenes  $(\text{Ca}^{2+})_2$ -CaM auch an andere Zielenzyme bindet, wurde durch Versuche an smMLCK belegt, wobei durch SAXS-Untersuchungen die Komplexbildung zwischen smMLCK und  $(\text{Ca}^{2+})_2$ -CaM nachgewiesen wurde. Es wird jedoch angenommen, daß für eine Aktivierung der smMLCK vollbeladenes  $(\text{Ca}^{2+})_4$ -CaM notwendig ist (182).

Die Interaktion der C-terminalen Domäne des CaMs mit der Calmodulin-Bindungsdomäne der Calciumpumpe ist also notwendig und ausreichend für die Aktivierung des Enzyms, jedoch wird die volle Kooperativität des Systems nicht erreicht. Der CaM/C20W-Komplex ist damit ein Schnappschuß des Systems auf dem Weg zu der vollständigen, globulären Struktur, bei der beide Domänen an die Calmodulin-Bindungsdomäne binden.

## 4.6 Literatur

---

162. Ikura, M., Kay, L.E., Krinks, M., and Bax, A. (1991) *Biochemistry* 30, 5498-5504.
163. Siivari, K., Zhang, M., Palmer III, A.G., Vogel, H.J (1995) *FEBS Letters* 366, 104-108.
164. Wilson, M. A., and Brunger, A.T. (2000) *J. Mol. Biol.* 301, 1237-1256.
165. Elshorst, B., Hennig, M., Försterling, H., Diener, A., Maurer, M., Schulte, P., Schwalbe, H., Griesinger, C., Krebs, J., Schmid, H., Vorherr, T., and Carafoli, E. (1999) *Biochemistry* 38, 12320-12332.
166. Case, D.A. (1995) *J. Biomol. NMR* 6, 341-346.
167. Konradi, R., Billeter, M., and Wüthrich, K. (1996) *J. Mol. Graphics* 14, 51-55.
168. Guerini, D., Krebs, J., and Carafoli, E. (1987) *Eur. J. Biochem.* 170, 35-42.
169. Chin, D., Winkler, K.E., and Means, A.R. (1977) *J. Biol. Chem.* 272, 31235-31240.
170. Lipari, G., and Szabo, A. (1982) *J. Am. Chem. Soc.* 104, 4546-4559.
171. Lipari, G., and Szabo, A. (1982) *J. Am. Chem. Soc.* 104, 4559-4570.
172. Palmer, A.G., Rance, M., and Wright, P.E. (1991) *J. Am. Chem. Soc.* 113, 4371-4380.
173. Mandel, A.M., Akke, M., and Palmer, A.G. (1995) *J. Mol. Biol.* 246, 144-163.
174. Lattman, E.E., Fiebig, K.M., and Dill, K.A. (1993) *Biochemistry* 33, 6158-6166.
175. Tüchelmann, A. (1999) *Dissertation*, Universität Frankfurt.
176. Meiler, J., *geplante Dissertation*, Universität Frankfurt
177. Goldberg, J., Nairn, A.C., and Kuriyan, J. (1996) *Cell* 84, 875-887.
178. Falchetto, R., Vorherr, T., and Carafoli, E. (1992) *Protein Sci.* 1, 1613-1621.
179. Klevit, R.E., Dalgarno, D.C., Levine, B.A., and Williams, R.J.P. (1984) *Eur. J. Biochem.* 139, 109-114.
180. Yazawa, M., Vorherr, T., James, P., Carafoli, E., and Yagi, K. (1992) *Biochemistry* 31, 3171-3176.
181. Gao, Z.H., Krebs, J., Van Berkum, M.F.A., Tang, W.-J., Maune, J.F., Gilman, A.G., Means, A.R., Stull, J.T., and Beckingham, K. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 20096-20104.
182. Krueger, J.K., Bishop, N.A., Blumenthal, D.K., Zhi, G., Beckingham, K., Stull, J.T., and Trewhella, J. (1998) *Biochemistry* 37, 17810-17817.

## 5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die dreidimensionale Struktur des CaM/C20W-Komplexes mit Hilfe von heteronuklearer, mehrdimensionaler NMR-Spektroskopie ermittelt. Der stabile CaM/C20W-Komplex mit einer Bindungskonstanten  $K_D = 11$  nM besteht aus dem Protein CaM und dem Peptid C20W. CaM, ein kleines, saures Protein (16,7 kDa), das in allen eukaryontischen Zellen vorkommt und hantelförmig mit zwei Domänen aufgebaut ist, übermittelt die Signalwirkung von Calciumionen an eine Reihe von Zielenzymen. Durch die Bindung von CaM an die Plasmamembran  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase wird das Calciumsignal wieder beendet. Das Peptid C20W entspricht dem N-terminalen Teil der Calmodulin-Bindungsdomäne der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. Röntgenkleinwinkelstreuungsexperimente an dem CaM/C20W-Komplex führten zu der Vermutung, daß das Peptid C20W nur an die C-terminale Domäne von CaM bindet und damit einen unterschiedlichen Bindungsmodus im Gegensatz zu den bekannten Calmodulin-bindenden Peptiden zeigt.

Zur Strukturbestimmung des CaM/C20W-Komplexes wurde eine Probe aus  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ -markiertem CaM und unmarkiertem C20W verwendet. Diese unterschiedliche Markierungsweise erlaubt die Unterscheidung beider Komponenten in den NMR-Spektren. Für CaM wurden eine Serie von heteronuklearen, dreidimensionalen Tripelresonanzexperimente aufgenommen, die zunächst die Zuordnung der Resonanzen des Proteinrückgrats und dann auch der der Seitenketten erlaubte. Spezielle NMR-Experimente wurden für die Zuordnung der neun Methionine durchgeführt, die bei der Bindung des Peptids eine wichtige Rolle spielen. Durch die Auswertung von NOESY Spektren wurden 1645 Abstands-*restraints* für CaM ermittelt, die sich in 794 intraresiduale, 387 sequentielle, 311 mittelreichweitige und 153 langreichweitige *restraints* aufteilen. Durch die Bestimmung der Temperaturkoeffizienten der Amidprotonen konnten 52 Wasserstoffbrücken von CaM zugeordnet werden. Durch doppeltgefilterte, homonukleare Korrelationsexperimente, bei denen die Protonenresonanzen von  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ -markiertem CaM unterdrückt werden, konnten die Resonanzen des unmarkierten Peptids C20W zugeordnet werden. Es wurden 163 NOE *restraints* ermittelt, wobei 102 intraresidual, 32 sequentiell und 29 mittelreichweitig waren. Schließlich konnten mit Hilfe eines halbgefilterten NOESY-Experiments 49 intermolekulare NOE's zwischen CaM und C20W zugeordnet werden. Außerdem wurden neben den Abstands-*restraints* für CaM 129 Dihedralwinkel-*restraints* ermittelt. Die gesamte Zuordnung des CaM/C20W-Komplexes wurde in der Datenbank BioMagResBank mit der Nummer 4284 abgelegt (<http://www.bmrb.wisc.edu/>).

Die experimentell gewonnenen *restraints* wurden in einer Moleküldynamik-Rechnung mit einem *simulated annealing*-Protokoll verwendet, wobei insgesamt 200 Strukturen berechnet wurden. Die 26 energieärmsten Strukturen wurden als repräsentativ ausgewählt und in der Brookhaven Protein Datenbank mit dem PDB ID-Code 1CFF abgelegt (<http://www.rcsb.org/>). Die 26 Strukturen weisen für die N-terminale Domäne einen RMSD-Wert von 0.75 Å über die Proteinrückgratome und für die C-terminale Domäne zusammen mit dem Peptid C20W einen RMSD-Wert von 0.53 Å über die Proteinrückgratome auf. Die hohe Konvergenz der Strukturen und gute Werte bei der Ramachandran-Statistik (73.7% in den erlaubten Bereichen) sprechen für eine gute Qualität der ermittelten Strukturen.

Die ermittelte Struktur des CaM/C20W-Komplexes zeigte einen neuartigen Bindungsmodus des Peptids. C20W bindet nur an die C-terminale Domäne von CaM, die N-terminale Domäne ist nicht in der Bindung involviert. Diese Struktur steht damit im Gegensatz zu den bisher bekannten CaM/Peptid-Komplexen, bei denen das Peptid von beiden Domänen gebunden wird und ein globulärer Komplex entsteht. Der Bindungsmodus des C20Ws wurde zum einen durch chemische Verschiebungsdifferenzen der Amidprotonen und der Methionine ermittelt. Zum anderen konnten ausgehend von C20W intermolekulare NOE's nur zur C-terminalen Domäne von CaM zugeordnet werden.

Die Sekundärstruktur von CaM ändert sich durch die Bindung des Peptids kaum. Beide Domänen, die zueinander homolog sind, bestehen aus vier  $\alpha$ -Helices und einem kurzen antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt. Verbunden sind beide Domänen durch einen flexiblen Linkerbereich, wobei die Domänen zueinander keine Orientierung zeigen, da keine NOE's zwischen den Domänen gefunden wurden.

Der ungewöhnliche Bindungsmodus des Peptids C20W steht im Einklang mit der Tatsache, daß die Plasmamembran  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase bereits durch die C-terminale Domäne von CaM aktiviert werden kann. Der CaM/C20W-Komplex läßt sich daher als Schnappschuß auf dem Weg der vollständigen Aktivierung der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase durch CaM verstehen.

Die Ergebnisse der NMR-spektroskopischen Untersuchung des CaM/C20W-Komplexes wurden in (1999) *Biochemistry* 38, 12320-12332 veröffentlicht. Die Publikation ist im Anhang (Kapitel 6.9) beigefügt.

Um die Orientierung der Domänen des CaM/C20W-Komplexes zueinander zu untersuchen, sind weiterführende Experimente geplant. Hierzu sollen Messungen an einem CaM/C20W-Komplex unternommen werden, der am N-Terminus des Peptids einen paramagnetischen Marker trägt, wobei dipolare Kopplungen und Pseudokontaktshifts ermittelt werden sollen. Weiterhin sind ähnliche Untersuchungen an einem CaM/C20W-Komplex geplant, der am N-Terminus von CaM einen paramagnetischen Marker trägt. Mit diesen Experimenten sollte es gelingen, die Frage der Domänenorientierung zu klären.

## 6 Anhang

### 6.1 Probenpräparation

#### 6.1.1 Expression von $^{13}\text{C}$ , $^{15}\text{N}$ -markiertem Calmodulin

Die Expression von  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ -markiertem, rekombinantem *Xenopus laevis* (183) CaM wurde von Dr. J. Krebs in der Arbeitsgruppe von Prof. E. Carafoli (ETH Zürich) durchgeführt. Dazu wurde der Expressionsvektor pTSNcol2 in *Escherichia coli* verwendet (184). Die Expression wurde induziert durch eine Temperaturveränderung, die Zellen wurden geerntet und lysiert. Die Isolierung von CaM erfolgte nach der Prozedur, die in (42) beschrieben ist.

#### 6.1.2 Synthese des Peptids C20W

Das unmarkierte Peptid C20W wurde mittels Festphasensynthese ebenfalls in der Arbeitsgruppe von Prof. E. Carafoli hergestellt, gereinigt und lyophilisiert. Die Synthese wurde bereits publiziert (185).

#### 6.1.3 Bildung des CaM/C20W-Komplexes

Zunächst wurde eine wässrige Peptidlösung mit einem pH-Wert von 6.5 hergestellt. Der Peptidgehalt wurde über die Absorption des Tryptophans bei 280 nm quantifiziert, wobei der Extinktionskoeffizient  $\epsilon^{280} = 5600 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  beträgt (186). Für die Präparation des Komplexes wurde eine CaM-Stammlösung vorgelegt, die die folgenden Konzentrationen enthielt: 3.8 mg/ml CaM, 5mM  $\text{CaCl}_2$ , 100mM KCl, 3%  $\text{NaN}_3$ , 10%  $\text{D}_2\text{O}$  pH-Wert 6.5. Nun wurde der 1,2 fache Überschuss an Peptidlösung in 200 $\mu\text{l}$  Portionen zu der Calmodulinlösung pipettiert, wobei dazwischen für eine kräftige Durchmischung der Lösung gesorgt wurde. Nach vollendeter Peptidzugabe wurde der pH-Wert nochmals kontrolliert und die Lösung bei Raumtemperatur über Nacht stehen gelassen. Mit Hilfe der Speedvac wurde nun die Lösung auf das ursprüngliche Volumen der Calmodulinlösung eingeeengt. Anschließend wurde die Lösung in ein Centricon mit einer 10000er-Membran überführt, das vorher zuerst mit 20%iger ethanolischer Lösung

und nachfolgend dreimal mit bidest. Wasser in der Zentrifuge durchgespült worden war. Nun wurde die Lösung bei 4°C und 4000 Umdrehungen/min in der Zentrifuge aufkonzentriert und anschließend in ein Shigemi-NMR-Röhrchen (Shigemi Inc., Allison Park, PA) eingefüllt. Die Konzentration an CaM/C20W betrug 1.7 mM in einem Endvolumen von 600 µl und einem pH-Wert von 6.5.

## 6.2 NMR-Experimente

Die folgende Tabelle faßt alle Aufnahme- und Prozessierungsparameter für die NMR-Experimente, die zur Strukturaufklärung des CaM/C20W-Komplexes verwendet wurden, zusammen. Die Experimente wurden an den Spektrometern DRX600 und DRX800 (Bruker Instruments, Rheinstetten) der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. C. Griesinger aufgenommen, die mit vier Frequenzkanälen und einem Tripelresonanz-Probenkopf mit xyz-Gradienten ausgerüstet sind. Alle Experimente wurden bei einer Temperatur von 303 K aufgenommen. Bei Experimenten mit  $^1\text{H}^{\text{N}}$ -Detektion wurden gepulste  $B_1$ -Feld-Gradienten verwendet, um einen Kohärenztransfer selektiv zur Kohärenzordnung (187,188,189) mit minimaler Wassersättigung (190) zu erhalten. Quadraturdetektion in allen indirekten  $^{13}\text{C}$  Dimensionen wurde mit States-TPPI-Phasenzzyklus (191) erreicht. Bei allen Experimenten wurde ein Relaxationsdelay von 1s verwendet. Die aufgenommenen Daten wurden mit Hilfe des Programms UXNMR (Bruker Instruments, Rheinstetten) mit *zero filling* und *linear prediction* prozessiert.

| Experiment   | Dimen-<br>sion | Kern            | Akquisi-<br>tion<br>(komplexe<br>Punkte) | Spektrale<br>Weite<br>(Hz) | Matrix<br>Dimen-<br>sion<br>(reale<br>Punkte) | Spektro-<br>meter | Probe                |
|--|----------------|-----------------|--|----------------------------|---|-------------------|----------------------|
| $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HSQC                                  | t1             | $^{15}\text{N}$ | 256                                      | 1825                       | 1024  | DRX 600           | $\text{H}_2\text{O}$ |
|  | t2             | $^1\text{H}$    | 2048                                     | 7937                       | 4096  |                   |                      |
| $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC                                  | t1             | $^{13}\text{C}$ | 256                                      | 8000                       | 1024  | DRX 800           | $\text{D}_2\text{O}$ |
|  | t2             | $^1\text{H}$    | 2048                                     | 8013                       | 4096  |                   |                      |
| NOESY- $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HSQC<br>(100 msec mixing time) | t1             | $^1\text{H}$    | 128                                      | 11111                      | 256   | DRX 800           | $\text{H}_2\text{O}$ |
|  | t2             | $^{15}\text{N}$ | 36                                       | 2433                       | 128   |                   |                      |
|  | t3             | $^1\text{H}$    | 1024                                     | 11161                      | 1024  |                   |                      |
| NOESY- $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC<br>(150 msec mixing time) | t1             | $^1\text{H}$    | 112                                      | 8000                       | 256   | DRX 800           | $\text{D}_2\text{O}$ |
|  | t2             | $^{13}\text{C}$ | 32                                       | 7680                       | 128   |                   |                      |
|  | t3             | $^1\text{H}$    | 1024                                     | 8013                       | 2048  |                   |                      |
| HNCO   | t1             | $^{13}\text{C}$ | 40                                       | 2000                       | 128   | DRX 600           | $\text{H}_2\text{O}$ |
|  | t2             | $^{15}\text{N}$ | 32                                       | 1824                       | 128   |                   |                      |
|  | t3             | $^1\text{H}$    | 1024                                     | 7937                       | 1024  |                   |                      |

|   |    |                 |      |       |      |         |                      |
|---|----|-----------------|------|-------|------|---------|----------------------|
| HNCA  | t1 | $^{13}\text{C}$ | 45   | 5000  | 128  | DRX 600 | $\text{H}_2\text{O}$ |
|   | t2 | $^{15}\text{N}$ | 32   | 1824  | 128  |         |                      |
|   | t3 | $^1\text{H}$    | 1024 | 7937  | 2048 |         |                      |
| CBCANH  | t1 | $^{13}\text{C}$ | 64   | 10000 | 256  | DRX 600 | $\text{H}_2\text{O}$ |
|   | t2 | $^{15}\text{N}$ | 25   | 1825  | 128  |         |                      |
|   | t3 | $^1\text{H}$    | 1024 | 7037  | 1024 |         |                      |
| CBCA(CO)NH  | t1 | $^{13}\text{C}$ | 64   | 10000 | 256  | DRX 600 | $\text{H}_2\text{O}$ |
|   | t2 | $^{15}\text{N}$ | 25   | 1825  | 128  |         |                      |
|   | t3 | $^1\text{H}$    | 1024 | 7937  | 1024 |         |                      |
| HBHA(CO)NH  | t1 | $^1\text{H}$    | 64   | 4000  | 256  | DRX 600 | $\text{H}_2\text{O}$ |
|   | t2 | $^{15}\text{N}$ | 25   | 1825  | 128  |         |                      |
|   | t3 | $^1\text{H}$    | 1024 | 7937  | 1024 |         |                      |
| H(CC)(CO)NH   | t1 | $^1\text{H}$    | 64   | 7937  | 256  | DRX 600 | $\text{H}_2\text{O}$ |
|   | t2 | $^{15}\text{N}$ | 32   | 1825  | 128  |         |                      |
|   | t3 | $^1\text{H}$    | 1024 | 7937  | 1024 |         |                      |
| (H)CC(CO)NH   | t1 | $^{13}\text{C}$ | 60   | 10000 | 256  | DRX 600 | $\text{H}_2\text{O}$ |
|   | t2 | $^{15}\text{N}$ | 32   | 1825  | 128  |         |                      |
|   | t3 | $^1\text{H}$    | 1024 | 7937  | 1024 |         |                      |
| HCCH-TOCSY  | t1 | $^1\text{H}$    | 96   | 6775  | 256  | DRX 600 | $\text{D}_2\text{O}$ |
|   | t2 | $^{13}\text{C}$ | 48   | 10638 | 128  |         |                      |
|   | t3 | $^1\text{H}$    | 1024 | 6775  | 2048 |         |                      |
| HNHA  | t1 | $^1\text{H}$    | 80   | 6193  | 256  | DRX 600 | $\text{H}_2\text{O}$ |
|   | t2 | $^{15}\text{N}$ | 32   | 1825  | 128  |         |                      |
|   | t3 | $^1\text{H}$    | 2048 | 7937  | 1024 |         |                      |
| (HB)CB(CCarom)H   | t1 | $^{13}\text{C}$ | 48   | 5000  | 256  | DRX 600 | $\text{H}_2\text{O}$ |
|   | t2 | $^1\text{H}$    | 2048 | 8091  | 2048 |         |                      |
| HMBC-HSQC   | t1 | $^{13}\text{C}$ | 64   | 10638 | 128  | DRX 600 | $\text{D}_2\text{O}$ |
|   | t2 | $^{13}\text{C}$ | 20   | 2660  | 128  |         |                      |
|   | t3 | $^1\text{H}$    | 512  | 6775  | 1024 |         |                      |
| LRCC  | t1 | $^{13}\text{C}$ | 48   | 14188 | 128  | DRX 800 | $\text{D}_2\text{O}$ |
|   | t2 | $^{13}\text{C}$ | 16   | 3547  | 64   |         |                      |
|   | t3 | $^1\text{H}$    | 1024 | 8013  | 2048 |         |                      |
| $^{15}\text{N}$ - $\{^{13}\text{C}_{\gamma}^{\text{arom}}\}$ spin-echo<br>difference $^1\text{H}$ , $^{15}\text{N}$ -CT-HSQC                | t1 | $^{15}\text{N}$ | 256  | 1825  | 1024 | DRX 600 | $\text{H}_2\text{O}$ |
|   | t2 | $^1\text{H}$    | 2048 | 7937  | 4096 |         |                      |
| $^{13}\text{C}'$ - $\{^{13}\text{C}_{\gamma}^{\text{arom}}\}$ spin-echo<br>difference $^1\text{H}$ , $^{15}\text{N}$ -CT-HSQC               | t1 | $^{15}\text{N}$ | 88   | 1825  | 256  | DRX 600 | $\text{H}_2\text{O}$ |
|   | t2 | $^1\text{H}$    | 2048 | 7937  | 4096 |         |                      |
| $^{12}\text{C}$ , $^{14}\text{N}$ -filtered NOESY<br>(100 ms mixing time)   | t1 | $^1\text{H}$    | 384  | 11161 | 1024 | DRX 800 | $\text{H}_2\text{O}$ |
|   | t2 | $^1\text{H}$    | 2048 | 11161 | 4096 |         |                      |
| $^{12}\text{C}$ , $^{14}\text{N}$ - $\omega$ 1-filtered<br>NOESY- $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}_{\text{ali}}$ -HSQC<br>(150 ms mixing time) | t1 | $^1\text{H}$    | 80   | 8000  | 256  | DRX 800 | $\text{D}_2\text{O}$ |
|   | t2 | $^{13}\text{C}$ | 32   | 15152 | 128  |         |                      |
|   | t3 | $^1\text{H}$    | 1024 | 8013  | 2048 |         |                      |

|  |    |                 |      |      |      |         |                      |
|--|----|-----------------|------|------|------|---------|----------------------|
| $^{12}\text{C}, ^{14}\text{N}$ - $\omega$ 1-filtered   | t1 | $^1\text{H}$    | 64   | 8000 | 256  | DRX 800 | $\text{D}_2\text{O}$ |
| NOESY- $^1\text{H}, ^{13}\text{C}_{\text{arom}}$ -HSQC | t2 | $^{13}\text{C}$ | 32   | 4630 | 128  |         |                      |
|  | t3 | $^1\text{H}$    | 1024 | 8013 | 2048 |         |                      |
| Serie von $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ HSQC bei         | t1 | $^{15}\text{N}$ | 128  | 1825 | 512  | DRX 600 | $\text{H}_2\text{O}$ |
| 301, 303, 305, 307, 309 K                              | t2 | $^1\text{H}$    | 2048 | 7937 | 4096 |         |                      |

### 6.3 Resonanzzuordnung des Calmodulin/C20W-Komplexes

Die Referenzierung der NMR-Spektren wurde wie folgt durchgeführt.  $^1\text{H}$  chemische Verschiebungen wurden auf das DSS-Signal (0.0 ppm) bei 303K referenziert. Die  $^{13}\text{C}$  und  $^{15}\text{N}$  chemischen Verschiebungen wurden mit den folgenden Werten auf die Frequenzen, die 0 ppm entsprechen, indirekt referenziert: 0.101329118 für  $^{15}\text{N}/^1\text{H}$  und 0.251449530 für  $^{13}\text{C}/^1\text{H}$  (192)

#### 6.3.1 $^1\text{H}, ^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ -Resonanzzuordnung des Calmodulins

| Rest | N ( $\text{H}^{\text{N}}$ ) | CO     | $\text{C}^{\alpha}$ ( $\text{H}^{\alpha}$ ) | $\text{C}^{\beta}$ ( $\text{H}^{\beta}$ ) | restliche Seitenkette  |
|------|-----------------------------|--------|---|---|--|
| A1   | . (.)                       | 175.94 | 52.14 (4.10)                                | 19.12 (1.15)                              |  |
| D2   | 123.04<br>(7.49)            | .      | 58.84 (3.78)                                | 40.06<br>(2.34,1.78)                      |  |
| Q3   | . (.)                       | .      | . (.)                                       | . (.,.)                                   | $\text{C}^{\gamma}$ , . (.,.); $\text{N}^{\epsilon 2}$ , * (.,.);  |
| L4   | 122.41<br>(8.17)            | 177.59 | 54.48 (4.66)                                | 43.30<br>(1.66,1.42)                      | $\text{C}^{\gamma}$ , 26.66 (1.66); $\text{C}^{\delta 1}$ , 23.54(*) $\text{C}^{\delta 2}$ , 23.54 (.);  |
| T5   | 112.36<br>(8.62)            | 175.32 | 60.35 (4.37)                                | 71.07 (4.59)                              | $\text{C}^{\gamma 2}$ , . (1.24);  |
| E6   | 119.83<br>(8.91)            | 179.41 | 60.04 (3.88)                                | 28.83<br>(1.95,1.95)                      | $\text{C}^{\gamma}$ , 36.28 (2.28,2.28);   |
| E7   | 118.84<br>(8.62)            | 179.12 | 59.91 (3.95)                                | 28.70<br>(1.93,1.93)                      | $\text{C}^{\gamma}$ , 36.80 (2.23,2.23);   |
| Q8   | 119.69<br>(7.63)            | 178.16 | 58.54 (3.77)                                | 28.75<br>(1.89,1.89)                      | $\text{C}^{\gamma}$ , 34.46 (2.24,2.24); $\text{N}^{\epsilon 2}$ , * (.,.);  |
| I9   | 118.89<br>(8.27)            | .      | 66.09 (3.61)                                | 37.56 (1.83)                              | $\text{C}^{\gamma 1}$ , 29.52 (1.72,1.72); $\text{C}^{\gamma 2}$ , 17.04 (1.00); $\text{C}^{\delta 1}$ , . (0.78);   |
| A10  | 120.48<br>(7.90)            | 179.16 | 55.33 (4.03)                                | 17.51 (1.43)                              |  |
| E11  | 118.41<br>(7.58)            | 180.43 | 58.86 (4.08)                                | 29.43<br>(1.95,1.95)                      | $\text{C}^{\gamma}$ , 35.76 (2.25,2.25);   |
| F12  | 119.49<br>(8.49)            | 178.64 | 59.08 (4.94)                                | 37.45<br>(3.38,3.38)                      | $\text{C}^{\delta 1}$ , 130.67 (7.03); $\text{C}^{\delta 2}$ , 130.67 (7.03); $\text{C}^{\epsilon 1}$ , . (7.11); $\text{C}^{\epsilon 2}$ , . (7.11); $\text{C}^{\zeta}$ , . (7.11); |

