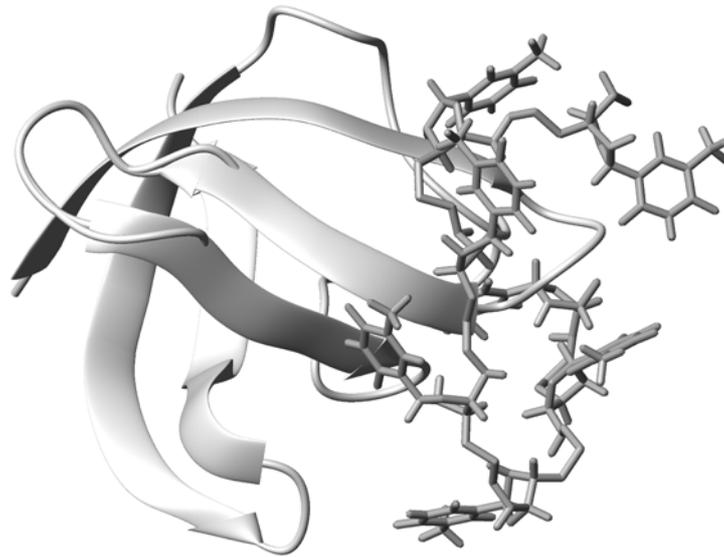


Laboratorium für Biochemie, Universität Bayreuth

**Strukturbiologische Untersuchungen und Faltungsstudien von  
Modellproteinen mittels NMR-Spektroskopie**



**Markus Wolfgang Zeeb**

Bayreuth 2004

**Strukturbiologische Untersuchungen und Faltungsstudien von  
Modellproteinen mittels NMR-Spektroskopie**

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften  
der Universität Bayreuth

vorgelegt von

Diplom-Biochemiker  
**Markus Wolfgang Zeeb**

Bayreuth 2004

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth zur Erlangung des akademischen Grades -Doktor der Naturwissenschaften- genehmigten Dissertation.

Diese Arbeit wurde von April 2000 bis Februar 2004 am Lehrstuhl für Biochemie der Universität Bayreuth unter der Anleitung von PD Dr. Jochen Balbach angefertigt.

Promotionsgesuch eingereicht am: 02. Februar 2004

Tag des wissenschaftlichen Kolloquiums: 07. Mai 2004

Prüfungsausschuss:

PD Dr. Jochen Balbach (Erster Gutachter)

Prof. Dr. Paul Rösch (Zweiter Gutachter)

Prof. Dr. Georg Krausch

Prof. Dr. Carlo Unverzagt

Prof. Dr. Mathias Sprinzl (Vorsitzender)



## INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG .....	1
1.1 Das Proteinfaltungsproblem.....	1
1.2 NMR-Spektroskopie zum Studium der Proteinfaltung.....	7
1.3 Millisekundenfaltung und DNA-Bindung: Das Modellprotein CspB aus <i>B. subtilis</i> ....	11
1.4 Das dimere Modellprotein ORF56 aus dem extremophilen Archäon <i>S. islandicus</i> .....	14
1.5 Der humane CDK-Inhibitor p19 <sup>INK4d</sup> .....	16
1.6 Studium langsamer Faltungsreaktionen: Das Modellprotein RNase T1 aus <i>A. oryzae</i> .	19
1.7 Problemstellung und Ziele der vorliegenden Arbeit.....	22
2. MATERIAL UND METHODEN .....	24
2.1 Materialien .....	24
2.1.1 <i>Biochemikalien, Chemikalien und Säulenmaterialien</i> .....	24
2.1.2 <i>Nährmedien</i> .....	24
2.1.3 <i>Bakterienstämme</i> .....	25
2.1.4 <i>Verbrauchsmaterialien</i> .....	25
2.1.5 <i>Geräte</i> .....	25
2.1.6 <i>Software</i> .....	26
2.2 Allgemeine molekularbiologische Methoden .....	26
2.2.1 <i>Agarose-Gelelektrophorese</i> .....	26
2.2.2 <i>Isolierung von Plasmid-DNA</i> .....	26
2.2.3 <i>Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Kolonie-PCR</i> .....	27
2.2.4 <i>Reinigung von PCR-Fragmenten</i> .....	27
2.2.5 <i>Sequenzspezifische Mutagenese (QuikChange)</i> .....	28
2.2.6 <i>Herstellung und Transformation CaCl<sub>2</sub>-kompetenter E. coli-Zellen</i> .....	28
2.2.7 <i>Herstellung und Transformation elektrokompeter E. coli-Zellen</i> .....	29
2.2.8 <i>Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese</i> .....	29
2.3 Gewinnung von Proteinen.....	30
2.3.1 <i>Reinigung des Kälteschockproteins CspB und verschiedener Varianten</i> .....	30
2.3.2 <i>Reinigung des Proteins ORF56</i> .....	31
2.3.3 <i>Reinigung des CDK-Inhibitors p19<sup>INK4d</sup></i> .....	32
2.3.4 <i>Reinigung von S54G/P55N RNase T1</i> .....	32
2.4 Spektroskopische Methoden .....	34
2.4.1 <i>Photometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinen und DNA</i> .....	34
2.4.2 <i>Fluoreszenzspektren</i> .....	34
2.4.3 <i>Circular dichroismusspektren</i> .....	35
2.4.4 <i>Konzentrationsbestimmung von GdmCl und Harnstoff</i> .....	35
2.4.5 <i>Messung und Auswertung Denaturierungsmittel-induzierter Übergänge</i> .....	35
2.4.6 <i>Messung und Auswertung thermisch induzierter Entfaltungsübergänge</i> .....	37
2.4.7 <i>Bestimmung der Stöchiometrie und Affinität von CspB/ssDNA-Komplexen</i> .....	38
2.4.8 <i>Messung und Auswertung von Faltungskinetiken</i> .....	39
2.4.9 <i>Nachweis von Prolyl-cis/trans-Isomerisierungen</i> .....	42
2.4.10 <i>Bestimmung von Assoziations- und Dissoziationsraten von Komplexen</i> .....	42
2.5 NMR-spektroskopische Methoden .....	43
2.5.1 <i>NMR-Experimente zur Bestimmung der Tertiärstruktur von Proteinen</i> .....	43
2.5.2 <i>Diffusionsmessungen zur Bestimmung des hydrodynamischen Radius</i> .....	50
2.5.3 <i>Messung von Relaxationsparametern für die Lipari-Szabo-Analyse</i> .....	52
2.5.4 <i>Modelunabhängige Analyse von Relaxationsparametern nach Lipari &amp; Szabo</i> ...	56
2.5.5 <i>Relaxations-kompensierte CPMG-Pulssequenzen (R<sub>2</sub>-Dispersion)</i> .....	59
2.5.6 <i>ZZ-Austauschspektroskopie</i> .....	62
2.5.7 <i>Eindimensionale Echtzeit NMR-Spektroskopie</i> .....	68
2.5.8 <i>Mehrdimensionale Echtzeit NMR-Spektroskopie</i> .....	70
3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION .....	73
3.1 Relaxation von CspB bei verschiedenen Lösungsmittelviskositäten.....	73
3.1.1 <i>Der Einfluss von Ethylenglykol auf die Relaxationsparameter von CspB</i> .....	73
3.1.2 <i>Erweiterte Lipari-Szabo-Analyse zur Bestimmung der Rotationskorrelationszeit</i> 76	76

3.1.3	<i>Bewegungsparameter der Lipari-Szabo-Analyse bei verschiedenen Viskositäten</i>	79
3.1.4	<i>Diffusion und hydrodynamischer Radius bei verschiedenen Viskositäten</i>	83
3.2	Nukleinsäurebindung von CspB	85
3.2.1	<i>Charakterisierung der Beiträge einzelner Reste zur Bindung von Y-Box25</i>	85
3.2.2	<i>Bindung von Heptathymidat (dT7) an CspB</i>	89
3.2.3	<i>Bestimmung der Tertiärstruktur von CspB im Komplex mit dT7</i>	91
3.2.4	<i>Modellierung der Struktur des CspB/dT7-Nukleoproteinkomplexes</i>	100
3.2.5	<i>Charakterisierung der Beiträge einzelner Aminosäuren zur Bindung von dT7</i>	102
3.2.6	<i>Vergleich der internen Dynamik von freiem und dT7-gebundenem CspB</i>	105
3.2.7	<i>Stabilisierung von CspB durch Bindung an dT7</i>	110
3.2.8	<i>Suche nach weiteren guten Bindern</i>	114
3.3	Studium der schnellen Faltung von CspB mit NMR-Spektroskopie	117
3.3.1	<i>ZZ-Austausch NMR Spektroskopie</i>	118
3.3.2	<i>Charakterisierung der Proteinfaltung mit R<sub>2</sub>-Dispersionsmessungen</i>	121
3.4	Das extrem stabile dimere Protein ORF56 von <i>Sulfolobus islandicus</i>	132
3.4.1	<i>Strukturbestimmung von ORF56 mittels NMR-Spektroskopie</i>	132
3.4.2	<i>Die außerordentlich hohe Stabilität von ORF56</i>	138
3.4.3	<i>Konzentrationsabhängigkeit des Entfaltungsmittelpunkts</i>	140
3.4.4	<i>NMR spektroskopischer Nachweis des Zweizustandsmodells</i>	144
3.4.5	<i>Salz- und pH-Abhängigkeit der Stabilität</i>	147
3.4.6	<i>Kinetische Untersuchungen: Konzentrationsabhängigkeit der Rückfaltung</i>	151
3.4.7	<i>GdmCl-Abhängigkeit der Rück- und Entfaltungsraten</i>	153
3.5	Faltung des humanen CDK-Inhibitors p19 <sup>INK4d</sup>	157
3.5.1	<i>Spektroskopische Charakterisierung der Gleichgewichtsstabilität von p19<sup>INK4d</sup></i>	157
3.5.2	<i>NMR-spektroskopische Detektion eines Harnstoff-induzierten Übergangs</i>	159
3.5.3	<i>Kinetische Experimente: CD-stopped flow und Echtzeit NMR-Spektroskopie</i>	165
3.5.4	<i>Weiterführende Arbeiten</i>	169
3.6	Echtzeit NMR-Spektroskopie zum Studium der langsamen Faltung von RNase T1	170
3.6.1	<i>Eindimensionale Echtzeit NMR-Spektroskopie mit S54G/P55N RNase T1</i>	170
3.6.2	<i>Zweidimensionale Echtzeit NMR-Spektroskopie mit S54G/P55N RNase T1</i>	174
3.6.3	<i>Dreidimensionale Echtzeit NMR-Spektroskopie mit S54G/P55N RNase T1</i>	181
4.	ZUSAMMENFASSENDER DISKUSSION	185
4.1	Strukturbestimmung und Charakterisierung von spezifischen Interaktionen	185
4.2	Dynamische Prozesse und Proteinfaltung	189
4.3	Das dimere Protein ORF56 faltet nach dem Zweizustandsmodell	193
4.4	Die Prolin-limitierte Faltung von S54G/P55N RNase T1	197
4.5	Die komplexe Faltungsreaktion des humanen CDK-Inhibitors p19 <sup>INK4d</sup>	200
5.	ZUSAMMENFASSUNG	207
6.	SUMMARY	211
7.	ABKÜRZUNGEN	215
8.	LITERATURVERZEICHNIS	217
9.	ANHANG	233
9.1	Pulsprogramme zur Aufnahme von NMR-Spektren	233
9.2	Zuordnung von CspB im Komplex mit dT7	250
9.3	Zuordnung von ORF56	251
9.4	Relaxations- und Bewegungsparameter von CspB bei verschiedenen Viskositäten	252
9.5	Relaxations- und Bewegungsparameter von CspB im Komplex mit dT7	258
9.6	Resultate der R <sub>2</sub> -Dispersionsmessungen an CspB bei 0 M Harnstoff	260
10.	EIGENE PUBLIKATIONEN	262
11.	DANKSAGUNG	263
12.	ERKLÄRUNG	265

# 1. EINLEITUNG

## 1.1 Das Proteinfaltungsproblem

Auch über 40 Jahre nach der Formulierung des Proteinfaltungsproblems hat diese zentrale Fragestellung in der Biochemie der Proteine nichts an ihrer Faszination verloren. Proteine werden als lineare Polypeptidketten an Ribosomen synthetisiert und stellen die wohl vielseitigste Klasse von Biomakromolekülen dar. Dabei enthält die Aminosäuresequenz die Information für die Ausbildung der funktionalen dreidimensionalen Struktur des Proteins. Der Prozess, der von der linearen Polypeptidkette zur nativen Tertiärstruktur führt, wird als Proteinfaltung bezeichnet (Jaenicke, 1987). Anfinsen und Mitarbeiter zeigten mit Hilfe von Renaturierungsexperimenten mit pankreatischer RNase A, dass dieser Vorgang reversibel verläuft (Anfinsen, *et al.*, 1961) und dass die Information für die korrekte Faltung eines Proteins ebenfalls in der Aminosäuresequenz enthalten ist (Anfinsen, 1973). Dies führte dazu, dass die Proteinfaltung auch als die zweite Hälfte des genetischen Codes verstanden wird (Goldberg, 1985). Die native Struktur eines Proteins stellt einen thermodynamisch stabilen Zustand dar. Seine kinetische Kontrolle darin besteht, dass er innerhalb einer physiologisch sinnvollen Zeit erreicht sein sollte (Schmid, 1999). Die Triebkraft der Faltung stellt dabei der Unterschied der freien Enthalpie des nativen und entfalteten Zustands dar (Jaenicke, 1996). Dieser Unterschied ist jedoch nur marginal und liegt üblicherweise zwischen 30 kJ/mol und 70 kJ/mol (Jaenicke, 1991). Die Stabilisierung des nativen Zustands erfolgt hauptsächlich über nicht-kovalente Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrücken sowie hydrophobe, elektrostatische und van der Waals-Wechselwirkungen. Eine Vielzahl dieser großen Energiebeiträge kompensiert sich in der natürlichen Umgebung der Polypeptidkette.

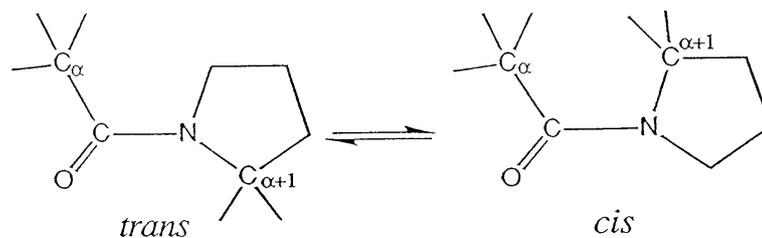
Eine prinzipielle Frage der Proteinfaltung besteht darin, wie die lineare Polypeptidkette die native Struktur schnell und effizient erreicht. Das sogenannte Levinthal'sche Paradoxon verdeutlicht, dass eine zufällige Suche innerhalb des Konformationsraums aufgrund der astronomisch großen Zahl von möglichen Konformationen des entfalteten Zustands, nicht mit der in der Natur realisierten Faltungsraten vereinbar ist (Levinthal, 1969). So würde ein kleines 100 Aminosäuren enthaltendes Eindomänenprotein bereits  $10^{27}$  Jahre benötigen, um seine native Struktur in einem Zufallsprozess zu finden (Baldwin & Eisenberg, 1987). Daher schlug Levinthal vor, dass die Bildung von teilgefalteten Zuständen, sogenannten Faltungsintermediaten, den Konformationsraum eines faltenden Proteins schnell einschränkt und dadurch die Faltung in einem physiologisch sinnvollen Zeitbereich erfolgen kann (Levinthal, 1969). Heute wissen wir, dass der Polypeptidkette aus energetischen und

sterischen Gründen nur einen sehr kleinen Teil dieses Konformationsraums zur Verfügung stehen kann. Trotzdem hat das Levinthal'sche Bild das Studium des Proteinfaltungsproblems ganz nachhaltig geprägt. Tatsächlich wurden für viele Modellproteine Faltungsintermediate während der Rückfaltung gefunden (Baldwin, 1993, Matthews, 1993, Ptitsyn, *et al.*, 1990), wodurch hohe Faltungsraten traditionell durch einen hierarchischen Faltungsmechanismus erklärt wurden (Kim & Baldwin, 1982, Kim & Baldwin, 1990), in dem teilgefaltete Intermediate die Vielzahl der möglichen Konformationen des entfalteten Zustands auf einige wenige produktive Konformationen eingrenzen. Beispiele dafür stellen Lysozym (Radford, *et al.*, 1992), BPTI (Weissman & Kim, 1991), RNase A (Udgaonkar & Baldwin, 1990), Trp-Aporepressor (Mann & Matthews, 1993) und Im7 (Capaldi, *et al.*, 2001) dar. Allerdings kann solch eine frühe Strukturbildung auch zu einer starken Verlangsamung der Faltung führen (Kiefhaber, *et al.*, 1992a) oder gar kinetische Fallen darstellen (Baldwin, 1996, Creighton, 1994, Creighton, *et al.*, 1996). Langlebige Faltungsintermediate können eine erhöhte Aggregationsneigung zeigen, da in diesen Zuständen häufig noch große hydrophobe Bereiche lösungsmittlexponiert vorliegen. Daher wird im Allgemeinen zwischen *on pathway* Intermediaten, die produktiv und direkt auf dem Faltungsweg liegen (Khorasanizadeh, *et al.*, 1996), und teilweise missgefalteten *off pathway* Intermediaten, die in einem lokalen Energieminimum gefangen sind (Creighton, *et al.*, 1996), unterschieden.

Durch die Untersuchungen von Proteinen wie dem Chymotrypsininhibitor 2 (Jackson & Fersht, 1991a), dem AcylCoA-Bindungsprotein (Kragelund, *et al.*, 1995), der Acylphosphatase (Chiti, *et al.*, 1999), dem Kälteschockprotein CspB (Schindler, *et al.*, 1995), dem monomeren  $\lambda$ -Repressor (Huang & Oas, 1995), der C-terminalen Domäne des Prion-Proteins (Wildegger, *et al.*, 1999) oder dem Amylase-Inhibitor Tendamistat (Schönbrunner, *et al.*, 1997), die in wenigen Millisekunden in einem einzigen kooperativen Schritt die native Struktur erreichen, wurde die ursprüngliche Bedeutung der Faltungsintermediate weiter relativiert. Verläuft die Faltung in Abwesenheit von Intermediaten, kann daraus ein Zweizustandsmodell abgeleitet werden, in dem nur der entfaltete und native Zustand im Gleichgewicht vorliegen. Proteine, die nach dem Zweizustandsmodell analysiert werden können, eignen sich sehr gut zur Untersuchung elementarer Faltungsreaktionen.

Abweichungen von dem einfachen Zweizustandsmodell wurden zunächst als kooperative sequentielle Faltungsschritte oder die Bildung unproduktiver Intermediate interpretiert (Ikai & Tanford, 1971, Tsong & Baldwin, 1972a, Tsong & Baldwin, 1972b). Später konnten Garel & Baldwin zeigen, dass bei der Rückfaltung von RNase A sowohl die schnelle als auch die langsame Phase enzymatisch aktives Protein ergeben (Garel & Baldwin, 1973). Das bedeutet,

dass der entfaltete Zustand heterogen ist, da langsam und schnell faltende Proteinmoleküle  $U_s$  bzw.  $U_f$  vorliegen. Dies führte zur Formulierung der Prolinhypothese die besagt, dass aufgrund der besonderen konformationellen Eigenschaften der Peptidylprolylbindung langsam und schnell faltende Spezies unterschieden werden können (Brandts, *et al.*, 1975). Peptidbindungen besitzen partiellen Doppelbindungscharakter, wodurch diese in einer *cis*- und *trans*-Konformation vorkommen können. Bei Nicht-Peptidyl-Prolylbindungen ist die *trans*-Konformation energetisch stark begünstigt (Jorgensen & Gao, 1988, Ramachandran & Mitra, 1976), so dass im Zeitmittel nur zwischen 0.1% bis 1% in der *cis*-Konformation vorliegen. In Proteinstrukturen ist der Anteil der *cis*-Konformation in Peptidyl-Prolylbindungen stark erhöht und liegt um 7% (Stewart, *et al.*, 1990). Die *trans/cis*-Isomerisierung der Peptidyl-Prolylbindung (Abb. 1) besitzt eine sehr hohe Aktivierungsbarriere von 85 kJ/mol (Brandts, *et al.*, 1975), so dass diese Isomerisierung eine intrinsisch langsame Faltungsreaktion mit Zeitkonstanten zwischen 10 s und 100 s bei 25 °C bedingt.



**Abb. 1:** *trans/cis*-Isomerisierung der Peptidyl-Prolylbindung. Das Gleichgewicht liegt in Peptiden und entfalteten Proteinen zwischen 70% und 90% auf der Seite der *trans*-Konformation (Balbach & Schmid, 2000).

Der Anteil der Peptidyl-Prolylbindungen in der *cis*-Konformation erhöht sich in unstrukturierten Peptiden und entfalteten Proteinen im Vergleich zu nativen Proteinen signifikant auf 10% bis 30% (Cheng & Bovey, 1977, Grathwohl & Wüthrich, 1981). Die *cis/trans*-Isomerisierung führt zu der Aufspaltung des entfalteten Zustands in die beiden Spezies  $U_f$  und  $U_s$ , wobei sich die schnell faltenden Spezies dadurch auszeichnen, dass sie im entfalteten Zustand die Konformation der Peptidyl-Prolylbindung enthalten, die auch in der nativen Struktur vorliegt. Im Gegensatz dazu besitzen die langsam faltenden Spezies dasjenige Prolylisomer, welches nicht in die native Struktur eingepasst werden kann und somit die Faltung aufgrund der Isomerisierung verlangsamt wird. In vielen Fällen wird vor der Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung ein nativähnliches Faltungsintermediat gebildet (Balbach, *et al.*, 1999, Cook, *et al.*, 1979, Goto & Hamaguchi, 1982, Kelley, *et al.*, 1986, Kiefhaber, *et al.*, 1990b, Munoz, *et al.*, 1994, Schmid, 1981). Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierungen wurden als geschwindigkeitsbestimmende Schritte beispielsweise während der Rückfaltung von RNase A (Schmid & Baldwin, 1978), Thioredoxin (Kelley & Richards,

1987), RNase T1 (Kiefhaber, *et al.*, 1990c), Chymotrypsin-Inhibitor 2 (Jackson & Fersht, 1991b), Staphylokokken-Nuklease (Kuwajima, *et al.*, 1991), Carboanhydrase (Kern, *et al.*, 1995) und  $\beta$ -Lactamase (Vanhove, *et al.*, 1998) identifiziert.

Die klassische Betrachtungsweise der Proteinfaltung greift auf phänomenologische Modelle zurück, die aus kinetischen Experimenten wie zum Beispiel dem reduzierten H/D-Austausch (Dobson, *et al.*, 1994, Roder, *et al.*, 1988, Udgaonkar & Baldwin, 1988) oder Mutationsanalysen (Fersht, *et al.*, 1992, Milla, *et al.*, 1995) hervorgingen. Die dabei auftretenden Intermediate werden meist als strukturell definierte Spezies definiert, die sequentiell auf einem einheitlichen, linearen Faltungsweg populiert werden. Neuere theoretische Überlegungen gehen davon aus, dass Intermediate auch auf eine inkorrekte Faltung zurückgeführt und in einer kinetischen Falle angehäuft werden können (Baldwin, 1995, Onuchic, *et al.*, 1997). Der sogenannte *new view* der Proteinfaltung trägt der Beobachtung Rechnung, dass weder der native noch der entfaltete Zustand eine einzige relevante Struktur besitzt, sondern dass ein Ensemble von Konformationen den jeweiligen Zustand beschreibt. Das globale Energieminimum, das dem Ensemble des nativen Zustands entspricht, kann auf mehreren parallelen, mikroskopischen Faltungswegen erreicht werden, denen diffusionsähnliche Prozesse zugrunde liegen (Dill & Chan, 1997, Goldbeck, *et al.*, 1999). Dabei werden einige Faltungswege häufiger beschritten als andere (Dill & Chan, 1997, Radford, 2000, Wolynes, *et al.*, 1995). Das Levinthal'sche Paradoxon, das den Konflikt zwischen der Weg-unabhängigen Faltung nach Anfinsen und der geforderten sequentiellen Abfolge einzelner Prozesse auf der Suche des nativen Zustands im unvorstellbar großen Konformationsraum beschreibt, stellt im *new view* kein intrinsisches Paradoxon dar, da keine definierten Faltungswege postuliert werden. Vielmehr ermöglichen sogenannte Faltungstrichter das Auffinden eines einzigen stabilen Zustands auf mehreren Wegen innerhalb des Konformationsraums (Dill & Chan, 1997, Dobson, *et al.*, 1998, Onuchic, *et al.*, 1996, Onuchic, *et al.*, 1997), wobei dieses Konzept sowohl für Faltungsreaktionen mit mehreren Zuständen als auch für das Zweizustandsmodell angewendet werden kann. Dabei ändert sich lediglich die Form des Faltungstrichters, der beim Vorliegen des Zweizustandsmodells glatt ist. Treten fakultative oder obligate Intermediate oder verschiedene Übergangszustände auf spricht man von einem 'rauhem' Faltungstrichter, der neben dem globalen Minimum mit der niedrigsten freien Enthalpie lokale Minima bzw. Maxima besitzt. Jeder Punkt in der Energielandschaft beschreibt eine mögliche Konformation und deren freie Enthalpie, wobei die dominierende Triebkraft der Faltung das Zusammenspiel des unvorteilhaften Verlustes der Ketten- oder Konfigurationsentropie des entfalteten

Zustands und der Bildung attraktiver nativer Wechselwirkungen beschreibt (Grantcharova, *et al.*, 2001). Außerdem gibt die Dynamik der Diffusion auf der Energieoberfläche Aufschluss über die Kinetik der Ent- und Rückfaltung (Eaton, 1999).

Für die Beschreibung der Energielandschaft ist die Charakterisierung der frühen Prozesse im Mikrosekunden- bis Millisekundenbereich von entscheidender Bedeutung. Dieser ist jedoch experimentell schwer zugänglich, wobei in den letzten Jahren große Fortschritte in der zeitlichen Auflösung von ultraschnellen Mischmethoden wie zum Beispiel *continuous flow*-Techniken (Capaldi, *et al.*, 2001, Chan, *et al.*, 1997, Shastry & Roder, 1998, Teilum, *et al.*, 2002) und die Einführung von Druck- oder Temperatursprüngen gemacht wurden. Auch die NMR-Spektroskopie (siehe Abschnitt 1.2 und 3.3) leistet einen großen Anteil bei der Charakterisierung extrem schneller Faltungsreaktionen im Mikrosekundenbereich mittels Linienformanalysen (Burton, *et al.*, 1996, Huang & Oas, 1995, Myers & Oas, 2001, Sato, *et al.*, 1999, Spector & Raleigh, 1999, Wang, *et al.*, 2003) oder der Dispersion von Relaxationsraten (Palmer, 2001, Palmer, *et al.*, 2001, Tollinger, *et al.*, 2001, Vugmeyster, *et al.*, 2000, Zeeb & Balbach, 2003b).

In der jüngsten Vergangenheit haben computergestützte Simulationen von Faltungswegen an Bedeutung gewonnen und stellen zunehmend eine Ergänzung zu experimentellen Untersuchungen dar (Daggett, 2003), was vor allem auf den enormen Zuwachs der zur Verfügung stehenden Rechenleistung einzelner Rechner oder Rechnerclustern zurückzuführen ist. Ein sehr eleganter Ansatz wird dabei von Pande und Mitarbeitern verfolgt, die die Initiative 'Folding@home' ins Leben gerufen haben. Dabei werden die *all atom* Moleküldynamik-Simulationen weltweit auf mehrere Tausend vernetzter PCs verteilt, wodurch Simulationen mit einer Gesamtdauer von mehreren 100  $\mu$ s erhalten werden konnten (Snow, *et al.*, 2002, Zagrovic, *et al.*, 2002). Diese kamen durch die Berechnung mehrerer Zehntausend 5-20 ns Simulationen zustande. Der Faltungsmechanismus des Villin *headpiece* beginnt mit einem unspezifischen hydrophoben Kollaps innerhalb der ersten 20 ns, der den zugänglichen Konformationsraum stark einschränkt. Die nachfolgende Absuche dieses Konformationsraums nach dem nativen Zustand und der Bildung des aromatischen Kerns stellt den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar (Zagrovic, *et al.*, 2002). Aus den Simulationen wurde eine Faltungsdauer von 5  $\mu$ s vorhergesagt. Eine NMR-Linienformanalyse ergab eine sehr gute Übereinstimmung dieser Vorhersage (Wang, *et al.*, 2003), was eindrucksvoll die Verbindung theoretischer und experimenteller Daten aufzeigt. Die längsten Einzelsimulationen liegen im Bereich von 1  $\mu$ s und wurden ebenfalls mit dem  $\alpha$ -helikalen Villin *headpiece* durchgeführt. Lange Einzelsimulationen haben neben dem enormen

Zeitbedarf auch den Nachteil, dass viele Eigenschaften der Faltungsreaktion, wie zum Beispiel die Heterogenität des Ensembles des Übergangszustands, möglicherweise nicht charakterisiert werden können. Allerdings konnten mit einer 1  $\mu$ s-Simulation Faltungswege zu einem Intermediat beobachtet werden (Duan & Kollman, 1998). In anderen Fällen konnte durch die Kombination von Mutationsstudien ( $\phi$ -Analyse) mit Moleküldynamikrechnungen die Struktur des Übergangszustands von Chymotrypsininhibitor 2 auf atomarer Ebene charakterisiert (Daggett, *et al.*, 1996, Lazaridis & Karplus, 1997) und dessen Faltungsweg beschrieben werden (Kazmirski, *et al.*, 2001). Kürzlich wurde ebenfalls durch die Kombination experimenteller Ergebnisse und theoretischer Simulationen der gesamte Faltungsweg im Nanosekunden- bis Mikrosekundenbereich einer drei Helixbündel beinhaltenden Homeodomäne beschrieben (Mayor, *et al.*, 2003). Die SH3-Domäne (Shea, *et al.*, 2002) und andere drei Helixbündelproteine wie zum Beispiel die B-Domäne von Protein A (Alonso & Daggett, 2000, Garcia & Onuchic, 2003, Shea, *et al.*, 1999) sind ebenfalls Gegenstand detaillierter Moleküldynamik-Simulationen. Für letzteres konnte mit Hilfe der *diffusion-collision* Theorie (Karplus & Weaver, 1976, Karplus & Weaver, 1979, Karplus & Weaver, 1994, Pappu & Weaver, 1998) die Faltungsraten erfolgreich vorhergesagt werden (Myers & Oas, 2001). Der quantitative Vergleich von vorhergesagten und experimentell bestimmten Faltungsraten des monomeren  $\lambda$ -Repressors und einiger Varianten ergab ebenfalls sehr gut übereinstimmende Ergebnisse der Faltungsraten (Burton, *et al.*, 1998). Eine zentrale Bedeutung der *diffusion-collision* und Moleküldynamik-Simulationen liegt darin, dass zukünftig die Faltung und in einem nächsten Schritt die Tertiärstruktur von Proteinen anhand ihrer Primärsequenz vorhergesagt werden kann (Baker & Sali, 2001, Nauli, *et al.*, 2001). Dies wäre aufgrund der exponentiell ansteigenden Zahl von Genom- und Proteinsequenzen sehr hilfreich, da diese die Kapazitäten der traditionellen Strukturbestimmung mittels Röntgenkristallographie oder NMR-Spektroskopie weit übersteigt.

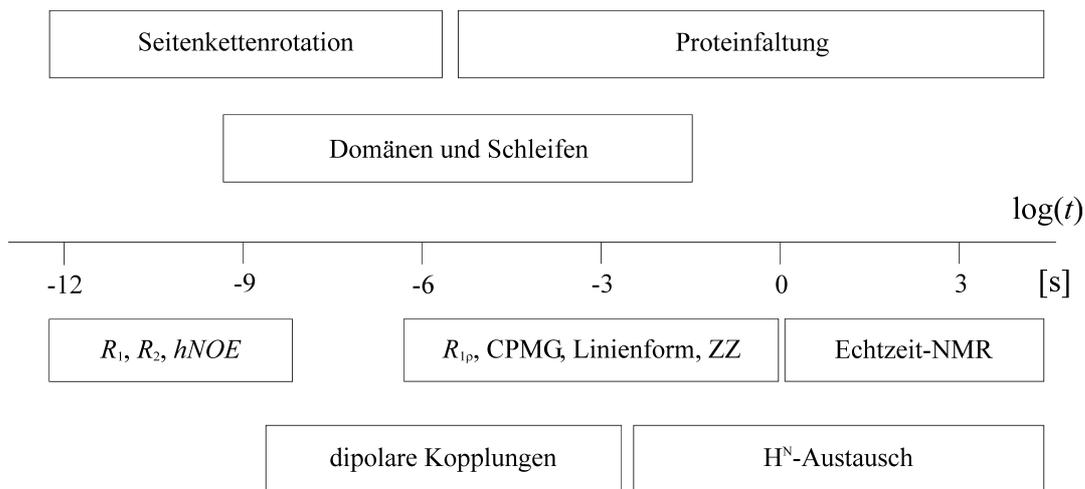
## 1.2 NMR-Spektroskopie zum Studium der Proteinfaltung

Das Verständnis der Proteinfaltungsreaktion und die Ableitung von Modellen hängt stark von den zu dieser Zeit zugänglichen experimentellen Informationen ab. Die NMR-Spektroskopie hat zu jedem Zeitpunkt wichtige Beiträge zum Verständnis der Proteinfaltung geleistet. Sie verbindet hohe räumliche Auflösung mit thermodynamischen und kinetischen Analysen über einen sehr breiten Zeitbereich, der von der Dynamik im Picosekundenbereich bis hin zu Kinetiken über mehrere Tage hinweg reicht. Ein Überblick über den Zeitbereich in dem NMR-Spektroskopie angewendet werden kann und die dazu gehörigen Methoden sind in Abb. 2 zusammengefasst.

Die ersten wichtigen NMR-Experimente im Bereich der Proteinfaltung stellten H/D-Austauschexperimente dar, die die Verteilung von Deuteronen an austauschkompetenten Stellen des Proteins detektierten (Wagner & Wüthrich, 1982, Wand, *et al.*, 1986). Aus den hieraus berechneten Schutzfaktoren konnten thermodynamische Parameter zur lokalen und globalen Entfaltung von nativen Proteinen oder Faltungsintermediaten gewonnen werden (Englander, *et al.*, 1996). Über unterschiedliche Abhängigkeiten der Schutzfaktoren von der Denaturierungsmittelkonzentration können Bereiche eines Proteins identifiziert werden, welche für den Austausch eine lokale oder globale Entfaltung erfordern (Bai, *et al.*, 1995). Wichtige Informationen über die initialen Schritte der Strukturbildung während der Faltungsreaktion wurden durch eine Kombination von *quenched-flow pulse labeling* Experimenten und der Bestimmung der ortsspezifischen Häufigkeit von Protonen im Protein mittels NMR-Spektroskopie erhalten. So konnte die Strukturbildung in transienten Intermediaten, die an vielen verschiedenen Positionen der Polypeptidkette einen reduzierten H/D-Austausch zeigten, während der Rückfaltung von Cytochrom c und RNase A im Millisekunden- bis Minutenbereich verfolgt werden (Roder, *et al.*, 1988, Udgaonkar & Baldwin, 1988). Diese Experimente trugen entscheidend zum Verständnis der sehr komplizierten Faltung von Lysozym bei. Es konnte gezeigt werden, dass die Strukturbildung nicht kooperativ erfolgt, sondern dass die  $\alpha$ -helikale Domäne vor der  $\beta$ -Domäne gefaltet vorliegt (Radford, *et al.*, 1992). In weiteren Studien zur Proteinfaltung mittels NMR-Spektroskopie wurde das Gleichgewicht zwischen nativem und entfaltetem Protein untersucht. Die Umwandlung der beiden Zustände wurde durch Zugabe von Denaturierungsmitteln oder durch Änderung der Temperatur bzw. des pH-Werts hervorgerufen und lieferten Einblicke in die Thermodynamik und Kooperativität der Faltungsreaktion (Dobson & Evans, 1984, Roder, 1989). Später konnten bei verschiedenen Proteinen Gleichgewichtsintermediate gefunden werden, die in Fluoreszenz- oder

Circulardichroismus-detektierten Experimenten nicht beobachtet werden konnten (Ropson & Frieden, 1992, Russell, *et al.*, 2000, Zeeb, *et al.*, 2002). Dies verdeutlicht die Empfindlichkeit der chemischen Verschiebung von NMR-Signalen gegenüber der lokalen Umgebung. Daher ist es mit der NMR-Spektroskopie auch möglich nicht-native Zustände wie *molten globule* Faltungsintermediate (Kuwajima & Arai, 2000) bzw. den entfalteten Zustand strukturell mit hoher Auflösung zu charakterisieren (Schwalbe, *et al.*, 1997).

Neben der Charakterisierung von Gleichgewichtsfaltungsintermediaten ist die Beobachtung von Faltungskinetiken von großem Interesse. Traditionell erfolgt die Bestimmung von Faltungsraten aus kinetischen Experimenten. Mit der NMR-Spektroskopie können so Raten unterhalb  $5 \text{ min}^{-1}$  erhalten werden, wobei ein spezieller *stopped flow* Probenkopf verwendet werden muss (Grimaldi & Sykes, 1975). Durch die schnelle Mischung der Proteinlösung mit dem Puffer innerhalb des NMR-Spektrometers wird die Faltungsreaktion initiiert, wobei nur sehr kurze Totzeiten auftreten (Frieden, *et al.*, 1993, McGee & Parkhurst, 1990). Mit einem kürzlich entwickelten *stopped flow* Probenkopf können Faltungsraten bis zu  $2 \text{ s}^{-1}$  erhalten werden (Mok, *et al.*, 2003).



**Abb. 2:** Logarithmische NMR-Zeitskala. Die Art der Bewegung und der zugängliche Zeitbereich innerhalb eines Proteins sowie von Reaktionen sind oberhalb der Zeitachse gezeigt. Unterhalb der Zeitachse ist eine Auswahl der zur Verfügung stehenden Messmethoden dargestellt. Dabei stehen  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $hNOE$  für die longitudinale bzw. transversale Relaxationsrate und den heteronuklearen NOE-Effekt,  $R_{1p}$  für die longitudinale Relaxationsrate im rotierenden Koordinatensystem, CPMG für die Dispersion der transversalen Relaxationsrate die durch Carr-Purcell-Meiboom-Gill-Spinecho-Sequenzen bestimmt wird, Linienform für die Linienformanalyse in 1D  $^1\text{H}$  NMR-Spektren, ZZ für 2D Austausch-Spektroskopie und  $\text{H}^{\text{N}}$  für Amidprotonenaustausch-Experimente.

Eine enorme Erhöhung der Empfindlichkeit der *stopped flow* NMR-Technik wurde durch die Verwendung der  $^{19}\text{F}$  NMR-Spektroskopie erreicht. Frieden und Mitarbeitern gelang es mit  $^{19}\text{F}$  markiertem Tryptophan spezifische Sonden innerhalb eines Proteins zu etablieren und die

verschiedenen Schritte der Faltungsreaktion von Dihydrofolatreduktase mit Echtzeit  $^{19}\text{F}$  NMR-Spektroskopie zu verfolgen (Frieden, *et al.*, 1993, Hoeltzli & Frieden, 1996, Hoeltzli & Frieden, 1998). Kürzlich konnte die aufeinander folgende Faltung und Assoziation der beiden Domänen des Chaperons PapD unter der Verwendung eines *stopped flow*  $^{19}\text{F}$  Kryoprobekopfs aufgelöst werden (Bann, *et al.*, 2002).

Eine breitere Anwendung erfährt die Echtzeit NMR-Spektroskopie bei der Beobachtung langsamer Proteinfaltungsreaktionen (Abb. 2), wie dies z.B. bei der Isomerisierung von Peptidyl-Prolylbindungen der Fall ist (Balbach & Schmid, 2000). Nach der Initiation der Reaktion mittels manueller Mischung wird eine Reihe von 1D NMR-Spektren aufgezeichnet, die wichtige Informationen über Eigenschaften von transienten Faltungsintermediaten während der Rück- bzw. Entfaltung beinhalten wie z.B. RNase A (Blum, *et al.*, 1978, Kiefhaber, *et al.*, 1995) oder Apoplastocyanin (Koide, *et al.*, 1993). Die Totzeit in diesen Experimenten kann durch die Mischung der Lösungen innerhalb des NMR-Spektrometers deutlich verkürzt werden was z.B. für  $\alpha$ -Lactalbumin (Balbach, *et al.*, 1995), Acylphosphatase (van Nuland, *et al.*, 1998a), Hpr (van Nuland, *et al.*, 1998c), RNase T1 (Balbach, *et al.*, 1999, Steegborn, *et al.*, 2000) und p19<sup>INK4d</sup> (Zeeb, *et al.*, 2002) gezeigt wurde. In einigen Fällen konnte eine Erweiterung dieser Methode auf zweidimensionale NMR-Techniken erreicht werden, die die Anzahl an ortsspezifischen Sonden in gut aufgelösten NMR-Spektren deutlich erhöht (Liu, *et al.*, 1996, Steegborn, *et al.*, 2000). Vor kurzem wurde während der Rückfaltung von Apoplastocyanin sogar eine Serie von 3D NMR-Spektren aufgenommen, da sich die Faltungsreaktion über mehrere Tage erstreckt (Mizuguchi, *et al.*, 2003). Die Aufzeichnung einer Serie von mehrdimensionalen NMR-Spektren ist aufgrund der benötigten Aufnahmezeit pro Spektrum jedoch nur bei sehr langsamen Reaktionen sinnvoll (Abb. 2). Daher entwickelten Balbach *et al.* eine elegante Methode zur Beobachtung von Faltungskinetiken, in der während der Reaktion nur ein einziges 2D NMR-Spektrum aufgezeichnet werden muss (Balbach, *et al.*, 1996). Die kinetische Information schlägt sich in der Linienform der Kreuzsignale in der indirekten Dimension des 2D NMR-Spektrums nieder. Durch Simulation der Resonanzlinie kann dann die Faltungsrate bestimmt und durch eine Subtraktionsanalyse die Kreuzsignale verschiedenen transienten Zuständen des Proteins zugeordnet werden (Balbach, *et al.*, 1996, Balbach, *et al.*, 1999).

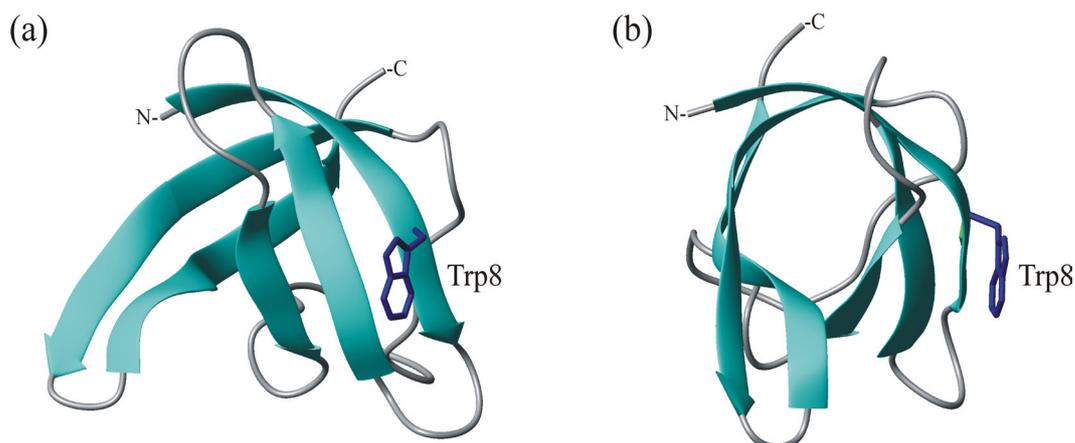
Die meisten Faltungsreaktionen sind für eine direkte Beobachtung mittels Echtzeit NMR-Spektroskopie zu schnell. Jedoch können Faltungsraten auch mit NMR-Experimenten unter Gleichgewichtsbedingungen bestimmt werden, solange eine schnelle Umwandlung zwischen

verschiedenen Zuständen bzgl. der NMR-Zeitskala vorliegt (Palmer, 2001, Palmer, *et al.*, 2001). Faltungsraten von langsameren Reaktionen zwischen  $0.1 \text{ s}^{-1}$  und  $10 \text{ s}^{-1}$  können mit zweidimensionaler ZZ-Austauschspektroskopie bestimmt werden (Abb. 2), bei der Kreuzsignale des nativen und entfalteten Zustands miteinander korreliert werden (Farrow, *et al.*, 1994, Montelione & Wagner, 1989, Wider, *et al.*, 1991). Prozesse im Milli- bis Mikrosekundenbereich beeinflussen die Relaxationseigenschaften NMR-aktiver Kerne durch die wechselnde chemische Umgebung (Sandström, 1982). Beispielsweise erfährt die transversale Relaxationsrate einen zusätzlichen Beitrag aufgrund des chemischen Austauschs ( $R_{\text{ex}}$ ), was sich auf die Intensität und Linienform des Signals auswirkt. Für die Analyse von Reaktionen im Submillisekunden- bis Sekundenbereich steht die von Oas und Mitarbeitern eingeführte Linienformanalyse zur Verfügung, die als Modellprotein den monomeren  $\lambda$ -Repressor verwendeten (Burton, *et al.*, 1996, Huang & Oas, 1995). Die Linienformanalyse wurde mittlerweile für eine Vielzahl von Proteinen wie das ribosomale Protein L9 (Kuhlman, *et al.*, 1998, Sato, *et al.*, 1999), psbd41 (Spector & Raleigh, 1999) und CspB (Zeeb, 2000, Zeeb & Balbach, 2003b) erfolgreich eingesetzt. Die größten Raten, die mit dieser Methode analysiert werden konnten, wurden mit einer Subdomäne des Villin *headpiece* bestimmt und liegen bei  $2 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$  (Wang, *et al.*, 2003). Aufgrund der Signalüberlagerung in 1D  $^1\text{H}$  Spektren können auch hier, wie bei der 1D  $^1\text{H}$  Echtzeit NMR-Spektroskopie, nur wenige gut aufgelöste Resonanzen zur Auswertung herangezogen werden. Daher wurden in jüngerer Vergangenheit zweidimensionale Methoden entwickelt, die zu einer signifikanten Erhöhung der Anzahl ortsspezifischer Sonden führten. Dazu zählen die Bestimmung von  $^{15}\text{N}$   $R_{1\rho}$  (Vugmeyster, *et al.*, 2000) und  $^{15}\text{N}$  transversaler kreuz-korrelierter Relaxationsraten (Zeeb, *et al.*, 2003) sowie die Messung der Dispersion von  $^{15}\text{N}$   $R_2$  Relaxationsraten (Tollinger, *et al.*, 2001). Ein zusätzlicher Vorteil dieser zweidimensionalen Methoden stellt die mögliche Unterscheidung lokaler und globaler Prozesse dar. Kürzlich konnte die experimentelle Lücke zur Charakterisierung der Dynamik im Nanosekunden- und Millisekundenbereich durch die Analyse residualer dipolarer Kopplungen, die in verschiedenen teilorientierenden Medien bestimmt wurden, geschlossen werden (Meiler, *et al.*, 2001, Meiler, *et al.*, 2003). Im Picosekunden- bis Nanosekundenbereich werden hauptsächlich klassische Relaxationsmethoden wie longitudinale bzw. transversale Relaxationsraten ( $R_1$ ,  $R_2$ ) sowie der heteronukleare NOE-Effekt (*hNOE*) eingesetzt. Diese werden dann zumeist mit dem modellfreien Ansatz von Lipari & Szabo (Clare, *et al.*, 1990, Lipari & Szabo, 1982a, Lipari & Szabo, 1982b) oder über die Kartierung der spektralen Leistungsdichte (*spectral density mapping*) analysiert (Peng & Wagner, 1992).

### 1.3 Millisekundenfaltung und DNA-Bindung: Das Modellprotein CspB aus *B. subtilis*

Die signifikante Erniedrigung der Wachstumstemperatur führt in vielen prokaryotischen Organismen zu einer Kälteschockantwort, in deren Verlauf die Expression verschiedener essentieller Proteine induziert oder transient erhöht wird (Jones, *et al.*, 1987, Jones & Inouye, 1996). Dies ist in besonderem Maße für die Familie der kleinen Kälteschockproteine der Fall (CSP), während die Synthese der meisten anderen Zellproteine reprimiert wird (Graumann, *et al.*, 1996, Graumann, *et al.*, 1997, Graumann & Marahiel, 1998). Kälteschockproteine wurden in psychrotrophen, mesophilen, thermophilen und hyperthermophilen Bakterien gefunden (Etchegaray & Inouye, 1999, Graumann & Marahiel, 1999, Hebraud & Potier, 1999, Perl, *et al.*, 1998, Phadtare, *et al.*, 1999, Welker, *et al.*, 1999). Der prominenteste Vertreter dieser Proteinfamilie stellt CspA aus *E. coli* dar. Neben CspA besitzt *E. coli* noch acht weitere Kälteschockproteine, von denen CspB, CspG und CspI ebenfalls Kälteschock-induzierbar sind (Ermolenko & Makhatadze, 2002, Wang, *et al.*, 1999, Xia, *et al.*, 2001b). Einige andere Proteine, zu denen z.B. der Transkriptionsfaktor NusA, die Polynukleotidphosphorylase (PNPase), der Initiationsfaktor IF2, RecA, H-NS, Gyrase, CsdA, der Ribosomen-Bindungsfaktor RbfA, die ribosomalen Proteine L7/L12 und S6 sowie die Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase, die Triosephosphatisomerase und die Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase PPIB zählen, werden ebenfalls induziert (Phadtare, *et al.*, 2002a). Die Induktion, Regulation und Funktion von CspA wurde in den letzten Jahren umfassend studiert und in mehreren Übersichtsartikeln besprochen (Ermolenko & Makhatadze, 2002, Phadtare, *et al.*, 1999, Weber, *et al.*, 2002, Weber & Marahiel, 2002). Die basale Konzentration und die Stärke der Induktion der einzelnen CSP ist abhängig von der jeweiligen Funktion bei der Zellteilung bzw. in der stationären Phase (Brandi, *et al.*, 1999, Yamanaka, *et al.*, 1998). CSP können die Transkription Kälteschock-induzierbarer Gene stimulieren (Jones, *et al.*, 1992) und die Initiation der Translation durch Destabilisierung nicht-produktiver Sekundärstrukturen in der mRNA bei tiefer Temperatur erleichtern (Jiang, *et al.*, 1997). Die Bindung der mRNA erfolgt Sequenz-unspezifisch (Lopez, *et al.*, 1999a, Lopez & Makhatadze, 2000, Lopez, *et al.*, 2001), wodurch die Kälteschockproteine auch als RNA-Chaperone bezeichnet werden (Jiang, *et al.*, 1997). Die Fähigkeit zur Entfaltung von Sekundärstrukturen innerhalb einzelsträngiger Nukleinsäuren ist auch bei der Antitermination von Bedeutung (Bae, *et al.*, 2000). Diese Aktivität von CspA und CspE aus *E. coli* ermöglicht eine erhöhte Transkription verschiedener Kälteschock-Gene bei tiefer Temperatur (Phadtare, *et al.*, 2002a, Phadtare, *et al.*, 2002b, Stühlke, 2002). Eine solch breite Wirkungsweise verlangt eine starke Induktion und hohe Proteinkonzentration der Hauptkälteschockproteine

(Neuhaus, *et al.*, 1999, Yamanaka, *et al.*, 1998). Letztere wird durch eine sehr effektive Initiation der Translation erreicht, wofür der lange 5'-untranslatierte Bereich (5'-UTR) der mRNA verantwortlich ist. Der 5'-UTR der mRNA der CSP besitzt eine sehr hohe Affinität zu Ribosomen, die sogar in Abwesenheit des codierenden Bereichs der *csp* mRNA vorhanden ist (Jiang, *et al.*, 1996, Xia, *et al.*, 2001a, Xia, *et al.*, 2002). Daher kann es bei tiefen Temperaturen und hohen CSP mRNA-Konzentrationen zu einer Blockierung der Ribosomen kommen, da nur noch wenige für die Translation anderer Proteine zur Verfügung stehen (Jiang, *et al.*, 1996, Neuhaus, *et al.*, 2003, Yamanaka & Inouye, 2001). Da die *cspA* mRNA bei tiefer Temperatur sehr stabil ist, wird ein selektiver Abbau durch RNase E diskutiert, die an verschiedenen CSC-Sequenzen (*cold shock cut box*) schneidet, um nach dem Kälteschock ein Wachstum bei tieferen Temperaturen zu ermöglichen (Neuhaus, *et al.*, 2003). Bei höheren Temperaturen (37 °C) ist die Halbwertszeit der *cspA* mRNA sehr gering und liegt bei 10 s (Brandi, *et al.*, 1996). Die Konzentration der *E. coli cspA* mRNA wird noch durch weitere Mechanismen reguliert. Die *cold box*-Sequenz ist ein negativer Regulator der Transkription der *cspA* mRNA (Fang, *et al.*, 1998), in dem CspE an den 5'-UTR bindet (Bae, *et al.*, 1999). Desweiteren wird die *cspA* mRNA bei tiefer Temperatur durch die *cold box*-Sequenz stabilisiert (Xia, *et al.*, 2002). Die *downstream box*-Sequenz, die 15 Nukleotide nach dem Startcodon liegt, erhöht vermutlich die Effektivität der Translation (Mitta, *et al.*, 1997). Letzteres wird auch durch die *upstream box*-Sequenz bewirkt, die sich im Bereich vor der Shine-Dalgarno Sequenz befindet (Yamanaka, *et al.*, 1999).



**Abb. 3:** Dreidimensionale Struktur des Kälteschockproteins CspB aus *B. subtilis* in der (a) Seitenansicht und (b) Aufsicht. Die Abbildung wurde mit dem Programm MolMol (Koradi *et al.*, 1996) und dem PDB-Eintrag 1CSP (Schindelin *et al.*, 1993) erstellt. Die Seitenkette von Trp8 wurde hervorgehoben.

In *Bacillus subtilis* sind drei Kälteschockproteine gefunden worden (CspB, CspC, CspD), die ihre Funktion *in vivo* gegenseitig komplementieren können (Graumann, 1997). Bakterien

in denen die Deletion einzelner bzw. zweier Kälteschockprotein-Gene vorgenommen wurde sind lebensfähig, während die Ausschaltung aller drei CSP-Gene auch unter normalen Wachstumsbedingungen letal ist (Graumann, *et al.*, 1997). CspB ist ein kleines saures monomeres Eindomänenprotein und besteht aus 67 Aminosäuren. Die dreidimensionale Struktur wurde sowohl mit NMR-Spektroskopie (Schnuchel, *et al.*, 1993) als auch mit Röntgenkristallographie (Schindelin, *et al.*, 1993) gelöst und ist in Abb. 3a gezeigt. Die Struktur stellt ein fünfsträngiges gekrümmtes antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt dar, das eine  $\beta$ -Faßstruktur ausbildet (Abb. 3b). Das Proteinrückgrat von CspA aus *E. coli* (Feng, *et al.*, 1998, Newkirk, *et al.*, 1994, Schindelin, *et al.*, 1994) und Csp aus *B. caldolyticus* (Mueller, *et al.*, 2000) ist nahezu deckungsgleich zur Struktur von CspB. Die NMR-Struktur des Csp aus dem hyperthermophilen Bakterium *Thermotoga maritima* zeigt jedoch einige kleinere Abweichungen (Kremer, *et al.*, 2001). Eine Besonderheit der Struktur ist die große Anzahl Lösungsmittel-exponierter aromatischer Seitenketten (W8, F9, F15, F17, F27, H29, F30, F38), wovon F15, F17, F27 und H29 einen großen Einfluss auf die thermodynamische Stabilität des Proteins besitzen (Schindler, *et al.*, 1998). Einige dieser Aminosäuren sind Teil der beiden nukleinsäurebindenden Motive RNP1 und RNP2 (*ribonucleoprotein consensus sequence*), die sich von K13 bis V20 und von V26 bis H29 erstrecken und in vielen nukleinsäurebindenden Proteinen unterschiedlicher Tertiärstruktur hochkonserviert sind (Burd & Dreyfuss, 1994, Graumann & Marahiel, 1996, Landsman, 1992, Mattaj & Nagai, 1995, Nagai, *et al.*, 1995). Erste Bindungsstudien zeigten, dass F15, F17 und F27 essentiell für die Wechselwirkung zwischen CspB und einzelsträngiger DNA sind (Schröder, *et al.*, 1995). CspB und die homologen Kälteschockproteine sind Vertreter der OB-fold Superfamilie der Oligonukleotid-/Oligosaccharid-bindenden Proteine (Murzin, 1993), zu der unter anderen auch die ribosomalen Proteine S1 und S17, das LysN-Protein sowie der Translationsinitiationsfaktor IF1 aus *E. coli* gehören (Alexandrescu, *et al.*, 1999, Draper & Reynaldo, 1999, Sette, *et al.*, 1997). In eukaryotischen Organismen wird häufig die CSP-homologe Kälteschockdomäne (*cold shock domain*, CSD) als Bestandteil von größeren Multidomänenproteinen gefunden. So enthalten die Y-box-Transkriptionsfaktoren und das Telomeren-Ende-Bindungsprotein eine CSD (Graumann & Marahiel, 1998, Horvath, *et al.*, 1998), wobei in jüngster Vergangenheit die Struktur zweier Telomer-bindenden Proteine im Komplex mit Telomer-DNA gelöst wurde (Lei, *et al.*, 2003, Mitton-Fry, *et al.*, 2002). Auch bei der RNA-Bindung von ribosomalen Proteinen (Draper & Reynaldo, 1999, Nakagawa, *et al.*, 1999) oder in mitochondrialen Y-box-Proteinen sind Kälteschockdomänen involviert (Pelletier, *et al.*, 2000). Vor kurzem wurde erstmals ein eigenständiges eukaryotisches

Kälteschockprotein isoliert. ClpH aus *Cladosporium herbarum*, einem Schimmelpilz, bindet im Gegensatz zu prokaryotischen CSP nicht nur einzel- sondern auch doppelsträngige DNA mit hoher Affinität, ist jedoch wesentlich weniger stabil als Letztere (Falsone, *et al.*, 2002).

Die Faltung von CspB zur nativen Struktur erfolgt sehr schnell und reversibel. Sowohl in Gleichgewichts- als auch in kinetischen Experimenten konnten keine Faltungsintermediate detektiert werden, so dass die Faltungsreaktion mit dem Zweizustandsmodell für monomere Proteine adäquat beschrieben werden kann (Schindler, *et al.*, 1995, Schindler, 1997). Die Faltungsraten in Abwesenheit des Denaturierungsmittels liegen bei 25 °C und pH 7.0 für die Rückfaltung bei  $1070 \text{ s}^{-1}$  und die Entfaltung bei  $12 \text{ s}^{-1}$  (Schindler, *et al.*, 1995), so dass die Faltungsreaktion im Millisekundenbereich abläuft. CspB enthält keine Cysteine oder *cis*-Prolylpeptidbindungen, die intrinsisch langsame Ausbildung von Disulfidbrücken oder Isomerisierungsreaktionen bedingen könnten und stellt somit ein sehr gutes Modellprotein zum Studium elementarer Faltungsreaktionen dar. Die thermodynamische Stabilität von CspB ist mit 11.4 kJ/mol bei 25 °C und pH 7.0 sehr gering (Schindler & Schmid, 1996).

#### 1.4 Das dimere Modellprotein ORF56 aus dem extremophilen Archäon *S. islandicus*

Das 5.4 kb große *rolling circle*-Plasmid pRN1 aus *Sulfolobus islandicus* wird der archaischen Plasmid-Familie pRN zugeordnet und enthält hauptsächlich drei offene Leseraster (*orf56*, *orf904*, *orf80*), die für funktionale Proteine codieren (Peng, *et al.*, 2000). Die sequentielle Anordnung dieser codierenden Sequenzen ist innerhalb der Plasmid-Familie konserviert und mit der Abfolge auf eubakterischen *rolling circle*-Plasmiden vergleichbar. Dabei überlappen das *orf56*- und das *orf904*-Gen, wodurch letzteres keinen eigenen Promotor besitzt (Keeling, *et al.*, 1996). Die Genprodukte dieser offenen Leseraster besitzen unterschiedliche Funktionen. ORF56 bindet hochaffin und spezifisch an doppelsträngige DNA, deren Sequenz einem *inverted repeat* aus der Promotorregion des *orf56*-Gens entspricht (Lipps, *et al.*, 2001b). Aufgrund der überlappenden Anordnung der Gene und von Sequenzhomologien zu anderen Plasmid-codierten DNA-Bindungsproteinen wird diskutiert, dass ORF56 die Kopienzahl des Plasmids pRN1 kontrolliert. ORF56 besitzt 22% Sequenzidentität zu dem ebenfalls plasmidal codierten CopG-Protein aus *Streptococcus*, welches für die Regulation der Kopienzahl des Plasmid pLS1 verantwortlich ist (Lipps, *et al.*, 2001b). Die Gene dieser Kontrollproteine liegen auf der 5'-Seite der Gene, die für Proteine der Replikationsinitiation des Plasmids codieren. Letzteres wird durch ORF904 bewerkstelligt, dessen Polypeptidkette eine ATPase-, eine Primase- und eine DNA-Polymerase-Aktivität trägt und ein neuartiges Replikationsprotein darstellt (Lipps, *et al.*,

2003). Die Kristallstruktur der Primase-Polymerase-Domäne von ORF904 konnte kürzlich aufgeklärt werden (Lipps, *et al.*, 2004). Wie für das pLS1-Plasmid und andere Plasmide gezeigt wurde, wird die Kopienzahl des Plasmids durch eine *feedback*-Regulation erreicht, indem das Kontrollprotein an seinen eigenen Promotor bindet und dadurch die eigene Synthese und die Synthese des Replikationsinitiationsproteins verhindert (Espinosa, *et al.*, 1995, Khan, 1997). Das Genprodukt des dritten offenen Leserasters auf pRN1, das ORF80-Protein, bindet ebenfalls sequenzspezifisch an DNA und enthält vermutlich ein neuartiges basisches Leucin-Zipper Motiv (Lipps, *et al.*, 2001a). ORF80 bindet im Gegensatz zu ORF56 hochkooperativ an die Ziel-DNA.

Das kleine basische Protein ORF56 besteht aus 56 Aminosäuren, besitzt einen berechneten isoelektrischen Punkt von 9.2 und liegt in Lösung als Dimer vor. Bei dem Organismus *Sulfolobus islandicus* handelt es sich um ein acidohalophiles und hyperthermophiles Archaeon, welches in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen bei pH 2-3 und 80 °C optimale Lebensbedingungen vorfindet. Die Proteine eines solch extremophilen Organismus sollten eine außergewöhnliche Thermostabilität besitzen. Trotz intensiver Bemühungen konnten jedoch noch keine allgemeingültigen Regeln zur thermischen Stabilisierung von Proteinen formuliert werden (Jaenicke & Böhm, 2001). Daher ist die Charakterisierung thermostabiler Proteine wie ORF56 von allgemeinem Interesse. Desweiteren werden Faltungsstudien zumeist mit monomeren Proteinen aus mesophilen Organismen durchgeführt (Jaenicke, 1999, Schmid, 1999). Von einigen dimeren Proteinen wurde der Faltungsmechanismus eingehender untersucht, die zum Großteil ebenfalls aus mesophilen Organismen stammen. Dazu gehören der Trp-Aporepressor aus *E. coli* und der P22 Arc-Repressor, die jeweils die prominentesten Vertreter verschiedener Faltungsmechanismen dimerer Proteine sind. Beide falten in Abwesenheit von Gleichgewichtsintermediaten (Bowie & Sauer, 1989, Gittelman & Matthews, 1990), was auch für die Dihydrofolatreduktase aus *T. maritima* (Dams & Jaenicke, 1999), die E2-DNA-Bindungsdomäne des humanen Papilloma-Virus (Mok, *et al.*, 1996b) und Spherulin 9a aus *P. polycephalum* (Kretschmar & Jaenicke, 1999) zutrifft. Auch in der Faltungskinetik des Arc-Repressors konnten keine transienten Faltungsintermediate detektiert werden (Milla & Sauer, 1994), während die Rückfaltung des Trp-Aporepressors über mehrere Faltungsintermediate verläuft (Gittelman & Matthews, 1990, Mann & Matthews, 1993). Aufgrund einer geringen Sequenzhomologie und einer Sekundärstrukturvorhersage wurde vermutet, dass ORF56 strukturell zur Faltungsklasse des Arc-Repressors gehört (Lipps, *et al.*, 2001b).

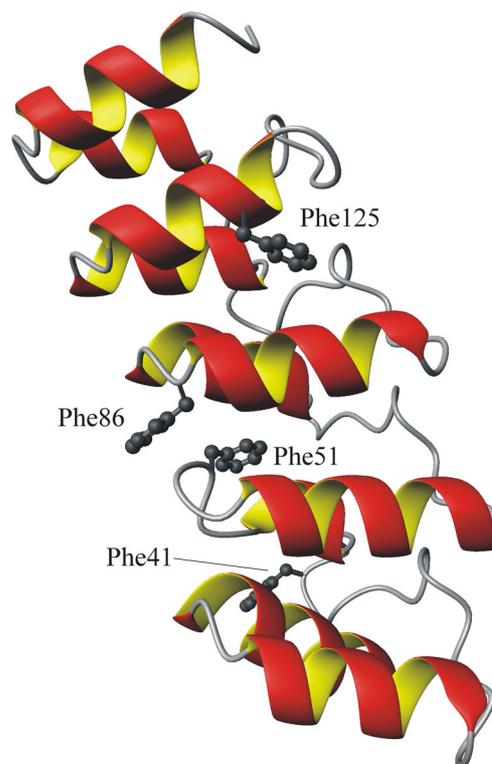
## 1.5 Der humane CDK-Inhibitor p19<sup>INK4d</sup>

Das humane Protein p19<sup>INK4d</sup> gehört zu der INK4-Familie (p15<sup>INK4b</sup>, p16<sup>INK4a</sup>, p18<sup>INK4c</sup>, p19<sup>INK4d</sup>), wobei INK4 für *inhibitor of CDK4* steht. Die Vertreter dieser Proteinfamilie stellen durch ihre spezifische Bindung und Inhibition CyclinD-abhängiger Kinasen (CDK) wichtige Regulatoren im Zellzyklus dar (Serrano, *et al.*, 1993, Sherr & Roberts, 1999). Der Übergang von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus wird durch die Phosphorylierung des Retinoblastoma-Proteins eingeleitet, die durch die Kinase des CyclinE-CDK2- und CyclinD-CDK4/6-Komplexes bewerkstelligt wird (Sherr & Roberts, 1999). Die CDK werden durch die Bindung des spezifischen Cyclins an die katalytische Untereinheit aktiviert und durch die Interaktion eines Inhibitors der CIP/KIP- bzw. INK4-Familie mit der äquivalenten Bindungsstelle ausgeschaltet. Aufgrund dieser entscheidenden Rolle der CDK-Inhibitoren im Zellzyklus wird versucht, diese Proteine als Tumorsuppressoren einzusetzen. p16<sup>INK4a</sup> stellt eines der am häufigsten mutierten Proteine in verschiedenen Krebszellen (Sherr, 1996) dar und ist bei über 50% von Haut- und Pankreaskrebspatienten verändert (Kamb, *et al.*, 1994, Nobori, *et al.*, 1994). Mutationen in p19<sup>INK4d</sup> wurden in Knochentumoren gefunden. Mäuse mit defizientem p19<sup>INK4d</sup> zeigen eine ausgeprägte Hodenverkrümmung und ein Absterben der Keimzellen (Zindy, *et al.*, 2000). Unkontrolliertes Wachstum von Epithelzellen und die Bildung bösartiger Tumore wurde ebenfalls für Mutationen in p18<sup>INK4c</sup> gefunden (Latres, *et al.*, 2000).

Die einzelnen Vertreter der INK4-Familie zeigen eine ähnliche Affinität zu CDK4 bzw. CDK6 und besitzen eine sehr ähnliche dreidimensionale Struktur. Diese wird aus vier bis fünf Ankyrin-Motiven (ANK) gebildet, wobei die Tertiärstruktur von p19<sup>INK4d</sup> in Abb. 4 gezeigt ist. Ein ANK-Motiv besteht aus zwei antiparallelen  $\alpha$ -Helices, die durch eine kurze Schleife voneinander getrennt vorliegen dem ein  $\beta$ -*hairpin* Motiv folgt. Letztere liegen senkrecht zu den beiden antiparallelen  $\alpha$ -Helices, wodurch die charakteristische L-Form entsteht. Das ANK-Motiv wurde erstmals in der dreidimensionalen Struktur des Komplexes zwischen 53BP2 und dem Zellzyklus Tumorsuppressorprotein p53 gefunden (Gorina & Pavletich, 1996). Seither sind über 4000 Proteine die ANK-Segmente beinhalten bekannt, mit deren Hilfe eine Konsensussequenz abgeleitet werden konnte. Rekombinant hergestellte Proteine, die ANK-Motive aus dieser Konsensussequenz enthalten sind sehr stark stabilisiert (Kohl, *et al.*, 2003, Mosavi, *et al.*, 2002). Bei einigen Mitgliedern der INK4-Familie (p16<sup>INK4a</sup>, p18<sup>INK4c</sup>, p19<sup>INK4d</sup>) ist die erste  $\alpha$ -Helix im zweiten ANK-Motiv unterbrochen, so dass nicht

alle  $\beta$ -*hairpin* Motive miteinander interagieren können und somit kein durchgehendes  $\beta$ -Faltblatt entsteht (Baumgartner, *et al.*, 1998b, Russo, *et al.*, 1998).

Wegen der strukturellen Verwandtschaft der einzelnen Vertreter der INK4-Familie wird die unterschiedliche biologische Aktivität der einzelnen Inhibitoren durch das Entwicklungsstadium der jeweiligen Zelle auf der Ebene der Transkription reguliert. So kommen p15<sup>INK4b</sup> und p16<sup>INK4a</sup> überwiegend in differenzierten Zellen und p18<sup>INK4c</sup> und p19<sup>INK4d</sup> in proliferierenden Geweben vor (Zindy, *et al.*, 1997). Die beiden letzteren Proteine können *in vivo* phosphoryliert werden, was auf eine mögliche Beteiligung an einer Signaltransduktionskette hindeutet (Thullberg, *et al.*, 2000b). Unterstützt wird dies durch die Tatsache, dass p19<sup>INK4d</sup> sowohl als Wechselwirkungspartner von CDK4/6 (Hirai, *et al.*, 1995) als auch als Wechselwirkungspartner des intrazellulären Steroidhormonrezeptors Nur77 (Chan, *et al.*, 1995) entdeckt wurde. Für p19<sup>INK4d</sup> wurden vier Phosphorylierungsstellen vorgeschlagen, von denen Ser66 und Ser76 nachgewiesen wurden (Thullberg, *et al.*, 2000b). Eine zusätzliche Besonderheit von p19<sup>INK4d</sup> liegt in der selektiven Ubiquitinierung und dem nachfolgenden Abbau mit Hilfe des Proteasoms, wodurch die periodische Expression während des Zellzyklus bestimmt wird (Thullberg, *et al.*, 2000a). Die Halbwertszeit beträgt *in vivo* somit nur 30 min und das Expressionsmuster während des Zellzyklus verläuft mit einer



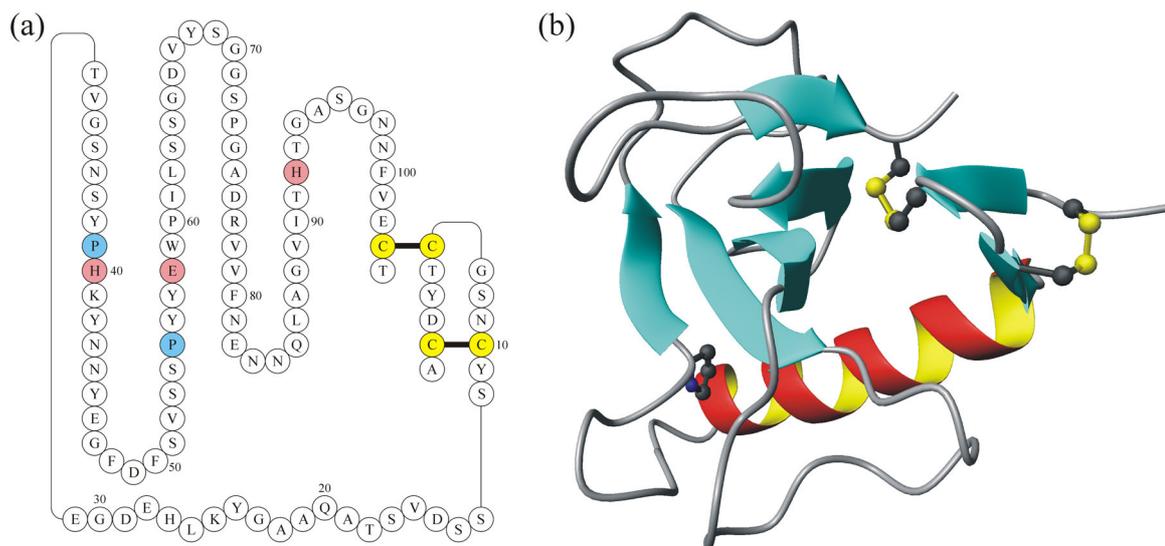
**Abb. 4:** Tertiärstruktur des humanen CDK-Inhibitors p19<sup>INK4d</sup>. Fünf Ankyrin-Motive mit je 33 Aminosäuren bilden eine gestreckte Struktur, in der die 10  $\alpha$ -Helices sequentiell angeordnet sind. Die Abbildung wurde mit dem Programm MolMol (Koradi *et al.*, 1996) und dem PDB-Eintrag 1BD8 (Baumgartner *et al.*, 1998) erstellt. Die Seitenketten der vier Phenylalanine wurden eingezeichnet.

geringen zeitlichen Verschiebung parallel zum Expressionsmuster von CyclinD (Thullberg, *et al.*, 2000b).

Der humane CDK-Inhibitor p19<sup>INK4d</sup> besteht aus 166 Aminosäuren und besitzt eine bemerkenswerte dreidimensionale Struktur, die eingehend mittels NMR-Spektroskopie und Röntgenkristallographie sowohl im freien Zustand als auch im Komplex mit CDK6 untersucht wurde (Baumgartner, *et al.*, 1998a, Brotherton, *et al.*, 1998, Kalus, *et al.*, 1997, Luh, *et al.*, 1997, Russo, *et al.*, 1998). Die Struktur besteht aus fünf Ankyrin-Motiven, einem Helix-turn-Helix-Schleife Motiv, wodurch die 10  $\alpha$ -Helices sequentiell angeordnet werden. Röntgenkristallographische und NMR-spektroskopische Untersuchungen lassen vermuten, dass der C-terminale Teil von p19<sup>INK4d</sup> stabiler und unbeweglicher ist als der N-terminale Teil (Baumgartner, *et al.*, 1998a, Brotherton, *et al.*, 1998, Renner, *et al.*, 1998). Die Faltung zur nativen Struktur erfolgt hauptsächlich über lokale Kontakte und nur begrenzt mit Hilfe von weitreichenden Wechselwirkungen, wie dies für kompakte globuläre Proteine mit komplexer Topologie der Fall ist. Desweiteren enthält p19<sup>INK4d</sup> keine Disulfidbrücken bzw. Cysteine, die die Faltung aufgrund von Isomerisierungsreaktionen signifikant verlangsamen können, was das Protein sehr interessant zum Studium elementarer Faltungsstudien macht. Eine besondere Herausforderung besteht auch darin, dass p19<sup>INK4d</sup> keine Trp- und Tyr-Reste enthält und damit die spektroskopische Charakterisierung des Proteins erschwert wird. Die Stabilität und Faltung von p16<sup>INK4a</sup> wurde schon von Tang *et al.* untersucht (Tang, *et al.*, 1999). Dieses homologe Protein besitzt nur eine geringe thermodynamische Stabilität und die Entfaltung verläuft ungewöhnlich schnell. Beides ist jedoch womöglich essentiell für dessen regulatorische Funktion. Wie oben erwähnt, werden in Tumorzellen oft veränderte Proteine der INK4-Familie gefunden. Die Untersuchung von Krebs-assoziierten Mutationen in p16<sup>INK4a</sup> ergab, dass diese die Wechselwirkungsfläche und die Interaktion zu CDK4/6 stört. Zusätzlich erfolgt eine Erniedrigung der Stabilität und die Faltung dieser Proteinvarianten verläuft meist nicht mehr korrekt (Tang, *et al.*, 1999). Somit ist ein Vergleich der Stabilitäts- und Faltungseigenschaften der homologen Proteine p19<sup>INK4d</sup> und p16<sup>INK4a</sup> von hohem Interesse, da diese möglicherweise für die unterschiedliche physiologische Bedeutung verantwortlich zeichnen.

## 1.6 Studium langsamer Faltungsreaktionen: Das Modellprotein RNase T1 aus *A. oryzae*

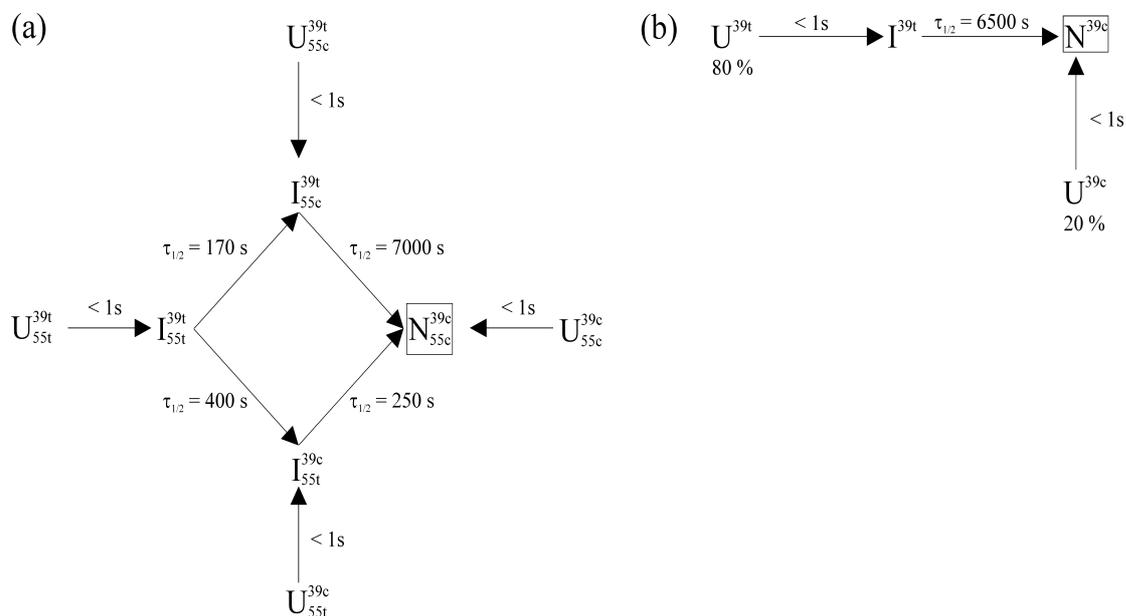
Ribonuklease T1 (RNase T1) aus dem Schimmelpilz *Aspergillus oryzae* ist ein kleines globuläres Eindomänenprotein und besteht aus 104 Aminosäuren. Die Funktion von RNase T1 besteht in der spezifischen Hydrolyse von Phosphodiesterbindungen an der 3'-Seite von Guanosin-Nukleotiden in einzelsträngiger RNA. Die Katalyse erfolgt nach einem Säure/Base-Mechanismus wobei ein intermediäres cyclisches 2',3'-Phosphodiester durchlaufen wird. Die Reste des aktiven Zentrums (His40, E58, H92) sind essentiell für die Katalyse. Die dreidimensionale Struktur wurde sowohl in Lösung (Hoffmann & Rüterjans, 1988, Pfeiffer, *et al.*, 1996, Pfeiffer, *et al.*, 1997) als auch im Kristall (Heinemann & Saenger, 1982, Martinez-Oyanedel, *et al.*, 1991) bestimmt und ist in Abb. 5b dargestellt. Sie besteht aus einer langen  $\alpha$ -Helix (S13-D29), einem kurzen zweisträngigen antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt ( $\beta$ 1,  $\beta$ 2) sowie einem langen fünfsträngigen antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt ( $\beta$ 3- $\beta$ 7). Die Abfolge der Sekundärstrukturelemente bzgl. der Aminosäuresequenz ist in Abb. 5a veranschaulicht.



**Abb. 5:** Struktur von RNase T1 aus *Aspergillus oryzae*. (a) Die Abfolge der Sekundärstrukturelemente wurde auf die Sequenz projiziert. Blau markiert sind die beiden Proline, welche in einer *cis*-Peptidbindung vorliegen. Gelb hervorgehoben sind die vier Cysteine, die paarweise eine Disulfidbrücke bilden (dicke Linie). Rosa markiert sind die Reste, die das aktive Zentrum bilden. (b) Native Tertiärstruktur, die mit Hilfe der Röntgenkristallographie bestimmt wurde. Die Abbildung wurde mit dem Programm MolMol (Koradi *et al.*, 1996) und dem PDB-Eintrag 9RNT (Martinez-Oyanedel *et al.*, 1991) erstellt. Die Seitenketten der Cysteine und von Pro39 wurden eingezeichnet. Letzteres stellt das verbleibende *cis*-Prolin in der Variante S54G/P55N RNase T1 dar, welche für die in 3.6 durchgeführten Echtzeit NMR-Experimente verwendet wurde.

RNase T1 besitzt vier Proline (Pro39, Pro55, Pro60, Pro73), wobei Pro39 und Pro55 in einer *cis*-Peptidbindung vorliegen (Heinemann & Saenger, 1982). Das Protein enthält zwei Disulfidbrücken (Cys2-Cys10, Cys6-Cys103), die einen großen Beitrag zur

thermodynamischen Stabilität liefern (Pace, *et al.*, 1988). Dabei ist die Disulfidbrücke Cys6-Cys103- (Pace & Creighton, 1986, Pace & Grimsley, 1988) im hydrophoben Kern eingebunden und dadurch vom Lösungsmittel abgeschirmt. Sie verbindet die beiden Termini. Die Cys2-Cys10-Brücke befindet sich an der Oberfläche des Proteins, bildet eine kleine Schleife und kann selektiv mit Dithiothreitol reduziert werden. Durch die Reduktion und Carboxymethylierung der beiden Disulfidbrücken (RCM-Form) wird RNase T1 so stark destabilisiert, dass sie bei niedrigen Ionenstärken entfaltet vorliegt. In Anwesenheit hoher Konzentrationen einwertiger Kationen erfolgt eine Stabilisierung der RCM-Form, so dass diese eine nativ-ähnliche Struktur einnimmt (Hagn, 2003, Oobatake, *et al.*, 1979, Pace & Grimsley, 1988).



**Abb. 6:** Kinetische Modelle für die Rückfaltung von (a) Wildtyp RNase T1 und (b) S54G/P55N RNase T1. Die hoch- und tiefgestellten Indices geben die *cis*- bzw. *trans*-Konformation der Peptidyl-Prolylbindung von Pro39 und Pro55 an (c bzw. t). Die einzelnen Spezies wurden mit U (entfalteter Zustand), I (Faltungsintermediat) und N (nativer Zustand) bezeichnet. Die Zeitkonstanten sind für 10 °C angegeben.

Der Faltungsmechanismus von RNase T1 wurde eingehend untersucht (Kiefhaber, *et al.*, 1990a, Kiefhaber, *et al.*, 1990b, Kiefhaber, *et al.*, 1990c, Kiefhaber, *et al.*, 1992b, Kiefhaber, *et al.*, 1992c, Mayr, *et al.*, 1994, Mayr, *et al.*, 1996) und ist für die Rückfaltung in Abb. 6 zusammengefasst. Im Wildtypprotein von RNase T1 liegen die beiden Proline P39 und P55 in der *cis*-Konformation vor. Da im entfalteten Zustand das Gleichgewicht zwischen *trans*- und *cis*-Peptidyl-Prolylbindungen zu ca. 80% auf der Seite der *trans*-Konformation liegt, sind nur ca. 4% schnell faltender Proteinmoleküle vorhanden (Kiefhaber, *et al.*, 1990c). Die überwiegende Mehrheit der Proteinmoleküle besitzen unterschiedliche Kombinationen bzgl.

der Konformation der beiden Proline, woraus der komplexe Rückfaltungsmechanismus resultiert (Abb. 6a). Eine starke Vereinfachung der Rückfaltung (Abb. 6b) folgt durch den Austausch von Ser54 und Pro55 zu Gly54 und Asn55 mittels ortsgerichteter Mutagenese (S54G/P55N RNase T1), wobei die konformationelle Stabilität kaum beeinflusst wird (Kiefhaber, *et al.*, 1990a). Diese Aminosäureaustausche wurden aufgrund eines Sequenzvergleichs mit dem nah verwandten homologen Enzym RNase C2 aus *Aspergillus clavatus* vorgenommen. In der Kristallstruktur von S54G/P55N RNase T1 findet man nur geringfügige Unterschiede in dem Schleifenbereich um die Mutationsstellen und eine *trans*-Peptidbindung zwischen Gly54 und Asn55 (Hinrichs *et al.*, unveröffentlichte Ergebnisse). Im entfalteten Zustand unterscheiden sich die Proteinmoleküle nur in der Konformation der Peptidbindung vor Pro39, wobei  $U^{39c}$  und  $U^{39t}$  sehr schnell zum nativen Zustand  $N^{39c}$  bzw. zum transienten Faltungsintermediat  $I^{39t}$  reagieren. Die lange Lebensdauer von  $I^{39t}$  und der vereinfachte Faltungsmechanismus macht es möglich, eine eingehende strukturelle Charakterisierung mittels mehrdimensionaler Echtzeit NMR-Spektroskopie durchzuführen (siehe 3.6). Die Zeitkonstante der Rückfaltung bei Temperaturen zwischen 1 °C und 15 °C liegt zwischen 350 min und 45 min. Die langsame Reaktion von  $I^{39t}$  zum nativen Zustand liegt voraussichtlich an der Lage von Pro39 in der Tertiärstruktur des nativen Proteins bzw. teilgefalteter Strukturen in  $I^{39t}$ . Diese teilgefalteten Strukturen erschweren die Isomerisierungsreaktion (Kiefhaber, *et al.*, 1990c, Kiefhaber, *et al.*, 1992a), was sich in der geringen katalytischen Effizienz verschiedener Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen (PPIasen) niederschlägt (Hagn, 2003).

## 1.7 Problemstellung und Ziele der vorliegenden Arbeit

In dieser Arbeit sollten vier Proteine bezüglich ihrer Struktur, Faltung und Funktion untersucht werden. Hierbei sollte die NMR-Spektroskopie als zentrale spektroskopische Methode im Vordergrund stehen. Beim Kälteschockprotein CspB und der Ribonuklease T1 handelt es sich um Proteine, deren Eigenschaften schon eingehend in der Arbeitsgruppe charakterisiert wurden, während ORF56 und der CDK-Inhibitor p19<sup>INK4d</sup> zuvor noch nicht untersucht wurden.

Die NMR-Spektroskopie stellt eine Vielzahl von Methoden zur Verfügung, die zur Charakterisierung unterschiedlichster Eigenschaften von Proteinen herangezogen werden können. Eine zentrale Rolle dabei spielt die Bestimmung der dreidimensionalen Struktur und das Studium der Dynamik von Proteinen auf einer sehr breiten Zeitskala. Für die detaillierten NMR-spektroskopischen Untersuchungen sollten die vier Proteine in den notwendigen Mengen hergestellt und gereinigt werden, sowie <sup>15</sup>N und falls notwendig <sup>15</sup>N/<sup>13</sup>C bzw. <sup>15</sup>N/<sup>13</sup>C/<sup>2</sup>H Isotopen-angereichert werden.

Das Kälteschockprotein aus *B. subtilis* ist aufgrund seiner Größe hervorragend für NMR-Studien geeignet. Eine Zielsetzung dieser Arbeit war, die dynamischen Eigenschaften von CspB im Pico- bis Nanosekundenbereich anhand von <sup>15</sup>N Relaxationsmessungen zu untersuchen. Dabei sollte erstmals die Viskosität als veränderliche physikalische Größe eingesetzt werden, um die Zahl der experimentellen Daten bei einer festen Feldstärke zu erhöhen. Die Faltung des Kälteschockproteins erfolgt im Millisekundenbereich nach dem Zweizustandsmodell die somit ebenfalls eine attraktive Zielsetzung darstellt. In dieser Arbeit sollten dynamische NMR-Techniken etabliert und angewendet werden, um den Übergangszustand der elementaren Faltungsreaktion von CspB zu untersuchen und die Gültigkeit des Zweizustandsmodells anhand vieler ortsspezifischer Sonden zu verifizieren. Desweiteren sollte die Wechselwirkung von CspB mit einzelsträngigen Nukleinsäuren näher charakterisiert werden, was zum besseren Verständnis der Interaktion von OB-*fold* Proteinen mit Nukleinsäuren beitragen sollte. Nach der Identifikation der an der Wechselwirkung beteiligten Reste sollten diese mittels ortsgerichteter Mutagenese verifiziert und die einzelnen Beiträge dieser Reste näher beleuchtet werden. Abschließend sollte die NMR-spektroskopische Bestimmung der Tertiärstruktur eines CspB/ssDNA-Komplexes erfolgen und dessen dynamische Eigenschaften im Picosekunden- bis Nanosekundenbereich ebenfalls mit <sup>15</sup>N Relaxationsmessungen analysiert werden.

Der Faltungsmechanismus von RNase T1 wurde vor dieser Arbeit bereits sehr detailliert mit Hilfe optischer Spektroskopie untersucht. Die Variante S54G/P55N RNase T1 besitzt im

Vergleich zum Wildtypprotein nur eine *cis*-Prolylpeptidbindung, deren Isomerisierung ratenlimitierend für die Rückfaltung ist. Daher tritt während der Rückfaltung ein transientes Intermediat auf, dessen strukturelle Charakterisierung mittels Echtzeit NMR-Spektroskopie ein wichtiger Schritt zum Verständnis des Faltungsweges darstellt. Allerdings geben ein- und zweidimensionale Echtzeit NMR-Techniken nur einen begrenzten Einblick. Daher sollten zwei- und dreidimensionale Echtzeit NMR-Experimente entwickelt und analysiert werden, die eine Vielzahl struktureller Informationen beinhalten und die strukturelle Charakterisierung des Faltungsintermediats ermöglichen sollten.

Eine Vielzahl von Faltungsstudien beschäftigt sich mit kleinen monomeren Proteinen aus mesophilen Organismen. In mehreren Fällen wurden auch thermophile oder hyperthermophile Homologe untersucht, um deren enorme thermodynamische Stabilität zu ergründen. Die Faltung von dimeren Proteinen, die aus hyperthermophilen Organismen stammen, wurde jedoch nur bei wenigen Beispielen untersucht. Daher sollte der Faltungsmechanismus des homodimeren Proteins ORF56 aus *Sulfolobus islandicus*, einem acidohalophilen und hyperthermophilen Organismus, mit zahlreichen biophysikalischen Methoden (Fluoreszenz, Circular dichroismus, NMR, *stopped flow*) untersucht werden. Zusätzlich sollten die nötigen NMR-Experimente zur Bestimmung der dreidimensionalen Struktur durchgeführt werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, den Faltungsmechanismus des humanen CDK-Inhibitors p19<sup>INK4d</sup> zu analysieren. Die meisten Modellproteine, die zu Faltungsstudien herangezogen werden, besitzen globuläre Tertiärstrukturen. Die dreidimensionale Struktur von p19<sup>INK4d</sup> ist jedoch modular aufgebaut, so dass die Faltung nahezu ohne die Ausbildung weitreichender Wechselwirkungen erfolgen kann. Zusätzliches Interesse zur Untersuchung der Faltung von p19<sup>INK4d</sup> besteht in dessen physiologischer Relevanz, da bestimmte Tumorzellen veränderte p19<sup>INK4d</sup>-Varianten enthalten. Für das homologe Protein p16<sup>INK4a</sup> wurde nachgewiesen, dass Varianten mit cancerogenen Mutationen eine deutlich verminderte Stabilität besitzen. Da p19<sup>INK4d</sup> und p16<sup>INK4a</sup> ähnliche Funktionen im Zellzyklus ausüben sollte untersucht werden, inwieweit sich die beiden Proteine in ihrer Stabilität und ihrem Faltungsmechanismus unterscheiden.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Biochemikalien, Chemikalien und Säulenmaterialien

Guanidiniumthiocyanat (Acros, D);  $^{15}\text{N}$ -Ammoniumchlorid,  $^2\text{H}_6$ -Ethylenglykol,  $^{13}\text{C}_6$ -Glucose (Campro, Berlin, D); Cacodylsäure-Natriumsalz-Trihydrat, Chloroform/Isoamylalkohol (29:1), Dioxan, Imidazol (Fluka, Neu-Ulm, D); Ampicillin, IPTG, Kanamycin (Gerbu, Gailberg, D); Guanidiniumchlorid *ultra pure*, Harnstoff *ultra pure* (ICN, Aurora, USA); DEAE-Fractogel EMD-650M, TMAE-Fractogel EMD-650M (Merck, Darmstadt, D); Molekulargewichtsstandards  $\lambda$ -DNA/*Eco*130I, pUC19/*Msp*I (MBI Fermentas, St.Leon-Rot, D); Butylsepharose FF, Pharmacia FlexiPrep<sup>TM</sup>-Kit, Superdex 75 Prep Grade (Pharmacia, Freiburg, D); Ni-NTA Superflow (Qiagen, Hilden, D); Agarose, Ethidiumbromid, Phenol, Roti-Load-Proteinauftragspuffer, Tris-(2-carboxymethyl)-aminomethan (Tris), stabilisierte wässrige Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamid-Lösung (29:1) (Roth, Karlsruhe, D); Ammoniumperoxodisulfat, Bromphenolblau, Natriumdodecylsulfat, N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin (TEMED), Xylencyanol (Serva, Heidelberg, D); Antifoam, Coomassie Brillant Blue G, Cytidin-2'-Monophosphat, Deuteriumoxid, Nickelsulfat-hexahydrat (Sigma, Deisenhofen, D)

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden im Reinheitsgrad p.A. von der Firma Merck (Darmstadt, D) bezogen. Für alle Pufferlösungen wurde deionisiertes Wasser (Leitfähigkeit  $< 0.1 \mu\text{S}/\text{cm}$ ) verwendet, welches mit einem Seralpur-Filtersystem (Seral, Ransbach-Baumbach, D) hergestellt wurde. Puffer für spektroskopische Messungen und für den Einsatz in der FPLC wurden durch  $0.45 \mu\text{m}$  Nylonfilter filtriert. Die Puffer für spektroskopische Anwendungen wurden vor der Messung mit einer Membranvakuumpumpe entgast.

#### 2.1.2 Nährmedien

Nährmedien und Lösungen für molekularbiologische Anwendungen wurden vor dem Gebrauch 20 min bei  $121 \text{ }^\circ\text{C}$  und 1 bar Überdruck autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurde den Nährmedien das jeweilige Antibiotikum zugegeben. Zur Herstellung fester Nährböden wurden 15 g Agar pro 1 l Medium zugesetzt. Hitzelabile Lösungen wurden mit  $0.22 \mu\text{m}$ -Filtern sterilfiltriert.

LB-Medium: 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl pro 1 l  $\text{H}_2\text{O}$

dYT-Medium: 16 g Trypton, 10 g Hefeextrakt, 5 g NaCl pro 1 l  $\text{H}_2\text{O}$

5xM9: 85 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12 H<sub>2</sub>O, 15 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.5 g NaCl, 5 g <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl ad 1 l H<sub>2</sub>O

TS2: 100 mg ZnSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O, 30 mg MnCl<sub>2</sub>·4 H<sub>2</sub>O, 300 mg H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 200 mg CoCl<sub>2</sub>·6 H<sub>2</sub>O, 20 mg NiCl<sub>2</sub>·6 H<sub>2</sub>O, 10 mg CuCl<sub>2</sub>·2 H<sub>2</sub>O, 900 mg Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2 H<sub>2</sub>O, 20 mg Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> ad 1 l H<sub>2</sub>O und sterilfiltrieren

Minimalmedium: 200 ml 5xM9, 2 ml TS2-Lösung, 1 ml 1 M MgSO<sub>4</sub>, 1 ml 0.1 M CaCl<sub>2</sub>, 25 ml 10 mM Fe(III)citrat, 20 ml 20% (w/v) Glucose (sterilfiltriert) pro 1 l Gesamtvolumen

### 2.1.3 Bakterienstämme

*Escherichia coli* BL21(DE3): B F<sup>-</sup> *dcm ompT hsdS*(r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) *gal*(DE3); *Escherichia coli* XL1-Blue: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17* (r<sub>K</sub><sup>-</sup>m<sub>K</sub><sup>+</sup>) *supE44 relA1 λ lac* [F'*proAB lacI<sup>q</sup> lacZΔM15 Tn10* (Tet<sup>r</sup>)] (Stratagene, Heidelberg, D); *Escherichia coli* K38: *hfrC tonA22 garB12 ompF relA1 pit-10 spoT1 T2 phoA6 lys-3 metB10 trpC2*

### 2.1.4 Verbrauchsmaterialien

Plastikküvetten (Brand, Wertheim, D); Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg, D); Petrischalen, PPN-Röhrchen (Greiner, Frickenhausen, D); NMR-Probenröhrchen (Norrell, Basel, CH); NAP-10 Säule aus Sephadex G-25 (Pharmacia, Freiburg, D), Membranfilter 0.45 µm und 0.2 µm, Papierfilter (Schleicher & Schuell, Dassel, D); NMR-Probenröhrchen (Shigemi, Allison Park, PA, USA); Spectro/Por-Dialyseschlauch (Ausschlußgrenze 3.5 kDa) (Spectrum, Los Angeles, CA, USA)

### 2.1.5 Geräte

DX.17MV Sequential Stopped-Flow Spektrofluorimeter (Applied Photophysics, Leatherhead, U.K.); Transilluminator, 302 nm (Bachhofer, Reutlingen, D); Microfuge E (Beckman, Glenrothes, GB); Bio-Rad Gene-Pulser II (Bio-Rad, München, D); Branson Sonifier B15 Ultraschall Desintegrator mit Mikrospritze (Branson, Heusenstamm, D); NMR-Spektrometer Avance360, DRX500, DRX600, Avance600, DMX750, Avance700, Avance750, Avance800 (Bruker, Rheinstetten, D); Christ Alpha 1-4 Gefriertrocknungsanlage (Christ, Osterode, D); Zentrifuge „Sorvall RCB5Plus“ (DuPont, Bad Homburg, D); Thermoschüttler „Thermomixer 5436“, Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburg, D); Haake Thermostate K und CH (Haake, Karlsruhe, D); Brutschrank, Zentrifuge „Labofuge 400R“ (Heraeus, Hanau, D); Spektralfluorimeter F-4010, F-4500 Hitachi (Tokyo, Japan); Dampfsterilisator FVS 2/3 Typ 6.0 (Integra Biosciences, Fernwald, D); Jasco J-600 Spektropolarimeter, Peltierelement PTC-348I (Jasco, Groß-Umstadt, D); Spektrometer „UVIKON 860“ (Kontron Instruments,

Neufahrn, D); Refraktometer (Krüss, Hamburg, D); Bio-Print Darkroom CN-UV/WL (LTF-Labortechnik, Wasserburg, D); Microfluidizer M-110L (Microfluidics, Newton, USA); Thermocycler PTC 100 "Mini-Cycler" (MJ Research, Watertown, USA); Schüttler G24, Wasserbadschüttler „Innova 300“ (New Brunswick, Edison, USA); FPLC-Anlage (Pharmacia, Freiburg, D); Sartorius Laboratory L610D Laborwaage, Sartorius Research R200D Analysenwaage (Sartorius, Göttingen, D); Unix-Workstation „Indy“ und „O2“ (Silicon Graphics, USA); Cary 100 UV-VIS-Spektrophotometer (Varian, Darmstadt, D)

### 2.1.6 Software

Grafit 3.0, Grafit 4.0 (Erithacus Software, Staines, U.K.); SwissProt-Pdb-Viewer (GlaxoWellcome, Genf, CH); Chromas 1.6.1 (Technelysium, Helensvale, Australien); MolMol 2.6 (Koradi, *et al.*, 1996); Molscript 1.4 (Kraulis, 1991); Biocapt (LTF-Labortechnik, Wasserburg, D); Scientist 2.01 (Micromath, Salt Lake City, USA); Felix97, Insight II (MSI, San Diego, USA); Agadir (Munoz & Serrano, 1995a, Munoz & Serrano, 1995b); OligoDemo (National Biosciences Inc., Plymouth, USA); RasMol 2.6 (Sayle, R. A., University of Massachusetts, USA); NDEE (Symbiose, Bayreuth, D)

## 2.2 Allgemeine molekularbiologische Methoden

### 2.2.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die horizontale Elektrophorese in Agarose-Gelen wurde zur analytischen Trennung von DNA-Fragmenten eingesetzt. Die Analyse von Fragmenten von bis zu 500 bp Länge wurde bei einer Agarosekonzentration von 1.6% (w/v) in 0.5 x TAE-Puffer (20 mM Tris/HCl, 10 mM Eisessig, 0.5 mM EDTA pH<sup>20 °C</sup> 8.0) durchgeführt, während bei längeren Fragmenten die Agarosekonzentration 0.6% (w/v) betrug. Vor dem Auftragen wurden die DNA-Proben mit 20% (v/v) Probenpuffer (4 M Harnstoff, 10 mM EDTA, 50% (v/v) Glycerin, 0.1% (w/v) Bromphenolblau) versetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 6 V/cm Elektrodenabstand. Anschließend wurden die getrennten DNA-Banden mit einer Ethidiumbromidlösung ( $\approx 2 \mu\text{g/ml}$  Ethidiumbromid in 0.5x TAE-Puffer) gefärbt und durch Bestrahlung mit einem UV-Transilluminator (Anregungswellenlänge 302 nm) analysiert.

### 2.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA

Für die Isolierung von Plasmid-DNA wurde der Pharmacia FlexiPrep<sup>TM</sup>-Kit (Pharmacia, Freiburg) verwendet. Hierzu wurden 5 ml dYT-Flüssigmedium mit *E. coli*-Zellen, die das zu isolierende Plasmid enthielten, in Gegenwart des Selektionsantibiotikums inokuliert und über

Nacht bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurden 1.5 ml der Übernachtskultur (ÜNK) zentrifugiert (5 min, 4 °C, 13000 min<sup>-1</sup>) und die Zellen entsprechend der Herstellerangaben behandelt. Die Zellen wurden einer alkalischen Lyse unterzogen (Sambrook, *et al.*, 1989) und die DNA an eine Anionenaustauschermatrix gebunden. Die Elution erfolgte mit 50 µl ddH<sub>2</sub>O.

### 2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Kolonie-PCR

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten erfolgte mit der Polymerase-Kettenreaktion. Je nach Anwendung wurde die thermostabile DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (*Taq*-Polymerase) oder aus *Pyrococcus furiosus* (*Pfu*-Polymerase) verwendet. Letztere besitzt eine *proofreading*-Aktivität und dadurch eine höhere Genauigkeit sowie eine geringere Syntheserate. Die Reaktionsmischung in ddH<sub>2</sub>O enthielt für 2 U *Taq*-Polymerase 1x Mg<sup>2+</sup>-freien *Taq*-Puffer, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub> (beide von Promega, Madison, USA), 200 µM dNTPs, je 0.2 µM Primer (z.B. T7-Promotor/T7-Terminator) und 1 ng bis 10 ng Matrizen-DNA (z.B. Plasmid-DNA). Für die *Pfu*-Polymerase wurde 1x *Pfu*-Reaktionspuffer (Promega, Madison, USA) verwendet. Die Reaktionen wurden in einem Thermocycler PTC 100 (MJ Research) oder Mastercycler Gradient (Eppendorf) durchgeführt.

Bei der Kolonie-PCR wurde als Matrize keine gereinigte DNA sondern eine einzelne *E. coli*-Zellkolonie verwendet. Diese wurden mit einer sterilen Pipettenspitze in das PCR-Reaktionsgefäß überführt und anschließend mit derselben Spitze 50 µl dYT-Medium angeimpft. Mit Hilfe einer Kolonie-PCR wurde überprüft, ob das gewünschte DNA-Fragment in einem Klon enthalten war. Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte über Agarose-Gelelektrophorese (2.2.1).

### 2.2.4 Reinigung von PCR-Fragmenten

DNA-Fragmente wurden entweder direkt aus dem PCR-Ansatz oder mittels Agarose-Gelelektrophorese präparativ isoliert (siehe 2.2.1). Bei letzterem Verfahren wurde die gewünschte Bande ausgeschnitten und nach Zugabe von zwei Volumeneinheiten 6 M NaI bei 55 °C geschmolzen. Bei dem alternativen Verfahren wurde dem PCR-Ansatz das doppelte Volumen 6 M NaI zugegeben. Danach wurden 15 µl Silicasuspension (1 g Silica in 10 ml 3 M NaI) zugegeben und 5 min auf Eis inkubiert. Das Silica wurde kurz abzentrifugiert (15 s, 25 °C, 13000 min<sup>-1</sup>) und dreimal mit 500 µl Waschpuffer (10 mM Tris/HCl pH<sup>25 °C</sup> 7.5, 50 mM NaCl, 2.5 mM EDTA, 50% (v/v) Ethanol) gewaschen und jeweils das Silica abzentrifugiert, wobei die letzte Zentrifugation für 3 min erfolgte. Der Überstand wurde

restlos abgenommen und verworfen. Das Silica wurde mit 20 µl ddH<sub>2</sub>O versetzt und für 5 min bei 45 °C inkubiert. Durch Zentrifugation wurde das Silica abgetrennt und der DNA-haltige Überstand bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

### 2.2.5 Sequenzspezifische Mutagenese (*QuikChange*)

Die Einführung von sequenzspezifischen Mutationen wurde mit dem *QuikChange*-System von Stratagene (Heidelberg) bewerkstelligt. Hierzu wurde doppelsträngige Plasmid-DNA mit Hilfe der thermostabilen *Pfu*-Polymerase linear amplifiziert. Beide Primer waren zueinander komplementär, enthielten die Mutation und ermöglichten die Synthese eines doppelsträngigen DNA-Moleküls ohne Fehlpaarung. Die Reaktionsmischung in ddH<sub>2</sub>O bestand aus 1x *Pfu*-Reaktionspuffer, 0,3 mM dNTPs, je 0,5 µM Primer und 50 ng Matrizen-DNA. Die Zugabe von 3 U *Pfu*-Polymerase erfolgte erst nach dem Aufheizen auf 95 °C (*hot start*) aufgrund der 3',5'-Exonukleaseaktivität der *Pfu*-Polymerase bei tieferer Temperatur.

Zur Entfernung der Matrizen-DNA wurde zum Reaktionsansatz das Restriktionsenzym *DpnI* (20 U) zugegeben und für 2 h bis 12 h bei 37 °C inkubiert. *DpnI* spaltet spezifisch *dam*-methylierte DNA (Zielsequenz 5'-G<sup>m6</sup>ATC-3') und somit nicht die mutagenisierte neu synthetisierte DNA. Anschließend wurde die Reaktionsmischung 20 min mikrodialysiert und ein Aliquot in *E. coli* XL1-Blue elektrotransformiert (2.2.7).

### 2.2.6 Herstellung und Transformation CaCl<sub>2</sub>-kompetenter *E. coli*-Zellen

500 ml dYT-Medium wurden mit 1 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* BL21(DE3) pLysS oder *E. coli* K38 pGP1-2 inokuliert und bei 30 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 geschüttelt. Die Zellsuspension wurde 10 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 4 °C für 10 min mit 4000 min<sup>-1</sup> im GS3-Rotor zentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden auf Eis in 200 ml 0,1 M CaCl<sub>2</sub> resuspendiert, mindestens 30 min bei 4 °C inkubiert und anschließend zentrifugiert (GS3-Rotor, 10 min, 4000 min<sup>-1</sup>, 4 °C). Das Bakterienpellet wurde dann in 5 ml 0,1 mM CaCl<sub>2</sub>, 20% Glycerin aufgenommen, in 200 µl Aliquots aufgeteilt und bei -80 °C gelagert.

Zur Transformation wurde je ein Aliquot CaCl<sub>2</sub>-kompetenter Zellen auf Eis aufgetaut, der gewünschte Expressionsvektor (1 ng bis 10 ng Plasmid-DNA) zugegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen 90 s einem 42 °C Hitzeimpuls ausgesetzt und sofort in 1 ml dYT Medium überführt. Wurde Ampicillin als Selektionsantibiotikum verwendet (Expressionsvektoren pCSPB3, pET11, pET15) erfolgte eine Inkubation von 30 min bei 37 °C. Anschließend wurden die Zellen kurz abzentrifugiert, der Großteil des Überstands abgenommen und die Zellen mit dem restlichen Medium resuspendiert. Die Suspension

wurde dann auf Nährböden mit den gewünschten Selektionsantibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### 2.2.7 Herstellung und Transformation elektrokompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Herstellung elektrokompetenter *E. coli* XL1-Blue-Zellen wurden 500 ml dYT-Medium mit 1 ml einer ÜNK angeimpft und bei 30 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0.7 geschüttelt. Die Kultur wurde 15 min auf Eis inkubiert und die Zellen mittels Zentrifugation im GS3-Rotor geerntet (10 min, 5000 min<sup>-1</sup>, 4 °C). Nach dem Waschen des Zellpellets mit 500 ml eiskaltem ddH<sub>2</sub>O und anschließender Zentrifugation (GS3-Rotor, 10 min, 5000 min<sup>-1</sup>, 4 °C) erfolgte die Resuspendierung der Zellen in 250 ml kaltem 10% (v/v) Glycerin. Nach der nochmaligen Zentrifugation (siehe oben) wurde das erhaltene Zellpellet in 10 ml 10% (v/v) Glycerin resuspendiert und im SS34-Rotor zentrifugiert (10 min, 6000 min<sup>-1</sup>, 4 °C). Danach wurden die Zellen in 1.5 ml 10% (v/v) Glycerin aufgenommen, in 40 µl Aliquots aufgeteilt bei -80 °C gelagert.

Zur Transformation wurde ein Aliquot auf Eis aufgetaut und mit Plasmid-DNA versetzt, die zuvor 10 min bis 15 min mikrodialysiert wurde. Die Zellsuspension wurde in eine eisgekühlte Elektroporationsküvette überführt. Die Transformation des Plasmids erfolgte durch einen elektrischen Puls (2.5 kV, 25 µF, 200 Ω, 4 ms bis 5 ms) mit dem *Easyject Prima*-Elektroporator (Equiobio). Nach dem elektrischen Puls wurden 600 ml dYT-Medium zugegeben, 10 min bei 37 °C inkubiert (Expressionsphase) und die Zellen abzentrifugiert (8000 min<sup>-1</sup>, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen, die Zellen auf dYT-Nährböden mit dem gewünschten Selektionsantibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### 2.2.8 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Das von Schägger und von Jagow eingeführte Verfahren zur SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ermöglicht eine gute Trennung von Proteinen zwischen 5 kD und 20 kD durch Verwendung des Folgeions Tricin (Schägger & von Jagow, 1987) anstelle von Glycin (Laemmli, 1970, Ornstein, 1964). Für das 5 cm hohe 10%ige Trenngel wurden 7.85 ml ddH<sub>2</sub>O, 7.85 ml Gelpuffer (3 M Tris/HCl, 0.1% (w/v) SDS pH<sup>25°C</sup> 8.45) und 8.1 ml 30% Acrylamidlösung gemischt, gründlich entgast und die Polymerisation durch Zugabe von 15 µl N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) und 200 µl 10% (w/v) Ammoniumpersulfat (APS) gestartet. Das gegossene Trenngel wurde sofort mit wassergesättigtem Isobutanol überschichtet und polymerisierte für mindestens 1 h. Nach der Polymerisation wurde das Isobutanol dekantiert und die Grenzfläche gründlich mit VE-Wasser gespült, das Sammelgel gegossen und die Kämme eingesetzt. Die Lösung des 1.5 cm hohen Sammelgels enthielt

8.0 ml ddH<sub>2</sub>O, 3.3 ml Gelpuffer und 1.9 ml 30% Acrylamidlösung. Zur Polymerisation wurden 100 µl 10% APS und 10 µl TEMED zugegeben.

Die Elektrophorese erfolgte in einer Midget-Vertikalelektrophoresekammer (Pharmacia). Als Kathoden- bzw. Anodenpuffer diente 0.1 M Tris, 0.1 M Tricin, 0.1% (w/v) SDS pH<sup>25°C</sup> 8.25 bzw. 0.2 M Tris/HCl, pH<sup>25°C</sup> 8.9. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit 4x Roti-Load-Probenauftragspuffer (200 mM Tris/HCl pH<sup>25°C</sup> 7.0, 120 mM DTE, 40 mM EDTA, 48% (w/v) Glycerin, 15% (w/v) SDS, 0.04% (w/v) Bromphenolblau) versetzt und mindestens 5 min bei 100 °C inkubiert. Die Proben wurden kurz zentrifugiert und anschließend 5 µl-20 µl aufgetragen (5 µg -10 µg Protein pro Geltasche). Bei der Vorelektrophorese im Sammelgel betrug die Stromstärke 20 mA pro Gel. Nachdem das Trenngel erreicht wurde, erfolgte die Erhöhung der Stromstärke auf 40 mA pro Gel.

Nach der Elektrophorese wurde das Sammelgel entfernt, das Trenngel unter Schwenken 15 min in Fixierlösung (20% (w/v) Trichloressigsäure) inkubiert und anschließend mindestens 120 min in 50% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure, 0.1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G gefärbt. Nach Behandlung mit Entfärbelösung (10% (v/v) Essigsäure, 5% (v/v) Methanol) über Nacht wurden die Gele zur Aufbewahrung für mehrere Tage in Trocknungspuffer (10% (v/v) Essigsäure, 2% (v/v) Glycerin) entwässert, zwischen zwei Cellophanfolien gespannt und getrocknet bzw. photographiert.

## 2.3 Gewinnung von Proteinen

### 2.3.1 Reinigung des Kälteschockproteins CspB und verschiedener Varianten

Für Wildtyp-CspB und nicht zu stark destabilisierte Varianten (K13Q, F15Y, F27A, H29Q, F30A, F30W, G35A, G35P, F38A, G54A, P58A) wurde *E. coli* K38 als Expressionsstamm verwendet, der die beiden Plasmide pGP1-2 und pCSPB3 enthält. Dabei kodiert pGP1-2 für den hitze-sensitiven λ-Repressor (*cI857*) und die T7-RNA-Polymerase (Tabor & Richardson, 1985), pCSPB3 enthält das Strukturgen von CspB, das unter der Kontrolle des T7-Promotors steht. Durch Hitzeinduktion, d.h. Erhöhung der Temperatur von 30 °C auf 43 °C wird die Repression der T7-RNA-Polymerase-Expression aufgehoben und dadurch die spezifische Expression von CspB ermöglicht. Beide Plasmide (pGP1-2 bzw. pCSP3) vermitteln eine Antibiotikum-Resistenz (Kanamycin bzw. Ampicillin). Die Expression labiler Varianten von CspB (F9A, F15A, G54P) wurde bei 30 °C in dem *E. coli*-Stamm BL21(DE3) pLysS durchgeführt, wobei pET11a als Expressionsvektor eingesetzt wurde (Martin, *et al.*, 2002). Dieses Plasmid codiert zusätzlich für das Enzym β-Lactamase,

das die Ampicillin-Resistenz vermittelt, während das Plasmid pLysS für die Chloramphenicol-Resistenz (Chloramphenicolacetyltransferase) codiert. Die Induktion erfolgte bei einer  $OD_{600}$  von 0.7 durch Zugabe von 1 mM IPTG für 4 h. Zur Markierung von CspB mit  $^{15}\text{N}$  wurde der *E. coli*-Stamm BL21(DE3) mit dem Vektor pET11a verwendet und die Fermentation in M9-Minimalmedium durchgeführt.

Die Reinigung von CspB aus *B. subtilis* erfolgte nach dem Protokoll von Schindelin *et al.* (Schindelin, *et al.*, 1992), wobei die von Schindler vorgeschlagenen Modifikationen berücksichtigt wurden (Schindler, 1994, Schindler, 1997). Die Zellen wurden mit einem Mikrofluidizer aufgeschlossen und unlösliche Bestandteile mittels Zentrifugation abgetrennt. Für alle chromatographischen Reinigungsschritte wurde eine FPLC-Anlage von Pharmacia verwendet. Das Reinigungsprotokoll umfasst eine Anionenaustauschchromatographie (TMAE-Fractogel EMD-650), eine hydrophobe Interaktionschromatographie (Butyl-Sepharose) und eine Größenausschlusschromatographie (HiLoad Superdex 75 prep grade) und wurde bei 4 °C durchgeführt. Das jeweilige Protein wurde gegen  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  dialysiert, lyophilisiert und bei -20 °C gelagert. Die Ausbeuten lagen zwischen 15 mg (CspB F9A) und 180 mg (Wildtyp-CspB) pro 5 l Bakterienkultur. Bei der  $^{15}\text{N}$ -Markierung wurden 30 mg pro 5 l M9-Minimalmedium erhalten.

Die Proteinvarianten K13Q, F15Y, F17A, H29Q, F30A, F38A, P58A wurden freundlicherweise von Dr. T. Schindler und Dr. D. Perl (AG Prof. F. X. Schmid, Universität Bayreuth) zur Verfügung gestellt. Wildtyp-Protein von Csp aus *B. caldolyticus* bzw. *T. maritima* wurden freundlicherweise von C. Magg (AG Prof. F. X. Schmid, Universität Bayreuth) bzw. Dr. W. Kremer (AG Prof. H. R. Kalbitzer, Universität Regensburg) bereitgestellt.

### 2.3.2 Reinigung des Proteins ORF56

Das ORF56-Protein aus *Sulfolobus islandicus* wurde mit dem *E. coli* Stamm BL21 (DE3)pLysS überproduziert. Der Expressionsvektor pET28d *orf56* sowie gereinigtes Protein für die ersten Messungen wurde freundlicherweise von Dr. G. Lipps (AG Prof. G. Krauss, Universität Bayreuth) zur Verfügung gestellt. Die Expression wurde bei 37 °C mit Hilfe des T7-RNA-Polymerase-/T7-Promotorsystems durchgeführt, das mit 1 mM IPTG induziert wurde. Die Reinigung von ORF56 wurde wie in (Lipps, *et al.*, 2001b) beschrieben durchgeführt. Dem Zellaufschluss unter Verwendung eines Mikrofluidizers folgte die Abtrennung unlöslicher Bestandteile durch Zentrifugation. Der Überstand wurde einem Hitzeschritt unterworfen (15 min bei 70 °C) und aggregierte Proteine mittels Zentrifugation

entfernt. Zur weiteren Reinigung wurden eine Kationenaustauschchromatographie (DEAE-Fractogel EMD  $\text{SO}_3^-$ -650) und eine Größenausschlußchromatographie (HiLoad Superdex 75 prep grade) eingesetzt.

### 2.3.3 Reinigung des CDK-Inhibitors p19<sup>INK4d</sup>

Die Gewinnung des humanen CDK-Inhibitors p19<sup>INK4d</sup> erfolgte mit dem *E. coli*-Stamm BL21 (DE3)pLysS, der den Expressionsvektor pET15b *p19wt* enthält. Dieser Expressionsvektor und gereinigtes homonukleares und <sup>15</sup>N-markiertes p19<sup>INK4d</sup> wurden freundlicherweise von Dr. T. Holak (Max Plack Institut für Biochemie, Martinsried) zur Verfügung gestellt. Dem 3'-Ende der Sequenz, die die genetische Information für einen His<sub>6</sub>-Anhang und eine Thrombin-Schnittstelle enthält, folgt die Sequenz, die für p19<sup>INK4d</sup> codiert. Die Expression wurde mit 1 mM IPTG bei 37 °C induziert. Die Reinigung erfolgte auf der Grundlage der Strategie von Baumgartner *et al.* (Baumgartner, *et al.*, 1998a). Eine optimierte Reinigungsprozedur ist in den Diplomarbeiten von H. Rösner und C. Löw beschrieben (Löw, 2003, Rösner, 2002). Nach dem Ernten der Zellen durch Zentrifugation und dem Aufschluss mittels Mikrofluidizer, wurde die Zellsuspension auf eine GdmCl-Konzentration von 5 M gebracht, da p19<sup>INK4d</sup> sowohl löslich als auch in Einschlusskörpern vorlag. Nach der Zentrifugation zum Abtrennen der Zelltrümmer, wurde eine Metallaffinitätschromatographie (Ni-NTA Superflow) unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Nach der Elution durch Erniedrigung des pH Werts wurde das gelöste Protein zurückgefaltet und einer weiteren Metallaffinitätschromatographie, jedoch unter nativen Bedingungen, unterworfen. Die Elution erfolgte mit 250 mM Imidazol. Nach dem Umpuffern der proteinhaltigen Fraktionen über NAP-10 Säulen in Thrombinspaltungspuffer wurde die His<sub>6</sub>-Fusion über Nacht mit 5 U Thrombin bei Raumtemperatur abgespalten. Zur Entfernung von Thrombin und des His<sub>6</sub>-haltigen Peptids wurde eine Anionenaustauschchromatographie (TMAE-Fractogel EMD-650) durchgeführt, die p19<sup>INK4d</sup>-haltigen Fraktionen gegen 20 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  dialysiert und lyophilisiert. Die Ausbeute betrug zwischen 10 mg und 20 mg je 1 l Bakterienkultur.

### 2.3.4 Reinigung von S54G/P55N RNase T1

RNase T1 aus *Aspergillus oryzae* wurde aus dem *E. coli*-Stamm DH5 $\alpha$  erhalten. Als Expressionsvektor diente das Plasmid pA2T1, welches die Sequenz für S54G/P55N RNase T1 enthielt (Quaas, *et al.*, 1988). Das Gen schließt sich an das 3'-Ende einer Sequenz an, die für das OmpA-Signalpeptid codiert und den Export von überexprimierter RNase T1

ins Periplasma vermittelt. Im Periplasma wird dann natives, disulfidverbrücktes Protein gebildet. Die Induktion des *tac*-Promotors erfolgte mit 1 mM IPTG. Durch den nachfolgenden osmotischen Schock konnte die RNase T1 aus dem Periplasma gewonnen werden (Neu & Heppel, 1965). Die Reinigung erfolgte wie bei Mayr & Schmid beschrieben (Mayr & Schmid, 1993). Zuerst wurde eine Anionenaustauschchromatographie (TMAE-Fractogel EMD-650) durchgeführt und die RNase-haltigen Fraktionen mit einem Aktivitätsplattentest identifiziert (Quaas, *et al.*, 1989). Im Anschluss daran folgte eine Größenausschlußchromatographie (HiLoad Superdex 75 prep grade) und Dialyse gegen 10 mM Ammoniumacetat. S54G/P55N RNase T1 wurde lyophilisiert und bei -20 °C gelagert. Die Ausbeuten lagen zwischen 50 mg und 150 mg je 5 l Bakterienkultur und 15 mg bei der <sup>15</sup>N-Markierung pro 5 l Minimalmedium.

## 2.4 Spektroskopische Methoden

### 2.4.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinen und DNA

UV-Absorptionsspektren wurden in Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm bei 25 °C im Bereich zwischen 240 nm und 350 nm an einem Kontron Uvikon 860 Absorptionsspektrophotometer (Mailand, Italien) oder einem Varian Cary 100 UV-VIS-Spektrophotometer (Darmstadt) aufgezeichnet. In beiden Fällen handelt es sich um Zweistrahlsspektrophotometer, so dass gegen den entsprechenden Puffer als Referenz gemessen wurde. Die Aufnahmegeschwindigkeit betrug 50 nm/min bei einer Bandbreite von 2 nm. Mit Hilfe des Absorptionswertes bei 280 nm bzw. 260 nm wurde über das Lambert-Beer'sche Gesetz die Protein- bzw. Nukleinsäurekonzentration bestimmt. In Tab. 1 sind die Extinktionskoeffizienten der verschiedenen Proteine zusammengefasst, die teilweise auf der Basis der Aminosäuresequenz berechnet wurden (Gill & von Hippel, 1989). Die Berechnung der Extinktionskoeffizienten der verwendeten einzelsträngigen DNA-Fragmente erfolgte durch sequenzabhängige Addition der Extinktionskoeffizienten bei 260 nm der jeweiligen Mononukleotide mit  $8400 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  für dT,  $12010 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  für dG,  $7050 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  für dC und  $15200 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  für dA (Wallace & Miyada, 1987).

**Tab. 1:** Extinktionskoeffizienten der verwendeten Proteine

Protein	$\epsilon_{280} (\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1})$	Referenz
<i>BsCspB</i> <sup>a</sup>	5800 <sup>d</sup>	(Schindler, <i>et al.</i> , 1995)
<i>BsCspB</i> F15Y	7300	(Zeeb & Balbach, 2003a)
<i>BsCspB</i> F30W	11700	(Zeeb & Balbach, 2003a)
<i>BcCsp</i> <sup>b</sup>	7300	(Perl, <i>et al.</i> , 1998)
<i>TmCsp</i> <sup>c</sup>	12820	(Welker, <i>et al.</i> , 1999)
S54G/P55N RNase T1	21060	(Takahashi, <i>et al.</i> , 1970)
ORF56	9650	(Lipps, <i>et al.</i> , 2001b)
p19 <sup>INK4d</sup>	- <sup>e</sup>	

<sup>a</sup> aus *B. subtilis*, <sup>b</sup> aus *B. caldolyticus*, <sup>c</sup> aus *T. maritima*, <sup>d</sup> gilt für alle *BsCspB*-Varianten außer F15Y und F30W, <sup>e</sup> enthält kein Trp, Tyr, Cys

### 2.4.2 Fluoreszenzspektren

Alle Fluoreszenzanregungs- bzw. Fluoreszenzemissionsspektren wurden an Hitachi F-4010 oder F-4500 Spektrofluorimetern mit thermostatierbaren Küvettenblöcken aufgenommen. Der Bereich der Anregungs- und Emissionswellenlänge wurde auf jedes Protein abgestimmt. Die Aufnahmegeschwindigkeit lag bei 60 nm/min bei einer Dämpfung von 2 s. Sämtliche Spektren wurden um die Eigenfluoreszenz des jeweiligen Puffers und den Ramanpeak des Wassers korrigiert.

### 2.4.3 Circular dichroismusspektren

Nah- und Fern-UV CD-Spektren wurden mit einem Jasco J-600A Spektropolarimeter in temperierbaren Quarzküvetten gemessen. Die Schichttiefe lag bei 0.1 cm bzw. 1 cm für Fern-UV bzw. Nah-UV CD-Spektren bei einer Aufnahmegeschwindigkeit von 20 nm/min und einer Dämpfung von 1 s. Die Proteinkonzentration lag je nach Protein zwischen 10  $\mu\text{M}$  und 30  $\mu\text{M}$ . Nah-UV CD-Spektren wurden im Bereich 250 nm bis 320 nm und Fern-UV CD-Spektren zwischen 190 nm und 250 nm aufgezeichnet. Die Spektren wurden achtmal gemessen, gemittelt und das Pufferspektrum subtrahiert, so dass mit Gl. 1 die molare Elliptizität  $[\Theta]_{\text{MRW}}$  berechnet werden konnte.

$$[\Theta]_{\text{MRW}} = \frac{\Theta \cdot 100}{c \cdot d \cdot N_{\text{AS}}} \quad \text{Gl. 1}$$

$[\Theta]_{\text{MRW}}$ : mittlere molare Elliptizität je Aminosäurerest in  $\text{Grad} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$ ;  $\Theta$ : gemessene Elliptizität in Grad;  $c$ : molare Konzentration des Proteins;  $d$ : Schichtdicke in cm;  $N_{\text{AS}}$ : Anzahl der Aminosäurereste des Proteins

### 2.4.4 Konzentrationsbestimmung von GdmCl und Harnstoff

Selbst bei genauem Einwiegen ist es schwierig, hochkonzentrierte GdmCl- oder Harnstofflösungen exakt herzustellen. Daher erfolgte die Bestimmung der tatsächlichen Konzentration des Chaotrops refraktometrisch nach Gl. 2 bzw. Gl. 3 (Pace, 1986).

$$[\text{GdmCl}] = 57.147 \cdot \Delta n + 38.68 \cdot \Delta n^2 - 91.6 \cdot \Delta n^3 \quad \text{Gl. 2}$$

$$[\text{Harnstoff}] = 1177.66 \cdot \Delta n + 29.753 \cdot \Delta n^2 + 185.56 \cdot \Delta n^3 \quad \text{Gl. 3}$$

$[\text{GdmCl}]$ : GdmCl-Konzentration in mol/l;  $[\text{Harnstoff}]$ : Harnstoff-Konzentration in mol/l;  $\Delta n$ : Differenz des Brechungsindex der Lösung mit und ohne GdmCl bzw. Harnstoff.

### 2.4.5 Messung und Auswertung Denaturierungsmittel-induzierter Übergänge

Die Verschiebung des Gleichgewichts zwischen nativem (N) und entfaltetem Protein (U) kann durch die Änderung der Temperatur, des Drucks, des pH-Werts oder durch die Zugabe von Denaturierungsmitteln erfolgen (Pace, 1986). Unterscheidet sich der native und entfaltete Zustand in einer physikalischen Eigenschaft  $y$ , so kann die Gleichgewichtskonstante  $K_U$  mit Gl. 5 berechnet werden. Dies gilt jedoch nur für monomere Proteine wie z.B. CspB, deren Faltungsmechanismus dem Zweizustandsmodell folgt (Gl. 4) (Tanford, 1968).



$$K_U = [\text{U}]/[\text{N}] = (y_{\text{N}} - y_{\text{obs}})/(y_{\text{obs}} - y_{\text{U}}) \quad \text{Gl. 5}$$

Die freie Enthalpie der Entfaltung  $\Delta G_U$  ist über die Gleichgewichtskonstante  $K_U$  definiert (Gl. 6). Unter der Annahme dass eine lineare Abhängigkeit der Proteinstabilität  $\Delta G_U$  von der

Denaturierungsmittelkonzentration ( $[D]$ ) besteht, kann das sog. lineare Extrapolationsmodell (LEM, *linear extrapolation model*) angewendet werden (Gl. 7). Dabei repräsentiert  $m$  die Kooperativität des konformationellen Übergangs und  $\Delta G(\text{H}_2\text{O})$  die Proteinstabilität in Abwesenheit des Denaturierungsmittels (Tanford, 1970).

$$\Delta G_U = -RT \cdot \ln K_U \quad \text{Gl. 6}$$

$$\Delta G_U = \Delta G_U(\text{H}_2\text{O}) + m[D] \quad \text{Gl. 7}$$

Desweiteren wurde eine lineare Abhängigkeit der spektroskopischen Eigenschaften des nativen bzw. entfalteten Proteins ( $y_N$  bzw.  $y_U$ ) von der Denaturierungsmittelkonzentration angenommen (Gl. 8). Dabei stellt  $y_{N,U}^0$  die spektroskopische Eigenschaft des nativen bzw. entfalteten Proteins in Abwesenheit des Denaturierungsmittels dar.  $m_N$  und  $m_U$  geben die Steigung der Basislinie des nativen bzw. entfalteten Proteins an.

$$y_{N,U} = y_{N,U}^0 + m_{N,U} \cdot [D] \quad \text{Gl. 8}$$

Die Anpassung an die experimentellen Daten durch nichtlineare Regression erfolgte mit der Messgröße  $y_{\text{obs}}$  in Gl. 9, die aus der Verknüpfung von Gl. 5 bis Gl. 8 hervorging (Santoro & Bolen, 1988).

$$y_{\text{obs}}([D]) = \frac{y_N^0 + m_N \cdot [D] + (y_U^0 + m_U \cdot [D]) \cdot e^{\frac{\Delta G_U(\text{H}_2\text{O}) - m \cdot [D]}{RT}}}{1 + e^{\frac{\Delta G_U(\text{H}_2\text{O}) - m \cdot [D]}{RT}}} \quad \text{Gl. 9}$$

Für die Auswertung der Entfaltungsübergänge von ORF56 wurde das Zweizustandsmodell für dimere Proteine angewendet (Gl. 10), in dem nur gefaltete Dimere oder entfaltete Monomere existieren. Ein wichtiger Unterschied zum Zweizustandsmodell für monomere Proteine (Gl. 4, Gl. 5) liegt darin, dass die Gleichgewichtskonstante ( $K_U$ ) von der Proteinkonzentration ( $[P_t]$ ) abhängt (Gl. 12). Die Normierung der Entfaltungsübergänge erfolgte mit Gl. 11.



$$f_U = (y_N - y_{\text{obs}}) / (y_N - y_U) \quad \text{Gl. 11}$$

$$K_U = [U]^2 / [N_2] = 2[P_t] \cdot (f_U^2 / (1 - f_U)) \quad \text{Gl. 12}$$

Die Proteinstabilität ( $\Delta G_U$ ) wurde auch hier mit Hilfe der Gleichgewichtskonstanten und Gl. 6 berechnet, wobei sich  $\Delta G_U$  auf eine Konzentration von 1 M jedes Reaktanden bezieht. Außerdem wurden äquivalente Annahmen getroffen wie bei monomeren Proteinen (lineares Extrapolationsmodell (Gl. 7), lineare Abhängigkeit der spektroskopischen Eigenschaften des nativen und entfalteten Proteins von der Denaturierungsmittelkonzentration (Gl. 8)).

Als Sonden zur Beobachtung von Denaturierungsmittel-induzierten Entfaltungsübergängen wurden Tryptophan- bzw. Phenylalanin-Fluoreszenz-, Circular dichroismus- sowie homo- bzw. heteronukleare NMR-Spektroskopie verwendet. Fluoreszenzmessungen wurden an einem Hitachi F-4010 oder F-4500 Spektrofluorimeter und CD-Messungen an einem Jasco J600A Spektropolarimeter durchgeführt. NMR-Spektren wurden mit Bruker DRX500 oder Avance700 NMR-Spektrometern aufgezeichnet. Je nach Stabilität des zu untersuchenden Proteins wurde Harnstoff (CspB, p19<sup>INK4d</sup>), GdmCl (RNase T1, ORF56) oder GdmSCN (ORF56) als Denaturierungsmittel eingesetzt.

#### 2.4.6 Messung und Auswertung thermisch induzierter Entfaltungsübergänge

Neben der denaturierungsmittelinduzierten Entfaltung (2.4.5) wurden auch thermische Entfaltungsübergänge von Proteinen aufgezeichnet. Diese wurden mittels Fern-UV CD-Spektroskopie mit einem Jasco J-600A detektiert. Für die Temperierung kam das Jasco Peltierelement PTC-348WI zum Einsatz, wobei während der gesamten Messung die Temperatur in der Lösung mit einem Temperaturfühler verfolgt wurde. Typischerweise wurde in einer 1x1 cm<sup>2</sup>-Rechteckküvette 3.4 ml einer 0.2 µM bis 28 µM Proteinlösung mit einer Geschwindigkeit von 60 °C/h erwärmt. Die Auflösung betrug 0.2 °C, die Bandbreite 1 nm und die Dämpfung 8 s. Die Detektionswellenlänge war abhängig vom eingesetzten Protein bzw. Puffer und lag zwischen 220 nm und 235 nm.

