

**Regulation der Transkription: Struktur, Dynamik  
und Wechselwirkungen der carboxyterminalen  
Domäne von *E.coli* NusA**

Dissertation

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

vorgelegt von

Dipl. Biochem.

Anke Eisenmann

Bayreuth 2005



## Inhaltsverzeichnis

Kapitel 1. Einleitung	9
1.1. Transkription und Transkriptionskontrolle	9
1.1.1. Die RNA Polymerasen	9
1.1.2. Der Transkriptionszyklus in Prokaryoten	11
1.1.3. Struktur des TECs	14
1.2. Elongation versus Termination	16
1.2.1. Elongation	16
1.2.2. $\rho$ -abhängige Termination	17
1.2.3. Faktorunabhängige Termination	18
1.2.4. Der Elongationsfaktor NusA	19
1.2.5. Das Protein N aus dem Phagen $\lambda$	22
1.3. Ziele der Arbeit	26
1.3.1. Bestimmung der Struktur der carboxyterminalen Domäne von <i>E.coli</i> NusA	26
1.3.2. Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen NusA, der RNAP und dem $\lambda$ N-Protein	26
Kapitel 2. Material & Methoden	27
2.1. Allgemeines zur NMR-Spektroskopie	27
2.1.1. NMR-Proben	27
2.1.1.1. Proteingewinnung	27
2.1.1.2. Konzentrationsbestimmung	28
2.1.1.3. Standard-Probenbedingungen	28
2.1.2. Aufnahme der Spektren	28
2.1.3. Prozessierung der Spektren	29
2.2. Strukturbestimmung	29
2.2.1. NMR-Spektroskopie	29
2.2.1.1. Theorie	29
2.2.1.2. Experimente	31

2.2.2.	Analyse der chemischen Verschiebungen	31
2.2.3.	Abstandsbeschränkungen aus NOESY-Spektren	31
2.2.4.	Wasserstoffbrücken aus H/D-Austauschexperimenten	36
2.2.5.	Diederwinkel aus Kopplungskonstanten	37
2.2.5.1.	Theorie	37
2.2.5.2.	Experimentelle Bestimmung	37
2.2.6.	Globale Beschränkungen aus dipolaren Restkopplungen	38
2.2.6.1.	Theorie	38
2.2.6.2.	Experimentelle Bestimmung	39
2.2.6.3.	Bestimmung der Axial- und Radialkomponente des Orientierungstensors	40
2.3.	Strukturberechnung	41
2.3.1.	Das Kraftfeld	42
2.3.2.	Molekulardynamik-Simulationen	46
2.3.2.1.	Erstellung der Startstruktur	46
2.3.2.2.	Simulated annealing I	46
2.3.2.3.	Simulated annealing II	46
2.3.3.	Analyse der Strukturen	46
2.4.	Dynamik: Experimente und Analysen	47
2.4.1.	Hydrodynamische Radien aus der Translationsdiffusion	47
2.4.2.	Dynamik aus $^{15}\text{N}$ -Relaxationsdaten	48
2.4.2.1.	NMR-Proben	48
2.4.2.2.	NMR-Experimente	48
2.4.2.3.	Bestimmung der transversalen und longitudinalen Relaxationsraten	49
2.4.2.4.	Bestimmung des $\{^1\text{H}\}$ - $^{15}\text{N}$ heteronuklearen NOEs	50
2.4.2.5.	Theorie	50
2.4.2.6.	Interpretation mit der RSDM-Methode	51
2.4.2.7.	Berechnung der Diffusionstensoren aus den $\frac{R_2}{R_1}$ -Verhältnissen	52
2.4.2.8.	Auswahl des Diffusionsmodells	55
2.4.2.9.	Hydrodynamische Modelle	57
2.4.2.10.	Interdomänendynamik mit dem erweiterten modellfreien Ansatz	57
2.4.3.	NMR-Titrationsen	59
2.4.3.1.	Experimente	59
2.4.3.2.	Auswertung der Titrationsexperimente	59
Kapitel 3.	Ergebnisse	63

3.1. Strukturbestimmung der carboxyterminalen Domäne von <i>E.coli</i> NusA	63
3.1.1. Charakterisierung des Systems	65
3.1.2. Zuordnung der Resonanzen	71
3.1.3. Sekundärstruktur von NusACTD(339–495)	73
3.1.3.1. Der chemische Verschiebungsindex	73
3.1.3.2. Wasserstoffbrücken aus H/D–Austausch–Experimenten	73
3.1.3.3. Diederwinkel aus skalaren Kopplungskonstanten	73
3.1.3.4. Zusammenfassung der sekundärstrukturspezifischen Daten	75
3.1.4. Flexible Bereiche und Domänengrenzen aus <sup>15</sup> N–Relaxationsdaten	77
3.1.5. Abstandsbeschränkungen aus NOESY–Experimenten	80
3.1.6. Globale Beschränkungen aus dipolaren Restkopplungen	84
3.1.7. Berechnung der Tertiärstruktur	84
3.2. Struktur und Dynamik von NusACTD(339–495)	89
3.2.1. Tertiärstruktur	89
3.2.2. Vergleich von AR1 und AR2	89
3.2.3. Oligomerezustand von NusACTD(339–495)	93
3.2.4. Dynamik von NusACTD(339–495) aus <sup>15</sup> N–Relaxationsdaten	95
3.2.4.1. Analyse der Rohdaten	96
3.2.4.2. Reste mit interner Flexibilität	96
3.2.4.3. Rotationsdiffusion der beiden Domänen	99
3.2.4.4. Amplitude und Zeitskala der Domänenbewegung	103
3.2.5. Amplitude der relativen Domänenbewegung aus dipolaren Kopplungen	104
3.3. Charakterisierung der Komplexe von NusACTD mit $\lambda$ N und $\alpha$ CTD	106
3.3.1. Wechselwirkung von $\lambda$ N mit NusACTD	106
3.3.2. Wechselwirkung von $\alpha$ CTD mit NusACTD	111
Kapitel 4. Diskussion	115
4.1. Analyse der Sequenz, Struktur und Funktion von NusACTD	115
4.1.1. Die modifizierten HhH–Motive von AR1 und AR2 unterscheiden sich strukturell kaum von klassischen HhH–Motiven	115
4.1.2. AR1 und AR2 stellen Module für Protein–Protein Wechselwirkungen dar	117
4.1.3. Homologe NusACTD–Sequenzen weisen auf mögliche Interaktionsflächen hin	119
4.1.4. Der Vergleich der Strukturen von NusACTD und NusACTD · $\lambda$ N ermöglicht Einsichten in die Erkennung durch (HhH) <sub>2</sub> –Faltungen	121
4.2. Biologische Implikationen der Struktur und Dynamik von NusACTD	124

4.2.1.	AR2 entspricht der autoinhibitorischen Funktion von NusA	124
4.2.2.	Bindet $\lambda$ N an AR2?	125
4.2.3.	NusACTD stabilisiert den Terminations- und Antiterminationskomplex	126
Kapitel 5.	Zusammenfassung	129
Kapitel 6.	Summary	131
	Literaturverzeichnis	133
Anhang A.	Abkürzungsverzeichnis	153
Anhang B.	Rohdaten	155
B.0.4.	Skalare $^3J(H^N H^\alpha)$ -Kopplungen	155
B.0.5.	Dipolare Restkopplungen	155
B.0.6.	Wasserstoffbrücken	157
B.0.7.	$^{15}N$ -Relaxationsdaten	158
B.0.7.1.	600 MHz (Probe 1)	158
B.0.7.2.	400 MHz (Probe 2)	160
B.0.7.3.	600 MHz (Probe 2)	161
Anhang C.	Strukturberechnung	165
C.1.	Chemische Verschiebungen für NusACTD	165
C.2.	XPLOR-Protokolle für die Strukturberechnung von NusA(351-426) und NusA(426-495)	179
C.2.1.	Erzeugung der Strukturdatei – generate_structure.inp	180
C.2.2.	Erzeugung der Koordinatendatei – generate_template.inp	180
C.2.3.	Simulated Annealing I – sa.inp	182
C.2.4.	Simulated Annealing II – refine.inp	186
C.3.	Experimentelle Randbedingungen für NusA(351-426) und NusA(426-495)	192
C.3.1.	Randbedingungen für NusA(351-426)	192
C.3.1.1.	Abstandsbeschränkungen aus NOESY-Spektren	192
C.3.1.2.	Beschränkung der Diederwinkel aus skalaren Kopplungen	200
C.3.1.3.	Abstandsbeschränkungen aus H/D-Austauschexperimenten	200
C.3.1.4.	Beschränkungen aus dipolaren Restkopplungen	201
C.3.2.	Randbedingungen für NusA(426-495)	201
C.3.2.1.	Abstandsbeschränkungen aus NOESY-Experimenten	201
C.3.2.2.	Beschränkung der Diederwinkel aus skalaren Kopplungen	208

C.3.2.3.	Abstandsbeschränkungen aus H/D–Austauschexperimenten	208
C.3.2.4.	Beschränkungen aus dipolaren Restkopplungen	209
Anhang D.	Danksagung	211
Anhang E.	Erklärung	213





## KAPITEL 1

### Einleitung

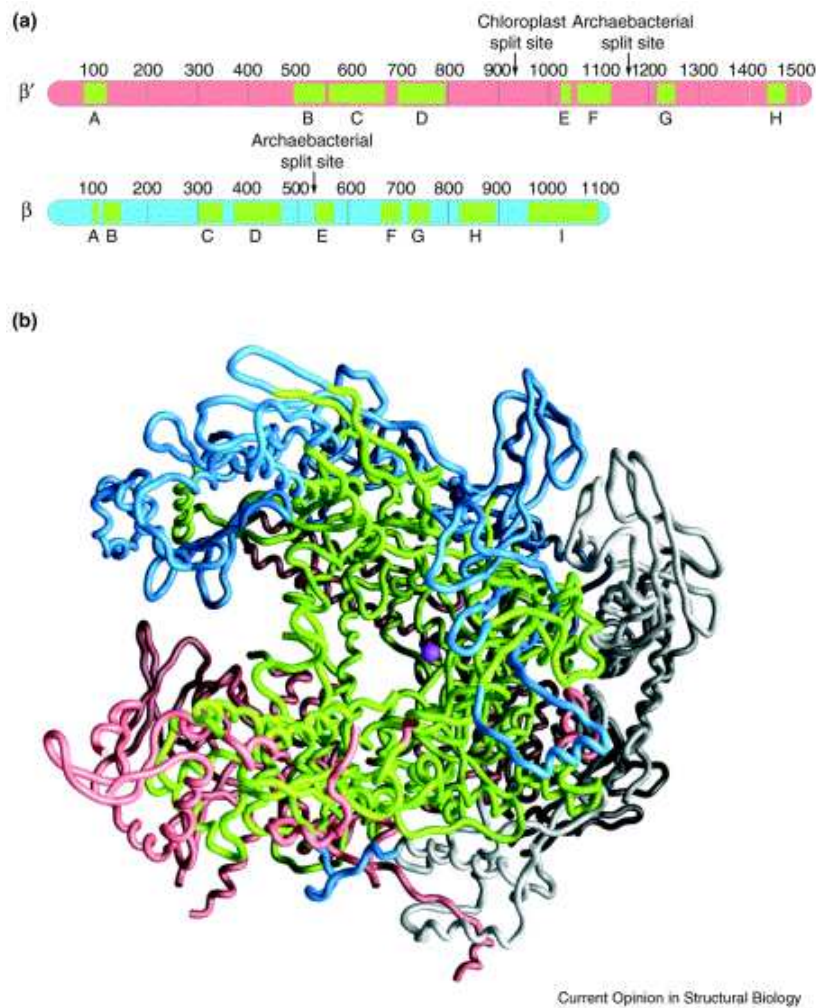
Das menschliche Genom besteht schätzungsweise aus 30.000 bis 40.000 Genen (Voet und Voet, 1995, Kapitel 33). Dabei dürfen in jeder Zelle nur diejenigen Gene abgelesen werden, deren Genprodukt für die Funktion der Zelle gerade benötigt wird. Das Ablesen der Geninformation, die Transkription mit Hilfe von DNA-abhängigen RNA Polymerasen (RNAPs), ist deshalb ein sorgfältig regulierter Prozess. Die Kontrolle erfolgt sowohl am Beginn, der Initiation, als auch während Transkription, der Elongation (Gollnick und Babitzke, 2002). Während bisher hauptsächlich die Kontrolle der Initiation untersucht wurde, zeigt die Forschung der letzten Jahre die Schlüsselrolle der Elongationsregulation in Krankheiten wie Krebs oder AIDS (Conaway und Conaway, 1999) auf.

Einen besonders wichtigen Kontrollpunkt der Elongation stellen DNA-Sequenzen dar, an denen die RNAP die Transkription abbrechen kann. In dem Enterobakterium *Escherichia coli* (*E.coli*), das ein Modellorganismus der Transkriptionsforschung ist, wird die Entscheidung *Elongation versus Termination* maßgeblich durch das NusA-Protein beeinflusst. Während NusA bei Bindung an die RNAP die Termination verstärkt, führt zum Beispiel die zusätzliche Interaktion mit dem viralen N-Protein aus dem Phagen  $\lambda$  ( $\lambda$ N) zu einem verstärkten Überlesen des Terminationsignals, ein Prozeß der als Antitermination bezeichnet wird.

Im folgenden soll kurz eine Übersicht über die RNAPs, den Transkriptionszyklus und die Regulation der Elongation beziehungsweise Termination unter besonderer Berücksichtigung des NusA- und  $\lambda$ N-Proteins gegeben werden. Unter 1.3 sind die sich aus dem Stand der Forschung ergebenden Ziele der Arbeit zusammengefaßt.

#### 1.1. Transkription und Transkriptionskontrolle

**1.1.1. Die RNA Polymerasen.** Zelluläre RNAPs sind Enzymkomplexe, die je nach Organismus aus 5–15 Untereinheiten bestehen. Als Prototyp der RNAPs gilt das bakterielle Enzym, da es lediglich fünf Untereinheiten benötigt, um die Synthese von RNA an der DNA-Matrize zu katalysieren. Wegen der teilweisen Sequenzhomologie der bakteriellen Untereinheiten  $\alpha_2\beta\beta'\omega$



**Abbildung 1.1:** Zelluläre RNA Polymerasen besitzen einen strukturell konservierten Kernbereich.

Die zellulären RNAPs von Prokaryoten, Chloroplasten, Archaeobakterien und Eukaryoten besitzen homologe Sequenzabschnitte, die einen strukturell konservierten *core*-Bereich bilden. A) Schematische Darstellung der  $\beta'$ - und  $\beta$ -Untereinheiten (rosa beziehungsweise blauer Balken). Die Pfeile symbolisieren die Trennung von  $\beta'$  und  $\beta$ -Untereinheiten in einzelne Peptide, wie sie in Chloroplasten und Archaeobakterien auftreten. Die evolutionär konservierten Segmente von  $\beta$  (Sweetser *et al.*, 1987) und  $\beta'$  (Jokerst *et al.*, 1989) sind in alphabetischer Reihenfolge beschriftet (A–H für  $\beta'$ , A–I für  $\beta$ ) und hellgrün markiert. B) Struktur der *T. aquaticus* core RNAP. Das Rückgrat der  $\beta'$ - und  $\beta$ -Untereinheiten ist bis auf die konservierten Segmente, die in hellgrün dargestellt sind, rosa und blau eingefärbt, die  $\alpha$ -Monomere und die  $\omega$ -Untereinheit sind in weiß gezeichnet. Das katalytische  $Mg^{2+}$ -Ion wird durch eine magentafarbene Kugel repräsentiert. (aus Darst (2001))

zu eukaryotischen RNAPs sowie RNAPs aus Archaeobakterien, werden die  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\beta'$ - und  $\omega$ -Untereinheiten auch als *core* RNAP bezeichnet (zusammengefaßt in Cramer (2002)). Mit der Aufklärung der Kristallstrukturen einer bakteriellen RNAP aus *Thermus aquaticus* (*T.aquaticus*) (Zhang *et al.*, 1999; Campbell *et al.*, 2001) und einer eukaryotischen RNAP II aus *Saccharomyces cerevisiae* (Cramer *et al.*, 2001, 2000; Gnatt *et al.*, 2001) konnte außerdem die strukturelle Ähnlichkeit der hochkonservierten Segmente um das aktive Zentrum der bakteriellen und eukaryotischen RNAPs bestätigt werden (Abb. 1.1; zusammengefaßt in Murakami und Darst (2003); Darst (2001); Cramer (2002)). Aus der Kristallstruktur einer eukaryotischen RNAP II im Elongationszustand mit RNA und DNA ist seit kurzem auch die Lage der Nukleinsäuren in dem Transkriptionskomplex bekannt (Kettenberger *et al.*, 2004).