|     |                   |        |                      |                      |   |
|-----|-------------------|--------|----------------------|----------------------|---|
| K13 | 122.91<br>(9.10)  | .      | 60.00 (3.98)         | 31.51<br>(1.83,1.83) | $C^{\gamma}$ , 25.10 (0.94,0.94); $C^{\delta}$ , 28.74 (.,.); $C^{\epsilon}$ , 39.40 (.,.); $N^{\zeta}$ , . (.);                        |
| E14 | 119.74<br>(7.69)  | 179.43 | 59.31 (4.05)         | 28.78<br>(2.14,2.14) | $C^{\gamma}$ , 35.76 (2.32,2.32);   |
| A15 | 121.97<br>(7.90)  | 178.90 | 55.24 (4.18)         | 17.62 (1.87)         |   |
| F16 | 118.56<br>(8.71)  | 177.21 | 61.87 (3.12)         | 39.31<br>(2.83,3.13) | $C^{\delta 1}$ , . (6.52); $C^{\delta 2}$ , . (6.52); $C^{\epsilon 1}$ , . (7.08); $C^{\epsilon 2}$ , . (7.08); $C^{\zeta}$ , . (7.20); |
| S17 | 112.02<br>(7.84)  | 174.75 | 61.47 (3.97)         | 63.22<br>(3.97,3.97) |   |
| L18 | 120.22<br>(7.31)  | 177.84 | 57.08 (3.93)         | 41.22<br>(1.58,1.58) | $C^{\gamma}$ , . (1.37); $C^{\delta 1}$ , .(*) $C^{\delta 2}$ , . (0.73);   |
| F19 | 114.16<br>(7.15)  | 176.51 | 59.25 (4.10)         | 40.79<br>(2.57,2.57) | $C^{\delta 1}$ , . (7.18); $C^{\delta 2}$ , . (7.18); $C^{\epsilon 1}$ , . (7.25); $C^{\epsilon 2}$ , . (7.25); $C^{\zeta}$ , . (.);    |
| D20 | 116.80<br>(7.70)  | 177.05 | 52.25 (4.47)         | 38.76<br>(2.29,1.43) |   |
| K21 | 123.97<br>(7.59)  | .      | 58.48 (3.88)         | 32.24<br>(1.79,1.79) | $C^{\gamma}$ , 24.32 (1.42,1.42); $C^{\delta}$ , 27.96 (1.79,1.79); $C^{\epsilon}$ , 42.00 (2.92,2.92); $N^{\zeta}$ , . (.);            |
| D22 | 113.32<br>(8.00)  | 177.63 | 52.70 (4.49)         | 39.34<br>(2.95,2.54) |   |
| G23 | 108.68<br>(7.59)  | 175.00 | 47.14<br>(3.78,3.78) |                      |   |
| D24 | 120.11<br>(8.30)  | 177.36 | 53.59 (4.42)         | 40.16<br>(2.95,2.36) |   |
| G25 | 112.55<br>(10.53) | 173.52 | 45.29<br>(4.28,3.61) |                      |   |
| T26 | 112.24<br>(8.05)  | 172.71 | 59.78 (5.23)         | 72.45 (3.74)         | $C^{\gamma 2}$ , . (0.95);  |
| I27 | 126.30<br>(9.70)  | 175.95 | 60.35 (4.84)         | 39.40 (1.67)         | $C^{\gamma 1}$ , 26.40 (1.01,1.01); $C^{\gamma 2}$ , 15.25 (0.16); $C^{\delta 1}$ , . (0.75);   |
| T28 | 115.87<br>(8.37)  | 176.36 | 59.67 (4.66)         | 72.22 (4.66)         | $C^{\gamma 2}$ , . (1.20);  |
| T29 | 112.20<br>(8.98)  | 177.00 | 66.25 (3.71)         | 67.68 (4.11)         | $C^{\gamma 2}$ , . (1.17);  |
| K30 | 120.17<br>(7.57)  | 179.79 | 59.15 (4.05)         | 32.12<br>(1.75,1.75) | $C^{\gamma}$ , 24.58 (1.40,1.40); $C^{\delta}$ , 28.74 (.,.); $C^{\epsilon}$ , 41.74 (2.86,2.86); $N^{\zeta}$ , . (.);                  |
| E31 | 120.88<br>(7.57)  | 178.08 | 59.13 (3.98)         | 29.37<br>(2.42,2.42) | $C^{\gamma}$ , 37.84 (.,.);   |
| L32 | 119.06<br>(8.44)  | 178.85 | 58.81 (3.94)         | 42.24<br>(1.65,1.33) | $C^{\gamma}$ , 25.62 (.); $C^{\delta 1}$ , 23.28(*) $C^{\delta 2}$ , 23.28 (.);   |
| G33 | 104.94<br>(8.56)  | 175.03 | 48.22<br>(3.89,3.47) |                      |   |
| T34 | 117.46<br>(7.84)  | 177.05 | 66.79 (3.80)         | 68.58 (4.24)         | $C^{\gamma 2}$ , . (1.18);  |

|     |                  |        |                      |                      |   |
|-----|------------------|--------|----------------------|----------------------|---|
| V35 | 121.52<br>(7.56) | 179.11 | 66.26 (3.43)         | 31.02 (1.89)         | $C^{\gamma^1}$ , 22.50(*) $C^{\gamma^2}$ , 20.16 (0.61);  |
| M36 | 117.85<br>(8.38) | 179.12 | 59.18 (4.00)         | 31.14<br>(1.89,1.89) | $C^{\gamma}$ , 31.65 (2.23,2.23); $C^{\epsilon}$ , 16.50 (2.02);  |
| R37 | 118.14<br>(7.96) | 181.23 | 59.81 (.)            | 37.84 (.,.)          | $C^{\gamma}$ , 29.00 (.,.); $C^{\delta}$ , 43.30 (.,.); $C^{\zeta}$ , . $N^{\epsilon}$ , . (.); $N^{\eta^1}$ , .(*, *); $N^{\eta^2}$ , .(*, *); |
| S38 | 118.30<br>(7.83) | 174.73 | 61.36 (4.31)         | 62.72<br>(4.00,4.00) |   |
| L39 | 120.06<br>(7.28) | 177.32 | 54.39 (4.38)         | 41.35<br>(1.74,1.74) | $C^{\gamma}$ , 25.36 (1.74); $C^{\delta^1}$ , 21.98(*) $C^{\delta^2}$ , 21.98 (.);  |
| G40 | 106.06<br>(7.75) | .      | 45.42<br>(3.70,4.18) |                      |   |
| Q41 | 117.77<br>(7.70) | 173.97 | 54.41 (4.39)         | 30.19<br>(1.55,1.55) | $C^{\gamma}$ , 33.68 (2.10,2.10); $N^{\epsilon^2}$ , * (6.72,7.43);   |
| N42 | 115.76<br>(8.60) | .      | 51.16 (4.61)         | 38.91 (.,.)          | $N^{\delta^2}$ , 111.49 (6.61,7.42);  |
| P43 | .                | 177.59 | 62.02 (4.63)         | 31.60<br>(1.77,2.06) | $C^{\gamma}$ , 26.92 (.,.); $C^{\delta}$ , 43.30 (.,.);   |
| T44 | 112.35<br>(8.64) | 175.01 | 60.36 (4.36)         | 71.07 (4.64)         | $C^{\gamma^2}$ , . (1.25);  |
| E45 | 120.11<br>(8.71) | 178.86 | 60.06 (3.88)         | 28.62<br>(1.95,1.95) | $C^{\gamma}$ , 36.02 (2.24,2.24);   |
| A46 | 120.10<br>(8.15) | 180.15 | 54.84 (4.00)         | 17.69 (1.30)         |   |
| E47 | 118.06<br>(7.58) | 180.10 | 58.86 (3.94)         | 29.43<br>(2.23,1.79) | $C^{\gamma}$ , 37.06 (1.96,1.96);   |
| L48 | 119.71<br>(8.07) | 178.46 | 58.15 (3.95)         | 42.09<br>(1.96,1.16) | $C^{\gamma}$ , 26.40 (1.65); $C^{\delta^1}$ , 25.36(*) $C^{\delta^2}$ , 23.28 (.);  |
| Q49 | 117.57<br>(8.09) | 178.52 | 58.54 (3.74)         | 27.79<br>(2.06,2.06) | $C^{\gamma}$ , 33.68 (2.33,2.33); $N^{\epsilon^2}$ , * (.,.);   |
| D50 | 119.38<br>(7.99) | 178.63 | 57.57 (4.32)         | 40.07<br>(2.69,2.57) |   |
| M51 | 118.74<br>(7.76) | 178.83 | 59.34 (3.96)         | 32.55<br>(2.18,1.87) | $C^{\gamma}$ , 32.75 (2.44,2.65); $C^{\epsilon}$ , 16.78 (1.94);  |
| I52 | 117.68<br>(7.65) | 177.72 | 64.61 (3.44)         | 36.61 (1.86)         | $C^{\gamma^1}$ , 28.74 (1.55,1.55); $C^{\gamma^2}$ , 21.46 (0.97); $C^{\delta^1}$ , . (0.62);   |
| N53 | 117.10<br>(8.49) | 177.26 | 55.79 (4.31)         | 37.72<br>(2.82,2.89) | $N^{\delta^2}$ , 111.14 (6.83,7.73);  |
| E54 | 115.77<br>(7.47) | 177.45 | 58.62 (3.93)         | 29.96<br>(1.95,2.05) | $C^{\gamma}$ , 36.02 (2.30,2.30);   |
| V55 | 108.47<br>(7.10) | 175.66 | 60.67 (4.32)         | 32.12 (2.24)         | $C^{\gamma^1}$ , 21.72(*) $C^{\gamma^2}$ , 19.38 (0.79);  |
| D56 | 120.99<br>(7.60) | 176.04 | 53.73 (4.53)         | 39.83<br>(2.65,2.45) |   |

|     |                   |        |                      |                      |   |
|-----|-------------------|--------|----------------------|----------------------|---|
| A57 | 131.08<br>(8.31)  | 178.57 | 54.06 (4.12)         | 19.10 (1.43)         |   |
| D58 | 113.13<br>(8.07)  | 177.80 | 52.60 (4.55)         | 39.44<br>(2.94,2.56) |   |
| G59 | 107.75<br>(7.48)  | 174.80 | 47.02<br>(3.72,3.78) |                      |   |
| N60 | 117.90<br>(8.00)  | 176.71 | 52.51 (4.57)         | 37.45<br>(3.21,2.55) | $N^{\delta 2}$ , . (...);   |
| G61 | 112.68<br>(10.47) | 173.07 | 45.50<br>(4.12,3.39) |                      |   |
| T62 | 108.26<br>(7.58)  | 173.03 | 59.43 (4.66)         | 71.82 (3.91)         | $C^{l2}$ , . (1.01);  |
| I63 | 123.14<br>(8.80)  | 175.36 | 59.62 (5.08)         | 39.31 (1.97)         | $C^{yl}$ , 26.92 (1.46,1.46); $C^{l2}$ , 18.08 (1.16);<br>$C^{\delta 1}$ , . (0.69);  |
| D64 | 127.60<br>(8.74)  | 176.18 | 51.98 (5.30)         | 42.03<br>(2.96,2.71) |   |
| F65 | 118.22<br>(8.85)  | .      | 63.39 (3.90)         | 35.62<br>(2.03,2.73) | $C^{\delta 1}$ , 132.70 (6.61); $C^{\delta 2}$ , 132.70 (6.61); $C^{e1}$ ,<br>131.19 (7.06); $C^{e2}$ , 131.19 (7.06); $C^{\zeta}$ , .<br>(7.10); |
| P66 | .                 | 179.98 | 66.18 (3.76)         | 30.30<br>(2.51,2.51) | $C^y$ , 27.96 (...); $C^{\delta}$ , 40.44 (...);  |
| E67 | 116.96<br>(7.86)  | 178.80 | 58.61 (4.03)         | 29.20<br>(2.01,2.01) | $C^y$ , 36.54 (2.85,2.53);  |
| F68 | 123.00<br>(8.70)  | 176.84 | 61.13 (3.87)         | 39.88<br>(3.07,3.37) | $C^{\delta 1}$ , 132.46 (6.49); $C^{\delta 2}$ , 132.46 (6.49); $C^{e1}$ ,<br>131.87 (6.92); $C^{e2}$ , 131.87 (6.92); $C^{\zeta}$ , .<br>(7.08); |
| L69 | 118.50<br>(8.35)  | 179.04 | 58.14 (3.23)         | 40.61<br>(1.41,1.05) | $C^y$ , 25.10 (0.92); $C^{\delta 1}$ , 23.80(*) $C^{\delta 2}$ , 20.42<br>(.);  |
| T70 | 114.81<br>(7.45)  | .      | 66.35 (3.69)         | 68.32 (4.20)         | $C^{l2}$ , . (1.08);  |
| M71 | . (.)             | 178.02 | 58.64 (3.66)         | 30.93<br>(2.01,2.01) | $C^y$ , 31.65 (2.34,2.34); $C^e$ , 16.85 (1.64);  |
| M72 | 116.34<br>(7.94)  | 178.42 | 55.65 (3.89)         | 30.44<br>(1.00,1.00) | $C^y$ , 31.65 (...); $C^e$ , 17.05 (1.58);  |
| A73 | 121.42<br>(8.10)  | 179.72 | 54.77 (3.96)         | 17.67 (1.31)         |   |
| R74 | 116.22<br>(7.45)  | .      | 58.40 (3.98)         | 29.94<br>(1.73,1.56) | $C^y$ , . (1.32,1.32); $C^{\delta}$ , 40.96 (2.98,2.98); $C^{\zeta}$ , .<br>$N^e$ , . (.); $N^{\eta 1}$ , .(*, *); $N^{\eta 2}$ , .(*, *);        |
| K75 | 118.04<br>(7.55)  | .      | 57.08 (3.95)         | 32.12<br>(1.76,1.76) | $C^y$ , 24.58 (1.30,1.30); $C^{\delta}$ , . (...); $C^e$ , . (...);<br>$N^{\zeta}$ , . (.);   |
| M76 | 117.83<br>(7.74)  | .      | 56.56 (.)            | 32.38 (..)           | $C^y$ , 32.20 (...); $C^e$ , 16.92 (1.90);  |
| K77 | . (.)             | 176.35 | 56.56 (4.18)         | 32.64<br>(1.72,1.72) | $C^y$ , 24.32 (1.33,1.33); $C^{\delta}$ , 28.74 (1.53,1.53);<br>$C^e$ , 40.96 (2.86,2.86); $N^{\zeta}$ , . (.);                                   |

|      |                   |        |                      |                      |  |
|------|-------------------|--------|----------------------|----------------------|--|
| D78  | 120.87<br>(8.13)  | 176.46 | 54.82 (4.61)         | 40.87<br>(2.61,2.59) |  |
| T79  | 113.61<br>(7.95)  | 174.34 | 62.14 (4.20)         | 69.70 (4.20)         | $C^{\gamma^2}$ , . (1.09);   |
| D80  | 122.50<br>(8.31)  | 176.66 | 54.58 (4.61)         | 41.15<br>(2.63,2.63) |  |
| S81  | 116.59<br>(8.32)  | 175.30 | 59.34 (4.34)         | 63.53<br>(3.92,3.92) |  |
| E82  | 122.06<br>(8.40)  | 177.94 | 58.75 (4.03)         | 29.26<br>(2.03,2.03) | $C^{\gamma}$ , 36.28 (2.25,2.25);  |
| E83  | 118.99<br>(8.20)  | 175.54 | 59.42 (4.38)         | 29.23 (..)           | $C^{\gamma}$ , . (..);   |
| E84  | 119.05<br>(8.23)  | 175.52 | 55.22 (4.26)         | 29.29<br>(1.84,1.84) | $C^{\gamma}$ , 33.42 (2.26,2.26);  |
| I85  | . (.)             | .      | . (.)                | . (.)                | $C^{\gamma^1}$ , . (..); $C^{\gamma^2}$ , . (.); $C^{\delta^1}$ , . (.);   |
| R86  | . (.)             | .      | 58.64 (4.00)         | 28.86<br>(1.98,1.98) | $C^{\gamma}$ , . (..); $C^{\delta}$ , . (..); $C^{\zeta}$ , . $N^e$ , . (.); $N^{\eta^1}$ , . (*, *); $N^{\eta^2}$ , . (*, *);                       |
| E87  | 120.53<br>(7.89)  | 178.97 | 58.90 (4.03)         | 32.64<br>(1.81,1.81) | $C^{\gamma}$ , 39.40 (..);   |
| A88  | 118.36<br>(8.43)  | 178.91 | 55.23 (4.05)         | 17.58 (1.80)         |  |
| F89  | 118.04<br>(8.45)  | 176.22 | 62.36 (3.13)         | 38.75<br>(2.90,2.90) | $C^{\delta^1}$ , . (.); $C^{\delta^2}$ , . (.); $C^{e^1}$ , . (.); $C^{e^2}$ , . (.); $C^{\zeta}$ , . (.);   |
| R90  | 114.10<br>(7.61)  | 177.66 | 58.46 (3.79)         | 29.76<br>(1.86,1.86) | $C^{\gamma}$ , 27.44 (1.64,1.64); $C^{\delta}$ , 43.30 (3.14,3.14); $C^{\zeta}$ , . $N^e$ , . (.); $N^{\eta^1}$ , . (*, *); $N^{\eta^2}$ , . (*, *); |
| V91  | 117.98<br>(7.27)  | 176.69 | 65.63 (3.36)         | 30.76 (1.99)         | $C^{\gamma^1}$ , 22.24(*) $C^{\gamma^2}$ , 20.68 (0.90);   |
| F92  | 113.89<br>(6.92)  | 176.01 | 61.07 (4.14)         | 40.78<br>(2.74,2.44) | $C^{\delta^1}$ , . (7.12); $C^{\delta^2}$ , . (7.12); $C^{e^1}$ , . (.); $C^{e^2}$ , . (.); $C^{\zeta}$ , . (.);                                     |
| D93  | 114.00<br>(7.77)  | 177.71 | 51.68 (4.47)         | 37.93<br>(2.11,1.20) |  |
| K94  | 124.82<br>(7.53)  | 178.21 | 59.21 (3.77)         | 32.44<br>(1.69,1.69) | $C^{\gamma}$ , 23.54 (1.41,1.41); $C^{\delta}$ , 28.48 (..); $C^e$ , 40.18 (..); $N^{\zeta}$ , . (.);  |
| D95  | 113.65<br>(8.36)  | 177.81 | 52.99 (4.45)         | 39.48<br>(3.00,2.59) |  |
| G96  | 108.86<br>(7.78)  | 175.10 | 46.88<br>(3.76,3.76) |                      |  |
| N97  | 119.37<br>(8.30)  | 175.98 | 53.08 (4.57)         | 37.83<br>(3.32,2.60) | $N^{\delta^2}$ , . (..);   |
| G98  | 112.40<br>(10.66) | 172.68 | 44.79<br>(4.04,3.39) |                      |  |
| Y99  | 115.92<br>(7.62)  | 174.56 | 56.14 (4.91)         | 42.34<br>(2.48,2.41) | $C^{\delta^1}$ , 132.46 (6.65); $C^{\delta^2}$ , 132.46 (6.65); $C^{e^1}$ , 118.79 (6.79); $C^{e^2}$ , 118.79 (6.79); $C^{\zeta}$ , .                |
| I100 | 127.03<br>(10.03) | 175.50 | 61.23 (4.57)         | 39.14 (1.87)         | $C^{\gamma^1}$ , 26.14 (0.09,1.27); $C^{\gamma^2}$ , 17.56 (0.91); $C^{\delta^1}$ , . (0.47);  |

|      |                  |        |                      |                      |  |
|------|------------------|--------|----------------------|----------------------|--|
| S101 | 123.35<br>(8.87) | 174.96 | 55.61 (4.88)         | 66.62<br>(4.39,3.90) |  |
| A102 | 122.82<br>(9.27) | 179.20 | 55.75 (3.81)         | 17.57 (1.37)         |  |
| A103 | 117.89<br>(8.15) | 180.98 | 55.16 (3.96)         | 17.86 (1.35)         |  |
| E104 | 119.06<br>(7.67) | 179.02 | 59.24 (4.05)         | 28.79<br>(1.89,1.89) | $C^{\gamma}$ , 37.84 (2.28,2.28);  |
| L105 | 119.90<br>(8.57) | 178.50 | 58.32 (3.91)         | 42.33<br>(1.43,1.64) | $C^{\gamma}$ , 26.67 (1.24); $C^{\delta^1}$ , 25.88(*) $C^{\delta^2}$ , 24.58 (0.54);  |
| R106 | 116.32<br>(8.34) | 178.84 | 59.78 (3.64)         | 30.17<br>(1.84,1.84) | $C^{\gamma}$ , 27.44 (1.50,1.50); $C^{\delta}$ , 43.56 (3.14,3.14);<br>$C^{\zeta}$ , . $N^{\epsilon}$ , . (.); $N^{\eta^1}$ , .(*, *); $N^{\eta^2}$ , .(*, *); |
| H107 | 119.39<br>(7.84) | 177.74 | 59.81 (4.17)         | 30.44<br>(3.13,3.23) | $C^{\delta^2}$ , . (.); $C^{\epsilon^1}$ , . (.); $N^{\delta^1}$ , . (.); $N^{\epsilon^2}$ , .(*)  |
| V108 | 119.49<br>(8.91) | 178.48 | 66.86 (3.45)         | 31.86 (2.03)         | $C^{\gamma^1}$ , 23.54(*) $C^{\gamma^2}$ , 20.68 (1.18);   |
| M109 | 114.87<br>(8.45) | 178.87 | 57.55 (4.21)         | 29.82<br>(2.06,1.85) | $C^{\gamma}$ , 33.52 (2.51,2.60); $C^{\epsilon}$ , 15.92 (1.79);   |
| T110 | 114.90<br>(7.77) | 178.26 | 66.68 (3.93)         | 68.39 (4.21)         | $C^{\gamma^2}$ , . (1.12);   |
| N111 | 122.42<br>(7.83) | 176.63 | 56.01 (4.26)         | 37.99<br>(2.70,2.70) | $N^{\delta^2}$ , 110.94 (6.39,7.24);   |
| L112 | 117.91<br>(7.80) | 176.66 | 55.20 (4.23)         | 41.75<br>(1.83,1.49) | $C^{\gamma}$ , 26.14 (1.83); $C^{\delta^1}$ , 21.72(*) $C^{\delta^2}$ , 21.72 (.);   |
| G113 | 105.01<br>(7.61) | 173.99 | 44.90<br>(4.22,3.58) |                      |  |
| E114 | 120.42<br>(7.95) | 174.21 | 54.41 (4.26)         | 29.64<br>(1.52,1.52) | $C^{\gamma}$ , 34.72 (1.82,1.82);  |
| K115 | 123.70<br>(8.25) | 175.47 | 55.62 (4.19)         | 31.38<br>(1.60,1.60) | $C^{\gamma}$ , 24.32 (1.22,1.22); $C^{\delta}$ , 29.00 (.,.); $C^{\epsilon}$ ,<br>41.74 (.,.); $N^{\zeta}$ , . (.);  |
| L116 | 124.42<br>(7.98) | 178.13 | 53.79 (4.67)         | 44.41<br>(1.47,1.47) | $C^{\gamma}$ , 27.70 (0.62); $C^{\delta^1}$ , 26.92(*) $C^{\delta^2}$ , 26.92 (.);   |
| T117 | 113.41<br>(9.07) | 175.44 | 60.32 (4.40)         | 71.17 (4.68)         | $C^{\gamma^2}$ , . (1.20);   |
| D118 | 120.27<br>(8.75) | 178.59 | 57.79 (4.14)         | 39.45<br>(2.63,2.49) |  |
| E119 | 118.62<br>(8.40) | 179.03 | 59.47 (3.99)         | 28.79<br>(1.86,1.86) | $C^{\gamma}$ , 36.54 (2.25,2.25);  |
| E120 | 120.03<br>(7.53) | 179.35 | 59.43 (3.97)         | 29.91<br>(1.91,1.91) | $C^{\gamma}$ , 36.54 (2.26,2.26);  |
| V121 | 120.50<br>(7.79) | 177.92 | 64.61 (3.88)         | 36.98 (2.10)         | $C^{\gamma^1}$ , 18.60(*) $C^{\gamma^2}$ , 28.74 (1.04);   |
| D122 | 121.00<br>(8.32) | 179.13 | 60.02 (4.05)         | 29.51<br>(2.02,1.79) |  |

|      |                   |        |                      |                      |  |
|------|-------------------|--------|----------------------|----------------------|--|
| E123 | 117.41<br>(8.13)  | 178.50 | 59.42 (4.03)         | 29.00<br>(2.02,2.02) | $C^{\gamma}$ , 35.76 (2.27,2.27);  |
| M124 | 117.96<br>(8.02)  | 180.09 | 59.42 (.)            | 29.10<br>(2.04,2.04) | $C^{\gamma}$ , 33.85 (.,.); $C^{\epsilon}$ , 14.85 (0.42);   |
| I125 | 119.87<br>(7.99)  | 177.38 | 64.02 (3.63)         | 35.76 (2.13)         | $C^{\gamma^1}$ , 27.44 (1.50,1.31); $C^{\gamma^2}$ , 16.52 (0.67);<br>$C^{\delta^1}$ , . (0.67);   |
| R126 | 117.80<br>(8.56)  | 178.87 | 59.46 (3.94)         | 29.90<br>(1.80,1.80) | $C^{\gamma}$ , 27.70 (1.57,1.57); $C^{\delta}$ , 43.30 (3.22,3.22);<br>$C^{\zeta}$ , . $N^{\epsilon}$ , . (.); $N^{\eta^1}$ , . (*, *); $N^{\eta^2}$ , . (*, *); |
| E127 | 115.00<br>(7.78)  | 176.28 | 58.07 (3.93)         | 29.65<br>(2.06,2.06) | $C^{\gamma}$ , 35.24 (2.28,2.28);  |
| A128 | 115.78<br>(6.99)  | 177.68 | 51.43 (4.37)         | 21.73 (1.14)         |  |
| D129 | 116.91<br>(8.22)  | 175.73 | 54.16 (4.38)         | 39.88<br>(2.73,2.41) |  |
| I130 | 127.53<br>(8.29)  | 177.68 | 63.10 (3.87)         | 38.71 (1.87)         | $C^{\gamma^1}$ , 27.44 (1.59,1.59); $C^{\gamma^2}$ , 17.04 (1.16);<br>$C^{\delta^1}$ , . (0.80);   |
| D131 | 116.36<br>(8.23)  | 178.19 | 53.89 (4.42)         | 39.59<br>(2.98,2.57) |  |
| G132 | 107.94<br>(7.57)  | 175.12 | 47.32<br>(3.91,3.73) |                      |  |
| D133 | 120.09<br>(8.25)  | 177.48 | 53.54 (4.40)         | 39.91<br>(2.89,2.43) |  |
| G134 | 111.85<br>(10.05) | 172.58 | 45.70<br>(3.96,3.33) |                      |  |
| Q135 | 114.77<br>(7.95)  | 175.06 | 53.06 (4.93)         | 32.49<br>(1.93,1.71) | $C^{\gamma}$ , 32.49 (1.93,1.93); $N^{\epsilon^2}$ , * (5.90,6.44);  |
| V136 | 124.74<br>(9.04)  | 175.67 | 61.52 (5.10)         | 33.21 (2.28)         | $C^{\gamma^1}$ , 21.72(*) $C^{\gamma^2}$ , 21.72 (0.99);   |
| N137 | 128.58<br>(9.45)  | 174.69 | 50.88 (5.28)         | 38.21<br>(3.10,2.82) | $N^{\delta^2}$ , 110.67 (6.64,7.36);   |
| Y138 | 118.14<br>(8.23)  | 175.95 | 62.23 (3.14)         | 37.62<br>(2.29,1.94) | $C^{\delta^1}$ , 133.35 (6.14); $C^{\delta^2}$ , 133.35 (6.14); $C^{\epsilon^1}$ ,<br>118.61 (6.37); $C^{\epsilon^2}$ , 118.61 (6.37); $C^{\zeta}$ , .           |
| E139 | 117.83<br>(7.96)  | 180.25 | 60.11 (3.53)         | 28.55<br>(1.94,1.85) | $C^{\gamma}$ , 36.54 (2.22,2.22);  |
| E140 | 119.14<br>(8.58)  | 179.22 | 58.68 (3.78)         | 28.74<br>(1.90,1.90) | $C^{\gamma}$ , 36.80 (2.21,2.21);  |
| F141 | 123.22<br>(8.44)  | 176.42 | 61.90 (3.15)         | 39.96<br>(3.07,2.82) | $C^{\delta^1}$ , . (6.53); $C^{\delta^2}$ , . (6.53); $C^{\epsilon^1}$ , . (7.07); $C^{\epsilon^2}$ ,<br>. (7.07); $C^{\zeta}$ , . (.);                          |
| V142 | 118.25<br>(8.53)  | .      | 66.71 (3.00)         | 31.02 (1.63)         | $C^{\gamma^1}$ , .(*) $C^{\gamma^2}$ , . (0.62);   |
| Q143 | . (.)             | 177.76 | 58.64 (3.71)         | 27.70<br>(1.92,1.92) | $C^{\gamma}$ , 33.68 (2.28,2.28); $N^{\epsilon^2}$ , * (.,.);  |
| M144 | 117.53<br>(7.32)  | 177.43 | 57.20 (4.06)         | 30.77<br>(1.60,1.60) | $C^{\gamma}$ , 30.55 (.,.); $C^{\epsilon}$ , 15.95 (1.04);   |

|      |                  |        |              |                      |  |
|------|------------------|--------|--------------|----------------------|--|
| M145 | 113.50<br>(7.52) | 177.44 | 57.01 (4.05) | 31.11<br>(1.70,1.70) | $C^\gamma$ , 31.10 (.,.); $C^\epsilon$ , 17.54 (1.56);   |
| T146 | 108.32<br>(7.48) | 174.06 | 61.95 (4.22) | 70.08 (4.22)         | $C^{\gamma^2}$ , . (1.06);   |
| A147 | 125.84<br>(7.47) | 176.35 | 52.71 (4.23) | 18.58 (1.35)         |  |
| K148 | 125.09<br>(7.61) | .      | 57.45 (3.95) | 33.39<br>(1.51,1.51) | $C^\gamma$ , . (1.29,1.29); $C^\delta$ , . (1.64,1.64); $C^\epsilon$ , . (2.80,2.80); $N^\zeta$ , . (.); |