Die Auswertung thermischer Entfaltungsübergänge erfolgt für Proteine die nach dem Zweizustandsmodell falten (äquivalent wie in 2.4.5). Es wird angenommen, dass die Meßgröße des nativen bzw. entfalteten Proteins linear von der Temperatur abhängt (Basislinie, Gl. 13). Die freie Enthalpie der Entfaltung ( $\Delta G_U$ ) ist über die veränderte Gibbs-Helmholtz-Gleichung gegeben (Gl. 14). Durch Kombination von Gl. 13 und Gl. 14 mit Gl. 5 und Gl. 6 ergibt sich dann die Abhängigkeit der Meßgröße von der Temperatur für monomere Proteine in Gl. 15 (Griko, *et al.*, 1988, Privalov, 1993).

$$y_{N,U} = y_{N,U}^0 + m_{N,U} \cdot T \quad \text{Gl. 13}$$

$$\Delta G_U(T) = \Delta H_U(T_m) \cdot \left( \frac{T_m - T}{T_m} \right) - \Delta C_p \cdot \left[ T_m - T + T \cdot \ln \left( \frac{T}{T_m} \right) \right] \quad \text{Gl. 14}$$

$$y_{obs}(T) = \frac{y_N^0 + m_N \cdot T + (y_U^0 + m_U \cdot T) \cdot e^{\left\{ -\frac{\Delta H_U(T_m)}{R} \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{T_m} \right) - \frac{\Delta C_p}{R} \left[ T_m - \frac{T_m}{T} - \ln \left( \frac{T}{T_m} \right) \right] \right\}}}{1 + e^{\left\{ -\frac{\Delta H_U(T_m)}{R} \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{T_m} \right) - \frac{\Delta C_p}{R} \left[ T_m - \frac{T_m}{T} - \ln \left( \frac{T}{T_m} \right) \right] \right\}}} \quad \text{Gl. 15}$$

Dabei stellt  $y_{N,U}^0$  die spektroskopische Meßgröße bei 0 K,  $m_{N,U}$  die Steigung der jeweiligen Basislinie,  $T_m$  die Temperatur im Übergangsmittelpunkt,  $\Delta H_U(T_m)$  die van't Hoff-Enthalpie

im Übergangsmittelpunkt und  $\Delta C_p$  die Änderung der Wärmekapazität durch die Entfaltung des Proteins bei konstantem Druck dar. Durch nichtlineare Regression von Gl. 15 an die Datenpunkte wurden dann die Basislinie des nativen bzw. entfalteten Zustands sowie  $\Delta H_U(T_m)$  und  $T_m$  bestimmt. Bei der Anpassung wurde  $\Delta C_p$  konstant gehalten. Sie kann über die Temperaturabhängigkeit der Proteinstabilität ( $\Delta G_U(T)$ ) mit Gl. 14 bestimmt werden. Die Überprüfung der Reversibilität der thermischen Entfaltung erfolgte durch die Aufnahme einer Abkühlkurve nach dem Aufheizvorgang. Eine alternative Möglichkeit zum Nachweis der Reversibilität besteht darin, das Protein für eine kurze Zeit bei hohen Temperaturen zu entfalten. Nach dem Abkühlen wurde wiederum eine thermische Entfaltung durchgeführt und mit einer thermischen Entfaltung ohne vorheriges Entfalten verglichen. Für die Analyse der thermischen Übergänge des dimeren Proteins ORF56 wurde die Gleichgewichtskonstante mit Gl. 16 berechnet, da der  $T_m$  von der Proteinkonzentration abhängt.

$$K_U = P_i \exp\{(\Delta H_m/R)(1/T_m - 1/T) - (\Delta C_p/RT)(T - T_m - T \ln(T/T_m))\} \quad \text{Gl. 16}$$

#### 2.4.7 Bestimmung der Stöchiometrie und Affinität von CspB/ssDNA-Komplexen

Durch die Bindung von CspB an einzelsträngige Nukleinsäuren wird die intrinsische Fluoreszenz von Trp8 spezifisch gelöscht (Lopez, *et al.*, 1999a, Zeeb, 2000, Zeeb & Balbach, 2003a). Die Abnahme der Fluoreszenzintensität kann daher als Sonde zur Bestimmung des Proteinanteils herangezogen werden, der sich im komplexierten Zustand befindet. Alle Titrationsexperimente wurden an Hitachi-Spektrofluorimetern (F-4010, F-4500) mit temperierbarem Küvettenblock und Makro- bzw. Halbmikrofluoreszenzrührküvetten (Hellma GmbH, Müllheim/Baden) gemessen. Die Anregungs- bzw. Emissionswellenlänge lag bei 280 nm bzw. 343 nm. Zu der vorgelegten Proteinlösung wurden sukzessive 1  $\mu$ l bis 5  $\mu$ l Aliquots einer ssDNA-Stammlösung zugegeben und jeweils 3 min inkubiert. Das Fluoreszenzsignal wurde 1 min aufgezeichnet, gemittelt und die Eigenfluoreszenz des Puffers subtrahiert. Eine zusätzliche Korrektur des Fluoreszenzsignals erfolgte aufgrund der Erniedrigung der Proteinkonzentration, die durch die Verdünnung infolge der Zugabe der ssDNA verursacht wurde. Aus diesem Grund wurde auch die tatsächlich vorhandene ssDNA-Konzentration mit dem jeweiligen Verdünnungsfaktor korrigiert. Insgesamt resultierte eine Verdünnung < 5%. Die Bandbreite der Anregung bzw. Emission wurde abhängig von der eingesetzten Proteinkonzentration gewählt.

Zur Ermittlung der Anzahl der CspB-Moleküle, die an ein ssDNA-Molekül binden, wurden Titrationen unter stöchiometrischen Bedingungen durchgeführt. Hierfür lag die Konzentration beider Bindungspartner um mindestens eine Größenordnung über der

jeweiligen Komplexdissoziationskonstanten ( $K_D$ ). Die gemessene Fluoreszenzintensität wurde wie oben beschrieben korrigiert und die prozentuale Löschung mit Gl. 17 berechnet. Letztere wurde gegen die ssDNA-Konzentration aufgetragen. Durch die Anfangs- bzw. Endwerte der hyperbolischen Titrationskurve wurde dann jeweils eine Gerade gelegt, deren Schnittpunkt die ssDNA-Konzentration angibt, bei der alle Proteinmoleküle im Komplex vorliegen (Eftink, 1997, Lopez, *et al.*, 1999a, Zeeb, 2000). Die Stöchiometrie wurde auch mit Hilfe der NMR-Spektroskopie bestimmt. Dazu wurde die Änderung der chemischen Verschiebung von  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -Kreuzsignalen in 2D HSQC-Spektren während einer Titration der beiden Bindungspartner verwendet. Dies ist jedoch nur dann möglich, wenn der freie und gebundene Zustand des Proteins sich im schnellen Austausch bzgl. der NMR-Zeitskala befinden.

$$Q = \frac{F_0 - F}{F_0} \cdot 100\% \quad \text{Gl. 17}$$

$Q$ : prozentuale Fluoreszenzlöschung;  $F_0$ : Fluoreszenzintensität des Proteins in Abwesenheit von ssDNA;  $F$ : volumenkorrigierte Fluoreszenzintensität

Die Bestimmung des  $K_D$ -Werts erfolgte äquivalent zur Ermittlung der Stöchiometrie, jedoch lag die Proteinkonzentration innerhalb einer Größenordnung unter dem  $K_D$ -Wert. Das Bindungsgleichgewicht kann mit Gl. 18 beschrieben werden, woraus  $K_D = \{[P] \cdot [D]\} / [PD]$  folgt. Dabei stellt  $[P]$ ,  $[D]$  und  $[PD]$  die Konzentration des Proteins, der ssDNA und des Nukleoproteinkomplexes dar. Die Analyse der Bindungsisothermen erfolgte mit Gl. 19 (Eftink, 1997, Lohman & Bujalowski, 1991).



$$Q = Q_{\max} \cdot \frac{A - \sqrt{A^2 - 4 \cdot n \cdot [P]_0 \cdot [D]_0}}{2 \cdot [P]_0} \quad \text{Gl. 19}$$

$A = K_D + [P]_0 + n \cdot [D]_0$ .  $[P]_0$  bzw.  $[D]_0$ : Gesamtkonzentration des Proteins bzw. der ssDNA,  $Q_{\max}$ : maximale Löschung der Fluoreszenz;  $n$ : Stöchiometrie, d.h. Anzahl der gebundenen Proteine pro ssDNA

Dieses Bindungsmodell (Gl. 19) nimmt für längere Oligodeoxynukleotide unabhängige, nicht unterscheidbare multiple Bindungsstellen innerhalb eines ssDNA-Moleküls an. Daher ergeben sich aus der Analyse apparente  $K_D$ -Werte.

#### 2.4.8 Messung und Auswertung von Faltungskinetiken

Schnelle Rückfaltungs- und Entfaltungskinetiken von CspB und ORF56 wurden mit einem DX.17MV Sequential Stopped-flow Spektrofluorimeter von Applied Photophysics (Leatherhead, U.K.) aufgenommen. Die Abmessungen der Beobachtungszelle betragen  $10 \times 2 \times 1 \text{ mm}^3$ . Zwischen der Mischkammer und dem Photomultiplier erfolgte die Absorption

von Streulicht und Fluoreszenzemission  $< 300$  nm (Aceton) bzw.  $< 320$  nm (10 mM Cytidin-2',3'-monophosphat) in einer 5 mm Küvette. Desweiteren wurde eine Bio-Logic SFM3 mit PMS400-Detektionseinheit verwendet, mit der die simultane Aufzeichnung von Fluoreszenz und Circular dichroismus möglich ist und für Untersuchungen an p19<sup>INK4d</sup> und ORF56 eingesetzt wurde. Messzeit an diesem Gerät wurde freundlicherweise von Prof. C. M. Dobson (Oxford, U.K.) während eines Aufenthalts in Oxford zur Verfügung gestellt. Im Allgemeinen wurden Rückfaltungs- bzw. Entfaltungsreaktionen durch eine schnelle 10fache Verdünnung von entfaltetem bzw. nativem Protein induziert. Als Denaturierungsmittel wurde Harnstoff (CspB, p19<sup>INK4d</sup>) oder GdmCl (ORF56) eingesetzt. Die Proteinendkonzentration lag für CspB bei 1  $\mu$ M, für p19<sup>INK4d</sup> bei 10  $\mu$ M und für ORF56 zwischen 0.5  $\mu$ M und 20  $\mu$ M. Die Faltungskinetiken von CspB verliefen einphasig und wurden mit einer einfachen ansteigenden bzw. abfallenden Exponentialfunktion angepasst (Gl. 20). Dabei repräsentieren  $k_f$  und  $k_u$  die Rückfaltungs- bzw. Entfaltungsrate und  $\lambda$  die apparente Faltungsrate (Summe von  $k_f$  und  $k_u$ ) sowie  $S_0$  und  $S_1$  den experimentellen *Offset* bzw. die Amplitude.

$$S(t) = S_0 + S_1 \cdot \exp(-\lambda t) \text{ bzw. } S(t) = S_0 + S_1 \cdot (1 - \exp(-\lambda t)) \text{ mit } \lambda = k_f + k_u \quad \text{Gl. 20}$$

Die Faltungskinetiken von p19<sup>INK4d</sup> konnten aufgrund fehlender Fluorophore nur mittels CD-Spektroskopie verfolgt werden. Das Signal/Rausch-Verhältnis der CD-Detektion im Vergleich zur Fluoreszenz-Detektion ist deutlich schlechter. Daher konnte während der Entfaltung von p19<sup>INK4d</sup> nur eine Phase aufgelöst werden und die Kinetiken wurden mit Gl. 20 angepasst. Die Rückfaltung beinhaltet drei Phasen, wobei die zwei schnelleren Phasen in der *stopped-flow* Apparatur detektiert werden konnten. Die dritte Phase konnte nur in Handmischungsexperimenten beobachtet werden (siehe unten), da diese sehr langsam verläuft. Somit wurden die Rückfaltungskinetiken an eine Summe von Exponentialfunktionen (Gl. 21) angeglichen.

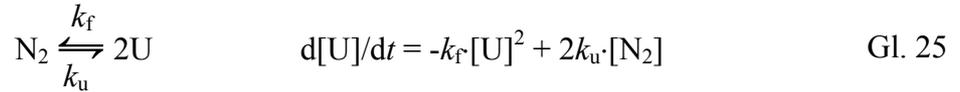
$$S(t) = S_0 + S_1 \cdot \exp(-k_{f1}t) + S_2 \cdot \exp(-k_{f2}t) + S_3 \cdot \exp(-k_{f3}t) \quad \text{Gl. 21}$$

Bei der Rückfaltung von ORF56 handelt es sich um eine einphasige jedoch bimolekulare Reaktion. Die Anpassung der experimentellen Daten erfolgte daher mit einer hyperbolischen Gleichung (Gl. 23). Die daraus resultierende apparente Rückfaltungsrate  $k_{app}$  hängt von der eingesetzten Proteinkonzentration ab. Mit diesem Zusammenhang und Gl. 24 wurde dann die tatsächliche bimolekulare Rückfaltungsrate bestimmt. Entfaltungskinetiken von ORF56 verlaufen einphasig und sehr langsam. Daher wurden für die Bestimmung von  $k_u$  Handmischungsexperimente durchgeführt, die mit einer monoexponentiellen Funktion angepasst wurden (Gl. 22).



$$k_{\text{app}} = P_t \cdot k_f \quad \text{Gl. 24}$$

Im Übergangsbereich tragen sowohl die Rückfaltungs- als auch die Entfaltungsreaktion zur Signaländerung bei (Gl. 25). Daher wurden Rückfaltungs- bzw. Entfaltungskinetiken mit Gl. 26 bzw. Gl. 27 angeglichen.



$$S = S_0 + S_1 \left( 1 - \frac{[\text{U}]}{[\text{P}_t]} \right) \quad \text{und} \quad z = \left\{ \frac{4 + b - \text{sq}}{4 + b + \text{sq}} \right\} e^{-(\text{sq})k_f t [\text{P}_t]^{1/2}} \quad \text{Gl. 26}$$

$$S = S_0 + S_1 \left( \frac{[\text{U}]}{[\text{P}_t]} \right) \quad \text{und} \quad z = \left\{ \frac{b - \text{sq}}{b + \text{sq}} \right\} e^{-(\text{sq})k_f t [\text{P}_t]^{1/2}} \quad \text{Gl. 27}$$

$$\text{Dabei ist } b = 2k_u / (k_f [\text{P}_t]), \text{ sq} = (b^2 + 8b)^{0.5} \text{ und } [\text{U}] = \frac{[\text{P}_t]}{4} \left\{ \frac{-b + \text{sq} + bz + (\text{sq})z}{1 - z} \right\}$$

Sehr langsame Faltungskinetiken wurden sowohl an einem Hitachi F-4010 Spektrofluorimeter als auch an einem Jasco J-600 Spektropolarimeter mit Hilfe von Handmischungsexperimenten analysiert. Die Faltungskinetiken wurden durch die Zugabe der Proteinlösung zum vorgelegten Puffer, der die gewünschte Denaturierungsmittelkonzentration ( $[D]$ ) enthielt, gestartet. Je nach Temperatur und Konzentration des Denaturierungsmittels lag die Totzeit  $< 5$  s. Handmischungsexperimente mit CD- und Fluoreszenzdetektion wurden für die Rückfaltung ( $[\text{GdmCl}] > 3.5$  M) und Entfaltung von ORF56 durchgeführt. Für die Beobachtung der langsamsten Phase der Rückfaltung von p19<sup>INK4d</sup> bzw. S54G/P55N-RNase T1 wurden ebenfalls Handmischungsexperimente mit CD- bzw. Fluoreszenzdetektion verwendet.

Die Abhängigkeit der Faltungsraten von  $[D]$  ist exponentiell (Gl. 28). Dabei stellt  $k_{f,u}(\text{H}_2\text{O})$  die Faltungsrate in Abwesenheit des Denaturierungsmittels und  $m_{f,u}$  die kinetischen  $m$ -Werte dar. Letzterer gibt die Steigung der linearen Abhängigkeit von  $\ln k_{f,u}$  von  $[D]$  in der halblogarithmischen Chevron-Auftragung an. Bei CspB wurde die apparente Faltungsrate  $\lambda$  (Summe von  $k_f$  und  $k_u$ ) gegen  $[D]$  aufgetragen, während bei p19<sup>INK4d</sup> die einzelnen mikroskopischen Faltungsraten eingesetzt wurden. Im Fall von ORF56 ist eine gemeinsame Auftragung nicht möglich, da die Rückfaltung eine bimolekulare Reaktion darstellt.

$$\ln k_{f,u} = \ln k_{f,u}(\text{H}_2\text{O}) + m_{f,u} \cdot [D] \quad \text{Gl. 28}$$

#### 2.4.9 Nachweis von Prolyl-cis/trans-Isomerisierungen

Die Raten der Rückfaltung von p19<sup>INK4d</sup> und S54G/P55N-RNase T1 wird durch eine langsame Prolyl-cis/trans- bzw. trans/cis-Isomerisierung limitiert. Spezifische Enzyme, wie die Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerasen (PPIasen), katalysieren diese Reaktion und wurden daher zum Nachweis eingesetzt. Dazu wurden Rückfaltungsexperimente unter identischen Bedingungen in An- bzw. Abwesenheit der PPIase durchgeführt und die resultierenden Raten verglichen. Die Handmischungsexperimente wurden wie in 2.4.8 beschrieben durchgeführt und an eine (p19<sup>INK4d</sup>) bzw. eine Summe von zwei Exponentialfunktionen (RNase T1) angepasst. Rückfaltungskinetiken von p19<sup>INK4d</sup> bzw. RNase T1 wurden mit CD- bzw. Fluoreszenzspektroskopie verfolgt. Die Beschleunigung der Faltungsreaktion gilt als Indiz für die Existenz einer Prolyl-cis/trans-Isomerisierung. Als PPIasen wurde das cytosolische Cyclophilin 18 sowie SlyD (beide aus *E. coli*) eingesetzt, die freundlicherweise von Dr. C. Scholz (Roche Diagnostics, Penzberg) zur Verfügung gestellt wurden.

#### 2.4.10 Bestimmung von Assoziations- und Dissoziationsraten von Komplexen

Alle Assoziationsreaktionen wurden mit einer *stopped-flow* Apparatur von Applied Photophysics (DX.17MV Sequential Stopped-flow Spektrofluorimeter) durchgeführt, deren Aufbau in 2.4.8 schon eingehend beschrieben wurde. Die Assoziationsreaktion wurde anhand der Fluoreszenzlöschung der integralen Fluoreszenz oberhalb 320 nm beobachtet (Küvette mit Aceton zwischen Mischkammer und Photomultiplier), nachdem die Anregung bei 280 nm erfolgte. Die Assoziation wurde durch schnelles Mischen der Protein- und der ssDNA-Lösung im Volumenverhältnis 1:1 induziert. Die Kinetiken wurden mindestens achtmal aufgenommen und gemittelt. Als Puffer wurde 50 mM Na-cacodylat/HCl, 100 mM KCl pH 7.0 verwendet. Die Proteinkonzentration wurde abhängig vom  $K_D$ -Wert der jeweiligen CspB-Variante bzgl. des ssDNA-Fragments gewählt und lag zwischen 27 nM und 270 nM. Die ssDNA-Konzentration wurde zwischen 10 nM und 0.5  $\mu$ M variiert, so dass über die Konzentrationsabhängigkeit der apparenten Assoziationsrate  $k_{\text{obs}}$  die tatsächliche Assoziationsrate zweiter Ordnung  $k_{\text{ass}}$  und die Dissoziationsrate  $k_{\text{diss}}$  bestimmt werden konnte (siehe 3.2.5)

## 2.5 NMR-spektroskopische Methoden

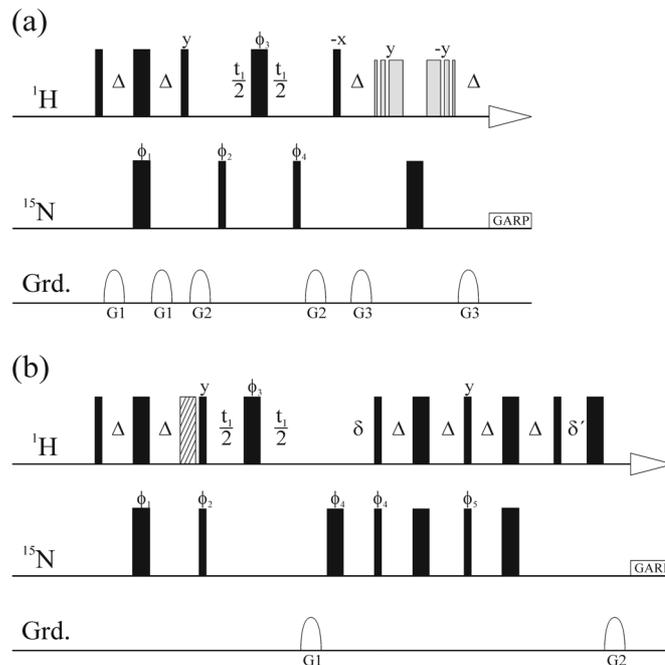
Nahezu alle Spektren wurden mit NMR-Spektrometern der Firma Bruker (Karlsruhe) aufgezeichnet. In Bayreuth kamen Avance360, DRX500, DRX600, Avance700, Avance800, in München DMX750 und in Utrecht (SON NMRLSF, Niederlande) Avance600US<sup>2</sup> und Avance750 NMR-Spektrometer zum Einsatz. Eine Ausnahme stellen die Echtzeit NMR-Experimente von p19<sup>INK4d</sup> dar. Diese wurden in Oxford (U.K) an einem im Haus umgebauten General Electric NMR-Spektrometer bei einer Feldstärke von 14.1 T (600 MHz <sup>1</sup>H-Frequenz) aufgezeichnet.

### 2.5.1 NMR-Experimente zur Bestimmung der Tertiärstruktur von Proteinen

Die Grundlage für eine Bestimmung der Tertiärstruktur eines Proteins mittels NMR-Spektroskopie ist die sequenzspezifische Zuordnung der Resonanzen des Makromoleküls. Sowohl für die Strukturbestimmung von CspB im Komplex mit dem ssDNA-Fragment dT7 als auch des kleinen dimeren Proteins ORF56 erfolgte die Zuordnung mit Hilfe mehrdimensionaler homo- und heteronuklearer Experimente. Auf die Beschreibung der grundlegenden homonuklearen Experimente (COSY, NOESY, TOCSY) wird hier verzichtet. Ausführliche Erläuterungen dazu sind in (Cavanagh, *et al.*, 1996, Ernst, *et al.*, 1987) zu finden. In heteronuklearen Experimenten wurde hauptsächlich <sup>15</sup>N als NMR-aktiver Heterokern eingesetzt. Einige spezielle Experimente erforderten eine zusätzliche Markierung mit dem NMR-aktiven Isotop <sup>13</sup>C. Desweiteren erfolgte eine Teildeuterierung von CspB bzw. ORF56 um 2D NOESY-Spektren zu vereinfachen und infolgedessen mögliche intermolekulare NOEs identifizieren zu können.

In Abb. 7 sind die verwendeten Pulssequenzen für die Aufnahme von 2D <sup>1</sup>H/<sup>15</sup>N HSQC-Spektren gezeigt. Routinemäßig wurde das FHSQC (Abb. 7a) eingesetzt, das zur Wasserunterdrückung die WATERGATE-Sequenz verwendet. Bei <sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N-markierten Proben wurde mit Hilfe eines *composite*-Pulses (90°<sub>x</sub>-180°<sub>y</sub>-90°<sub>x</sub> auf <sup>13</sup>C) während der t<sub>1</sub>-Zeit und mit der GARP-Sequenz sowohl auf <sup>15</sup>N als auch auf <sup>13</sup>C während der Acquisition des FIDs entkoppelt. Teilweise wurden auch <sup>1</sup>H/<sup>15</sup>N HSQC-Spektren mit Empfindlichkeitssteigerung (Abb. 7b) aufgezeichnet. Diese wird dadurch erreicht, dass die beiden orthogonalen Operatoren (2I<sub>Z</sub>S<sub>X</sub>, 2I<sub>Z</sub>S<sub>Y</sub>), die sich während der t<sub>1</sub>-Zeit entwickeln, refokussiert werden (PEP-Technik, *preservation of equivalent pathways*) und somit eine Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses erfolgt (siehe Abb. 15 in 2.5.3). Ein zusätzlicher Unterschied besteht darin, dass die Kohärenzselektion in Abb. 7a über den Phasenzyklus und in Abb. 7b

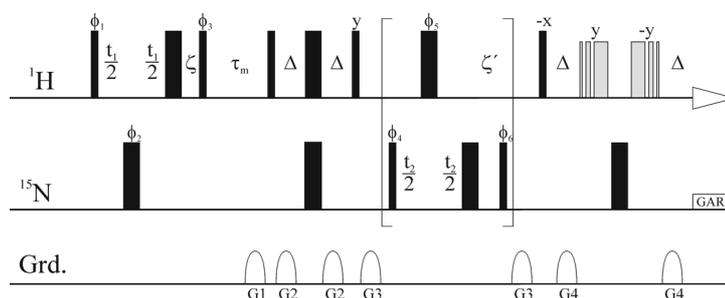
mit Hilfe der Gradienten (Echo/Antiecho) erreicht wird. Im Allgemeinen wurden zwischen 1024x160 und 2048x256 komplexe Punkte je nach Protein und Verwendung des Spektrums aufgezeichnet. Bei  $^{15}\text{N}$ -editierten Experimenten wurde nur die linke Hälfte des Spektrums mit mindestens einfachem *zerofilling* prozessiert, woraus Datenmatrizen mit 1024x512 oder 2048x512 realen Punkten resultierten. Als Fensterfunktion wurden  $\cos^2$ -Funktionen in beiden Dimensionen eingesetzt.



**Abb. 7:** Pulssequenzen für die Aufnahme von 2D  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  HSQC-Spektren. Schmale und breite ausgefüllte Rechtecke repräsentieren  $90^\circ$ - bzw.  $180^\circ$ -Pulse und schraffierte Rechtecke *Spinlock*-Pulse. Offene Halbellipsen stehen für z-Gradienten. (a) FHSQC nach Mori et al. (Mori et al., 1995). (b) PEP-HSQC mit Empfindlichkeitssteigerung (siehe 2.5.3). Die Kohärenzselektion erfolgte in (a) über den Phasenzyklus und in (b) mit Hilfe der Gradienten.  $\Delta$  lag je nach Proteingröße zwischen 2.3 ms und 2.7 ms  $\leq (1/(4 \cdot ^1J_{\text{HN}}))$ .  $\delta = p_{16} + d_{16} + p_2 + t_1$  und  $\delta' = p_{16} + d_{16}$ , wobei  $p_{16}$  die Länge des Gradienten ist (0.5 ms bis 1 ms),  $d_{16}$  der Wartezeit nach einem Gradienten (0.1 ms bis 0.5 ms) entspricht,  $p_2$  für einen  $180^\circ$   $^1\text{H}$ -Puls steht und  $t_1$  das Inkrement in der indirekten Dimension darstellt. Die Phasenzyklen lauteten für (a) und (b)  $\phi_1 = x$ ,  $\phi_2 = (x, -x)$ ,  $\phi_3 = 2(x)2(-x)$  sowie für (a)  $\phi_4 = 4(x)4(-x)$ ,  $rec = (x, -x, x, -x, -x, x, -x, x)$  und für (b)  $\phi_4 = 2(x)2(-x)$ ,  $\phi_5 = 2(y)2(-y)$ ,  $rec = (x, -x, -x, x)$ .  $rec$  ist die Phase des Detektors. Die Gradientenstärken (%) betragen für G1-G3 in (a) 15, 24, 9 bzw. (b) 80, 8.01. Quadraturdetektion erfolgte in (a) durch Inkrementierung von  $\phi_1$  und  $\phi_2$  im States-TPPI Modus und in (b) durch invertieren von  $\phi_1$ ,  $\phi_2$ , G2 und  $rec$  im Echo/Antiecho-Modus. Die Wasserunterdrückung in (a) erfolgte mit der 3-9-19 (y) WATERGATE-Sequenz (Piotto et al., 1992), deren Pulse mit grauen Balken markiert sind.

Auf der Basis dieser Korrelationsspektren wurden  $^{15}\text{N}$ -editierte 3D NOESY-HSQC (Abb. 8) bzw. 3D TOCSY-HSQC Experimente implementiert, die hauptsächlich für die Zuordnung der Resonanzen von CspB im Komplex mit dT7 und ORF56 eingesetzt wurden. Die Pulssequenz für das TOCSY-Experiment kann aus dem jeweiligen NOESY-Experiment

abgeleitet werden, indem für  $\tau_m$  die TOCSY-Mischsequenz eingesetzt wird. Für die isotrope Mischung in TOCSY-Experimenten ergab die DIPSI2rc-Sequenz (Cavanagh & Rance, 1992) mit Mischzeiten zwischen 80 ms und 120 ms die besten Resultate. Die für die Strukturrechnung benötigten Abstandsrandbedingungen (NOEs) wurden größtenteils aus 2D  $^{15}\text{N}$ -entkoppelten und  $^{15}\text{N}$ -editierten NOESY-Spektren gewonnen. Die Mischzeit in den jeweiligen NOESY-Experimenten betrug zwischen 80 ms und 150 ms, so dass Spindiffusionseffekte vernachlässigt werden konnten. Aus dem dargestellten 3D NOESY-HSQC wurde ein  $^{15}\text{N}$ -editiertes 2D NOESY-Experiment hergeleitet, indem die Elemente in Klammern nicht ausgeführt und  $t_2/2$  konstant auf 3  $\mu\text{s}$  gesetzt wurden.

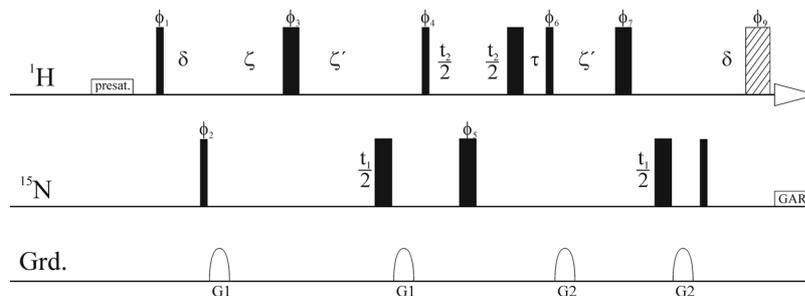


**Abb. 8:** Pulssequenz zur Aufnahme eines 3D  $^{15}\text{N}$  NOESY-HSQC (Talluri & Wagner, 1996). Schmale und breite ausgefüllte Rechtecke stellen  $90^\circ$ - und  $180^\circ$ -Pulse dar, Halbellipsen entsprechen sinusförmigen z-Gradienten. Die Zeitintervalle betragen  $\Delta = 2.7$  ms,  $\zeta = t_1 + \tau_{180}(^{15}\text{N})$ ,  $\zeta' = t_1 + \tau_{180}(^1\text{H})$ .  $\zeta$  und  $\zeta'$  refokussieren sich entwickelnde  $^1\text{H}$  bzw.  $^{15}\text{N}$  chemische Verschiebung.  $\tau_m$  entspricht der NOESY-Mischzeit (80 ms bis 150 ms). Die relativen Gradientenstärken (%) für G1-G4 waren 10, 50, 0.6, 30. Der Phasenzklus lautete:  $\phi_1=x$ ,  $\phi_2=4(x)4(-x)$ ,  $\phi_3=(x,-x)$ ,  $\phi_4=2(x)2(-x)$ ,  $\phi_5=4(x)4(-x)$ ,  $\phi_6=8(x)8(-x)$ ,  $rec=(x,-x,-x,x,x,-x,-x,x,-x,x,x,-x-x,x,x,-x)$ . Quadraturdetektion in den beiden indirekten Dimensionen wurde durch Inkrementierung von  $\phi_1$  ( $^1\text{H}$ ) und  $\phi_4$  ( $^{15}\text{N}$ ) im States-TPPI Modus erreicht. Die Wasserunterdrückung erfolgte mit der abschließenden 3-9-19 (y) WATERGATE-Sequenz (graue Rechtecke). Aus der Pulssequenz kann ein  $^{15}\text{N}$ -editiertes 2D NOESY abgeleitet werden, indem die Elemente innerhalb der Klammer nicht ausgeführt und  $t_2/2$  konstant auf 3  $\mu\text{s}$  gesetzt wurde.

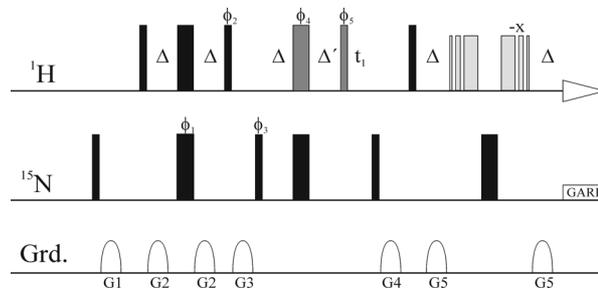
Neben Abstandsrandbedingungen sind dihedrale Winkel wichtige Einschränkungen bei der Bestimmung der Rückgratkonformation. Diese sind über die Messung von skalaren Kopplungskonstanten zugänglich. Mit dem 3D HNHA-Experiment (Abb. 9) (Vuister & Bax, 1993) konnte nicht nur die für die Zuordnung wichtige intraresiduale  $\text{H}^{\text{N}}, \text{H}^{\alpha}$ -Korrelation bestimmt sondern auch die Kopplungskonstanten zwischen Amidprotonen und  $\text{H}^{\alpha}$  ( $^3J(\text{H}^{\text{N}}, \text{H}^{\alpha})$ ) gemessen werden. Die Berechnung der Kopplungskonstanten erfolgte aus dem Verhältnis der Intensität des Kreuzsignals ( $I_{\text{kreuz}}$ ) und des Diagonalsignals ( $I_{\text{diag}}$ ) und Gl. 29.

$$^3J(\text{H}^{\text{N}}, \text{H}^{\alpha}) = \frac{\arctan\left(\sqrt{I_{\text{kreuz}} / I_{\text{diag}}}\right)}{(2\zeta\pi)} \quad \text{Gl. 29}$$

Dabei ist  $\zeta$  das Zeitintervall für den Aufbau der Kreuzsignalintensität und beträgt 13.05 ms ( $1/(4 \cdot {}^3J(\text{H}^{\text{N}}, \text{H}^{\alpha}))$ ). Da die Relaxation der Kreuzsignale schneller als die der Diagonalsignale ist, wird für die aus Gl. 29 erhaltene  ${}^3J(\text{H}^{\text{N}}, \text{H}^{\alpha})$  ein apparent zu geringer Wert berechnet. Um dies zu kompensieren, wurde die Kopplungskonstante mit einem molekulargewichtsabhängigen Korrekturfaktor multipliziert, der für kleine Proteine wie CspB bzw. ORF56 1.05 ist (Düx, *et al.*, 1997, Kuboniwa, *et al.*, 1994, Vuister & Bax, 1993).



**Abb. 9:** Pulsfolge des 3D HNHA-Experiments (Vuister & Bax, 1993). Schmale und breite ausgefüllte Rechtecke stellen 90°- und 180°-Pulse dar. Das schraffierte Rechteck steht für einen *Spinlock*-Puls und die Halbellipsen für sinusförmige z-Gradienten. Die Zeitintervalle wurden wie folgt gewählt:  $\delta = 4.5$  ms,  $\tau = t_2 + \tau_{180}({}^{15}\text{N})$ ,  $\zeta = 13.05$  ms- $\delta$ -p16-d16- $\tau_{90}({}^{15}\text{N})$ ,  $\zeta' = 13.05$  ms-p16-d16. Dabei ist p16 die Länge des Gradientenpulses und d16 die Wartezeit nach dem Gradienten. Die relativen Gradientenstärken (%) für G1 und G2 waren 2 bzw. -2. Der Phasenzzyklus lautete:  $\phi_1=x$ ,  $\phi_2=x$ ,  $\phi_3=4(x)4(-x)$ ,  $\phi_4=(x,-x)$ ,  $\phi_5=8(y)8(-y)$ ,  $\phi_6=2(x)2(-x)$ ,  $\phi_7=4(x)4(-x)$ ,  $rec=8(x)8(-x)$ . Quadraturdetektion in den beiden indirekten Dimensionen wurde durch Inkrementierung von  $\phi_1$ ,  $\phi_3$ ,  $\phi_4$  ( ${}^1\text{H}$ ) und  $\phi_2$  ( ${}^{15}\text{N}$ ) im TPPI Modus erreicht.



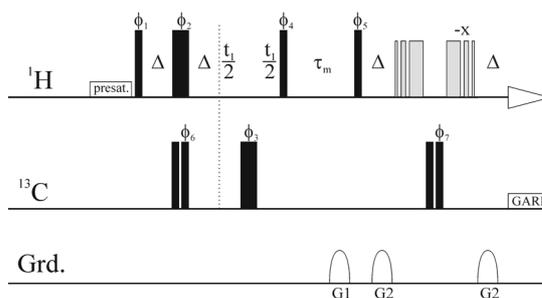
**Abb. 10:** Pulssequenz zur Bestimmung  ${}^1\text{H}/{}^{15}\text{N}$  residueller dipolarer Kopplungen. Schmale bzw. breite ausgefüllte Rechtecke stellen 90°- bzw. 180°-Pulse und Halbellipsen sinusförmige z-Gradienten dar. Die Zeitintervalle wurden wie folgt gewählt:  $\Delta = 2.7$  ms,  $\Delta' = \Delta - \tau_{90}({}^1\text{H}) - t_1$ . Zur Selektion der zweiten Komponente wurden die beiden dunkelgrau ausgefüllten  ${}^1\text{H}$ -Pulse nicht ausgeführt und  $\Delta' = \Delta - t_1$  gewählt. Die relativen Gradientenstärken (%) für G1-G5 waren -13, 30, 0.6, -13, 50. Der Phasenzzyklus lautete:  $\phi_1=x$ ,  $\phi_2=y$ ,  $\phi_3=(y,-y)$ ,  $\phi_4=4(x)4(-x)$ ,  $\phi_5=2(x)2(-x)$ ,  $rec=2(x,-x)$ . Für die Quadraturdetektion in der indirekten Dimension wurde  $\phi_1$  und  $\phi_3$  im States-TPPI Modus inkrementiert. Die Wasserunterdrückung erfolgte mit der 3-9-19 (x) WATERGATE-Sequenz.

In den letzten Jahren haben residuale dipolare Kopplungen (*rdc*) zur Verfeinerung von Strukturen erheblich an Bedeutung gewonnen.  ${}^1\text{H}/{}^{15}\text{N}$  residuale dipolare Kopplungen kamen bei der Strukturbestimmung von CspB im Komplex mit dT7 zum Einsatz. Hierzu wurden 2D

$^1\text{H}/^{15}\text{N}$  Korrelationsspektren ohne  $^{15}\text{N}$ -Entkopplung in An- bzw. Abwesenheit eines teilweise orientierenden Mediums (18 mg/ml PF1-Phagen, Asla Biotech, Riga) mit den Pulssequenzen aus Abb. 10 aufgenommen. In Anwesenheit der PF1-Phagen mittelt sich die dipolare Kopplung nicht wie in isotropen Lösungen aus, sondern trägt zusätzlich zu der Aufspaltung durch die skalare Kopplung  $^1J(\text{H}^{\text{N}},\text{N})$  zwischen Amidproton und Amidstickstoff bei (Hansen, *et al.*, 1998). Da durch die Aufspaltung die doppelte Anzahl an Resonanzen im HSQC-Spektrum vorliegen würde, wurde jede einzelne Komponente des Kreuzsignals selektiert und ein separates Spektrum im *interleaved* Modus aufgezeichnet. Nach der Bestimmung der chemischen Verschiebung wurde die Aufspaltung, d.h. die  $^1J(\text{H}^{\text{N}},\text{N})$  ohne dipolare Kopplung in isotroper Lösung bestimmt. Die Aufspaltung der beiden Komponenten in Anwesenheit der Phagen stellte die Summe der skalaren und dipolaren Kopplung dar. Daher resultiert aus der Subtraktion der beiden Aufspaltungen die residuale dipolare Kopplung (Gl. 30).

$$rdc = {}^1J_{\text{mit}}(\text{H}^{\text{N}},\text{N}) - {}^1J_{\text{ohne}}(\text{H}^{\text{N}},\text{N}) \quad \text{Gl. 30}$$

Zur Identifizierung von intermolekularen NOEs wurde das  $^{13}\text{C}(\omega_1, \omega_2)$  Doppelhalbfilter-NOESY-Experiment von (Otting & Wüthrich, 1989) implementiert und mit einer WATERGATE-Sequenz (Piotto, *et al.*, 1992) zur besseren Wasserunterdrückung modifiziert (Abb. 11). Das Filterelement  $\Delta$ - $180^\circ(^1\text{H})$ - $90^\circ(^{13}\text{C})$ - $90^\circ(^{13}\text{C})$ - $\Delta$  enthält den editierenden  $180^\circ(^{13}\text{C})$ -Puls. Bei  $^{13}\text{C}$  und  $^{15}\text{N}$  markierten Proben wurde ein  $180^\circ(^{15}\text{N})$ -Puls in der Mitte der  $t_1$ -Zeit und eine zusätzliche GARP-Sequenz während der Akquisition des *FIDs* zur Entkopplung der  $^{15}\text{N}$ -Kerne hinzugefügt.



**Abb. 11:** Pulsfolge zur Aufnahme von  $^{13}\text{C}(\omega_1, \omega_2)$ -Doppelhalbfilter-NOESY-Spektren. Schmale bzw. breite ausgefüllte Rechtecke stellen  $90^\circ$ - bzw.  $180^\circ$ -Pulse und Halbellipsen sinusförmige z-Gradienten dar. Das Zeitintervall  $\Delta$  war 3.94 ms ( $1/(2 \cdot {}^1J(^{13}\text{C}, ^1\text{H}))$ ) und die Mischzeit  $\tau_m = 80$  ms. Die relativen Gradientenstärken (%) für G1 und G2 waren 80 bzw. 50. Der Phasenzyklus lautet:  $\phi_1=(x,-x)$ ,  $\phi_2=8(x)8(-x)$ ,  $\phi_3=16(x)16(-x)$ ,  $\phi_4=2(x)2(-x)$ ,  $\phi_5=4(x)4(-x)$ ,  $rec=x,-x,-x,x,-x,x,x,-x$ . Die vier Teilspektren wurden durch Kombination von  $\phi_6$  und  $\phi_7$  nach Tab. 2 aufgezeichnet. Für die Quadraturdetektion in der indirekten  $^1\text{H}$  Dimension wurde  $\phi_1$  im TPPI Modus inkrementiert und zur Wasserunterdrückung die 3-9-19 (x) WATERGATE-Sequenz verwendet.

Zur Bestimmung intermolekularer Kontakte zwischen  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  CspB und dT7 wurden alle vier möglichen Teilspektren (Tab. 2) im *interleaved* Modus aufgezeichnet. Diese wurden durch unterschiedliche Kombination der Phasenzyklen von  $\phi_6$  und  $\phi_7$  in Abb. 11 generiert (Tab. 2). Mittels verschiedener Linearkombinationen dieser Teilspektren wurden dann die vier Subspektren berechnet, die die in Tab. 3 beschriebenen Filtercharakteristika besitzen.

**Tab. 2:** Phasenzklus für  $\phi_6$  und  $\phi_7$  für die Aufnahme der vier Teilspektren im  $^{13}\text{C}(\omega_1, \omega_2)$ -Doppelhalbfilter-Experiment (Abb. 11).

Teilspektrum	Phase $\phi_6$	Phase $\phi_7$
I	x	x
II	-x	x
III	x	-x
IV	-x	-x

So beinhaltet beispielsweise Subspektrum (A), das die Summe aller vier aufgezeichneten Teilspektren darstellt, nur Diagonal- und Kreuzsignale von Protonen, die nicht an  $^{13}\text{C}$  gebunden sind und somit nicht vom editierenden  $180^\circ(^{13}\text{C})$ -Puls beeinflusst werden. Subspektrum (B) ergibt ein konventionelles  $^{13}\text{C}(\omega_2)$ -Halbfilter-Spektrum, das jedoch in der  $\omega_1$ -Dimension nur Signale von  $^1\text{H}$  enthält, die nicht an  $^{13}\text{C}$  gebunden sind. Subspektrum (C) stellt das komplementäre Spektrum zu (B) dar. Der Unterschied besteht darin, dass die Charakteristik der beiden Dimensionen ausgetauscht ist. Die Kombination (D) führt zu einem Subspektrum, das ausschließlich Resonanzen zwischen  $^{13}\text{C}$  gebundenen Protonen zeigt.

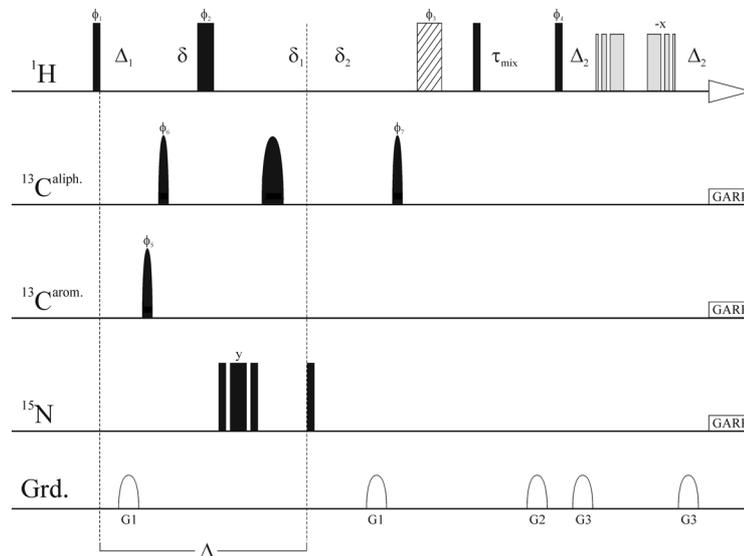
**Tab. 3:** Berechnung der unterschiedlich gefilterten/selektierten Subspektren durch Linearkombination der vier Teilspektren, die mit Hilfe der Phasenzyklen aus Tab. 2 aufgezeichnet wurden.

Subspektrum	Linearkombination der Teilspektren	Filtercharakteristik
(A) $^{13}\text{C}(\omega_1)$ - $^{13}\text{C}(\omega_2)$ zweifach gefiltert	I + II + III + IV	nicht markierte Resonanzen in $\omega_1$ und $\omega_2$
(B) $^{13}\text{C}(\omega_1)$ -gefiltert/ $^{13}\text{C}(\omega_2)$ -selektiert	(I + II) – (III + IV)	$^{13}\text{C}$ markiert in $\omega_2$ , unmarkiert in $\omega_1$
(C) $^{13}\text{C}(\omega_1)$ -selektiert/ $^{13}\text{C}(\omega_2)$ -gefiltert	(I - II) + (III - IV)	$^{13}\text{C}$ markiert in $\omega_1$ , unmarkiert in $\omega_2$
(D) $^{13}\text{C}(\omega_1)$ - $^{13}\text{C}(\omega_2)$ zweifach selektiert	(I - II) - (III - IV)	$^{13}\text{C}$ markiert in $\omega_1$ und $\omega_2$

Im Falle des Homodimers ORF56 wurden Heterodimere aus  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ -markiertem ORF56 und unmarkiertem ORF56 gebildet und nur die zwei Teilspektren I und IV aufgenommen, um intermolekulare NOEs zwischen den Monomeren zu detektieren. Bei Addition der beiden Teilspektren wird ein Subspektrum erhalten, das NOEs zwischen  $^{12}\text{C}$  gebundenen Protonen in beiden Dimensionen ( $\omega_1$  und  $\omega_2$ ) enthält, sowie NOEs zwischen  $^{13}\text{C}$  gebundenen Protonen in  $\omega_1$  und  $\omega_2$ . Durch Subtraktion der beiden Teilspektren resultiert ein Subspektrum mit

$\{^{12}\text{C}(\omega_1), ^{13}\text{C}(\omega_2)\}$ - und  $\{^{13}\text{C}(\omega_1), ^{12}\text{C}(\omega_2)\}$ -Kreuzsignalen. Zur Herstellung der Heterodimere wurden äquimolare Mengen von  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -markiertem und unmarkiertem ORF56 gemischt und mit GdmCl entfaltet. Durch Verdünnung des Denaturierungsmittels wurde die Rückfaltung induziert, wodurch eine Mischung von unmarkierten bzw. markierten Homodimeren und Heterodimeren von 1:1:2 entstand. Nach der Rückfaltung wurde gegen  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  dialysiert und das Protein gefriergetrocknet.

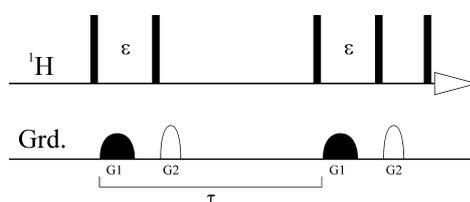
Eine Alternative zu den Doppelhalbfilter-Experimenten (Abb. 11) zur Gewinnung von intermolekularen NOEs ist die selektive Unterdrückung von Kreuzsignalen zwischen  $^{15}\text{N}$ - und  $^{13}\text{C}$ -gebundenen Protonen mit  $J$ -Filter erster und zweiter Ordnung (Sattler, *et al.*, 1999). In Abb. 12 ist die Pulssequenz zur Aufnahme eines 2D  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}(\omega_1)$ -gefilterten NOESY-Spektrums gezeigt, das NOEs innerhalb des unmarkierten Liganden und zwischen dem Liganden und dem  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -angereichertem Protein enthält.



**Abb. 12:** Pulssequenz zur Aufnahme eines 2D  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}(\omega_1)$ -gefilterten NOESY-Spektrums [Sattler, 1999 #4629]. Schmale bzw. breite ausgefüllte Balken repräsentieren  $90^\circ$ - bzw.  $180^\circ$ -Pulse. Schraffierte Rechtecke stehen für *Spinlock*-Pulse. Ausgefüllte Halbellipsen stellen folgende selektive Pulse dar:  $90^\circ$ -msg41251-Puls ( $^{13}\text{C}^{\text{arom.}}$ , p13, 0.4 ms, schmal),  $90^\circ$ -G4-Puls ( $^{13}\text{C}^{\text{aliph.}}$ , p13, 0.4 ms, schmal),  $180^\circ$ -G3-Puls ( $^{13}\text{C}^{\text{aliph.}}$ , p14, 0.3 ms, breit). Offene Halbellipsen repräsentieren für sinusförmige  $z$ -Gradienten (p16, 1 ms, Abklingzeit 0.2 ms). Die relativen Gradientenstärken (%) für G1-G3 waren 0.3, 50, 50. Die Mischzeit  $\tau_{\text{mix}}$  lag bei 120 ms. Die Werte für die einzelnen Zeitintervalle waren  $\Delta = 5.4$  ms,  $\Delta_1 = 3.1$  ms,  $\Delta_2 = 2.7$  ms,  $\delta = 0.5$  ms,  $\delta_1 = 0.4$  ms,  $\delta_2 = \Delta_1 + p13 + \delta - 5 - p5 - p14 - \delta_1 \approx 1.8$  ms. Zur Wasserunterdrückung wurde die WATERGATE-Sequenz (Piotto *et al.*, 1992) mit einem Zeitintervall von 106.8  $\mu\text{s}$  zwischen den Pulsen eingesetzt (hellgraue Balken). Der Phasenzyklus ist  $\phi_1 = x, -x$ ,  $\phi_2 = x$ ,  $\phi_3 = 2(x)2(-x)$ ,  $\phi_4 = 16(x)16(-x)$ ,  $\phi_5 = 4(x)4(-x)$ ,  $\phi_6 = 8(y)8(-y)$ ,  $\text{rec} = x, -x, -x, x$ . Für die Quadraturdetektion in der indirekten  $^1\text{H}$ -Dimension wurde  $\phi_1$ ,  $\phi_2$  und  $\phi_3$  gemäß States-TPPI inkrementiert.

### 2.5.2 Diffusionsmessungen zur Bestimmung des hydrodynamischen Radius

Zur Messung der relativen Diffusionskonstante von Proteinen wurden PFG-SLED-Experimente verwendet (Gibbs & Johnson, 1991, Jones, *et al.*, 1997), deren Pulssequenz in Abb. 13 gezeigt ist. Mit einem gepulsten Feldgradienten (PFG) in z-Richtung lässt sich eine ortsabhängige Dephasierung transversaler Kohärenzen erzielen. Durch einen zweiten, invertierten Gradienten aus z-Richtung erfolgt die Refokussierung dieser Kohärenzen, sofern diese ihre Position nicht verändert haben. Durch Diffusion des Proteins ergibt sich ein Signalverlust, der umso größer ist, desto weiter sich das Molekül von der ursprünglichen Position entfernt hat.



**Abb. 13:** PFG-SLED Experimente zur Bestimmung der relativen Diffusionskonstante in  $^2\text{H}_2\text{O}$ . Schmale und breite ausgefüllte Rechtecke stellen  $90^\circ$ - bzw.  $180^\circ$ -Pulse dar. Der sinusförmige Dephasierungsgradient G1 ist zwischen 5.75 ms und 8 ms lang (ausgefüllte breite Halbellipsen). Der zweite G1-Gradient wird zur Refokussierung der Kohärenzen invertiert. Die Gradientenstärke von G1 wird variiert. Offene Halbellipsen repräsentieren sinusförmige z-Gradienten (Dauer 1 ms, Gradientenstärke 80%).  $\epsilon$  entspricht der Gesamtdauer des Gradienten und der Abklingzeit. Letztere betrug 2 ms. Die Diffusionszeit  $\tau$  lag zwischen 80 ms und 140 ms.

Alle Spektren wurden bei  $25^\circ\text{C}$  mit Bruker Avance360, DRX500 oder DRX600 NMR-Spektrometern mit 2048 komplexen Punkten je 1D NMR-Spektrum aufgezeichnet. Zur Bestimmung der Diffusionskonstanten wurden 18 verschiedene Gradientenstärken eingesetzt. In der Praxis wurden je Gradientenstärke drei 1D Experimente aufgezeichnet, um das Signal/Rausch-Verhältnis zu verbessern, und in einem pseudo 2D *ser*-File abgespeichert. Die Länge des Dephasierungs- bzw. Refokussierungsgradienten lag zwischen 5.75 ms und 8 ms je nach Protein und Spektrometer. Die Diffusionszeit hängt ebenfalls von den experimentellen Bedingungen ab. So wurde für CspB in Gegenwart von 0% und 27% EG eine Diffusionszeit von 80 ms gewählt, während bei 52% und 70% EG 140 ms benötigt wurden, um einen Signalverlust zwischen 70% und 90% bei der höchsten Gradientenstärke zu gewährleisten. Die Diffusionsintervalle für ORF56 bzw. p19<sup>INK4d</sup> betragen 71 ms bzw. 45 ms. Die Abhängigkeit der Intensität des NMR-Signals  $I(g)$  von der Gradientenstärke ist durch Gl. 31 gegeben (Balbach, 2000, Jones, *et al.*, 1997). Typischerweise wurde  $I(g)$  durch Integration der Signale im Bereich der aliphatischen  $^1\text{H}$  (zwischen 0.5 ppm und 2.5 ppm) oder im Bereich der aromatischen  $^1\text{H}$  (zwischen 6.5 ppm und 8.5 ppm) ermittelt.

$$I(g) = A \cdot \exp(-d_{\text{prot}} \cdot g^2) \quad \text{Gl. 31}$$

Der Diffusionskoeffizient der Translationsbewegung des Proteins ist proportional zu  $d_{\text{prot}}$  und  $A$  repräsentiert die Amplitude der Gauss-förmigen Diffusionskurve. Als interne Referenz wurde Dioxan verwendet, das weder mit nativen noch entfaltenen Proteinen signifikant interagiert (Jones, *et al.*, 1997). Das Integral der Resonanz von Dioxan bei 3.6 ppm besitzt jedoch geringe Beiträge von Proteinresonanzen, so dass  $d_{\text{diox}}$  mit Gl. 32 berechnet wurde. Dabei wurde  $d_{\text{prot}}$  konstant gehalten. Die beiden Amplituden  $A_{\text{prot}}$  bzw.  $A_{\text{diox}}$  stellen den jeweiligen Beitrag des Proteins bzw. Dioxans dar.

$$I(g) = A_{\text{diox}} \cdot \exp(-d_{\text{diox}} \cdot g^2) + A_{\text{prot}} \cdot \exp(-d_{\text{prot}} \cdot g^2) \quad \text{Gl. 32}$$

Der hydrodynamische Radius des Proteins ( $R_{\text{H}}^{\text{prot}}$ ) kann mit Hilfe von  $d_{\text{prot}}$  und  $d_{\text{diox}}$  und Gl. 33 bestimmt werden, da der hydrodynamische Radius der internen Referenz Dioxan ( $R_{\text{H}}^{\text{diox}}$ ) mit 2.12 Å bekannt ist (Wilkins, *et al.*, 1999).

$$R_{\text{H}}^{\text{prot}} = \frac{d_{\text{diox}}}{d_{\text{prot}}} \cdot R_{\text{H}}^{\text{diox}} \quad \text{Gl. 33}$$

Zur theoretischen Abschätzung des hydrodynamischen Radius wurden die Eichgeraden aus Wilkins *et al.* für native (Gl. 34) oder entfaltete (Gl. 35) Proteine verwendet (Wilkins, *et al.*, 1999).

$$R_{\text{H}} = (4.75 \pm 1.11)N^{0.29 \pm 0.02} \quad \text{Gl. 34}$$

$$R_{\text{H}} = (2.21 \pm 1.07)N^{0.57 \pm 0.02} \quad \text{Gl. 35}$$

### 2.5.3 Messung von Relaxationsparametern für die Lipari-Szabo-Analyse

2D  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  Korrelationsspektren zur Bestimmung der Relaxationsparameter ( $R_1$ ,  $R_2$ ,  $h\text{NOE}$ ,  $\eta_{xy}$ ) wurden an NMR-Spektrometern (DRX500, DRX600) der Firma Bruker (Karlsruhe) mit einer  $^1\text{H}$  Resonanzfrequenz von 500 MHz (CspB in 0% EG, CspB/dT7-Komplex, ORF56) oder 600 MHz (CspB in 27% EG bzw. 70% EG) aufgenommen. Die spektrale Breite bei 500 MHz betrug 6510 Hz ( $^1\text{H}$ ) bzw. 1470 Hz ( $^{15}\text{N}$ ) und bei 600 MHz 9615 Hz ( $^1\text{H}$ ) bzw. 1764 Hz ( $^{15}\text{N}$ ). Es wurden 2048 x 256 komplexe Punkte mit 32 Wiederholungen pro  $t_1$ -Inkrement aufgezeichnet. Phasensensitive Quadraturdetektion wurde entweder über die TPPI- oder die Echo/Antiecho-Methode erreicht. Die Prozessierung erfolgte mit *Felix 97* (Accelrys Inc.), wobei nur die linke Hälfte des Spektrums in Matrizen von 1024 x 512 Punkten verwendet wurde. Als Fensterfunktion diente in der Regel eine  $\cos^2$ -Funktion. Die Basislinienkorrektur wurde mit dem *flatt*-Algorithmus von *Felix* durchgeführt.

Die verwendeten Pulssequenzen ohne (Barbato, *et al.*, 1992, Kay, *et al.*, 1992) bzw. mit (Dayie & Wagner, 1994) gepulsten Feldgradienten sind in Abb. 14 bzw. Abb. 15 gezeigt und die experimentellen Bedingungen für die folgenden Proben in Tab. 4 zusammengefasst: CspB bei verschiedenen Viskositäten sowie im Komplex mit der ssDNA dT7 bei 25 °C.

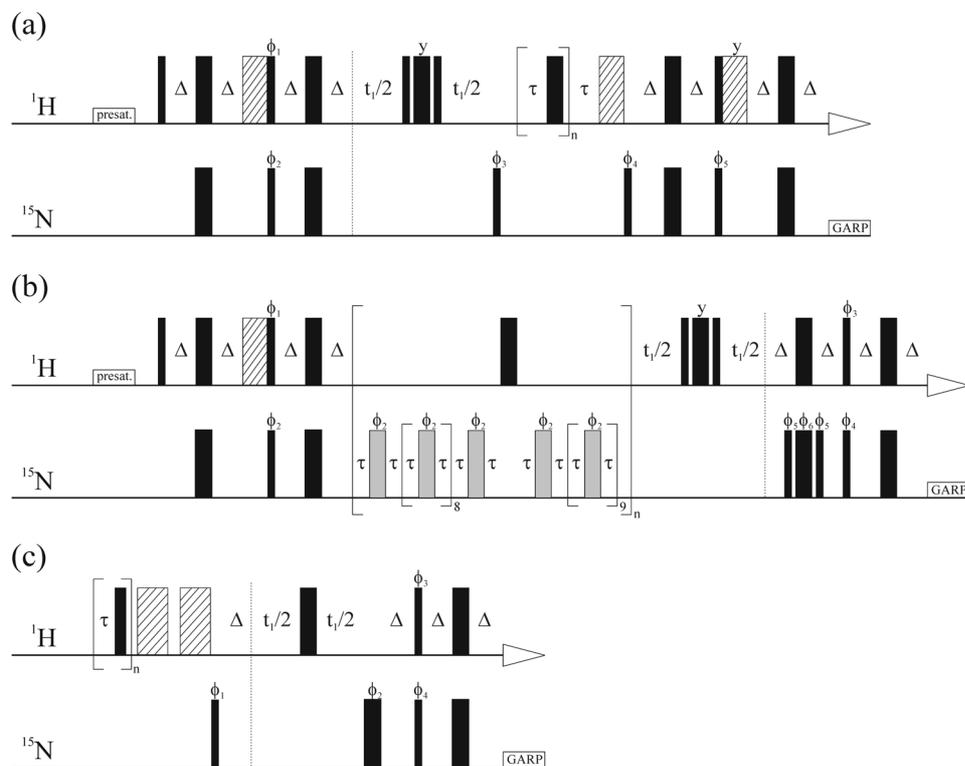
**Tab. 4:** Experimentelle Bedingungen zur Bestimmung von  $R_1$  und  $R_2$

Probe <sup>a</sup>	Parameter	Relaxationsintervall (ms)
CspB in 0% EG <sup>b</sup>	$R_1^c$	12.5, 37.7, 82.9, 148.2 <sup>h</sup> , 233.5, 344 <sup>h</sup> , 474.6, 806.1
	$R_2^d$	22.8, 45.6, 68.4, 91.2, 114, 136.8, 159.6, 182.4, 205.2
CspB in 27% EG <sup>c</sup> , 70% EG <sup>c</sup>	$R_1^f$	10, 40.1, 130.4, 280.9, 496.6, 767.5, 1103.6, 1500, 2498.2
	$R_2^g$	22.4, 44.8, 67.2, 89.6, 112, 134.4, 156.8, 179.2
CspB/dT7 <sup>b</sup>	$R_1^c$	12.5, 37.7, 82.9, 148.2, 233.5, 344, 474.6, 806.1, 1007.9
	$R_2^d$	23.2, 46.4, 69.6, 92.8, 116, 139.2, 162.4, 185.6, 208.8, 232, 348

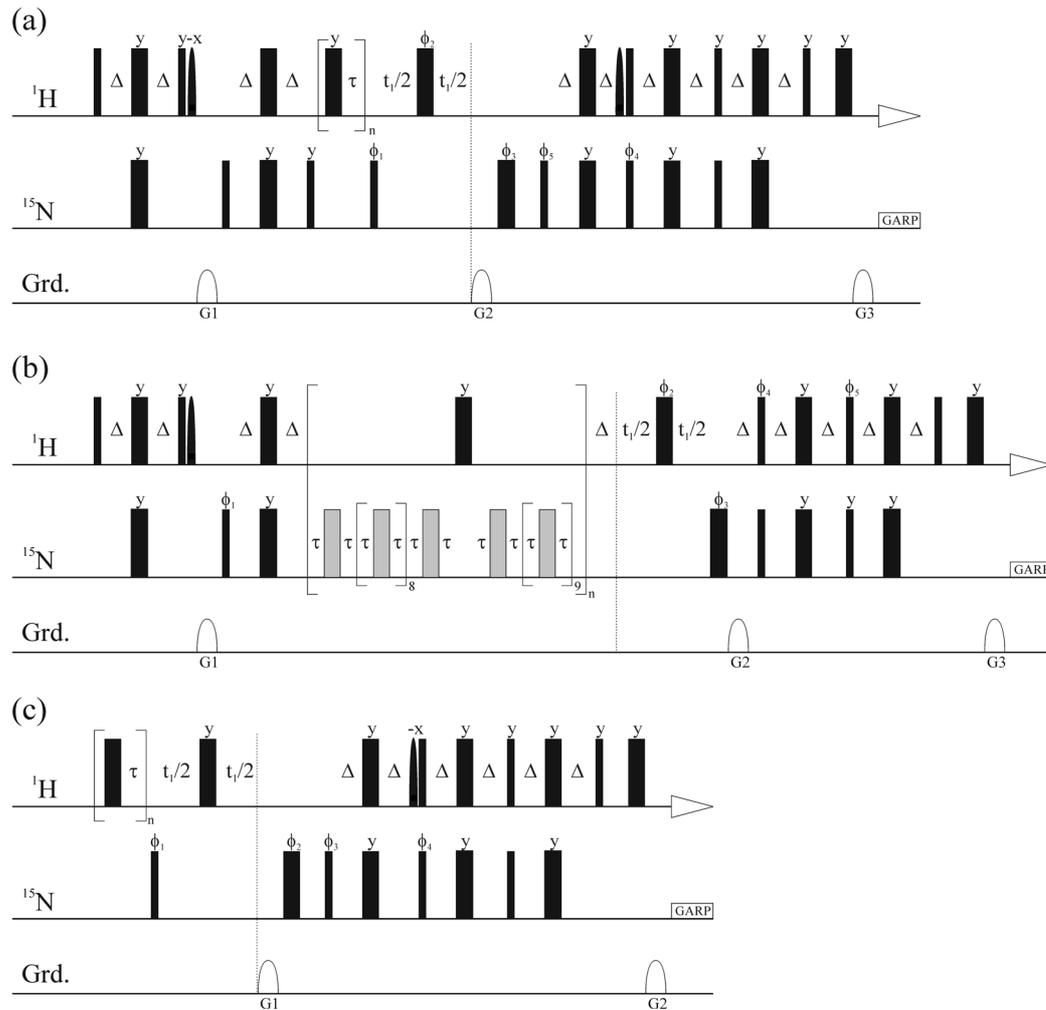
<sup>a</sup> Experimente wurden bei 25 °C durchgeführt. <sup>b</sup> DRX500, <sup>c</sup> Pulssequenz siehe Abb. 14a, <sup>d</sup> Pulssequenz siehe Abb. 14b, <sup>e</sup> DRX600, <sup>f</sup> Pulssequenz siehe Abb. 15a, <sup>g</sup> Pulssequenz siehe Abb. 15b. <sup>h</sup> Experiment wurde zweimal durchgeführt.

Longitudinale  $^{15}\text{N}$  Spin-Gitter-Relaxationsraten ( $R_1$ ) wurden mit der *inversion-recovery* Methode bestimmt, zu Beginn während des Relaxationsintervalls der Operator  $S_z$  vorliegt (Abb. 14a, Abb. 15a). Für die Messung transversaler  $^{15}\text{N}$  Spin-Spin-Relaxationsraten ( $R_2$ ) wurde eine etwas abgewandelte Carr-Purcell-Meiboom-Gill-Spinecho-Sequenz (CPMG) eingesetzt (Abb. 14b, Abb. 15b). Während der Operator  $-S_x$  vorhanden ist, refokussiert die Serie von  $180^\circ$ -Pulsen die  $^{15}\text{N}$  chemische Verschiebung, die sich während des Zeitintervalls  $\tau = 0.5$  ms zwischen aufeinander folgenden  $180^\circ$   $^{15}\text{N}$ -Pulsen entwickelt. Durch die Variation der Anzahl der Spinecho-Zyklen werden verschieden lange Relaxationsintervalle ermöglicht.

Der  $180^\circ$   $^1\text{H}$ -Puls in der Mitte der CPMG-Sequenz invertiert  $^1\text{H}$  und verhindert somit die Ausbildung von Kreuzkorrelationseffekten. Die Relaxationsintervalle zur Bestimmung von  $R_1$  und  $R_2$  wurden so gewählt, dass ein vollständiger Signalabfall erreicht wurde. Dadurch war die Anpassung an eine einfache Exponentialfunktion möglich ( $I(t) = A \cdot \exp(-R_{1,2} \cdot t)$ ). Für die Bestimmung des heteronuklearen  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  NOE ( $h\text{NOE}$ ) wurde je ein Spektrum mit und ohne 3 s Vorsättigung aufgezeichnet (Abb. 14c, Abb. 15c). Die Vorsättigung wurde durch eine Folge von  $120^\circ$ -Pulsen auf  $^1\text{H}$  erreicht, die 5 ms voneinander getrennt waren. Im Referenzexperiment erfolgte während des äquivalenten Zeitintervalls keine Vorsättigung. Da  $^{15}\text{N}$  ein negatives gyromagnetisches Verhältnis besitzt, wird die Intensität des  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -Kreuzsignals durch den  $h\text{NOE}$  abgeschwächt. Der  $h\text{NOE}$  ergibt sich dann aus dem Quotienten der Intensitäten der Kreuzsignale mit und ohne Vorsättigung ( $I_{\text{sat}}/I_{\text{ref}}$ ).



**Abb. 14:** Pulssequenzen zur Bestimmung der Relaxationsparameter (a)  $R_1$ , (b)  $R_2$ , (c)  $h\text{NOE}$  mit Vorsättigung (*presat.*). Schmale und breite ausgefüllte Rechtecke symbolisieren  $90^\circ$ - bzw.  $180^\circ$ -Pulse, schraffierte Rechtecke stehen für *Spinlock*-Pulse ((a), (b) 2 ms, (c) 10 ms). (b) Die  $180^\circ$ -Pulse auf  $^{15}\text{N}$  in der CPMG-Sequenz sind abgeschwächt und  $120 \mu\text{s}$  lang. (c) Die Sättigung von  $^1\text{H}$  erfolgt mit  $120^\circ$ -Pulsen. Im Referenzexperiment wurde der  $120^\circ$ -Puls durch eine Wartezeit identischer Länge ersetzt. Die Zeitintervalle betragen für  $\Delta=2.3$  ms bis 2.7 ms und für  $\tau$  (a) 5 ms, (b) 0.5 ms (c) 5 ms. Die Phasenzyklen lauten für (a)  $\phi_1=8(y)8(-y)$ ,  $\phi_2=4(x)4(-x)$ ,  $\phi_3=(-y,y)$ ,  $\phi_4=2(x)2(-x)$ ,  $\phi_5=16(y)16(-y)$ , für (b)  $\phi_1=(y,-y)$ ,  $\phi_2=2(x)2(-x)$ ,  $\phi_3=4(x)4(-x)$ ,  $\phi_4=8(x)8(-x)$ ,  $\phi_5=16(x)16(-x)$ ,  $\phi_6=16(y)16(-y)$  und für (c)  $\phi_1=(x,-x)$ ,  $\phi_2=8(x)8(y)8(-x)8(-y)$ ,  $\phi_3=2(x)2(-x)$ ,  $\phi_4=4(y)4(-y)$ . Für die Quadraturdetektion entlang der  $^1\text{H}$  Dimension ist (a)  $\phi_3$ , (b)  $\phi_4$ , (c)  $\phi_1$  gemäß TPPI inkrementiert worden.

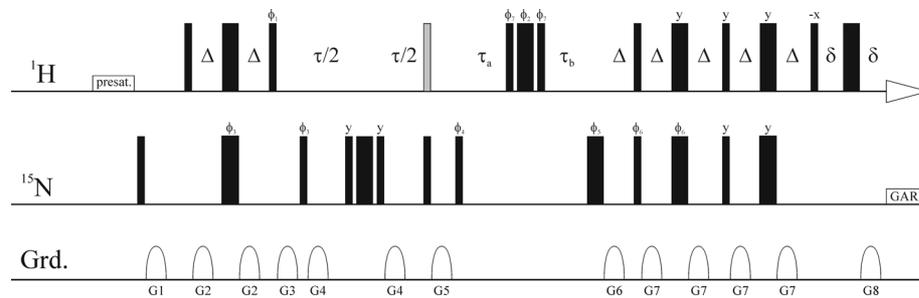


**Abb. 15:** Pulssequenzen zur Bestimmung der Relaxationsparameter (a)  $R_1$ , (b)  $R_2$ , (c)  $hNOE$  mit gepulsten Feldgradienten. (b) Die  $180^\circ$ -Pulse auf  $^{15}\text{N}$  in der CPMG-Sequenz sind abgeschwächt und  $120\ \mu\text{s}$  lang (Anregung  $4.2\ \text{kHz}$ ). (c) Die Sättigung von  $^1\text{H}$  erfolgt mit  $120^\circ$ -Pulsen, wobei im Referenzexperiment der  $120^\circ$ -Puls durch eine Wartezeit identischer Länge ersetzt wurde. Die gefüllten Halbellipsen stellen selektive  $90^\circ$  Halbgausspulse dar. Die offenen Halbellipsoide stehen für z-Gradienten, deren relative Stärke (%) in (a), (b) 50, 50, 8.11 bzw. (c) 80, 8.11 betrug. Die Zeitintervalle betragen  $\Delta=2.3\ \text{ms}$ - $2.7\ \text{ms}$ , (a)  $\tau=5\ \text{ms}$ , (b)  $\tau=0.5\ \text{ms}$ , (c)  $\tau=5\ \text{ms}$ . Die Phasenzyklen lauten für (a)  $\phi_1=(x,-x)$ ,  $\phi_2=4(y)4(-y)$ ,  $\phi_3=2(x)2(-x)$ ,  $\phi_4=2(y)2(-y)$ ,  $\phi_5=y$ , für (b)  $\phi_1=(x,-x)$ ,  $\phi_2=4(y)4(-y)$ ,  $\phi_3=\phi_4=2(x)2(-x)$ ,  $\phi_5=2(y)2(-y)$  und für (c)  $\phi_1=(x,-x,x,-x,-x,x,-x,x)$ ,  $\phi_2=2(x)2(-x)$ ,  $\phi_3=y$ ,  $\phi_4=2(y)2(-y)2(y)2(-y)2(y)2(-y)2(y)2(-y)2(y)$ . Quadraturdetektion erfolgte mit der Echo/Antiecho-Methode durch Inversion von (a)  $\phi_5$ , (b)  $\phi_5$ , (c)  $\phi_3$  und dem Gradienten G2.

Die Pulssequenzen aus Abb. 14 und Abb. 15 besitzen zwei grundlegende Unterschiede. Letztere verwenden für den Aufbau von  $^1\text{H}$ -Magnetisierung vor der Detektion anstatt eines reversen INEPT-Schritts (*insensitive nuclei enhanced by polarisation transfer*) die PEP-Technik (*preservation of equivalent pathways*) zur Empfindlichkeitssteigerung. Während der  $t_1$ -Evolution entwickeln sich die beiden Terme  $2I_zS_y$  und  $2I_zS_x$ . Der zweite Term wird durch den reversen INEPT-Schritt nicht refokussiert und trägt somit nicht zur observierbaren

Magnetisierung bei. Durch die PEP-Technik werden beide Antiphase-Komponenten refokussiert und können dadurch beobachtet werden. Die Empfindlichkeitssteigerung kann bis zu einem Faktor  $\sqrt{2}$  betragen. Der zweite Unterschied liegt darin, dass die Selektion des Kohärenztransferwegs in Abb. 14 über den Phasenzyklus und in Abb. 15 mit Hilfe der Inversion des Gradienten G2 (Echo/Antiecho) erfolgt.

Die transversale Kreuzrelaxationsrate  $\eta_{xy}$  zwischen der  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  dipolaren Relaxation und der Relaxation der Anisotropie der  $^{15}\text{N}$  chemischen Verschiebung ( $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}/^{15}\text{N}$ -CSA-Kreuzrelaxation) wurde mit den Pulssequenzen aus Abb. 16 bestimmt. Dabei wird  $^{15}\text{N}$  Antiphaskohärenz ( $2I_{zS_y}$ ) gebildet, die während der Relaxationszeit  $\tau$  zu  $^{15}\text{N}$  Inphasenkohärenz ( $S_y$ ) relaxiert.



**Abb. 16:** Pulssequenz zur Messung der transversalen  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -dipolaren/ $^{15}\text{N}$  CSA Kreuzrelaxationsrate  $\eta_{xy}$ . Schmale und breite ausgefüllte Balken repräsentieren  $90^\circ$ - bzw.  $180^\circ$ -Pulse. Die Zeitintervalle betragen  $\Delta = 2.67$  ms und  $\delta = 1.5$  ms.  $\tau$  stellt die variable Relaxationszeit dar ( $\tau = n/{}^1J_{\text{NH}}$ ,  $n$  ist eine ganze Zahl und  ${}^1J_{\text{NH}}$  die skalare Kopplung zwischen Amidproton und Amidstickstoff). Je zwei Spektren pro  $\tau$  wurden aufgezeichnet. Das Kreuzrelaxationsexperiment enthält den  $90^\circ$   $^1\text{H}$ -Puls (grauer Balken) mit  $\tau_a = \Delta + t_1/2$  und  $\tau_b = t_1/2$ . Im Autorelaxationsexperiment fehlt dieser  $90^\circ$   $^1\text{H}$ -Puls und die Zeitintervalle betragen  $\tau_a = t_1/2$  und  $\tau_b = \Delta + t_1/2$ . Der Phasenzyklus ist  $\phi_1=2(-y)2(y)$ ,  $\phi_2=4(x)4(-x)$ ,  $\phi_3=4(x)4(-x)$ ,  $\phi_4=8(x)8(-x)$ ,  $\phi_5=(x,y,-x,-y)$ ,  $\phi_6=x$  und  $\phi_7=4(y)4(-y)$ . Alle Pulse erfolgen aus x-Richtung sofern keine weitere Angabe vorhanden ist. Alle z-Gradienten (Halbellipsen) sind sinusförmig und 1 ms lang. Die relativen Gradientenstärken (%) betragen für G1-G8 10.8, 4, 8, 6, 8.6, -80, 5.5, 8.1. Quadraturdetektion erfolgte mit der Echo/Antiecho-Methode durch Inversion von  $\phi_6$  und dem Gradienten G6. Zusätzlich wurde das Signal des Wassers durch einen langen Vorsättigungspuls (presat.) unterdrückt. Während der Aufnahme des *FID* erfolgte die  $^{15}\text{N}$ -Entkopplung mit der GARP-Sequenz.

Das erste Experiment, in dem der  $90^\circ$   $^1\text{H}$ -Puls (grauer Balken in Abb. 16) ausgeführt wird, selektiert auf  $S_y$ , wodurch das Signal die Intensität der Kreuzrelaxation ( $I_{\text{kreuz}}$ ) widerspiegelt. Das zweite Experiment, in dem der  $90^\circ$   $^1\text{H}$  Puls nicht ausgeführt wird, selektiert  $2I_{zS_y}$ , so dass das Signal auf die Autorelaxation ( $I_{\text{auto}}$ ) zurückgeführt werden kann. Über das Verhältnis der Intensitäten der Kreuzsignale aus dem Auto- und Kreuzrelaxationsexperiment ( $I_{\text{kreuz}}/I_{\text{auto}}$ ) und Gl. 36 kann  $\eta_{xy}$  berechnet werden (Kroenke, *et al.*, 1998, Tjandra, *et al.*, 1996).

$$I_{\text{kreuz}}/I_{\text{auto}} = \tanh(\eta_{xy} \tau) \quad \text{Gl. 36}$$

Die Relaxationsintervalle  $\tau$  lagen bei 32 ms, 53.4 ms, 74.8 ms, 96.1 ms und 106.8 ms. Für jedes  $\tau$  wurde je ein Auto- und ein Kreuzrelaxationsexperiment aufgezeichnet. Deren Unterschiede sind in der Legende von Abb. 16 beschrieben.  $\eta_{xy}$  ist unabhängig vom chemischen Austausch im Mikro- bis Millisekundenbereich, wodurch die tatsächliche transversale Spin-Spin-Relaxationsrate ( $R_2^0$ ) mit Gl. 37 bestimmt werden kann. Dabei ist  $\gamma_N$  bzw.  $\gamma_H$  das gyromagnetische Verhältnis von  $^{15}\text{N}$  bzw.  $^1\text{H}$ ,  $B_0$  das statische Magnetfeld,  $\Delta\sigma$  die  $^{15}\text{N}$ -CSA mit -172 ppm,  $P_2[x]=(3x^2 - 1)/2$ ,  $r_{\text{NH}}$  die N-H-Bindungslänge (0.102 nm) und  $\beta$  der experimentell bestimmte Winkel zwischen dem N-H-Bindungsvektor und der Symmetrieachse des  $^{15}\text{N}$ -CSA-Tensors mit  $18.5^\circ$  (Boyd & Redfield, 1999, Kroenke, *et al.*, 1998, Vugmeyster, *et al.*, 2000).

$$R_2^0 = \sqrt{3}(4c^2 + 3d^2)/(12cdP_2[\cos \beta])\eta_{xy} \quad \text{Gl. 37}$$

$$\text{mit } c = \gamma_N B_0 \Delta\sigma / \sqrt{3}, \quad d = -\mu_0 \gamma_H \gamma_N / (8\pi^2 r_{\text{NH}}^3)$$

Zur Berechnung aller Relaxationsraten ( $R_1$ ,  $R_2$ ,  $\eta_{xy}$ ) wurde das Programm Grafit (Erithacus Software) verwendet. Der erhaltene Standardfehler stimmt gut mit dem Fehler überein, den man durch Monte Carlo Simulationen mit dem Programm CURVEFIT, das Bestandteil des MODELFREE-Programmpakets ist, erhält (Mandel, *et al.*, 1995, Palmer, *et al.*, 1991). Dieser Standardfehler liegt für  $R_1$  bzw.  $R_2$  ca. 10% unter, für  $\eta_{xy}$  ca. 20% über der Abschätzung des Fehlers mit der *jack-knife* Methode. Die Unsicherheiten der *hNOE*-Werte wurden aus dem Rauschen der Basislinie des jeweiligen Spektrums bestimmt und lagen um 5%.

#### 2.5.4 Modelunabhängige Analyse von Relaxationsparametern nach Lipari & Szabo

Die erweiterte Lipari-Szabo-Analyse wurde mit dem Programm MODELFREE (Version 3.1) durchgeführt. Die grundlegende Annahme dieses modelunabhängigen Ansatzes ist, dass die Dynamik von Proteinen durch zwei voneinander unabhängige Korrelationszeiten charakterisiert werden kann. Dabei wird für die Gesamtbewegung die Korrelationszeit  $\tau_m$  (*overall tumbling*) und für lokale, schnellere Bewegungen jedes individuellen Kerns die effektive Korrelationszeit  $\tau_e$  definiert. Als Datenbasis für die Analyse dienten für jede Probe die Relaxationsparameter  $R_1$ ,  $R_2$  und *hNOE* aus Tab. 4. Die Relaxation des Kernspins von Amidstickstoffen ( $^{15}\text{N}$ ) in einem diamagnetischen Protein kann im Allgemeinen durch die dipolare Kopplung zu dem direkt gebundenen Amidproton ( $^1\text{H}$ ) und der Anisotropie der  $^{15}\text{N}$  chemischen Verschiebung (*chemical shift anisotropy*, CSA) beschrieben werden (Abragam,

1961). Daraus ergeben sich für die Relaxationsparameter folgende Definitionen (Gl. 38 bis Gl. 40).

$$R_1 = (d_{\text{NH}}^2/4) \cdot \{J(\omega_{\text{H}} - \omega_{\text{N}}) + 3J(\omega_{\text{N}}) + 6J(\omega_{\text{H}} + \omega_{\text{N}})\} + (\omega_{\text{N}}^2/3)(\sigma_{\parallel} - \sigma_{\perp})^2 J(\omega_{\text{N}}) \quad \text{Gl. 38}$$

$$R_2 = (d_{\text{NH}}^2/8) \cdot \{4J(0) + J(\omega_{\text{H}} - \omega_{\text{N}}) + 3J(\omega_{\text{N}}) + 6J(\omega_{\text{H}}) + 6J(\omega_{\text{H}} + \omega_{\text{N}})\} + (\omega_{\text{N}}^2/18)(\sigma_{\parallel} - \sigma_{\perp})^2 \{4J(0) + 3J(\omega_{\text{N}})\} + R_{\text{ex}} \quad \text{Gl. 39}$$

$$h\text{NOE} = 1 + (d_{\text{NH}}^2/4R_1)(\gamma_{\text{H}}/\gamma_{\text{N}}) \{6J(\omega_{\text{H}} + \omega_{\text{N}}) - J(\omega_{\text{H}} - \omega_{\text{N}})\} \quad \text{Gl. 40}$$

$$\text{mit } d_{\text{NH}} = (\mu_0 h \gamma_{\text{H}} \gamma_{\text{N}} / 8 \pi^2) \langle r_{\text{NH}}^{-3} \rangle \quad \text{Gl. 41}$$

Dabei ist  $\mu_0$  die Permeabilität im Vakuum,  $h$  das Planck'sche Wirkungsquantum,  $\gamma_{\text{H}}$  bzw.  $\gamma_{\text{N}}$  das gyromagnetische Verhältnis von  $^1\text{H}$  bzw.  $^{15}\text{N}$  und  $\omega_{\text{H}}$  bzw.  $\omega_{\text{N}}$  die jeweilige Larmorfrequenz von  $^1\text{H}$  bzw.  $^{15}\text{N}$ . Die Länge der N-H-Bindung  $r_{\text{NH}}$  beträgt 0.102 nm. Die parallele und vertikale Komponente des Tensors der  $^{15}\text{N}$  chemischen Verschiebung wird durch  $\sigma_{\parallel}$  und  $\sigma_{\perp}$  repräsentiert. Dieser Tensor wurde als axial symmetrisch angenommen, wobei der übliche Wert für  $\Delta\sigma = \sigma_{\parallel} - \sigma_{\perp}$  mit -160 ppm bei der Lipari-Szabo-Analyse eingesetzt wurde (Hiyama, *et al.*, 1988). Neuere Bestimmungen der  $^{15}\text{N}$  CSA ergeben Werte um -170 ppm (Boyd & Redfield, 1999, Canet, *et al.*, 2001, Ottiger, *et al.*, 1997), was allerdings keine signifikanten Änderungen in  $\tau_{\text{m}}$  oder den anderen internen Bewegungsparametern verursacht. Dies wurde für ausgewählte Datensätze gezeigt. Der  $R_{\text{ex}}$ -Term in Gl. 39 stellt den Beitrag des langsamen chemischen oder konformationellen Austauschs im Mikro- bis Millisekundenbereich zu  $R_2$  dar (Palmer, *et al.*, 1996). Die spektrale Leistungsdichtefunktion  $J(\omega_i)$  bei der Winkelgeschwindigkeit  $\omega_i$  hängt sowohl von der internen Beweglichkeit des  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -Bindungsvektors als auch von der Gesamtbewegung des Proteins ab.

**Tab. 5:** Spektrale Leistungsdichtefunktionen für die erweiterte Lipari-Szabo-Analyse von  $^{15}\text{N}$ -Relaxationsparametern.

Model	Spektrale Leistungsdichtefunktion	Optimierte Parameter
1	$J(\omega) = 2/5 \{S^2 \tau_{\text{m}} / (1 + \omega^2 \tau_{\text{m}}^2)\}$	$S^2$
2 <sup>a</sup>	$J(\omega) = 2/5 \{S^2 \tau_{\text{m}} / (1 + \omega^2 \tau_{\text{m}}^2) + (1 - S^2) \tau_{\text{e}}' / (1 + \omega^2 \tau_{\text{e}}'^2)\}$	$S^2, \tau_{\text{e}}$
3	$J(\omega) = 2/5 \{S^2 \tau_{\text{m}} / (1 + \omega^2 \tau_{\text{m}}^2)\}$ $1/T_{2(\text{obs})} = 1/T_2 + R_{\text{ex}}$	$S^2, R_{\text{ex}}$
4	$J(\omega) = 2/5 \{S^2 \tau_{\text{m}} / (1 + \omega^2 \tau_{\text{m}}^2) + (1 - S^2) \tau_{\text{e}}' / (1 + \omega^2 \tau_{\text{e}}'^2)\}$ $1/T_{2(\text{obs})} = 1/T_2 + R_{\text{ex}}$	$S^2, \tau_{\text{e}}, R_{\text{ex}}$
5 <sup>b</sup>	$J(\omega) = 2/5 \{S^2 \tau_{\text{m}} / (1 + \omega^2 \tau_{\text{m}}^2) + S_{\text{f}}^2 (1 - S_{\text{s}}^2) \tau_{\text{s}}' / (1 + \omega^2 \tau_{\text{s}}'^2)\}$	$S_{\text{f}}^2, S_{\text{s}}^2, \tau_{\text{e}}$

<sup>a</sup>  $\tau_{\text{e}}' = \tau_{\text{m}} \tau_{\text{e}} / (\tau_{\text{m}} + \tau_{\text{e}})$ ; <sup>b</sup>  $\tau_{\text{s}}' = \tau_{\text{m}} \tau_{\text{s}} / (\tau_{\text{m}} + \tau_{\text{s}})$  und  $S^2 = S_{\text{f}}^2 S_{\text{s}}^2$

Der erweiterte Lipari-Szabo-Formalismus schlägt verschiedene spektrale Leistungsdichtefunktionen vor (Tab. 5), die von den Bewegungsparametern  $S^2$ ,  $\tau_m$ ,  $\tau_e$  und  $R_{ex}$  abhängen. Dabei stellt  $S^2$  das Quadrat des allgemeinen Ordnungsparameters dar, der die Amplitude der internen Beweglichkeit charakterisiert. Eine Unterscheidung zwischen der Amplitude der Beweglichkeit auf verschiedenen Zeitskalen wird durch  $S_f$  (schnell) und  $S_s$  (langsam) erreicht. Wie zuvor schon erwähnt, repräsentieren  $\tau_m$  bzw.  $\tau_e$  die globale bzw. lokale effektive Korrelationszeit der langsamen Gesamtbewegung (*overall tumbling*) bzw. der schnelleren individuellen Bewegung einzelner Kerne.  $R_{ex}$  spiegelt den Beitrag des chemischen und konformationellen Austauschs wider.

Für CspB wurde sowohl bei den verschiedenen Lösungsmittelviskositäten (0%, 27%, 70% Ethylenglykol) als auch im Komplex mit dem ssDNA-Fragment dT7 ein isotropes Modell angenommen. Mit Hilfe der Struktur von freiem bzw. komplexiertem CspB wurde mit dem Programm *pdbinertia* (Bestandteil des MODELFREE-Pakets) die relative Ausdehnung bzgl. der drei Hauptachsen durch den Schwerpunkt des Moleküls mit 1:0.92:0.77 bestimmt. Die fünf Modelle aus Tab. 5 wurden an die experimentell bestimmten Relaxationsparameter im Zuge der Lipari-Szabo-Analyse angepasst und dabei die Minimierung der Fehlerquadrate der Zielfunktion (Gl. 42) für jede Aminosäure erreicht.

$$SSE = (R_1 - R_1^*)^2 / \sigma_1^2 + (R_2 - R_2^*)^2 / \sigma_2^2 + (hNOE - hNOE^*)^2 / \sigma_{hNOE}^2 \quad \text{Gl. 42}$$

$R_1$ ,  $R_2$  und  $hNOE$  sind die experimentellen Relaxationsparameter, die als Basis für die Lipari-Szabo-Analyse dienen, und  $\sigma_1$ ,  $\sigma_2$  und  $\sigma_{hNOE}$  die dazugehörigen Unsicherheiten der experimentellen Bestimmung.  $R_1^*$ ,  $R_2^*$  und  $hNOE^*$  stellen die mit der jeweiligen spektralen Leistungsdichtefunktion (Tab. 4) zurückgerechneten Relaxationsparameter dar. Die Auswahl des Modells, welches die Bewegung jedes individuellen Kerns am besten wiedergibt, erfolgte über den kleinsten SSE-Wert. Neben dem minimalen SSE-Wert wurden auch die optimalen Bewegungsparameter als Auswahlkriterien herangezogen. So sollte je nach Modell  $\tau_e > 30$  ps,  $R_{ex} > 0.5 \text{ s}^{-1}$  oder  $S_f^2 > 0.95$  erfüllt sein. Ergaben sich für mehrere Modelle identische SSE-Werte oder wurde eines der anderen Kriterien verletzt, wurde das einfachere Modell bevorzugt. Die iterative Optimierung der Rotationskorrelationszeit  $\tau_m$  wurde wie von Montelione *et al.* beschrieben durchgeführt (Feng, *et al.*, 1998, Li & Montelione, 1995).

Chemischer Austausch  $R_{ex}$  kann durch unimolekulare Reaktionen im Mikro- bis Millisekundenbereich hervorgerufen werden und so zur Spin-Spin-Relaxationsrate  $R_2$  beitragen (Gl. 43), die mit CPMG Spinecho-Sequenzen (Abb. 14b, Abb. 15b) bestimmt wird.

$$R_{ex} = R_2 - R_2^0 \quad \text{Gl. 43}$$

Eine einfache Näherung für die Bestimmung der Relaxationsrate von Kern A kann unabhängig davon erfolgen, ob das System (Gl. 44) sich im schnellen, intermediären oder langsamen Austausch bzgl. der NMR-Zeitskala befindet (Gl. 45), sofern  $p_A \gg p_B$  ist (Ishima & Torchia, 1999).



$$R_2(1/\tau_{cp}) = R_2(1/\tau_{cp} \rightarrow \infty) + p_A p_B \Delta\omega^2 k_{ex} / [k_{ex}^2 + (p_A^2 \Delta\omega^4 + 144/\tau_{cp}^4)^{1/2}] \quad \text{Gl. 45}$$

Hierbei sind  $k_1$  und  $k_{-1}$  die Rate der Hin- und Rückreaktion. Die Rate des chemischen Austauschs  $k_{ex}$  gibt die Summe beider Raten wieder ( $k_{ex} = k_1 + k_{-1}$ ).  $p_A$  und  $p_B$  repräsentieren die Population des Kerns im Zustand A und B sowie  $\Delta\omega$  die Differenz der chemischen Verschiebung des Kerns im Zustand A und B.  $\tau_{cp}$  steht für die Dauer eines Spinechos ( $\tau_{cp}/2 - 180^\circ(^{15}\text{N}) - \tau_{cp}/2$ ) in der CPMG-Sequenz. Eine allgemeine Beschreibung zur Bestimmung von  $R_{ex}$  bzw.  $k_{ex}$  mit Hilfe von Relaxations-kompensierten CPMG-Spinecho Sequenzen ist im folgenden Abschnitt (2.5.5) enthalten.

### 2.5.5 Relaxations-kompensierte CPMG-Pulssequenzen ( $R_2$ -Dispersion)

Die experimentelle Bestimmung des Beitrags des chemischen Austauschs zur Spin-Spin-Relaxationsrate  $R_2$  kann nicht nur mit Kreuzrelaxationsexperimenten (siehe Abb. 16 in 2.5.3) sondern auch mit Relaxations-kompensierten CPMG-Spinecho-Experimenten (Abb. 17) erfolgen (Loria, *et al.*, 1999, Millet, *et al.*, 2000, Wang, *et al.*, 2001). Die allgemeine phänomenologische Beschreibung der transversalen Spin-Spin-Relaxationsrate eines Kerns A, der in zwei Zuständen vorliegen kann (Gl. 44), ist in Gl. 46-Gl. 47 wiedergegeben.

$$R_2(1/\tau_{cp}) = \frac{1}{2} \left( R_{2A} + R_{2B} + k_{ex} - \frac{1}{\tau_{cp}} \cosh^{-1} [D_+ \cosh(\eta_+) - D_- \cosh(\eta_-)] \right) \quad \text{Gl. 46}$$

mit 
$$D_{\pm} = \frac{1}{2} \left[ \pm 1 + \frac{\psi + 2\Delta\omega^2}{\sqrt{\psi^2 + \zeta^2}} \right] ; \quad \eta_{\pm} = \frac{\tau_{cp}}{\sqrt{2}} \sqrt{\pm \psi + \sqrt{\psi^2 + \zeta^2}}$$

$$\psi = (R_{2A} - R_{2B} - p_A k_{ex} + p_B k_{ex})^2 - \Delta\omega^2 + 4 p_A p_B k_{ex}^2$$

$$\zeta = 2\Delta\omega \cdot (R_{2A} - R_{2B} - p_A k_{ex} + p_B k_{ex})$$

$$R_{ex} = \Delta R_2(0, \infty) = R_2(1/\tau_{cp} \rightarrow 0) - R_2(1/\tau_{cp} \rightarrow \infty) = \frac{1}{2} \left\{ \sqrt{\psi + \Delta\omega^2} - \frac{1}{\sqrt{2}} \sqrt{\psi + \sqrt{\psi^2 + \zeta^2}} \right\} \quad \text{Gl. 47}$$

$\tau_{cp}$ : Zeitintervall eines Spinechos ( $\tau_{cp} = 2\tau$ ) in Abb. 17;  $R_{2A}$ ,  $R_{2B}$ :  $R_2$ -Rate des Kerns in Zustand A bzw. B,  $k_{ex}$ : Austauschrate ( $k_{ex} = k_1 + k_{-1}$ );  $\Delta\omega$ : Differenz der  $^{15}\text{N}$  chemischen Verschiebung des Kerns A in Zustand A und B;  $p_A$ ,  $p_B$ : Population von Zustand A bzw. B;  $R_{ex}$ : Beitrag des chemischen Austauschs zu  $R_2$  (siehe Gl. 43).

Die Bestimmung von  $k_{\text{ex}}$  bzw.  $R_{\text{ex}}$  mit Gl. 46 bzw. Gl. 47 ist unabhängig vom vorliegenden Austauschregime, welches mit dem  $\alpha$ -Wert in Gl. 48 für  $p_A \gg p_B$  theoretisch abgeschätzt werden kann. Für diesen Sonderfall kann auch die Näherung aus Gl. 45 zur Bestimmung von  $R_{\text{ex}}$  bzw.  $k_{\text{ex}}$  verwendet werden. Schneller, intermediärer oder langsamer Austausch liegt dann vor, wenn  $1 < \alpha \leq 2$ ,  $\alpha = 1$  bzw.  $0 \leq \alpha < 1$  ist. Durch die Messung von  $R_{\text{ex}}$  bei mindestens zwei Feldstärken ist es mit Gl. 49 möglich, den  $\alpha$ -Wert experimentell für alle möglichen Populationsverteilungen zu ermitteln.

$$\alpha = \frac{2(k_{\text{ex}} / \Delta\omega^2)}{1 + (k_{\text{ex}} / \Delta\omega^2)} \quad \text{Gl. 48}$$

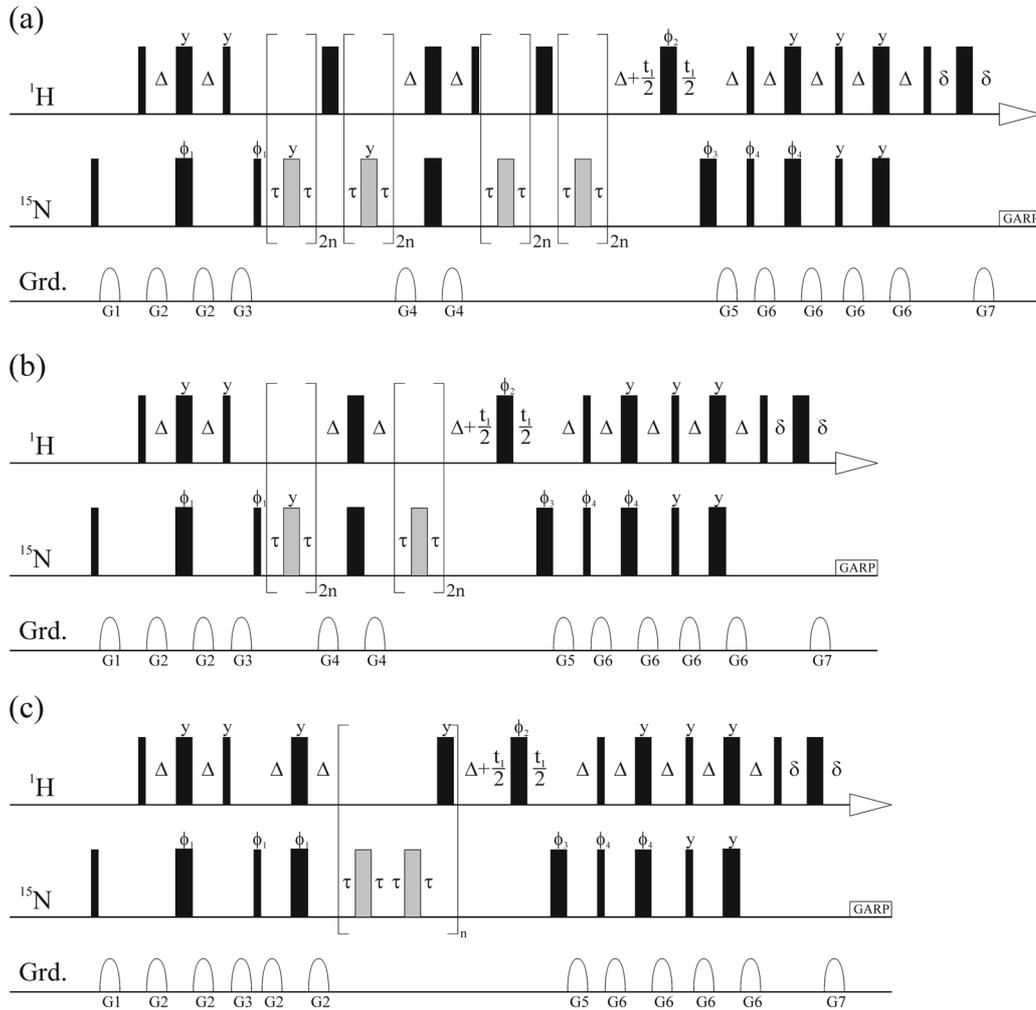
$$\alpha = \left( \frac{B_{02} + B_{01}}{B_{02} - B_{01}} \right) \cdot \left( \frac{R_{\text{ex}2} - R_{\text{ex}1}}{R_{\text{ex}2} + R_{\text{ex}1}} \right) \quad \text{Gl. 49}$$

$B_{01}$ ,  $B_{02}$ : äußeres Magnetfeld ( $B_{02} > B_{01}$ );  $R_{\text{ex}1}$ ,  $R_{\text{ex}2}$ : chemischer Austauschterm bei niedrigerem bzw. höherem äußeren Magnetfeld.

Die Bestimmung von  $k_{\text{ex}}$  mit dem Formalismus aus Gl. 46 erfolgt mit Hilfe einer sog.  $R_2$ -Dispersionskurve. Diese wird durch Variation des Zeitintervalls  $\tau$  zwischen den  $180^\circ$ -Pulsen innerhalb der CPMG-Spinecho-Sequenz (Abb. 17) erhalten. Chemischer Austausch kann durch die CPMG-Sequenz erfolgreich eliminiert werden, sofern der Austausch langsamer ist als das Zeitintervall zwischen den  $180^\circ$ -Pulsen. Liegen nur wenige Mikrosekunden zwischen den aufeinander folgenden Pulsen, so spricht man vom *fast-pulsing limit*. Hier beeinflussen nur extrem schnelle Prozesse im Picosekunden- bis Nanosekundenbereich die apparente  $R_2$ -Rate, so dass diese näherungsweise  $R_2^0$  entspricht. Somit stellt diese Methode eine Alternative zur Bestimmung von  $R_2^0$  dar. In 2.5.4 wurde die direkte bzw. indirekte Bestimmung von  $R_2^0$  mit Hilfe der transversalen Kreuzrelaxationsrate  $\eta_{\text{xy}}$  (Abb. 16) bzw. der Lipari-Szabo Analyse beschrieben. Befindet sich der Austausch zwischen den zwei Zuständen jedoch im Zeitbereich von  $\tau$ , so wird  $R_2$  apparent erhöht

Experimente zur Bestimmung von  $R_2$ -Dispersionskurven wurden hauptsächlich zur Charakterisierung des Übergangszustands der Faltung von CspB durchgeführt. Hierzu wurden Spektren von  $^{15}\text{N}$ -markiertem CspB in Gegenwart von 0 M, 1.23 M, 2 M, 3.1 M, 4.2 M, 5.3 M und 6.4 M Harnstoff aufgezeichnet. Durch die Zugabe von Harnstoff wird die Population von nativem und entfaltetem Protein variiert, wodurch die Faltungsraten ( $k_f$ ,  $k_u$ ) und somit auch die Austauschraten ( $k_{\text{ex}} = k_f + k_u$ ) beeinflusst werden. Die Auftragung von  $\ln k_{\text{ex}}$  gegen die Harnstoffkonzentration entspricht der sog. Chevron-Auftragung, die üblicherweise mittels stopped flow Fluoreszenzspektroskopie bestimmt wird (2.4.8). Die

Experimente wurden sowohl in Bayreuth (Bruker DRX500, DRX600 oder Avance700) als auch an der European NMR Large Scale Facility (SON NMRLSF) in Utrecht (Niederlande) an einem Bruker Avance600 aufgenommen, wobei überwiegend die Pulssequenzen aus Abb. 17a und Abb. 17b verwendet wurden.



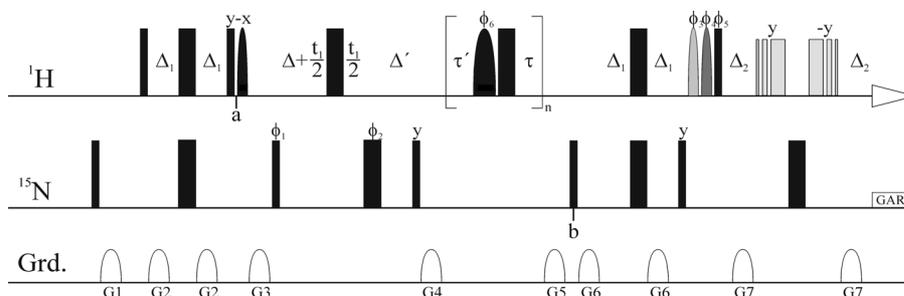
**Abb. 17:** Relaxations-kompensierte Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) Spinecho-Pulssequenzen zur Messung von  $^{15}\text{N}$   $R_2(1/\tau_{cp})$ .  $\tau_{cp}$  entspricht der Länge eines Spinecho-Elements und  $\tau = 0.5 \cdot \tau_{cp}$ . (a) CPMG-Experiment zur Bestimmung von  $R_2$  für  $\tau_{cp} < 7.2$  ms, (b) CPMG-Experiment für  $\tau_{cp} < 10$  ms, (c) CPMG-Experiment für  $\tau_{cp} = 1/{}^1J(\text{H}^{\text{N}}, \text{N}) = 10.8$  ms oder  $\tau_{cp} = 2/{}^1J(\text{H}^{\text{N}}, \text{N}) = 21.6$  ms. Schmale und breite schwarz ausgefüllte Balken repräsentieren  $90^\circ$ - bzw.  $180^\circ$ -Pulse. Grau ausgefüllte breite Balken stehen für  $180^\circ$   $^{15}\text{N}$ -Pulse in der Spinecho-Sequenz, die eine Länge von  $97 \mu\text{s}$  besitzen. Bis auf die gekennzeichneten Pulse erfolgten alle Pulse aus x-Richtung. Halbellipsen stellen sinusförmige z-Gradienten mit einer Länge von 1 ms dar. Die relativen Gradientenstärken (%) für G1-G7 betragen 5, 3, 80, 4, 40, 8, 4.05 und die Abklingzeit lag bei  $200 \mu\text{s}$ . Die Zeitintervalle betragen  $\Delta = 2.7$  ms und  $\delta = 1.2$  ms. Das Relaxationsintervall  $t$  wurde durch den Parameter  $n$  variiert ((a)  $t = 8n\tau_{cp}$ , (b)  $t = 4n\tau_{cp}$ , (c)  $t = 2n\tau_{cp}$ ). Der Phasenzklus ist für (a)  $\phi_1=x, -x, \phi_2=4(x)4(-x), \phi_3=2(x)2(y)2(-x)2(-y), \phi_4=y, rec=x, -x, -x, x$ . In (b) und (c) ist  $\phi_4=x, -x$ . Zur Kohärenzselektion wurde  $\phi_4$  und G5 invertiert. Quadraturdetektion erfolgte mit der Echo/Antiecho-Methode durch Inversion von  $\phi_1$  und  $rec$ .

Die Anpassung der  $R_2$ -Dispersionskurven mit Gl. 46 erfordert die vorherige Bestimmung einiger Parameter. Sehr kritisch für die Verlässlichkeit der Anpassung und der daraus resultierenden Austauschraten ist die Differenz der chemischen Verschiebung des betreffenden Kreuzsignals im nativen bzw. entfalteten Zustand ( $\Delta\omega$ ). Eine essentielle Voraussetzung für die genaue Bestimmung von  $\Delta\omega$  ist die Zuordnung der Kreuzsignale des entfalteten Zustands. Hierzu wurden 2D ZZ-Austauschexperimente bei verschiedenen Harnstoffkonzentrationen aufgenommen, über die eine Korrelation zwischen Kreuzsignalen des nativen und entfalteten Proteins möglich ist (siehe 2.5.6). Zusätzlich wurden eine Reihe von 2D  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  HSQC-Spektren bei unterschiedlichen Harnstoffkonzentrationen gemessen, womit die Harnstoffabhängigkeit der chemischen Verschiebung des jeweiligen Kreuzsignals ermittelt werden konnte. Daraus wurde dann  $\Delta\omega$  bei der jeweils vorliegenden Harnstoffkonzentration berechnet und als wichtiger Parameter bei der Anpassung der  $R_2$ -Dispersionkurven eingesetzt. Für die Ermittlung der  $R_2$ -Dispersionskurven wurde für jeden  $\tau_{\text{cp}}$ -Wert  $R_2(\tau_{\text{cp}})$  mit einer einfachen Exponentialfunktion ( $I(t, \tau_{\text{cp}}) = A \cdot \exp(-R_2(\tau_{\text{cp}}) \cdot t)$ ) und Grafit 4.0 (Erithacus Software) bestimmt. Für jede  $R_2(\tau_{\text{cp}})$  wurden Spektren mit sechs bis acht verschiedenen Relaxationszeiten gemessen. Bei  $\tau_{\text{cp}} > 10$  ms wurden meist nur Spektren mit zwei bis drei unterschiedliche Relaxationszeiten verwendet, die jedoch mehrfach gemessen wurden. Die Fehler der angepassten Parameter verhalten sich wie in 2.5.3 beschrieben. Die Anpassung der  $R_2$ -Dispersionskurven erfolgte mit Scientist (Micromath) oder CPMGfit.

### 2.5.6 ZZ-Austauschspektroskopie

Befinden sich zwei Zustände im langsamen chemischen Austausch bzgl. der NMR-Zeitskala, so ergeben sich für einen Kern zwei Signale unterschiedlicher chemischer Verschiebung. Grundlegende Experimente zur Verwendung von 2D ZZ-Austauschspektren zur Bestimmung von Faltungsraten wurden in meiner Diplomarbeit durchgeführt (Zeeb, 2000). Eine detaillierte Diskussion über die Empfindlichkeit der Experimente bei unterschiedlichen Austauschraten bzw. bei der Verwendung verschiedener Kohärenzen während der Austauschzeit ist ebenfalls dort zu finden. Die Weiterentwicklung dieser Grundlagen wird im Folgenden gezeigt. Durch die Zugabe von Harnstoff wird sowohl der native als auch der entfaltete Zustand von CspB signifikant populiert, so dass Kreuzsignale beider Konformationen in einem  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  ZZ-Austauschspektrum enthalten sind (Autosignale). Durch eine zusätzliche Wartezeit  $\tau_m$  in Anwesenheit longitudinaler Kohärenz ( $S_Z$  oder  $2I_ZS_Z$ ) werden Austauschkreuzsignale generiert. Diese kommen dadurch zustande, dass die Kerne

des nativen bzw. entfalteten Zustands durch die Entwicklung ihrer  $^{15}\text{N}$ -chemischen Verschiebung zunächst frequenzmarkiert werden und während der nachfolgenden Mischzeit  $\tau_m$  durch den chemischen Austausch diese Magnetisierung auf den entfalteten bzw. nativen Zustand übertragen. Im Anschluss daran entwickelt sich dann die  $^1\text{H}$ -chemische Verschiebung, so dass die Austauschsignale eine Frequenzmodulation von beiden Zuständen enthalten ( $I_{\text{NU}}(\delta(^{15}\text{N})^{\text{N}}, \delta(^1\text{H})^{\text{U}})$ ,  $I_{\text{UN}}(\delta(^{15}\text{N})^{\text{U}}, \delta(^1\text{H})^{\text{N}})$ ). Dies führt zur Korrelation des Kreuzsignals eines Amidprotons im nativen Zustand mit dem Kreuzsignal desselben Amidprotons im entfalteten Zustand über die zwei Austauschsignale. Mit der verwendeten Pulssequenz in Abb. 18 (Farrow, *et al.*, 1994) ist die gleichzeitige Bestimmung der longitudinalen Relaxationsraten beider Zustände ( $R_{1\text{N}}$ ,  $R_{1\text{U}}$ ) und der intrinsischen Faltungsraten möglich ( $k_{\text{f}}$ ,  $k_{\text{u}}$ ). Die publizierte Pulssequenz wurde um die selektive Unterdrückung des Harnstoffsignals modifiziert und die Gradientenstärken optimiert.



**Abb. 18:** Pulssequenz (Farrow *et al.*, 1994) zur gleichzeitigen Bestimmung von longitudinalen Spin-Gitter-Relaxationsraten ( $R_1$ ) und chemischen Austauschraten ( $k_{\text{f}}$ ,  $k_{\text{u}}$ ). Schmale und breite ausgefüllte Balken repräsentieren  $90^\circ$ - bzw.  $180^\circ$ -Pulse. Ausgefüllte Halbellipsen stellen folgende selektive Pulse dar:  $90^\circ$ -G4-Puls selektiv auf  $\text{H}_2\text{O}$  und Harnstoff (5 ms, schmal, schwarz),  $180^\circ$ -G3-Puls selektiv auf  $\text{H}_2\text{O}$  und Harnstoff (2 ms, breit, schwarz),  $90^\circ$ -Sinc1-Puls selektiv auf  $\text{H}_2\text{O}$  (2 ms, schmal, hellgrau),  $90^\circ$ -Sinc1-Puls selektiv auf Harnstoff (2 ms, schmal, dunkelgrau). Offene Halbellipsen stehen für sinusförmige z-Gradienten (Pulslänge 0.5 ms, Abklingzeit 0.2 ms). Die relativen Gradientenstärken (%) für G1-G7 waren 25, 4, 60, -20, -10, 8, 50. Die Werte für die einzelnen Zeitintervalle sind  $\Delta = 2.75$  ms, wobei  $\Delta'$  je  $t_1$ -Inkrement um  $t_1$  reduziert wird,  $\Delta_1 = 2.25$  ms,  $\Delta_2 = 2.7 \text{ ms} - (p16 \cdot 2.5 \cdot d29 - 2 \cdot d12) \approx 2$  ms, dabei entspricht p16 der Länge des Gradientenpulses, d12 (3  $\mu\text{s}$ ) bzw. d29 (100  $\mu\text{s}$ ) dem Zeitintervall zwischen aufeinander folgenden Pulsen bzw. zwischen den WATERGATE-Pulsen (hellgraue Balken) zur Wasserunterdrückung.  $\tau = 2.5$  ms und  $\tau' = 2.5 \text{ ms} - p6 \cdot d13 \approx 0.5$  ms woraus sich  $\tau_m = n \cdot (\tau + \tau' + p6) + 2 \cdot (p16 + d16)$  als Mischzeit ergibt. Dabei ist p6 der selektive  $180^\circ$ -G3-Puls (2 ms, breit, schwarz). Der Phasenzyklus ist  $\phi_1 = x$ ,  $\phi_2 = 4(x)4(y)4(-x)4(-y)$ ,  $\phi_3 = 2(x)2(-x)$ ,  $\phi_4 = 2(-x)2(x)$ ,  $\phi_5 = 2(x)2(-x)$  und  $\phi_6 = -x, x$ . Alle Pulse erfolgen aus x-Richtung sofern keine weitere Angabe vorhanden ist. Quadraturdetektion wurde durch Verschieben von  $\phi_1$  gemäß States-TPPI erreicht.

Der Austausch während  $\tau_m$  erfolgt bei vorliegender  $S_z$ -Polarisierung. Durch Variation des Austauschintervalls über den Parameter  $n$  ergeben sich charakteristische Intensitätsverläufe für die Autosignale des nativen bzw. entfalteten Zustands ( $I_{\text{NN}}(t)$ ,  $I_{\text{UU}}(t)$ ) sowie für die beiden

Austauschsignale ( $I_{\text{NU}}(t)$ ,  $I_{\text{UN}}(t)$ ). Es wurden mindestens sechs verschiedene  $\tau_{\text{m}}$ -Werte zwischen 6.4 ms und 201.4 ms zur Bestimmung der Raten in 20 mM Na-cacodylat/HCl pH 7.0 in Gegenwart von 2.77 M, 3.02 M, 3.25 M, 3.50 M, 3.90 M, 4.22 M und 4.65 M Harnstoff bei 25 °C an einem Bruker Avance750 in Utrecht (SON NMRLSF, Niederlande) gemessen. Die simultane Anpassung der vier Intensitätsverläufe (Autosignal des nativen bzw. entfalteten Zustands und die beiden Austauschsignale) mit Gl. 50 liefert  $R_{\text{IN}}$ ,  $R_{\text{IU}}$ ,  $k_{\text{f}}$  und  $k_{\text{u}}$  (Farrow, *et al.*, 1994, Palmer, *et al.*, 2001). Zur Bestimmung der maximalen Intensität in Abwesenheit von chemischem Austausch wurde ein Spektrum mit einer modifizierten Pulssequenz aufgezeichnet. Dabei wurden die Pulse und Wartezeiten, die in Abb. 18 in Klammern dargestellt sind, nicht ausgeführt.

$$I_{\text{NN}}(t) = I_{\text{N}}(0) \cdot \frac{(\lambda_1 - a_{11}) \cdot e^{-\lambda_2 t} - (\lambda_2 - a_{11}) \cdot e^{-\lambda_1 t}}{\lambda_1 - \lambda_2} \quad I_{\text{NU}}(t) = I_{\text{N}}(0) \cdot \frac{a_{21} \cdot e^{-\lambda_1 t} - a_{21} \cdot e^{-\lambda_2 t}}{\lambda_1 - \lambda_2}$$

$$I_{\text{UU}}(t) = I_{\text{U}}(0) \cdot \frac{(\lambda_1 - a_{22}) \cdot e^{-\lambda_2 t} - (\lambda_2 - a_{22}) \cdot e^{-\lambda_1 t}}{\lambda_1 - \lambda_2} \quad I_{\text{UN}}(t) = I_{\text{U}}(0) \cdot \frac{a_{12} \cdot e^{-\lambda_1 t} - a_{12} \cdot e^{-\lambda_2 t}}{\lambda_1 - \lambda_2}$$

$$\lambda_1 = \frac{1}{2} \cdot \left( a_{11} + a_{22} + \sqrt{(a_{11} - a_{22})^2 + 4 \cdot k_{\text{NU}} \cdot k_{\text{UN}}} \right)$$

$$\lambda_2 = \frac{1}{2} \cdot \left( a_{11} + a_{22} - \sqrt{(a_{11} - a_{22})^2 + 4 \cdot k_{\text{NU}} \cdot k_{\text{UN}}} \right)$$

$$a_{11} = R_{\text{N}} + k_{\text{NU}} \quad a_{12} = -k_{\text{UN}} \quad a_{21} = -k_{\text{NU}} \quad a_{22} = R_{\text{U}} + k_{\text{UN}} \quad \text{Gl. 50}$$

In der Pulssequenz aus Abb. 18 wird sehr viel Wert auf eine unterschiedliche Führung der Protein- bzw. Lösungsmittelmagnetisierung (Wasser, Harnstoff) gelegt. Dadurch ist eine effiziente Unterdrückung der Lösungsmittelsignale bei einer minimalen Sättigung derselben möglich. Letzteres ist essentiell für die Bestimmung der Relaxations- und Faltungsraten, da Sättigungstransfer von Wasser oder Harnstoff auf die Amidprotonen des Proteins eine fehlerhafte Bestimmung der Intensitäten zur Folge hat. Aufgrund unterschiedlicher Relaxations- und Austauschcharakteristika des nativen und entfalteten Zustands ergibt sich durch den Sättigungstransfer eine zusätzliche Unsicherheit. Eine Beschreibung der Pulssequenz aus Abb. 18 mit dem Produktoperatorformalismus ist in Gl. 51 für die Kerne des nativen Proteins und in Gl. 52 für die Kerne des Lösungsmittels (Wasser und Harnstoff) gegeben. Die gepulsten Feldgradienten werden zur Unterdrückung von Artefakten und zur Minimierung der Lösungsmittelsignale eingesetzt. Der Gradient nach dem ersten  $^{15}\text{N}$  90°-Puls zu Beginn der Pulssequenz stellt sicher, dass  $^{15}\text{N}$ -Magnetisierung nur über das direkt gebundene Proton generiert wird. Der im Anschluss folgende INEPT-Transferschritt erzeugt am Punkt *a* longitudinale Zweispinordnung  $2I_{\text{Z}}S_{\text{Z}}$ , während die Magnetisierung der

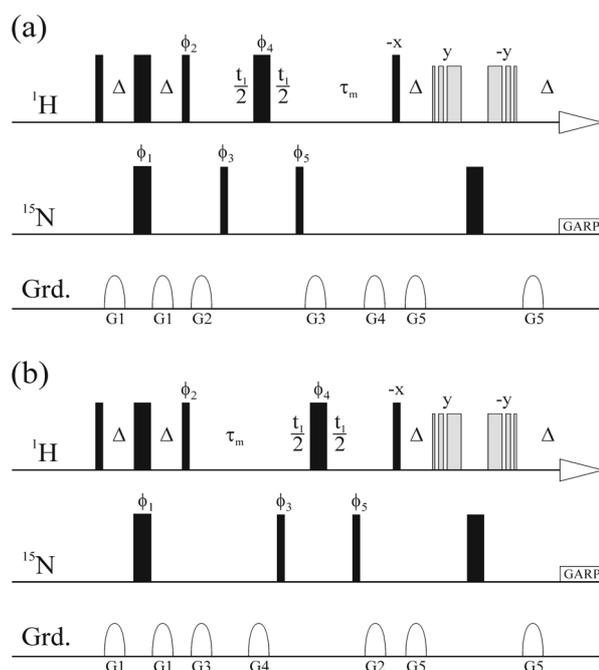
Lösungsmittelprotonen transversal vorliegt ( $-I_Y$ ). Der selektive  $^1\text{H}$   $90^\circ$ -Puls dreht die Magnetisierung des Lösungsmittels nach  $-z$  und der folgende Gradient dephasiert verbleibende transversale Magnetisierung. Mit dem  $^{15}\text{N}$   $90^\circ$ -Puls wird Antiphasenmagnetisierung  $2I_Z S_Y$  erzeugt und es entwickelt sich die  $^{15}\text{N}$  chemische Verschiebung, wodurch die Kerne des nativen bzw. entfalteten Proteins frequenzmarkiert werden. Zusätzlich erfolgt die Refokussierung von  $2I_Z S_Y$  ( $\Delta + \Delta' = 1/(2 \cdot J_{\text{HN}})$ ), so dass an Zeitpunkt  $b$  ein Inphasesignal vorliegt. Anschließend wird durch den  $^{15}\text{N}$   $90^\circ$ -Puls  $S_Z$ -Magnetisierung etabliert. In der Mischzeit  $\tau_m$  erfolgt sowohl longitudinale Relaxation als auch der konformationelle Austausch zwischen dem nativen und dem entfalteten Protein. Während der Mischzeit wird die Sättigung der Lösungsmittelsignale durch die selektiven  $^1\text{H}$  G3  $180^\circ$ -Pulse minimal und in  $z$ -Richtung gehalten. Nach der Mischzeit erfolgt ein refokussierter INEPT-Schritt, der die Magnetisierung wieder auf die Protonen transferiert und der  $FID$  unter  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -Entkopplung aufgezeichnet. Die beiden selektiven  $^1\text{H}$   $90^\circ$ -Pulse bringen die transversale Magnetisierung der Protonen des Lösungsmittels in  $z$ -Richtung, die auch nach der abschließenden 3-9-19-WATERGATE-Sequenz (Piotto, *et al.*, 1992) erhalten bleibt.

$$\begin{aligned}
 I_Z^{\text{N}} &\xrightarrow{90_x} -I_Y^{\text{N}} \xrightarrow{2\pi J_{\text{HN}} \Delta I_Z S_Z, 180_x (1, S)} 2I_X^{\text{N}} S_Z^{\text{N}} \xrightarrow{90_y} -2I_Z^{\text{N}} S_Z^{\text{N}} & a \\
 &\xrightarrow{90_x} 2I_Z^{\text{N}} S_Y^{\text{N}} \xrightarrow{\Omega_S^{\text{N}} t_1 S_Z, 180_x} -2I_Z^{\text{N}} S_Y^{\text{N}} \cos(\Omega_S^{\text{N}} t_1) \xrightarrow{2\pi J_{\text{HN}} \Delta I_Z S_Z, 180_x (S)} -S_X^{\text{N}} \cos(\Omega_S^{\text{N}} t_1) & b \\
 &\xrightarrow{90_y} S_Z^{\text{N}} \cos(\Omega_S^{\text{N}} t_1) \xrightarrow{\tau_m} S_Z^{\text{U}} \cos(\Omega_S^{\text{N}} t_1) \xrightarrow{90_x} -S_Y^{\text{U}} \cos(\Omega_S^{\text{N}} t_1) \xrightarrow{2\pi J_{\text{HN}} \Delta I_Z S_Z, 180_x} 2I_Z^{\text{U}} S_X^{\text{U}} \cos(\Omega_S^{\text{N}} t_1) \\
 &\xrightarrow{90_y} -2I_Z^{\text{U}} S_Z^{\text{U}} \cos(\Omega_S^{\text{N}} t_1) \xrightarrow{90_x} 2I_Y^{\text{U}} S_Z^{\text{U}} \cos(\Omega_S^{\text{N}} t_1) \xrightarrow{2\pi J_{\text{HN}} \Delta I_Z S_Z, (3-19-19)_y} I_X^{\text{U}} \cos(\Omega_S^{\text{N}} t_1) & \text{Gl. 51}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 I_Z &\xrightarrow{90_x} -I_Y \xrightarrow{2\pi J_{\text{HN}} \Delta I_Z S_Z, 180_x} I_Y \xrightarrow{90_y} I_Y \xrightarrow{90_x (G4)} -I_Z & a \\
 &\xrightarrow{90_x} -I_Z \xrightarrow{\Omega_S t_1 S_Z, 180_x} I_Z & b \\
 &\xrightarrow{90_y} I_Z \xrightarrow{\tau_m - 180_x (G3) - 180_x} I_Z \xrightarrow{90_x} I_Z \xrightarrow{2\pi J_{\text{HN}} \Delta I_Z S_Z, 180_x} -I_Z \\
 &\xrightarrow{90_y} -I_Z \xrightarrow{90_x (\text{sinc1})} I_Y \xrightarrow{90_x} I_Z \xrightarrow{2\pi J_{\text{HN}} \Delta I_Z S_Z, (3-9-19)_y} I_Z & \text{Gl. 52}
 \end{aligned}$$

Die Identifikation von Auto- bzw. Austauschsignalen konnte über eine einfache Subtraktionsmethode nach Wider *et al.* erreicht werden (Wider, *et al.*, 1991). Hierzu wurden die Pulssequenzen aus Abb. 19 verwendet, die aus dem zuvor gezeigten 2D  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  FHSQC-Experiment aus Abb. 7a (Mori, *et al.*, 1995) entwickelt wurden. Daher liegt während des Austauschintervalls longitudinale Zweispinordnung ( $2I_Z S_Z$ ) vor. Die Gesamtelaxationszeit der beiden Experimente in Abb. 19 ist identisch, was zu einer Minimierung von Subtraktionsartefakten führt. Erreicht wird diese durch das Verschieben des Austausch-

/Relaxationsintervalls  $\tau_m$  vor die Inkrementierung der indirekten Dimension (Abb. 19b). Dadurch werden nur die Autosignale des nativen und entfalteten Zustands generiert, da nach der Entwicklung der  $^{15}\text{N}$  chemischen Verschiebung kein signifikanter Austausch mehr möglich ist. Die Subtraktion des Austauschexperiments (Abb. 19a) vom  $R_1$ -Relaxationsexperiment (Abb. 19b) ergibt eine nahezu vollständige Auslöschung der Autosignale und negative Intensitäten für die Austauschsignale.



**Abb. 19:** Pulssequenzen zur (a) simultanen Bestimmung von  $R_1$  und chemischen Austauschraten sowie (b) zur Bestimmung von  $R_1$ . Schmale und breite schwarz ausgefüllte Balken repräsentieren  $90^\circ$ - bzw.  $180^\circ$ -Pulse. Halbellipsen stehen für sinusförmige 1 ms lange z-Gradienten. Die Gradientenstärken (%) für G1-G5 betragen 13, 0,6, 12, 15, 50 und die Abklingzeit 0,2 ms.  $\Delta$  lag bei 2,7 ms. Der Phasenzzyklus lautete für  $\phi_1=x$ ,  $\phi_2=y$ ,  $\phi_3=x,-x$ ,  $\phi_4=2(x)2(-x)$ ,  $\phi_5=4(x)4(-x)$ ,  $rec=(x,-x,x,-x,-x,x,-x,x)$ .  $rec$  ist die Phase des Detektors und die Kohärenzselektion erfolgte über den Phasenzzyklus. Quadraturdetektion erfolgte durch Inkrementierung von  $\phi_1$  und  $\phi_3$  im States-TPPI Modus. Die Wasserunterdrückung erfolgte mit der 3-9-19 (y) WATERGATE-Sequenz (Piotto *et al.*, 1992), deren Pulse mit grauen Balken markiert sind.

Mit der Pulssequenz aus Abb. 19b werden die apparenten  $R_1$ -Raten des nativen und entfalteten Zustands unter identischen Bedingungen, d.h. in Anwesenheit von chemischem Austausch, wie bei der Bestimmung der Austauschraten (Abb. 19a) gemessen. Daher können  $R_{1N}$  bzw.  $R_{1U}$  bei der Berechnung von  $k_f$  und  $k_u$  mit Gl. 50 konstant gehalten werden. Dies verringert die Anzahl der anzupassenden Parameter und verbessert somit die Qualität und Signifikanz der Resultate für die Austauschraten. Der Nachteil dieser Methode im Vergleich zur vorigen ist jedoch der verdoppelte Messzeitaufwand. Außerdem wird der unterschiedliche Austausch der Amidprotonen im entfalteten bzw. nativen Zustand mit dem Lösungsmittel

nicht berücksichtigt, wodurch die relativen Intensitäten der beiden Zustände fehlerhaft bestimmt werden. Desweiteren relaxiert die hier vorliegende  $2I_Z S_Z$ -Kohärenz deutlich schneller als die in Abb. 18 verwendete  $S_Z$ -Kohärenz. Wie sich die unterschiedlichen Relaxationseigenschaften auf die Empfindlichkeit des jeweiligen Experiments bzgl. der bestimmbaren Austauschraten auswirken, wurde ebenfalls in meiner Diplomarbeit diskutiert (Zeeb, 2000). Die Faltungsraten von CspB sind bei den zu untersuchenden Bedingungen so hoch, dass die Eigenrelaxation von  $S_Z$ - bzw.  $2I_Z S_Z$ -Kohärenz nicht ins Gewicht fallen und daher beide Experimente (Abb. 18) eine vergleichbare Empfindlichkeit besitzen. Die Experimente aus Abb. 19 wurden mit Hilfe des Produktoperatorformalismus in Gl. 53 (Austauschexperiment) und Gl. 54 (Referenzexperiment) beschrieben. In beiden Experimenten wird durch einen INEPT-Schritt longitudinale Zweispinordnung  $2I_Z S_Z$  des Proteins und transversale  $^1\text{H}$ -Magnetisierung des Lösungsmittels erzeugt. Im Austauschexperiment (Abb. 19a) folgt nun ein  $^{15}\text{N}$   $90^\circ$ -Puls der Antiphasenmagnetisierung  $2I_Z S_Y$  generiert. Danach entwickelt sich die  $^{15}\text{N}$  chemische Verschiebung, wodurch die Kerne des nativen bzw. entfalteteten Proteins frequenzmarkiert werden. Der nachfolgende  $^{15}\text{N}$   $90^\circ$ -Puls ergibt wiederum longitudinale Zweispinordnung, die während der Mischzeit relaxiert. Zusätzlich erfolgt chemischer Austausch zwischen nativem und entfaltetem Protein. Die Magnetisierung der Lösungsmittelprotonen wird nach dem INEPT-Transfer mit dem Gradienten G2 (Abb. 19a) bzw. G3 (Abb. 19b) dephasiert. Die nachfolgenden Gradienten (G3 und G4 bzw. G4 und G2) dienen zur Dephasierung zurückrelaxierter transversaler Magnetisierung der Lösungsmittelprotonen. Durch den  $^1\text{H}$   $90^\circ$ -Puls nach der Mischzeit wird Antiphasenmagnetisierung des Proteins und transversale Magnetisierung der Lösungsmittelprotonen erzeugt. In der Wartezeit  $1/(2 \cdot ^1J_{\text{HN}})$  wirkt die skalare Kopplung zwischen  $^1\text{H}$  und  $^{15}\text{N}$ , so dass detektierbare transversale  $^1\text{H}$ -Magnetisierung entsteht. Währenddessen werden Signale des Lösungsmittels effektiv mit der 3-9-19-WATERGATE-Sequenz (Piotto, *et al.*, 1992) unterdrückt.

$$\begin{aligned}
 & I_Z^N \xrightarrow{90_x} -I_Y^N \xrightarrow{2\pi J_{\text{HN}} \Delta I_Z S_Z, 180_x (\text{IS})} -2I_X^N S_Z^N \xrightarrow{90_y} 2I_Z^N S_Z^N \\
 & \xrightarrow{90_x} -2I_Z^N S_Y^N \xrightarrow{\Omega_S^N t_1 S_Z, 180_x} -2I_Z^N S_Y^N \cos(\Omega_S^N t_1) \xrightarrow{90_x} 2I_Z^N S_Z^N \cos(\Omega_S^N t_1) \\
 & \xrightarrow{\tau_m} 2I_Z^U S_Z^U \cos(\Omega_S^N t_1) \xrightarrow{90_x} -2I_Y^U S_Z^U \cos(\Omega_S^N t_1) \xrightarrow{2\pi J_{\text{HN}} \Delta I_Z S_Z, (3-9-19)_y} -I_X^U \cos(\Omega_S^N t_1)
 \end{aligned} \tag{Gl. 53}$$

$$\begin{aligned}
 & 2I_Z^N S_Z^N \xrightarrow{\tau_m} 2I_Z^N S_Z^N \xrightarrow{90_x} -2I_Z^N S_Y^N \xrightarrow{\Omega_S^N t_1 S_Z, 180_x} -2I_Z^N S_Y^N \cos(\Omega_S^N t_1) \\
 & \xrightarrow{90_x} -2I_Z^N S_Z^N \cos(\Omega_S^N t_1) \xrightarrow{90_x} -2I_Y^N S_Z^N \cos(\Omega_S^N t_1) \xrightarrow{2\pi J_{\text{HN}} \Delta I_Z S_Z, (3-9-19)_y} -I_X^N \cos(\Omega_S^N t_1)
 \end{aligned} \tag{Gl. 54}$$

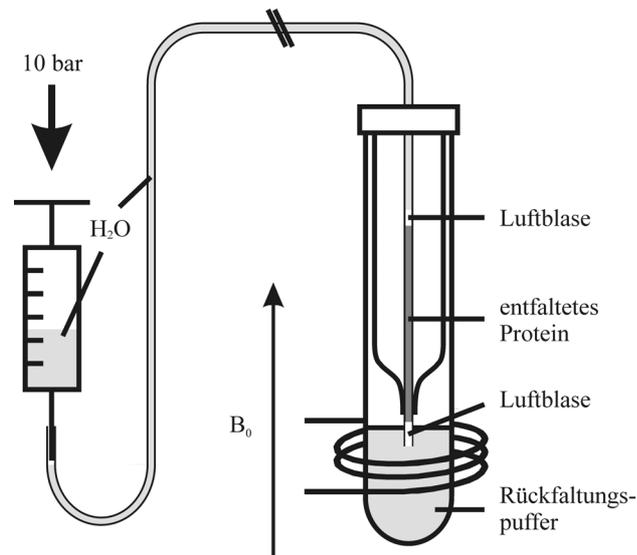
Im Referenzexperiment (Abb. 19b) schließt sich direkt nach dem INEPT-Transfer die Mischzeit an, so dass die longitudinale Relaxation und der chemische Austausch zwischen den beiden Konformationen vor der Frequenzmarkierung der unterschiedlichen Zustände erfolgt. Der  $^{15}\text{N}$   $90^\circ$ -Puls erzeugt Antiphasenmagnetisierung und es entwickelt sich die  $^{15}\text{N}$  chemische Verschiebung. Die Bildung detektierbarer transversaler  $^1\text{H}$ -Magnetisierung und die Unterdrückung der Lösungsmittelresonanzen wird wie im Austauschexperiment bewerkstelligt (siehe (Abb. 19a)).