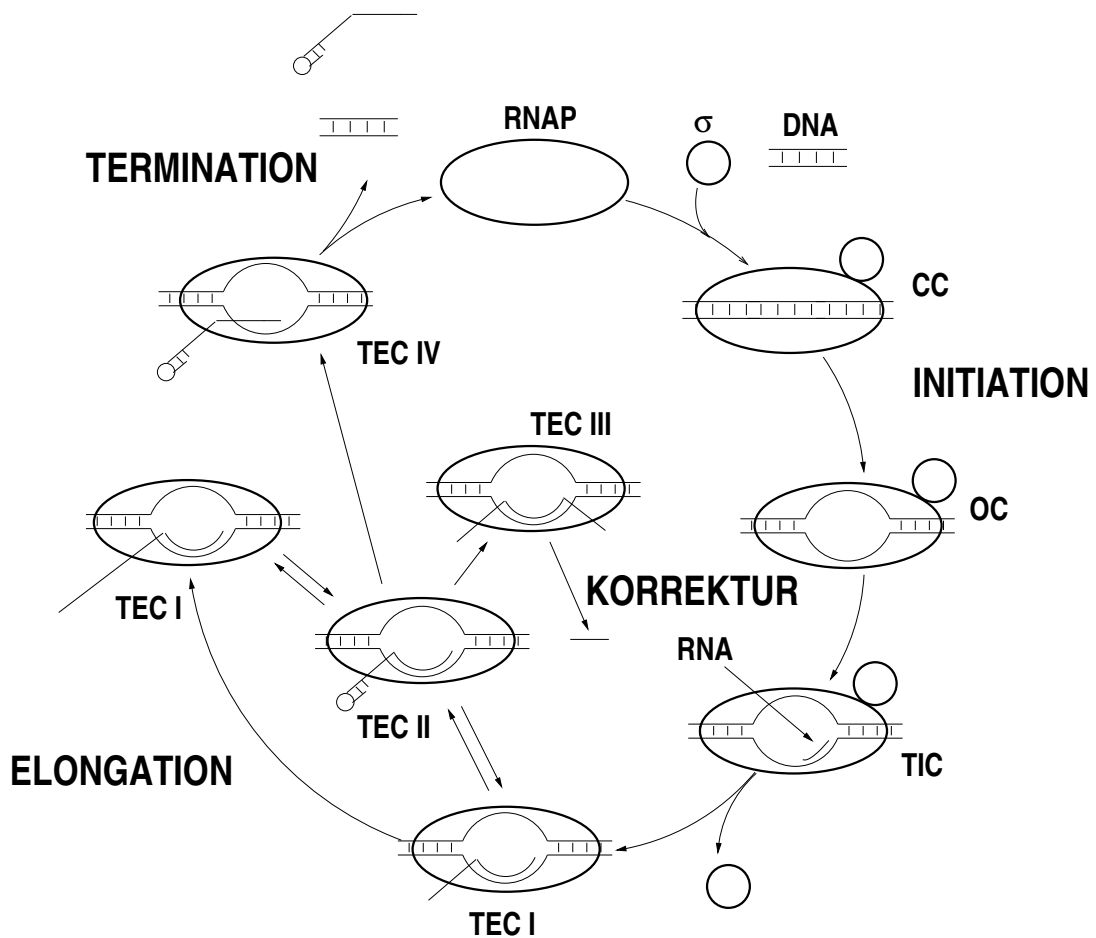
Die beiden größten Untereinheiten  $\beta$  und  $\beta'$  sind für die Katalyse der Polymerisation verantwortlich. Mit Hilfe eines katalytischen  $Mg^{2+}$ -Ions synthetisieren sie die Phosphodiesterbindung zwischen dem freien 3'-OH der bereits vorhandenen RNA-Kette und dem nächsten mit der DNA-Matrize basengepaarten Ribonukleotid (Sosunov *et al.*, 2003).

Für den Zusammenhalt der  $\beta'$  beziehungsweise  $\beta$ -Untereinheit sorgt das  $\alpha$ -Dimer, das aus einer aminoterminalen und einer carboxyterminalen Domäne besteht. Während die Dimerisierung hauptsächlich über die aminoterminalen Domäne erfolgt, ist die carboxyterminale Domäne für Wechselwirkungen mit regulatorischen Proteinen und DNA-Elementen verantwortlich (zusammengefaßt in Ebright und Busby (1995); Rhodius und Busby (1998)).

Die *E.coli*  $\omega$ -Untereinheit ist nicht essentiell für das Überleben der Bakterienzellen, sie erleichtert aber vermutlich die Assemblierung der RNAP *in vitro* (Severinov, 2000). In *T.aquaticus* verbindet die  $\omega$ -Untereinheit die  $\beta'$ -Untereinheit mit dem  $\alpha_2\beta$ -Teil (Borukhov und Severinov, 2002), eine Aufgabe, die in *E.coli* von dem carboxyterminalen Bereich der  $\beta'$ -Untereinheit übernommen wird.

**1.1.2. Der Transkriptionszyklus in Prokaryoten.** Der Transkriptionszyklus kann in die Phasen der Initiation, Elongation und Termination eingeteilt werden. Eine Übersicht über die wichtigsten Schritte der Transkription und bekannte Intermediate des Transkriptionszyklus ist in Abb. 1.2 dargestellt (von Hippel, 1998; von Hippel und Pashan, 2002; Mooney *et al.*, 1998; Erie, 2002).

Obwohl das *core*-Enzym die Synthese der RNA ausführen kann, benötigt es für die Initiation einen zusätzlichen Faktor  $\sigma$ , mit dem es das sogenannte Holoenzym bildet (zusammengefaßt in Borukhov und Nudler (2003)). Schlüsselaufgaben der Initiation sind die Promotorerkennung,



**Abbildung 1.2:** Der Transkriptionszyklus.

Der Zyklus beginnt mit der Initiation, deren Aufgabe zunächst die Promotorerkennung sowie die Bildung des geschlossenen (CC) und offenen Komplexes (OC) umfaßt. Nach dem Einbau der ersten 8–9 Nukleotide durch den nicht prozessiven initialen Transkriptionskomplex (TIC), verläßt die RNAP den Promotorbereich und geht in den stabileren Transkriptionselongationskomplex (TEC) über. Der  $\sigma$ -Faktor wird nur für die Initiation benötigt, während die Elongation allein durch das *core*-Enzym erfolgen kann. Auch während der Elongation kann die RNAP verschiedene Zustände einnehmen, die im Text näher beschrieben sind. Die Elongation ist als Verlängerung der RNA zwischen zwei Elongationskomplexen (TEC I) dargestellt. Termination und Korrektur erfolgen wahrscheinlich über einen Zwischenzustand (TEC II), in dem die RNAP reversibel die Elongation verlangsamt oder angehalten hat.

das Aufschmelzen der DNA, der Beginn der RNA-Synthese und die Bildung des ternären Elongationskomplexes (TEC) aus DNA, RNA und RNAP, der für die Elongation verantwortlich ist. Die RNAP führt dabei größere Konformationsumwandlungen durch. Zunächst bildet das *core*-Enzym zusammen mit dem  $\sigma$ -Faktor und der DNA reversibel den sogenannten geschlossenen Komplex, der zum offenen Komplex isomerisieren kann. Im offenen Komplex ist ein ungefähr 12 Basenpaare umfassendes Stück DNA, inklusive der Startstelle der Transkription aufgeschmolzen, so daß der offene Komplex in der Lage ist, mit der RNA-Synthese zu beginnen. Durch weitere Konformationsänderungen, Ablösen des  $\sigma$ -Faktors und Verlassen des Promotorbereichs wird aus dem initialen Elongationskomplex, der noch zu instabil ist, um längere RNA-Stücke synthetisieren zu können, der TEC.

Die bemerkenswerteste Eigenschaft des TECs ist seine Prozessivität, das heißt, seine Fähigkeit das jeweilige Transkript ohne Dissoziation von der DNA oder RNA zu synthetisieren. So ist die eukaryotische RNAP II in der Lage, ein zwei Millionen Nukleotide umfassendes Vorläufertranskript des Dystrophins in einer einzigen Reaktion herzustellen (Tennyson *et al.*, 1995). Die meisten TECs sind sogar unter Hochsalzbedingungen wie 1 M KCl oder bei Temperaturen um 65° C stabil gegenüber Dissoziation (Mooney *et al.*, 1998). Trotz der Stabilität erfolgt die RNA-Synthese scheinbar ohne Affinität zur DNA mit einer Geschwindigkeit von 60–80 Nukleotiden pro Sekunde (Gotta *et al.*, 1991; Vogel und Jensen, 1994).

Analog zu den verschiedenen Initiationskomplexen, ist auch der TEC dynamisch und kann eine Reihe von Zuständen oder Konformationen mit unterschiedlichen Funktionen einnehmen (Mooney *et al.*, 1998; Erie, 2002). In Abb. 1.2 sind neben dem elongationskompetenten TEC (TEC I) drei weitere Intermediate, TEC II–TEC IV, dargestellt, die eine Rolle bei der Regulation der RNAP, der Korrektur falsch eingebauter Basen oder der Termination spielen. Ein wichtiges Intermediat sowohl des Korrektur- als auch des Terminationswegs scheint ein reversibel gestoppter TEC (TEC II) zu sein (Yin *et al.*, 1999). TEC III repräsentiert einen Zustand, der beim Rückwärtslaufen der RNAP auf der Matrize entsteht. Durch Aktivierung der schwachen Exo- beziehungsweise Endonukleaseaktivität der RNAP in einer solchen zurückgesetzten Konformation kann ein neues 3'-Ende des Transkripts generiert und unter Umständen eine Korrektur falsch eingebauter Nukleotide vorgenommen werden (Sosunov *et al.*, 2003).

Im Gegensatz zur Elongation kann die Termination nur an bestimmten Stellen der DNA-Matrize, an sogenannten Terminatoren, erfolgen. Bei der Termination kommt es zur irreversiblen Dissoziation des TECs in RNAP, DNA und RNA-Transkript. Ob die Termination über weitere

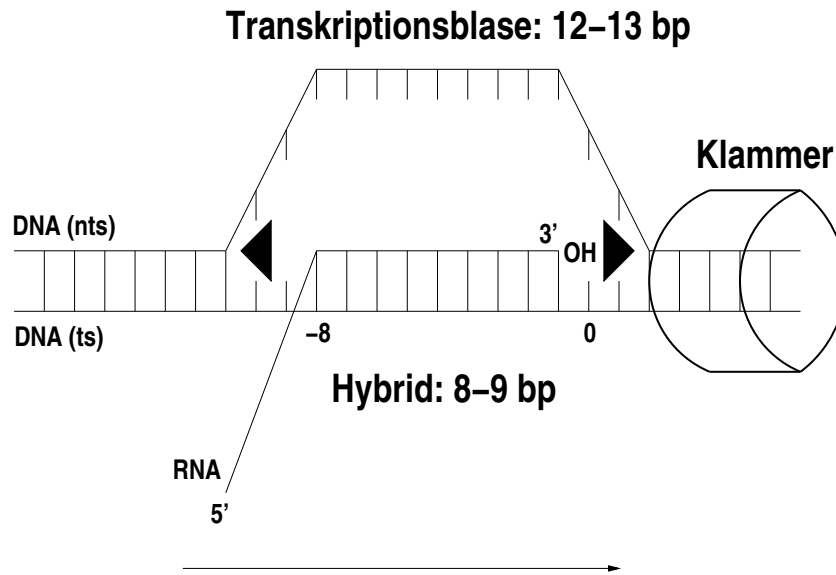
Zwischenzustände (TEC IV) erfolgt (Yarnell und Roberts, 1999), ist noch ungeklärt. *In vitro*-Experimente zeigen, daß die Termination ohne zusätzliche Faktoren in der Regel mit einer Terminationseffizienz zwischen 10% und 90% stattfindet (von Hippel und Pasman, 2002). Dies bedeutet, daß ein gewisser Anteil der TECs in der Lage ist, Terminatoren zu überlesen.

Entsprechend dem Schwerpunkt der Arbeit soll im folgenden die Struktur des TECs (s. 1.1.3) und seine Regulation bei der Elongation beziehungsweise Termination in Prokaryoten (s. 1.2) detaillierter vorgestellt werden.

**1.1.3. Struktur des TECs.** Auf der Basis der Kristallstrukturen unterschiedlicher bakterieller RNAPs (Zhang *et al.*, 1999; Darst, 2001) sowie von Elongationskomplexen in Hefe (Gnatt *et al.*, 2001; Cramer *et al.*, 2001; Kettenberger *et al.*, 2004) und Kreuzvernetzungs-Daten (Nudler *et al.*, 1998; Korzheva und Mustaev, 2001) konnte ein Struktur-Funktionsmodell des TECs erstellt werden (Darst, 2001). Die Konserviertheit struktureller Eigenschaften des Kernbereichs in zellulären RNAPs erlaubt hierbei die Übertragung von Daten zwischen eukaryotischen und bakteriellen TECs. Strukturelle und biochemische Daten geben unter anderem Hinweise auf die Frage, wie der TEC Prozessivität erhält (Abb. 1.3) (Sidorenkov *et al.*, 1998; Nudler, 1999; Nudler und Gottesman, 2002; Korzheva und Mustaev, 2001; Kettenberger *et al.*, 2004).

Die Stabilität des TECs beruht sowohl auf Wechselwirkungen zwischen DNA und RNA im DNA-RNA-Hybrid, als auch zwischen DNA, RNA und der RNAP. Dabei kompensiert das DNA-RNA-Hybrid teilweise den destabilisierenden Beitrag der Transkriptionsblase zur freien Energie. Zusätzliche Wechselwirkungen zwischen Nukleinsäuren und der RNAP vor allem im Bereich der stromabwärts gelegenen doppelsträngigen DNA (Positionen +3 bis +9), des aktiven Zentrums (Positionen 0 und -1) und der RNA stromaufwärts des RNA-DNA-Hybrids (Positionen -8 bis -10) führen zu einer für die Komplexbildung günstigen Gesamtenergie. Allerdings ist im wesentlichen noch unverstanden, wie sich die gesamte freie Energie der Bindung auf die einzelnen Wechselwirkungen aufteilt (von Hippel und Pasman, 2002).

Neben stabilisierenden Wechselwirkungen bietet die RNAP ein Gerüst, das den Verlauf der Nukleinsäuren durch die RNAP festlegt. Stromabwärts der Transkriptionsblase werden circa 7 Basenpaare der doppelsträngigen DNA über die aminoterminalen Reste der  $\beta$ -Untereinheit sowie die carboxyterminalen Reste der  $\beta'$ -Untereinheit gebunden. Die  $\beta$ - und  $\beta'$ -Untereinheiten legen sich wie eine Klammer um den DNA-Doppelstrang und bieten ein Modell dafür, wie sich laterale Beweglichkeit und Stabilität vereinbaren lassen. Kurz vor dem aktiven Zentrum wird der DNA-Doppelstrang durch die Separatorschleife ( $\beta D$  loop 1) (Gnatt *et al.*, 2001) in den Matrizenstrang



**Abbildung 1.3:** Strukturelle Eigenschaften des TECs.

Der TEC besteht aus fünf Teilen: die stromabwärts beziehungsweise stromaufwärts liegende doppelsträngige DNA, das RNA–DNA–Hybrid und die einzelsträngige DNA in der Transkriptionsblase, sowie die naszierende einzelsträngige RNA. Die stromabwärts der Transkriptionsblase liegende doppelsträngige DNA wird durch die  $\beta$ - und  $\beta'$ -Untereinheiten der RNAP gebunden, die sich wie eine Klammer um die DNA legen. Die Klammerstruktur könnte eine Erklärung dafür bieten, wie die RNAP Prozessivität und laterale Beweglichkeit vereinbaren kann.