### 6.3.2 $^1\text{H}$ -Resonanzzuordnung des Peptides C20W

| Rest | $H^N$ | $H^\alpha$ | $H^\beta$ | restliche Seitenkette   |
|------|-------|------------|-----------|---|
| L1   | .     | .          | ...       | $H^\gamma$ ; $H^{\delta^1}$ ; $H^{\delta^2}$ ;  |
| R2   | .     | .          | ...       | $H^\gamma$ ...; $H^\delta$ ...;   |
| R3   | .     | .          | ...       | $H^\gamma$ ...; $H^\delta$ ...;   |
| G4   | 7.84  | 4.06,3.56  |           |   |
| Q5   | 8.00  | 4.03       | ...       | $H^\gamma$ 2.05,1.99; $H^{N\epsilon^2}$ 7.58,6.72;  |
| I6   | 7.70  | 3.73       | 1.84      | $H^{\gamma^1}$ 1.57,1.57; $H^{\gamma^2}$ 0.76; $H^{\delta^1}$ 0.57;   |
| L7   | 7.52  | 4.03       | 1.59,1.40 | $H^\gamma$ ; $H^{\delta^1}$ ; $H^{\delta^2}$ 0.59;  |
| W8   | 8.06  | 4.29       | 3.49,3.08 | $H^{\delta^1}$ 7.10; $H^{\epsilon^3}$ 7.04; $H^{\eta^2}$ 6.51; $H^{\zeta^2}$ 6.76; $H^{\zeta^3}$ 5.76; $H^{N\epsilon^1}$ 10.23; |
| F9   | 8.45  | 4.02       | 3.07,2.97 | $H^{\delta^1}$ 7.09; $H^{\delta^2}$ 7.09; $H^{\epsilon^1}$ 7.16; $H^{\epsilon^2}$ 7.16; $H^\zeta$ ;                             |
| R10  | 8.17  | 3.62       | 1.86,1.86 | $H^\gamma$ 1.74,1.74; $H^\delta$ ...;   |
| G11  | 8.59  | 4.06,3.64  |           |   |
| L12  | 8.58  | 4.39       | 1.71,1.71 | $H^\gamma$ 1.75; $H^{\delta^1}$ 0.79; $H^{\delta^2}$ 0.92;  |
| N13  | 8.21  | 4.39       | 2.77,2.67 | $H^{N\delta^2}$ 6.68,7.47;  |
| R14  | 7.87  | 4.05       | 2.02,1.81 | $H^\gamma$ 1.70,1.70; $H^\delta$ 3.63,3.55; $H^{N\epsilon}$ 7.45;   |
| I15  | 7.64  | 4.00       | 1.78      | $H^{\gamma^1}$ 1.64,1.55; $H^{\gamma^2}$ 1.21; $H^{\delta^1}$ 0.72;   |
| Q16  | 7.74  | 4.20       | 1.97,1.89 | $H^\gamma$ 2.25,2.22; $H^{N\epsilon^2}$ 6.61,7.28;  |
| T17  | 7.72  | 4.19       | 4.00      | $H^{\gamma^2}$ 0.73;  |
| Q18  | 8.01  | 3.56       | 1.89,1.89 | $H^\gamma$ 2.42,2.29; $H^{N\epsilon^2}$ 7.37,6.74;  |
| I19  | 7.60  | 4.15       | 1.99      | $H^{\gamma^1}$ ...; $H^{\gamma^2}$ ...; $H^{\delta^1}$ ...;   |
| K20  | .     | .          | ...       | $H^\gamma$ ...; $H^\delta$ ...; $H^\epsilon$ ...;   |

## 6.4 Resonanzzuordnung von CaM

Ikura, M., Kay, L.E., and Bax, A. (1990) *Biochemistry* 29, 4659-4667.

|     |       |      |       |  |       |           |       |       |       |       |       |           |       |       |       |       |       |           |
|-----|-------|------|-------|--|-------|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-----------|
| A1  |       | 51.9 | 174.0 |  | 4.15  | M51       | 119.3 | 59.5  | 178.8 | 7.84  | 4.09  | I100      | 127.3 | 60.5  | 175.8 | 10.15 | 4.87  |           |
| D2  | 120.5 | 54.7 | 175.8 |  | 4.67  | I52       | 118.0 | 65.0  | 177.9 | 7.74  | 3.57  | S101      | 123.8 | 56.0  | 175.5 | 9.01  | 4.90  |           |
| Q3  | 119.6 | 55.7 | 175.8 |  | 8.24  | 4.42      | N53   | 117.5 | 56.0  | 177.5 | 8.47  | 4.42      | A102  | 123.0 | 56.1  | 179.4 | 9.16  | 3.97      |
| L4  | 122.8 | 54.6 | 177.7 |  | 8.16  | 4.70      | E54   | 116.4 | 59.0  | 177.8 | 7.58  | 4.09      | A103  | 118.1 | 55.3  | 181.3 | 8.15  | 4.08      |
| T5  | 112.9 | 60.7 | 175.8 |  | 8.56  | 4.52      | V55   | 108.9 | 61.1  | 176.0 | 7.22  | 4.47      | E104  | 119.4 | 59.4  | 179.9 | 7.79  | 4.09      |
| E6  | 120.5 | 60.2 | 179.4 |  | 8.93  | 4.03      | D56   | 121.6 | 54.0  | 176.4 | 7.72  | 4.67      | L105  | 120.8 | 58.5  | 178.7 | 8.53  | 4.16      |
| E7  | 119.3 | 60.0 | 179.1 |  | 8.63  | 4.12      | A57   | 131.7 | 54.3  | 178.8 | 8.47  | 4.25      | R106  | 117.3 | 60.0  | 178.8 | 8.51  | 3.85      |
| Q8  | 119.8 | 58.7 | 178.3 |  | 7.67  | 3.93      | D58   | 113.9 | 52.8  | 178.1 | 8.18  | 4.67      | H107  | 118.6 | 59.5  | 177.4 | 7.91  | 4.38      |
| I9  | 119.4 | 66.1 | 177.9 |  | 8.31  | 3.77      | G59   | 108.2 | 47.4  | 175.2 | 7.55  | 3.95/3.85 | V108  | 118.7 | 66.2  | 178.1 | 7.93  | 3.56      |
| A10 | 121.3 | 55.6 | 180.9 |  | 7.97  | 4.15      | N60   | 118.4 | 52.7  | 177.0 | 8.07  | 4.67      | M109  | 116.5 | 57.8  | 178.7 | 8.18  | 4.37      |
| E11 | 119.1 | 55.4 | 180.2 |  | 7.78  | 4.17      | G61   | 113.3 | 45.8  | 173.6 | 10.51 | 4.22/3.55 | T110  | 114.4 | 65.8  | 177.6 | 8.10  | 4.22      |
| F12 | 119.6 | 59.5 | 178.8 |  | 8.52  | 5.01      | T62   | 109.0 | 59.7  | 173.5 | 7.68  | 4.79      | N111  | 121.9 | 55.7  | 176.5 | 7.85  | 4.54      |
| K13 | 123.1 | 60.3 | 179.4 |  | 9.09  | 4.06      | I63   | 124.0 | 60.0  | 175.6 | 8.90  | 5.19      | L112  | 118.7 | 55.6  | 177.5 | 7.78  | 4.37      |
| E14 | 120.2 | 59.5 | 179.5 |  | 7.82  | 4.20      | D64   | 128.3 | 52.4  | 176.7 | 8.87  | 5.39      | G113  | 106.3 | 45.6  | 174.6 | 7.79  | 4.27/3.78 |
| A15 | 122.2 | 55.4 | 179.0 |  | 8.01  | 4.28      | F65   | 119.0 | 63.7  | 173.8 | 8.90  | 4.04      | E114  | 120.3 | 55.5  | 175.8 | 7.90  | 4.46      |
| F16 | 119.0 | 62.1 | 177.4 |  | 8.73  | 3.31      | P66   | 117.2 | 66.7  | 180.1 |       | 3.95      | K115  | 123.5 | 55.8  | 175.7 | 8.41  | 4.41      |
| S17 | 112.4 | 61.6 | 175.2 |  | 7.90  | 4.18      | E67   | 117.4 | 58.8  | 178.8 |       | 7.80      | L116  | 124.2 | 54.4  | 178.0 | 7.92  | 4.78      |
| L18 | 120.8 | 57.3 | 178.0 |  | 7.45  | 4.04      | F68   | 123.3 | 61.3  | 177.1 | 8.76  | 4.00      | T117  | 114.0 | 60.8  | 175.6 | 8.91  | 4.52      |
| F19 | 115.0 | 59.3 | 176.6 |  | 7.29  | 4.29      | L69   | 118.8 | 58.1  | 179.1 | 8.31  | 3.39      | D118  | 122.5 | 58.5  | 177.9 | 8.44  | 4.22      |
| D20 | 117.5 | 52.5 | 177.3 |  | 7.74  | 4.52      | T70   | 114.9 | 66.5  | 176.2 | 7.47  | 3.83      | E119  | 119.8 | 59.5  | 178.6 | 8.27  | 4.11      |
| K21 | 124.4 | 58.6 | 178.3 |  | 7.66  | 4.01      | M71   | 121.4 | 59.0  | 178.1 | 7.75  | 3.84      | E120  | 118.7 | 59.5  | 179.9 | 8.15  | 4.19      |
| D22 | 114.0 | 53.0 | 177.9 |  | 8.10  | 4.62      | M72   | 116.4 | 56.0  | 178.4 | 7.98  | 4.06      | V121  | 120.8 | 67.0  | 177.4 | 8.02  | 3.68      |
| G23 | 109.1 | 47.4 | 175.4 |  | 7.65  | 3.94/3.94 | A73   | 121.8 | 54.5  | 179.6 | 8.08  | 4.13      | D122  | 119.6 | 57.8  | 179.2 | 8.02  | 3.38      |
| D24 | 120.8 | 53.8 | 177.7 |  | 8.37  | 4.54      | R74   | 116.5 | 58.1  | 177.8 | 7.52  | 4.15      | E123  | 119.2 | 59.2  | 178.1 | 7.89  | 4.05      |
| G25 | 113.1 | 45.6 | 174.0 |  | 10.57 | 4.38/3.74 | K75   | 118.7 | 57.1  | 177.6 | 7.71  | 4.28      | M124  | 119.4 | 59.5  | 179.1 | 7.80  | 4.06      |
| T26 | 112.9 | 60.1 | 173.2 |  | 8.14  | 5.31      | M76   | 118.4 | 56.5  | 176.5 | 7.85  | 4.42      | I125  | 118.2 | 64.2  | 177.3 | 7.92  | 3.55      |
| I27 | 127.1 | 60.5 | 176.3 |  | 9.71  | 5.00      | K77   | 120.3 | 60.2  | 176.5 | 7.81  | 4.37      | R126  | 118.4 | 59.9  | 179.3 | 8.13  | 4.05      |
| T28 | 116.6 | 59.8 | 176.8 |  | 8.53  | 4.86      | D78   | 121.4 | 54.6  | 176.7 | 8.21  | 4.74      | E127  | 115.8 | 58.5  | 177.4 | 7.87  | 4.05      |
| T29 | 112.8 | 66.8 | 177.2 |  | 8.99  | 3.83      | T79   | 114.0 | 62.3  | 174.7 | 8.01  | 4.37      | A128  | 119.1 | 52.3  | 177.8 | 7.37  | 4.45      |
| K30 | 120.4 | 59.3 | 179.9 |  | 7.65  | 4.22      | D80   | 122.8 | 54.8  | 176.9 | 8.35  | 4.75      | N129  | 117.3 | 54.2  | 176.4 | 7.83  | 4.57      |
| E31 | 121.3 | 59.4 | 179.2 |  | 7.60  | 4.10      | S81   | 116.7 | 59.9  | 175.7 | 8.30  | 4.50      | I130  | 127.4 | 63.2  | 178.0 | 8.50  | 4.03      |
| L32 | 120.4 | 58.2 | 179.1 |  | 8.64  | 4.13      | E82   | 120.9 | 58.2  | 178.7 | 8.76  | 4.26      | D131  | 117.1 | 53.8  | 178.5 | 8.27  | 4.61      |
| G33 | 105.3 | 48.4 | 175.5 |  | 8.59  | 4.00/3.62 | E83   | 118.8 | 60.0  | 179.2 | 8.63  | 4.13      | G132  | 108.3 | 47.6  | 175.5 | 7.57  | 4.01/3.85 |
| T34 | 117.8 | 67.0 | 177.2 |  | 7.85  | 3.99      | E84   | 120.2 | 59.3  | 179.4 | 7.68  | 4.06      | D133  | 120.6 | 53.8  | 177.8 | 8.34  | 4.51      |
| V35 | 122.2 | 66.5 | 179.1 |  | 7.64  | 3.50      | I85   | 121.3 | 64.5  | 178.0 | 7.93  | 4.07      | G134  | 112.8 | 46.0  | 173.2 | 10.27 | 4.07/3.47 |
| M36 | 117.9 | 59.1 | 179.2 |  | 8.38  | 4.16      | R86   | 121.6 | 60.2  | 179.3 | 8.32  | 4.20      | Q135  | 115.4 | 53.3  | 175.0 | 7.96  | 4.88      |
| R37 | 118.9 | 59.2 | 181.1 |  | 8.38  | 4.81      | E87   | 118.4 | 59.1  | 178.7 | 8.07  | 4.18      | V136  | 125.2 | 61.8  | 176.1 | 9.12  | 5.24      |
| S38 | 118.4 | 61.8 | 174.9 |  | 7.93  | 4.42      | A88   | 121.8 | 55.2  | 179.2 | 7.93  | 4.23      | N137  | 129.0 | 51.4  | 175.2 | 9.62  | 5.28      |
| L39 | 120.1 | 54.7 | 177.6 |  | 7.38  | 4.52      | F89   | 118.5 | 62.2  | 176.7 | 8.47  | 3.23      | Y138  | 118.2 | 62.9  | 176.3 | 8.36  | 3.50      |
| G40 | 106.4 | 45.7 | 174.7 |  | 7.82  | 4.24/3.81 | R90   | 115.4 | 58.9  | 178.3 | 7.64  | 3.94      | E139  | 118.2 | 60.5  | 180.5 | 8.00  | 3.72      |
| Q41 | 118.4 | 54.6 | 174.4 |  | 7.82  | 4.53      | V91   | 118.1 | 65.7  | 177.4 | 7.52  | 3.56      | E140  | 120.1 | 58.7  | 179.2 | 8.73  | 4.08      |
| N42 | 116.5 | 51.4 | 172.3 |  | 8.59  | 5.20      | F92   | 116.4 | 60.0  | 177.0 | 7.47  | 4.25      | F141  | 124.0 | 61.6  | 177.0 | 8.86  | 4.05      |
| P43 | 115.6 | 62.7 | 177.9 |  |       | 4.80      | D93   | 116.9 | 52.4  | 177.6 | 7.74  | 4.59      | V142  | 119.4 | 67.2  | 179.6 | 8.48  | 3.21      |
| T44 | 112.6 | 60.7 | 175.4 |  | 8.60  | 4.50      | K94   | 125.8 | 59.0  | 178.4 | 7.66  | 3.97      | T143  | 116.5 | 66.7  | 176.1 | 7.67  | 3.81      |
| E45 | 120.7 | 60.3 | 179.0 |  | 8.74  | 4.02      | D95   | 114.2 | 53.2  | 177.9 | 8.24  | 4.62      | M144  | 121.8 | 58.7  | 178.0 | 7.93  | 4.13      |
| A46 | 120.5 | 55.2 | 180.2 |  | 8.16  | 4.14      | G96   | 109.1 | 47.3  | 175.4 | 7.76  | 3.86/3.82 | M145  | 114.8 | 55.7  | 177.8 | 7.89  | 4.34      |
| E47 | 118.6 | 59.2 | 180.1 |  | 7.63  | 4.08      | N97   | 119.4 | 52.8  | 176.2 | 8.32  | 4.68      | T146  | 110.0 | 62.5  | 175.1 | 7.64  | 4.45      |
| L48 | 120.2 | 58.0 | 178.6 |  | 8.11  | 4.12      | G98   | 112.8 | 45.3  | 172.8 | 10.59 | 4.04/3.44 | S147  | 117.8 | 59.1  | 173.7 | 7.74  | 4.52      |
| Q49 | 118.1 | 58.8 | 178.6 |  | 8.13  | 3.89      | F99   | 115.6 | 56.0  | 174.9 | 7.64  | 5.19      | K148  | 127.7 | 57.7  | 181.2 | 7.65  | 4.21      |
| D50 | 120.0 | 57.7 | 178.8 |  | 8.01  | 4.46      |       |       |       |       |       |           |       |       |       |       |       |           |

\*<sup>1</sup>H Chemical shifts are expressed relative to (trimethylsilyl)propionic-*d*<sub>4</sub> acid, <sup>15</sup>N shifts relative to liquid NH<sub>3</sub> (Live et al., 1984), and <sup>13</sup>C shifts relative to hypothetical internal (trimethylsilyl)propionic acid (Bax & Subramanian, 1986).

## 6.5 Resonanzzuordnung des CaM/M13-Komplexes

Ikura, M., Kay, L.E., Krinks, M. and Bax, A. (1991) *Biochemistry* 30, 5498-5504.

Table I: Polypeptide Backbone  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , and  $^{15}\text{N}$  Chemical Shifts for *Drosophila* Calmodulin Complexed with M13 and  $\text{Ca}^{2+}$  and pH 6.8 and 36  $^{\circ}\text{C}$  and 0.1 M  $\text{KCl}^a$

|     | $^{15}\text{N}$ | $\text{C}\alpha$ | $\text{C}'$ | NH    | $\text{H}\alpha$ |     | $^{15}\text{N}$ | $\text{C}\alpha$ | $\text{C}'$ | NH    | $\text{H}\alpha$ |      | $^{15}\text{N}$ | $\text{C}\alpha$ | $\text{C}'$ | NH    | $\text{H}\alpha$ |
|-----|-----------------|------------------|-------------|-------|------------------|-----|-----------------|------------------|-------------|-------|------------------|------|-----------------|------------------|-------------|-------|------------------|
| A1  |                 | 51.6             | 173.7       |       | 4.11             | M51 | 119.3           | 59.7             | 177.4       | 8.09  | 4.05             | I100 | 127.3           | 61.0             | 175.7       | 10.28 | 4.75             |
| D2  | 120.5           | 54.5             | 175.6       |       | 4.68             | I52 | 116.1           | 63.4             | 178.2       | 7.55  | 3.62             | S101 | 123.9           | 55.4             | 175.5       | 9.02  | 5.00             |
| Q3  | 120.0           | 55.4             | 175.7       | 8.37  | 4.41             | N53 | 117.0           | 55.7             | 177.6       | 8.72  | 4.43             | A102 | 123.1           | 55.6             | 179.2       | 9.32  | 3.95             |
| L4  | 123.5           | 54.3             | 177.8       | 8.23  | 4.72             | E54 | 116.1           | 57.9             | 177.2       | 7.58  | 4.15             | A103 | 118.2           | 54.8             | 181.5       | 8.28  | 4.08             |
| T5  | 113.1           | 60.3             | 175.3       | 8.75  | 4.53             | V55 | 112.3           | 61.1             | 175.6       | 7.15  | 4.22             | E104 | 120.3           | 59.0             | 179.6       | 7.92  | 4.05             |
| E6  | 120.3           | 59.8             | 179.6       | 8.99  | 4.03             | D56 | 121.5           | 53.3             | 176.1       | 7.86  | 4.53             | L105 | 121.1           | 57.9             | 178.2       | 8.56  | 4.20             |
| E7  | 119.7           | 59.6             | 178.5       | 8.23  | 4.15             | A57 | 131.1           | 54.0             | 178.9       | 8.09  | 4.26             | R106 | 117.2           | 59.7             | 178.7       | 8.71  | 3.76             |
| Q8  | 118.7           | 58.5             | 179.6       | 7.74  | 4.09             | D58 | 114.0           | 52.4             | 178.0       | 8.26  | 4.67             | H107 | 120.4           | 59.9             | 177.2       | 8.12  | 4.28             |
| I9  | 119.8           | 66.0             | 177.7       | 8.52  | 3.92             | G59 | 108.6           | 47.0             | 175.3       | 7.61  | 3.98/3.83        | V108 | 118.4           | 66.4             | 178.0       | 7.98  | 3.57             |
| A10 | 121.7           | 55.2             | 180.8       | 8.05  | 4.16             | D60 | 118.9           | 52.3             | 176.9       | 8.21  | 4.65             | M109 | 115.9           | 59.2             | 179.2       | 8.17  | 4.04             |
| E11 | 118.3           | 59.6             | 179.4       | 7.90  | 4.01             | G61 | 113.3           | 45.1             | 173.3       | 10.60 | 4.31/3.54        | T110 | 114.7           | 66.1             | 178.5       | 8.44  | 4.12             |
| F12 | 117.0           | 62.5             | 178.9       | 8.30  | 4.66             | T62 | 108.1           | 59.0             | 173.4       | 7.65  | 4.80             | N111 | 123.5           | 55.6             | 176.9       | 7.96  | 4.39             |
| K13 | 122.6           | 59.5             | 179.6       | 9.20  | 3.83             | I63 | 123.7           | 58.7             | 175.7       | 8.76  | 5.28             | L112 | 118.6           | 55.7             | 176.7       | 7.78  | 4.10             |
| E14 | 119.8           | 59.3             | 180.1       | 8.52  | 4.12             | D64 | 128.9           | 51.8             | 176.1       | 9.12  | 5.51             | G113 | 103.7           | 44.6             | 175.1       | 7.52  | 4.33/3.65        |
| A15 | 123.0           | 55.3             | 179.3       | 8.20  | 4.20             | F65 | 118.3           | 62.7             | 173.8       | 8.93  | 3.88             | E114 | 121.5           | 55.6             | 175.4       | 8.08  | 4.41             |
| F16 | 118.9           | 61.6             | 178.1       | 8.88  | 3.45             | P66 | 137.6           | 66.6             | 179.8       |       | 3.85             | K115 | 124.7           | 55.1             | 175.4       | 8.47  | 4.43             |
| S17 | 114.2           | 61.4             | 174.4       | 8.04  | 4.20             | E67 | 118.1           | 58.7             | 179.1       | 8.32  | 3.95             | L116 | 125.2           | 53.8             | 177.2       | 8.12  | 4.86             |
| L18 | 119.8           | 56.6             | 177.6       | 7.48  | 4.12             | F68 | 124.1           | 61.0             | 176.2       | 8.59  | 3.93             | T117 | 112.8           | 60.1             | 175.5       | 8.71  | 4.53             |
| F19 | 114.7           | 58.8             | 176.1       | 7.29  | 4.20             | L69 | 119.8           | 57.3             | 179.0       | 8.75  | 3.22             | D118 | 121.1           | 57.8             | 178.7       | 8.87  | 4.27             |
| D20 | 116.6           | 51.7             | 176.8       | 7.66  | 4.55             | T70 | 115.0           | 66.3             | 176.4       | 7.93  | 3.66             | E119 | 119.3           | 59.6             | 179.1       | 8.74  | 4.13             |
| K21 | 123.0           | 57.7             | 178.4       | 7.57  | 4.01             | M71 | 120.4           | 58.7             | 178.0       | 7.43  | 3.79             | E120 | 120.2           | 58.8             | 179.7       | 7.67  | 4.01             |
| D22 | 114.0           | 52.5             | 177.8       | 8.12  | 4.62             | M72 | 114.7           | 54.0             | 177.1       | 7.51  | 4.36             | V121 | 120.9           | 66.6             | 177.5       | 7.86  | 3.47             |
| G23 | 109.4           | 46.9             | 175.4       | 7.71  | 3.94/3.81        | A73 | 121.4           | 51.9             | 178.1       | 7.93  | 4.30             | D122 | 119.8           | 57.4             | 179.1       | 8.02  | 4.38             |
| D24 | 121.2           | 53.3             | 177.4       | 8.52  | 4.55             | R74 | 118.6           | 56.3             | 176.2       | 7.06  | 4.15             | E123 | 119.2           | 59.0             | 178.8       | 8.07  | 4.01             |
| G25 | 112.9           | 44.9             | 173.8       | 10.63 | 4.43/3.76        | K75 | 124.1           | 55.8             | 176.7       | 8.50  | 4.36             | M124 | 119.4           | 59.6             | 180.2       | 7.71  | 4.32             |
| T26 | 111.7           | 59.1             | 173.3       | 8.21  | 5.47             | M76 | 123.8           | 54.6             | 176.2       | 8.64  | 4.54             | I125 | 120.7           | 63.1             | 177.6       | 8.18  | 3.89             |
| I27 | 126.6           | 60.7             | 176.3       | 10.00 | 4.79             | K77 | 122.0           | 57.3             | 177.1       | 8.64  | 4.23             | R126 | 117.9           | 59.5             | 179.1       | 8.42  | 4.11             |
| T28 | 116.3           | 59.0             | 176.7       | 8.46  | 4.89             | D78 | 120.2           | 55.5             | 176.4       | 8.59  | 4.54             | E127 | 116.8           | 58.5             | 177.1       | 8.04  | 4.04             |
| T29 | 112.5           | 66.0             | 177.1       | 9.11  | 3.73             | T79 | 112.7           | 62.5             | 174.4       | 7.77  | 4.41             | A128 | 117.4           | 51.1             | 177.5       | 7.20  | 4.38             |
| K30 | 120.6           | 58.8             | 179.9       | 7.57  | 4.13             | D80 | 123.9           | 54.2             | 177.4       | 8.21  | 4.76             | D129 | 118.2           | 54.2             | 175.7       | 7.98  | 4.53             |
| E31 | 121.9           | 59.1             | 178.8       | 7.67  | 4.00             | S81 | 117.3           | 61.2             | 176.3       | 8.55  | 4.35             | I130 | 128.1           | 63.4             | 177.9       | 8.27  | 3.91             |
| L32 | 120.4           | 57.8             | 179.0       | 8.72  | 4.08             | E82 | 121.6           | 59.2             | 178.6       | 8.37  | 4.14             | D131 | 116.7           | 53.6             | 178.4       | 8.41  | 4.53             |
| G33 | 105.7           | 48.2             | 175.0       | 8.73  | 3.94/3.50        | E83 | 118.0           | 59.0             | 178.2       | 8.10  | 4.23             | G132 | 108.6           | 47.0             | 175.4       | 7.65  | 4.01/3.84        |
| T34 | 117.9           | 66.7             | 177.1       | 7.90  | 3.97             | E84 | 119.8           | 58.9             | 179.9       | 7.99  | 4.12             | D133 | 120.9           | 53.3             | 177.8       | 8.40  | 4.49             |
| V35 | 122.5           | 66.5             | 178.0       | 7.62  | 3.59             | I85 | 121.7           | 66.1             | 178.3       | 8.16  | 4.22             | G134 | 112.6           | 45.4             | 172.8       | 10.29 | 4.09/3.46        |
| M36 | 116.6           | 58.2             | 179.2       | 8.52  | 4.10             | R86 | 122.6           | 60.0             | 179.2       | 8.44  | 4.19             | Q135 | 115.0           | 53.0             | 175.1       | 8.00  | 4.97             |
| R37 | 118.4           | 58.6             | 181.5       | 8.60  | 4.83             | E87 | 118.2           | 58.9             | 179.7       | 8.64  | 4.10             | V136 | 125.4           | 61.4             | 176.0       | 9.16  | 5.24             |
| S38 | 119.4           | 61.6             | 175.0       | 8.05  | 4.32             | A88 | 121.2           | 55.3             | 179.2       | 8.07  | 4.23             | N137 | 129.4           | 50.6             | 174.8       | 9.66  | 5.38             |
| L39 | 118.8           | 53.9             | 177.6       | 7.37  | 4.39             | F89 | 120.2           | 62.2             | 176.8       | 8.95  | 3.38             | Y138 | 118.4           | 62.0             | 176.3       | 8.29  | 3.29             |
| G40 | 107.1           | 45.3             | 174.6       | 7.85  | 4.32/3.84        | R90 | 115.2           | 58.4             | 177.1       | 7.99  | 3.97             | E139 | 118.9           | 59.8             | 180.5       | 8.07  | 3.64             |
| Q41 | 118.5           | 53.9             | 174.3       | 7.99  | 4.50             | V91 | 117.7           | 65.3             | 177.0       | 7.32  | 3.63             | E140 | 120.9           | 58.5             | 179.2       | 8.88  | 3.83             |
| N42 | 116.2           | 51.2             | 172.0       | 8.69  | 5.21             | F92 | 114.9           | 60.6             | 176.5       | 7.12  | 4.20             | F141 | 123.8           | 61.4             | 176.4       | 8.46  | 3.53             |
| P43 | 136.4           | 62.1             | 177.7       |       | 4.85             | D93 | 115.9           | 51.5             | 177.1       | 8.01  | 4.61             | V142 | 119.4           | 66.7             | 179.4       | 8.78  | 3.03             |
| T44 | 113.1           | 60.2             | 175.3       | 8.86  | 4.47             | K94 | 125.1           | 58.9             | 178.4       | 7.48  | 3.94             | T143 | 118.3           | 66.7             | 175.9       | 8.03  | 3.65             |
| E45 | 120.3           | 59.7             | 178.9       | 8.79  | 4.01             | D95 | 114.1           | 52.8             | 177.8       | 8.38  | 4.58             | M144 | 119.3           | 56.9             | 177.5       | 7.38  | 4.15             |
| A46 | 120.9           | 54.7             | 180.3       | 8.23  | 4.13             | G96 | 109.4           | 46.9             | 175.2       | 7.88  | 3.91/3.91        | M145 | 112.8           | 55.1             | 177.4       | 7.50  | 3.91             |
| E47 | 118.6           | 58.8             | 179.8       | 7.68  | 4.10             | N97 | 119.8           | 52.3             | 176.0       | 8.43  | 4.67             | T146 | 107.9           | 61.3             | 174.7       | 7.55  | 4.39             |
| L48 | 119.7           | 57.5             | 178.7       | 8.22  | 4.24             | G98 | 112.6           | 44.5             | 172.7       | 10.71 | 4.09/3.46        | S147 | 118.4           | 58.4             | 173.7       | 7.56  | 4.47             |
| Q49 | 117.8           | 58.2             | 178.3       | 8.06  | 3.85             | F99 | 116.2           | 55.5             | 174.9       | 7.74  | 5.17             | K148 | 128.5           | 57.6             | 181.5       | 8.09  | 4.15             |
| D50 | 120.3           | 57.3             | 178.9       | 7.97  | 4.49             |     |                 |                  |             |       |                  |      |                 |                  |             |       |                  |