### 2.5.7 Eindimensionale Echtzeit NMR-Spektroskopie

Unter Echtzeit NMR-Spektroskopie versteht man Experimente, die während einer Reaktion aufgezeichnet werden und somit Rückschlüsse auf die strukturellen und dynamischen Änderungen innerhalb des Systems zulassen. Diese zeitaufgelöste Methode kann z.B. bei der Rückfaltung von Proteinen eingesetzt werden und ermöglicht so die Beobachtung der Bildung der nativen Tertiärstruktur bei einer hohen Auflösung. Die Rückfaltung wird zur Verbesserung der Totzeit der Experimente mit einer speziellen Mischapparatur (Abb. 20) innerhalb des NMR-Spektrometers initiiert. Dazu werden 450  $\mu\text{l}$  Rückfaltungspuffer im NMR-Röhrchen vorgelegt und 50  $\mu\text{l}$  einer Lösung injiziert, die entfaltetes Protein enthält. Üblicherweise werden hohe Konzentrationen an Harnstoff oder GdmCl als Denaturierungsmittel eingesetzt. Jedoch kann die Entfaltung auch mittels Änderung des pH-Werts oder der Ligandenkonzentration (z.B.  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen) erfolgen. Um die vorzeitige Mischung des entfaltetes Proteins mit dem Rückfaltungspuffer bzw. mit der flüssigkeitsgefüllten Schlauchverbindung zu verhindern, werden die verschiedenen Lösungen jeweils mit einer Luftblase voneinander getrennt. Mit der hier gezeigten Mischapparatur ist eine Totzeit bis ca. 800 ms erreichbar, wenn die Injektion mit Druckluft (8 bar bis 10 bar) erfolgt. Bei manueller Bedienung erhöht sich die Totzeit auf 2 s bis 5 s. Mit neueren Entwicklungen sind Totzeiten im Bereich von 10 ms bis 50 ms zugänglich (Mok, *et al.*, 2003).

Eindimensionale Echtzeit NMR-Experimente wurden während der Rückfaltung von p19<sup>INK4d</sup> aufgezeichnet. Dazu wurde das Protein in 80  $\mu\text{l}$  50 mM Na-phosphat, 6 M Harnstoff pH 7.4 (10%  $^2\text{H}_2\text{O}$ ) entfaltet und die Rückfaltung durch die schnelle Mischung mit 420  $\mu\text{l}$  Rückfaltungspuffer (50 mM Na-phosphat, 1.2 M Harnstoff pH 7.4 (10%  $^2\text{H}_2\text{O}$ )) initiiert. Die Endkonzentrationen betragen 1 mM p19<sup>INK4d</sup> und 2 M Harnstoff. Direkt nach der Mischung wurden 100 1D  $^1\text{H}$  NMR-Spektren mit je vier *scans* aufgezeichnet und in einem pseudo 2D *ser-File* abgespeichert. Die Unterdrückung des Wassersignals wurde mit der WATERGATE-

Sequenz (Piotto, *et al.*, 1992) erreicht. Das Signal des Harnstoffs wurde mit einem *off*-resonanten Vorsättigungspuls unterdrückt. Um die Abstimmung des Probenkopfs und die Homogenität des Magnetfelds zu optimieren, wurde unter identischen Bedingungen ein Vorexperiment mit  $\alpha$ -Lactalbumin durchgeführt. Hierzu ist die Verwendung baugleicher Probenröhrchen essentiell.



**Abb. 20:** Schematische Darstellung der Mischapparatur, die in Echtzeit NMR-Experimenten eingesetzt wurde. Das NMR-Röhrchen mit dem Rückfaltungspuffer befindet sich im Probenkopf des NMR-Spektrometers und ist mit Hilfe einer Luftblase von der Proteinlösung getrennt. Die Flüssigkeit im Teflon-Schlauch ist ebenfalls mit einer Luftblase von der Proteinlösung getrennt, so dass eine vorzeitige Mischung verhindert wird. Der Stempel der Spritze, die sich außerhalb des Magneten befindet, kann mit Druckluft (10 bar) betätigt werden, was zu einer schnellen Injektion der Proteinlösung in das Probenröhrchen führt.

Zur Bestimmung der Faltungsraten wurden Resonanzen des nativen Zustands integriert, die keine Überlagerung mit Signalen des entfaltenen Zustands aufweisen. Die Anpassung mit einer einfachen Exponentialfunktion an den Intensitätsaufbau des nativen Zustands liefert die Rückfaltungsrates. Um den Anteil des Spektrums des entfaltenen  $p19^{\text{INK4d}}$  am Gesamtspektrum zu erhalten, muss der Anteil des Spektrums des nativen Proteins vom Gesamtspektrum subtrahiert werden. Dazu wird nach der vollständigen Rückfaltung des Proteins unter identischen Bedingungen ein 1D  $^1\text{H}$  NMR-Experiment mit einem sehr guten Signal/Rausch-Verhältnis aufgezeichnet. Dieses wird dann mit der zuvor bestimmten Kinetik skaliert und danach von jedem Gesamtspektrum subtrahiert. Die daraus resultierenden Differenzspektren enthalten nur noch den Anteil des Spektrums des entfaltenen  $p19^{\text{INK4d}}$ . Durch Mittelung einiger Spektren zu Beginn der Rückfaltung wird das 1D  $^1\text{H}$  NMR-Spektrum des entfaltenen Proteins erhalten. Die Bestimmung der Abbaurates dieses Spektrums erfolgt dann äquivalent zu

der Aufbaurrate des nativen Zustands mittels Integration gut aufgelöster Resonanzen und nachfolgender Anpassung einer monoexponentiellen Funktion an die NMR-Intensität.

### 2.5.8 Mehrdimensionale Echtzeit NMR-Spektroskopie

Zwei- und dreidimensionale Echtzeit NMR-Spektroskopie kann nur zur Beobachtung sehr langsamer Reaktionen eingesetzt werden. Das Modelprotein S54G/P55N RNase T1 (P55-RNase T1) benötigt mehrere Stunden zur Bildung der nativen Tertiärstruktur und stellt somit ein geeignetes System zur Entwicklung mehrdimensionaler Echtzeit NMR-Methoden dar. Auch hier wurde zur Initiation der Rückfaltung die Mischapparatur aus Abb. 20 verwendet. Die allgemeine Vorgehensweise ist wie in 2.5.7 beschrieben. Bei mehrdimensionalen Experimenten ist es sehr wichtig, dass der Mischprozess, der eine enorme Feldinhomogenität mit sich bringt, vor der Aufnahme des ersten  $t_1$ -Inkrementes beendet wird. Während der Rückfaltung von P55-RNase T1 wurde bei 15 °C ein 2D  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  HSQC-Spektrum (Pulssequenz des FHSQC siehe Abb. 7a) aufgezeichnet. Dazu wurden 50  $\mu\text{l}$  7 mM P55-RNase T1 in 10 mM Na-oxalat, 6 M GdmCl pH 5.0 in  $\text{H}_2\text{O}$  im Probenröhrchen 10fach mit Rückfaltungspuffer (10 mM Na-oxalat pH 5.0, 10%  $^2\text{H}_2\text{O}$ ) verdünnt. Es wurden 384 komplexe Datenpunkte in der indirekten Dimension aufgezeichnet und die Experimentdauer lag bei 12 h 38 min. Nach der vollständigen Rückfaltung wurde unter identischen Bedingungen noch ein Referenzexperiment aufgenommen.

Gl. 55 beschreibt ein NMR-Signal in der Zeitdomäne, das einer harmonischen Schwingung bei der Resonanzfrequenz  $\nu'$  entspricht und mit der transversalen Relaxationsrate  $R_2^*$  monoexponentiell abklingt.

$$F(t) = A \cdot \exp\{2\pi i \nu' t\} \cdot \exp\{-R_2^* t\} \quad \text{Gl. 55}$$

Die Reaktionskinetik, die eine Populationsänderung während der Acquisition des *FID* der indirekten Dimension bewirkt, ergibt charakteristische Linienformen in der indirekten Dimension des 2D NMR-Spektrums (Balbach, *et al.*, 1996, Balbach, *et al.*, 1999). Für ein Zweizustandsmodell können daher drei Fälle unterschieden werden (Gl. 56).

$$\begin{aligned} \text{exponentieller Abfall bzw. Anstieg: } & G^1(t) = \exp(-kt) \text{ bzw. } G^2(t) = 1 - \exp(-kt) \\ \text{unverändertes Signal:} & G^3(t) = 1 \end{aligned} \quad \text{Gl. 56}$$

Die Modulation des *FID* durch die Reaktionskinetik wird durch Multiplikation der beiden Terme  $S^x = G^x(t) \cdot F(t)$  formuliert. Durch Fourier-Transformation des jeweiligen Signals ergeben sich dann die Realteile der Frequenz-abhängigen Signale (Gl. 57).

$$\begin{aligned}
\operatorname{Re}\{\operatorname{FT}[S^1(t)]\} &= A \cdot \left[ \frac{R_2^* + k}{(R_2^* + k)^2 + 4\pi^2(v - v')^2} \right] \\
\operatorname{Re}\{\operatorname{FT}[S^2(t)]\} &= A \cdot \left[ \frac{\frac{1}{R_2^*}}{1 + \left(\frac{1}{R_2^*}\right)^2 \cdot 4\pi^2(v - v')^2} - \frac{R_2^* + k}{(R_2^* + k)^2 + 4\pi^2(v - v')^2} \right] \\
\operatorname{Re}\{\operatorname{FT}[S^3(t)]\} &= A \cdot \left[ \frac{\frac{1}{R_2^*}}{1 + \left(\frac{1}{R_2^*}\right)^2 \cdot 4\pi^2(v - v')^2} \right]
\end{aligned} \tag{Gl. 57}$$

Die Analyse der Linienformen der Resonanzen im kinetischen Spektrum und im Referenzspektrum führt zu der Bestimmung der Rückfaltungsrate. Dazu wird mit dem Felix-Makro *addcol* das 1D Spektrum der gewünschten Resonanz in der indirekten Dimension ( $^{15}\text{N}$ ) aus dem jeweiligen Spektrum extrahiert und über die Breite in der direkten Dimension ( $^1\text{H}$ ) gemittelt. Zuerst wird die Resonanzlinie des Signals des nativen Zustands im Referenzexperiment, d.h. im Gleichgewicht, an  $\operatorname{Re}\{\operatorname{FT}[S^3(t)]\}$  aus Gl. 57 angepasst. Daraus ergeben sich die Amplitude  $A$  sowie  $v'$  und  $R_2^*$ . Danach wird die Resonanzlinie des Signals des nativen Zustands im kinetischen Experiment an  $\operatorname{Re}\{\operatorname{FT}[S^2(t)]\}$  aus Gl. 57 angeglichen, wobei die zuvor bestimmten Parameter  $v'$  und  $R_2^*$  konstant gehalten werden. Die erhaltene apparente Rate  $k$  wird dann noch skaliert, da sich die Zeitskala in der indirekten Dimension ( $t_{\text{dwell}} = 1/2SW_{\text{indirekt}}$  mit  $SW_{\text{indirekt}}$  als spektraler Breite in der inkrementierten Dimension) und die tatsächliche Zeitauflösung zwischen der Aufzeichnung zweier  $t_1$ -Inkrementen ( $t_{1\text{D}}$  ist die exakte Dauer eines  $t_1$ -Inkrementes und wird durch Division der Gesamtdauer des Experiments durch die Gesamtzahl an  $t_1$ -Inkrementen erhalten) unterscheiden. Die tatsächliche Rückfaltungsrate stellt dann  $k_f$  dar.

$$k_f = k \cdot \frac{t_{\text{dwell}}}{t_{1\text{D}}} \tag{Gl. 58}$$

Zur effektiven Unterscheidung von Kreuzsignalen verschiedener Spezies (nativer Zustand oder Intermediat) wurde das kinetische Spektrum vom Referenzspektrum subtrahiert (Gl. 59). Die theoretisch zu erwartenden Linienformen sind in Abb. 96 schematisch dargestellt.

Die Rückfaltung von P55-RNase T1 ist bei 1 °C so stark verlangsamt, dass währenddessen ein vollständiges  $^{15}\text{N}$ -editiertes 3D NOESY-HSQC NMR-Spektrum aufgezeichnet werden konnte. Experimentell wurde wie bei der 1D bzw. 2D Echtzeit NMR-Spektroskopie

vorgegangen und die Rückfaltung durch die schnelle Mischung von 50  $\mu\text{l}$  7 mM P55-RNase T1 in 10 mM Na-oxalat, 6 M GdmCl pH 5.0 in  $\text{H}_2\text{O}$  mit 450  $\mu\text{l}$  Rückfaltungspuffer (10 mM Na-oxalat pH 5.0) initiiert. Nach der Rückfaltung wurde ebenfalls ein Referenzspektrum des nativen Proteins aufgezeichnet. Die Zuordnung der Kreuzsignale zu den beiden vorliegenden Zuständen im kinetischen Experiment wurde über die verschiedenen Linienformen und die zuvor beschriebene Subtraktionsmethode erreicht (siehe 3.6.3).

$$\text{Re}\{\text{FT}[\text{S}^1(t)]\} = -A \cdot \left[ \frac{R_2^* + k}{(R_2^* + k)^2 + 4\pi^2(\nu - \nu')^2} \right]$$

$$\text{Re}\{\text{FT}[\text{S}^2(t)]\} = A \cdot \left[ \frac{R_2^* + k}{(R_2^* + k)^2 + 4\pi^2(\nu - \nu')^2} \right]$$

$$\text{Re}\{\text{FT}[\text{S}^3(t)]\} = 0$$

Gl. 59

### 3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

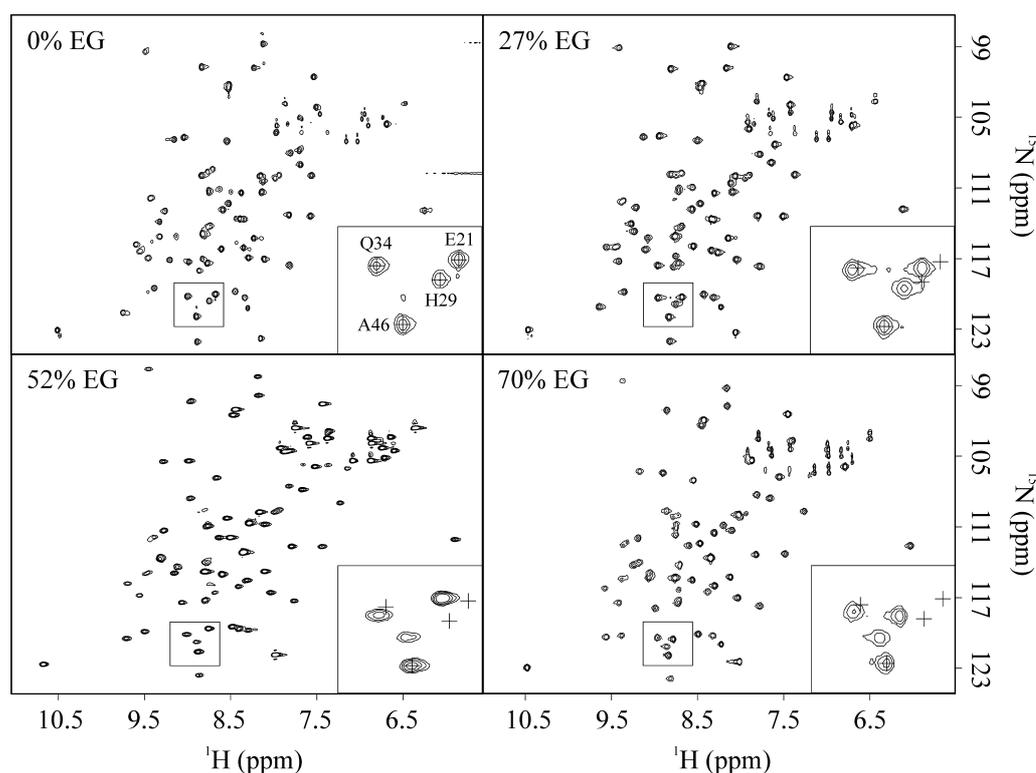
#### 3.1 Relaxation von CspB bei verschiedenen Lösungsmittelviskositäten

Die NMR-Spektroskopie ermöglicht die Charakterisierung von Reaktionen und Bewegungen innerhalb eines außerordentlich großen Zeitfensters (Abb. 2). Dieses reicht von schneller interner Dynamik im Picosekunden- bis Nanosekundenbereich (Palmer, 1997) bis hin zu  $^1\text{H}/^2\text{H}$ -Austausch (Bai, *et al.*, 1994) und langsamen Proteinfaltungsreaktionen im Zeitraum von Minuten bis Stunden (van Nuland, *et al.*, 1998b). In diesem Kapitel wird die schnelle interne Dynamik von CspB näher beleuchtet, die über Relaxationsstudien zugänglich ist. Die Interpretation der Relaxationsparameter erfolgte mit dem Modelfree-Formalismus nach Lipari & Szabo (Lipari & Szabo, 1982a, Lipari & Szabo, 1982b). Dazu wurden longitudinale Spin-Gitter- und transversale Spin-Spin-Relaxationsraten ( $R_1$  und  $R_2$ ) sowie der heteronukleare NOE Effekt ( $hNOE$ ) für jeden  $^{15}\text{N}$ -Kern des Rückgrats bestimmt. Die komplexe Lipari-Szabo-Analyse wird umso verlässlicher je mehr Daten für den jeweiligen Heterokern vorhanden sind. Üblicherweise werden hierzu die Relaxationsparameter bei verschiedenen Feldstärken oder bei unterschiedlichen Temperaturen gemessen und dann gemeinsam analysiert. Eine weitere makroskopische Größe, die variiert werden kann, ist die Viskosität, die allerdings bisher noch nicht zur Gewinnung zusätzlicher Relaxationsparameter eingesetzt wurde. Daher wird im Folgenden die Abhängigkeit der Relaxations- und Bewegungsparameter von der Viskosität beschrieben (Zeeb, *et al.*, 2003). Eine zusätzliche Fragestellung ergibt sich aus der Faltungsreaktion von CspB, die im Millisekundenbereich verläuft. So konnte gezeigt werden, dass bei erhöhter Viskosität, die durch Zugabe von Ethylenglykol oder Saccharose erreicht wird, sowohl die Rückfaltung als auch die Entfaltung deutlich verlangsamt wird (Jacob, *et al.*, 1997, Jacob, *et al.*, 1999a).

##### 3.1.1 Der Einfluss von Ethylenglykol auf die Relaxationsparameter von CspB

Eine wichtige Voraussetzung für die Analyse der Viskositätsabhängigkeit der Relaxationsparameter ist, dass Ethylenglykol (EG) nicht an spezifischen Stellen des Proteins bindet und die Struktur von CspB nicht verändert wird. Um dies zu überprüfen wurden 2D  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  HSQC-Spektren bei verschiedenen EG-Konzentrationen aufgezeichnet (Abb. 21). Die Dispersion der Spektren ist bei allen Viskositäten unverändert. Trotz der zunehmenden Linienbreite durch die verlangsamte Rotationsdiffusion des Proteins bei steigender Viskosität konnten alle Kreuzsignale direkt auf der Basis der publizierten Zuordnung (Schnuchel, 1995) identifiziert werden. Die meisten Kreuzsignale zeigen eine moderate graduelle Änderung der

chemischen Verschiebung ( $\Delta\delta$ ) mit steigender EG-Konzentration (Teilabbildungen in Abb. 21). Zwischen 0% und 70% EG sind diese Änderungen kleiner als 0.09 ppm ( $\Delta\delta(^1\text{H})$ ) bzw. 0.6 ppm ( $\Delta\delta(^{15}\text{N})$ ). Daraus lässt sich schließen, dass die Tertiärstruktur von CspB durch die Zugabe von EG nur geringfügige Änderungen erfährt. Ferner gibt es keine Korrelation zwischen den Änderungen der chemischen Verschiebung der Kreuzsignale zu den Sekundärstrukturelementen, der Lösungsmittelzugänglichkeit oder spezieller Aminosäuretypen. Demzufolge kann eine spezifische Bindung von EG an CspB ebenfalls ausgeschlossen werden.

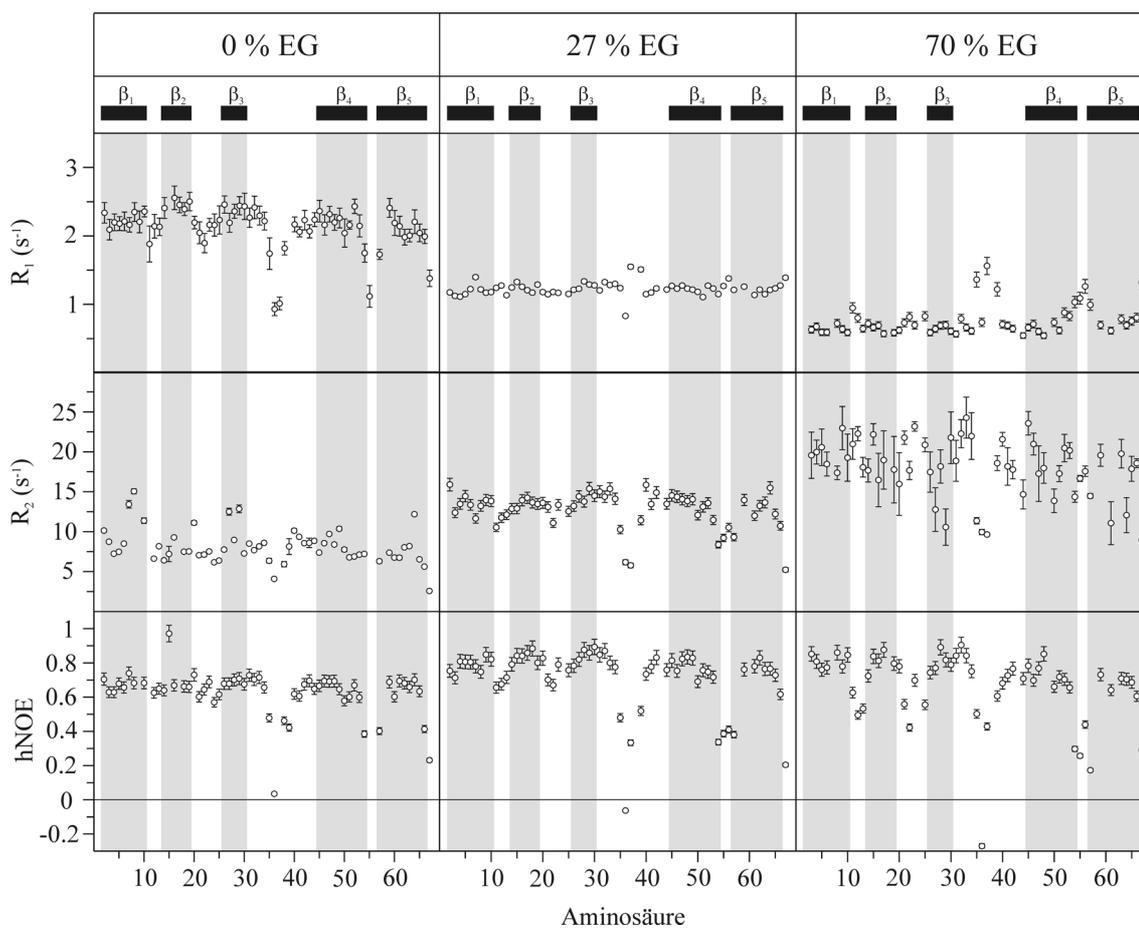


**Abb. 21:** 2D  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  HSQC-Spektren von CspB in Gegenwart von 0%, 27%, 52% und 70% Ethylenglykol bei 25 °C. Als Puffer wurde 100 mM Na-cacodylat/HCl pH 7.0 mit 7%  $^2\text{H}_2\text{O}$  verwendet und die Proteinkonzentration betrug jeweils 1.5 mM. Die Kreuzsignale von E21, H29, Q34 und A46 sind innerhalb des Kastens vergrößert dargestellt, wobei (+) die jeweilige chemische Verschiebung bei 0% EG repräsentiert.

Nachdem die Tertiärstruktur von CspB selbst in 70% Ethylenglykol keine signifikanten Änderungen aufweist, wurden Relaxationsdaten für 62, 61 und 56 der 65 möglichen Rückgratamide bei 0%, 27% und 70% EG bestimmt. Die  $R_1$ - und  $R_2$ -Raten sowie der  $h\text{NOE}$  bei der jeweiligen EG-Konzentration sind in Abb. 22 dargestellt und im Anhang in Tab. A 3-Tab. A 5 aufgeführt. Die Bestimmung dieser Relaxationsparameter ist in 2.5.3 ausführlich beschrieben. Prinzipiell werden  $R_1$  und  $R_2$  mit Hilfe von 2D  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -Korrelationsspektren bestimmt in deren Pulssequenz ein veränderliches Relaxationsintervall enthalten ist (Abb. 14 bzw. Abb. 15). Dieses Intervall bewirkt einen Signalabfall der selektierten Kohärenz, dessen

Rate mit einer einfachen Exponentialfunktion berechnet werden kann ( $I(t) = A \cdot \exp(-R_{1,2} \cdot t)$ ). Für die Bestimmung des  $hNOE$  wurde je ein 2D Spektrum mit bzw. ohne 3 s Vorsättigung von  $^1H$  aufgezeichnet und die Intensitäten der Kreuzsignale ermittelt ( $I_{sat}$  bzw.  $I_{ref}$ ). Der Quotient der Intensitäten ergibt dann den  $hNOE$  ( $hNOE = I_{sat}/I_{ref}$ ).

Die gemittelten Relaxationsparameter  $\langle R_1 \rangle$ ,  $\langle R_2 \rangle$  und  $\langle hNOE \rangle$  betragen für 0% EG bei 500 MHz  $2.11 \text{ s}^{-1}$ ,  $8.19 \text{ s}^{-1}$  und 0.63, für 27% bei 600 MHz  $1.23 \text{ s}^{-1}$ ,  $12.77 \text{ s}^{-1}$  und 0.72 sowie für 70% EG bei 600 MHz  $0.76 \text{ s}^{-1}$ ,  $17.96 \text{ s}^{-1}$  und 0.67. Mit zunehmender Viskosität verringert sich  $R_1$  während  $R_2$  zunimmt, was auf eine verlangsamte Brown'sche Molekularbewegung bzw. Diffusion zurückzuführen ist und sich in einer erhöhten Rotationskorrelationszeit ( $\tau_m$ ) ausdrücken sollte (siehe 3.1.2). Diese Änderung der Relaxationsraten ( $R_1$ ,  $R_2$ ) eines Proteins bei steigender Viskosität zeigt dieselbe Charakteristik, wie dies für Proteine mit steigendem Molekulargewicht bei konstanter Viskosität der Fall ist. Die großen Fehlerbalken von  $R_2$  bei 70% EG resultieren aus dem schlechten Signal/Rausch-Verhältnis der Spektren. Der  $hNOE$  weist jedoch keine signifikante Veränderung bei erhöhter Viskosität auf.



**Abb. 22:**  $^{15}N$   $R_1$ - und  $R_2$  Relaxationsraten sowie  $hNOE$ -Effekte von CspB bei 0%, 27% und 70% EG. Die Spektren zur Bestimmung der Relaxationsparameter wurden bei einer  $^{15}N$  Resonanzfrequenz von 50.7 MHz (0% EG) bzw. 60.8 MHz (27% und 70% EG) aufgezeichnet. Die grauen und schwarzen Balken heben die Aminosäuren der  $\beta$ -Faltblattstränge hervor.

### 3.1.2 Erweiterte Lipari-Szabo-Analyse zur Bestimmung der Rotationskorrelationszeit

Die Gesamtbewegung von Proteinmolekülen kann mit Hilfe der Rotationskorrelationszeit ( $\tau_m$ ) unter der Annahme beschrieben werden, dass ein starrer sphärischer Körper vorliegt. Die Geschwindigkeit dieser Bewegung ist abhängig von der Temperatur und der Viskosität der Lösung (Einstein, 1905). Eine detaillierte Analyse von  $\tau_m$  sowie der zusätzlichen internen Dynamik des Proteinrückgrats von CspB bei verschiedenen Viskositäten wurde anhand des erweiterten Lipari-Szabo-Ansatzes unter Verwendung der Relaxationsparameter  $R_1$ ,  $R_2$  und  $hNOE$  mit dem Programm MODELFREE 3.1 durchgeführt. Die erweiterte Lipari-Szabo-Analyse beinhaltet fünf Modelle (Clare, *et al.*, 1990, Lipari & Szabo, 1982a, Lipari & Szabo, 1982b), deren spektrale Leistungsdichtefunktionen in Tab. 5 definiert sind. Eine ausführliche Beschreibung ist ebenfalls in 2.5.4 gegeben. Unter der Annahme eines isotropen Bewegungsmodells (2.5.4) wurde  $\tau_m$  nach einem Verfahren von Montelione *et al.* iterativ optimiert (Feng, *et al.*, 1998, Li & Montelione, 1995). Die Richtigkeit der eingesetzten Rotationskorrelationszeit ist sowohl für die Auswahl des besten Modells für jede Aminosäure als auch für die Ergebnisse der optimierten Bewegungsparameter (Ordnungsparameter  $S^2$ , Beitrag des chemischen Austauschs  $R_{ex}$ , effektive Korrelationszeit  $\tau_e$ , siehe 3.1.3) von essentieller Bedeutung. So kann beispielsweise chemischer Austausch zur tatsächlichen  $R_2$ -Rate beitragen, was zu einer erhöhten  $R_2$ -Rate führt. Dies resultiert in der Annahme einer zu großen  $\tau_m$ , da diese über den Quotienten der beiden Relaxationsraten ( $\tau_m = R_2/R_1$ ) abgeschätzt werden kann (Kay, *et al.*, 1989). In Tab. 6 sind die verschiedenen Zyklen der Optimierung von  $\tau_m$ , ausgehend von der ursprünglichen Abschätzung der Rotationskorrelationszeit, zusammengefasst. Diese wurde auf der Grundlage des Mittelwerts aller bestimmten  $R_2/R_1$ -Quotienten erhalten. Die einzelnen Kriterien, die zur Verbesserung von  $\tau_m$  und zum Ausschluss verschiedener Rückgratamide herangezogen wurden, sind in der Legende von Tab. 6 beschrieben.

Für drei verschiedene Viskositäten konnte die Rotationskorrelationszeit von CspB iterativ optimiert werden. Dabei mussten für 0%, 27% und 70% EG sechs, vier bzw. zwei Optimierungszyklen durchgeführt werden. Die Auftragung von  $\tau_m$  gegen die Ethylenglykolkonzentration ergibt einen linearen Anstieg zwischen 0% und 70% EG von 4.4 ns auf 17.3 ns (Abb. 23a). Das bedeutet, dass die Gesamtbewegung des Proteins mit zunehmender Viskosität deutlich verlangsamt wird. Die erhöhten Rotationskorrelationszeiten bei 27% und 70% EG sind vergleichbar mit Rotationskorrelationszeiten, die für Proteine mit 170 bzw. 340 Aminosäuren gefunden werden.

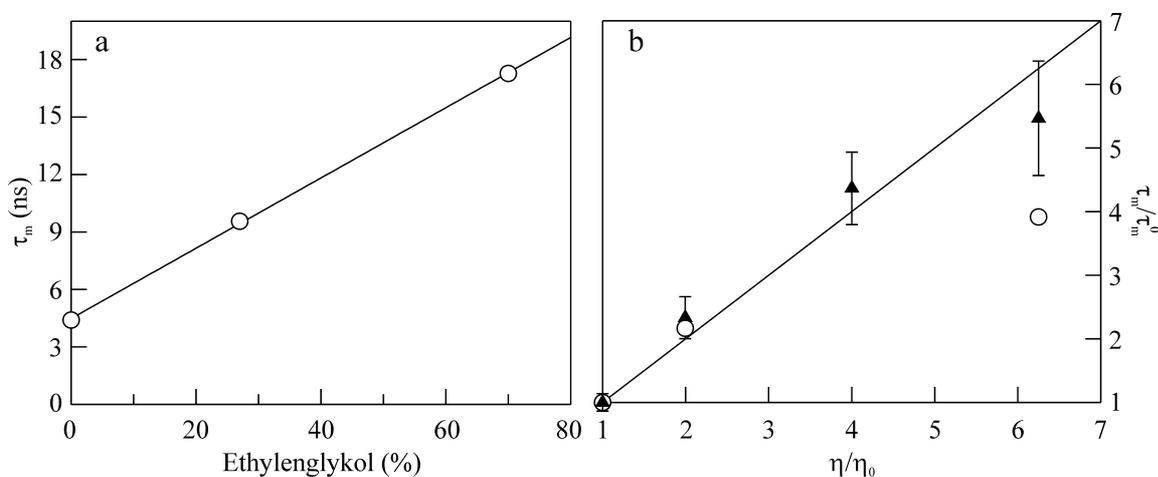
**Tab. 6:** Iterative Optimierung der gemittelten  $R_2/R_1$ -Quotienten und die jeweiligen Rotationskorrelationszeiten  $\tau_m$  der Gesamtbewegung von CspB bei 25 °C und verschiedenen Viskositäten.

Probe	Zyklus	$\langle R_2/R_1 \rangle^a$	$\tau_{m, \text{init}}$ (ns)	$\tau_{m, \text{opt}}$ (ns)
CspB in 0% EG	0	$3.90^b \pm 0.87$	$6.44 \pm 1.12$	
	1	$3.74^c \pm 0.25$	$6.27 \pm 0.30$	$6.27 \pm 0.05$
	2	$3.60^d \pm 0.17$	$6.12 \pm 0.24$	$6.02 \pm 0.05$
	3	$3.26^e \pm 0.18$	$5.67 \pm 0.28$	$5.48 \pm 0.06$
	4	$3.00^f \pm 0.03$	$5.32 \pm 0.03$	$5.21 \pm 0.02$
	5	$2.86^g \pm 0.01$	$5.12 \pm 0.02$	$4.34 \pm 0.03$
CspB in 27% EG	0	$10.45^b \pm 3.85$	$9.90 \pm 0.53$	
	1	$11.00^c \pm 0.69$	$10.20 \pm 0.27$	$10.11 \pm 0.04$
	2	$10.85^d \pm 0.66$	$10.12 \pm 0.24$	$9.90 \pm 0.03$
	3	$10.51^e \pm 0.56$	$9.95 \pm 0.28$	$9.76 \pm 0.05$
CspB in 70% EG	0	$25.31^b \pm 7.72$	$15.92 \pm 2.46$	
	1	$27.91^c \pm 2.84$	$16.83 \pm 0.89$	$17.39 \pm 0.15$
		$29.60^d \pm 1.95$	$17.28 \pm 0.58$	$17.27 \pm 0.12$

<sup>a</sup>  $\langle R_2/R_1 \rangle$  ist der Mittelwert der ausgewählten  $R_2/R_1$ -Quotienten. <sup>b</sup>  $\langle R_2/R_1 \rangle_{\text{all}}$  ist der Mittelwert der  $R_2/R_1$ -Quotienten aller 62 (0% EG), 61 (27% EG) bzw. 56 (70% EG) analysierten Rückgratamide. <sup>c</sup>  $\langle R_2/R_1 \rangle$  für je 48, 45 oder 47 Amide in 0%, 27% oder 70% EG für die gilt:  $|R_2/R_1 - \langle R_2/R_1 \rangle_{\text{all}}| < 1$  (0% EG),  $< 1.5$  (27% EG),  $< 3$  (70% EG). Die ausgeschlossenen Aminosäuren sind K7, W8, G14, V20, D24, D25, F27, H29, G37, V52, N55, T64, E66, A67 (0% EG), L2, K5, K7, S31, G35, E36, G37, K39, T40, G54, N55, R56, G57, T64, E66, A67 (27% EG) oder F27, H29, G35, E36, G37, K39, A61, T64, A67 (70% EG). <sup>d</sup>  $\langle R_2/R_1 \rangle$  für 39 (0% EG), 41 (27% EG) oder 40 (70% EG) Amide aus Zyklus 0 mit einem angepassten  $R_{\text{ex}} < 1.5$  Hz. Daher wurden zusätzlich zu Fußnote c folgende Rückgratamide ausgeschlossen L2, E3, N10, G35, E36, T40, L41, F49, G57 (0% EG), G4, S11, I33, E42 (27% EG) oder F9, E21, Q23, I33, T40, Q45, R56 (70% EG). <sup>e</sup> Von allen  $R_2$ -Werten wurde der jeweilige  $R_{\text{ex}}$ -Wert aus Zyklus 1 subtrahiert ( $R_{2, \text{corr}} = R_2 - R_{\text{ex}}$ ). Daraus ergeben sich die korrigierten und gemittelten  $\langle R_2/R_1 \rangle_{\text{all, corr}}$ -Werte von  $3.26 \pm 0.18$  (0% EG) oder  $9.97 \pm 2.78$  (27% EG).  $\langle R_2/R_1 \rangle$  wurde mit 44 (0% EG) oder 53 (27% EG) Amidinen bestimmt, die dem Kriterium  $|(R_2/R_1)_{\text{corr}} - \langle R_2/R_1 \rangle_{\text{all, corr}}| < 0.36$  (0% EG) oder  $< 2.78$  (27% EG) gehorchen. Die ausgeschlossenen Rückgratamide sind F9, N11, G14, D24, D25, G35, E36, G37, F38, T40, G44, F49, E50, V52, G54, G57, A66, A67 bei 0% EG und E36, G37, K39, G54, N55, R56, G57, A67 bei 27% EG. <sup>f</sup> Das gleiche Kriterium wie in Fußnote e wurde mit den  $R_{\text{ex}}$ -Werten aus Zyklus 2 für die Korrektur von  $R_2$  angewendet und ergibt ein  $\langle R_2/R_1 \rangle_{\text{all, corr}}$  von  $2.91 \pm 0.20$  bzw.  $9.54 \pm 2.18$  für 0% bzw. 27% EG.  $\langle R_2/R_1 \rangle$  wurde für 53 bzw. 56 Amide für 0% bzw. 27% EG berechnet. Die ausgeschlossenen Reste stellen N11, D24, G35, E36, G37, F38, G54, G57, A67 für 0% EG bzw. E36, G37, G54, N55, A67 für 27% EG dar. <sup>g</sup> Das gleiche Kriterium wie in Fußnote e wurde mit den  $R_{\text{ex}}$ -Werten aus Zyklus 3 für die Korrektur von  $R_2$  angewendet und ergibt ein  $\langle R_2/R_1 \rangle_{\text{all, corr}}$  von  $2.82 \pm 0.20$ . Für 43 Amide bei 0% EG wurden  $\langle R_2/R_1 \rangle$  berechnet, wobei N11, G16, I18, D24, V26, G35, E36, G37, F38, Q45, E50, E53, G54, N55, G57, Q59, A60, A61, A67 zuvor ausgeschlossen wurden. <sup>h</sup> Das gleiche Kriterium wie in Fußnote e wurde mit den  $R_{\text{ex}}$ -Werten aus Zyklus 4 für die Korrektur von  $R_2$  angewendet und ergibt ein  $\langle R_2/R_1 \rangle_{\text{all, corr}}$  von  $2.36 \pm 0.10$ . Für 49 Rückgratamide wurde  $\langle R_2/R_1 \rangle$  bei 0% EG berechnet. Dabei wurden N11, G14, D24, G35, E36, G37, F38, V52, G54, N55, G57, E66, A67 ausgeschlossen.

Die Stokes-Einstein-Beziehung beschreibt die lineare Abhängigkeit der relativen Rotationskorrelationszeit von der relativen Viskosität. Dieser Zusammenhang gilt für die mit

der erweiterten Lipari-Szabo-Analyse bestimmten relativen  $\tau_m$ -Werte zwischen 0% und 27% EG ( $\eta/\eta_0 = 2$ ). In Gegenwart von 70% EG ( $\eta/\eta_0 = 6$ ) ist die Korrelationszeit deutlich kleiner als die Vorhersage mit der Stokes-Einstein-Beziehung (offene Kreise in Abb. 23b). Somit bewegt sich das Protein schneller, als dies von der makroskopischen Viskosität des Lösungsmittels her erwartet wurde. Eine mögliche Begründung hierfür ist, dass die Mikroviskosität der Hydratationshülle von CspB geringer ist, als die Makroviskosität der freien Lösung. Diese schnellere Rotationsbewegung könnte auch durch Verschiebung des Gleichgewichts zwischen gefaltetem und nativem CspB herrühren, da EG stabilisierend wirkt. Jedoch liegt selbst in Abwesenheit von EG nur 1% entfaltetes CspB im Gleichgewicht vor, wodurch eine so signifikante Änderung der Gesamtbewegung nicht möglich ist.



**Abb. 23:** Ergebnisse der Lipari-Szabo-Analyse der  $^{15}\text{N}$ -Relaxationsparameter von CspB bei verschiedenen Viskositäten. (a) Die Rotationskorrelationszeit  $\tau_m$  als Funktion der EG-Konzentration. Die Gerade stellt das Resultat der linearen Regression dar. (b) Abhängigkeit der relativen  $\tau_m$  aus der Analyse (O) der  $^{15}\text{N}$ -Relaxationsparameter und der ( $\blacktriangle$ ) Diffusionsexperimente (siehe 3.1.4) von der relativen Viskosität. Die Gerade mit der Steigung 1 repräsentiert die theoretische Viskositätsabhängigkeit von  $\tau_m$  gemäß der Stokes-Einstein Gleichung.

Zur Kontrolle wurde die relative Korrelationszeit mit Hilfe des hydrodynamischen Radius  $R_H$ , der über Diffusionsmessungen erhalten wurde, und der Stokes-Einstein-Debye-Gleichung bestimmt (siehe 3.1.4). Aus diesen Diffusionsmessungen werden jedoch nur relative Diffusionskonstanten des Proteins erhalten, mit der die direkte Berechnung des  $R_H$  nicht möglich ist. Um dennoch den  $R_H$  des Proteins bestimmen zu können, wurde die relative Diffusionskonstante des internen Standards Dioxan verwendet, dessen  $R_H$  bekannt ist (Gl. 33). Die Berechnung des  $R_H$  mit Gl. 33 und der relativen Diffusionskonstante von Dioxan bewirkt eine Korrektur der Viskositätsabhängigkeit der relativen Diffusionskonstanten von CspB und ergibt somit für das Protein inklusive der Hydratationshülle einen konstanten  $R_H$  über den gesamten Viskositätsbereich (Tab. 9). Mit Hilfe des so bestimmten  $R_H$  und der Stokes-

Einstein-Debye-Gleichung konnten aus der Translationsdiffusion die relativen Rotationskorrelationszeiten bei vier verschiedenen EG-Konzentrationen berechnet werden. Diese relativen  $\tau_m$  folgen der linearen Abhängigkeit von der Makroviskosität des Lösungsmittels (gefüllten Dreiecke in Abb. 23b). Das bedeutet, dass die Abweichung vom idealen Verhalten der relativen  $\tau_m$ , die mit Hilfe der Lipari-Szabo-Analyse erhalten wurden, auf die Mikroviskosität in der Hydratationshülle und nicht auf die Größe des Proteins mit der Hydratationshülle zurückzuführen ist. Folglich wird die Geschwindigkeit der Rotationsbewegung maßgeblich von der lokalen Umgebung des Proteins innerhalb der Hydratationshülle bestimmt.

### 3.1.3 Bewegungsparameter der Lipari-Szabo-Analyse bei verschiedenen Viskositäten

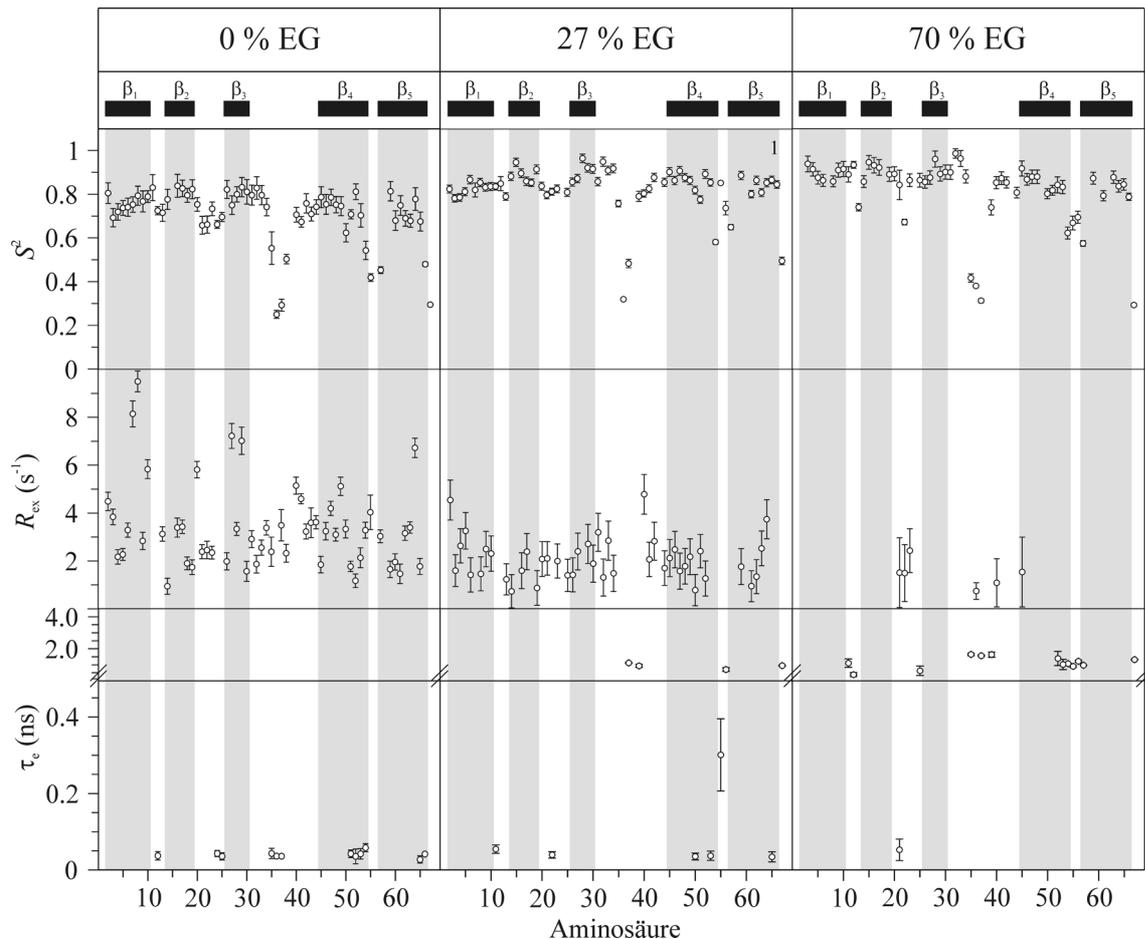
Neben der Rotationskorrelationszeit der Gesamtbewegung gibt die erweiterte Lipari-Szabo-Analyse auch Aufschluss über die interne Beweglichkeit. Der Ordnungsparameter  $S^2$ , der Beitrag des chemischen Austauschs  $R_{ex}$  zur  $R_2$ -Rate sowie die effektive Korrelationszeit  $\tau_e$  bei 0%, 27% und 70% Ethylenglykol sind in Abb. 24 dargestellt. Die Zahl der Rückgratamide, die optimal mit einem der fünf Modelle aus Tab. 5 angepasst werden konnten, sind für die analysierten EG-Konzentrationen sehr unterschiedlich (Tab. 7). Bei niedrigen Viskositäten (0%, 27% EG) werden hauptsächlich Modelle, die den chemischen Austauschterm  $R_{ex}$  beinhalten (Model 3 und 4) favorisiert. Liegen hohe Viskositäten vor, reichen einfachere Modelle zur Beschreibung der Relaxationsparameter aus. Daher werden die experimentellen Daten bei 70% EG überwiegend von Model 1 am besten wiedergegeben, das lediglich den Ordnungsparameter  $S^2$  enthält. Desweiteren wird nur eine geringe Anzahl von Rückgratamiden am besten durch Model 5 angepasst, welches schnelle interne Bewegungen auf mehreren Zeitskalen annimmt (Tab. 7).

**Tab. 7:** Verteilung der angepassten Modelle bei der Lipari-Szabo-Analyse von CspB bei verschiedenen Viskositäten nach der iterativen Optimierung der Korrelationszeit  $\tau_m$

Model <sup>a</sup>	0% EG	27% EG	70% EG
1	2	8	38
2	5	8	7
3	48	41	5
4	7	1	1
5	0	3	5

<sup>a</sup> Die Definition der einzelnen Modelle ist in Tab. 5 zu finden.

Die Ergebnisse für die Bewegungsparameter bei verschiedenen Viskositäten wurden mit Hilfe der erweiterten Lipari-Szabo-Analyse erhalten und sind in Abb. 24 zusammengefasst.

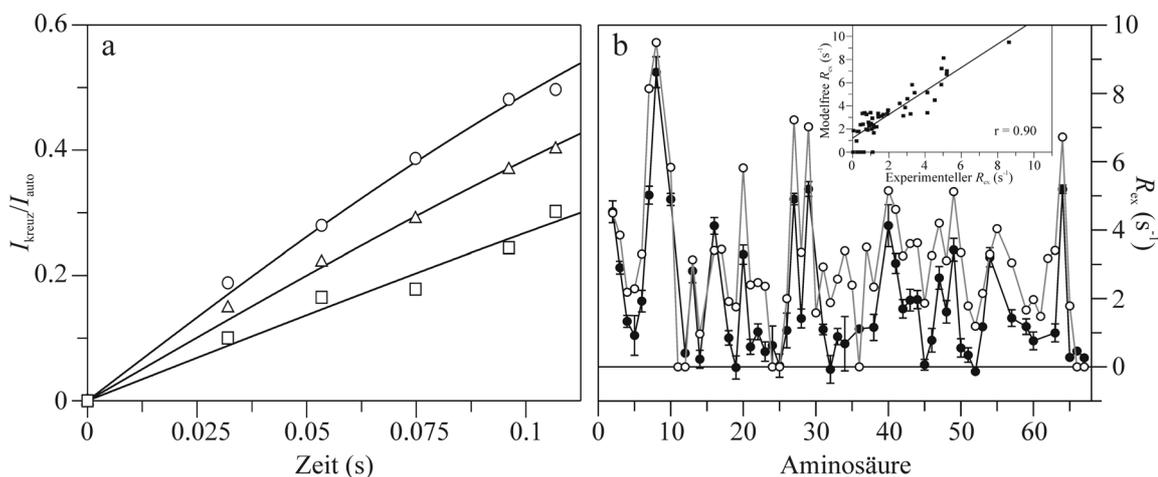


**Abb. 24:** Ordnungsparameter  $S^2$ , chemische Austauschraten  $R_{ex}$  und effektive Korrelationszeiten  $\tau_c$  von CspB bei 0%, 27% und 70% Ethylenglykol als Ergebnisse der erweiterten Lipari-Szabo Analyse nach Analyse der  $^{15}N$  Relaxationsparameter (Abb. 22) mit dem Programm MODELFREE. Die Fehlerbalken resultieren aus Monte Carlo Simulationen. Die grauen und schwarzen Balken sollen die Sekundärstruktur von CspB verdeutlichen.

Der Ordnungsparameter  $S^2$  ist nahezu unabhängig von der vorliegenden Viskosität, so dass die Amplitude der internen Beweglichkeit nicht von der langsamen Gesamtbewegung, die durch die Rotationskorrelationszeit beschrieben wird, beeinflusst wird (Abb. 24). Die meisten Aminosäuren, die sich innerhalb der  $\beta$ -Faltblattstränge befinden, zeigen eine geringe Flexibilität im Pico- bis Nanosekundenbereich mit  $S^2$ -Werten über 0.75. Etwas kleinere Ordnungsparameter sind in den Schleifen zwischen den  $\beta$ -Faltblattsträngen  $\beta_1/\beta_2$  und  $\beta_2/\beta_3$  zu finden, während in der langen Schleife zwischen den beiden Subdomänen ( $\beta_3/\beta_4$ ) sowie zwischen den  $\beta$ -Faltblattsträngen  $\beta_4/\beta_5$  deutlich reduzierte  $S^2$ -Werte vorliegen. Diese weisen auf eine ausgeprägte interne Beweglichkeit im Pico- bis Nanosekundenbereich hin, die unabhängig von der Viskosität ist. Auch der C-terminale Bereich ist sehr flexibel (Abb. 24).

Bei Aminosäuren in CspB, welche zusätzlich eine schnelle interne Beweglichkeit besitzen, treten effektive Korrelationszeiten ( $\tau_c$ ) auf. Diese liegen für einige Rückgratamide bei 0% EG um 50 ps und steigen für die meisten Reste mit zunehmender Viskosität auf über 500 ps an.

Die Beiträge des chemischen bzw. konformationellen Austauschs ( $R_{\text{ex}}$ ) zur  $R_2$ -Rate sind bei geringen Viskositäten (0% und 27% EG) substantiell und über das gesamte Protein verteilt. Bei 70% EG sind nur noch wenige geringe  $R_{\text{ex}}$ -Terme im Bereich der flexiblen Schleifen zwischen den  $\beta$ -Faltblattsträngen  $\beta_2/\beta_3$  und  $\beta_3/\beta_4$  vorhanden. Insgesamt nimmt die Zahl der Aminosäuren mit  $R_{\text{ex}}$ -Beiträgen von 55 bei 0% EG auf 42 bei 27% EG und auf sechs bei 70% EG signifikant ab.



**Abb. 25:** Experimentelle Bestätigung der Beiträge des chemischen Austauschs zu  $R_2$ . (a) Bestimmung von  $R_2^0$  über die Interferenz von transversaler  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  dipolarer Relaxation und der Relaxation der Anisotropie der  $^{15}\text{N}$  chemischen Verschiebung (CSA). Die Anpassung an Gl. 36 ergibt für ( $\Delta$ ) G4, ( $\circ$ ) V20 und ( $\square$ ) G54 Kreuzrelaxationsraten ( $\eta_{\text{xy}}$ ) von  $4.05 \text{ s}^{-1}$ ,  $5.36 \text{ s}^{-1}$  und  $2.75 \text{ s}^{-1}$ . (b) Vergleich der  $R_{\text{ex}}$ -Terme die mittels der ( $\circ$ ) erweiterten Lipari-Szabo-Analyse oder der ( $\bullet$ ) Interferenz zwischen dipolarer und CSA-Relaxation erhalten wurden. Der Übersichtlichkeit halber wurden nur für Letztere Fehlerbalken angegeben. Die grauen bzw. schwarzen Linien verbinden die offenen bzw. ausgefüllten Symbole. Die Teilabbildung in (b) zeigt die Korrelation der  $R_{\text{ex}}$ -Werte beider Methoden. Die lineare Regression liefert eine Ausgleichsgerade mit der Steigung  $1.02 \pm 0.07$  und dem y-Achsenabschnitt  $1.21 \pm 0.19 \text{ s}^{-1}$ . Der Korrelationskoeffizient  $r$  beträgt 0.90.

Die ungewöhnlich große Anzahl an  $R_{\text{ex}}$ -Termen bei 0% EG verlangte eine experimentelle Bestätigung des Beitrags des chemischen Austauschs zur  $R_2$ -Rate. Dazu wurde die tatsächliche transversale Relaxationsrate  $R_2^0$  über die Interferenz von transversaler  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  dipolarer Relaxation und der Relaxation der Anisotropie der  $^{15}\text{N}$  chemischen Verschiebung (CSA) mit Gl. 36 bestimmt und exemplarisch in Abb. 25a dargestellt. Nach Gl. 43 ergibt sich  $R_{\text{ex}}$  aus der Differenz zwischen  $R_2$  und  $R_2^0$ . Der Vergleich der so erhaltenen  $R_{\text{ex}}$ -Terme mit denjenigen, die aus der erweiterten Lipari-Szabo-Analyse resultieren, ist in Abb. 25b für alle Reste von CspB bei 0% EG gezeigt. Es besteht eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse beider Methoden, die sich auch in einer signifikanten Korrelation der  $R_{\text{ex}}$ -Werte mit einem Korrelationskoeffizienten von 0.90 ausdrückt (Teilabbildung in Abb. 25b). Die  $R_{\text{ex}}$ -Werte, die basierend auf den  $^{15}\text{N}$ -Relaxationsparametern mit der Lipari-Szabo-Methode erhalten wurden,

sind um ca. 1 Hz größer als die experimentell über die Kreuzrelaxation von  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -dipolarer und  $^{15}\text{N}$  CSA-Relaxation bestimmten Beiträge des chemischen Austauschs. Dies wird durch den y-Achsenabschnitt der Regressionsgeraden von  $1.21 \pm 0.19 \text{ s}^{-1}$  gekennzeichnet (Teilabbildung in Abb. 25b).

**Tab. 8:** Berechnete Beiträge des chemischen Austauschs ( $R_{\text{ex}}^{\text{a}}$ ) zu  $R_2$  mit Hilfe der Faltungsraten von CspB bei verschiedenen EG-Konzentration

Aminosäure	$\Delta\delta_{\text{N}}$ (ppm)	$R_{\text{ex}}$ bei 0% EG ( $\text{s}^{-1}$ )	$R_{\text{ex}}$ bei 27% EG ( $\text{s}^{-1}$ )	$R_{\text{ex}}$ bei 70% EG ( $\text{s}^{-1}$ )
W8	11.7	9.9 (9.5) <sup>b</sup>	1.7 (1.5)	0.1 (-) <sup>c</sup>
V20	6.8	4.7 (5.8)	0.8 (0.9)	0.0 (-)
F27	8.0	6.1 (7.2)	1.0 (1.2)	0.1 (-)

<sup>a</sup> Gl. 45 wurde zur Berechnung des  $R_{\text{ex}}$ -Beitrags zu  $R_2$  mit  $\tau_{\text{cp}} = 1 \text{ ms}$  und den folgenden Faltungsraten (Jacob, *et al.*, 1997, Schindler, *et al.*, 1995) verwendet:  $k_{\text{f}} = 1070 \text{ s}^{-1}$  bzw.  $k_{\text{u}} = 14 \text{ s}^{-1}$  bei 0% EG,  $k_{\text{f}} = 1000 \text{ s}^{-1}$  bzw.  $k_{\text{u}} = 2.3 \text{ s}^{-1}$  bei 27% EG und  $k_{\text{f}} = 160 \text{ s}^{-1}$  bzw.  $k_{\text{u}} = 0.1 \text{ s}^{-1}$  bei 70% EG. <sup>b</sup> Die Werte in Klammern stellen den  $R_{\text{ex}}$  dar, der mit der Lipari-Szabo Analyse gefunden wurde (Abb. 24). <sup>c</sup> Die drei Aminosäuren wurden bei der Lipari-Szabo Analyse am besten von Model 1 angepasst, so dass kein  $R_{\text{ex}}$ -Beitrag zu  $R_2$  vorhanden ist.

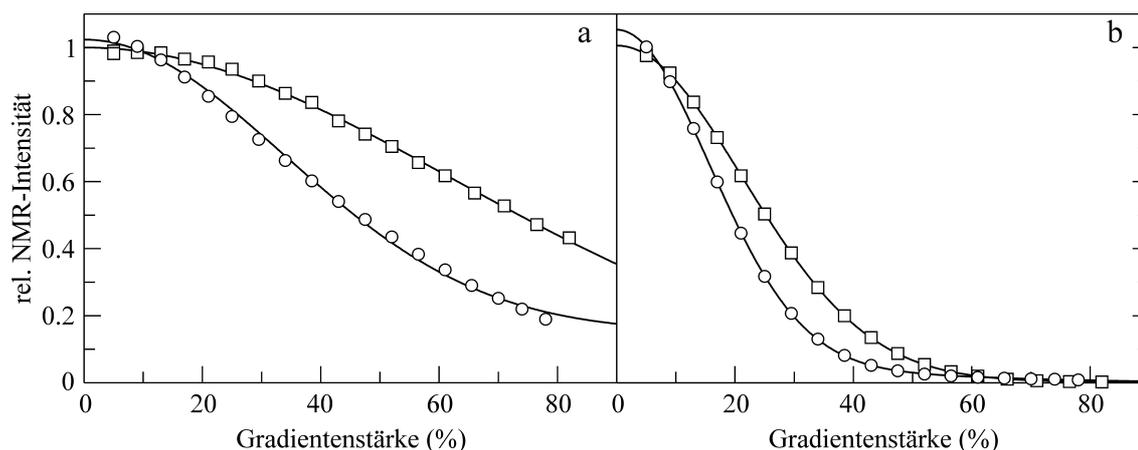
Im Allgemeinen spiegeln  $R_{\text{ex}}$ -Beiträge lokale Konformationsaustausche im Bereich von Millisekunden wider, die meistens in unstrukturierten Regionen eines Proteins vorhanden sind. Im Falle von CspB weisen diese  $R_{\text{ex}}$ -Werte auf eine erhebliche Dynamik hin, die allerdings nicht mit den Sekundärstrukturelementen korrelieren. Deshalb kann diese Dynamik auf die Millisekundenfaltung von CspB zurückgeführt werden. Auf diese wird in Abschnitt 3.3 ausführlich eingegangen und detailliert mittels NMR-spektroskopischer Methoden charakterisiert. Mit Hilfe der bekannten Faltungsraten von CspB bei den untersuchten EG-Konzentrationen (Jacob, *et al.*, 1997, Schindler, *et al.*, 1995) und Gl. 45 wurden die zu erwarteten  $R_{\text{ex}}$ -Beiträge zu  $R_2$  berechnet (Tab. 8). Die dafür benötigte Differenz der  $^{15}\text{N}$  chemischen Verschiebung des Kreuzsignals des jeweiligen Rückgratamids im nativen und entfalteten Zustand ( $\Delta\delta_{\text{N}}$ ) wurde mit 2D ZZ-Austauschexperimenten in Gegenwart von verschiedenen Harnstoffkonzentrationen bestimmt und auf 0 M Harnstoff extrapoliert (3.3.1).

CspB wird in Anwesenheit von Ethylenglykol stabilisiert, was zu einer Verringerung der Population des entfalteten Zustands mit steigender EG-Konzentration führt (1.3% bei 0% EG, 0.2% bei 27% EG und 0.06% bei 70% EG). Aus der erniedrigten Population des entfalteten Zustands resultieren  $R_2$ -Raten bei 70% EG, die nur wenige  $R_{\text{ex}}$ -Beiträge aufweisen (Tab. 7, Abb. 24). Eine zusätzliche Verringerung des  $R_{\text{ex}}$ -Werts erfolgt durch die Erniedrigung der Rückfaltungs- sowie der Entfaltungsraten mit zunehmender EG-Konzentration (Jacob, *et al.*, 1997), wodurch die Austauschrate zwischen dem nativen und entfalteten Zustand von  $1084 \text{ s}^{-1}$  (0% EG) auf  $1002 \text{ s}^{-1}$  (27% EG) bzw.  $160 \text{ s}^{-1}$  (70% EG) sinkt. Wie zuvor schon erwähnt, sind

Aminosäuren, die bei 0% EG bzw. 27% EG einen signifikanten  $R_{\text{ex}}$ -Beitrag besitzen, über das gesamte Protein verteilt und nicht mit den Sekundärstrukturelementen korreliert. Das bedeutet, dass den  $R_{\text{ex}}$ -Beiträgen nicht ein lokaler Konformationsaustausch sondern die globale Faltungs-/Entfaltungsreaktion von CspB zugrunde liegt. Dadurch hängt die Größe des  $R_{\text{ex}}$ -Werts nur von  $\Delta\delta_{\text{N}}$  ab (siehe Tab. 8), da die Austauschrate und die Gleichgewichtskonstante der Faltungsreaktion für alle Reste des Proteins identisch sind (3.3.2). Die noch vorhandenen  $R_{\text{ex}}$ -Beiträge bei 70% EG sind jedoch nicht auf das Faltungsgleichgewicht von CspB sondern auf eine verbleibende lokale Beweglichkeit in den Schleifen zwischen den  $\beta$ -Faltblattsträngen  $\beta_2$  und  $\beta_3$  bzw.  $\beta_3$  und  $\beta_4$  zurückzuführen.

### 3.1.4 Diffusion und hydrodynamischer Radius bei verschiedenen Viskositäten

Die Stokes-Einstein Gleichung ( $D = kT/(6\pi r\eta)$ ) gibt die Diffusionskonstante  $D$  eines sphärischen Körpers mit dem Radius  $r$  als Funktion der Viskosität  $\eta$  bei einer bestimmten Temperatur  $T$  wieder. Zur Bestimmung der apparenten Diffusionskonstanten wurden PFG-SLED Experimente durchgeführt (Abb. 13). Die Erhöhung der Viskosität führt zu einer verlangsamten Diffusion (Tab. 9), was sich durch einen geringeren Signalverlust bei gleicher Gradientenstärke ausdrückt (Abb. 26). Der Signalverlust von Dioxan (Abb. 26b) ist aufgrund der wesentlich schnelleren relativen Diffusion im Vergleich zu CspB (Abb. 26a) schon bei geringen Gradientenstärken sehr hoch. Dieses Verhalten resultiert aus dem unterschiedlichen Molekulargewicht und der damit einhergehenden verschiedenen räumlichen Ausdehnung.



**Abb. 26:** Bestimmung der relativen Diffusionskonstante in (○) 0% und (□) 52% EG von (a) CspB bzw. (b) Dioxan. Die Anpassung erfolgte mit Gl. 31 (CspB) bzw. Gl. 32 (Dioxan). Die Ergebnisse für  $d_{\text{prot}}$  und  $d_{\text{diox}}$  sind in Tab. 9 enthalten.

Um die komplexe Form von Biomakromolekülen mit der Stokes-Einstein Gleichung erfassen zu können, wird der effektive hydrodynamische Radius  $R_{\text{H}}$  eingeführt, der den

Radius einer idealen Kugel mit identischem Diffusionskoeffizienten repräsentiert. Hierzu wurde der  $R_H$  von CspB bei verschiedenen Viskositäten durch NMR-Diffusionsexperimente (2.5.2) und mit Hilfe von  $d_{\text{prot}}$  bzw.  $d_{\text{diox}}$  sowie Gl. 33 bestimmt. Dabei dient Dioxan als interne Referenz, die weder mit nativem noch mit entfaltetem Protein signifikant interagiert (Jones, *et al.*, 1997) und dessen  $R_H$  bekannt ist (Balbach, 2000, Wilkins, *et al.*, 1999). Die Ergebnisse sind in Tab. 9 gezeigt. Neben der Lipari-Szabo Analyse aus 3.1.2 kann eine Abschätzung der Rotationskorrelationszeit  $\tau_m$  auch mit Hilfe des hydrodynamischen Radius ( $R_H$ ) erfolgen. Die Stoke-Einstein-Debye Gleichung ( $\tau_m^{\text{diff}} = 4\pi R_H^3 \eta / (3kT)$ ) (Debye, 1929) verknüpft die translationale Diffusion mit der Rotationsbewegung.

**Tab. 9:** Hydrodynamischer Radius in Abhängigkeit von der Lösungsmittelviskosität

%EG	$\eta$ (mPa·s) <sup>a</sup>	$d_{\text{prot}}$	$d_{\text{diox}}$	$R_H$ (Å)	$\tau_m^{\text{diff}}$ (ns) <sup>b</sup>
0	1.01	$3.07 \pm 0.10$	$20.65 \pm 0.06$	$14.3 \pm 0.5$	$3.0 \pm 0.3$
27	1.99	$1.76 \pm 0.06$	$12.55 \pm 0.08$	$15.1 \pm 0.5$	$7.0 \pm 0.7$
52	4.12	$1.58 \pm 0.04$	$10.86 \pm 0.04$	$14.6 \pm 0.4$	$13.1 \pm 1.1$
70	6.25	$1.26 \pm 0.03$	$8.17 \pm 0.07$	$13.7 \pm 0.6$	$16.4 \pm 2.2$

<sup>a</sup> Die Viskosität der Lösung wurde mit einem oszillierenden Kapillar-Rheometer bestimmt (Jacob, *et al.*, 1997).

<sup>b</sup>  $\tau_m^{\text{diff}}$  wurde mit der Stokes-Einstein-Debye Gleichung  $\tau_m^{\text{diff}} = 4\pi R_H^3 \eta / (3kT)$  berechnet.

Tab. 9 fasst die Ergebnisse der NMR-Diffusionsmessungen bei verschiedenen Viskositäten zusammen. Die interne Referenzierung durch Dioxan korrigiert die verlangsamte Diffusion bei höheren EG-Konzentrationen sehr gut, wodurch sich ein einheitlicher hydrodynamischer Radius von CspB bei allen Viskositäten ergibt. Dieser konstante  $R_H$  deutet auf einen monomeren Charakter des Proteins im untersuchten Viskositätsbereich hin. Um weiter auszuschließen, dass die Analyse der Translations- und Rotationsbewegung durch eine Multimerisierung verfälscht wird, wurden NMR-Diffusionsexperimente bei verschiedenen Proteinkonzentrationen zwischen 0.2 mM und 1.5 mM CspB durchgeführt. Der erhaltene  $R_H$  ist im Rahmen der Messgenauigkeit identisch, wodurch eine Multimerisierung ausgeschlossen werden kann. Wie unter 3.1.2 bereits erwähnt, verhält sich die Translation von CspB aufgrund des konstanten  $R_H$  bei verschiedenen Viskositäten ideal. Letzteres stellt die Voraussetzung dar, um die Stokes-Einstein-Debye Gleichung anwenden zu können. Die resultierenden relativen  $\tau_m^{\text{diff}}$  zeigen im Gegensatz zu den relativen Rotationskorrelationszeiten ( $\tau_m$ ), die mit der Lipari-Szabo-Methode bestimmt wurden, eine ungefähr lineare Abhängigkeit von der relativen Viskosität ( $\blacktriangle$  in Abb. 23b). Das bedeutet, dass  $\tau_m$  einen Sensor für die Mikroviskosität in der Hydratationshülle darstellt, die aufgrund des konstanten  $R_H$  invariant ist.

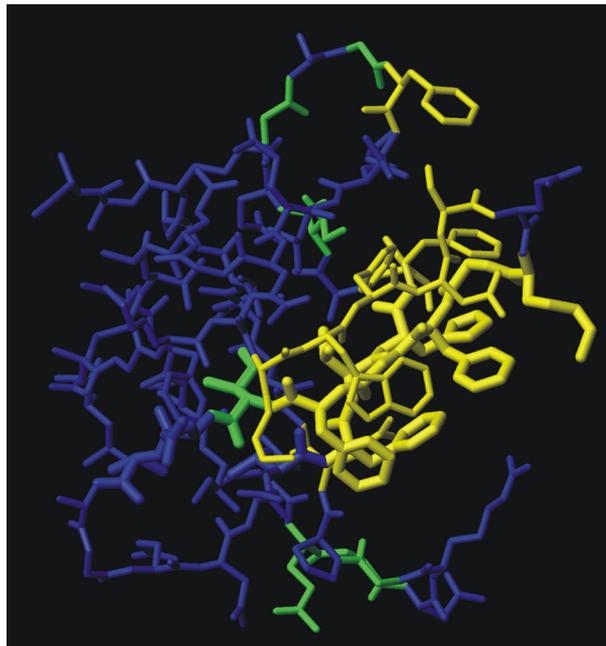
### 3.2 Nukleinsäurebindung von CspB

Die dreidimensionale Struktur des Kälteschockproteins CspB aus *Bacillus subtilis* wurde sowohl mit NMR als auch mit Röntgenkristallographie gelöst (Schindelin, *et al.*, 1993, Schnuchel, *et al.*, 1993) und besteht aus fünf antiparallelen  $\beta$ -Faltblattsträngen, die eine  $\beta$ -Faßstruktur ergeben (Abb. 3). Dabei sind die beiden Subdomänen I ( $\beta$ -Strang  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  und  $\beta_3$ ) und II ( $\beta$ -Strang  $\beta_4$  und  $\beta_5$ ) senkrecht zueinander angeordnet. CspB gehört zur Faltungsklasse der Oligonukleotid- bzw. Oligosaccharid-bindenden Proteine (*OB-fold*). Es besitzt die zwei konservierten Bindungsmotive RNP1 (K13-V20) und RNP2 (V26-H29), die anhand von Sequenzvergleichen identifiziert wurden (Schröder, *et al.*, 1995), sowie mehrere lösungsmittlexponierte aromatische Aminosäuren, die für die Interaktion des Proteins mit der Nukleinsäure bedeutend sind. Homolog zu den prokaryotischen Kälteschockproteinen sind die Kälteschockdomänen (CSD) eukaryotischer Y-Box Transkriptionsfaktoren und anderer Nukleinsäurebindungsproteine (Graumann & Marahiel, 1998, Horvath, *et al.*, 1998). Daher wurden frühere Bindungsstudien von CspB mit ssDNA-Fragmenten durchgeführt, die das Y-Box Kernmotiv ATTGG enthielten (Graumann & Marahiel, 1994, Schindelin, *et al.*, 1993, Schindler, *et al.*, 1999, Schnuchel, *et al.*, 1993, Schröder, *et al.*, 1995). Neuere Studien (Lopez, *et al.*, 1999a, Lopez & Makhatadze, 2000, Lopez, *et al.*, 2001) sowie die Abschnitte 3.2.3 und 3.2.8 zeigen, dass CspB eine geringe Sequenzspezifität besitzt, jedoch eine Präferenz für Thymidin- bzw. Uridin-reiche Bereiche aufweist.

#### 3.2.1 Charakterisierung der Beiträge einzelner Reste zur Bindung von Y-Box25

Erste detaillierte Einblicke in die Wechselwirkung zwischen CspB und einzelsträngigen Nukleinsäuren auf struktureller Ebene wurden mit dem Oligodeoxynukleotid Y-Box25 erhalten. Dieses Fragment wird von CspB mit einer moderaten Affinität gebunden (4  $\mu$ M), wobei die Stöchiometrie 3:1 (CspB:Y-Box25) beträgt. Eine Titration von  $^{15}$ N markiertem CspB mit Y-Box25 wurde mit heteronuklearer 2D NMR-Spektroskopie verfolgt und daraus die für die Komplexbildung wichtigen Aminosäurereste identifiziert (Zeeb, 2000, Zeeb & Balbach, 2003a). Direkt an der Wechselwirkung beteiligte Reste konnten durch die extreme Linienverbreiterung ihrer Kreuzsignale im 2D  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  HSQC-Spektrum bei einem ca. 10fachen Überschuss an CspB nachgewiesen werden (gelb in Abb. 27). Diese beinhalten K7, W8, F9, N10, S11, K13, G14, F15, G16, F17, F27, V28, H29, F30, S31, F38, Q59. Davon gehören acht Reste zu den beiden konservierten Bindungsmotiven RNP1 und RNP2. Rückgratamide von sieben der neun aromatischen Aminosäuren von CspB zeigen eine

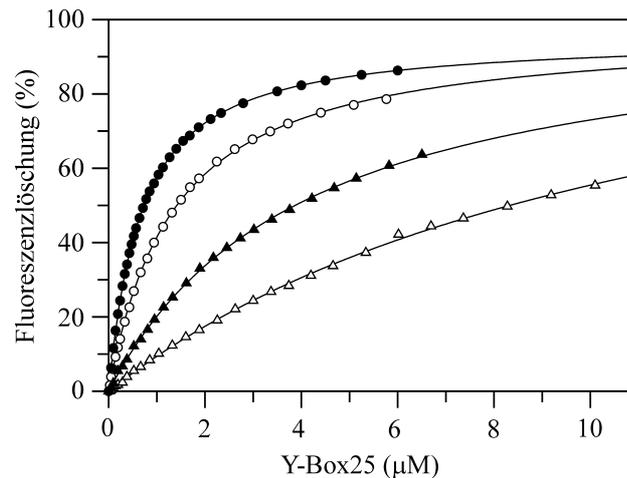
extreme Linienverbreiterung (F9, F15, F17, F27, H29, F30, F38). Außerdem wurden zwei Aminosäuren mit positiv geladenen Seitenketten gefunden (K7, K13), deren Kreuzsignale eine große Änderung in der chemischen Verschiebung erfahren. Diese zeigen konformationelle Änderungen im Zuge der Bindung von CspB an Y-Box25 und sind in Abb. 27 in grün dargestellt (Zeeb, 2000, Zeeb & Balbach, 2003a). Die einzelnen Beiträge dieser Reste zur Stabilisierung des Nukleoproteinkomplexes wurden durch verschiedene CspB-Varianten mit einzelnen Aminosäuresubstitutionen näher untersucht (Zeeb & Balbach, 2003a).



**Abb. 27:** Identifikation von Aminosäureresten, die an der Nukleinsäurebindung von CspB beteiligt sind. Reste, die eine extreme Linienverbreiterung ihrer Kreuzsignale bei einer Y-Box25 Konzentration von 70  $\mu\text{M}$  erfahren sind in gelb eingefärbt (K7, W8, F9, N10, S11, K13, G14, F15, G16, F17, F27, V28, H29, F30, S31, F38, Q59). Reste deren Kreuzsignale eine signifikante Änderung der chemischen Verschiebung zeigen, sind in grün dargestellt (I18, I33, G35, G37, E53, G54, G57). Aminosäurereste die sich in den RNP-Bindungsmotiven befinden sind mit größeren Bindungsradien gekennzeichnet. Die Abbildung wurde mit MolMol (Koradi *et al.*, 1996) und dem pdb-Eintrag 1CSP erstellt (Schindelin *et al.*, 1993).

Als Sonde für die Bestimmung der Komplexdissoziationskonstanten  $K_D$  diente die Fluoreszenzemission von CspB, welche durch Trp8 dominiert wird. Die Bindung von ssDNA führt zu einer spezifischen Löschung der Fluoreszenzemission von Trp8, da sich dieses in der Bindungsregion befindet und dadurch eine direkte Wechselwirkung zwischen dem Fluorophor und dem Bindungspartner erfolgen kann. Eine Löschung der Fluoreszenz durch zufällige Kollision der Moleküle konnte durch Titration von N-Acetyltryptophanamid mit verschiedenen ssDNA-Fragmenten ausgeschlossen werden, weil dort keine nennenswerte

Reduktion der Fluoreszenzintensität gefunden worden ist (Lopez, *et al.*, 1999a). Daher konnte diese leicht zugängliche Sonde zur Bestimmung der Bindungsaffinität der einzelnen CspB-Varianten zu Y-Box25 herangezogen werden. Repräsentative Titrationsexperimente von Wildtyp-CspB, G35A, F38A und G54P sind in Abb. 28 gezeigt. Das oben erwähnte Verhältnis von CspB zu Y-Box25 (3:1) wurde durch eine Titration unter stöchiometrischen Bedingungen mittels Fluoreszenzlöschung (10  $\mu\text{M}$  CspB) bzw. Änderung der gemittelten  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  chemischen Verschiebung (0.6 mM CspB) bestimmt (Zeeb & Balbach, 2003a).



**Abb. 28:** Löschung der Trp8-Fluoreszenz durch Bindung von Y-Box25 an CspB. Die hyperbolische Bindungsisothermen von 0.25  $\mu\text{M}$  (○) Wildtyp-CspB, (●) G35A, (▲) F38A und (▲) G54P verdeutlichen die unterschiedlichen Affinitäten zu Y-Box25 in 50 mM Na-cacodylat/HCl, 100 mM KCl pH 7.0 bei 15 °C. Aus der Anpassung von Gl. 19 an die Daten resultieren die  $K_D$ -Werte, die in Tab. 10 enthalten sind.

Für die Berechnung der Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) wurde Gl. 19 unter der Annahme verwendet, dass die drei Bindungsstellen für CspB auf Y-Box25 unabhängig sind und die Proteinmoleküle nicht interagieren. Die erhaltenen  $K_D$ -Werte sind in Tab. 10 zusammengefasst (Zeeb & Balbach, 2003a). Das Ersetzen der hochkonservierten Phenylalanine in den beiden Bindungsmotiven RNP1 (F17) und RNP2 (F30) durch Alanin führt zu einer 10fachen Reduktion der Affinität. Die Austausch von F15A und F27A resultieren ebenfalls in einem moderaten Anstieg des  $K_D$ -Werts (7fach bzw. 4fach) und somit zu einer verringerten Affinität zur ssDNA. Aromatische Aminosäuren außerhalb von RNP1 und RNP2 tragen ebenfalls signifikant zur Affinität von CspB zu Y-Box25 bei. Der  $K_D$  von F9A im C-terminalen Teil des  $\beta$ -Strangs  $\beta_1$  und F38A in der langen Schleife zwischen Subdomäne I und II ist 4fach bzw. 10fach erhöht im Vergleich zum Wildtypprotein (Tab. 10).

Kälteschockproteine aus thermophilen Organismen wie *B. caldolyticus* oder *T. maritima* binden bei 15 °C stärker an Y-Box25 als CspB aus *B. subtilis* mit  $K_D$ -Werten von 0.7  $\mu\text{M}$  bzw. 0.01  $\mu\text{M}$ . Ein Sequenzvergleich dieser drei Proteine zeigte, dass sie sich innerhalb der

beiden Bindungsmotive nur an einer bzw. zwei Positionen unterscheiden (*BcCsp* bzw. *TmCsp*). *BcCsp* und *TmCsp* beinhalten an Position 15 ein Tyr und *TmCsp* an Position 30 ein Trp, während CspB an beiden Positionen ein Phe besitzt. Nimmt man diese Austausche in CspB vor (F15Y bzw. F30W), so wird die Affinität in beiden Fällen 2fach erhöht. Dies zeigt, dass die Bindungsstelle durch eine andere Zusammensetzung an aromatischen Aminosäuren noch verbessert werden kann (Tab. 10). Allerdings ist die Affinität von *TmCsp* noch ca. 100fach höher als von CspB F30W. Es ist möglich, dass dies auf das zusätzliche Tyr an Position 15 und die höhere Anzahl positiver Ladungen in *TmCsp* zurückgeführt werden kann ( $pI(TmCsp) = 6.7$ ,  $pI(CspB) = 4.8$ ).

**Tab. 10:** Dissoziationskonstanten ( $K_D$ ) der jeweiligen CspB/Y-Box25-Komplexe und thermodynamische Stabilität der einzelnen CspB-Varianten (Zeeb & Balbach, 2003a).

Protein	$K_D \cdot 10^{-6}$ (M)	$T_m$ (°C)	$\Delta G_U$ (15 °C) (kJ/mol)
Wildtyp	$3.9 \pm 0.1$	$55.7 \pm 0.1$	$13.1 \pm 0.4$
F9A <sup>a</sup>	$15.1 \pm 0.6$	$34.0 \pm 0.2$	$2.9 \pm 0.1$
K13Q <sup>a</sup>	$21.6 \pm 0.2$	$55.3 \pm 0.2$	$12.7 \pm 0.7$
F15A <sup>a</sup>	$27.2 \pm 0.8$	$36.2 \pm 0.1$	$4.7 \pm 0.1$
F15Y <sup>a,c</sup>	$1.9 \pm 0.1$	$55.5 \pm 0.1$	$14.0 \pm 0.6$
F17A <sup>a</sup>	$48.4 \pm 1.6$	$41.2 \pm 0.3$	$6.7 \pm 0.4$
F27A <sup>a</sup>	$17.0 \pm 0.3$	$47.9 \pm 0.6$	$8.2 \pm 1.1$
H29Q <sup>a</sup>	$27.5 \pm 1.0$	$48.7 \pm 0.3$	$9.1 \pm 0.8$
F30A <sup>a</sup>	$40.8 \pm 0.6$	$54.5 \pm 0.1$	$13.4 \pm 0.4$
F30W <sup>a,c</sup>	$1.4 \pm 0.1$	$57.8 \pm 0.1$	$14.1 \pm 0.2$
G35A <sup>b</sup>	$1.8 \pm 0.1$	$48.5 \pm 0.1$	$9.1 \pm 0.2$
G35P <sup>b</sup>	$26.1 \pm 0.8$	$44.2 \pm 0.3$	$6.7 \pm 0.5$
F38A <sup>a</sup>	$35.4 \pm 1.1$	$56.8 \pm 0.1$	$13.4 \pm 0.6$
G54A <sup>b</sup>	$3.2 \pm 0.1$	$46.2 \pm 0.3$	$7.4 \pm 0.6$
G54P <sup>b</sup>	$12.1 \pm 0.3$	$36.0 \pm 1.1$	$2.5 \pm 0.4$
P58A <sup>d</sup>	$4.4 \pm 0.1$	$49.6 \pm 0.2$	$9.4 \pm 0.4$

<sup>a</sup> zeigt eine extreme Linienverbreiterung im NMR-Titrationsexperiment

<sup>b</sup> zeigt eine große Änderung der chemischen Verschiebung im NMR-Titrationsexperiment

<sup>c</sup> Aminosäureaustausch aufgrund eines Sequenzvergleichs zu Kälteschockproteinen aus thermophilen Organismen (*B. caldolyticus*, *T. maritima*)

<sup>d</sup> Substitution zur Erhöhung der möglichen Rückgratkonformationen in der Schleife  $\beta 4$ - $\beta 5$

Neben der Identifizierung wichtiger Reste für die Komplexbildung innerhalb der beiden Bindungsmotive, enthielt das NMR-Titrationsexperiment auch Hinweise auf bedeutsame Reste, die außerhalb von RNP1 und RNP2 liegen. Gly35 und Gly37 befinden sich in der langen Schleife zwischen den beiden Subdomänen in der Nähe von Phe38 und zeigen eine starke Änderung der chemischen Verschiebung ihrer Kreuzsignale bei der Komplexbildung. Um die Anzahl möglicher Rückgratkonformationen dieser Schleife einzuschränken, wurde Gly35 durch Alanin bzw. Prolin ausgetauscht. Die G35A Substitution begrenzt die zu erwartenden Rückgratkonformationen an dieser Position auf negative  $\phi$ -Winkel, lässt die

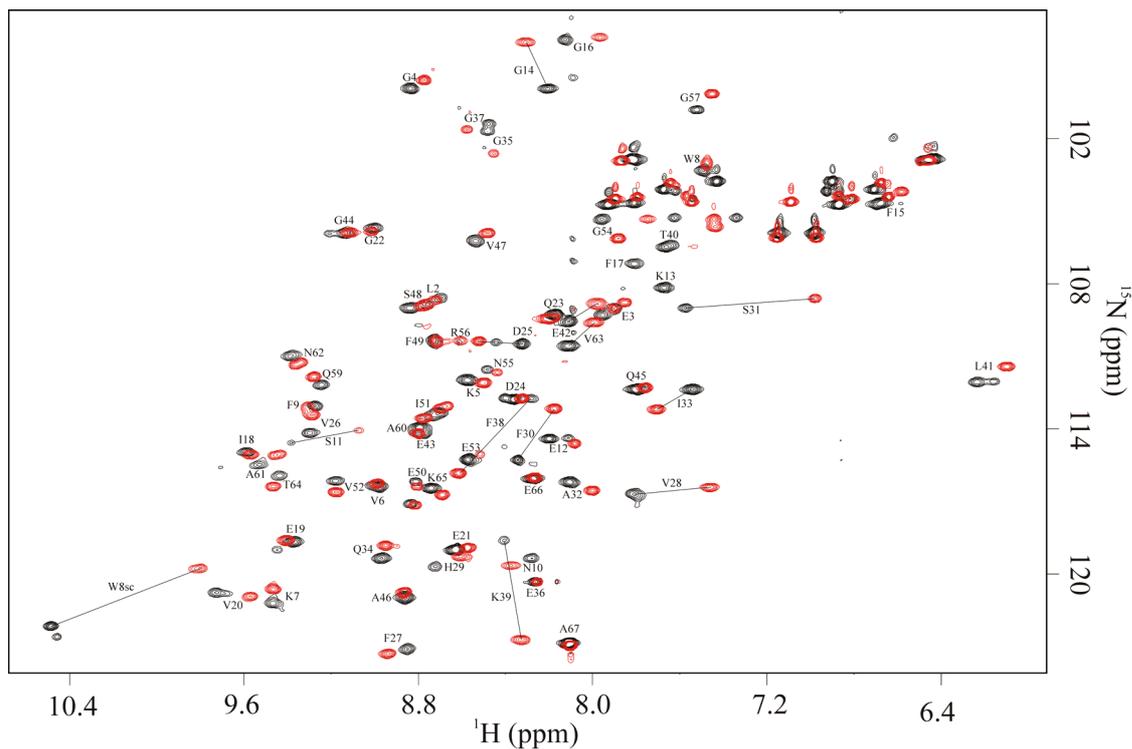
Affinität jedoch unverändert. Eine drastischere Einschränkung durch Einführen eines Prolins führt zu einer 6.5fachen Verringerung der Affinität, die vergleichbar zu Austausch innerhalb der Bindungsmotive RNP1 bzw. RNP2 ((F15A bzw. H29Q, beide 7fach) ist. Äquivalente Aminosäureaustausche wurden für Gly54 in der Schleife zwischen den  $\beta$ -Strängen  $\beta$ 4 und  $\beta$ 5 gemacht. Auch hier lässt die Alanin-Substitution (G54A) den  $K_D$ -Wert nahezu unverändert. Der Austausch G54P führt jedoch nur zu einer 3fachen Reduktion der Affinität, so dass die Einschränkung der möglichen Rückgratkonformationen in der Schleife zwischen  $\beta$ 4 und  $\beta$ 5 nicht so große Auswirkungen auf die Affinität hat, wie dies in der Schleife zwischen  $\beta$ 3 und  $\beta$ 4 der Fall ist. Bestätigt wird dies dadurch, dass die Affinität ebenso unverändert bleibt, wenn die Anzahl der möglichen Rückgratkonformationen erhöht wird (P58A). Zusammenfassend heißt das, dass die Einschränkung konformationeller Freiheit in der Schleife zwischen  $\beta$ 4 und  $\beta$ 5 keinen großen Einfluss auf die Affinität hat, diese jedoch in der Schleife zwischen  $\beta$ 3 und  $\beta$ 4 für eine feste Bindung von CspB an Y-Box25 notwendig ist (Zeeb & Balbach, 2003a).

Um auszuschließen, dass die unterschiedlichen Affinitäten der einzelnen CspB-Varianten auf verschiedene thermodynamische Stabilitäten basieren, wurden thermisch induzierte Entfaltungsübergänge aller Proteinvarianten gemessen. Die Mittelpunkte der thermischen Entfaltung ( $T_m$ ) und die extrapolierten  $\Delta G_U$ -Werte bei 15 °C sind in Tab. 10 zu sehen. Die thermischen Übergänge aller Varianten haben bei 15 °C die Basislinie des nativen Proteins erreicht und zeigen positive  $\Delta G_U$ -Werte. Somit liegen alle Proteinvarianten unter den experimentellen Bedingungen der Titrationsexperimente vollständig nativ vor. Eine Korrelation zwischen der thermodynamischen Stabilität und der Bindungsaffinität konnte nicht gefunden werden.

### 3.2.2 Bindung von Heptathymidat (dT7) an CspB

Aufgrund der schwachen Bindung von Y-Box25 ( $K_D = 4 \mu\text{M}$ ) und der Stöchiometrie von 3:1 (CspB:Y-Box25) wurde nach kürzeren ssDNA-Fragmenten mit einer höheren Affinität gesucht. Da CspB die größte Affinität zu Pyrimidin-reichen Oligonukleotiden besitzt und für die Bindung eines Proteinmoleküls 6-7 Nukleotide benötigt werden (Lopez, *et al.*, 1999b) wurde das ssDNA-Fragment dT7 (5'-TTTTTTT-3') ausgewählt, dessen  $K_D$  bei 2 nM liegt (siehe 3.2.5). Die Titration von CspB mit dT7 wurde ebenfalls anhand von 2D  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  HSQC-Spektren verfolgt. In Abb. 29 ist eine Überlagerung des HSQC-Spektrums des freien und des gebundenen Proteins gezeigt. Die Zuordnung der Kreuzsignale von komplexiertem CspB war

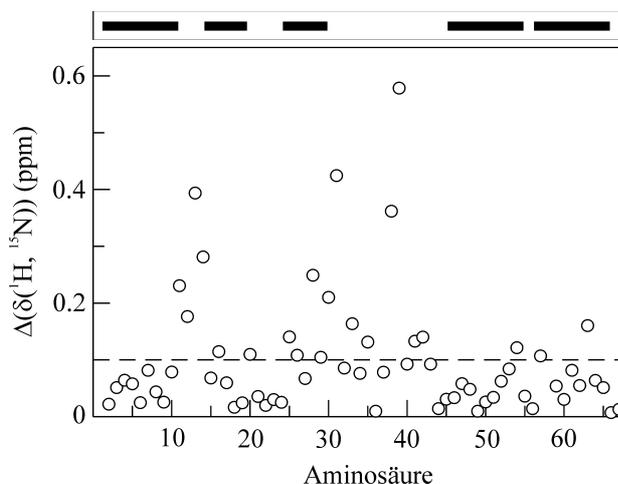
ausgehend von der Zuordnung des freien Proteins direkt möglich, da sich die meisten Amide des Komplexes im schnellen Austausch bezüglich der NMR-Zeitskala befinden. Das bedeutet, dass die Differenz der chemischen Verschiebung der freien und gebundenen Form ( $\Delta\nu$ ) deutlich kleiner ist, als die Austauschrate zwischen dem gebundenen und freien Protein ( $k_{ex}$ ), wodurch die Kreuzsignale während der Titration graduell verrücken. Im Vergleich dazu befinden sich die Rückgratamide der in Abb. 27 gelb eingezeichneten Aminosäuren des CspB/Y-Box25-Komplexes im intermediären Austausch ( $\Delta\nu$  liegt im Bereich von  $k_{ex}$ ), so dass die Kreuzsignale stark verbreiterte Linien aufweisen und dadurch nicht mehr detektierbar waren. Wie beim CspB/Y-Box25-Komplex beschrieben wurden auch beim CspB/dT7-Komplex sieben Kreuzsignale mit extremer Linienverbreiterung bei einem Unterschub an dT7 beobachtet (K13, F17, F30, S31, F38, K39, T40). Bis auf die Amidprotonen von F17 und T40 fand eine Anschärfung der Resonanzlinien im weiteren Verlauf des NMR-Titrationsexperiments statt (Überschub an dT7). Die Zuordnung dieser Kreuzsignale erfolgte sequentiell mit Hilfe von  $^{15}\text{N}$  editierten NOESY- und TOCSY-Spektren (siehe in 3.2.3).



**Abb. 29:** 2D  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  HSQC-Spektrum von freiem (schwarz) und dT7-gebundenem (rot) CspB in 50 mM Nacacodylat/HCl, 3 mM  $\text{MgCl}_2$  pH7.0 bei 15 °C. Die Spektren wurden bei einer CspB-Konzentration von 0.8 mM an einem Bruker DRX500 Spektrometer aufgezeichnet. Die Endkonzentration von dT7 war 1.2 mM.

Der Vergleich der  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  HSQC-Spektren vom freien und komplexierten CspB zeigt, dass nahezu jedes Kreuzsignal eine Änderung der chemischen Verschiebung aufgrund der Komplexbildung erfährt. Die Kreuzsignale von Aminosäuren, die direkt an der Bindung von

CspB an dT7 beteiligt sind oder eine strukturelle Änderung erfahren, besitzen signifikante Unterschiede in den chemischen Verschiebungen. Die Änderung der gemittelten  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  chemischen Verschiebung ( $\Delta(\delta_{\text{MW}}(^1\text{H}, ^{15}\text{N}))$ ) ist in Abb. 30 dargestellt. Die größten Unterschiede in  $\Delta(\delta_{\text{MW}}(^1\text{H}, ^{15}\text{N}))$  sind sowohl im Bereich der beiden Bindungsmotive RNP1 (K13, G14, G16, V20) und RNP2 (V26, V28, H29, F30) als auch in der Schleife zwischen den beiden Subdomänen (G35, F38, K39) zu finden. Diese Aminosäurereste sind wichtig für die Wechselwirkung von CspB mit dT7 und stimmen gut mit den zuvor identifizierten Positionen für die Bindung an Y-Box25 (3.2.1) überein. Daher sind diese Reste von erheblicher Bedeutung für die ssDNA-Bindung von CspB.

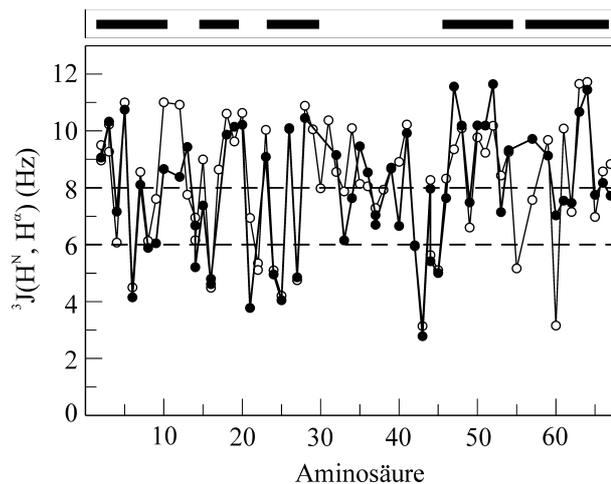


**Abb. 30:** Änderung der gewichteten  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  chemischen Verschiebung ( $\Delta(\delta_{\text{MW}}(^1\text{H}, ^{15}\text{N}))$ ) bei der Bindung von CspB an dT7.  $\Delta(\delta_{\text{MW}}(^1\text{H}, ^{15}\text{N}))$  wurde mit  $\Delta(\delta_{\text{MW}}(^1\text{H}, ^{15}\text{N})) = (((\delta(^1\text{H}))^2 + 1/25(\delta(^{15}\text{N}))^2)/2)^{0.5}$  berechnet (Grzesiek *et al.*, 1996). Die gestrichelte Linie stellt die Standardabweichung der gemittelten gewichteten Änderung der chemischen Verschiebung dar. Die Balken stehen für die fünf  $\beta$ -Faltblattstränge von freiem CspB. Die beiden Bindungsmotive RNP1 und RNP2 reichen von K13 bis V20 und von V26 bis H29.

### 3.2.3 Bestimmung der Tertiärstruktur von CspB im Komplex mit dT7

Die Zuordnung der Resonanzen von CspB im Komplex mit dem ssDNA-Fragment dT7 erfolgte auf Grundlage der Zuordnung des freien Proteins (Schnuchel, 1995). Unter Annahme, dass die Aminogruppe des N-Terminus keine Resonanz liefert und CspB ein Prolin enthält, sind theoretisch 65 Kreuzsignale für die Rückgratamide in einem 2D  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  Korrelationspektrum zu erwarten. Wie in 3.2.2 beschrieben, konnten 58 Kreuzsignale von Rückgratamiden im 2D  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  HSQC durch das graduelle Verrücken während des NMR-Titrationsexperiments identifiziert werden. Basierend auf der Zuordnung der Rückgratamide wurden dann mit einem 3D  $^{15}\text{N}$ -editierten NOESY- bzw. TOCSY-HSQC die Seitenketten-Protonen zugeordnet. Daraufhin konnten durch sequentielle Zuordnung noch fünf weitere Aminosäuren identifiziert werden, so dass bis auf M1, F17, T40 und P58 für insgesamt 63

Spinsysteme die Zuordnung erhalten wurde. Erste Hinweise auf die Sekundärstruktur von CspB im Komplex mit dT7 konnten durch die Bestimmung der skalaren  ${}^3J(\text{H}^{\text{N}}, \text{H}^{\alpha})$ -Kopplung aus einem 3D HNHA-Experiment (Abb. 9) gewonnen werden. Dies erfolgte mit Hilfe von Gl. 29 und des Intensitätsverhältnisses zwischen Diagonalsignal ( $\text{H}^{\text{N}}$ ) und Kreuzsignal ( $\text{H}^{\alpha}$ ). Für  $\alpha$ -helikale Bereiche ergeben sich meist Kopplungskonstanten kleiner 6 Hz, wogegen für  $\beta$ -Faltblattstrukturen oft  ${}^3J(\text{H}^{\text{N}}, \text{H}^{\alpha}) > 8$  Hz vorliegen. Ein Vergleich der Kopplungskonstanten von freiem und gebundenem CspB ist in Abb. 31 gegeben.

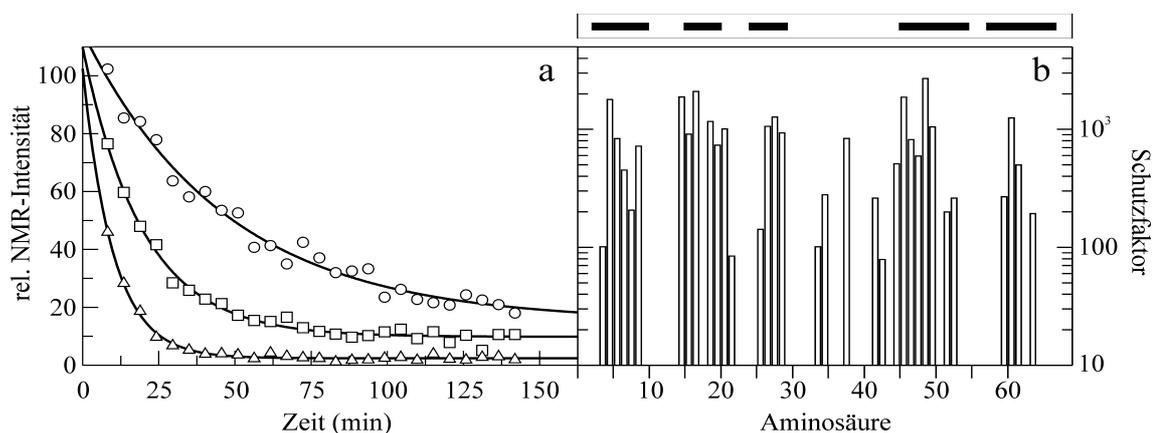


**Abb. 31:** Skalare  ${}^3J(\text{H}^{\text{N}}, \text{H}^{\alpha})$ -Kopplungskonstanten von (○) freiem und (●) dT7-gebundenem CspB die aus je einem 3D HNHA-Experiment erhalten wurden (Abb. 9). Die Balken repräsentieren die fünf  $\beta$ -Faltblattstränge des freien Proteins (Schnuchel *et al.*, 1993; Schindelin *et al.*, 1993).

Die  ${}^3J(\text{H}^{\text{N}}, \text{H}^{\alpha})$  von CspB im Komplex mit dT7 unterscheiden sich nur geringfügig von denen im freien Protein. Dies deutet darauf hin, dass die Sekundärstruktur von CspB nach der Bindung an das ssDNA-Fragment dT7 nahezu unverändert bleibt. Dies bestätigen auch Fern-UV CD-Spektren von CspB im Komplex mit Y-Box25, die eine *all*- $\beta$ -Struktur des Proteins vorhersagen und eine Linearkombination aus freiem Protein und freier ssDNA darstellten (Zeeb, 2000). Insgesamt konnten aus dem HNHA-Spektrum 60  ${}^3J(\text{H}^{\text{N}}, \text{H}^{\alpha})$ -Kopplungskonstanten für CspB im Komplex mit dT7 bestimmt werden, wovon 35 als Beschränkungen der  $\phi$ -Winkel zum Einsatz kamen (Tab. 11). Zusätzliche Hinweise auf die Sekundärstrukturelemente konnten durch sekundärstrukturtypische Kreuzsignale in NOESY-Experimenten erhalten werden. Die starken sequentiellen  $\text{H}^{\alpha}(i)$ - $\text{H}^{\text{N}}(i+1)$ -Kreuzsignale sind charakteristisch für  $\beta$ -Faltblattstrukturen.

Zur Identifizierung von möglichen Wasserstoffbrücken wurde der lyophilisierte Komplex von  ${}^{15}\text{N}$  markiertem CspB und dT7 in  ${}^2\text{H}_2\text{O}$  gelöst und eine Serie von 2D  ${}^1\text{H}/{}^{15}\text{N}$  HSQC-Experimenten aufgezeichnet. Die gemittelte Austauschrate beträgt  $0.2 \text{ min}^{-1}$  so dass als

langsamer austauschende Amidprotonen ( $k_{\text{ex}} < 0.2 \text{ min}^{-1}$ ) L2, G4, V6, W8, G14, F15, G16, I18, E19, V20, V26, F27, V28, Q45, V47, S48, F49, I51, V52, A60 identifiziert wurden, die als mögliche Donoren für Wasserstoffbrücken dienen können. In Abb. 32a sind exemplarisch die Austauschkinetiken von V20, V47 und I51 gezeigt, während in Abb. 32b die Schutzfaktoren der Rückgratamide enthalten sind. Der Schutzfaktor stellt sowohl ein Maß für die lokale Struktur und Stabilität als auch für globale Entfaltungsreaktionen dar.

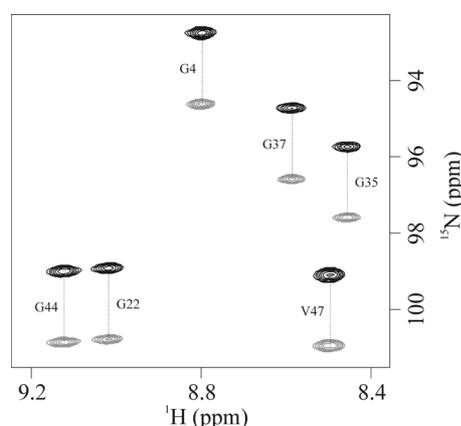


**Abb. 32:** Amidprotonenaustausch von dT7-gebundenem CspB. (a) Kinetik des  $\text{H}^2\text{H}$ -Austausches von (○) V20, (□) V47 und (△) I51. Die Anpassung einer monoexponentielle Funktion an die Kinetiken liefern Raten von  $0.021 \pm 0.002 \text{ min}^{-1}$ ,  $0.051 \pm 0.002 \text{ min}^{-1}$  und  $0.101 \pm 0.003 \text{ min}^{-1}$  für V20, V47 und I51 (b) Schutzfaktoren von CspB im Komplex mit dT7. Die schwarzen Balken repräsentieren die Sekundärstruktur des freien Proteins.

Amidprotonen, die sich in den  $\beta$ -Faltblattsträngen von CspB befinden, besitzen höhere Schutzfaktoren, da diese vermutlich als Donoren in Wasserstoffbrücken involviert sind. In den Schleifenregionen zeigen die meisten Amidprotonen entweder keinen Schutz vor dem  $^1\text{H}/^2\text{H}$ -Austausch oder weisen niedrigere Schutzfaktoren auf. Eine Ausnahme stellt das Amidproton von F38 dar, welches wahrscheinlich durch die Wechselwirkung mit dT7 den höchsten Schutzfaktor innerhalb der Schleifenregionen hat. In 3.2.7 wird näher auf die Bedeutung der Schutzfaktoren eingegangen sowie ein Vergleich mit dem Austauschverhalten des freien Proteins gezogen.

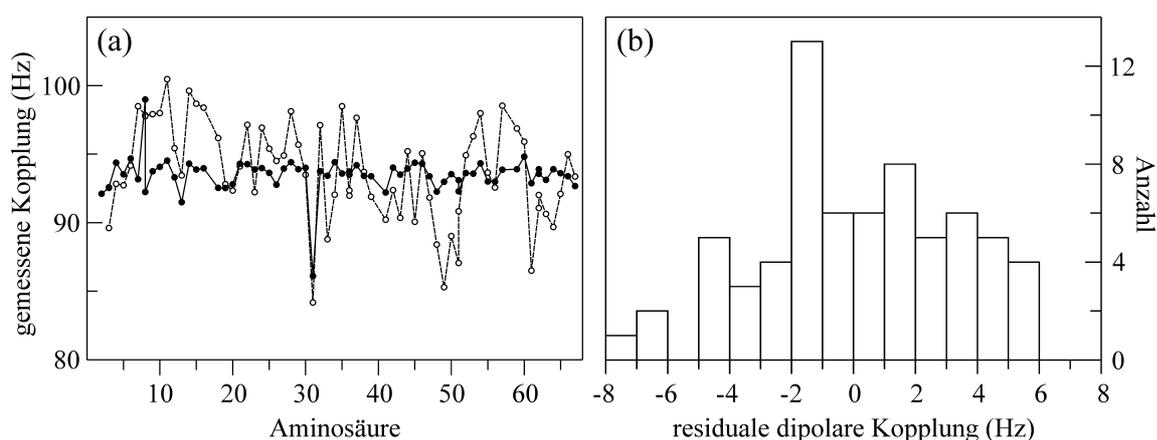
Zusätzliche strukturelle Informationen wurden über die Messung der residualen dipolaren Kopplung (RDC) zwischen Amidproton und Amidstickstoff in teilweise orientierenden Medien, wie z.B. Bicellen oder Phagen, erhalten. Die RDC gibt Aufschluss über die räumliche Orientierung der N-H-Vektoren bzgl. des Orientierungstensors des Proteins. Zur Bestimmung der residualen dipolaren Kopplungen wurden 2D  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  Korrelationsspektren ohne Entkopplung in der  $^{15}\text{N}$ -Dimension in An- bzw. Abwesenheit von PF1-Phagen aufgenommen, so dass eine Aufspaltung aufgrund der skalaren  $^1J(^1\text{H}, ^{15}\text{NH})$ -Kopplung erfolgt. Abb. 33 zeigt einen solchen Ausschnitt aus einem 2D  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  HSQC ohne  $^{15}\text{N}$ -

Entkopplung von CspB im Komplex mit dT7. Wie in 2.5.1 beschrieben wurden mögliche Signalüberlagerungen durch die separate Aufzeichnung von Spektren mit nur jeweils einer Komponente des Dupletts vermieden (Abb. 10).



**Abb. 33:** Ausschnitt aus einem  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  HSQC Spektrum von CspB/dT7 ohne  $^{15}\text{N}$ -Entkopplung in Abwesenheit von teilweise orientierenden Medien. Die schwarzen bzw. grauen Kreuzsignale wurden getrennt voneinander aufgezeichnet um Signalüberlagerungen zu vermeiden.

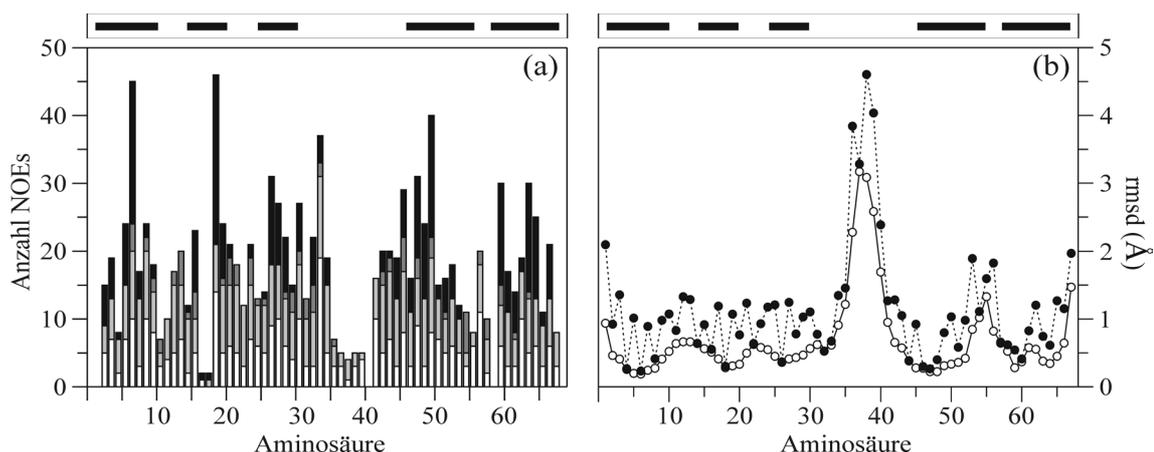
Die gemessene Aufspaltung in An- bzw. Abwesenheit der teilweise orientierenden PF1-Phagen (18 mg/ml) ist in Abb. 34a gezeigt. In Abwesenheit der PF1-Phagen liegen fast alle  $^1J(\text{H}^{\text{N}},\text{N})$  Kopplungen um 93 Hz, was dem publizierten Durchschnittswert entspricht (Bystrov, 1976). Befindet sich der CspB/dT7-Komplex im teilweise orientierenden Medium mittelt sich die RDC nicht mehr aus und trägt additiv zur Aufspaltung durch die skalare Kopplung bei.



**Abb. 34:**  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  residuale dipolare Kopplungen von CspB im Komplex mit dT7. (a) Aufspaltung der Kreuzsignale in der  $^{15}\text{N}$ -Dimension in (○) An- und (●) Abwesenheit der teilweise orientierenden PF1-Phagen. (b) Histogramm der residualen dipolaren Kopplungen, die sich aus der Differenz der Aufspaltung der Kreuzsignale im 2D  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  HSQC ohne  $^{15}\text{N}$ -Entkopplung in An- und Abwesenheit von teilweise orientierenden PF1-Phagen (Gl. 30) errechnen.

Durch die Subtraktion der Aufspaltung der beiden Kreuzsignale im Spektrum in An- bzw. Abwesenheit der PF1-Phagen wurden die residualen dipolaren Kopplungen mit Gl. 30 berechnet. Insgesamt wurden 65 residuale dipolare Kopplungen erhalten, von denen 61 in die Strukturrechnung zur Verfeinerung eingegangen sind und deren Verteilung in dem Histogramm in Abb. 34b zusammengefasst ist. Die hier gezeigten Parameter spielen bei der Strukturrechnung nur eine untergeordnete Rolle und werden oft zur Verfeinerung eingesetzt.

Die Bestimmung der Tertiärstruktur von CspB im Komplex mit dT7 basiert jedoch hauptsächlich auf Abstandsrandbedingungen, die durch die Zuordnung von NOE-Kreuzsignalen in 2D und 3D NOESY-Spektren erhalten wurden. Diese Zuordnung erfolgte iterativ durch Kombination der NOESY-Spektren mit den Moleküldynamikrechnungen, die von Prof. H. Sticht durchgeführt wurden. Zu Beginn gingen nur eindeutig zugeordnete interresiduale NOE-Kreuzsignale als Abstandsrandbedingungen ein. Im weiteren Verlauf der Strukturrechnung wurden dann weitere Abstandsrandbedingungen auf Grundlage von NOE-Kreuzsignalen sowie dihedrale Beschränkungen ( ${}^3J(\text{H}^{\text{N}}, \text{H}^{\alpha})$ ) hinzugefügt. Später wurden dann die Akzeptoren der Wasserstoffbrückenbindungen (Carbonyl-Sauerstoff) identifiziert, sofern der Abstand zum Donor-Amidproton geringer als 2.3 Å und der O...H-N-Winkel größer als 120° ist. In den letzten Zyklen der Strukturrechnung erfolgte die Verfeinerung der Tertiärstruktur unter Verwendung der residualen dipolaren Kopplungen. Die Verteilung der Abstandsrandbedingungen, die von NOE-Kreuzsignalen abgeleitet wurden, ist für jede Aminosäure in Abb. 35a wiedergegeben. Die Einteilung der NOEs erfolgte wie in Tab. 11,



**Abb. 35:** Verteilung der Abstandsrandbedingungen und Schwankung der Atomkoordinaten (*rmsd*-Wert) entlang der Aminosäuresequenz. (a) Distanzbeschränkungen für jede Aminosäure unterteilt in intrareiduale NOEs (weiß), sequentielle NOEs (hellgrau), NOEs mittlerer Reichweite ( $|i-j| < 5$ ) (dunkelgrau) und weitreichende NOEs (schwarz). Eine Zusammenfassung der Abstandsrandbedingungen ist in Tab. 11 enthalten. (b) Schwankung der Atomkoordinaten der (○) Rückgratotope und (●) aller schweren Atome der einzelnen Aminosäuren. Für die Überlagerung der 20 energieminierten Strukturen ergibt sich ein *rmsd*-Wert von 0.68 Å bzw. 1.14 Å für die Rückgratotope bzw. alle schweren Atome.

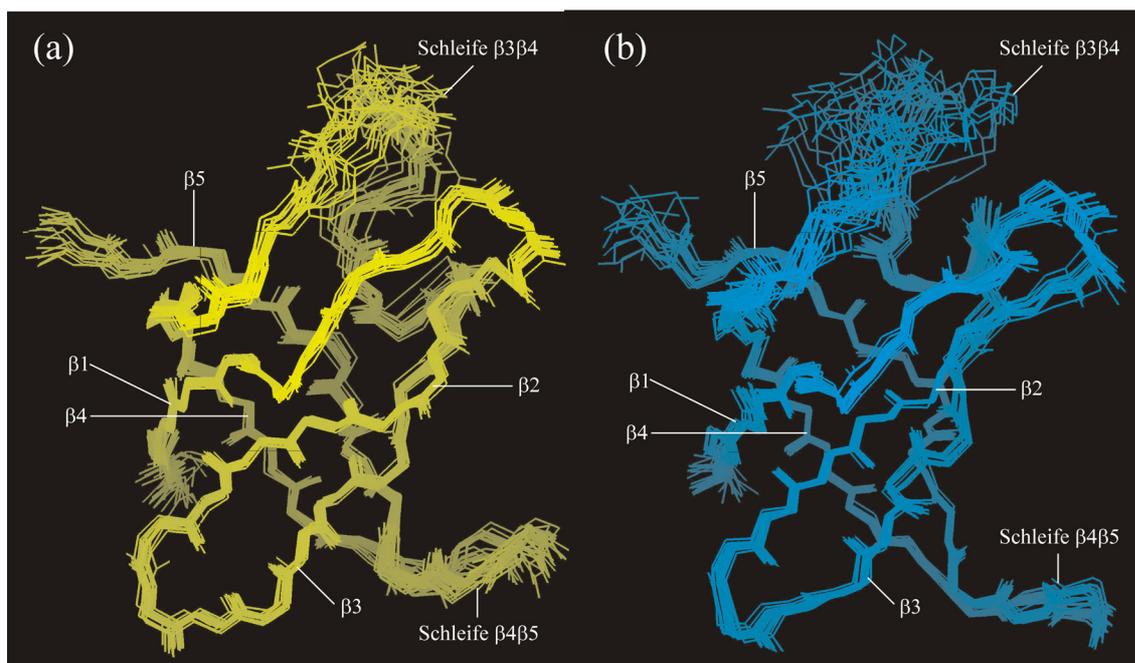
die alle experimentellen Randbedingungen zur Strukturrechnung zusammenfasst. Insgesamt konnten 874 konformationelle Einschränkungen eingesetzt werden.

Die Schwankungen der Atomkoordinaten der Rückgratome bzw. aller schweren Atome der einzelnen Aminosäuren in den 20 energieminierten Strukturen von CspB im Komplex mit dT7 ist in Abb. 35b gezeigt. Die Überlagerung der Strukturen ergibt eine mittlere Abweichung (*rmsd*) von 0.68 Å für die Rückgratome und 1.14 Å für alle schweren Atome.

**Tab. 11:** Verteilung der experimentell abgeleiteten Randbedingungen zur Berechnung der Tertiärstruktur von CspB im Komplex mit dem ssDNA-Fragment dT7

Interresiduale NOEs			
	sequentiell	( $ i-j  = 1$ )	215
	mittelweitreichend	( $ i-j  < 5$ )	42
	weitreichend	( $ i-j  \geq 5$ )	149
Intraresiduale NOEs			359
Dihedrale Beschränkungen $^3J(\text{H}^N, \text{H}^\alpha)$			35
Dipolare Kopplungen			61
Wasserstoffbrücken			13

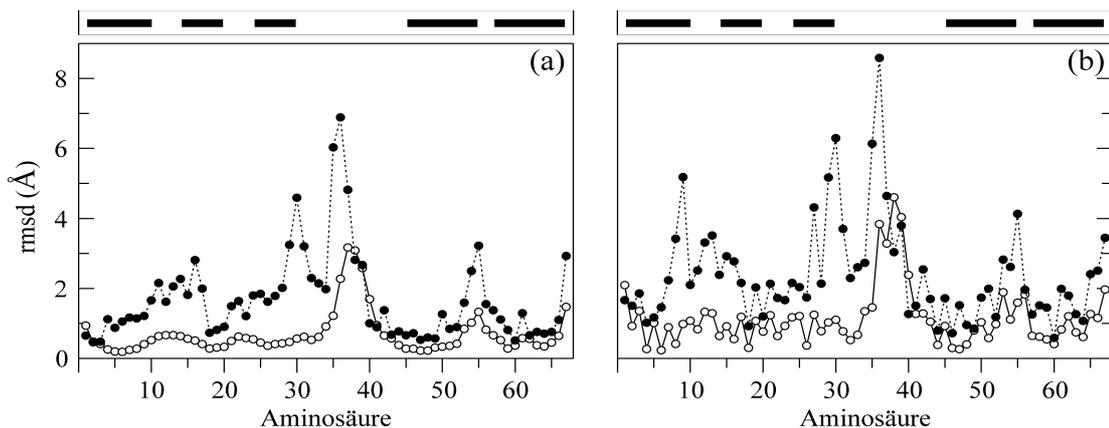
Die dreidimensionale Struktur von CspB im Komplex mit dem ssDNA-Fragment dT7 ist in Abb. 36a dargestellt. Sie besteht hauptsächlich aus einem fünfsträngigen antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt (L2-N10, F15-E19, D24-H29, A46-G54, G57-K65), das eine  $\beta$ -Faßstruktur bildet.



**Abb. 36:** Überlagerung der Proteinrückgrate der 16 energetisch günstigsten Strukturen von (a) CspB im Komplex mit dT7 und (b) freiem CspB (Schnuchel *et al.*, 1993) für die Bereiche regulärer Sekundärstruktur.

Im Vergleich zur Sekundär- und Tertiärstruktur des freien Proteins (Abb. 36b) sind nur geringe Unterschiede bezüglich des Proteinerückgrats zu erkennen.

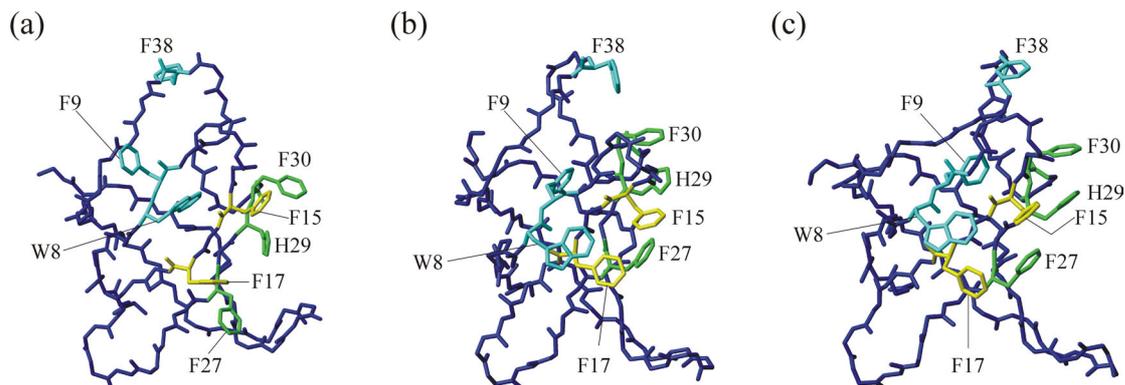
Diese Veränderungen zeigen sich hauptsächlich in den flexiblen Bereichen des Proteins (siehe Dynamikstudie in 3.2.6). So weisen die Konformationen der langen Schleife zwischen den beiden  $\beta$ -Faltblattsträngen  $\beta 3$  und  $\beta 4$  im komplexierten CspB eine etwas geringere Streuung auf. Die Schleife zwischen den  $\beta$ -Faltblattsträngen  $\beta 4$  und  $\beta 5$  im Bereich von Arg56 ist um ca.  $25^\circ$  nach oben gedreht. Diese Unterschiede werden deutlich, wenn die Schwankungen der Atomkoordinaten in den Strukturscharen des freien und dT7- gebundenen CspB überlagert werden (Abb. 37). Zusätzliche Änderungen erfolgen demzufolge im Bereich der beiden Bindungsmotive RNP1 (K13-V20) und RNP2 (V26-F30) sowie im Bereich um W8 und F9, die ebenfalls an der Bindung der ssDNA beteiligt sind. Da diese hohen *rmsd*-Werte bei dem Vergleich aller schweren Atome (Abb. 37b) ausgeprägter sind liegt der Schluss nahe, dass die strukturellen Veränderungen überwiegend innerhalb der Seitenketten zu finden sind.



**Abb. 37:** Unterschiede der Tertiärstruktur von freiem und dT7-gebundenem CspB. Schwankungen der Atomkoordinaten der (a) Rückgratatom und (b) aller schweren Atome. (○) Schwankungen der Atomkoordinaten innerhalb der Strukturschar von komplexiertem CspB, (●) Schwankung der Atomkoordinaten zwischen der gemittelten Struktur von CspB im Komplex mit dT7 und der NMR-Struktur (1NMF) (Schnuchel *et al.*, 1993).

Die Lage und Orientierung der meisten aromatischen Seitenketten von CspB lassen deutliche Unterschiede zwischen der freien und gebundenen Konformation erkennen. Die aromatischen Seitenketten von W8, F15, F17, F27, H29, F30 und F38 sind solvensexponiert und sehr wichtig für die Bindung der Nukleinsäure (3.2.1 und 3.2.5). Bei der Bindung wird diese kompakte hydrophobe Oberfläche teilweise aufgelöst bzw. über einen größeren Teil der Oberfläche verteilt, um eine bessere Wechselwirkung mit der ssDNA zu ermöglichen. Der Vergleich der räumlichen Anordnung dieser Reste im komplexierten und im freien Protein ist in Abb. 38 gezeigt. Dabei sind einige geringfügige Unterschiede in der Lage der aromatischen

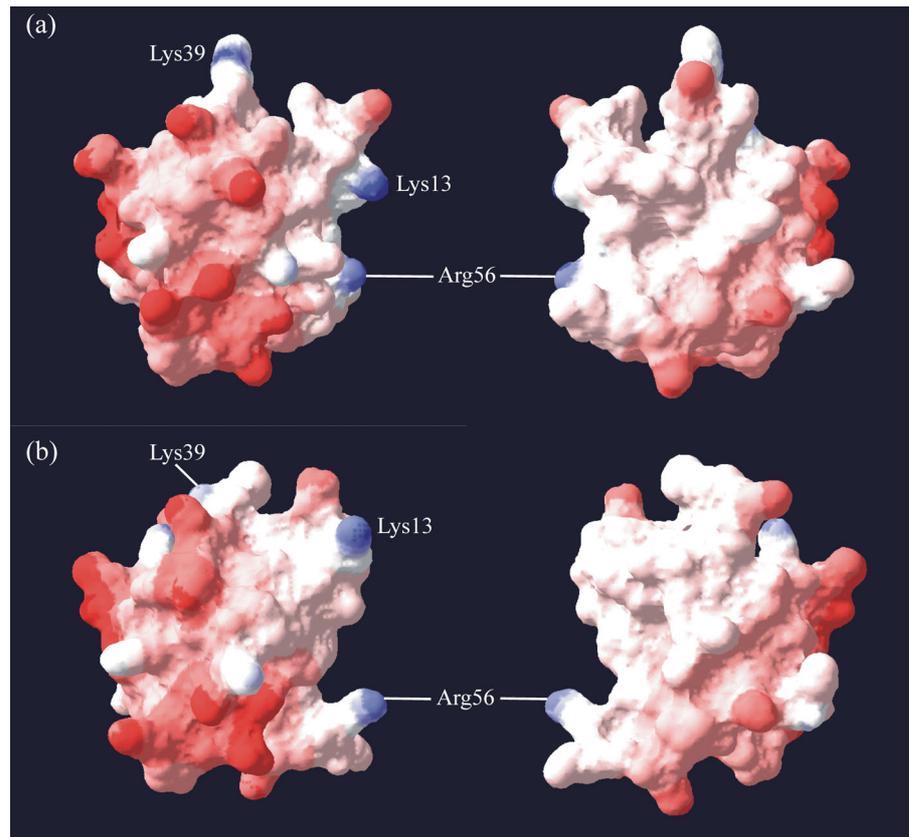
Seitenketten zwischen der NMR-Struktur und der Kristallstruktur des freien Proteins zu finden (Abb. 38b, c). Die Orientierung der langen Schleife zwischen den  $\beta$ -Faltblattsträngen  $\beta_3$  und  $\beta_4$  weist jedoch größere Abweichungen auf. Im Bindungsmotiv RNP1 kommt es bei der Bindung zu einer 90°-Drehung des Phenylrings von F17, während F15 eine geringere Veränderung spürt. Auch im RNP2-Bindungsmotiv kommt es zu einer großen und kleineren Drehung zweier Seitenketten (F27 bzw. H29). Die Seitenkette von F9 erfährt eine Drehung aus dem Proteininneren und erweitert somit die zugängliche hydrophobe Oberfläche. Der Indolring von Trp8 wird bei der Bindung ebenfalls gedreht (siehe Abb. 38a). In der langen Schleife zwischen  $\beta_3$  und  $\beta_4$  zeigt der Phenylring von F38 nach der Bindung in die entgegengesetzte Richtung. Neben der veränderten Lage der aromatischen Seitenketten ist auch hier die Drehung der Schleifenregion zwischen den  $\beta$ -Faltblattsträngen  $\beta_4$  und  $\beta_5$  deutlich erkennbar. Sie enthält R56, dem eine untergeordnete Rolle bei der Interaktion mit der Nukleinsäure zugesprochen wurde (Schröder, *et al.*, 1995). Allerdings deuten erste Rechnungen zur Modellierung der Komplexstruktur darauf hin, dass R56 direkt mit dT7 interagiert (Abb. 40).



**Abb. 38:** Vergleich der Konformation der Lösungsmittel-exponierten aromatischen Aminosäureseitenketten im (a) dT7-gebundenem und (b), (c) freien Zustand. In (b) ist die gemittelte NMR-Struktur (Schnuchel *et al.*, 1993) und in (c) die Kristallstruktur (Schindelin *et al.*, 1993) von CspB dargestellt. Farblich hervorgehoben wurden die aromatischen Aminosäuren der beiden konservierten Bindungsmotive RNP1 (F15, F17) in gelb und RNP2 (F27, H29, F30) in grün sowie W8, F9 und F38 in cyan. Für die Abbildung wurde das Programm MolMol und die PDB-Einträge (b) 1NMG und (c) 1CSP verwendet. Es wurden nur die Schweratome dargestellt.

Die veränderte Orientierung der Schleifen zwischen den  $\beta$ -Faltblattsträngen  $\beta_4$  und  $\beta_5$  bzw.  $\beta_3$  und  $\beta_4$  und den darin enthaltenen geladenen Aminosäureseitenketten (E53, R56 bzw. E36, K39, E42, E43) ergeben Konsequenzen für die elektrostatische Oberfläche von CspB im Komplex mit dT7. In Abb. 39 ist die elektrostatische Oberfläche von freiem und komplexiertem CspB dargestellt. Die Umorientierung der beiden Schleifen bewirkt eine veränderte Lage der positiv bzw. negativ geladenen Seitengruppen von CspB im dT7-

gebundenen Zustand. Dabei sind vor allem die beiden positiv geladenen Seitengruppen von Lys13 und Lys39 sowie Arg56 hervorzuheben, wobei Lys13 und Lys39 an der Interaktion mit der Nukleinsäure direkt beteiligt sind (Schröder, *et al.*, 1995). Die negativ geladenen Seitengruppen zeigen von der ssDNA-Bindungsstelle weg, so dass im Bindungsbereich eine elektrostatische Abstoßung mit dem Phosphodiester-Rückgrat der ssDNA vermieden wird. Weiß eingefärbte Bereiche repräsentieren die zugängliche hydrophobe Oberfläche, die für die Wechselwirkung von CspB mit dT7 essentiell sind (siehe 3.2.1 und 3.2.5).



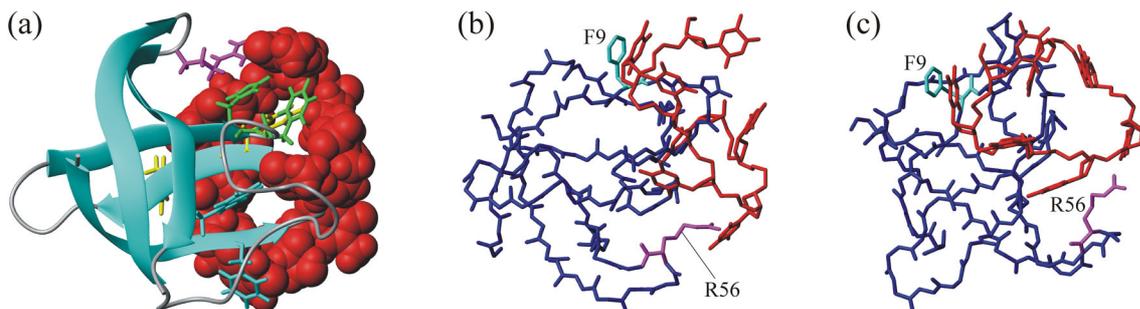
**Abb. 39:** Vergleich der elektrostatischen Oberfläche von CspB im (a) dT7-gebundenen und (b) freien Zustand. Blau bzw. rot repräsentieren positiv bzw. negativ geladene Bereiche des Proteins. Aminosäuren mit positiv geladenen Seitenketten, die an der Bindung des ssDNA-Fragments beteiligt sind, wurden gekennzeichnet. Die Orientierung auf der rechten Seite wurde durch Drehung der Orientierung auf der linken Seite um 180° erhalten. Die Orientierung entspricht der in Abb. 38. Die Abbildung wurde mit dem Programm SwissProt-PDB-Viewer (Glaxco Wellcome) erstellt. Die Berechnung der Ladungsverteilung wurde mit einer Dielektrizitätskonstante ( $\epsilon$ ) des Proteins von 2 und einer  $\epsilon$  des Lösungsmittels von 80 bei einer Ionenstärke von 100 mM NaCl durchgeführt.