Die Transkriptionsblase besteht aus circa 12–13 Basenpaaren und wird durch den vorderen und hinteren Separator (schwarze Dreiecke) auf einer konstanten Länge gehalten. Neben den Wechselwirkungen von RNA und DNA im RNA–DNA–Hybrid tragen vor allem die Kontakte zwischen RNAP und Nukleinsäuren im Bereich der Separatoren und der Klammer zur Stabilität des TECs bei. Der Pfeil zeigt die Transkriptionsrichtung an. (nts: kodierender Strang; ts: Matrizenstrang)

und den kodierenden Strang getrennt. Während der kodierende Strang keine wesentlichen Wechselwirkungen mit der RNAP einzugehen scheint, wird der Matrizenstrang im Bereich des aktiven Zentrums und stromaufwärts der Transkriptionsblase fixiert.

Die RNA interagiert im Bereich des RNA–Ausgangs mit der aminoterminalen Region von  $\beta'$  und der carboxyterminalen Region von  $\beta$  (Nudler *et al.*, 1998; Korzheva *et al.*, 2000). Diese Wechselwirkungen scheinen jedoch nicht wesentlich zur Stabilität des TECs beizutragen (Korzheva und Mustaev, 2001). Die doppelsträngige DNA stromaufwärts der Transkriptionsblase konnte

bisher in den Kristallstrukturen nicht beobachtet werden. Es ist daher davon auszugehen, daß sie keine entscheidenden Wechselwirkungen mit der RNAP ausbildet (Kettenberger *et al.*, 2004).

Die Aufrechterhaltung der Transkriptionsblase stromaufwärts des DNA–RNA–Hybrids erfolgt über die sogenannten Deckel– und Reissverschluss–Schleifen (*lid* und *zipper*). Eine weitere Schleife, die als Ruder–Schleife (*rudder*) bezeichnet wird, sorgt für die Trennung des DNA–RNA–Hybrids (Cramer, 2002).

## 1.2. Elongation versus Termination

**1.2.1. Elongation.** Neuere Modelle der Elongation (Epshtein *et al.*, 2002; Sosunov *et al.*, 2003) gehen von einem Zwei–Schritt–Mechanismus aus, bei dem das 3'–Ende des RNA–Transkripts zwischen zwei Bindungsstellen am aktiven Zentrum, der Substrat– und Produktbindungsstelle, hin– und herwechselt. Zu Beginn des Zyklus befindet sich das 3'–Ende des Transkripts an der Produktbindungsstelle. Die Substratbindungsstelle ist dagegen mit einem rNTP besetzt, das über Watson–Crick–Basenpaarung an die DNA–Matrize bindet. Die anschließende Bildung des Phosphodiesters zwischen dem 3'–OH des Transkripts und dem  $\alpha$ –Phosphat des rNTPs führt zur Freisetzung von Pyrophosphat und zur Translokation der RNAP entlang der DNA–Matrize. Dabei wird die naszierende RNA von der Substratbindungsstelle abgelöst und die RNAP in einen Gleitmodus versetzt, in dem sie eindimensional auf der DNA–Matrize diffundiert, bis das neue 3'–Ende in der Produktbindungsstelle einrastet. Zusätzliche Stabilisierung in dieser Position erfährt die RNAP durch die Bindung des nächsten rNTP. Entscheidend für eine schnelle Elongationsreaktion scheint die optimale Positionierung der 3'–Hydroxylgruppe im aktiven Zentrum zu sein (Uptain *et al.*, 1997; Nudler *et al.*, 1997).

Die Elongationsreaktion dominiert die alternativen Reaktionen an den meisten Matrizenpositionen in Gegenwart von physiologischen rNTP–Konzentrationen (0.1–0.5 mM). rNTP–Mangel, DNA–Bindungsproteine und Wartesignale können jedoch ein Einrasten der gleitenden RNAP an der Produktbindungsstelle verhindern und zu alternativen Zuständen der RNAP führen, die zum Beispiel die Hydrolyse des Transkripts katalysieren können (von Hippel und Pasmán, 2002; Sosunov *et al.*, 2003; Mosrin–Huaman *et al.*, 2004). Terminatoren bewirken eine Destabilisierung des TECs und erlauben als zusätzliche Alternative die Dissoziation in RNAP, DNA und RNA–Transkript. Die Termination in Prokaryoten kann dabei  $\rho$ –abhängig oder  $\rho$ –unabhängig erfolgen.

**1.2.2.  $\rho$ –abhängige Termination.**  $\rho$ –abhängige Terminatoren sind zweigeteilt und bestehen auf DNA–Ebene aus einer Erkennungssequenz für den  $\rho$ –Faktor *rut* (*rut*:  $\rho$  utilization site) sowie einer *tsp*–Sequenz (*tsp*: transcription stop point) (Carlomagno und Nappo, 2001), an der



die Termination erfolgt. Beide Sequenzelemente sind schlecht konserviert, das Transkript der *rut*-Sequenz, RUT, zeichnet sich jedoch durch wenig Sekundärstrukturen und einen hohen C-Anteil aus. Der  $\rho$ -Faktor kann an die RUT-Sequenz binden und sich ATP-abhängig in 5'–3' Richtung auf dem Transkript bewegen. Trifft er auf die transkribierende RNAP, nutzt er seine Helikase-Aktivität um den TEC zu dissoziieren. *tsp*-Sequenzen sind bekannte Wartestellen, die die Elongationsgeschwindigkeit des TECs herabsetzen, so daß der  $\rho$ -Faktor den TEC schneller erreicht (zusammengefaßt in Richardson (2002, 2003)).

Die kürzlich gelöste Kristall-Struktur des  $\rho$ -Faktors (Skordalakes und Berger, 2003) gibt Hinweise auf den Mechanismus der  $\rho$ -abhängigen Termination (zusammengefaßt in Kaplan und O'Donnell (2003)). Der  $\rho$ -Faktor ist ein Hexamer, wobei sich die sechs Monomere zu einem Ring anordnen, der eine offene oder geschlossene Form annehmen kann (Yu *et al.*, 2000). Jedes Monomer besteht aus einer aminoterminalen RNA- und einer carboxyterminalen ATP-bindenden Domäne. Die sechs aminoterminalen Domänen bilden gemeinsam auf der Innenseite des Hexamer-Rings die Bindungsstelle für die RUT-Sequenz, wobei pro Monomer bevorzugt eine C–C–Dinukleotidsequenz gebunden wird.  $\rho$  beherbergt jedoch weitere RNA-Kontaktstellen in der ATP-bindenden Domäne, die für die Translokation und Helikaseaktivität von  $\rho$  verantwortlich sind. Die Anordnung der  $\rho$ -Monomere stellt dabei sicher, daß das 3'-Ende des Transkripts in das Innere des Hexamers zeigt. Der Kontakt der RNA mit den sekundären Bindungsstellen in den carboxyterminalen Domänen schließt den Hexamer-Ring und stimuliert die ATPase-Aktivität von  $\rho$ . Der Zyklus aus abwechselnder RNA-Bindung und ATP-Hydrolyse ermöglicht es dem  $\rho$ -Faktor sowohl sich auf der RNA fortzubewegen als auch den TEC zu dissoziieren.

Die Arbeitsweise des  $\rho$ -Faktors kann auch das Phänomen der polaren Mutationen erklären, das sich darin äußert, daß eine *nonsense*-Mutation in einem Gen der Transkriptionseinheit die Transkription der darauffolgenden Gene verhindert. In Prokaryoten sind Transkription und Translation von Strukturgenen gekoppelt, so daß in der Regel die RNA dicht mit Ribosomen bedeckt ist und der  $\rho$ -Faktor keinen Zugang zum naszierenden Transkript hat. *Nonsense*-Mutationen bewirken eine Dissoziation der Ribosomen vom Transkript und gewähren  $\rho$  Zugang zu RUT-Sequenzen stromabwärts der *nonsense*-Mutation. Die physiologische Bedeutung dieser intragenen  $\rho$ -abhängigen Terminatoren ist, die Transkription ineffizient translaterter Gene zu stoppen (Carlomagno und Nappo, 2001).

*In vivo* wird die Terminationseffizienz des  $\rho$ -Faktors wesentlich durch die allgemeinen Transkriptionsfaktoren der Nus-Familie beeinflusst. Während NusA und NusG direkt mit dem  $\rho$ -Faktor wechselwirken (Burns *et al.*, 1998), kann die Gegenwart von NusB die Termination an suboptimalen  $\rho$ -abhängigen Terminatoren (Carlomagno und Nappo, 2001) steigern.

**1.2.3. Faktorunabhängige Termination.** Faktorunabhängige Terminatoren zeichnen sich auf DNA-Ebene durch einen GC-reichen Sequenzabschnitt mit dyadischer Symmetrie und einer Oligo-T-Sequenz aus. Bei der Transkription bildet der GC-reiche Bereich eine Haarnadelstruktur, die von einer circa 8 Reste umfassenden U-Region am 3'-Ende gefolgt wird (d'Aubenton Carafa *et al.*, 1990). Beide Elemente sind nötig, um eine Termination herbeizuführen (Wilson und von Hippel, 1995; Komissarova *et al.*, 2002). Im folgenden sollen die Rollen der Haarnadel beziehungsweise der U-Region erörtert werden.

Systematische Untersuchungen an veränderten Terminationssignalen (Artsimovitch und Landick, 1998; Touloukhonov *et al.*, 2001) weisen darauf hin, daß die Haarnadel auf zweierlei Weise zur Termination beiträgt. Zum einen inhibiert die RNA-Haarnadel allosterisch die Nukleotidaddition am aktiven Zentrum, so daß die RNAP angehalten wird. Für die allosterische Wirkung der Haarnadel sind dabei spezifische Interaktionen mit der RNAP im Bereich der sogenannten *flap tip*-Helix verantwortlich. Strukturelle Daten zeigen, daß sich die *flap tip*-Helix an der Spitze der flexibel mit der RNAP verbundenen Klappen-Domäne (*flap domain*) befindet, die im TEC zusammen mit der Klammer-Domäne (*clamp domain*) die austretende RNA umschließt (Touloukhonov *et al.*, 2001). Neben dem RNA-Austrittskanal begrenzt diese Klammer-Domäne auch den DNA-Eintritts- und den DNA-RNA-Hybrid-Kanal und kontaktiert im Bereich des aktiven Zentrums über drei Schalter-Schleifen (*switches 1-3*) das RNA-DNA-Hybrid (Landick, 2001; Cramer *et al.*, 2001; Cramer, 2002). Ein teilweises Öffnen des RNA-Austrittskanals durch die sterisch anspruchsvolle Haarnadel könnte somit die beobachtete Veränderung der Lage des 3'-Endes des Transkripts (Touloukhonov *et al.*, 2001) und die dadurch verursachte Pause (Nudler *et al.*, 1997) erklären. Alternativ könnte die Haarnadel aber auch ein Öffnen der mobilen Klappendomäne bewirken, die über ein zweisträngiges  $\beta$ -Faltblatt mit Seitenketten von Resten im aktiven Zentrum verbunden ist (Touloukhonov *et al.*, 2001; Landick, 2001). Die Öffnung der Klappe könnte zudem die Wechselwirkung der RNA mit der Ruder-Schleife aufbrechen (Darst, 2001).

Ein zweiter Effekt einer Haarnadelstruktur ist die Trennung des RNA-DNA-Hybrids am 5'-Ende (Komissarova *et al.*, 2002). In Übereinstimmung mit der Ausdehnung des RNA-DNA-Hybrids im TEC (s. 1.1.3) führen Haarnadelstrukturen, deren Stamm maximal 8 Nukleotide vom

3'-Ende entfernt gebildet wird, zur Termination. Haarnadelstrukturen, deren Stamm sich bis maximal zur Position -11 relativ zum 3'-Ende des Transkripts erstreckt, sind zwar in der Lage die RNAP anzuhalten, sie können jedoch keine Termination des TECs herbeiführen (Artsimovitch und Landick, 1998).

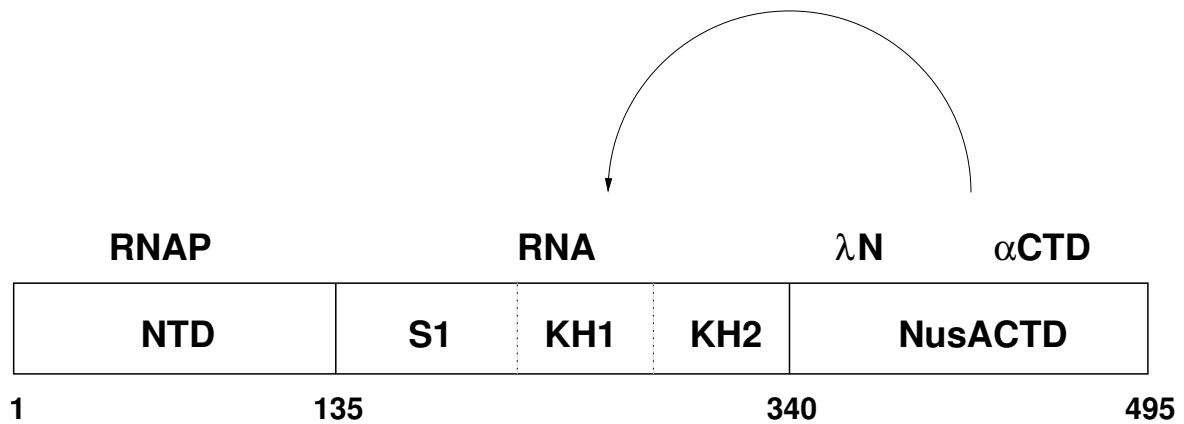
Nach Gusarov und Nudler (2001) bestimmt vor allem die Geschwindigkeit der Haarnadelbildung die Terminationseffizienz. Instabile DNA-RNA-Hybride fördern Pausen während der Transkription (Yarnell und Roberts, 1999; Guajardo und Sousa, 1997) und können damit die Termination durch Verlängerung der Haarnadel-induzierten Pause steigern (Nudler, 1999). Zudem ist möglicherweise das Schließen der Klammerdomäne über die Faltung der Schalter-Schleifen am aktiven Zentrum an die Stabilität des DNA-RNA-Hybrids gekoppelt (Landick, 2001; Cramer *et al.*, 2001; Cramer, 2002), so daß instabile DNA-RNA-Hybride zusätzlich die Öffnung der Klammerdomäne erleichtern könnten.

In Bakterien existieren zwei prinzipiell unterschiedliche Mechanismen, um die Entscheidung *Elongation versus Termination* an intrinsischen Terminatoren zu beeinflussen (zusammengefaßt in Henkin (2000); Weisberg und Gottesman (1999)). Eine Möglichkeit stellt die Kontrolle der Transkriptstruktur durch Ausbildung alternativer Haarnadelstrukturen dar. Welche Struktur das Transkript annimmt, hängt dabei von der Stoffwechselsituation des Bakteriums ab. Diese Art der Regulation findet sich vor allem in biosynthetischen Operons (zusammengefaßt in Henkin und Yanofsky (2002); Gollnick und Babitzke (2002)). Alternativ kann die Kontrolle der Terminationseffizienz durch eine Modifikation der RNAP erfolgen. Ein Beispiel hierfür ist das  $\lambda$ N-Protein (s. 1.2.5).

Häufig wird die Termination durch weitere Faktoren moduliert. So regulieren zum Beispiel NusA und NusB die Terminationseffizienz an den intragenen Terminatoren des *hisG* Cistrons (Carlo-magno und Nappo, 2003).

**1.2.4. Der Elongationsfaktor NusA.** Der Elongationsfaktor NusA ist neben NusB, NusE (oder ribosomales Protein S10) und NusG ein Mitglied der Nus-Familie. Der Name der Nus-Familie *N utilization substance* ist historisch bedingt und leitet sich von der Beteiligung der Nus-Faktoren an der durch das Protein  $\lambda$ N vermittelten Antitermination ab (s. 1.2.5).