<sup>a</sup> $^1\text{H}$  chemical shifts are expressed relative to (trimethylsilyl)propionic-*d*<sub>4</sub> acid (TSP),  $^{13}\text{C}$  chemical shifts are relative to hypothetically internal TSP, where 0 ppm is obtained by multiplying the  $^1\text{H}$  TSP frequency by 0.25144954.  $^{15}\text{N}$  shifts are relative to external liquid ammonia at 25  $^{\circ}\text{C}$ , where 0 ppm has been obtained by multiplying the 0 ppm  $^1\text{H}$  TSP frequency by 0.10132914.

## 6.6 X-PLOR Protokolle

### 6.6.1 generate\_cam.inp

```

remarks  file  nmr/generate.inp
remarks  Generate structure file for a protein
remarks  using the SA parameter and topology files.

topology
  @topallhdg.pro
end      { Read topology file      }

set echo on message on end

segment      { Generate protein      }
  name="B    " { This name has to match the }
              { four characters in columns 73 }
              { through 76 in the coordinate }
              { file, in XPLOR this name is }
              { name is referred to as SEGId. }

  chain
    @toph19.pep
    sequence      @@camsequence.dat      END
                  { obtain the sequence  }
end
end
write structure output=cam.psf end

stop

```

### 6.6.2 camsequence.dat

```

ALA ASP GLN LEU THR GLU GLU GLN ILE ALA GLU PHE LYS
GLU ALA PHE SER LEU PHE ASP LYS ASP GLY ASP GLY THR
ILE THR THR LYS GLU LEU GLY THR VAL MET ARG SER LEU
GLY GLN ASN PRO THR GLU ALA GLU LEU GLN ASP MET ILE
ASN GLU VAL ASP ALA ASP GLY ASN GLY THR ILE ASP PHE
PRO GLU PHE LEU THR MET MET ALA ARG LYS MET LYS ASP
THR ASP SER GLU GLU GLU ILE ARG GLU ALA PHE ARG VAL
PHE ASP LYS ASP GLY ASN GLY TYR ILE SER ALA ALA GLU
LEU ARG HIS VAL MET THR ASN LEU GLY GLU LYS LEU THR
ASP GLU GLU VAL ASP GLU MET ILE ARG GLU ALA ASP ILE
ASP GLY ASP GLY GLN VAL ASN TYR GLU GLU PHE VAL GLN
MET MET THR ALA LYS

```

### 6.6.3 generate\_template\_cam.inp

```

remarks  file  nmr/generate_template.inp
remarks  generates a "template" coordinate set.  This produces

```

```

remarks  an arbitrary extended conformation with ideal geometry.
remarks  author: Axel T. Brunger

{====>}
structure @cam.psf end                { * read structure file * }

parameter
{====>}
  @parallhdg.pro                      { * read parameters * }
end

parameter
  bond (name sg) (name sg) 0.0 TOKEN
  angle (all) (name sg) (name sg) 0.0 TOKEN
end

vector ident (x) ( all )
vector do (x=x/10.) ( all )
vector do (y=random(0.5) ) ( all )
vector do (z=random(0.5) ) ( all )

vector do (fbeta=50) (all)           { * friction coefficient, in 1/ps * }
vector do (mass=100) (all)          { * heavy masses, in amu * }

parameter
  nbonds
    cutnb=5.5 rcon=20. nbxmod=-2 repel=0.9 wmin=0.1 tolerance=1.
    rexp=2 irexp=2 inhibit=0.25
  end
  nbfix S S 462 13.6 462 13.6
end

flags exclude * include bond angle vdw end

minimize powell nstep=50 nprint=10 end

flags include impr end

minimize powell nstep=50 nprint=10 end

dynamics verlet
  nstep=50 timestep=0.001 iasvel=maxwell firsttemp= 300.
  tcoupling = true tbath = 300. nprint=50 iprfrq=0
end

parameter
  nbonds
    rcon=2. nbxmod=-3 repel=0.75
  end
end

minimize powell nstep=100 nprint=25 end

dynamics verlet
  nstep=500 timestep=0.005 iasvel=maxwell firsttemp= 300.
  tcoupling = true tbath = 300. nprint=100 iprfrq=0
end

```

```

flags exclude vdw elec end
vector do (mass=1.) ( name h* )
hbuild selection=( name h* ) phistep=360 end
flags include vdw elec end

minimize powell nstep=200 nprint=50 end
                                                                    { * write coordinates * }
remarks produced by nmr/generate_template.inp
write coordinates output=cam.pdb end

stop

```

### 6.6.4 param.ca

```

!Parameters for Ca- ION
!From parallh22x.pro Parameter file

NONBONDED CAL      .1200  3.0469  .1200  3.0469 ! ALLOW ION
              ! optimized before july 89, and need polarization term (BP)

```

### 6.6.5 topo.ca

```

!topology for Ca-Ion
!from topallh22x.pro

      autogenerate angles=true end
      autogenerate DIHEDRAL=true end

mass CAL  40.0800 ! calcium 2+
mass CA   40.0800 ! calcium 2+

RESIDUE CAL  ! Calcium ion
GROUP
  ATOM  CA      TYPE CAL  CHARGE  2.0000  END
end

end

```

### 6.6.6 ca\_psf.inp

```

topology
  @topo.ca
end
      { Read topology file          }

segment
  name="CA  "
      { Generate protein            }
      { This name has to match the  }
      { four characters in columns 73 }
      { through 76 in the coordinate }

```

```

{ file, in XPLOR this name is }
{ name is referred to as SEGid. }

molecule number=4 name=CAL end
end
write structure output=ca.psf end
stop

```

### 6.6.7 ca.psf

PSF

```

2 !NTITLE
REMARKS FILENAME="ca.psf"
REMARKS DATE:29-Jan-98 10:47:48          created by user: bb

4 !NATOM
1 CA 1 CAL CA CAL 2.00000 40.0800 0
2 CA 2 CAL CA CAL 2.00000 40.0800 0
3 CA 3 CAL CA CAL 2.00000 40.0800 0
4 CA 4 CAL CA CAL 2.00000 40.0800 0

0 !NBOND: bonds
0 !NTHETA: angles
0 !NPHI: dihedrals
0 !NIMPHI: impropers
0 !NDON: donors
0 !NACC: acceptors
0 !NNB
0 0 0 0
4 0 !NGRP
0 0 0 1 0 0 2 0 0
3 0 0

```

### 6.6.8 ca.pdb

```

REMARK FILENAME="ca.pdb"
REMARK produced by nmr/generate_template.inp
REMARK DATE:29-Jan-98 10:48:19          created by user: bb
ATOM 1 CA CAL 1 12.245 3.506 -10.388 1.00 0.00 CA
ATOM 2 CA CAL 2 -9.315 -3.011 -1.975 1.00 0.00 CA
ATOM 3 CA CAL 3 4.530 0.283 19.756 1.00 0.00 CA
ATOM 4 CA CAL 4 -5.942 1.794 -6.171 1.00 0.00 CA
END

```

### 6.6.9 make\_dimer.inp

```

structure @cam.psf end
coordinates @cam.pdb end

```

```

structure @ca.psf end
coordinates @ca.pdb end

write structure output=cam_mit_ca.psf end
write coordinates output=cam_mit_ca.pdb end

stop

```

### 6.6.10 generate\_c20w.inp

```

remarks file nmr/generate.inp
remarks Generate structure file for a protein
remarks using the SA parameter and topology files.

topology
  @topallhdg.pro
end          { Read topology file          }

set echo on message on end

segment          { Generate protein          }
  name="A      " { This name has to match the      }
                  { four characters in columns 73  }
                  { through 76 in the coordinate  }
                  { file, in XPLOR this name is  }
                  { name is referred to as SEGId.  }

  chain
    @toph19.pep
    sequence      @@c20wsequence.dat      END
                  { obtain the sequence      }

end
end
write structure output=c20w.psf end

stop

```

### 6.6.11 c20wsequence.dat

```

LEU ARG ARG GLY GLN ILE LEU TRP PHE ARG
GLY LEU ASN ARG ILE GLN THR GLN ILE LYS

```

### 6.6.12 sa\_lal.inp

```

remarks sa_lal.inp
remarks Author: Michael Nilges

```

```

evaluate ($ini_count = 100)
evaluate ($end_count = 300)

evaluate ($iniseed = 283745)  { * changed from 567313 * }

evaluate ($init_t = 2000 )  { * initial simulated annealing temperature
* }
evaluate ($high_steps = 26000)
evaluate ($cool1_steps = 5000) { increased from 2500 }
evaluate ($cool2_steps = 2000) { increased from 1000 }
evaluate ($final1_t = 1000)   { K }
evaluate ($final2_t = 100)    { K }
evaluate ($tempstep = 50)     { K }

evaluate ($fileroot = "cs/complex_0903")
evaluate ($reference = "ci/cam_mit_ca.pdb")
evaluate ($template_1 = "ci/cam_mit_ca.pdb")
evaluate ($template_2 = "ci/c20w.pdb")

structure
@@ci/cam_mit_ca.psf
@@ci/c20w.psf end

parameter @@ci/parallhdg.pro
           @@ci/param.ca end

parameter
  bond (name sg) (name sg) 0.0 TOKEN
  angle (all) (name sg) (name sg) 0.0 TOKEN
end

@@ci/read_aldata.xplor

flags exclude * include bonds angle impr vdw noe cdih end

vector do (fbeta=10) (all) { * friction coefficient for MD heatbath, in
1/ps * }
vector do (mass=100) (all)

evaluate ($kcdih = 5)
restraints dihedral
           scale=$kcdih           { * initial weight - will be modified
later * }
end

evaluate ($count = $ini_count)
while ($count < $end_count ) loop main

  evaluate ($count=$count+1)
  evaluate ($nreassign = 0)
  coor @$template_1
  coor @$template_2
  evaluate ($seed = $count*$iniseed)
  set seed $seed end
  @ci/sa_1_randomchain.xplor

  evaluate ($cpu1 = $cpu)

```

```

evaluate ($ncycle = ($init_t-$final_t)/$tempstep)
evaluate ($nstep = int($cool1_steps/$ncycle))

@ci/setup_swapnew.xplor
vector ident (store2) (store1)
parameter
  improper (store2) (store2) (all) (all) 0.0 TOKEN TOKEN
  improper (all) (all) (store2) (store2) 0.0 TOKEN TOKEN
end

  @@ci/sa_l_initial_values.xplor
parameter
  angle (store2) (all) (store2) $ini_flt TOKEN
  angle (all) (all) (store2) $ini_flt TOKEN
end

parameter nbonds
  atom cutnb 12 tolerance 3.5 repel=1.2 wmin 0.5
  rexp=2 irexp=2 rcon=1. nbxmod 4
end end

  @@ci/sa_l_reduced.xplor { defines store1 }

  constraints
interaction (all) (not store1) weights * 1 angl 1.0 impr 1.0 vdw 0.0
elec 0 end
interaction (store1) (store1) weights * 1 angl 1.0 impr 1.0 vdw 0.1
elec 0 end
  end

{* 1 ===== initial minimization *}
  restraints dihedral scale=5. end
  noe potential * soft scale * 1.0 asymptote * 2.0 end
  minimize powell nstep=50 drop=10. nprint=25 end

{* 2 ===== high temperature dynamics *}

  @ci/sa_l_hightemp.xplor
  {* write coor sele= (name ca) output= high.pdb end *}

{* 3 ===== cooling 1 *}

  @ci/sa_l_cool1.xplor

{* 4 ===== cooling 2 *}

  @ci/sa_l_cool2.xplor

{* 5 ===== final minimization *}

  evaluate ($swap = 1.001)
  flags exclude * include noe end
  @ci/swap15v.xplor
  flags include bond angl impr vdw noe cdih end

```

```

    minimize powell nstep=200 drop=10.0 nprint=25 end

{* 6 ===== write out the final structure(s) *}

    evaluate ($filename=$fileroot+ encode($count)+ ".pdb")
    @@ci/print_coorheader.xplor
    write coordinates sele= (all) output =$filename end

end loop main

stop

```

### 6.6.13 read\_aldata.xplor

```

noe

    reset
    nrestraints = 5000                ! allocate space for NOEs
    ceiling 100

    set echo off message off end
    class      dist @@cd/cam1612_pseudo.upl
                @@cd/filtnoe1502_test.upl
                @@cd/c20w_0703_pseudo.upl
                @@cd/hbonds_1612.upl
                @@cd/Calcium.upl

    set echo on message on end

    averaging * r-6
    potential * soft
    scale      * 1.0
    sqconstant * 1.0
    sqexponent * 2
    soexponent * 1
    rswitch    * 1.0
    sqoffset   * 0.0
    asymptote  * 2.0
    avexpo hbond 20

end

restraints dihedral
    @@cd/aromchi1_1301.upl
    @@cd/phipsi0601.upl
    set echo on message on end

end

```

### 6.6.14 sa\_1\_randomchain.xplor

```

REMARK randomchain.inp
REMARK randomize a structure by random rotations around the N-Ca and
REMARK Ca-C bonds.
REMARK input:  a coordinate set obtained with generate_template.inp or

```

```

REMARK          any other pdb file with good geometry
REMARK output:  the coordinates randomized around phi and psi. chi_i
REMARK          are not affected.
REMARK
REMARK the input file can be used also to generate the randomized
REMARK coordinates "on the fly" as part of the sa.inp protocol. the
REMARK lines setting the seed, reading the structure and the template
REMARK coordinates at the beginning, and writing out the randomized
REMARK coordinates and the stop command at the end, should then be
REMARK deleted. this file should be read after the "coor swap" and
REMARK "coor copy" statements at the beginning of the main loop in
REMARK sa.inp.
REMARK Author:  M. Nilges, EMBL, Oct. 1993

set message off echo off end

! The vector store1 is set to 1 for all atoms that have already been
! rotated.
vector do (store1=0) (all)
vector do (store2=0) (all)

! loop through all ca atoms.
for $id in id (name ca) loop pept

    vector show element (resid) (id $id)
    evaluate ($res = $result)
    vector show element (segid) (id $id)
    evaluate ($seg = $result)
    vector do (store2=1) (byres (id $id))

    evaluate ($phi = random()*360-180)
    evaluate ($psi = random()*360-180)

! all atoms up to the present ca are held fixed for phi rotation
vector do (store1=1)
    ((store2 and (name n or name hn or name ht* or name ca)))

! rotate phi
coor rotate sele= (attribute store1=0)
    center (head (store2 and name ca))
    axis   (head (store2 and name ca)
            tail (store2 and name n)) $phi
end

! fix the sidechain of the current residue for psi rotation
vector do (store1=1)
    ((store2 and not (name c or name o or name ot#)))

! rotate psi
coor rotate sele= (attribute store1=0 and segid $seg)
    center (head (store2 and name c) )
    axis   (head (store2 and name c)
            tail (store2 and name ca)) $psi
end

! fix all of current residue
vector do (store1=1) (store2)
vector do (store2=0) (byres (id $id))

```

```

end loop pept

!!coor translate selection (segid B) vector (head (segid A) tail
(segid B)) end

evaluate ($filename="random"+encode($count)+".pdb")

!!!write coordinates output =$filename end

set message on echo on end

```

### 6.6.15 sa\_l\_hightemp.xplor

```

evaluate ($nstep1=int($high_steps / 5.0 ) )

    vector do (vx = maxwell($init_t)) (all)
    vector do (vy = maxwell($init_t)) (all)
    vector do (vz = maxwell($init_t)) (all)

    for $knoe in (3.125 6.25 12.5 25 50) loop anne
        noe scale dist $knoe scale ambi $ini_amb scale hbon $ini_amb end

        flags exclude * include noe end
        flags include bond angl impr vdw noe cdih dihe end

        evaluate ($kvdw = $knoe * 0.002)
        constraints
            interaction (all) (not store1) weights * 1 angl 1.0 impr 1.0
vdw 0.0 elec 0 end
            interaction (store1) (store1) weights * 1 angl 1.0 impr 1.0
vdw $kvdw elec 0 end
        end

        dynamics verlet
            nstep=$nstep1 timestep=0.003 iasvel=current
firstt=$init_t
            tcoupling=true tbath=$init_t nprint=50 iprfrq=0
            ntrfrq=9999
        end

        evaluate ($critical=$temp/$init_t)
        if ($critical > 1.2) then
            evaluate ($nreassign = $nreassign + 1)
            mini powell nstep 100 end
            vector do (vx=maxwell($init_t)) ( all )
            vector do (vy=maxwell($init_t)) ( all )
            vector do (vz=maxwell($init_t)) ( all )
        end if
    end loop anne

```

**6.6.16 sa\_l\_reduced.xplor**

```

vector ident (store1)
  ((resn Gly  and name CA) or
  (resn Ala  and (name CA or name CB )) or
  (resn Val  and (name CA or name CG1 )) or
  (resn Ile  and (name CA or name CG1 )) or
  (resn Leu  and (name CA or name CD1 )) or
  (resn Phe  and (name CA or name CD1 )) or
  (resn Pro  and (name CA or name CG )) or
  (resn Met  and (name CA or name SD )) or
  (resn Trp  and (name CA or name CE2 )) or
  (resn Cys  and (name CA or name SG )) or
  (resn Ser  and (name CA or name CB )) or
  (resn Thr  and (name CA or name CG2 )) or
  (resn Asn  and (name CA or name CG )) or
  (resn Gln  and (name CA or name CD )) or
  (resn Tyr  and (name CA or name CD1 )) or
  (resn His  and (name CA or name CD2 )) or
  (resn Asp  and (name CA or name CG )) or
  (resn Glu  and (name CA or name CD )) or
  (resn Lys  and (name CA or name CD )) or
  (resn Arg  and (name CA or name CD )))

```

**6.6.17 sa\_l\_initial\_values.xplor**

```

evaluate ($ini_rad = 0.9)           evaluate ($fin_rad = 0.78)
  evaluate ($ini_con= 0.003)       evaluate ($fin_con= 4.0)
  evaluate ($ini_flt = 5)          evaluate ($fin_flt = 500)
  evaluate ($ini_ang = 1.0)       evaluate ($fin_ang = 1.0)
  evaluate ($ini_imp = 1.0)       evaluate ($fin_imp = 1.0)
  evaluate ($ini_amb = 1.0)       evaluate ($fin_amb = 50.0)

evaluate ($bath = $init_t)
evaluate ($k_vdw = $ini_con)
evaluate ($k_vdwfact = ($fin_con/$ini_con)^(1/$ncycle))
evaluate ($radius= $ini_rad)
evaluate ($radfact = ($fin_rad/$ini_rad)^(1/$ncycle))
evaluate ($k_flt = $ini_flt)
evaluate ($flt_fac = ($fin_flt/$ini_flt)^(1/$ncycle))
evaluate ($k_ang = $ini_ang)
evaluate ($ang_fac = ($fin_ang/$ini_ang)^(1/$ncycle))
evaluate ($k_imp = $ini_imp)
evaluate ($imp_fac = ($fin_imp/$ini_imp)^(1/$ncycle))
evaluate ($k_amb = $ini_amb)
evaluate ($amb_fac = ($fin_amb/$ini_amb)^(1/$ncycle))

```

**6.6.18 setup\_swapnew.xplor**

```

vector do (q = 0) (all)
vector do (store1 = 0) (all)
vector do (store1 = store1 + 1)
      ((resn leu and name cd*) or (resn val and name cg*))

set echo off message off end
for $id in id (
  (resn gly and name ha1)
  or (resn ile and name hg11)
  or (resn leu and name hb1)
  or (resn phe and name hb1)
  or (resn pro and (name hb1 or name hg1 or name hd1))
  or (resn met and (name hb1 or name hg1))
  or (resn trp and name hb1)
  or (resn cys and name hb1)
  or (resn ser and name hb1)
  or (resn asn and name hb1)
  or (resn gln and (name hb1 or name hg1))
  or (resn tyr and name hb1)
  or (resn his and name hb1)
  or (resn asp and name hb1)
  or (resn glu and (name hb1 or name hg1))
  or (resn lys and (name hb1 or name hg1 or name hd1 or name he1))
  or (resn arg and (name hb1 or name hg1 or name hd1)))

loop meth
  vector show element (resid) (id $id)
  eval ($resid = $result)
  vector show element (name) (id $id)
  eval ($name = $result - "1" + "%")
  coor sele= (resid $resid and name $name) end
  if ($select = 2) then
    vector do (store1 = store1 + 1) (resid $resid and name $name)
  end if
end loop meth
set echo on message on end

```

**6.6.19 swap15v.xplor**

```

REMARK   swaps systematically randomly selected methylene protons
REMARK   accepts the conformation with lower noe energy
REMARK   can be used in conjunction with floating assignment
REMARK   removes atoms from list that do not have any influence on
energy
REMARK   uses the new "coor flip" and "coor vflip" commands
REMARK
REMARK   Author: Michael Nilges, Yale University.