Die Umorientierung der beiden Schleifen scheint auch zu einer geringen Kompaktierung des Proteins bei der Bindung zu führen. Deutlich wird dies an der Schleife in der sich R56 befindet. Diese steht im freien CspB weit heraus (Abb. 39b) und packt durch die Bindung auf die Oberfläche des Proteins. Insgesamt bleibt die räumliche Ausdehnung jedoch nahezu unbeeinflusst von der Komplexbildung, was aus NMR-Diffusions- und  $^{15}\text{N}$ -

Relaxationsmessungen geschlossen werden kann. Der hydrodynamische Radius ( $R_H$ ) von  $13.5 \pm 0.3 \text{ \AA}$  entspricht nahezu dem in 3.1.4 erhaltenen  $R_H$  von freiem CspB (Tab. 9). Desweiteren ist die Rotationskorrelationszeit von CspB im Komplex mit dT7 (siehe Abschnitt 3.2.6) nur geringfügig kleiner als die in Abschnitt 3.1.2 bestimmte  $\tau_m$  des freien Proteins.

### 3.2.4 Modellierung der Struktur des CspB/dT7-Nukleoproteinkomplexes

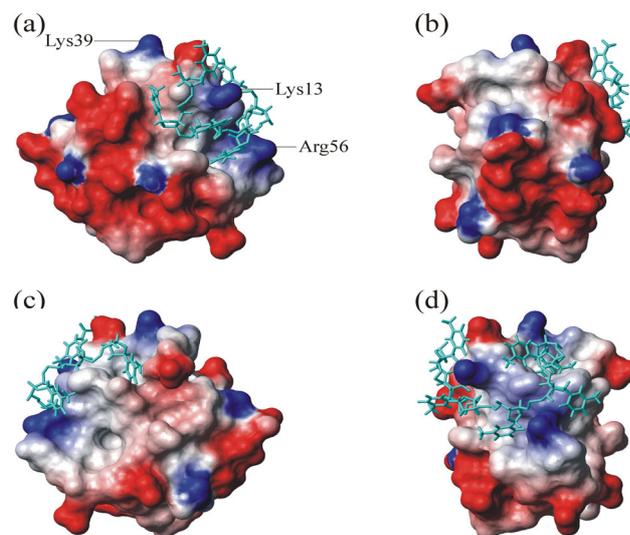
Die Bestimmung der Tertiärstruktur des Nukleoproteinkomplexes ist nicht möglich, da das ssDNA-Fragment dT7 sowohl in der freien als auch in der gebundenen Form nur eine sehr geringe Dispersion der  $^1\text{H}$  chemischen Verschiebung aufweist. Aufgrund der degenerierten Sequenz konnte auch keine sequentielle Zuordnung durchgeführt werden. Zudem erschwerte die hohe Dynamik der Assoziation und Dissoziation der Nukleinsäure die Identifizierung intermolekularer NOEs, die essentiell für die Berechnung der Struktur des Komplexes sind. So wurden in  $^{13}\text{C}$ -editierten Halbfilterexperimenten (Abb. 11) keine intermolekularen NOEs detektiert. Dies war auch der Fall für einen CspB/dT7-Komplex, in dem  $^{15}\text{N}$ -markiertes Protein mit teilweise deuterierten Seitenketten (Deuterierungsgrad ca. 70%) vorlag. Der Vergleich des  $^{15}\text{N}$ -gefilterten NOESY-Spektrums in An- und Abwesenheit von dT7 enthielt keine zusätzlichen NOE-Kreuzsignale, die von räumlich nahen Protonen zwischen Protein und Nukleinsäure herrühren. Dies ist auch der Fall für  $^{15}\text{N}$ -entkoppelte NOESY-Spektren, wobei der Bereich der aliphatischen Protonen trotz teilweiser Deuterierung noch stark überlagert war, so dass hier keine klare Aussage getroffen werden konnte. Lediglich ein 2D



**Abb. 40:** Wechselwirkungen im modellierten CspB/dT7-Komplex. Die Berechnung der Struktur des Komplexes erfolgte mit dem Programm HADDOCK (Dominguez *et al.*, 2003) auf der Grundlage der Struktur von gebundenem CspB, intermolekularer NOEs und zusätzlicher mehrdeutiger Randbedingungen (AIR, siehe Text). (a) Bänderdarstellung von CspB im Komplex mit dT7, das raumerfüllt abgebildet wurde. Für die Interaktion wichtige Aminosäureseitenketten sind farblich hervorgehoben (cyan: W8, F9; gelb: F15, F17; grün: H29, F30; magenta: R56). (b) Darstellung des Proteinrückgrats (blau) und des ssDNA-Fragments dT7 (rot). Die Seitenketten die für die Stapel-Wechselwirkung von F9 mit Thy2 sowie für mögliche Wasserstoffbrücken zwischen R56 und Thy5 verantwortlich sind, wurden eingezeichnet. (c) Abbildung äquivalent zu (b) jedoch in der Orientierung wie in Abb. 38. Die Abbildung wurde mit MolMol erstellt (Koradi *et al.*, 1996).

$^{13}\text{C}/^{15}\text{N}(\omega_2)$  gefiltertes NOESY-Experiment (Abb. 12) ermöglichte die Identifizierung einiger weniger intermolekularer NOEs zu drei unterschiedlichen Thyminen.

Mit dem Programm HADDOCK (*high ambiguity driven docking*) ist es möglich Komplexe aus Makromolekülen mit Hilfe biochemischer bzw. biophysikalischen Daten zu modellieren (Dominguez, *et al.*, 2003). Dies können Informationen aus NMR-Titrationsexperimenten, Änderung der chemischen Verschiebung oder Mutationsanalysen sein. Für die Charakterisierung der Interaktion zwischen dem ssDNA-Fragment dT7 und CspB wurden sowohl NMR-Titrationsexperimente (Abb. 29) als auch die Änderung der chemischen Verschiebung bei der Komplexbildung (Abb. 30) analysiert. Zusätzliche Informationen konnten über den Vergleich des Amidprotonenaustauschs (Abb. 32) und durch ortsgerechte Mutagenese (3.2.5) erhalten werden. Aus diesen Informationen wurden dann mehrdeutige Interaktionsrandbedingungen (*ambiguous interaction restraints*, AIR) gewonnen. Mit diesen AIR, der Struktur von CspB im Komplex mit dT7 und einer randomisierten Struktur von dT7 wurden erste Berechnungen der Struktur des Nukleoproteinkomplexes von Prof. A. Bonvin (Universität Utrecht, Niederlande) durchgeführt.



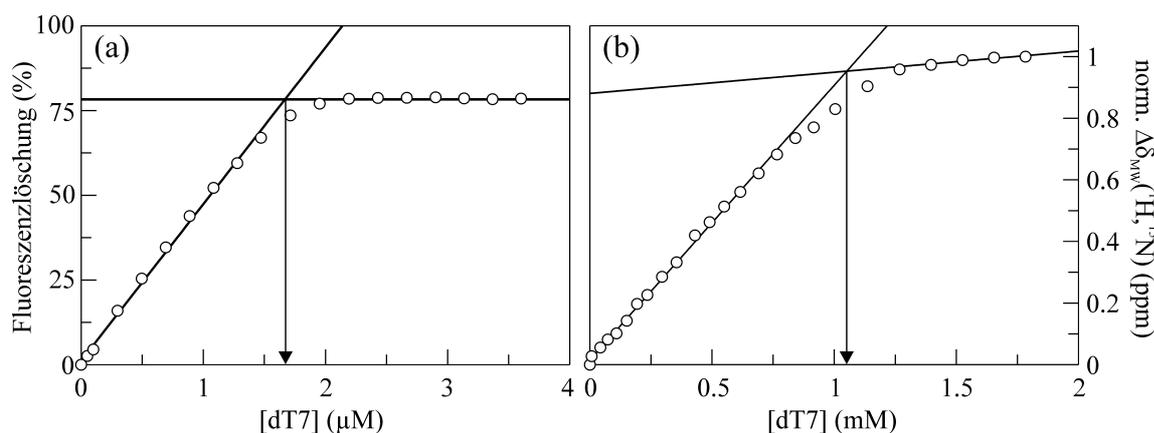
**Abb. 41:** Elektrostatische Oberfläche von CspB und Konformation von dT7 im modellierter CspB/dT7-Komplex. Die Simulationen wurden mit dem Programm HADDOCK durchgeführt (Dominguez *et al.*, 2003). Dafür verwendete Randbedingungen sind im Text beschrieben. Bereiche positiver bzw. negativer Ladungsdichte von CspB wurde blau bzw. rot eingefärbt und hydrophobe Bereiche erscheinen weiß. Die Konformation von dT7 wurde in cyan dargestellt. Zwischen (a), (b), (c) und (d) liegt jeweils eine  $90^\circ$ -Drehung. Die Orientierung von CspB entspricht der Orientierung in Abb. 38. Die Interaktion zwischen CspB und dT7 ist auf die positiv geladenen und hydrophoben Bereiche begrenzt. Bereiche negativer Ladungsdichte sind ausschließlich auf der entgegengesetzten Seite des Proteins zu finden. Die Berechnung der Ladungsverteilung wurde mit einer Dielektrizitätskonstante ( $\epsilon$ ) des Proteins von 2 und einer  $\epsilon$  des Lösungsmittels von 80 bei einer Ionenstärke von 100 mM NaCl durchgeführt. Die Abbildung wurde mit MolMol erstellt (Koradi, *et al.* 1996).

Zusätzlich zu den oben erwähnten AIRs wurden intermolekulare NOEs als Abstandsrandbedingungen herangezogen. Für diese zugeordneten Protonen des Proteins wurden ebenfalls mehrere Wechselwirkungspartner in der ssDNA angenommen. Abb. 40 zeigt ein Ergebnis der Modellierung. Einige mögliche Interaktionen zwischen CspB und dT7 wurden herausgestellt. Die räumliche Orientierung der ssDNA bezüglich von CspB und dessen elektrostatischer Oberfläche ist in Abb. 41 gezeigt. Aufgrund der elektrostatischen Abstoßung ist in Bereichen negativer Ladungsdichte von CspB keine Wechselwirkung mit der Nukleinsäure vorhanden. Das ssDNA-Fragment wechselwirkt hauptsächlich mit der exponierten hydrophoben Oberfläche und den positiv geladenen Seitengruppen von CspB.

Insgesamt wurden drei Gruppen von Strukturen mit unterschiedlicher ssDNA-Konformation gefunden. Die Verfeinerung der modellierten Struktur des Komplexes ist Gegenstand zukünftiger Simulationen.

### 3.2.5 Charakterisierung der Beiträge einzelner Aminosäuren zur Bindung von dT7

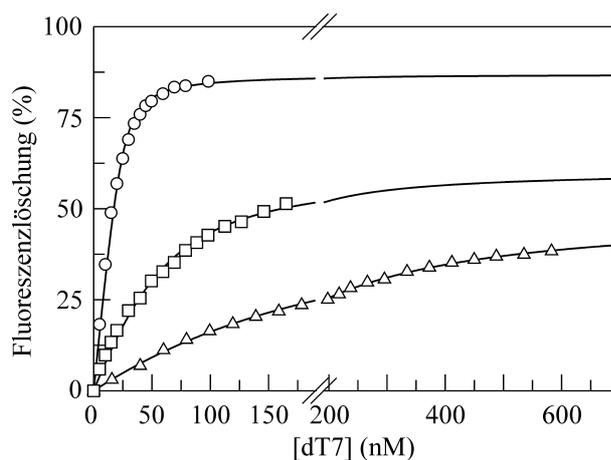
Die NMR-Titration von CspB mit dT7 zeigte, dass die Bindung der Nukleinsäure von den identischen Aminosäuren wie im CspB/Y-Box25-Komplex bewerkstelligt wird (Abb. 30 und 3.2.2). Im Weiteren wurde nun untersucht, welchen Anteil die identifizierten Aminosäuren an der Komplexbildung von CspB und dT7 besitzen. Hierzu wurde zuerst die Stöchiometrie des Nukleoproteinkomplexes über Fluoreszenzlöschungsexperimente (Abb. 42a) sowie mit Hilfe der Änderung der normierten gemittelten  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  chemischen Verschiebung im NMR-Titrationsexperiment (Abb. 42b) bestimmt.



**Abb. 42:** Bestimmung der Stöchiometrie des CspB/dT7-Komplexes. (a) Fluoreszenzlöschung von 2  $\mu\text{M}$  CspB und (b) Änderung der normierten gemittelten  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  chemischen Verschiebung ( $\Delta\delta_{\text{MW}}(^1\text{H}, ^{15}\text{N})$ ) von 24 Kreuzsignalen (K5, K7, V20, E21, V26, F27, H29, A32, Q34, G35, G37, L41, Q45, V52, E53, G54, N55, G57, N59, A61, N62, V63, T64, K65) bei 1.3 mM CspB. Sie wurde mit  $\Delta\delta_{\text{MW}}(^1\text{H}, ^{15}\text{N}) = [(\Delta\delta(^1\text{H}))^2 + 1/25 \cdot \Delta\delta(^{15}\text{N})^2]/2]^{0.5}$  berechnet (Grzesiek *et al.*, 1996). Die Stöchiometrie liegt näherungsweise bei 1:1.

Die Stöchiometrie beträgt über den gesamten Proteinkonzentrationsbereich (nano- bis millimolar) näherungsweise 1:1 und entspricht daher der Annahme, dass die Bindungsstelle von CspB 6-7 Nukleotide umfasst (Lopez, *et al.*, 1999a). Übereinstimmende Ergebnisse lieferten auch Titrations unter stöchiometrischen Bedingungen der CspB-Varianten K13Q, F27A und G54P. Die Proteinkonzentration lag jeweils bei 2  $\mu\text{M}$  (Wildtyp-CspB), 5  $\mu\text{M}$  (K13Q) und 10  $\mu\text{M}$  (F27A, G54P).

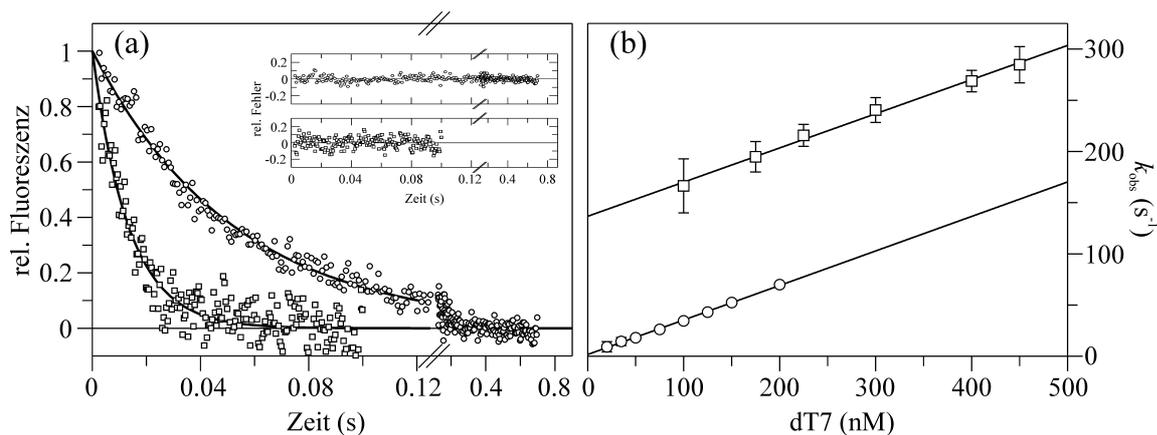
Zur weiteren Charakterisierung der Wechselwirkung zwischen CspB und dT7 wurden die Dissoziationskonstanten ( $K_D$ ) der verschiedenen CspB-Varianten bestimmt. Dies erfolgte durch Fluoreszenzlöschungs-Titrationsexperimente und anschließender Analyse mit Gl. 17-Gl. 19. In Abb. 43 sind exemplarisch die Titrations von Wildtyp-CspB, K13Q und F15A mit dT7 gezeigt und die erhaltenen  $K_D$ -Werte aller Proteinvarianten in Tab. 12 zusammengefasst. Im Vergleich zu den Ergebnissen mit Y-Box25 ist die Bindungsaffinität der untersuchten CspB-Varianten deutlich höher (Tab. 10, Tab. 12) und liegt im nM-Bereich. Die relativen Unterschiede des  $K_D$ -Werts der einzelnen Proteinvarianten bei beiden ssDNA-Fragmenten sind vergleichbar ausgeprägt. Die Substitution eines Phenylalanins in der Bindungsregion erniedrigt die Affinität sowohl zu dT7 als auch zu Y-Box25 dramatisch (F27A, F38A), während die Substitution einer Ladung (K13Q) nur einen moderaten Effekt zeigt. Die Auswirkungen des Austauschs einzelner Aminosäuren auf die Bindungseigenschaften von CspB ergaben für dT7 wesentlich deutlichere Ergebnisse als für Y-Box25. Die Übereinstimmung der Ergebnisse für beide ssDNA-Fragmente lässt daher eine Verallgemeinerung der Interpretationen aus 3.2.1 zu.



**Abb. 43:** Bestimmung der Affinität von (○) Wildtyp-CspB, (□) K13Q und (△) F15A zu dT7 in 50 mM Nacacodylat/HCl, 100 mM KCl pH 7.0 bei 15 °C. Die Proteinkonzentration betrug 25 nM, 50 nM und 100 nM.

Neben der Affinität eines Proteins zu einem Interaktionspartner ist der zeitliche Rahmen der Bindung und Ablösung eine entscheidende Eigenschaft. Um abschätzen zu können, ob die

unterschiedliche Affinität der einzelnen CspB-Varianten durch Änderungen der Assoziations- und/oder der Dissoziationsrate ( $k_{\text{ass}}$ ,  $k_{\text{diss}}$ ) bestimmt wird, wurden Assoziationskinetiken gemessen. Hierzu wurde durch schnelles Mischen von Protein und dT7 in einer *stopped-flow* Apparatur die Komplexbildung induziert. Die Bindung von CspB an dT7 erfolgt in einem einzigen Schritt ( $P + D \rightleftharpoons PD$ , wobei P für Protein, D für Nukleinsäure und PD für den Nukleoproteinkomplex steht) und kann daher mit einer monoexponentiellen Funktion ( $F(t) = A \cdot e^{-k_{\text{obs}} \cdot t} + b$ ) beschrieben werden (Abb. 44a). Die Assoziations- und Dissoziationsrate wurde dann mit Hilfe der Konzentrationsabhängigkeit der beobachteten Geschwindigkeitskonstante ( $k_{\text{obs}}$ ) unter Bedingungen pseudo-erster Ordnung mit  $k_{\text{obs}} = k_{\text{ass}} \cdot [D] + k_{\text{diss}}$  bestimmt (Bernasconi, 1976). Die lineare Abhängigkeit von  $k_{\text{obs}}$  von der dT7-Konzentration ist in Abb. 44b für Wildtyp-CspB und die CspB-Variante F38A gezeigt. Da die Kinetiken unter Bedingungen gemessen wurden, bei denen  $k_{\text{ass}} \cdot [P] \gg k_{\text{diss}}$  vorliegt, ist die Steigung, d.h.  $k_{\text{ass}}$  sehr gut definiert. Der y-Achsenabschnitt, d.h.  $k_{\text{diss}}$  kann jedoch nicht so exakt bestimmt werden, da in diesem Konzentrationsbereich die Komplexbildung bevorzugt wird. Die Bestimmung von  $k_{\text{diss}}$  sollte im Bereich  $k_{\text{diss}} \gg k_{\text{ass}} \cdot [P]$  erfolgen. Aufgrund der hoch affinen Bindung müssten Konzentrationen unter 1 nM eingesetzt werden. Die damit einhergehenden geringen Signaländerungen sind jedoch nicht mehr detektierbar. Daher wurde  $k_{\text{diss}}$  aus dem Produkt der Dissoziationskonstanten  $K_D$  und der Assoziationsrate  $k_{\text{ass}}$  berechnet. Die berechneten  $k_{\text{diss}}$  stimmen für viele Varianten gut mit der experimentell bestimmten  $k_{\text{diss}}$  überein. Im Allgemeinen ergaben die berechneten Werte kleinere Raten. Die Assoziations- und Dissoziationsraten sind ebenfalls in Tab. 12 zusammengefasst.



**Abb. 44:** Bestimmung der Assoziations- und Dissoziationsraten. (a) Assoziationskinetiken von 27 nM CspB F15Y mit (○) 50 nM dT7 bzw. (□) 200 nM dT7. Die Anpassung einer monoexponentiellen Funktion an die Daten liefert  $19.1 \text{ s}^{-1}$  bzw.  $74.8 \text{ s}^{-1}$  für  $k_{\text{obs}}$ . Die Teilabbildungen zeigen die Differenz zwischen den Daten und der nicht-linearen Regression an eine einfache Exponentialfunktion (siehe Text). (b) Lineare Abhängigkeit der beobachteten Rate ( $k_{\text{obs}}$ ) von der dT7-Konzentration ergibt für (○) 27 nM Wildtyp-CspB  $k_{\text{ass}} = 3.4 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  bzw.  $k_{\text{diss}} = 2.4 \text{ s}^{-1}$  und für (□) 270 nM CspB F38A  $k_{\text{ass}} = 3.3 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  bzw.  $k_{\text{diss}} = 136.7 \text{ s}^{-1}$ .

Alle untersuchten CspB-Varianten weisen eine sehr schnelle und nahezu identische Assoziationsrate im Bereich der Diffusionskontrolle auf, zeigen jedoch starke Unterschiede in der Dissoziationsrate (Tab. 12). Die hohen  $k_{\text{diss}}$  sind ausschließlich bei CspB-Varianten vorhanden, die eine deutlich geringere Affinität zum ssDNA-Fragment dT7 besitzen. Dies wurde auch schon für das Oligodeoxynukleotid Y-Box25 gezeigt (Zeeb & Balbach, 2003a). Daraus lässt sich schließen, dass die Affinität von CspB zu einzelsträngigen Nukleinsäuren durch unterschiedliche Dissoziationsraten bestimmt wird. Dieses Verhalten könnte der zellulären RNA-Chaperon Funktion von CspB zugrunde liegen. Zuerst erfolgt eine schnelle und eher sequenzunspezifische schwache Bindung an die Nukleinsäure. Die Wechselwirkung wird jedoch hoch affin, wenn das Protein mit einem T- bzw. U-reichen Bereich interagiert. Die Erhöhung der Affinität erfolgt hier über die starke Erniedrigung von  $k_{\text{diss}}$ .

**Tab. 12:** Dissoziationskonstanten ( $K_D$ ) der jeweiligen CspB/dT7-Komplexe sowie die Assoziations- und Dissoziationsraten der einzelnen CspB-Varianten

Protein	$K_D \cdot 10^{-9}$ (M)	$k_{\text{ass}} \cdot 10^8$ ( $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )	$k_{\text{diss}}$ ( $\text{s}^{-1}$ ) <sup>c</sup>	$k_{\text{diss}}$ ( $\text{s}^{-1}$ ) <sup>d</sup>
Wildtyp	$1.8 \pm 0.4$	$3.37 \pm 0.11$	$1.7 \pm 0.6$	$0.6 \pm 0.2$
K13Q	$25 \pm 3$	$1.45 \pm 0.03$	$5.5 \pm 0.2$	$3.6 \pm 0.5$
F15A	$135 \pm 4$	$1.58 \pm 0.08$	$30.0 \pm 1.6$	$21.3 \pm 1.7$
F15Y <sup>a</sup>	$1.4 \pm 0.4$	$3.44 \pm 0.10$	$2.2 \pm 0.3$	$0.5 \pm 0.2$
F17A	$345 \pm 63$			
F27A	$286 \pm 7$	$2.18 \pm 0.08$	$103.1 \pm 2.0$	$62.3 \pm 3.8$
H29Q	$104 \pm 6$	$2.41 \pm 0.01$	$35.1 \pm 2.3$	$25.1 \pm 1.6$
F30A	$208 \pm 11$	$4.29 \pm 0.03$	$176.9 \pm 6.3$	$89.2 \pm 5.3$
F30W <sup>a</sup>	$1.3 \pm 0.3$	$4.08 \pm 0.06$	$1.0 \pm 0.7$	$0.5 \pm 0.1$
G35A	$1.1 \pm 0.3$	$3.18 \pm 0.02$	$1.8 \pm 1.1$	$0.3 \pm 0.1$
G35P	$118 \pm 5$	$2.03 \pm 0.04$	$72.5 \pm 1.1$	$24.0 \pm 1.5$
F38A	$228 \pm 9$	$3.34 \pm 0.01$	$136.7 \pm 3.5$	$76.2 \pm 3.2$
G54A	$1.3 \pm 0.3$	$2.62 \pm 0.07$	$1.3 \pm 0.8$	$0.3 \pm 0.1$
G54P	$(220 \pm 9)$	$(0.63 \pm 0.01)$	$(9.8 \pm 0.6)$	$\pm$
P58A <sup>b</sup>	$1.3 \pm 0.2$	$2.11 \pm 0.06$	$1.4 \pm 0.7$	$0.3 \pm 0.1$

<sup>a</sup> Aminosäureaustausch aufgrund eines Sequenzvergleichs zu Kälteschockproteinen aus thermophilen Organismen (*B. caldolyticus*, *T. maritima*)

<sup>b</sup> Substitution zur Erhöhung der möglichen Rückgratkonformationen in der Schleife  $\beta 4$ - $\beta 5$  (Tab. 10)

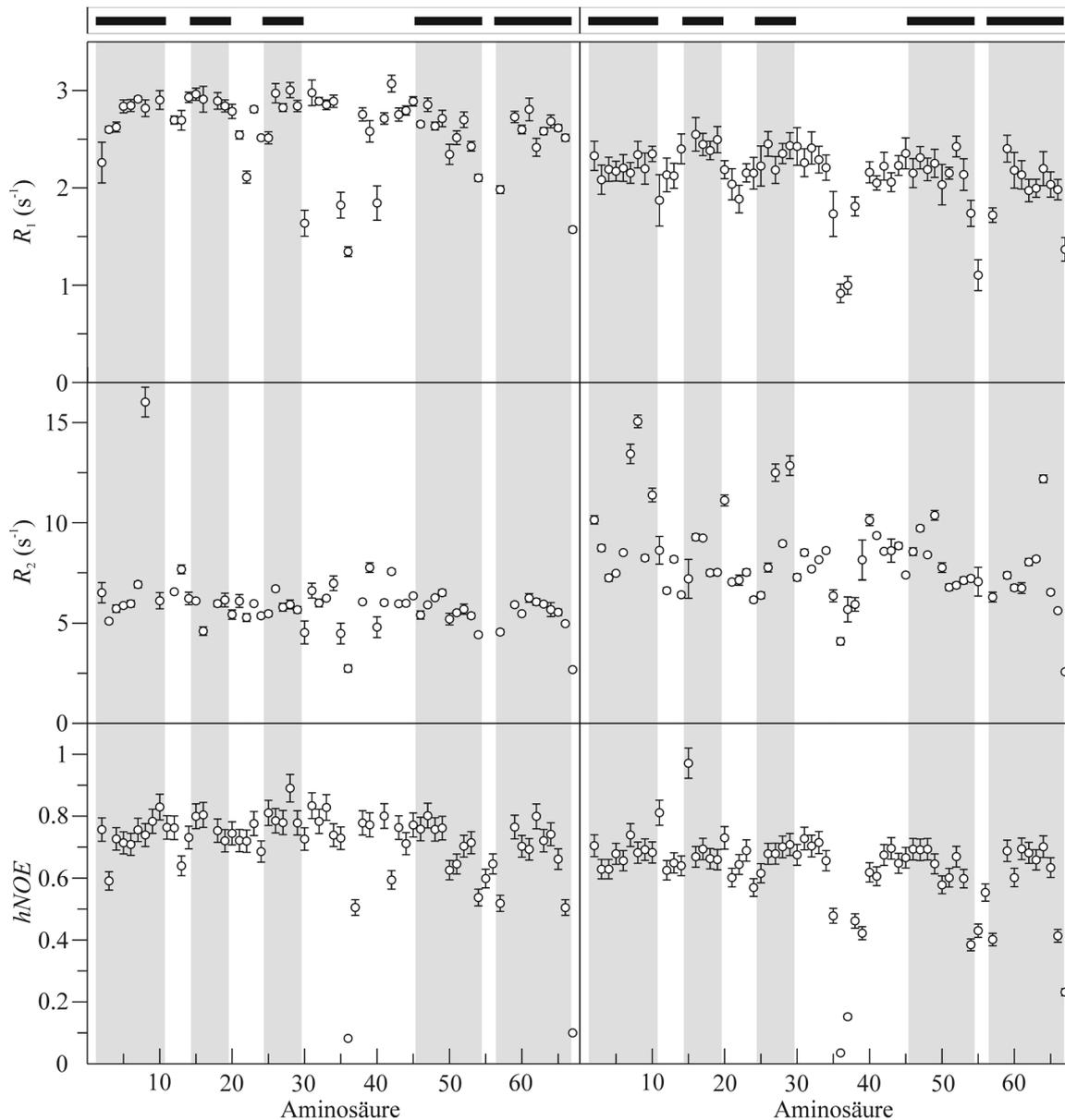
<sup>c</sup>  $k_{\text{diss}}$  aus dem y-Achsenabschnitt der linearen Abhängigkeit der  $k_{\text{obs}}$  von [dT7] bestimmt

<sup>d</sup>  $k_{\text{diss}}$  wurde aus dem Produkt von  $K_D$  und  $k_{\text{ass}}$  berechnet

### 3.2.6 Vergleich der internen Dynamik von freiem und dT7-gebundenem CspB

Die interne Dynamik von Proteinen wird meist auf der Grundlage von NMR-Relaxationsparametern charakterisiert. Eine ausführliche Beschreibung der verwendeten Modelle und ein Überblick über die wichtigsten Methoden ist in 3.1 zu finden. Häufig wird beobachtet, dass dynamische Bereiche in einem Protein bei der Komplexbildung wesentlich rigider werden. Dies liegt zum einen daran, dass Bindungsregionen oft durch solch

dynamische Bereiche gebildet werden. Durch die direkte Interaktion werden diese dann unbeweglicher. Zum anderen werden Strukturänderungen induziert, wie dies z.B. beim Lac-Repressor der Fall ist. Bei der Bindung an die Nukleinsäure wird die Bildung einer  $\alpha$ -Helix (*hinge helix*) induziert, so dass die vormals sehr flexible Schleifenregion den Großteil ihrer internen Beweglichkeit verliert. Der Zeitbereich dieser Dynamik reicht von Pico- bis Millisekunden und ist über eine Lipari-Szabo-Analyse wie in 3.1.2 beschrieben zugänglich.



**Abb. 45:**  $R_1$ - und  $R_2$ -Relaxationsraten sowie heteronuklearer NOE-Effekt von CspB im CspB/dT7-Komplex (links) und im freien Protein (rechts) in 50 mM Na-cacodylat/HCl pH 7.0 bei 25 °C. Die Bestimmung der Relaxationsparameter erfolgte wie in 2.5.3 beschrieben mit Hilfe der Pulssequenzen aus Abb. 15 bei 500 MHz.

Die Bestimmung der Relaxationsparameter von freiem und dT7-gebundenem CspB für die erweiterte Lipari-Szabo-Analyse erfolgte wie in 3.1 beschrieben. Es wurden longitudinale Spin-Gitter- und transversale Spin-Spin-Relaxationsraten ( $R_1$  und  $R_2$ ) sowie heteronukleare

NOE-Effekte (*hNOE*) für jeden  $^{15}\text{N}$ -Kern des Proteinrückgrats bestimmt. Insgesamt wurden Relaxationsdaten für 62 bzw. 59 Rückgratamide im freien bzw. komplexierten CspB erhalten. Die Resultate für  $R_1$ ,  $R_2$  und *hNOE* sind in Abb. 45 dargestellt und im Anhang (Tab. A 3 bzw. Tab. A 9) enthalten. Die gemittelten  $R_1$ -,  $R_2$  und *hNOE*-Werte betragen  $2.61\text{ s}^{-1}$ ,  $5.95\text{ s}^{-1}$  und  $0.71$  bzw.  $2.11\text{ s}^{-1}$ ,  $8.19\text{ s}^{-1}$  und  $0.62$  für dT7-gebundenes bzw. für freies CspB bei 500 MHz und  $25\text{ }^\circ\text{C}$ . Wie für das erhöhte Molekulargewicht des Nukleoproteinkomplexes zu erwarten ist, steigt die gemittelte  $R_2$ -Rate an, während die  $R_1$ -Rate reduziert ist. Der gemittelte *hNOE* von CspB im Komplex mit dT7 ist im Vergleich zum freien Protein deutlich erhöht, was auf eine verringerte interne Dynamik hinweist. Dies war schon qualitativ im Vergleich der NMR-Strukturscharen in Abb. 36 angedeutet worden, da die energieminierten Strukturen von CspB im Komplex mit dT7 weniger stark streuten als im freien Protein.

Mit Hilfe der gewonnenen Relaxationsdaten wurde eine erweiterte Lipari-Szabo-Analyse durchgeführt, die schon in 2.5.4 und 3.1 detailliert beschrieben wurde. Für den CspB/dT7-Komplex wurde wie für das freie Protein ein isotropes Bewegungsmodell angenommen, so dass die Rotationskorrelationszeit ( $\tau_m$ ) durch eine iterative Optimierung der Bewegungsparameter bestimmt werden konnte. Die Rotationskorrelationszeit von CspB im Komplex mit dT7 beträgt  $4.0\text{ ns}$  und liegt somit etwas unter der  $\tau_m$  des freien Proteins ( $4.4\text{ ns}$ ). Die Lipari-Szabo-Analyse ergab eine sehr unterschiedliche Verteilung der angepassten Modelle für freies und komplexiertes CspB. Wie schon in 3.1 gezeigt, werden die Relaxationsparameter für freies CspB hauptsächlich von Modellen beschrieben, die chemische Austauschsterme ( $R_{\text{ex}}$ ) beinhalten (Tab. 7, Tab. 13). Diese Austauschsterme beruhen auf der Faltungsreaktion von CspB, die im Millisekundenbereich abläuft (3.1.3).

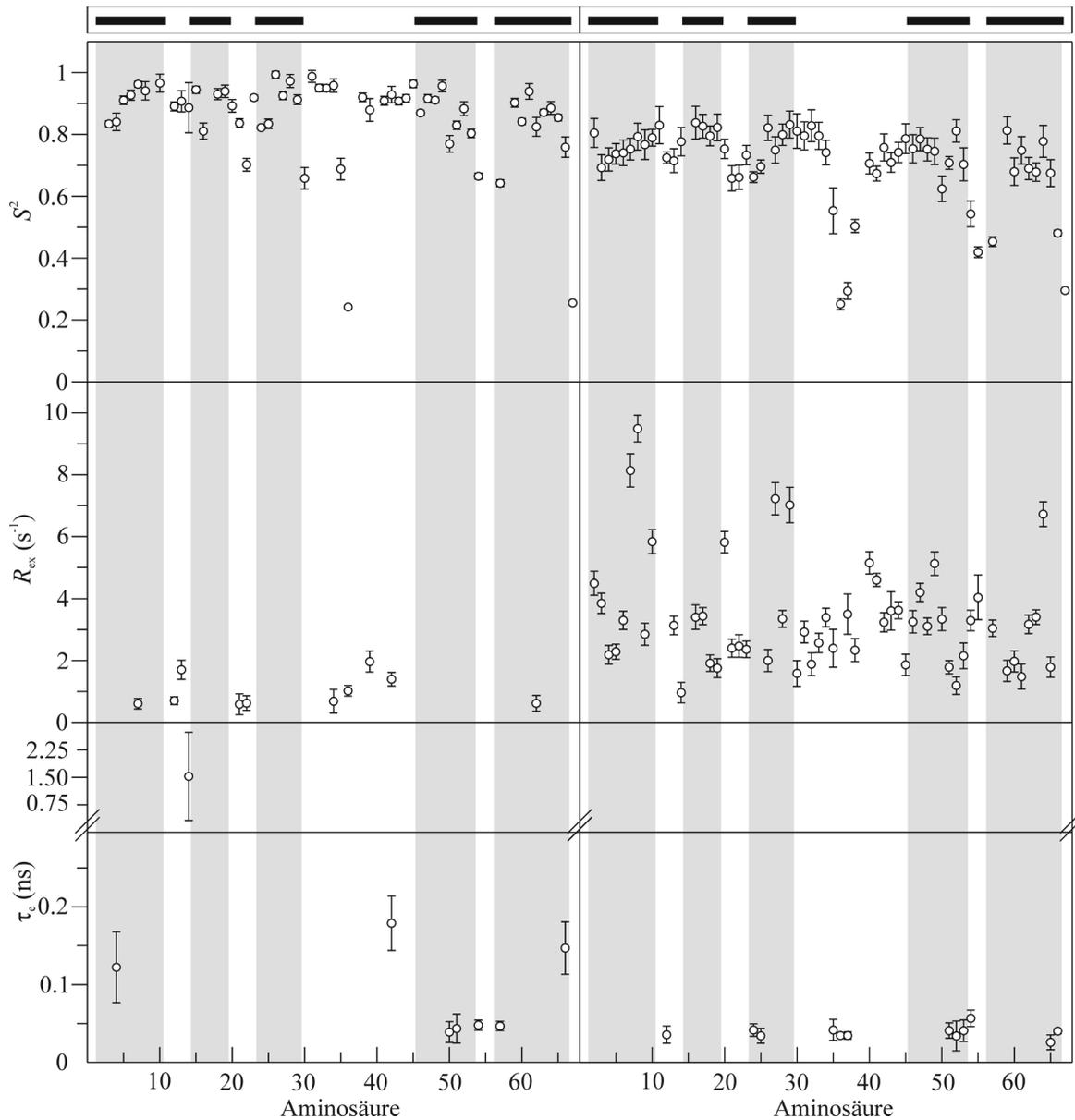
**Tab. 13:** Verteilung der Modelle nach der iterativen Optimierung der Rotationskorrelationszeit  $\tau_m$  mit einer erweiterten Lipari-Szabo-Analyse.

	Model 1 <sup>a</sup>	Model 2 <sup>a</sup>	Model 3 <sup>a</sup>	Model 4 <sup>a</sup>	Model 5 <sup>a</sup>
CspB/dT7	39	5	10	1	2
CspB	2	5	48	7	0

<sup>a</sup> Die Beschreibung der jeweiligen Modelle ist in Tab. 5 gegeben.

CspB im Komplex mit dT7 wird vorwiegend am besten von Modellen angepasst, die keine  $R_{\text{ex}}$ -Beiträge enthalten (Tab. 13). Die Reduktion des chemischen Austauschs ist gleichmäßig über das gesamte Protein verteilt. Dieser globale Effekt kann durch die Stabilisierung von CspB im Zuge der Komplexbildung erklärt werden. Mit anderen Worten die Bindung von dT7 verschiebt somit das Faltungsgleichgewicht von CspB in Richtung des nativen Zustands. Der Nachweis dieser Stabilisierung wird in 3.2.7 mit Hilfe von Amidprotonenaustausch-

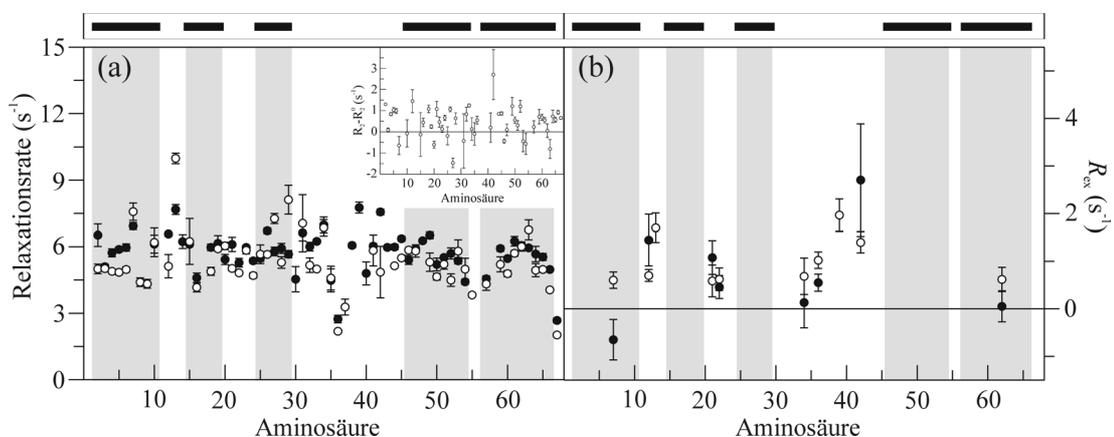
Experimenten erbracht. Eine ähnliche Interpretation bzgl. des Verlustes der  $R_{\text{ex}}$ -Terme wurde in 3.1 bei der Stabilisierung von CspB durch Ethylenglykol beschrieben. Die zahlreichen  $R_{\text{ex}}$ -Terme im freien Protein sind möglicherweise dafür verantwortlich, dass die Rotationskorrelationszeit ( $\tau_m$ ) geringfügig größer ist als für CspB im Komplex. Die Ursache liegt wahrscheinlich darin, dass die iterative Optimierung die  $R_{\text{ex}}$ -Beiträge zu  $R_2$  nicht vollständig kompensieren konnte und dadurch  $\tau_m$  etwas überschätzt wird (3.1). Die Bewegungsparameter, die mit der erweiterten Lipari-Szabo-Analyse für freies und dT7-gebundenes CspB bestimmt wurden, sind in Abb. 46 gezeigt.



**Abb. 46:** Ordnungsparameter  $S^2$ , chemischer Austausch  $R_{\text{ex}}$  und effektive Korrelationszeit  $\tau_e$  von CspB im CspB/dT7-Komplex (links) und im freien Protein (rechts) die von einer erweiterten Lipari-Szabo-Analyse mit dem Programm MODELFREE erhalten wurden. Die Fehlerbalken resultieren aus Monte Carlo-Simulationen. Die Vorgehensweise war wie in 2.5.4 und 3.1.2 beschrieben.

Der gemittelte Ordnungsparameter  $\langle S^2 \rangle$  nimmt durch die Komplexbildung von 0.70 auf 0.86 zu, was auf einen Verlust an interner Dynamik im Pico- bis Nanosekunden-Bereich hindeutet. Diese Änderung von  $S^2$  erstreckt sich über das gesamte Protein und ist nicht lokal auf reduzierte Beweglichkeit in flexiblen Bereichen wie z.B. Schleifenregionen beschränkt (Abb. 46). Das einzige Amidproton, das im Komplex einen geringeren  $S^2$  als im freien Protein besitzt, ist F30. Für G16, G22, D36 und A67 konnten keine signifikanten Änderungen beobachtet werden. Die interne Beweglichkeit, die durch die effektive Korrelationszeit  $\tau_e$  beschrieben wird, zeigt insgesamt nur geringfügige Unterschiede zwischen dT7-gebundenem und freiem CspB (Abb. 46). Die gemittelte  $\tau_e$  ( $\langle \tau_e \rangle$ ) steigt bei der Komplexbildung von 38 ps auf 269 ps an, da für einige Reste  $\tau_e$  im Komplex erhöht ist (G4, G14, E42, A67). Dies lässt auf eine verringerte Beweglichkeit in diesem Zeitbereich schließen und bestätigt somit die vorherige Interpretation der Ordnungsparameter.

Dramatische Veränderungen ergeben sich im Zeitbereich des chemischen Austauschs ( $R_{ex}$ ). Wie schon in Tab. 7 bzw. Tab. 13 gezeigt wurde, verringert sich die Anzahl der Amide mit  $R_{ex}$ -Beiträgen von 55 im freien Protein auf 11 im CspB/dT7-Komplex. Die  $R_{ex}$ -Terme im freien Protein liegen aufgrund der Faltungsreaktion von CspB im Millisekundenbereich (3.1.3) zwischen  $1 \text{ s}^{-1}$  und  $9.5 \text{ s}^{-1}$ . Währenddessen besitzt komplexiertes CspB nur  $R_{ex}$ -Werte zwischen  $0.6 \text{ s}^{-1}$  und  $2.0 \text{ s}^{-1}$ . Dadurch verringert sich die gemittelte Austauschrate ( $\langle R_{ex} \rangle$ ) bei der Komplexbildung von  $3.4 \text{ s}^{-1}$  auf  $1.0 \text{ s}^{-1}$ , was auf eine deutliche Reduktion der Dynamik auf der Millisekundenzeitskala zurückzuführen ist. Dies kann durch die Stabilisierung des Proteins bei der Bindung an das ssDNA-Fragment (3.2.7) erklärt werden. Die restlichen  $R_{ex}$ -Terme von Amidprotonen im komplexierten CspB sind aufgrund zusätzlicher lokaler Mobilität vorhanden und liegen fast alle in den Schleifenregionen.

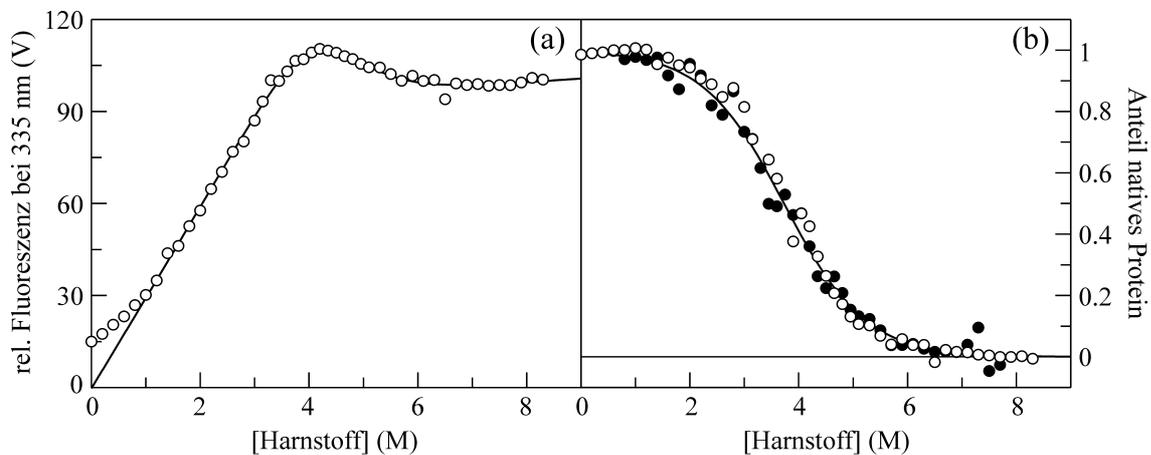


**Abb. 47:** Experimentelle Bestimmung der  $R_{ex}$ -Beiträge von CspB im Komplex mit dT7. (a) Vergleich der (○) tatsächlichen transversalen Relaxationsrate  $R_2^0$  und (●)  $R_2$ .  $R_2^0$  wurde über die Kreuzrelaxationsrate  $\eta_{xy}$  und Gl. 37 bestimmt (Abb. 16). Die Teilabbildung zeigt die Differenz von  $R_2$  und  $R_2^0$  aus der sich der  $R_{ex}$  mit Gl. 43. (b)  $R_{ex}$ -Beiträge aus (○) der Lipari-Szabo-Analyse und (●) experimentell bestimmter  $R_{ex}$  (Teilabbildung in (a)).

Eine experimentelle Bestimmung der noch vorhandenen  $R_{\text{ex}}$ -Terme von CspB im Komplex mit dT7 wurde mit Hilfe der Interferenz zwischen transversaler  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  dipolarer und  $^{15}\text{N}$ -CSA-Relaxation bestimmt (vgl. 2.5.3 und 3.1.3). In Abb. 47a ist der Vergleich der tatsächlichen transversalen Relaxationsrate  $R_2^0$  und  $R_2$  dargestellt. Aus der Differenz von  $R_2$  und  $R_2^0$  ergibt sich dann  $R_{\text{ex}}$  (Teilabbildung in Abb. 47a), wobei K13 bzw. E42 mit  $2.3 \text{ s}^{-1}$  bzw.  $2.7 \text{ s}^{-1}$  die größten  $R_{\text{ex}}$ -Werte besitzen. Die meisten  $R_{\text{ex}}$ -Werte liegen unter  $1 \text{ s}^{-1}$ , was in etwa der Messgenauigkeit entspricht, da die Kreuzrelaxationsexperimente sehr unempfindlich sind. Abb. 47b beinhaltet den Vergleich der experimentell bestimmten  $R_{\text{ex}}$ -Terme mit den  $R_{\text{ex}}$ -Werten, die aus der erweiterten Lipari-Szabo-Analyse stammen. Wie dies schon für das freie Protein in 3.1 gezeigt wurde, ist die Übereinstimmung sehr gut.

### 3.2.7 Stabilisierung von CspB durch Bindung an dT7

Die thermodynamische Stabilität von Proteinen kann mit Hilfe von Entfaltungsübergängen bestimmt werden. Daher wurden Harnstoff-induzierte Entfaltungsübergänge von CspB in An- und Abwesenheit von dT7 gemessen. Als Sonde wurde sowohl die Fluoreszenzemission von Trp8 als auch Fern-UV CD verwendet. Bei der Entfaltung von CspB mit Harnstoff wird Trp8 zum Lösungsmittel exponiert und dadurch die Fluoreszenz gelöscht (Schindler, 1994).



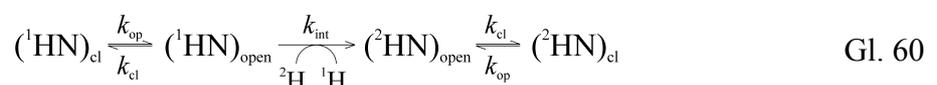
**Abb. 48:** Harnstoff-induzierter Entfaltungsübergang von CspB in Gegenwart von dT7. (a) Fluoreszenzintensität bei 335 nm. Die durchgezogene Linie repräsentiert den Anstieg an Gl. 9. (b) Anteil natives Protein verfolgt mit (○) Fluoreszenz bei 335 nm und (●) Fern-UV CD bei 222.6 nm.

In Gegenwart von dT7 zeigt sich ein anderes Verhalten (Abb. 48a). Mit steigender Harnstoffkonzentration steigt die Fluoreszenz stark an, was auf die Dissoziation der Nukleinsäure vom Protein schließen lässt, da diese im gebundenen Zustand die Fluoreszenz von CspB ebenfalls löscht. Bei mittleren Harnstoffkonzentrationen erreicht die Fluoreszenz ein Maximum. Eine weitere Erhöhung der Harnstoffkonzentration bewirkt eine Abnahme der

Fluoreszenz. Diese Abnahme kann der Entfaltung von CspB zugeordnet werden. Die Beobachtung des Übergangs mittels Fern-UV CD zeigt dem freien Protein entsprechend eine Abnahme der positiven molaren Elliptizität mit zunehmender Harnstoffkonzentration.

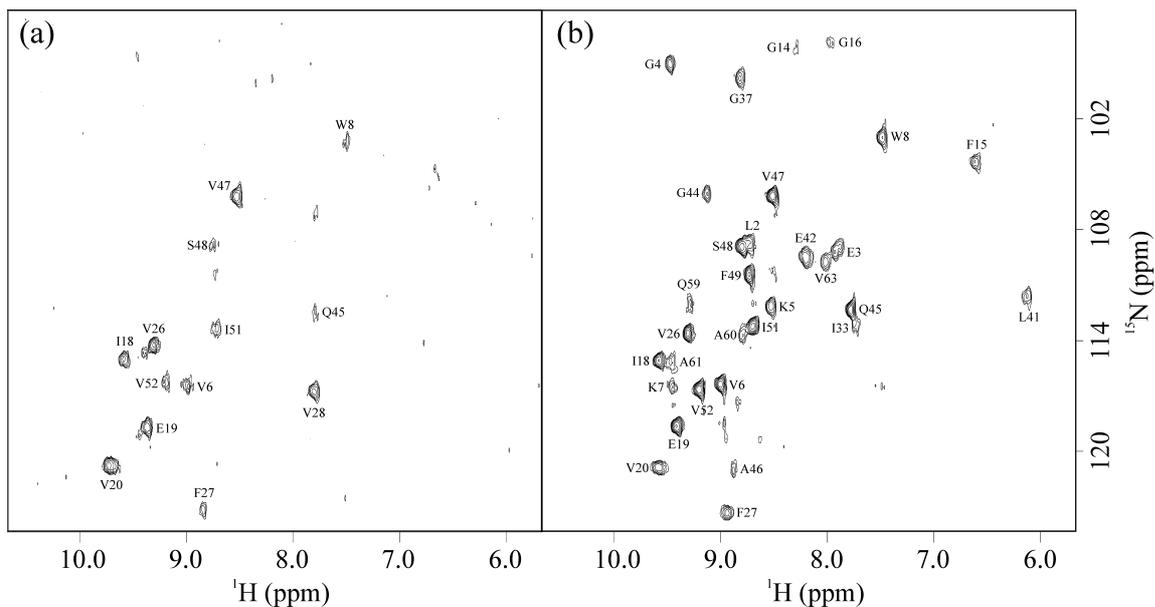
Die Normierung des Fluoreszenz- bzw. Fern-UV CD-detektierten Entfaltungsübergangs ist in Abb. 48b gezeigt. Es ergeben sich deckungsgleiche Entfaltungsübergänge für beide Sonden. Die Anpassung an Gl. 9 liefert 11.9 kJ/mol für  $\Delta G_U(\text{H}_2\text{O})$  und -3.2 kJ/(mol·K) für den  $m$ -Wert für CspB im Komplex mit dT7. Freies CspB besitzt bei 15 °C ein  $\Delta G_U(\text{H}_2\text{O})$  von 11.8 kJ/mol und einen  $m$ -Wert von -3.3 kJ/(mol·K) (Zeeb, 2000). Die Ergebnisse für komplexiertes und freies CspB sind nahezu identisch. Dies lässt vermuten, dass entweder keine Stabilisierung des Proteins bei der Komplexbildung erfolgt, oder dass im Übergangsbereich kein CspB/dT7-Komplex mehr vorhanden ist und somit die Stabilität des freien Proteins gemessen wird. Ersteres kann aufgrund der erweiterten Lipari-Szabo-Analyse ausgeschlossen werden (3.2.6). Ein ähnliches Verhalten in Harnstoff-induzierten Entfaltungsübergängen wurden auch schon für CspB im Komplex mit dem ssDNA-Fragment Y-Box25 gefunden (Zeeb, 2000), welches allerdings wesentlich weniger affin an CspB bindet. Es ist also anzunehmen, dass bereits bei geringen Harnstoffkonzentrationen die Protein/ssDNA-Wechselwirkung stark gestört wird, wodurch die Verschiebung des Übergangsmittelpunkts zu höheren Harnstoffkonzentrationen ausbleibt.

Thermische Entfaltungsübergänge stellen ebenfalls eine Möglichkeit zur Bestimmung der Stabilität von Proteinen dar. Die Mittelpunkte der thermischen Entfaltung von CspB in An- bzw. Abwesenheit von dT7 betragen 53.6 °C bzw. 51.1 °C und sind ebenso nahezu identisch. Dieses Verhalten kann möglicherweise mit der zellulären Funktion von CspB begründet werden. Während der Kälteschockantwort bei tiefen Temperaturen bindet CspB an einzelsträngige Nukleinsäuren um stabile unproduktive Sekundärstrukturen zu verhindern. Bei höheren Temperaturen sollte jedoch eine weniger starke Bindung erfolgen. Die Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) des CspB/dT7-Komplexes bei verschiedenen Temperaturen wurde mittels Titrationsexperimenten bestimmt (vgl. 3.2.5). Der  $K_D$ -Wert steigt von 2 nM bei 15 °C auf 19 nM bei 25 °C und auf 219 nM bei 35 °C an. Da der Übergangsbereich bei 35 °C noch nicht erreicht ist und die Affinität bei steigender Temperatur weiter abnehmen sollte, ergibt sich eine vergleichbare Situation zum Harnstoff-induzierten Entfaltungsübergang. D.h. auch im thermischen Übergang ist hauptsächlich freies CspB im Übergangsbereich vorhanden, so dass dessen Stabilität gemessen wird.



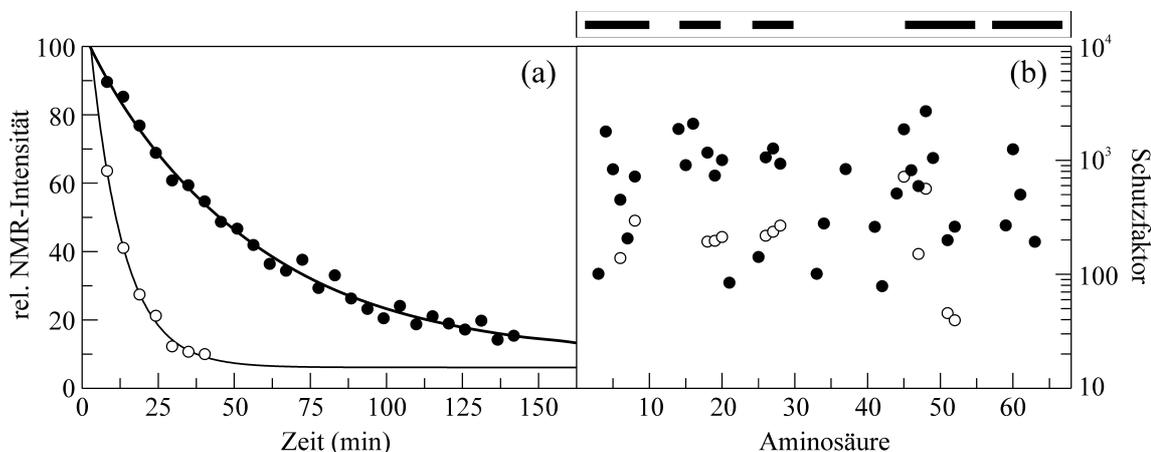
Eine Methode zur Bestimmung der thermodynamischen Stabilität von Proteinen unter nativen Bedingungen stellt der Amidprotonenaustausch dar, der mit Hilfe des Zwei-Schritt-Mechanismus in Gl. 60 beschrieben werden kann (Bai, *et al.*, 1994, Woodward, 1994). Dabei entspricht die Entfaltungsrates  $k_u$  der Öffnungsrates ( $k_{op}$ ) und die Rückfaltungsrates  $k_f$  der Schließrate ( $k_{cl}$ ).  $K_{int}$  repräsentiert die Ratenkonstante des chemischen Austauschs, die von der Sequenz, dem pH-Wert und der Temperatur abhängt. Grundsätzlich können geschützte Amidprotonen entweder durch globale Entfaltung oder durch lokale Fluktuationen im nativen Zustand (*local breathing*) mit dem Lösungsmittel austauschen. Unter nativen Bedingungen ist  $k_{cl} \gg k_{op}$  so dass die beobachtete Austauschrate über  $k_{ex} = (k_u \cdot k_{int}) / (k_f + k_{int})$  definiert ist. Unter EX2-Bedingungen, d.h. dass  $k_{cl} > k_{int}$  ist, ist der chemische Austausch ratenlimitierend und die Austauschrate kann durch  $k_{ex} = (k_{op} \cdot k_{int}) / k_{cl}$  beschrieben werden. Der Schutzfaktor  $P$  ist gegeben durch  $P = k_{int} / k_{ex}$  und entspricht dem Kehrwert der Gleichgewichtskonstante der Faltungsreaktion ( $P = 1/K = k_{op} / k_{cl}$ ). Die Bestimmung von  $\Delta G_{ex}$  erfolgt durch  $\Delta G_{ex} = -RT \ln(1/P)$  für die am langsamsten austauschenden Amidprotonen, da diese nur bei der vollständigen Entfaltung des Proteins Austausch zeigen.

Experimentell wurde  $^{15}\text{N}$ -markiertes CspB in An- bzw. Abwesenheit von dT7 lyophilisiert und in  $^2\text{H}_2\text{O}$  gelöst. Im Anschluss daran erfolgte die Aufzeichnung einer Serie von 2D  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  HSQC-Spektren (Abb. 7b). Das erste 2D  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  HSQC-Spektrum wurde 8 min nach dem Lösen in  $^2\text{H}_2\text{O}$  aufgenommen und ist in Abb. 49 für freies bzw. dT7-gebundenes CspB dargestellt. Die Messzeit jedes 2D  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  HSQC-Experiments betrug ca. 5 min.



**Abb. 49:** Erstes 2D  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  HSQC-Spektrum von (a) freiem und (b) dT7-gebundenem CspB nach dem Lösen der lyophilisierten Probe in  $^2\text{H}_2\text{O}$ . Die Pufferbedingungen waren 50 mM Na-cacodylat/HCl, 3 mM  $\text{MgCl}_2$  pH 7.0 bei 25 °C. Das erste Spektrum wurde 8 min nach dem Lösen an einem Bruker DRX500 Spektrometer aufgezeichnet.

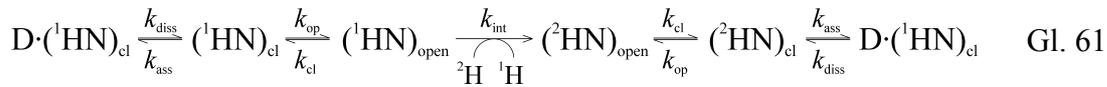
Der Vergleich der beiden ersten  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  HSQC-Spektren zeigt, dass CspB im Komplex mit dT7 deutlich mehr geschützte Amidprotonen besitzt als im freien Protein. Dieser Schutz vor Austausch mit dem Lösungsmittel kann entweder durch die Bindung des ssDNA –Fragments, d.h. sterische Behinderung des Austauschs, oder durch die Stabilisierung von CspB bei der Komplexbildung begründet werden. Da der Schutz nicht nur auf die Bindungsregion begrenzt sondern über das gesamte Protein gleichmäßig verteilt ist, scheiden lokale Effekte wie die sterische Abschirmung der Amidprotonen durch Bindung von dT7 aus. Somit kann der Schutz der Amidprotonen auf die Stabilisierung von CspB im vorliegenden Nukleoproteinkomplex zurückgeführt werden. Der Austausch von  $^1\text{H}$  durch  $^2\text{H}$  führt zu einem Intensitätsverlust des jeweiligen Kreuzsignals, dessen Rate ( $k_{\text{ex}}$ ) dann mit Hilfe einer Exponentialfunktion berechnet werden kann (Abb. 50a). Das Amidproton von V26 ist das am langsamsten austauschende Amidproton von CspB sowohl im freien als auch im gebundenen Protein (Abb. 32). Der Signalverlust tritt im freien Protein ca. fünfmal schneller als im dT7-gebundenen CspB ein. Mit der Austauschrate kann der Schutzfaktor  $P$  bestimmt werden, der abhängig von der Sequenzumgebung, der Temperatur und dem pH-Wert ist (Bai, *et al.*, 1994, Woodward, 1994). In Abb. 50b ist der Vergleich der Schutzfaktoren für CspB im freien und komplexierten Zustand bei 15 °C und pH 7.0 dargestellt.



**Abb. 50:** Nachweis der Stabilisierung von CspB durch die Bindung an dT7 mittels Amidprotonenaustausch. (a) Intensitätsverlauf von V26 in (○) freiem und (●) dT7-gebundenem CspB. Die Anpassung der NMR-Intensität an eine Exponentialfunktion liefert  $k_{\text{ex}} = 0.092 \text{ min}^{-1}$  und  $0.019 \text{ min}^{-1}$ . (b) Schutzfaktoren von (○) freiem und (●) dT7-gebundenem CspB.

Die Schutzfaktoren im CspB/dT7-Komplex sind ausnahmslos größer als im freien Protein und  $\Delta G_{\text{ex}}$  nimmt durch die Komplexbildung von 12.7 kJ/mol auf 16.4 kJ/mol zu. Grundlage für die Berechnung der Stabilität von CspB im Komplex mit dT7 stellt das in Gl. 61 postulierte Modell dar. Dabei wird angenommen, dass nur Amidprotonen im entfalteten

Protein mit dem Lösungsmittel austauschen können und dass die Nukleinsäure ausschließlich an den nativen Zustand bindet.



Die bestimmte Stabilität von CspB im Komplex mit dT7 scheint jedoch zu niedrig zu sein. Bei einem  $K_D$ -Wert des CspB/dT7-Komplexes von 2 nM bei 15 °C beträgt die Stabilität des Komplexes ( $\Delta G = -RT \ln K_D$ ) 48 kJ/mol. Nimmt man eine Kopplung des Faltungs- und des Bindungsgleichgewichts an ( $K = K_D \cdot K_U$ ), so ergibt sich eine Stabilität von komplexiertem CspB von 58.7 kJ/mol. Die Diskrepanz zwischen dem experimentell bestimmten und dem theoretisch zu erwartenden Wert lässt darauf schließen, dass das angenommene Modell, in dem nur Amidprotonen im entfalteten Protein mit dem Lösungsmittel austauschen können, zu stark vereinfacht ist. Daher sind weitere Experimente vonnöten, um zu klären, ob Amidprotonen von gefaltetem CspB im freien oder komplexierten Zustand mit dem Lösungsmittel austauschen können. Dies würde dann zu einer Verifizierung des Modells in Gl. 61 führen. Andererseits berücksichtigt die theoretische Abschätzung jedoch keine Änderungen bzgl. der Struktur und der Dynamik des Proteins, die durchaus Teile des Stabilitätsgewinns durch die Bindung kompensieren können. Während nur geringe strukturelle Veränderungen bei der Komplexbildung beobachtet werden konnten (3.2.3), wurden weitreichende Unterschiede in der Picosekunden- bis Millisekundenbeweglichkeit gefunden (3.2.6). Diese kann mit der Änderung der Entropie bei der Bindung von CspB an dT7 korreliert werden, die mit Hilfe des Ordnungsparameters  $S^2$  im freien und gebundenen Protein abgeschätzt werden kann (Mercier, *et al.*, 2001). Ein Entropieverlust von bis zu 0.5 kJ/(mol·K) kann bei der Bindung auftreten, was zumindest zu einer teilweisen Enthalpie/Entropie-Kompensation führen könnte. Die Stabilität des freien Proteins ( $\Delta G_U = 11.8$  kJ/mol) wurde mit Hilfe eines Harnstoff-induzierten Entfaltungsübergangs ermittelt und stimmt sehr gut mit dem Ergebnis aus dem Amidprotonen-Experiment überein. Daraus folgt, dass Amidprotonenaustausch-Experimente durchaus für die Bestimmung der Proteinestabilität eingesetzt werden können.

### 3.2.8 Suche nach weiteren guten Bindern

Die Bestimmung der Konformation der Nukleinsäure im CspB/dT7-Komplex ist aufgrund der mangelnden Dispersion der NMR-Resonanzen des ssDNA-Fragments nicht möglich. Daher wurden weitere Oligodeoxyribonukleotide verschiedener Länge und Basenzusammensetzung untersucht, um einen möglichst hoch affinen Nukleoproteinkomplex zu

erhalten, der eine sequentielle Zuordnung der Nukleotide zulässt. Da es Hinweise darauf gibt, dass CspB bei Kälteschock an den 5'-untranslatierten Bereich (5'-UTR) seiner eigenen mRNA bindet, wurden auch davon abgeleitete ssDNA-Fragmente verwendet. Die Stöchiometrie und Bindungsaffinität der jeweiligen CspB/ssDNA-Komplexe wurde wie in 3.2.5 beschrieben anhand von Fluoreszenzlöschungsexperimenten bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tab. 14 zusammengefasst.

**Tab. 14:** Charakterisierung der Anzahl der Bindungsplätze und der Affinität von verschiedenen ssDNA-Fragmenten zu CspB zur Überprüfung deren Eignung zur Strukturbestimmung eines CspB/ssDNA-Komplexes mittels NMR-Spektroskopie.<sup>a</sup>

Fragment	Nukleotide	Sequenz	CspB:ssDNA	$K_D$ (nM)
dT4	4	TTT T	1:1	3205 ± 150
dT5	5	TTT TT	1:1	940 ± 10
dT6	6	TTT TTT	1:1	326 ± 20
dC6	6	CCC CCC	1:1	12600 ± 1000
dT7	7	TTT TTT T	1:1	1.8 ± 0.4
Y-Box5 <sup>b</sup>	5	<u>ATTGG</u>	<sub>f</sub>	<sub>f</sub>
Y-Box7 <sup>b</sup>	7	<u>TAT TGG T</u>	1.4:1	530 ± 50
Y-Box12 <sup>b</sup>	12	CTG <u>ATT GGC</u> CAA	1.9:1	2030 ± 390
Y-Box25 <sup>b</sup>	25	ATC CTA CTG <u>ATT GGC</u> CAA GGT GCT G	3:1	3920 ± 45
dcb1 <sup>c</sup>	7	TTA TTA G	1:1	20 ± 3.4
dcb1_a <sup>c</sup>	13	ATT ATT TTT GTT C	2:1	43.5 ± 2.2
dcb1_b <sup>c,d</sup>	13	GAG CAA GAA TAG G	2:1	1160 ± 90
dcb1_br <sup>c,d</sup>	13	GGA TAA GAA CGA G	2:1	1090 ± 110
dcb2_a <sup>c</sup>	17	TTT AAG AAG AAA GTT TT	2:1	460 ± 34
dcb2_b <sup>c,e</sup>	16	GAG TTT TGG TCT TGA A	2:1	43 ± 2
dcb2_br <sup>c,e</sup>	16	AAG TTC TGG TTT TGA G	2:1	30 ± 2
dcb2ds_13 <sup>c</sup>	13	GTT TTG TAA GAG T	2:1	66 ± 21

<sup>a</sup> Alle Experimente wurden in 50 mM Na-cacodylat, 100 mM KCl pH 7.0 bei 15 °C durchgeführt; <sup>b</sup> ssDNA-Fragmente enthalten das Y-Box Kernmotiv ATTGG; <sup>c</sup> ssDNA-Fragmente wurden aus dem 5'-untranslatierten Bereich der *cspB* mRNA abgeleitet (*cold box1* und 2); <sup>d</sup> bzw. <sup>e</sup> ssDNA-Fragmente besitzen identische Sequenz mit vertauschten 5'- und 3'-Enden; <sup>f</sup> nicht messbar, da Affinität zu gering.

Die Anzahl der CspB-Moleküle, die an ein ssDNA-Molekül binden hängt vor allem von der Länge der Nukleinsäure ab. Es werden zwischen 6-7 Nukleotiden für eine hochaffine Bindung von CspB benötigt, was bei dem Vergleich der dT-haltigen Oligonukleotiden deutlich in Erscheinung tritt und frühere Ergebnisse bestätigt (Lopez, *et al.*, 1999a, Lopez, *et al.*, 2001). Die Verkürzung von dT7 um ein Thymidine (dT6) führt zu einer 200fachen Erhöhung der Komplexdissoziationskonstante ( $K_D$ ). Auch die Basenzusammensetzung spielt eine wichtige Rolle, wie der Vergleich zwischen dT7 und Y-Box7 verdeutlicht. Die aus dem 5'-UTR abgeleiteten *cold box*-Fragmente zeigen sehr unterschiedliche Affinitäten was ausschließlich an der Basenzusammensetzung liegt. Diese ist darauf zurückzuführen, dass in

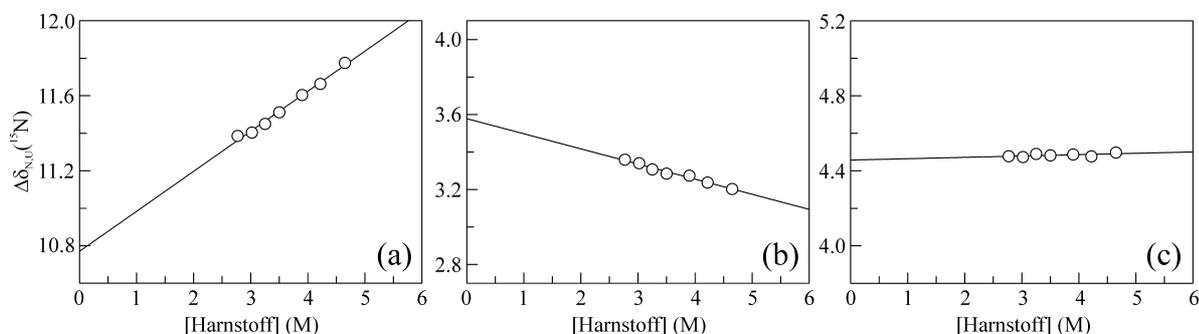
diesem Bereich des 5'-UTR doppelsträngige Strukturen ausgebildet werden, so dass der T-reiche Bereich (z.B. dcb1\_a) einen komplementären A-reichen Bereich besitzt (z.B. dcb1\_b), an den CspB nur sehr schwach bindet. Das Vertauschen des 5'- und 3'-Endes hat jedoch keinen Einfluss auf die Affinität und Stöchiometrie (z.B. dcb1\_b und dcb1\_br, dcb2\_b und dcb2\_br). Von den ssDNA-Fragmenten aus Tab. 14 vereinigt das sieben Nukleotide lange dcb1 die erforderlichen Anforderungen für die NMR-Untersuchungen am besten. Die Affinität liegt im nanomolaren Bereich und die Stöchiometrie beträgt 1:1. Homonukleare 1D und 2D NMR-Spektren zeigten eine gute Dispersion der  $^1\text{H}$  der freien Nukleinsäure, so dass die sequentielle Zuordnung durchgeführt werden konnte (Weininger, 2004). Aufgrund dieser viel versprechenden Ergebnisse wird zurzeit im Rahmen einer Diplomarbeit in unserer Gruppe die weitere NMR-spektroskopische Charakterisierung der Wechselwirkung von CspB mit dcb1 durchgeführt.

### 3.3 Studium der schnellen Faltung von CspB mit NMR-Spektroskopie

Die Faltung des kleinen monomeren Kälteschockproteins CspB von *B. subtilis* erfolgt nach dem Zweizustandsmodell (Schindler, *et al.*, 1995, Schindler, 1997). In diesem existieren sowohl im Gleichgewicht als auch in der Faltungskinetik nur der entfaltete und der native Zustand. CspB war eines der ersten Proteine, an denen kinetische Faltungsstudien im Millisekundenbereich durchgeführt wurden. Allerdings stoßen hierbei herkömmliche Methoden wie schnelle Mischungsverfahren (*stopped-flow*) an ihre experimentellen Grenzen, da die maximal bestimmbaren Raten bei ca.  $3000\text{ s}^{-1}$  liegen. Mit Hilfe von *continuous-flow* Apparaturen können Faltungsraten von bis zu  $10000\text{ s}^{-1}$  aufgelöst werden (Capaldi, *et al.*, 2001, Chan, *et al.*, 1997, Shastry & Roder, 1998, Teilum, *et al.*, 2002). Mischungsfreie Methoden wie Druck- oder Temperatursprung machen die Bestimmung von Faltungsraten bis ca.  $2 \cdot 10^4\text{ s}^{-1}$  bzw.  $2 \cdot 10^5$  zugänglich (Jacob, *et al.*, 1999b, Kubelka, *et al.*, 2003, Munoz, *et al.*, 1997). Neben der geringen Totzeit der Mischungsfreien Methoden stellt auch die unveränderte Lösungszusammensetzung nach dem Start der Reaktion einen Vorteil dar. In beiden Fällen erfolgt jedoch nur eine kleine Auslenkung aus dem Gleichgewicht, deren Relaxation am empfindlichsten messbar ist, wenn der native und entfaltete Zustand signifikant populiert vorliegen. Dies trifft vor allem im Übergangsbereich eines Entfaltungsübergangs zu. Die Detektion bei all diesen Methoden erfolgt meistens mittels Fluoreszenzspektroskopie, wobei die globale Reaktion mit Hilfe einer lokalen Sonde (Trp8 in CspB) beobachtet wird (Schindler, *et al.*, 1995). Dabei wird die Annahme getroffen, dass die Faltungsreaktion kooperativ verläuft und alle Bereiche im Protein konzertiert falten bzw. entfalten. Um diese Kooperativität auf atomarer Ebene überprüfen zu können bietet sich die hochauflösende NMR-Spektroskopie an. Allerdings ist die NMR-Spektroskopie nur begrenzt für kinetische Experimente einsetzbar, wobei die zu beobachtende Reaktion eine Rate  $< 5\text{ min}^{-1}$  besitzen sollte (siehe 3.6). Jedoch ist es möglich, kinetische Parameter aus Gleichgewichtsexperimenten zu extrahieren, da schnelle Fluktuationen (z.B. der Austausch zwischen zwei Konformationen) verschiedene NMR-Parameter wie z.B. Relaxationsraten beeinflussen können (siehe 1.2). In früheren Studien wurde die Linienformanalyse von 1D  $^1\text{H}$  NMR-Spektren erfolgreich zur Bestimmung der intrinsischen Faltungsraten von CspB angewendet (Zeeb, 2000, Zeeb & Balbach, 2003b). Aufgrund der geringen spektralen Auflösung in 1D  $^1\text{H}$ -NMR Spektren und der daraus folgenden starken Überlappung ist diese Methode nur begrenzt einsetzbar. Daher wurden in dieser Arbeit 2D NMR-Methoden zur Bestimmung der Faltungsraten etabliert, mit denen die Charakterisierung der Kooperativität der Reaktion und des Übergangszustand ermöglicht werden.

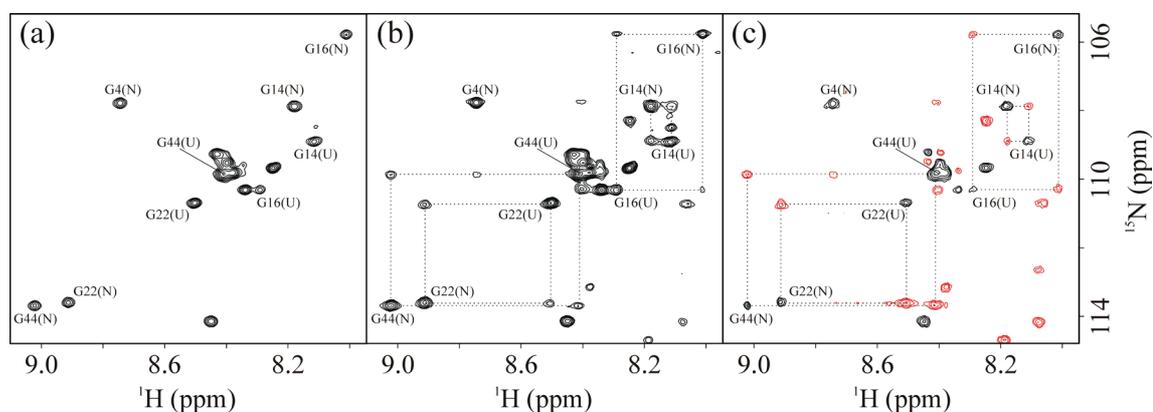
### 3.3.1 ZZ-Austausch NMR Spektroskopie

Im Übergangsbereich des Harnstoff-induzierten Entfaltungsübergangs von CspB ist sowohl der native als auch der entfaltete Zustand signifikant populiert. Daher werden in NMR-Spektren für beide Konformationen Signale erhalten, sofern sich diese im langsamen Austausch bezüglich der NMR-Zeitskala befinden. Langsamer Austausch bedeutet, dass die Austauschrate zwischen den beiden Zuständen kleiner ist, als die Differenz der chemischen Verschiebung zwischen den Signalen der beiden Zustände. Dies trifft für CspB im Bereich zwischen 2.77 M und 4.65 M Harnstoff zu, weshalb in diesem Bereich bei sieben verschiedenen Harnstoffkonzentrationen 2D ZZ-Austauschspektren aufgezeichnet wurden. Dabei kam die Pulssequenz aus Abb. 18 zum Einsatz mit der die Spin-Gitter Relaxationsraten ( $R_{1N}$ ,  $R_{1U}$ ) und die Austauschraten ( $k_f$ ,  $k_u$ ) simultan ermittelt werden können. Die meisten Amidprotonen von CspB befinden sich im langsamen Austausch, so dass diese ein Kreuzsignal für den nativen und ein Kreuzsignal für den entfalteten Zustand zeigen (Autosignale). Durch Verlängerung des Austauschzeitintervalls werden sog. Austauschsignale generiert, die die  $^{15}\text{N}$  chemische Verschiebung des nativen bzw. entfalteten Zustands und die  $^1\text{H}$  chemische Verschiebung des jeweils anderen Zustands tragen (2.5.6). Die Zuordnung der Kreuzsignale des nativen Zustands bei 0 M Harnstoff ist bekannt. Durch die Aufnahme von 2D  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  HSQC-Spektren bei unterschiedlichen Harnstoffkonzentrationen konnte die Abhängigkeit der chemischen Verschiebung bestimmt werden, da die Kreuzsignale sich graduell verschoben. Somit konnte die Zuordnung der Kreuzsignale des nativen Proteins über den gesamten Harnstoffkonzentrationsbereich getroffen werden. Die Abhängigkeit des Betrags der Differenz der  $^{15}\text{N}$  chemischen Verschiebung zwischen dem Kreuzsignal des nativen und des entfalteten Proteins ( $\Delta\delta_{N,U}(^{15}\text{N})$ ) von der Harnstoffkonzentration ist linear und in Abb. 51 gezeigt.



**Abb. 51:** Harnstoffabhängigkeit der Differenz der  $^{15}\text{N}$  chemischen Verschiebung zwischen den Kreuzsignalen des nativen und entfalteten Zustands ( $\Delta\delta_{N,U}(^{15}\text{N})$ ). (a) W8, (b) G54, (c) G16. Die lineare Regression ergab für die Steigung bzw. den y-Achsenabschnitt für (a)  $(0.213 \pm 0.009) \text{ ppm}\cdot\text{M}^{-1}$  bzw.  $(10.771 \pm 0.034) \text{ ppm}$ , für (b)  $(-0.081 \pm 0.005) \text{ ppm}\cdot\text{M}^{-1}$  bzw.  $(3.578 \pm 0.019) \text{ ppm}$ , für (c)  $(0.007 \pm 0.005) \text{ ppm}\cdot\text{M}^{-1}$  bzw.  $(4.457 \pm 0.017) \text{ ppm}$ .

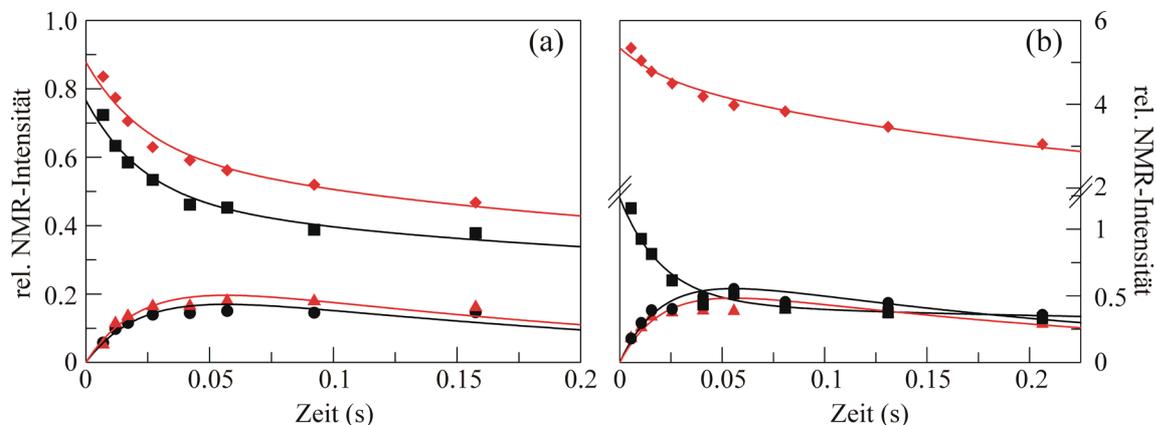
In den ZZ-Austauschspektren sind neben den Autosignalen des nativen und entfalteten Zustands auch die dazugehörigen Austauschsignale vorhanden, so dass teilweise eine Überlagerung der Kreuzsignale eintritt. Die Unterscheidung der Autosignale von den Austauschsignalen erfolgte nach einer Subtraktionsmethode (2.5.6). Hierzu wurden  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  2D-Korrelationsspektren mit der Pulssequenz aus Abb. 19 mit identischen Austauschintervallen aufgezeichnet. Der Unterschied dieser beiden Spektren besteht darin, dass in einem Experiment der Austausch nach (Abb. 19a, Austauschspektrum) bzw. vor (Abb. 19b, Autospektrum) der Entwicklung der  $^{15}\text{N}$  chemischen Verschiebung ermöglicht wird, so dass Austauschsignale generiert werden oder nicht. Die Subtraktion des Austauschspektrums vom Autospektrum ergibt positive Intensitäten für die Autosignale und negative Intensitäten für die Austauschsignale, was in Abb. 52 gezeigt ist. Da die Relaxations- bzw. Austauschzeit identisch ist werden Subtraktionsartefakte minimiert. Die Korrelation der Autosignale des nativen und des entfalteten Zustands mit Hilfe der Austauschsignale ermöglicht eine einfache Zuordnung der Kreuzsignale des entfalteten Zustands ausgehend von der Zuordnung des nativen Proteins. Insgesamt konnten so 34 Kreuzsignale von Amidprotonen im entfalteten Zustand identifiziert und zugeordnet werden.



**Abb. 52:** Ausschnitt aus 2D  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  Korrelationsspektren von CspB mit einem Austauschzeitintervall von 60 ms in 20 mM Na-cacodylat, 3.1 M Harnstoff pH7.0 bei 25 °C. (a) Autospektrum (Pulssequenz Abb. 19b), in dem nur Kreuzsignale des nativen und entfalteten Proteins auftreten. (b) Austauschspektrum (Pulssequenz Abb. 19a), das zusätzlich zu den Autosignalen auch die Austauschsignale enthält. (c) Differenzspektrum (Subtraktion des Austauschspektrums vom Autospektrum). Positive bzw. negative Intensitäten wurden in schwarz bzw. rot dargestellt und repräsentieren die Auto- bzw. Austauschsignale. Die Kreuzsignale eines Amidprotons wurden mit einem Rechteck verbunden und die Zuordnung angegeben.

Durch die Variation des Austauschintervalls in der Pulssequenz aus Abb. 19 sind ebenso wie mit der Pulssequenz aus Abb. 18 die Bestimmung der longitudinalen Relaxationsraten von U und N sowie die Faltungsraten möglich. Allerdings ist der doppelte Messzeitaufwand notwendig, da für jede Austauschzeit sowohl ein Auto- als auch ein Austauschspektrum

gemessen werden muss. Dadurch entsteht aber auch ein Vorteil für die nachfolgende Anpassung mit Gl. 50. So kann die im Autoexperiment bestimmte  $R_{1N}$ - und  $R_{1U}$ -Rate bei der Anpassung der Intensitätsverläufe der vier Kreuzsignale eines Amidprotons aus dem Austauschexperiment konstant gehalten werden, was die Güte der Anpassung durch Gl. 50 verbessert. Ein entscheidender Nachteil der Pulssequenz aus Abb. 19 für die quantitative Bestimmung der Austauschraten ist jedoch, dass das unterschiedliche Austauschverhalten der Amidprotonen mit dem Lösungsmittel im nativen bzw. entfalteten Protein nicht berücksichtigt wird. Dies führt zu einer fehlerhaften Bestimmung der Signalintensität der Kreuzsignale und somit zu einer Unsicherheit in der Gleichgewichtskonstante (2.5.6). Daher wurden die Faltungsraten ausschließlich mit der Pulssequenz aus Abb. 18 bestimmt, in der sehr viel Wert auf das unterschiedliche Führen der Wasser- bzw. Proteinmagnetisierung gelegt wird. In Abb. 53 ist die simultane Anpassung der Intensität der vier Kreuzsignale von G22 bei 2.8 M Harnstoff und von F15 bei 3.5 M Harnstoff an Gl. 50 gezeigt. Die Intensität der Autosignale erfährt einen exponentiellen Abfall (■,◆), während die Intensität der Austauschsignale (●,▲) einen charakteristischen Verlauf nimmt: Bei kurzen Austauschzeiten steigt die Intensität deutlich an, um bei längeren Austauschzeiten aufgrund der größer werdenden longitudinalen Relaxation wieder abzunehmen.



**Abb. 53:** Gleichzeitige Anpassung der longitudinalen Relaxationsraten ( $R_{1N}$ ,  $R_{1U}$ ) und der Austauschrate ( $k_{\text{ex}} = k_f + k_u$ ) in 20 mM Na-cacodylat pH 7.0 bei 25 °C. (a) G22 in Gegenwart von 2.8 M Harnstoff. (b) F15 in Gegenwart von 3.5 M Harnstoff. Intensität der Autosignale des (■) nativen bzw. des (◆) entfalten Zustands. Intensität der Austauschsignale des (●) nativen bzw. des (▲) entfalten Zustands. Die gemeinsame Anpassung der vier Kreuzsignalintensitäten je Amidproton an Gl. 50 ergab für (a)  $R_{1N} = (7.4 \pm 3.1) \text{ s}^{-1}$ ,  $R_{1U} = (2.4 \pm 2.6) \text{ s}^{-1}$ ,  $k_{\text{ex}} = (38.9 \pm 4.2) \text{ s}^{-1}$  und für (b)  $R_{1N} = (4.6 \pm 2.3) \text{ s}^{-1}$ ,  $R_{1U} = (4.2 \pm 0.5) \text{ s}^{-1}$ ,  $k_{\text{ex}} = (43.4 \pm 3.9) \text{ s}^{-1}$ . Die Spektren wurden an einem Bruker Avance750 mit der Pulssequenz aus Abb. 18 aufgezeichnet.

Aus der mit *stopped flow* Fluoreszenzmessungen erhaltenen Chevron-Auftragung (halblogarithmische Auftragung von  $k_{\text{ex}}$  gegen [Harnstoff]) sind die Faltungsraten und ihre Harnstoffabhängigkeiten bekannt (Schindler, *et al.*, 1995). Die damit bestimmte

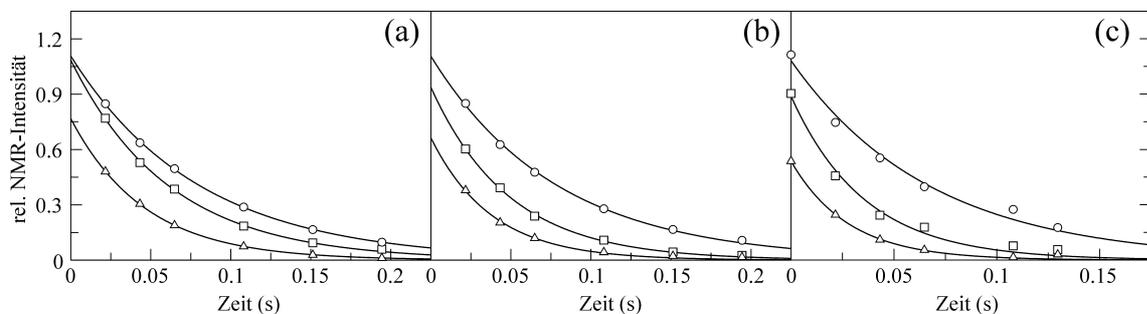
Austauschrate  $k_{\text{ex}}$  ( $k_{\text{ex}} = k_{\text{f}} + k_{\text{u}}$ ) beträgt bei 25 °C und 2.8 M bzw. 3.5 M Harnstoff 75 s<sup>-1</sup> bzw. 55 s<sup>-1</sup>. Die mit der 2D ZZ-Austauschspektroskopie erhaltenen Ergebnisse sind vergleichbar (39 s<sup>-1</sup> bzw. 43 s<sup>-1</sup>), liegen jedoch zu tief. Der Hauptgrund dafür ist in der Empfindlichkeit dieser Austauschexperimente bzgl. der Geschwindigkeit der beobachteten Reaktion zu suchen. Die Faltungsrate von CspB im untersuchten Harnstoffkonzentrationsbereich liegt teilweise deutlich über dem theoretisch vorgeschlagenen Bereich von 0.1 s<sup>-1</sup> bis 10 s<sup>-1</sup>. Durch die hohe Austauschrate sind auch Austauschsignale bei sehr kurzen Austauschintervallen (< 1 ms) in den Spektren vorhanden, da während des abschließenden INEPT-Schritts der Pulssequenz in Abb. 18 ebenfalls der Austausch wirkt. Zusätzliche Probleme bei der Anpassung der relativen Intensitäten der vier Kreuzsignale treten durch das ungünstiger werdende Populationsverhältnis von nativem und entfaltetem Protein bei höheren Harnstoffkonzentrationen auf. Dies ist schon teilweise in Abb. 53b zu sehen. Bei steigender Harnstoffkonzentration steigt die Intensität des Autosignals von U stark an und die Intensität des Autosignals von N nimmt stark ab. Bei 4.2 M Harnstoff liegt bei G22 die relative Intensität des Autosignals von N noch bei ca. 3% der Intensität des Autosignals von U. Die Austauschrate ( $k_{\text{ex}}$ ) bleibt für G22 zwischen 2.8 M Harnstoff und 4.2 M Harnstoff nahezu konstant, was ebenso ein Zeichen für die zu geringe Sensitivität der ZZ-Austauschspektroskopie ist, um einen vollständigen Datensatz für die quantitative Analyse zwischen 0 M und 8 M Harnstoff zu erhalten. Vergleichbare Resultate wurden für W8, F15, E19 und G44 erhalten. Aus diesen Gründen wurde hier auf die Auswertung und Darstellung der weiteren 19 analysierbaren Aminosäuren verzichtet.

### 3.3.2 Charakterisierung der Proteinfaltung mit $R_2$ -Dispersionsmessungen

Die Bestimmung von Faltungsraten im Übergangsbereich des Harnstoff-induzierten Entfaltungsübergangs von CspB mittels zweidimensionaler ZZ-Austauschspektroskopie wurde in 3.3.1 beschrieben. Ebenso wurde auf die eingeschränkte Empfindlichkeit bzgl. der bestimmbareren Raten eingegangen. Um die Millisekundenfaltung von CspB in einem größeren Zeit- und Harnstoffkonzentrationsbereich untersuchen zu können, wurden sog.  $R_2$ -Dispersionsmessungen durchgeführt (2.5.5). Dabei werden transversale Relaxationsraten ( $R_2$ ) mit Hilfe von relaxations-kompensierten Carr-Purcell-Meiboom-Gill-Spinecho-Sequenzen (CPMG) bestimmt (Loria, *et al.*, 1999, Millet, *et al.*, 2000), die in Abb. 17 wiedergegeben wurden. Eine Spinecho-Sequenz besteht prinzipiell aus einer Wartezeit ( $\tau_{\text{cp}} = 2\tau$ ), die durch einen 180°-Puls auf den zu beobachtenden Kern geteilt wird ( $[\tau-180^\circ-\tau]_n$ ). Prozesse im Millisekunden- bis Mikrosekundenbereich tragen zu  $R_2$  bei und werden als chemischer

Austausch ( $R_{\text{ex}}$ ) bezeichnet. Somit stellt die gemessene  $R_2$  die Summe aus  $R_{\text{ex}}$  und der apparenten  $R_2$  in Abwesenheit von chemischem Austausch ( $R_2^0$ ) dar (Gl. 43). Der Beitrag des chemischen Austauschs kann durch die CPMG-Spinecho-Sequenz eliminiert werden, wenn der Austauschprozess auf einer langsameren Zeitskala im Vergleich zu  $\tau_{\text{cp}}$  abläuft. Bei sehr kurzen  $\tau_{\text{cp}}$ -Werten (*fast pulsing limit*) tragen nur sehr schnelle Prozesse auf der Picosekunden- bis Nanosekundenzeitskala zu  $R_2$  bei, woraus sich  $R_2^0$  ergibt. Befindet sich  $\tau_{\text{cp}}$  in einem Zeitbereich, in dem der Austausch zwischen verschiedenen Zuständen erfolgen kann, wird  $R_2$  um den  $R_{\text{ex}}$ -Beitrag erhöht. Durch die Variation von  $\tau_{\text{cp}}$  wird folglich auch  $R_2$  variiert, sofern ein ausreichend schneller Austauschprozess vorhanden ist. Die Auftragung von  $R_2$  als Funktion von  $1/\tau_{\text{cp}}$  stellt die  $R_2$ -Dispersionskurve dar, durch deren Anpassung mit Gl. 46 die Austauschrate bestimmt werden kann. Diese Methode ist bis zu einer Population eines Zustands von 1% empfindlich (Loria, *et al.*, 1999, Mulder, *et al.*, 2001). Daraus ergibt sich für die Faltung von CspB, dass selbst in Abwesenheit des Denaturierungsmittels die Bestimmung der Faltungsraten möglich ist, da das entfaltete Protein ausreichend populiert vorliegt.

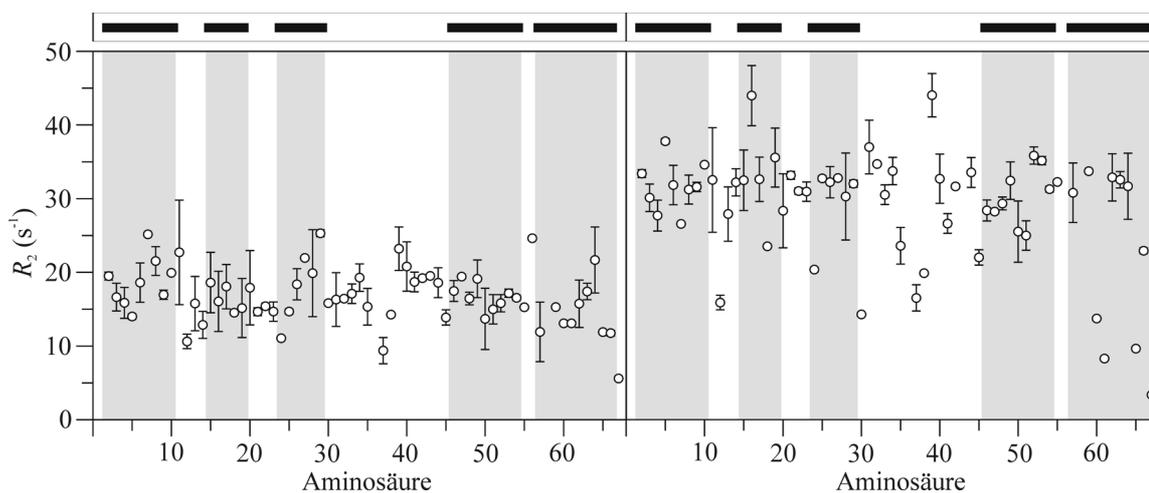
Zur Bestimmung von der  $R_2$ -Dispersionskurve wurden zuerst die  $R_2$ -Raten für jeden  $\tau_{\text{cp}}$ -Wert mit Hilfe einer einfachen Exponentialfunktion ermittelt. In Abb. 54 wurde diese Anpassung bei verschiedenen Harnstoffkonzentrationen exemplarisch für  $\tau_{\text{cp}} = 10.8$  ms gezeigt. Bei diesem  $\tau_{\text{cp}}$ -Wert trägt die Millisekundenfaltung von CspB signifikant zu  $R_2$  bei.



**Abb. 54:** Anpassung der Intensitätsverläufe zur Bestimmung von  $R_2$  einiger Reste von CspB in 20 mM Nacacodylat/HCl pH 7.0 bei 25 °C und 600 MHz in Gegenwart von (a) 1.2 M, (b) 2.0 M und (c) 3.1 M Harnstoff. Die 2D  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  Korrelationsspektren wurden mit der Pulssequenz aus Abb. 17b aufgezeichnet, wobei  $\tau_{\text{cp}} 10.8$  ms betrug und dadurch  $R_{\text{ex}}$  signifikant zu  $R_2$  beiträgt. Die durchgezogenen Linien stellen die Anpassung an eine einfache Exponentialfunktion der Intensitäten von ( $\square$ ) K5, ( $\circ$ ) D24 und ( $\triangle$ ) S48 dar.  $R_2$  von K5 bei 1.2 M, 2 M und 3.1 M Harnstoff beträgt  $(16.2 \pm 0.4) \text{ s}^{-1}$ ,  $(20.4 \pm 0.5) \text{ s}^{-1}$  und  $(27.9 \pm 2.1) \text{ s}^{-1}$ , von D24  $(12.5 \pm 0.1) \text{ s}^{-1}$ ,  $(12.7 \pm 0.3) \text{ s}^{-1}$  und  $(14.7 \pm 1.0) \text{ s}^{-1}$  sowie von S48  $(21.6 \pm 0.2) \text{ s}^{-1}$ ,  $(26.4 \pm 1.4) \text{ s}^{-1}$  und  $(35.8 \pm 1.7) \text{ s}^{-1}$ .

Die  $R_2$ -Raten der in Abb. 54 dargestellten Reste von CspB besitzen verschiedene Abhängigkeiten von der Harnstoffkonzentration. Während  $R_2$  von D24 zwischen 1.2 M und 3.1 M Harnstoff nur geringfügig zunimmt steigt  $R_2$  von K5 bzw. S48 bei höherer

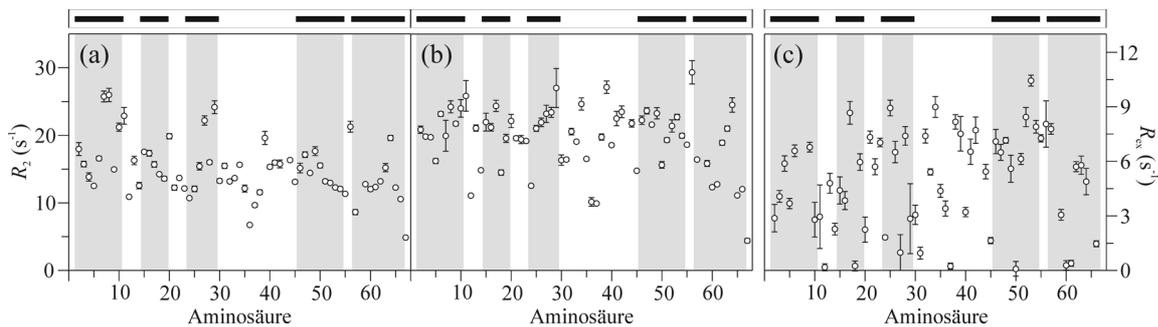
Harnstoffkonzentration stark an. Letzteres liegt am zunehmenden Austausch aufgrund der höheren Population von entfaltetem Protein. Bei D24 ist vermutlich die Differenz der  $^{15}\text{N}$  chemischen Verschiebung zwischen dem Kreuzsignal im nativen und entfalteten Zustand sehr klein, wodurch nur eine geringe Zunahme von  $R_2$  bei steigender Population des entfalteten Zustands erfolgt. Die Abhängigkeit der  $R_2$ -Raten von der Harnstoffkonzentration bei einer Feldstärke von 16.4 T und  $\tau_{\text{cp}} = 10.8$  ms ist für alle Reste von CspB in Abb. 55 gezeigt.



**Abb. 55:** Abhängigkeit der transversalen Relaxationsrate  $R_2$  von der Harnstoffkonzentration. Die Experimente wurden in 20 mM Na-cacodylat/HCl pH 7.0 bei 25 °C und 16.4 T (700 MHz  $^1\text{H}$ ) in Abwesenheit von Harnstoff (links) bzw. in Gegenwart von 3.1 M Harnstoff (rechts) durchgeführt.  $R_2$  wurde wie in Abb. 54 beschrieben bei einem  $\tau_{\text{cp}}$ -Wert von 10.8 ms bestimmt. Die gemittelten  $R_2$ -Raten steigen zwischen 0 M und 3.1 M von  $16.8 \text{ s}^{-1}$  auf  $28.9 \text{ s}^{-1}$  an. Die schwarzen bzw. grauen Rechtecke entsprechen den fünf  $\beta$ -Faltblattstränge von CspB.

Auch hier ist die Zunahme von  $R_2$  mit steigender Harnstoffkonzentration zu beobachten, die für nahezu alle Reste von CspB zutrifft unabhängig davon, ob sich die Aminosäure in einem unstrukturierten Schleifenbereich oder in einem regulären Sekundärstrukturelement befindet. Daraus ergibt sich ein erster Hinweis, dass die Entfaltung des Proteins einen globalen Prozess darstellt. Zusätzlich kann daraus geschlossen werden, dass die  $R_2$ -Dispersion neben der Identifizierung lokaler Beweglichkeiten (Loria, *et al.*, 1999) auch zur Beobachtung der globalen Entfaltung der gesamten Proteinkette verwendet werden kann. Zur Verdeutlichung kann eine semi-quantitative Abschätzung des chemischen Austauschbeitrags zu  $R_2$  herangezogen werden (Loria, *et al.*, 1999). Dabei erfolgt die Subtraktion einer  $R_2$ , die bei einem kurzen  $\tau_{\text{cp}}$  bestimmt wurde, von einer  $R_2$ , die bei einem langen  $\tau_{\text{cp}}$  bestimmt wurde ( $R_{\text{ex}} \approx R_2(\tau_{\text{cp}}=10.8 \text{ ms}) - R_2(\tau_{\text{cp}}=1 \text{ ms})$ ). Die so ermittelten  $R_{\text{ex}}$ -Werte und die dazugehörige  $R_2(\tau_{\text{cp}}=10.8 \text{ ms})$  und  $R_2(\tau_{\text{cp}}=1 \text{ ms})$  sind für CspB in Gegenwart von 1.2 M Harnstoff bei einer Feldstärke von 14.1 T in Abb. 56 gezeigt. Der durchschnittliche  $R_{\text{ex}}$ -Wert beträgt  $4.9 \text{ s}^{-1}$  und 11 Aminosäuren (K7, W8, E12, I18, S31, G37, E50, A60, A61, K65, A67) besitzen keinen

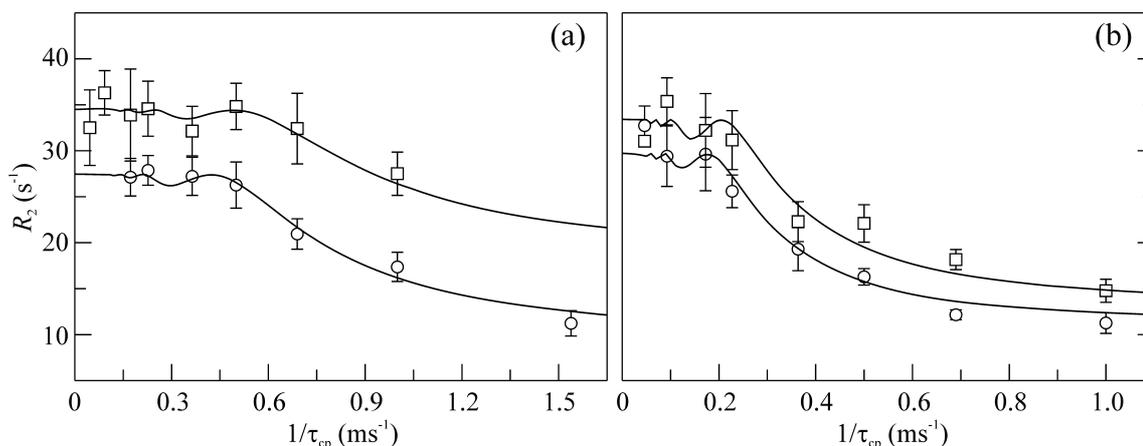
signifikanten  $R_{\text{ex}}$ -Beitrag zu  $R_2$  ( $R_{\text{ex}} < 1 \text{ s}^{-1}$ ). Dieses Verhalten bedeutet entweder dass diese Aminosäuren keinen chemischen Austausch im Millisekundenbereich erfahren, oder dass die Differenz der  $^{15}\text{N}$  chemischen Verschiebung zwischen dem Kreuzsignal des nativen bzw. entfalteten Proteins zu klein ist ( $\Delta\omega < 0.5 \text{ ppm}$ ). Für diese Reste ist die nachfolgende quantitative Analyse nicht sinnvoll. Die semi-quantitative Abschätzung des  $R_{\text{ex}}$ -Beitrags wird oftmals zur schnellen Identifizierung von Resten in einem Protein verwendet, die eine Dynamik im Mikro- bis Millisekundenbereich aufweisen, ohne dass eine vollständige  $R_2$ -Dispersionskurve aufgezeichnet werden muss (Loria, *et al.*, 1999).



**Abb. 56:** Abschätzung des  $R_{\text{ex}}$ -Beitrags zu  $R_2$  durch Differenzbildung zwischen  $R_2(\tau_{\text{cp}}=10.8 \text{ ms})$  und  $R_2(\tau_{\text{cp}}=1 \text{ ms})$  in 20 mM Na-cacodylat/HCl pH 7.0 in Gegenwart von 1.2 M Harnstoff bei 25 °C und 14.1 T (600 MHz  $^1\text{H}$ ). (a)  $R_2(\tau_{\text{cp}}=1 \text{ ms})$ , (b)  $R_2(\tau_{\text{cp}}=10.8 \text{ ms})$ , (c)  $R_{\text{ex}}$ -Beitrag ( $R_{\text{ex}} = R_2(\tau_{\text{cp}}=10.8 \text{ ms}) - R_2(\tau_{\text{cp}}=1 \text{ ms})$ )

Die quantitative Bestimmung des  $R_{\text{ex}}$ -Beitrags bzw. der Austauschrate ( $k_{\text{ex}}$ ) erfolgt durch die Anpassung von Gl. 47 bzw. Gl. 46 an die  $R_2$ -Dispersionskurve. Aus dieser resultieren Ergebnisse für die transversale Relaxationsrate des nativen bzw. entfalteten Proteins in Abwesenheit des Austauschs ( $R_{2\text{N}}$ ,  $R_{2\text{U}}$ ), die Differenz der chemischen Verschiebung der Kreuzsignale der beiden Zustände ( $\Delta\omega$ ), die Population des jeweiligen Zustands ( $p_{\text{N}}$ ,  $p_{\text{U}}$ ) sowie für die Austauschrate. Eine freie Anpassung einer einzelnen  $R_2$ -Dispersionskurve, d.h. ohne die Festlegung einiger Parameter, ergab keine verlässlichen Resultate. Abhilfe könnte z.B. durch eine globale Analyse mehrerer  $R_2$ -Dispersionskurven bei verschiedenen Feldstärken schaffen. Eine Alternative um signifikantere Ergebnisse für die einzelnen Parameter zu erhalten besteht darin, diejenigen Parameter, die experimentell zugänglich sind, separat zu bestimmen und bei der nachfolgenden Anpassung der  $R_2$ -Dispersionskurve konstant zu halten. So wurde  $\Delta\omega$  und dessen Harnstoffabhängigkeit mit Hilfe der 2D ZZ-Austauschspektroskopie und einer Reihe 2D  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  HSQC-Spektren bei unterschiedlichen Harnstoffkonzentrationen bestimmt (Abb. 51). Desweiteren wurde die Annahme getroffen, dass  $R_{2\text{N}}$  und  $R_{2\text{U}}$  äquivalent sind. Dies gilt unter der Voraussetzung, dass  $p_{\text{N}} \gg p_{\text{U}}$  ist (Millet, *et al.*, 2000). Da sich die Population des entfaltenen Zustands aus dem Zweizustandsmodell der Faltung von CspB über die Population des nativen Zustands ergibt ( $p_{\text{U}} = 1 - p_{\text{N}}$ ), müssen

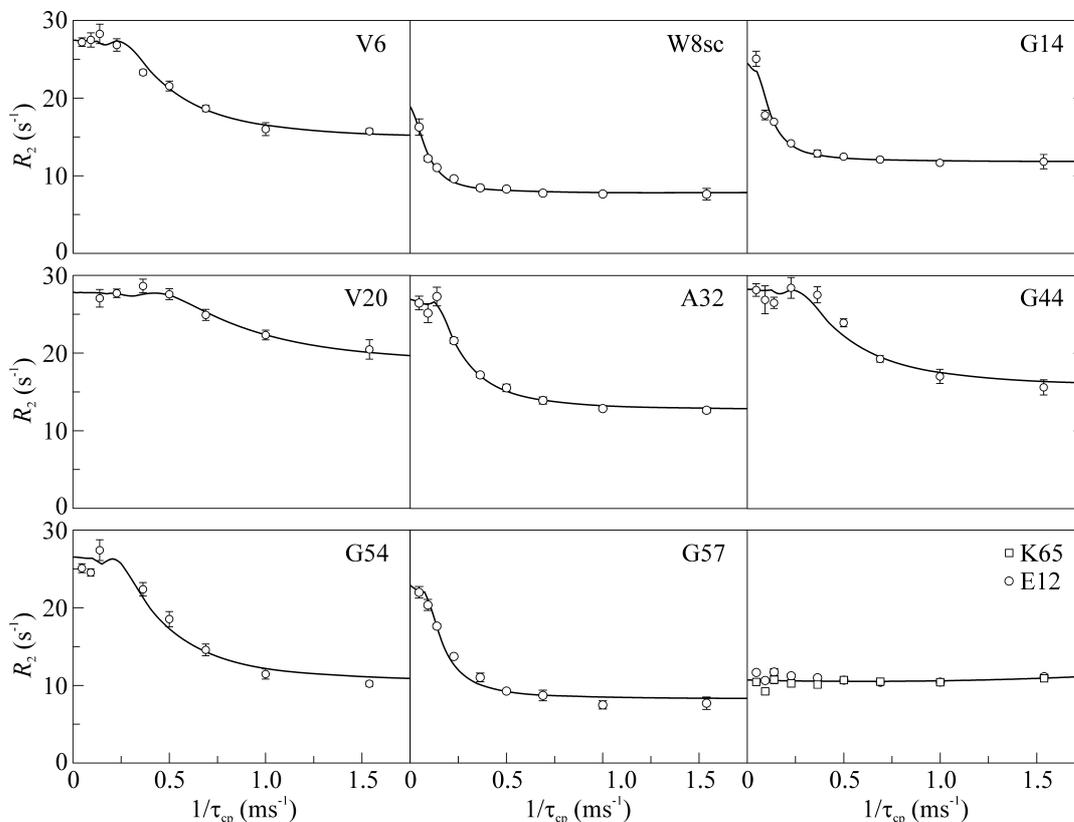
bei der Anpassung der  $R_2$ -Dispersionskurve lediglich die Parameter  $R_{2N}$ ,  $p_N$  sowie  $k_{ex}$  ermittelt werden. Stehen experimentelle Daten für zwei Feldstärken zur Verfügung sind die Ergebnisse für  $p_N$  ausreichend verlässlich, wie dies für die simultane Anpassung der  $R_2$ -Dispersionskurve von F15 und G22 in 20 mM Na-cacodylat/HCl pH 7.0 in Gegenwart von 3.1 M Harnstoff bei 14.1 T (600 MHz  $^1\text{H}$ -Resonanzfrequenz) und 16.4 T (700 MHz  $^1\text{H}$ -Resonanzfrequenz) der Fall ist (Abb. 57). Die berechneten Populationen liegen für F15 bzw. G22 bei 0.72 bzw. 0.71 und die Austauschraten bei  $65.7\text{ s}^{-1}$  bzw.  $56.3\text{ s}^{-1}$  und stimmen sehr gut mit den Ergebnissen von Schindler *et al.* überein (Schindler, *et al.*, 1995). Darin wurde die Harnstoffabhängigkeit der Faltungsraten mittels *stopped flow* Fluoreszenzspektroskopie erhalten (Chevron-Auftragung). Die Population in Gegenwart von 3.1 M Harnstoff betrug 0.73 und die Austauschrate  $74.4\text{ s}^{-1}$ . Erfolgt eine separate Anpassung der verschiedenen  $R_2$ -Dispersionskurven aus Abb. 57 mit einer konstant gehaltenen Population von 0.73 stimmen die ermittelten Austauschraten ebenfalls mit den Ergebnissen der *stopped flow*-Experimente überein. Bei 14.1 T bzw. 16.4 T beträgt  $k_{ex}$  für F15 ( $60.1 \pm 14.0$ )  $\text{s}^{-1}$  bzw. ( $74.2 \pm 5.0$ )  $\text{s}^{-1}$  und für G22 ( $73.3 \pm 9.5$ )  $\text{s}^{-1}$  bzw. ( $75.4 \pm 7.4$ )  $\text{s}^{-1}$ .



**Abb. 57:** Simultane Anpassung von Gl. 46 an die  $R_2$ -Dispersionskurven von (a) F15 und (b) G22. Zur Bestimmung der apparenten  $R_2$  wurde die Pulssequenz aus Abb. 17a ( $1/\tau_{cp} > 0.14\text{ ms}^{-1}$ ) bzw. Abb. 17b ( $1/\tau_{cp} < 0.14\text{ ms}^{-1}$ ) verwendet. Die Experimente wurden bei einer Feldstärke von (○) 14.1 T (600 MHz  $^1\text{H}$ ) bzw. (□) 16.4 T (700 MHz  $^1\text{H}$ ) in 20 mM Na-cacodylat/HCl, 3.1 M Harnstoff pH 7.0 und  $25\text{ }^\circ\text{C}$  durchgeführt. Für die Anpassung wurden  $R_{2U}$ (○) bzw.  $R_{2U}$ (□) und  $\Delta\omega$  (F15: 6.91 ppm; G22: 2.89 ppm) nicht variiert, wodurch sich für (a) F15:  $p_N = (0.72 \pm 0.09)$ ,  $R_{2N}$ (○) =  $(8.8 \pm 2.7)\text{ s}^{-1}$ ,  $R_{2N}$ (□) =  $(15.9 \pm 3.7)\text{ s}^{-1}$ ,  $k_{ex} = (65.7 \pm 25.3)\text{ s}^{-1}$  und für (b) G22:  $p_N = (0.71 \pm 0.07)$ ,  $R_{2N}$ (○) =  $(13.1 \pm 2.5)\text{ s}^{-1}$ ,  $R_{2N}$ (□) =  $(16.8 \pm 3.0)\text{ s}^{-1}$ ,  $k_{ex} = (56.3 \pm 20.0)\text{ s}^{-1}$  ergaben.

Die Charakterisierung der Millisekundenfaltung von CspB mit Hilfe der  $R_2$ -Dispersion wurde bei Harnstoffkonzentrationen zwischen 0 M und 5.3 M durchgeführt. Bis zum jetzigen Zeitpunkt existieren aufgrund des enormen Messzeitaufwands jedoch noch nicht für alle Harnstoffkonzentrationen experimentelle Daten bei zwei Feldstärken, so dass für die weiteren

Anpassungen der  $R_2$ -Dispersionskurven die Populationen gemäß der Chevron-Auftragung (Schindler, *et al.*, 1995) eingesetzt und konstant gehalten wurden. Diese Auswertestrategie ist aufgrund der oben gezeigten Übereinstimmung der Ergebnisse der simultanen Anpassung von zwei  $R_2$ -Dispersionskurven, die bei unterschiedlichen Feldstärken erhalten wurden, und der separaten Anpassung einer  $R_2$ -Dispersionskurve mit konstant gehaltener Population, anwendbar. Alle Anpassungen wurden mit Gl. 46 durchgeführt, da diese unabhängig vom vorherrschenden Austauschregime (schnell, intermediär, langsam) ist. Zusätzlich kann Gl. 46 bei jedem vorliegenden Verhältnis von  $p_N$  und  $p_U$  eingesetzt werden. In Abb. 58 sind  $R_2$ -Dispersionskurven einiger Aminosäuren von CspB in Gegenwart von 2 M Harnstoff und bei einer Feldstärke von 14.1 T dargestellt.



**Abb. 58:**  $R_2$ -Dispersionskurven verschiedener Aminosäuren von CspB in 20 mM Na-cacodylat/HCl, 2 M Harnstoff pH 7.0 bei 25 °C und einer Feldstärke von 14.1 T. Die apparente  $R_2$  wurde mit der Pulssequenz aus Abb. 17a ( $1/\tau_{cp} > 0.14 \text{ ms}^{-1}$ ) bzw. Abb. 17b ( $1/\tau_{cp} < 0.14 \text{ ms}^{-1}$ ) bestimmt. Die durchgezogene Linie zeigt die separate Anpassung von Gl. 46 an die jeweilige  $R_2$ -Dispersionskurve, wobei  $p_N$  mit 0.894 und  $\Delta\omega$  für V6, W8sc, G14, V20, A32, G44, G54, G57 und E12 mit 3.82 ppm, 0.53 ppm, 0.89 ppm, 6.95 ppm, 1.89 ppm, 3.42 ppm, 3.58 ppm, 1.00 ppm und 1.02 ppm konstant gehalten wurde. Für K65 konnte kein  $\Delta\omega$  bestimmt werden. Die erhaltenen Austauschraten betragen  $(124.3 \pm 7.3) \text{ s}^{-1}$ ,  $(236.4 \pm 32.1) \text{ s}^{-1}$ ,  $(135.3 \pm 19.0) \text{ s}^{-1}$ ,  $(92.0 \pm 8.1) \text{ s}^{-1}$ ,  $(138.4 \pm 5.5) \text{ s}^{-1}$ ,  $(121.2 \pm 12.0) \text{ s}^{-1}$ ,  $(156.0 \pm 14.4) \text{ s}^{-1}$  und  $(149.0 \pm 9.8) \text{ s}^{-1}$  für V6, W8sc, G14, V20, A32, G44, G54 und G57. E12 und K65 zeigen keine Abhängigkeit der  $R_2$  von  $\tau_{cp}$ . Die Linie soll nur das Auge führen.

Die ermittelten Austauschraten liegen bis auf V20 und W8sc zwischen  $121 \text{ s}^{-1}$  und  $156 \text{ s}^{-1}$  und sind mit der aus der Chevron-Auftragung (Schindler, *et al.*, 1995) erhaltenen  $k_{\text{ex}}$  von  $173 \text{ s}^{-1}$  nahezu identisch. E12 und K65 zeigen keine Dispersion von  $R_2$  unter den gewählten experimentellen Bedingungen. Die Form der  $R_2$ -Dispersionskurve hängt neben  $k_{\text{ex}}$  auch stark von  $\Delta\omega$  ab (Abb. 58). Insgesamt konnten bis jetzt  $R_2$ -Dispersionskurven von 24 Aminosäuren ausgewertet werden, deren Ergebnisse in Tab. 15 zusammengefasst wurden und eine gemittelte  $k_{\text{ex}}$  von  $136.2 \text{ s}^{-1}$  ergeben. Aus den Ergebnissen der separaten Anpassung von Gl. 46 an die  $R_2$ -Dispersionskurven (Abb. 58) und Gl. 47 kann der  $R_{\text{ex}}$ -Beitrag zu  $R_2$  berechnet werden. Die erhaltenen Resultate für  $R_{\text{ex}}$  sowie die transversalen Relaxationsraten des nativen Proteins in Abwesenheit des konformationellen Austauschs sind auch in Tab. 15 zu finden.

**Tab. 15:** Ergebnisse der Analyse der  $R_2$ -Dispersionskurven verschiedener Aminosäuren von CspB in Gegenwart von 2 M Harnstoff bei 14.1 T (600 MHz  $^1\text{H}$ ).<sup>a</sup>

Aminosäure	$\Delta\omega$ (ppm) <sup>b</sup>	$k_{\text{ex}}$ ( $\text{s}^{-1}$ ) <sup>c</sup>	$R_{2\text{N}}$ ( $\text{s}^{-1}$ ) <sup>c</sup>	$R_{\text{ex}}$ ( $\text{s}^{-1}$ ) <sup>d</sup>
V6	3.825	$124.3 \pm 7.3$	14.4	12.9
W8sc	0.533	$236.4 \pm 32.1$	7.8	11.2
F9	1.381	$135.0 \pm 5.9$	11.6	13.5
K13	4.342	$113.8 \pm 6.8$	15.4	11.9
G14	0.869	$135.3 \pm 19.0$	11.8	12.9
F15	6.890	$147.7 \pm 19.6$	12.6	15.1
G16	4.472	$102.8 \pm 13.3$	16.8	10.9
E19	1.077	$126.3 \pm 9.8$	13.2	12.5
V20	6.953	$92.0 \pm 8.1$	18.1	9.8
G22	2.853	$116.2 \pm 7.6$	13.4	12.1
Q23	1.290	$128.1 \pm 25.7$	13.8	13.1
F27	8.159	$157.4 \pm 17.5$	15.2	16.1
V28	2.998	$120.5 \pm 11.7$	16.0	12.7
A32	2.013	$138.4 \pm 5.5$	12.6	12.7
Q34	2.859	$145.8 \pm 7.9$	13.9	15.2
T40	4.761	$95.6 \pm 20.4$	10.5	9.9
L41	4.453	$161.6 \pm 4.6$	12.9	16.9
G44	3.907	$121.2 \pm 12.0$	15.5	14.6
A46	3.275	$125.5 \pm 11.0$	14.1	13.2
V47	5.018	$135.3 \pm 5.4$	14.4	14.2
S48	2.286	$143.0 \pm 4.7$	13.0	14.8
V52	1.870	$162.6 \pm 8.4$	11.6	16.5
G54	3.417	$156.0 \pm 14.4$	10.2	16.4
G57	1.223	$149.0 \pm 9.8$	8.3	14.7

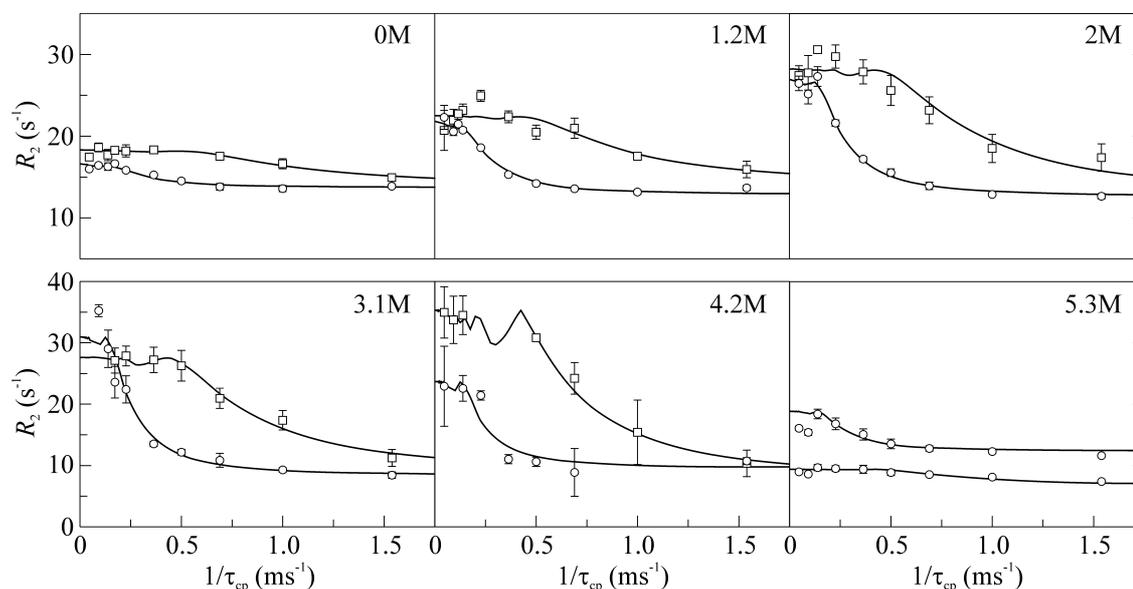
<sup>a</sup> Die Experimente wurden in 20 mM Na-cacodylat/HCl bei 25 °C an einem Bruker Avance600 aufgezeichnet. <sup>b</sup>  $\Delta\omega$  sowie die Harnstoffabhängigkeit wurde mit Hilfe der 2D ZZ-Austauschspektroskopie bestimmt (3.3.1, Abb. 51). <sup>c</sup> Ergebnisse der separaten Anpassung von Gl. 46 an die  $R_2$ -Dispersionskurve mit  $p_{\text{N}} = 0.894$ . Die Berechnung erfolgte mit Gl. 47 unter Verwendung von  $k_{\text{ex}}$ ,  $\Delta\omega$ ,  $R_{2\text{N}}$  sowie  $B_0 = 60.84 \text{ MHz } ^{15}\text{N}$  (Feldstärke 14.1 T).

Die meisten Austauschraten liegen zwischen  $113.8 \text{ s}^{-1}$  und  $162.6 \text{ s}^{-1}$  und befinden sich damit im Bereich der Austauschrate, die mittels *stopped flow* Fluoreszenzspektroskopie ermittelt wurde ( $173 \text{ s}^{-1}$ ). Die Größe der berechneten  $R_{\text{ex}}$ -Werte hängt nicht von der Differenz der  $^{15}\text{N}$  chemischen Verschiebung zwischen dem nativen und entfalteten Protein ab, da z.B. V6 und G14 identische  $R_{\text{ex}}$ -Beiträge zu  $R_2$  besitzen ( $12.9 \text{ s}^{-1}$ ), aber  $\Delta\omega$  für V6 und G14  $3.83 \text{ ppm}$  bzw.  $0.87 \text{ ppm}$  beträgt. Für den chemischen Austausch ergaben sich  $R_{\text{ex}}$ -Werte zwischen  $9.8 \text{ s}^{-1}$  und  $16.9 \text{ s}^{-1}$  und für  $R_{2\text{N}}$  Relaxationsraten zwischen  $7.8 \text{ s}^{-1}$  und  $18.1 \text{ s}^{-1}$ . Die Unterschiede in den erhaltenen Parametern ( $k_{\text{ex}}$ ,  $R_{2\text{N}}$ ,  $R_{\text{ex}}$ ) korrelieren nicht mit Sekundärstrukturelementen oder unstrukturierten Bereichen in CspB. Das bedeutet, dass die Faltungsreaktion von CspB kooperativ in einem Schritt erfolgt und mit dem Zweizustandsmodell beschrieben werden kann. Die gute Übereinstimmung der Austauschraten, die mittels  $R_2$ -Dispersion von vielen unterschiedlichen Reportern und der *stopped flow* Fluoreszenzspektroskopie erhalten wurden, weist auch auf eine kooperative Reaktion hin und verdeutlicht die Signifikanz der erhaltenen Resultate. Desweiteren wird dadurch die Annahme bestätigt, dass das lokale Fluorophor Trp8 über die globale Reaktion berichtet, was für die Aussagekraft von Experimenten, die mit dieser Sonde beobachtet werden, von entscheidender Bedeutung ist.

Für die Bestimmung des Austauschregimes mit Gl. 48 wurden die aus der Anpassung der  $R_2$ -Dispersionskurve erhaltenen  $k_{\text{ex}}$  und die dazu eingesetzten  $\Delta\omega$  aus Tab. 15 verwendet. Mit dem  $\alpha$ -Wert kann zwischen langsamem ( $0 < \alpha < 1$ ), intermediärem ( $\alpha = 1$ ) und schnellem ( $1 < \alpha < 2$ ) chemischen Austausch unterschieden werden. Dabei kann Gl. 48 nur unter Voraussetzung angewendet werden, wenn  $p_{\text{N}} > 0.7$  gilt (Millet, *et al.*, 2000). Alle untersuchten Aminosäuren aus Tab. 15 befinden sich im langsamen Austausch bzgl. der NMR-Zeitskala ( $0 < \alpha < 0.18$ ) mit Ausnahme von W8sc. Letzteres besitzt die geringste  $\Delta\omega$  und befindet sich daher im intermediären bis schnellen Austausch ( $\alpha = 1.15$ ). In Gegenwart von 2 M Harnstoff sind  $R_2$ -Dispersionsmessungen bei einer Feldstärke von 11.7 T (500 MHz  $^1\text{H}$ ) und 14.1 T (600 MHz  $^1\text{H}$ ) durchgeführt worden, so dass das vorliegende Austauschregime auch mit Gl. 49 bestimmt werden konnte. Auch hier liegen, bis auf W8sc, alle ausgewerteten Aminosäuren im langsamen chemischen Austausch vor. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der Beobachtung bei höheren Harnstoffkonzentrationen (z.B. 2.8 M Harnstoff), bei denen sowohl für den nativen als auch für den entfalteten Zustand Kreuzsignale in 2D  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  Korrelationsspektren detektiert werden konnten (3.3.1), was charakteristisch für langsamen chemischen Austausch ist. Keine  $R_2$ -Dispersion in Gegenwart von 2 M Harnstoff zeigen die Reste K7, W8, E12, I18, G37, A61, K65 und A67. Davon wurden in Abb. 58 die beiden Reste

E12 und K65 gezeigt, die eine gemittelte  $R_2$  von  $(11.0 \pm 0.2) \text{ s}^{-1}$  und  $(10.4 \pm 0.2) \text{ s}^{-1}$  besitzen, wobei der durchschnittliche Fehler bei der Bestimmung der jeweiligen  $R_2(\tau_{\text{cp}})$   $0.3 \text{ s}^{-1}$  beträgt.

Durch die Variation der Harnstoffkonzentration werden die Populationen des nativen und entfalteten CspB verändert sowie die Faltungsraten gemäß der Chevron-Auftragung beeinflusst (Schindler, *et al.*, 1995). Die Rückfaltungsrates von CspB zeigt eine große Abhängigkeit von der Denaturierungsmittelkonzentration und fällt mit zunehmender Harnstoffkonzentration stark ab, während die Entfaltung nur moderat von der Harnstoffkonzentration abhängt. In Abb. 59 sind  $R_2$ -Dispersionskurven von F15 und A32 bei sechs verschiedenen Harnstoffkonzentrationen zwischen 0 M und 5.3 M Harnstoff abgebildet.