*E.coli* NusA ist ein essentielles Protein, das in drei funktionelle Bereiche eingeteilt werden kann: die aminoternale RNAP-bindende Domäne, den zentralen RNA-bindenden Bereich, und den regulativen carboxyterminalen Abschnitt (NusACTD). Der zentrale RNA-bindende Bereich besteht dabei aus einem S1-Modul und zwei KH-Modulen (KH: *K homology*), die in der Regel spezifische und unspezifische RNA-Wechselwirkungen vermitteln (Gibson *et al.*, 1993; Bycroft



**Abbildung 1.4:** Aufbau und Wechselwirkungspartner von NusA.

*E. coli* NusA besteht aus drei Bereichen mit unterschiedlichen Funktionen. Die aminoterminale Domäne (NTD) vermittelt Wechselwirkungen mit den großen Untereinheiten der RNAP, während die S1- und KH-Domänen des zentralen Bereichs für die RNA-Bindung verantwortlich sind. NusACTD interagiert mit der  $\alpha$ -Untereinheit der RNAP und dem Protein N aus dem Phagen  $\lambda$ . Zusätzlich inhibiert NusACTD in Abwesenheit von  $\alpha$ CTD die Wechselwirkung von RNA mit den RNA-bindenden Domänen (Mah *et al.*, 1999, 2000).

*et al.*, 1997). NusACTD interagiert mit der carboxyterminalen Domäne der  $\alpha$ -Untereinheit der RNAP ( $\alpha$ CTD) und dem Protein N aus dem Phagen  $\lambda$ . Zusätzlich inhibiert NusACTD in Abwesenheit von  $\alpha$ CTD die Wechselwirkung von RNA mit den RNA-bindenden Domänen (Mah *et al.*, 1999, 2000) (Abb. 1.4).

Der Sequenzvergleich mit NusA-Proteinen aus anderen Bakterien zeigt weitgehende Homologien der RNAP- und RNA-bindenden Bereiche, während der carboxyterminale Teil nur in  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Proteobakterien wie *E. coli* und in *Chlamydia* und *Treponema* konserviert ist (Mah *et al.*, 2000). Die bisher gelösten Kristallstrukturen von *Thermotoga maritima* (*T. maritima*) NusA (Worbs *et al.*, 2001; Shin *et al.*, 2003) und *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) NusA (Gopal *et al.*, 2001) umfassen die aminoterminale Domäne und den RNA-bindenden Abschnitt.

NusA assoziiert mit einer Gleichgewichtskonstante der Assoziation von  $10^7$ – $10^8$   $M^{-1}$  reversibel mit dem TEC (Greenblatt und Li, 1981; Schmidt und Chamberlin, 1984; Liu und Hanna, 1995; Burns *et al.*, 1998) und ist so an der Regulation einer Vielzahl von Prozessen während der Elongation beteiligt. Der generelle Effekt von NusA scheint dabei eine Herabsetzung der Geschwindigkeit der Elongation zu sein, die zu einer längeren Verweildauer an Wartestellen (Farnham *et al.*, 1982; Kassavetis und Chamberlin, 1981; Landick und Yanofsky, 1984; Lau

*et al.*, 1983; Fisher und Yanofsky, 1983) und einer erhöhten Terminationseffizienz an faktorunabhängigen (Schmidt und Chamberlin, 1987) und  $\rho$ -abhängigen (Lau *et al.*, 1982) Terminatoren führt. Bei der Transkription der ribosomalen RNA Operons wirkt es unter anderem zusammen mit RNA-Elementen und weiteren Nus-Faktoren (Torres *et al.*, 2004) als Antiterminator (Vogel und Jensen, 1997). Auch in dem durch das Protein  $\lambda$ N vermittelten Antiterminationskomplex ist NusA ein wesentlicher Bestandteil (s. 1.2.5) (Whalen *et al.*, 1988; Mason *et al.*, 1992b). Eine physiologische Rolle von NusA könnte daher die Kopplung von Transkription und Translation in Strukturgenen sein (Zheng und Friedman, 1994). RNAs ribosomaler Operons werden im Gegensatz zu Strukturgenen nicht translatiert, so daß über die Erhöhung der Transkriptionsgeschwindigkeit polare Effekte vermieden werden könnten.

NusA steigert die Terminationseffizienz an intrinsischen Terminatoren (s. 1.2.3) zum einen, indem es die Elongationsgeschwindigkeit herabsetzt und Pausen verlängert (Burns *et al.*, 1998). Der Mechanismus, über den NusA die Elongationsgeschwindigkeit verlangsamt, ist noch unbekannt. Es gibt jedoch Hinweise, daß NusA mit den  $\beta$ - und  $\beta'$ -Untereinheiten der RNAP wechselwirkt und so die Konformation der RNAP im Bereich der Bindungsstelle des 3'-Endes der RNA verändert (Zhang und Hanna, 1994).

Zum anderen konnten Gusarov und Nudler (2001) einen direkten Einfluß von NusA auf die Geschwindigkeit der Haarnadelbildung zeigen. Kreuzvernetzungs-Daten weisen auf schwache Wechselwirkungen der  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\beta'$ -Untereinheiten der RNAP und dem Bereich -18 bis -24 der naszierenden RNA hin (Liu und Hanna, 1995; Nudler, 1999; Gusarov und Nudler, 2001). An Terminationsstellen entsprechen diese Positionen dem stromaufwärts gelegenen Teil des potentiellen Haarnadelstamms, so daß die RNAP-RNA-Wechselwirkungen der Bildung der Haarnadel entgegenwirken. In dem Modell von Gusarov und Nudler (2001) beschleunigt NusA die Haarnadelbildung, indem es die RNA-RNAP-Interaktionen abschwächt.

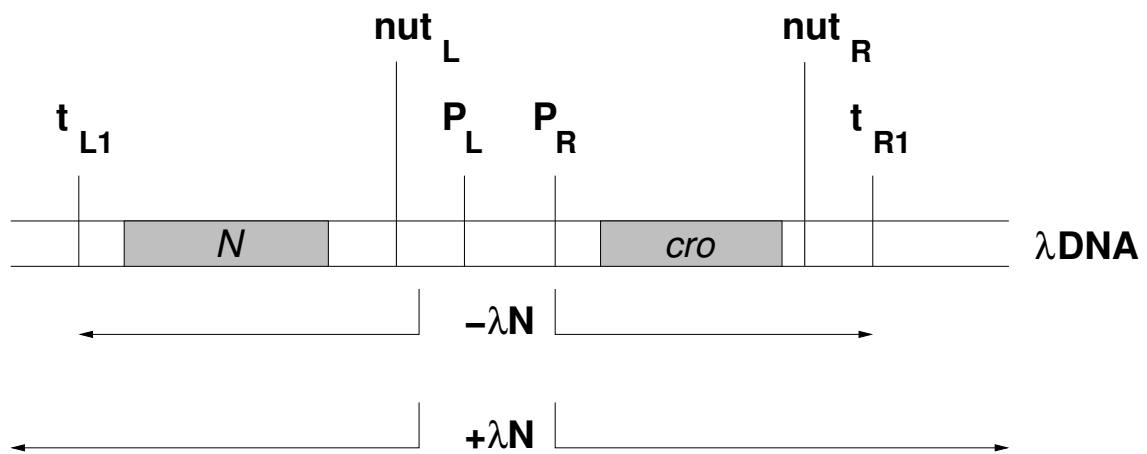
Alternativ könnte NusA sterische Hinderungen der Haarnadelbildung durch die RNAP beseitigen. Während der durch die Klammer- und Klappendomäne gebildete RNA-Austritts-Kanal im geschlossenen Zustand nur Platz für eine einzelsträngige RNA bietet, kann der Kanal eine RNA-Haarnadel nach dem Öffnen der Klappendomäne ohne sterische Probleme beherbergen (Toulokhonov *et al.*, 2001). Toulokhonov *et al.* (2001) konnten eine Bindung von NusA an die *flap tip*-Helix an der Spitze der Klappendomäne nachweisen, so daß eine Veränderung der Position dieser Domäne durch NusA möglich scheint.

Eine Reihe von experimentellen Befunden spricht dafür, daß NusA auch in der  $\rho$ -abhängigen Termination (s. 1.2.2) eine wichtige regulative Funktion ausübt. Zum einen interagiert NusA neben NusG direkt mit dem  $\rho$ -Faktor (Burns *et al.*, 1998). Zum anderen konnten Zheng und Friedman (1994) zeigen, daß eine letale NusA-Mutante lebensfähig ist, wenn zugleich die Aktivität des  $\rho$ -Proteins herabgesetzt ist. Vermutlich bewirkt die Abwesenheit von NusA, daß Transkription und Translation entkoppelt werden und der  $\rho$ -Faktor vor dem Ende des Gens Zugang zur RNAP hat und die Transkription beendet (Zheng und Friedman, 1994). Auf struktureller und mechanistischer Ebene ist der Einfluß von NusA auf die  $\rho$ -abhängige Termination allerdings noch ungeklärt.

**1.2.5. Das Protein N aus dem Phagen  $\lambda$ .** Der Phage  $\lambda$  ist ein temperenter coli-Phage, der in zwei Lebensformen vorkommen kann. In lysogenen Bakterien ist der Phage als Prophage in das Genom des Wirtsbakteriums integriert, während er im lytischen Modus die Zellmaschinerie des Wirts ausnutzt, um sich zu vermehren. Die Produktion von neuen Phagen verläuft in drei Schritten über die Replikation der Phagen-DNA, das Verpacken der DNA in Phagenpartikel und die Lyse der Wirtszelle. Die zeitliche Kontrolle der Expression der entsprechenden Phagengene wird zum einen durch die Anordnung der Gene nach Funktion und zum anderen durch die Kontrollproteine  $\lambda N$  und  $\lambda Q$  erreicht, die zwischen den sogenannten frühen und verzögert frühen beziehungsweise verzögert frühen und späten Genen umschalten. Dementsprechend codieren die frühen Gene für den Regulator  $\lambda N$  sowie Enzyme, die für die Replikation benötigt werden. Die Expression der verzögert frühen Gene liefert den Regulator  $\lambda Q$  und Genprodukte, die für den Zusammenbau des Phagenpartikels wichtig sind und die späten Gene codieren für Proteine, die die Wirtszelle lysieren.

Die Kontrolle der Genexpression durch das  $\lambda N$ - und  $\lambda Q$ -Protein erfolgt über Antitermination (zusammengefaßt in Greenblatt *et al.* (1993)) und soll im folgenden für das  $\lambda N$ -Protein genauer beschrieben werden (Abb. 1.5).

Die Transkription des ringförmigen  $\lambda$ -Genoms startet in zwei Richtungen von den Promotoren  $P_R$  und  $P_L$  und läuft zunächst bis zu den  $\rho$ -abhängigen Terminatoren  $t_{R1}$  und  $t_{L1}$ . Das Genprodukt der rechten Transkriptionseinheit ist das Cro-Protein, das unter anderem nach dem Eintritt in die verzögert frühe Phase die Transkription von  $P_R$  und  $P_L$  abschaltet. Dagegen wird von der linken Transkriptionseinheit das  $\lambda N$ -Protein produziert, das zusammen mit den Wirtsproteinen der Nus-Familie sowie den regulatorischen *nut*-Sequenzen (*nut*: *N utilization*) die RNAP derart verändert, daß sie in der Lage ist, die Terminatoren  $t_{R1}$  und  $t_{L1}$  zu überlesen. Die *nut*-Sequenzen *nutR* und *nutL* befinden sich zwischen *cro* und  $t_{R1}$  beziehungsweise zwischen  $P_L$  und *N* und

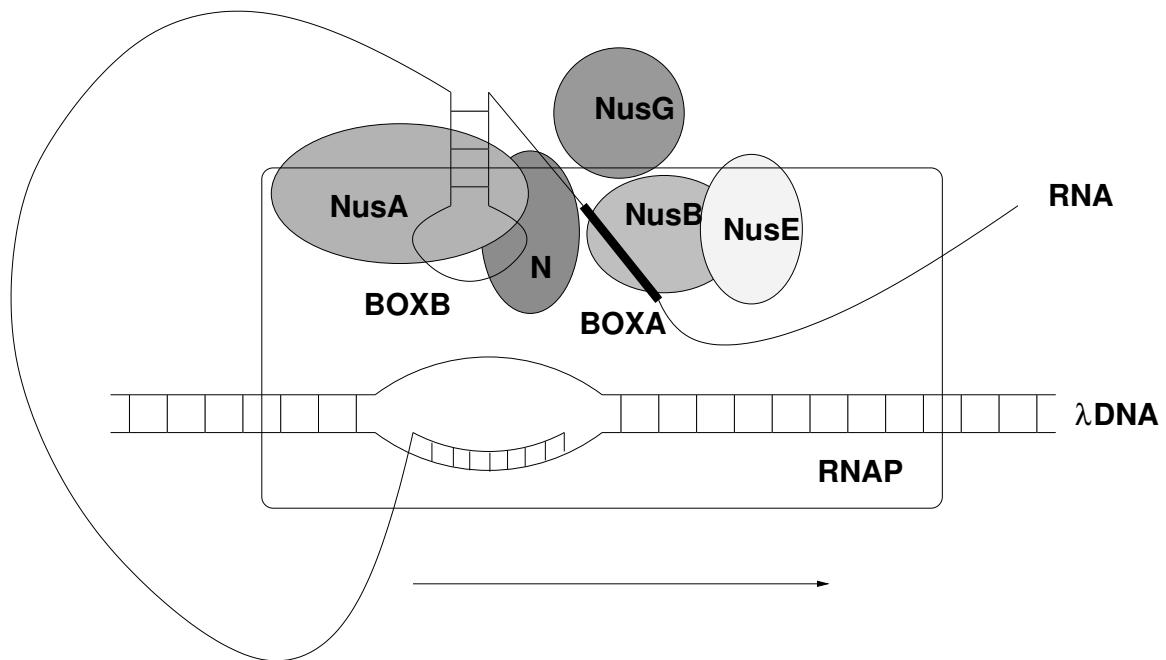


**Abbildung 1.5:** Die Kontrolle der Transkription des  $\lambda$ -Genoms erfolgt durch Antitermination.

Das Genom des Phagen  $\lambda$  besteht aus einer links- und einer rechtsgerichteten Transkriptionseinheit. Ausgehend von den beiden Promotoren  $P_L$  und  $P_R$  werden zunächst die frühen Gene  $N$  beziehungsweise  $cro$  abgelesen. Die Transkription endet dabei an den Terminatoren  $t_{L1}$  und  $t_{R1}$ . In Gegenwart von  $\lambda N$ , dem Genprodukt von  $N$ , und der regulatorischen NUT-RNA, dem Transkript von  $nut_R$  beziehungsweise  $nut_L$ , ist die RNAP in der Lage, die beiden Terminatoren zu überlesen, und somit die verzögert frühen Gene zu transkribieren.

führen bei der Transkription jeweils zu zwei regulatorisch wirksamen RNA-Elementen, BOXA (Olson *et al.*, 1982) und BOXB (Rosenberg *et al.*, 1978; de Crombrughe *et al.*, 1979). Während BOXB eine Stamm-Schleifen-Struktur ausbildet, die von dem sogenannten ARM-Motiv (ARM: *arginine rich motive*) des  $\lambda N$ -Proteins und von dem Elongationsfaktor NusA (Chattopadhyay *et al.*, 1995) erkannt wird, zeichnet sich BOXA durch eine Konsensus-Sequenz ohne Sekundärstruktur aus. BOXA bietet eine Bindungsstelle für den NusB · NusE-Komplex (Mason *et al.*, 1992a; Luttmann *et al.*, 2002). Zusammen mit einem weiteren *E.coli* Protein NusG (Zhou *et al.*, 2002) und der RNAP bilden die NUT-RNA, die Nus-Faktoren und das  $\lambda N$ -Protein den  $\lambda N$ -abhängigen Antiterminationskomplex (ATC) (Abb. 1.6).

Der ATC ist in der Lage,  $\rho$ -abhängige und -unabhängige Terminatoren zu überlesen, die bis zu 7000 Basenpaare stromaufwärts der  $nut$ -Sequenz liegen (DeVito und Das, 1994). Da  $\lambda N$  *in vitro* ohne weitere Hilfsfaktoren antiterminatorisch wirken kann (Rees *et al.*, 1996; Gusarov und Nudler, 2001), ist davon auszugehen, daß direkte Kontakte zwischen dem TEC und  $\lambda N$  einen entscheidenden Beitrag zum Mechanismus der Antitermination liefern. Allerdings erfolgt eine



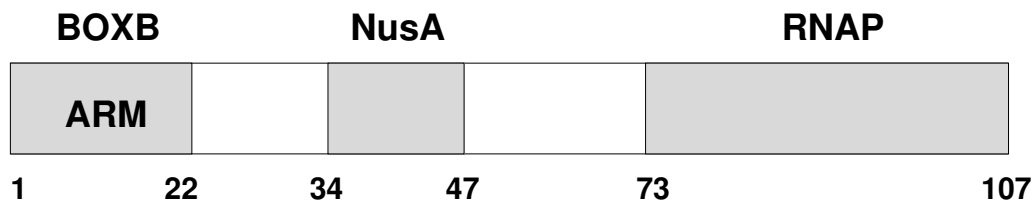
**Abbildung 1.6:** Der  $\lambda$ N-abhängige Antiterminationskomplex.