```

```

set echo off message off end

```

```

evaluate ($reject = 0)
evaluate ($tries = 0)

```

```

evaluate ($newnoe=0)
energy end
evaluate ($oldnoe=$noe)

if ($swap > 0) then
  vector do (q = q * ran()) (attr q > -0.5)
end if

for $id in id (store2 and name h*1 and attr q < $swap and attr q > -
0.5) loop meth
  vector show element (resid) (id $id)
  eval ($resid = $result)
  vector show element (name) (id $id)
  eval ($name1 = $result)
  eval ($name2 = $result - "1" + "2")
  coor flip sele= (resid $resid and (name $name1 or name $name2)) end

  energy end
  evaluate ($newnoe=$noe)
  evaluate ($tries = $tries + 1)

  if ($newnoe >= $oldnoe) then
    coor flip sele= (resid $resid and (name $name1 or name $name2))
  end
  evaluate ($reject = $reject+1)
  else
    evaluate ($oldnoe = $newnoe)
    coor vflip sele= (resid $resid and (name $name1 or name $name2))
  end
end if
end loop meth

for $id in id (store2 and ((resn val and name cg1) or (resn leu and
name cd1))
  and attr q < $swap and attr q > -0.5) loop meth
  coor copy end

  vector show element (resid) (id $id)
  eval ($resid = $result)
  vector show element (name) (id $id)
  eval ($name1 = $result)
  eval ($name2 = $name1 - "1" + "2")

  coor flip sele= (resid $resid and (name $name1 or name $name2)) end

  for $hycount in (1 2 3) loop myle
    eval ($hname1 = "H" + $name1 - "C" + encode($hycount))
    eval ($hname2 = "H" + $name2 - "C" + encode($hycount))
    coor flip sele= (resid $resid and (name $hname1 or name
$hname2)) end
  end loop myle

  energy end
  evaluate ($newnoe=$noe)
  evaluate ($tries = $tries + 1)

  if ($newnoe >= $oldnoe) then
    coor swap end
    evaluate ($reject = $reject+1)
  end
end for

```

```

else
  evaluate ($oldnoe = $newnoe)
  coor vflip sele= (resid $resid and (name $name1 or name $name2))
end
for $hycount in (1 2 3) loop myle
  eval ($hname1 = "H" + $name1 - "C" + encode($hycount))
  eval ($hname2 = "H" + $name2 - "C" + encode($hycount))
  coor vflip sele= (resid $resid and (name $hname1 or name
$hname2)) end
end loop myle
end if
end loop meth

if ($tries > 0) then evaluate ($reject = 100 * $reject / $tries) end
if

vector do (q=1) (attr q < $swap and attr q > -0.5)

display swaps tried: $tries swaps rejected: $reject percent

set echo on message on end

```

### 6.6.20 sa\_1\_cool1.xplor

```

vector do (vx=maxwell($init_t)) ( all )
vector do (vy=maxwell($init_t)) ( all )
vector do (vz=maxwell($init_t)) ( all )

{* 4 ===== cool the system *}

restraints dihedral scale=200. end

parameter          {* parameters for the repulsive energy term *}
nbonds
  repel=1.          {* initial value for repel - modified later *}
  rexp=2 irexp=2 rcon=1.
  nbxmod=3
  wmin=0.01
  cutnb=4.5 ctonnb=2.99 ctofnb=3.
  tolerance=0.5
end
end

evaluate ($ncycle = ($init_t-$final_t)/$tempstep)
evaluate ($nstep = int($cool_steps/$ncycle))

evaluate ($i_cool = 0)
while ($i_cool < $ncycle) loop cool
  evaluate ($i_cool=$i_cool+1)

  evaluate ($bath = $bath - $tempstep)
  evaluate ($k_vdw=min($fin_con,$k_vdw*$k_vdwfact))
  evaluate ($radius=max($fin_rad,$radius*$radfact))
  evaluate ($kflt = $kflt*$flt_fac)
  evaluate ($k_ang = $k_ang*$ang_fac)

```

```

evaluate ($k_imp = $k_imp*$simp_fac)
evaluate ($k_amb = $k_amb*$amb_fac)

flags exclude * include noe end
flags include bond angl impr vdw noe cdih dihe end

parameter
  angle (store2) (all) (store2) $k_flt TOKEN
  angle (all) (all) (store2) $k_flt TOKEN
  nbonds repel=$radius end
end

constraints
  interaction (all) (all) weights * 1 vdw $k_vdw end
end
noe scale dist $knoe scale ambi $k_amb scale hbon $k_amb end

dynamics verlet
  nstep=$nstep time=0.003 iasvel=current firstt=$bath
  tcoup=true tbath=$bath nprint=$nstep iprfrq=0
  ntrfrq=99999
end

evaluate ($critical=$temp/$bath)
if ($critical > 1.2) then
  evaluate ($nreassign = $nreassign + 1)
  mini powell nstep 100 end
  vector do (vx=maxwell($bath)) ( all )
  vector do (vy=maxwell($bath)) ( all )
  vector do (vz=maxwell($bath)) ( all )
end if

end loop cool

```

### 6.6.21 sa\_l\_cool2.xplor

```

constraints interaction (all) (all) weights * 1. vdw 4. end end

evaluate ($ncycle = ($bath-$final2_t)/$tempstep)
evaluate ($nstep = int($cool2_steps/$ncycle))

evaluate ($i_cool = 0)
while ($i_cool < $ncycle) loop cool
  evaluate ($i_cool=$i_cool+1)
  evaluate ($bath = $bath - $tempstep)

  flags exclude * include noe end
  flags include bond angl impr vdw noe dihe cdih end

  dynamics verlet
    nstep=$nstep time=0.003 iasvel=current firstt=$bath
    tcoup=true tbath=$bath nprint=$nstep iprfrq=0
    ntrfrq=9999
  end
end

```

```

{====>}                                     { * abort condition *}
  evaluate ($critical=$temp/$bath)
  if ($critical > 1.2) then
    evaluate ($nreassign = $nreassign + 1)
    mini powell nstep 100 end
    vector do (vx=maxwell($bath)) ( all )
    vector do (vy=maxwell($bath)) ( all )
    vector do (vz=maxwell($bath)) ( all )
  end if

end loop cool

```

### 6.6.22 print\_coorheader.xplor

```

print threshold=0.5 noe
  evaluate ($rms_noe=$result)
  evaluate ($violations_noe=$violations)
  print threshold=5. cdih
  evaluate ($rms_cdih=$result)
  evaluate ($violations_cdih=$violations)
  print thres=0.05 bonds
  evaluate ($rms_bonds=$result)
  print thres=5. angles
  evaluate ($rms_angles=$result)
  print thres=5. impropers
  evaluate ($rms_impropers=$result)
  remarks initial random number seed: $seed
  remarks
=====
  remarks          overall,bonds,angles,improper,vdw,noe,cdih
  remarks energies: $ener, $bond, $angl, $impr, $vdw, $noe, $cdih
  remarks
=====
  remarks          bonds,angles,impropers,noe,cdih
  remarks rms-dev.:
$rms_bonds,$rms_angles,$rms_impropers,$rms_noe,$rms_cdih
  remarks
=====
  remarks          noe, cdih
  remarks violations.: $violations_noe, $violations_cdih
  remarks
=====

```

## 6.7 Daten

### 6.7.1 Calcium.upl

```
assign ( resid 1 and name CA and segid "CA")
(resid 20 and name OD1 and segid "B") 2.5 2.5 0.000
assign ( resid 1 and name CA and segid "CA")
(resid 22 and name OD1 and segid "B") 2.5 2.5 0.000
assign ( resid 1 and name CA and segid "CA")
(resid 24 and name OD1 and segid "B") 2.5 2.5 0.000
assign ( resid 1 and name CA and segid "CA")
(resid 26 and name O and segid "B") 2.5 2.5 0.000
assign ( resid 1 and name CA and segid "CA")
(resid 31 and name OE1 and segid "B") 2.5 2.5 0.000
assign ( resid 1 and name CA and segid "CA")
(resid 31 and name OE2 and segid "B") 2.5 2.5 0.000

assign ( resid 2 and name CA and segid "CA")
(resid 56 and name OD1 and segid "B") 2.5 2.5 0.000
assign ( resid 2 and name CA and segid "CA")
(resid 62 and name O and segid "B") 2.5 2.5 0.000
assign ( resid 2 and name CA and segid "CA")
(resid 58 and name OD1 and segid "B") 2.5 2.5 0.000
assign ( resid 2 and name CA and segid "CA")
(resid 60 and name OD1 and segid "B") 2.5 2.5 0.000
assign ( resid 2 and name CA and segid "CA")
(resid 67 and name OE1 and segid "B") 2.8 2.8 0.000
assign ( resid 2 and name CA and segid "CA") (
resid 67 and name OE2 and segid "B") 2.5 2.5 0.000

assign ( resid 3 and name CA and segid "CA")
(resid 99 and name O and segid "B") 2.5 2.5 0.000
assign ( resid 3 and name CA and segid "CA")
(resid 93 and name OD1 and segid "B") 2.5 2.5 0.000
assign ( resid 3 and name CA and segid "CA")
(resid 97 and name OD1 and segid "B") 2.5 2.5 0.000
assign ( resid 3 and name CA and segid "CA")
(resid 104 and name OE1 and segid "B") 2.5 2.5 0.000
assign ( resid 3 and name CA and segid "CA")
(resid 104 and name OE2 and segid "B") 2.5 2.5 0.000
assign ( resid 3 and name CA and segid "CA")
(resid 95 and name OD1 and segid "B") 2.5 2.5 0.000

assign ( resid 4 and name CA and segid "CA")
(resid 133 and name OD1 and segid "B") 2.5 2.5 0.000
assign ( resid 4 and name CA and segid "CA")
(resid 135 and name O and segid "B") 2.5 2.5 0.000
assign ( resid 4 and name CA and segid "CA")
(resid 129 and name OD1 and segid "B") 2.5 2.5 0.000
assign ( resid 4 and name CA and segid "CA")
(resid 131 and name OD1 and segid "B") 2.5 2.5 0.000
assign ( resid 4 and name CA and segid "CA")
(resid 140 and name OE1 and segid "B") 2.5 2.5 0.000
assign ( resid 4 and name CA and segid "CA")
```

```
(resid 140 and name OE2 and segid "B") 2.5 2.5 0.000
```

## 6.8 Felix-Makros und C-Programme

### 6.8.1 mkstrip.mac

```
c** mkstrip.mac <file> <mat2d>
;
; To write stripes to matrix <mat2d> which are specified in input
; file <file>:
;
; Usage: mkstrip <file> <mat2d>
;
; The format of <file> is:
;
; <no> <mat3d> <d1> <d2> <d3>
; <no> <mat3d> <d1> <d2> <d3>
; <no> <mat3d> <d1> <d2> <d3>
; <no>
; ...
;
; One of the <d2> or <d3> in each entry must be null (=0) indicating
; the strip dimension. Blank lines generate stripes with only <no>
in
; them.
;
def _oldat &datpfx
def datpfx './' ; Read from current directory
if &_args lt 2 then
; ty Wrong number of arguments.
; ty Try: mkstrip <file> <mat2d>
; go quit
gets 'Ascii stripe input file: ' infn
gets 'Stripe file directory: ' datpfx
gets 'Stripe output matrix: ' mat2d
else
def infn &_arg1
def mat2d &_arg2
eif
;
; Determine upper limit on the number of stripes:
mat &mat2d w
eval finjj (&d1size/16)
cmx
;
inq dat &infn exist
if &exist eq 0 then
ty Input file <&infn> does not exist.
go quit
eif
opn dat &infn 2 ; Open file for reading
;
```

```

; Loop through all stripes in file &infn
for _jj 1 &finjj
skip:
  esc out
  if &out ne 0 quit
  def status 0
  rea
  if &status ne 0 done
  str parse $str wrd cnt
  if &wrd1 eqs '#' skip
  if &cnt lt 1 skip
  if &cnt lt 4 then
    ty stripe &mat2d &wrd1 $
    ty
    exr stripe &mat2d &wrd1
  else
    ty stripe &mat2d &wrd1 &wrd2 &wrd3 &wrd4 &wrd5 $
    ty
    exr stripe &mat2d &wrd1 &wrd2 &wrd3 &wrd4 &wrd5
  eif
next
;
done:
  cls          ; Close &infn
quit:
  def datpfx &_oldat
; pur finjj infn mat2d no
  ret
end

```

## 6.8.2 xpk\_hgt\_vol3d.mac

```

c** xpk_hgt_vol
c**
c** 931006 mikael akke
c** this macro will find the maximum peak height within the xpk box
c** of the xpk (max 9999) of your data base entity xpk:&peaks,
c**
c** your dba will be modified to contain a new entity called
c** peakmax, that contains the same info as xpk:&peaks + the
c** intensity of the xpk as the last item of the entity.
c**
c** you are prompted for a name for the output file.
c** the name of the current matrix is suffixed to the output file
name.
c**
c** you are also prompted to decide whether you want to view where
c** on the xpk that the obtained peak maxima are found.
c** note: this will tie up the cursor, so you will not be able to
c** work in another window while this macro is run in felix.
c**
c** YOU NEED THE SCHEMA: xpkhgtv.sch IN YOUR SCHEMA DIRECTORY!
c** this can be found in /agpl/users/akke/felix/schema/
c**
c** the macro tests whether the 'highest' point is positive or

```

```

c** negative, and reports the signed 'peak height' (this is desiged
c** with T1 inversion-recovery experiments in mind).
c** if you do not like this, then you can easily comment out a few
c** lines of macro code and comment in a few others -- as you will
c** easily find out below!
c**
def thispt 0
def smalr 0
def smalc 0
def smalv 0
def bigr 0
def bigc 0
def bigv 0
def xcen 0
def xwid 0
def ycen 0
def ywid 0
def zcen 0
def zwid 0
def width 0
def firstc 0
def lastc 0
def firstr 0
def lastr 0
def firstv 0
def lastv 0
def smalst 0
def bigst 0
ty
def peaks peaks
def volumes volumes
get 'peak entity:' peaks
get 'volume entity:' volumes
get 'enter output file name:' filnam
ty
ty do you want to view where the found peak maxima are located on the
xpk?
ty (this will lock the cursor during the execution of this macro...)
get 'answer (y/n):' answer
ty
dba entity delete vol:&volumes
vol xpk:&peaks vol:&volumes 1 0.00
dba list range 1 xpk:&peaks item 1 9999 xpktot
ty Total number of xpks = &xpktot
ty
dba entity delete peakmax
dba entity build peakmax xpkhgtv 3
for xpknum 1 &xpktot
  dba list load 1 &xpknum itmnum
;   ty xpknum &xpknum
;   ty itmnum &itmnum
  dba element load vol:&volumes.&itmnum.2 volint
  dba element store peakmax.&itmnum.16 &volint
  dba element load xpk:&peaks.&itmnum.2 xcen
  dba element load xpk:&peaks.&itmnum.3 xwid
  dba element load xpk:&peaks.&itmnum.5 xass
  dba element load xpk:&peaks.&itmnum.6 ycen
  dba element load xpk:&peaks.&itmnum.7 ywid
  dba element load xpk:&peaks.&itmnum.9 yass

```

```

    dba element load xpk:&peaks.&itmnum.10 zcen
    dba element load xpk:&peaks.&itmnum.11 zwid
    dba element load xpk:&peaks.&itmnum.13 zass
; it appears that wid1, wid2 in dba is 1/4 of the size of the xpk
box...
    eva firstc (&xcen-&xwid*2)
    eva lastc (&xcen+&xwid*2)
    eva firstr (&ycen-&ywid*2)
    eva lastr (&ycen+&ywid*2)
    eva firstv (&zcen-&zwid*2)
    eva lastv (&zcen+&zwid*2)
    for vert &firstv &lastv
      for row &firstr &lastr
        loa 0 &row &vert
;      shl &firstc
;      ty 'firstc' &firstc
;      dr
;      wai 1
;      eva width (&xwid*4)
;      def datsiz &width
;      ty 'datsiz' &width
;      dr
;      wai 1
;      ld &firstc &lastc
    for point &firstc &lastc
      gv &point thispt
;      ty Value &thispt
      if &thispt lt &smalst then
        eva smalst (&thispt+0.0)
        eva smalr &row
        eva smalc &point
        eva smalv &vert
;      ty smalst in row &row and column &point has value &smalst
      eif
      if &thispt gt &bigst then
        eva bigst (&thispt+0.0)
        eva bigr &row
        eva bigc &point
        eva bigv &vert
;      ty bigst in row &row and column &point has value &bigst
      eif
    next
  next
next
; ty Xpk &itmnum -int &smalst in column &smalc row &smalr
; ty Xpk &itmnum +int &bigst in column &bigc row &bigr
; if abs(&bigst) gt abs(&smalst) then
if (abs(&bigst)) gt (abs(&smalst)) then
  ty Xpk &itmnum has signed peak max &bigst in col &bigc row &bigr
  dba element store peakmax.&itmnum.15 &bigst
  if &answer eqs y then
    lim 1 &firstc &lastc
    lim 2 &firstr &lastr
    lim 3 &firstv &lastv
    cp
    drx
    def x0pnt &bigc
    def y0pnt &bigr
    def z0pnt &bigv

```

```

        cur 0 1 1 5
        wai 1
    eif
    dba element store peakmax.&itmnum.2 &bigc
    dba element store peakmax.&itmnum.3 &xwid
    dba element store peakmax.&itmnum.5 &xass
    dba element store peakmax.&itmnum.6 &bigr
    dba element store peakmax.&itmnum.7 &ywid
    dba element store peakmax.&itmnum.9 &yass
    dba element store peakmax.&itmnum.10 &bigv
    dba element store peakmax.&itmnum.11 &zwid
    dba element store peakmax.&itmnum.13 &zass
    els
    ty Xpk &itmnum has signed peak max &smalst in col &smalc row
    &smalr vert &smalv
    dba element store peakmax.&itmnum.15 &smalst
    if &answer eqs y then
        lim 1 &firstc &lastc
        lim 2 &firstr &lastr
        lim 3 &firstv &lastv
        cp
        drx
        def x0pnt &smalc
        def y0pnt &smalr
        def z0pnt &smalv
        cur 0 1 1 5
        wai 1
    eif
    dba element store peakmax.&itmnum.2 &smalc
    dba element store peakmax.&itmnum.3 &xwid
    dba element store peakmax.&itmnum.5 &xass
    dba element store peakmax.&itmnum.6 &smalr
    dba element store peakmax.&itmnum.7 &ywid
    dba element store peakmax.&itmnum.9 &yass
    dba element store peakmax.&itmnum.10 &bigv
    dba element store peakmax.&itmnum.11 &zwid
    dba element store peakmax.&itmnum.13 &zass
    eif
    def smalst 0
    def bigst 0
next

dba entity write peakmax &filnam
ty
ty output written to file &filnam
return
end

```

### 6.8.3 baxie.c

```

/*integrals to distances by 2-spin-approximation */
/*compile with 'cc -o xx xx.c -lm -lc_s' */

#include <stdio.h>
#include <math.h>

```

```
#define J1 165.9

FILE *ascout;
char s1[80];
double const1,inten,argum,argum2,argum1,d2,cp1,cp2,cp3,d2;

main()
{
    printf("cross peak intensity : ");scanf("%lf",&cp1);
    printf("diagonal peak intensity : ");scanf("%lf",&cp3);
    printf("refocussing delay: ");scanf("%lf",&d2);

        const1=1.0/(M_PI*d2*2);
        inten=cp1/cp3;
        inten=pow(inten,0.5);
        argum2=const1*fatan(inten);
printf("long range coupling equals %lf Hz\n",argum2);
}
```

## 6.9 Publikation

Elshorst, B., Hennig, M., Försterling, H., Diener, A., Maurer, M., Schulte, P., Schwalbe, H., Griesinger, C., Krebs, J., Schmid, H., Vorherr, T., and Carafoli, E. (1999) *Biochemistry* 38, 12320-12332.

# NMR Solution Structure of a Complex of Calmodulin with a Binding Peptide of the $\text{Ca}^{2+}$ Pump<sup>†,‡</sup>

Bettina Elshorst,<sup>§</sup> Mirko Hennig,<sup>§</sup> Holger Försterling,<sup>§</sup> Alexander Diener,<sup>§</sup> Marcus Maurer,<sup>§</sup> Petra Schulte,<sup>§</sup> Harald Schwalbe,<sup>§</sup> Christian Griesinger,<sup>\*,§</sup> Joachim Krebs,<sup>\*,||</sup> Holger Schmid,<sup>||,⊥</sup> Thomas Vorherr,<sup>||,⊥</sup> and Ernesto Carafoli<sup>||,#</sup>

*Institute of Organic Chemistry, University of Frankfurt, D-60439 Frankfurt, Germany, and Institute of Biochemistry, Swiss Federal Institute of Technology (ETH), CH-8092 Zurich, Switzerland*

*Received April 8, 1999; Revised Manuscript Received June 25, 1999*

**ABSTRACT:** The three-dimensional structure of the complex between calmodulin (CaM) and a peptide corresponding to the N-terminal portion of the CaM-binding domain of the plasma membrane calcium pump, the peptide C20W, has been solved by heteronuclear three-dimensional nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. The structure calculation is based on a total of 1808 intramolecular NOEs and 49 intermolecular NOEs between the peptide C20W and calmodulin from heteronuclear-filtered NOESY spectra and a half-filtered experiment, respectively. Chemical shift differences between free  $\text{Ca}^{2+}$ -saturated CaM and its complex with C20W as well as the structure calculation reveal that C20W binds solely to the C-terminal half of CaM. In addition, comparison of the methyl resonances of the nine assigned methionine residues of free  $\text{Ca}^{2+}$ -saturated CaM with those of the CaM/C20W complex revealed a significant difference between the N-terminal and the C-terminal domain; i.e., resonances in the N-terminal domain of the complex were much more similar to those reported for free CaM in contrast to those in the C-terminal half which were significantly different not only from the resonances of free CaM but also from those reported for the CaM/M13 complex. As a consequence, the global structure of the CaM/C20W complex is unusual, i.e., different from other peptide calmodulin complexes, since we find no indication for a collapsed structure. The fine modulation in the peptide protein interface shows a number of differences to the CaM/M13 complex studied by Ikura et al. [Ikura, M., Clore, G. M., Gronenborn, A. M., Zhu, G., Klee, C. B., and Bax, A. (1992) *Science* 256, 632–638]. The unusual binding mode to only the C-terminal half of CaM is in agreement with the biochemical observation that the calcium pump can be activated by the C-terminal half of CaM alone [Guerini, D., Krebs, J., and Carafoli, E. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 15172–15177].

Calcium plays a central role in the modulation of a number of cellular processes (1). The receptor protein that mediates the calcium signal to most intracellular targets is calmodulin (CaM)<sup>1</sup> (for review see ref 2). The binding of  $\text{Ca}^{2+}$  alters the conformation of CaM, exposing hydrophobic patches (3–5) on its surface and thereby conferring to CaM the ability to interact with intracellular targets.

The X-ray structure of  $\text{Ca}^{2+}$ -loaded CaM reveals an extended, rigid, and dumbbell shape, in which the two domains are connected by a rigid  $\alpha$ -helix (Figure 1a). <sup>15</sup>N relaxation studies (6), hydrogen exchange rates, and chemical

shift perturbations (7) of the protein in solution suggest that the central part of this long stretched helix (Asp78 through Ser81) is disordered and, therefore, the two domains show no conserved relative orientation; i.e., in solution this central helix is a “flexible tether” (8).

The structures of  $\text{Ca}^{2+}$ -loaded CaM complexed to binding peptides derived from skeletal and smooth muscle myosin light chain kinase (MLCK) and from CaM kinase II $\alpha$  (CaMKII $\alpha$ ) have been solved by NMR (9) and by X-ray crystallography (10, 11), respectively (for sequences of the

<sup>†</sup> The present work was supported by Grant 31-46'998.96 from the Swiss National Science Foundation and by the Fonds der Chemischen Industrie. A.D. and M.H. were supported by a Doktoranden-Stipendium of the Fonds der Chemischen Industrie. H.F. was supported by a fellowship of the DFG (Eg 53/3-3). H.S. and M.M. were supported by and all measurements have been performed at the Large Scale Facility for Biomolecular NMR at the University of Frankfurt (ERB CT 95 00 34) and by the Italian Ministry of University and Scientific Research (MURST-PRIN, 1998).

<sup>‡</sup> The coordinates of the 26 final CaM/C20W structures have been deposited in the Brookhaven Protein Data Bank under the PDB ID code 1CFF. The chemical shift assignment of CaM/C20W has been deposited in the BioMagResBank database, with accession number 4284.

\* To whom correspondence should be addressed. C.G.: Institute of Organic Chemistry, University of Frankfurt, Marie-Curie-Strasse 11, D-60439 Frankfurt, Germany. E-mail: cigr@org.chemie.uni-frankfurt.de. Phone: +49 69 79829130. Fax: +49 69 79829128. J.K.: Institute of Biochemistry, Swiss Federal Institute of Technology (ETH), CH-8092 Zurich, Switzerland. E-mail: krebs@bc.biol.ethz.ch. Phone: +41 1 632 3005. Fax: +41 1 632 1591.

<sup>§</sup> Institute of Organic Chemistry, University of Frankfurt, D-60439 Frankfurt, Germany.

<sup>||</sup> Institute of Biochemistry, Swiss Federal Institute of Technology (ETH), CH-8092 Zurich, Switzerland.

<sup>⊥</sup> Current address: BACHEM AG, Hauptstrasse 144, CH-4416 Bubendorf, Switzerland.

<sup>#</sup> Current address: Department of Biochemistry, University of Padova, 35121 Padova, Italy.

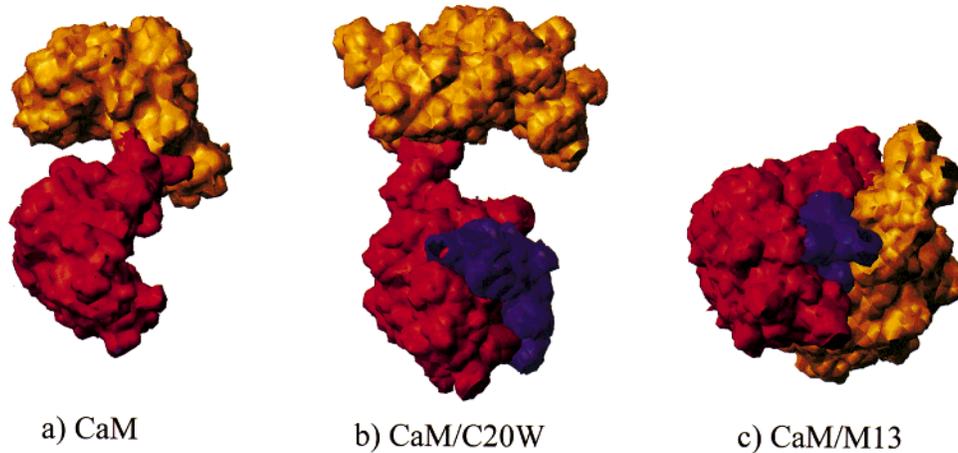


FIGURE 1: Surface representation of  $(\text{Ca}^{2+})_4$ -calmodulin (CaM) and its different binding modes to peptides. The N-terminal half of CaM (residues 1–78) is in orange, the C-terminal half (residues 79–148) is in red, and the peptides are in blue. The orientation of the C-terminal half of CaM is the same in all cases. The structures of  $(\text{Ca}^{2+})_4$ -CaM and of the CaM/M13 complex are based on coordinates taken from the Brookhaven Protein Data Bank [entries 3CLN (12) and 2BBM (9)]. The CaM/C20W coordinates are from the structure reported here. (a) Surface representation of the crystal structure of  $(\text{Ca}^{2+})_4$ -CaM. The dumbbell shape of CaM comprises two globular domains, each of which contains two  $\text{Ca}^{2+}$  binding sites and which are connected by a long rigid central helix. In solution NMR studies indicate that the central helix is disrupted near its midpoint and serves as a flexible linker between the two domains (6, 7). (b) Solution structure of the CaM/C20W complex showing that the peptide C20W, corresponding to the N-binding domain of the plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  pump, binds only to the C-terminal half of CaM. The flexible tether region between the N- and C-terminal domains allows large variations in the orientation of one domain relative to the other. Thus, this depicted structure taken from the ensemble of 26 final structures shows a specific orientation of the two halves. (c) The solution structure of CaM/M13 shows a compact globular complex involving both C- and N-terminal halves of CaM in binding the peptide M13 corresponding to the CaM-binding domain of MLCK.

Table 1: Peptide Sequences from the CaM Binding Domains of CaM Target Proteins<sup>a</sup>

|              | -6 | -5 | -4 | -3 | -2 | -1 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 |
|--------------|----|----|----|----|----|----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| C20W         |    |    | L  | R  | R  | G  | Q | I | L | W | F | R | G | L | N | R  | I  | Q  | T  | Q  | I  | K  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| C24W         |    |    |    |    |    |    | Q | I | L | W | F | R | G | L | N | R  | I  | Q  | T  | Q  | I  | R  | V  | V  | N  | A  | F  | S  | S  | S  |    |    |
| C28W         |    |    | L  | R  | R  | G  | Q | I | L | W | F | R | G | L | N | R  | I  | Q  | T  | Q  | I  | R  | V  | V  | N  | A  | F  | S  | S  | S  |    |    |
| skMLCK (M13) |    |    |    |    |    |    | K | R | R | W | K | K | N | F | I | A  | V  | S  | A  | A  | N  | R  | F  | K  | K  | I  | S  | S  | S  | G  | A  | L  |
| smMLCK (R20) |    |    |    |    |    |    | A | R | R | K | W | Q | K | T | G | H  | A  | V  | R  | A  | I  | G  | R  | L  | S  | S  |    |    |    |    |    |    |
| CaMKII       | L  | K  | K  | F  | N  | A  | R | R | K | L | K | G | A | I | L | T  | T  | M  | L  | A  | T  | R  | N  | F  | S  |    |    |    |    |    |    |    |
| CaMKI        |    |    |    |    |    |    | A | K | S | K | W | K | Q | A | F | N  | A  | T  | A  | V  | V  | R  | H  | M  |    |    |    |    |    |    |    |    |

<sup>a</sup> The alignment of the peptides is based on the first hydrophobic anchor residue shown in dark shading, which interacts with the C-terminal half of CaM. The second anchor residue interacting with the N-terminal half (missing in C20W) is shown in light shading. The numbering of the residues was chosen using the M13 sequence according to ref 9. The arrow denotes the splice site in the CaM-binding domain (between Q<sub>14</sub> and I<sub>15</sub>) due to which different isoforms of the calcium pump may occur, differing in their sequence downstream of the splice site (24).

different peptides see Table 1). Several conclusions have emerged from these studies: (1) The binding of target peptides induces a large conformational change of  $\text{Ca}^{2+}$ -saturated CaM, which bends from the extended shape revealed by crystallographic work (12) into a more globular structure in which the two halves of the protein wrap around the target peptide (Figure 1c). In each binding peptide two hydrophobic residues spaced by 8 or 12 positions (see Table 1) are key to the interaction with CaM. The first residue is

often a tryptophan (for a review see ref 13). (2) The CaM-binding peptides, which are mainly random coil in solution, adopt  $\alpha$ -helical structures in the complex with CaM, interacting with the latter in an antiparallel manner; i.e., the N-terminal half of CaM binds the C-terminal part of the peptide and vice versa.

The plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  pump, a CaM target protein, is one of the key enzymes controlling the  $\text{Ca}^{2+}$  level in cells. The enzyme is an essential component of all animal plasma membranes and is the product of at least four genes with additional isoforms produced by alternative splicing (14). The CaM-binding domain has a length of ca. 30 amino acids, i.e., AA<sub>1100–1127</sub> of hPMCA1b (15), and has the expected propensity to form an amphiphilic helix of basic and apolar amino acids. It functions as an autoinhibitory domain of the pump, binding to two “receptor” sites near the active center (16, 17) of the  $\text{Ca}^{2+}$  pump. The N-terminal region of the CaM-binding domain interacts with a site located between the phosphorylatable aspartate (D<sub>475</sub>) and the FITC- (ATP-) binding site (K<sub>609</sub>), whereas the C-terminal part interacts with

<sup>1</sup> Abbreviations: CaM, calmodulin; C20W, N-terminal portion of the CaM-binding domain of the plasma membrane calcium pump; TR2C, C-terminal tryptic fragment (residues 78–146) of CaM; NMR, nuclear magnetic resonance; MLCK, myosin light chain kinase; CaMKII $\alpha$ , calmodulin kinase II $\alpha$ ; SAXS, small-angle X-ray scattering; TPPI, time-proportional phase incrementation; ppm, parts per million; DSS, 2,2-dimethyl-2-silapentane-5-sulfonate, sodium salt; NOE, nuclear Overhauser effect; rmsd, root-mean-square deviation; M13, CaM-binding domain of MLCK; smMLCK, smooth muscle MLCK; R20, CaM-binding domain of smMLCK; CaMKI, calmodulin kinase I; ATP, adenosine triphosphate; pH\*, uncorrected pH meter reading for D<sub>2</sub>O solution.

the cytoplasmic loop between transmembrane domains 2 and 3, corresponding to the "transduction unit" of P-type ATPases (14).

Unique among CaM targets, the plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  pump can be activated by the C-terminal but not the N-terminal half of CaM (18), isolated after trypsin cleavage. In other cases of CaM targets isolated CaM fragments may bind the target without activation (e.g., see refs 19, 20), or both fragments, i.e., the N- and the C-terminal halves of CaM (21, 22), are necessary for activation. This raises the question of the mode of CaM interaction with the binding domain of the pump, especially which part of the CaM-binding domain of the  $\text{Ca}^{2+}$  pump is sufficient to interact solely with the C-terminal half of CaM. We have addressed this problem by dissecting the binding domain in peptide models of various length (the sequences are shown in Table 1). In addition, previous experiments provided evidence that a splicing site was located in the middle of the CaM-binding domain (23) which to the best of our knowledge has not been observed for other CaM targets. This has the consequence that only the upstream, N-terminal part of the binding domain is identical in all isoforms (23; see Table 1). Thus, it was decided to study the complex between CaM and a shorter peptide C20W, stopping just close to the splice site and short of the putative second CaM anchor residue. The  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent affinity of this peptide for CaM is comparable to the affinity of CaM for the native enzyme (24).

Small-angle X-ray scattering studies (SAXS) (25) have been previously performed on complexes of CaM with peptides C20W and C24W (26) (Table 1), corresponding to different portions of the CaM-binding domain of the plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  pump. The results indicate that the complex of CaM with peptide C24W, which contains both anchoring hydrophobic residues, has a globular shape as observed with other CaM-binding peptides. The SAXS data on the complex of CaM with peptide C20W, on the other hand, which lacks the second hydrophobic anchor residue in the peptide, are indicative of flexibility between the two CaM domains (26) typical for CaM in solution (25).

The solution structure of the CaM/C20W complex described in the present study indeed shows that the peptide is only bound to the C-terminal half of CaM (Figure 1b). Analysis of NMR  $^{15}\text{N}$  relaxation data also indicates a higher degree of flexibility in the mid-portion of the central helix of CaM in the complex, comparable to free CaM in solution (6).

The focus of the present investigation is to define the binding interactions of C20W with CaM and to derive the overall topology of the complex. The interesting finding here is that the CaM/C20W structure resembles a complex halfway on the folding pathway of fully complexed CaM with, e.g., M13, in which both domains of CaM are bound to the peptide. As CaM interacts with a variety of different target enzymes, the determination of structural differences between different CaM complexes is of great importance for the understanding of molecular recognition and specific signaling pathways.

## MATERIALS AND METHODS

**Sample Preparation.** Uniformly  $^{15}\text{N}$ - or  $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -labeled recombinant *Xenopus laevis* (27) CaM (identical to mam-

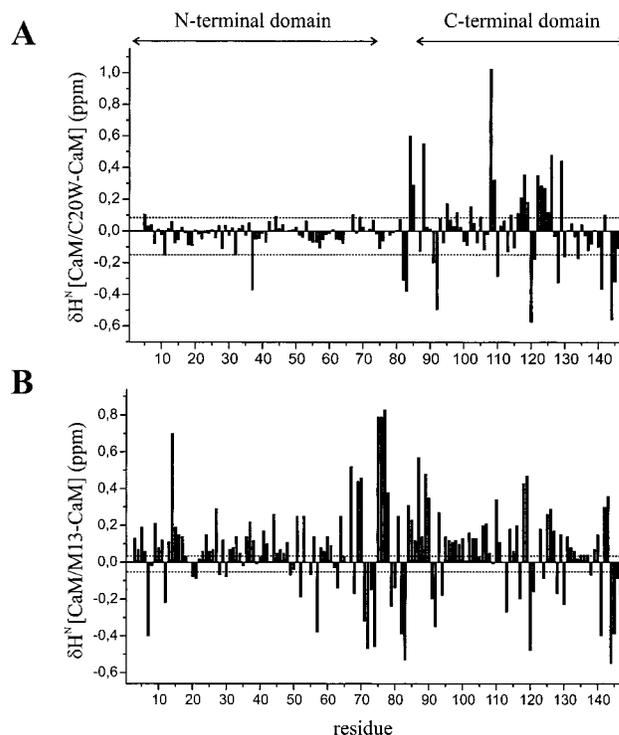


FIGURE 2: Chemical shift differences of the amide protons of (A) CaM/C20W and (B) CaM/M13 (29) with respect to  $\text{Ca}^{2+}$ -loaded CaM (66). For the CaM/C20W complex major changes occur only in the C-terminal domain of CaM, suggesting that the peptide C20W binds only to this domain. This is in contrast to the CaM/M13 complex where both domains are involved in binding the peptide M13, and hence chemical shift changes can be observed over the complete amino acid sequence of CaM. It should be noted that the NMR experiments of the three CaM systems were measured at different temperatures:  $\text{Ca}^{2+}$ -loaded CaM at 320 K (47 °C), CaM/C20W at 303 K (30 °C), and CaM/M13 at 309 K (36 °C). However, the differences between chemical shifts in the three compared systems are larger than the expected temperature-induced chemical shift perturbations (marked as dotted horizontal lines).

malian CaM) was expressed in *Escherichia coli* using the expression vector pTSNco12 (28). CaM expression was induced by a temperature shift, cells were harvested and lysed, and CaM was isolated by a modification of the procedure described elsewhere (18). C20W with natural isotopic abundance was synthesized and purified as described by Vorherr et al. (24) and was complexed to CaM in a 1:1 ratio following the procedure described by Ikura et al. (29). NMR samples were prepared as 1.7 mM CaM/C20W solutions in a Shigemi tube (Shigemi Inc., Allison Park, PA) containing 140 mM KCl and 7 mM  $\text{CaCl}_2$  in  $\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{D}_2\text{O}$ , respectively. The pH/pH\* values of the samples were 6.5 without consideration of the isotope effect.

For the preparation of the C-terminal tryptic fragment of CaM (TR2C) CaM was isolated from bovine brain as described before (18). It was cleaved by trypsin in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  according to Walsh et al. (30) as described elsewhere (18). The fragments were purified according to Toda et al. (31). The C-terminal fragment (TR2C) comprised residues Asp78–Lys148. An NMR sample was prepared as 2 mM TR2C/C20W solution in 90%  $\text{H}_2\text{O}/10\%$   $\text{D}_2\text{O}$ , 100 mM KCl and 5 mM  $\text{CaCl}_2$  with pH value of 6.3.

**NMR Spectroscopy.** All spectra were recorded at a temperature of 303 K using Bruker DRX600 and DRX800 spectrometers equipped with four frequency channels and a

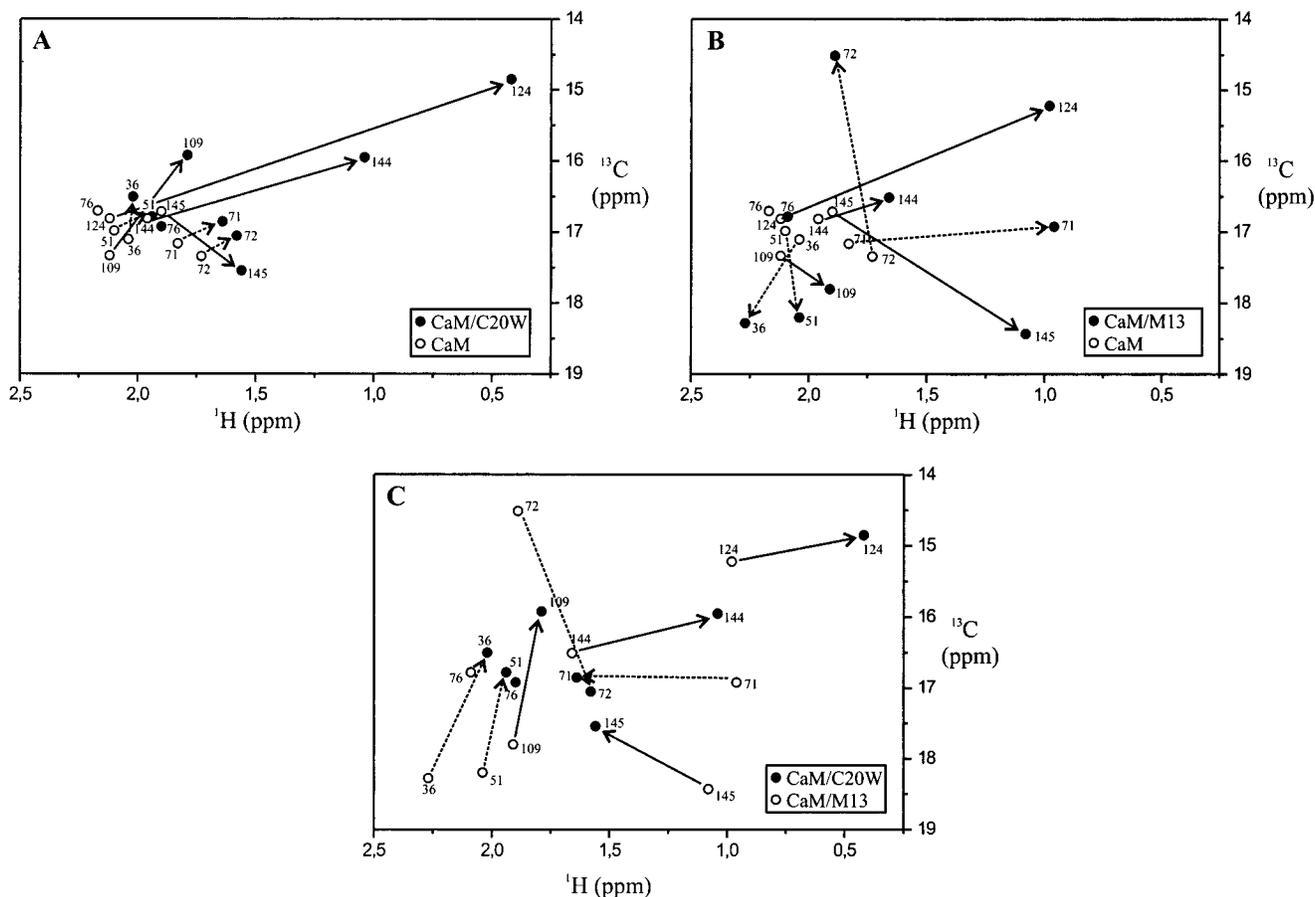


FIGURE 3: Schematic  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HSQC spectra of the  $\epsilon\text{CH}_3$  groups of the methionine residues in CaM (68) and the CaM/C20W and CaM/M13 (68) complexes. Chemical shift differences of methionines of the C-terminal domain of CaM (Met109, Met124, Met144, Met145) are indicated with solid arrows, and the differences of the methionines of the N-terminal domain of CaM (Met36, Met51, Met71, Met72) are indicated with dotted arrows. Met76 is a residue of the flexible linker region. (A) The comparison between CaM and the CaM/C20W complex shows large chemical shift differences of methionines only of the C-terminal domain of CaM. (B) Upon binding of the peptide M13 to both domains of CaM, methionines of both domains are largely shifted. (C) When the CaM/C20W and CaM/M13 complexes are compared, the methionines of the C-terminal domain show large chemical shifts due to the different side-chain conformations in the two complexes. The methionines of the N-terminal domain in CaM/C20W reveal only small chemical shift dispersion similar to the ones in free  $\text{Ca}^{2+}$ -saturated CaM whereas in the CaM/M13 complex the corresponding methionines are widely dispersed. In both complexes the resonance of Met76 which is part of the flexible tether region is close to the random coil value.

triple-resonance three-axis gradient probe. All experiments with  $\text{H}^{\text{N}}$  detection were carried out using pulsed field gradients for coherence-order-selective coherence transfer (32–34) with minimal water saturation (35). Quadrature detection in all indirect  $^{13}\text{C}$  dimensions was obtained with States–TPPI phase cycling (36). In all experiments a relaxation delay of 1 s was used. All data were processed with UXRMR (Bruker Instruments, Rheinstetten) including zero filling and linear prediction calculations. The spectra were analyzed with FELIX (MSI, San Diego, CA). Proton chemical shifts are reported with respect to the DSS signal (0.0 ppm) at 303 K. The  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  chemical shifts were indirectly referenced using the following ratios of the zero-point frequencies at 303 K: 0.101329118 for  $^{15}\text{N}$  to  $^1\text{H}$  and 0.251449530 for  $^{13}\text{C}$  to  $^1\text{H}$  (37). The sequence assignments for the protein backbone nuclei of the  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ -labeled CaM were mainly achieved by a pair of CBCA(CO)NH and CBCANH (38) experiments and further confirmed by another set of experiments, HNCO, HNCA (38), HBHA(CO)NH (39), HNHA (40), and NOESY  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  HSQC (41). Side-chain assignments were obtained using HCCH-TOCSY (42), (H)CC(CO)NH (43), and H(CCCO)NH (43). The (HB)CB-(CCarom)H experiment using the PLUSH-TACSYS (44)

sequence was recorded to obtain the proton assignments of the aromatic residues of CaM. Methionine methyl groups were assigned via an HMBC HSQC (45) and a LRCC experiment (45). NOEs within CaM were measured using NOESY  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HSQC (46) and NOESY  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  HSQC (41) with mixing times of 150 and 100 ms, respectively. The proton resonances of the peptide C20W which was not labeled could be assigned by a  $^{12}\text{C}$ ,  $^{14}\text{N}$ -filtered NOESY experiment with a mixing time of 100 ms. Intermolecular NOEs between CaM and the peptide were measured using a 3D  $^{12}\text{C}$ ,  $^{14}\text{N}$   $\omega_1$ -filtered NOESY  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HSQC experiment (47) with a mixing time of 150 ms. A HNHA (40) experiment was collected in order to obtain  $^3J_{\text{HNH}\alpha}$  values used to generate qualitative dihedral angle restraints. The experimental  $^3J_{\text{HNH}\alpha}$  values were multiplied with a correction factor of 1.1 (48). For the determination of the  $^3J_{\text{NC}\gamma}$  and  $^3J_{\text{C}\gamma}$  coupling constants of aromatic side chains of CaM, the experiments  $^{15}\text{N}$ - $\{^{13}\text{C}_{\text{arom}}\}$  spin-echo difference  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  HSQC and  $^{13}\text{C}'$ - $\{^{13}\text{C}_{\text{arom}}\}$  spin-echo difference  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  HSQC (49) were recorded, respectively. Slowly exchanging amide protons were identified by measuring the temperature coefficients of the amide protons from a series of sensitivity-enhanced  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  HSQC spectra recorded at different tem-

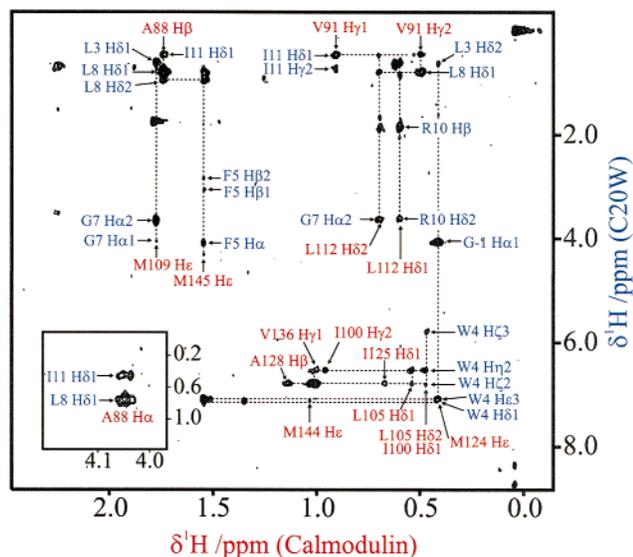


FIGURE 4: 2D  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$  projection of the  $^{12}\text{C}/^{14}\text{N}$   $\omega_1$ -filtered 3D NOESY  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HSQC spectrum containing only intermolecular NOEs between CaM (in red) and the peptide C20W (in blue). Only contacts between the C-terminal half of CaM and the peptide were observed. Assigned cross peaks are indicated in the spectrum.

peratures (301, 303, 305, 307, 309 K). Measurement of  $^1\text{H}/^2\text{H}$  exchange rates of the amide protons was hampered by the insolubility of the CaM/C20W complex after lyophilization.  $^{15}\text{N}$  relaxation rates and heteronuclear NOE were measured using standard pulse sequences (50–54) and analyzed according to the model-free Lipari–Szabo approach (55, 56) using the program MODELFREE 4.0 (57, 58). A list of all recorded NMR experiments with parameters and the  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , and  $^{15}\text{N}$  resonance assignments are given in Supporting Information. The chemical shifts have also been deposited in the BioMagResBank, with accession number 4284.

Of the unlabeled TR2C/C20W complex a 2D NOESY spectrum with a mixing time of 200 ms was recorded at 303 K using a Bruker AM600 (Spectrospin AG, Fällanden) spectrometer.

**Structure Calculations.** Distance restraints were classified on the basis of peak intensity with upper bounds of 2.9 Å (strong), 4.2 Å (medium), and 5.7 Å (weak). A correction of 0.5 Å was added to the upper bounds of restraints involving pseudoatoms for methyl groups (59). For the lower bounds of the distance restraints the sum of the van der Waals radii was used. The intermolecular restraints were treated in the same way as the intramolecular ones. In the early stage of structure calculation the  $^3J_{\text{HNH}\alpha}$  coupling constants were used to derive  $\phi$  dihedral angle restraints. For regions with distinct secondary structure identified in the first generation of structures in agreement with characteristic NOE patterns and chemical shift indices (60), both  $\phi$  and  $\psi$  dihedral angle restraints were included in the final calculations. For  $\alpha$ -helical regions ( $^3J_{\text{HNH}\alpha} < 5.5$  Hz) dihedral angle values of  $\phi = -65^\circ$  ( $\pm 25^\circ$ ) and  $\psi = -40^\circ$  ( $\pm 25^\circ$ ) were used. For  $\beta$ -strands ( $^3J_{\text{HNH}\alpha} > 8$  Hz) the values were taken as  $\phi = -120^\circ$  ( $\pm 30^\circ$ ) and  $\psi = 120^\circ$  ( $\pm 30^\circ$ ) (61). From the determined  $^3J_{\text{NC}\gamma}$  and  $^3J_{\text{C}\gamma\text{C}\gamma}$  values five dihedral angle restraints for aromatic residues were taken as  $\chi_1 = 180^\circ$  ( $\pm 30^\circ$ ) and as  $\chi_1 = -60^\circ$  ( $\pm 30^\circ$ ). Backbone hydrogen bonds were included as pairs of restraints between NH and N atoms to the corresponding

Table 2: Structural Statistics for the CaM/C20W Complex<sup>a</sup>

|  |                     |
|--|---------------------|
| rmsd from idealized covalent geometry  |                     |
| bond length (Å)  | 0.0027 $\pm$ 0.0001 |
| bond angle (deg)   | 0.483 $\pm$ 0.009   |
| impropers (deg)  | 10.3 $\pm$ 1.2      |
| rmsd from experimental restraints  |                     |
| distances (Å)  | 0.031 $\pm$ 0.001   |
| dihedral angles (deg)  | 0.67 $\pm$ 0.11     |
| energies (kcal mol <sup>-1</sup> )   |                     |
| <i>E</i> <sub>total</sub>  | 381 $\pm$ 17        |
| <i>E</i> <sub>bond</sub>   | 20 $\pm$ 2          |
| <i>E</i> <sub>angle</sub>  | 170 $\pm$ 6         |
| <i>E</i> <sub>impropers</sub>  | 29 $\pm$ 2          |
| <i>E</i> <sub>vdw</sub>  | 63 $\pm$ 6          |
| <i>E</i> <sub>NOE</sub>  | 96 $\pm$ 9          |
| <i>E</i> <sub>CDIH</sub>   | 4 $\pm$ 1           |
| coordinate precision <sup>b</sup> (Å)  |                     |
| N-terminal half of CaM (residues L <sub>4</sub> –A <sub>73</sub> )   |                     |
| rmsd of backbone atoms   | 0.75                |
| rmsd of all heavy atoms  | 1.17                |
| superposition over secondary structure elements (7–18, 26–38, 47–54, 62–74)  |                     |
| rmsd of backbone atoms   | 0.56                |
| rmsd of all heavy atoms  | 1.08                |
| C-terminal half of CaM (residues I <sub>85</sub> –T <sub>145</sub> ) and C20W (residues G <sub>-1</sub> –Q <sub>12</sub> ) |                     |
| rmsd of backbone atoms   | 0.53                |
| rmsd of all heavy atoms  | 1.06                |
| superposition over secondary elements [85–92, 99–112, 118–128, 135–145; C20W (–1)–12]                                      |                     |
| rmsd of backbone atoms   | 0.50                |
| rmsd of all heavy atoms  | 1.07                |

<sup>a</sup> Refers to the ensemble of the final 26 structures with lowest energy.

<sup>b</sup> Rmsd between the ensemble of 26 structures and the mean structure.

carbonyl O atom only when the temperature coefficient of the amide proton of the residue was less than  $-0.003$  ppm/K (61, 62) and the NOE pattern indicated unambiguous donor–acceptor pairs. A total of 61 hydrogen bonds were identified and used as restraints for  $r_{\text{NH–O}}$  of an upper bound of 2.4 Å and  $r_{\text{N–O}}$  of 3.3 Å in the final stage of the structure determination. In addition, 24 distance restraints between the four  $\text{Ca}^{2+}$  ions and protein groups derived from the crystal structure of  $\text{Ca}^{2+}$ -loaded CaM (12) were used in the structure calculation. This procedure is similar to published NMR-derived structure determinations of the CaM/M13 complex (9) and the CaM/W7 (63) complex.

For all calculations the X-PLOR program, version 3.851, by Brünger (64) was used. The ab initio simulated annealing protocol started with a 32.5 ps high-temperature phase at 2000 K, followed by a first cooling phase of 25 ps, where the temperature was lowered to 1000 K in steps of 50 K. In the second cooling phase the temperature was lowered to 100 K, followed by a final energy minimization. A total of 1857 NOE-derived distance restraints were applied with a square-well potential and a force constant of 50 kcal·mol<sup>-1</sup>·Å<sup>-2</sup>. Restraints involving methylene protons which were not stereospecifically assigned were treated with the floating assignment procedure of X-PLOR. A total of 129 dihedral angle restraints from  $^3J_{\text{HNH}\alpha}$ ,  $^3J_{\text{NC}\gamma}$ , and  $^3J_{\text{C}\gamma\text{C}\gamma}$  coupling constant measurements were also applied with a force constant of 200 kcal·mol<sup>-1</sup>·rad<sup>-2</sup>. The final 26 structures with the lowest energy were used for the structural statistics (Table 2). This ensemble of 26 structures satisfied the criteria of no NOE violation  $>0.5$  Å and no dihedral violations  $>5^\circ$ . The coordinates have been deposited with the Protein Data Bank, Chemistry Department, Brookhaven National Laboratory, with accession code 1CFF. All structure displays in

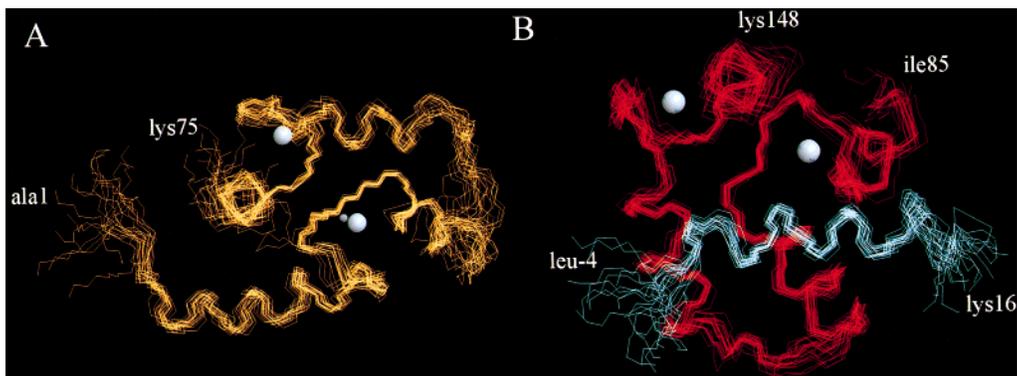


FIGURE 5: Best-fit superpositions of the backbone atoms (N, C $\alpha$  and C') of (A) the N-terminal domain (in orange) and (B) the C-terminal domain (in red) of the final 26 NMR-derived structures of the CaM/C20W complex. The peptide C20W (in blue) binds only to the C-terminal half of CaM. The residues of the N- and C-termini of each domain and of the peptide are indicated, and the Ca $^{2+}$  ions are shown as gray balls. For the N-terminal domain (residues 4–73) superposition yields a rmsd value of 0.85 Å for all backbone atoms and 1.27 Å for all heavy atoms referring to a mean structure. For the backbone and all heavy atoms of the C-terminal domain (residues 85–145) together with the peptide C20W [residues (–1)–12] the rms deviations are 0.57 and 1.08 Å, respectively.

the figures were created using the program MOLMOL by Konradi et al. (65).