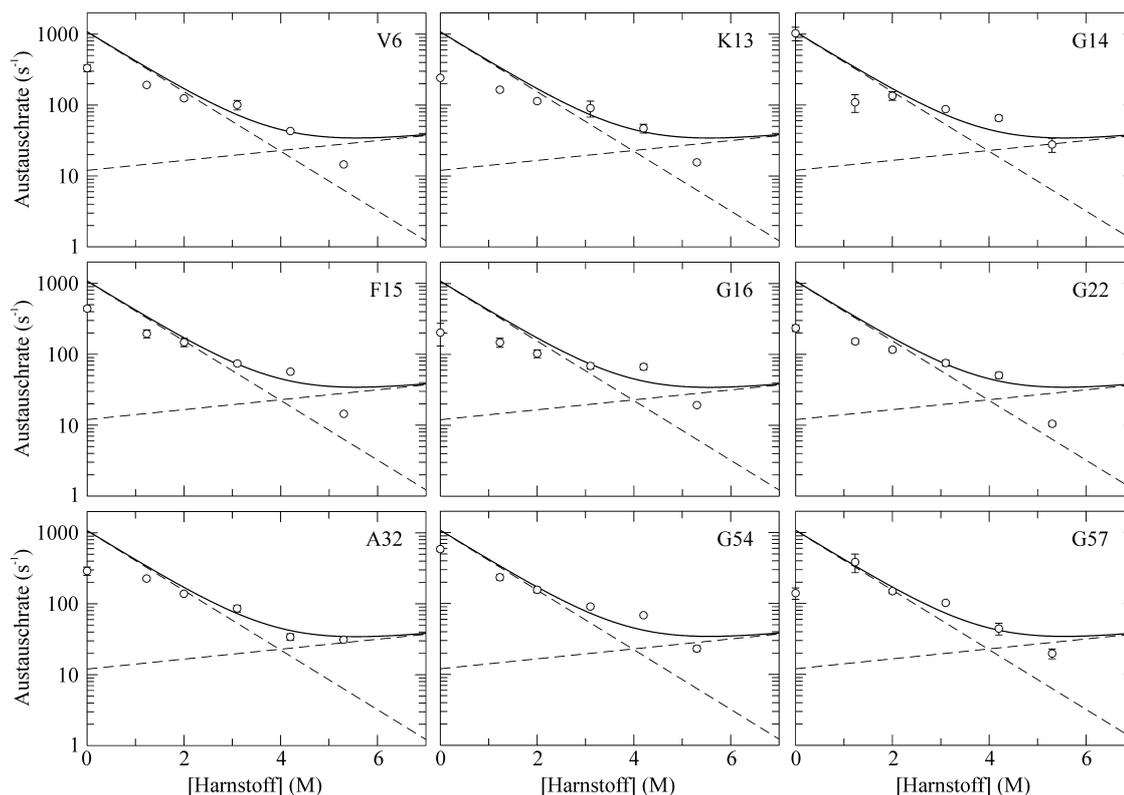
**Abb. 59:** Harnstoffabhängigkeit der  $R_2$ -Dispersion von ( $\square$ ) F15 und ( $\circ$ ) A32. Die  $R_2$ -Dispersionskurven wurden separat mit Gl. 46 angepasst, wobei  $p_N$  mit 0.989, 0.957, 0.894, 0.734, 0.446 und 0.234 sowie  $\Delta\omega$  für F15 bzw. A32 mit 6.85 ppm bzw. 1.89 ppm, 6.87 ppm bzw. 1.96 ppm, 6.89 ppm bzw. 2.01 ppm, 6.91 ppm bzw. 2.08 ppm, 6.94 ppm bzw. 2.15 ppm und 6.96 ppm bzw. 2.22 ppm bei 0 M, 1.2 M, 2 M, 3.1 M, 4.2 M und 5.3 M Harnstoff als Konstanten eingesetzt wurden. Als Ergebnisse für die Austauschraten von F15 bzw. A32 ergaben sich  $(441.4 \pm 31.4) \text{ s}^{-1}$  bzw.  $(291.1 \pm 39.4) \text{ s}^{-1}$  bei 0 M,  $(195.2 \pm 25.4) \text{ s}^{-1}$  bzw.  $(227.1 \pm 18.0) \text{ s}^{-1}$  bei 1.2 M,  $(147.7 \pm 19.6) \text{ s}^{-1}$  bzw.  $(138.4 \pm 5.5) \text{ s}^{-1}$  bei 2 M,  $(74.2 \pm 5.0) \text{ s}^{-1}$  bzw.  $(85.8 \pm 9.3) \text{ s}^{-1}$  bei 3.1 M,  $(56.8 \pm 3.4) \text{ s}^{-1}$  bzw.  $(34.1 \pm 2.6) \text{ s}^{-1}$  bei 4.2 M und  $(6.3 \pm 0.5) \text{ s}^{-1}$  bzw.  $(31.9 \pm 1.8) \text{ s}^{-1}$  bei 5.3 M Harnstoff. Alle Experimente wurden in 20 mM Na-cacodylat/HCl, 2 M Harnstoff pH 7.0 bei 25 °C und einer Feldstärke von 14.1 T durchgeführt. Die  $R_2$ -Dispersion bei 0 M Harnstoff wurde bei 16.4 T aufgezeichnet.

Die Größe des  $R_{\text{ex}}$ -Beitrags zu  $R_2$  ist abhängig vom Populationsverhältnis der beiden Zustände. Liegt nahezu nur natives CspB vor (0 M Harnstoff,  $p_N = 0.989$ ), so ergibt sich eine geringe Dispersion von  $R_2$  in Abhängigkeit von  $\tau_{\text{cp}}$  (Abb. 59). Die Verschiebung des Faltungsgleichgewichts durch Zugabe von Harnstoff führt zu einer Erhöhung der Population des entfalteten Zustands und somit zu einer deutlichen Erhöhung des  $R_{\text{ex}}$ -Beitrags (1.2 M bis

4.2 M Harnstoff). Bei hohen Harnstoffkonzentrationen, bei denen der entfaltete Zustand im Überschuß vorhanden ist, zeigt sich wiederum nur eine geringe Dispersion von  $R_2$  (5.3 M Harnstoff,  $p_N = 0.234$ ). Dies lässt sich damit begründen, dass die Austauschrate zwischen dem nativen und entfalteten Protein bei höheren Harnstoffkonzentrationen deutlich langsamer wird und im Bereich des längsten  $\tau_{cp}$ -Wertes ( $\tau_{cp} = 21.6$  ms) liegt. Die mittels *stopped flow* Fluoreszenzspektroskopie ermittelte Austauschrate bei 5.3 M Harnstoff beträgt  $34.8 \text{ s}^{-1}$ , was einer Zeitkonstante von 28.7 ms entspricht (Schindler, *et al.*, 1995). Dadurch erfolgt meist nur noch eine Interkonversion der beiden Zustände während  $\tau_{cp}$  was zur Folge hat, dass der  $R_{ex}$ -Beitrag zu  $R_2$  stark verringert wird und somit die Austauschrate nicht mehr präzise bestimmt werden kann, wie dies bei mittleren Harnstoffkonzentrationen der Fall ist. Die aus der jeweiligen  $R_2$ -Dispersionskurve erhaltenen Austauschraten von F15 und A32 stimmen gut miteinander überein und liegen im Bereich der mit *stopped flow* Fluoreszenzspektroskopie ermittelten Raten (Abb. 59).

Zur Verdeutlichung der Übereinstimmung der mittels  $R_2$ -Dispersion erhaltenen Austauschraten mit den Ergebnissen von Schindler *et al.* (Schindler, *et al.*, 1995) wurden diese anhand der Chevron-Auftragung in Abb. 60 miteinander verglichen. Dabei stellen die durchgezogenen und gestrichelten Linien die bereits publizierten Resultate der Harnstoffabhängigkeit der Austauschrate bzw. der Rückfaltungs- und Entfaltungsrate dar. Von insgesamt elf spezifischen Sonden konnten bis jetzt mittels  $R_2$ -Dispersionsmessungen die Harnstoffabhängigkeiten der Austauschraten bestimmt werden (V6, W8sc, K13, G14, F15, G16, E19, G22, A32, G54, G57). Bei mittleren Harnstoffkonzentrationen stimmen  $k_{ex}$  aus den  $R_2$ -Dispersionsmessungen sehr gut mit  $k_{ex}$  aus den *stopped flow* Fluoreszenzmessungen überein. Die gemittelten Austauschraten bei 1.2 M, 2 M, 3.1 M und 4.2 M Harnstoff betragen  $216 \text{ s}^{-1}$ ,  $141 \text{ s}^{-1}$ ,  $84 \text{ s}^{-1}$  und  $55 \text{ s}^{-1}$  im Vergleich zu  $345 \text{ s}^{-1}$ ,  $174 \text{ s}^{-1}$ ,  $75 \text{ s}^{-1}$  und  $43 \text{ s}^{-1}$ . Die Abweichungen der Austauschraten aus den  $R_2$ -Dispersionsmessungen bei mittleren Harnstoffkonzentrationen liegen hauptsächlich an der Annahme, dass die transversale Relaxationsrate des nativen und entfalteten Zustands ( $R_{2N}$ ,  $R_{2U}$ ) in Abwesenheit des chemischen Austauschs äquivalent ist. Die simultane Berechnung von  $R_{2N}$  und  $R_{2U}$  durch die Anpassung an eine  $R_2$ -Dispersionskurve ergibt keine physikalisch sinnvollen Ergebnisse. Lösbar ist die Unterbestimmung dieses Systems entweder durch die gemeinsame Anpassung von zwei  $R_2$ -Dispersionskurven, die bei unterschiedlichen Feldstärken aufgezeichnet wurden, oder durch die separate Messung von  $R_{2N}$  bzw.  $R_{2U}$  z.B. mittels der Interferenz von transversaler  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  dipolarer Relaxation und der Relaxation der Anisotropie der  $^{15}\text{N}$  chemischen Verschiebung (CSA) (siehe 2.5.3 und 3.1.3) bei der jeweiligen

Harnstoffkonzentration. Die Austauschraten bei 5.3 M Harnstoff sind zu niedrig, was schon im Text zu Abb. 59 begründet und diskutiert wurde. In Abwesenheit von Harnstoff liegen die meisten Austauschraten aus den  $R_2$ -Dispersionsmessungen ebenfalls zu tief, was vermutlich auf die zu geringe Population des entfalteten Zustands zurückgeführt werden kann. Letzteres führt zu einer nur geringen Dispersion von  $R_2$  in Abhängigkeit von  $\tau_{cp}$ , die der Sensitivitätsgrenze der Methode entspricht. Die in Abb. 60 gezeigten Aminosäuren repräsentieren nahezu alle Bereiche innerhalb der Tertiärstruktur von CspB. Sie besitzen vergleichbare Austauschraten über den untersuchten Harnstoffkonzentrationsbereich, so dass keine Korrelation zwischen Austauschraten und vorhandenen Sekundärstrukturelementen besteht. Daraus lässt sich schließen, dass die Faltung von CspB kooperativ und in einem Schritt erfolgt. Somit ist die Beschreibung mit dem Zweizustandsmodell ausreichend.  $R_2$ -Dispersionsmessungen eignen sich daher sehr gut, Faltungsreaktionen im Millisekundenbereich mit Hilfe vieler lokaler Sonden, die über das gesamte Protein verteilt vorliegen, eingehend zu charakterisieren.



**Abb. 60:** Vergleich der Harnstoffabhängigkeit der Austauschraten ( $k_{ex} = k_f + k_u$ ) von CspB mit Hilfe der Chevron-Auftragung. Ergebnisse der (○)  $R_2$ -Dispersionsmessungen und der (—) *stopped flow* Fluoreszenzspektroskopie (Schindler *et al.*, 1995). (○) wurden durch separate Anpassung von Gl. 57 an die  $R_2$ -Dispersionskurve der jeweiligen Aminosäure bei der vorhandenen Harnstoffkonzentration erhalten (siehe Abb. 59). Die gestrichelten Linien stellen die Harnstoffabhängigkeit der Rück- und Entfaltungsrate ( $k_f$  und  $k_u$ ) dar. Alle Experimente wurden bei 25 °C in (○) 20 mM oder (—) 100 mM Na-cacodylat pH 7.0 durchgeführt.

### 3.4 Das extrem stabile dimere Protein ORF56 von *Sulfolobus islandicus*

Das Archaeon *Sulfolobus islandicus* wurde in heißen Schwefelquellen entdeckt, wo es in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen bei pH 2-3 und 80 °C optimale Lebensbedingungen vorfindet. Um solch extremen Umweltbedingungen standhalten zu können, müssen die Proteine dieses Organismus eine hohe thermodynamische Stabilität besitzen. Hier sollte nun das Protein ORF56 untersucht werden, welches durch das Plasmid pRN1 codiert wird. Die Funktion von ORF56 ist vermutlich die Kontrolle der Kopienzahl des Plasmids pRN1 durch sequenzspezifische DNA-Bindung an die eigene Promotorregion (Lipps, *et al.*, 2001b). Dies wurde aufgrund von Sequenzhomologien zum CopG Protein (22%) des Plasmids pLS1 von *Streptococcus* und der identischen Anordnung der offenen Leseraster auf beiden Plasmiden geschlossen. Außer ORF56 enthält das Plasmid pRN1 die Sequenzinformation für zwei weitere Proteine, deren Funktion eingehend von Lipps *et al.* untersucht wurde (Lipps, *et al.*, 2001a, Lipps, *et al.*, 2003). ORF80 bindet ebenfalls sequenzspezifisch DNA und enthält ein neuartiges Leucin-Zipper Motiv (Lipps, *et al.*, 2001a). ORF904 ist ein neuartiges Replikationsenzym, welches eine ATPase-, eine Primase- und eine DNA-Polymerase-Aktivität besitzt und dessen Gen mit dem *orf56* Gen überlappt (Lipps, *et al.*, 2003).

#### 3.4.1 Strukturbestimmung von ORF56 mittels NMR-Spektroskopie

Die sequentielle Zuordnung der Resonanzen von ORF56 erfolgte sowohl mit Hilfe von homonuklearen 2D NMR-Spektren als auch mit heteronuklear editierten 2D und 3D NMR Spektren und wurde von Dr. G. Lipps durchgeführt. Die Experimente wurden an einem Bruker DRX500 NMR-Spektrometer aufgenommen und sind in Tab. 16 zusammengefasst.

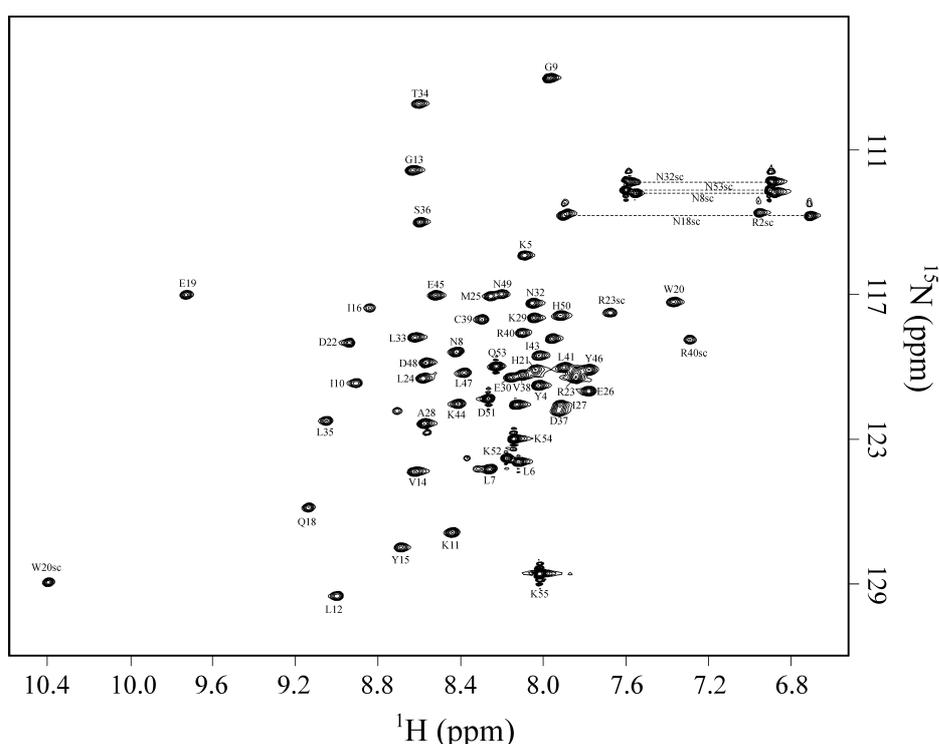
**Tab. 16:** NMR-Experimente für die Zuordnung von ORF56 bei pH 5.0 und 25 °C.

Experiment <sup>a</sup>	Kerne (F1, F2, F3)	Mischzeit	Lösungsmittel
2D NOESY	<sup>1</sup> H, <sup>1</sup> H	80 ms, 150 ms	H <sub>2</sub> O, D <sub>2</sub> O
2D TOCSY	<sup>1</sup> H, <sup>1</sup> H	80 ms, 100 ms	H <sub>2</sub> O
3D NOESY-HSQC	<sup>1</sup> H, <sup>15</sup> N, <sup>1</sup> H	80 ms	H <sub>2</sub> O
3D TOCSY-HSQC	<sup>1</sup> H, <sup>15</sup> N, <sup>1</sup> H	80 ms	H <sub>2</sub> O

<sup>a</sup> Die Experimente wurden an einem Bruker DRX500 NMR-Spektrometer gemessen.

In Abb. 61 ist ein 2D <sup>1</sup>H/<sup>15</sup>N HSQC-Spektrum von ORF56 in 50 mM Na-phosphat pH 5.0 bei 25 °C gezeigt, das die Zuordnung der Kreuzsignale der Rückgrat- und Seitenkettenamide beinhaltet. Die Dispersion der Kreuzsignale ist sehr gut, so dass kaum Signalüberlagerungen auftreten. Für Arg2 und Lys31 konnten keine Kreuzsignale detektiert werden. Die beiden Proline (Pro3, Pro17) besitzen kein Amidproton und zeigen daher ebenfalls kein Kreuzsignal

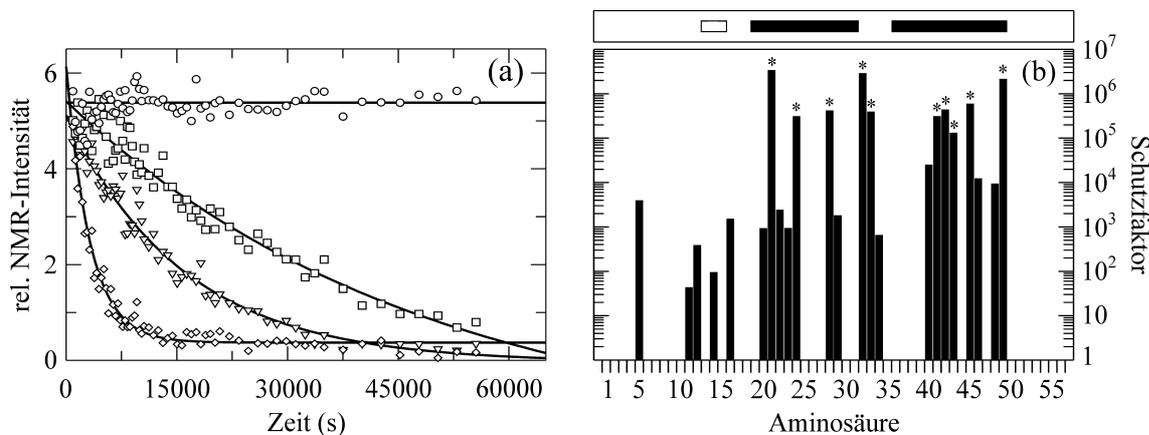
im 2D  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  HSQC, so dass insgesamt 51 Kreuzsignale von Rückgratamiden in diesem Spektrum enthalten sind. Daraus folgt, dass in beiden Monomeren das entsprechende Rückgratamid eine identische chemische Umgebung besitzt und somit die Tertiärstruktur der beiden Monomere äquivalent ist. Mit anderen Worten, bei ORF56 handelt es sich um ein symmetrisches Dimer. Eine Tabelle mit den  $^1\text{H}$  und  $^{15}\text{N}$  chemischen Verschiebungen sowie die Zuordnung von ORF56 befindet sich im Anhang (Tab. A 2).



**Abb. 61:** 2D  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  HSQC von  $^{15}\text{N}$ -markiertem ORF56 in 50 mM Na-phosphat pH 5.0 bei 25 °C. Die Kreuzsignale der Amidprotonen sind mit der Zuordnung versehen. Die Resonanzen der Seitenkettenamide sind mit einer gestrichelten Linie verbunden und die Seitenkettenresonanzen von Trp und Arg mit sc gekennzeichnet.

Eine Sekundärstrukturvorhersage für ORF56 (Lipps, *et al.*, 2001b) auf der Basis von Sequenzhomologien zu sechs plasmidally codierten Proteinen gleichartiger Funktion mit GOR IV (Garnier, *et al.*, 1996) und AGADIR (Munoz & Serrano, 1995a, Munoz & Serrano, 1995b) lieferte übereinstimmende Ergebnisse. Danach sollte ORF56 einen kurzen N-terminalen  $\beta$ -Faltblattstrang (G13 bis F15) und zwei  $\alpha$ -Helices (E19 bis E31, L36 bis D49) enthalten. Die Analyse der sekundären chemischen Verschiebungen (*chemical shift index*, CSI) mit dem Programm CSI (Case, 1998, Case, 2000, Osapay & Case, 1994) bestätigt die Bereiche  $\alpha$ -helikaler Sekundärstrukturen (P17 bis N32, L35 bis K52), sagt jedoch das kurze  $\beta$ -Faltblatt nicht voraus. Allerdings wurde für diese Analyse nur die  $^1\text{H}$  chemische Verschiebung der  $\text{H}^\alpha$  verwendet, welche im Vergleich zur  $^{13}\text{C}$  chemischen Verschiebung von  $\text{C}^\alpha$  und CO nicht so stark durch unterschiedliche Sekundärstrukturen beeinflusst wird.

Erste experimentelle Hinweise auf vorhandene Sekundärstrukturelemente wurden über den  $^1\text{H}/^2\text{H}$ -Austausch erhalten. Hierzu wurde protoniertes  $^{15}\text{N}$  markiertes ORF56 in  $^2\text{H}_2\text{O}$  aufgelöst und im Anschluss eine Serie von 2D  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  HSQC-Experimenten aufgezeichnet. Amidprotonen, die sich in einer regelmäßigen Sekundärstruktur befinden und in H-Brücken involviert sind, tauschen langsamer mit dem Lösungsmittel aus. Daher sollten deren Kreuzsignale einen geringeren Intensitätsverlust durch den Eintauch von  $^2\text{H}$  zeigen. In Abb. 62a sind exemplarisch unterschiedliche Austauschraten ( $k_{\text{ex}}$ ) dargestellt. Durchgezogene Linien repräsentieren den Anstieg einer einfachen Exponentialfunktion. Die Intensität des Kreuzsignals von E45 verändert sich innerhalb von 16 h nicht. Dies deutet darauf hin, dass sich diese Aminosäure in einer  $\alpha$ -Helix befindet und das Amidproton als Donor einer H-Brücke fungiert. Die Amidprotonen von L12 bzw. V14 tauschen deutlich schneller aus ( $k_{\text{ex}} = 6.4 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  bzw.  $2.2 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ) und gehören vermutlich zu dem kurzen N-terminalen  $\beta$ -Faltblattstrang. Eine mittlere Austauschrate besitzt W20 ( $k_{\text{ex}} = 3.3 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ), das möglicherweise im Bereich des *N-cap* der ersten  $\alpha$ -Helix liegt. Von 27 schnell austauschenden Amidprotonen konnten keine Kreuzsignale im ersten  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC nach dem Lösen in  $^2\text{H}_2\text{O}$  detektiert werden.

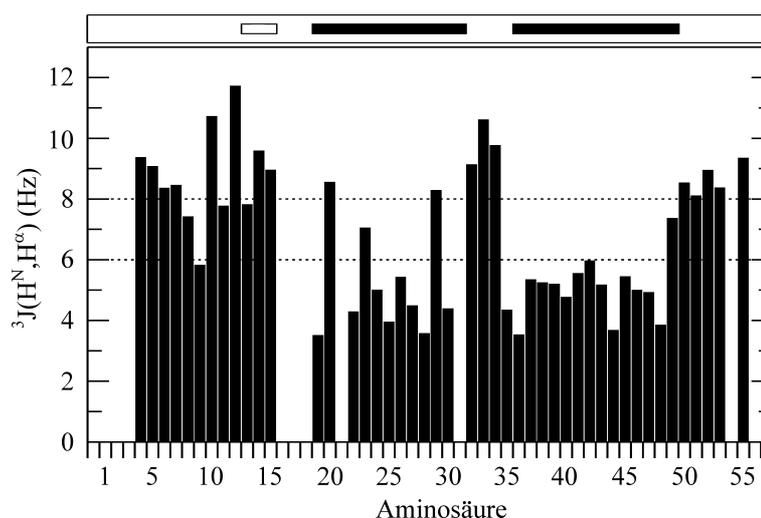


**Abb. 62:** Amidprotonenaustausch von ORF56 in 50 mM Na-phosphat pH 5.0 bei 25 °C. (a) Anpassung an die Intensitäten der Kreuzsignale von ( $\nabla$ ) L12, ( $\diamond$ ) V14, ( $\square$ ) W20 und ( $\circ$ ) E45. (b) Schutzfaktoren von ORF56 bei pH 5.0 und 25 °C. Kreuzsignale, deren Intensität keine Änderung über die Dauer des Experiments erfahren, wurden mit (\*) gekennzeichnet und eine  $k_{\text{ex}}$  von  $10^{-7} \text{ s}^{-1}$  angenommen (siehe Text). Im Kasten über den Schutzfaktoren repräsentieren die beiden ausgefüllten Rechtecke die vorhergesagten  $\alpha$ -Helices und das leere Rechteck den kurzen  $\beta$ -Faltblattstrang.

Insgesamt konnten 24 Kreuzsignale von langsam austauschenden Amidprotonen detektiert und deren Schutzfaktoren ( $k_{\text{intr}}/k_{\text{ex}}$ ) bestimmt werden (Abb. 62b). Dabei hängt die intrinsische Austauschrate ( $k_{\text{intr}}$ ) von der jeweiligen Aminosäure und der Sequenzumgebung ab (Bai, *et al.*, 1993). Mit (\*) wurden die Aminosäuren gekennzeichnet, deren  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -Kreuzsignale eine

konstante Intensität während des Experiments zeigten. Die schnellstmögliche Austauschrate, die bei der Simulation mit einer einfachen Exponentialfunktion keinen Intensitätsverlust innerhalb der Experimentdauer lieferte, betrug  $10^{-7} \text{ s}^{-1}$  und wurde daher als obere Grenze angenommen. Das bedeutet, dass die hier gezeigten Schutzfaktoren die geringstmöglichen sind. In den  $\alpha$ -Helices liegen die meisten Schutzfaktoren über  $10^4$  und somit relativ hoch. Für die laut Sekundärstrukturvorhersage N-terminalen Reste der zweiten  $\alpha$ -Helix sind keine erhöhten Schutzfaktoren gefunden worden. Im Bereich des  $\beta$ -Faltblattstrangs ist jedes zweite Amidproton vor Austausch mit dem Lösungsmittel geschützt, was einem typischen H-Brückenmuster eines  $\beta$ -Faltblatts entspricht.

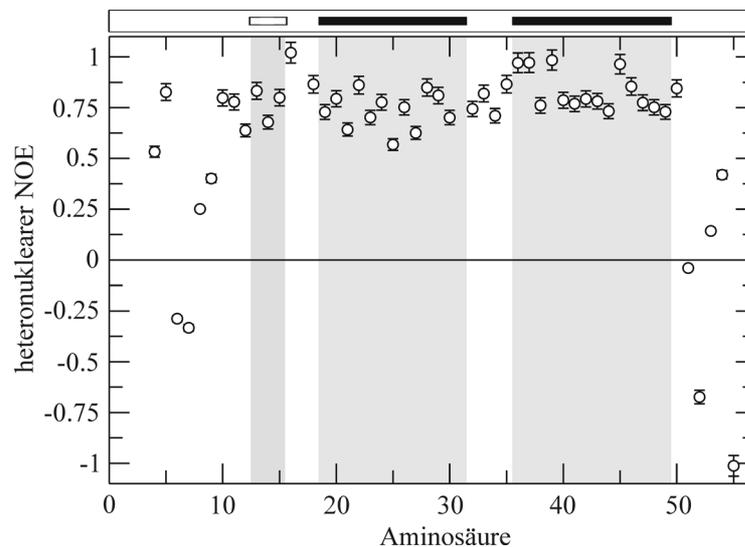
Zusätzliche experimentelle Hinweise auf reguläre Sekundärstrukturelemente können über Kopplungskonstanten erhalten werden. Die Größe der  $^3J(\text{H}^{\text{N}}, \text{H}^{\alpha})$  ist abhängig von der Sekundärstruktur, in der sich die koppelnden Kerne befinden, und ist für  $\alpha$ -Helices typischerweise kleiner 6 Hz und für  $\beta$ -Faltblätter größer 8 Hz. Mit Hilfe des 3D HNHA wurde die skalare  $^3J$ -Kopplung zwischen  $\text{H}^{\text{N}}$  und  $\text{H}^{\alpha}$  bestimmt. Hierzu wird der Quotient aus der Intensität des Diagonalsignals ( $\Omega(\text{H}^{\text{N}})$ ,  $\Omega(\text{N})$ ,  $\Omega(\text{H}^{\text{N}})$ ) und des Kreuzsignals ( $\Omega(\text{H}^{\alpha})$ ,  $\Omega(\text{N})$ ,  $\Omega(\text{H}^{\text{N}})$ ) gebildet und dieser in Gl. 29 eingesetzt. Das experimentspezifische Zeitintervall für den Aufbau des Kreuzsignals ( $\zeta$ ) beträgt 13.05 ms. Aufgrund unterschiedlicher Relaxation der Magnetisierung des Diagonal- bzw. Kreuzsignals, wurde die Kopplungskonstante mit dem Faktor 1.05 korrigiert, der für Proteine mit einem Molekulargewicht  $< 17 \text{ kD}$  charakteristisch ist. In Abb. 63 sind die für ORF56 bestimmten Kopplungskonstanten dargestellt.



**Abb. 63:**  $^3J(\text{H}^{\text{N}}, \text{H}^{\alpha})$ -Kopplungskonstanten von ORF56, die aus dem 3D HNHA-Experiment (Abb. 9) bestimmt wurden. Eine Kopplungskonstante oberhalb 8 Hz ist charakteristisch für ein  $\beta$ -Faltblatt, unter 6 Hz für eine  $\alpha$ -Helix. Die beiden ausgefüllten Rechtecke repräsentieren die vorhergesagten  $\alpha$ -Helices, das leere Rechteck den kurzen  $\beta$ -Faltblattstrang.

Die in Abb. 63 gezeigten Ergebnisse bestätigen ebenfalls die Sekundärstrukturvorhersage zu einem großen Teil. Die Kopplungskonstanten im Bereich der beiden  $\alpha$ -Helices liegen unter 6 Hz. Im N-terminalen Bereich sind einige  $^3J(\text{H}^{\text{N}}, \text{H}^{\alpha})$  größer als 8 Hz, was auf einen etwas längeren  $\beta$ -Faltblattstrang im Vergleich zur Vorhersage hindeutet. Mit Hilfe der  $^3J(\text{H}^{\text{N}}, \text{H}^{\alpha})$  lässt sich für die Strukturrechnung eine Beschränkung des Rückgratwinkels  $\phi$  erreichen.

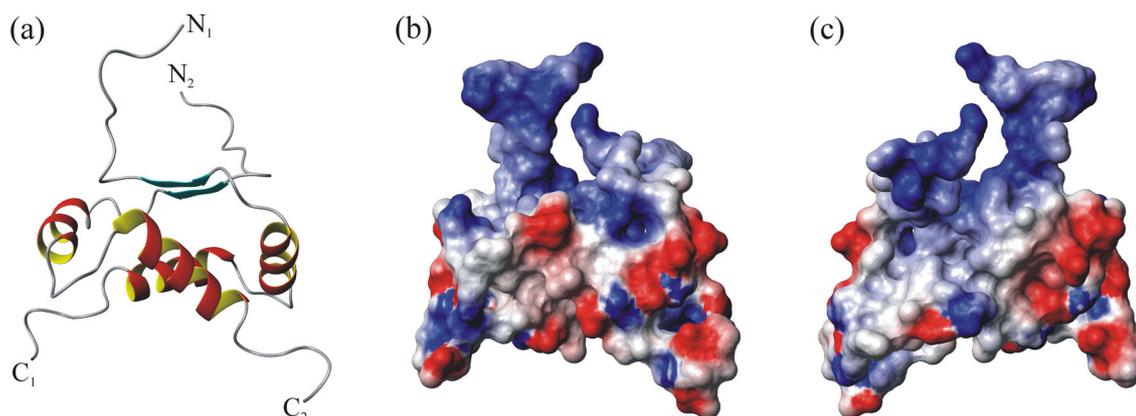
Die interne Dynamik von Proteinen kann ebenfalls Aufschluss über vorhandene Sekundärstrukturelemente geben. Der heteronukleare NOE (*hNOE*) ist besonders sensitiv für solche dynamischen Prozesse im Picosekunden- bis Nanosekundenbereich. Für die Bestimmung des heteronuklearen NOE wurde je ein Spektrum mit und ohne 3 s Vorsättigung aufgenommen (siehe 2.5.3). Aus dem Quotienten der beiden Intensitäten der Kreuzsignale ( $I_{\text{sat}}/I_{\text{ref}}$ ) ergibt sich der *hNOE*. Liegt keine interne Dynamik vor beträgt der *hNOE* je nach Korrelationszeit und Feldstärke zwischen 0.8 und 0.9. Bewegliche Bereiche zeigen *hNOE*-Werte  $< 0.7$ , wobei negative *hNOE*-Werte besonders flexible Bereiche kennzeichnen. In Abb. 64 ist der *hNOE* von ORF56 bei 25 °C dargestellt. Die N- und C-terminalen Aminosäuren besitzen kleine oder negative *hNOE*-Werte, was auf wenig strukturierte Bereiche mit hoher Beweglichkeit schließen lässt und bei Proteinen häufig an den Termini beobachtet wird. Im Gegensatz dazu besitzen die vorhergesagten Sekundärstrukturelemente zumeist hohe *hNOE*-Werte, die auf eine geringe Dynamik hinweisen.



**Abb. 64:** Heteronuklearer NOE von ORF56 in 50 mM Na-phosphat pH 5.0 bei 25 °C. Die Kästen oberhalb der Abbildung repräsentieren die vorhergesagten Sekundärstrukturelemente, wobei der leere Kasten den kurzen  $\beta$ -Faltblattstrang zeigt und die beiden ausgefüllten Kästen die  $\alpha$ -Helices darstellen.

Die Berechnung der dreidimensionalen Struktur von ORF56 bei pH 5.0 und 25 °C mit dem Programm *Aria* (Linge, *et al.*, 2001, Linge, *et al.*, 2003) wird innerhalb einer Kooperation von

Dr. G. Lipps durchgeführt. Als Basis und Kerninformation dienten NOE-Kreuzsignale aus den 2D und 3D NOESY-Spektren (Tab. 16), die in Abstandsrandbedingungen umgewandelt wurden. Die ersten Iterationen der Strukturrechnung wurden nur mit Abstandsbeschränkungen durchgeführt, die von eindeutig zugeordneten NOE-Kreuzsignalen abgeleitet wurden. Im weiteren Verlauf erfolgte eine iterative Zuordnung der NOESY-Spektren durch Kombination mit den Moleküldynamikrechnungen. Die dadurch gewonnenen zusätzlichen Abstandsbeschränkungen wurden dann wiederum in die weiteren Zyklen der Strukturrechnung eingeführt. Ferner gingen dann Abstandsrandbedingungen aufgrund identifizierter Donoren von H-Brücken (Abb. 62) ein. Außerdem wurden dihedrale Beschränkungen verwendet, die mit Hilfe der  $^3J(\text{H}^{\text{N}}, \text{H}^{\alpha})$  bestimmt worden sind (Abb. 63). Einige Kontakte zwischen den beiden Monomeren wurden durch sog. Halbfilterexperimente (Abb. 11) mit ORF56-Heterodimeren (bestehend aus  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -markiertem und unmarkiertem  $^1\text{H}$  ORF56) identifiziert, die eine Unterscheidung von NOEs innerhalb eines Monomers ermöglichen (2.5.1). Das vorläufige Ergebnis der Strukturrechnung stellt Abb. 65 dar.



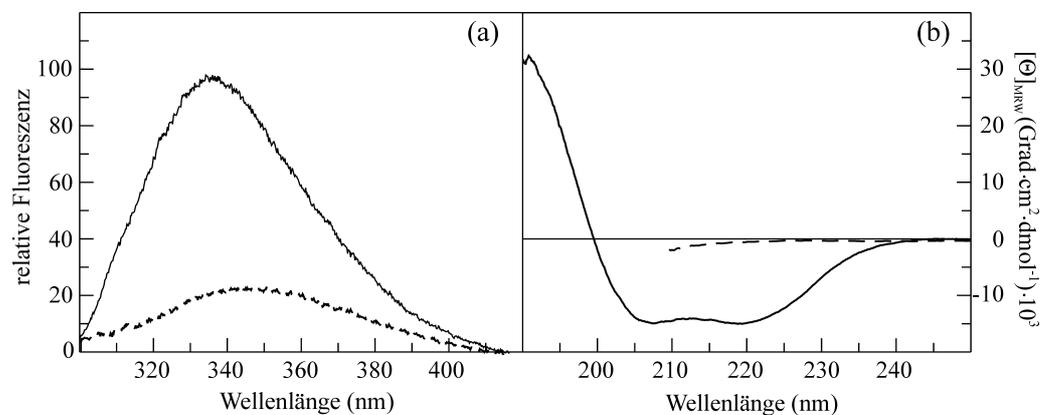
**Abb. 65:** Vorläufige dreidimensionale Struktur von ORF56 in 50 mM Na-phosphat pH 5.0 bei 25 °C. (a) Bänderdarstellung, (b) Elektrostatische Oberfläche. Bereiche mit positiv und negativ geladener Ladungsdichte wurden in blau bzw. rot dargestellt. Hydrophobe Regionen erscheinen weiß. (c) Darstellung wie in (b) jedoch um 180° gedreht. Die Abbildung wurde mit MolMol erstellt (Koradi *et al.*, 1996).

Die vorläufige Tertiärstruktur eines ORF56-Monomers beinhaltet einen kurzen  $\beta$ -Faltblattstrang im N-terminalen Bereich und ein *helix-turn-helix*-Motiv (Abb. 65a). Der Faltblattstrang der beiden Monomere bildet ein gemeinsames antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt und ist somit Teil der Dimerisierungsfläche. Zusätzliche Wechselwirkungen erfolgen über die beiden C-terminalen  $\alpha$ -Helices, die gegeneinander gepackt vorliegen. Die Struktur von ORF56 ähnelt stark der dreidimensionalen Struktur des sequenz- und funktionshomologen CopG (Gomis-Rüth, *et al.*, 1998) sowie des Arc-Repressors (Breg, *et al.*, 1990). Bei beiden Proteinen erfolgt die Bindung der Nukleinsäure hauptsächlich über den unstrukturierten N-terminalen Bereich

sowie das  $\beta$ -Faltblatt. Dies könnte bei ORF56 ebenso der Fall sein. Unterstützt wird diese Annahme durch die ungleichmäßige Ladungsverteilung an der Oberfläche des Proteins (Abb. 65b und Abb. 65c). So bilden der N-terminale Bereich und das kurze  $\beta$ -Faltblatt eine ausgedehnte positive Ladungsdichte (Arg2, Lys5, Lys11) die mit dem negativ geladenen Rückgrat der DNA interagieren kann. Aminosäuren mit negativ geladenen Seitenketten kommen befinden sich nicht in der N-terminalen Region von ORF56, während im Bereich der  $\alpha$ -Helices und des C-Terminus sowohl positive als auch negative Ladungen vorkommen (2xArg, 6xLys, 4xAsp, 4xGlu), die sich möglicherweise kompensieren. In Bindungsstudien konnte gezeigt werden, dass die Bindungsaffinität von ORF56 zu doppelsträngiger DNA stark von der Salzkonzentration abhängt, wodurch die Stabilität des Protein/DNA-Komplexes überwiegend auf elektrostatische Wechselwirkungen zurückgeführt werden kann (Lipps, *et al.*, 2001b). Hydrophobe Wechselwirkungen, wie dies bei der Interaktion von CspB mit ssDNA der Fall ist (siehe Abschnitt 3.2.3 bis 3.2.5), spielen wahrscheinlich eine untergeordnete Rolle, da nur kleine hydrophobe Bereiche exponiert vorliegen (Abb. 65). Desweiteren wird vermutet, dass durch die Komplexbildung eine Strukturierung des N-terminalen Bereichs erfolgt, da die molare Elliptizität im Fern-UV CD-Spektrum signifikant abnimmt (Lipps, *et al.*, 2001b).

### 3.4.2 Die außerordentlich hohe Stabilität von ORF56

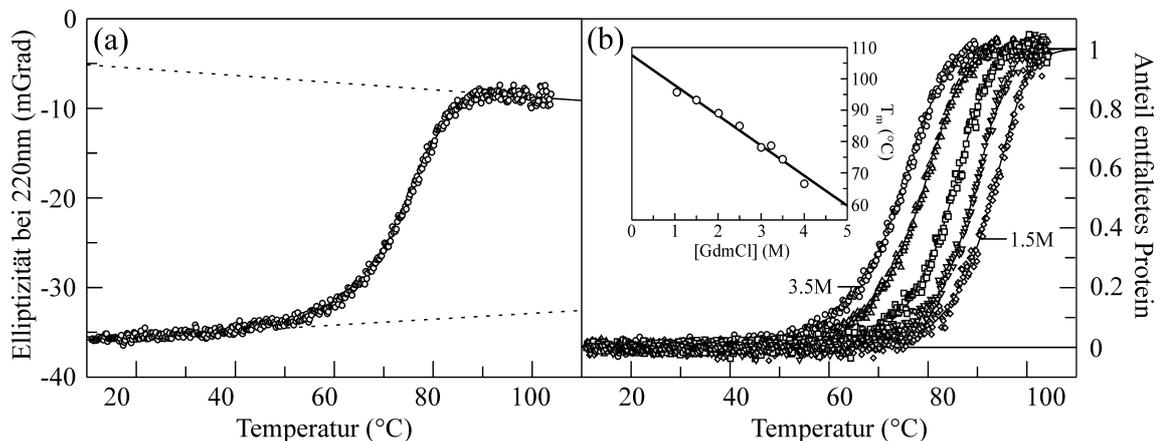
ORF56 ist ein kleines basisches Protein, das in Lösung als Dimer vorkommt (Zeeb, *et al.*, 2004) und 56 Aminosäuren je Monomer besitzt. Desweiteren enthält jedes Monomer ein Tryptophan (Trp20) und drei Tyrosine (Tyr4, Tyr15, Tyr46). Das Fluoreszenzspektrum von nativem und entfaltetem ORF56 ist in Abb. 66a gezeigt.



**Abb. 66:** Fluoreszenz- und Fern-UV CD-Spektren von entfaltetem (----) und nativem (—) ORF56 in An- und Abwesenheit von 8 M GdmCl in 20 mM Na-phosphat pH 7.5 bei 25 °C. (a) Fluoreszenzemission (Bandbreite 5 nm) von 1  $\mu$ M ORF56 nach Anregung bei 280 nm (Bandbreite 5 nm) in einer 1 cm Küvette. (b) Fern-UV CD Spektren von 20  $\mu$ M ORF56 in einer 0.1 cm Küvette.

Die intrinsische Tryptophan-Fluoreszenz dominiert das Fluoreszenzspektrum, während die Tyrosinreste kaum zum Fluoreszenzspektrum von ORF56 beitragen. Bestätigt wird dies dadurch, dass nahezu deckungsgleiche Spektren bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm bzw. 295 nm erhalten wurden. Das Emissionsmaximum des Spektrums des nativen Proteins liegt daher bei 335 nm, was darauf hindeutet, dass Trp20 größtenteils vom Lösungsmittel abgeschirmt wird. Die Entfaltung des Proteins führt zu einem Intensitätsverlust der Fluoreszenz von 80% und zu einer Rotverschiebung des Emissionsmaximums auf 348 nm. Dies ist auf eine erhöhte Lösungsmittelzugänglichkeit der aromatischen Seitenkette des Tryptophans zurückzuführen und spiegelt den Verlust der intakten Tertiärstruktur wider.

Das Fern-UV CD-Spektrum von nativem und entfaltetem ORF56 ist in Abb. 66b dargestellt. Das Spektrum des nativen Zustands zeigt alle charakteristischen Eigenschaften des Spektrums eines Proteins (Minima der molaren Elliptizität bei 208 nm und 222 nm, Nulldurchgang bei 200 nm, maximale Elliptizität bei 191 nm), das hauptsächlich aus  $\alpha$ -Helices besteht. Somit stimmen die Ergebnisse der Sekundärstruktur-spezifischen Sonde (Fern-UV CD) und der berechneten vorläufigen Tertiärstruktur gut überein. Bei Entfaltung wird die Kopplung der Übergangsdipole der Peptidbindungen innerhalb der repetitiven Sekundärstrukturelemente aufgehoben, wodurch die beiden Minima der molaren Elliptizität bei 208 nm und 222 nm verloren gehen. ORF56 besitzt im Nah-UV-Bereich (250 nm bis 320 nm) kein verwertbares CD-Signal.



**Abb. 67:** Thermische Entfaltung von 5  $\mu$ M ORF56 in 20 mM Na-cacodylat pH 7.5 in Gegenwart von GdmCl als Denaturierungsmittel. (a) Experimentelle Daten der thermischen Entfaltung von ORF56 in Gegenwart von 3.5 M GdmCl. (b) Normierte thermische Übergänge in Anwesenheit von 1.5 M ( $\diamond$ ), 2 M ( $\nabla$ ), 2.5 M ( $\square$ ), 3 M ( $\triangle$ ) und 3.5 M ( $\circ$ ) GdmCl (von rechts nach links). Der Anteil des entfaltenen Proteins wurde mit Gl. 11 bestimmt und die normierten Übergänge mit Gl. 16 und Gl. 6 angepasst. Als Meßgröße wurde das CD-Signal bei 220 nm verwendet. Die Teilabbildung in (b) zeigt die GdmCl-Abhängigkeit des Übergangsmittelpunkts  $T_m$ . Die Gerade stellt die lineare Extrapolation auf 0 M GdmCl mit einer Steigung von  $-9.6$   $^{\circ}\text{C}/\text{M}$  dar. Daraus ergibt sich ein  $T_m$  in Abwesenheit des Denaturierungsmittels von  $T_m(\text{H}_2\text{O})$  von  $107.5 \pm 1.8$   $^{\circ}\text{C}$ .

Erste Einblicke in die außergewöhnliche Stabilität von ORF56 wurden anhand thermischer Entfaltungsübergänge gewonnen, wobei die Änderung des CD-Signals bei 220 nm als Sonde diente (Zeeb, *et al.*, 2004). Bei einer Proteinkonzentration von 5  $\mu\text{M}$  konnte keine vollständige Entfaltung bis 100 °C detektiert werden. Daher wurde durch Zugabe hoher Konzentrationen an GdmCl, was als denaturierendes Agens die Stabilität des Proteins verringert und somit den Mittelpunkt des Übergangs zu niedrigeren Temperaturen verschiebt, eine vollständige thermische Entfaltung erreicht (Abb. 67a). Selbst in Gegenwart von 2.5 M GdmCl besitzt ORF56 noch eine extrem hohe thermische Stabilität mit einem Übergangsmittelpunkt ( $T_m$ ) von 85 °C. Mit Hilfe einer linearen Extrapolation der GdmCl-Abhängigkeit des  $T_m$  wurde ein Übergangsmittelpunkt in Abwesenheit des Denaturierungsmittels ( $T_m(\text{H}_2\text{O})$ ) von 107.5 °C erhalten.

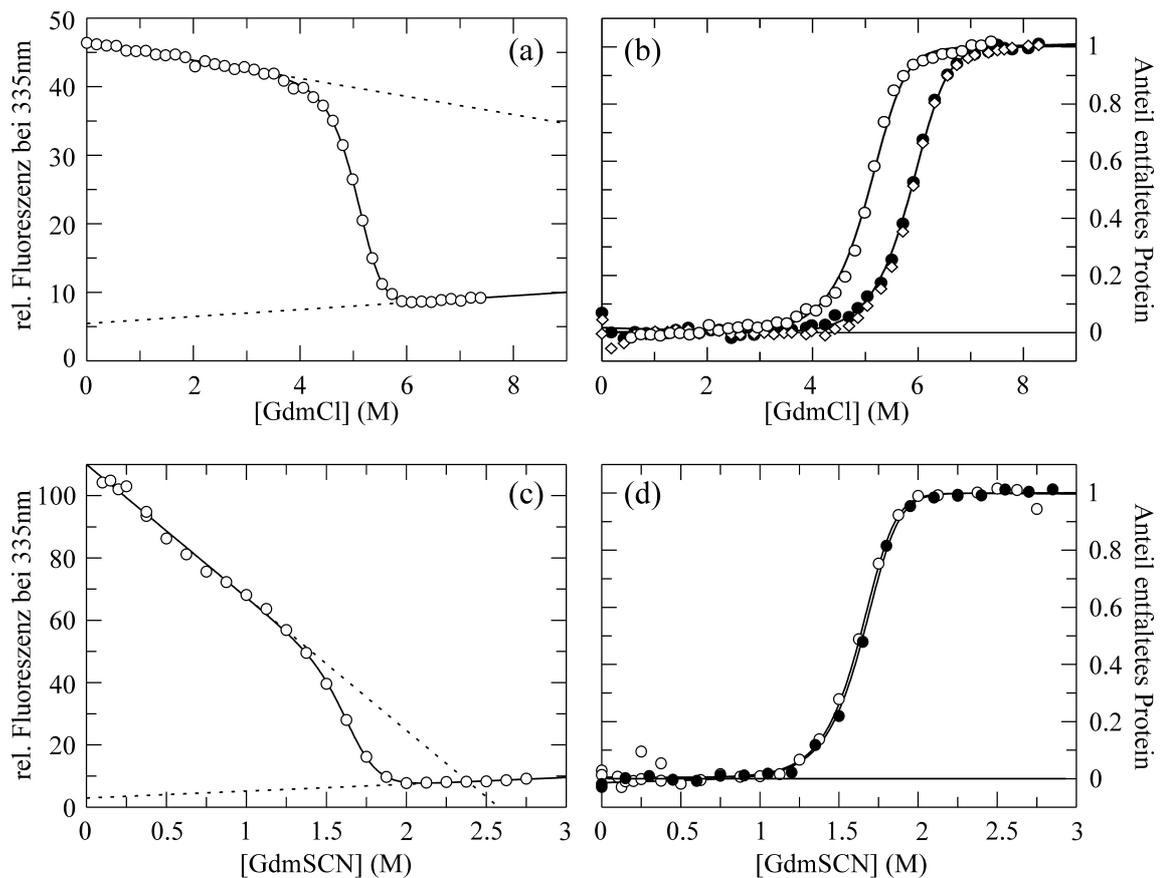
### 3.4.3 Konzentrationsabhängigkeit des Entfaltungsmittelpunkts

ORF56 liegt in Lösung als Homodimer vor, was eindeutig durch analytische Ultrazentrifugation gezeigt wurde (Zeeb, *et al.*, 2004). Der einfachste Faltungsmechanismus für dimere Protein stellt das Zweizustandsmodell in Gl. 10 dar, in dem nur entfaltete Monomere und nativ gefaltete Dimere im Gleichgewicht vorliegen. Ist dies der Fall, so hängt der Mittelpunkt des Entfaltungsübergangs von der Proteinkonzentration ab, da bei höherer Proteinkonzentration die Dimerbildung begünstigt wird. Hier soll nun mit verschiedenen biophysikalischen Methoden gezeigt werden, dass die Faltung von ORF56 nach diesem Zweizustandsmodell erfolgt.

Voraussetzung für die weiterführende Beschreibung des Faltungsgleichgewichts von ORF56 ist, dass die Faltung reversibel verläuft. Um die Reversibilität der thermischen Entfaltung zu überprüfen wurde 1  $\mu\text{M}$  ORF56 in 20 mM Na-cacodylat/HCl pH 7.5 für fünf Minuten in Gegenwart von 4 M GdmCl bei 100 °C inkubiert und danach auf Eis abgekühlt. Im Anschluss wurde mit dem renaturierten Protein ein thermischer Übergang gemessen. Dieser ist mit dem thermischen Übergang von nativem ORF56 in Gegenwart von 4 M GdmCl deckungsgleich und die thermische Entfaltung somit reversibel. Die Denaturierungsmittel-induzierte Entfaltung verläuft ebenfalls reversibel, da die Renaturierungskurve (beginnend mit entfaltetem Protein) und die Denaturierungskurve (beginnend mit gefaltetem Protein) übereinstimmen.

Um die Abhängigkeit des Übergangsmittelpunkts von der Proteinkonzentration zu zeigen, wurden sowohl thermische als auch Denaturierungsmittel-induzierte Entfaltungsübergänge bei unterschiedlichen ORF56-Konzentrationen gemessen (Zeeb, *et al.*, 2004). Der

Übergangsmittelpunkt der thermischen Entfaltung von ORF56 in 20 mM Na-cacodylat/HCl pH 7.5 in Gegenwart von 4 M GdmCl steigt von 51.0 °C auf 75.8 °C an, wenn die Proteinkonzentration von 0.2  $\mu\text{M}$  auf 28  $\mu\text{M}$  erhöht wird. Neben der außerordentlich hohen thermischen Stabilität von ORF56 ist auch die Stabilität gegenüber Denaturierungsmitteln bemerkenswert. Bei 25 °C ist die Entfaltung mit Harnstoff nicht möglich, da das Protein selbst in 10 M Harnstoff noch vollständig nativ vorliegt. Daher wurden stärker denaturierend wirkende Agentien wie GdmCl und GdmSCN verwendet. In Abb. 68 sind Denaturierungsmittel-induzierte Übergänge zwischen 0.5  $\mu\text{M}$  und 5  $\mu\text{M}$  ORF56 gezeigt.

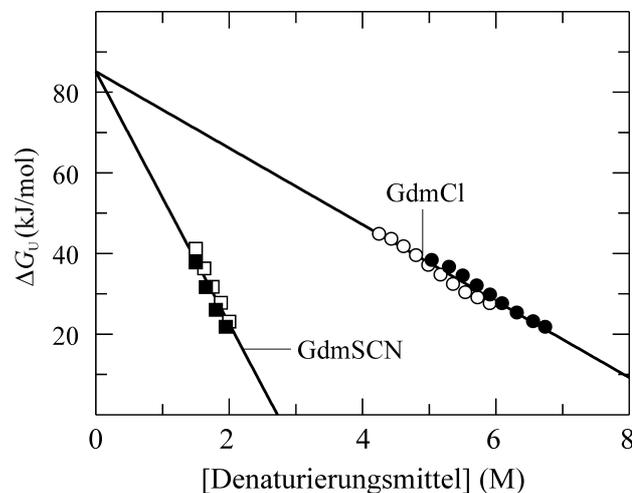


**Abb. 68:** Der Mittelpunkt des Entfaltungsübergangs hängt von der Proteinkonzentration ab. (a) Experimentelle Daten des GdmCl-induzierten Entfaltungsübergangs von 0.5  $\mu\text{M}$  ORF56. (b) GdmCl-induzierter Übergang von 0.5  $\mu\text{M}$  (○) und 5  $\mu\text{M}$  (◇, ●) ORF56. (c) Experimentelle Daten des GdmSCN-induzierten Entfaltungsübergangs von 1  $\mu\text{M}$  ORF56. (d) GdmSCN-induzierter Übergang von 1  $\mu\text{M}$  (○) und 5  $\mu\text{M}$  (●) ORF56. Alle Übergänge wurden bei 25 °C in 20 mM Na-cacodylat/HCl pH 7.5 aufgenommen, mit Gl. 11 normiert und an Gl. 6, Gl. 7, und Gl. 12 angepasst. (○, ●) Detektion der Fluoreszenz bei 335 nm nach Anregung bei 280 nm. (◇) Detektion des Fern-UV CD-Signals bei 225 nm.

Auch hier ist der Mittelpunkt der Entfaltung mit zunehmender Proteinkonzentration zu höheren Denaturierungsmittelkonzentrationen verschoben, was bei den GdmCl-induzierten Übergängen deutlicher zu sehen ist (Abb. 68b, Abb. 68d). Der Übergangsmittelpunkt steigt

von 5.1 M GdmCl auf 5.9 M GdmCl an, wenn die Konzentration von ORF56 von 0.5  $\mu\text{M}$  auf 5  $\mu\text{M}$  erhöht wird. Die Denaturierungseffizienz von GdmSCN ist etwa dreimal so hoch wie von GdmCl, was in einer erhöhten Kooperativität des Übergangs und einer Verschiebung des Übergangsmittelpunkts zu niedrigeren Denaturierungsmittelkonzentrationen zum Ausdruck kommt (Abb. 68b, Abb. 68d). Alle Übergänge sind einstufig und lassen keine intermediäre Zwischenstufe erkennen. Außerdem verlaufen Fluoreszenz- und Fern-UV CD detektierte Übergänge deckungsgleich, was einen simultanen Verlust an Tertiär- und Sekundärstruktur bei der Entfaltung bedeutet (Abb. 68b) und charakteristisch für ein Zweizustandsmodell ist.

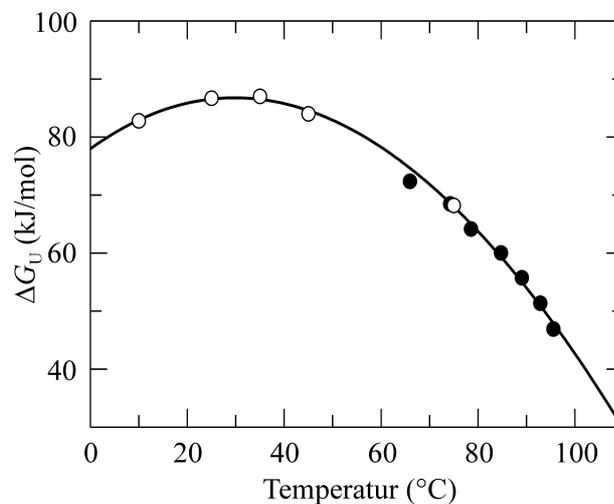
Zur Bestimmung der freien Enthalpie der Entfaltung in Abwesenheit von Denaturierungsmittel ( $\Delta G_U(\text{H}_2\text{O})$ ) wurden für die verschiedenen Proteinkonzentrationen ( $\Delta G_U$ )-Werte im Übergangsbereich mit Gl. 6 und Gl. 12 berechnet und gegen die Denaturierungsmittelkonzentration aufgetragen (Abb. 69). Die lineare Extrapolation mit Gl. 7 auf 0 M Denaturierungsmittel ergibt für beide verwendeten chaotrope Agentien ein übereinstimmendes  $\Delta G_U(\text{H}_2\text{O})$  von 85.1 kJ/mol. Der Kooperativitätsparameter ( $m$ -Wert) ist durch die Steigung der Ausgleichsgerade definiert und ergibt 9.5 kJ/(mol·K) für GdmCl bzw. 31.3 kJ/(mol·K) für GdmSCN. Dies spiegelt die unterschiedlichen Denaturierungseffizienzen der verwendeten Agentien wider.



**Abb. 69:** Abhängigkeit von  $\Delta G_U$  von der Denaturierungsmittelkonzentration. GdmCl-induzierte Entfaltung von (○) 0.5  $\mu\text{M}$  bzw. (●) 5  $\mu\text{M}$  ORF56 und GdmSCN-induzierte Entfaltung von (□) 1  $\mu\text{M}$  bzw. (■) 5  $\mu\text{M}$  ORF56 in 20 mM Na-cacodylat/HCl pH 7.5 bei 25 °C.  $\Delta G_U$  im Übergangsbereich wurde mit Gl. 6 und Gl. 12 berechnet. Die lineare Regression erfolgte mit Gl. 7 und ergab ein  $\Delta G_U(\text{H}_2\text{O})$  von 85.1 kJ/mol und einen  $m$ -Wert von 9.5 kJ/(mol·K) bzw. 31.3 kJ/(mol·K) für GdmCl bzw. GdmSCN.

Das Stabilitätsmaximum von ORF56 kann über die Temperaturabhängigkeit der freien Enthalpie der Entfaltung ( $\Delta G_U$ ) bestimmt werden. Die Enthalpie ( $H$ ) und Entropie ( $S$ ) des nativen und entfalteten Zustands hängen stark von der Temperatur ab, was durch die große

Differenz der Wärmekapazität  $\Delta C_p$  beider Zustände erklärt werden kann. Ähnliche Beträge von  $\Delta H_U$  und  $T\Delta S_U$  führen zu einer Kompensation, so dass die resultierende  $\Delta G_U$  nur eine kleine Differenz zwischen dem enthalpischen und entropischen Beitrag ist. Für die in Abb. 70 gezeigte Stabilitätskurve wurden GdmCl-induzierte Übergänge zwischen 10 °C und 75 °C sowie die thermischen Entfaltungen in Gegenwart von 1.5 M-3.5 M GdmCl (Abb. 67) kombiniert (Zeeb, *et al.*, 2004). Dadurch wird ein sehr breiter Temperaturbereich von 85 °C erhalten, der eine zuverlässige Bestimmung von  $\Delta C_p$  erlaubt. Die GdmCl-induzierten Übergänge wurden mit Fluoreszenzspektroskopie verfolgt und mit Gl. 6 und Gl. 12 analysiert. Im Mittelpunkt des thermischen Übergangs ( $T_m$ ) wird Gl. 16 zu  $K_U = [P_t]$  und  $\Delta G_U$  nach Gl. 6 bestimmt. Die Detektion der thermischen Übergänge erfolgte mit CD-Spektroskopie. Da die thermischen Übergänge bei verschiedenen GdmCl-Konzentrationen gemessen wurden, musste anschließend mit Hilfe der GdmCl-Abhängigkeit von  $\Delta G_U$  (Abb. 69) und Gl. 7 auf 0 M GdmCl extrapoliert werden. Als Steigung diente dabei der  $m$ -Wert von 9.5 kJ/(mol·K). Die Konsistenz der verwendeten Daten zeigt die übereinstimmende Stabilität bei 75 °C, die sowohl von der Sonde (CD bzw. Fluoreszenz) als auch von der Art der Entfaltung (thermisch bzw. GdmCl-induziert) unabhängig ist.



**Abb. 70:** Temperaturabhängigkeit der freien Enthalpie der Entfaltung  $\Delta G_U$ . (○)  $\Delta G_U(\text{H}_2\text{O})$  aus GdmCl-induzierten Entfaltungsübergängen bei der jeweiligen Temperatur. (●)  $\Delta G_U(\text{H}_2\text{O})$  am Mittelpunkt von thermischen Übergängen bei verschiedenen GdmCl-Konzentrationen nach Extrapolation mit Gl. 7 und  $m = -9.5$  kJ/(mol·K). Die durchgezogene Linie zeigt die nicht-lineare Regression von Gl. 6 und Gl. 16 an die Temperaturabhängigkeit von  $\Delta G_U$  und ergibt für  $\Delta H_m = 525 \pm 10$  kJ/mol,  $T_m = 378.3 \pm 0.5$  K und  $\Delta C_p = 5.8 \pm 0.2$  kJ/(mol·K) bei einer ORF56-Konzentration von 5  $\mu\text{M}$ .

Die maximale Stabilität von ORF56 beträgt ca. 30 °C und liegt etwa 50 °C unter der optimalen Wachstumstemperatur von *Sulfolobus islandicus*. Dieses Phänomen wird bei thermostabilen Proteinen häufig beobachtet (Grättinger, *et al.*, 1998, Jaenicke & Böhm, 1998)

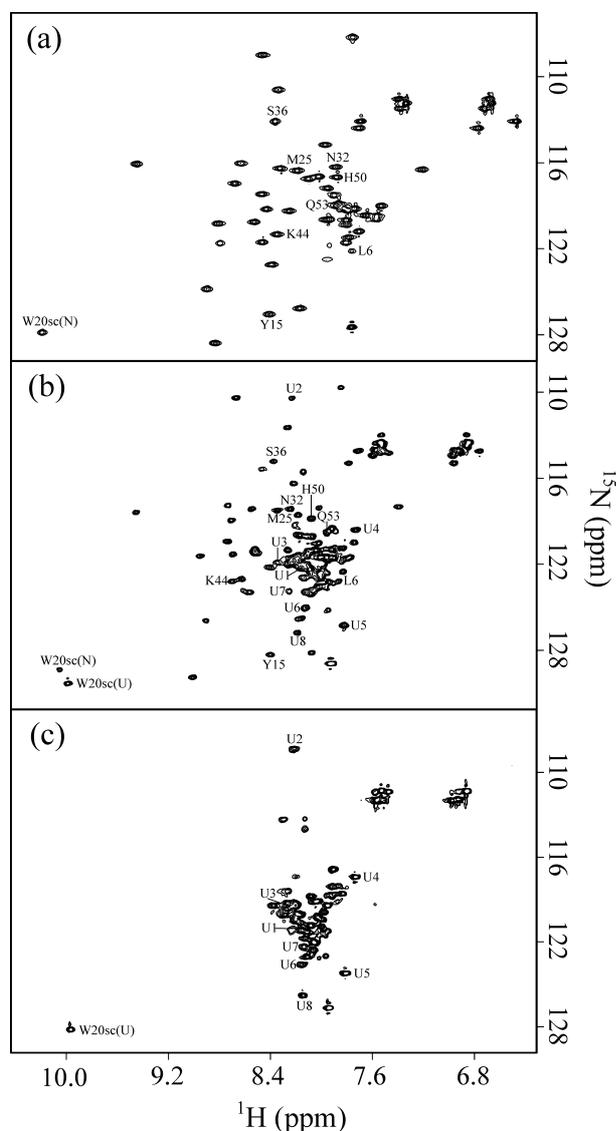
und legt den Schluss nahe, dass Proteine aus thermophilen und hyperthermophilen Organismen nicht durch eine Verschiebung des Stabilitätsmaximums zu höheren Temperaturen sondern vielmehr durch eine Erhöhung der Gibb'schen freien Enthalpie stabilisiert werden. Aus der Anpassung von Gl. 6 und Gl. 16 an die Stabilitätskurve resultieren  $\Delta H_m = 525 \pm 10$  kJ/mol,  $T_m = 105.2 \pm 0.5$  °C und  $\Delta C_p = 5.8 \pm 0.2$  kJ/(mol·K) bei einer Monomerkonzentration von 5  $\mu$ M bzw.  $T_m = 131.1 \pm 0.5$  °C für eine Proteinkonzentration von 1 M. Die Differenz der Wärmekapazität zwischen nativem und entfaltetem Zustand stimmt gut mit dem für diese Proteingröße zu erwartenden  $\Delta C_p$  von 6 kJ/mol·K (Myers, *et al.*, 1995) überein.

#### 3.4.4 NMR spektroskopischer Nachweis des Zweizustandsmodells

Die Kooperativität der Faltungsreaktion von ORF56 wurde mit heteronuklearer 2D NMR-Spektroskopie eingehend untersucht. Der entscheidende Vorteil dieser Methode gegenüber Fluoreszenz- oder CD-Messungen ist die hohe Anzahl ortsspezifischer Sonden, die über das gesamte Protein verteilt sind. Die Denaturierungsmittel-induzierte Entfaltung wurde bei einer Konzentration von 1 mM ORF56 bei pH 7.5 und 25 °C gemessen. Da es sich bei ORF56 um ein Dimer handelt, ist der Übergangsmittelpunkt im Vergleich zu den Fluoreszenzmessungen (0.5  $\mu$ M bis 5  $\mu$ M) stark zu höheren Denaturierungsmittelkonzentrationen verschoben. Daher ist die vollständige Entfaltung von 1 mM ORF56 mit GdmCl unter diesen Bedingungen nicht mehr möglich. Folglich musste GdmSCN als Denaturierungsmittel verwendet werden.

Zur Beobachtung des GdmSCN-induzierten Übergangs wurden 28 2D  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  HSQC-Experimente in 50 mM Na-phosphat pH 7.5 zwischen 0 M und 4.5 M GdmSCN bei 25 °C aufgezeichnet (Zeeb, *et al.*, 2004). Die Spektren von nativem und entfaltetem ORF56 sind in Abb. 71a und Abb. 71c dargestellt. Dabei zeigen die Kreuzsignale des nativen Zustands im Gegensatz zu den Kreuzsignalen des entfaltetem Zustands eine sehr gute Dispersion. Die Kreuzsignale des entfaltetem Proteins fallen hauptsächlich bei einer  $^1\text{H}$  chemischen Verschiebung zwischen 8 ppm und 8.5 ppm zusammen, was zu einer signifikanten Signalüberlagerung führt. Mit zunehmender GdmSCN-Konzentration verringert sich die Intensität der Kreuzsignale von nativem ORF56, während die Signale des entfaltetem Zustands an Intensität gewinnen. Das 2D  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  HSQC im Übergangsmittelpunkt bei 2.8 M GdmSCN enthält (Abb. 71b) sowohl Kreuzsignale des nativen als auch des entfaltetem Zustands, da beide Konformationen sich im langsamen Austausch bezüglich der NMR-Zeitskala befinden. Daher ist keine direkte Zuordnung des entfaltetem Zustands ausgehend von der Zuordnung des nativen Proteins möglich. Dies wäre der Fall, wenn der native und entfaltetem Zustand sich im

schnellen Austausch befinden würden, da dann die Kreuzsignale eine populationsgemittelte chemische Verschiebung aufweisen und die Kreuzsignale dadurch schrittweise Änderung ihrer chemischen Verschiebung erfahren würden.

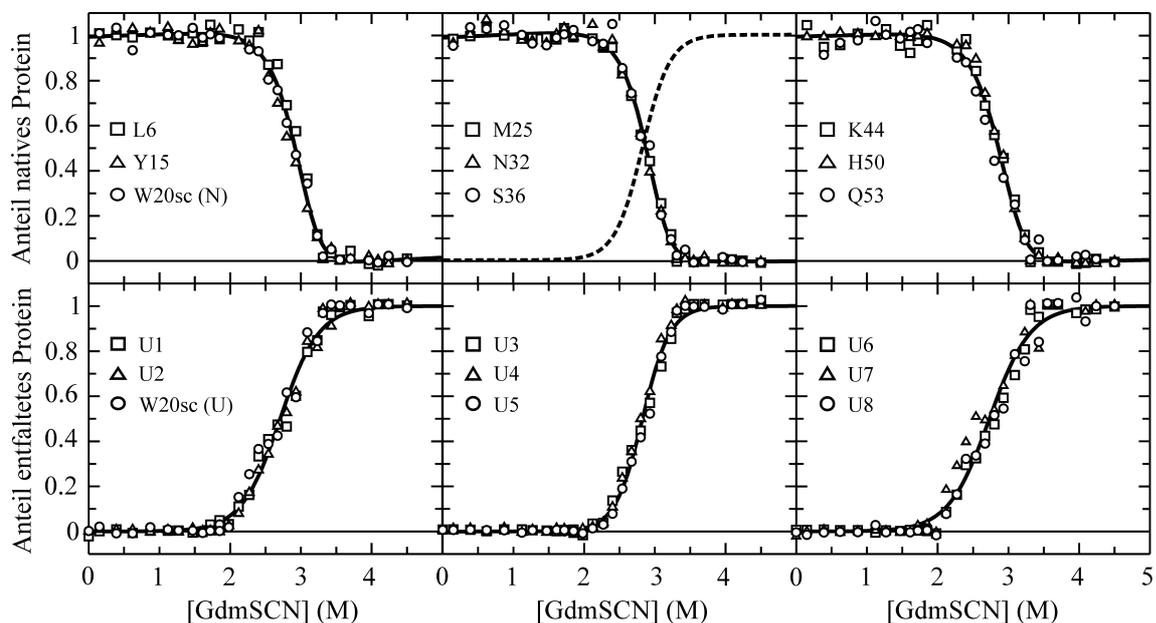


**Abb. 71:** 2D  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  HSQC-Spektrum (a) von nativem ORF56, (b) im Übergangsmittelpunkt (2.8 M GdmSCN) und (c) von vollständig entfaltetem ORF56 (4.5 M GdmSCN) bei 25 °C in 50 mM Na-phosphat pH 7.5. Die markierten Kreuzsignale identifizieren die Aminosäurereste, deren Entfaltungsübergang in Abb. 72 gezeigt wird. Die Zuordnung des nativen Proteins bei pH 5 (Abb. 61) wurde mit einer Reihe von  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  HSQC-Spektren bei verschiedenen pH-Werten (3.4.5) auf pH 7.5 übertragen, da die Kreuzsignale im schnellen Austausch vorliegen.

Über den gesamten GdmSCN-Konzentrationsbereich konnten neben den Kreuzsignalen des nativen und entfaltenen Zustands keine zusätzlichen Kreuzsignale detektiert werden, so dass die Existenz eines intermediären Zustands ausgeschlossen werden kann.

Ein weiteres Indiz für die Gültigkeit des Zweizustandsmodells kann aus den Übergängen in Abb. 72 entnommen werden. Hier wurden jeweils neun Kreuzsignale des nativen (obere Reihe in Abb. 72) und des entfaltenen (untere Reihe in Abb. 72) Zustands analysiert. Die

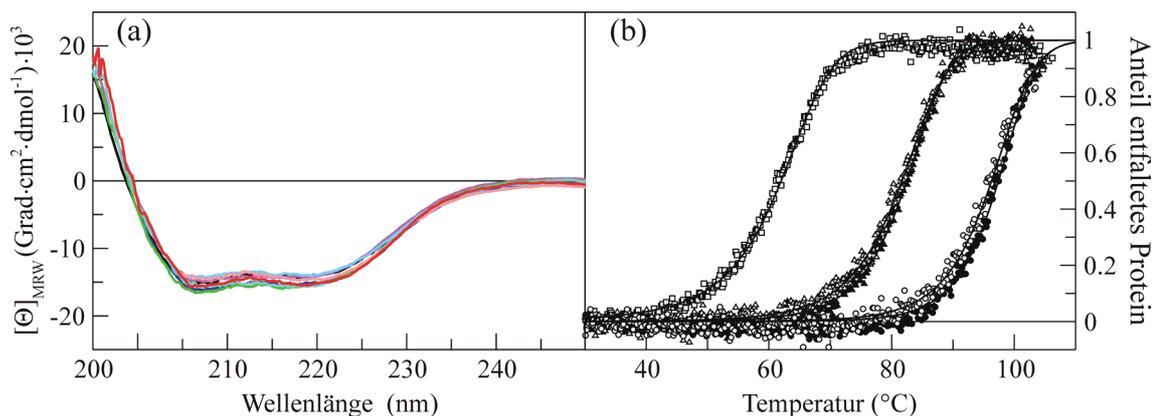
GdmSCN-induzierten Übergänge beider Konformationen sind deckungsgleich und schneiden sich im Übergangsmittelpunkt bei 0.5 (siehe Mitte obere Reihe in Abb. 72), was eine notwendige Voraussetzung des Zweizustandsmodells ist. Als interne Referenz dient das Kreuzsignal des C-terminalen K55, da die Signale beider Konformationen identische chemische Verschiebungen besitzen und somit zusammenfallen. Die Intensität des Kreuzsignals von K55 ist über den gesamten GdmSCN-Konzentrationsbereich konstant woraus sich schließen lässt, dass keine höheren Oligomere oder Aggregate existieren. Insgesamt konnten 31 Kreuzsignale des nativen und 18 Kreuzsignale des entfaltenen Proteins ausgewertet werden. Die gemittelten Ergebnisse für  $\Delta G_U$  und  $m$  betragen  $77.3 \pm 4.0$  kJ/mol und  $57.0 \pm 6.0$  kJ/mol sowie  $-20.9 \pm 1.4$  kJ/(mol·K) und  $-15.6 \pm 2.4$  kJ/(mol·K) für die Kreuzsignale des nativen bzw. entfaltenen Zustands. Die Werte, vor allem des Kooperativitätsparameters  $m$  sind im Vergleich zu den Fluoreszenz- oder CD-Messungen etwas zu niedrig, was jedoch bei nahezu allen NMR-Studien der Fall ist. Als eine mögliche Erklärung hierfür wird zumeist der große Konzentrationsunterschied angeführt, der im hier vorliegenden Fall des ORF56-Dimers offensichtlich noch deutlicher auftritt als bei monomeren Proteinen, da auch der Übergangsmittelpunkt von Proteinkonzentration abhängt.



**Abb. 72:** GdmSCN-induzierter Übergang von 1 mM  $^{15}\text{N}$ -markiertem ORF56 in 50 mM Na-phosphat pH 7.5 und 25 °C, der anhand von 28 2D  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  HSQC-Experimenten verfolgt wurde. Die Zuordnung der Kreuzsignale ist in der jeweiligen Teilabbildung angegeben und entspricht den in Abb. 71 hervorgehobenen Resonanzen. Die obere Reihe zeigt die analysierten Kreuzsignale von nativem ORF56, die über die gesamte Sequenz des Proteins verteilt sind. Die untere Reihe beinhaltet Übergangskurven von Kreuzsignalen des entfaltenen Proteins. Durchgezogenen Linien stellen die Anpassung an Gl. 6, Gl. 7 und Gl. 12 dar. Die gestrichelte Linie in der mittleren Abbildung der oberen Reihe repräsentiert die Anpassung der Kreuzsignale des entfaltenen Zustands und schneidet die Kurve der Anpassung der Kreuzsignale des nativen Zustands bei 0.5.

### 3.4.5 Salz- und pH-Abhängigkeit der Stabilität

Auf die ungewöhnlich hohe thermische Stabilität von ORF56 aus *Sulfolobus islandicus* bei pH 7.5 wurde schon in 3.4.2 ausführlich eingegangen. *Sulfolobus islandicus* ist ein hyperthermophiles und acidohalophiles Archaeon, so dass die optimalen Lebensbedingungen nicht nur durch sehr hohe Temperaturen sondern auch durch einen niedrigen pH-Wert und hohe Salzkonzentrationen bestimmt werden. Daher liegt die Vermutung nahe, dass die thermische Stabilität von ORF56 sowohl von der vorliegenden Salzkonzentration als auch vom pH-Wert abhängt. Bei 10 °C ist das Protein zwischen pH 2 und pH 11 gefaltet, da das Fern-UV CD-Spektrum im gesamten pH-Bereich unverändert bleibt (Abb. 73a) (Zeeb, *et al.*, 2004). Die Abhängigkeit der Stabilität vom pH-Wert wurde mit Hilfe von thermischen Übergängen bei einer ORF56-Konzentration von 5  $\mu$ M ermittelt, wobei das CD-Signal bei 225 nm als Sonde diente. In Abb. 73b sind thermische Übergänge bei verschiedenen pH-Werten dargestellt. Auch hier zeigt sich die extrem hohe Stabilität von ORF56. Zwischen pH 5 und pH 9 ist eine vollständige thermische Entfaltung in Abwesenheit von Denaturierungsmitteln nicht möglich, da der  $T_m$  über dem Siedepunkt von Wasser liegt (Tab. 17). Daher wurde die pH-Abhängigkeit der thermodynamischen Stabilität von ORF56 zusätzlich in Gegenwart von 4 M GdmCl gemessen. ORF56 wird durch das vorliegende Denaturierungsmittel destabilisiert und somit der  $T_m$  zu niedrigeren Temperaturen verschoben (siehe 3.4.2 und Abb. 67). Die thermischen Übergänge wurden nach dem Zweizustandsmodell für dimere Proteine (Gl. 10) mit Gl. 12 und Gl. 16 analysiert.



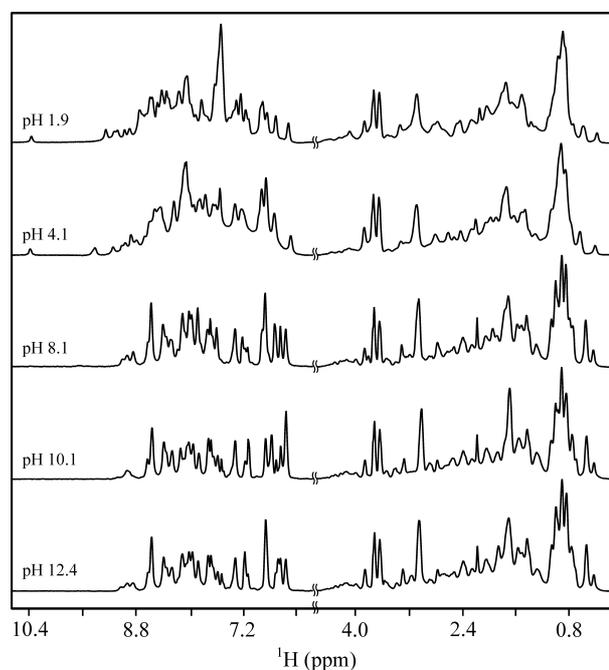
**Abb. 73:** pH-Abhängigkeit der Sekundärstruktur und der thermischen Stabilität von ORF56 in 20 mM Naphosphat, 20 mM Na-citrat. (a) Fern-UV CD-Spektren von 20  $\mu$ M ORF56 bei (schwarz) pH 2, (dunkelblau) pH 3, (meerblau) pH 4, (hellblau) pH 5, (rot) pH 7, (magenta) pH 9, (rosa) pH 10 und (grün) pH 11. (b) Thermische Übergänge von 5  $\mu$ M ORF56 bei ( $\square$ ) pH 2, ( $\blacktriangle$ ) pH 3, ( $\bullet$ ) pH 4, ( $\circ$ ) pH 10 and ( $\triangle$ ) pH 11 in Abwesenheit von GdmCl. Die Detektion erfolgte mit dem CD-Signal bei 225 nm. Die durchgezogenen Linien zeigen die Anpassungen an das Zweizustandsmodell für dimere Proteine (Gl. 10) mit Gl. 12 und Gl. 16. Die Übergangsmittelpunkte sind in Tab. 17 zusammengefasst.

**Tab. 17:** pH-Abhängigkeit der thermischen Stabilität von ORF56

pH	$T_m$ (°C) <sup>b</sup>	$T_m$ (°C) <sup>b</sup>	pH	$T_m$ (°C) <sup>b</sup>	$T_m$ (°C) <sup>b</sup>
		in 4 M GdmCl			in 4 M GdmCl
2	61.7	43.0	8	n.a. <sup>c</sup>	68.6
3	82.1	55.5	9	99.6	64.8
4	97.0	63.9	10	96.0	57.0
5	n.a. <sup>c</sup>	67.9	11	81.6	41.6
6	n.a. <sup>c</sup>	72.1	12	37.1	n.a. <sup>d</sup>
7	n.a. <sup>c</sup>	78.6			

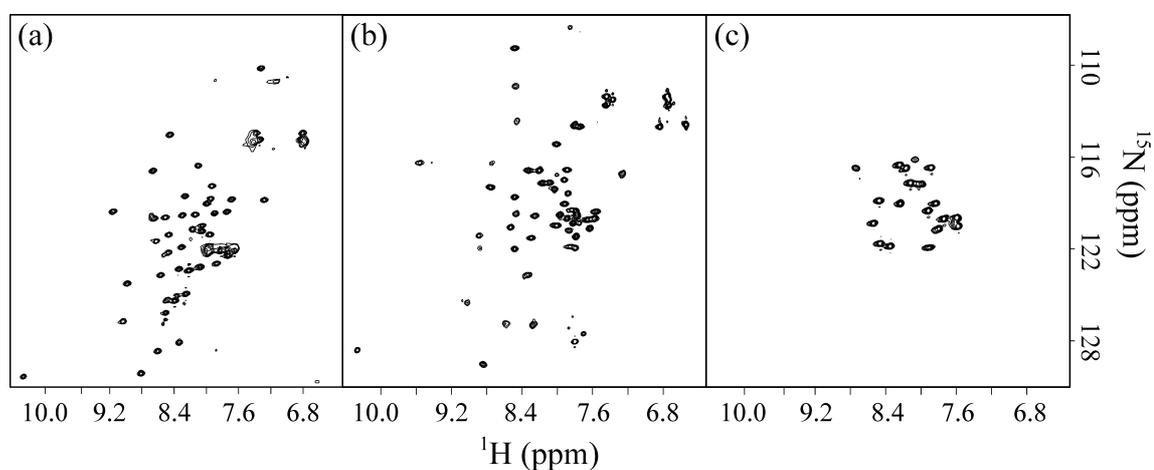
<sup>a</sup> Alle Experimente wurden mit 5  $\mu$ M ORF56 durchgeführt. <sup>b</sup> Als Puffer diente 20 mM Na-phosphat, 20 mM Na-citrat. <sup>c</sup> Keine vollständige Entfaltung in Abwesenheit von GdmCl. <sup>d</sup> ORF56 ist bei den Anfangsbedingungen (10 °C) entfaltet.

Ein detailliertes Bild über die Tertiärstruktur von ORF56 in diesem breiten pH-Bereich wurde anhand von NMR-Spektren gewonnen. Abb. 74 zeigt <sup>15</sup>N-entkoppelte 1D <sup>1</sup>H NMR-Spektren von ORF56 zwischen pH 1.9 und pH 12.4. Aufgrund der guten Dispersion und Schärfe der Resonanzen lässt sich erkennen, dass das Protein gefaltet vorliegt. Ab pH 8.1 wird die Intensität der Amidprotonen wegen des deutlich erhöhten Austauschs mit dem Lösungsmittel H<sub>2</sub>O deutlich geringer und die aromatischen <sup>1</sup>H dominieren das 1D-Spektrum bei tieferem Feld (6.4 ppm bis 10.4 ppm). Einige gut aufgelöste und zu höherem Feld verschobene Resonanzen von Methylgruppen ( $\delta < 0.8$  ppm) sind ein weiterer Hinweis für eine intakte räumliche Struktur im analysierten pH-Bereich.



**Abb. 74:** <sup>15</sup>N-entkoppelte 1D <sup>1</sup>H NMR Spektren von ORF56 bei 25 °C in 20 mM Na-phosphat, 20 mM Na-citrat bei verschiedenen pH-Werten zwischen pH 1.9 und pH 12.4. Der Bereich der aromatischen und Amidprotonen (6.4 ppm bis 10.4 ppm) wurde vierfach vergrößert dargestellt.

Zusätzlich wurden 2D  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  HSQC-Spektren bei unterschiedlichen pH-Werten aufgezeichnet (Abb. 75). Die chemischen Verschiebungen der Kreuzsignale sind vom pH-Wert abhängig. Durch das graduelle Verrücken der Resonanzen war jedoch eine eindeutige Zuordnung der Kreuzsignale möglich. Ausgehend vom Spektrum bei neutralem pH-Wert zeigt nur geringfügig Veränderungen in Richtung pH 1.9 bezüglich der Intensität. Dies kann mit der pH-Abhängigkeit des Amidprotonenaustauschs begründet werden der zu sauren pH-Werten um eine Größenordnung pro pH-Einheit verlangsamt wird, solange der EX2-Mechanismus vorliegt. Das Minimum des Amidprotonenaustauschs liegt bei pH 3 und die Rate beträgt ca.  $0.1 \text{ min}^{-1}$  bei  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  (Wüthrich & Wagner, 1979). Die äquivalente Dispersion weist auf eine nahezu unveränderte Struktur von ORF56 bei sauren pH-Werten hin.



**Abb. 75:** 2D  $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ -HSQC von ORF56 bei  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  in 20 mM Na-phosphat, 20 mM Na-citrat bei (a) pH 1.9, (b) pH 7.5, (c) pH 12.4.

In Richtung höherer pH-Werte stellen sich deutlichere Veränderungen im Spektrum ein, da der basenkatalysierte Amidprotonenaustausch deutlich schneller wird und dadurch die Intensität der Kreuzsignale verloren geht (Bai, *et al.*, 1993). Jedoch sind im 2D  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  HSQC bei pH 12.4 noch 24 Kreuzsignale zu erkennen (Abb. 75c). Diese stammen hauptsächlich von Protonen, die sich in den  $\alpha$ -Helices (W20, R23, L24, M25, E26, I27, A28 und N32, L33, T34, D37, V38, C39, R40, L41, A42, I43, K44, E45, Y46, L47, N49) oder dem  $\beta$ -Faltblattstrang (L12, I16) befinden und wahrscheinlich aufgrund der H-Brücken geschützt sind. Der Großteil dieser Reste stimmt mit den Ergebnissen aus dem  $^1\text{H}/^2\text{H}$ -Austauschexperiment bei pH 5.0 überein (Abb. 62). Selbst nach einer Inkubation von 16.5 h bei pH 12.4 und  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  tauschen zusätzlich nur die Amidprotonen von L12, I16, W20, R23, T34 und A42 aus, so dass deren Kreuzsignale im 2D  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  HSQC ebenfalls nicht mehr detektiert werden konnten. Der Schutz ist ungewöhnlich hoch, da der Amidprotonenaustausch bei pH 12.4 um das  $10^9$ -fache

schneller ist als bei pH 3. Diese Abschätzung gilt allerdings nur unter Annahme eines EX2-Mechanismus, d.h. eines basen- bzw. säurekatalysierten Austausches, und stellt somit die obere Grenze dar. Im Allgemeinen kommt es bei basischen pH-Werten zu einem Wechsel des Mechanismus von EX2 zu EX1, wobei bei Vorliegen von EX1 die Entfaltung der Struktur und nicht mehr der Austausch selbst ratenlimitierend ist. Zusammenfassend lässt sich anhand der NMR-Spektren feststellen, dass sowohl die Sekundär- als auch die Tertiärstruktur von ORF56 über den gesamten pH-Bereich erhalten bleibt und vermutlich keine signifikanten Veränderungen auftreten.

Bei neutralem pH-Wert ist eine Bestimmung der Salzabhängigkeit der thermischen Stabilität von ORF56 nicht möglich, da das Protein in Abwesenheit von Denaturierungsmittel zu stabil ist (Tab. 17). Daher wurde die Salzabhängigkeit bei pH 2 und pH 11 untersucht, da die Stabilität von ORF56 dort geringer und die Nettoladung des Proteins sehr verschieden ist. ORF56 enthält je vier Aspartate und Glutamate sowie drei Arginine und acht Lysine, woraus ein berechneter isoelektrischer Punkt von 9.2 resultiert. Hohe Salzkonzentrationen können unvorteilhafte elektrostatische Wechselwirkungen abschirmen, was zu einer Stabilisierung des Proteins führt. Mit zunehmender KCl-Konzentration steigt der Übergangsmittelpunkt  $T_m$  deutlich an (Tab. 18). Diese Stabilisierung ist wesentlich ausgeprägter bei pH 2 als bei pH 11, was vermutlich auf die hohe positive Nettoladung bei pH 2 und die sich daraus ergebende Abstoßung der gleichnamigen Ladungen zurückzuführen ist. Ferner konnte die Stabilisierung von ORF56 bei pH 2 auch durch andere Salze bewerkstelligt werden, wobei das Ausmaß der Stabilisierung von der Ionenstärke abhängig ist. Daher hat  $\text{NH}_4\text{Cl}$  den geringsten und  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  den größten Effekt auf den  $T_m$  (Tab. 18).

**Tab. 18:** Salzabhängigkeit der thermischen Stabilität von ORF56 <sup>a</sup>

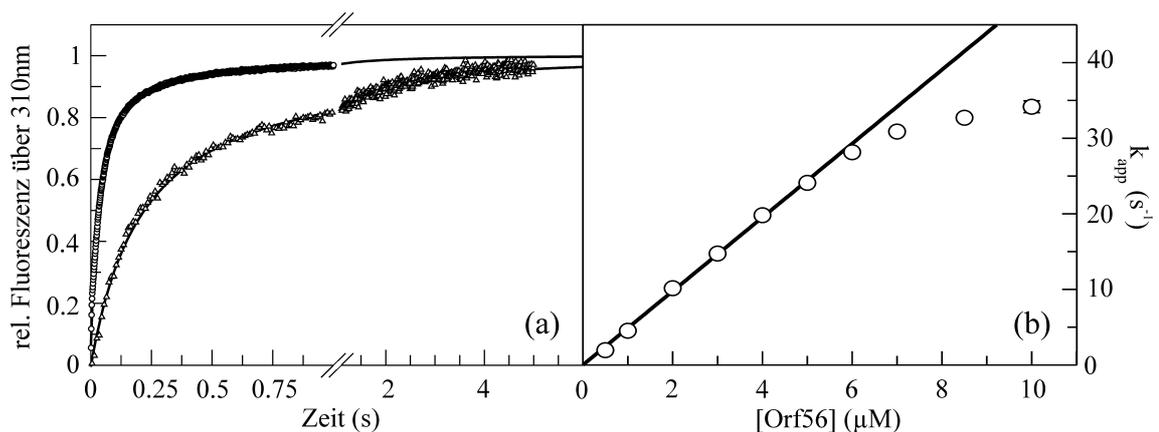
KCl (M)	pH 2 <sup>b</sup>		0.5 M Salz	pH 11 <sup>b</sup>	
	$T_m$ (°C)	$T_m$ (°C)		$T_m$ (°C)	$T_m$ (°C)
0.1	70.4	86.5	$\text{NH}_4\text{Cl}$	79.6	
0.25	77.6	87.9	$\text{NaCl}$	81.0	
0.5	82.6	87.7	$\text{KCl}$	82.6	
0.75	87.4	89.9	$\text{MgCl}_2$	87.3	
1.0	90.5	91.6	$\text{Na}_2\text{SO}_4$	96.0	

<sup>a</sup> Die ORF56-Konzentration war bei allen Experimenten 5  $\mu\text{M}$ ; <sup>b</sup> Die thermischen Übergänge wurden in 20 mM Na-phosphat, 20 mM Na-citrat durchgeführt.

### 3.4.6 Kinetische Untersuchungen: Konzentrationsabhängigkeit der Rückfaltung

Aus den Gleichgewichtsexperimenten (3.4.2 bis 3.4.5) ging hervor, dass die Faltung von ORF56 dem Zweizustandsmodell für dimere Proteine folgt. Dieses beschreibt die simultane Faltung und Assoziation der beiden Monomere, wodurch natives ORF56-Dimer gebildet wird und keine intermediären Spezies populiert werden (Gl. 10). Hier sollte nun untersucht werden, ob die Faltungskinetik ebenfalls dem Zweizustandsmodell gehorcht.

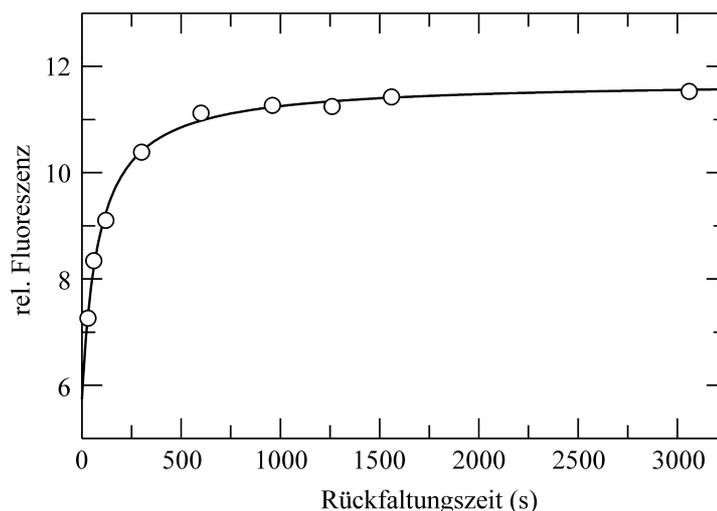
Gilt das Zweizustandsmodell, so hängt die Rückfaltungsrate von der Proteinkonzentration ab, während die Entfaltungsrate unabhängig von der eingesetzten Proteinkonzentration ist. Daher wurden sowohl Rückfaltungs- als auch Entfaltungskinetiken bei verschiedenen ORF56-Konzentrationen aufgezeichnet. Die Rückfaltungsreaktion ist sehr schnell und wurde daher in einer *stopped-flow* Apparatur durchgeführt. Hierzu wurde ORF56 in 20 mM Na-cacodylat/HCl, 8.5 M GdmCl pH 7.5 entfaltet und im Verhältnis 1:10 mit Rückfaltungspuffer (20 mM Na-cacodylat/HCl pH 7.5) gemischt. Die Reaktion wurde anhand der Änderung der integralen Fluoreszenz über 300 nm beobachtet. Alle Rückfaltungskinetiken zeigen einen einphasigen Verlauf, was charakteristisch für das Zweizustandsmodell ist. In Abb. 76a sind exemplarisch die Rückfaltungskinetiken bei einer ORF56-Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  und 7  $\mu\text{M}$  sowie die Anpassung von Gl. 23 dargestellt. Die apparenten Rückfaltungsraten ( $k_{\text{app}}$ ) betragen  $5.3 \text{ s}^{-1}$  und  $30.9 \text{ s}^{-1}$  und sind somit abhängig von der ORF56-Konzentration. Bis zu einer ORF56-Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  hängt  $k_{\text{app}}$  linear von der Proteinkonzentration ab. Die Anpassung an Gl. 24 liefert anhand der Steigung eine bimolekulare Faltungsrate ( $k_f$ ) von  $4.9 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (Abb. 76b).



**Abb. 76:** Konzentrationsabhängigkeit der Rückfaltung von ORF56 in 20 mM Na-cacodylat/HCl, 0.8 M GdmCl pH 7.5 bei 20 °C. (a) Rückfaltungskinetiken von ( $\Delta$ ) 1  $\mu\text{M}$  ORF56 und ( $\circ$ ) 7  $\mu\text{M}$  ORF56. Die Anpassung mit Gl. 23 ergab apparente Raten von  $5.3 \text{ s}^{-1}$  und  $30.9 \text{ s}^{-1}$ . (b) Apparente Rückfaltungsrate als Funktion der ORF56-Konzentration. Die lineare Regression (Gl. 24) liefert anhand der Steigung eine bimolekulare Faltungsrate von  $4.9 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Die Rückfaltung wurde durch 10fache Verdünnung der Lösung des entfalteten Proteins initiiert.

Oberhalb von 5  $\mu\text{M}$  ORF56 nimmt  $k_{\text{app}}$  weniger zu als von der Erhöhung der Proteinkonzentration zu erwarten ist. Diese Abweichung von  $k_{\text{app}}$  von der linearen Abhängigkeit wurde nicht nur unter stark nativen Bedingungen (Rückfaltung in 0.8 M GdmCl) sondern auch bei höheren GdmCl-Konzentrationen (1.8 M, 2.8 M und 3.8 M GdmCl) beobachtet. Dabei entspricht 3.8 M GdmCl dem Ende der Basislinie des nativen Proteins im GdmCl-induzierten Entfaltungsübergang von ORF56 (Abb. 68). Die Abweichung könnte darauf zurückgeführt werden, dass bei höheren Proteinkonzentrationen ein unimolekularer Schritt vor oder nach der bimolekularen Assoziation geschwindigkeitsbestimmend wird. Bei der Rückfaltung des Arc-Repressors wurde ebenfalls eine solche Abweichung gefunden (Milla & Sauer, 1994). Der bimolekulare Schritt ist mit einer Rate um  $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  bei beiden Proteinen ungefähr um Faktor 100 langsamer als eine diffusionskontrollierte Reaktion.

Um zu überprüfen, ob das Produkt der Rückfaltung natives Protein oder ein intermediärer Zustand ist, der ohne Signaländerung zum nativen Protein weiterreagiert, wurde ein sog. Doppelmischungsexperiment durchgeführt (Abb. 77). Hierzu wurde ORF56 in 8 M GdmCl entfaltetet und durch Verdünnung in Gegenwart von 3.5 M GdmCl die Rückfaltung induziert. Nach unterschiedlichen Zeiten wurde die Rückfaltung durch Verdünnen in 8 M GdmCl unterbrochen und das Protein wieder entfaltet. Die Amplitude der Entfaltungsreaktion gibt dann Aufschluss über die Anzahl nativer Moleküle. Zwischen dem nativen und einem intermediären Zustand liegt eine hohe Aktivierungsbarriere, so dass die Entfaltung des nativen Proteins viel langsamer verläuft. Da die Entfaltung intermediärer Zustände sehr schnell erfolgt, tragen diese nicht zur Amplitude bei (Schmid, 1992). Unter den gewählten Bedingungen ist sowohl die Rückfaltungs- als auch die Entfaltungsreaktion langsam, so dass Handmischungsexperimente durchgeführt werden konnten. Der Amplitudenverlauf der Entfaltung von 1  $\mu\text{M}$  ORF56 als Funktion der Rückfaltungszeit ist in Abb. 77 dargestellt. Die Entfaltung verlief für alle Experimente einphasig und  $k_{\text{u}}$  war mit  $0.0049 \text{ s}^{-1}$  konstant. Die mit Gl. 23 und Gl. 24 berechnete Rückfaltungsrate ergab  $11760 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , so dass sowohl die Entfaltungs- als auch die Rückfaltungsrate den Ergebnissen entspricht, die bei direkter Beobachtung der Faltungsreaktion im Zuge der Bestimmung der GdmCl-Abhängigkeit von  $k_{\text{u}}$  und  $k_{\text{f}}$  erhalten wurden (Abb. 78b und Abb. 79b). Mit diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass bei einer GdmCl-Konzentration von 3.5 M keine zusätzlichen Spezies auftreten und somit das Zweizustandsmodell vorliegt. Um dieses Resultat für die Rückfaltung von ORF56 verallgemeinern zu können, müssen noch weitere Doppelmischungsexperimente bei verschiedenen GdmCl- und ORF56-Konzentrationen durchgeführt werden.



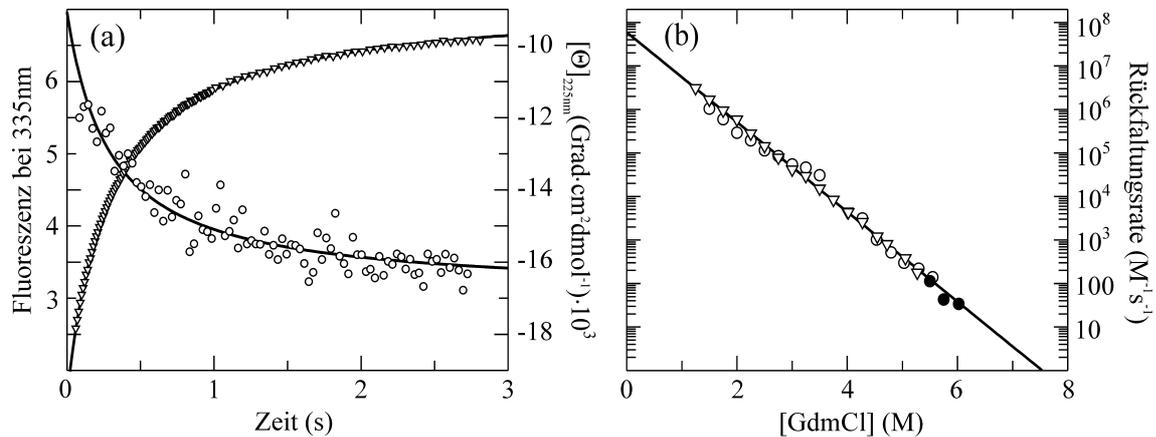
**Abb. 77:** Doppelmischungsexperiment von ORF56. Die Induktion der Rückfaltung erfolgte durch 10fache Verdünnung von 200  $\mu\text{M}$  denaturiertem ORF56 (20 mM Na-cacodylat/HCl, 8 M GdmCl pH 7.5) in 20 mM Na-cacodylat/HCl, 2.7 M GdmCl pH 7.5 bei 10  $^{\circ}\text{C}$  (Endkonzentration 3.5 M GdmCl). Nach variabler Rückfaltungszeit wurde dann durch 20fache Verdünnung in 20 mM Na-cacodylat/HCl, 8 M GdmCl pH 7.5 die Entfaltung gestartet. Die Endkonzentration betrug 1  $\mu\text{M}$  ORF56.

Die Entfaltung von ORF56 ist sehr langsam und konnte daher mit manueller Mischung induziert werden. Dazu wurde die Entfaltungsreaktion durch 40fache Verdünnung des nativen Proteins mit 20 mM Na-cacodylat/HCl, 8.2 M GdmCl pH 7.5 gestartet. Die Detektion erfolgte über die Änderung der Fluoreszenzintensität bei 335 nm. Alle Entfaltungskinetiken verliefen einphasig und konnten daher mit der einfachen Exponentialfunktion aus Gl. 22 angepasst werden. Im Konzentrationsbereich zwischen 0.25  $\mu\text{M}$  und 5  $\mu\text{M}$  ORF56 ist die Entfaltungsrate konstant und beträgt bei 15  $^{\circ}\text{C}$  0.057  $\text{s}^{-1}$ , wodurch das angenommene Zweizustandsmodell für dimere Proteine weiter bestätigt wird.

### 3.4.7 GdmCl-Abhängigkeit der Rück- und Entfaltungsraten

Einphasige Faltungskinetiken sind charakteristisch für einstufige Reaktionen. Jedoch lässt sich nicht unterscheiden, ob der Startpunkt der Rückfaltungs- bzw. Entfaltungsreaktion vollständig entfaltetes bzw. natives ORF56 ist und nicht die Bildung eines kinetischen Intermediats beobachtet wird, das anschließend in einer spektroskopisch stillen Faltungsreaktion entfaltetes bzw. natives Protein liefert. Ein solches Intermediat könnte ein vollständiger oder teilgefalteter dimerer Zustand sein, dessen vollständige Rückfaltung oder die Umorientierung der Monomere innerhalb des Dimers keine Signaländerung bewirkt. In der Entfaltungsrichtung wäre dann ebenso nur die Entfaltung dieses teilgefalteten dimeren Intermediats zu beobachten. Zur Überprüfung des postulierten Zweizustandsmodells und der

damit einhergehenden Abwesenheit von Faltungsintermediaten wurde die GdmCl-Abhängigkeit der Faltungsraten bestimmt. Rückfaltungs- und Entfaltungsexperimente wurden mit einer ORF56-Endkonzentration von 5  $\mu\text{M}$  bei 10  $^{\circ}\text{C}$  in 20 mM Na-cacodylat/HCl pH 7.5 durchgeführt und sowohl mit Fluoreszenz als auch mit Fern-UV CD detektiert. Die Rückfaltung ist zwischen 0.7 M GdmCl und 3.7 M GdmCl sehr schnell, so dass eine *stopped-flow* Apparatur zum Einsatz kam, die simultan Fluoreszenz- und CD-Signal aufzeichnen kann (siehe 2.4.8). Exemplarisch ist solch eine Rückfaltungskinetik in Abb. 78a gezeigt. Die Endkonzentration betrug 2 M GdmCl und die Anpassung erfolgte mit Gl. 23. Beide Detektionsmethoden ergaben eine vergleichbare apparente Rückfaltungsrate ( $k_{\text{app}}$ ). Im Bereich zwischen 3.7 M und 6 M GdmCl wurden dann Handmischungsexperimente durchgeführt. Die Abhängigkeit der bimolekularen Rückfaltungsrate ( $k_f$ ) von der GdmCl-Konzentration ist in Abb. 78b enthalten

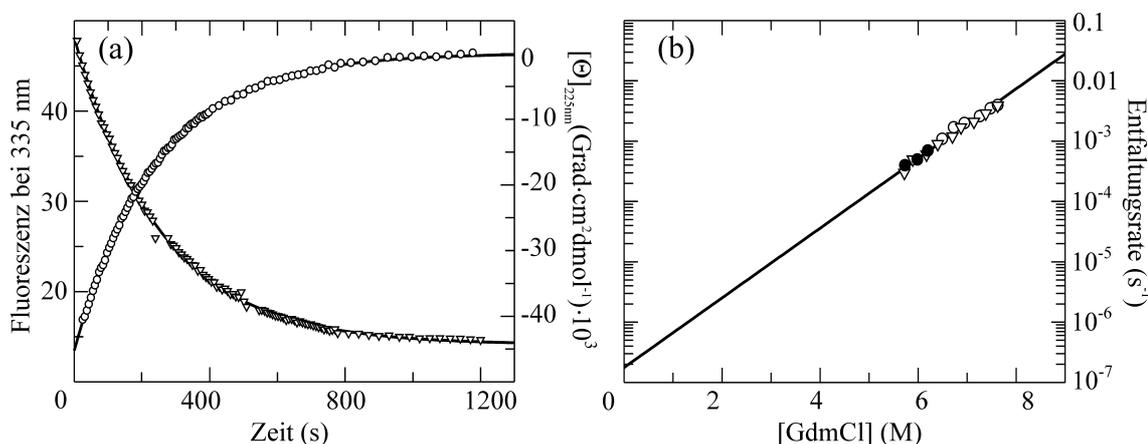


**Abb. 78:** GdmCl-Abhängigkeit der Rückfaltung von ORF56. (a) Die Rückfaltungskinetik von 5  $\mu\text{M}$  ORF56 in 20 mM Na-cacodylat/HCl, 2 M GdmCl pH 7.5 bei 10  $^{\circ}\text{C}$  wurde mit ( $\nabla$ ) Fluoreszenz- und ( $\circ$ ) CD-Spektroskopie verfolgt. Die Anpassung an Gl. 23 ergab für  $k_{\text{app}}$   $1.36 \pm 0.01 \text{ s}^{-1}$  bzw.  $0.78 \pm 0.12 \text{ s}^{-1}$  für die Fluoreszenz- bzw. CD-Daten. Mit Gl. 24 resultieren bimolekulare Rückfaltungsraten ( $k_f$ ) von  $6.6 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  bzw.  $3.9 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . (b) Abhängigkeit der Rückfaltungsraten von der GdmCl-Konzentration. Die Rückfaltungsrate in Abwesenheit von Denaturierungsmittel  $k_f(\text{H}_2\text{O})$  bzw. der  $m$ -Wert wurde mit Gl. 28 bestimmt und beträgt  $(7.0 \pm 0.7) \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  bzw.  $m_f -2.44 \pm 0.02 \text{ M}^{-1}$ . Die Symbole wurden analog zu (a) verwendet. ( $\bullet$ ) Rückfaltungsraten, die aus Entfaltungsexperimenten gewonnen wurden (Gl. 27).

Die Kinetiken wurden bis zu einer GdmCl-Konzentration von 5 M mit Gl. 23 und Gl. 24 angepasst, da die Population des entfaltenen Zustands sehr gering und die Entfaltungsreaktion sehr langsam ist (Abb. 79b). Dadurch leistet die Entfaltung keinen signifikanten Beitrag zur Signaländerung und kann vernachlässigt werden. Bei höheren GdmCl-Konzentrationen im Übergangsbereich wurde der Beitrag der Entfaltungsreaktion berücksichtigt (Gl. 26). Alle Rückfaltungskinetiken im Bereich der Basislinie des nativen Proteins sind einphasig und die mittels Fluoreszenz- und CD-Detektion erhaltenen Raten stimmen sehr gut überein (Abb.

78b). Daraus folgt, dass die Bildung von Sekundär- und Tertiärstruktur sowie die Assoziation gleichzeitig erfolgen. Aus der linearen Abhängigkeit von  $\ln k_f$  (Gl. 28) von der GdmCl-Konzentration resultiert eine Rückfaltungsrate in Abwesenheit des Denaturierungsmittels ( $k_f(\text{H}_2\text{O})$ ) von  $7.0 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  und eine Steigung ( $m_f$ -Wert) von  $-2.44 \text{ M}^{-1}$ . Diese Ergebnisse untermauern die Richtigkeit des angenommenen Zweizustandsmodells.

Abb. 79a zeigt die langsame Entfaltungskinetik von  $5 \mu\text{M}$  ORF56 in  $20 \text{ mM}$  Na-cacodylat/HCl,  $7.6 \text{ M}$  GdmCl pH 7.5, die mittels manueller Mischung durch eine 40fache Verdünnung von nativem ORF56 gestartet wurde. Für die Detektion via Fluoreszenz bzw. CD wurde jeweils ein separates Experiment durchgeführt, da keine simultane Detektion möglich war. Die Entfaltung wurde im Bereich zwischen  $5.7 \text{ M}$  GdmCl und  $8 \text{ M}$  GdmCl untersucht und die GdmCl-Abhängigkeit der Entfaltungsrate in Abb. 79b dargestellt.



**Abb. 79:** GdmCl-Abhängigkeit der Entfaltung von ORF56. (a) Die Entfaltungskinetik von  $5 \mu\text{M}$  ORF56 in  $20 \text{ mM}$  Na-cacodylat/HCl,  $7.6 \text{ M}$  GdmCl pH 7.5 bei  $10 \text{ }^\circ\text{C}$  wurde mit ( $\nabla$ ) Fluoreszenz- und ( $\circ$ ) CD-Spektroskopie verfolgt. Die Anpassung der Gl. 22 ergab für  $k_u$   $0.0039 \pm 0.0001 \text{ s}^{-1}$  bzw.  $0.0041 \pm 0.0001 \text{ s}^{-1}$  für die Fluoreszenz- bzw. CD-Daten. (b) Abhängigkeit der Entfaltungsraten von der GdmCl-Konzentration. Die Entfaltungsraten in Abwesenheit des Denaturierungsmittels  $k_u(\text{H}_2\text{O})$  ist  $(1.8 \pm 0.6) \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1}$  und der  $m$ -Wert  $m_u$  ist  $-1.33 \pm 0.06 \text{ M}^{-1}$  und wurde mit Gl. 28 bestimmt. Die Symbole wurden analog zu (a) verwendet. ( $\bullet$ ) Entfaltungsraten, die aus Rückfaltungsexperimenten gewonnen wurden (Gl. 26).

Im Gegensatz zur Rückfaltung ist die Entfaltung von der Konzentration unabhängig (3.4.6), so dass die Kinetiken mit einer einfachen Exponentialfunktion im Bereich zwischen  $6.6 \text{ M}$  GdmCl und  $8 \text{ M}$  GdmCl ausgewertet werden konnten (Gl. 22). Im Übergangsbereich ( $5.2 \text{ M}$  GdmCl bis  $6.4 \text{ M}$  GdmCl) trägt die Rückfaltung signifikant zu der beobachteten Signaländerung bei. Deshalb wurden die Entfaltungsraten ( $k_u$ ) mit Gl. 27 bestimmt, die die Rückfaltung mit berücksichtigen. Fluoreszenz- bzw. CD-detektierte Entfaltungsexperimente ergeben identische Resultate für  $k_u$ . Alle beobachteten Entfaltungskinetiken in der Basislinie

des entfalteten Proteins verlaufen einphasig und  $\ln k_u$  zeigt eine lineare Abhängigkeit von der GdmCl-Konzentration (Gl. 28). Die Entfaltungsrates von ORF56 in Abwesenheit des Denaturierungsmittels ( $k_u(\text{H}_2\text{O})$ ) ist außerordentlich langsam und beträgt  $1.8 \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1}$  (d.h.  $5.7 \text{ Jahr}^{-1}$ ). Als Steigung wurde ein  $m_u$ -Wert von  $-1.33 \text{ M}^{-1}$  erhalten.

Die Korrelation kinetischer und thermodynamischer Daten ist ein wichtiges Kriterium für die Gültigkeit des Zweizustandsmodells. Daher wurde die Stabilität von ORF56 aus den gewonnenen kinetischen Parametern bestimmt. Die Gleichgewichtskonstante  $K_U^{\text{kin}} = 2k_u(\text{H}_2\text{O})/k_f(\text{H}_2\text{O})$  beträgt  $5.1 \cdot 10^{-15} \text{ M}$  und ergibt eine freie Enthalpie der Entfaltung von  $\Delta G_U^{\text{kin}}(\text{H}_2\text{O}) = 77.5 \text{ kJ/mol}$  (Tab. 19). Diese Ergebnisse sind vergleichbar zu den Resultaten, die aus dem GdmCl-induzierten Entfaltungsübergang erhalten wurden (Abb. 70). Die Abweichungen liegen zu einem großen Teil an der Extrapolation von  $\Delta G_U$  und  $k_u$ , die sich über einen weiten GdmCl-Konzentrationsbereich erstreckt (siehe Abb. 69). Eine zusammenfassende Gegenüberstellung ist in Tab. 19 zu finden, wobei der Kooperativitätsparameter  $m$  ebenfalls eine gute Übereinstimmung der thermodynamischen und kinetischen Daten aufweist.

**Tab. 19:** Thermodynamische und kinetische Parameter der Faltung von ORF56 <sup>a</sup>

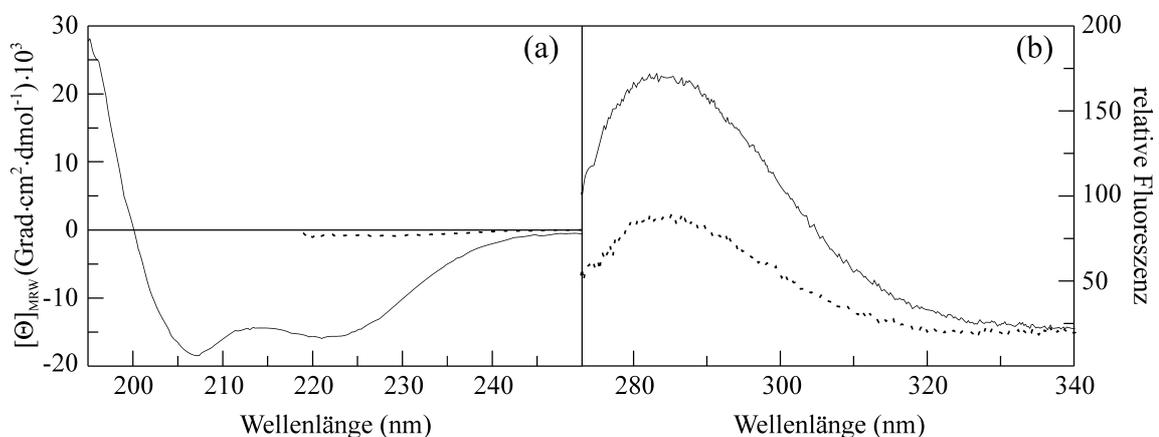
Experimentelle Daten	$K_U$ (M)	$\Delta G_U(\text{H}_2\text{O})$ (kJ/mol)	$m$ (kJ/(mol·M))
Gleichgewicht	$(5.3 \pm 0.1) \cdot 10^{-16}$	$82.8 \pm 0.3$	$9.5 \pm 0.5$
Kinetik	$(5.1 \pm 1.3) \cdot 10^{-15}$	$77.5 \pm 0.6$	$8.9 \pm 0.2$ <sup>b</sup>

<sup>a</sup> in 25 mM Na-cacodylat/HCl pH 7.5 bei 10 °C. <sup>b</sup> Der kinetische  $m$ -Wert ( $m = m_u - m_f$ ) wurde mit  $m_f = -2.44 \pm 0.02 \text{ M}^{-1}$  und  $m_u = 1.33 \pm 0.06 \text{ M}^{-1}$  berechnet und mit R-T multipliziert.

### 3.5 Faltung des humanen CDK-Inhibitors p19<sup>INK4d</sup>

#### 3.5.1 Spektroskopische Charakterisierung der Gleichgewichtsstabilität von p19<sup>INK4d</sup>

Die Analyse der Stabilität und Faltung des humanen CDK-Inhibitors p19<sup>INK4d</sup> mit optischer Spektroskopie ist durch die Abwesenheit gut zugänglicher Chromophore wie z.B. Trp oder Tyr deutlich erschwert. Da die Tertiärstruktur hauptsächlich aus  $\alpha$ -Helices aufgebaut ist (Abb. 4), steht der Fern-UV Circular dichroismus als Sonde zur Verfügung. Desweiteren enthält p19<sup>INK4d</sup> vier Phenylalanine, die in Abwesenheit von Tryptophan und Tyrosin ein detektierbares Signal ergeben. Die Sensitivität der Sonde ( $\epsilon_{\max} \cdot \phi_F$ ) ist das Produkt des Extinktionskoeffizienten des Chromophors im Absorptionsmaximum ( $\epsilon_{\max}$ ) und der Quantenausbeute ( $\phi_F$ ) dar. Sowohl  $\epsilon_{\max}$  als auch  $\phi_F$  sind für Trp ( $5600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  bzw. 0.2), Tyr ( $1400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  bzw. 0.14) und Phe ( $200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  bzw. 0.04) sehr unterschiedlich und somit nimmt die Sensitivität von Trp ( $1120 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) über Tyr ( $196 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) zu Phe ( $8 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) sehr stark ab (Cantor & Schimmel, 1980). Daher kann die Fluoreszenzemission von Phe nur in Abwesenheit von Trp und Tyr detektiert werden, wofür p19<sup>INK4d</sup> ein sehr seltenes Beispiel darstellt. Die Fern-UV CD- und Fluoreszenzspektren des nativen und entfalteten p19<sup>INK4d</sup> sind in Abb. 80 enthalten (Zeeb, *et al.*, 2002).

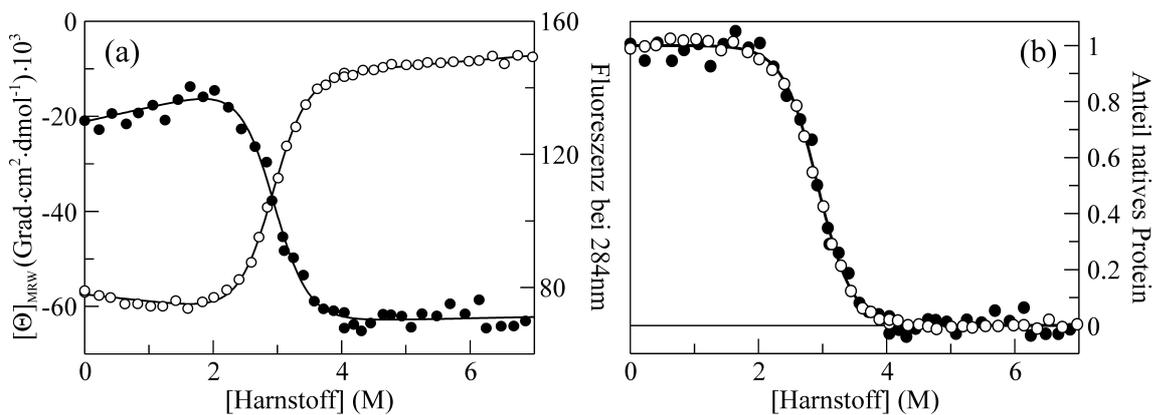


**Abb. 80:** Optische Spektren von p19<sup>INK4d</sup> in 20 mM Na-phosphat pH 7.4 bei 15 °C. (a) Fern-UV CD Spektrum des (—) nativen Proteins und des (·····) entfalteten Proteins in Gegenwart von 6 M Harnstoff. Die Messung erfolgte in einer 0.1 cm Küvette bei einer Proteinkonzentration von 10  $\mu\text{M}$ . (b) Fluoreszenzemissionsspektren von (—) nativem und (·····) entfaltetem p19<sup>INK4d</sup>. Die Anregung erfolgte bei 258 nm in einer verspiegelten 1 cm Küvette und einer Proteinkonzentration von 4  $\mu\text{M}$ .

Das Fern-UV CD-Spektrum in Abb. 80a entspricht dem typischen Spektrum eines  $\alpha$ -helikalen Proteins mit den beiden charakteristischen Minima bei 207 nm und 222 nm. In Folge der Entfaltung mit 6 M Harnstoff geht die reguläre Sekundärstruktur verloren und damit auch die negative Elliptizität, wodurch die Entfaltung von p19<sup>INK4d</sup> beobachtet werden

kann. In Abb. 80b ist die Fluoreszenzemission der intrinsischen Phenylalanine im nativen und entfalteten Protein dargestellt. Durch die Entfaltung des Proteins mit Harnstoff verringert sich die Fluoreszenzintensität um ca. 50%, wobei das Emissionsmaximum unverändert bleibt. Somit ist auch die Phenylalanin-Fluoreszenz eine geeignete Sonde zur Beobachtung der Entfaltung von p19<sup>INK4d</sup>, die den Verlust der Tertiärstruktur reflektiert.

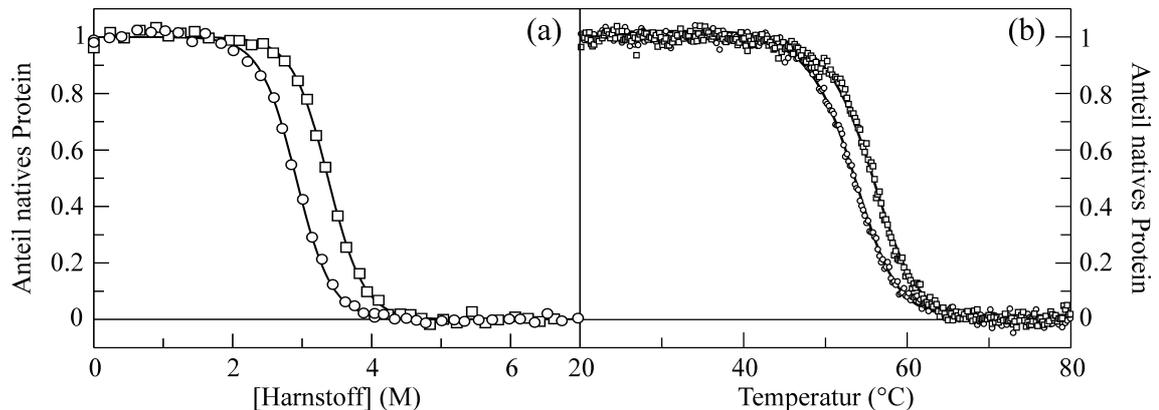
Die Harnstoff-induzierte Entfaltung von p19<sup>INK4d</sup> wurde anhand des CD-Signals bei 222 nm und der Phenylalanin-Fluoreszenz bei 284 nm verfolgt und ist in Abb. 81 wiedergegeben (Zeeb, *et al.*, 2002). Sowohl die Zunahme der Elliptizität als auch die Abnahme der Phenylalanin-Fluoreszenz bei steigender Harnstoffkonzentration gibt die kooperative und einphasige Entfaltung von p19<sup>INK4d</sup> wieder (Abb. 81a). Nach der Normierung resultiert für beide Sonden ein deckungsgleicher Übergang, der einen simultanen Verlust von Sekundär- und Tertiärstruktur bei der Entfaltung beschreibt. Diese Übereinstimmung ist im Allgemeinen ein wichtiger Hinweis auf die Gültigkeit eines Zweizustandsmodells (siehe z.B. Abb. 68 in 3.4.3). Wie jedoch in 3.5.2 gezeigt wird, ist dies hier nicht der Fall, da mit Hilfe der NMR-Spektroskopie ein Faltungsintermediat detektiert werden konnte.



**Abb. 81:** Harnstoff-induzierte Entfaltung von p19<sup>INK4d</sup> in 20 mM Na-phosphat pH 7.4 bei 15 °C. (a) (○) Fern-UV CD bei 222 nm, (●) Phenylalaninfluoreszenz bei 284 nm (20 nm Bandbreite) nach Anregung bei 258 nm (5 nm Bandbreite). Die Proteinkonzentration betrug 4 μM. (b) Auftragung der normierten Daten aus (a). Die durchgezogenen Linien stellen den Angleich an das Zweizustandsmodell (Gl. 9) dar, das hier jedoch keine physikalische Bedeutung besitzt (siehe unten). Der Mittelpunkt des Übergangs liegt bei 2.9 M Harnstoff.

In 3.5.2 werden außerdem NMR-Experimente besprochen, die in <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O durchgeführt wurden. Daher wurde der Einfluss des Isotopeneffekts auf die thermodynamische Stabilität von p19<sup>INK4d</sup> untersucht. In Abb. 82 ist sowohl die Harnstoff-induzierte als auch die thermische Entfaltung von p19<sup>INK4d</sup> in <sup>1</sup>H<sub>2</sub>O und <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O dargestellt. Die Entfaltungsübergänge wurden anhand des CD-Signals bei 222 nm verfolgt. In beiden Fällen ist eine geringe Stabilisierung des Proteins durch <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O zu erkennen, was bei anderen Proteinen auch schon beobachtet wurde (Krantz, *et al.*, 2000, Mullins, *et al.*, 1997, Parker & Clarke, 1997). So

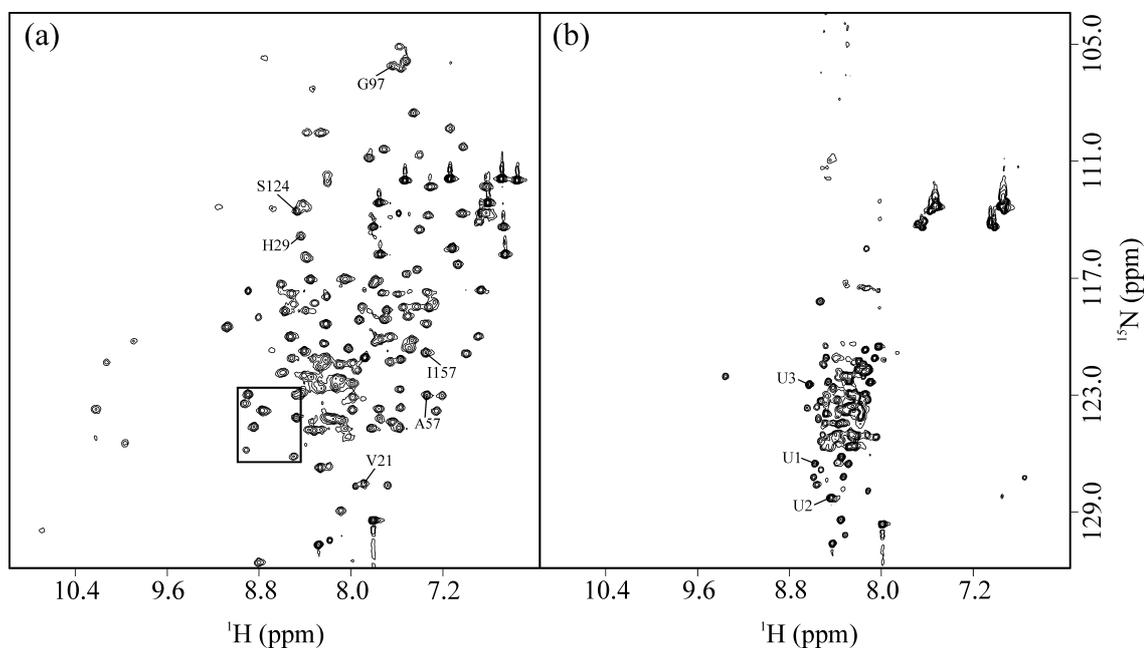
erhöht sich der Mittelpunkt des Harnstoff-induzierten bzw. thermischen Entfaltungsübergangs von 2.9 M auf 3.3 M Harnstoff bzw. von 53.4 °C auf 55.6 °C.



**Abb. 82:** Einfluss des Isotopeneffekts auf die Stabilität von p19<sup>INK4d</sup> in 20 mM Na-phosphat pH 7.4. Der p<sup>2</sup>H wurde mit p<sup>2</sup>H = pH<sub>abgelesen</sub> + 0.4 korrigiert. (a) Harnstoff-induzierte Entfaltung bei 15 °C bzw. (b) thermische Entfaltung in (○) <sup>1</sup>H<sub>2</sub>O und (□) <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O. Die Übergänge wurden mit dem CD-Signal bei 222 nm beobachtet.

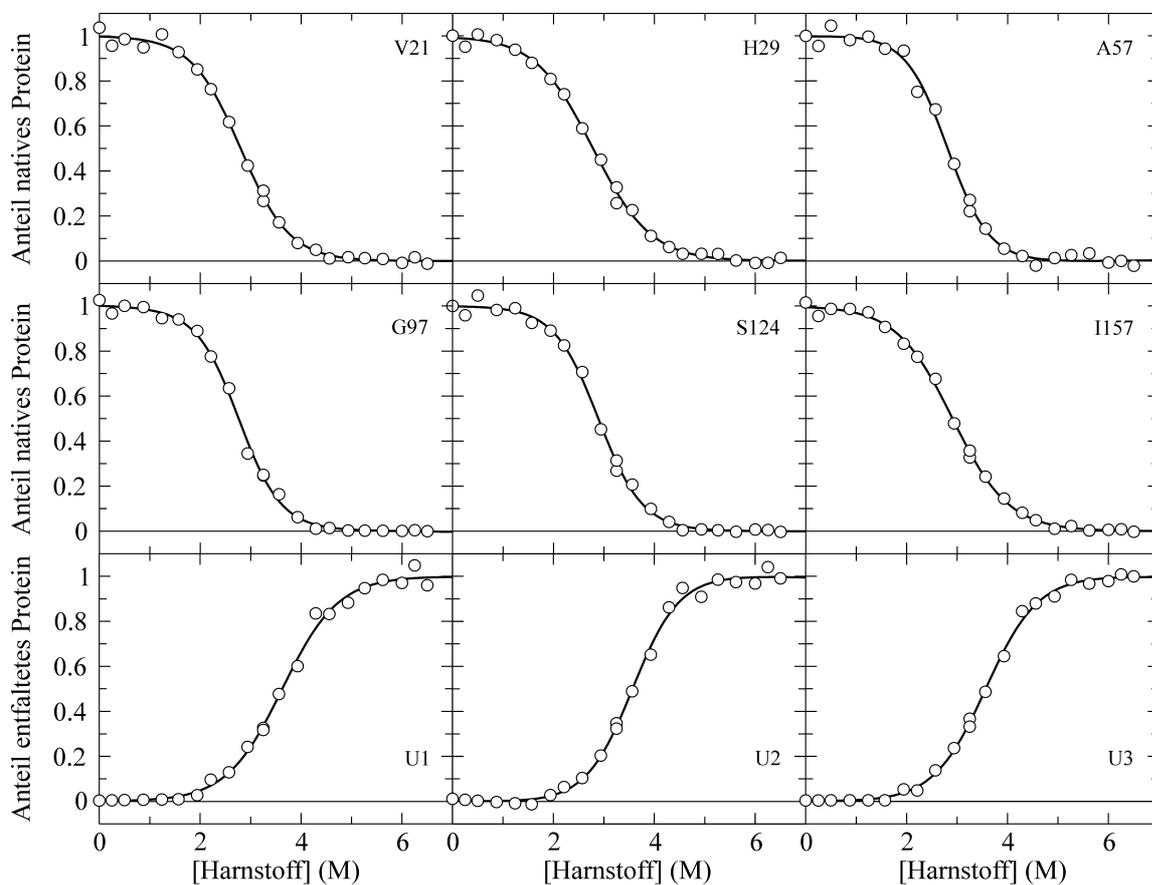
### 3.5.2 NMR-spektroskopische Detektion eines Harnstoff-induzierten Übergangs

Eine wesentlich detailliertere Analyse des Faltungsgleichgewichts von p19<sup>INK4d</sup> wurde durch die Aufnahme eines Harnstoff-induzierten Entfaltungsübergangs unter NMR-Detektion möglich (Zeeb, *et al.*, 2002).



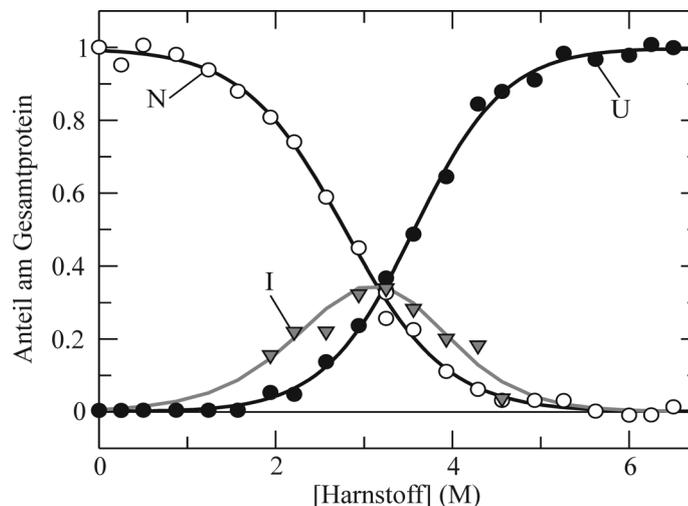
**Abb. 83:** 2D <sup>1</sup>H/<sup>15</sup>N HSQC-Spektrum von (a) nativem und (b) entfaltetem p19<sup>INK4d</sup> in 20 mM Na-phosphat pH 7.4 bei 15 °C. Die Spektren wurden an einem Bruker DRX500 bei einer Proteinkonzentration von 0.5 mM aufgezeichnet. Die Entfaltung erfolgte durch Zugabe von 6.5 M Harnstoff. Für die zugeordneten Signale ist in Abb. 84 der gesamte Entfaltungsübergang gezeigt. Der Rahmen gibt den Bereich an, der in Abb. 86 vergrößert dargestellt wurde.