Das Protein  $\lambda$ N verändert die RNAP derart, daß sie in der Lage ist, Terminationssignale zu überlesen. Für eine prozessive und spezifische Modifikation der RNAP durch  $\lambda$ N werden jedoch zusätzlich die RNA-Elemente BOXA und BOXB sowie die *E.coli* Wirtsfaktoren NusA, NusB, NusE und NusG benötigt (van Gilst und von Hippel, 2000). Der Pfeil zeigt die Transkriptionsrichtung an.

Antitermination durch  $\lambda$ N alleine nur unter unphysiologisch hohen  $\lambda$ N- oder erniedrigten Salzkonzentrationen und an unmittelbar benachbarten Terminatoren. Für die Spezifität und Prozessivität der Antitermination sind daher weitere Faktoren nötig.

Die Nus-Faktoren scheinen dabei vorrangig die Stabilisierung des ATC zu gewährleisten (DeVito und Das, 1994), während die NUT-RNA ein komplexeres Aufgabenspektrum besitzt. Die BOXB interagiert sowohl mit  $\lambda$ N als auch mit NusA (Chattopadhyay *et al.*, 1995). Untersuchungen von Xia *et al.* (2003) zeigen eine wichtige Rolle der Konformation der BOXB in dem  $\lambda$ N · NusA · BOXB-Komplex auf und weisen darauf hin, daß die Aufgabe der BOXB über die Rekrutierung der Komponenten des ATC (van Gilst und von Hippel, 1997, 2000) hinausgehen könnte. Nach van Gilst und von Hippel (2000) stellt die BOXB vor allem die Spezifität der  $\lambda$ N-RNAP-Wechselwirkung sicher. An dem  $\rho$ -abhängigen Terminator  $t_{R1}$  konnten Vieu und Rahmouni (2004) eine weitere Funktion der Wechselwirkung zwischen  $\lambda$ N und NusA nachweisen. In Abwesenheit von  $\lambda$ N führt die Faltung der BOXB zu einer günstigen Konformation der





**Abbildung 1.7:** Das Protein N des Bakteriophagen  $\lambda$ .

$\lambda$ N ist ein intrinsisch ungefaltetes Protein, dessen Domänen sich erst bei Bindung an den jeweiligen Wechselwirkungspartner strukturieren. Dabei interagiert das ARM-Motiv mit der BOXB, während die Region um  $\lambda$ N(34–47) mit NusA wechselwirkt. Die carboxyterminalen 35 Aminosäuren sind an der Wechselwirkung mit der RNAP beteiligt.

RUT-Sequenz, so daß der  $\rho$ -Faktor die Termination effizient beenden kann. Die Bindung von  $\lambda$ N an die BOXB verhindert hingegen, daß  $\rho$  Zugang zu den RUT-Sequenzen erhält. Ein minimaler ATC, der *in vitro* unter physiologischen Bedingungen über mehrere 100 Basenpaare aktiv ist, benötigt neben der RNAP und  $\lambda$ N den Hilfsfaktor NusA sowie die BOXB.

$\lambda$ N ist ein intrinsisch unstrukturiertes Protein, dessen Domänen  $\lambda$ N(1–22),  $\lambda$ N(34–47) und  $\lambda$ N(73–107) sich unabhängig voneinander bei Bindung an den jeweiligen Bindungspartner strukturieren (Abb. 1.7). Dabei interagiert  $\lambda$ N(1–22) mit BOXB, während  $\lambda$ N(34–47) an NusA und  $\lambda$ N(73–107) an die RNAP bindet. Die antiterminatorische Wirkung von  $\lambda$ N wird primär durch die RNAP-bindende Region  $\lambda$ N(73–107) vermittelt, obwohl ein Teil des terminationssteigernden Effekts von NusA durch  $\lambda$ N(1–47) revertiert werden kann (Mogridge *et al.*, 1998).

$\lambda$ N erhöht wie andere Antiterminatoren (Mason *et al.*, 1992b; Santangelo und Roberts, 2002) die Elongationsgeschwindigkeit. Der antiterminatorische Effekt ist jedoch hauptsächlich auf eine direkte Modulation der Haarnadelbildung zurückzuführen (Rees *et al.*, 1997; Gusarov und Nudler, 2001). Kreuzvernetzungs-Experimente zeigen, daß  $\lambda$ N, wie NusA, die Kontakte zwischen der RNAP und der naszierenden RNA im Bereich von –18 bis –24 beeinflusst (s. 1.2.4). Vermutlich setzt es die Terminationseffizienz herab, indem es eigene starke Wechselwirkungen mit der stromaufwärts liegenden Schulter der Haarnadel ausbildet. Zusätzlich wird in Gegenwart von  $\lambda$ N eine verstärkte Kreuzvernetzung von RNA und NusA beobachtet. Demnach wirkt  $\lambda$ N der NusA-Bindung nicht entgegen, sondern verwandelt den Terminationsfaktor NusA in einen Antiterminationsfaktor, indem es die Wechselwirkungen von NusA mit der RNA fördert. Die Kontaktstelle der RNA auf NusA liegt in der S1-Domäne, die wahrscheinlich auch an der BOXB-Bindung beteiligt ist (Mah *et al.*, 1999).

Der ATC ist Gegenstand intensiver Strukturuntersuchungen. Bisher wurden die Strukturen des  $\lambda$ N · BOXB-Komplexes (Scharpf *et al.*, 2000; Legault *et al.*, 1998) und des  $\lambda$ N · NusA-Komplexes (Bonin *et al.*, 2004a) gelöst. Von den beteiligten Nus-Faktoren sind neben den bereits erwähnten NusA-Strukturen (s. 1.2.4) die Strukturen von *T.maritima* NusB (Bonin *et al.*, 2004b), *E.coli* NusB (Altieri *et al.*, 2000), *M.tuberculosis* NusB (Gopal *et al.*, 2000), *Aquifex aeolicus* NusG (Knowlton *et al.*, 2003) und die Komplexstruktur des *E.coli* NusB · NusE-Komplexes (Luttgen *et al.*, 2002) bekannt.

### 1.3. Ziele der Arbeit

#### 1.3.1. Bestimmung der Struktur der carboxyterminalen Domäne von *E.coli* NusA.

NusA ist ein zentrales Molekül in der Elongationskontrolle in Prokaryoten, das aus einer aminoterminalen RNAP-bindenden Domäne, einem RNA-bindenden Abschnitt sowie einem regulatorischen carboxyterminalen Abschnitt besteht. Die hochaufgelöste dreidimensionale Struktur eines Proteins ist ein wichtiger Schritt für das Verständnis der Funktion und stellt ein Gerüst für die Interpretation der bereits aus der Literatur bekannten biochemischen Daten dar.

Während für die aminoterminalen und die RNA-bindende Domäne strukturelle Informationen aus homologen NusA-Proteinen vorliegen, sind für NusACTD keine hochaufgelösten Strukturdaten bekannt. Der Schwerpunkt der Arbeit liegt daher zunächst auf der Bestimmung der dreidimensionalen Struktur von NusACTD mittels NMR-Spektroskopie.

#### 1.3.2. Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen NusA, der RNAP und dem $\lambda$ N-Protein.

Biochemische Daten weisen auf Interaktionen zwischen NusACTD und  $\alpha$ CTD sowie  $\lambda$ N hin. Die  $\alpha$ CTD ist eine regulatorische Domäne der RNAP, während das virale  $\lambda$ N-Protein das verursachende Prinzip in der  $\lambda$ N-vermittelten Antitermination darstellt. Diese Interaktionen unterstreichen die tragende Rolle von NusACTD sowohl in der Elongation als auch in der  $\lambda$ N-vermittelten Antitermination.

In der Regel handelt es sich bei Wechselwirkungen zwischen Domänen in größeren Komplexen um schwache Wechselwirkungen, die besonders gut mit der Methode der NMR-Spektroskopie charakterisiert werden können. Zum einen erlauben Dynamikmessungen die Identifizierung flexibler Bereiche des Proteins, die häufig an Interaktionen beteiligt sind. Zum anderen können durch Titrationsexperimente mit der Auflösung der einzelnen Aminosäure die an der Komplexbildung beteiligten Reste bestimmt werden. Neben strukturellen Daten sollen daher die Dynamik von NusACTD sowie die Wechselwirkungen mit  $\alpha$ CTD und  $\lambda$ N untersucht und die Implikationen für Termination und Antitermination diskutiert werden.

## KAPITEL 2

### Material & Methoden

#### 2.1. Allgemeines zur NMR-Spektroskopie

##### 2.1.1. NMR-Proben.

2.1.1.1. *Proteingewinnung.* Die Klonierung, sowie die Expressions- und Reinigungsstrategie der Fragmente von NusA, der  $\alpha$ -Untereinheit der RNA Polymerase sowie des N Proteins aus dem Phagen  $\lambda$  gehen auf Dr. S. Schwarz zurück und sind in Eisenmann *et al.* (2004), Eisenmann *et al.* (2005) sowie Prsch (2004) beschrieben.

In dieser Arbeit wurden folgende Konstrukte verwendet:

**NusACTD(339–495):** NusACTD(339–495) umfaßt außer den Aminosäuren M339–A495 zwei aminoterminalen Aminosäuren (GP), die aus der Abspaltung des aminoterminalen Dekahistidinanhangs mit Hilfe der Rhinovirus-Protease 3C (Cordingley *et al.*, 1990) resultieren.

**$\alpha$ CTD(233–329):**  $\alpha$ CTD(233–329) ist identisch mit dem von Jeon *et al.* (1995) beschriebenen Fragment der  $\alpha$ -Untereinheit der *E.coli* RNAP mit den Resten D233–E329, wurde aber wie NusACTD(339–495) über eine Spaltung mit Rhinovirus-Protease 3C erhalten (Cordingley *et al.*, 1990) und trägt daher aminoterminal die zusätzlichen Aminosäuren Glycin und Prolin.

**$\lambda$ N(1–53):** Das für  $\lambda$ N ausgewählte Konstrukt besteht aus den Resten M1–N53 und enthält sowohl das RNA-bindende ARM-Motiv (M1–N22) als auch die NusA-Bindungsdomäne (N34–R47) (Mogridge *et al.*, 1998).

Die für die NMR-spektroskopischen Untersuchungen verwendeten unmarkierten sowie einheitlich  $^{15}\text{N}$ - oder  $^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ -markierten Proteine wurden entweder selbst oder von Dr. S. Schwarz (NusACTD(339–495)) und S. Prsch ( $\alpha$ CTD(233–329),  $\lambda$ N(1–53)) hergestellt. Die Proben wurden gelelektrophoretisch, massenspektrometrisch und/oder NMR-spektroskopisch auf ihre Identität und Reinheit überprüft.

2.1.1.2. *Konzentrationsbestimmung.* Die Konzentrationen von NusACTD(339–495),  $\alpha$ CTD(233–329) und  $\lambda$ N(1–53) wurden photometrisch über das Lambert–Beer’sche Gesetz

$$A_{280} = c \cdot d \cdot \epsilon_{280}$$

durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm  $A_{280}$  ermittelt. Die Messungen wurden in Schwarzwand–Quarzküvetten (Hellma, Mühlheim, D) mit einer Schichtdicke  $d = 1$  cm an einem He $\lambda$ ios  $\gamma$  Einstrahl–UV–VIS–Spektrophotometer (Thermo Spectronic, Cambridge, UK) vorgenommen. Als Referenz wurde der entsprechende Puffer verwendet. Für die Extinktionskoeffizienten  $\epsilon_{280}$  wurden die auf Basis der Aminosäuresequenz berechneten Werte eingesetzt (NusACTD(339–495):  $8250 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ;  $\lambda$ N(1–53):  $5690 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ;  $\alpha$ CTD(233–329):  $6970 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) (Gill und von Hippel, 1989).

2.1.1.3. *Standard–Probenbedingungen.* Sofern nicht anders angegeben wurden die gegen H<sub>2</sub>O dialysierten und lyophilisierten Proteine in einer wässrigen Lösung mit 50 mM NaCl und 10 mM Kaliumphosphat pH 6.8, gelöst. Zusätzlich wurden 10% D<sub>2</sub>O (Eurisotop, Gif-sur-Yvette, F) für den Feldfrequenz–Lock, 0.02% NaN<sub>3</sub> als antimikrobielles Agens und Proteaseinhibitor–Cocktail Complete EDTA free PNGase A (Roche, Mannheim, D) entsprechend den Herstellerangaben zugegeben. Als Meßzellen wurden bis zu einem Probenvolumen von mindestens 500  $\mu$ l 5 mm Ultra Precision NMR Probenröhrchen (Norell, Inc., Landisville, NH, USA) verwendet. Für geringere Volumina kamen Mikrozellröhrchen der Firma Shigemi (Campro Scientific, Veendendaal, NL) zum Einsatz.

**2.1.2. Aufnahme der Spektren.** Die Experimente wurden bei 25.0°C mit Spektrometern der Firma Bruker (Karlsruhe, D) Avance400, DRX600, Avance700 und Avance800 bei Protonenresonanzfrequenzen von 400 MHz, 600 MHz, 700 MHz und 800 MHz durchgeführt. Sämtliche Spektrometer verfügen über Einrichtungen, die den Einsatz gepulster Feldgradienten erlauben. Die Temperaturregulierung erfolgte über eine BVT2000 oder BVT3000 Einheit (Bruker, Karlsruhe, D). Zur Wasserunterdrückung wurden entweder eine 3–9–19–WATERGATE Sequenz (Sklenar *et al.*, 1993) mit *Water Flip–Back* (Grzesiek und Bax, 1993b) oder eine Kohärenzselektion mit gepulsten Feldgradienten eingesetzt. Das Signal wurde phasensensitiv mittels Quadraturdetektion aufgenommen, wobei für die indirekten Dimensionen die STATES–TPPI–Methode (States *et al.*, 1982; Marion *et al.*, 1989) oder die Echo/Antiecho–Methode (Kay *et al.*, 1992) verwendet wurde. Letztere wurde in Experimenten eingesetzt, in denen die Wasserresonanz mit Kohärenzselektion unterdrückt wurde. Die selektive Anregung der Aliphaten– beziehungsweise der Carbonylregion auf dem <sup>13</sup>C–Kanal wurde durch bandselektive Pulse wie Gauß–Kaskaden (Emsley und Bodenhausen, 1990) realisiert. Heteronukleare Breitbandentkopplung erfolgte über

Sequenzen wie WALTZ-16 (Shaka *et al.*, 1983) oder GARP (Shaka *et al.*, 1985). Die ppm-Skala wurde relativ zu dem externen Standard DSS (2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonat) geeicht, während die Verschiebungen der Heterokerne  $^{13}\text{C}$  und  $^{15}\text{N}$  indirekt über das Verhältnis der Nullpunktsfrequenzen  $\omega_{\text{C}}/\omega_{\text{H}} = 0.251449527$  beziehungsweise  $\omega_{\text{N}}/\omega_{\text{H}} = 0.10101329051$  referenziert wurden (Markley *et al.*, 1998).

**2.1.3. Prozessierung der Spektren.** Die Spektren wurden mit dem Programm NMRpipe (Delaglio *et al.*, 1995) oder mit den am Lehrstuhl Biopolymere, Universität Bayreuth von Dr. Kristian Schweimer entwickelten Routinen (Schweimer, 2000) prozessiert. Zunächst wurden die Spektren in allen Dimensionen zwei- bis vierfach mit Nullen aufgefüllt (*zerofilling*), um die digitale Auflösung zu verbessern (Cavanagh, 1996, Abschnitt 3.3.2.1). Als Fensterfunktionen wurden entweder Lorentz-zu-Gauß-Transformationen oder um  $60^\circ$ – $90^\circ$  phasenverschobene Sinus-Funktionen verwendet (Cavanagh, 1996, Abschnitt 3.3.2.2), um die Auflösung zu steigern oder die durch zu kurze Aufnahmezeiten resultierenden Artefakte abzuschwächen. In 2D-, 3D- und 4D-Spektren wurden in der jeweils zuletzt prozessierten indirekten Dimension zusätzliche Datenpunkte mittels linearer Vorhersage berechnet (Barkhuijsen *et al.*, 1985), wobei bei *constant time*-Evolution eine *mirror image linear prediction* (Zhu und Bax, 1990) durchgeführt wurde. Die Phasenkorrektur der Spektren erfolgte mit dem Programm NmrDraw (F. Delaglio, *unveröffentlicht*) oder mit NMRview5.0.4 (Johnson und Blevins, 1994). NMRview5.0.4 wurde auch für die Auswertung der Spektren eingesetzt.