## RESULTS AND DISCUSSION

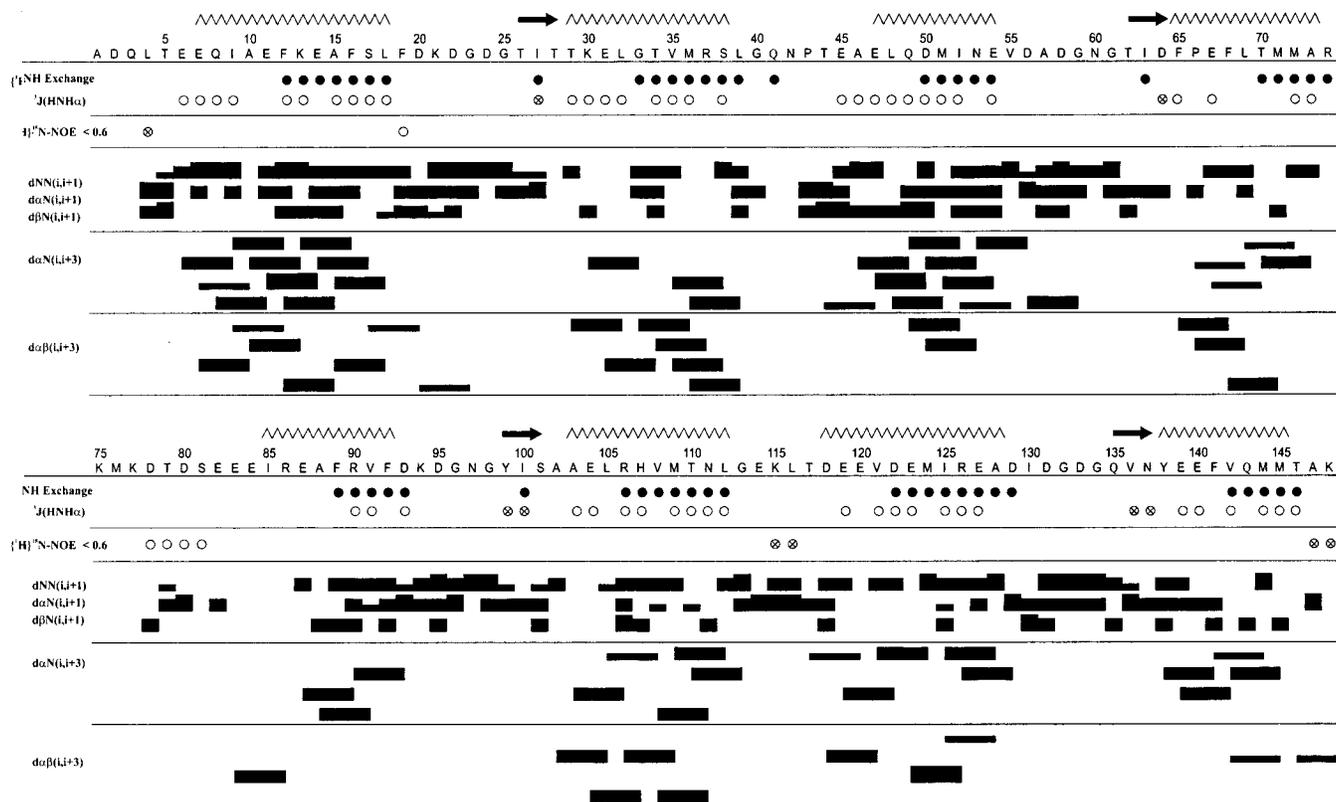
**NMR Spectroscopy of the CaM/C20W Complex.** The structure of the complex between Ca $^{2+}$ -saturated,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ -labeled CaM and nonlabeled peptide C20W (corresponding to the N-terminal portion of the CaM-binding domain of the plasma membrane Ca $^{2+}$  pump) was determined by multidimensional, heteronuclear NMR spectroscopy. A set of heteronuclear three-dimensional experiments yielded the assignment of 95% of the backbone atoms (H $^{\text{N}}$ , N, C $^{\alpha}$ , C') of CaM, of most of its side chains, and 74% of the peptide proton resonances (the assignment is given in Supporting Information). The assignment of the protein part of the CaM/C20W complex was especially difficult for the N- and C-terminal residues and the flexible linker region (residues Arg74 to Glu84) where cross-peaks were found to be broad and weak presumably due to the slow conformational flexibility in these regions. The unlabeled peptide part was assigned from a  $^{12}\text{C}$ ,  $^{14}\text{N}$ -filtered NOESY experiment. Figure 2A shows the difference of the amide proton chemical shift of the CaM/C20W complex to the shifts of Ca $^{2+}$ -loaded CaM (66). The most notable changes are seen in the C-terminal domain of CaM, whereas almost no changes occur in the N-terminal domain. This result suggests that the peptide C20W binds only to the C-terminal domain but not to the N-terminal domain of CaM. In contrast, the amide proton chemical shift difference between the CaM/M13 complex (29) and Ca $^{2+}$ -loaded CaM (65) shown in Figure 2B is clearly indicative of M13 binding to both domains of CaM. Despite the fact that the NMR experiments of the three CaM systems were measured at different temperatures, Ca $^{2+}$ -loaded CaM at 320 K (47 °C), CaM/C20W at 303 K (30 °C), and CaM/M13 at 309 K (36 °C), the differences between chemical shifts in the three compared systems are larger than the expected temperature-induced chemical shift perturbations for the complexes studied as marked in Figure 2 as dotted horizontal lines.

For the structure determination of the complex the assignment of the  $\epsilon\text{CH}_3$  groups of the nine methionine residues of CaM was crucial, because methionines are mainly involved in binding the target peptides of CaM (67). The 3D HMBC

HSQC experiment correlating the  $^1\text{H}\epsilon$  and the  $^{13}\text{C}\epsilon$  chemical shifts over the sulfur atom with the  $^{13}\text{C}\gamma$  chemical shift together with information from NOESY spectra allowed the assignment of all nine methionine methyl groups. Met124 and Met144, which are both involved in the binding of the tryptophan residue of the C20W peptide, exhibit a large upfield shift due to ring current effects of the Trp aromatic ring. In Figure 3A the chemical shifts of the  $\epsilon\text{CH}_3$  groups of the methionines in CaM (68) and in the CaM/C20W complex are compared in a schematic  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HSQC spectrum. All methionines of the C-terminal half (Met109, Met124, Met144, Met145) of CaM show a large chemical shift upon complexation with the peptide C20W (solid arrows), whereas all methionines of the N-terminal half (Met36, Met51, Met71, Met72) have similar shifts in free CaM and in the CaM/C20W complex (dotted arrows). This observation provides additional evidence that the peptide binds only to the C-terminal domain of CaM but not to the N-terminal domain. In the CaM/M13 complex the methionines of both domains show large chemical shift deviations when compared to the methionines in CaM (Figure 3B) due to the fact that both domains of CaM are involved in binding of the peptide M13. The importance of methionines in CaM molecular recognition will be discussed in the section Comparison of the CaM/C20W Complex with Other CaM/Peptide Complexes.

The 3D  $^{13}\text{C}$ - and  $^{15}\text{N}$ -separated NOESY experiments were used to identify 1645 NOE restraints (794 intraresidual, 387 sequential, 311 medium range, and 153 long range) within CaM, corresponding to an average of 15.6 NOEs per residue (69). A figure showing the number of NOE restraints per residue is given in Supporting Information. For peptide C20W, 163 intramolecular NOE restraints (102 intraresidual, 32 sequential, 29 medium range) could be assigned from the  $^{12}\text{C}$ ,  $^{14}\text{N}$ -filtered NOESY experiment, suppressing the signal of  $^{13}\text{C}$ - and  $^{15}\text{N}$ -attached protons. A total of 49 intermolecular NOEs between the peptide and the protein, detected in the 3D  $^{12}\text{C}$ ,  $^{14}\text{N}$   $\omega_1$ -filtered NOESY  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HSQC experiment, defined the interface between the two molecules. The 2D  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$  skyline projection of this 3D experiment is depicted in Figure 4. For example, the side chain of the single tryptophan residue of C20W at position 4 shows numerous NOE interactions to the methyl groups of Ile100, Leu105,

## A. Calmodulin



## B. C20W

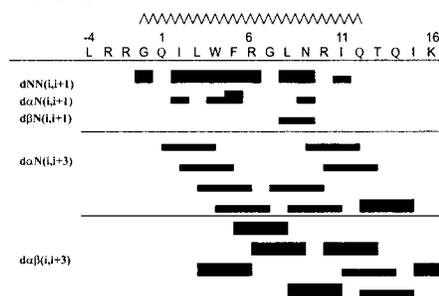


FIGURE 6: Summary of sequential and medium-range NOEs involving HN, C $\alpha$ H, and C $\beta$ H protons, slowly exchanging amide protons,  $^3J_{\text{HNH}\alpha}$ , and  $\{^1\text{H}\}^{15}\text{N}$  heteronuclear NOE values for the CaM/C20W complex. The amino acid sequence and residue numbers together with the secondary structure elements (zigzag line for  $\alpha$ -helix, arrows for  $\beta$ -sheet) are shown at the top of the figure. Slowly exchanging amide protons of CaM represented as full circles were identified by measuring the temperature coefficients from a series of  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  HSQC spectra recorded at different temperatures (301, 303, 305, 307, 309 K). Small ( $< 5.5$  Hz) and large ( $> 8$  Hz) values of  $^3J_{\text{HNH}\alpha}$  are represented by open circles and crossed circles, respectively.  $\{^1\text{H}\}^{15}\text{N}$  heteronuclear NOE values between 0.6 and 0.4 are depicted by open circles and  $\{^1\text{H}\}^{15}\text{N}$  heteronuclear NOE values less than 0.4 by crossed circles. Sequential and medium-range NOEs classified as strong, medium, and weak according to the intensity of the cross-peak are indicated by different heights of the connecting box.

Met124, Ile125, Ala128, Val136, and Met144 of CaM. In the final stage of the structure calculation 52 intramolecular hydrogen bond restraints were incorporated for CaM, on the basis of the temperature dependence of amide proton chemical shifts (61, 62), and 9 for the peptide C20W. The acceptor of the hydrogen bond was identified with structures calculated only from NOE restraints. In addition, 24 distance restraints between the four  $\text{Ca}^{2+}$  ions and atoms of the protein derived from the crystal structure of  $\text{Ca}^{2+}$ -loaded CaM (12) were used in the structure calculation.

*Structure of the CaM/C20W Complex.* The listed structural restraints were used in a simulated annealing protocol (70) using X-PLOR (64) (for details see Materials and Methods) to calculate a final set of 26 structures. Due to the lack of

NOEs between the N- and C-terminal domain, it is impossible to superimpose both domains simultaneously, and therefore the structure of the two domains is presented separately. Figure 5 illustrates a best-fit superposition of the backbone atoms of the N-terminal domain (panel A) and of the C-terminal domain with the bound C20W peptide (panel B). The amino (residues 1–3) and the carboxyl (residues 146–148) termini of CaM, the tether connecting the two domains of CaM (residues 74–84), and the amino (residues –4 to –2) and the carboxyl (residues 13–16) termini of C20W are ill-defined by the NMR data and appear disordered. The final 26 structures are converged with an rmsd from the mean structure of 0.75 Å for all backbone atoms in the N-terminal domain of CaM (residues 4–73) and 0.53

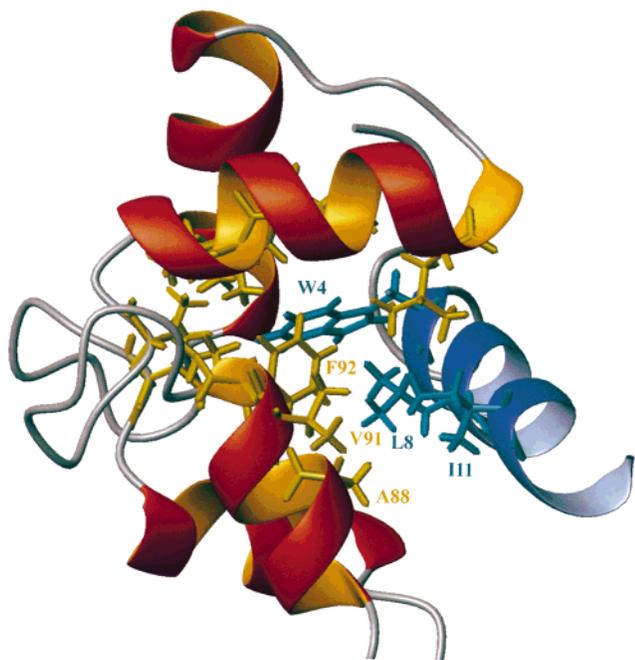


FIGURE 7: Ribbon representation of the C-terminal half of CaM (in red) complexed to the peptide C20W (in blue). The binding of the peptide is stabilized by hydrophobic contacts between W<sub>4</sub>, L<sub>8</sub>, and I<sub>11</sub> of the peptide and side chains of CaM. Selected residues involved in the binding are shown. The interaction between the aromatic systems of peptide W<sub>4</sub> and CaM F<sub>92</sub> giving rise to the large chemical shift perturbation (see Figure 10) is also shown.

Å for all backbone atoms in the C-terminal domain of CaM (residues 85–145) and the peptide C20W [residues (–1)–12] and with low rmsds from the experimental restraints and idealized covalent geometry. The 26 structures exhibited no distance violations exceeding 0.5 Å or dihedral angle violations exceeding 5° and have on average 73.7% of all residues in the most favorable region of the Ramachandran plot according to the PROCHECK (69) procedure. Only 1.5% of all residues are found in disallowed regions of the Ramachandran plot. The structural statistics are summarized in Table 2.

The structure of the CaM/C20W complex contains the following secondary structure elements within CaM: Eight  $\alpha$ -helix segments identified from the NMR data (Figure 6A) are located at Glu7 to Leu18, Thr29 to Ser38, Glu47 to Glu54, Phe65 to Ala73, Ile85 to Phe92, Ala103 to Leu112, Asp118 to Ala128, and Tyr138 to Met145. Two short antiparallel  $\beta$ -sheets connect the strands Thr26 to Thr28 and Thr62 to Asp64 and the strands Tyr99 to Ser101 and Gln135 to Asn137, respectively. Compared to Ca<sup>2+</sup>-CaM the backbone conformation and the secondary structure remain essentially unchanged upon complexation with the peptide C20W. A superposition of the CaM/C20W complex with Ca<sup>2+</sup>-CaM reveals a rmsd value of 1.57 Å for the backbone atoms over the N-terminal domain (residues 7–73) and 1.56 Å over the C-terminal domain (residues 85–145). In the structures of other CaM/peptide complexes (9–11) and of complexes of CaM with small organic compounds (63), the backbone conformation of CaM is also highly conserved upon complexation. The peptide C20W, which has a random coil structure in solution, adopts an  $\alpha$ -helical structure upon complexation with the C-terminal domain of CaM. The helix extends from residue Gly(–1) to Gln12 (Figure 6B; for

nomenclature see Table 1) and shows amphiphatic properties. The hydrophobic side of the helix (Trp4, Leu8, Ile11) is bound to the C-terminal domain of CaM, which the complex CaM/C20W stabilizes by numerous hydrophobic interactions. The hydrophilic side of the helical peptide which contains several basic amino acids [Arg(–3), Arg6, Arg10] is accessible to the surrounding water molecules.

There are no NOE interactions between the N-terminal and the C-terminal domains of CaM, indicating that the two domains do not interact directly on a time scale where NOE interactions can be observed. A flexible tether region extending from Arg74 to Glu84 connects the two domains, and therefore large variations in the orientation of one domain relative to the other occur randomly in the 26 final structures. For the tether region no NMR evidence for  $\alpha$ -helical structure like medium-range NOEs was found (Figure 6A). The dynamics of the tether region of Ca<sup>2+</sup>-loaded CaM in solution indicated flexibility by NOE data, backbone amide hydrogen exchange studies (7), and <sup>15</sup>N NMR relaxation measurements (6). Flexibility of this region can also be concluded for the CaM/C20W complex from the decreased values of the {<sup>1</sup>H}<sup>15</sup>N heteronuclear NOE (Figure 6A). Comparison of the absolute values of the heteronuclear NOE is difficult because the investigations have been carried out under different experimental conditions. The heteronuclear NOE data, however, indicate that the flexibility of CaM/C20W is decreased compared to CaM without target peptide, because different from the free CaM, the values of the heteronuclear NOE for the central helix are larger than for the residues Lys115–Leu116 within the loop region G<sub>113</sub>–T<sub>117</sub> in the C-terminal domain of CaM.

*Comparison of the CaM/C20W Complex with Other CaM/Peptide Complexes.* The most striking difference was noticed in the global structure of the CaM/C20W complex as compared to the complex of CaM with M13, the CaM-binding peptide of MLCK (9). Only the C-terminal half of CaM binds to the peptide, with no detectable contacts between the peptide and the N-terminal half of CaM. As a result, and different from the structures determined previously, the extended structure of CaM appears to be retained in the complex (Figure 1). Local structural differences in the CaM/C20W complex, as compared to the CaM/M13 complex, are also detected. The C20W peptide adopts an  $\alpha$ -helical structure from G<sub>–1</sub> to Q<sub>12</sub>, which extends the helix by one turn toward the N-terminus and reduces it by two turns toward the C-terminus with respect to the helical structure of M13 from W<sub>4</sub> to S<sub>21</sub>. The peptide C20W interacts with CaM via three hydrophobic amino acids (W<sub>4</sub>, L<sub>8</sub>, and I<sub>11</sub>) (Figure 7), corresponding to W<sub>4</sub>, F<sub>8</sub>, and V<sub>11</sub> in the M13 peptide. However, in the CaM/M13 complex only W<sub>4</sub> interacts with M<sub>124</sub> in CaM, whereas in peptide C20W additional contacts with M<sub>124</sub> are made by the residues G<sub>–1</sub> and L<sub>3</sub>. However, in R20 (10), a peptide derived from smMLCK, and also in another peptide derived from CaMKII (11), a contact between M<sub>124</sub> and A<sub>–1</sub> (corresponding to G<sub>–1</sub> in peptide C20W) has been observed. In both cases, the additional N-terminal helical turn observed in peptide C20W is also present. A further difference concerns F<sub>92</sub>, which has NOE contacts only to W<sub>4</sub> in peptide C20W, whereas it interacts with W<sub>4</sub>, N<sub>7</sub>, F<sub>8</sub>, and V<sub>11</sub> in peptide M13. Apparently, the position of V<sub>11</sub> in M13 is critical, since it interacts with both CaM halves (9, 13), whereas the corresponding

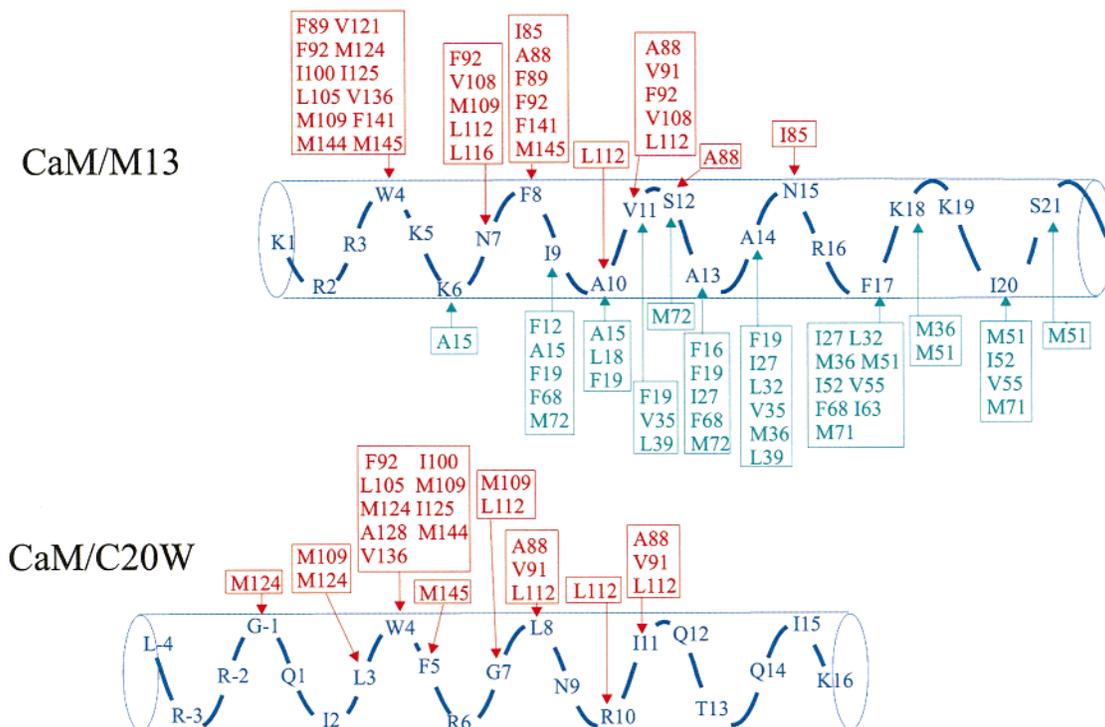


FIGURE 8: Schematic representation of residue pairs for which intermolecular NOEs between CaM and the peptides C20W and M13 are observed.

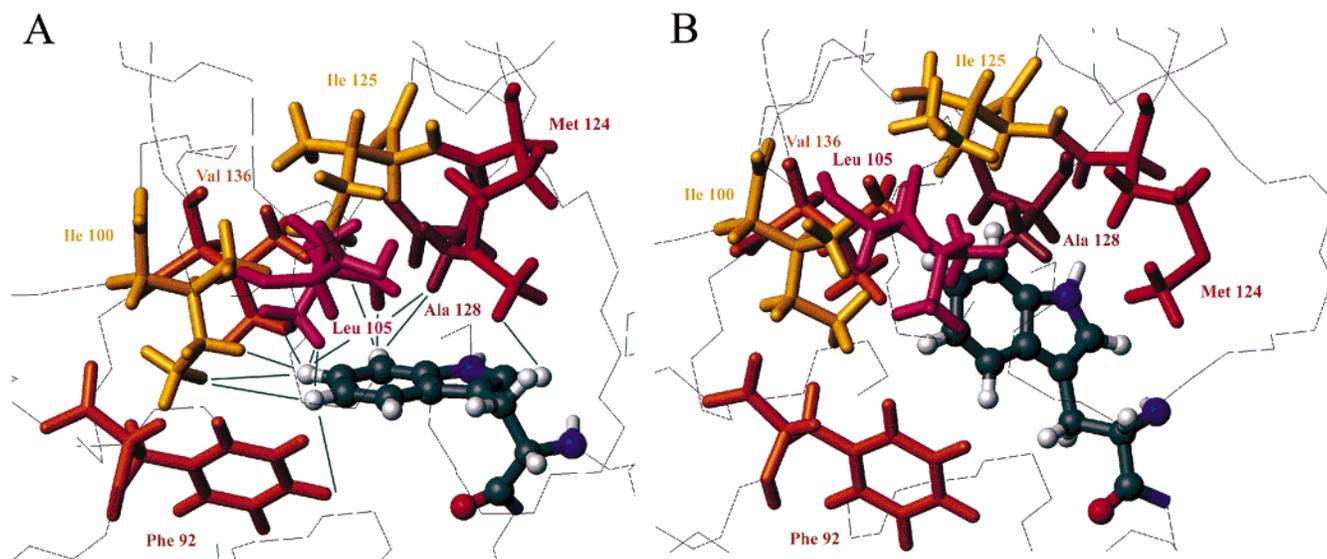


FIGURE 9: Comparison of tryptophan environments in the CaM/C20W (A) and CaM/M13 (B) complexes. The backbones of the C-terminal halves (residues 85–145) of CaM were superimposed (rmsd = 1.47 Å). Experimental NOEs observed between W<sub>4</sub> and the residues of CaM are shown as green lines for CaM/C20W. The plane of the indole ring of W<sub>4</sub> in CaM/C20W is rotated by almost 90° with respect to the one in CaM/M13. In the case of CaM/C20W the C–H $\zeta$ 3 proton is pointing toward the center of the aromatic ring of F<sub>92</sub> leading to a strong upfield shift of –1.30 ppm for this proton (see Figure 10). For CaM/M13 F<sub>92</sub> is further away and the plane normal does not point toward C–H $\zeta$ 3.

I<sub>11</sub> in peptide C20W only interacts with residues in the C-terminal half of CaM (A<sub>88</sub>, V<sub>91</sub>, L<sub>112</sub>). Interestingly, A<sub>10</sub>, the other M13 residue which makes major contacts to both halves of CaM (13), is replaced by an arginine residue in C20W, for which no contacts are observed in the CaM/C20W complex. A summary of the contacts between CaM and the peptides C20W and M13, respectively, is presented in Figure 8.

An interesting observation, however, is made concerning the topological orientation of W<sub>4</sub>: In peptide C20W the orientation of the indole ring is turned about 90° with respect

to M13 (Figure 9). Possibly, the absence of interactions between peptide C20W and the N-terminal half of CaM is responsible for this topological difference. This suggestion is supported by the very similar chemical shift values of the indole ring protons observed in a complex between peptide C20W and the C-terminal tryptic fragment of CaM (TR2C, residues 78–148). In addition, calculations of secondary chemical shifts by the method of Case (71) using the program MOLMOL (65) yields the values given in parentheses in Figure 10. Only contributions of ring currents of neighboring phenyl groups are considered. These values are in good

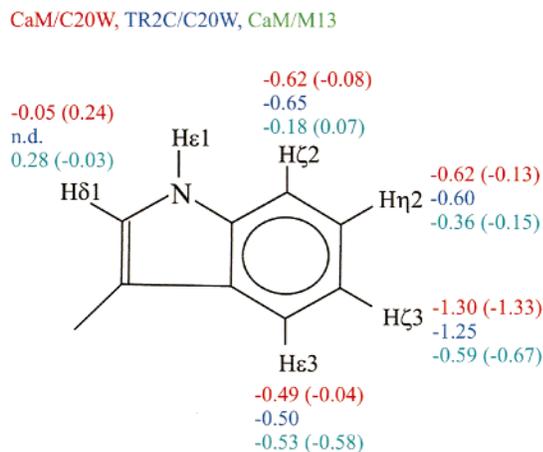


FIGURE 10: Experimental secondary chemical shifts of the tryptophan indole protons of the CaM-bound peptides in CaM/C20W, TR<sub>2</sub>C/C20W and CaM/M13. The Hζ3 proton exhibits an extreme upfield shift in the case of CaM/C20W and TR2C/C20W and a much smaller one in the case of the CaM/M13 complex. Calculated values (70) are shown in parentheses for CaM/C20W and CaM/M13.

agreement with the experimental data: The largest contribution of the extreme shift of the Hζ3 proton arises from the F<sub>92</sub> residue in CaM, whereas the contribution of F<sub>5</sub> in peptide C20W (a lysine in M13) is negligible. This is consistent with the difference in orientation of the tryptophan indole rings in the CaM/C20W and CaM/M13 complexes. As opposed to the CaM/M13 complex, the C–Hζ3 bond is directed toward the center of the aromatic ring of F92 in the CaM/C20W complex (Figure 9). Furthermore, aliphatic protons of CaM residues in spatial proximity to the tryptophan exhibit ring current shifts caused by the tryptophan indole ring which could be confirmed by chemical shift calculations.