Hierzu wurden 24 2D  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  HSQC-Spektren bei Harnstoffkonzentrationen zwischen 0 M und 6.5 M bei 15 °C aufgezeichnet wie in 3.4.4 beschrieben vorgegangen. Abb. 83 zeigt das 2D  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  HSQC von nativem und entfaltetem p19<sup>INK4d</sup>. Die geringe Dispersion der  $^1\text{H}$  chemischen Verschiebung und die große Überlagerung der Kreuzsignale ist typisch für den entfalteten Zustand und vergleichbar dem Spektrum von entfaltetem ORF56 (Abb. 71). Natives p19<sup>INK4d</sup> zeigt ein gut aufgelöstes 2D  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  HSQC, das nur wenig überlagerte Kreuzsignale enthält und eine für ein überwiegend  $\alpha$ -helikales Protein eine gute Dispersion sowohl der  $^1\text{H}$  als auch der  $^{15}\text{N}$  chemischen Verschiebung aufweist. Die in Abb. 83 beispielhaft identifizierten Kreuzsignale sind über den gesamten Konzentrationsbereich des eingesetzten Denaturierungsmittels gut aufgelöst und zeigen keine Überlappung mit anderen Kreuzsignalen, so dass deren Übergang in Abb. 84 dargestellt werden kann.



**Abb. 84:** Harnstoff-induzierte Entfaltung von p19<sup>INK4d</sup>. Die oberen beiden Reihen zeigen die Beobachtung der Entfaltung anhand der Kreuzsignale von V21, H29, A57, G97, S124 und I157 des nativen Zustands, während die untere Reihe den Verlauf aufgrund der Kreuzsignale des entfaltenen Zustands wiedergibt. Die Kreuzsignale im entfaltenen Zustand sind nicht zugeordnet und daher nur sequentiell bezeichnet. Die durchgezogenen Linien repräsentieren die Anpassung an ein Zweizustandsmodell mit Gl. 9 und sollen das Auge führen, besitzen jedoch keine physikalische Bedeutung.

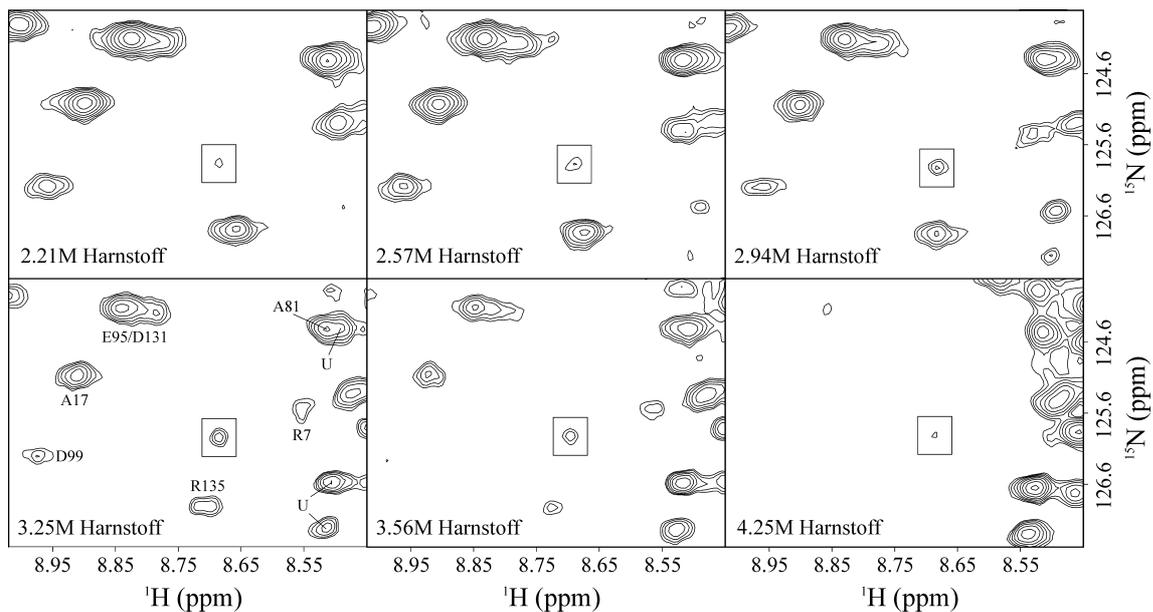
Die Übergänge der Kreuzsignale des nativen Zustands zeigen nahezu identische Verläufe. Insgesamt konnten 52 Kreuzsignale von Rückgratamiden ausgewertet werden, wobei die Mittelpunkte bei vergleichbaren Kooperativitäten um 2.9 M Harnstoff liegen (Rösner, 2002, Zeeb, *et al.*, 2002). Die Übereinstimmung der Übergänge der Kreuzsignale von p19<sup>INK4d</sup> im entfalteten Zustand ist ebenfalls vorhanden, jedoch ist der Mittelpunkt zu höheren Harnstoffkonzentrationen im Vergleich zum Übergangsmittelpunkt des nativen Proteins verschoben und liegt um 3.6 M. Vom entfalteten Zustand konnten 15 gut aufgelöste Kreuzsignale ausgewertet werden. Aus den unterschiedlichen Mittelpunkten der beiden Zustände ergibt sich, dass die Populationen der beiden Zustände sich nicht bei einem Proteinanteil von 0.5 schneiden (Abb. 85). Der Schnittpunkt der Population des nativen und entfalteten Zustands ( $p_N$  bzw.  $p_U$ ) im Übergangsmittelpunkt bei 0.5 ist ein entscheidendes Kriterium für die Gültigkeit des Zweizustandsmodells, in dem nur der native und der entfaltete Zustand im Gleichgewicht vorliegen dürfen. Da dies hier nicht der Fall ist, muss eine dritte Spezies in Betracht gezogen werden. Die Population des Faltungsintermediats ( $p_I$ ) hängt von der Harnstoffkonzentration ab und kann mit  $p_I = 1 - (p_N + p_U)$  berechnet werden (graue Linie in Abb. 85). Bei 3.25 M Harnstoff liegt eine maximale  $p_I$  von 0.32 vor.



**Abb. 85:** Normierte Anteile des (○) nativen und (●) entfalteten Zustands am Gesamtprotein. Die jeweilige Population ( $p_N$ ,  $p_U$ ) wurde aus den Harnstoff-induzierten Entfaltungsübergängen unter NMR-Detektion ermittelt, wobei die Kreuzsignale des nativen und entfalteten Zustands verwendet wurden. Die graue Linie stellt den Proteinanteil ( $p_I$ ) dar, der mit  $p_I = 1 - (p_N + p_U)$  berechnet wurde. Die grauen Dreiecke repräsentieren die experimentell bestimmten Intensitäten der gut aufgelösten Kreuzsignale des Intermediats (Abb. 86), die auf 0.32 bei 3.25 M Harnstoff skaliert wurden. Die schwarzen Linien besitzen auch hier keine physikalische Bedeutung.

Bei genauerer Betrachtung der 2D <sup>1</sup>H/<sup>15</sup>N HSQC-Spektren konnten acht zusätzliche Kreuzsignale bei mittleren Harnstoffkonzentrationen identifiziert werden, die weder dem nativen noch dem entfalteten Zustand zugeordnet werden konnten. Ein repräsentatives

Beispiel sowie die Abhängigkeit der Intensität dieses Kreuzsignals von der Harnstoffkonzentration ist in Abb. 86 gegeben (Zeeb, *et al.*, 2002). Die Intensität dieses Kreuzsignals steigt von 2.25 M bis 3.25 M Harnstoff an und fällt dann bei höheren Harnstoffkonzentrationen wieder ab. Skaliert man diesen Intensitätsverlauf im Maximum bei 3.25 M Harnstoff auf  $p_1 = 0.32$ , so folgen die experimentell bestimmten Daten dem zuvor theoretisch berechneten Profil (Abb. 85). Im Vergleich dazu verringert sich die Intensität des Kreuzsignals von A17 im nativen Zustand mit steigender Harnstoffkonzentration, während die Kreuzsignale des entfalteten Zustands an Intensität gewinnen.

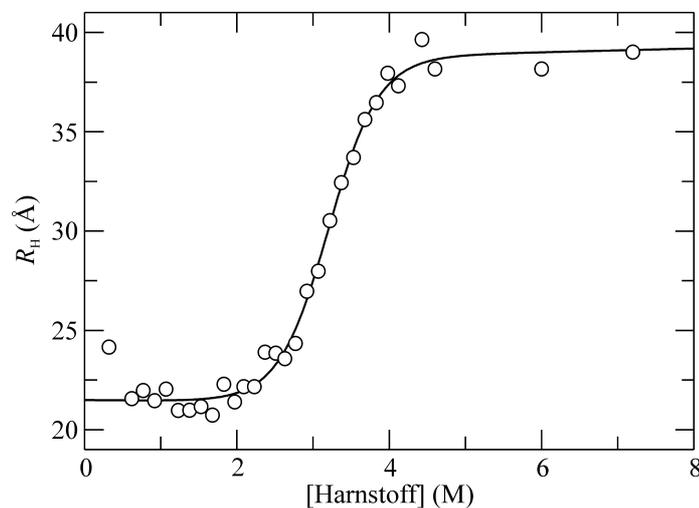


**Abb. 86:** Ausschnitt aus den  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  HSQC-Spektren bei verschiedenen Harnstoffkonzentrationen zwischen 2.21 M und 4.25 M (Rahmen in Abb. 83). Das zusätzliche Kreuzsignal des Faltungsintermediats liegt innerhalb des kleinen Rahmens. Die Zuordnung der Kreuzsignale ist im Ausschnitt in 3.25 M Harnstoff gegeben.

Die geringe Anzahl der zusätzlichen Kreuzsignale des transienten Intermediats und deren geringe Dispersion in der  $^1\text{H}$  chemischen Verschiebung (8.1 ppm bis 8.7 ppm) lässt darauf schließen, dass es nur teilweise strukturiert und überwiegend entfaltet vorliegt. Daraus ergibt sich eine Überlagerung der Kreuzsignale mit dem entfalteten Zustand. Diese Ähnlichkeit mit dem entfalteten Zustand ist verantwortlich dafür, dass eine spektroskopische Beobachtung mit optischen Methoden nicht möglich ist und der CD- bzw. Phenylalanin-Fluoreszenz-detektierte Entfaltungsübergang dem Übergang der Kreuzsignale des nativen p19<sup>INK4d</sup> folgt.

Um ausschließen zu können, dass die Abweichung der NMR-Daten von den CD- und Fluoreszenzdaten nicht z.B. auf eine erhöhte Aggregationsanfälligkeit bei hohen Proteinkonzentrationen zurückzuführen ist, wurde die Intensität des Kreuzsignals des C-terminalen L166 untersucht. Dieses zeigt keinen Unterschied in der Linienbreite und der  $^1\text{H}$  bzw.  $^{15}\text{N}$  chemischen Verschiebung was auf eine sehr ähnliche unstrukturierte und flexible

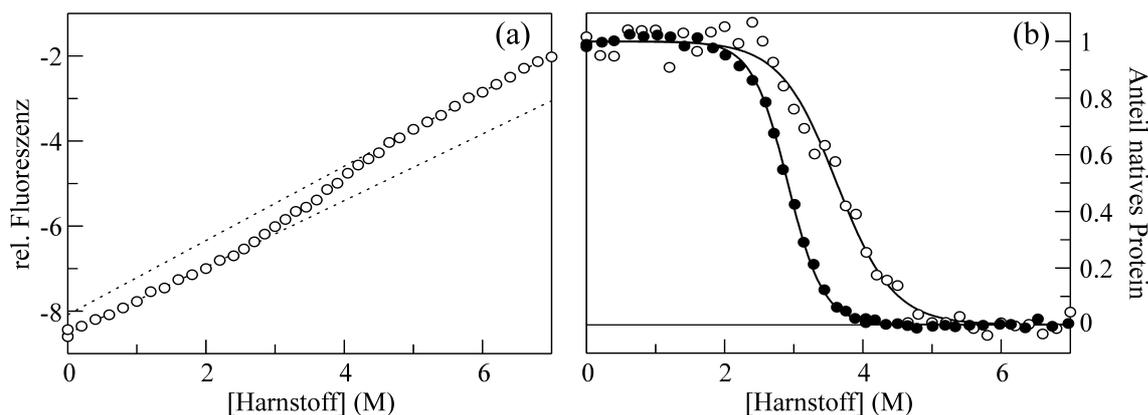
Umgebung hindeutet. Die Intensität dieses Kreuzsignals bleibt bei allen untersuchten Harnstoffkonzentrationen unverändert, was auf eine konstante Proteinkonzentration in Lösung und die Abwesenheit von höheren Aggregaten hindeutet. Da die NMR-Experimente im Vergleich zu den CD-Messungen bei wesentlich höheren Proteinkonzentrationen durchgeführt wurden und nur in ersteren das Intermediat beobachtet werden konnte, besteht die Möglichkeit, dass es sich um ein dimeres oder oligomeres Intermediat handelt. In den konventionellen HSQC-Spektren wurden allerdings nur scharfe Signale für das Intermediat gefunden, was gegen ein höhermolekulares Intermediat spricht. Zusätzlich wurde ein Harnstoff-induzierter Entfaltungsübergang von p19<sup>INK4d</sup> mit NMR-Diffusionsexperimenten verfolgt. Wie schon in 2.5.2 und 3.1.4 beschrieben ist es mit diesen Diffusionsmessungen möglich, den hydrodynamischen Radius ( $R_H$ ) eines Proteins zu bestimmen. Um ein besseres Signal/Rausch-Verhältnis zu erreichen, wurde p19<sup>INK4d</sup> in <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O gelöst. Als niedermolekulare Referenz mit bekanntem hydrodynamischem Radius wurde auch hier Dioxan eingesetzt. Für das native und entfaltete p19<sup>INK4d</sup> wurde ein  $R_H$  von 21.5 Å bzw. 39.2 Å bestimmt. Die Integration der Signale im Methylgruppenbereich (2.4 ppm bis 0.4 ppm) sowie im Bereich der Aromaten (6.8 ppm bis 8.1 ppm) ergeben äquivalente Resultate. Diese stimmen ebenfalls sehr gut mit den mit Hilfe der Eichgeraden aus Wilkins *et al.* (Gl. 34, Gl. 35) vorhergesagten  $R_H$  von 21 Å bzw. 41.1 Å überein (Wilkins, *et al.*, 1999).



**Abb. 87:** Gemittelter hydrodynamischer Radius von p19<sup>INK4d</sup> bei verschiedenen Harnstoffkonzentrationen in 20 mM Na-phosphat, 25 mM NaCl, 25 mM KCl p<sup>2</sup>H 7.4 bei 25 °C. Der p<sup>2</sup>H wurde mit p<sup>2</sup>H = pH<sub>abgelesen</sub> + 0.4 korrigiert.  $R_H$  wurde mit den relativen Diffusionskonstanten ( $d_{\text{prot}}$ ,  $d_{\text{diox}}$ ) wie in 2.5.2 beschrieben bestimmt.

In Abb. 87 ist der gemittelte  $R_H$  als Funktion der Harnstoffabhängigkeit dargestellt, da eine unabhängige Bestimmung des  $R_H$  des nativen und entfaltenen Zustands nicht möglich ist. Dazu müssten nicht überlagerte und gut aufgelöste Resonanzen des jeweiligen Zustands integriert werden, was aber aufgrund des zu geringen Signal/Rausch-Verhältnisses keine

verlässlichen Resultate ergeben würde. Der gemittelte  $R_H$  spiegelt das Verhältnis der verschiedenen Konformationen wider, wobei der Übergangsmittelpunkt bei 3.2 M Harnstoff liegt und dem Mittelpunkt des CD-detektierten Übergangs in  $^2\text{H}_2\text{O}$  (Abb. 82a) entspricht. Da der Übergang in Abb. 87 ebenfalls nur einstufig ist und der  $R_H$  im gesamten Harnstoffkonzentrationsbereich zwischen dem  $R_H$  des nativen und entfalteten p19<sup>INK4d</sup> liegt, kann das Vorliegen eines dimeren oder oligomeren Intermediats ausgeschlossen werden und der  $R_H$  des Gleichgewichtsintermediats entspricht eher dem  $R_H$  des entfalteten Zustands.

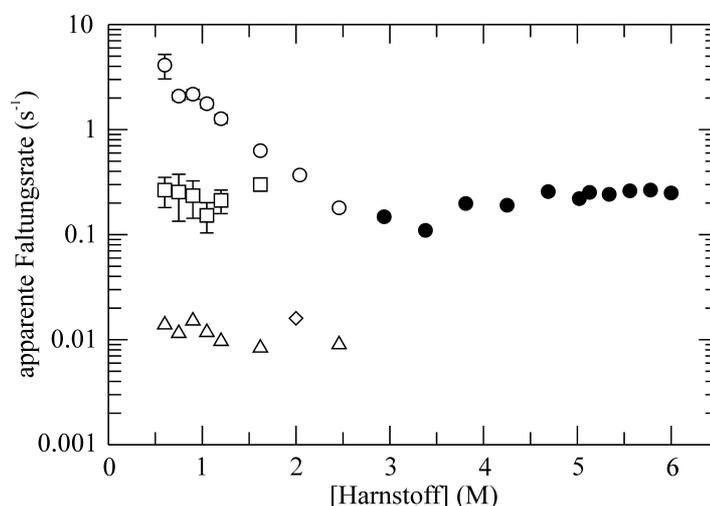


**Abb. 88:** Beobachtung der Harnstoff-induzierten Entfaltung von 2.5  $\mu\text{M}$  p19<sup>INK4d</sup> in Gegenwart von 25  $\mu\text{M}$  ANS in 20 mM Na-phosphat pH 7.4 bei 15 °C. (a) Zunahme der ANS-Fluoreszenz durch die Exposition hydrophober Oberflächen. Nach einer Anregung bei 360 nm (5 nm Bandbreite) erfolgte die Aufnahme von Fluoreszenzemissionsspektren zwischen 440 nm und 540 nm (10 nm Bandbreite). Im Bereich der maximalen Differenz zwischen der Fluoreszenz des nativen und entfalteten p19<sup>INK4d</sup> zwischen 460 nm und 480 nm wurde die Fluoreszenzintensität integriert und von der Pufferfluoreszenz subtrahiert. Die Basislinien sind mit gestrichelten Linien wiedergegeben. (b) Normierte Auftragung des Entfaltungsübergangs der identischen Proben unter Detektion mit (○) ANS-Fluoreszenz und (●) CD-Spektroskopie bei 222 nm.

Die Charakterisierung von Intermediaten kann auch über externe Sonden erfolgen. Der fluoreszierende Farbstoff 1-Anilino-8-naphthalin-sulfonsäure (ANS) bindet spezifisch an hydrophobe Oberflächen von Proteinen und verändert dabei seine Fluoreszenzeigenschaften. Daher ist es möglich, die Exposition von hydrophoben Aminosäuren bei der Entfaltung zu untersuchen (Abb. 88). Der Harnstoff-induzierte Entfaltungsübergang folgt dem Übergang der mit Hilfe der Kreuzsignale des entfalteten Proteins beobachtet wurde, wobei der Übergangsmittelpunkt bei 3.6 M Harnstoff liegt. Das bedeutet, dass ANS schwächer an das Intermediat als an den entfalteten Zustand bindet und somit vermutlich weniger exponierte hydrophobe Oberfläche besitzt. Die Kooperativität des ANS-detektierten Übergangs ist ebenso geringer als diejenige, die mit den Übergängen der Kreuzsignale des nativen Zustands (Abb. 84) bzw. als die mit den optischen Methoden (Abb. 81) erhalten wurde. Diese Ergebnisse stellen einen weiteren Hinweis für die Existenz eines dritten Zustands dar.

### 3.5.3 Kinetische Experimente: CD-stopped flow und Echtzeit NMR-Spektroskopie

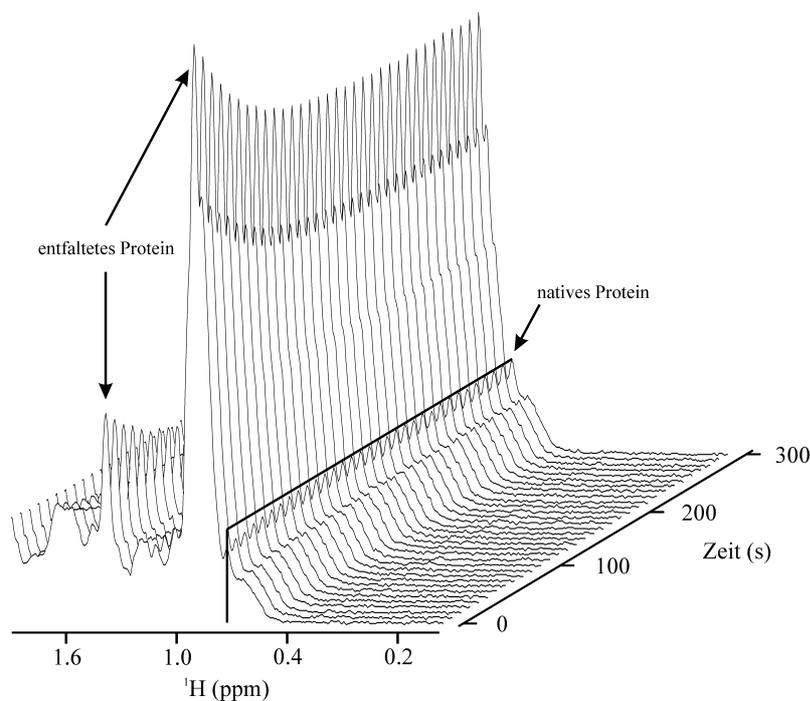
Neben der thermodynamischen Stabilität ist die Faltungskinetik von ebenso zentraler Bedeutung für die Charakterisierung eines Proteins. Da p19<sup>INK4d</sup> außer vier Phenylalaninen keine Aminosäuren mit aromatischen Seitenketten enthält wurden die schnellen Faltungskinetiken mit Fern-UV CD-Spektroskopie in einer *stopped-flow* Apparatur beobachtet. Die geringe Sensitivität und das schlechte Signal/Rausch-Verhältnis bei diesen Experimenten wurde durch die hohe Proteinkonzentration von 10  $\mu\text{M}$  p19<sup>INK4d</sup> verbessert. In Abb. 89 ist die sog. Chevron-Auftragung, d.h. die Harnstoffabhängigkeit der apparenten Faltungsraten von p19<sup>INK4d</sup> gezeigt. Die Experimente konnten freundlicherweise im Labor von Prof. C.M. Dobson (Oxford Center of Molecular Science, Oxford, U.K.) an einer *stopped-flow* Apparatur der Firma Bio-Logic durchgeführt werden (Zeeb, *et al.*, 2002).



**Abb. 89:** Chevron-Auftragung der apparenten Faltungsraten von p19<sup>INK4d</sup> in 20 mM Na-phosphat pH 7.5 bei 15 °C. Die (○) schnellen bzw. (□) langsamen Rückfaltungsraten ( $k_{f1}$  bzw.  $k_{f2}$ ) sowie die (●) Entfaltungsraten ( $k_u$ ) wurden in einer *stopped-flow* Apparatur mit dem CD-Signal bei 225 nm bestimmt. Die (△) sehr langsame Rückfaltungsrate ( $k_{f3}$ ) wurde mit Handmischungsexperimenten ermittelt. (◇) ist das Ergebnis des Echtzeit NMR-Experiments während der Rückfaltung von p19<sup>INK4d</sup> (Abb. 90 und Abb. 91).

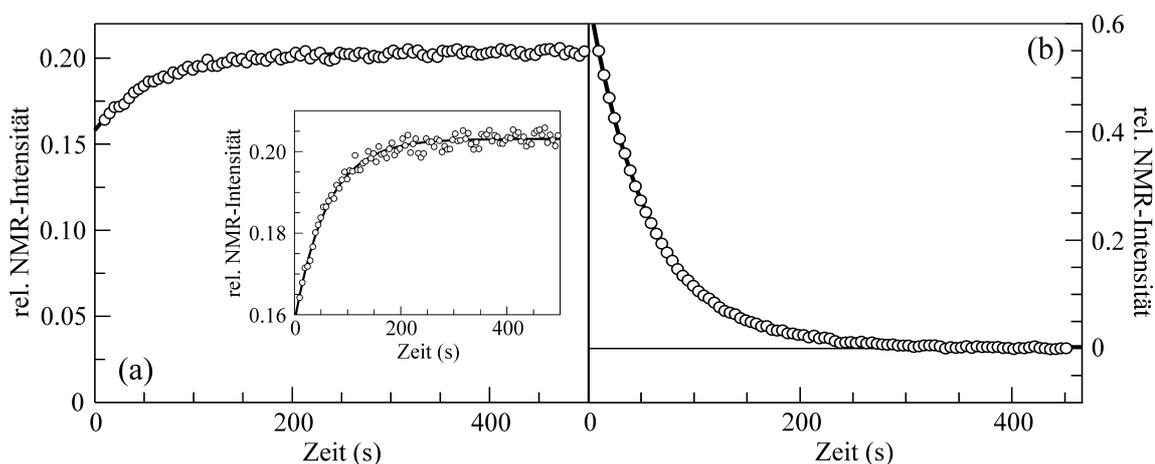
Die Entfaltung von p19<sup>INK4d</sup> zwischen 2.8 M und 6 M Harnstoff zeigt ein ansteigendes CD-Signal bei 225 nm und verläuft einphasig. Daher können die Kinetiken mit einer einfachen Exponentialfunktion angepasst und die Entfaltungsraten ( $k_u$ ) bestimmt werden. Die Abhängigkeit von  $\ln k_u$  ist näherungsweise linear. Die Rückfaltung von p19<sup>INK4d</sup> stellt sich jedoch wesentlich komplizierter dar. So werden in der *stopped-flow* Apparatur bei Harnstoffkonzentrationen zwischen 0.5 M und 1.8 M zwei Rückfaltungsphasen detektiert, was eine Angleich der Kinetiken mit einer Summe von zwei Exponentialfunktionen notwendig macht. Die Rückfaltungsrate der langsamen Phase ( $k_{f2}$ ) ist nahezu unabhängig von der Harnstoffkonzentration, während  $\ln k_{f1}$  mit steigender Harnstoffkonzentration linear

abnimmt. Mit Handmischungsexperimenten konnte eine dritte sehr langsame Phase während der Rückfaltung von p19<sup>INK4d</sup> detektiert werden. Diese Kinetiken können wiederum mit einer einfachen Exponentialfunktion angepasst werden, da die beiden schnelleren Phasen in der Totzeit der Handmischung beendet sind. Die Rückfaltungsrate ( $k_{f3}$ ) ist unabhängig von der Harnstoffkonzentration und die relativen Amplituden der drei Rückfaltungsphasen betragen 79% bzw. 14% sowie 7% für die schnelle, langsame bzw. sehr langsame Phase. Letztere liegt im charakteristischen Zeitbereich der *cis/trans* Isomerisierung von Peptidyl-Prolylbindungen. Daher wurde 3  $\mu\text{M}$  p19<sup>INK4d</sup> in Gegenwart einer äquimolaren Konzentration der cytosolischen Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase Cyclophilin 18 aus *E. coli* rückgefaltet. Die Harnstoffkonzentration betrug 0.5 M, so dass Cyclophilin 18 noch eine Restaktivität von ca. 70% besitzt (persönliche Mitteilung von R. Maier). Die langsamste Rückfaltungsphase konnte um den Faktor 3 beschleunigt werden woraus sich schließen lässt, dass diese Rückfaltungsphase von p19<sup>INK4d</sup> durch eine Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung verursacht wird (Zeeb, *et al.*, 2002). Ein zusätzliches Merkmal für solch eine Isomerisierung ist die Unabhängigkeit der Rate von der Denaturierungsmittelkonzentration, was für  $k_{f3}$  ebenfalls zutrifft. In der Kristallstruktur von p19<sup>INK4d</sup> liegen alle sieben Prolinreste in einer *trans*-Peptidbindung vor (Baumgartner, *et al.*, 1998a).



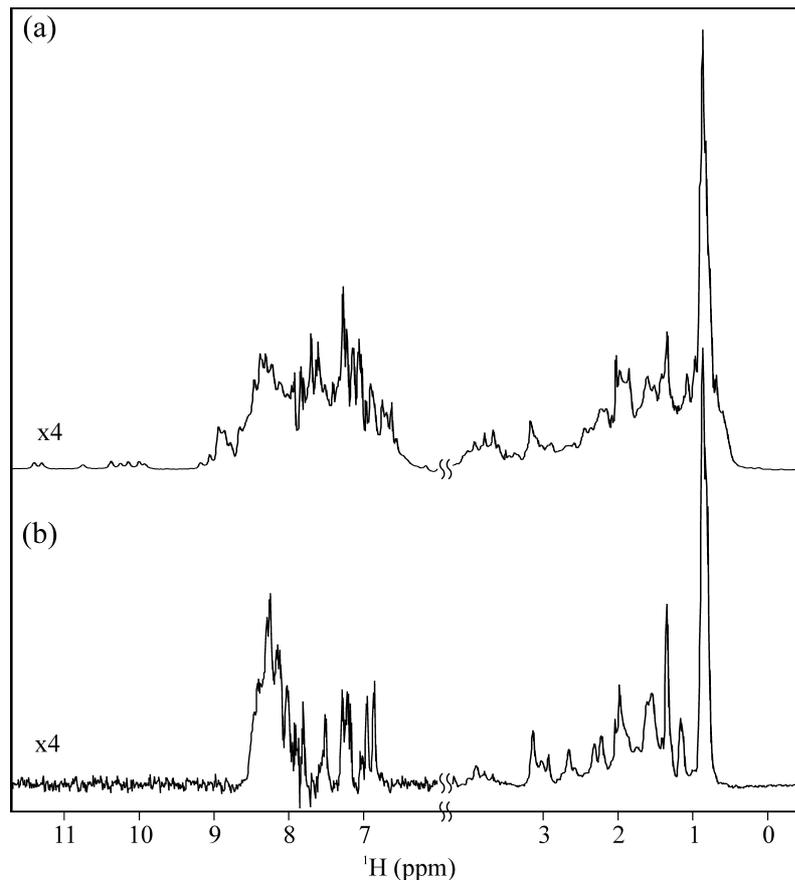
**Abb. 90:** *Stacked-Plot* der Hochfeldregion des 1D <sup>1</sup>H NMR-Spektrums bei verschiedenen Zeiten während der Rückfaltung von p19<sup>INK4d</sup> in 50 mM Na-phosphat, 2 M Harnstoff pH 7.4 (10% <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O) bei 15 °C. Die Rückfaltung wurde durch eine 10fache Verdünnung von entfaltetem p19<sup>INK4d</sup> in 6 M Harnstoff initiiert. Jedes dargestellte Spektrum stellt die Mittelung von zwei aufeinander folgenden Spektren mit je 4 *scans* dar. Die hervorgehobenen Resonanzen wurden zur Bestimmung der Faltungsraten herangezogen (Abb. 91).

Die langsamste Phase der Rückfaltung von p19<sup>INK4d</sup> liegt in einem Zeitbereich, der für eindimensionale Echtzeit NMR-Spektroskopie zugänglich ist. Daher wurde durch eine schnelle 10fache Verdünnung von 50 µl entfaltetem p19<sup>INK4d</sup> (in 6 M Harnstoff) mit 450 µl Rückfaltungspuffer die Rückfaltung innerhalb des NMR-Spektrometers initiiert (2.5.7) und eine Folge von 100 1D <sup>1</sup>H NMR-Experimenten aufgezeichnet. Aufgrund der hohen Proteinkonzentration (0.7 mM) kann es bei niedrigen Denaturierungsmittelkonzentrationen zur teilweisen Aggregation des Proteins kommen. Um dies zu vermeiden wurde bei 15 °C eine Harnstoffkonzentration von 2 M gewählt, da p19<sup>INK4d</sup> dort noch in der Basislinie des nativen Proteins im Harnstoff-induzierten Entfaltungsübergang vorliegt (Abb. 81). Ein Ausschnitt des 1D <sup>1</sup>H NMR-Spektrums im Aliphatenbereich zu verschiedenen Zeiten während der Rückfaltung ist in Abb. 90 gezeigt. Die schnelle und langsame Rückfaltungsphase kann aufgrund der Totzeit des Echtzeit NMR-Experiments von ca. 1 s nicht beobachtet werden. Diese beiden Phasen ergeben natives p19<sup>INK4d</sup> (*burst*-Phase, 83% des Gesamtproteins), wodurch das erste 1D <sup>1</sup>H NMR-Spektrum nach 10 s schon vom Spektrum des nativen Proteins dominiert wird. Die Rückfaltung der verbleibenden 17% des Gesamtproteins ist durch die Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung verlangsamt. Die Zunahme der Population des nativen Proteins kann durch den Intensitätsverlauf des hochfeldverschobenen Signals bei 0.7 ppm verfolgt werden, während das Absinken der Population des entfaltenen Zustands an der Intensität der Signale bei 0.9 ppm oder 1.45 ppm beobachtbar ist (Abb. 90).



**Abb. 91:** Faltungskinetik von p19<sup>INK4d</sup>, die aus dem 1D Echtzeit NMR-Experiment extrahiert wurden. (a) Intensitätsverlauf des Signals bei 0.70 ppm, das den Aufbau des nativen Proteins widerspiegelt. Die beiden schnelleren Rückfaltungsphasen ( $k_{f1}$ ,  $k_{f2}$ ) ergeben in der Totzeit des Experiments natives Protein und führen zu einem sog. *burst* (83%). Die Anpassung (kontinuierliche Linie) an eine einfache Exponentialfunktion ergibt eine Rate von  $0.017 \text{ s}^{-1}$ . Die Vergrößerung zeigt die identischen Daten mit einer weiter gespreizten Ordinate. (b) Abfall der Intensität des Spektrums des entfaltenen Proteins. Vor der Integration des Signals zwischen 0.78 ppm und 0.90 ppm wurde entsprechend der Rückfaltungskinetik der Beitrag des Spektrums des nativen Proteins vom Gesamtspektrum subtrahiert. Die Anpassung an eine Exponentialfunktion liefert eine Rate von  $0.018 \text{ s}^{-1}$ .

Alle 1D-Spektren können durch Linearkombination der zwei Komponenten aus Abb. 92 erhalten werden. Dabei zeigt Abb. 92a das Spektrum des nativen Proteins in 2 M Harnstoff, das dem Spektrum in Abwesenheit von Harnstoff sehr ähnelt. Abb. 92b enthält ein Spektrum mit einer geringen Dispersion, was für ein hauptsächlich entfaltetes Protein charakteristisch ist. Die Bestimmung der Rückfaltungsrate, d.h. die Zunahme der nativen Konformation, wird durch Integration von Signalen, die keine Überlappung mit Signalen des entfaltetes Zustands zeigen, wie z.B. die Amidprotonen oberhalb 8.5 ppm oder unterhalb 6.9 ppm, bewerkstelligt. Hier wurde das Signal aliphatischer Seitenkettenprotonen bei 0.7 ppm verwendet und in Abb. 91a dargestellt (Zeeb, *et al.*, 2002). Die ermittelte Rate von  $0.017 \text{ s}^{-1}$  entspricht der mit CD-Spektroskopie bestimmten Rate. Dies zeigt, dass trotz der unterschiedlichen Ergebnisse in den Gleichgewichtsexperimenten zwischen NMR- und CD-Spektroskopie, die sehr langsame Faltungsrate über den gesamten Proteinkonzentrationsbereich ( $\mu\text{M}$  bis  $\text{mM}$ ) vorhanden und unabhängig von der Proteinkonzentration ist. Weiter folgt daraus, dass die Bildung der Sekundär- und Tertiärstruktur während der langsamsten Phase kooperativ verläuft.



**Abb. 92:** Hoch- und Tieffeldregion der beiden Beiträge zum 1D  $^1\text{H}$  NMR-Spektrum während der Rückfaltung von p19<sup>INK4d</sup> im Echtzeit NMR-Experiment. (a) Beitrag des Spektrums von nativem p19<sup>INK4d</sup>, das nach dem Rückfaltungsexperiment in Gegenwart von 2 M Harnstoff bei 15 °C aufgezeichnet wurde. (b) 1D  $^1\text{H}$  NMR-Spektrum der größtenteils entfaltetes Komponente. Dazu wurde das Spektrum des nativen Zustands entsprechend der Rückfaltungskinetik subtrahiert und die Spektren der ersten 50 s der Rückfaltung gemittelt.

Um nun den Abbau des entfalteten Proteins analysieren zu können, wird der Anteil des 1D <sup>1</sup>H NMR-Spektrums des nativen Proteins (Abb. 92a) entsprechend der Rückfaltungskinetik von jedem Gesamtspektrum subtrahiert. Das verbleibende Spektrum ist in Abb. 92b gezeigt und entspricht dem Spektrum des entfalteten p19<sup>INK4d</sup>. Dieses trägt zu 17% zum ersten 1D <sup>1</sup>H NMR-Spektrum nach der Initiation der Rückfaltung bei. Das Spektrum des nativen p19<sup>INK4d</sup> besitzt im Vergleich zum Spektrum des entfalteten Proteins eine gute Dispersion vorallem im Bereich der Amidprotonen (6.5 ppm bis 11.3 ppm im nativen bzw. 6.9 ppm bis 8.5 ppm im entfalteten Protein) und der hochfeldverschobenen Methylgruppen. Die Anpassung des Intensitätsverlaufs des entfalteten Zustands liefert eine Rate von 0.018 s<sup>-1</sup> (Abb. 91b). Das bedeutet, dass der native Zustand ebenso schnell gebildet wird wie der entfaltete Zustand verloren geht. Die sehr langsame Phase geht also von einem unstrukturierten Zustand aus und bildet über einen Faltungsweg, der vermutlich parallel zu den beiden schnelleren Phasen verläuft, natives p19<sup>INK4d</sup>.

### 3.5.4 Weiterführende Arbeiten

Die Aufklärung des Faltungsmechanismus von p19<sup>INK4d</sup> war das Ziel von zwei Diplomarbeiten in unserer Gruppe und wird Thema einer zukünftigen Doktorarbeit sein. Da die spektroskopischen Eigenschaften von p19<sup>INK4d</sup> durch das Fehlen von Tryptophan- bzw. Tyrosinresten sehr eingeschränkt ist, wurden mit sequenzspezifischer Mutagenese diese Chromophore in p19<sup>INK4d</sup> eingebracht und die daraus resultierenden Proteinvarianten eingehend charakterisiert. Bis jetzt konnten die Proteinvarianten L32W, F41W, F86W und F125W (Rösner, 2002) sowie F51Y, F86Y, H96W, H96W/Δ140-160, H96Y, H119W, Q148W und I157W (Löw, 2003) analysiert werden. Alle p19<sup>INK4d</sup>-Varianten außer der verkürzten Variante H96W/Δ140-160 zeigen eine sehr ähnliche Stabilität in thermischen und Harnstoff-induzierten Entfaltungsübergängen im Vergleich zum Wildtypprotein. Durch die Einführung von Trp-Resten konnten die Faltungskinetiken mittels *stopped flow* Fluoreszenzspektroskopie verfolgt werden, deren Sensitivität wesentlich höher ist als die zur Analyse von p19<sup>INK4d</sup> verwendete *stopped flow* CD-Spektroskopie. Daher konnte eine zusätzliche schnelle Entfaltungsphase gefunden werden. Die beiden Varianten F86W und H96W zeigen sog. „overshoot“-Kinetiken, die einen deutlichen Hinweis für die Existenz eines Faltungsintermediats darstellen. Anhand von ersten Doppelmischungsexperimenten zeichnet sich ebenfalls ab, dass ein weiteres kinetisches Intermediat parallel zu der sehr langsam ablaufenden Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung existiert, welches auf einer wesentlich schnelleren Zeitskala zu nativem Protein führt (Löw, 2003, Rösner, 2002).

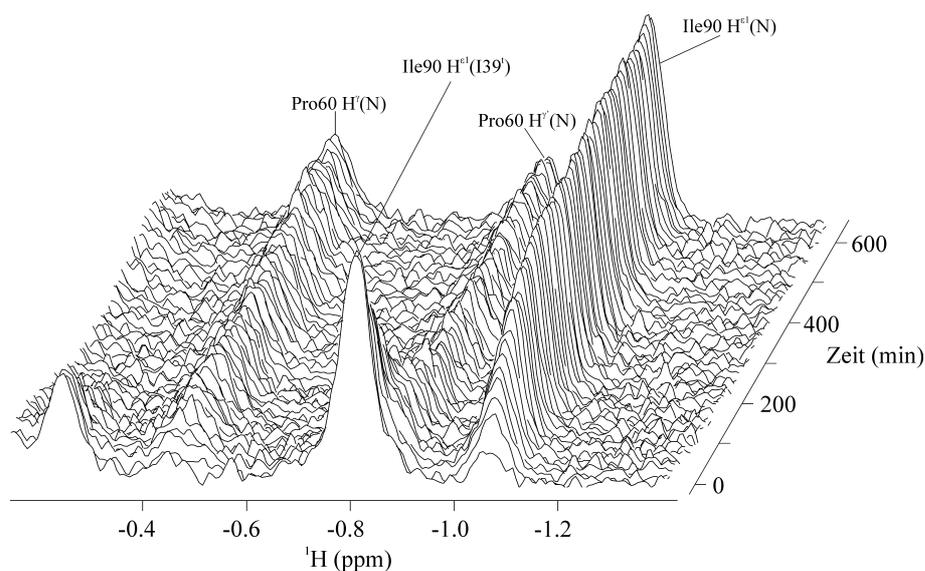
### 3.6 Echtzeit NMR-Spektroskopie zum Studium der langsamen Faltung von RNase T1

Die Faltung des Modellproteins RNase T1 aus *Aspergillus oryzae* stellt eines der am eingehendsten untersuchten Systeme dar. Wie in 1.6 bereits beschrieben wurde, besitzt das Wildtyp-Protein zwei *cis*-Peptidyl-Prolylbindungen, deren Isomerisierung zu einem komplexen Faltungsmechanismus führt (Abb. 6a), der mit Hilfe verschiedenster kinetischer Experimente aufgeklärt wurde. Dabei wurde als Sonde überwiegend Trp59 eingesetzt, das sich abgeschirmt vom Lösungsmittel im hydrophoben Kern befindet. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt stellt die *trans/cis*-Isomerisierung der Peptidbindung vor Pro39 dar, die sehr langsam erfolgt. Eine deutliche Vereinfachung der Rückfaltung von RNase T1 wurde durch ortsgerichtete Mutagenese erreicht, in dem die beiden Aminosäuren ausgetauscht wurden, die sich im nativen Protein in einer der beiden *cis*-Peptidyl-Prolylbindungen befinden (siehe 1.6). Die daraus resultierende Proteinvariante S54G/P55N RNase T1 wurde ebenfalls mit optischer Spektroskopie detailliert untersucht. Während der Rückfaltung dieser Variante wird hauptsächlich nur noch die sehr langsame *trans/cis*-Isomerisierung der Peptidbindung vor Pro39 beobachtet. Das Faltungsintermediat  $I^{39t}$  wird sehr schnell gebildet und reagiert nur sehr langsam zum nativen Zustand weiter (Abb. 6.b), was dieses Protein attraktiv zur Weiterentwicklung der Echtzeit NMR-Spektroskopie macht. Die sehr große Zeitkonstante der Rückfaltung von S54G/P55N RNase T1 erlaubt somit die strukturelle Charakterisierung des transienten Faltungsintermediats  $I^{39t}$  mit mehrdimensionaler Echtzeit NMR-Spektroskopie.

#### 3.6.1 Eindimensionale Echtzeit NMR-Spektroskopie mit S54G/P55N RNase T1

Die Rückfaltungskinetik von S54G/P55N RNase T1 wurde zunächst mit eindimensionaler Echtzeit NMR-Spektroskopie bei verschiedenen Temperaturen aufgezeichnet. Hierzu wurden 50  $\mu$ l einer 7 mM Proteinlösung in 6 M GdnDCI innerhalb des NMR-Röhrchens schnell mit 450  $\mu$ l Rückfaltungspuffer (10 mM Na-oxalat pH 5.0 in 100%  $D_2O$ ) verdünnt. Die Rückfaltungsreaktion wurde mit einer Serie von 512  $^1H$  1D-NMR Spektren für 650 min verfolgt. In Abb. 93 ist ein Ausschnitt aus 1D NMR-Spektrum von S54G/P55N RNase T1 im Hochfeldbereich während der Rückfaltung gezeigt bei 15 °C gezeigt. Die Dispersion der Resonanzsignale im ersten Spektrum nach der Initiation der Rückfaltung (über die ersten 80 s gemittelt) ist sehr hoch, so dass sich das langlebige Faltungsintermediat  $I^{39t}$  innerhalb der Mischzeit gebildet hat. Die langsame Umwandlung dieses Intermediats zum nativen Zustand ist an den Resonanzen der gut aufgelösten Methylgruppe von Ile18 (Ile18  $H^\delta$  bei -1.05 ppm)

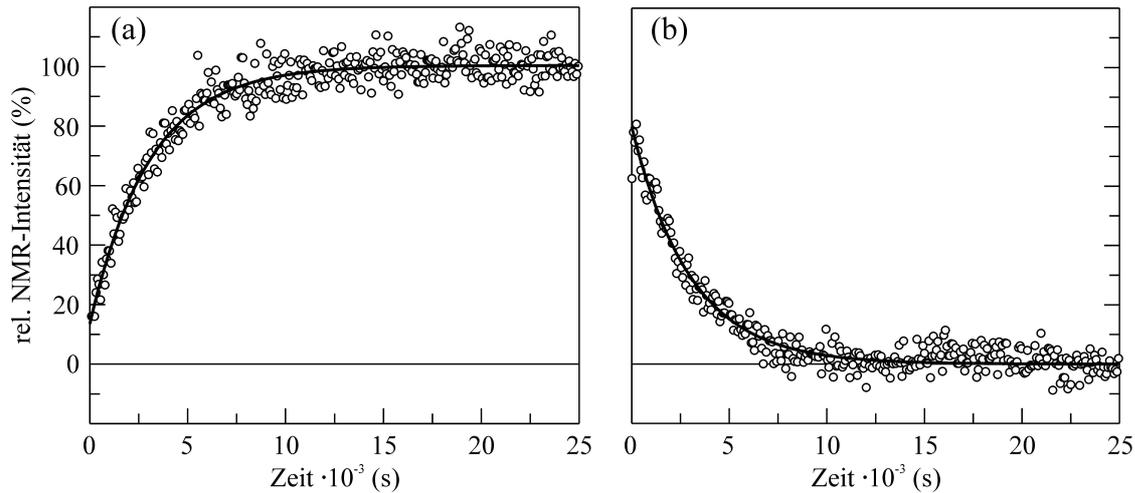
und von Pro60  $H^\gamma$  (-0.45 ppm) zu erkennen, deren Intensität mit zunehmender Rückfaltungsdauer ansteigt (Abb. 93). Diese beiden Reste befinden sich im Intermediat in einer nicht-nativen Konformation, so dass die Signale des nativen Zustands im Spektrum des Intermediats nicht vorhanden sind. Die geringe Intensität dieser Signale im ersten Spektrum nach der Rückfaltung ist auf das schon vorhandene native Protein zurückzuführen, welches von der schnell faltenden Spezies  $U^{39c}$  in der Totzeit des Experiments gebildet wurde. Andere Signale, die nur im Intermediat vorhanden sind, verlieren während der Rückfaltung an Intensität und verschwinden (z.B. Ile90 $H^\delta$  ( $I^{39t}$ ) oder die Resonanz bei -0.3 ppm in Abb. 93).



**Abb. 93:** Folge von 1D  $^1H$  NMR-Spektren von S54G/P55N RNase T1, die während der Rückfaltung an einem Bruker DRX500-Spektrometer bei 15 °C in  $^2H_2O$  aufgezeichnet wurden. (a) Hochfeldbereich mit der gut aufgelösten Resonanz von Ile90  $H^\delta$  in  $I^{39t}$  (-0.8 ppm, abfallende Intensität mit steigender Rückfaltungsdauer) bzw. im nativen Zustand (-1.05 ppm, ansteigende Intensität mit zunehmender Rückfaltungszeit). Die Reaktion wurde durch eine 10fache Verdünnung von 50  $\mu$ l 7 mM S54G/P55N RNase T1 in 10 mM Na-oxalat, 6 M GdmCl pH 5.0 mit 450  $\mu$ l Rückfaltungspuffer (10 mM Na-oxalat pH 5.0) im NMR-Röhrchen gestartet. Zur Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses wurden acht aufeinander folgende Spektren mit je 64 *scans* gemittelt. Die zeitliche Auslösung beträgt 10.2 min, da acht Spektren zur Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses gemittelt wurden.

Die Rückfaltungsrate ( $k_f$ ) bzw. die Zerfallsrate von  $I^{39t}$  ( $k_{-f}$ ) lässt sich mit Hilfe dieser Resonanz bestimmen, in dem über das jeweilige Signal integriert wird und die Daten mit einer einfachen Exponentialfunktion angepasst werden (Abb. 94). Zuerst wird die Rückfaltungsrate mit Hilfe der Resonanz des nativen Zustands bestimmt. Um die Zerfallsrate von  $I^{39t}$  berechnen zu können, muss zuerst der Beitrag des Signals von Pro60  $H^\gamma$  zum Gesamtsignal bestimmt werden, da dieses eine identische Resonanzfrequenz wie Ile90  $H^\delta$  ( $I^{39t}$ ) besitzt. Die Skalierung der Intensität des Gesamtsignals wird anhand der zuvor bestimmten Rückfaltungskinetik

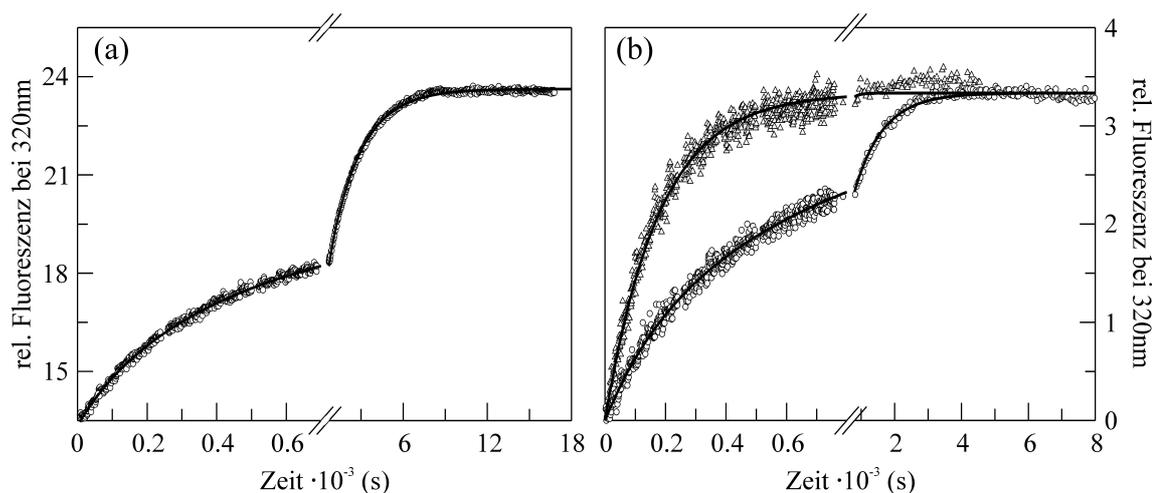
bewerkstelligt, wobei die Intensität des Signals von Pro60 H<sup>γ</sup> im vollständig nativen Zustand verwendet wurde. Der daraus resultierende Intensitätsverlauf wurde dann ebenfalls mit einer einfachen Exponentialfunktion angepasst. Für  $k_f$  und  $k_{-f}$  ergibt sich jeweils eine Rate von  $3.3 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ . Das bedeutet, dass I<sup>39t</sup> genauso schnell zerfällt wie der native Zustand gebildet wird. Die Anfangsintensität der nativen Resonanz beträgt 16%, was auf die in der Totzeit faltende U<sup>39c</sup>-Spezies zurückzuführen ist und etwa dem Gleichgewichtsverhältnis der *cis*- und *trans*-Peptidyl-Prolylbindung Y38-P39 von 20:80 entspricht.



**Abb. 94:** Rückfaltungskinetik von S54G/P55N RNase T1 bei 15 °C in 10 mM Na-oxalat, 0.6 M GdnDCl pH 5.0 in 100% <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O. (a) Relative NMR-Intensität von Ile90 H<sup>δ</sup> im nativen Zustand (Integration zwischen -1.17 ppm und -1.22 ppm). (b) Relative NMR-Intensität von Ile90 H<sup>δ</sup> im intermediären Zustand (Integration zwischen -0.80 ppm und -0.90 ppm), die um den Beitrag der Intensität von Pro60 H<sup>γ</sup> skaliert wurde. Die durchgezogene Linie stellt die Anpassung an eine einfache Exponentialfunktion mit *offset* dar und ergibt in beiden Fällen eine Rate von  $3.3 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ .

Eine äquivalente Rückfaltungsrate wird durch die Analyse der gut aufgelösten Resonanzen im Tieffeldbereich erhalten. Im aliphatischen Bereich ergibt sich jedoch eine doppelt exponentielle Rückfaltungskinetik mit einer zusätzlichen schnelleren Phase. Diese kann auf ein gering populierte weniger stabiles Intermediat (7%) zurückgeführt werden, welches vermutlich im intermediären Zustand eine zusätzliche *cis*-Prolylpeptidbindung vor Pro60 oder Pro73 enthält (siehe 1.6). Beide liegen jedoch im nativen Zustand in *trans* vor. Eine ausführliche Diskussion und das rekonstruierte 1D-Spektrum dieses wenig populierte Intermediats, das einen hauptsächlich unstrukturierten Charakter aufweist, ist in Balbach *et al.* zu finden (Balbach, *et al.*, 1999). Eine zweiphasige Rückfaltungskinetik ist ebenfalls bei Handmischungsexperimenten mit Fluoreszenzdetektion vorhanden (Abb. 95a). Die langsame Rate ( $4.0 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ) stimmt sehr gut mit derjenigen überein, die mit dem 1D Echtzeit NMR-Experiment ermittelt wurde. Der Nachweis, dass es sich bei der langsamen Bildung der

nativen Struktur um eine *trans/cis*-Isomerisierung einer Prolylpeptidbindung handelt wurde in Gegenwart der spezifischen Peptidyl-Prolylisomerase SlyD aus *E. coli* eine Rückfaltungsreaktion initiiert (Abb. 95b). Die zehnfache Beschleunigung der langsamen Phase bestätigt die Existenz der Isomerisierung im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt. Erste 1D-Echtzeit NMR Experimente während der Rückfaltung von S54G/P55N RNase T1 in Gegenwart von SlyD zeigen ebenfalls eine Beschleunigung der Rückfaltung und die Änderung der chemischen Verschiebung einiger Resonanzsignale des Intermediats I<sup>39t</sup>, welche auf eine Bindung der Isomerase hindeuten (Hagn, 2003).



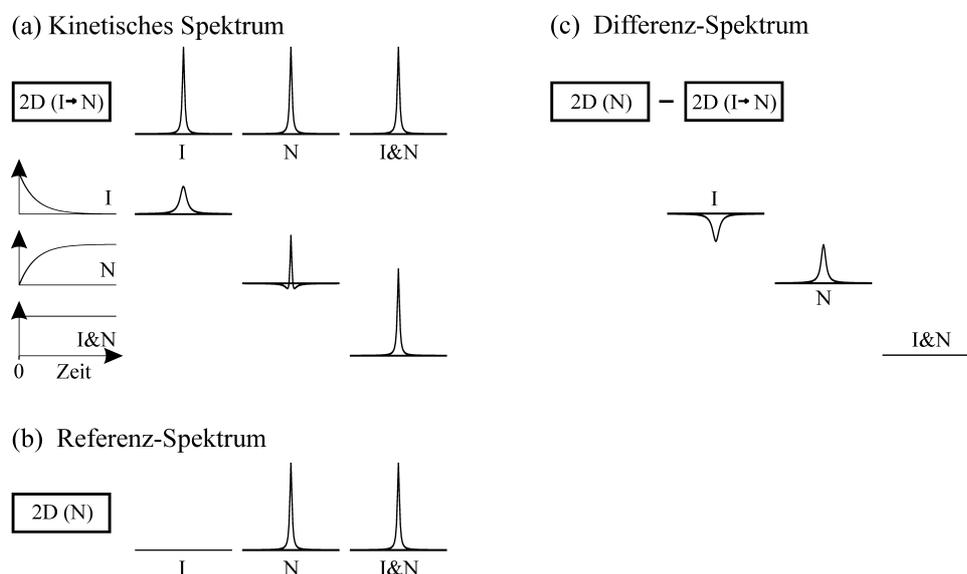
**Abb. 95:** Rückfaltung von S54G/P55N RNase T1 in 10 mM Na-oxalat, 0.6 M GdmCl pH 5.0. Die Kinetiken wurden mittels Fluoreszenzspektroskopie beobachtet, wobei die Anregung bei 268 nm (Bandbreite 1.5 nm) und die Detektion bei 320 nm (Bandbreite in (a) bzw. (b) 10 nm bzw. 5 nm) erfolgte. Die durchgezogenen Linien stellten die Anpassung an eine mono- oder biexponentielle Funktion mit *offset* dar. (a) Die Rückfaltung wurde bei 15 °C durchgeführt, wobei die Proteinendkonzentration 0.15 μM betrug. Die ermittelten Rückfaltungsraten liegen bei  $4.0 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  und  $2.8 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ . (b) Die Rückfaltung wurde bei 10 °C und einer Proteinendkonzentration von 0.1 μM in (Δ) An- bzw. (○) Abwesenheit der spezifischen PPIase SlyD aus *E. coli* durchgeführt. Die Rückfaltungsraten betragen in Abwesenheit von SlyD  $1.2 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  und  $5.8 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ . In Anwesenheit von SlyD konnte aufgrund der Beschleunigung beider Phasen nur noch eine Rate von  $5.6 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  detektiert werden, welche bei der unkatalysierten Reaktion die langsamere Phase darstellt. Die schnellere Phase wird so stark beschleunigt, dass diese in der Totzeit des Handmischungsexperiments abgeschlossen ist.

### 3.6.2 Zweidimensionale Echtzeit NMR-Spektroskopie mit S54G/P55N RNase T1

In 3.6.1 wurde gezeigt, dass die Faltungsreaktion von S54G/P55N RNase T1 ein geeignetes System zur Beobachtung mittels Echtzeit NMR-Spektroskopie darstellt. Der größte Nachteil der 1D  $^1\text{H}$  NMR-Spektroskopie liegt in der geringen Auflösung und der starken Überlagerung von Signalen, so dass, bis auf wenige Ausnahmen gut aufgelöster Resonanzen (Abb. 94), nur eine globale Analyse der 1D-Spektren möglich ist. Aufgrund der sehr langsamen Rückfaltung von S54G/P55N RNase T1 besteht die Möglichkeit auch zweidimensionale NMR-Experimente während der Reaktion aufzuzeichnen. Prinzipiell gibt es zwei unterschiedliche Vorgehensweisen. Zum einen kann, wie bei eindimensionalen Echtzeit NMR-Experimenten, eine Serie von einzelnen 2D NMR-Experimenten gemessen werden, in denen dann Kreuzsignale des nativen Zustands an Intensität gewinnen und Kreuzsignale des Faltungsintermediats verschwinden. Dies wurde für die Rückfaltung dieser RNase T1-Variante mit einer Reihe von 128 schnellen 2D  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HMQC-Experimenten bewerkstelligt und in Steegborn *et al.* ausführlich beschrieben (Steegborn, *et al.*, 2000). Die andere Möglichkeit besteht darin, während des Rückfaltungsexperiments lediglich ein 2D NMR-Spektrum aufzuzeichnen (Balbach, *et al.*, 1996). Für S54G/P55N RNase T1 wurde die Rückfaltung schon mit einem homonuklearen 2D NOESY-Spektrum beobachtet (Balbach, *et al.*, 1999). Damit konnten anhand der chemischen Verschiebungen der einzelnen Protonen und der vorhandenen NOE-Kreuzsignale die Bereiche innerhalb des Faltungsintermediats bestimmt werden, die schon in der nativen Tertiärstruktur vorliegen, sowie Bereiche, die eine noch-nicht-native Konformation in  $I^{39t}$  einnehmen.

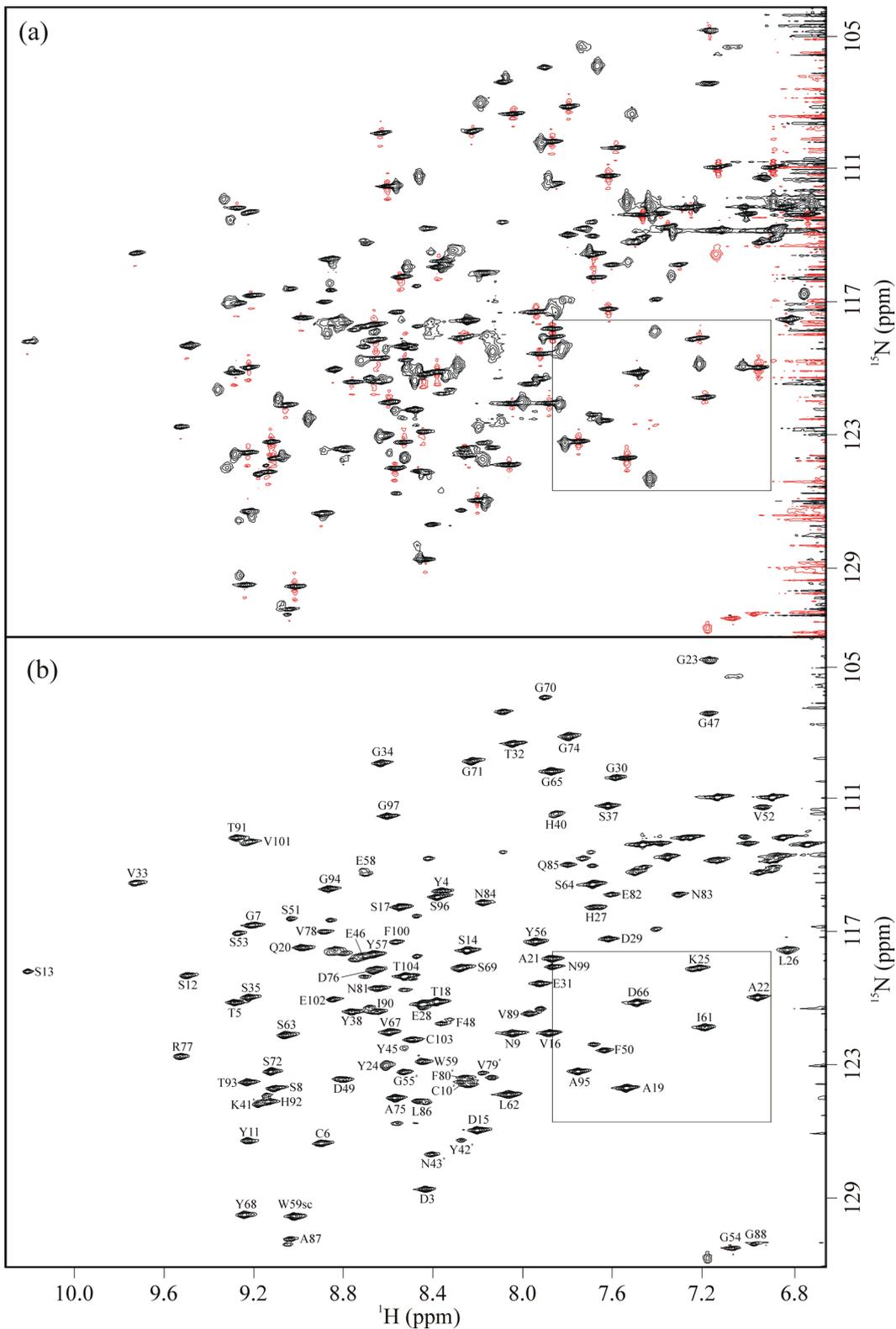
Im Gegensatz zu der oben erwähnten Aufzeichnung vieler Einzelerperimente und Analyse der Intensitäten der einzelnen Kreuzsignale, schlägt sich die Rückfaltungskinetik bei der Aufnahme eines einzelnen Experiments nicht nur in der Intensität sondern auch in der Linienform des Resonanzsignals nieder. Dabei können drei mögliche Linienformen in der indirekten Dimension unterschieden werden, deren mathematische Beschreibung in 2.5.8 und deren grafische Verdeutlichung in Abb. 96 gegeben ist. Die Linienform beinhaltet die Information über die Zeitabhängigkeit der jeweiligen Spezies. (i) Kreuzsignale, die eine charakteristische chemische Verschiebung im Faltungsintermediat besitzen und die sich von der chemischen Verschiebung im nativen Zustand unterscheidet, erfahren eine Signalverbreiterung mit der ein Intensitätsverlust einhergeht. (ii) Kreuzsignale, deren chemische Verschiebung sich im nativen Zustand und im Faltungsintermediat nicht unterscheiden zeigen scharfe Linien mit unveränderter Intensität. (iii) Kreuzsignale, die eine charakteristische chemische Verschiebung im nativen Zustand besitzen und die verschieden

von der chemischen Verschiebung im Intermediat ist, ergeben eine spezielle Linienform, die sich durch zwei negative Flanken auszeichnet (Abb. 96a). Durch Simulation dieser Linienform ist die Berechnung der Rückfaltungsrate möglich (siehe Gl. 55 bis Gl. 58 in 2.5.8). Um diese Analyse durchführen zu können wird neben dem kinetischen Experiment noch ein Referenz-Experiment des nativen Zustands benötigt (Abb. 96b). Durch Differenzbildung dieser beiden Spektren ist es dann schnell möglich, die Kreuzsignale der jeweiligen Spezies zuzuordnen. So ergeben sich für Kreuzsignale mit unterschiedlicher chemischer Verschiebung im Intermediat und nativen Zustand Kreuzsignale mit negativen bzw. positiven Intensitäten. Die Intensitäten von Kreuzsignalen, deren chemische Verschiebung im Intermediat und nativen Zustand identisch ist, löschen sich aus (Abb. 96c).



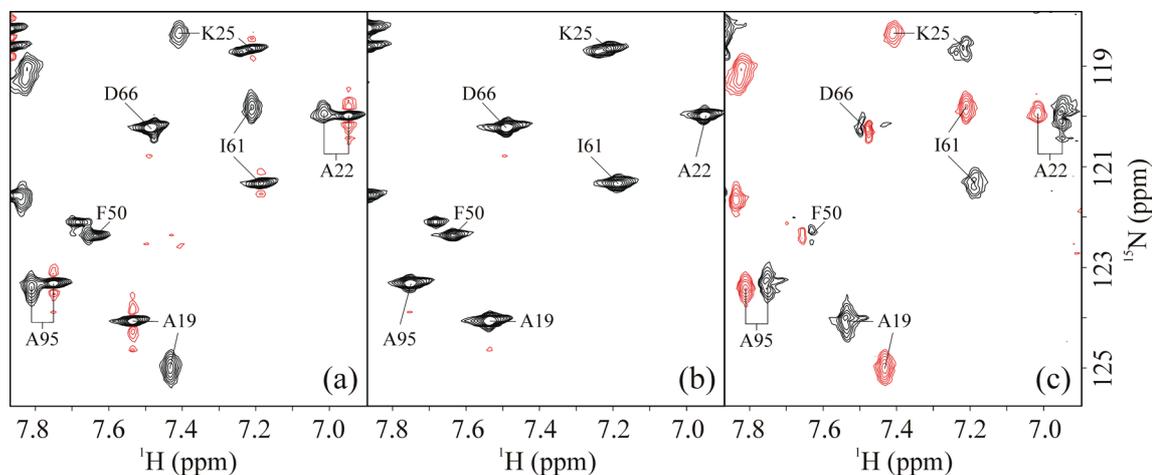
**Abb. 96:** Schematische Darstellung der Linienform und der Intensität von Signalen in der indirekten Dimension. (a) Kinetisches Spektrum, das während der Rückfaltung eines Proteins aufgezeichnet wurde. (b) Referenz-Spektrum, das nach der vollständigen Rückfaltung des Proteins unter identischen Bedingungen gemessen wurde. (c) Differenz-Spektrum, das durch Subtraktion des kinetischen vom Referenz-Spektrum erhalten wurde.

Hier wurde nun ein 2D  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  HSQC während der Rückfaltung von S54G/P55N RNase T1 bei 15 °C aufgezeichnet. Das Experiment dauerte 12 h 38 min, wobei 384 Inkremente in der indirekten Dimension gemessen wurden. Die Initiation der Rückfaltung erfolgte ebenfalls im NMR-Röhrchen durch schnelle Verdünnung von 50  $\mu\text{l}$  7 mM  $^{15}\text{N}$ -S54G/P55N RNase T1 in 10 mM Na-oxalat, 6 M GdmCl pH 5.0 in 450  $\mu\text{l}$  Rückfaltungspuffer (10 mM Na-oxalat pH 5.0, 10%  $^2\text{H}_2\text{O}$ ). Nach der vollständigen Rückfaltung des Proteins wurde dann das Referenz-Spektrum der nativen S54G/P55N RNase T1 aufgezeichnet. Beide Spektren sind in Abb. 97 dargestellt. Die Zuordnung des nativen Zustands ist im Referenz-Spektrum angegeben (Abb. 97b)



**Abb. 97:** 2D  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  HSQC-Spektren von S54G/P55N RNase T1 in 10 mM Na-oxalat, 0,6 M GdmCl pH 5.0 bei 15 °C und 800 MHz. Das Rechteck zeigt den Bereich des Spektrums, der in Abb. 98 vergrößert dargestellt wurde. (a) Kinetisches Spektrum, das während der Rückfaltung aufgezeichnet wurde. Positive Intensitäten sind in schwarz und negative Intensitäten sind in rot dargestellt. (b) Referenz-Spektrum des nativen Proteins unter identischen Bedingungen wie (a) nach der vollständigen Rückfaltung. Die Zuordnung der Kreuzsignale ist angegeben.

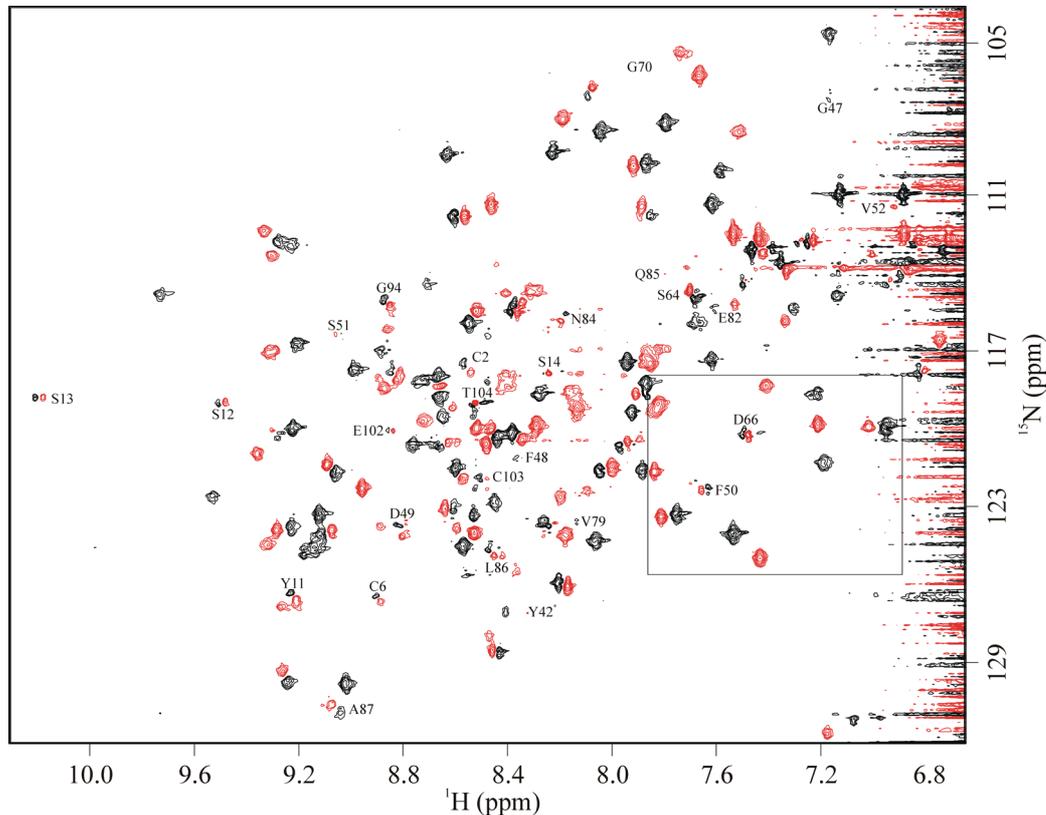
Im kinetischen Spektrum (Abb. 97a), das während der Rückfaltung von S54G/P55N RNase T1 aufgenommen wurde, sind die zuvor theoretisch beschriebenen Linienformen (Abb. 96) zu finden. Die Vergrößerung des angegebenen Ausschnitts der 2D  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  HSQC-Spektren verdeutlicht dies und ist in Abb. 98 gezeigt.



**Abb. 98:** Ausschnitt aus dem 2D  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  HSQC-Spektren von S54G/P55N RNase T1 bei 15 °C und 800 MHz. Die experimentellen Bedingungen können der Legende von Abb. 97 entnommen werden. Positive bzw. negative Intensitäten sind in schwarz bzw. rot dargestellt. (a) kinetisches Spektrum, das während der Rückfaltungsreaktion aufgenommen wurde. Kreuzsignale von Protonen in  $I^{39t}$ , die sich in einer nicht-nativen Umgebung befinden zeigen breitere Linien und unterschiedliche chemische Verschiebungen zu den jeweiligen Kreuzsignalen des nativen Zustands. Letztere besitzen zwei negative Flanken in der indirekten Dimension (A19, A22, K25, I61, A95). Kreuzsignale mit identischer chemischer Verschiebung in  $I^{39t}$  und  $N^{39c}$  zeigen scharfe Linien und äquivalente Intensitäten wie im Referenz-Spektrum (F50, D66). (b) Referenz-Spektrum des nativen Proteins nach vollständiger Rückfaltung enthält keine Kreuzsignale von  $I^{39t}$ . (c) Differenz-Spektrum nach der Subtraktion des kinetischen Spektrums vom Referenz-Spektrum. Charakteristische Kreuzsignale von  $I^{39t}$  besitzen negative, charakteristische Kreuzsignale des nativen Zustands zeigen positive Intensitäten (A19, A22, K25, I61, A95). Kreuzsignale mit identischer chemischer Verschiebung in  $I^{39t}$  und  $N^{39c}$  löschen sich aus (F50, D66).

Die Zuordnung der einzelnen Kreuzsignale zum nativen bzw. intermediären Zustand kann sowohl mit Hilfe der charakteristischen Linienform der Kreuzsignale des nativen Zustands (negative Flanken in der indirekten Dimension in Abb. 97a) sowie über das Vorzeichen der Kreuzsignale nach der Differenzbildung erfolgen (Abb. 99). Insgesamt wurden 25 Amidprotonen gefunden, deren Kreuzsignale in  $I^{39t}$  und  $N^{39c}$  identische chemische Verschiebungen aufweisen und somit in diesen Bereichen die Tertiärstruktur des Faltungsintermediats der Struktur des nativen Proteins gleicht (Tab. 20). Diese Regionen befinden sich im Bereich der beiden Disulfidbrücken, am N-Terminus der  $\alpha$ -Helix, in der langen Schleife zwischen den  $\beta$ -Faltblattsträngen  $\beta_3$  und  $\beta_4$  sowie jeweils im N-terminalen Teil der beiden  $\beta$ -Faltblattstränge  $\beta_6$  und  $\beta_7$ . Übereinstimmende Ergebnisse wurden bei der Analyse eines 2D Echtzeit NOESY-Experiments erhalten (Balbach, *et al.*, 1999). Die große

Mehrheit der zugeordneten Kreuzsignale des nativen Zustands besitzen jedoch die charakteristische Linienform mit den beiden negativen Flanken und positive Intensitäten im Differenzspektrum (Abb. 99), so dass diese im Intermediat in einer nicht-nativen Struktur vorliegen. Insgesamt wurden 67 solcher Kreuzsignale identifiziert, die ebenfalls in Tab. 20 zusammengefasst wurden und gleichmäßig über die Sequenz des Proteins verteilt sind.



**Abb. 99:** 2D  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  HSQC-Differenz-Spektrum von S54G/P55N RNase T1 bei 15 °C und 800 MHz. Das kinetische Spektrum (Abb. 97a) wurde vom Referenz-Spektrum (Abb. 97b) subtrahiert. Nur die Kreuzsignale, die eine identische chemische Verschiebung und Intensität in den beiden Spektren besitzen und sich daher im Differenz-Spektrum weitgehend auslöschen sind gekennzeichnet. Diese weisen auf native Bereiche im Faltungsintermediat  $I^{39t}$  hin. Der markierte Ausschnitt ist in Abb. 98c wiedergegeben. Positive bzw. negative Intensitäten sind in schwarz bzw. rot dargestellt und repräsentieren charakteristische Kreuzsignale von  $\text{N}^{39c}$  bzw.  $I^{39t}$  (siehe Abb. 96).

Die 66 negativen Kreuzsignale im Differenzspektrum (Abb. 99) ergeben mit den 25 Kreuzsignalen, die in  $I^{39t}$  eine identische chemische Verschiebung wie im nativen Zustand besitzen, das 2D  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  HSQC-Spektrum des Faltungsintermediats  $I^{39t}$  von S54G/P55N RNase T1. Dieses stimmt sehr gut mit dem  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  HMQC-Spektrum von  $I^{39t}$  überein, das zu Beginn der Rückfaltung aufgezeichnet (Steggorn, *et al.*, 2000) und in Abb. 102 dargestellt wurde. Darin ist die vorläufige Zuordnung der Kreuzsignale von  $I^{39t}$  gezeigt, die mit Hilfe dreidimensionaler Echtzeit NMR-Experimente getroffen wurde (siehe 3.6.3). Die Dispersion der Kreuzsignale ist sehr gut und deutet darauf hin, dass  $I^{39t}$  eine definierte Tertiärstruktur

besitzt. Allerdings sollten aufgrund der unterschiedlichen chemischen Verschiebungen deutliche Abweichungen von der nativen Konformation vorhanden sein.

**Tab. 20:** Einteilung der Kreuzsignale im Echtzeit 2D  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  HSQC Spektrum in native und nicht-native Bereiche des Faltungsintermediat  $\text{I}^{39\text{t}}$

Nicht-native Bereiche <sup>(a)</sup>	D3, <i>T5</i> <sup>(c)</sup> , G7, S8, N9, Y11, S13, D15, V16, S17, T18, A19, Q20, A21, A22, G23, K25, L26, H27, E28, D29, G30, E31, T32, V33, G34, S35, S37, Y38, H40, K41, N43, Y45, S53, G54, N55, Y56, Y57, E58, W59, W59 <sub>sc</sub> , I61, L62, S63, G65, V67, Y68, S69, G71, S72, G74, A75, D76, R77, V78, N81, N83, G88, V89, I90, T91, H92, T93, A95, G97, N99, V101
Native Bereiche <sup>(b)</sup>	C2, C6, S12, S14, Y42, G47, F48, D49, F50, S51, V52, S64, D66, G70, V79, E82, N84, Q85, L86, A87, G94, S96, E102, C103, T104

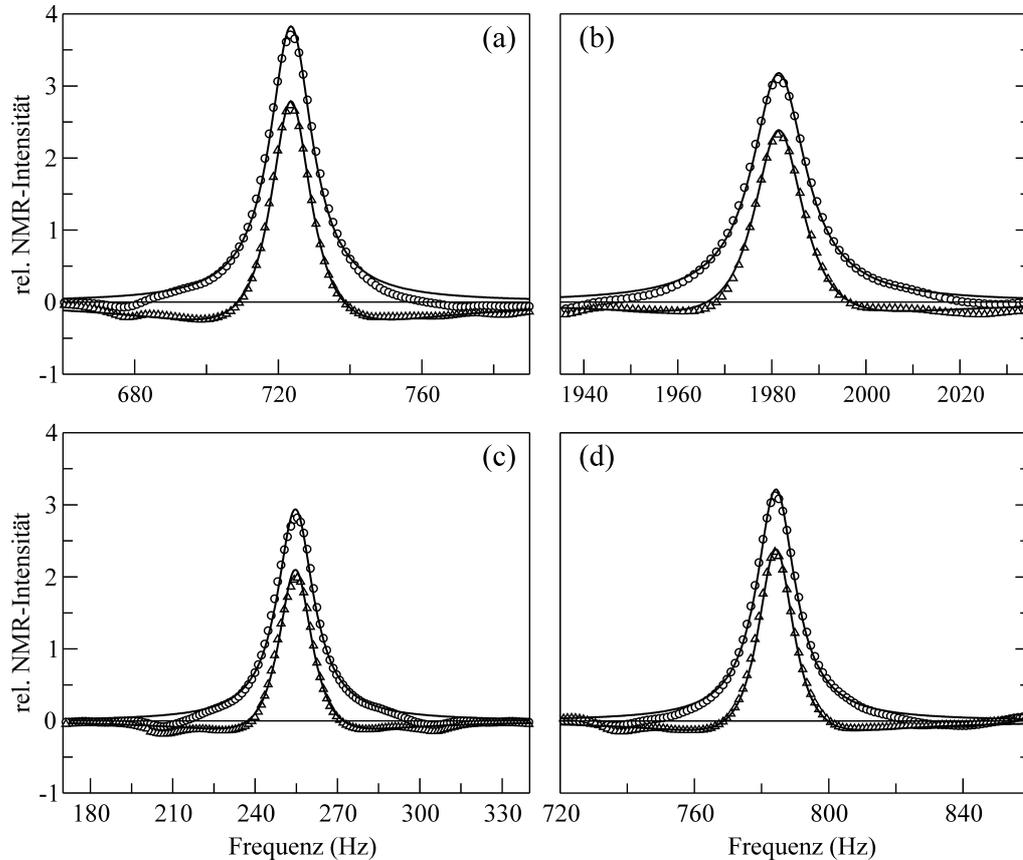
<sup>(a)</sup> Kreuzsignale im kinetischen Spektrum besitzen die charakteristische Linienform mit den beiden negativen Flanken in der indirekten Dimension und unterschiedliche chemische Verschiebungen in  $\text{I}^{39\text{t}}$  und  $\text{N}^{39\text{c}}$  sowie positive Intensitäten im Differenzspektrum. Die Kreuzsignale dieser Amidprotonen in  $\text{I}^{39\text{t}}$  ergeben negative Intensitäten im Differenzspektrum.

<sup>(b)</sup> Kreuzsignale im kinetischen Spektrum besitzen scharfe Linien und eine identische chemische Verschiebung in  $\text{I}^{39\text{t}}$  und  $\text{N}^{39\text{c}}$ . Daher erfolgt eine Auslöschung der Kreuzsignale im Differenzspektrum.

<sup>(c)</sup> Kreuzsignale der kursiv gekennzeichnete Aminosäuren wurden zur Bestimmung der Rückfaltungsrate herangezogen (Steebhorn, *et al.*, 2000). Dabei wurden während der Rückfaltung 128 schnelle 2D  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  HMQC-Experimente aufgezeichnet und der Intensitätsverlauf an eine Exponentialfunktion angeglichen.

Aus der Analyse der zuvor beschriebenen Linienform kann die Rückfaltungsrate ( $k_f$ ) bestimmt werden (siehe 2.5.8). Dazu wurde zuerst das 1D-Spektrum des Kreuzsignals im Referenz-Spektrum in der indirekten Dimension simuliert ( $\text{Re}\{\text{FT}[S^3(t)]\}$  aus Gl. 57) und sowohl die Intensität (Amplitude  $A$ ), die Resonanzfrequenz ( $\nu'$ ) und die transversale Relaxationsrate ( $R_2^*$ ), die die Linienbreite bestimmt, als Resultate erhalten. Mit diesen Parametern wurde dann das äquivalente 1D-Spektrum aus dem kinetischen 2D  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  HSQC-Spektrum angepasst ( $\text{Re}\{\text{FT}[S^2(t)]\}$  aus Gl. 57). Die so erhaltene apparenten Rate ( $k_{\text{dwell}}$ ) wurde dann mit Gl. 58 in die tatsächliche Rückfaltungsrate umgerechnet. In Abb. 100 sind repräsentative Beispiele der Linienformanalyse dargestellt. Insgesamt konnten bis jetzt 19 Kreuzsignale ausgewertet werden, die über die Sequenz des gesamten Proteins verteilt sind und deren Ergebnisse in Tab. 21 zusammengefasst sind. Die Resonanzsignale werden mit dem Formalismus aus Gl. 57 sehr gut beschrieben. Die ermittelten Rückfaltungsraten liegen zwischen  $2.9 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  und  $4.8 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  und die gemittelte  $k_f$  beträgt  $(3.4 \pm 0.2) \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ . Alle analysierten Resonanzen gehorchen im experimentellen Fehler einer identischen monoexponentiellen Kinetik. Das bedeutet, dass das gesamte Protein kooperativ und synchronisiert der geschwindigkeitsbestimmenden Peptidyl-Prolylisomerisierung folgt. Diese Ergebnisse stimmen sehr gut mit der Rückfaltungsrate aus den zuvor gezeigten 1D  $^1\text{H}$

Echtzeit NMR-Spektren und den Fluoreszenzexperimenten ( $3.3 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  bzw.  $4.0 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ) überein (siehe 3.6.1).



**Abb. 100:** Linienformanalyse zur Bestimmung der Rückfaltungsrate von S54G/P55N RNase T1. (a) Ala19, (b) Thr32, (c) Trp59, (d) Ala95. (O) 1D-Spektrum in der indirekten Dimension, das aus dem Referenz-Spektrum unter Gleichgewichtsbedingungen nach der vollständigen Rückfaltung extrahiert wurde. (Δ) Äquivalentes 1D-Spektrum aus dem kinetischen Spektrum, das während der Rückfaltung aufgezeichnet wurde. Die Kurven stellen die Anpassung der Daten an Gl. 57 dar. Dabei wurde für (O)  $\text{Re}\{\text{FT}[S^3(t)]\}$  und für (Δ)  $\text{Re}\{\text{FT}[S^2(t)]\}$  verwendet. Für die Anpassung von (Δ) wurden die Ergebnisse für  $A$ ,  $\nu'$  und  $R_2^*$  aus (O) eingesetzt. Die erhaltenen Rückfaltungsraten sind in Tab. 21 enthalten.

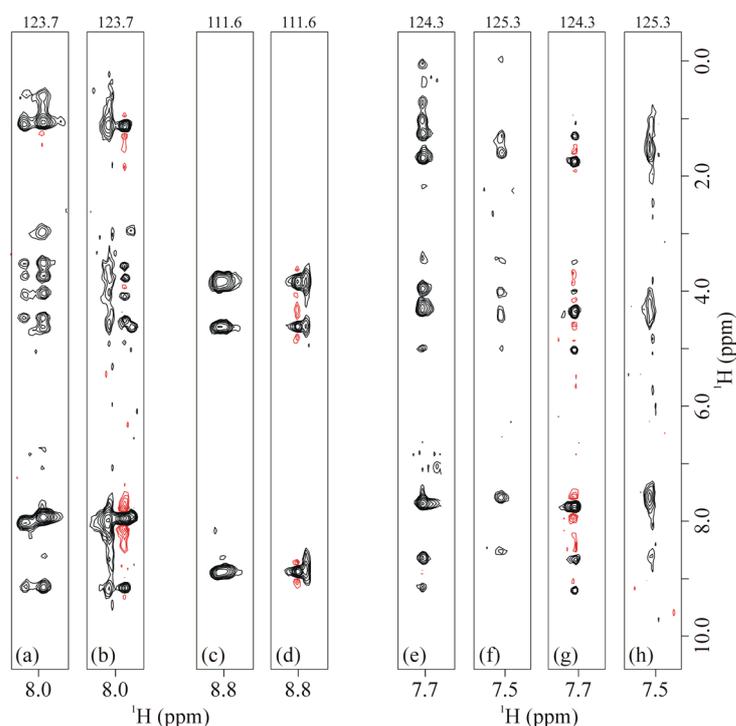
**Tab. 21:** Rückfaltungsraten von individuellen Rückgratamiden, die mit der Linienformanalyse aus dem 2D Echtzeit NMR-Spektrum erhalten wurden.

Aminosäure	$k_f (10^{-4} \text{ s}^{-1})^a$	Aminosäure	$k_f (10^{-4} \text{ s}^{-1})^a$
Gly7	$3.38 \pm 0.17$	Leu62	$3.28 \pm 0.10$
Thr18	$3.64 \pm 0.23$	Gly71	$3.13 \pm 0.12$
Ala19	$3.37 \pm 0.11$	Ser72	$2.94 \pm 0.11$
Ala22	$2.91 \pm 0.14$	Gly74	$3.31 \pm 0.12$
Gly23	$3.53 \pm 0.18$	Arg77	$3.36 \pm 0.13$
Lys25	$3.27 \pm 0.21$	Thr93	$4.76 \pm 0.22$
Thr32	$3.31 \pm 0.11$	Ala95	$3.28 \pm 0.09$
Ser35	$3.35 \pm 0.13$	Val101	$4.06 \pm 0.29$
Ser37	$3.28 \pm 0.13$	Glu102	$3.38 \pm 0.15$
Trp59	$3.41 \pm 0.14$		

<sup>a</sup> Die Berechnung erfolgte wie in 2.5.8 beschrieben mit Gl. 57 und Gl. 58.

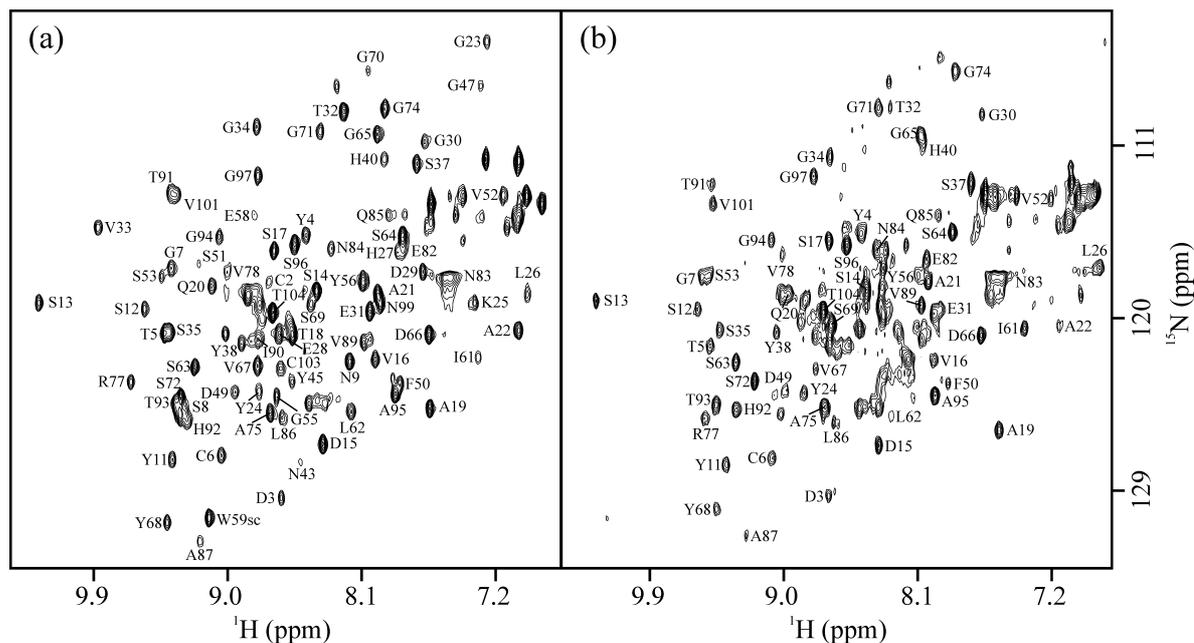
### 3.6.3 Dreidimensionale Echtzeit NMR-Spektroskopie mit S54G/P55N RNase T1

Für die sequentielle Zuordnung der Resonanzen des Faltungsintermediats I<sup>39t</sup> reicht die spektrale Auflösung zweidimensionaler NMR-Spektren nicht aus, da in Echtzeit NMR-Spektren neben den Kreuzsignalen des transienten I<sup>39t</sup> auch die Kreuzsignale des nativen Zustands auftreten. In vielen Fällen ist die chemische Verschiebung der Resonanzen im nativen und intermediären Zustand ähnlich, was zu einer signifikanten Überlagerung von Signalen führt. Neben der sequentiellen Zuordnung ist auch die Zuordnung von NOE-Kreuzsignalen von Interesse, da diese Informationen über den Abstand der wechselwirkenden Protonen liefert und die Grundlage jeder Strukturrechnung darstellt. Hierzu wurde schon ein homonukleares 2D NOESY-Spektrum während der Rückfaltung aufgezeichnet und ca. 200 NOEs des Intermediats mit Hilfe der in Abb. 96 (siehe 3.6.2) beschriebenen Linienformanalyse bzw. Differenzbildung identifiziert (Balbach, *et al.*, 1999). Die Rückfaltung von S54G/P55 RNase T1 bei 1 °C verläuft so langsam, dass währenddessen ein dreidimensionales <sup>15</sup>N-editiertes NOESY-HSQC Echtzeit NMR-Spektrum (Abb. 8) aufgezeichnet werden konnte. Die Vorgehensweise entspricht der Analyse, die für das 2D Echtzeit <sup>1</sup>H/<sup>15</sup>N HSQC-Spektrum durchgeführt wurde. Im 3D Echtzeit Experiment sind jedoch zwei indirekte Dimensionen vorhanden, so dass je nach der Reihenfolge der Inkrementierung die charakteristische Linienform der auftretenden Kreuzsignale des nativen Proteins entweder in der indirekten <sup>1</sup>H- oder <sup>15</sup>N-Dimension zu beobachten ist. Daher wurden jeweils ein 3D <sup>1</sup>H/<sup>15</sup>N NOESY-HSQC Spektrum während der Rückfaltung von S54G/P55N RNase T1 aufgezeichnet. Um die charakteristische Linienform in der indirekten <sup>1</sup>H-Dimension zu erhalten, wurden bei der Aufnahme zuerst die <sup>15</sup>N-Dimension und anschließend die indirekte <sup>1</sup>H-Dimension inkrementiert. Für die charakteristische Linienform in der <sup>15</sup>N-Dimension wurden zuerst die indirekte <sup>1</sup>H-Dimension und dann die <sup>15</sup>N-Dimension inkrementiert. In Abb. 101 sind die jeweiligen 2D NOESY-Ebenen aus den beiden 3D <sup>1</sup>H/<sup>15</sup>N NOESY-HSQC Echtzeit NMR-Spektren gezeigt. Die charakteristische Linienform mit den negativen Flanken ist nur in der 2D NOESY-Ebene zu finden, bei der im 3D Experiment die indirekte <sup>1</sup>H-Dimension nach der <sup>15</sup>N-Dimension inkrementiert wurde. Die Kreuzsignale sind allerdings sehr breit und zeigen daher eine geringere Intensität. Somit kann mit diesem Spektrum lediglich die Unterscheidung zwischen charakteristischen Kreuzsignalen im nativen bzw. intermediären Zustand getroffen werden. Die äquivalente 2D NOESY-Ebene des 3D Experiments, welche die charakteristische Linienform in der <sup>15</sup>N-Dimension trägt, besitzt scharfe und intensive Kreuzsignale und kann somit zur sequentiellen Zuordnung und zur Zuordnung von NOE-Kreuzsignalen eingesetzt werden.



**Abb. 101:** 2D  $^1\text{H}/^1\text{H}$  NOESY-Ausschnitte aus den 3D Echtzeit  $^{15}\text{N}$ -editierten NOESY-HSQC-Spektren. In (b), (d), (g) und (h) besitzen die Kreuzsignale des nativen Zustands die charakteristische Linienform in der indirekten  $^1\text{H}$ -Dimension mit den beiden negativen Flanken, da die indirekte  $^1\text{H}$ -Dimension nach der  $^{15}\text{N}$ -Dimension inkrementiert wurde. In (a), (c), (e) und (f) ist die charakteristische Linienform der Kreuzsignale des nativen Proteins nicht vorhanden, da diese aus dem 3D Echtzeit NMR-Spektrum extrahiert wurden, in dem die indirekte  $^1\text{H}$ -Dimension vor der  $^{15}\text{N}$ -Dimension inkrementiert wurde. NOESY-Ausschnitte von (a), (b) A95 in  $\text{I}^{39\text{t}}$  (8.06 ppm) und  $\text{N}^{39\text{c}}$  (7.98 ppm) bzw. von (c), (d) G97 in  $\text{I}^{39\text{t}}$  (8.75 ppm) und  $\text{N}^{39\text{c}}$  (8.80 ppm). NOESY-Ausschnitte von A19 im nativen Zustand (e), (g) und in  $\text{I}^{39\text{t}}$  (f), (h). Über den NOESY-Ausschnitten ist die jeweilige  $^{15}\text{N}$ -chemische Verschiebung im 3D-Spektrum angegeben.

Neben den 3D Echtzeit NMR-Spektren wurden nach der Rückfaltung auch die dazugehörigen Referenz-Spektren aufgezeichnet. Wie in 3.6.2 für das 2D  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  Echtzeit HSQC-Spektrum beschrieben, wurde auch hier das Differenz-Spektrum berechnet, um eine schnelle Unterscheidung zwischen Kreuzsignalen des Intermediats und des nativen Zustands zu erreichen. Auf der Grundlage dieser vier 3D-Spektren konnte der Großteil der Kreuzsignale des Faltungsintermediats zugeordnet werden. Die verwendete Zuordnungsstrategie ist in der Diplomarbeit von F. Hagn ausführlich beschrieben (Hagn, 2003), wobei als Startpunkte der sequentiellen Zuordnung die Kreuzsignale von Amidprotonen dienen, die im nativen Zustand und im Faltungsintermediat eine identische oder sehr ähnliche chemische Verschiebung besitzen (siehe Abb. 99 und Tab. 20). Die Zuordnung des Intermediats ist in dem 2D  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  HMQC-Spektrum in Abb. 102b dargestellt. Im Vergleich dazu ist das äquivalente Spektrum des nativen Zustands abgebildet (Abb. 102a).



**Abb. 102:** Schnelle 2D  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  HMQC-Spektren von S54G/P55N RNase T1, die während der Rückfaltung aus 6 M GdmCl in 10 mM Na-oxalat, 0.6 mM GdmCl pH 5.0 bei 10 °C an einem Bruker DRX600 aufgezeichnet wurden. (a) Spektrum des nativen Proteins nach der Rückfaltung ( $\text{N}^{39\text{c}}$ ). (b) Spektrum des langlebigen Faltungsintermediats ( $\text{I}^{39\text{t}}$ ), das durch Mittelung der ersten vier Spektren während der Rückfaltung und anschließender Subtraktion des Spektrums des nativen Anteils erhalten wurde. Die Spektren wurden freundlicherweise von Steegborn *et al.* zur Verfügung gestellt (Steegborn *et al.*, 2000). Dort sind auch die weiteren experimentellen Bedingungen und die Berechnung des Spektrums von  $\text{I}^{39\text{t}}$  beschrieben. Die Zuordnung von  $\text{N}^{39\text{c}}$  bzw.  $\text{I}^{39\text{t}}$  wurde mit  $^{15}\text{N}$ -editierten dreidimensionalen NMR-Spektren bzw. dreidimensionalen Echtzeit NMR-Spektren getroffen.

Das 2D HMQC-Spektrum des Intermediats wurde aus einem 2D Echtzeit NMR-Experiment erhalten. Dabei wurden 128 schnelle 2D HMQC-Spektren während der Rückfaltung von S54G/P55N RNase T1 in 10 mM Na-oxalat, 0.6 M GdmCl pH 5.0 bei 10 °C aufgezeichnet. Die Experimentdauer pro 2D HMQC-Spektrum betrug 207 s. Nach der Mittelung der ersten vier 2D HMQC-Spektren wurde das mit der Rückfaltungsrateskalierte Spektrum des nativen Anteils (Abb. 102a) subtrahiert woraus das 2D HMQC-Spektrum des Faltungsintermediats (Abb. 102b) resultierte. Die Spektren und deren Analyse wurde freundlicherweise von Steegborn *et al.* zur Verfügung gestellt (Steegborn, *et al.*, 2000). Die Kreuzsignale im 2D  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  HMQC-Spektrum von  $\text{I}^{39\text{t}}$  bei 10 °C sind vergleichbar den Kreuzsignalen von  $\text{I}^{39\text{t}}$  im 2D Echtzeit  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  HSQC-Spektrum bei 15 °C (Abb. 97a) und zeigt eine ebenso gute Dispersion. Daraus lässt sich schließen, dass  $\text{I}^{39\text{t}}$  schon weitgehend strukturiert vorliegt. Allerdings besitzt der Großteil der Amidprotonen im Spektrum des Intermediats eine unterschiedliche chemische Verschiebung als im Spektrum des nativen Proteins (Abb. 99 und Tab. 20). Ähnliches wurde auch für NOE-Kreuzsignale im 3D Echtzeit

NOESY-HSQC-Spektrum gefunden. Hier können, wie dies schon im homonuklearen 2D NOESY-Spektrum gezeigt wurde (Balbach, *et al.*, 1999), drei Gruppen von NOE-Kreuzsignalen unterschieden werden (Abb. 96). (i) NOE-Kreuzsignale zwischen Protonen, die nur im Intermediat räumlich nahe sind, zeigen eine abnehmende Intensität während dem Verlauf des Experiments und breitere Linien. (ii) NOE-Kreuzsignale zwischen Protonen, die nur im nativen Protein räumlich nahe sind, weisen die charakteristische Linienform in der indirekten  $^1\text{H}$ - bzw.  $^{15}\text{N}$ -Dimension mit den beiden negativen Flanken auf. Die Intensität steigt mit zunehmender Rückfaltungsdauer an. In den NOESY-Ausschnitten des Intermediats sind diese NOE-Kreuzsignale nicht zu finden (z.B. A95, A19 in Abb. 101). (iii) NOE-Kreuzsignale zwischen Protonen, die in  $\text{N}^{39\text{c}}$  und in  $\text{I}^{39\text{t}}$  räumlich nahe sind und sich in der nativen strukturellen Umgebung befinden, besitzen eine unveränderte Intensität, scharfe Linien und eine identische chemische Verschiebungen. Durch die Einteilung der NOE-Kreuzsignale in diese drei Gruppen ermöglicht die sequentielle Zuordnung des Intermediats.

## 4. ZUSAMMENFASSENDER DISKUSSION

Die NMR-Spektroskopie stellt eine sehr wichtige und in vielen Bereichen einsetzbare Methode zur Charakterisierung der Struktur, Funktion, Faltung und Dynamik von Biomakromolekülen und deren Wechselwirkungen in Lösung dar. In den letzten fünf Jahren wurden weltweit zahlreiche *structural genomics* Projekte mit unterschiedlichen Zielsetzungen gestartet, wobei die Strukturaufklärung von Proteinen mittels Röntgenkristallographie und NMR-Spektroskopie betrieben wird. Dabei hat sich die NMR-Spektroskopie als gleichwertige Methode zur Röntgenkristallographie etabliert, was sich dadurch ausdrückt, dass die Hälfte aller erhaltenen Strukturen mit Hilfe der NMR-Spektroskopie gelöst werden konnten.

### 4.1 Strukturbestimmung und Charakterisierung von spezifischen Interaktionen

Das plasmidal-codierte Protein ORF56 aus *Sulfolobus islandicus* kommt in Lösung als Dimer vor und besteht aus je 56 Aminosäuren pro Monomer (Lipps, *et al.*, 2001b, Zeeb, *et al.*, 2004). ORF56 bindet sequenz-spezifisch an doppelsträngige DNA und zeigt eine schwache Sequenzhomologie zu dem ebenfalls plasmidal-codierten homodimeren Transkriptionsrepressor CopG aus *Streptococcus*, der zur Strukturfamilie des P22 Arc-Repressors gehört (Gomis-Rüth, *et al.*, 1998). Aus den Faltungsstudien an ORF56 konnte eine Homologie bezüglich der thermodynamischen und kinetischen Eigenschaften zum Arc-Repressor abgeleitet werden (siehe Abschnitt 4.3), so dass sich die Frage stellte, ob ORF56 auch eine homologe Struktur besitzt. Die Bestimmung der dreidimensionalen Struktur von ORF56 wurde mittels NMR-Spektroskopie durchgeführt. Aus dem 2D  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  HSQC-Spektrum des Proteins war umgehend ersichtlich, dass es sich um ein symmetrisches Homodimer handelt, da nur ein Datensatz für die Rückgratamide von 51 Kreuzsignalen vorhanden war (Abb. 61). Die Berechnung der Tertiärstruktur basiert hauptsächlich auf Abstandsrandbedingungen, die aus NOE-Kreuzsignalen abgeleitet werden können. In einem symmetrischen Homodimer ist es *a priori* nicht möglich NOE-Effekte zwischen Protonen innerhalb eines Monomers von NOE-Effekten zwischen Protonen beider Untereinheiten zu unterscheiden, da Protonen in beiden Monomeren eine äquivalente chemische Umgebung besitzen. Eine Differenzierung in intra- und intermonomeren NOEs wurde durch selektiv markierte Heterodimere mit Hilfe von Halbfilterexperimenten und unterschiedlich gefilterten NOESY-Spektren bewerkstelligt. Bei dem homologen Protein (Arc-Repressor) wurde mit  $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ - und  $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ -editierten Halbfilterexperimenten anhand von intermonomeren NOEs ( $\text{H}^{\text{N}}\text{-H}^{\text{N}}$  bzw.  $\text{H}^{\alpha}\text{-H}^{\alpha}$ ) gezeigt, dass je ein Strang des kurzen zweisträngigen antiparallelen  $\beta$ -

Faltblatts von einem Monomer beigesteuert wird (Burgering, *et al.*, 1993). Eine weitere Analyse dieser Spektren ergab, dass die überwiegende Mehrheit der intermonomeren Kontakte zwischen Kohlenstoff-gebundenen  $^1\text{H}$  der Seitenketten bestehen. Daher ist eine vollständige Zuordnung der Seitenketten von ORF56 eine entscheidende Voraussetzung für die Identifizierung dieser Kontakte. Allerdings gestaltet sich die eindeutige Zuordnung mit konventionellen  $^{15}\text{N}$ -editierten 2D und 3D NMR-Spektren, hauptsächlich aufgrund der ungünstigen Aminosäurezusammensetzung und der geringeren Dispersion des überwiegend  $\alpha$ -helikalen Proteins im Vergleich zu Proteinen mit hohem Anteil von  $\beta$ -Faltblattstrukturen, als schwierig. So enthalten nahezu die Hälfte der in ORF56 enthaltenen Aminosäuren lange Seitenketten (8x Leu, 8x Lys, 4x Ile, 3x Arg), von denen die meisten eine Resonanzfrequenz des Amidprotons im Bereich zwischen 7.7 ppm und 8.4 ppm besitzen, was zu einer signifikanten Signalüberlagerung führt. Daher wird nun im Rahmen einer Diplomarbeit in unserer Gruppe die vollständige Zuordnung der  $^1\text{H}$  der Seitenketten anhand von Tripleresonanzexperimenten getroffen. Erste  $^{13}\text{C}$ -Halbfilterexperimente, die an einem Bruker DRX500 durchgeführt wurden zeigten, dass der Informationsgehalt dieser Spektren den entscheidenden Beitrag zur Strukturbestimmung von ORF56 leisten werden, wobei einige identifizierte intermonomere NOEs schon in der Berechnung der vorläufigen Struktur (Abb. 65) enthalten sind. Diese besteht aus einem kurzen  $\beta$ -Faltblattstrang (Lys11-Tyr15) im N-terminalen Bereich, an den sich zwei  $\alpha$ -Helices anschließen (Gln18-Lys29, Thr34-Asn49). Ein solches *helix-turn-helix* Motiv stellt eines der klassischen DNA-Bindungsmotive zur Erkennung der großen Furche dar (Harrison & Aggarwal, 1990, Matthews, *et al.*, 1982, Pabo & Sauer, 1984). Die N- und C-terminalen Enden der Polypeptidkette liegen unstrukturiert vor. Die Assoziation zweier Monomere führt zu der Bildung eines zweisträngigen antiparallelen  $\beta$ -Faltblatts, welches vom hydrophoben Kern des Proteins nach außen zeigt. Letzterer entsteht durch die Wechselwirkung von Resten des  $\beta$ -Faltblatts und der vier Helices. Die Topologie und Dimerisierungsfläche von ORF56 entspricht derjenigen, die auch bei CopG (Gomis-Rüth, *et al.*, 1998) und dem Arc-Repressor (Breg, *et al.*, 1990) gefunden wurde. Die Erkennung der großen Furche der DNA erfolgt bei diesen Proteinen über das antiparallele  $\beta$ -Faltblatt. Dies könnte bei ORF56 ebenso der Fall sein, was durch die ähnlich ungleichmäßige Ladungsverteilung von ORF56 im Vergleich zum Arc-Repressor unterstützt wird. Der N-terminale Bereich und das kurze  $\beta$ -Faltblatt zeigen eine ausgedehnte positive Ladungsdichte (Arg2, Lys5, Lys11) die mit dem negativ geladenen Rückgrat der DNA interagieren kann. Die Abhängigkeit der Affinität von der Salzkonzentration stellt einen weiteren Hinweis auf eine solche Interaktion dar (Lipps, *et al.*, 2001b).

Neben der sequenzspezifischen Bindung von Proteinen an doppelsträngige Nukleinsäuren sind Proteine, die mit einzelsträngigen Nukleinsäuren interagieren von hoher physiologischer Relevanz. Das Verständnis der Wechselwirkung zwischen Proteinen und RNA war lange Zeit auf Komplexe beschränkt, in denen die RNA selbst eine definierte Sekundär- oder Tertiärstruktur eingenommen hat, die durch intramolekulare Basenpaarungen oder Stapelwechselwirkungen stabilisiert werden (Outbridge, *et al.*, 1994, Price, *et al.*, 1998). In den letzten fünf Jahren gelang allerdings ein Durchbruch bezüglich der Charakterisierung von Wechselwirkungen zwischen Proteinen und einzelsträngigen unstrukturierten Nukleinsäuren (Antson, 2000). Dabei spielen Proteine, die RNP-Bindungsmotive beinhalten (Deo, *et al.*, 1999, Handa, *et al.*, 1999) oder Proteine, die zur Faltungsklasse der OB-fold Superfamilie gehören (Bogden, *et al.*, 1999), eine entscheidende Rolle. Das Kälteschockprotein CspB aus *B. subtilis* gehört aufgrund seiner  $\beta$ -Faßstruktur zur OB-fold Faltungsklasse und besitzt darüber hinaus zwei RNP-Bindungsmotive. Letztere wurden zuerst über Sequenzhomologien postuliert (Schröder, *et al.*, 1995) und später mit Hilfe von Bindungsstudien verifiziert (Hillier, *et al.*, 1998, Schröder, *et al.*, 1995, Zeeb & Balbach, 2003a). Die Strukturbestimmung von CspB im Komplex mit dem ssDNA-Fragment dT7 wurde ebenfalls mittels NMR-Spektroskopie durchgeführt. Dabei ergeben sich einige strukturelle Änderungen innerhalb der flexiblen Schleifenregionen. Die Schleife zwischen den beiden Faltblattsträngen  $\beta_4$  und  $\beta_5$  in der Arg56 liegt, erfährt eine Drehung um  $25^\circ$  und besitzt wie die lange Schleife zwischen den  $\beta$ -Faltblattsträngen  $\beta_3$  und  $\beta_4$  eine reduzierte Dynamik im Picosekunden- bis Nanosekundenbereich. Die Gesamtstruktur, das heißt das fünfsträngige antiparallele  $\beta$ -Faltblatt, bleibt nahezu unverändert. Größere Änderungen sind in der Orientierung der aromatischen Seitenketten der beiden RNP-Bindungsmotive (Phe15, Phe17, Phe27, His29, Phe30) zu finden, die für die Wechselwirkung mit dem ssDNA-Fragment dT7 maßgeblich verantwortlich sind, was durch eine detaillierte Mutationsstudie verifiziert wurde. Desweiteren ist eine veränderte Lage von Trp8, Phe9 und Phe38 zu erkennen, die voraussichtlich auf direkte Stapelwechselwirkungen mit den Basen zurückzuführen ist. Im Komplex der N-terminalen Domäne des Transkriptionsfaktors Rho wurden ebenfalls Stapelwechselwirkungen zwischen Basen und Aminosäureseitenketten gefunden (Bogden, *et al.*, 1999), wobei die potentiellen Interaktionsfläche von Rho zuvor NMR-spektroskopisch identifiziert wurde (Briercheck, *et al.*, 1998). Spezifische Wasserstoffbrücken mit den Basen, die eine Geometrie von Watson-Crick-ähnlichen Basenpaarungen bedingen, stabilisieren den Protein/RNA-Komplex zusätzlich. Bei der Bindung des poly(A)-bindenden Proteins an eine poly(A)-Sequenz führen die spezifischen Wasserstoffbrücken zur 2'-OH Gruppe der Ribose

zu einem hochaffinen Komplex, der die Spezifität gegenüber DNA ausmacht (Deo, *et al.*, 1999). Neuartige Stapelwechselwirkungen zwischen Seitenketten des Telomerschutzproteins Pot1 und den Basen der einzelsträngigen Telomerenden-DNA konnten in der Kristallstruktur des Komplexes identifiziert werden (Lei, *et al.*, 2003). Dabei kommt eine aromatische Seitenkette über zwei miteinander stapelnden Basen zu liegen, die über van der Waals Wechselwirkungen die obere Base kontaktiert. Desweiteren ist die Orientierung der Donor-/Akzeptorgruppen der Watson-Crick-Basenpaarungen derart, dass viele nach außen gerichtete Wasserstoffbrücken zu Aminosäureseitenketten ausgebildet werden können. Um solche spezifische Interaktionen im CspB/dT7-Komplex beschreiben zu können, ist die Bestimmung der Tertiärstruktur des Komplexes notwendig. Dies war jedoch aufgrund einiger ungünstiger Eigenschaften des Systems nicht möglich. Zum einen besitzt das ssDNA-Fragment dT7 weder im freien noch im gebundenen Zustand eine ausreichende Dispersion der Resonanzen in den NMR-Spektren sowie eine degenerierte Sequenz, so dass eine sequentielle Zuordnung nicht möglich war. Zum anderen konnten trotz der hochaffinen Bindung von CspB an dT7 aufgrund der hohen Dynamik der Interaktion (nahezu diffusionskontrollierte Assoziation und Dissoziation im Millisekundenbereich) nur wenige NOEs zwischen den beiden Wechselwirkungspartnern identifiziert werden. Allerdings ist mit dem neuartigen Modellierungsprogramm HADDOCK (Dominguez, *et al.*, 2003) eine Simulation der Komplexstruktur möglich. Die Besonderheit von HADDOCK liegt darin, dass sowohl biochemische als auch biophysikalische Daten als mehrdeutige Interaktionsrandbedingungen (AIR, *ambiguous interaction restraints*) in einer Moleküldynamikrechnung eingesetzt werden können. Neben den intramolekularen NOEs, die zur Strukturrechnung der Konformation von komplexiertem CspB verwendet wurden bedeutet das im Fall des CspB/dT7-Komplexes, dass die Änderungen der chemischen Verschiebungen aus dem NMR-Titrationsexperiment ebenso wie die Ergebnisse des Amidprotonenaustauschs und der ortsgerichteten Mutagenese in die Simulationen eingingen. Dabei unterscheidet HADDOCK zwischen aktiven und passiven Resten auf der Oberfläche des Proteins (Dominguez, *et al.*, 2003). Das heißt mit anderen Worten, dass Reste die direkt an der Wechselwirkung beteiligt sind und zum Beispiel über die Mutationsanalyse identifiziert wurden als aktiv und die dazu benachbarten Reste auf der Oberfläche des Proteins als passiv definiert werden. Auch die wenigen identifizierten intermolekularen NOEs zwischen CspB und dT7 wurden als AIR eingesetzt. Die intermolekularen NOEs treten hauptsächlich zwischen Protonen der aromatischen Seitenketten von Trp8, Phe9, Phe15 und den 2'-H der Desoxyribose sowie zu den Protonen der Thymin-Nukleotide auf. Die ersten vorläufigen Resultate der Modellierung, in der der

Konformation des gebundenen CspB nur eine geringfügige Flexibilität erlaubt wurde, sind viel versprechend. Die räumliche Lage der einzelsträngigen Nukleinsäure ist hauptsächlich im Bereich der exponierten hydrophoben Oberfläche zu finden, die durch die aromatischen Seitenketten des RNP1- und RNP2-Bindungsmotivs gebildet wird. Dabei deuten sich Stapelwechselwirkungen zwischen Phenylringen von CspB und einzelnen Basen von dT7 an. Auch einige elektrostatische Interaktionen und potentielle Wasserstoffbrücken sind sichtbar. Das bedeutet, dass diese Simulationen zum besseren Verständnis der Wechselwirkung von CspB mit dT7 beitragen können.

## 4.2 Dynamische Prozesse und Proteinfaltung

Die Verwendung der NMR-Spektroskopie zur Untersuchung dynamischer Prozesse in Lösung ist neben der Strukturbestimmung und der Charakterisierung der Wechselwirkungen von Biomakromolekülen von zentraler Bedeutung. Wie in Abschnitt 1.2 eingehend beschrieben wurde, steht eine Fülle von NMR-spektroskopischen Methoden zur Verfügung, um Bewegungen über einen enormen Zeitbereich charakterisieren zu können (Abb. 2), der von Seitenkettenrotationen im Picosekundenbereich bis hin zur Proteinfaltung in einigen Tagen reicht. Zur Beschreibung der internen Dynamik von Proteinen im Picosekunden- bis Nanosekundenbereich wird meistens die modelunabhängige Lipari-Szabo-Analyse verwendet (Clare, *et al.*, 1990, Lipari & Szabo, 1982a, Lipari & Szabo, 1982b). Als experimentelle Daten gehen zumeist  $^{15}\text{N}$  Relaxationsparameter wie longitudinale und transversale Relaxationsraten sowie der heteronukleare NOE-Effekt ein. Als Ergebnis dieser Analyse werden die Rotationskorrelationszeit ( $\tau_m$ ) der Gesamtbewegung des Proteins und die Bewegungsparameter der internen Dynamik ( $S^2$ ,  $R_{ex}$ ,  $\tau_e$ ) erhalten. Die Verlässlichkeit dieser Ergebnisse hängt jedoch stark von der Anzahl der experimentellen Daten ab. Üblicherweise wird diese durch die Messung der Relaxationsparameter bei unterschiedlichen Feldstärken erhöht, die dann global mit den Bewegungsmodellen des Lipari-Szabo-Formalismus angepasst werden (Canet, *et al.*, 2001, Nicholson, *et al.*, 1995, Renner, *et al.*, 1998). Alternativ können weitere Parameter wie z.B. die Temperatur (Evenäs, *et al.*, 1999, Mandel, *et al.*, 1996, Seewald, *et al.*, 2000, Vugmeyster, *et al.*, 2002, Yang, *et al.*, 1997) oder die Viskosität variiert werden. Letztere wurde allerdings noch nicht zur Aufnahme unabhängiger Datensätze herangezogen und wurde daher erstmals bei der Charakterisierung der internen Dynamik des Kälteschockproteins CspB angewendet (Zeeb, *et al.*, 2003).

Dabei wurden die verschiedenen Lösungsmittelviskositäten über die Ethylenglykolkonzentration (EG) eingestellt. Aus der Lipari-Szabo-Analyse der

Relaxationsparameter bei den einzelnen Viskositäten resultierte die Rotationskorrelationszeit, die eine empfindliche Sonde für die Mikroviskosität darstellt und die Gesamtbewegung des Proteins bestimmt. Die Stokes-Einstein-Gleichung sagt eine lineare Abhängigkeit der relativen  $\tau_m$  von der relativen Viskosität ( $\eta/\eta_0$ ) voraus, die auch für CspB bis zu einer relativen Viskosität von 2 zutrifft. Bei  $\eta/\eta_0 = 6$  ist die relative  $\tau_m$  wesentlich geringer als vorhergesagt was bedeutet, dass die Gesamtbewegung des Proteins schneller ist, als dies aufgrund der Viskosität des Lösungsmittels (Makroviskosität) zu erwarten ist. Obwohl Ethylenglykol stabilisierend auf CspB wirkt kann ausgeschlossen werden, dass die apparent schnellere Bewegung auf die Verschiebung des Faltungsgleichgewichts auf die Seite des nativen Proteins verursacht wird, da in Abwesenheit von EG nur 1% des Gesamtproteins entfaltet vorliegt und somit die Änderung sehr gering ist. Eine plausible Erklärung ist, dass die Mikroviskosität in der Hydratationshülle von CspB geringer ist als die Viskosität des umgebenden Lösungsmittels. Die Überprüfung dieser Hypothese erfolgte durch die Bestimmung von relativen Korrelationszeiten über den hydrodynamischen Radius ( $R_H$ ), der über die Messung der Translationsdiffusion zugänglich ist, wobei Dioxan als interner Standard verwendet wurde. Unter der Voraussetzung dass der  $R_H$  von Dioxan nicht durch EG beeinflusst wird (Jones, *et al.*, 1997) ergibt sich ein nahezu konstanter  $R_H$  für CspB im untersuchten Viskositätsbereich. Daraus lässt sich schließen, dass CspB auch in Gegenwart von 70% EG monomer vorliegt. Die absoluten Werte der Korrelationszeiten, die aus den  $R_H$  mit der Stokes-Einstein-Debye-Gleichung berechnet wurden ( $\tau_m^{\text{diff}}$ ) liegen systematisch um 30% unter den Werten, die aus den  $^{15}\text{N}$  Relaxationsmessungen erhalten wurden, was möglicherweise auf die Annahme eines zu großen  $R_H$  des Dioxans zurückgeführt werden kann (Wilkins, *et al.*, 1999). Die geringe Variation des  $R_H$  bei unterschiedlichen Viskositäten ergibt relative Korrelationszeiten, die näherungsweise proportional zur Makroviskosität des Lösungsmittels ist. Daraus folgt, dass die Mikroviskosität der Hydratationshülle und nicht die Größe des Proteins inklusive seiner Hydratationshülle die Rotationsbewegung bestimmt. Somit erlauben  $^{15}\text{N}$  Relaxationsmessungen und deren Analyse die Mikroviskosität von Proteinen zu charakterisieren, was für viskositätsabhängige Faltungsstudien von großer Bedeutung ist (Jacob, *et al.*, 1997).

Ähnliche Abweichungen der Rotationskorrelationszeit von der Stokes-Einstein-Beziehung wurde auch in zeitaufgelösten Experimenten von Proteinen in viskosen Medien gefunden, die mit Absorption oder Fluoreszenzanisotropie verfolgt wurden (Lakshmikanth & Krishnamoorthy, 1999, Lavalette, *et al.*, 1999). Auch bei Lipari-Szabo-Analysen von  $^{15}\text{N}$  Relaxationsparametern, die über einen großen Temperaturbereich durchgeführt werden, sind

solche Abweichungen aufgetreten. Dies ist z.B. der Fall für die B1-Domäne des Protein G aus *Streptococcus* (Seewald, *et al.*, 2000), deren Bewegungsparameter bei sechs verschiedenen Temperaturen zwischen 0 °C und 50 °C untersucht wurden. Die relative Viskosität nimmt von 50 °C auf 0 °C um den Faktor 3 zu. Nimmt man an, dass die Rotationskorrelationszeit linear von der Temperatur abhängt ergibt sich bei 0 °C ( $\eta/\eta_0 = 3$ ) immer noch ein Wert für  $\tau_m$ , der um 25% unter dem zu erwartenden liegt (Seewald, *et al.*, 2000).

Die Erhöhung der Viskosität führt zu einer signifikanten Verlangsamung der Gesamtbewegung des Proteins und lässt das 67 Aminosäuren große CspB aufgrund der erhöhten  $\tau_m$  bei  $\eta/\eta_0 = 2$  und  $\eta/\eta_0 = 6$  als ein 170 bzw. 340 Aminosäuren großes Protein erscheinen. Im Allgemeinen wird versucht größere Proteine, die eine langsame Gesamtbewegung ausführen und daher ungünstige Relaxationseigenschaften besitzen, dazu zu bringen, ein apparentes Verhalten eines kleineren Proteins anzunehmen. Dies wird z.B. dadurch erreicht, dass große Proteine in reversen Micellen eingeschlossen werden und diese dann in niedrig viskosen Flüssigkeiten gelöst werden. (Wand, *et al.*, 1998). Somit stellt die Erhöhung der Viskosität den reziproken Ansatz zur apparenten Erniedrigung des Molekulargewichts dar. Letztlich können mit der apparenten Erhöhung des Molekulargewichts kleine Proteine zur Entwicklung und Implementierung von NMR-Experimenten eingesetzt werden, die zur Charakterisierung und Strukturbestimmung sehr großer Proteine oder von Komplexen benötigt werden.

Die erweiterte Lipari-Szabo-Analyse bei drei unterschiedlichen Lösungsmittelviskositäten gibt einen Einblick in die interne Dynamik von CspB. Eine der zentralen Annahmen des modelunabhängigen Ansatzes stellt die Unabhängigkeit der Gesamtbewegung und der internen Beweglichkeit dar (Lipari & Szabo, 1982b). Die Rotationskorrelationszeit von CspB steigt von 4.3 ns bei  $\eta/\eta_0 = 1$  auf 17.3 ns bei  $\eta/\eta_0 = 6$  an. Aus vielen  $^{15}\text{N}$  Relaxationsstudien geht hervor, dass der Ordnungsparameter  $S^2$ , der neben  $R_{ex}$ ,  $\tau_e$ ,  $S_f^2$  und  $S_s^2$  zur Beschreibung der internen Dynamik herangezogen wird, den verlässlichsten Parameter darstellt. Dies gilt unabhängig von dem Problem für jeden Rest des Proteins aufgrund statistischer Erwägungen ein adäquates Model für die Funktion der spektralen Leistungsdichte zu finden (Palmer, 2001). Für CspB resultiert bei allen Viskositäten ein übereinstimmendes Bild für die Amplitude der internen Beweglichkeit im Subnanosekundenbereich in den Sekundärstrukturelementen ( $S^2$ -Werte in Abb. 24). Die lange Schleife zwischen  $\beta$ -Faltblattstrang  $\beta_3$  und  $\beta_4$  sowie die beiden Faltblattstränge  $\beta_4$  und  $\beta_5$  sowie der C-Terminus besitzen große Amplituden der internen Beweglichkeit.

Im Gegensatz zu  $S^2$  hängen die erhaltenen internen Korrelationszeiten  $\tau_e$  von der Viskosität ab. Allerdings sind die  $\tau_e$ -Werte im Vergleich zu  $S^2$  weniger gut definiert und besitzen Fehler von 30%-50%, vor allem wenn die Relaxationsparameter nur bei einer Feldstärke gemessen wurden. Desweiteren geht aus den Funktionen der spektralen Leistungsdichte von Model 2 und 4 (Tab. 5) hervor, dass  $\tau_e$ -Werte die unter 5% von  $\tau_m$  betragen oder nahe bei  $\tau_m$  liegen, ebenfalls schlecht definiert sind (Ernst, *et al.*, 1996). Das bedeutet, dass die Größe der Rotationskorrelationszeit den Bereich bestimmt, in dem  $\tau_e$  signifikant zu der spektralen Leistungsdichtefunktion beiträgt. Dies erklärt, warum die Mehrheit der  $\tau_e$ -Werte in Abwesenheit von EG um 50 ps liegen, während in Gegenwart von 70% EG Beiträge im Nanosekundenbereich und keine Beiträge im Picosekundenbereich existieren. Die internen Korrelationszeiten treten in den Schleifenregionen zwischen den Faltblattsträngen und am C-Terminus auf.

Die Beiträge des chemischen Austauschs  $R_{ex}$  zu der transversalen Relaxationsrate können durch die Lipari-Szabo-Analyse indirekt bestimmt werden und stimmen gut mit den direkt bestimmten  $R_{ex}$ -Werten überein. Letztere wurden aus der Messung kreuzkorrelierter dipolaren/CSA Relaxation erhalten. Es konnte in einigen Fällen schon gezeigt werden, dass Faltungsreaktionen im Millisekundenbereich chemische Austauschtermine erzeugen können und dass diese  $R_{ex}$ -Werte aus Relaxationsmessungen zur quantitativen Bestimmung sehr schneller Faltungsraten verwendet werden können (Burton, *et al.*, 1996, Mulder, *et al.*, 2001, Tollinger, *et al.*, 2001, Vugmeyster, *et al.*, 2000). Die exemplarische Berechnung von  $R_{ex}$ -Werten von einigen Aminosäuren bei den drei Viskositäten ergaben gut übereinstimmende Ergebnisse. In Abwesenheit von EG sind für nahezu alle Aminosäuren von CspB  $R_{ex}$ -Werte vorhanden, die bei einer relativen Viskosität von 2 geringer werden und bei  $\eta/\eta_0 = 6$  fast alle abwesend sind. Dies resultiert zum einen aus der Stabilisierung von CspB durch EG, da die Größe des  $R_{ex}$  von dem Populationsverhältnis der austauschenden Spezies abhängt (1.3%, 0.2% und 0.06% bei 0%, 27% und 70% EG) und zum anderen führt die Verlangsamung der Rück- und Entfaltungsreaktion (Jacob, *et al.*, 1997) zu einer reduzierten Austauschrate, wodurch der  $R_{ex}$ -Beitrag ebenfalls verringert wird.

Neben der indirekten Bestimmung des  $R_{ex}$ -Beitrags über die erweiterte Lipari-Szabo-Analyse kann dieser auch über die Messung kreuzkorrelierter Relaxationsraten (Kroenke, *et al.*, 1998, Renner & Holak, 2000, Tessari, *et al.*, 1997) oder die sogenannte  $R_2$ -Dispersion erhalten werden. Üblicherweise wird  $R_{ex}$  in Regionen von Proteinen beobachtet, die eine erhöhte lokale Dynamik im Mikrosekunden- bis Millisekundenbereich aufweisen. Mit Hilfe des  $R_{ex}$ -Werts werden dann die Populationen der miteinander austauschenden Spezies

bestimmt und die Austauschrate  $k_{\text{ex}}$  berechnet. Diese Herangehensweise wurde zur Untersuchung des konformationellen Austauschs bei der Isomerisierung der Disulfidbrücke im aktiven Zentrum von BPTI (Loria, *et al.*, 1999, Millet, *et al.*, 2000), der Flexibilität von T4-Lysozym im Bereich der Ligandenbindungsstelle (Mulder, *et al.*, 2000) oder dessen aktivierte Zustände angewandt (Mulder, *et al.*, 2001). Für die Charakterisierung der Faltung von CspB und dessen Übergangszustand wurde ein reziproker Ansatz gewählt, da im Gegensatz zu den zuvor erwähnten Beispielen hier eine globale Faltungs-/Entfaltungsreaktion vorliegt. Dies drückt sich dadurch aus, dass die mit  $R_2$ -Dispersion experimentell bestimmten  $R_{\text{ex}}$ -Werte keine Korrelation mit Sekundärstrukturelementen zeigen und über das gesamte Protein verteilt sind. Die Berechnung dieser  $R_{\text{ex}}$ -Werte basiert auf den Populationen des nativen und entfalteten Zustands, die mittels *stopped flow* Fluoreszenzspektroskopie erhalten wurden. Mit diesen  $R_{\text{ex}}$ -Werten ist die Berechnung der Austauschrate  $k_{\text{ex}}$  möglich, die der apparenten Faltungsrate aus den *stopped flow* Experimenten entspricht. Durch den Vergleich dieser unterschiedlich erhaltenen Austauschraten kann dann eine Aussage über die Kooperativität der Faltung und die Homogenität bzw. Heterogenität des Übergangszustands getroffen werden. Im Falle der Faltungsreaktion von CspB konnten für alle untersuchten Aminosäuren ähnliche Austauschraten gefunden werden, wobei die geringen Unterschiede nicht mit den Sekundärstrukturelementen oder den unstrukturierten Schleifenregionen von CspB korrelieren. Das bedeutet, dass die Faltungsreaktion kooperativ verläuft und dass die über die gesamte Sequenz verteilten Sonden den gleichen Prozess spüren. Die gute Übereinstimmung der Austauschraten mit den Ergebnissen der Fluoreszenzmessungen unterstreicht ebenfalls die Signifikanz der erhaltenen Resultate. Zusätzlich wird die essentielle Voraussetzung experimentell belegt, dass das lokale Fluorophor Trp8 eine Sonde für die globale Reaktion darstellt.

### 4.3 Das dimere Protein ORF56 faltet nach dem Zweizustandsmodell

Eine Vielzahl von Proteinfaltungs- und Stabilitätsstudien befasst sich mit monomeren Proteinen aus mesophilen Organismen (Jaenicke, 2000, Schmid, 1999), während die Anzahl dieser Untersuchungen zu dimeren oder oligomeren Proteinen wesentlich geringer ist (Jaenicke, 1999, Jaenicke & Lilie, 2000). Die Charakterisierung der Faltung und Stabilität von Homodimeren erfolgt auch zumeist mit Proteinen aus mesophilen Organismen, wobei der *E. coli* Trp-Aporepressor (Gittelman & Matthews, 1990, Mann & Matthews, 1993) und der P22 Arc-Repressor (Bowie & Sauer, 1989, Milla & Sauer, 1994) wichtige Modellproteine darstellen. Über die Faltungswege hyperthermophiler dimerer Proteine und deren

Stabilisierung gegenüber thermischer, pH- oder Denaturierungsmittel-induzierter Entfaltung ist jedoch nur wenig bekannt (Dams & Jaenicke, 1999, Esser, *et al.*, 1999, Kawamura, *et al.*, 1998, Sterner, *et al.*, 1996, Thoma, *et al.*, 2000). Das homodimere Protein ORF56 aus dem hyperthermophilen und acidophilen Archaeon *Sulfolobus islandicus* zeichnet sich gegenüber diesen durch eine extrem hohe Stabilität aus. Letztere konnte auch schon bei anderen Proteinen aus hyperthermophilen Organismen beobachtet und durch deren thermodynamische und kinetische Eigenschaften erklärt werden. Dabei stellt die Oligomerisierung einen der möglichen Mechanismen der thermischen Stabilisierung dar, jedoch konnten noch keine verallgemeinerbaren Regeln aufgestellt werden (Dams & Jaenicke, 1999, Jaenicke & Böhm, 1998, Jaenicke & Böhm, 2001, Perl, *et al.*, 1998).