## 2.2. Strukturbestimmung

### 2.2.1. NMR-Spektroskopie.

2.2.1.1. *Theorie.* Die Gesamtheit der in einer NMR-Probe vorhandenen magnetisch aktiven Kerne (Kerne mit Kernspinzahl  $I > 0$ ) führt in einem statischen Magnetfeld zu einer Nettomagnetisierung, die sich mit NMR-Experimenten manipulieren läßt. NMR-Experimente bestehen dabei aus Pulsfolgen, das heißt einer Kombination aus Radiofrequenz-Pulsen und Perioden freier Präzession der Magnetisierung. Am Ende eines NMR-Experiments wird die aus dem Experiment resultierende Magnetisierung als Funktion der Zeit als sogenannter freier Induktionszerfall (FID: *free induction decay*) registriert und mittels Fouriertransformation in ein Frequenzspektrum umgewandelt (van de Ven, 1995, Kapitel 1).

Eindimensionale NMR-Experimente lassen sich in eine Präparations- und Detektionsphase unterteilen. Bei mehrdimensionalen Experimenten sind pro Dimension eine Evolutions- und eine Mischphase vor der Detektion eingeschoben (Abb. 2.1; Schweimer (2000, Abschnitt 3.1.1)).

1D Präp - Det ( $t_1$ )  
2D Präp - Evol ( $t_1$ )- Misch - Det ( $t_2$ )  
3D Präp - Evol ( $t_1$ )- Misch - Evol ( $t_2$ )- Misch - Det ( $t_3$ )

**Abbildung 2.1:** Prinzip mehrdimensionaler NMR-Experimente.

Präp: Präparation; Evol: Evolution; Misch: Mischphase; Det: Detektion (aus Schweimer (2000, Abschnitt 3.1.1))

In der Präparationsphase wird die gewünschte Magnetisierung erzeugt. Die Evolutionsperiode liefert die zusätzlichen Zeit- beziehungsweise Frequenzdimensionen, indem die Länge der Evolutionsperiode bei aufeinanderfolgenden Aufnahmen systematisch inkrementiert wird. In einem zweidimensionalen Experiment ist der FID somit eine Funktion von ( $t_1, t_2$ ), wobei  $t_1$  die Werte  $t_1(0), t_1(0) + \Delta t, t_1(0) + 2\Delta t, \dots$  annimmt. In der Mischphase kann man in definierter Weise Magnetisierung von einem Spin auf einen anderen transferieren, was unter anderem zu Kreuzsignalen beziehungsweise Korrelationen von Kernspins führt. Im Prinzip nutzt man zwei verschiedene Methoden um Magnetisierung zwischen Kernen zu übertragen, Magnetisierungstransfer über Bindungen oder Magnetisierungstransfer über den Raum (zusammengefaßt in van de Ven (1995, Kapitel 4 und 5)).

Der Magnetisierungstransfer über Bindungen beruht auf skalaren Kopplungen zwischen kovalent verknüpften Kernen, und ist umso effizienter, je größer die Kopplungskonstante zwischen den jeweiligen Kernen ist. Die Größe der Kopplungskonstante hängt dabei von der Stärke der Wechselwirkung zwischen den Kern- und Elektronenspins der beteiligten Atome und Bindungen ab. Diese Art des Magnetisierungstransfers wird unter anderem in HSQC- (*heteronuclear single quantum coherence*), HMQC- (*heteronuclear multiple quantum coherence*), COSY- (*correlation spectroscopy*), TOCSY- (*total correlation spectroscopy*) sowie in Tripelresonanzexperimenten ausgenutzt.

Dagegen basiert der Magnetisierungstransfer über den Raum auf dipolaren Kopplungen zwischen Kernen, die sich räumlich nahe kommen, unabhängig davon, ob sie über eine kovalente Bindung verknüpft sind, oder nicht. Die Transfereffizienz wird dabei wesentlich vom Abstand  $r$  der Kerne beeinflusst und führt in der Regel zu einem beobachtbaren Signal zwischen Kernen, die weniger als fünf Å entfernt sind. In der Strukturaufklärung mittels NMR-Spektroskopie wird die dipolare Kopplung in NOESY-Experimenten (*nuclear overhauser enhancement spectroscopy*) genutzt, um herauszufinden, welche Protonen eines Makromoleküls sich in räumlicher Nachbarschaft befinden (s. 2.2.3).

Für die in dieser Arbeit verwendeten Experimente sind die jeweils beobachtbaren Korrelationen in Tab. 2.1 zusammengefaßt.

2.2.1.2. *Experimente.* Sämtliche NMR-Experimente wurden an  $^{15}\text{N}$ - beziehungsweise  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ -markierten Proben von NusACTD(339–495) unter Standardbedingungen bei Konzentrationen zwischen 1.0 mM und 1.5 mM aufgenommen. In Tabelle 2.2 sind die Aufnahmeparameter der in dieser Arbeit abgebildeten HSQC-Spektren sowie der für die Strukturaufklärung benutzten Tripelresonanz-, TOCSY-, COSY- und NOESY-Experimente zusammengestellt.

**2.2.2. Analyse der chemischen Verschiebungen.** Der chemische Verschiebungsindex ist eine empirische Methode zur Vorhersage der Sekundärstruktur in Abhängigkeit von der Sequenzposition (Wishart und Sykes, 1994). Im Prinzip wird für jeden Kern zunächst die Differenz zwischen der beobachteten und einer für jeden Kern bekannten Referenzfrequenz, die dem Wert in einer Zufallskonformation entspricht, berechnet. Die Referenzfrequenzen wurden dabei Wishart und Sykes (1994) entnommen. Über- oder unterschreitet die Differenz einen vorgegebenen Schwellenwert, wird dem Kern der Wert +1 beziehungsweise –1 zugewiesen, andernfalls der Wert 0. Die Schwellenwerte betragen  $\pm 0.1$  ppm für  $^1\text{H}^\alpha$ ,  $\pm 0.5$  ppm für  $^{13}\text{CO}$  und  $+0.5$  ppm/–0.8 ppm für  $^{13}\text{C}^\alpha$ . Zur Berechnung des Gesamtindex wurde die Summe der Indices ermittelt, wobei der Index von  $^1\text{H}^\alpha$  negativ gezählt wurde. Werte des Gesamtindex  $\geq 1$  weisen auf eine Helix hin, wenn sie mindestens viermal in Folge auftreten. Dagegen liefern Werte des Gesamtindex  $\leq -1$  für mindestens drei sequentiell benachbarte Aminosäuren einen Hinweis auf das Vorliegen eines  $\beta$ -Faltblattstrangs.

**2.2.3. Abstandsbeschränkungen aus NOESY-Spektren.** Abstandsbeschränkungen für die Strukturberechnung wurden aus NOESY-Experimenten (s. 2.2.1) ermittelt. NOE-Kreuzresonanzen zwischen zwei Kernen sind in der Regel wegen der Proportionalität zur inversen sechsten Potenz des Abstands bis zu einer Distanz der Kerne von 5 Å zu beobachten. Da in den hier durchgeführten NOESY-Experimenten wegen der längeren Mischzeiten aufgrund von Spindiffusion und Dynamik kein einfacher Zusammenhang zwischen NOE-Kreuzresonanzstärke und Abstand besteht (Cavanagh, 1996, Abschnitt 8.2.1) wurden die NOE-Kreuzresonanzen manuell ausgelesen und aufgrund der Signalstärke grob in die drei Klassen schwach ( $< 5.0$  Å), mittel ( $< 3.5$  Å) und stark ( $< 2.7$  Å) eingeteilt.

Experiment	beobachtete Korrelation
$^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC	$\text{H}(i), \text{N}(i)$
ct- $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -HSQC	$\text{H}^{aliph}(i), \text{C}^{aliph}(i)$
$^1\text{H}^{13}\text{C}$ -HSQC ( <i>Aromaten</i> )	$\text{H}^{aro}(i), \text{C}^{aro}(i)$
HNCO	$\text{H}^N(i), \text{N}(i), \text{CO}(i-1)$
HNCA	$\text{H}^N(i), \text{N}(i), \text{C}^\alpha(i-1), \text{C}^\alpha(i)$
HNHA	$\text{H}^N(i), \text{N}(i), \text{H}^\alpha(i)$
CBCA(CO)NH	$\text{H}^N(i), \text{N}(i), \text{C}^\alpha(i-1), \text{C}^\beta(i-1)$
CBCA(CO)NH ( <i>Seitenkettenamide</i> )	$\text{H}^{amid}(i), \text{N}^{amid}(i), \text{C}^\alpha(i), \text{C}^\beta(i)$
HBHA(CBCA)(CO)NH	$\text{H}^N(i), \text{N}(i), \text{H}^\alpha(i-1), \text{H}^\beta(i-1)$
HNCACB	$\text{H}^N(i), \text{N}(i), \text{C}^\alpha(i-1), \text{C}^\beta(i-1), \text{C}^\alpha(i), \text{C}^\beta(i)$
(H)CC(CO)NH-TOCSY	$\text{H}^N(i), \text{N}(i), \text{C}^{aliph}(i-1)$
H(CC)(CO)NH-TOCSY	$\text{H}^N(i), \text{N}(i), \text{H}^{aliph}(i-1)$
H(C)CH-TOCSY	$\text{H}^{aliph}(i), \text{C}^{aliph}(i)$
H(C)CH-COSY	$\text{H}^{aliph}(i), \text{C}^{aliph}(i)$
3D- $^1\text{H}, ^{15}\text{N}^1\text{H}$ -NOESY-HSQC	$\text{H}(i) \xrightarrow{\text{NOE}} \text{H}(j), \text{N}(j)$
3D- $^1\text{H}, ^{13}\text{C}^1\text{H}$ -NOESY-HSQC	$\text{H}(i) \xrightarrow{\text{NOE}} \text{H}(j), \text{C}(j)$
3D- $^1\text{H}, ^{13}\text{C}^1\text{H}$ -NOESY-HSQC ( <i>Aromaten</i> )	$\text{H}(i) \xrightarrow{\text{NOE}} \text{H}^{aro}(j), \text{C}^{aro}(j)$
3D- $^{15}\text{N}, ^{15}\text{N}^1\text{H}$ -HMQC-NOESY-HSQC	$\text{N}(i), (\text{H}(i)) \xrightarrow{\text{NOE}} \text{H}(j), \text{N}(j)$
3D- $^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}^1\text{H}$ -HMQC-NOESY-HSQC	$\text{C}(i), (\text{H}(i)) \xrightarrow{\text{NOE}} \text{H}(j), \text{N}(j)$
3D- $^{13}\text{C}, ^{13}\text{C}^1\text{H}$ -HMQC-NOESY-HSQC	$\text{C}(i), (\text{H}(i)) \xrightarrow{\text{NOE}} \text{H}(j), \text{C}(j)$
4D- $^1\text{H}^{13}\text{C}, ^{13}\text{C}^1\text{H}$ -HMQC-NOESY-HSQC	$\text{C}(i), \text{H}(i) \xrightarrow{\text{NOE}} \text{H}(j), \text{C}(j)$

**Tabelle 2.1:** Beobachtbare Korrelationen in den verwendeten NMR-Experimenten.

In Tripelresonanz-, TOCSY- und COSY-Experimenten sind definierte Korrelationen zwischen Kernen innerhalb einer Aminosäure  $i$  oder zwischen in der Sequenz benachbarten Aminosäuren zu beobachten. Die Namen der Tripelresonanz-, TOCSY- und COSY-Experimente spiegeln dabei den Weg der Magnetisierung in dem Experiment wider. Kerne, deren Resonanzfrequenz nicht detektiert wurde, sind in Klammern gesetzt. Dagegen führt in NOESY-Experimenten der Magnetisierungstransfer zwischen räumlich benachbarten Protonen zu Kreuzsignalen zwischen Kernen in den Aminosäuren  $i$  und  $j$ . ( $\text{C}^{aliph}/\text{H}^{aliph}$ : aliphatische Kohlenstoffe/Protonen;  $\text{C}^{aro}/\text{H}^{aro}$ : aromatische Kohlenstoffe/Protonen;  $\text{N}^{amid}$  und  $\text{H}^{amid}$ : Kerne der Seitenkettenamide von Asparagin und Glutamin;  $\text{H}^N$ : Amidproton des Rückgrats; CO: Carbonylkohlenstoff)



Dimension <sup>1</sup>	Kern	SW (Hz) <sup>2</sup>	TD <sup>3</sup>	SF0 (MHz) <sup>4</sup>	Referenz
<i><sup>1</sup>H<sup>15</sup>N–HSQC</i>					
F1	<sup>15</sup> N	1731.4	256		(Mori <i>et al.</i> , 1995)
F2 (16)	<sup>1</sup> H	8389.3	512	700	
<i>ct-[<sup>1</sup>H<sup>13</sup>C]–HSQC</i>					
F1	<sup>13</sup> C	14084.5	360		(Vuister und Bax, 1992)
F2 (8)	<sup>1</sup> H	10416.7	512	800	
<i><sup>1</sup>H<sup>13</sup>C–HSQC (aromatische Aminosäuren)</i>					
F1	<sup>13</sup> C	4225.8	128		(Vuister und Bax, 1992)
F2 (16)	<sup>1</sup> H	6613.8	512	600	
<i>HNCO</i>					
F1	<sup>13</sup> C	2113.2	48		(Grzesiek und Bax, 1992b)
F2	<sup>15</sup> N	1731.4	40		
F3 (4)	<sup>1</sup> H	8389.3	512	700	
<i>HNCA</i>					
F1	<sup>13</sup> C	5282.9	48		(Grzesiek und Bax, 1992b)
F2	<sup>15</sup> N	1731.4	40		
F3 (4)	<sup>1</sup> H	8389.3	512	700	
<i>CBCA(CO)NH</i>					
F1	<sup>13</sup> C	10212.3	64		(Grzesiek und Bax, 1992a)
F2	<sup>15</sup> N	1731.4	40		
F3 (16)	<sup>1</sup> H	8389.3	512	700	
<i>HNCACB</i>					
F1	<sup>13</sup> C	10212.3	64		(Wittekind und Mueller, 1993)
F2	<sup>15</sup> N	1731.4	40		
F3 (16)	<sup>1</sup> H	8389.3	512	700	
<i>(H)CC(CO)NH–TOCSY</i>					
F1	<sup>13</sup> C	10212.3	64		(Grzesiek <i>et al.</i> , 1993)
F2	<sup>15</sup> N	1731.4	40		
F3 (16)	<sup>1</sup> H	8389.3	512	700	

Dimension <sup>1</sup>	Kern	SW (Hz) <sup>2</sup>	TD <sup>3</sup>	SF0 (MHz) <sup>4</sup>	Referenz
<i>HBHA(CBCA)(CO)NH</i>					
F1	<sup>1</sup> H	3300.7	64		(Grzesiek und Bax, 1993a)
F2	<sup>15</sup> N	1484.0	32		
F3 (16)	<sup>1</sup> H	7183.9	512	600	
<i>HNHA</i>					
F1	<sup>1</sup> H	4800.8	96		(Vuister und Bax, 1993)
F2	<sup>15</sup> N	1978.5	40		
F3 (16)	<sup>1</sup> H	9615.4	512	600	
<i>H(CC)(CO)NH-TOCSY</i>					
F1	<sup>1</sup> H	3600.8	64		(Grzesiek <i>et al.</i> , 1993)
F2	<sup>15</sup> N	1484.0	32		
F3 (32)	<sup>1</sup> H	7183.9	512	600	
<i>H(C)CH-COSY</i>					
F1	<sup>1</sup> H	3600.8	80		(Ikura <i>et al.</i> , 1991a)
F2	<sup>13</sup> C	5281.8	32		
F3 (16)	<sup>1</sup> H	7183.9	512	600	
<i>H(C)CH-TOCSY</i>					
F1	<sup>1</sup> H	4201.2	80		(Wijmenga <i>et al.</i> , 1997)
F2	<sup>15</sup> N	6162.6	32		
F3 (16)	<sup>1</sup> H	8389.3	512	700	
<i>3D-<sup>1</sup>H, <sup>15</sup>N<sup>1</sup>H-NOESY-HSQC</i>					
F1	<sup>1</sup> H	7702.2	128		(Talluri und Wagner, 1996)
F2	<sup>15</sup> N	1731.4	32		
F3 (8)	<sup>1</sup> H	8389.3	512	800	
<i>3D-<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C<sup>1</sup>H-NOESY-HSQC</i>					
F1	<sup>1</sup> H	9281.6	128		(Ikura <i>et al.</i> , 1991b)
F2	<sup>13</sup> C	7042.3	30		
F3 (16)	<sup>1</sup> H	10416.7	512	800	