The ability of CaM to bind to a wide variety of target peptides, which can differ significantly in their amino acid sequences, appears to be related to the high abundance of methionine residues within CaM as discussed in detail by Osawa et al. (63). The fine adjustment of side-chain conformations of eight out of nine methionine residues can provide optimized interactions with the target peptides. The methionine side chains are very flexible due to an unbranched side chain and a long C–S bond, which enables essentially free rotation about the χ<sub>3</sub> torsion angle. In addition, sulfur has a larger polarizability than carbon, causing stronger van der Waals interactions (72). A comparison of the conformations of the methionines in the binding pocket of the C-terminal domain of CaM (Met109, Met124, Met144, Met145) reveals large differences between the CaM/C20W and CaM/M13 complexes. The εCH<sub>3</sub> group of Met109, which is located above the plane of the aromatic ring of the tryptophan in the CaM/M13 complex, is found close to the α- and β-protons of Trp4 in CaM/C20W with only a small conformational change of the side chain. The side-chain conformations of Met144 and Met145 show large changes, but in both complexes the εCH<sub>3</sub> groups are in close proximity to the Trp4 aromatic ring. Only the side chain of Met124 shows the same conformation in both complexes with the εCH<sub>3</sub> group in contact with the aromatic ring of the tryptophan. The importance of the interaction between Met124 of CaM and the Trp residue in the binding domain of CaMKI (Trp303) for the activation of this kinase has been

recently suggested by Chin et al. (73) on the basis of the point mutation M124Q which led to a 60-fold increase of the activation constant of CaM. Similarly, previous oxidation experiments of methionine residues provided evidence that Met124 is also important for the activation of the Ca<sup>2+</sup> pump by CaM (74). The described conformational differences are in agreement with the observation that the four Met residues of the binding pocket of the C-terminal domain reveal large chemical shift differences between the two complexes (Figure 3C). Since the N-terminal domain is not involved in the binding of the peptide, the εCH<sub>3</sub> groups of the Met residues of the N-terminal domain (Met36, Met51, Met71, Met72) show chemical shifts in the CaM/C20W complex comparable to those in free Ca<sup>2+</sup>-saturated CaM (Figure 3A). In contrast, in the CaM/M13 complex the resonances are well dispersed due to the binding of the N-terminal methionines to the M13 peptide (Figure 3B,C).

In the structure of the CaM/R20 complex residue Glu84 forms a salt bridge to Arg16 in peptide R20 (10). A similar salt bridge to Arg16 may also occur in the CaM/M13 complex and to Lys16 in the CaM/C20W complex studied here: The existence of the salt bridge in the CaM/M13 complex causes chemical shift changes of –0.39/–0.53/–0.31 ppm for the amide protons of the residues Glu82, Glu83, and Glu84 compared to those of free Ca<sup>2+</sup>-CaM. Similar pronounced chemical shift changes (–0.31/–0.38/0.60 ppm) observed for residues Glu82, Glu83, and Glu84 in CaM/C20W suggest the presence of an equivalent environment. Therefore, similar contacts may exist between K<sub>16</sub> of peptide C20W and CaM even though these residues are in a region of CaM not defined by long-range NOEs.

Calculation of SAXS data based on the presented structure qualitatively reproduces the experimental finding as documented previously (26). However, quantitatively, the compaction indicated in the experimental SAXS data is not reproduced, even if the salt bridge (Lys16/Glu84) is taken into account. Modeling (55–58) the heteronuclear relaxation data (*T*<sub>1</sub>, *T*<sub>2</sub>, and heteronuclear NOE) to individual correlation times τ<sub>c</sub> for both domains leads to comparable values (3% difference) for the two domains in CaM/C20W (τ<sub>c</sub><sup>N-terminal</sup> = 9.8 ns; τ<sub>c</sub><sup>C-terminal</sup> = 10.1 ns). This is different from free Ca<sup>2+</sup>-CaM for which a 12% difference in correlation times for the two domains has been reported (6). This is consistent with the SAXS data that show an increased compaction of the CaM/C20W complex as compared to free Ca<sup>2+</sup>-CaM.

**Biological Implications of the Structural Results.** The structure described here may help to understand why the Ca<sup>2+</sup> pump is activated by the isolated C-terminal (and not by the N-terminal) half of CaM. This, together with the significantly higher affinity of peptide C20W for the C-terminal than for the N-terminal half of CaM (75), very likely reflects the finding that only the C-terminal half of CaM interacts with the peptide C20W. This peculiar aspect of the interaction may be due to (1) the lack of the second hydrophobic anchor residue at position 17 and (2) the crucial positions of M13 residues A<sub>10</sub> and V<sub>11</sub> which interact with both halves of CaM in the CaM/M13 complex (13). In the CaM/C20W complex residue I<sub>11</sub>, equivalent to V<sub>11</sub> in M13, interacts instead only with the C-terminal half of CaM. Residue R<sub>10</sub> of C20W (which replaces A<sub>10</sub> of M13) shows no contacts.

Since most CaM targets are not activated by the two separate halves of CaM (18, 19), it is generally concluded

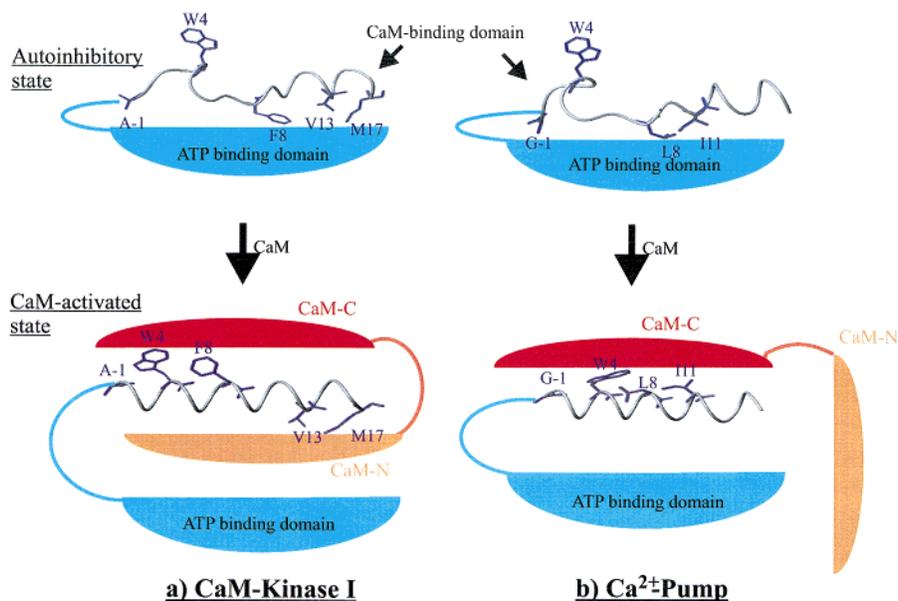


FIGURE 11: Schematic representation illustrating the activation of CaMKI (a) and of the  $\text{Ca}^{2+}$  pump (b) upon binding of CaM. (a) In the absence of CaM, the CaM-binding domain is bound to the ATP-binding domain of CaMKI, resulting in an autoinhibited state (top). In the crystal structure obtained for this state (76) the tryptophan anchor residue is directed outward, suggesting that the initial interaction of the C-terminal half of CaM takes place at this residue. The CaM-binding domain could then undergo a major structural change, adopting  $\alpha$ -helical structure, exposing the other hydrophobic residues F<sub>8</sub>, V<sub>13</sub>, and M<sub>17</sub> to interact with the two halves of CaM, and thereby releasing the ATP-binding domain (bottom). (b) As explained in the text a similar structural model is proposed for the autoinhibited state of the  $\text{Ca}^{2+}$  pump (top) on the basis of the structure of the CaM/C20W complex and the finding that the pump can be activated by the isolated C-terminal half of CaM. After the initial interaction of the C-terminal half of CaM with W<sub>4</sub> the hydrophobic residues L<sub>8</sub> and I<sub>11</sub> are displaced from the region next to the catalytic site of the  $\text{Ca}^{2+}$  pump, thereby releasing the autoinhibited state (bottom). The region of the pump interacting with the CaM-binding domain is defined in the figure as the ATP-binding domain, but it corresponds in fact to the region between the phosphorylated aspartate (D<sub>475</sub>) and the lysine (K<sub>609</sub>), which is a component of the ATP-binding domain.

that efficient activation requires the wrapping of CaM around the binding domain and its locking in position by the two hydrophobic anchoring residues mentioned above. In the structure presented here CaM occupies instead only one half-side of the peptide, indicating that activation, i.e., the displacement of the autoinhibitory peptide from its binding site in the pump, is possible without wrapping CaM around it. Thus, it may be proposed (Figure 11) that in the binding of the autoinhibitory peptide to the pump (Figure 11b) residues L<sub>8</sub> and I<sub>11</sub> [corresponding to L<sub>1111</sub> and I<sub>1114</sub> in the pump (15)], but not W<sub>4</sub>, would establish hydrophobic contacts to the pump to become displaced by the incoming CaM. Figure 11b shows W<sub>4</sub> exposed to the solvent, in analogy to its recently established topology in CaMKI in the absence of CaM (76) (see Figure 11a). The importance of W<sub>4</sub> for the interaction with CaM is underlined by the finding that replacing W<sub>4</sub> by an alanine residue reduces the affinity of the peptide for CaM by more than 1 order of magnitude (24). The hydrophobic amino acids located in the stretch Phe<sub>8</sub>–Met<sub>17</sub> of the CaMKI peptide are expected to bind to CaM, but they also interact with hydrophobic residues of the ATP-binding domain (76) in the kinase. In this context it is of interest that the ATP-binding domain in CaMKI (76) contains a hydrophobic sequence similar to the stretch next to the catalytic region of the  $\text{Ca}^{2+}$  pump (16) which is the acceptor site for the CaM-binding domain: C<sub>537</sub>ALLGFVT<sub>544</sub> (16).

The structure of the CaM/C20W complex may have special significance for the function of the  $\text{Ca}^{2+}$  pump. Differences in affinity of CaM have been described with respect to the two halves of the CaM-binding domain including various isoforms of the pump which differ in the

C-terminal half of the CaM-binding domain due to alternative splicing (23). These variations result in different activation profiles of the pump and lead to the fine modulation of the pump by CaM (14, 18, 75, 77) possibly influencing the apparent affinity of the enzyme for  $\text{Ca}^{2+}$  (77). As a consequence of the fact that the  $\text{Ca}^{2+}$ -loaded C-terminal domain alone activates the pump, we would expect that full CaM loaded with just two  $\text{Ca}^{2+}$  ions would bind and activate the pump as well. Such a conclusion is corroborated by experiments recently conducted on skMLCK (78). SAXS measurements provided evidence that a complex between skMLCK and CaM was formed already at  $(\text{Ca}^{2+})_2$ -CaM. Since  $\text{Ca}^{2+}$  binds first to the C-terminal half of CaM, those results would imply that for CaM-target interactions binding of  $\text{Ca}^{2+}$  to the C-terminal half of CaM would be sufficient. If this interpretation is also valid for the  $\text{Ca}^{2+}$  pump, we could conclude that a complex between CaM and the pump could be formed already at substoichiometric  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations. Since, on the other hand, the C-terminal half of CaM is sufficient for the activation of the  $\text{Ca}^{2+}$  pump, the pump could be active (but at low efficiency) even at the low  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations of the resting cell at which only the  $\text{Ca}^{2+}$  binding sites of the C-terminal half of CaM would be loaded in a CaM– $\text{Ca}^{2+}$  pump complex. This view is in line with the observation that high-affinity binding of C20W to CaM occurs already at a stoichiometry of 2  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM at about 200 nM  $\text{Ca}^{2+}$  concentration (79) compatible with the free  $\text{Ca}^{2+}$  concentration of a resting cell and that intact  $\text{Ca}^{2+}$  binding sites of the C-terminal half of CaM are essential for the activation of the  $\text{Ca}^{2+}$  pump (80).

Thus the interaction between the C-terminal half of CaM and the CaM-binding domain of the pump would be

necessary (and sufficient) to release the autoinhibited state of the enzyme, but not for the full cooperativity typical of the system, thus providing a snapshot of the complex trapped in a step along its way to form the collapsed globular structure.

#### ACKNOWLEDGMENT

We thank M. Nilges, EMBL, Heidelberg, and H. Sticht, University of Bayreuth, for advice on structure calculation. We also thank K. M. Fiebig, Yale University, for drawing our attention to the program CALCROT to calculate SAXS data. This program was written by Ed Lattman, Johns Hopkins University, Baltimore, MD.

#### SUPPORTING INFORMATION AVAILABLE

Table S1 listing the NMR experiments with parameters, Table S2 containing the  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ , and  $^{13}\text{C}$  chemical shift assignments for CaM, Table S3 containing the  $^1\text{H}$  chemical shift assignment for the peptide C20W, and a figure showing the number of NOE restraints per residue. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

#### REFERENCES

- Means, A. R. (1994) *FEBS Lett.* 347, 1–4.
- Cohen, P., and Klee, C. B., Eds. (1988) in *Calmodulin. Molecular Aspects of Cellular Regulation*, Vol. 5, Elsevier, Amsterdam.
- Zhang, M., Tanaka, T., and Ikura, M. (1995) *Nat. Struct. Biol.* 2, 758–767.
- Kuboniva, H., Tjandra, N., Grzesiek, S., Ren, H., Klee, C. B., and Bax, A. (1995) *Nat. Struct. Biol.* 2, 768–776.
- Krebs, J., Bürkler, J., Guerini, D., Brunner, J., and Carafoli, E. (1984) *Biochemistry* 23, 400–403.
- Barbato, G., Ikura, M., Kay, L. E., Pastor, R. W., and Bax, A. (1992) *Biochemistry* 31, 5269–5278.
- Ikura, M., Spera, S., Barbato, G., Kay, L. E., Krinks, M., and Bax, A. (1991) *Biochemistry* 30, 9216–9228.
- Persechini, A., and Kretsinger, R. H. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 12175–12178.
- Ikura, M., Clore, G. M., Gronenborn, A. M., Zhu, G., Klee, C. B., and Bax, A. (1992) *Science* 256, 632–638.
- Meador, W. E., Means, A. R., and Quijcho, F. A. (1992) *Science* 257, 1251–1255.
- Meador, W. E., Means, A. R., and Quijcho, F. A. (1993) *Science* 263, 1718–1721.
- Babu, Y. S., Sack, J. S., Greenhough, T. J., Bugg, C. E., Means, A. R., and Cook, W. J. (1985) *Nature* 315, 37–40.
- Clore, G. M., Bax, A., Ikura, M., and Gronenborn, A. (1993) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3, 838–845.
- Carafoli, E. (1995) *FASEB J.* 8, 993–1002.
- Verma, A. K., Filoteo, A. G., Stanford, D. R., Wieben, E. D., Penniston, J. T., Strehler, E. E., Fischer, R., Heim, R., Vogel, G., Mathews, S., Strehler-Page, M.-A., James, P., Vorherr, T., Krebs, J., and Carafoli, E. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 14152–14159.
- Falchetto, R., Vorherr, T., Brunner, J., and Carafoli, E. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 2930–2936.
- Falchetto, R., Vorherr, T., and Carafoli, E. (1992) *Protein Sci.* 1, 1613–1621.
- Guerini, D., Krebs, J., and Carafoli, E. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 15172–15177.
- Newton, D. L., Oldewurtel, M. D., Krinks, M. H., Shiloach, J., and Klee, C. B. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 4419–4426.
- Barth, A., Martin, S. R., and Bayley, P. M. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 2174–2183.
- Klump, S., Guerini, D., Krebs, J., and Schultz, J. E. (1987) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 142, 857–864.
- Kuznicki, J., Grabarek, Z., Brzeska, H., Drabikowski, W., and Cohen, P. (1981) *FEBS Lett.* 130, 141–145.
- Strehler, E. E. (1991) *J. Membr. Biol.* 120, 1–15.
- Vorherr, T., James, P., Krebs, J., Enyedi, A., McCormick, D. J., Penniston, J. T., and Carafoli, E. (1990) *Biochemistry* 29, 355–365.
- Trewhella, J. (1994) in *Structural Biology: The State of the Art* (Sarma, R. H., and Sarma, M. H., Eds.) Adenine Press, Guilderland, NY.
- Kataoka, M., Head, J. F., Vorherr, T., Krebs, J., and Carafoli, E. (1991) *Biochemistry* 30, 6247–6251.
- Chien, Y., and Dawid I. (1984) *Mol. Cell. Biol.* 4, 507–513.
- Shatzman, A. R., and Rosenberg, M. (1987) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 478, 233–248.
- Ikura, M., Kay, L. E., Krinks, M., and Bax, A. (1991) *Biochemistry* 30, 5498–5504.
- Walsh, M., Stevens, F. C., Kuznicki, J., and Drabikowski, W. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 7440–7443.
- Toda, H., Yazawa, M., Kondo, K., Honma, T., Narita, K., and Yagi, K. (1981) *J. Biochem. (Tokyo)* 90, 1493–1505.
- Muhandiram, D. R., and Kay, L. E. (1994) *J. Magn. Reson. B* 103, 203–216.
- Schleucher, J., Schwendinger, M., Sattler, M., Schmidt, P., Schedletzky, O., Glaser, S. J., Sørensen, O. W., and Griesinger, C. (1994) *J. Biomol. NMR* 4, 301–306.
- Palmer, A. G., Cavanagh, J., Wright, P. E., and Rance, M. (1991) *J. Magn. Reson.* 93, 151–170.
- Kay, L. E., Xu, G. Y., and Yamazaki, T. (1994) *J. Magn. Reson. A* 109, 129–133.
- Marion, D., Ikura, M., Tschudin, R., and Bax, A. (1989) *J. Magn. Reson.* 85, 393–399.
- Wishart, D. S., Bigam, C. G., Yao, J., Abildgaard, F., Dyson, H. J., Oldfield, E., Markley, J. L., and Sykes, B. D. (1995) *J. Biomol. NMR* 6, 135–140.
- Bax, A., and Grzesiek, S. (1993) *Acc. Chem. Res.* 26, 131–138.
- Grzesiek, S., Anglister, J., and Bax, A. (1993) *J. Magn. Reson. B* 101, 114–119.
- Vuister, G. W., and Bax, A. (1993) *J. Am. Chem. Soc.* 115, 7772–7777.
- Fesik, S. W., and Zuiderweg, E. R. P. (1988) *J. Magn. Reson.* 78, 588–593.
- Fesik, S. W., Eaton, H. L., Olejniczak, E. T., Zuiderweg, E. R. P., McIntosh, L. P., and Dahlquist, F. W. (1990) *J. Am. Chem. Soc.* 112, 886–888.
- Montelione, G. T., Lyons, B. A., Emerson, S. D., and Tashiro, M. (1992) *J. Am. Chem. Soc.* 114, 10974–10975; Lyons, B. A., and Montelione, G. T. (1993) *J. Magn. Reson. B* 101, 206–209; Logan, T. M., Olejniczak, E. T., Zhu, R. X., and Fesik, S. W. (1993) *J. Biomol. NMR* 3, 225–231.
- Carlomagno, T., Maurer, M., Sattler, M., Schwendinger, M. G., Glaser, S. J., and Griesinger, C. (1996) *J. Biomol. NMR* 8, 161–170.
- Bax, A., Delaglio, F., Grzesiek, S., and Vuister, G. W. (1994) *J. Biomol. NMR* 4, 787–797.
- Ikura, M., Kay, L. E., Tschudin, R., and Bax, A. (1990) *J. Magn. Reson.* 86, 204–209.
- Zwahlen, C., Legault, P., Vincent, S. J. F., Greenblatt, J., Konrat, R., and Kay, L. E. (1997) *J. Am. Chem. Soc.* 119, 6711–6721.
- Kuboniva, H., Grzesiek, S., Delaglio, F., and Bax, A. (1994) *J. Biomol. NMR* 4, 871–878.
- Hu, J.-S., Grzesiek, S., and Bax, A. (1997) *J. Am. Chem. Soc.* 119, 1803–1804.
- 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., and Kay, L. E. (1994) *Biochemistry* 33, 5984–6003.
- Dayie, K. T., and Wagner, G. (1994) *J. Magn. Reson. A* 111, 121–126.
- Boyd, J., Hommel, U., and Campbell, I. D. (1990) *Chem. Phys. Lett.* 175, 477.
- Palmer, A. G., Skelton, N. J., Chazin, W. J., Wright, P. E., and Rance, M. (1992) *Mol. Phys.* 75, 699.
- Kay, L. E., Nicholson, L. K., Delaglio, F., Bax, A., and Torchia, D. A. (1992) *J. Magn. Reson.* 97, 359.

55. Lipari, G., and Szabo, A. (1982) *J. Am. Chem. Soc.* *104*, 4546–4559.
56. Lipari, G., and Szabo, A. (1982) *J. Am. Chem. Soc.* *104*, 4559–4570.
57. Palmer, A. G., Rance, M., and Wright, P. E. (1991) *J. Am. Chem. Soc.* *113*, 4371–4380.
58. Mandel, A. M., Akke, M., and Palmer, A. G. (1995) *J. Mol. Biol.* *246*, 144–163.
59. Clore, G., Gronenborn, A., Nilges, M., and Ryan, C. (1987) *Biochemistry* *26*, 8012–8023.
60. Wishart, D. S., Sykes, B. D., and Richards, F. M. (1991) *J. Mol. Biol.* *222*, 311–333.
61. Deslauriers, R., and Smith, I. C. P. (1980) in *Biological Magnetic Resonance* (Berliner, L. J., and Reuben, J., Eds.) Vol. 2, pp 286–288, Plenum Press, New York.
62. Baxter, N. J., and Williamson, M. P. (1997) *J. Biomol. NMR* *9*, 359–369.
63. Osawa, M., Swindells, M. B., Tanikawa, J., Tanaka, T., Mase, T., Furuya, T., and Ikura, M. (1998) *J. Mol. Biol.* *276*, 165–176.
64. Brünger, A. T. (1992) *X-PLOR: A System for X-ray Crystallography and NMR*, Yale University Press, New Haven, CT.
65. Konradi, R., Billeter, M., and Wüthrich, K. (1996) *J. Mol. Graphics* *14*, 51–55.
66. Ikura, M., Kay, L. E., and Bax, A. (1990) *Biochemistry* *29*, 4659–4667.
67. O'Neil, K. T., and DeGrado, W. F. (1990) *Trends Biochem. Sci.* *15*, 59–64.
68. Siivari, K., Zhang, M., Palmer, A. G., III, and Vogel, H. J. (1995) *FEBS Lett.* *366*, 104–108.
69. Laskowski, R. A., Rullmann, J. A. C., MacArthur, M. W., Kaptein, R., and Thornton, J. M. (1996) *J. Biomol. NMR* *8*, 477–486.
70. Nilges, M., and O'Donoghue, S. I. (1998) *Prog. NMR Spectrosc.* *32*, 107–139.
71. Case, D. A. (1995) *J. Biomol. NMR* *6*, 341–346.
72. Gellman, S. H. (1991) *Biochemistry* *30*, 6633–6626.
73. Chin, D., Winkler, K. E., and Means, A. R. (1997) *J. Biol. Chem.* *272*, 31235–31240.
74. Guerini, D., Krebs, J., and Carafoli, E. (1987) *Eur. J. Biochem.* *170*, 35–42.
75. Vorherr, T., Quadroni, M., Krebs, J., and Carafoli, E. (1992) *Biochemistry* *31*, 8245–8251.
76. Goldberg, J., Nairn, A. C., and Kuriyan, J. (1996) *Cell* *84*, 875–887.
77. Enyedi, A., Verma, A. K., Heim, R., Adamo, H. P., Filoteo, A. G., Strehler, E. E., and Penniston, J. P. (1994) *J. Biol. Chem.* *269*, 41–43.
78. Krueger, J. K., Bishop, N. A., Blumenthal, D. K., Zhi, G., Beckingham, K., Stull, J. T., and Trewbella, J. (1998) *Biochemistry* *37*, 17810–17817.
79. Yazawa, M., Vorherr, T., James, P., Carafoli, E., and Yagi, K. (1992) *Biochemistry* *31*, 3171–3176.
80. Gao, Z. H., Krebs, J., Van Berkum, M. F. A., Tang, W.-J., Maune, J. F., Gilman, A. G., Means, A. R., Stull, J. T., and Beckingham, K. (1993) *J. Biol. Chem.* *268*, 20096–20104.

BI9908235

## 6.10 Literatur

---

183. Chien, Y., and Dawid I. (1984) *Mol. Cell Biol.* 4, 507-513.
184. Shatzman, A.R., and Rosenberg, M. (1987) *Ann. N. Y. Acad. Sci. U.S.A* 478, 233-248.
185. Vorherr, T., James, P., Krebs, J., Enyedi, A., McCormick, D.J., Penniston, J.T., and Carafoli, E. (1990) *Biochemistry* 29, 355-365.
186. Creighton, T.E. (1993) *Proteins, Structures and Molecular Properties*, 2<sup>nd</sup> Ed., S. 14, Freeman and Company.
187. Muhandiram, D. R. and Kay, L. E. (1994) *J. Magn. Reson. B* 103, 203-216.
188. Schleucher, J., Schwendinger, M., Sattler, M., Schmidt, P., Schedletzky, O., Glaser, S.J., Sørensen, O.W., and Griesinger, C. (1994) *J. Biomol. NMR* 4, 301-306.
189. Palmer, A. G., Cavanagh, J., Wright, P. E., and Rance, M. (1991) *J. Magn. Reson.* 93, 151-170.
190. Kay, L. E., Xu, G. Y., and Yamazaki, T. (1994) *J. Magn. Reson. A* 109, 129-133.
191. Marion, D., Ikura, M., Tschudin, R., and Bax, A. (1989) *J. Magn. Reson.* 85, 393-399.
192. Wishart, D. S., Bigam, C. G., Yao, J., Abildgaard, F., Dyson, H. J., Oldfield, E., Markley, J. L., and Sykes, B. D. (1995) *J. Biomol. NMR* 6, 135-140.

## Lebenslauf

Name: Bettina Elshorst, geb. Baumann

Geboren am: 28.8.1970 in München

Eltern: Ernst Baumann, Diplom-Ingenieur und Baudirektor  
Ortrun Baumann, geb. Wolf, Hausfrau

Familienstand: 25.4.1996 Heirat mit David Elshorst, Rechtsanwalt

Kinder: 20.7.1996 Geburt der Tochter Hannah  
17.5.1999 Geburt der Tochter Katharina

Anschrift: Schwarzburgstr. 52  
60318 Frankfurt  
Tel.: 069/59793545

Schulbildung: 1976 - 1980 Grundschule Planegg bei München  
1981 - 1989 Feodor-Lynen-Gymnasium, Planegg  
Mai 1989 Abiturprüfung ( Note 1,3 )

Studium: WS 89/90 Beginn des Studiums Chemie, Diplom an der  
Universität Bayreuth  
Oktober 1991 Vordiplomprüfung ( Note 1,0 )  
Dezember 1994 bis Juli 1995 Diplomarbeit am Lehrstuhl für  
Struktur und Chemie der Biopolymere bei Prof. Dr. Rösch  
Juli 1995 Diplomprüfung ( Note 1,0)

Stipendium: Stipendiatin der Studienstiftung des Deutschen Volkes von  
März 1993 bis Juli 1995

Promotion: September 1995 Beginn der Promotion am Lehrstuhl für  
Organische Chemie bei Prof. Dr. Griesinger  
Oktober 1996 bis März 1997 Wiedereinstiegsstipendium für  
Frauen von der Universität Frankfurt

Meine akademischen Lehrer waren:

Prof. Dr. H. G. Alt, Prof. Dr. C. D. Eisenbach, Prof. Dr. H. J. Gerlach, Prof. Dr. C. Griesinger, Prof. Dr. M. Herberhold, Prof. Dr. H. Hoffmann, Prof. Dr. G. Krauss, Prof. Dr. H.-L. Krauss, Prof. Dr. Morys, Prof. Dr. G. Platz, Prof. Dr. P. Rösch, Prof. Dr. F.-X. Schmid, Prof. Dr. M. Schmidt, Prof. Dr. W. Schnick, Prof. Dr. K. Seifert, Prof. Dr. G. Spittler, Prof. Dr. M. Sprinzl, Prof. Dr. A. Wokaun, Prof. Dr. B. Wrackmeyer

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Zuhilfenahme der genannten Literatur und der erwähnten Hilfen angefertigt habe.

Frankfurt, den 06.02.2001

*Bettina Elshorst*

(Bettina Elshorst)