Die Bildung des nativen oligomeren Zustands multimerer Proteine beinhaltet sowohl einen Faltungs- als auch einen Assoziationsschritt (Jaenicke & Lilie, 2000). Die prominentesten Vertreter stellen die zuvor schon erwähnten Proteine Arc-Repressor und Trp-Aporepressor dar, die beide in Abwesenheit von Gleichgewichtsintermediaten falten. In dem daraus folgenden Zweizustandsmodell befinden sich nur der monomere entfaltete und dimere gefaltete Zustand im Gleichgewicht. Neben der Dihydrofolatreduktase aus *T. maritima* (Dams & Jaenicke, 1999), der DNA-bindenden Domäne des humanen Papillomavirus E2-Proteins (Mok, *et al.*, 1996b), einem *coiled-coil* Leucin-Zipper Protein (Dürr, *et al.*, 1999) und Spherulin3a (Kretschmar & Jaenicke, 1999) gehört auch ORF56 aufgrund der hier gezeigten Ergebnisse zu dieser Gruppe von Proteinen. Der Übergangsmittelpunkt der thermischen und Denaturierungsmittel-induzierten Entfaltung hängt von der Proteinkonzentration ab, wobei sich der simultane Verlust der Sekundär- und Tertiärstruktur anhand deckungsgleicher Fluoreszenz- und Fern-UV CD-detektierten Entfaltungsübergänge ergibt. Allerdings ist diese Übereinstimmung nicht immer ein verlässlicher Hinweis auf die Abwesenheit von Gleichgewichtsintermediaten und die Existenz eines Zweizustandsmodells. In Faltungsstudien des Fettsäure-bindenden Proteins aus Rattendarm (Ropson & Frieden, 1992), Ferricytochrom c (Russell, *et al.*, 2000) und dem humanen CDK-Inhibitor p19<sup>INK4d</sup> (Zeeb, *et al.*, 2002) ergaben alle untersuchten optischen Sonden übereinstimmende Entfaltungsübergänge und daher ein apparentes Zweizustandsmodell. Eine detaillierte NMR-spektroskopische Charakterisierung dieser Proteine führte jedoch zur Entdeckung von Gleichgewichtsintermediaten. Dies kann allerdings für ORF56 ausgeschlossen werden, da alle 2D NMR-Spektren, die über den gesamten GdmSCN-induzierten Entfaltungsübergang aufgezeichnet wurden, nur Kreuzsignale des nativen und entfalteten Zustands enthalten haben. Insgesamt konnten 31 und 18 Übergänge von Kreuzsignalen des nativen bzw.

entfalteten Proteins analysiert werden, von denen alle äquivalente Mittelpunkte besitzen. Daraus ergibt sich, dass die Populationen der beiden Zustände im Übergangsmittelpunkt bei einer Population von 0.5 schneiden, was ebenfalls die Abwesenheit von Gleichgewichtsintermediaten unterstützt.

Zusätzliche Beweise für die Richtigkeit des angenommenen Zweizustandsmodells wurden aus Experimenten zur Faltungskinetik von ORF56 erhalten. Fluoreszenz- und Fern-UV CD-detektierte Entfaltungs- und Rückfaltungskinetiken ( $k_u$  bzw.  $k_f$ ) sind einphasig und ergeben äquivalente Faltungsraten. Desweiteren hängt nur die Rückfaltungsrate von der Proteinkonzentration ab und die GdmCl-Abhängigkeit von  $\ln k_f$  und  $\ln k_u$  ist linear. Das bedeutet, dass über die gesamte GdmCl-Konzentration keine Veränderung bezüglich des geschwindigkeitsbestimmenden Schritts erfolgt. Ferner werden im Übergangsbereich der GdmCl-induzierten Entfaltung einheitliche Faltungsraten aus Rückfaltungs- und Entfaltungsexperimenten erhalten. Die Übereinstimmung der Ergebnisse der freien Enthalpie der Entfaltung  $\Delta G_U$  und des Kooperativitätsparameters  $m$  aus der Analyse der Gleichgewichtsexperimente und der Faltungskinetiken sprechen ebenfalls für die Existenz des Zweizustandsmodells. In einigen Fällen, wie z.B. dem Arc-Repressor (Milla & Sauer, 1994) oder speziellen GCN4-Peptiden (Wendt, *et al.*, 1995, Zitzewitz, *et al.*, 1995), konnte von so einem kinetischen Zweizustandsmodell berichtet werden, dem eine simultane Faltung und Assoziation der Polypeptidketten zugrunde liegt. Im Gegensatz dazu wurden kinetische Intermediate und komplexere Rückfaltungsmechanismen für den Trp-Aporepressor aus *E. coli* (Gittelman & Matthews, 1990, Mann & Matthews, 1993), die Dihydrofolatreduktase aus *T. maritima* (Dams & Jaenicke, 1999), der DNA-bindenden Domäne des humanen Papillomavirus E2-Proteins (Mok, *et al.*, 1996a), stabilisierten Leucin-Zipper Peptiden (Dürr, *et al.*, 1999, Zitzewitz, *et al.*, 2000) und das Cro-Protein des Phagen 434 (Laurents, *et al.*, 2000) gefunden.

Die enorme thermodynamische Stabilität von ORF56 konnte unter vielfältigen Bedingungen in einem Temperaturbereich von 85 °C und von pH-Werten zwischen pH 2 und pH 12 gezeigt und mit dem Zweizustandsmodell für dimere Proteine analysiert werden. Die Kombination von GdmCl-induzierter Entfaltung bei unterschiedlichen Temperaturen sowie thermischer Entfaltungsübergänge in Anwesenheit verschiedener GdmCl-Konzentrationen, deren Ergebnisse auf 0 M GdmCl extrapoliert wurden, ermöglichte eine fundierte Analyse der Temperaturabhängigkeit von  $\Delta G_U$  (sog. Stabilitätskurve). Die extrapolierten Werte für  $\Delta G_U$  repräsentieren allerdings Stabilitäten von ORF56 unter Hochsalzbedingungen, da die experimentellen Daten in Lösungen mit mindestens 1 M GdmCl gewonnen wurden.

Ähnliches gilt für den zuvor erwähnten Vergleich der thermodynamischen Parameter, die aus Gleichgewichts- und kinetischen Experimenten erhalten wurden. Die maximale Stabilität von ORF56 liegt um 30 °C und liegt somit ungefähr 50 °C unter der optimalen Wachstumstemperatur von *S. islandicus*. Dieses Verhalten wird häufig bei Proteinen thermophiler Organismen beobachtet (Grättinger, *et al.*, 1998, Jaenicke & Böhm, 1998) und zeigt, dass die Stabilisierung dieser Proteine durch eine erhöhte Gibbs'sche freie Enthalpie und nicht durch die Verschiebung des Stabilitätsmaximums zu höheren Temperaturen erfolgt. Bei 80 °C besitzt ORF56 noch 70% seiner maximalen Stabilität und liegt daher selbst bei einer Konzentration von 10 pM noch zu 99% gefaltet vor, was bedeutet, dass das Protein bei der optimalen Wachstumstemperatur von *S. islandicus* immer funktional vorliegt. Die maximale Affinität von ORF56 zu einem doppelsträngigen DNA-Fragment liegt bei 40 °C und beträgt 4 nM (Lipps, *et al.*, 2001b). Die Extrapolation der Dissoziationskonstanten auf 80 °C ergibt einen Wert unter 1 µM. Eine Aussage darüber, ob ORF56 dem Konzept der korrespondierenden Zustände (Jaenicke & Böhm, 1998, Jaenicke & Böhm, 2001) zwischen mesophilen und thermophilen Organismen, wie dies für das Maltose-bindende Protein des hyperthermophilen Bakteriums *T. maritima* gezeigt wurde (Wassenberg, *et al.*, 2000), folgt kann aufgrund des fehlenden korrespondierenden mesophilen Archaeons zu *S. islandicus* nicht getroffen werden.

Allerdings ähneln die hier präsentierten thermodynamischen, kinetischen und strukturellen Eigenschaften von ORF56 dem P22 Arc-Repressor sehr. Die konzentrationsabhängige bimolekulare Faltungsreaktion liegt bei beiden Proteinen im Bereich von  $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Der Hauptunterschied liegt in der extrem hohen Stabilität von ORF56, dessen extrapoliertes Mittelzentrum der thermischen Entfaltung 107 °C gegenüber 54 °C beträgt, was sich in einem  $\Delta G_{\text{U}}(\text{H}_2\text{O})$  von 85 kJ/mol im Vergleich zu 26 kJ/mol widerspiegelt. Die enorme Stabilisierung von ORF56 gegenüber Arc-Repressor leitet sich aus dem besonders großen Unterschied in der Entfaltungsrates ab. ORF56 entfaltet in Abwesenheit von Denaturierungsmittel extrem langsam mit einer Rate von  $1.8 \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1}$  (d.h. 5.7 Jahr<sup>-1</sup>), während Arc-Repressor eine Rate von  $0.1 \text{ s}^{-1}$  besitzt. Die Korrelation zwischen hoher Proteinstabilität und extrem langsamer Entfaltung wurde schon öfter beim Vergleich homologer Proteine aus mesophilen und (hyper)thermophilen Organismen unabhängig vom Oligomerisierungszustand beschrieben. Im Falle der Dihydrofolatreduktase aus *T. maritima* ist die Entfaltungsreaktion um den Faktor  $10^8$  langsamer als im Enzym aus *E. coli*. Ein sehr detaillierter Vergleich wurde anhand homologer Kälteschockproteine aus mesophilen, thermophilen und hyperthermophilen Organismen durchgeführt (CspB aus *B. subtilis*, Bc-Csp aus *B. caldolyticus* und Tm-Csp aus

*T. maritima*) (Perl, *et al.*, 1998). Alle homologen Proteine sind monomer und erreichen den nativen Zustand mit ähnlichen Rückfaltungsraten zwischen  $500 \text{ s}^{-1}$  und  $1500 \text{ s}^{-1}$  nach dem Zweizustandsmodell. Die Entfaltungsraten sind jedoch umgekehrt proportional zur thermischen Stabilität und betragen  $10 \text{ s}^{-1}$  für CspB,  $0.64 \text{ s}^{-1}$  für Bc-Csp und  $0.018 \text{ s}^{-1}$  für Tm-Csp. Weitere Beispiele stellen das Rubredoxin und die Pyrrolidon-Carboxypeptidase aus *Pyrococcus furiosus* dar. Dabei entfaltet das Rubredoxin 2000fach langsamer als das homologe Rubredoxin aus dem mesophilen *Clostridium pasteurianum* (Cavagnero, *et al.*, 1998), während die Pyrrolidon-Carboxypeptidase eine  $10^7$ -fache Erniedrigung der Entfaltungsrates im Vergleich zum homologen Protein aus *B. amyloliquefaciens* aufweist (Ogasahara, *et al.*, 1998). In beiden Fällen gibt es allerdings keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Rückfaltungsraten.

Der Vergleich von ORF56 und P22 Arc-Repressor zeigt den seltenen Fall auf, wo das Protein des thermophilen und mesophilen Organismus sowohl in der Kinetik, als auch unter Gleichgewichtsbedingungen demselben Faltungsmechanismus folgen, was neue Einblicke in die elementaren Faltungsprozesse von Homodimeren und deren Stabilität eröffnet

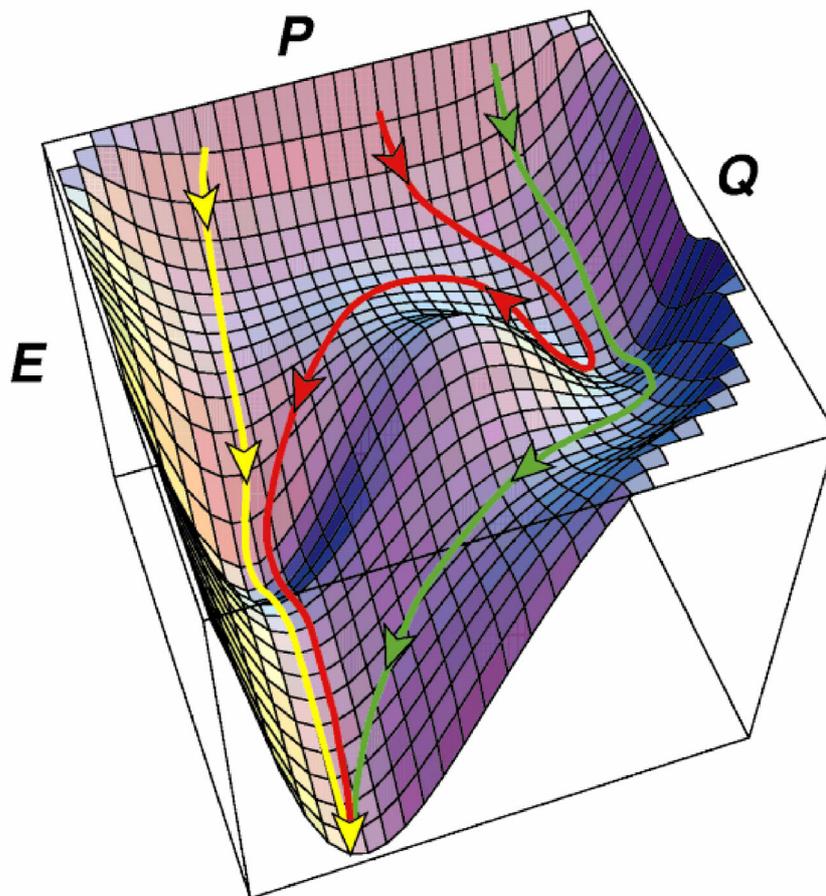
#### 4.4 Die Prolin-limitierte Faltung von S54G/P55N RNase T1

In der nativen Struktur von RNase T1 aus *Aspergillus oryzae* liegen je zwei Peptidyl-Prolylbindungen in der *cis*-Konformation (Pro39, Pro55) und in der *trans*-Konformation (Pro60, Pro73) vor (Heinemann & Saenger, 1982). Dadurch wird der Faltungsmechanismus des Wildtyp-Proteins sehr komplex, da im entfalteten Zustand eine Vielzahl möglicher Kombinationen von Prolylisomeren vorkommt. Die Rückfaltungsreaktion erfährt eine entscheidende Vereinfachung, wenn die beiden Reste Ser54 und Pro55 mittels ortsgerichteter Mutagenese ausgetauscht werden. S54G/P55N RNase T1 faltet in zwei Schritten, wobei zuerst die schnelle Bildung eines teilgefalteten Intermediats erfolgt, welches in einer sehr langsamen Reaktion zum nativen Zustand weiterreagiert (Kiefhaber, *et al.*, 1990a). Der sehr langsame Schritt wird durch die *trans/cis*-Isomerisierung der Tyr38-Pro39-Bindung limitiert. Die Zeitkonstante dieser Isomerisierung liegt in einem Bereich, der für Echtzeit NMR-Studien sehr gut geeignet ist (Balbach, *et al.*, 1995, Balbach, *et al.*, 1999). Bei  $10 \text{ }^\circ\text{C}$  beträgt die Zeitkonstante der Rückfaltung  $7300 \text{ s}$ . Der hydrodynamische Radius ( $R_H$ ) des kinetischen Faltungsintermediats  $I^{39t}$  konnte mit Hilfe von Echtzeit NMR-Diffusionsmessungen bestimmt werden. S54G/P55N RNase T1 kollabiert vor dem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der *trans/cis*-Prolylisomerisierung zu einem hydrodynamischen Radius, der nahezu dem  $R_H$  des nativen Proteins entspricht (Steggorn, *et al.*, 2000).

Für eine detaillierte Analyse der Kooperativität der Faltungsreaktion stehen zwei unterschiedliche 2D Echtzeit NMR-Techniken zur Verfügung. Zum einen kann während der Rückfaltung nur ein einziges 2D NMR-Experiment durchgeführt werden und zum anderen, wie dies auch bei 1D Echtzeit NMR-Experimenten der Fall ist, eine Serie von 2D NMR-Spektren aufgezeichnet werden. Letztere Methode wurde mit sehr schnellen 2D  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  HMQC-Spektren während der Rückfaltung von S54G/P55N RNase T1 angewendet. Das 2D  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  HMQC-Spektrum von I<sup>39t</sup> zeichnet sich durch eine sehr gute Dispersion und scharfe Linien aus und ist dem Spektrum eines Proteins mit definierter Sekundärstruktur- und Tertiärstrukturkontakten sehr ähnlich. Faltungsintermediate die lediglich lokale Sekundärstrukturen enthalten, reichen für eine gute Dispersion der Signale nicht aus. Beispielsweise enthält das 2D  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  HSQC-Spektrum des *molten globule*-Zustands von  $\alpha$ -Lactalbumin nur wenige gut aufgelöste Kreuzsignale und meist breite Linien, die in einem engen Bereich der chemischen Verschiebung zwischen 7.8 ppm-8.5 ppm ( $^1\text{H}$ ) und 117 ppm-122 ppm ( $^{15}\text{N}$ ) zusammenfallen (Balbach, *et al.*, 1996). Zusätzlich konnten in der Serie von 2D-Spektren drei unterschiedliche Zeitabhängigkeiten der Intensität der Kreuzsignale gefunden werden. Eine konstante Intensität zeigen dabei diejenigen Aminosäuren, die sowohl im nativen als auch intermediären Zustand eine identische chemische Verschiebung und somit auch eine äquivalente strukturelle Umgebung besitzen. Ansteigende und abfallende Intensitäten repräsentieren den sich bildenden nativen bzw. den zerfallenden intermediären Zustand. Die Analyse von 66 individuellen Kinetiken zeigte, dass alle Reste derselben geschwindigkeitsbestimmenden Prolylisomerisierung folgen und somit die kooperative Rückfaltung vollständig synchronisiert abläuft (Steggborn, *et al.*, 2000). Übereinstimmende Ergebnisse wurden erhalten, wenn während der Rückfaltung von S54G/P55N RNase T1 ein einziges 2D Echtzeit  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  HSQC aufgezeichnet wurde. Hierbei schlägt sich die Kinetik der Reaktion in der Linienform der indirekten Dimension des 2D-Spektrums nieder (Balbach, *et al.*, 1996). Durch die Simulation des Resonanzsignals kann die Rückfaltungsrate erhalten werden, die für die 19 analysierten Reste ebenfalls äquivalente Raten aufweisen. Desweiteren entsprechen sich die Kreuzsignale, die eine konstante, abfallende oder ansteigende Intensität in den beiden unterschiedlichen 2D Echtzeit NMR-Experimenten aufweisen.

Für strukturelle Charakterisierungen von nativen oder transienten Zuständen sind NOE-Informationen am aussagekräftigsten. In einem 2D Echtzeit NOESY-Experiment wurden ca. 200 NOE-Kreuzsignale des Faltungsintermediats zugeordnet (Balbach, *et al.*, 1999). Durch die Erniedrigung der Temperatur auf 1 °C erhöht sich die Zeitkonstante der Rückfaltung von S54G/P55N RNase T1 auf ca. 21000 s. Damit ist die Rückfaltung so stark verlangsamt, dass

erstmalig ein kinetisches 3D Echtzeit NOESY-HSQC aufgezeichnet werden konnte. Dabei wurde die charakteristische Linienform entweder in der indirekten  $^1\text{H}$ - oder  $^{15}\text{N}$ -Dimension generiert. Nach der Rückfaltung erfolgte noch die Aufzeichnung eines Referenzexperiments unter identischen Bedingungen, um die NOE-Kreuzsignale des nativen Proteins im kinetischen Spektrum eindeutig identifizieren zu können. Mit Hilfe dieser vier Spektren war es möglich, die vollständige Zuordnung der Resonanzen des Intermediats zu treffen und viele weitere NOE-Kreuzsignale des Intermediats zu identifizieren, womit die Basis für eine nachfolgende Strukturbestimmung dieser transienten Spezies gelegt ist.



**Abb. 103:** Hypothetischer Faltungstrichter eines Proteins. Drei mögliche Wege zum entfalteten Zustand vom nativen Zustand sind farblich hervorgehoben. Die drei Achsen entsprechen (P) der Zahl der Konformationen, (E) der freien Energie und (Q) der Zahl der nativen Kontakte. Die Abbildung ist dem Übersichtsartikel (Dobson *et al.*, 1998) entnommen.

Nach dem sog. *new view* der Proteinfaltung kann jeder Vertreter des breiten Ensembles von Konformationen des entfalteten Zustands auf einem individuellen Weg innerhalb einer für jedes Protein charakteristischen Energielandschaft zum nativen Zustand gelangen. Diese Energielandschaft wird durch die Zahl der Konformationen, die freie Enthalpie und die Zahl der bereits nativen Kontakte aufgespannt (Abb. 103). Im Falle der Rückfaltung von

S54G/P55N RNase T1 teilen sich die Konformationen des entfalteten Zustands in schnell und langsam rückfaltende Spezies gemäß der Konformation der Y38-P39 Peptidbindung. Die Position des Faltungsintermediat in der Energielandschaft kann jetzt aufgrund der NMR Charakterisierung festgelegt werden. Aus den Schutzfaktoren der Rückgratamide ergab sich, dass das Intermediat bereits 40% der freien Enthalpie zwischen gefaltetem und entfaltetem Zustand gewonnen hat. Die definierte Tertiärstruktur zeigt, dass P an dieser Stelle bereits dem nativen Zustand sehr nahe kommt. Aus den Echtzeit NOESY Experimenten kann Q mit ca. 0.6 abgeschätzt werden. Dieses Beispiel zeigt, dass die NMR-Spektroskopie in Zukunft einen wichtigen experimentellen Beitrag für die theoretische Beschreibung der Proteinfaltung leisten wird, wie er mit anderen Methoden nicht möglich ist.

#### 4.5 Die komplexe Faltungsreaktion des humanen CDK-Inhibitors p19<sup>INK4d</sup>

Das humane Tumorsuppressorprotein p19<sup>INK4d</sup> gehört zu der Familie von CyclinD-abhängigen Kinaseinhibitoren von CDK4 und CDK6 und besitzt eine aus fünf Ankyrin-Einheiten (ANK) modular aufgebaute Tertiärstruktur. Dabei besteht ein 33 Aminosäuren umfassendes Ankyrin-Motiv aus zwei antiparallelen  $\alpha$ -Helices, die durch eine Schleife voneinander getrennt sind. An die zweite  $\alpha$ -Helix folgt eine weitere Schleife die die einzelnen ANK verbindet und eine  $\beta$ -hairpin Struktur ausbildet. Die daraus resultierende reguläre Topologie weist grundlegende Unterschiede zu globulären Proteinen auf. Besonders die Abwesenheit eines zentralen hydrophoben Kerns und die lokalen Wechselwirkungen zwischen Aminosäuren, die sich in der Primärsequenz nahe sind, machen diese Proteine p16<sup>INK4a</sup> (Tang, *et al.*, 1999, Tang, *et al.*, 2003, Zhang & Peng, 2000), p19<sup>INK4d</sup> (Zeeb, *et al.*, 2002) oder die Ankyrin-Domäne des Notch-Repressors (Marchetti Bradley & Barrick, 2002, Zweifel & Barrick, 2001) zu sehr interessanten Modellproteinen zum Studium der Proteinfaltung (siehe Abb. 104).

Die Beobachtung der Harnstoff-induzierten Entfaltung von p19<sup>INK4d</sup> mit Fern-UV CD und Phenylalaninfluoreszenz ergab ein apparentes Zweizustandsmodell der Faltung unter Gleichgewichtsbedingungen. Durch eine detaillierte NMR-spektroskopische Analyse wurde allerdings ein Gleichgewichtsintermediat zum Vorschein gebracht, das in den CD- und Fluoreszenz-detektierten Übergängen nicht beobachtet werden konnte. Dies kann zum einen auf die sehr ähnlichen spektroskopischen Eigenschaften des intermediären und entfalteten Zustands bezüglich der optischen Methoden und zum anderen auf die eingesetzten globalen Sonden zurückgeführt werden. Die heteronukleare 2D NMR-Spektroskopie bietet entscheidende Vorteile gegenüber den optischen Methoden, da eine Vielzahl lokaler und

unabhängiger Sonden simultan über den Faltungsprozess Auskunft geben können. Zusätzlich ist die chemische Verschiebung sehr empfindlich gegenüber strukturellen Veränderungen, so dass die Störung von Interaktionen einzelner Reste detektiert werden können. In den 2D NMR-Spektren des Harnstoff-induzierten Entfaltungsübergangs von p19<sup>INK4d</sup> konnten neben den Kreuzsignalen des nativen und des entfalteten Proteins (N bzw. U) auch Resonanzen einer dritten, intermediären Spezies (I) aufgelöst werden. Alle Entfaltungsübergänge der analysierten Kreuzsignale des nativen Proteins sind nahezu deckungsgleich und ergeben somit einen äquivalenten Übergangsmittelpunkt bei 2.9 M Harnstoff sowie vergleichbare Kooperativitäten. Für die Analyse der Kreuzsignale des entfalteten Proteins ergibt sich ein ähnliches Bild bezüglich der Übereinstimmung der einzelnen Übergänge, jedoch sind die Übergangsmittelpunkte im Vergleich zu den Übergangsmittelpunkten des nativen Zustands zu deutlich höheren Harnstoffkonzentrationen verschoben und liegen bei 3.6 M Harnstoff. Dennoch kann die Entfaltung von p19<sup>INK4d</sup> im Gleichgewicht als konzertierte Reaktion des gesamten Proteins verstanden werden. Diese Feststellung ist bei ANK-Proteinen nicht selbstverständlich, da die aus sequentiell angeordneten  $\alpha$ -Helices bestehende gestreckte Tertiärstruktur ohne eine Vielzahl von weitreichenden Wechselwirkungen stabilisiert wird. Für p16<sup>INK4a</sup> und die Ankyrin-Domäne des Notch-Rezeptors wird eine sequentielle Entfaltung (Tang, *et al.*, 2003) bzw. eine limitierte Kooperativität der Entfaltung diskutiert (Marchetti Bradley & Barrick, 2002).

Der zwingendste Befund für die Existenz eines dritten Zustands bei mittleren Harnstoffkonzentrationen stellt die Identifizierung zusätzlicher Kreuzsignale im 2D NMR-Spektrum dar, die weder dem nativen noch dem entfalteten Protein zugeordnet werden konnten. Insgesamt konnten acht gut aufgelöste Resonanzen gefunden werden, deren maximale Intensität um 3.2 M Harnstoff zu finden ist. Der transiente Intensitätsverlauf dieser Signale entspricht demjenigen, der aus den Populationen von N und U theoretisch vorhergesagt wurde. Ferner ist die Dispersion der chemischen Verschiebung der Kreuzsignale des Intermediats gering, so dass alle anderen Resonanzen von I mit den Kreuzsignalen des entfalteten Zustands überlagert vorliegen oder aufgrund einer extremen Linienverbreiterung nicht beobachtet werden können. Die geringe Dispersion der Kreuzsignale von I bestätigt die oben getroffene Annahme, dass wegen der strukturellen Ähnlichkeit von I und U diese mittels optischer Spektroskopie nicht unterscheidbar sind und dadurch der mit Fluoreszenz- oder CD-detektierte Harnstoff-induzierte Übergang mit dem Übergang der Kreuzsignale des nativen Proteins übereinstimmt.

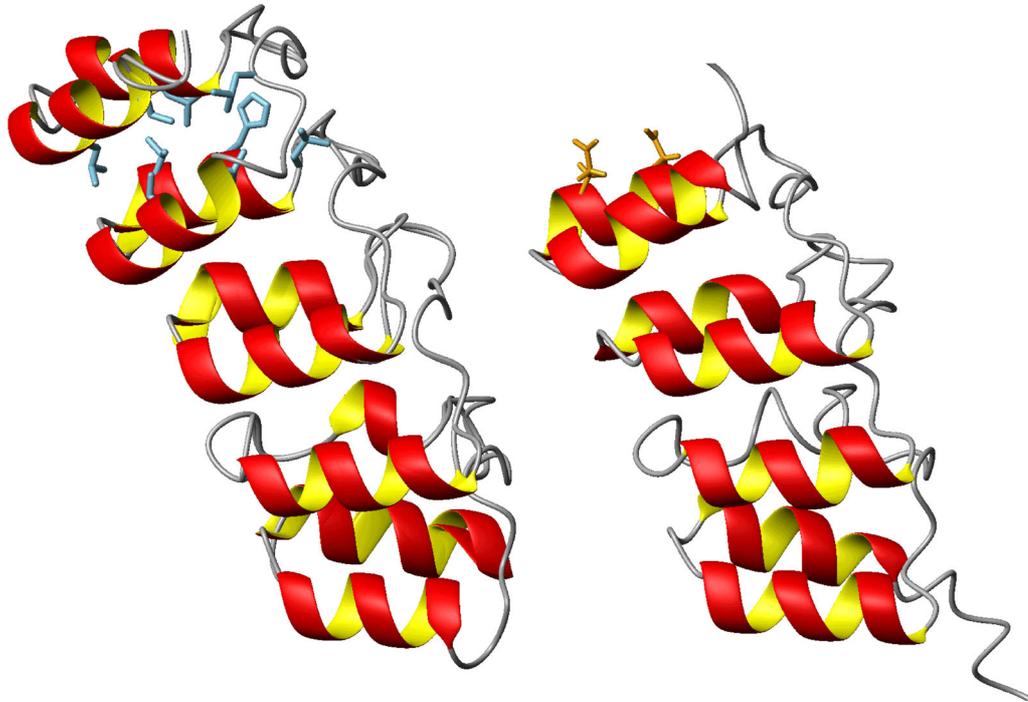
Die Abweichung der NMR-Daten vom Zweizustandsmodell könnte möglicherweise auf die Aggregation bei mittleren Harnstoffkonzentrationen zurückgeführt werden, was zu einer apparenten Erniedrigung der Intensität der Kreuzsignale führen würde. Dies kann aufgrund der über den gesamten Harnstoffkonzentrationsbereich konstanten Intensität des C-terminalen L166 ausgeschlossen werden, das identische chemische Verschiebungen im nativen und entfalteten Protein besitzt. Das bedeutet, dass die Proteinkonzentration in Lösung invariant ist. Desweiteren zeigte ein Harnstoff-induzierter Übergang, der mit NMR-Diffusionsmessungen verfolgt wurde, dass der mittlere hydrodynamische Radius des Proteins im gesamten Übergang zwischen den Werten des nativen und entfalteten p19<sup>INK4d</sup> liegt, so dass auch die Bildung oligomerer Aggregate ausgeschlossen werden kann. Für andere Proteine konnten ebenfalls Abweichungen zwischen NMR- und Fluoreszenz- oder CD-detektierten Harnstoff-induzierten Entfaltungsübergängen gefunden werden. Dabei verhalten sich Ferricytochrom c (Ropson & Frieden, 1992) und das Fettsäure-bindende Protein aus Rattendarm (Russell, *et al.*, 2000) vergleichbar zu p19<sup>INK4d</sup>, da hier auch ein mittels optischer Spektroskopie nicht detektierbares Entfaltungsintermediat mit NMR-Spektroskopie gefunden wurde. Der mit Fluoreszenz- und CD-Spektroskopie beobachtete Entfaltungsübergang von Apoflavodoxin aus *Azotobacter vinelandii* stimmt nicht miteinander überein, kann aber mit einem Modell beschrieben werden, das unter Gleichgewichtsbedingungen ein *molten globule*-ähnliches Intermediat berücksichtigt. Interessanterweise verläuft der NMR-detektierte Übergang von 21 Rückgratamiden deckungsgleich mit dem Fluoreszenz-detektierten Übergang (van Mierlo, *et al.*, 1998, van Mierlo, *et al.*, 2000). Die Harnstoff-induzierte Entfaltung einer CheY-Variante ergibt je nach Proteinkonzentration teilweise übereinstimmende Ergebnisse der Fluoreszenz- und NMR-Detektion, wobei die Bildung eines *on-pathway molten globule*-ähnlichen Intermediats erfolgt, welches *off-pathway* assoziieren kann. Alternativ bildet sich daraus ein weiteres sequentielles Intermediat mit einer kollabierten N-terminalen und entfalteten C-terminalen Domäne (Garcia, *et al.*, 2002). Allerdings gibt es auch Proteinfaltungsreaktionen, die keine unterschiedlichen Ergebnisse zwischen NMR- und optischer Spektroskopie zeigen. Ein Beispiel dafür ist das kleine globuläre Histidin-enthaltende Phosphotransportprotein Hpr aus *E. coli*, dessen langsame Faltung nach dem Zweizustandsmodell folgt, was mit allen verwendeten Sonden übereinstimmend gefunden wurde (van Nuland, *et al.*, 1998c).

Durch die sequentielle Anordnung der Sekundärstrukturelemente von p19<sup>INK4d</sup> könnte angenommen werden, dass zu Beginn der Rückfaltung die Bildung individueller Helices erfolgt, die dann einzelne Ankyrin-Einheiten bilden. Als letzter Schritt würde dann die

Zusammenlagerung der Ankyrin-Motive die native Struktur entstehen lassen. Unter stark nativen Bedingungen werden tatsächlich drei Rückfaltungsphasen beobachtet, die in zeitaufgelösten Fern-UV CD-detektierten Experimenten über die Bildung der  $\alpha$ -helikalen Struktur verfolgt wurden. In 1D Echtzeit NMR-Experimenten können strukturelle Änderungen mit einer weit höheren Auflösung als mit Hilfe optischer Spektroskopie studiert werden. Vergleichbare Rückfaltungsraten konnten mittels Fluoreszenz-, CD- und Echtzeit NMR-Spektroskopie für einige Proteine bestimmt werden (Balbach, *et al.*, 1995, Guijarro, *et al.*, 1998, Hoeltzli & Frieden, 1996, Killick, *et al.*, 1998, Laurents & Baldwin, 1997, van Nuland, *et al.*, 1998a). Für p19<sup>INK4d</sup> konnte die langsamste Phase der Rückfaltung mit einem 1D Echtzeit NMR-Experiment aufgelöst werden, wobei die damit bestimmte Rate sehr gut mit derjenigen übereinstimmt, die mittels CD-Spektroskopie erhalten wurde. Das zeigt, dass trotz der unterschiedlichen Ergebnisse zwischen CD- und NMR-Spektroskopie unter Gleichgewichtsbedingungen, die langsamste Rückfaltungsrate unabhängig von der Proteinkonzentration ist. Desweiteren zeigt die Übereinstimmung der Rate, dass die Bildung der Sekundär- und Tertiärstruktur kooperativ erfolgt, was z.B. bei apo  $\alpha$ -Lactalbumin nicht der Fall ist (Balbach, *et al.*, 1995). Die Bildung der nativen Moleküle und das Verschwinden der entfalteten Spezies finden mit der gleichen Rate statt, so dass zu Beginn der langsamsten Phase der Rückfaltung ein völlig unstrukturierter Zustand mit möglicherweise unterschiedlichen Prolyl-isomeren vorliegt. Dies stellt die umgekehrte Situation wie bei der Rückfaltung von RNase T1 dar, die ebenfalls durch eine Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung ratenlimitiert ist (Balbach, *et al.*, 1999), wobei die sehr langsame Rückfaltungsphase von einem sehr gut strukturierten Intermediat ausgeht. Noch ist nicht klar, ob die langsamste Phase von p19<sup>INK4d</sup> von der Heterogenität des entfalteten Zustands, vom Gleichgewichtsintermediat, welches bei 2 M Harnstoff zu einem gewissen Teil vorliegt, oder von einem unstrukturierten kinetischen Intermediat ausgeht. Die beiden schnellen Phasen der Rückfaltung sind in der Totzeit des Echtzeit NMR-Experiments abgeschlossen und konnten daher nur mit *stopped flow* CD-Spektroskopie detektiert werden. Im ersten NMR-Spektrum nach der Initiation der Rückfaltung führen die beiden Phasen zur Bildung von 83% des nativen Proteins. Aus der gemeinsamen Analyse der schnellen und langsamen Rückfaltungsphasen lässt sich schließen, dass die Reaktionen eher parallel als sequentiell erfolgen.

Die Proteinfaltung und Stabilität des humanen CDK-Inhibitors p16<sup>INK4a</sup>, einem weiteren Vertreter der INK4-Familie, wurde von Tang *et al.* näher untersucht (Tang, *et al.*, 1999, Tang, *et al.*, 2003). Die Sequenzhomologie zwischen p16<sup>INK4a</sup> und p19<sup>INK4d</sup> beträgt ca. 40%, so dass

ein Vergleich dieser beiden strukturell und funktionell verwandten Proteine (Chan, *et al.*, 1995) einen Einblick zum Verständnis in die unterschiedlichen Stabilitäten und Faltungsmechanismen innerhalb einer Proteinfamilie beitragen sollte. Sowohl p19<sup>INK4d</sup> als auch p16<sup>INK4a</sup> folgen unter Gleichgewichtsbedingungen einem apparenten Zweizustandsmodell sofern die Faltung mittels optischer Spektroskopie beobachtet wird.



**Abb. 104:** Vergleich der dreidimensionalen Struktur von p19<sup>INK4d</sup> (links) und p16<sup>INK4a</sup> (rechts). Die Seitenketten der im Text angesprochenen Aminosäuren die den hydrophoben Kern in p19<sup>INK4d</sup> zwischen Ankyrin-Einheit 4 und 5 bilden sind hervorgehoben. In p16<sup>INK4a</sup> wurden die Seitenketten von Asp112 und Glu115 dargestellt. Die unstrukturierten Bereiche von p16<sup>INK4a</sup> an den beiden Termini wurden nicht gezeigt sondern nur die Reste 7-138. Die Abbildung wurde mit MolMol (Koradi *et al.*, 1996) angefertigt.

Die Übergangsmittelpunkte der Harnstoff-induzierten Entfaltung liegen bei 2.9 M (p19<sup>INK4d</sup>, 15 °C) und 1.9 M (p16<sup>INK4a</sup>, 25 °C) Harnstoff, wobei der geringe Temperaturunterschied die erhöhte Stabilität von p19<sup>INK4d</sup> nicht erklären kann. Das heißt, dass vermutlich die fünfte Ankyrin-Einheit von p19<sup>INK4d</sup> dessen thermodynamische Stabilität im Vergleich zu p16<sup>INK4a</sup> signifikant erhöht, da p16<sup>INK4d</sup> lediglich vier Ankyrin-Motive enthält. Die fünfte Ankyrin-Einheit von p19<sup>INK4d</sup> trägt einen zusätzlichen hydrophoben Kern bei, der aus fünf Leucinen (Leu109, Leu132, Leu145, Leu154, Leu158), zwei Valinen (Val115, Val123), Ile118 und His112 besteht (Abb. 104). Sechs dieser hydrophoben Reste werden vom vierten Ankyrin-Segment von p19<sup>INK4d</sup> beigesteuert. In p16<sup>INK4a</sup> sind einige hydrophobe Seitenketten durch geladene Aminosäuren ersetzt (Asp112, Glu115, Arg132), um die Exposition großer hydrophober Oberflächen am C-Terminus zu vermeiden. Interessanterweise zeigen die Reste

des fünften Ankyrin-Motivs von p19<sup>INK4d</sup> die höchste Helixwahrscheinlichkeit der gesamten Sequenz bei einer Analyse mit dem Programm AGADIR (Munoz & Serrano, 1995a, Munoz & Serrano, 1995b). Dies zeigt ebenso, wie wichtig die Helices 9 und 10 für die Bildung der nativen Tertiärstruktur von p19<sup>INK4d</sup> sind. Experimentell konnte dies an dem sehr hohen Stabilitätsverlust einer verkürzten Variante von p19<sup>INK4d</sup> gezeigt werden, die nur noch aus vier Ankyrin-Einheiten besteht (Löw, 2003). Die Untersuchung von Peptidfragmenten von p16<sup>INK4a</sup> zeigte, dass nur die beiden C-terminalen Ankyrin-Segmente eine autonome Faltungseinheit darstellen, während Peptide mit der Sequenz eines Ankyrin-Motivs unstrukturiert vorliegen (Zhang & Peng, 2000). Kürzlich wurde von zwei unabhängigen Arbeitsgruppen durch Sequenzanalyse von über 4000 Proteinen die Ankyrin-Einheiten enthalten, eine sehr ähnliche Konsensus-Sequenz postuliert (Kohl, *et al.*, 2003, Mosavi, *et al.*, 2002). Jedoch zeigt auch hier das Peptid mit lediglich einem Ankyrin-Segment keine Sekundärstruktur (Mosavi, *et al.*, 2002). Die hergestellten Proteine mit drei, vier, fünf und sechs Ankyrin-Einheiten sind stark stabilisiert, wobei der Übergangsmittelpunkt der thermischen bzw. der GdmCl-induzierten Entfaltung mit zunehmender Anzahl der ANK-Motive bedeutend zunimmt. Die Kristallstrukturen von Proteinen, die drei und vier (Mosavi, *et al.*, 2002) bzw. fünf ANK-Segmente enthalten (Kohl, *et al.*, 2003) konnten ebenfalls bestimmt werden.

Neben den Unterschieden von p19<sup>INK4d</sup> und p16<sup>INK4a</sup> bezüglich ihrer Struktur und Stabilität sind die Rückfaltungskinetiken bemerkenswert ähnlich. Beide Proteine besitzen bei niedrigen Harnstoffkonzentrationen drei Rückfaltungsphasen und eine Entfaltungsphase. Nur jeweils die schnellste Rückfaltungsphase von p19<sup>INK4d</sup> und p16<sup>INK4a</sup> hängt signifikant von der Harnstoffkonzentration ab, wobei diese unter stark nativen Bedingungen lediglich bei p16<sup>INK4a</sup> einen sog. *roll-over* zeigt. Die Abweichung vom linearen Verhalten von  $\ln k_f$  von der Denaturierungsmittelkonzentration wird üblicherweise bei der Bildung eines wenig stabilen kinetischen Intermediats gefunden. Allerdings muss hier angemerkt werden, dass die Rückfaltungskinetiken von p16<sup>INK4a</sup> und p19<sup>INK4d</sup> mit *stopped flow* Fluoreszenzspektroskopie bzw. mit *stopped flow* CD-Spektroskopie erhalten wurden, da p19<sup>INK4d</sup> kein Tryptophan oder Tyrosin besitzt. Die *stopped flow* Fluoreszenzspektroskopie weist eine deutlich kürze Totzeit und vor allem ein wesentlich besseres Signal/Rausch-Verhältnis auf. Aufgrund dieser apparativen Unterschiede könnte bei der Bestimmung der Rückfaltungskinetiken unter stark nativen Bedingungen der *roll-over* verloren gegangen sein.

Die zweite, deutlich langsamere Rückfaltungsphase von p16<sup>INK4a</sup> zeigt nur eine Änderung in der Fluoreszenz, während keine messbare Änderung in *stopped flow* CD-Experimenten

gefunden werden konnte. Daher spekulierten die Autoren, dass ein während der Rückfaltung möglicherweise populierte Intermediat überwiegend unstrukturiert ist (Tang, *et al.*, 1999). Während der Rückfaltung von p19<sup>INK4d</sup> geben alle drei Phasen eine detektierbare Änderung der molaren Elliptizität im Fern-UV CD-Bereich. In beiden Proteinen wurde die zweite Phase der Rückfaltung bis zu einer Konzentration < 1.5 M Harnstoff erhalten, die jedoch nahezu unabhängig von der Harnstoffkonzentration ist.

Die dritte, sehr langsame Phase von p16<sup>INK4a</sup> und p19<sup>INK4d</sup> zeigt ebenfalls keine Harnstoffabhängigkeit und wird durch Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen (PPIasen) beschleunigt, wobei ersteres zehn und letzteres sieben Peptidyl-Prolylbindungen in der *trans*-Konformation im nativen Zustand besitzt. Tang *et al.* zeigten mit Hilfe eines Doppelmischungsexperiments, dass die Heterogenität des Isomerisierungszustands dieser Peptidyl-Prolylbindungen im entfalteten Zustand sehr wahrscheinlich die Ursache für die sehr langsame Phase darstellt (Tang, *et al.*, 1999).

Ein direkter Vergleich der Amplituden der drei Rückfaltungsphasen ist aufgrund der unterschiedlichen Sonden, die zur Beobachtung der Kinetiken herangezogen wurden, nicht möglich, da jede Phase einen bestimmten Beitrag zum Fluoreszenz-, CD- oder NMR-Signal liefert. Für beide Proteine gilt jedoch, dass die detektierte Amplitude der Änderung der Fluoreszenz oder Elliptizität entspricht, die aus den Gleichgewichtsstudien vorhergesagt wurden. Das bedeutet, dass sehr schnelle Faltungsprozesse innerhalb der Totzeit der *stopped flow*-Experimente ausgeschlossen werden können.

Tang *et al.* schlugen vor, dass die Proteine der INK4-Familie aufgrund ihrer regulatorischen Funktion im Allgemeinen eine thermodynamische und kinetische Instabilität besitzen sollten (Tang, *et al.*, 1999). p19<sup>INK4d</sup> zeigt jedoch keine signifikante Abweichung in der Stabilität von anderen Proteinen dieser Größe und vernünftige kinetische Barrieren bei einer vergleichbaren inhibitorischen Aktivität zu p16<sup>INK4a</sup>. Daher könnte die im Vergleich zu p16<sup>INK4a</sup> erhöhte thermodynamische und kinetische Stabilität von p19<sup>INK4d</sup> vorteilhaft unter weniger günstigen Bedingungen in der Zelle sein. Beispielsweise tauscht das weniger stabile p16<sup>INK4a</sup> bei höheren Temperaturen schneller mit dem entfalteten Zustand aus als p19<sup>INK4d</sup> und kann daher effizient degradiert werden. Unter diesen Bedingungen könnte p19<sup>INK4d</sup> dann die Funktion der weniger stabilen INK4-Inhibitoren in der Kontrolle des Zellzyklus komplementieren.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Die biologische Funktion von Proteinen basiert in den meisten Fällen auf einer definierten dreidimensionalen Struktur, die sich im Verlauf der Proteinfaltung ausbildet. In dieser Arbeit wurden die Struktur und Faltung der Modellproteine CspB aus *B. subtilis*, RNase T1 aus *A. oryzae*, ORF56 aus *S. islandicus* sowie des humanen CDK-Inhibitors p19<sup>INK4d</sup> mit einer Reihe biophysikalischer Methoden ausführlich charakterisiert.

Zunächst wurde die schnelle intramolekulare Dynamik von CspB bei verschiedenen Lösungsmittelviskositäten untersucht, das selbst in 70% EG eine unveränderte native Struktur besitzt. Die Rotationskorrelationszeit  $\tau_c$  wurde durch eine erweiterte Lipari-Szabo-Analyse der <sup>15</sup>N-Relaxationsparameter iterativ optimiert. Die relative  $\tau_c$  folgt bis zu einer relativen Viskosität von 2 (entspricht 27% EG) der linearen Abhängigkeit der Stokes-Einstein-Gleichung, weicht jedoch bei einer relativen Viskosität von 6 (70% EG) um 30% vom vorhergesagten linearen Verhalten ab. Der hydrodynamische Radius zeigt dahingegen keine Abweichung vom linearen Verhalten von der relativen Makroviskosität.  $\tau_c$  stellt somit einen empfindlichen Sensor gegenüber der unmittelbaren Umgebung des Proteins innerhalb der Hydratationshülle dar, wobei die Geschwindigkeit der Gesamtbewegung nicht von der Größe des Proteins inklusive seiner Hydratationshülle sondern vielmehr von deren Mikroviskosität abhängt. Die Dynamik im Picosekunden- bis Nanosekundenbereich, die durch den Ordnungsparameter  $S^2$  der Lipari-Szabo-Analyse ausgedrückt wird, bleibt nahezu unverändert mit steigender EG-Konzentration, wobei das untere Limit des Beobachtungsfensters der internen Korrelationszeit  $\tau_e$  bei 70% EG auf über 0.5 ns angehoben wird. Der Beitrag des chemischen Austauschs  $R_{ex}$  zur transversalen Relaxationsrate  $R_2$  aus der Lipari-Szabo-Analyse stimmt gut mit den experimentell (Relaxationsrate der kreuzkorrelierten <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N-dipolaren/<sup>15</sup>N CSA-Relaxation  $\eta_{xy}$ ) bestimmten  $R_{ex}$ -Werten überein. Diese sind über das ganze Protein verteilt und nicht mit Sekundärstrukturen oder flexiblen Schleifen korreliert, so dass  $R_{ex}$  nicht wie üblicherweise auf die lokale Dynamik einzelner Reste sondern auf die globale Faltungsreaktion von CspB im Millisekundenbereich zurückgeführt werden kann. Die EG-Abhängigkeit der Größe und der Anzahl der  $R_{ex}$ -Beiträge (55 und 6  $R_{ex}$  bei 0% bzw. 70%) ist auf die Stabilisierung von CspB durch EG und die viskositätsbedingte Reduktion der Faltungsraten zurückzuführen.

Die Kooperativität der Millisekundenfaltung von CspB wurde anhand verschiedener dynamischer NMR-Methoden sehr detailliert untersucht, wobei die Bestimmung der Austauschraten bzw. des  $R_{ex}$  mit  $R_2$ -Dispensionsmessungen die verlässlichsten Ergebnisse

lieferte. Die 24 analysierten ortsspezifischen Sonden zeigen sehr ähnliche apparente Faltungsraten  $k_{ex}$ , die mit den Fluoreszenz-detektierten  $k_{ex}$  gut übereinstimmen. Die Faltungsreaktion verläuft kooperativ und vermutlich über einen wenig heterogenen Übergangszustand. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass die lokale Sonde Trp8 die globale Faltungsreaktion sehr gut wiedergibt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Wechselwirkung von CspB mit einzelsträngiger DNA (ssDNA) auf struktureller Ebene charakterisiert werden. Die aus Sequenzvergleichen postulierte potentielle Bindungsregion (RNP1 und RNP2) von CspB wurde mittels NMR-Titrationsexperimenten verifiziert. Dabei konnten neben den Aminosäuren der beiden postulierten Bindungsmotive RNP1 (K13, G14, F15, G16, F17) und RNP2 (F27, H29, F30) auch zusätzliche Reste identifiziert werden (F9, G35, G37, F38), die für die Interaktion sehr wichtig sind und in der Aminosäuresequenz weit entfernt vorliegen. Die Beiträge einzelner Reste zur Bindungsaffinität wurden anhand einer Reihe von CspB-Varianten bestimmt, in denen jeweils eine Aminosäure ausgetauscht wurde. Die Beiträge der Lösungsmittel-exponierten Phenylalanine sind essentiell für eine feste Bindung. Der Austausch eines Phenylalanins durch Alanin führt zu einer starken Erhöhung der Komplexdissoziationskonstanten, die bei dT7-Komplexen bis zu 150fach betragen kann. Desweiteren führt die Einschränkung der Anzahl möglicher Rückgratkonformationen durch den Austausch von Glycinen in den Schleifenregionen durch Prolin zu einer signifikanten Erniedrigung der Affinität. Aus der Strukturbestimmung von CspB im Komplex mit dem ssDNA-Fragment dT7 folgte, dass die Struktur bezüglich des fünfsträngigen antiparallelen  $\beta$ -Faltblatts unverändert vorliegt, jedoch die Schleifen zwischen den  $\beta$ -Strängen  $\beta_3$  und  $\beta_4$  sowie  $\beta_4$  und  $\beta_5$  teilweise umstrukturiert werden. Die Hauptunterschiede befinden sich in der relativen Orientierung der aromatischen Seitenketten, die größtenteils für die Interaktion von CspB mit dT7 verantwortlich sind. Eine Strukturbestimmung des Komplexes war aufgrund der hohen Dynamik des Systems nicht möglich. Die Modellierung der Struktur des Komplexes mit dem Programm HADDOCK bestätigt die vermuteten Stapel-Wechselwirkungen einiger aromatischer Seitenketten mit den Basen der ssDNA und zeigt einige intermolekulare Kontakte über Wasserstoffbrücken auf. Durch die Bindung der Nukleinsäure wird CspB stabilisiert, was sich in einer veränderten internen Dynamik sowohl im Picosekunden- bis Nanosekundenbereich durch die Erhöhung von  $S^2$ , als auch durch den Verlust von  $R_{ex}$ -Beiträgen im Millisekundenbereich ausdrückt.

Neben dem Kälteschockprotein wurde die Faltung des homodimeren Proteins ORF56 aus dem acidohalophilen und hyperthermostabilen Archaeon *Sulfolobus islandicus* sehr detailliert

mit einer Fülle von biophysikalischen Methoden (Fluoreszenz, CD, NMR, *stopped flow* Fluoreszenz bzw. CD) studiert sowie dessen vorläufige dreidimensionale Struktur bestimmt, die der Struktur des P22 Arc-Repressor sehr ähnelt. Die Faltung von ORF56 kann sowohl im Gleichgewicht als auch in der Faltungskinetik mit dem einfachen Zweizustandsmodell für dimere Proteine beschrieben werden. Das Protein besitzt eine außerordentlich hohe Stabilität gegenüber Denaturierungsmittel-, Hitze- und pH-induzierter Entfaltung was in dem extrapolierten Schmelzpunkt der thermischen Entfaltung von 107 °C (pH 7.5, bei 5 µM ORF56) sowie einem  $\Delta G_U(\text{H}_2\text{O})$  aus GdmCl- und GdmSCN-induzierten Entfaltungsübergängen von 85 kJ/mol bei pH 7.5 zum Ausdruck kommt. Diese bemerkenswerte Stabilität wird sowohl von der schnellen simultanen Assoziations- und Faltungsreaktion ( $7 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) aber vor allem durch die extrem langsame Entfaltungsreaktion ( $5.7 \text{ Jahr}^{-1}$ ) in Abwesenheit des Denaturierungsmittels bestimmt.

Ferner war die Anwendung und Entwicklung höherdimensionaler Echtzeit NMR-Techniken zum Studium langsamer Faltungsreaktionen Gegenstand dieser Arbeit. Dabei wurde S54G/P55N RNase T1 eingesetzt, deren Rückfaltungsmechanismus im Vergleich zum Wildtyp-Protein deutlich vereinfacht ist. Die geschwindigkeitsbestimmende *trans/cis* Isomerisierung der Y38-P39 Peptidbindung synchronisiert die kooperative Rückfaltung des Faltungsintermediats I39<sup>f</sup>, was anhand einer Vielzahl von ortsspezifischen Sonden gezeigt wurde. Durch die Aufnahme von 3D Echtzeit NOESY-HSQC-Spektren während der Rückfaltung und dem Vergleich eines Referenzspektrums konnte die Zuordnung des Proteinrückgrats des Faltungsintermediats getroffen werden und NOE-Kreuzsignale identifiziert werden, die die Basis für eine zukünftige Strukturbestimmung des transienten Faltungsintermediats von S54G/P55N RNase T1 bilden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch die Faltung des humanen CDK-Inhibitors p19<sup>INK4d</sup> untersucht, der eine elongierte Tertiärstruktur besitzt. Diese besteht aus einer sequentiellen Anordnung von fünf Ankyrin-Einheiten, die jeweils zwei  $\alpha$ -Helices beinhalten. Die Stabilisierung der Struktur erfolgt nur durch lokale Wechselwirkungen. p19<sup>INK4d</sup> enthält weder Tryptophan noch Tyrosin, so dass in diesem Fall neben dem Circular dichroismus die intrinsische Fluoreszenz der vier Phenylalanine zur Beobachtung des Faltungsgleichgewichts eingesetzt werden konnte. Mittels dieser optischen Sonden wurde ein apparentes Zweizustandsmodell gefunden. Allerdings konnte in einem NMR-detektierten Harnstoff-induzierten Entfaltungsübergang eine dritte zusätzliche Spezies bei mittleren Harnstoffkonzentrationen gefunden werden, deren transientes Vorliegen über den charakteristischen Intensitätsverlauf ihrer Kreuzsignale in 2D  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  HSQC-Spektren

nachgewiesen werden konnte. Da nur acht Kreuzsignale dieses Gleichgewichtsintermediat identifiziert werden konnten, ist davon auszugehen, dass es nur wenig strukturiert vorliegt. Unter stark nativen Bedingungen konnten Rückfaltungskinetiken mit drei Phasen aufgelöst werden, wobei die Rate der schnellsten Phase signifikant von der Harnstoffkonzentration abhängt. Die beiden langsameren Phasen zeigen keine Harnstoffabhängigkeit ihrer Rate. Die langsamste Phase kann mit PPIasen signifikant beschleunigt werden, was auf eine Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung hindeutet, die mittels 1D Echtzeit NMR-Spektroskopie verfolgt werden konnte. Ein Vergleich mit p16<sup>INK4a</sup> zeigte, dass die deutlich höhere Stabilität von p19<sup>INK4d</sup> auf die vielen hydrophoben Interaktionen zwischen dem vierten und fünften Ankyrin-Segment zurückzuführen ist, was möglicherweise eine bedeutende physiologische Relevanz in der Kontrolle des Zellzyklus besitzt.

## 6. SUMMARY

The biological function of proteins is in most cases defined by their three dimensional structure, which is formed by the protein folding reaction. In this thesis, structure and folding of the four model proteins CspB from *B. subtilis*, RNase T1 from *A. oryzae*, ORF56 from *S. islandicus*, as well as of human CDK inhibitor p19<sup>INK4d</sup> was studied with various biophysical techniques in great detail.

The dynamics of CspB was investigated at different solvent viscosities, which exhibits an almost unaltered native three dimensional structure in the presence of 70% ethylene glycol (EG). Iterative optimization of the overall rotational correlation time  $\tau_m$  with the extended Lipari-Szabo model free analysis of <sup>15</sup>N relaxation data revealed a linear dependence of the relative  $\tau_m$  up to a relative viscosity of 2 (27% EG), which was correctly predicted by the macroscopic viscosity using the Stokes-Einstein equation. At a relative viscosity of 6 (70% EG) the relative correlation time deviates from linearity by 30%. The corresponding hydrodynamic radii show no variation according to the solvent viscosity. Therefore,  $\tau_m$  is a sensitive probe on the local environment and the solvent composition of its hydration shell. The microscopic viscosity rather than the extent of the protein and its hydration shell determines the overall tumbling of the protein. The amplitudes of intramolecular motions on a sub-nanosecond time scale represented by the order parameter  $S^2$  are mainly independent of solvent viscosity, whereas the lower limit of the observation window for the internal correlation time  $\tau_e$  shifts above 0.5 ns at 70% EG. Chemical exchange contributions ( $R_{ex}$ ) to the transversal relaxation rate  $R_2$  derived from the Lipari-Szabo analyses coincide with experimentally determined values from the transverse <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N dipolar/<sup>15</sup>N chemical shift anisotropy relaxation interference. These contributions are equally distributed over the entire protein and are not correlated with secondary structure elements or loop regions. Therefore,  $R_{ex}$  cannot be interpreted as usual as local mobility because the exchange originates from the fast folding reactions on a millisecond timescale. The extent and number of  $R_{ex}$  contributions to  $R_2$  (55 or 6  $R_{ex}$ -values at 0% or 70% EG, respectively) depends on the EG concentration due to the stabilizing effect and to the retardation of folding rates in the presence of EG.

The cooperativity of the folding reaction of CspB was probed by various dynamic NMR techniques, whereas the determination of exchange rates  $k_{ex}$  or of  $R_{ex}$  contributions, respectively, using  $R_2$  relaxation dispersion measurements gave the most reliable results. All 24 analyzed site specific probes depict equivalent apparent folding rates  $k_{ex}$ , which coincide well with fluorescence detected  $k_{ex}$  values. Therefore, the folding reaction is cooperative and

the transition state of folding is most likely homogeneous. It was also shown that the local probe Trp8 reports on the global folding reaction of CspB.

The interaction of CspB with single stranded DNA (ssDNA) was also studied. The potential binding epitope with the two highly conserved binding motifs RNP1 and RNP2 was postulated from multiple sequence alignments. NMR titration experiments revealed the residues involved in binding of CspB to ssDNA, which are mainly located in the predicted binding motifs RNP1 (K13, G14, F15, G16, F17) and RNP2 (F27, H29, F30). Additionally, important residues, which are highly separated in sequence, were also identified by NMR (F9, G35, G37, and F38). To elucidate the individual contributions to the binding affinity of particular residues CspB variants with containing a single amino acid substitution were generated. The contributions of the solvent-exposed phenylalanines are essential for tight binding. The exchange of such a phenylalanine by alanine leads to a loss in affinity of CspB to dT7 up to 150fold. Additionally, the restriction of the number of possible backbone conformations in the loop regions by replacing glycine residues by proline also results in a significantly reduced affinity. Structure calculations of CspB in complex with the ssDNA fragment dT7 showed a nearly unchanged overall structure in respect to the five stranded antiparallel  $\beta$ -sheet. Nevertheless, small to medium rearrangements of the flexible loop regions between  $\beta$ -strands  $\beta$ 3 and  $\beta$ 4 as well as  $\beta$ 4 and  $\beta$ 5 occur. The main difference between free and complexed CspB is the relative orientations of the aromatic side chains, which are mainly responsible for the interaction with ssDNA. A structure determination of the CspB/dT7 complex was not possible due to the high dynamics of the system. The modelling of the CspB/dT7 complex structure with HADDOCK supports the idea of stacking interactions between aromatic amino acid side chains and the bases as well as enlightens some contacts via hydrogen bonds. Binding of dT7 stabilizes CspB and therefore alters the intramolecular dynamics on the pico- to nanosecond as well as on the millisecond timescale, which is represented by the increase of  $S^2$  and the loss of  $R_{ex}$  contributions upon binding.

Besides the cold shock protein, the folding of the homodimeric ORF56 protein from the acidophilic and hyperthermophilic Archaeon *Sulfolobus islandicus* was studied in great detail by many biophysical methods including fluorescence, CD, NMR stopped flow fluorescence or CD, respectively. Also the preliminary three dimensional structure was determined by NMR, which resembles the structure of homologous P22 Arc repressor. ORF56 folding can be described by the two state model of dimeric proteins in equilibrium as well as in folding kinetics. The protein displays a remarkable thermodynamic stability against denaturant, heat and pH induced unfolding which is obviously represented by the extrapolated

melting temperature of the thermal transition at 107 °C and a  $\Delta G_U(\text{H}_2\text{O})$  of 85 kJ/mol at pH 7.5, which was revealed by GdmCl- or GdmSCN-induced denaturation. This remarkable stability is determined by the fast and simultaneous folding and association of ORF56 ( $7 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) and the extremely slow unfolding reaction ( $5.7 \text{ year}^{-1}$ ) in the absence of denaturants.

Another topic of the thesis was the application and development of two and three dimensional real-time NMR techniques to study slow protein folding reactions. Therefore, the S54G/P55N RNase T1 variant was used due to its simplified refolding mechanism in comparison to the wild type protein. The rate determining *cis/trans* isomerization of peptide bond Y38-P39 synchronizes the cooperative refolding reaction of the folding intermediate I39<sup>†</sup>, which was found by analyzing many site specific probes. With the acquisition of real-time 3D NOESY-HSQC spectra during the refolding reaction and a successive comparison with the corresponding reference spectrum of the native state under these conditions the sequence specific assignment of the resonances of the folding intermediate was performed. The identification of NOE cross peaks of the transient intermediate of S54G/P55N RNase T1 are the basis for a future structure determination of this state.

Finally, the folding of human CDK inhibitor p19<sup>INK4d</sup> was characterized. The protein possesses an elongated structure and comprises five sequentially arranged ankyrin repeats. Each ankyrin repeat contains two antiparallel  $\alpha$ -helices and the tertiary structure is stabilized only by local interaction. p19<sup>INK4d</sup> contains no tryptophan or tyrosine residues so that only circular dichroism and the intrinsic phenylalanine fluorescence can be used to follow the folding equilibrium. The optical probes monitor an apparent two state unfolding transitions whereas in a urea induced unfolding transition detected by 2D <sup>1</sup>H/<sup>15</sup>N NMR spectroscopy an additional third species at intermediate urea concentrations was revealed. The transient appearance of this intermediate species was followed by its individual cross peak intensities. The dispersion of the cross peaks of the equilibrium intermediate is very poor and only eight cross peaks were detected. Therefore, the intermediate state is most likely highly unstructured. Refolding kinetics under strong native conditions revealed three phases from which only the rate of the fastest phase depict a significant dependence on the urea concentration. The rates of the two slower phases are independent of the urea concentration. Additionally, the slowest phase can be significantly accelerated by PPIases indicating that this phase is caused by a prolyl *cis/trans* isomerization, which was also investigated by 1D real-time NMR spectroscopy. A comparison with p16<sup>INK4a</sup> revealed that the additional hydrophobic

interactions between ankyrin repeat 4 and 5 causes the higher thermodynamic stability of p19<sup>INK4d</sup>, which might be of physiological importance of cell cycle control.

## 7. ABKÜRZUNGEN

Amp	Ampicillin
Cm	Chloramphenicol
CPMG	Carr-Purcell-Meiboom-Gill Spinecho-Sequenz
CSA	<i>chemical shift anisotropy</i>
CSP	<i>cold shock protein</i> (Kälteschockprotein)
CSD	Kälteschockdomäne
$\Delta C_p$	differentielle Wärmekapazität zwischen N und U ( $\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ )
d	optische Weglänge (cm)
DEPT	<i>distortionless enhancement by polarisation transfer</i>
DTE	Dithioerythritol
dT7	einzelsträngige DNA mit der Sequenz 5'-TTTTTTT-3'
$\epsilon_\lambda$	Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge $\lambda$ ( $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ )
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EG	Ethylenglykol
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
FID	<i>free induction decay</i>
$\Delta G_U$	frei Enthalpie der Entfaltung ( $\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}$ )
GdmCl	Guanidiniumchlorid
GdmSCN	Guanidiniumthiocyanat
$G^z$	Gradient aus z-Richtung
$\Delta H_U$	Enthalpie der Entfaltung ( $\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}$ )
HSQC	<i>heteronuclear single-quantum coherence</i>
INEPT	<i>insensitive nuclei enhanced by polarisation transfer</i>
$I_{X,Y}$	transversale Magnetisierung der Protonen
$I_Z$	longitudinale Magnetisierung der Protonen
${}^nJ$	skalare Kopplungskonstante
$K_D$	Gleichgewichtskonstante der Dissoziation
$k_{\text{app}}$	apparente Geschwindigkeitskonstante ( $\text{s}^{-1}$ )
$k_{\text{ass}}$	Geschwindigkeitskonstante der Assoziation ( $\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ )
$k_{\text{diss}}$	Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation ( $\text{s}^{-1}$ )
$k_u$	Geschwindigkeitskonstante der Entfaltung ( $\text{s}^{-1}$ )
$k_f$	Geschwindigkeitskonstante der Rückfaltung ( $\text{s}^{-1}$ )
NATA	N-Acetyl-tryptophanamid
$m$	Kooperativitätsparameter ( $\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ )
$m_u$	Parameter der Harnstoff-Abhängigkeit von $\ln k_u$ ( $\text{M}^{-1}$ )
$m_f$	Parameter der Harnstoff-Abhängigkeit von $\ln k_f$ ( $\text{M}^{-1}$ )
MHz	Megahertz
n	Brechungsindex
N	native Form des Proteins
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NOE	<i>nuclear Overhauser enhancement</i>
NOESY	<i>nuclear Overhauser enhancement and exchange spectroscopy</i>
$\text{OD}_{600}$	optische Dichte bei 600 nm
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PEG	Polyethylenglykol
$[\Theta]_{\text{MRW}}$	mittlere molare Elliptizität pro Rest ( $\text{Grad}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$ )
R	allgemeine Gaskonstante ( $\text{J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ )
$R_1$	longitudinale oder Spin-Gitter-Relaxationsrate ( $\text{s}^{-1}$ )

---

$R_2$	transversale oder Spin-Spin-Relaxationsrate ( $s^{-1}$ )
$R_H$	hydrodynamischer Radius
RNase	Ribonuklease
RNP	<i>ribonucleoprotein consensus sequence</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
$\Delta S_U$	Entropie der Entfaltung ( $J \cdot K^{-1} \cdot mol^{-1}$ )
scan	einmaliger Durchlauf der Pulssequenz mit Aufzeichnung des <i>FID</i>
spinlock-Puls	langer Puls zur Dephasierung
ssDNA	einzelsträngige DNA
$S_{X,Y}$	transversale Magnetisierung des Heterokerns
$S_Z$	longitudinale Magnetisierung des Heterokerns
$T_M$	Temperatur im Mittelpunkt eines thermischen Übergangs ( $K_{EF}=1$ )
$t_n$	Evolutionszeit der Dimension n
$T_1^*$	apparente Spin-Gitter-Relaxationszeit
$T_2^*$	apparente Spin-Spin-Relaxationszeit
<i>T. maritima</i>	<i>Thermotoga maritima</i>
TPPI	<i>time proportional phase incrementation</i>
Tris	Tri-(hydroxymethyl)-aminoethan
$\tau_m$	Mischzeit (ms)
$\tau_{cp}$	Zeit (ms) zwischen aufeinanderfolgenden $180^\circ$ -Pulsen in CPMG-Sequenz
$\tau_c$	Rotationskorrelationszeit
U	denaturierte Form eines Proteins
(v/v)	Volumen pro Volumen
(w/v)	Gewicht pro Volumen
WATERGATE	<i>water suppression by gradient tailored excitation</i>
Y-Box25	einzelsträngige 25 Basen lange DNA mit dem „Y-Box“-Motiv

## 8. LITERATURVERZEICHNIS

- Abraham, A. (1961). Principles of Nuclear Magnetism, pp. 599. Clarendon Press, Oxford.
- Alexandrescu, A. T., Jaravine, V. A., Dames, S. A. & Lamour, F. P. (1999). NMR hydrogen exchange of the OB-fold protein LysN as a function of denaturant: the most conserved elements of the structure are the most stable to unfolding. *J Mol Biol* **289**, 1041-1054.
- Alonso, D. O. V. & Daggett, V. (2000). Staphylococcal protein A: unfolding pathways, unfolded states, and differences between the B and E domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 133-138.
- Anfinsen, C. B., Haber, E., Sela, M. & White, F. H. (1961). The kinetics of the formation of native ribonucleases during oxidation of the reduced polypeptide chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **47**, 1309-1314.
- Anfinsen, C. B. (1973). Principles that govern the folding of proteins chains. *Science* **181**, 223-230.
- Antson, A. A. (2000). Single-stranded-RNA binding proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**, 87-94.
- Bae, W., Phadtare, S., Severinov, K. & Inouye, M. (1999). Characterization of Escherichia coli cspE, whose gene product negatively regulates transcription of cspA, the gene for the major cold shock protein. *Mol Microbiol* **31**, 1429-1441.
- Bae, W., Xia, B., Inouye, M. & Severinov, K. (2000). Escherichia coli CspA-family RNA chaperones are transcription antiterminators. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 7784-7789.
- Bai, Y. W., Milne, J. S., Mayne, L. & Englander, S. W. (1993). Primary Structure Effects on Peptide Group Hydrogen Exchange. *Proteins: Structure Function and Genetics* **17**, 75-86.
- Bai, Y. W., Milne, J. S., Mayne, L. & Englander, S. W. (1994). Protein stability parameters measured by hydrogen exchange. *Proteins: Structure Function and Genetics* **20**, 4-14.
- Bai, Y. W., Sosnick, T. R., Mayne, L. & Englander, S. W. (1995). Protein folding intermediates: Native-state hydrogen exchange. *Science* **269**, 192-197.
- Baker, D. & Sali, D. (2001). Protein structure prediction and structural genomics. *Science* **294**, 93-96.
- Balbach, J., Forge, V., van Nuland, N. A. J., Winder, S. L., Hore, P. J. & Dobson, C. M. (1995). Following protein folding in real time using NMR spectroscopy. *Nat. Struct. Biol.* **2**, 865-870.
- Balbach, J., Forge, V., Lau, W. S., van Nuland, N. A. J., Brew, K. & Dobson, C. M. (1996). Protein folding monitored at individual residues during a two-dimensional NMR experiment. *Science* **274**, 1161-1163.
- Balbach, J., Steegborn, C., Schindler, T. & Schmid, F. X. (1999). A protein folding intermediate of ribonuclease T1 characterized at high resolution by 1D and 2D real-time NMR spectroscopy. *J. Mol. Biol.* **285**, 829-842.
- Balbach, J. (2000). Compaction during protein folding reactions studied by real-time NMR diffusion experiments. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 5887-5888.
- Balbach, J. & Schmid, F. X. (2000). Proline isomerization and its catalysis in protein folding. In *Mechanisms of Protein Folding* 2nd edit. (Pain, R. H., ed.), pp. 212-237. University Press, Oxford.
- Baldwin, R. L. & Eisenberg, D. (1987). Protein stability. In *Protein engineering* (Oxender, D. L. & Fox, C. F., eds.), pp. 127-148. Alan R. Liss, Inc.
- Baldwin, R. L. (1993). Pulsed H/D-exchange studies of folding intermediates. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **3**, 84-91.
- Baldwin, R. L. (1995). The nature of protein folding pathways: The classical versus the new view. *Journal of Biomolecular NMR* **5**, 103-109.
- Baldwin, R. L. (1996). On-pathway versus off-pathway folding intermediates. *Fold. Des.* **1**, R1-R8.
- Bann, J. G., Pinkner, J., Hultgren, S. J. & Frieden, C. (2002). Real-time and equilibrium <sup>19</sup>F-NMR studies reveal the role of domain-domain interactions in the folding of the chaperone PapD. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 709-714.
- Barbato, G., Ikura, M., Kay, L. E., Pastor, R. W. & Bax, A. (1992). Backbone dynamics of calmodulin studied by <sup>15</sup>N relaxation using inverse detected two-dimensional NMR spectroscopy: The central helix is flexible. *Biochemistry* **31**, 5269-5278.
- Baumgartner, R., Fernandez-Catalan, C., Winoto, A., Huber, R., Engh, R. A. & Holak, T. A. (1998a). Structure of human cyclin-dependent kinase inhibitor p19INK4d: comparison to known ankyrin-repeat-containing structures and implications for the dysfunction of tumor suppressor p16INK4a. *Structure* **6**, 1279-1290.
- Baumgartner, R., Fernandez-Catalan, C., Winoto, A., Huber, R., Engh, R. A. & Holak, T. A. (1998b). Structure of human cyclin-dependent kinase inhibitor p19INK4d: comparison to known ankyrin-repeat-containing structures and implications for the dysfunction of tumor suppressor p16INK4a [In Process Citation]. *Structure* **6**, 1279-1290.
- Bernasconi, C. F. (1976). Relaxation kinetics. Academic Press, New York.
- Blum, A. D., Smallcombe, S. H. & Baldwin, R. L. (1978). Nuclear magnetic resonance evidence for a structural intermediate at an early stage in the refolding of ribonuclease A. *J. Mol. Biol.* **118**, 305-316.

- Bogden, C. E., Fass, D., Bergman, N., Nichols, M. D. & Berger, J. M. (1999). The structural basis for terminator recognition by the Rho transcription termination factor. *Mol. Cell* **3**, 487-493.
- Bowie, J. U. & Sauer, R. T. (1989). Equilibrium dissociation and unfolding of the Arc repressor dimer. *Biochemistry* **28**, 7139-43.
- Boyd, J. & Redfield, C. (1999). Characterization of <sup>15</sup>N Chemical Shift Anisotropy from Orientation-Dependent Changes to <sup>15</sup>N Chemical Shifts in Dilute Bicelle Solutions. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 7441-7442.
- Brandi, A., Pietroni, P., Gualerzi, C. O. & Pon, C. L. (1996). Post-transcriptional regulation of CspA expression in Escherichia coli. *Mol. Microbiol.* **19**, 231-240.
- Brandi, A., Spurio, R., Gualerzi, C. O. & Pon, C. L. (1999). Massive presence of the Escherichia coli 'major cold-shock protein' CspA under non-stress conditions. *Embo J.* **18**, 1653-1659.
- Brandts, J. F., Halvorson, H. R. & Brennan, M. (1975). Consideration of the possibility that the slow step in protein denaturation reactions is due to cis-trans isomerism of proline residues. *Biochemistry* **14**, 4953-4963.
- Breg, J. N., van Opheusden, J. H., Burgering, M. J., Boelens, R. & Kaptein, R. (1990). Structure of Arc repressor in solution: evidence for a family of beta-sheet DNA-binding proteins. *Nature* **346**, 586-589.
- Briercheck, D. M., Wood, T. C., Allison, T. J., Richardson, J. P. & Rule, G. S. (1998). The NMR structure of the RNA binding domain of E. coli rho factor suggests possible RNA-protein interactions. *Nat Struct Biol* **5**, 393-399.
- Brotherton, D. H., Dhanaraj, V., Wick, S., Brizuela, L., Domaille, P. J., Volyanik, E., Xu, X., Parisini, E., Smith, B. O., Archer, S. J., Serrano, M., Brenner, S. L., Blundell, T. L. & Laue, E. D. (1998). Crystal structure of the complex of the cyclin D-dependent kinase Cdk6 bound to the cell-cycle inhibitor p19INK4d [published erratum appears in Nature 1998 Nov 26;396(6709):390]. *Nature* **395**, 244-250.
- Burd, C. G. & Dreyfuss, G. (1994). Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins. *Science* **265**, 615-621.
- Burgering, M. J. M., Boelens, R., Caffrey, M. & Kaptein, R. (1993). Observation of inter-subunit nuclear Overhauser effects in a dimeric protein. *FEBS Lett* **330**, 105-109.
- Burton, R. E., Huang, G. S., Daugherty, M. A., Fullbright, P. W. & Oas, T. G. (1996). Microsecond protein folding through a compact transition state. *Journal of Molecular Biology*, 311-322.
- Burton, R. E., Myers, J. A. & Oas, T. G. (1998). Protein folding dynamics: quantitative comparison between theory and experiment. *Biochemistry* **37**, 5337-5343.
- Bystrov, V. F. (1976). *Progress in NMR Spectroscopy* **10**, 41.
- Canet, D., Barthe, P., Mutzenhardt, P. & Roumestand, C. (2001). A comprehensive analysis of multifield <sup>15</sup>N relaxation parameters in proteins: determination of <sup>15</sup>N chemical shift anisotropies. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 4567-4576.
- Cantor, C. R. & Schimmel, P. R. (1980). Biophysical chemistry, Vol. 2, pp. 443. W.H. Freeman and Company, San Francisco.
- Capaldi, A. P., Shastry, M. C., Kleanthous, C., Roder, H. & Radford, S. E. (2001). Ultrarapid mixing experiments reveal that Im7 folds via an on-pathway intermediate. *Nat Struct Biol* **8**, 68-72.
- Case, D. A. (1998). The use of chemical shifts and their anisotropies in biomolecular structure determination. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**, 624-630.
- Case, D. A. (2000). Interpretation of chemical shifts and coupling constants in macromolecules. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**, 197-203.
- Cavagnero, S., Debe, D. A., Zhou, Z. H., Adams, M. W. & Chan, S. I. (1998). Kinetic role of electrostatic interactions in the unfolding of hyperthermophilic and mesophilic rubredoxins. *Biochemistry* **37**, 3369-3376.
- Cavanagh, J. & Rance, M. (1992). Suppression of cross-relaxation effects in TOCSY spectra via a modified DIPSI-2 mixing sequence. *J Magn Res* **96**, 670-678.
- Cavanagh, J., Fairbrother, W. J., Palmer, A. G., 3rd & Skelton, N. J. (1996). Protein NMR spectroscopy: Principles and practice, pp. 1-587. Academic Press, San Diego.
- Chan, C. K., Hu, Y., Takahashi, S., Rousseau, D. L., Eaton, W. A. & Hofrichter, J. (1997). Submillisecond protein folding kinetics studied by ultrarapid mixing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 1779-1784.
- Chan, F. K., Zhang, J., Cheng, L., Shapiro, D. N. & Winoto, A. (1995). Identification of human and mouse p19, a novel CDK4 and CDK6 inhibitor with homology to p16ink4. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 2682-2688.
- Cheng, H. N. & Bovey, F. A. (1977). Cis-trans equilibrium and kinetic studies of acetyl-L-proline and glycyl-L-proline. *Biopolymers* **16**, 1465-1472.
- Chiti, F., Taddei, N., Webster, P., Hamada, D., Fiaschi, T., Ramponi, G. & Dobson, C. M. (1999). Acceleration of the folding of acylphosphatase by stabilization of local secondary structure. *Nat Struct Biol* **6**, 380-387.
- Clore, G. M., Szabo, A., Bax, A., Kay, L. E., Driscoll, P. C. & Gronenborn, A. M. (1990). Deviations from the simple two-parameter model-free approach to the interpretation of nitrogen-15 nuclear magnetic relaxation of proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 4989-4991.

- Cook, K. H., Schmid, F. X. & Baldwin, R. L. (1979). Role of proline isomerization in folding of ribonuclease A at low temperatures. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **76**, 6157-6161.
- Creighton, T. E. (1994). The energetic ups and downs of protein folding. *Nature Structural Biology* **1**, 135-138.
- Creighton, T. E., Darby, N. J. & Kemmink, J. (1996). The roles of partly folded intermediates in protein folding. *FASEB Journal* **10**, 110-118.
- Daggett, V., Li, A. J., Itzhaki, L. S., Otzen, D. E. & Fersht, A. R. (1996). Structure of the transition state for folding of a protein derived from experiment and simulation. *Journal of Molecular Biology* **257**, 430-440.
- Daggett, V. (2003). Molecular dynamics simulations of the protein unfolding/folding reaction. *Acc. Chem. Res.* **35**, 422-439.
- Dams, T. & Jaenicke, R. (1999). Stability and folding of dihydrofolate reductase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *Biochemistry* **38**, 9169-9178.
- Dayie, K. & Wagner, G. (1994). Relaxation-rate measurements for  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  groups with pulsed-field gradients and preservation of coherence pathways. *J. Magn. Reson. A* **111**, 121-126.
- Debye, P. (1929). Polar Molecules. Dover, New York.
- Deo, R. C., Bonanno, J. B., Sonenberg, N. & Burley, S. K. (1999). Recognition of the poladenylate RNA by the poly(A)-binding protein. *Cell* **98**, 835-845.
- Dill, K. A. & Chan, H. S. (1997). From Levinthal to pathways to funnels. *Nature Struct.Biology.* **4**, 10-19.
- Dobson, C. M. & Evans, P. A. (1984). Protein folding kinetics from magnetization transfer nuclear magnetic resonance. *Biochemistry* **23**, 4267-4270.
- Dobson, C. M., Evans, P. A. & Radford, S. E. (1994). Understanding how proteins fold: the lysozyme story so far. *Trends in Biochemical Sciences* **19**, 31-37.
- Dobson, C. M., Sali, A. & Karplus, M. (1998). Protein folding: A perspective from theory and experiment. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **37**, 868-893.
- Dominguez, C., Boelens, R. & Bonvin, A. M. J. J. (2003). HADDOCK: A protein-protein docking approach based on biochemical or biophysical information. *J Am Chem Soc* **125**, 1731-1737.
- Draper, D. E. & Reynaldo, L. P. (1999). RNA binding strategies of ribosomal proteins. *Nucleic Acid Research* **27**, 381-388.
- Duan, Y. & Kollman, P. A. (1998). Pathways to a protein folding intermediate observed in a 1-microsecond simulation in aqueous solution. *Science* **282**, 740-744.
- Dürr, E., Jelesarov, I. & Bosshard, H. R. (1999). Extremely fast folding of a very stable leucine zipper with a strengthened hydrophobic core and lacking electrostatic interactions between helices. *Biochemistry* **38**, 870-880.
- Düx, P., Whitehead, B., Boelens, R., Kaptein, R. & Vuister, G. W. (1997). Measurements of  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  couplings in uniformly  $^{15}\text{N}$ -labeled proteins: Application to the photoactive yellow protein. *J biomol NMR* **10**, 301-306.
- Eaton, W. A. (1999). Searching for "downhill scenarios" in protein folding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 5897-9.
- Eftink, M. R. (1997). Fluorescence methods for studying equilibrium macromolecule-ligand interactions. *Methods Enzymol* **278**, 221-57.
- Einstein, A. (1905). *Ann. Phys.* **17**, 549-560.
- Englander, S. W., Sosnick, T. R., Englander, J. J. & Mayne, L. (1996). Mechanisms and uses of hydrogen exchange. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **6**, 18-23.
- Ermolenko, D. N. & Makhatazde, G. I. (2002). Bacterial cold-shock proteins. *Cell Mol Life Sci* **59**, 1902-1913.
- Ernst, R. R., Bodenhausen, G. & Wokaun, A. (1987). Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions, pp. 124. Oxford University Press, Oxford.
- Ernst, R. R., Blackledge, M. J., Bremi, T., Brüschweiler, R., Ernst, M., Griesinger, C., Mádí, Z. L., Peng, J. M., Schmid, J. M. & Xu, P. (1996). Intramolecular dynamics of biomolecules, possibilities and limitations of NMR. In *NMR as a Structural Tool for Macromolecules: Current Status and Future Directions* (Rao, B. D. N. & Kemple, M. D., eds.), pp. 15-30. Plenum Press, New York.
- Espinosa, M., del Solar, G. H., Rojo, F. & Alonso, J. C. (1995). Plasmid rolling circle replication and its control. *FEMS Microbiology Letters* **130**, 111-120.
- Esser, D., Rudolph, R., Jaenicke, R. & Böhm, G. (1999). The HU protein from *Thermotoga maritima*: recombinant expression, purification and physicochemical characterization of an extremely hyperthermophilic DNA-binding protein. *J. Mol. Biol.* **291**, 1135-1146.
- Etchegaray, J. P. & Inouye, M. (1999). CspA, CspB, and CspG, major cold shock proteins of *Escherichia coli*, are induced at low temperature under conditions that completely block protein synthesis. *J Bacteriol* **181**, 1827-30.

- Evenäs, J., Forsen, S., Malmendal, A. & Akke, M. (1999). Backbone dynamics and energetics of a calmodulin domain mutant exchanging between open and closed conformations. *J Mol Biol* **289**, 603-617.
- Falsone, S. F., Weichel, M., Cramer, R., Breitenbach, M. & Kungl, A. J. (2002). Unfolding and double-stranded DNA binding of the cold shock protein homologue Cla h 8 from *Cladosporium herbarum*. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 16512-16516.
- Fang, L., Hou, Y. & Inouye, M. (1998). Role of the cold-box region in the 5' untranslated region of the *cspA* mRNA in its transient expression at low temperature in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **180**, 90-95.
- Farrow, N. A., Zhang, O., Forman-Kay, J. D. & Kay, L. E. (1994). A heteronuclear correlation experiment for simultaneous determination of  $^{15}\text{N}$  longitudinal decay and chemical exchange rates of systems in slow equilibrium. *J. Biomol. NMR* **4**, 727-734.
- Feng, W., Tejero, R., Zimmerman, D. E., Inouye, M. & Montelione, G. T. (1998). Solution NMR structure and backbone dynamics of the major cold-shock protein (CspA) from *Escherichia coli*: evidence for conformational dynamics in the single-stranded RNA-binding site. *Biochemistry* **37**, 10881-96.
- Fersht, A. R., Matouschek, A. & Serrano, L. (1992). The Folding of an Enzyme .1. Theory of Protein Engineering Analysis of Stability and Pathway of Protein Folding. *Journal of Molecular Biology* **224**, 771-782.
- Frieden, C., Hoeltzli, S. D. & Ropson, I. J. (1993). NMR and protein folding: equilibrium and stopped-flow studies. *Protein Sci.* **2**, 2007-2014.
- Garcia, A. E. & Onuchic, J. N. (2003). Folding a protein in a computer: an atomic description of the folding/unfolding of protein A. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 13898-13903.
- Garcia, P., Serrano, L., Rico, M. & Bruix, M. (2002). An NMR view of the folding process of a CheY mutant at the residue level. *Guide.to.Yeast.Genetics.and.Molecular.Biology.* **194:675-682**, 675-682X.
- Garel, J. R. & Baldwin, R. L. (1973). Both the fast and slow refolding reactions of ribonuclease A yield native enzyme. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **70**, 3347-3351.
- Garnier, J., Gibrat, J. F. & Robson, B. (1996). GOR method for predicting protein secondary structure from amino acid sequence. *Methods in Enzymology* **266**, 540-553.
- Gibbs, S. J. & Johnson, C. S., Jr. (1991). A PFG NMR experiment for accurate diffusion and flow studies in the presence of eddy currents. *J. Magn. Reson.* **93**, 395-402.
- Gill, S. C. & von Hippel, P. H. (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* **182**, 319-326.
- Gittelman, M. S. & Matthews, C. R. (1990). Folding and stability of *trp* aporepressor from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **29**, 7011-7020.
- Goldbeck, R. A., Thomas, Y. G., Chen, E., Esquerra, R. M. & Kliger, D. S. (1999). Multiple pathways on a protein-folding energy landscape: kinetic evidence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 2782-7.
- Goldberg, M. E. (1985). The second translation of the genetic message: protein folding and assembly. *Trends in Biochemical Sciences* **10**, 388-391.
- Gomis-Rüth, F. X., Sola, M., Acebo, P., Parraga, A., Guasch, A., Eritja, R., Gonzalez, A., Espinosa, M., del Solar, G. & Coll, M. (1998). The structure of plasmid-encoded transcriptional repressor CopG unliganded and bound to its operator. *Embo J.* **17**, 7404-7415.
- Gorina, S. & Pavletich, N. P. (1996). Structure of the p53 tumor suppressor bound to the ankyrin and SH3 domains of 53BP2. *Science* **274**, 1001-1005.
- Goto, Y. & Hamaguchi, K. (1982). Unfolding and refolding of the reduced constant fragment of the immunoglobulin light chain. Kinetic role of the disulfide bond. *Journal of Molecular Biology* **156**, 911-926.
- Grantcharova, V., Alm, E. J., Baker, D. & Horwich, A. L. (2001). Mechanism of protein folding. *Current Opinion in Structural Biology* **11**, 70-82.
- Grathwohl, C. & Wüthrich, K. (1981). NMR studies of the rates of proline cis-trans isomerization in oligopeptides. *Biopolymers* **20**, 2623-2633.
- Grättinger, M., Dankesreiter, A., Schurig, H. & Jaenicke, R. (1998). Recombinant phosphoglycerate kinase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*: catalytic, spectral and thermodynamic properties. *J. Mol. Biol.* **280**, 525-533.
- Graumann, P. & Marahiel, M. A. (1994). The major cold shock protein of *Bacillus subtilis* CspB binds with high affinity to the ATTGG- and CCAAT sequences in single stranded oligonucleotides. *FEBS Lett* **338**, 157-60.
- Graumann, P. & Marahiel, M. A. (1996). A case of convergent evolution of nucleic acid binding modules. *Bioessays* **18**, 309-315.
- Graumann, P., Schroder, K., Schmid, R. & Marahiel, M. A. (1996). Cold shock stress-induced proteins in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **178**, 4611-4619.
- Graumann, P. (1997). Molekulare Analyse der Kälteschock-Antwort in *Bacillus subtilis*. Doktorarbeit. Philipps-Universität Marburg.

- Graumann, P., Wendrich, T. M., Weber, M. H., Schröder, K. & Marahiel, M. A. (1997). A family of cold shock proteins in *Bacillus subtilis* is essential for cellular growth and for efficient protein synthesis at optimal and low temperatures. *Mol. Microbiol.* **25**, 741-756.
- Graumann, P. L. & Marahiel, M. A. (1998). A superfamily of proteins that contain the cold-shock domain. *Trends Biochem Sci* **23**, 286-290.
- Graumann, P. L. & Marahiel, M. A. (1999). Cold shock proteins CspB and CspC are major stationary-phase-induced proteins in *Bacillus subtilis*. *Arch Microbiol* **171**, 135-8.
- Griko, Y. V., Privalov, P. L., Sturtevant, J. M. & Venyaminov, S. (1988). Cold denaturation of staphylococcal nuclease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 3343-7.
- Grimaldi, J. J. & Sykes, B. D. (1975). Stopped flow fourier transform nuclear magnetic resonance spectroscopy. An application to the alpha-chymotrypsin-catalyzed hydrolysis of tert-butyl-L-phenylalanine. *J. Am. Chem. Soc.* **97**, 273-276.
- Grzesiek, S., Stahl, S. J., Wingfield, P. T. & Bax, A. (1996). The CD4 determinant for downregulation by HIV-1 Nef directly binds to Nef. Mapping of the Nef binding surface by NMR. *Biochemistry* **35**, 10256-61.
- Guijarro, J. I., Morton, C. J., Plaxco, K. W., Campbell, I. D. & Dobson, C. M. (1998). Folding kinetics of the SH3 domain of PI3 kinase by real-time NMR combined with optical spectroscopy. *J. Mol. Biol.* **276**, 657-667.
- Hagn, F. (2003). Echtzeit NMR-Spektroskopie zum Studium der Proteinfaltung von Ribonuklease T1. Diplomarbeit. Universität Bayreuth.
- Handa, N., Nureki, O., Kurimoto, K., Kim, I., Sakamoto, H., Shimura, Y. & Muto, Y. (1999). Structural basis for recognition of the tra mRNA precursor by the sex-lethal protein. *Nature* **398**, 579-585.
- Hansen, M. R., Mueller, L. & Pardi, A. (1998). Tunable alignment of macromolecules by filamentous phage yields dipolar coupling interactions. *Nat Struct Biol* **5**, 1065-1074.
- Harrison, S. C. & Aggarwal, A. K. (1990). DNA recognition by proteins with the helix-turn-helix motif. *Annual Review of Biochemistry* **59**, 933-969.
- Hebraud, M. & Potier, P. (1999). Cold shock response and low temperature adaptation in psychrotrophic bacteria. *J Mol Microbiol Biotechnol* **1**, 211-219.
- Heinemann, U. & Saenger, W. (1982). Specific protein-nucleic acid recognition in ribonuclease T1-2'-guanylic acid complex: an x-ray structure. *Nature* **299**, 27-31.
- Hillier, B. J., Rodriguez, H. M. & Gregoret, L. M. (1998). Coupling protein stability and protein function in *Escherichia coli* CspA. *Fold Des* **3**, 87-93.
- Hirai, H., F., R. M., Kato, J. Y., Ashmun, R. A. & Sherr, C. J. (1995). Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 2672-2681.
- Hiyama, Y., Niu, C.-H., Silverton, J. V., Bavoso, A. & Torchia, D. A. (1988). Determination of <sup>15</sup>N chemical shift tensor via <sup>15</sup>N-<sup>2</sup>H dipolar coupling in Boc-glycylglycyl[<sup>15</sup>N]glycine benzyl ester. *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 2378-2383.
- Hoeltzli, S. D. & Frieden, C. (1996). Real-time refolding studies of 6-19F-tryptophan labeled *Escherichia coli* dihydrofolate reductase using stopped-flow NMR spectroscopy. *Biochemistry* **35**, 16843-16851.
- Hoeltzli, S. D. & Frieden, C. (1998). Refolding of [6-<sup>19</sup>F]tryptophan-labeled *Escherichia coli* dihydrofolate reductase in the presence of ligand: a stopped-flow NMR spectroscopy study. *Biochemistry* **37**, 387-398.
- Hoffmann, E. & Rüterjans, H. (1988). Two-dimensional <sup>1</sup>H-NMR investigation of ribonuclease T1. Resonance assignments, secondary and low-resolution tertiary structures of ribonuclease T1. *European Journal of Biochemistry* **177**, 539-560.
- Horvath, M. P., Schweiker, V. L., Bevilacqua, J. M., Ruggles, J. A. & Schultz, S. C. (1998). Crystal structure of the *Oxytricha nova* telomere end binding protein complexed with single strand DNA. *Cell* **95**, 963-74.
- Huang, G. S. & Oas, T. G. (1995). Submillisecond folding of monomeric lambda repressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 6878-6882.
- Ikai, A. & Tanford, C. (1971). Kinetic evidence for incorrectly folded intermediate states in the refolding of denatured proteins. *Nature* **230**, 100-2.
- Ishima, R. & Torchia, D. A. (1999). Estimating the time scale of chemical exchange of proteins from measurements of transverse relaxation rates in solution. *J. Biomol. NMR* **14**, 369-372.
- Jackson, S. E. & Fersht, A. R. (1991a). Folding of Chymotrypsin Inhibitor-2 .1. Evidence for a Two- State Transition. *Biochemistry* **30**, 10428-10435.
- Jackson, S. E. & Fersht, A. R. (1991b). Folding of Chymotrypsin Inhibitor-2 .2. Influence of Proline Isomerization on the Folding Kinetics and Thermodynamic Characterization of the Transition State of Folding. *Biochemistry* **30**, 10436-10443.
- Jacob, M., Schindler, T., Balbach, J. & Schmid, F. X. (1997). Diffusion control in an elementary protein folding reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 5622-5627.

- Jacob, M., Geeves, M., Holtermann, G. & Schmid, F. X. (1999a). Diffusional barrier crossing in a two-state protein folding reaction. *Nat Struct Biol* **6**, 923-6.
- Jacob, M., Holtermann, G., Perl, D., Reinstein, J., Schindler, T., Geeves, M. A. & Schmid, F. X. (1999b). Microsecond folding of the cold shock protein measured by a pressure-jump technique. *Biochemistry* **38**, 2882-91.
- Jaenicke, R. (1987). Folding and association of proteins. *Prog. Biophys. molec. Biol.* **49**, 117-237.
- Jaenicke, R. (1991). Protein folding: local structures, domains, subunits, and assemblies. *Biochem.* **30**, 3147-3161.
- Jaenicke, R. (1996). How do proteins acquire their three-dimensional structure and stability? *Naturwissenschaften.* **83**, 544-554.
- Jaenicke, R. & Böhm, G. (1998). The stability of proteins in extreme environments. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**, 738-748.
- Jaenicke, R. (1999). Stability and folding of domain proteins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **71**, 155-241.
- Jaenicke, R. (2000). Stability and stabilization of globular proteins in solution. *J. Biotechnol.* **79**, 193-203.
- Jaenicke, R. & Lilie, H. (2000). Folding and association of oligomeric and multimeric proteins. *Adv. Protein Chem.* **53**, 329-401.
- Jaenicke, R. & Böhm, G. (2001). Thermostability of proteins from *Thermotoga maritima*. *Methods Enzymol.* **334**, 438-469.
- Jiang, W., Fang, L. & Inouye, M. (1996). Complete growth inhibition of *Escherichia coli* by ribosome trapping with truncated *cspA* mRNA at low temperature. *Genes Cells* **1**, 965-976.
- Jiang, W., Hou, Y. & Inouye, M. (1997). *CspA*, the major cold-shock protein of *Escherichia coli*, is an RNA chaperone. *J Biol Chem* **272**, 196-202.
- Jones, J. A., Wilkins, D. K., Smith, L. J. & Dobson, C. M. (1997). Characterisation of protein unfolding by NMR diffusion measurements. *J. Biomol. NMR* **10**, 199-203.
- Jones, P. G., van Bogelen, R. A. & Neidhardt, F. C. (1987). Induction of proteins in response to low temperature in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **169**, 2092-2095.
- Jones, P. G., Krah, R., Tafuri, S. R. & Wolffe, A. P. (1992). DNA gyrase, CS7.4, and the cold shock response in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **174**, 5798-5802.
- Jones, P. G. & Inouye, M. (1996). RbfA, a 30S ribosomal binding factor, is a cold-shock protein whose absence triggers the cold-shock response. *Mol. Microbiol.* **21**, 1207-1218.
- Jorgensen, W. L. & Gao, J. (1988). Cis-trans energy difference for the peptide bond in the gas phase and in aqueous solution. *J. Am. Chem. Soc.*, 4212-4216.
- Kalus, W., Baumgartner, R., Renner, C., Noegel, A., Chan, F. K., Winoto, A. & Holak, T. A. (1997). NMR structural characterization of the CDK inhibitor p19INK4d. *FEBS Lett* **401**, 127-32.
- Kamb, A., Gruis, N. A., Weaver-Feldhaus, J., Liu, Q., Harshman, K., Tavtigian, S. V., Stockert, E., Day, R. S. r., Johnson, B. E. & Skolnick, M. H. (1994). A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* **264**, 436-440.
- Karplus, M. & Weaver, D. L. (1976). Protein-folding dynamics. *Nature* **260**, 404-406.
- Karplus, M. & Weaver, D. L. (1979). Diffusion-collision model for protein folding. *Biopolymers* **18**, 1421-1437.
- Karplus, M. & Weaver, D. L. (1994). Protein folding dynamics: the diffusion-collision model and experimental data. *Protein Sci.* **3**, 650-668.
- Kawamura, S., Abe, Y., Ueda, T., Masumoto, K., Imoto, T., Yamasaki, N. & Kimura, M. (1998). Investigation of the structural basis for thermostability of DNA-binding protein HU from *Bacillus stearothermophilus*. *J. Biol. Chem.* **273**, 19982-19987.
- Kay, L., Nicholson, L., Delaglio, F., Bax, A. & Torchia, D. (1992). Pulse sequence for removal of the effects of cross-correlation between dipolar and chemical-shift anisotropy relaxation mechanism on the measurements of heteronuclear T1 and T2 values in proteins. *J. Magn. Reson.* **97**, 359-375.
- Kay, L. E., Torchia, D. A. & Bax, A. (1989). Backbone dynamics of proteins as studied by <sup>15</sup>N inverse detected heteronuclear NMR spectroscopy: application to staphylococcal nuclease. *Biochemistry* **28**, 8972-8979.
- Kazmirski, S. L., Wong, K.-B., Freund, S. M. V., Tan, Y.-J., Fersht, A. R. & Daggett, V. (2001). Protein folding from a highly disordered denatured state: the folding pathway of chymotrypsin inhibitor 2 at atomic resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 4349-4354.
- Keeling, P. J., Klenk, H. P., Singh, R. K., Feeley, O., Schleper, C., Zillig, W., Doolittle, W. F. & Sensen, C. W. (1996). Complete nucleotide sequence of the *Sulfolobus islandicus* multicopy plasmid pRN1. *Plasmid* **35**, 141-144.
- Kelley, R. F., Wilson, J., Bryant, C. & Stellwagen, E. (1986). Effects of guanidine hydrochloride on the refolding kinetics of denatured thioredoxin. *Biochemistry* **25**, 728-732.
- Kelley, R. F. & Richards, F. M. (1987). Replacement of proline-76 with alanine eliminates the slowest kinetic phase in thioredoxin folding. *Biochemistry* **26**, 6765-6774.

- Kern, G., Kern, D., Schmid, F. X. & Fischer, G. (1995). A kinetic analysis of the folding of human carbonic anhydrase II and its catalysis by cyclophilin. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 740-745.
- Khan, S. A. (1997). Rolling-circle replication of bacterial plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**, 442-455.
- Khorasanizadeh, S., Peters, I. D. & Roder, H. (1996). Evidence for a three-state model of protein folding from kinetic analysis of ubiquitin variants with altered core residues. *Nature Struct. Biology* **3**, 193-205.
- Kiefhaber, T., Grunert, H.-P., Hahn, U. & Schmid, F. X. (1990a). Replacement of a cis proline simplifies the mechanism of ribonuclease T1 folding. *Biochemistry* **29**, 6475-6480.
- Kiefhaber, T., Quaas, R., Hahn, U. & Schmid, F. X. (1990b). Folding of ribonuclease T1. 2. Kinetic models for the folding and unfolding reactions. *Biochemistry* **29**, 3061-3070.
- Kiefhaber, T., Quaas, R., Hahn, U. & Schmid, F. X. (1990c). Folding of Ribonuclease T<sub>1</sub>. 1. Existence of multiple unfolded states created by proline isomerization. *Biochemistry* **29**, 3053-3061.
- Kiefhaber, T., Grunert, H. P., Hahn, U. & Schmid, F. X. (1992a). Folding of RNase T1 is decelerated by a specific tertiary contact in a folding intermediate. *Proteins: Structure Function and Genetics* **12**, 171-179.
- Kiefhaber, T., Kohler, H. H. & Schmid, F. X. (1992b). Kinetic Coupling Between Protein Folding and Prolyl Isomerization .1. Theoretical Models. *Journal of Molecular Biology* **224**, 217-229.
- Kiefhaber, T., Schmid, F. X., Willaert, K., Engelborghs, Y. & Chaffotte, A. (1992c). Structure of a Rapidly Formed Intermediate in Ribonuclease- T1 Folding. *Protein Science* **1**, 1162-1172.
- Kiefhaber, T., Labhardt, A. M. & Baldwin, R. L. (1995). Direct NMR evidence for an intermediate preceding the rate-limiting step in the unfolding of ribonuclease A. *Nature* **375**, 513-515.
- Killick, T. R., Freund, S. M. & Fersht, A. R. (1998). Real-time NMR studies on folding of mutants of barnase and chymotrypsin inhibitor 2. *FEBS Lett.* **423**, 110-112.
- Kim, P. S. & Baldwin, R. L. (1982). Specific intermediates in the folding reactions of small proteins and the mechanism of protein folding. *Annual Review of Biochemistry* **51**, 459-489.
- Kim, P. S. & Baldwin, R. L. (1990). Intermediates in the folding reactions of small proteins. *Annual Review of Biochemistry* **59**, 631-660.
- Kohl, A., Binz, H. K., Forrer, P., Stumpp, M. T., Plückthun, A. & Grütter, M. G. (2003). Designed to be stable: Crystal structure of a consensus ankyrin repeat protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 1700-1705.
- Koide, S., Dyson, H. J. & Wright, P. E. (1993). Characterization of a folding intermediate of apoplastocyanin trapped by proline isomerization. *Biochemistry* **32**, 12299-12310.
- Koradi, R., Billeter, M. & Wüthrich, K. (1996). MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. *J Mol Graph* **14**, 51-55.
- Kragelund, B. B., Robinson, C. V., Knudsen, J., Dobson, C. M. & Poulsen, F. M. (1995). Folding of a four-helix bundle: Studies of acyl-coenzyme A binding protein. *Biochemistry* **34**, 7217-7224.
- Krantz, B. A., Moran, L. B., Kentsis, A. & Sosnick, T. R. (2000). D/H amide kinetic isotope effects reveal when hydrogen bonds form during protein folding. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 62-71.
- Kraulis, P. J. (1991). MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.* **24**, 946-950.
- Kremer, W., Schuler, B., Harrieder, S., Geyer, M., Gronwald, W., Welker, C., Jaenicke, R. & Kalbitzer, H. R. (2001). Solution NMR structure of the cold-shock protein from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *Eur J Biochem* **268**, 2527-39.
- Kretschmar, M. & Jaenicke, R. (1999). Stability of a homo-dimeric Ca(2+)-binding member of the beta gamma-crystallin superfamily: DSC measurements on spherulin 3a from *Physarum polycephalum*. *J. Mol. Biol.* **291**, 1147-1153.
- Kroenke, C. D., Loria, J. P., Lee, L. K., Rance, M. & Palmer, A. G., III (1998). Longitudinal and Transverse 1H-15N Dipolar/15N Chemical Shift Anisotropy Relaxation Interference: Unambiguous Determination of Rotational Diffusion Tensors and Chemical Exchange Effects in Biological Macromolecules. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 7905-7915.
- Kubelka, J., Eaton, W. A. & Hofrichter, J. (2003). Experimental tests of villin subdomain folding simulations. *J Mol Biol* **329**, 625-630.
- Kuboniwa, H., Grzesiek, S., Delaglio, F. & Bax, A. (1994). Measurements of H<sup>N</sup>-H<sup>α</sup> J couplings in calcium-free calmodulin using new 2D and 3D water flip-back methods. *J biomol NMR* **4**, 871-878.
- Kuhlman, B., Boice, J. A., Fairman, R. & Raleigh, D. P. (1998). Structure and stability of the N-terminal domain of the ribosomal protein L9: evidence for rapid two-state folding. *Biochemistry* **37**, 1025-32.
- Kuwajima, K., Okayama, N., Yamamoto, K., Ishihara, T. & Sugai, S. (1991). The Pro117 to Glycine Mutation of Staphylococcal Nuclease Simplifies the Unfolding Folding Kinetics. *FEBS Lett.* **290**, 135-138.
- Kuwajima, K. & Arai, M. (2000). The molten globule state: the physical picture and biological significance. In *Mechanisms of Protein Folding* 2nd edit. (Pain, R. H., ed.), pp. 138-174. University Press, Oxford.

- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lakshmikanth, G. S. & Krishnamoorthy, G. (1999). Solvent-exposed tryptophans probe the dynamics at protein surfaces. *Biophys. J.* **77**, 1100-1106.
- Landsman, D. (1992). RNP-1, an RNA-binding motif is conserved in the DNA-binding cold-shock domain. *Nucleic Acids Res.* **20**, 2861-2864.
- Latres, E., Malumbres, M., Sotillo, R., Martin, J., Ortega, S., Martin-Caballero, J., Flores, J. M., Cordon-Cardo, C. & Barbacid, M. (2000). Limited overlapping roles of P15(INK4b) and P18(INK4c) cell cycle inhibitors in proliferation and tumorigenesis. *EMBO Journal* **19**, 3496-3506.
- Laurents, D. V. & Baldwin, R. L. (1997). Characterization of the unfolding pathway of hen egg white lysozyme. *Biochemistry* **36**, 1496-1504.
- Laurents, D. V., Corrales, S., Elias-Arnanz, M., Sevilla, P., Rico, M. & Padmanabhan, S. (2000). Folding kinetics of phage 434 cro protein. *Biochemistry* **39**, 13963-13973.
- Lavalette, D., Tetreau, C., Tourbez, M. & Blouquit, Y. (1999). Microscopic viscosity and rotational diffusion of proteins in a macromolecular environment. *Biophys. J.* **76**, 2744-2751.
- Lazaridis, T. & Karplus, M. (1997). "New view" of protein folding reconciled with the old through multiple unfolding simulations. *Science* **278**, 1928-1931.
- Lei, M., Podell, E. R., Baumann, P. & Cech, T. R. (2003). DNA self-recognition in the structure of Pot1 bound to telomeric single-stranded DNA. *Nature* **426**, 198-203.
- Levinthal, C. J. (1969). How to fold graciously. *Mössbaun Spec. Biol. Systems Proc.* **67**, 22-24.
- Li, Y. C. & Montelione, G. T. (1995). Human type-alpha transforming growth factor undergoes slow conformational exchange between multiple backbone conformations as characterized by nitrogen-15 relaxation measurements. *Biochemistry* **34**, 2408-2423.
- Linge, J. P., O'Donoghue, S. I. & Nilges, M. (2001). Automated assignment of ambiguous nuclear overhauser effects with ARIA. *Methods in Enzymology* **339**, 71-90.
- Linge, J. P., Habeck, M., Rieping, W. & Nilges, M. (2003). ARIA: automated NOE assignment and NMR structure calculation. *Bioinformatics* **19**, 315-316.
- Lipari, G. & Szabo, A. (1982a). Model-free approach to the interpretation of nuclear magnetic resonance relaxation in macromolecules .2. Analysis of experimental results. *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 4559-4570.
- Lipari, G. & Szabo, A. (1982b). Model-free approach to the interpretation of nuclear magnetic resonance relaxation in macromolecules .1. Theory and range of validity. *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 4546-4559.
- Lipps, G., Ibanez, P., Stroessenreuther, T., Hekimian, K. & Krauss, G. (2001a). The protein ORF80 from the acidophilic and thermophilic archaeon *Sulfolobus islandicus* binds highly site-specifically to double-stranded DNA and represents a novel type of basic leucine zipper protein. *Nucleic Acids Res.* **29**, 4973-4982.
- Lipps, G., Stegert, M. & Krauss, G. (2001b). Thermostable and site-specific DNA binding of the gene product ORF56 from the *Sulfolobus islandicus* plasmid pRN1, a putative archaeal plasmid copy control protein. *Nucleic Acids Res.* **29**, 904-913.
- Lipps, G., Rother, S., Hart, C. & Krauss, G. (2003). A novel type of replicative enzyme harbouring ATPase, primase and DNA polymerase activity. *EMBO J.* **22**, 2516-2525.
- Lipps, G., Weinzierl, A. O., Von Scheven, G., Buchen, C. & Cramer, P. (2004). Structure of a bifunctional DNA primase-polymerase. *Nat Struct Mol Biol* **11**, 157-162.
- Liu, X. Y., Siegel, D. L., Fan, P., Brodsky, B. & Baum, J. (1996). Direct NMR measurement of the folding kinetics of a trimeric peptide. *Biochemistry* **35**, 4306-4313.
- Lohman, T. M. & Bujalowski, W. (1991). Thermodynamic methods for model-independent determination of equilibrium binding isotherms for protein-DNA interactions: spectroscopic approaches to monitor binding. *Methods Enzymol.* **208**, 258-290.
- Lopez, M. M., Yutani, K. & Makhatadze, G. I. (1999a). Interactions of the major cold shock protein of *Bacillus subtilis* CspB with single-stranded DNA templates of different base composition. *J. Biol. Chem.* **274**, 33601-8.
- Lopez, M. M., Yutani, K. & Makhatadze, G. I. (1999b). Interactions of the major cold shock protein of *Bacillus subtilis* CspB with single-stranded DNA templates of different base composition. *J Biol Chem* **274**, 33601-33608.
- Lopez, M. M. & Makhatadze, G. I. (2000). Major cold shock proteins, CspA from *Escherichia coli* and CspB from *Bacillus subtilis*, interact differently with single-stranded DNA templates. *Biochim. Biophys. Acta* **1479**, 196-202.
- Lopez, M. M., Yutani, K. & Makhatadze, G. I. (2001). Interactions of the cold shock protein CspB from *Bacillus subtilis* with single-stranded DNA. Importance of the T base content and position within the template. *J. Biol. Chem.* **276**, 15511-15518.
- Loria, J. P., Rance, M. & Palmer, A. G., 3rd (1999). A relaxation-compensated Carr-Purcell-Meiboom-Gill sequence for characterizing chemical exchange by NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 2331-2332.

- Löw, C. (2003). Modelle zur Beschreibung der Proteinfaltung von humanem CDK-Inhibitor p19<sup>INK4d</sup>. Diplomarbeit. Universität Bayreuth.
- Luh, F. Y., Archer, S. J., Domaile, P. J., Smith, B. O., Owen, D., Brotherton, D. H., Raine, A. R., Xu, X., Brizuela, L., Brenner, S. L. & Laue, E. D. (1997). Structure of the cyclin-dependent kinase inhibitor p19<sup>Ink4d</sup>. *Nature* **389**, 999-1003.
- Mandel, A. M., Akke, M. & Palmer, A. G., III (1995). Backbone dynamics of Escherichia coli ribonuclease HI: correlations with structure and function in an active enzyme. *J. Mol. Biol.* **246**, 144-163.
- Mandel, A. M., Akke, M. & Palmer, A. G., III (1996). Dynamics of ribonuclease H: Temperature dependence of motions on multiple time scales. *Biochemistry* **35**, 16009-16023.
- Mann, C. J. & Matthews, C. R. (1993). Structure and Stability of an Early Folding Intermediate of Escherichia-coli trp Aporepressor Measured by Far-UV Stopped-Flow Circular Dichroism and 8-Anilino-1-Naphthalene Sulfonate Binding. *Biochemistry* **32**, 5282-5290.
- Marchetti Bradley, C. & Barrick, D. (2002). Limits of cooperativity in a structurally modular protein: Response of the Notch ankyrin domain to analogous alanine substitutions in each repeat. *J Mol Biol* **324**, 373-386.
- Martin, A., Kather, I. & Schmid, F. X. (2002). Origins of the high stability of an in-vitro selected cold-shock protein. *J. Mol. Biol.* **318**, 1341-1349.
- Martinez-Oyanedel, J., Choe, H.-W., Heinemann, U. & Saenger, W. (1991). Ribonuclease T1 with free recognition and catalytic site: crystal structure analysis at 1.5 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **222**, 335-352.
- Mattaj, I. A. & Nagai, K. (1995). Recruiting proteins to the RNA world. *Nat Struct Biol* **2**, 518-522.
- Matthews, B. W., Ohlendorf, D. H., Anderson, D. F. & Takeda, Y. (1982). The DNA loop model for ara repression: AraC protein occupies the proposed loop sites in vivo and repression-negative mutations lie in these same sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 3654-3658.
- Matthews, C. R. (1993). Pathways of Protein Folding. *Annual Review of Biochemistry* **62**, 653-683.
- Mayor, U., Guydosh, N. R., Johnson, C. M., Grossmann, J. G., Sato, S., Jas, G. S., Freund, S. M. V., Alonso, D. O., Daggett, V. & Fersht, A. R. (2003). The complete folding pathway of a protein from nanoseconds to microseconds. *Nature* **421**, 863-867.
- Mayr, L. M. & Schmid, F. X. (1993). A purification method for labile variants of ribonuclease T1. *Protein Expression and Purification* **4**, 52-58.
- Mayr, L. M., Willbold, D., Landt, O. & Schmid, F. X. (1994). Role of the Cys 2-Cys 10 disulfide bond for the structure, stability, and folding kinetics of ribonuclease T1. *Protein Science* **3**, 227-239.
- Mayr, L. M., Odefey, C., Schutkowski, M. & Schmid, F. X. (1996). Kinetic analysis of the unfolding and refolding of ribonuclease T1 by a stopped-flow double-mixing technique. *Biochemistry* **35**, 5550-5561.
- McGee, W. A. & Parkhurst, L. J. (1990). A combined nuclear magnetic resonance and absorbance stopped-flow apparatus for biochemical studies. *Anal. Biochem.* **189**, 267-273.
- Meiler, J., Prompers, J. J., Peti, W., Griesinger, C. & Bruschweiler, R. (2001). Model-free approach to the dynamic interpretation of residual dipolar couplings in globular proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 6098-6107.
- Meiler, J., Peti, W. & Griesinger, C. (2003). Dipolar couplings in multiple alignments suggest alpha helical motion in ubiquitin. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 8072-8073.
- Mercier, P., Spyrapoulos, L. & Sykes, B. D. (2001). Structure, dynamics, and thermodynamics of the structural domain of troponin C in complex with the regulatory peptide 1-40 of troponin I. *Biochemistry* **40**, 10063-10077.
- Milla, M. E. & Sauer, R. T. (1994). P22 Arc Repressor: folding kinetics of a single-domain, dimeric protein. *Biochemistry* **33**, 1125-1133.
- Milla, M. E., Brown, B. M., Waldburger, C. D. & Sauer, R. T. (1995). P22 arc repressor: Transition state properties inferred from mutational effects on the rates of protein unfolding and refolding. *Biochemistry* **34**, 13914-13919.
- Millet, O., Loria, J. P., Kroenke, C. D., Pons, M. & Palmer, A. G., 3rd (2000). The static magnetic field dependence of chemical shift exchange linebroadening defines the NMR chemical shift time scale. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 2867-2877.
- Mitta, M., Fang, L. & Inouye, M. (1997). Deletion analysis of cspA of Escherichia coli: requirement of the AT-rich UP element for cspA transcription and the downstream box in the coding region for its cold shock induction. *Mol Microbiol* **26**, 321-35.
- Mitton-Fry, R. M., Anderson, E. M., Hughes, T. R., Lundblad, V. & Wuttke, D. S. (2002). Conserved structure for single-stranded telomeric DNA recognition. *Science* **296**, 145-147.
- Mizuguchi, M., Kroon, G. J., Wright, P. E. & Dyson, H. J. (2003). Folding of a  $\beta$ -sheet protein monitored by real-time NMR spectroscopy. *J. Mol. Biol.* **328**, 1161-1171.
- Mok, K. H., Nagashima, T., Day, I. J., Jones, J. A., Jones, C. J. V., Dobson, C. M. & Hore, P. J. (2003). Rapid sample-mixing technique for transient NMR and photo-CIDNP spectroscopy: applications to real-time protein folding. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 12484-12492.

- Mok, Y. K., Bycroft, M. & de Prat Gay, G. (1996a). The dimeric DNA binding domain equilibrium of the human papillomavirus E2-protein folds through a monomeric intermediate which cannot be native-like. *Nat Struct Biol* **3**, 711-717.
- Mok, Y. K., de Prat Gay, G., Butler, P. J. & Bycroft, M. (1996b). Equilibrium dissociation and unfolding of the dimeric human papillomavirus strain-16 E2 DNA-binding domain. *Protein Sci.* **5**, 310-319.
- Montelione, G. T. & Wagner, G. (1989). 2D Chemical Exchange NMR Spectroscopy by Proton-Detected Heteronuclear Correlation. *Journal of the American Chemical Society* **111**, 3096-3098.
- Mori, S., Abeygunawardana, C., Johnson, M. O. & van Zijl, P. C. (1995). Improved sensitivity of HSQC spectra of exchanging protons at short interscan delays using a new fast HSQC (FHSQC) detection scheme that avoids water saturation. *J. Magn. Reson. B* **108**, 94-98.
- Mosavi, L. K., Minor, D. L. & Peng, Z. Y. (2002). Consensus-derived structural determinants of the ankyrin repeat motif. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 16029-16034.
- Mueller, U., Perl, D., Schmid, F. X. & Heinemann, U. (2000). Thermal stability and atomic-resolution crystal structure of the *Bacillus caldolyticus* cold shock protein. *J. Mol. Biol.* **297**, 975-988.
- Mulder, F. A., Hon, B., Muhandiram, D. R., Dahlquist, F. W. & Kay, L. E. (2000). Flexibility and ligand exchange in a buried cavity mutant of T4 Lysozyme studied by multinuclear NMR. *Biochemistry* **39**, 12614-12622.
- Mulder, F. A., Mittermaier, A., Hon, B., Dahlquist, F. W. & Kay, L. E. (2001). Studying excited states of proteins by NMR spectroscopy. *Nat. Struct. Biol.* **8**, 932-935.
- Mullins, L. S., Pace, C. N. & Raushel, F. M. (1997). Conformational stability of ribonuclease T1 determined by hydrogen- deuterium exchange. *Protein Science* **6**, 1387-1395.
- Munoz, V., Lopez, E. M., Jager, M. & Serrano, L. (1994). Kinetic characterization of the chemotactic protein from *Escherichia coli*, CheY. Kinetic analysis of the inverse hydrophobic effect. *Biochemistry* **33**, 5858-66.
- Munoz, V. & Serrano, L. (1995a). Elucidating the folding problem of helical peptides using empirical parameters .2. Helix macrodipole effects and rational modification of the helical content of natural peptides. *Journal of Molecular Biology* **245**, 275-296.
- Munoz, V. & Serrano, L. (1995b). Elucidating the folding problem of helical peptides using empirical parameters .3. Temperature and pH dependence. *Journal of Molecular Biology* **245**, 297-308.
- Munoz, V., A., T. P., Hofrichter, J. & Eaton, W. A. (1997). Folding dynamics and mechanism of beta-hairpin formation. *Nature* **390**, 196-199.
- Murzin, A. G. (1993). OB(oligonucleotide/oligosaccharide binding)-fold: common structural and functional solution for non-homologous sequences. *EMBO J.* **12**, 861-7.
- Myers, J. K., Pace, C. N. & Scholtz, J. M. (1995). Denaturant m values and heat capacity changes: Relation to changes in accessible surface areas of protein unfolding. *Protein Sci.* **4**, 2138-2148.
- Myers, J. K. & Oas, T. G. (2001). Preorganized secondary structure as an important determinant of fast protein folding. *Nat. Struct. Biol.* **8**, 552-558.
- Nagai, K., Oubridge, C., Ito, N., Avis, J. & Evans, P. (1995). The RNP domain: A sequence-specific RNA-binding domain involved in processing and transport of RNA. *Trends.Biochem.Sci.* **20**, 235-240.
- Nakagawa, A., Nakashima, T., Taniguchi, M., Hosaka, H., Kimura, M. & Tanaka, I. (1999). The three-dimensional structure of the RNA-binding domain of ribosomal protein L2; a protein at the peptidyl transferase center of the ribosome. *Embo J* **18**, 1459-67.
- Nauli, S., Kuhlman, B. & Baker, D. (2001). Computer-based redesign of a protein folding pathway. *Nat Struct Biol* **8**, 602-605.
- Neu, H. C. & Heppel, L. A. (1965). The release of enzymes from *Escherichia coli* by osmotic shock and during formation of spheroblasts. *Journal of Biological Chemistry* **240**, 3685-3692.
- Neuhaus, K., Francis, K. P., Rapposch, S., Görg, A. & Scherer, S. (1999). Pathogenic *Yersinia* species carry a novel, cold-inducible major cold shock protein tandem gene duplication producing both bicistronic and monocistronic mRNA. *Journal of Bacteriology* **181**, 6449-6455.
- Neuhaus, K., Anastasov, N., Kaberdin, V., Francis, K. P., Miller, V. L. & Scherer, S. (2003). The AGUAAA motif in *cspA1/A2* mRNA is important for adaptation of *Yersinia enterocolitica* to grow at low temperature. *Molecular Microbiology* **50**, 1629-1645.
- Newkirk, K., Feng, W., Jiang, W., Tejero, R., Emerson, S. D., Inouye, M. & Montelione, G. T. (1994). Solution NMR structure of the major cold shock protein (CspA) from *Escherichia coli*: Identification of a binding epitope for DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 5114-5118.
- Nicholson, L. K., Yamazaki, T., Torchia, D. A., Grzesiek, S., Bax, A., Stahl, S. J., Kaufman, J. D., Wingfield, P. T., Lam, P. Y. S., Jadhav, P. K., Hodge, N., Domaille, P. J. & Chang, C.-H. (1995). Flexibility an function in HIV-1 protease. *Nat Struct Biol* **2**, 274-280.
- Nobori, T., Miura, K., Wu, D. J., Lois, A., Takabayashi, K. & Carson, D. A. (1994). Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature* **368**, 753-756.

- Ogasahara, K., Nakamura, M., Nakura, S., Tsunasawa, S., Kato, I., Yoshimoto, T. & Yutani, K. (1998). The unusually slow unfolding rate causes the high stability of pyrrolidone carboxyl peptidase from hyperthermophile *Pyrococcus furiosus*: equilibrium und kinetic studies of guanidine hydrochloride-induced unfolding and refolding. *Biochemistry* **37**, 17537-17544.
- Onuchic, J. N., Soccì, N. D., Lutheyschulten, Z. & Wolynes, P. G. (1996). Protein folding funnels: The nature of the transition state ensemble. *Fold.Des.* **1**, 441-450.
- Onuchic, J. N., Luthey-Schulten, Z. & Wolynes, P. G. (1997). Theory of protein folding: the energy landscape perspective. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **48**, 545-600.
- Oobatake, M., Takahashi, S. & Ooi, T. (1979). Conformational stability of ribonuclease T1. II. Salt-induced renaturation. *Journal of Biochemistry* **86**, 65-70.
- Ornstein, L. (1964). Disc electrophoresis. I. Background and theory. *Ann.NY Acad.Sci.* **121**, 321-349.
- Osapay, K. & Case, D. A. (1994). Analysis of proton chemical shifts in regular secondary structure of proteins. *J biomol NMR* **4**, 215-230.
- Ottiger, M., Tjandra, N. & Bax, A. (1997). Magnetic Field Dependent Amide <sup>15</sup>N Chemical Shifts in a Protein-DNA Complex Resulting from Magnetic Ordering in Solution. *J. Am. Chem Soc.* **119**, 9825-9830.
- Otting, G. & Wüthrich, K. (1989). Extended heteronuclear editing of 2D <sup>1</sup>H NMR spectra of isotope-labeled proteins, using X( $\omega_1, \omega_2$ ) double half filter. *J. Magn. Reson.* **85**, 586-594.
- Outbridge, C., Ito, N., Evans, P. R., Teo, C. H. & Nagai, K. (1994). Crystal structure at 1.92 Å resolution of the RNA-binding domain of the U1A spliceosomal protein complexed with an RNA hairpin. *Nature* **372**, 432-438.
- Pabo, C. O. & Sauer, R. T. (1984). Protein-DNA recognition. *Annual Review of Biochemistry* **53**, 293-321.
- Pace, C. N. (1986). Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. *Methods in Enzymology* **131**, 266-280.
- Pace, C. N. & Creighton, T. E. (1986). The disulphide folding pathway of ribonuclease T1. *Journal of Molecular Biology* **188**, 477-486.
- Pace, C. N. & Grimsley, G. R. (1988). Ribonuclease T1 is stabilized by cation and anion binding. *Biochemistry* **27**, 3242-3246.
- Pace, C. N., Grimsley, G. R., Thomson, J. A. & Barnett, B. J. (1988). Conformational stability and activity of ribonuclease T1 with zero, one, and two intact disulfide bonds. *Journal of Biological Chemistry* **263**, 11820-11825.
- Palmer, A. G., 3rd, Williams, J. & McDermott, A. (1996). Nuclear magnetic resonance studies of biopolymer dynamics. *J Phys Chem* **100**, 13293-13310.
- Palmer, A. G., 3rd (2001). NMR probes of molecular dynamics: overview and comparison with other techniques. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **30**, 129-155.
- Palmer, A. G., III, Rance, M. & Wright, P. E. (1991). Intramolecular motions of a zinc finger DNA-binding domain from xfin characterized by proton detected natural abundance C-13 heteronuclear NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 4371-4380.
- Palmer, A. G., III (1997). Probing molecular motion by NMR. *Curr Opin Struct Biol* **7**, 732-7.
- Palmer, A. G., III, Kroenke, C. D. & Loria, J. P. (2001). Nuclear magnetic resonance methods for quantifying microsecond-to-millisecond motions in biological macromolecules. *Methods Enzymol.* **339**, 204-238.
- Pappu, R. V. & Weaver, D. L. (1998). The early folding kinetics of apomyoglobin. *Protein Sci.* **7**, 480-490.
- Parker, M. J. & Clarke, A. R. (1997). Amide backbone and water-related H/D isotope effects on the dynamics of a protein folding reaction. *Biochemistry* **36**, 5786-5794.
- Pelletier, M., Miller, M. M. & Read, L. K. (2000). RNA-binding properties of the mitochondrial Y-box protein RBP16. *Nucleic Acids Research* **28**, 1266-1275.
- Peng, J. W. & Wagner, G. (1992). Mapping of the spectral densities of N-H bond motions in eglin c using heteronuclear relaxation experiments. *Biochemistry* **31**, 8571-86.
- Peng, X., Holz, I., Zillig, W., Garrett, R. A. & She, Q. (2000). Evolution of the family of pRN plasmids and their integrase-mediated insertion into the chromosome of the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus*. *J Mol Biol* **303**, 449-454.
- Perl, D., Welker, C., Schindler, T., Schröder, K., Marahiel, M. A., Jaenicke, R. & Schmid, F. X. (1998). Conservation of rapid two-state folding in mesophilic, thermophilic and hyperthermophilic cold shock proteins. *Nat. Struct. Biol.* **5**, 229-35.
- Pfeiffer, S., Engelke, J. & Rüterjans, H. (1996). Complete <sup>1</sup>H, <sup>15</sup>N and <sup>13</sup>C resonance assignment of ribonuclease T1: secondary structure and backbone dynamics as derived from chemical shifts. *Quart. Magn. Res. Biol. Med.* **3**, 69-87.
- Pfeiffer, S., Karimi-Nejad, Y. & Rüterjans, H. (1997). Limits of NMR structure determination using variable target function calculations: ribonuclease T1, a case study. *J. Mol. Biol.* **266**, 400-423.
- Phadtare, S., Alsina, J. & Inouye, M. (1999). Cold-shock response and cold-shock proteins. *Curr Opin Microbiol* **2**, 175-180.

- Phadtare, S., Inouye, M. & Severinov, K. (2002a). The nucleic acid melting activity of Escherichia coli CspE is critical for transcription antitermination and cold acclimation of cells. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 7239-7245.
- Phadtare, S., Tyagi, S., Inouye, M. & Severinov, K. (2002b). Three amino acids in Escherichia coli CspE surface-exposed aromatic patch are critical for nucleic acid melting activity leading to transcription antitermination and cold acclimation of cells. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 46706-46711.
- Piotto, M., Saudek, V. & Sklenar, V. (1992). Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions. *Journal of Biomolecular NMR* **2**, 661-665.
- Price, S. R., Evans, P. R. & Nagai, K. (1998). Crystal structure of the spliceosomal U1B'-U1A' protein complex bound to a fragment of U2 small nuclear RNA. *Nature* **394**, 645-650.
- Privalov, P. L. (1993). Physical basis of the stability of the folded conformations of proteins. In *Protein folding* (Creighton, T. E., ed.). Freeman, New York.
- Ptitsyn, O. B., Pain, R. H., Semisotnov, G. V., Zerovnik, E. & Razgulyaev, O. I. (1990). Evidence for a molten globule state as a general intermediate in protein folding. *FEBS Lett* **262**, 20-24.
- Quaas, R., Grunert, H.-P., Kimura, M. & Hahn, U. (1988). Expression of ribonuclease T1 in *Escherichia coli* and rapid purification of the enzyme. *Nucleosides & Nucleotides* **7**, 619-623.
- Quaas, R., Landt, O., Grunert, H.-P., Beineke, M. & Hahn, U. (1989). Indicator plates for rapid detection of ribonuclease T1 secreting *Escherichia coli* clones. *Nucleic Acids Research* **17**, 3318-3323.
- Radford, S. E., Dobson, C. M. & Evans, P. A. (1992). The Folding of Hen Lysozyme Involves Partially Structured Intermediates and Multiple Pathways. *Nature* **358**, 302-307.
- Radford, S. E. (2000). *Trends in Biochemical Sciences* **25**, 611-618.
- Ramachandran, G. N. & Mitra, A. K. (1976). An explanation for the rare occurrence of cis peptide units in proteins and polypeptides. *Journal of Molecular Biology*, 85-92.
- Renner, C., Baumgartner, R., Noegel, A. A. & Holak, T. A. (1998). Backbone dynamics of the CDK inhibitor p19<sup>INK4d</sup> studied by <sup>15</sup>N NMR relaxation experiments at two field strengths. *J Mol Biol* **283**, 221-9.
- Renner, C. & Holak, T. A. (2000). Separation of anisotropy and exchange line broadening using <sup>15</sup>N CSA-<sup>15</sup>N-<sup>1</sup>H dipol-dipol relaxation cross-correlation experiments. *J. Magn. Reson.* **145**, 192-200.
- Roder, H., Elöve, G. A. & Englander, S. W. (1988). Structural characterization of folding intermediates in cytochrome c by hydrogen exchange labeling and proton NMR. *Nature* **335**, 700-704.
- Roder, H. (1989). Structural characterization of protein folding intermediates by proton magnetic resonance and hydrogen exchange. *Methods Enzymol.* **176**, 446-473.
- Ropson, I. J. & Frieden, C. (1992). Dynamic NMR spectral analysis and protein folding - Identification of a highly populated folding intermediate of rat intestinal fatty acid-binding protein by <sup>19</sup>F NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 7222-7226.
- Rösner, H. (2002). Stabilität und Faltung von humanem CDK-Inhibitor p19<sup>INK4d</sup>. Diplomarbeit. Universität Bayreuth.
- Russell, B. S., Melenkivitz, R. & Bren, K. L. (2000). NMR investigation of ferricytochrome c unfolding: detection of an equilibrium unfolding intermediate and residual structure in the denatured state. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 8312-8317.
- Russo, A. A., Tong, L., Lee, J. O., Jeffrey, P. D. & Pavletich, N. P. (1998). Structural basis for inhibition of the cyclin-dependent kinase Cdk6 by the tumour suppressor p16<sup>INK4a</sup>. *Nature* **395**, 237-243.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sandström, J. (1982). *Dynamic NMR spectroscopy*. Academic Press, New York.
- Santoro, M. M. & Bolen, D. W. (1988). Unfolding free energy changes determined by the linear extrapolation method. 1. Unfolding of phenylmethanesulfonyl  $\alpha$ -chymotrypsin using different denaturants. *Biochemistry* **27**, 8063-8068.
- Sato, S., Kuhlman, B., Wu, W. J. & Raleigh, D. P. (1999). Folding of the multidomain ribosomal protein L9: the two domains fold independently with remarkably different rates. *Biochemistry* **38**, 5643-50.
- Sattler, M., Schleucher, J. & Griesinger, C. (1999). Heteronuclear multidimensional NMR experiments for the structure determination of proteins in solution employing pulsed field gradients. *Prog. NMR Spectrosc.* **34**, 93-158.
- Schägger, H. & von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry* **166**, 368-379.
- Schindelin, H., Herrler, M., Willimsky, G., Marahiel, M. A. & Heinemann, U. (1992). Overproduction, Crystallization, and Preliminary X-Ray Diffraction Studies of the Major Cold Shock Protein from *Bacillus subtilis*, CspB. *Protein-Struct.Funct.Genet.* **14**, 120-124.
- Schindelin, H., Marahiel, M. A. & Heinemann, U. (1993). Universal nucleic acid-binding domain revealed by crystal structure of the *B. subtilis* major cold-shock protein. *Nature* **364**, 164-168.