Dimension <sup>1</sup>	Kern	SW (Hz) <sup>2</sup>	TD <sup>3</sup>	FS <sup>4</sup> (MHz)	Referenz
<i>3D-<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C<sup>1</sup>H-NOESY-HSQC (aromatische Aminosäuren)</i>					
F1	<sup>1</sup> H	7183.6	128		(Ikura <i>et al.</i> , 1991b)
F2	<sup>13</sup> C	4225.8	30		
F3 (8)	<sup>1</sup> H	6613.8	512	600	
<i>3D-<sup>15</sup>N, <sup>15</sup>N<sup>1</sup>H-HMQC-NOESY-HSQC</i>					
F1	<sup>15</sup> N	1484.0	48		(Ikura <i>et al.</i> , 1990)
F2	<sup>15</sup> N	1484.0	32		
F3 (32)	<sup>1</sup> H	7183.9	512	600	
<i>3D-<sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N<sup>1</sup>H-HMQC-NOESY-HSQC</i>					
F1	<sup>13</sup> C	9658.5	64		(Diercks <i>et al.</i> , 1999)
F2	<sup>15</sup> N	1484.0	32		
F3 (32)	<sup>1</sup> H	7183.9	512	600	
<i>4D-<sup>1</sup>H<sup>13</sup>C, <sup>13</sup>C<sup>1</sup>H-HMQC-NOESY-HSQC</i>					
F1	<sup>1</sup> H	7042.3	48		(Vuister <i>et al.</i> , 1993)
F2	<sup>13</sup> C	6250.0	16		
F3	<sup>13</sup> C	7042.3	16		
F4 (4)	<sup>1</sup> H	5580.4	256	800	
<i>CBCA(CO)NH Seitenkettenamide</i>					
F1	<sup>13</sup> C	10212.3	64		(Grzesiek und Bax, 1992a)
F2	<sup>15</sup> N	1731.4	40		
F3 (16)	<sup>1</sup> H	8389.3	512	700	

**Tabelle 2.2:** Zusammenfassung der verwendeten NMR-Experimente und Parameter.

<sup>1</sup>In der Aufnahmedimension ist zusätzlich die Zahl der Wiederholungen des Experiments angegeben. <sup>2</sup>Spektrale Breite. <sup>3</sup>Zahl der realen Datenpunkte. <sup>4</sup>Magnetfeldstärke in Protonenresonanzfrequenz. Die Mischzeit für NOESY-Experimente betrug durchgehend 120 ms, die der TOCSY-Experimente 60 ms.

Die Zuordnung des jeweiligen Wechselwirkungspartners erfolgte iterativ anhand folgender Kriterien

- Übereinstimmung der chemischen Verschiebung
- Existenz der entsprechenden Kreuzresonanz bei dem zweiten Wechselwirkungspartner
- Verträglichkeit der Abstandsbeschränkung mit bereits gerechneten Strukturen

Die in den unterschiedlichen Experimenten beobachtbaren Korrelationen sind in Tab. 2.1 zusammengefaßt.

**2.2.4. Wasserstoffbrücken aus H/D–Austauschexperimenten.** Amidprotonen, die in Wasserstoffbrücken eingebunden sind, zeigen stark verminderte Austauschraten mit dem Lösungsmittel. Diese langsam austauschenden Amidprotonen lassen sich über H/D–Austausch-Experimente identifizieren. Dazu wurden 500  $\mu\text{l}$  einer 860  $\mu\text{M}$  unter Standardbedingungen (s. 2.1.1.3) hergestellten und anschließend lyophilisierten Lösung von  $^{15}\text{N}$ -markiertem NusACTD(339–495) mit 500  $\mu\text{l}$   $D_2\text{O}$  aufgegossen und der Austausch durch Aufnahme einer Serie von zwanzig  $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren (s. 2.3) im Abstand von circa zwanzig Minuten dokumentiert.

Dimension <sup>1</sup>	Kern	SW (Hz) <sup>2</sup>	TD <sup>3</sup>	SF0 (MHz) <sup>4</sup>	Referenz
<i><math>^1\text{H}^{15}\text{N}</math>-HSQC</i>					
F1	$^{15}\text{N}$	1978.5	192		
F2 (16)	$^1\text{H}$	9615.4	512	700	(Mori <i>et al.</i> , 1995)

**Tabelle 2.3:** Aufnahmeparameter des für die Bestimmung des H/D–Austauschs verwendeten  $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC-Experiments.

<sup>1</sup>In der Aufnahmedimension ist zusätzlich die Zahl der akkumulierten Wiederholungen des Experiments angegeben. <sup>2</sup>Spektrale Breite. <sup>3</sup>Zahl der realen Datenpunkte. <sup>4</sup>Magnetfeldstärke in Protonenresonanzfrequenz.

Intrinsische Austauschraten für Amidprotonen betragen circa  $k_{intr} = 10^2 \text{ min}^{-1}$  bei pH 6.8 (Wüthrich, 1986, Abschnitt 2.3), so daß Amidprotonen, die nach zwanzig Minuten noch im Spektrum zu sehen waren, als langsam austauschend angenommen wurden. Da langsam austauschende Protonen zwar auf eine Wasserstoffbrücke hinweisen, aber keine Information über den jeweiligen Akzeptor liefern, wurden die Akzeptoren aus bereits relativ gut über NOESY- und Diederwinkel definierten Strukturenscharen bestimmt. Eine Wasserstoffbrücke war dabei über einen

$O \cdots H^N$ -N-Winkel von  $> 120^\circ$  und einen Abstand zwischen Amidproton und Akzeptorsauerstoff von  $< 2.3 \text{ \AA}$  definiert. Wasserstoffbrücken wurden in die Strukturberechnung einbezogen, wenn entweder eine eindeutige Wasserstoffverbrückung in mindestens 50% der Strukturen vorlag, oder, falls mehr als ein Akzeptorsauerstoff gefunden wurde, die Wasserstoffbrücke in 100% der Strukturen beobachtet werden konnte. Für jede auf diese Weise ermittelte Wasserstoffbrücke wurden zwei Abstandsbeschränkungen,  $d(H^N \cdots O) < 2.3 \text{ \AA}$  sowie  $d(N \cdots O) < 3.3 \text{ \AA}$ , eingeführt (Kraulis *et al.*, 1989).

### 2.2.5. Diederwinkel aus Kopplungskonstanten.

2.2.5.1. *Theorie.* Der Wert der  ${}^3J$  skalaren Kopplungskonstante hängt über die sogenannte Karplus-Gleichung

$${}^3J = A \cos^2\theta + B \cos\theta + C$$

von dem Diederwinkel  $\theta$  ab. Die Konstanten  $A$ ,  $B$  und  $C$  sind dabei spezifisch für die jeweils an den Bindungen beteiligten Kerne (Cavanagh, 1996, Abschnitt 8.2.1).

Informationen über den Rückgratwinkel  $\phi$  kann aus der  ${}^3J(H^N H^\alpha)$ -Kopplungskonstante gewonnen werden, wobei sich  $\theta$  und  $\phi$  um  $60^\circ$  unterscheiden

$$\theta = \phi - 60^\circ .$$

Mit den Parametern aus Pardi *et al.* (1984) erhält man folgende Karplus-Beziehung

$${}^3J(H^N H^\alpha) = 6.4 \text{ Hz} \cos^2(\phi - 60^\circ) - 1.4 \text{ Hz} \cos(\phi - 60^\circ) + 1.9 \text{ Hz}.$$

Problematisch bei der Umsetzung der Kopplungskonstante in Beschränkungen für Diederwinkel ist zum einen, daß dem Wert der Kopplungskonstante nicht immer eindeutig ein  $\phi$ -Winkel zugeordnet werden kann. Zum anderen können intramolekulare Bewegungen zu einer Mittelung der Diederwinkel führen. Die Mittelung resultiert in einer  ${}^3J(H^N H^\alpha)$ -Kopplungskonstante von circa 7 Hz. In der Praxis verwendet man daher nur Kopplungskonstanten kleiner 6 Hz und größer 8 Hz (Cavanagh, 1996, Abschnitt 8.2.1), die typisch für Helices beziehungsweise  $\beta$ -Faltblattkonformationen sind. In der Strukturberechnung wurden Reste mit Kopplungskonstanten  ${}^3J(H^N H^\alpha) \leq 6 \text{ Hz}$  auf Winkel zwischen  $-80^\circ \leq \phi \leq -40^\circ$  beziehungsweise  ${}^3J(H^N H^\alpha) \geq 8 \text{ Hz}$  auf Winkel zwischen  $-160^\circ \leq \phi \leq -80^\circ$  beschränkt (Schweimer *et al.*, 2002).

2.2.5.2. *Experimentelle Bestimmung.* Die Messung der  ${}^3J(H^N H^\alpha)$ -Kopplungskonstante von NusACTD(339–495) erfolgte mit einer  ${}^{15}\text{N}$ -markierten Probe unter Standardbedingungen

(s. 2.1.1.3) bei einer Konzentration von 550  $\mu\text{M}$  in 500  $\mu\text{l}$  über das HNHA-Experiment (Vuister und Bax, 1993; Zhang *et al.*, 1997) (Aufnahmeparameter s. 2.2.1).

Die Kopplungskonstanten ergeben sich aus den Intensitäten der Diagonal- und Kreuzresonanzen  $I_d$  und  $I_c$  über folgende Beziehung

$$\frac{I_c}{I_d} = -\tan^2\left(2\pi^3 J(H^N H^\alpha)\delta\right)$$

wobei  $\delta$  das Zeitintervall für die Entwicklung der Kopplung darstellt, das hier  $\delta = 12.3$  ms betrug. Die erhaltenen Kopplungskonstanten wurden mit einem Faktor von 1.1 multipliziert, der den Beitrag der Selbstentkopplung durch Relaxation in größeren Proteinen berücksichtigt (Vuister und Bax, 1993; Cavanagh, 1996, Abschnitt 8.2.1).

## 2.2.6. Globale Beschränkungen aus dipolaren Restkopplungen.

2.2.6.1. *Theorie.* Die dipolare Restkopplung  $D^{ij}$  hängt vom gyromagnetischen Verhältnis  $\gamma$  der beiden Kerne  $i$  und  $j$ , dem Ordnungsparameter  $S$ , dem Abstand zwischen den Kernen  $r$  und dem Winkel  $\theta$  zwischen dem internuklearen Verbindungsvektor und dem statischen Magnetfeld ab:

$$(1) \quad D^{ij} = -\frac{\mu_0 \gamma_i \gamma_j \hbar}{(2\pi r)^3} \cdot S \cdot \left\langle \frac{3 \cos^2 \theta - 1}{2} \right\rangle$$

Dabei steht  $\mu_0$  für die magnetische Feldkonstante, die Klammern um den winkelabhängigen Term repräsentieren die Mittelung der Kopplung durch die schnelle Reorientierungsbewegung der Moleküle (zusammengefaßt in Prestegard *et al.* (2004) und Bax *et al.* (2001)). Da in Proteinen die Abstände zwischen kovalent verknüpften Atomen bekannt sind und in Bereichen regulärer Sekundärstrukturen  $S$  näherungsweise eins beträgt, kann man die Winkelinformation für die Strukturbestimmung nutzen.

In der Regel lassen sich für Moleküle in Lösung dipolare Kopplungen nicht beobachten, da die schnelle Rotation der Moleküle über die Mittelung des winkelabhängigen Terms zu Null führt. Daher muß zur Messung der dipolaren Restkopplungen zunächst eine Vorzugsorientierung der Moleküle erzeugt werden. Dies läßt sich zum Beispiel durch filamentöse Phagen oder Bicellen erreichen, die unter bestimmten Bedingungen eine flüssig-kristalline Phase bilden und über elektrostatische und/oder sterische Mechanismen eine teilweise Orientierung der Moleküle bewirken (Bax *et al.*, 2001).

Die Orientierung des Moleküls relativ zum statischen Magnetfeld  $B_0$  kann durch den Orientierungstensor  $A'$  beschrieben werden. Der Orientierungstensor ist eine reale und symmetrische Matrix und daher immer diagonalisierbar. Anschaulich entsprechen die Komponenten  $A'_{zz}, A'_{yy}, A'_{xx}$  im Hauptachsensystem den Wahrscheinlichkeiten für die  $z$ -,  $y$ - und  $x$ -Achse sich parallel zum statischen Magnetfeld  $B_0$  zu befinden (Bax, 2003).

Da für die dipolaren Kopplungen nur die Unterschiede in den Hauptkomponenten entscheidend sind, verwendet man den Orientierungstensor in seiner spurlosen Form  $A$ . Mit  $A_{zz} > A_{yy} > A_{xx}$  erhält man  $D^{ij}$  in Abhängigkeit von den Polarkoordinaten des Vektors  $i-j$  im Koordinatensystem des diagonalisierten Orientierungstensors

$$(2) \quad D^{ij}(\phi, \theta) = -\frac{3}{4} \cdot \frac{\mu_0 \gamma_i \gamma_j h}{(2\pi r)^3} [(3 \cos^2 \theta - 1) A_{zz} + \sin^2 \theta \cos 2\phi (A_{xx} - A_{yy})].$$

Unter Definition einer Axialkomponente  $D_a$

$$D_a = \frac{3}{4} \cdot \frac{\mu_0 \gamma_i \gamma_j h}{(2\pi r)^3} \cdot A_{zz},$$

die in der Regel auf die Wechselwirkung des N-H<sup>N</sup>-Vektors normalisiert wird, und einer Radialkomponente  $R$

$$R = \frac{2}{3} \frac{A_{xx} - A_{yy}}{A_{zz}}$$

läßt sich Gleichung (2) zu

$$(3) \quad D^{ij}(\phi, \theta) = D_a [(3 \cos^2 \theta - 1) + \frac{3}{2} R \sin^2 \theta \cos 2\phi]$$

umformen. Der Winkel  $\theta$  ist dabei der Winkel zwischen der  $z$ -Achse des Orientierungstensors und des  $i-j$ -Vektors, während der Winkel  $\phi$  die Position der Projektion des  $i-j$ -Vektors auf die  $x-y$ -Ebene relativ zur  $x$ -Achse des Tensors beschreibt.

**2.2.6.2. Experimentelle Bestimmung.** Dipolare Restkopplungen führen wie skalare Kopplungen im Spektrum zu einer Aufspaltung der Resonanzen, so daß nur die Gesamtkopplung beobachtet werden kann. Da skalare und dipolare Restkopplungen additiv sind, lassen sich die dipolaren Restkopplungen aus der Differenz der in orientiertem Medium gemessenen Gesamtkopplung und der in isotropem Medium gemessenen skalaren Kopplung ermitteln (Prestegard *et al.*, 2004).

Die Aufnahme der skalaren Kopplungen zwischen dem Amidproton und –stickstoff erfolgte mit  $^{15}\text{N}$  markiertem NusACTD(339–495) unter Standardbedingungen (s. 2.1.1.3) bei einer Konzentration von  $550\ \mu\text{M}$  in  $500\ \mu\text{l}$ . Die Messung der entsprechenden Gesamtkopplung wurde in Gegenwart einer Endkonzentration von  $10\ \text{mg/ml}$  Pf1 Phagen (Hansen *et al.*, 1998) der Firma Asla (Riga, Lettland) durchgeführt.