- Schindelin, H., Jiang, W. N., Inouye, M. & Heinemann, U. (1994). Crystal structure of CspA, the major cold shock protein of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **91**, 5119-5123.
- Schindler, T. (1994). Stabilität und Faltung des Kälteschockproteins CspB aus *Bacillus subtilis*. Diplomarbeit. Bayreuth.
- Schindler, T., Herrler, M., Marahiel, M. A. & Schmid, F. X. (1995). Extremely rapid folding in the absence of intermediates: the cold-shock protein from *Bacillus subtilis*. *Nat. Struct. Biol.* **2**, 663-673.
- Schindler, T. & Schmid, F. X. (1996). Thermodynamic properties of an extremely rapid protein folding reaction. *Biochemistry* **35**, 16833-16842.
- Schindler, T. (1997). Das Kälteschockprotein: ein Modellsystem für elementare Prozesse der Proteinfaltung. Dissertation. Bayreuth.
- Schindler, T., Perl, D., Graumann, P., Sieber, V., Marahiel, M. A. & Schmid, F. X. (1998). Surface-exposed phenylalanines in the RNP1/RNP2 motif stabilize the cold-shock protein CspB from *Bacillus subtilis*. *Proteins* **30**, 401-406.
- Schindler, T., Graumann, P. L., Perl, D., Ma, S., Schmid, F. X. & Marahiel, M. A. (1999). The family of cold shock proteins of *Bacillus subtilis*. Stability and dynamics in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* **274**, 3407-3413.
- Schmid, F. X. & Baldwin, R. L. (1978). Acid catalysis of the formation of the slow-folding species of RNase A: evidence that the reaction is proline isomerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **75**, 4764-4768.
- Schmid, F. X. (1981). A native-like intermediate on the ribonuclease A folding pathway. 1. Detection by tyrosine fluorescence changes. *Eur J Biochem* **114**, 105-9.
- Schmid, F. X. (1992). Kinetics of unfolding and refolding of single-domain proteins. In *Protein folding 1* edit. (Creighton, T. E., ed.), pp. 197-241. Freeman, New York.
- Schmid, F. X. (1999). Protein folding. In *Proteins: A Comprehensive Treatise* (Allen, G., ed.), pp. 153-215. JAI Press, Greenwich, Connecticut.
- Schnuchel, A., Wiltschek, R., Czisch, M., Herrler, M., Willimsky, G., Graumann, P., Marahiel, M. A. & Holak, T. A. (1993). Structure in solution of the major cold-shock protein from *Bacillus subtilis*. *Nature* **364**, 169-171.
- Schnuchel, A. (1995). Proteinstrukturbestimmung von Aktin- und DNA-bindenden Proteinen mit mehrdimensionaler NMR-Spektroskopie. Dissertation. München.
- Schönbrunner, N., Pappenberger, G., Scharf, M., Engels, J. & Kiefhaber, T. (1997). Effect of preformed correct tertiary interactions on rapid two-state tandem folding: evidence for hairpins as initiation sites for beta-sheet formation. *Biochemistry* **36**, 9057-9065.
- Schröder, K., Graumann, P., Schnuchel, A., Holak, T. A. & Marahiel, M. A. (1995). Mutational analysis of the putative nucleic acid-binding surface of the cold-shock domain, CspB, revealed an essential role of aromatic and basic residues in binding of single-stranded DNA containing the Y-box motif. *Mol. Microbiol.* **16**, 699-708.
- Schwalbe, H., Fiebig, K. M., Buck, M., Jones, J. A., Grimshaw, S. B., Spencer, A., Glaser, S. J., Smith, L. J. & Dobson, C. M. (1997). Structural and dynamical properties of a denatured protein. Heteronuclear 3D NMR experiments and theoretical simulations of lysozyme in 8 M urea. *Biochemistry* **36**, 8977-91.
- Seewald, M. J., Pichumani, K., Stowell, C., Tibbals, B. V., Regan, L. & Stone, M. J. (2000). The role of backbone conformational heat capacity in protein stability: temperature dependent dynamics of the B1 domain of Streptococcal protein G. *Protein Sci.* **9**, 1177-93.
- Serrano, M., Hannon, G. J. & Beach, D. (1993). A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* **371**, 257-261.
- Sette, M., van Tilborg, P., Spurio, R., Kaptein, R., Paci, M., Gualerzi, C. O. & Boelens, R. (1997). The structure of the translational initiation factor IF1 from *E. coli* contains an oligomer-binding motif. *EMBO J.* **16**, 1436-1443.
- Shastry, M. C. & Roder, H. (1998). Evidence for barrier-limited protein folding kinetics on the microsecond time scale. *Nat Struct Biol* **5**, 385-392.
- Shea, J. E., Onuchic, J. N. & Brooks, C. L. I. (1999). Exploring the origins of topological frustration: design of a minimally frustrated model of fragment B of protein A. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 12512-12517.
- Shea, J. E., Onuchic, J. N. & Brooks, C. L. I. (2002). Probing the folding free energy landscape of the Src-SH3 protein domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 16064-16068.
- Sherr, C. J. (1996). Cancer cell cycles. *Science* **274**, 1672-1677.
- Sherr, C. J. & Roberts, J. M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes. Dev.* **13**, 1501-1512.
- Snow, C. D., Nguyen, H., Pande, V. J. & Gruebele, M. (2002). Absolute comparison of simulated and experimental protein-folding dynamics. *Nature* **420**, 33-34.

- Spector, S. & Raleigh, D. P. (1999). Submillisecond folding of the peripheral subunit-binding domain. *J Mol Biol* **293**, 763-8.
- Steggborn, C., Schneider-Hassloff, H., Zeeb, M. & Balbach, J. (2000). Cooperativity of a protein folding reaction probed at multiple chain positions by real-time 2D NMR spectroscopy. *Biochemistry* **39**, 7910-7919.
- Sterner, R., Kleemann, G. R., Szadkowski, H., Lustig, A., Hennig, M. & Kirschner, K. (1996). Phosphoribosyl anthranilate isomerase from *Thermotoga maritima* is an extremely stable and active homodimer. *Protein Science* **5**, 2000-2008.
- Stewart, D. E., Sarkar, A. & Wampler, J. E. (1990). Occurrence and role of cis peptide bonds in protein structures. *J. Mol. Biol.* **214**, 253-260.
- Stühlke, J. (2002). Control of transcription termination in bacteria by RNA-binding proteins that modulate RNA structures. *Arch Microbiol* **177**, 433-440.
- Tabor, S. & Richardson, C. C. (1985). A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 1074-8.
- Takahashi, K., Uchida, T. & Egami, F. (1970). Ribonuclease T1: structure and function. *Advances in Biophysics* **1**, 53-98.
- Talluri, S. & Wagner, G. (1996). An optimized 3D NOESY-HSQC. *J Magn Res* **112B**, 200-205.
- Tanford, C. (1968). Protein denaturation, part A. *Advances in Protein Chemistry* **23**, 121-217.
- Tanford, C. (1970). Protein denaturation. C. Theoretical models for the mechanism of denaturation. *Adv. Protein Chem.* **24**, 1-95.
- Tang, K. S., Guralnick, B. J., Wang, W. K., Fersht, A. R. & Itzhaki, L. S. (1999). Stability and folding of the tumour suppressor protein p16. *J. Mol. Biol.* **285**, 1869-1886.
- Tang, K. S., Fersht, A. R. & Itzhaki, L. S. (2003). Sequential unfolding of ankyrin repeats in tumour suppressor p16. *Structure* **11**, 67-73.
- Teilum, K., Maki, K., Kragelund, B. B., Poulsen, F. M. & Roder, H. (2002). Early kinetic intermediate in the folding of acyl-CoA binding protein detected by fluorescence labeling and ultrarapid mixing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 9807-9812.
- Tessari, M., Mulder, F. A. A., de Graaf, R. A., Boelens, R. & Vuister, G. W. (1997). Determination of amide proton CSA in  $^{15}\text{N}$  labeled proteins using  $^1\text{H}$  CSA/ $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  dipolar and  $^{15}\text{N}$  CSA/ $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  dipolar cross-correlation rates. *J. Magn. Reson.* **127**, 128-133.
- Thoma, R., Hennig, M., Sterner, R. & Kirschner, K. (2000). Structure and function of mutationally generated monomers dimeric phosphoribosylanthranilate isomerase from *Thermotoga maritima*. *Structure Fold. Des.* **8**, 265-276.
- Thullberg, M., Bartek, J. & Lukas, J. (2000a). Ubiquitin/proteasome-mediated degradation of p19INK4d determines its periodic expression during the cell cycle. *Oncogene* **19**, 2870-2876.
- Thullberg, M., Bartkova, J., Khan, S., Hansen, K., Ronnstrand, L., Lukas, J., Strauss, M. & Bartek, J. (2000b). Distinct versus redundant properties among members of the INK4 family of cyclin-dependent kinase inhibitors. *FEBS Lett.* **470**, 161-166.
- Tjandra, N., Szabo, A. & Bax, A. (1996). Protein Backbone Dynamics and  $^{15}\text{N}$  Chemical Shift Anisotropy from Quantitative Measurement of Relaxation Interference Effects. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 6986-6991.
- Tollinger, M., Skrynnikov, N. R., Mulder, F. A., Forman-Kay, J. D. & Kay, L. E. (2001). Slow dynamics in folded and unfolded states of an SH3 domain. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 11341-11352.
- Tsong, T.-Y. & Baldwin, R. L. (1972a). Kinetic evidence for intermediate states in the unfolding of chymotrypsinogen A. *J Mol Biol* **69**, 145-148.
- Tsong, T.-Y. & Baldwin, R. L. (1972b). Kinetic evidence for intermediate states in the unfolding of ribonuclease A. II. Kinetics of exposure to solvent of a specific dinitrophenyl group. *J Mol Biol* **69**, 149-153.
- Udgaonkar, J. B. & Baldwin, R. L. (1988). NMR evidence for an early framework intermediate on the folding pathway of ribonuclease A. *Nature* **335**, 694-699.
- Udgaonkar, J. B. & Baldwin, R. L. (1990). Early folding intermediate of ribonuclease A. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 8197-201.
- van Mierlo, C. P., van Dongen, W. M., Vergeldt, F., van Berkel, W. J. & Steensma, E. (1998). The equilibrium unfolding of *Azotobacter vinelandii* apoflavodoxin II occurs via a relatively stable folding intermediate. *Prot. Sci.* **7**, 2331-2344.
- van Mierlo, C. P., van den Oever, J. M. & Steensma, E. (2000). Apoflavodoxin (un)folding followed at the residue level by NMR. *Prot. Sci.* **9**, 145-157.
- van Nuland, N. A., Chiti, F., Taddei, N., Raugei, G., Ramponi, G. & Dobson, C. M. (1998a). Slow folding of muscle acylphosphatase in the absence of intermediates. *J. Mol. Biol.* **283**, 883-891.
- van Nuland, N. A. J., Forge, V., Balbach, J. & Dobson, C. M. (1998b). Real-time NMR studies of protein folding. *Acc. Chem. Res.* **31**, 773-780.
- van Nuland, N. A. J., Meijberg, W., Warner, J., Forge, V., Scheek, R. M., Robillard, G. T. & Dobson, C. M. (1998c). Slow cooperative folding of a small globular protein HPr. *Biochemistry* **37**, 622-637.

- Vanhove, M., Lejeune, A. & Pain, R. H. (1998). Beta-lactamases as models for protein folding studies. *Cell Mol Life Sci* **54**, 372-377.
- Vugmeyster, L., Kroenke, C. D., Picart, F., Palmer, A. G., 3rd & Raleigh, D. P. (2000).  $^{15}\text{N}$   $R_{1\rho}$  measurements allow the determination of ultrafast folding rates. *J Am Chem Soc* **122**, 5387-5388.
- Vugmeyster, L., Trott, O., McKnight, C. J., Raleigh, D. P. & Palmer, A. G., 3rd (2002). Temperature-dependent dynamics of the villin headpiece helical subdomain, an unusually small thermostable protein. *J Mol Biol* **320**, 841-854.
- Vuister, G. W. & Bax, A. (1993). Quantitative J correlation: a new approach for measuring homonuclear three-bond  $J(\text{H}^{\text{N}}-\text{H}^{\alpha})$  coupling constants in  $^{15}\text{N}$ -enriched proteins. *J Am Chem Soc* **115**, 7772-7777.
- Wagner, G. & Wüthrich, K. (1982). Amide proton exchange and surface conformation of the basic pancreatic trypsin inhibitor in solution. Studies with two-dimensional nuclear magnetic resonance. *J. Mol. Biol.* **160**, 343-361.
- Wallace, R. B. & Miyada, C. G. (1987). Oligonucleotide probes for the screening of recombinant DNA libraries. *Methods Enzymol* **152**, 432-442.
- Wand, A. J., Roder, H. & Englander, S. W. (1986). Two-dimensional  $^1\text{H}$  NMR studies of cytochrome c: hydrogen exchange in the N-terminal helix. *Biochemistry* **25**, 1107-1114.
- Wand, A. J., Ehrhardt, M. R. & Flynn, P. F. (1998). High-resolution NMR of encapsulated proteins dissolved in low-viscosity fluids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 15299-15302.
- Wang, C., Grey, M. J. & Palmer, A. G., III (2001). CPMG sequences with enhanced sensitivity to chemical exchange. *J. Biomol. NMR* **21**, 361-366.
- Wang, M., Tang, Y., Sato, S., Vugmeyster, L., McKnight, C. J. & Raleigh, D. P. (2003). Dynamic NMR line-shape analysis demonstrates that the villin headpiece subdomain folds on the microsecond time scale. *J Am Chem Soc* **125**, 6032-6033.
- Wang, N., Yamanaka, K. & Inouye, M. (1999). CspI, the ninth member of the CspA family of Escherichia coli, is induced upon cold shock. *J Bacteriol* **181**, 1603-1609.
- Wassenberg, D., Liebl, W. & Jaenicke, R. (2000). Maltose-binding protein from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*: stability and binding properties. *J. Mol. Biol.* **295**, 279-288.
- Weber, M. H., Fricke, I., Doll, N. & Marahiel, M. A. (2002). CSDBase: an interactive database for cold shock domain-containing proteins and the bacterial cold shock response. *Nucleic Acids Res.* **30**, 375-378.
- Weber, M. H. & Marahiel, M. A. (2002). Coping with the cold: the cold shock response in the Gram-positive soil bacterium *Bacillus subtilis*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **357**, 895-907.
- Weininger, U. (2004). Projektarbeit. Universität Bayreuth.
- Weissman, J. S. & Kim, P. S. (1991). Reexamination of the Folding of BPTI - Predominance of Native Intermediates. *Science* **253**, 1386-1393.
- Welker, C., Bohm, G., Schurig, H. & Jaenicke, R. (1999). Cloning, overexpression, purification, and physicochemical characterization of a cold shock protein homolog from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *Protein Sci* **8**, 394-403.
- Wendt, H., Berger, C., Baici, A., Thomas, R. M. & Bosshard, H. R. (1995). Kinetics of folding of leucine zipper domains. *Biochemistry* **34**, 4097-4107.
- Wider, G., Neri, D. & Wüthrich, K. (1991). Studies of slow conformational equilibria in macromolecules by exchange of heteronuclear longitudinal 2-spin-order in a 2D difference correlation experiment. *Journal of Biomolecular NMR* **1**, 93-98.
- Wildegger, G., Liemann, S. & Glockshuber, R. (1999). Extremely rapid folding of the C-terminal domain of the prion protein without kinetic intermediates. *Nat Struct Biol* **6**, 550-3.
- Wilkins, D. K., Grimshaw, S. B., Receveur, V., Dobson, C. M., Jones, J. A. & Smith, L. J. (1999). Hydrodynamic radii of native and denatured proteins measured by pulse field gradient NMR techniques. *Biochemistry* **38**, 16424-16431.
- Wolynes, P. G., Onuchic, J. N. & Thirumalai, D. (1995). Navigating the folding routes. *Science* **267**, 1619-1620.
- Woodward, C. K. (1994). Hydrogen exchange rates and protein folding. *Current Opinion in Structural Biology* **4**, 112-116.
- Wüthrich, K. & Wagner, G. (1979). Nuclear magnetic resonance of labile protons in the basic pancreatic trypsin inhibitor. *J. Mol. Biol.* **130**, 1-18.
- Xia, B., Etchegaray, J. P. & Inouye, M. (2001a). Nonsense mutations in *cspA* cause ribosome trapping leading to complete growth inhibition and cell death at low temperature in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 35581-35588.
- Xia, B., Ke, H. & Inouye, M. (2001b). Acquisition of cold sensitivity by quadruple deletion of the *cspA* family and its suppression by PNPase S1 domain in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **40**, 179-188.

- Xia, B., Ke, H., Jiang, W. & Inouye, M. (2002). The cold box stem-loop proximal to the 5'-end of the *Escherichia coli* cspA gene stabilizes its mRNA at low temperature. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 6005-6011.
- Yamanaka, K., Fang, L. & Inouye, M. (1998). The CspA family in *Escherichia coli*: multiple gene duplication for stress adaptation. *Mol Microbiol* **27**, 247-255.
- Yamanaka, K., Mitta, M. & Inouye, M. (1999). Mutation analysis of the 5' untranslated region of the cold shock cspA mRNA of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **181**, 6284-91.
- Yamanaka, K. & Inouye, M. (2001). Selective mRNA degradation by polynucleotide phosphorylase in cold shock adaption in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **183**, 247-255.
- Yang, D., Mok, Y. K., Forman-Kay, J. D., Farrow, N. A. & Kay, L. E. (1997). Contributions to protein entropy and heat capacity from bond vector motions measured by NMR spin relaxation. *Journal of Molecular Biology* **272**, 790-804.
- Zagrovic, B., Snow, C. D., Shirts, M. R. & Pande, V. J. (2002). Simulation of folding of a small alpha-helical protein in atomistic detail using worldwide-distributed computing. *J Mol Biol* **323**, 927-937.
- Zeeb, M. (2000). NMR-spektroskopische Untersuchungen zur DNA-Bindung und Faltung des Kälteschockproteins CspB aus *Bacillus subtilis*. Diplomarbeit. Universität Bayreuth.
- Zeeb, M., Rösner, H., Zeslawski, W., Canet, D., Holak, T. A. & Balbach, J. (2002). Protein folding and stability of human CDK inhibitor p19<sup>INK4d</sup>. *J. Mol. Biol.* **315**, 447-457.
- Zeeb, M. & Balbach, J. (2003a). Single-stranded DNA binding of the cold shock protein CspB from *Bacillus subtilis*: NMR mapping and mutational characterisation. *Protein Sci.* **12**, 112-123.
- Zeeb, M. & Balbach, J. (2003b). Millisecond protein folding studied by NMR spectroscopy. *Protein and Peptide Letters*, in press.
- Zeeb, M., Jacob, M. H., Schindler, T. & Balbach, J. (2003). <sup>15</sup>N relaxation study of the cold shock protein CspB at various solvent viscosities. *J. Biomol. NMR* **27**, 221-234.
- Zeeb, M., Lipps, G., Lilie, H. & Balbach, J. (2004). Folding and association of an extremely stable protein dimer from *Sulfolobus islandicus*. *J Mol Biol* **336**, 227-240.
- Zhang, B. & Peng, Z. (2000). A minimum folding unit in the ankyrin repeat protein p16(INK4). *J Mol Biol* **299**, 1121-32.
- Zindy, F., Quelle, D. E., Roussel, M. F. & Sherr, C. J. (1997). Expression of the p16INK4a tumor suppressor versus other INK4 family members during mouse development and aging. *Oncogene* **15**, 203-211.
- Zindy, F., van Deursen, J., Grosveld, G., Sherr, C. J. & Roussel, M. F. (2000). INK4d-deficient mice are fertile despite testicular atrophy. *Mol Cell Biol* **20**, 372-8.
- Zitzewitz, J. A., Bilsel, O., Luo, J., Jones, B. E. & Matthews, C. R. (1995). Probing the folding mechanism of a leucine zipper peptide by stopped-flow circular dichroism spectroscopy. *Biochemistry* **34**, 12812-12819.
- Zitzewitz, J. A., Ibarra-Molero, B., Fishel, D. R., Terry, K. L. & Matthews, C. R. (2000). Preformed secondary structure drives the association reaction of GCN4-p1, a model coiled-coil system. *J Mol Biol* **296**, 1105-1116.
- Zweifel, M. E. & Barrick, D. (2001). Studies for ankyrin repeats of the *Drosophila melanogaster* Notch Receptor. 2. Solution stability and cooperativity of unfolding. *Biochemistry* **40**, 14357-14367.

## 9. ANHANG

### 9.1 Pulsprogramme zur Aufnahme von NMR-Spektren

#### 9.1.1 Bestimmung der skalaren $^3J(\text{H}^N, \text{H}^\alpha)$ mit dem 3D $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ HNHA-Experiment

---

```

mznhhagp3df2
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>

"d11=30m"
"d12=20u"
"d23=13.05m"      ;zeta
"d24=4.5m"        ;delta

"in20=in0"
"d10=3u"
"d0=d24*0.5-(p22-p21)*0.5-(p2-
p1)*0.5+d10*0.5"
"d20=d23-d24*0.5-p16-d16-p1*0.5-p22-p21*0.5-
d10*1.5-4u"

"DELTA1=d23-d24-p21-p16-d16-4u"
"DELTA2=d23-p16-d16-4u"
"DELTA3=d24-4u"

"TAU=p22+d10*2"

aqseq 312

1 ze
  d11 p116:f2
2 d11 do:f2
3 d12 p19:f1
  d12 fq1:f1
  d1 cw:f1 ph29
  4u do:f1
  d12 fq1:f1
  d12 p11:f1
  (p1 ph2)
  d24 p13:f2 UNBLKGRAD
  (p21 ph7):f2
  4u

p16:gp1
d16
DELTA1
(p2 ph3)
(DELTA2) (d0 p22 ph1):f2
4u
p16:gp1
d16
(p1 ph4)
d10
(p22 ph8):f2
d10
p2 ph1
TAU
(p1 ph5)
4u
p16:gp2
d16
(DELTA2 p2 ph6 DELTA1) (d20 p22 ph1):f2
4u
p16:gp2
d16
(p21 ph1):f2
DELTA3 p116:f2
4u BLKGRAD
(p28 ph9)      ; trim pulse 1ms
go=2 ph31 cpd2:f2
d11 do:f2 mc #0 to 2
  F1PH(ip7, id0 & id20)
  F2PH(rd0 & rd20 & ip2 & ip3 & ip4, id10)
exit

ph1=0
ph2=0
ph3=0 0 0 0 2 2 2 2
ph4=0 2
ph5=0 0 2 2
ph6=0 0 0 0 2 2 2 2
ph7=0
ph8=0 0 0 0 0 0 0 1 1 1 1 1 1 1 1
ph9=1 3
ph29=0
ph31=0 0 0 0 0 0 0 2 2 2 2 2 2 2 2

```

---

### 9.1.2 Bestimmung residueller dipolarer Kopplungen ( $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ )

;Teilspektren der Komponenten werden mit wr#1 und wr#2 in separaten Experimenten gespeichert.

```

jbdipoi1
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>

"d11=30m"
"d12=20u"

"p2=p1*2"
"p22=p21*2"

"d0=3u"
"d8=2.65m"
"d9=d8-p1-d0"
"d29=d9+p1"

"DELTA=d19-p22/2"
"DELTA1=d26-p16-d16-p28*3-d19*5+p22/2"
"DELTA2=d26-p16-d16-p28*3-d19*5+p22/2-8u"

"TAU=d26-p16-4u"
"CEN_HN1=(p22-p2)/2"
"CEN_HN2=(p22-p2)/2"

"l3=(td1/2)"

1 ze
  d11 p116:f2
  d12
2 d1 do:f2
  d12
3 d12
  9m
4 d11
5 d12 p11:f1
  d12 p12:f2
  50u UNBLKGRAD
  (p21 ph0):f2
  GRADIENT(cnst20)
  d16
  5m
  (p1 ph0)
  4u
  GRADIENT(cnst21)
  TAU
  (CEN_HN2 p2 ph0) (p22 ph6):f2
  4u
  GRADIENT(cnst21)
  TAU
  (p1 ph1)
  4u
  GRADIENT(cnst22)
  d16
  (p21 ph4):f2
  d8
  (CEN_HN1 p2 ph7):f1 (p22 ph0):f2
  d9
  (p1 ph5):f1
  d0
  (p21 ph0):f2
  4u
  GRADIENT(cnst23)
  d16
  (p1 ph0)
  DELTA1
  GRADIENT(cnst24)
  d16 p118:f1
  p28*0.231 ph0
  d19*2
  p28*0.692 ph0
  d19*2
  p28*1.462 ph0
  DELTA
  (p22 ph0):f2
  DELTA
  p28*1.462 ph2
  d19*2
  p28*0.692 ph2
d19*2
p28*0.692 ph0
d19*2
p28*1.462 ph0
DELTA
(p22 ph0):f2
DELTA
p28*1.462 ph2
d19*2
p28*0.692 ph2

```

;\*\*\*\*\* 2nd \*\*\*\*\*

```

6 d1 do:f2
  d12
  d12
  9m
  d11
  d12 p11:f1
  d12 p12:f2
  50u UNBLKGRAD
  (p21 ph0):f2
  GRADIENT(cnst20)
  d16
  5m
  (p1 ph0)
  4u
  GRADIENT(cnst21)
  TAU
  (CEN_HN2 p2 ph0) (p22 ph6):f2
  4u
  GRADIENT(cnst21)
  TAU
  (p1 ph1)
  4u
  GRADIENT(cnst22)
  d16
  (p21 ph14):f2
  d8
  (p22 ph0):f2
  d29
  d0
  (p21 ph0):f2
  4u
  GRADIENT(cnst23)
  d16
  (p1 ph0)
  DELTA1
  GRADIENT(cnst24)
  d16 p118:f1
  p28*0.231 ph0
  d19*2
  p28*0.692 ph0
  d19*2
  p28*1.462 ph0
  DELTA
  (p22 ph0):f2
  DELTA
  p28*1.462 ph2
  d19*2
  p28*0.692 ph2

```

```

d19*2 p28*0.231 ph2          lo to 5 times l3
4u
GRADIENT(cnst24)             exit
d16
4u BLKGRAD
DELTA2 p116:f2              ph0=0
go=6 ph31 cpd2:f2          ph1=1
d1 do:f2 wr #2 if #2 zd     ph2=2
d12                          ph3=3
d12                          ph4=1 3
3m ip4                       ph5=0 0 2 2
3m ip6                       ph6=0
3m ip14                      ph7=0 0 0 0 2 2 2
lo to 4 times 2             ph14=0 2
d11 id0                      ph31=0 2 0 2

```

### 9.1.3 $^{13}\text{C}(\omega_1, \omega_2)$ -Doppelhalbfiter-NOESY

;Getrennte Speicherung der Teilspektren der vier Komponenten mit wr#1 bis wr#4  
;Für Homodimere nur Aufzeichnung von x,x und -x,-x notwendig

```

mzdohafi3919i14
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>

"d11=30m"
"d12=20u"

"p2=p1*2"
"p4=p3*2"

"d21=d2-2*d0-p4"

"CEN_HN2=(p4+2u-p2)/2"
"DELTA=d19-(p4+2u)/2"
"DELTA1=d2-p16-d16-p28*3-d19*5+(p4+2u)/2"
"DELTA2=d2-p16-d16-p28*3-d19*5+(p4+2u)/2-8u"

;***** -x x *****

1 ze
  d11 p116:f2

;***** x x *****

2 d11 do:f2
3 d12 p19:f1
  d1 cw:f1
  d13 do:f1
  d12 p11:f1
  (p1 ph1)
  d2 p12:f2 ; TAU=1/(2J(YH))
  (CEN_HN2 p2 ph2) (p3 ph8 2u p3 ph10):f2
  d21
  d0
  (p4 ph3):f2
  d0
  (p1 ph4)
  d8 ; Mischzeit
  50u UNBLKGRAD
  GRADIENT(cnst21)
  d16
  (p1 ph5)
  DELTA1
  GRADIENT(cnst22)
  d16 p118:f1
  p28*0.231 ph18
  d19*2
  p28*0.692 ph18
  d19*2
  p28*1.462 ph18
  DELTA
  (p3 ph8 2u p3 ph13):f2
  DELTA
  p28*1.462 ph19
  d19*2

4 d12 p19:f1
  d1 cw:f1
  d13 do:f1
  d12 p11:f1
  (p1 ph1)
  d2 p12:f2 ; TAU=1/(2J(YH))
  (CEN_HN2 p2 ph2) (p3 ph8 2u p3 ph12):f2
  d21
  d0
  (p4 ph3):f2
  d0
  (p1 ph4)
  d8
  50u UNBLKGRAD
  GRADIENT(cnst21)
  d16
  (p1 ph5)
  DELTA1
  GRADIENT(cnst22)
  d16 p118:f1
  p28*0.231 ph18
  d19*2
  p28*0.692 ph18
  d19*2
  p28*1.462 ph18
  DELTA
  (p3 ph8 2u p3 ph13):f2
  DELTA
  p28*1.462 ph19
  d19*2

```

```

p28*0.692 ph19
d19*2
p28*0.231 ph19
4u
GRADIENT(cnst23)
d16
4u BLKGRAD
DELTA2 p116:f2
go=4 ph31 cpd2:f2
d11 do:f2 wr #2 if #2 zd

;***** x -x *****
5 d12 p19:f1
d1 cw:f1
d13 do:f1
d12 p11:f1
(p1 ph1)
d2 p12:f2 ; TAU=1/(2J(YH))
(CEN_HN2 p2 ph2) (p3 ph8 2u p3 ph14):f2
d21
d0
(p4 ph3):f2
d0
(p1 ph4)
d8
50u UNBLKGRAD
GRADIENT(cnst21)
d16
(p1 ph5)
DELTA1
GRADIENT(cnst22)
d16 p118:f1
p28*0.231 ph18
d19*2
p28*0.692 ph18
d19*2
p28*1.462 ph18
DELTA
(p3 ph8 2u p3 ph15):f2
DELTA
p28*1.462 ph19
d19*2
p28*0.692 ph19
d19*2
p28*0.231 ph19
4u
GRADIENT(cnst23)
d16
4u BLKGRAD
DELTA2 p116:f2
go=6 ph31 cpd2:f2
d11 do:f2 wr #4 if #4 id0 ip1 zd

lo to 3 times td1

d11 do:f2
exit

ph1=0 2
ph2=0 0 0 0 0 0 0 0 2 2 2 2 2 2 2 2
ph3=0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
      2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2
ph4=0 0 2 2
ph5=0 0 0 0 2 2 2 2
ph6=0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
      0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
      2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2
      2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2
ph8=0

ph10=0
ph11=0

ph12=2
ph13=0

ph14=0
ph15=2

ph16=2
ph17=2

ph18=0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
      0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
      2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2
      2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2
ph19=2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2
      2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2
      0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
      0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
ph31=0 2 2 0 2 0 0 2

;***** -x -x *****
6 d12 p19:f1
d1 cw:f1
d13 do:f1
d12 p11:f1
(p1 ph1)
d2 p12:f2 ; TAU=1/(2J(YH))
(CEN_HN2 p2 ph2) (p3 ph8 2u p3 ph16):f2
d21
d0
(p4 ph3):f2
d0
(p1 ph4)
d8
50u UNBLKGRAD
GRADIENT(cnst21)

```

9.1.4  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}(\omega_1)$ -gefiltertes NOESY

```

jbxfcngnoewg1
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>

"d14=3.1m-p16-d16"
;; "d15=0.5m"
"d6=0.9m-d9"
"d7=d14+p13+d15-p5*4-6u-p14-d6-p5+d9"
"p10=0.5m" ; 1H trim pulse
"l0=td1/2"

;;"d19=100u" ; 3-9-19 delay ~ 1/(4*OFFSET)
100-120u

1 ze
2 d1 do:f3 do:f2
  15m
3 10m
4 20u p11:f1
  20u p12:f2
  20u p13:f3
  100u UNBLKGRAD fq2:f2
  (p1 ph1):f1
  23u
  p16:gp1
  d16
  d14 ;3.1m
  (p13:sp5 ph5):f2
    ;msg41251 arom.
  d15 ;0.5m
  (p13:sp1 ph3):f2 ;g4.256
aliph.
  d9 ;neue
Kompensation
  (p2 ph2):f1
  (p5 ph0 3u p5*2 ph18 3u p5 ph0):f3
  (p14:sp3 ph0):f2 ;g3.256
aliph.
  d6 ;0.5m
  (p5 ph3):f3 ;90 (15N)
  d7 ;~ 3.1m
  p16:gp1
  d16

(p13:sp2 ph4):f2
;g4tr.256 aliph.
3u
(p10 ph11):f1
d0 ; t1
(p1 ph0):f1
d25 ; NOE mixing time
p16:gp2
d16
(p1 ph12):f1
3u
p19:gp3
d16 p113:f3 p112:f2
(p1*0.231 ph20 d19*2 p1*0.692 ph20 d19*2
p1*1.462 ph20):f1
d19*2
(p1*1.462 ph22 d19*2 p1*0.692 ph22 d19*2
p1*0.231 ph22):f1
p19:gp3
d16 fq2:f2
3u BLKGRAD
go=2 ph31 cpd2:f2 cpd3:f3
d1 do:f2 do:f3 wr #0 if #0 zd
5m ip1
5m ip2
5m ip11
lo to 3 times 2
10m id0
lo to 4 times 10
exit
ph0= 0
ph1= 0 2
ph2= 0
ph11= 1
ph12= 0 0 2 2
ph3= 0 0 0 2 2 2 2
ph4= 1 1 1 1 1 1 1 1 3 3 3 3 3 3 3
ph5 =0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
  2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2
ph18=1
ph19=0
ph20=0
ph22=2
ph31=0 2 2 0

```

### 9.1.5 2D $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ Korrelation zur Bestimmung von $R_1$ ohne Gradienten

```

mzt115n2
#include <Avance.incl>

1 ze
2 d11 do:f2
3 d12 pl2:f2
  d12 pl9:f1
  d1 cw:f1
  d13 do:f1
  d12 pl1:f1
  p1 ph11
  d24 pl2:f2
  (p2 ph11):f1 (p4 ph12):f2
  d24
  p16 ph5 ; spinlock 2m
  (p1 ph1):f1 (p3 ph2):f2
  d4
  (p2 ph11):f1 (p4 ph12):f2
  d4
  d0
  (p1 ph11 p2 ph13 p1 ph11):f1
  d0
  (p3 ph3):f2
4 d27 ;5-10m
  p2 ph11
  lo to 4 times 14
  d27
  p19 ph11 ; spinlock 2.5m

(p3 ph4):f2
d4
(p2 ph11):f1 (p4 ph12):f2
d4
(p1 ph11):f1 (p3 ph14):f2
p17 ph13 ; spinlock 3m
d24
(p2 ph11):f1 (p4 ph12):f2
d24 pl12:f2
go=2 ph31 cpd2:f2
d11 do:f2 wr #0 if #0 id0 ip3 zd
lo to 3 times tdl
exit

ph1=1 1 1 1 1 1 1 1 3 3 3 3 3 3 3 3
ph2=0 0 0 0 2 2 2 2
ph3=3 1
ph4=0 0 2 2
ph5=0
ph11=0
ph12=0
ph13=1
ph14=1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1
      3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3
ph29=0
ph31=0 2 2 0 2 0 0 2 2 0 0 2 0 2 2 0
      2 0 0 2 0 2 2 0 0 2 2 0 2 0 0 2

```

### 9.1.6 2D $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ Korrelation zur Bestimmung von $R_2$ ohne Gradienten

```

mzt215n2
#include <Avance.incl>

1 ze
2 d11 do:f2
3 d12 pl2:f2
  d12 pl9:f1
  d1 cw:f1
  d13 do:f1
  d12 pl1:f1
  p1 ph11
  d24 pl2:f2
  (p2 ph11):f1 (p4 ph12):f2
  d24
  p16 ph5
  (p1 ph1):f1 (p3 ph2):f2
  d4
  (p2 ph11):f1 (p4 ph12):f2
  d4 p17:f2 ;ca. 10db
  d13
6 d30
  p7:f2 ph2
  d28 ;ca. 500u
4 d28
  p7:f2 ph2
  d28
  lo to 4 times 8
  d28
  p7:f2 ph2
  d29
  p2 ph11
  d29
  p7:f2 ph2
  d28
5 d28

p7:f2 ph2
d28
lo to 5 times 9
d13
lo to 6 times 14
d0
(p1 ph11 p2 ph13 p1 ph11):f1
d0
d4 pl2:f2
(p2 ph11):f1 (p3 ph15 p4 ph16 p3 ph15):f2
d4
(p1 ph3):f1 (p3 ph4):f2
d24
(p2 ph11):f1 (p4 ph12):f2
d24 pl12:f2
go=2 ph31 cpd2:f2
d11 do:f2 wr #0 if #0 id0 ip4 zd
lo to 3 times tdl
exit

ph1=1 3
ph2=0 0 2 2
ph3=0 0 0 0 2 2 2 2
ph4=0 0 0 0 0 0 0 0 2 2 2 2 2 2 2 2
ph5=0
ph11=0
ph12=0
ph13=1
ph15=0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
      2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2
ph16=1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1
      3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3
ph29=0
ph31=0 2 2 0 2 0 0 2 2 0 0 2 0 2 2 0

```

### 9.1.7 2D $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ Korrelation zur Bestimmung des *hNOE* ohne Gradienten

;Getrennte Aufzeichnung mit/ohne Vorsättigung (p5 in hnoeNpr/d5 in hnoeN)

```

hnoeNpr bzw. hnoeN
#include <Avance.incl>
1 ze
2 d11 do:f2
3 d15 p12:f2
  p5 ph12          ; in hnoeN d5
  lo to 3 times l4 ; 14 ca. 150
  p17 ph12         ; 10m
  d16 do:f1
  p17 ph12
  d13
; p11:h
; d7
p3:f2 ph1
d4
d0
(p2 ph12)
d0
(p4 ph2):f2
d14
(p3 ph4):f2
d13
; p10:h
; d6
(p1 ph3):f1
d24
(p2 ph12):f1 (p4 ph12):f2
d24 p112:f2
go=2 ph31 cpd2:f2
d11 do:f2 wr #0 if #0 id0 ip1 zd
lo to 3 times td1
exit
ph1=0 2
ph2=0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 1 1 1 1 1 1
      2 2 2 2 2 2 2 2 3 3 3 3 3 3 3 3
ph3=0 0 2 2
ph4=1 1 1 1 3 3 3 3
ph12=0
ph14=1
ph31=0 2 2 0 2 0 0 2 2 0 0 2 0 2 2 0

```

### 9.1.8 2D $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ Korrelation zur Bestimmung von $R_1$ mit Gradienten

```

jbt1gs
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>

"p2=p1*2"
"p4=p3*2"
"d0=3u"
"d11=30m"
"d20=p16+d16+p2+d0*2"
"d21=d13+p16+d16+4u"
"d24=d4-p10-20u"
"l1=d19/(p5+d5)"
"p5=p1*1.333"
"l3=(td1/2)"
"ds=ns*2*cnst0"

1 ze
  d11 p112:f2
2 d11 do:f2
  6m
3 d11
4 d11 p12:f2
5 d1
  p1 ph0
  d4
  (p2 ph11) (p4 ph11):f2
  d4
  p1 ph11
  20u p10:f1
  (p10:sp2 ph12):f1
  50u UNBLKGRAD
  GRADIENT(cnst21)
  d16 p11:f1
  (p3 ph10):f2
  d4
  (p2 ph11) (p4 ph11):f2
  d4
  (p3 ph11):f2
  d13
6 p5 ph11 ;120° for T1
mix
  d5 ;5m
  lo to 6 times l1
  (p3 ph1):f2
  d0
  p2 ph2
  d0

GRADIENT(cnst22)
d16
(p4 ph3):f2
d20
(p3 ph5):f2
d4
(p2 ph11) (p4 ph11):f2
d24 p10:f1
(p10:sp2 ph10):f1 ;90deg. half
gauss pulse on water
20u p11:f1
(p1 ph0) (p3 ph4):f2
d4
(p2 ph11) (p4 ph11):f2
d4
(p1 ph11) (p3 ph10):f2
d4
(p2 ph11) (p4 ph11):f2
d4
(p1 ph11)
d21
(p2 ph11)
d13
GRADIENT(cnst23)
d16 p112:f2
4u BLKGRAD
go=2 ph31 cpd2:f2
d11 do:f2 wr #0 if #0 zd
3m ip5
3m ip5
lo to 3 times 2
d11 id0
lo to 4 times l3
exit

ph0=0
ph1=0 2 ;alpha
ph2=1 1 1 1 3 3 3 3 ;beta
ph3=0 0 2 2 ;gamma
ph4=1 1 3 3 ;delta
ph5=1 ;phi(+/- echo/antiecho)
ph10=0
ph11=1
ph12=2
ph31=0 2 2 0

```

### 9.1.9 2D $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ Korrelation zur Bestimmung von $R_2$ mit Gradienten

```

jbt2gs
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>

"p2=p1*2"
"p4=p3*2"
"d0=3u"
"d11=30m"
"d20=d4-p16-d16-d13+2*d0+p2"
"d21=d13+p16+d16+4u"
"d29=d28-0.5*p2"
"d30=d28-d13"

"l3=(td1/2)"
"ds=ns*2*cnst0"

1 ze
  d11 p112:f2
2 d11 do:f2
  6m
3 d11
4 d11 p12:f2
5 d1
  p1 ph0
  d4
  (p2 ph11) (p4 ph11):f2
  d4
  p1 ph11
  20u p10:f1
; (p10:sp2 ph10):f1
  50u UNBLKGRAD
  GRADIENT(cnst21)
  d16 p11:f1
  (p3 ph1):f2
  d4
  (p2 ph11) (p4 ph11):f2
  d4 p110:f2 ;ca. 10db
6 d30
  (p7 ph20):f2 ;120u
  d28
7 d28 ;500u
  (p7 ph20):f2
  d28
  lo to 7 times 8
  d28
  (p7 ph20):f2
  d29
  p2 ph11
  d29
  (p7 ph20):f2
  d28
8 d28

```

```

(p7 ph20):f2
d28
lo to 8 times 9
d13
lo to 6 times 14
d4 p12:f2
d0
p2 ph2
d0
(p4 ph3):f2
d13
GRADIENT(cnst22)
d16
d20
(p1 ph4) (p3 ph10):f2
d4
(p2 ph11) (p4 ph11):f2
d4
(p1 ph5) (p3 ph11):f2
d4
(p2 ph11) (p4 ph11):f2
d4
(p1 ph10)
d21
(p2 ph11)
d13
GRADIENT(cnst23)
d16 p112:f2
4u BLKGRAD
go=2 ph31 cpd2:f2
d11 do:f2 wr #0 if #0 zd
3m ip5
3m ip5
lo to 3 times 2
d11 id0
lo to 4 times 13
exit

ph0=0
ph1=0 2
ph2=1 1 1 1 3 3 3 3 ;alpha
ph3=0 0 2 2 ;beta
ph4=0 0 2 2 ;gamma
ph5=1 1 3 3 ;delta
echo/antiecho ;phi(+/-)
ph10=0
ph11=1
ph20=0
ph31=0 2 2 0

```

### 9.1.10 2D $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ Korrelation zur Bestimmung des $h\text{NOE}$ mit Gradienten

;ohne Vorsättigung (p5,d5 in jbhnoeoff auskommentiert-> d1 auf exakte Dauer der Vorsättigung)

```

jbhnoeon
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>

"p2=p1*2"
"p4=p3*2"
"d0=3u"
"d11=30m"
"d20=p16+d16+50u+p2+d0*2"
"d21=d13+p16+d16+4u"
"d24=d4-p10-20u"

"l1=d1/(p5+d5)"
"l3=(td1/2)"
"ds=ns*2*cnst0"

1 ze
  d11 pl12:f2
2 d11 do:f2
  6m
3 d11
  ; 12m
4 d11 pl2:f2
5 (p5 ph0)                ;120°
  d5                      ;5m
  lo to 5 times l1
  (p3 ph1):f2
  d0
  p2 ph2
  d0
  50u UNBLKGRAD
  GRADIENT(cnst21)
  d16
  (p4 ph3):f2
  d20
  (p3 ph5):f2
  d4
  (p2 ph11) (p4 ph11):f2
  d24 pl0:f1
  (pl0:sp2 ph12):f1      ;90deg. half
guass pulse on water

20u pl1:f1
(p1 ph10) (p3 ph4):f2
d4
(p2 ph11) (p4 ph11):f2
d4
(p1 ph11) (p3 ph10):f2
d4
(p2 ph11) (p4 ph11):f2
d4
(p1 ph11)
d21
(p2 ph11)
d13
GRADIENT(cnst23)
d16 pl12:f2
4u BLKGRAD
go=2 ph31 cpd2:f2
d11 do:f2 wr #0 if #0 zd
3m ip5
3m ip5
lo to 3 times 2
d11 id0
; 3m ip1
; 3m ip1
; 3m ip31
; 3m ip31
lo to 4 times l3
exit

ph0=0
ph1=0 2 0 2 2 0 2 0
ph2=1
ph3=0 0 2 2
ph4=1 1 3 3 1 1 3 3 3 3 1 1 3 3 1 1
ph5=1
ph6=0 0 2 2
ph10=0
ph11=1
ph12=2
ph31=0 2 2 0 2 0 0 2 2 0 0 2 0 2 2 0

```



### 9.1.12 2D $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ Korrelation zur Bestimmung der $\eta_{xy}$ (Autorelaxation, Experiment 2)

;Experiment 2 enthält  $^1\text{H}$  90° Puls nicht

```

mzt2orex1
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>

"p2=p1*2"
"p4=p3*2"
"d0=3u"
"d20=d16+p16+4u+4u"
"d24=2.67m"
"d11=30m"
"d13=3u"

"DELTA=d24-4u-p16-d16"
"DELTA1=3u"
"DELTA2=d24-2*d0-2*p2-4u"
; (DELTA1=t1/2, DELTA2=2.67ms+t1/2)

"CEN_HN1=(p3-p1)/2"
"CEN_HN2=(p4-p2)/2"

"TAU=d8-p16-d16-(2*p3+p4)/2"

"l3=(td1/2)"
"ds=ns*2*cnst0"

1 ze
  d12 p11:f1
  d11 p112:f2
2 d11 do:f2
  3m
  3m
3 3m
4 d12 p19:f1
  d1 cw:f1
  d13 do:f1
  d12 p11:f1
  d12 p12:f2
  (p3 ph10):f2
  50u UNBLKGRAD
  GRADIENT(cnst21)
  d16
  (p1 ph10):f1
  4u
  GRADIENT(cnst22)
  d16
  DELTA
  (CEN_HN2 p2 ph10):f1 (p4 ph3):f2
  4u
  GRADIENT(cnst22)
  d16
  DELTA
  (p1 ph1):f1
  4u
  GRADIENT(cnst23)
  d16
  (p3 ph3):f2
  TAU*0.5
  GRADIENT(cnst24)
  d16
  4u
  (p3 ph11 2u p4 ph10 2u p3 ph11):f2
  4u
  GRADIENT(cnst24)
  d16
  TAU*0.5
; (p1 ph10 p1 ph11):f1 (p3 ph10):f2
; (p1 ph10):f1 (p3 ph10):f2
; (p3 ph10):f2 ;auto
d16
GRADIENT(cnst25)
d16
(p3 ph4):f2
; DELTA1
d0
(p1 ph22 2u p2 ph2 2u p1 ph22):f1
DELTA2
d0
(p4 ph5):f2
4u
GRADIENT(cnst26)
d16
DELTA
(CEN_HN1 p1 ph10):f1 (p3 ph6):f2
4u
GRADIENT(cnst27)
d16
DELTA
(CEN_HN2 p2 ph12):f1 (p4 ph6):f2
4u
GRADIENT(cnst27)
d16
DELTA
(CEN_HN1 p1 ph12):f1 (p3 ph12):f2
4u
GRADIENT(cnst27)
d16
DELTA
(CEN_HN2 p2 ph12):f1 (p4 ph12):f2
4u
GRADIENT(cnst27)
d16
DELTA
(p1 ph13):f1
d20 ;750u
(p2 ph10):f1
4u
GRADIENT(cnst28)
d16 p112:f2
4u BLKGRAD
go=2 ph31 cpd2:f2
d11 do:f2 wr #0 if #0 zd
3m ip6
3m ip6
lo to 3 times 2
3m id0
lo to 4 times 13
exit

ph1=3 3 1 1
ph2=0 0 0 0 2 2 2 2
ph3=0 0 0 0 2 2 2 2
ph4=0 0 0 0 0 0 0 2 2 2 2 2 2 2 2
ph5=0 1 2 3
ph6=0
ph10=0
ph11=1
ph12=1
ph13=2
ph22=1 1 1 1 3 3 3 3
ph31=0 2 2 0 2 0 0 2 2 0 0 2 0 2 2 0

```

### 9.1.13 2D $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ Korrelation zur Bestimmung von $R_2(\tau_{\text{cp}} < 10 \text{ ms})$

```

mzcpmg2d
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>

"p2=p1*2"
"p4=p3*2"
"d0=3u"
"d20=d16+p16+4u+4u"
"d24=2.7m"
"d11=30m"
"d13=3u"

"DELTA=d24-p17-d16-4u"
"DELTA1=d24-p19-d16-4u"
"DELTA2=d24-p20-d16-4u+2*d0+p2"
"DELTA3=d24-p21-d16-4u"

"CEN_HN1=(p3-p1)/2"
"CEN_HN2=(p4-p2)/2"
"TAU=d8"

"l3=(td1/2)"
"ds=ns*2*cnst0"

1 ze
  d12 p11:f1
  d11 p112:f2
2 d1 do:f2
3 3m
  3m
4 15m p12:f2
  (p3 ph5):f2
  50u UNBLKGRAD
  GRADIENT(cnst21)
  d16
  (p1 ph5):f1
  4u
  GRADIENT(cnst22)
  d16
  DELTA
  (CEN_HN2 p2 ph6):f1 (p4 ph1):f2
  4u
  GRADIENT(cnst22)
  d16
  DELTA
  (p1 ph6):f1 ;Fehler in der org.
Lit.
  4u
  GRADIENT(cnst23)
  d16
  (p3 ph1):f2
5 TAU p16:f2
  (p6 ph6):f2 ;97u
  TAU
  lo to 5 times 15
  (p2 ph5):f1
6 TAU
  (p6 ph6):f2
  TAU
  lo to 6 times 15
  GRADIENT(cnst24)
  d16 p12:f2
  4u
  DELTA1
  (CEN_HN2 p2 ph5):f1 (p4 ph5):f2
  4u
  GRADIENT(cnst24)

d16 p16:f2
DELTA1
(p1 ph5):f1
7 TAU
(p6 ph5):f2
TAU
lo to 7 times 15
(p2 ph5):f1
8 TAU
(p6 ph5):f2
TAU
lo to 8 times 15
d24 p12:f2
d0
(p2 ph2):f1
d0
(p4 ph3):f2
4u
GRADIENT(cnst25)
d16
DELTA2
(CEN_HN1 p1 ph5):f1 (p3 ph4):f2
4u
GRADIENT(cnst26)
d16
DELTA3
(CEN_HN2 p2 ph6):f1 (p4 ph4):f2
4u
GRADIENT(cnst26)
d16
DELTA3
(CEN_HN1 p1 ph6):f1 (p3 ph6):f2
4u
GRADIENT(cnst26)
d16
DELTA3
(CEN_HN2 p2 ph6):f1 (p4 ph6):f2
4u
GRADIENT(cnst26)
d16
DELTA3
(p1 ph5):f1
d20
(p2 ph5):f1
4u
GRADIENT(cnst27)
d16 p112:f2
4u BLKGRAD
go=2 ph31 cpd2:f2
d1 do:f2 wr #0 if #0 zd
3m ip4
3m ip4
lo to 3 times 2
3m id0
3m ip1
3m ip1
3m ip31
3m ip31
lo to 4 times 13
exit

ph1=0 2
ph2=0 0 0 2 2 2 2
ph3=0 0 1 1 2 2 3 3
ph4=1
ph5=0
ph6=1
ph31=0 2 2 0

```

### 9.1.14 2D $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ Korrelation zur Bestimmung von $R_2(\tau_{\text{cp}} = 10.8 \text{ m}, 21.6 \text{ m})$

```

mzcpmg2db                    5 TAU
                               (p6 ph5):f2                ;97u
                               TAU
                               TAU
                               (p6 ph5):f2
                               TAU
                               (p2 ph6):f1
                               lo to 5 times 15
                               d24 p12:f2
                               d0
                               (p2 ph2):f1
                               d0
                               (p4 ph3):f2
                               4u
                               GRADIENT(cnst25)
                               d16
                               DELTA2
                               (CEN_HN1 p1 ph5):f1 (p3 ph4):f2
                               4u
                               GRADIENT(cnst26)
                               d16
                               DELTA3
                               (CEN_HN2 p2 ph6):f1 (p4 ph4):f2
                               4u
                               GRADIENT(cnst26)
                               d16
                               DELTA3
                               (CEN_HN1 p1 ph6):f1 (p3 ph6):f2
                               4u
                               GRADIENT(cnst26)
                               d16
                               DELTA3
                               (CEN_HN2 p2 ph6):f1 (p4 ph6):f2
                               4u
                               GRADIENT(cnst26)
                               d16
                               DELTA3
                               (CEN_HN2 p2 ph6):f1 (p4 ph6):f2
                               4u
                               GRADIENT(cnst26)
                               d16
                               DELTA3
                               (p1 ph5):f1
                               d20
                               (p2 ph5):f1
                               4u
                               GRADIENT(cnst27)
                               d16 p112:f2
                               4u BLKGRAD
                               go=2 ph31 cpd2:f2
                               d1 do:f2 wr #0 if #0 zd
                               3m ip4
                               3m ip4
                               lo to 3 times 2
                               3m id0
                               3m ip1
                               3m ip1
                               3m ip31
                               3m ip31
                               lo to 4 times 13
                               exit

Lit. (1999), in (2000) richtig
4u
GRADIENT(cnst23)
d16
(p3 ph1):f2
4u
GRADIENT(cnst22)
d16
DELTA
(CEN_HN2 p2 ph6):f1 (p4 ph1):f2
4u
GRADIENT(cnst22)
d16
DELTA
(CEN_HN2 p2 ph6):f1 (p4 ph1):f2
4u
GRADIENT(cnst22)
DELTA p16:f2

                               ph1=0 2
                               ph2=0 0 0 0 2 2 2 2
                               ph3=0 0 1 1 2 2 3 3
                               ph4=0 2
                               (1999): ph4=1
                               ph5=0
                               ph6=1
                               ph31=0 2 2 0

```

### 9.1.15 2D $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ Korrelation zur Bestimmung von $k_{\text{ex}}$ & $R_1$ (Austauschexperiment)

```

jb2dex
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>

"d11=30m"
"d12=20u"

"p2=p1*2"
"p22=p21*2"

"d0=(in0-(p21*1.273+p2))*0.5"

"DELTA=d19-p22/2"
"DELTA1=d26-p16-d16-p28*3-d19*5+p22/2"
"DELTA2=d26-p16-d16-p28*2-p0-d19*5+p22/2-8u"

"TAU=d26-p16-4u"

"CEN_HN2=(p22-p2)/2"

"l3=(td1/2)"

1 ze
  d11 p116:f2
2 d1 do:f2
  3m
3 d11
4 d12 p11:f1
  50u UNBLKGRAD
  (p1 ph1)
  4u
  GRADIANT (cnst21)
  TAU p12:f2
  (CEN_HN2 p2 ph1) (p22 ph6):f2
  4u
  GRADIANT (cnst21)
  TAU
  (p1 ph2)
  4u
  GRADIANT (cnst22)
  d16
  (p21 ph3):f2
  d0
  (p2 ph5)
  d0
  (p21 ph4):f2
  4u
  GRADIANT (cnst23)

d16
; (p5:sp2 ph7):f1
d8
GRADIANT (cnst24)
d16
; (p5:sp2 ph1):f1
d13
(p1 ph7)
DELTA1
GRADIANT (cnst25)
d16 p118:f1
p28*0.231 ph8
d19*2
p28*0.692 ph8
d19*2
p28*1.462 ph8
DELTA
(p22 ph1):f2
DELTA
p28*1.462 ph9
d19*2
p28*0.692 ph9
d19*2
p0*0.231 ph9
4u
GRADIANT (cnst25)
d16
4u BLKGRAD
DELTA2 p116:f2
go=2 ph31 cpd2:f2
d1 do:f2 wr #0 if #0 ip3 zd
3m ip6
lo to 3 times 2
d11 id0
lo to 4 times 13
exit

ph1=0
ph2=1
ph3=0 2
ph4=0 0 0 0 2 2 2 2
ph5=0 0 2 2
ph6=0
ph7=2
ph8=1
ph9=3
ph31=0 2 0 2 2 0 2 0

```

### 9.1.16 2D $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ Korrelation zur Bestimmung von $k_{\text{ex}}$ & $R_1$ (Referenzexperiment)

```

jb2dexref
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>

"d11=30m"
"d12=20u"

"p2=p1*2"
"p22=p21*2"

"d0=(in0-(p21*1.273+p2))*0.5"

"DELTA=d19-p22/2"
"DELTA1=d26-p16-d16-p28*3-d19*5+p22/2"
"DELTA2=d26-p16-d16-p28*2-p0-d19*5+p22/2-8u"

"TAU=d26-p16-4u"

"CEN_HN2=(p22-p2)/2"

"l3=(td1/2)"

1 ze
  d11 p116:f2
2 d1 do:f2
  3m
3 d11
4 d12 p11:f1
  50u UNBLKGRAD
  (p1 ph1)
  4u
  GRADIANT(cnst21)
  TAU p12:f2
  (CEN_HN2 p2 ph1) (p22 ph6):f2
  4u
  GRADIANT(cnst21)
  TAU
  (p1 ph2)
  4u
  GRADIANT(cnst23)
  d16
  d8
  GRADIANT(cnst24)
  d16
  d13
  (p21 ph3):f2

d0
(p2 ph5)
d0
(p21 ph4):f2
4u
GRADIANT(cnst22)
d16
(p1 ph7)
DELTA1
GRADIANT(cnst25)
d16 p118:f1
p28*0.231 ph8
d19*2
p28*0.692 ph8
d19*2
p28*1.462 ph8
DELTA
(p22 ph1):f2
DELTA
p28*1.462 ph9
d19*2
p28*0.692 ph9
d19*2
p0*0.231 ph9
4u
GRADIANT(cnst25)
d16
4u BLKGRAD
DELTA2 p116:f2
go=2 ph31 cpd2:f2
d1 do:f2 wr #0 if #0 ip3 zd
3m ip6
lo to 3 times 2
d11 id0
lo to 4 times 13
exit

ph1=0
ph2=1
ph3=0 2
ph4=0 0 0 0 2 2 2 2
ph5=0 0 2 2
ph6=0
ph7=2
ph8=1
ph9=3
ph31=0 2 0 2 2 0 2 0

```

**9.1.17 2D  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  Korrelation zur Bestimmung von  $k_{\text{ex}}$  &  $R_1$  (nach Farrow *et al.*)**

;Zur Bestimmung der initialen Intensität ist die Mischzeit (kursive Befehle) auszukommentieren.

```

lo to 6 times ll
mz2dexhnprf3spwg          d13
                           GRADIENT(cnst25)
#include <Avance.incl>    d16 p11:f1
#include <Grad.incl>      (p21 ph0):f3
                           d13
"p2=p1*2"                GRADIENT(cnst26)
"p22=p21*2"              d16
"p16=0.5m"               d30 ;2.75m
"d0=3u"                  (p2 ph0) (p22 ph0):f3
"d4=2.75m-(6u+p2)"      d13
"d14=2.75m"              GRADIENT(cnst26)
"d16=200u"               d16
"d15=2.5m"               d30 ;2.75m
"d25=d15-p6-d13"        (p21 ph9):f3
"d29=100u"              d13
"d18=d29/2-p21"         (p7:sp4 ph3):f1 ;2m(90,sincl)
"d28=2.7m-2*d12-p16-2.5*d29" d13
"d31=2.25m-(d13+p16+d16)" (p7:sp7 ph7):f1 ;2m(90,sincl)
"d30=2.75m-(p16+d16)"  d12 p11:f1
"l1=d8/(d15+d25+p6+d13+p2)" p1 ph4
                           d13
1 ze                      GRADIENT(cnst27)
  d11 p116:f3             d28
2 d11 do:f3               (p1*0.231 ph18):f1
  3m                      d29
3 d11                     (p1*0.692 ph18):f1
  d11                     d29
  d11                     (p1*1.462 ph18):f1
4 d11                     d18
5 d1 p11:f1               (p22 ph0):f3
  20u p13:f3              d18
  (p21 ph0):f3            (p1*1.462 ph19):f1
  50u UNBLKGRAD           d29
  GRADIENT(cnst21)        (p1*0.692 ph19):f1
  d16 p11:f1              d29
  p1 ph0                  (p1*0.231 ph19):f1
  d13                     d13
  GRADIENT(cnst22)        GRADIENT(cnst27)
  d16                     d28 p116:f3
  d31 ;2.25m              4u BLKGRAD
  (p2 ph0) (p22 ph0):f3  go=2 ph31 cpd3:f3
  d13                     d11 do:f3 wr #0 if #0 zd
  GRADIENT(cnst22)        3m ip1
  d16                     lo to 3 times 2
  d31 ;2.25m              d11 id0
  p1 ph9                   d11 id10
  d13                      d11 dd14
  (p5:sp5 ph10):f1 ;5m(90,G4) lo to 4 times 13
  d12 p11:f1              exit
  GRADIENT(cnst23)
  d16
  (p21 ph1):f3
  d4 ph0=0
  d0 ph1=0
  p2 ph0 ph2=0 0 0 0 1 1 1 1 2 2 2 2 3 3 3 3
  d10 ph3=0 0 2 2
  (p22 ph2):f3 ph4=0 0 2 2
  d14 ph5=0 2
  (p21 ph9):f3 ph6=2 0
  d13 ph7=2 2 0 0
  GRADIENT(cnst24) ph31=0 0 2 2 2 2 0 0
  d16 ph9=1
  6 d25 ;2.5m ph10=2
  (p6:sp6 ph0):f1 ;2m(180,G3) ph18=1
  d13 ph19=3
  (p2 ph0):f1
  d15 ;2.5m

```

## 9.2 Zuordnung von CspB im Komplex mit dT7

**Tab. A 1:** Zuordnung der  $^1\text{H}$  und  $^{15}\text{N}$  Resonanzen von CspB im Komplex mit dT7 in 50 mM Na-cacodylat, 3 mM  $\text{MgCl}_2$  pH 7.0 bei 15 °C.

Aminosäure	$\text{H}^\alpha$ (ppm)	$\text{H}^\beta$ (ppm)	$\text{H}^\gamma$ (ppm)	andere H (ppm)	$^{15}\text{N}$ (ppm)
L2	8.81	4.48	0.97, 0.53		0.79
E3	7.90	5.31	2.27, 2.19	1.96	
G4	8.77	4.52, 3.93			
K5	8.49	5.41	1.69, 1.55	1.41	1.32
V6	8.98	3.54	2.40	0.93, 0.53	
K7	9.46	4.27		1.76	
W8	7.47	4.64	3.53, 3.36		9.80, 7.95, 7.19, 6.96, 6.68
F9	9.31	4.25	2.82, 2.36		
N10	8.33	4.80	2.43		7.76, 7.43
S11	9.07	5.00	4.40, 4.18		
E12	8.17	4.31	2.24	2.38	3.15, 1.25
K13	7.44	4.37	2.07	1.54	
G14	8.30	4.12, 3.83			
F15	6.57	4.94	2.90, 2.50		6.91
G16	7.98	3.92			
F17					
I18	9.57	4.07	1.14	0.36, 0.24	-0.26
E19	9.41	4.92	2.06	2.37, 2.22	
V20	9.58	4.38	1.95	1.09	
E21	8.57	4.12	2.06	2.33	
G22	9.02	4.26, 3.82			
Q23	8.20	4.93	2.24, 1.96	2.39	7.88, 6.46
D24	8.33	4.62	3.01, 2.62		
D25	8.53	5.01	3.02, 2.62		
V26	9.29	4.47	1.60	1.11, 0.85	
F27	8.95	3.52	2.88, 2.62		6.49
V28	7.45	4.41	1.36	0.35	
H29	8.61	4.81	3.10, 2.72		
F30	8.08	3.93	2.98, 2.74		7.24, 7.09
S31	6.96	3.71	3.38		
A32	7.99	4.50	1.57		
I33	7.70	3.98	0.81	1.84, 1.56, 0.37	0.29
Q34	8.95	4.33	1.99	2.28, 2.15	
G35	8.45	4.43, 3.85			
E36	8.26	4.53	2.04, 1.97		
G37	8.58	3.86			
F38	8.52	4.11	2.92, 2.80		
K39	8.31	4.34	1.73	1.54	1.23
T40					
L41	6.09	4.51	1.01	0.55	0.36, 0.23
E42	7.99	4.61	2.01, 1.75	2.26	
E43	8.80	3.53	2.07	2.60, 2.22	
G44	9.12	4.40, 3.66			
Q45	7.75	4.22	2.26, 2.00	2.39	7.15, 6.96
A46	8.87	4.94	1.55		
V47	8.48	5.41	2.06	0.64, 0.53	
S48	8.77	5.82	3.88		
F49	8.71	5.18	3.23, 3.05		6.91
E50	8.77	4.75	1.96, 1.82	2.29, 2.16	
I51	8.71	4.92	1.73	0.97	
V52	9.17	4.60	2.06	0.83	
E53	8.61	4.34	2.06, 1.92	2.26	
G54	7.88	4.56, 3.94			
N55	8.44	4.56	2.30, 1.94		7.91, 6.81
R56	8.61	4.52	1.83	1.44, 1.34	7.03, 2.80
G57	7.45	4.79, 3.96			
P58					
Q59	9.28	5.09	2.19	2.40	7.57, 6.87
A60	8.78	4.96	0.91		
A61	9.44	4.71	1.36		
N62	9.37	4.32	3.09, 2.61		7.79, 6.64
V63	8.18	4.51	1.81	0.65	
T64	9.46	4.73	4.11	1.17	
K65	8.69	4.52	1.74	1.35	1.18
E66	8.26	4.37	2.12, 1.81	2.30	
A67	8.10	4.17	1.38		

## 9.3 Zuordnung von ORF56

Tab. A 2: Zuordnung der  $^1\text{H}$  und  $^{15}\text{N}$  Resonanzen von ORF56 in 50 mM Na-phosphat pH 5.0 bei 15 °C.

Aminosäure	$\text{H}^{\text{N}}$ (ppm)	$\text{H}^{\alpha}$ (ppm)	$\text{H}^{\beta}$ (ppm)	$\text{H}^{\gamma}$ (ppm)	andere H (ppm)	$^{15}\text{N}$ (ppm)
Gly1	7.97	3.86, 3.74				
Arg2	8.48	4.55	1.69, 1.62	1.50	7.01, 3.06	
Pro3		4.30	2.14, 1.93	1.77, 1.42	3.39, 3.31	
Tyr4	7.85	4.54	2.69, 2.63		7.01, 6.73	120.87
Lys5	7.90	4.23	1.42	1.91, 0.75		115.42
Leu6	7.90	4.15	1.38	1.66	0.72, 0.65	123.61
Leu7	8.29	4.20	1.44	1.38	0.77, 0.66	124.26
Asn8	8.26	4.50	2.57		7.38, 6.70	119.41
Gly9	7.82	3.90, 3.61				108.15
Ile10	8.71	4.27	1.52	1.14, 0.86, 0.48	0.45	120.60
Lys11	8.24	4.01	1.50	0.82, 0.56	1.38, 1.07, 2.64	126.89
Leu12	8.82	4.45	1.54, 1.39	1.48	0.77	129.51
Gly13	8.43	4.75, 3.22				111.89
Val14	8.46	4.24	1.85	0.76		124.53
Tyr15	8.51	4.97	2.64, 2.55		6.75, 6.58	127.55
Ile16	8.66		1.86	1.05, 0.93	0.81	117.83
Pro17		4.33	2.12	1.91, 1.82	3.69, 3.51	
Gln18	8.95	3.67	1.90	2.31, 2.26	7.71, 6.53	125.82
Glu19	9.56	4.18	2.07	2.39, 2.35		117.18
Trp20	7.22	4.57	3.35, 3.04		10.23, 7.45, 7.18, 7.17, 7.03, 6.99	117.39
His21	7.89	3.79	3.54, 2.84			119.98
Asp22	8.74	4.27	2.76			119.17
Arg23	7.66	4.12	1.87	1.88	7.75, 3.35, 3.06	120.48
Leu24	8.40	3.86	1.82	1.14	0.87, 0.45	119.99
Met25	8.08	4.13	2.08, 2.01	2.45, 2.23		117.15
Glu26	7.60	4.03	2.21, 2.10	2.42, 2.31		120.96
Ile27	7.73	3.61	1.79	0.81	0.62	121.71
Ala28	8.39	3.54	1.29			122.40
Lys29	7.90	4.05	1.90	1.53, 1.38	2.91, 1.66	117.55
Glu30	7.97	3.96	2.22, 2.15	2.46, 2.27		120.42
Lys31						
Asn32	7.87	4.32	3.11, 2.70		7.39, 6.71	117.93
Leu33	8.42	4.85	1.26	1.84		118.76
Thr34	8.40	4.54	4.59	1.24		109.18
Leu35	8.84	3.83	1.70	1.47	0.78, 0.65	122.36
Ser36	8.40	3.99	3.91			113.99
Asp37	7.73	4.32	3.13, 2.59			121.71
Val38	7.93	3.51	2.06	0.91, 0.82		120.26
Cys39	8.10	3.70	3.05, 2.36			118.04
Arg40	7.93	3.91	2.08	1.87, 1.63	3.47, 3.19, 7.47	118.74
Leu41	7.73	3.95	1.75	1.36		120.17
Ala42	7.68	3.62	0.92			120.48
Ile43	7.85	3.37	1.98	1.61, 1.05, 0.81	0.68	119.72
Lys44	8.24	2.95	1.74			121.66
Glu45	8.35	3.90	2.06	2.59, 2.28		117.15
Tyr46	7.62	4.28	3.23, 3.00		6.72, 6.36	120.25
Leu47	8.21	3.62	1.62, 1.17	1.66	0.62, 0.28	120.28
Asp48	8.38	4.14	2.60, 2.46			119.99
Asn49	8.02	4.39	2.60, 2.35		7.70, 6.77	116.91
His50	7.74	4.31	3.05, 2.48		8.38, 6.69	117.83
Asp51	7.98	4.46	2.96, 2.92			121.35
Lys52	8.04	4.16	1.74	1.31	2.88, 1.57	123.60
Gln53	8.05	4.16	2.00, 1.88	2.26	7.41, 6.72	120.16
Lys54	7.96	4.17	1.72	1.34	2.90, 1.65	123.14
Lys55	7.81	4.06	1.72, 1.70	1.29	2.89, 1.57	128.57

## 9.4 Relaxations- und Bewegungsparameter von CspB bei verschiedenen Viskositäten

**Tab. A 3:**  $^{15}\text{N}$  Relaxationsparameter von CspB in 0 % EG bei 25 °C und 50.7 MHz.

Aminosäure	$R_1$ (s $^{-1}$ )	$R_2$ (s $^{-1}$ )	$hNOE$	$\eta_{xy}$ (s $^{-1}$ )
L2	2.33 ± 0.15	10.14 ± 0.21	0.70 ± 0.04	3.84 ± 0.17
E3	2.08 ± 0.15	8.74 ± 0.16	0.63 ± 0.03	3.99 ± 0.11
G4	2.19 ± 0.12	7.25 ± 0.16	0.63 ± 0.03	4.05 ± 0.06
K5	2.17 ± 0.10	7.48 ± 0.09	0.68 ± 0.03	4.49 ± 0.19
V6	2.20 ± 0.14	8.51 ± 0.09	0.66 ± 0.03	4.51 ± 0.10
K7	2.15 ± 0.11	13.43 ± 0.48	0.74 ± 0.04	5.76 ± 0.22
W8	2.34 ± 0.14	15.06 ± 0.31	0.68 ± 0.03	4.41 ± 0.03
F9	2.20 ± 0.16	8.24 ± 0.14	0.69 ± 0.04	4.51 ± 0.15
N10	2.35 ± 0.08	11.38 ± 0.34	0.68 ± 0.03	4.44 ± 0.20
S11	1.87 ± 0.26	8.62 ± 0.69	0.81 ± 0.04	
E12	2.13 ± 0.17	6.63 ± 0.14	0.63 ± 0.03	4.26 ± 0.11
K13	2.12 ± 0.13	8.18 ± 0.14	0.65 ± 0.03	3.67 ± 0.07
G14	2.40 ± 0.15	6.42 ± 0.12	0.64 ± 0.03	4.24 ± 0.09
G16	2.55 ± 0.17	9.28 ± 0.17	0.67 ± 0.03	3.53 ± 0.20
F17	2.45 ± 0.11	9.24 ± 0.09	0.69 ± 0.04	4.88 ± 0.17
I18	2.38 ± 0.09	7.50 ± 0.16	0.66 ± 0.03	4.55 ± 0.06
E19	2.50 ± 0.14	7.52 ± 0.08	0.66 ± 0.03	5.16 ± 0.16
V20	2.19 ± 0.09	11.11 ± 0.27	0.73 ± 0.04	5.36 ± 0.09
E21	2.04 ± 0.16	7.05 ± 0.10	0.60 ± 0.03	4.43 ± 0.13
G22	1.89 ± 0.14	7.14 ± 0.25	0.64 ± 0.03	4.18 ± 0.16
Q23	2.15 ± 0.09	7.53 ± 0.16	0.69 ± 0.03	4.84 ± 0.16
D24	2.15 ± 0.16	6.16 ± 0.13	0.57 ± 0.03	3.79 ± 0.12
D25	2.22 ± 0.21	6.38 ± 0.16	0.62 ± 0.03	4.35 ± 0.12
V26	2.45 ± 0.13	7.76 ± 0.22	0.68 ± 0.03	4.58 ± 0.12
F27	2.18 ± 0.14	12.50 ± 0.43	0.68 ± 0.03	5.20 ± 0.26
V28	2.35 ± 0.10	8.96 ± 0.13	0.70 ± 0.04	5.16 ± 0.22
H29	2.43 ± 0.13	12.85 ± 0.49	0.71 ± 0.04	5.24 ± 0.10
F30	2.42 ± 0.19	7.27 ± 0.17	0.67 ± 0.03	5.05 ± 0.02
S31	2.26 ± 0.14	8.51 ± 0.16	0.73 ± 0.04	5.07 ± 0.15
A32	2.41 ± 0.17	7.69 ± 0.11	0.70 ± 0.04	5.31 ± 0.13
I33	2.29 ± 0.14	8.16 ± 0.10	0.71 ± 0.04	4.98 ± 0.14
Q34	2.21 ± 0.13	8.61 ± 0.13	0.66 ± 0.03	5.43 ± 0.06
G35	1.73 ± 0.23	6.36 ± 0.30	0.48 ± 0.02	6.60 ± 0.19
E36	0.92 ± 0.10	4.09 ± 0.18	0.04 ± 0.01	2.04 ± 0.10
G37	1.00 ± 0.09	5.69 ± 0.62	0.15 ± 0.02	3.73 ± 0.34
F38	1.81 ± 0.10	5.94 ± 0.34	0.46 ± 0.02	3.27 ± 0.25
T40	2.16 ± 0.11	10.13 ± 0.27	0.62 ± 0.03	4.11 ± 0.13
L41	2.05 ± 0.07	9.36 ± 0.13	0.61 ± 0.03	4.34 ± 0.25
E42	2.22 ± 0.14	8.57 ± 0.10	0.67 ± 0.03	4.70 ± 0.13
E43	2.06 ± 0.10	8.60 ± 0.58	0.70 ± 0.04	4.55 ± 0.13
G44	2.23 ± 0.10	8.85 ± 0.16	0.65 ± 0.03	4.71 ± 0.17
Q45	2.35 ± 0.16	7.39 ± 0.10	0.67 ± 0.03	5.01 ± 0.17
A46	2.15 ± 0.15	8.56 ± 0.19	0.69 ± 0.03	5.32 ± 0.17
V47	2.31 ± 0.11	9.72 ± 0.15	0.69 ± 0.03	4.87 ± 0.15
S48	2.19 ± 0.12	8.40 ± 0.08	0.69 ± 0.03	4.64 ± 0.09
F49	2.25 ± 0.15	10.37 ± 0.24	0.65 ± 0.03	4.75 ± 0.17
E50	2.03 ± 0.21	7.76 ± 0.25	0.58 ± 0.03	4.93 ± 0.16
I51	2.15 ± 0.06	6.79 ± 0.16	0.60 ± 0.03	4.41 ± 0.20
V52	2.42 ± 0.11	6.89 ± 0.13	0.67 ± 0.03	4.81 ± 0.21
E53	2.14 ± 0.16	7.13 ± 0.17	0.60 ± 0.03	4.07 ± 0.14
G54	1.74 ± 0.13	7.23 ± 0.13	0.38 ± 0.02	2.75 ± 0.11
N55	1.10 ± 0.16	7.07 ± 0.71	0.43 ± 0.02	
G57	1.72 ± 0.08	6.30 ± 0.24	0.40 ± 0.02	3.33 ± 0.09
Q59	2.40 ± 0.14	7.37 ± 0.16	0.69 ± 0.03	4.24 ± 0.13
A60	2.18 ± 0.18	6.77 ± 0.15	0.60 ± 0.03	4.11 ± 0.13
A61	2.13 ± 0.15	6.75 ± 0.27	0.69 ± 0.03	6.00 ± 0.16
N62	1.97 ± 0.11	8.04 ± 0.18	0.68 ± 0.03	5.71 ± 0.10
V63	2.00 ± 0.09	8.20 ± 0.12	0.66 ± 0.03	4.93 ± 0.16
T64	2.20 ± 0.17	12.19 ± 0.19	0.70 ± 0.04	4.79 ± 0.44
A65	2.03 ± 0.13	6.54 ± 0.13	0.63 ± 0.03	4.29 ± 0.15
E66	1.98 ± 0.10	5.62 ± 0.07	0.41 ± 0.02	3.53 ± 0.17
A67	1.37 ± 0.12	2.57 ± 0.10	0.23 ± 0.01	1.58 ± 0.05

**Tab. A 4:**  $^{15}\text{N}$  Relaxationsparameter von CspB in 27 % EG bei 25 °C und 60.8 MHz.

Aminosäure	$R_1$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$R_2$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$h\text{NOE}$
2	1.18 ± 0.02	15.92 ± 0.80	0.75 ± 0.04
3	1.12 ± 0.02	12.40 ± 0.62	0.71 ± 0.04
4	1.11 ± 0.02	13.49 ± 0.67	0.81 ± 0.04
5	1.15 ± 0.02	14.46 ± 0.72	0.81 ± 0.04
6	1.22 ± 0.02	13.38 ± 0.67	0.80 ± 0.04
7	1.40 ± 0.03	11.67 ± 0.58	0.78 ± 0.04
8	1.22 ± 0.02	13.25 ± 0.66	0.75 ± 0.04
9	1.17 ± 0.02	13.98 ± 0.70	0.85 ± 0.04
10	1.18 ± 0.02	13.85 ± 0.69	0.82 ± 0.04
11	1.24 ± 0.02	10.56 ± 0.53	0.66 ± 0.03
12	1.28 ± 0.03	11.77 ± 0.59	0.68 ± 0.03
13	1.14 ± 0.02	12.15 ± 0.61	0.71 ± 0.04
14	1.25 ± 0.02	12.89 ± 0.64	0.79 ± 0.04
15	1.33 ± 0.03	12.93 ± 0.65	0.84 ± 0.04
16	1.26 ± 0.03	13.95 ± 0.70	0.84 ± 0.04
17	1.21 ± 0.02	14.26 ± 0.71	0.86 ± 0.04
18	1.17 ± 0.02	13.67 ± 0.68	0.88 ± 0.04
19	1.29 ± 0.03	13.48 ± 0.67	0.8 ± 0.04
20	1.18 ± 0.02	13.63 ± 0.68	0.83 ± 0.04
21	1.15 ± 0.02	13.10 ± 0.66	0.7 ± 0.04
22	1.18 ± 0.02	11.11 ± 0.56	0.67 ± 0.03
23	1.17 ± 0.02	13.38 ± 0.67	0.79 ± 0.04
25	1.15 ± 0.02	12.57 ± 0.63	0.76 ± 0.04
26	1.21 ± 0.02	13.23 ± 0.66	0.78 ± 0.04
27	1.23 ± 0.02	14.42 ± 0.72	0.82 ± 0.04
28	1.34 ± 0.03	13.78 ± 0.69	0.88 ± 0.04
29	1.29 ± 0.03	15.41 ± 0.77	0.86 ± 0.04
30	1.28 ± 0.03	14.52 ± 0.73	0.89 ± 0.04
31	1.21 ± 0.02	15.03 ± 0.75	0.85 ± 0.04
32	1.33 ± 0.03	14.39 ± 0.72	0.87 ± 0.04
33	1.28 ± 0.03	15.38 ± 0.77	0.8 ± 0.04
34	1.30 ± 0.03	14.14 ± 0.71	0.78 ± 0.04
35	1.24 ± 0.02	10.27 ± 0.51	0.48 ± 0.02
36	0.83 ± 0.02	6.19 ± 0.31	-0.06 ± 0.02
37	1.55 ± 0.03	5.79 ± 0.29	0.33 ± 0.02
39	1.51 ± 0.03	11.45 ± 0.57	0.52 ± 0.03
40	1.15 ± 0.02	15.88 ± 0.79	0.73 ± 0.04
41	1.17 ± 0.02	13.47 ± 0.67	0.78 ± 0.04
42	1.23 ± 0.02	14.92 ± 0.75	0.83 ± 0.04
44	1.22 ± 0.02	13.50 ± 0.68	0.76 ± 0.04
45	1.27 ± 0.03	14.55 ± 0.73	0.81 ± 0.04
46	1.23 ± 0.02	14.39 ± 0.72	0.75 ± 0.04
47	1.28 ± 0.03	14.08 ± 0.70	0.82 ± 0.04
48	1.23 ± 0.02	13.86 ± 0.69	0.83 ± 0.04
49	1.22 ± 0.02	14.08 ± 0.70	0.83 ± 0.04
50	1.18 ± 0.02	12.09 ± 0.60	0.69 ± 0.03
51	1.11 ± 0.02	13.13 ± 0.66	0.76 ± 0.04
52	1.27 ± 0.03	13.59 ± 0.68	0.75 ± 0.04
53	1.23 ± 0.02	11.49 ± 0.57	0.72 ± 0.04
54	1.15 ± 0.02	8.4 ± 0.42	0.34 ± 0.02
55	1.27 ± 0.03	9.23 ± 0.46	0.39 ± 0.02
56	1.38 ± 0.03	10.53 ± 0.53	0.41 ± 0.02
57	1.21 ± 0.02	9.33 ± 0.47	0.38 ± 0.02
59	1.26 ± 0.03	13.98 ± 0.7	0.76 ± 0.04
61	1.14 ± 0.02	12.01 ± 0.6	0.78 ± 0.04
62	1.22 ± 0.02	13.26 ± 0.66	0.83 ± 0.04
63	1.15 ± 0.02	13.67 ± 0.68	0.76 ± 0.04
64	1.21 ± 0.02	15.50 ± 0.78	0.77 ± 0.04
65	1.24 ± 0.02	12.22 ± 0.61	0.73 ± 0.04
66	1.28 ± 0.03	10.75 ± 0.54	0.62 ± 0.03
67	1.39 ± 0.03	5.25 ± 0.26	0.20 ± 0.01

**Tab. A 5:**  $^{15}\text{N}$  Relaxationsparameter von CspB in 70 % EG bei 25 °C und 60.8 MHz.

Aminosäure	$R_1$ (s $^{-1}$ )	$R_2$ (s $^{-1}$ )	$hNOE$
3	0.63 ± 0.05	19.60 ± 2.89	0.85 ± 0.04
4	0.68 ± 0.05	20.01 ± 1.52	0.81 ± 0.04
5	0.59 ± 0.05	20.62 ± 2.28	0.76 ± 0.04
6	0.59 ± 0.05	18.54 ± 1.51	0.77 ± 0.03
8	0.72 ± 0.06	17.42 ± 0.85	0.86 ± 0.04
9	0.64 ± 0.05	23.02 ± 2.70	0.78 ± 0.04
10	0.59 ± 0.04	19.31 ± 2.95	0.85 ± 0.04
11	0.95 ± 0.08	21.03 ± 1.91	0.63 ± 0.03
12	0.80 ± 0.06	22.31 ± 0.89	0.50 ± 0.02
13	0.65 ± 0.05	18.12 ± 1.23	0.53 ± 0.03
14	0.72 ± 0.06	17.71 ± 1.45	0.72 ± 0.04
15	0.66 ± 0.05	22.24 ± 1.34	0.84 ± 0.04
16	0.69 ± 0.06	16.45 ± 3.34	0.81 ± 0.04
17	0.57 ± 0.05	19.02 ± 3.651	0.88 ± 0.04
19	0.59 ± 0.05	17.86 ± 4.16	0.80 ± 0.04
20	0.62 ± 0.05	16.03 ± 3.92	0.78 ± 0.04
21	0.73 ± 0.06	21.81 ± 0.84	0.56 ± 0.03
22	0.82 ± 0.07	17.72 ± 1.14	0.42 ± 0.02
23	0.70 ± 0.06	23.22 ± 0.59	0.70 ± 0.03
25	0.83 ± 0.07	20.93 ± 0.87	0.56 ± 0.03
26	0.59 ± 0.04	17.52 ± 2.53	0.74 ± 0.04
27	0.64 ± 0.05	12.84 ± 2.74	0.77 ± 0.04
28	0.69 ± 0.06	18.24 ± 2.09	0.89 ± 0.04
29	0.70 ± 0.06	10.62 ± 2.27	0.82 ± 0.04
30	0.61 ± 0.05	21.81 ± 3.25	0.79 ± 0.04
31	0.57 ± 0.04	18.90 ± 2.57	0.84 ± 0.04
32	0.79 ± 0.06	22.31 ± 1.76	0.90 ± 0.05
33	0.66 ± 0.05	24.32 ± 2.57	0.84 ± 0.04
34	0.61 ± 0.05	22.01 ± 2.92	0.75 ± 0.04
35	1.36 ± 0.11	11.41 ± 0.40	0.50 ± 0.03
36	0.74 ± 0.06	9.98 ± 0.33	-0.27 ± -0.01
37	1.56 ± 0.13	9.68 ± 0.175	0.43 ± 0.02
39	1.22 ± 0.10	18.60 ± 0.925	0.61 ± 0.03
40	0.71 ± 0.06	21.62 ± 0.86	0.68 ± 0.03
41	0.69 ± 0.06	18.21 ± 2.35	0.73 ± 0.04
42	0.64 ± 0.05	17.80 ± 1.15	0.77 ± 0.04
44	0.54 ± 0.04	14.70 ± 1.82	0.71 ± 0.03
45	0.66 ± 0.05	23.63 ± 1.47	0.78 ± 0.04
46	0.71 ± 0.06	21.00 ± 1.37	0.70 ± 0.03
47	0.61 ± 0.05	17.31 ± 3.48	0.77 ± 0.04
48	0.54 ± 0.04	18.04 ± 1.92	0.85 ± 0.04
50	0.74 ± 0.06	13.93 ± 1.49	0.66 ± 0.03
51	0.62 ± 0.05	17.33 ± 1.00	0.72 ± 0.04
52	0.88 ± 0.07	20.52 ± 1.72	0.70 ± 0.04
53	0.83 ± 0.07	20.21 ± 1.01	0.66 ± 0.03
54	1.03 ± 0.08	14.41 ± 0.69	0.30 ± 0.01
55	1.09 ± 0.09	16.71 ± 0.38	0.26 ± 0.01
56	1.26 ± 0.10	17.64 ± 0.66	0.44 ± 0.02
57	0.99 ± 0.08	14.56 ± 0.28	0.17 ± 0.01
59	0.70 ± 0.06	19.58 ± 1.38	0.73 ± 0.04
61	0.62 ± 0.05	11.09 ± 2.69	0.64 ± 0.03
63	0.78 ± 0.06	19.82 ± 1.79	0.71 ± 0.04
64	0.70 ± 0.05	12.11 ± 2.20	0.70 ± 0.04
65	0.76 ± 0.06	17.97 ± 1.565	0.69 ± 0.03
66	0.81 ± 0.06	18.64 ± 0.56	0.61 ± 0.03
67	1.32 ± 0.11	8.97 ± 0.17	0.29 ± 0.01

**Tab. A 6:** Bewegungsparameter der erweiterten Lipari-Szabo Analyse von CspB bei 25 °C und 50.7 MHz.

Aminosäure	$S^2$	$R_{ex}$ ( $s^{-1}$ )	$\tau_c$ (ps)	Modell
L2	0.80 ± 0.05	4.49 ± 0.38		3
E3	0.69 ± 0.04	3.85 ± 0.33		3
G4	0.72 ± 0.04	2.19 ± 0.30		3
K5	0.74 ± 0.03	2.29 ± 0.25		3
V6	0.74 ± 0.04	3.30 ± 0.30		3
K7	0.75 ± 0.04	8.14 ± 0.54		3
W8	0.79 ± 0.04	9.49 ± 0.43		3
F9	0.77 ± 0.05	2.85 ± 0.36		3
N10	0.79 ± 0.03	5.84 ± 0.39		3
S11	0.83 ± 0.06			1
E12	0.72 ± 0.02		35.6 ± 11.1	2
K13	0.72 ± 0.04	3.14 ± 0.30		3
G14	0.78 ± 0.05	0.96 ± 0.33		3
G16	0.84 ± 0.05	3.41 ± 0.40		3
F17	0.83 ± 0.04	3.44 ± 0.28		3
I18	0.80 ± 0.03	1.91 ± 0.27		3
E19	0.82 ± 0.04	1.75 ± 0.31		3
V20	0.75 ± 0.03	5.82 ± 0.34		3
E21	0.66 ± 0.04	2.40 ± 0.29		3
G22	0.66 ± 0.04	2.47 ± 0.37		3
Q23	0.73 ± 0.03	2.36 ± 0.27		3
D24	0.66 ± 0.02		41.5 ± 8.1	2
D25	0.70 ± 0.02		34.2 ± 9.7	2
V26	0.82 ± 0.04	2.00 ± 0.36		3
F27	0.75 ± 0.04	7.22 ± 0.52		3
V28	0.80 ± 0.03	3.35 ± 0.27		3
H29	0.83 ± 0.04	7.02 ± 0.57		3
F30	0.81 ± 0.06	1.58 ± 0.41		3
S31	0.80 ± 0.05	2.92 ± 0.35		3
A32	0.83 ± 0.05	1.88 ± 0.37		3
I33	0.80 ± 0.04	2.57 ± 0.31		3
Q34	0.74 ± 0.04	3.39 ± 0.30		3
G35	0.55 ± 0.07	2.40 ± 0.61	41.7 ± 13.5	4
E36	0.25 ± 0.02		34.6 ± 3.4	2
G37	0.29 ± 0.03	3.50 ± 0.65	34.5 ± 4.7	4
F38	0.50 ± 0.02	2.34 ± 0.37		3
T40	0.71 ± 0.03	5.15 ± 0.36		3
L41	0.67 ± 0.02	4.60 ± 0.21		3
E42	0.76 ± 0.04	3.24 ± 0.31		3
E43	0.71 ± 0.03	3.61 ± 0.62		3
G44	0.74 ± 0.03	3.63 ± 0.27		3
Q45	0.79 ± 0.05	1.86 ± 0.34		3
A46	0.75 ± 0.05	3.26 ± 0.36		3
V47	0.79 ± 0.04	4.21 ± 0.29		3
S48	0.75 ± 0.04	3.11 ± 0.27		3
F49	0.75 ± 0.04	5.13 ± 0.38		3
E50	0.62 ± 0.04	3.34 ± 0.37		3
I51	0.71 ± 0.02	1.79 ± 0.22	40.9 ± 9.8	4
V52	0.81 ± 0.04	1.19 ± 0.28	34.0 ± 19.2	4
E53	0.70 ± 0.05	2.15 ± 0.41	40.7 ± 13.8	4
G54	0.54 ± 0.04	3.30 ± 0.33	56.7 ± 10.6	4
N55	0.42 ± 0.02	4.04 ± 0.72		3
G57	0.45 ± 0.02	3.04 ± 0.27		3
Q59	0.81 ± 0.04	1.67 ± 0.34		3
A60	0.68 ± 0.04	1.97 ± 0.34		3
A61	0.75 ± 0.04	1.48 ± 0.40		3
N62	0.69 ± 0.04	3.17 ± 0.30		3
V63	0.68 ± 0.03	3.41 ± 0.24		3
T64	0.78 ± 0.05	6.72 ± 0.40		3
A65	0.68 ± 0.04	1.79 ± 0.33	25.7 ± 9.5	4
E66	0.48 ± 0.01		40.1 ± 3.1	2
A67	0.30 ± 0.01			1

**Tab. A 7:** Bewegungsparameter der erweiterten Lipari-Szabo Analyse von CspB in 27% EG bei 25 °C und 60.8 MHz.

Aminosäure	$S^2$	$R_{ex}$ ( $s^{-1}$ )	$\tau_e$ (ps)	Modell
L2	0.82 ± 0.02	4.55 ± 0.83		3
E3	0.78 ± 0.02	1.61 ± 0.66		3
G4	0.78 ± 0.02	2.64 ± 0.71		3
K5	0.81 ± 0.02	3.27 ± 0.76		3
V6	0.87 ± 0.02	1.43 ± 0.72		1
K7	0.82 ± 0.03		2578.7 ± 1668.4	2
W8	0.85 ± 0.02	1.47 ± 0.71		3
F9	0.83 ± 0.02	2.51 ± 0.74		3
N10	0.83 ± 0.02	2.32 ± 0.74		3
S11	0.83 ± 0.02		54.7 ± 11.0	1
E12	0.85 ± 0.03		543.9 ± 485.3	1
K13	0.79 ± 0.02	1.24 ± 0.65		1
G14	0.88 ± 0.02	0.74 ± 0.70		1
F15	0.94 ± 0.02			1
G16	0.89 ± 0.02	1.61 ± 0.75		3
F17	0.86 ± 0.02	2.40 ± 0.76		3
I18	0.85 ± 0.02			3
E19	0.91 ± 0.02	0.88 ± 0.73		1
V20	0.84 ± 0.02	2.09 ± 0.73		3
E21	0.80 ± 0.02	2.11 ± 0.70		4
G22	0.81 ± 0.02		39.6 ± 8.7	2
Q23	0.82 ± 0.02	2.00 ± 0.71		3
D25	0.81 ± 0.02	1.41 ± 0.67		3
V26	0.85 ± 0.02	1.43 ± 0.71		3
F27	0.87 ± 0.02	2.41 ± 0.77		3
V28	0.96 ± 0.02			1
H29	0.92 ± 0.02	2.72 ± 0.82		3
F30	0.91 ± 0.02	1.90 ± 0.78		3
S31	0.86 ± 0.02	3.21 ± 0.79		3
A32	0.95 ± 0.02	1.32 ± 0.77		1
I33	0.91 ± 0.02	2.86 ± 0.82		3
Q34	0.92 ± 0.02	1.49 ± 0.76		3
G35	0.76 ± 0.02			2
E36	0.32 ± 0.01			3
G37	0.48 ± 0.02		1113.1 ± 31.5	2
K39	0.79 ± 0.02		930.1 ± 90.9	2
T40	0.80 ± 0.02	4.79 ± 0.83		3
L41	0.82 ± 0.02	2.07 ± 0.72		3
E42	0.88 ± 0.02	2.83 ± 0.79		3
G44	0.85 ± 0.02	1.71 ± 0.72		3
Q45	0.90 ± 0.02	2.13 ± 0.78		3
A46	0.86 ± 0.02	2.49 ± 0.76		3
V47	0.91 ± 0.02	1.58 ± 0.75		3
S48	0.87 ± 0.02	1.79 ± 0.74		3
F49	0.86 ± 0.02	2.19 ± 0.75		3
E50	0.82 ± 0.02	0.79 ± 0.65	35.3 ± 9.1	2
I51	0.77 ± 0.02	2.42 ± 0.70		3
V52	0.89 ± 0.02	1.28 ± 0.73		1
E53	0.85 ± 0.02		37.3 ± 12.0	1
G54	0.58 ± 0.01			1
N55	0.85 ± 0.01		300.9 ± 94.4	2
R56	0.74 ± 0.03		702.6 ± 114.9	5
G57	0.65 ± 0.01			1
Q59	0.88 ± 0.02	1.77 ± 0.75		3
A61	0.80 ± 0.02	0.96 ± 0.65		1
N62	0.86 ± 0.02	1.35 ± 0.71		1
V63	0.81 ± 0.02	2.53 ± 0.72		3
T64	0.85 ± 0.02	3.75 ± 0.82		3
A65	0.86 ± 0.02		34.6 ± 13.2	1
E66	0.84 ± 0.02			2
A67	0.49 ± 0.02		948.5 ± 24.6	2

**Tab. A 8:** Bewegungsparameter der erweiterten Lipari-Szabo Analyse von CspB in 70% EG bei 25 °C und 60.8 MHz.

Aminosäure	$S^2$	$R_{ex}$ (s <sup>-1</sup> )	$\tau_c$ (ps)	Modell
E3	0.94 ± 0.04			1
G4	0.91 ± 0.03			1
K5	0.87 ± 0.03			1
V6	0.86 ± 0.03			1
W8	0.86 ± 0.02			1
F9	0.91 ± 0.03			1
N10	0.91 ± 0.03			1
S11	0.89 ± 0.04		1097.7 ± 264.0	2
E12	0.93 ± 0.02		334.6 ± 481.5	2
K13	0.74 ± 0.02			1
G14	0.86 ± 0.03			1
F15	0.94 ± 0.03			1
G16	0.93 ± 0.04			1
F17	0.92 ± 0.04			1
E19	0.89 ± 0.03			1
V20	0.89 ± 0.03			1
E21	0.84 ± 0.07	1.50 ± 1.45	52.4 ± 28.0	4
G22	0.67 ± 0.01	1.49 ± 1.18		3
Q23	0.86 ± 0.03	2.42 ± 0.91		3
D25	0.86 ± 0.03		621.2 ± 291.6	5
V26	0.85 ± 0.03			1
F27	0.87 ± 0.03			1
V28	0.96 ± 0.04			1
H29	0.89 ± 0.03			1
F30	0.90 ± 0.03			1
S31	0.90 ± 0.03			1
A32	0.98 ± 0.02			1
I33	0.96 ± 0.04			1
Q34	0.88 ± 0.03			1
G35	0.42 ± 0.02		1640.7 ± 72.5	2
E36	0.38 ± 0.01	0.74 ± 0.34		3
G37	0.31 ± 0.01		1555.8 ± 50.2	2
K39	0.74 ± 0.03		1630.5 ± 165.6	5
T40	0.85 ± 0.03	1.08 ± 1.00		3
L41	0.87 ± 0.03			1
E42	0.85 ± 0.03			1
G44	0.81 ± 0.02			1
Q45	0.92 ± 0.03	1.53 ± 1.45		3
A46	0.87 ± 0.03			1
V47	0.88 ± 0.03			1
S48	0.88 ± 0.03			1
E50	0.80 ± 0.02			1
I51	0.82 ± 0.02			1
V52	0.84 ± 0.04		1386.6 ± 438.5	5
E53	0.83 ± 0.03		1014.2 ± 321.3	5
G54	0.62 ± 0.03		1060.0 ± 41.2	2
N55	0.67 ± 0.03		892.9 ± 57.6	5
R56	0.69 ± 0.03		1215.1 ± 70.1	2
G57	0.57 ± 0.01		961.4 ± 17.0	2
Q59	0.87 ± 0.03			1
A61	0.79 ± 0.02			1
V63	0.88 ± 0.03			1
T64	0.83 ± 0.03			1
A65	0.84 ± 0.03			1
E66	0.79 ± 0.02			1
A67	0.29 ± 0.01		1316.3 ± 23.1	2

## 9.5 Relaxations- und Bewegungsparameter von CspB im Komplex mit dT7

Tab. A 9: <sup>15</sup>N- Relaxationsparameter von CspB im Komplex mit dT7 bei 25 °C und 50.7 MHz.

Aminosäure	$R_1$ (s <sup>-1</sup> )	$R_2$ (s <sup>-1</sup> )	$hNOE$	$\eta_{xy}$ (s <sup>-1</sup> )
L2	2.26 ± 0.21	6.52 ± 0.50	0.76 ± 0.04	3.57 ± 0.09
E3	2.60 ± 0.03	5.10 ± 0.12	0.59 ± 0.03	3.43 ± 0.07
G4	2.62 ± 0.05	5.73 ± 0.18	0.73 ± 0.04	3.35 ± 0.05
K5	2.84 ± 0.07	5.88 ± 0.11	0.71 ± 0.04	3.32 ± 0.08
V6	2.85 ± 0.06	5.97 ± 0.17	0.71 ± 0.04	3.41 ± 0.08
K7	2.91 ± 0.03	6.93 ± 0.16	0.76 ± 0.04	5.19 ± 0.27
W8	2.82 ± 0.09	16.02 ± 0.74	0.74 ± 0.04	3.01 ± 0.13
F9			0.78 ± 0.04	2.96 ± 0.13
N10	2.90 ± 0.10	6.12 ± 0.41	0.83 ± 0.04	4.24 ± 0.44
S11			0.76 ± 0.04	
E12	2.70 ± 0.04	6.57 ± 0.08	0.76 ± 0.04	3.51 ± 0.36
K13	2.69 ± 0.10	7.67 ± 0.22	0.64 ± 0.03	6.83 ± 0.16
G14	2.93 ± 0.05	6.23 ± 0.31	0.73 ± 0.04	
F15	2.96 ± 0.06	6.11 ± 0.09	0.80 ± 0.04	4.27 ± 0.71
G16	2.91 ± 0.13	4.60 ± 0.21	0.80 ± 0.04	2.85 ± 0.14
I18	2.89 ± 0.09	5.98 ± 0.15	0.75 ± 0.04	3.35 ± 0.12
E19	2.84 ± 0.06	6.16 ± 0.34	0.72 ± 0.04	4.04 ± 0.06
V20	2.79 ± 0.07	5.43 ± 0.23	0.74 ± 0.04	4.13 ± 0.11
E21	2.54 ± 0.04	6.11 ± 0.32	0.72 ± 0.04	3.44 ± 0.08
G22	2.11 ± 0.06	5.28 ± 0.20	0.72 ± 0.04	3.30 ± 0.03
Q23	2.81 ± 0.03	5.97 ± 0.09	0.78 ± 0.04	4.00 ± 0.11
D24	2.52 ± 0.02	5.37 ± 0.11	0.69 ± 0.03	3.22 ± 0.08
D25	2.51 ± 0.06	5.48 ± 0.14	0.81 ± 0.04	3.88 ± 0.29
V26	2.97 ± 0.10	6.72 ± 0.13	0.79 ± 0.04	3.87 ± 0.08
F27	2.82 ± 0.04	5.79 ± 0.20	0.78 ± 0.04	4.97 ± 0.16
V28	3.00 ± 0.08	5.93 ± 0.23	0.89 ± 0.04	3.62 ± 0.18
H29	2.84 ± 0.06	5.67 ± 0.16	0.78 ± 0.04	5.56 ± 0.45
F30	1.64 ± 0.13	4.54 ± 0.57	0.73 ± 0.04	9.44 ± 0.98
S31	2.98 ± 0.13	6.62 ± 0.37	0.83 ± 0.04	4.83 ± 0.88
A32	2.89 ± 0.04	6.01 ± 0.19	0.78 ± 0.04	3.54 ± 0.22
I33	2.85 ± 0.05	6.25 ± 0.09	0.83 ± 0.04	3.42 ± 0.05
Q34	2.89 ± 0.06	6.98 ± 0.36	0.74 ± 0.04	4.69 ± 0.25
G35	1.82 ± 0.13	4.48 ± 0.52	0.73 ± 0.04	3.14 ± 0.37
E36	1.34 ± 0.05	2.74 ± 0.17	0.08 ± 0.00	1.50 ± 0.04
G37			0.51 ± 0.03	2.25 ± 0.24
F38	2.76 ± 0.07	6.06 ± 0.11	0.78 ± 0.04	
K39	2.58 ± 0.11	7.76 ± 0.25	0.77 ± 0.04	
T40	1.84 ± 0.18	4.80 ± 0.52		
L41	2.71 ± 0.06	6.03 ± 0.13	0.80 ± 0.04	3.99 ± 0.48
E42	3.07 ± 0.09	7.56 ± 0.13	0.59 ± 0.03	3.32 ± 0.80
E43	2.75 ± 0.07	5.97 ± 0.09	0.76 ± 0.04	
G44	2.79 ± 0.05	5.99 ± 0.12	0.71 ± 0.04	3.52 ± 0.03
Q45	2.89 ± 0.05	6.37 ± 0.11	0.77 ± 0.04	3.76 ± 0.05
A46	2.65 ± 0.03	5.41 ± 0.21	0.76 ± 0.04	4.01 ± 0.07
V47	2.85 ± 0.07	5.91 ± 0.11	0.80 ± 0.04	3.98 ± 0.19
S48	2.63 ± 0.04	6.27 ± 0.09	0.76 ± 0.04	
F49	2.71 ± 0.08	6.52 ± 0.15	0.76 ± 0.04	3.63 ± 0.28
E50	2.34 ± 0.10	5.21 ± 0.29	0.63 ± 0.03	3.18 ± 0.10
I51	2.52 ± 0.07	5.52 ± 0.10	0.65 ± 0.03	3.57 ± 0.16
V52	2.70 ± 0.08	5.70 ± 0.25	0.70 ± 0.04	3.08 ± 0.19
E53	2.43 ± 0.05	5.37 ± 0.14	0.71 ± 0.04	3.98 ± 0.35
G54	2.10 ± 0.04	4.42 ± 0.11	0.54 ± 0.03	3.42 ± 0.34
N55			0.60 ± 0.03	2.62 ± 0.06
R56			0.65 ± 0.03	
G57	1.98 ± 0.04	4.56 ± 0.13	0.52 ± 0.03	2.96 ± 0.20
Q59	2.73 ± 0.06	5.92 ± 0.12	0.76 ± 0.04	3.57 ± 0.23
A60	2.60 ± 0.04	5.47 ± 0.08	0.70 ± 0.04	3.28 ± 0.09
A61	2.81 ± 0.12	6.25 ± 0.22	0.69 ± 0.03	3.91 ± 0.09
N62	2.42 ± 0.09	6.06 ± 0.16	0.80 ± 0.04	4.11 ± 0.14
V63	2.58 ± 0.04	5.95 ± 0.10	0.72 ± 0.04	4.63 ± 0.30
T64	2.68 ± 0.07	5.68 ± 0.35	0.74 ± 0.04	3.39 ± 0.20
A65	2.62 ± 0.03	5.54 ± 0.16	0.66 ± 0.03	3.40 ± 0.78
E66	2.51 ± 0.04	4.98 ± 0.09	0.50 ± 0.03	2.77 ± 0.06
A67	1.57 ± 0.03	2.68 ± 0.10	0.10 ± 0.01	1.39 ± 0.05

**Tab. A 10:** Bewegungsparameter der erweiterten Lipari-Szabo Analyse von CspB im Komplex mit dT7 bei 25 °C und 50.7 MHz.

Aminosäure	$S^2$	$R_{ex}$ ( $s^{-1}$ )	$\tau_c$ (ps)	Modell
E3	0.83 ± 0.01			1
G4	0.84 ± 0.01		122.2 ± 45.5	5
K5	0.91 ± 0.01			1
V6	0.93 ± 0.02			1
K7	0.96 ± 0.01	0.61 ± 0.17		3
W8	0.94 ± 0.03			3
N10	0.97 ± 0.03			1
E12	0.89 ± 0.01	0.70 ± 0.13		3
K13	0.91 ± 0.03	1.70 ± 0.31		3
G14	0.89 ± 0.08		1527.0 ± 1203.5	2
F15	0.94 ± 0.01			1
G16	0.81 ± 0.03			1
I18	0.93 ± 0.02			1
E19	0.94 ± 0.02			1
V20	0.89 ± 0.02			1
E21	0.84 ± 0.01	0.59 ± 0.33		3
G22	0.70 ± 0.02	0.62 ± 0.24		3
Q23	0.92 ± 0.01			1
D24	0.82 ± 0.01			1
D25	0.83 ± 0.02			1
V26	0.99 ± 0.01			1
F27	0.93 ± 0.01			1
V28	0.97 ± 0.02			1
H29	0.91 ± 0.02			1
F30	0.66 ± 0.03			1
S31	0.99 ± 0.02			1
A32	0.95 ± 0.01			1
I33	0.95 ± 0.01			1
Q34	0.96 ± 0.02	0.69 ± 0.38		3
G35	0.69 ± 0.01			1
E36	0.24 ± 0.01	1.02 ± 0.17		3
F38	0.92 ± 0.01			1
K39	0.88 ± 0.04	1.97 ± 0.34		3
L41	0.91 ± 0.01			1
E42	0.93 ± 0.03	1.40 ± 0.22	178.9 ± 35.0	4
E43	0.91 ± 0.01			1
G44	0.92 ± 0.01			1
Q45	0.96 ± 0.01			1
A46	0.87 ± 0.01			1
V47	0.92 ± 0.01			1
S48	0.91 ± 0.01			1
F49	0.96 ± 0.02			1
E50	0.77 ± 0.03		39.0 ± 13.5	2
I51	0.83 ± 0.01		43.4 ± 18.7	2
V52	0.88 ± 0.02			1
E53	0.80 ± 0.01			1
G54	0.66 ± 0.01		47.9 ± 6.6	2
G57	0.64 ± 0.01		46.8 ± 6.0	2
Q59	0.90 ± 0.01			1
A60	0.84 ± 0.01			1
A61	0.94 ± 0.03			1
N62	0.82 ± 0.03	0.62 ± 0.25		3
V63	0.87 ± 0.01			1
T64	0.89 ± 0.02			1
A65	0.85 ± 0.01			1
E66	0.76 ± 0.01		147.0 ± 33.6	5
A67	0.25 ± 0.01			1

## 9.6 Resultate der $R_2$ -Dispersionsmessungen an CspB bei 0 M Harnstoff

**Tab. A 11:**  $R_2(\tau_{cp})$  bei 0 M Harnstoff in 20 mM Na-cacodylat/HCl pH 7.0 bei 25 °C und 16.4 T ( $0.3 \text{ ms} < \tau_{cp} < 1.4 \text{ ms}$ )

Aminosäure	$R_2(\tau_{cp}=325 \text{ } \mu\text{s}) \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$R_2(\tau_{cp}=500 \text{ } \mu\text{s}) \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$R_2(\tau_{cp}=725 \text{ } \mu\text{s}) \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$R_2(\tau_{cp}=1 \text{ ms}) \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$R_2(\tau_{cp}=1.375 \text{ ms}) \text{ (s}^{-1}\text{)}$
L2	17.4 ± 0.6	18.2 ± 0.3	19.3 ± 0.3	20.1 ± 0.3	20.0 ± 0.2
E3	14.4 ± 0.4	15.2 ± 0.1	16.0 ± 0.2	17.3 ± 0.1	17.3 ± 0.3
G4	13.7 ± 0.5	13.5 ± 0.3	14.0 ± 0.2	14.1 ± 0.2	15.1 ± 0.3
K5	13.6 ± 0.3	13.2 ± 0.2	13.3 ± 0.2	13.5 ± 0.2	13.7 ± 0.1
V6	15.5 ± 0.5	15.9 ± 0.5	16.2 ± 0.3	17.0 ± 0.4	17.8 ± 0.2
K7	20.2 ± 0.8	22.4 ± 0.7	22.0 ± 0.7	22.7 ± 0.4	23.8 ± 1.0
W8	20.8 ± 1.1	21.8 ± 0.4	22.3 ± 0.5	22.8 ± 0.2	23.3 ± 0.4
W8sc	8.5 ± 0.1	9.1 ± 0.3	8.8 ± 0.3	8.9 ± 0.3	9.1 ± 0.3
F9	15.3 ± 0.6	15.5 ± 0.3	15.8 ± 0.2	16.0 ± 0.4	17.0 ± 0.2
N10	17.3 ± 1.2	19.5 ± 0.6	20.3 ± 0.4	21.3 ± 0.7	20.7 ± 0.5
S11	22.1 ± 1.0	19.9 ± 0.5	22.2 ± 0.5	22.6 ± 0.8	25.2 ± 0.7
E12	11.8 ± 0.4	11.3 ± 0.2	11.4 ± 0.1	11.0 ± 0.2	11.3 ± 0.1
K13	13.3 ± 0.2	13.8 ± 0.2	14.4 ± 0.2	15.1 ± 0.3	15.5 ± 0.2
G14	13.1 ± 0.7	12.5 ± 0.1	13.4 ± 0.5	12.5 ± 0.2	13.5 ± 0.3
F15	14.9 ± 0.7	16.6 ± 0.3	17.5 ± 0.4	19.2 ± 0.7	18.3 ± 0.3
G16	14.1 ± 0.9	15.0 ± 0.4	14.7 ± 0.7	15.3 ± 0.7	16.5 ± 0.9
F17	14.8 ± 0.5	15.2 ± 0.2	16.1 ± 0.4	17.1 ± 0.4	17.8 ± 0.3
I18	14.9 ± 0.4	14.2 ± 0.3	14.6 ± 0.2	14.0 ± 0.2	14.9 ± 0.2
E19	14.3 ± 0.6	14.2 ± 0.3	14.7 ± 0.3	14.4 ± 0.2	14.2 ± 0.2
V20	16.4 ± 0.2	17.1 ± 0.6	18.4 ± 0.4	17.6 ± 0.3	18.3 ± 0.5
E21	12.6 ± 0.5	12.7 ± 0.2	13.4 ± 0.4	13.6 ± 0.2	13.4 ± 0.2
G22	13.2 ± 0.5	13.4 ± 0.2	13.7 ± 0.3	13.9 ± 0.2	14.8 ± 0.2
Q23	12.3 ± 0.4	12.4 ± 0.1	12.6 ± 0.1	13.2 ± 0.1	13.8 ± 0.1
D24	11.3 ± 0.2	11.0 ± 0.1	10.8 ± 0.1	10.7 ± 0.1	10.7 ± 0.1
D25	11.7 ± 0.4	12.0 ± 0.2	12.3 ± 0.2	12.5 ± 0.2	13.5 ± 0.2
V26	15.1 ± 0.6	14.7 ± 0.4	15.6 ± 0.2	16.2 ± 0.2	16.9 ± 0.2
F27	18.2 ± 0.5	21.4 ± 0.7	21.4 ± 0.9	21.1 ± 0.4	21.8 ± 0.5
V28	15.7 ± 0.6	16.7 ± 0.3	17.5 ± 0.4	18.6 ± 0.4	19.7 ± 0.3
H29	21.2 ± 1.5	23.7 ± 0.8	26.9 ± 1.3	27.6 ± 0.7	26.6 ± 0.6
F30	14.4 ± 0.2	14.5 ± 0.4	14.6 ± 0.4	15.0 ± 0.4	15.6 ± 0.3
S31	17.2 ± 0.7	16.1 ± 0.5	16.2 ± 0.4	16.9 ± 0.4	16.8 ± 0.4
A32	13.9 ± 0.5	13.6 ± 0.1	13.8 ± 0.1	14.5 ± 0.2	15.3 ± 0.2
I33	15.5 ± 0.6	15.2 ± 0.2	15.3 ± 0.2	15.6 ± 0.4	15.9 ± 0.1
Q34	15.7 ± 0.2	16.3 ± 0.5	17.4 ± 0.4	18.1 ± 0.3	18.5 ± 0.3
G35	12.3 ± 0.3	12.4 ± 0.2	12.9 ± 0.5	12.7 ± 0.4	12.5 ± 0.3
G37	10.4 ± 0.5	10.1 ± 0.3	10.0 ± 0.3	9.7 ± 0.3	9.6 ± 0.2
F38	13.5 ± 0.8	12.5 ± 0.2	13.3 ± 0.4	13.4 ± 0.4	13.8 ± 0.5
K39	20.0 ± 0.7	20.0 ± 0.6	21.3 ± 0.3	23.4 ± 0.6	23.2 ± 0.4
T40	20.0 ± 0.7	20.1 ± 0.2	20.1 ± 0.4	20.2 ± 0.2	20.5 ± 0.3
L41	15.4 ± 0.8	15.8 ± 0.2	17.5 ± 0.4	18.6 ± 0.4	20.7 ± 0.5
E42	15.4 ± 0.4	15.8 ± 0.2	16.6 ± 0.2	17.7 ± 0.2	18.7 ± 0.1
E43	15.8 ± 0.8	17.3 ± 0.6	21.4 ± 2.6	22.9 ± 2.2	22.9 ± 1.8
G44	15.4 ± 0.6	16.6 ± 0.3	17.1 ± 0.3	17.6 ± 0.3	18.2 ± 0.2
Q45	13.9 ± 0.4	13.8 ± 0.1	13.6 ± 0.1	13.6 ± 0.2	13.4 ± 0.2
A46	14.8 ± 0.3	14.5 ± 0.3	15.7 ± 0.3	16.3 ± 0.2	17.5 ± 0.2
V47	16.3 ± 0.7	17.3 ± 0.3	18.3 ± 0.3	18.8 ± 0.4	19.8 ± 0.3
S48	14.3 ± 0.3	14.5 ± 0.2	14.8 ± 0.2	14.9 ± 0.2	15.8 ± 0.3
F49	16.6 ± 0.7	17.0 ± 0.1	18.0 ± 0.2	18.9 ± 0.4	19.2 ± 0.3
E50	14.2 ± 0.4	13.8 ± 0.2	13.6 ± 0.2	14.0 ± 0.1	13.9 ± 0.2
I51	12.9 ± 0.4	13.1 ± 0.2	13.3 ± 0.2	13.5 ± 0.3	14.0 ± 0.2
V52	13.5 ± 0.5	13.4 ± 0.2	13.5 ± 0.2	14.0 ± 0.3	15.1 ± 0.2
E53	12.7 ± 0.1	13.0 ± 0.2	13.5 ± 0.2	14.2 ± 0.2	15.5 ± 0.2
G54	11.5 ± 0.2	12.5 ± 0.2	13.7 ± 0.3	14.7 ± 0.2	16.1 ± 0.3
N55	13.3 ± 0.5	13.1 ± 0.2	13.2 ± 0.2	13.5 ± 0.3	14.2 ± 0.2
R56	21.9 ± 1.3	21.2 ± 1.1	21.5 ± 1.0	24.9 ± 0.7	25.1 ± 0.8
G57	9.7 ± 0.4	10.0 ± 0.4	10.0 ± 0.3	10.0 ± 0.2	10.5 ± 0.1
Q59	14.1 ± 0.2	13.9 ± 0.1	14.2 ± 0.2	14.2 ± 0.2	14.1 ± 0.3
A60	12.9 ± 0.3	12.7 ± 0.1	12.5 ± 0.2	12.7 ± 0.1	12.7 ± 0.2
A61	13.1 ± 0.7	13.0 ± 0.2	12.8 ± 0.2	12.7 ± 0.1	13.3 ± 0.2
N62	14.1 ± 0.7	14.1 ± 0.2	14.2 ± 0.2	14.4 ± 0.3	15.0 ± 0.3
V63	13.9 ± 0.6	14.7 ± 0.2	15.8 ± 0.2	16.3 ± 0.1	17.5 ± 0.2
T64	19.8 ± 0.6	20.2 ± 0.5	20.6 ± 0.2	22.5 ± 0.6	22.4 ± 0.7
A65	12.3 ± 0.5	12.1 ± 0.2	12.0 ± 0.1	12.6 ± 0.3	12.5 ± 0.1
E66	11.5 ± 0.2	11.0 ± 0.2	11.2 ± 0.1	11.5 ± 0.2	11.9 ± 0.1
A67	4.7 ± 0.2	4.8 ± 0.33	4.5 ± 0.1	4.6 ± 0.1	4.7 ± 0.1

**Tab. A 12:**  $R_2(\tau_{cp})$  bei 0 M Harnstoff in 20 mM Na-cacodylat/HCl pH 7.0 bei 25 °C und 16.4 T (2.2 ms <  $\tau_{cp}$  < 10.8 ms).

Aminosäure	$R_2(\tau_{cp}=2.2 \text{ ms}) (s^{-1})$	$R_2(\tau_{cp}=2.9 \text{ ms}) (s^{-1})$	$R_2(\tau_{cp}=3.6 \text{ ms}) (s^{-1})$	$R_2(\tau_{cp}=5.4 \text{ ms}) (s^{-1})$	$R_2(\tau_{cp}=10.8 \text{ ms}) (s^{-1})$
L2	20.9 ± 0.3	21.3 ± 0.4	20.4 ± 0.3	19.5 ± 0.3	19.5 ± 0.4
E3	17.4 ± 0.4	18.0 ± 0.5	17.1 ± 0.1	16.6 ± 0.2	16.7 ± 0.4
G4	15.5 ± 0.3	15.4 ± 0.4	15.0 ± 0.2	15.9 ± 0.1	16.0 ± 0.6
K5	13.7 ± 0.2	14.4 ± 0.3	13.6 ± 0.1	14.0 ± 0.3	13.6 ± 0.3
V6	18.2 ± 0.2	18.2 ± 0.1	17.7 ± 0.3	18.6 ± 0.1	18.7 ± 0.6
K7	22.2 ± 0.2	20.5 ± 0.3	21.8 ± 0.8	25.2 ± 1.4	12.7 ± 3.0
W8	22.1 ± 0.4	23.0 ± 0.6	22.8 ± 1.0	21.5 ± 0.3	21.6 ± 0.8
W8sc	8.9 ± 0.2	9.3 ± 0.2	8.8 ± 0.2	9.8 ± 0.1	10.3 ± 0.6
F9	17.2 ± 0.3	17.6 ± 0.3	17.7 ± 0.1	17.0 ± 0.4	17.5 ± 0.5
N10	19.8 ± 1.0	20.5 ± 0.9	21.0 ± 0.6	19.9 ± 0.3	18.5 ± 0.4
S11	24.2 ± 1.1	22.5 ± 0.8	22.0 ± 1.8	22.7 ± 0.6	22.2 ± 1.1
E12	11.1 ± 0.1	11.3 ± 0.2	11.0 ± 0.4	10.6 ± 0.2	10.8 ± 0.3
K13	15.7 ± 0.2	15.7 ± 0.2	15.5 ± 0.1	15.8 ± 0.3	15.6 ± 0.3
G14	13.3 ± 0.2	12.7 ± 0.3	12.7 ± 0.4	12.9 ± 0.3	13.1 ± 0.4
F15	18.2 ± 0.4	18.3 ± 0.6	17.7 ± 0.5	18.6 ± 0.4	17.4 ± 0.4
G16	16.1 ± 0.3	17.3 ± 1.1	14.9 ± 1.5	16.1 ± 0.7	19.3 ± 1.0
F17	18.1 ± 0.4	18.9 ± 0.7	19.6 ± 0.8	18.1 ± 0.5	17.6 ± 0.6
I18	14.5 ± 0.2	15.0 ± 0.4	14.6 ± 0.3	14.5 ± 0.2	14.3 ± 0.2
E19	14.4 ± 0.2	15.2 ± 0.2	14.8 ± 0.4	15.2 ± 0.2	14.6 ± 0.3
V20	18.2 ± 0.5	17.2 ± 0.1	17.8 ± 0.7	17.9 ± 0.3	16.9 ± 0.2
E21	14.1 ± 0.1	14.9 ± 0.3	14.7 ± 0.2	14.7 ± 0.1	15.0 ± 0.6
G22	15.2 ± 0.2	16.0 ± 0.4	15.7 ± 0.1	15.4 ± 0.2	15.2 ± 0.1
Q23	14.8 ± 0.2	15.3 ± 0.4	15.1 ± 0.2	14.7 ± 0.3	14.6 ± 0.4
D24	11.0 ± 0.1	11.1 ± 0.2	11.0 ± 0.2	11.0 ± 0.1	11.1 ± 0.2
D25	14.5 ± 0.2	15.0 ± 0.4	15.3 ± 0.1	14.7 ± 0.2	14.9 ± 0.2
V26	18.4 ± 0.1	18.7 ± 0.5	18.7 ± 0.6	18.4 ± 0.3	17.8 ± 0.1
F27	20.4 ± 0.8	20.8 ± 0.4	20.5 ± 0.7	22.0 ± 1.0	21.0 ± 1.3
V28	19.3 ± 0.3	21.2 ± 0.9	19.7 ± 0.4	19.9 ± 0.3	18.4 ± 0.6
H29	24.9 ± 1.1	25.1 ± 1.2	26.3 ± 2.3	25.3 ± 1.4	26.3 ± 0.6
F30	15.5 ± 0.2	16.2 ± 0.2	16.4 ± 0.4	15.8 ± 0.4	15.4 ± 0.4
S31	16.6 ± 0.1	17.5 ± 0.5	17.3 ± 0.1	16.3 ± 0.4	16.6 ± 0.5
A32	15.8 ± 0.2	16.6 ± 0.4	16.3 ± 0.3	16.4 ± 0.3	16.0 ± 0.4
I33	16.4 ± 0.4	17.3 ± 0.3	17.0 ± 0.3	17.1 ± 0.2	17.1 ± 0.5
Q34	19.2 ± 0.4	19.8 ± 0.3	19.8 ± 0.1	19.3 ± 0.2	18.3 ± 0.3
G35	12.9 ± 0.3	13.8 ± 0.4	13.5 ± 0.1	15.3 ± 0.5	16.7 ± 1.6
G37	9.9 ± 0.1	10.0 ± 0.2	9.1 ± 0.3	9.4 ± 0.2	9.1 ± 0.2
F38	14.6 ± 0.4	15.6 ± 0.6	14.6 ± 0.2	14.3 ± 0.3	14.3 ± 0.3
K39	23.7 ± 0.7	24.2 ± 1.1	22.3 ± 1.4	23.2 ± 0.6	21.7 ± 0.4
T40	21.2 ± 0.4	21.6 ± 0.5	21.4 ± 0.6	20.8 ± 0.5	19.7 ± 0.2
L41	19.6 ± 0.6	20.1 ± 0.7	19.6 ± 0.4	18.7 ± 0.4	18.0 ± 0.7
E42	19.3 ± 0.3	20.5 ± 0.4	19.7 ± 0.1	19.2 ± 0.2	18.8 ± 0.4
E43	22.5 ± 1.4	24.2 ± 1.7	19.9 ± 0.7	19.5 ± 0.5	19.2 ± 0.6
G44	18.5 ± 0.4	18.2 ± 0.2	18.2 ± 0.2	18.6 ± 0.3	17.5 ± 0.3
Q45	13.5 ± 0.2	14.0 ± 0.2	13.8 ± 0.1	13.9 ± 0.2	13.7 ± 0.3
A46	17.8 ± 0.3	18.3 ± 0.4	17.5 ± 0.1	17.5 ± 0.4	18.5 ± 0.8
V47	19.8 ± 0.4	19.9 ± 0.3	20.3 ± 0.5	19.4 ± 0.1	19.1 ± 0.4
S48	16.0 ± 0.2	16.7 ± 0.4	16.9 ± 0.4	16.4 ± 0.3	16.4 ± 0.6
F49	20.0 ± 0.2	20.7 ± 0.3	18.9 ± 0.5	19.1 ± 0.5	18.7 ± 0.5
E50	13.9 ± 0.1	14.8 ± 0.6	13.6 ± 0.2	13.7 ± 0.2	13.4 ± 0.4
I51	14.7 ± 0.2	15.5 ± 0.4	15.2 ± 0.1	15.0 ± 0.3	14.9 ± 0.3
V52	15.1 ± 0.2	16.0 ± 0.4	15.6 ± 0.1	15.8 ± 0.1	15.6 ± 0.4
E53	16.3 ± 0.2	17.1 ± 0.3	17.7 ± 0.2	17.2 ± 0.1	17.0 ± 0.4
G54	16.6 ± 0.3	17.0 ± 0.1	16.7 ± 0.3	16.6 ± 0.2	16.4 ± 0.4
N55	14.6 ± 0.4	15.5 ± 0.4	15.0 ± 0.4	15.3 ± 0.2	15.0 ± 0.1
R56	25.4 ± 1.2	24.1 ± 1.0	25.6 ± 1.9	24.6 ± 0.8	24.1 ± 1.0
G57	10.9 ± 0.1	11.0 ± 0.2	11.1 ± 0.3	11.9 ± 0.2	11.4 ± 0.4
Q59	14.3 ± 0.3	14.8 ± 0.2	15.1 ± 0.2	15.3 ± 0.4	15.5 ± 0.2
A60	13.0 ± 0.2	13.3 ± 0.4	13.0 ± 0.2	13.1 ± 0.2	12.9 ± 0.1
A61	13.0 ± 0.2	13.3 ± 0.4	13.3 ± 0.1	13.1 ± 0.3	12.8 ± 0.2
N62	15.4 ± 0.3	16.3 ± 0.7	16.0 ± 0.2	15.7 ± 0.2	15.6 ± 0.2
V63	18.0 ± 0.4	18.3 ± 0.3	17.8 ± 0.2	17.4 ± 0.2	17.4 ± 0.5
T64	22.8 ± 0.5	23.2 ± 0.8	22.8 ± 0.2	21.7 ± 0.6	20.5 ± 0.4
A65	12.4 ± 0.2	12.4 ± 0.4	11.9 ± 0.2	11.9 ± 0.1	11.9 ± 0.3
E66	11.6 ± 0.2	12.2 ± 0.3	11.5 ± 0.1	11.7 ± 0.2	11.5 ± 0.3
A67	4.7 ± 0.1	5.0 ± 0.1	4.5 ± 0.2	5.6 ± 0.3	6.0 ± 0.4

## 10. EIGENE PUBLIKATIONEN

- Steggborn, C., Schneider-Hassloff, H., Zeeb, M. & Balbach, J. (2000). Cooperativity of a protein folding reaction probed at multiple chain positions by real-time 2D NMR spectroscopy, *Biochemistry*, **39**, 7910-7919.
- Zeeb, M. & Balbach, J. (2001). DNA binding and micro-viscosity effects on the folding of CspB, *Nova Acta Leopoldina Suppl.*, **16**, 57-58.
- Zeeb, M., Rösner, H., Zeslawski, W., Canet, D., Holak, T.A. & Balbach, J. (2002). Protein folding and stability of human CDK inhibitor p19<sup>INK4d</sup>, *J. Mol. Biol.*, **315**, 447-457.
- Zeeb, M. & Balbach, J. (2003) Single-stranded DNA binding of the cold shock protein CspB from *Bacillus subtilis*: NMR mapping and mutational characterization, *Protein Sci.*, **12**, 112-123.
- Zeeb, M., Jacob, M.H., Schindler, T. & Balbach, J. (2003) <sup>15</sup>N relaxation study of the cold shock protein CspB under various solvent viscosities. *J. biomol. NMR*, **27**, 221-234.
- Zeeb, M., Lipps, G. & Balbach, J. (2004) Folding and association of an extremely stable dimeric protein from *Sulfolobus islandicus*. *J. Mol. Biol.*, **336**, 227-240.
- Zeeb, M. & Balbach, J. (2003) Millisecond protein folding studied by NMR spectroscopy, *Protein and Peptide Letters*, im Druck.
- Zeeb, M. & Balbach, J. (2004) Protein folding studied by real-time NMR spectroscopy, *Methods*, im Druck.
- Zeeb, M. & Balbach, J. (2003) Kinetic studies of protein folding using NMR spectroscopy, in: 'Handbook of protein folding' (T. Kiefhaber, J. Buchner, eds.), Wiley-VCH, Weinheim, im Druck.
- Bienert, R., Zeeb, M., Magg, C., Dostál, L., Feske, A., Max, K., Welfle, H. Balbach, J. & Heinemann, U. (2004) Single-stranded DNA bound to bacterial cold-shock proteins: Preliminary crystallographic and Raman analysis. *Acta Crystallogr. D*, eingereicht.

## 11. DANKSAGUNG

Diese Arbeit wurde von April 2000 bis Februar 2004 im Laboratorium für Biochemie der Universität Bayreuth unter der Leitung von PD Dr. Jochen Balbach angefertigt. Bei ihm möchte mich sehr herzlich für die spannenden Themen und die hervorragende Betreuung und Unterstützung sowie dem steten Interesse am Fortgang dieser Arbeit bedanken. Ebenso möchte ich mich bei Prof. Franz X. Schmid für zahlreiche Diskussionen und sein Interesse an dieser Arbeit bedanken.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinen Laborkollegen Barbara Eckert, Maria del Mar Garcia-Mira, Maik Jacob, Insa Kather, Christine Magg, Raimund Maier, Andreas Martin, Dieter Perl, Michael Rape, Christian Scholz, Michael Seewald und Michael Wunderlich für die freundliche und angenehme Arbeitsatmosphäre und deren Hilfsbereitschaft, die viel zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Ein Dankeschön auch an die Diplomanden Franz Hagn, Sophia Hartung, Tobias Haslberger, Christian Löw, Heike Rösner und Uli Weininger für die wertvolle Mitarbeit.

Mein Dank für die sehr gute Zusammenarbeit und die vielen Diskussionen gilt auch den Kooperationspartnern Prof. Udo Heinemann und Dr. Ralf Bienert (Max Delbrück Centrum, Berlin), Dr. Tad Holak und Dr. Wojciech Zeslawski (MPI für Biochemie, Martinsried), Prof. Heinrich Sticht (Universität Erlangen), Dr. Georg Lipps (Universität Bayreuth), Prof. Alexandre M. J. J. Bonvin (Universität Utrecht, Niederlande), Dr. Denis Canet (Oxford Center for Molecular Sciences, Oxford, U.K.), Dr. Hauke Lilie (Universität Halle-Wittenberg) sowie Dr. Christian Scholz (Roche Diagnostics, Penzberg)

Vielen Dank auch an Prof. Paul Rösch (Universität Bayreuth), Prof. Christopher M. Dobson (Oxford Center for Molecular Sciences, Oxford, U.K.), Dr. Nico A. J. van Nuland und Dr. Rainer Wechselberger (SON NMRLSF, Universität Utrecht, Niederlande) für die Messzeit an den NMR-Spektrometern, ohne die viele Ergebnisse dieser Arbeit nicht möglich gewesen wären.

Ein Dankeschön an Dr. Kristian Schweimer (AG Prof. Paul Rösch) für so manche NMR-Unterhaltung und die großzügige Messzeitvergabe sowie an Ralf Schubert (AG Prof. Carlo Unverzagt, Universität Bayreuth) für die unkomplizierte Verwaltung der Messzeit am DRX500 und die Überlassung zahlreicher Messtage sowie für diverse Destillationen deuterierter Lösungsmittel.

Ganz besonders möchte ich mich bei Nicole für die guten Nerven und ihre Unterstützung bedanken. Vielen Dank auch an meine Mutter für die moralische und finanzielle Unterstützung meines Studiums.

Der DFG möchte ich für die finanzielle Unterstützung während meiner Promotion danken.



## **12. ERKLÄRUNG**

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ferner erkläre ich, dass ich nicht anderweitig oder ohne Erfolg versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder mich der Doktorprüfung zu unterziehen.

Bayreuth, am 11. Februar 2004