Sowohl die skalare als auch die Gesamtkopplung zwischen dem Amidproton und –stickstoff  $^1J(\text{H}^N\text{N})$  beziehungsweise  $^1J(\text{H}^N\text{N})+^1D(\text{H}^N\text{N})$  wurden aus einer Serie von  $J$ -modulierten  $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren bestimmt (Tjandra *et al.*, 1996). Dabei wird die Zeit für die Evolution der Kopplung  $2\Delta$  variiert und die resultierenden Intensitätsunterschiede an eine gedämpfte Schwingung angepaßt

$$I(2\Delta) = C \cos(2\pi\ ^1J(\text{H}^N\text{N}) \Delta) \exp(-2\Delta/R_2^*)$$

wobei  $C$  die Amplitude der Schwingung und  $R_2^*$  den Beitrag der transversalen Relaxationsrate und nicht aufgelöster langreichweitiger  $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -Kopplungen berücksichtigt. Insgesamt wurden 24 Spektren mit  $2\Delta = 6.986\ \text{ms}$  bis  $2\Delta = 29.986\ \text{ms}$  aufgenommen, wobei  $2\Delta$  in  $1\ \text{ms}$ -Schritten inkrementiert wurde. Die restlichen Aufnahmeparameter der  $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren wurden innerhalb der Serie nicht verändert und sind in Tab. 2.4 gegeben.

Dimension <sup>1</sup>	Kern	SW (Hz) <sup>2</sup>	TD <sup>3</sup>	SFO (MHz) <sup>4</sup>	Referenz
$^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC					
F1	$^{15}\text{N}$	1978.5	192		
F2 (16)	$^1\text{H}$	9615.4	512	800	(Tjandra <i>et al.</i> , 1996)

**Tabelle 2.4:** Aufnahmeparameter des für die Bestimmung der dipolaren Kopplungen verwendeten  $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC-Experiments.

<sup>1</sup>In der Aufnahmedimension ist zusätzlich die Zahl der akkumulierten Wiederholungen des Experiments angegeben. <sup>2</sup>Spektrale Breite. <sup>3</sup>Zahl der realen Datenpunkte. <sup>4</sup>Magnetfeldstärke in Protonenresonanzfrequenz.

2.2.6.3. *Bestimmung der Axial- und Radialkomponente des Orientierungstensors.* Für eine genügend große Anzahl von Kopplungen lassen sich unter der Annahme einer isotropen Verteilung der  $i$ - $j$ -Verbindungsvektoren die Hauptkomponenten des Orientierungstensors aus der Häufigkeitsverteilung der dipolaren Kopplungen ablesen (Clore *et al.*, 1998).

Aus Gleichung (3) ist zu entnehmen, daß die Extremwerte der Häufigkeitsverteilung  $D^{ij}(\theta, \phi)$  der  $z$ -Achse ( $\theta = 0^\circ$ ) und der  $y$ -Achse ( $\theta = 90^\circ; \phi = 90^\circ$ ) des Orientierungstensors entsprechen.



Die  $x$ -Achse ( $\theta = 90^\circ; \phi = 0^\circ$ ) des Tensors erhält man aus dem wahrscheinlichsten Wert des Histogramms.

Da für einen spurlosen Tensor  $A_{xx} + A_{yy} + A_{zz} = 0$  gilt, erhält man aus Gleichung (3) und den Definitionen für  $D_a$  und  $R$

$$(4) \quad \begin{aligned} A_{zz} &= 2D_a \\ A_{yy} &= -D_a (1 + 1.5R) \\ A_{xx} &= -D_a (1 - 1.5R) , \end{aligned}$$

so daß man  $D_a$  und  $R$  aus den Extremwerten der Verteilung, die  $A_{zz}$  und  $A_{yy}$  entsprechen, abschätzen kann (Bax *et al.*, 2001).

Für die Erzeugung der Histogramme und für die Strukturberechnung wurden ausschließlich Kopplungen mit Werten des  $HetNOE > 0.65$  berücksichtigt.

### 2.3. Strukturberechnung

Das Ziel der Strukturberechnung ist, Konformationen des jeweiligen Moleküls zu erzeugen, die die experimentellen Daten möglichst gut wiedergeben. In dieser Arbeit wurde zu diesem Zweck eine *simulated annealing*-Strategie eingesetzt (Leach, 1999, 8.7.1). *Simulated annealing*-Methoden basieren auf Molekulardynamik-Simulationen (Leach, 1999, Kapitel 6), die durch numerische Integration der Newton'schen Bewegungsgleichung eine Trajektorie mit immer neuen Konformationen des Moleküls liefern und so eine Möglichkeit darstellen, den Konformationsraum der Peptidkette abzusuchen. Um ein ausreichendes Absuchen des Konformationsraums zu gewährleisten, führt man dem System durch Ankopplung an ein Wärmebad zunächst Energie zu, die man im Laufe der Simulation wieder entzieht. Die Kräfte, die in der Simulation auf das jeweilige Atom wirken, werden durch ein empirisches Kraftfeld bestimmt, das aus einer Potentialfunktion und den zugehörigen Parametern (Leach, 1999, Kapitel 3) besteht. Die Potentialfunktion dient gleichzeitig als Gütefunktion, die die Konformation des Systems in Bezug auf die Erfüllung der Meßdaten bewertet.

**2.3.1. Das Kraftfeld.** Als Kraftfeld wurde das CHARMM–Kraftfeld (Brooks *et al.*, 1983) mit den Standardparametern aus der XPLOR–Distribution (*parallhdg.pro* beziehungsweise *topallhdg.pro*) eingesetzt, wobei die Prolin–Winkel gemäß (Neudecker *et al.*, 2004) modifiziert wurden.

Im Gegensatz zu freien Molekulardynamik–Simulationen enthalten die zur Strukturberechnung aus NMR–Daten eingesetzten Potentialfunktionen zusätzliche Strafterme, die zu große Abweichungen der ermittelten Konformationen von den experimentellen Daten verhindern sollen (Leach, 1999, Abschnitt 8.7.2). Die Potentialfunktion  $E_{pot}$

$$E_{pot} = E_{chem} + \omega E_{exp}$$

besteht daher neben dem Term  $E_{chem}$ , der auf physikalischen Modellvorstellungen beruht, aus einem zusätzlichen Term  $E_{exp}$ , in dem die experimentellen Beschränkungen zusammengefaßt sind. Der Faktor  $\omega$  erlaubt eine Skalierung der beiden Terme zueinander.

Für die Simulationen in dieser Arbeit wurden folgende Beiträge für  $E_{chem}$  berücksichtigt (Neudecker, 2003, Abschnitt 3.2.):

**Bindungslängen:** Die Kräfte zwischen Atomen, die kovalent über eine Bindung verknüpft sind, werden über ein harmonisches Potential beschrieben

$$E_{bond} = \sum k_d (d - d_0)^2 .$$

Dabei sind die empirisch ermittelten Parameter  $k_d$  und  $d_0$  die Kraftkonstante der Bindung beziehungsweise die ideale Bindungslänge, während  $d$  für den tatsächlichen Abstand der beiden Atome steht. Die Summe wird über alle kovalenten Bindungen gebildet.

**Bindungswinkel:** Die Abweichungen der Bindungswinkel  $\theta$  von den idealen Bindungswinkeln  $\theta_0$  werden analog der Bindungslängen über ein harmonisches Potential mit der Kraftkonstante  $k_a$  modelliert

$$E_{angle} = \sum k_a (\theta - \theta_0)^2 ,$$

wobei die Summation über sämtliche Bindungswinkel erfolgt.

**Diederwinkel, Planarität und Chiralität:** Ein Diederwinkel  $\phi$  ist der Winkel zwischen zwei Ebenen, die aus den Atomen  $i, j$  und  $k$  sowie  $j, k, l$  gebildet werden. Je nachdem,

ob lediglich eine oder mehrere bevorzugte Konformationen der Ebenen zueinander existieren, wird entweder ein harmonisches Potential

$$E_{impr}^{sing} = \sum k_i (\phi - \phi_0)^2$$

oder ein periodisches Potential der Form

$$E_{impr}^{per} = \sum k_i (1 + (\cos(n\phi - \phi_0)))$$

verwendet. Zu beachten ist, daß der Referenzwinkel  $\phi_0$  in dem periodischen Potential derart gewählt wird, daß das Potential an dieser Stelle maximal wird. Neben der Kraftkonstante für die *improper*-Winkel  $k_i$  gibt der zusätzliche Parameter  $n$  die Periodizität an, zum Beispiel ist entsprechend der Symmetrie bei der Rotation einer Methylgruppe  $n = 3$ . Das Gesamtpotential ergibt sich aus der Summe der beiden Terme

$$E_{impr} = E_{impr}^{sing} + E_{impr}^{per} .$$

Auf diese Weise können zum Beispiel die Torsionswinkel der Seitenketten, die trans-Konformation des Proteinrückgrats, sowie die Planarität der Peptidbindung oder aromatischer Seitenketten modelliert werden.

**nicht-kovalente Wechselwirkungen:** Während in freien Molekulardynamik-Simulationen meistens elektrostatische und van-der-Waals Wechselwirkungen in die Potentialfunktion eingehen, wurde hier lediglich der abstossende Teil der van-der-Waals Wechselwirkung mit der Kraftkonstante  $A$  in der Potentialfunktion berücksichtigt:

$$E_{vdW} = \begin{cases} \frac{1}{2} \sum_{i,j=1}^N A \left( (sr_{min})^2 - r_{ij}^2 \right)^2 & \text{falls } r_{ij} < sr_{min} \\ 0 & \text{falls } r_{ij} > sr_{min} \end{cases}$$

Das konventionelle 12-6 Lennard-Jones-Potential (Leach, 1999, 3.9.3) führt wegen der  $r^{-12}$ -Abhängigkeit bei geringen Atomabständen zu großen Gradienten, die Probleme bei Minimierungen nach sich ziehen (Brünger, 1992, Abschnitt 4.3.1.). Der Skalierungsfaktor  $s$  ermöglicht eine Variation des van-der-Waals-Radius  $r_{min}$  für verschiedene Phasen der Simulation.

Die experimentellen Daten wurden über die folgenden Potentialfunktionen in das Kraftfeld integriert:

**Abstandsbeschränkungen:** Zur Beschreibung der Abstandsbeschränkungen aus NOESY- oder H/D-Austauschexperimenten kam folgendes Potential zum Einsatz

$$E_{NOE} = \begin{cases} k_{NOE}(r - r_l)^2 & \text{falls } r < r_l \\ 0 & \text{falls } r_l \leq r \leq r_u \\ k_{NOE}(r - r_u)^2 & \text{falls } r_u < r < r_s \\ k_{NOE} \left( a + \frac{b}{r - r_u} + c(r - r_u) \right) & \text{falls } r \geq r_s \end{cases}$$

Dabei stellen  $r_l$  und  $r_u$  die experimentell bestimmte Unter- und Obergrenze für den Abstand  $r$  dar,  $k_{NOE}$  ist die Kraftkonstante. Für NMR-spektroskopisch nicht unterscheidbare Protonen, zum Beispiel Protonen in Methylgruppen, entspricht der Abstand  $r$  der mit  $\frac{1}{r^6}$  gewichteten Summe über alle möglichen Atomabstände  $r_{ij}$ :

$$\frac{1}{r^6} = \sum \frac{1}{r_{ij}^6}$$

Das Potential ist für  $r < r_l$  und  $r > r_u$  quadratisch. Für große Abstände wird anstelle des quadratischen ein lineares Potential mit der Steigung  $c$  verwendet. Die Parameter  $a$  und  $b$  sind über

$$a = -2c(r_s - r_u) + 3(r_s - r_u)^2$$

und

$$b = c(r_s - r_u)^2 - 2(r_s - r_u)^3$$

gegeben, wobei  $r_s$  der Abstand ist, bei dem die quadratische in eine lineare Form übergeht. In dieser Arbeit wurden Werte von  $c = 2 \text{ \AA}$ ,  $r_s = r_u + 1.0 \text{ \AA}$  und  $r_l = 0.0 \text{ \AA}$  eingesetzt. Einige NOE-Signale wurden als mehrdeutige Beschränkungen, sogenannte *ambiguous restraints*, in der Strukturberechnung verwendet. Eine ausführliche Beschreibung, wie mehrdeutige Beschränkungen in die Strukturberechnung einbezogen werden können, findet sich in Nilges (1995).

**Diederwinkel:** Die Beschränkungen der Torsionswinkel  $\phi$  aus skalaren Kopplungskonstanten wurden über ein beidseitig quadratisches Kastenpotential mit der Kraftkonstante

$k_{dih}$  in die Strukturberechnung eingebracht

$$E_{cdih} = \begin{cases} k_{cdih}(\phi - \phi_l)^2 & \text{falls } \phi < \phi_l \\ 0 & \text{falls } \phi_l \leq \phi \leq \phi_u \\ k_{cdih}(\phi - \phi_u)^2 & \text{falls } \phi > \phi_u \end{cases}$$

wobei  $\phi_l$  und  $\phi_u$  für die untere und obere Grenze des experimentell bestimmten Torsionswinkels stehen.

**Dipolare Kopplungskonstanten:** Die gemessenen dipolaren Kopplungskonstanten  $D$  können mit der Kraftkonstante  $k_{sani}$  direkt über

$$E_{sani} = \sum k_{sani} \left( D - \left( D_a(3 \cos^2\theta - 1) + \frac{3}{2}R \sin^2\theta \cos 2\phi \right) \right)^2$$

in der Strukturberechnung eingesetzt werden (Tjandra *et al.*, 1997), wobei die Summe über sämtliche gemessenen dipolaren Kopplungen zu bilden ist. Die Anisotropie  $D_a$  und die Rhombizität  $R$  des Orientierungstensors wurden dabei aus der Verteilung der ermittelten dipolaren Kopplung abgeschätzt (s. 2.2.6.3). Der Polarwinkel  $\theta$  und der Azimutalwinkel  $\phi$  sind die Winkel zwischen dem entsprechenden Bindungsvektor und einem externen, willkürlichen Koordinatensystem. Das externe Koordinatensystem wird über ein Pseudomolekül aus vier Atomen X, Y, Z und O definiert, dessen X–O–, Y–O– und Z–O–Achsen orthogonal zueinander sind und die  $x$ –,  $y$ – und  $z$ –Achsen des Orientierungstensors repräsentieren. Das externe Koordinatensystem kann sich während der Moleküldynamiksimulation frei drehen.

**Datenbankterm:** Der Datenbankterm beschränkt das Absuchen des Konformationsraums auf tatsächlich in hochaufgelösten Kristallstrukturen beobachtete Diederwinkelwerte (Kuszewski *et al.*, 1996; Kuszewski und Clore, 2000). Datenbankterme können für verschiedene Verteilungen erstellt werden (Clore und Gronenborn, 1998), in dieser Arbeit wurde unter anderem ein Datenbankpotential für den  $\phi$ – $\psi$ – $\chi_1$ –Raum verwendet (außer für Alanin und Glycin). Prinzipiell digitalisiert man die Winkel zunächst in  $8^\circ$ – $10^\circ$ –Intervallen, so daß man zum Beispiel im Fall von  $10^\circ$ –Schritten für den  $\phi$ – $\psi$ – $\chi_1$ –Raum  $36 \cdot 36 \cdot 36 = 46656$   $\phi$ – $\psi$ – $\chi_1$ –Kombinationen erhält. Anschließend berechnet man für jede der  $\phi$ – $\psi$ – $\chi_1$ –Kombinationen die Häufigkeit  $P_i$ , mit der sie in den Röntgenkristallstrukturen auftritt. Diese Wahrscheinlichkeiten können mit der Boltzmann–Verteilung in ein Potential  $E_{DB}$  umgewandelt werden

$$E_{DB}(i) = -k_{DB}(\ln P_i),$$

wobei  $k_{DB}$  ein Skalierungsfaktor ist. Um die Differenzierbarkeit des diskreten Potentials zu erreichen, werden die berechneten Potentiale durch eine Linearkombination von Gauss-Funktionen ersetzt (Kuszewski und Clore, 2000; Neudecker *et al.*, 2001).

**2.3.2. Molekulardynamik–Simulationen.** Die Strukturberechnungen wurden mit dem Programm XPLOR–NIH 1.2.1 (Schwieters *et al.*, 2003) auf einem Linux–Cluster aus PCs mit 3.06 GHz Pentium IV Prozessoren durchgeführt. Die in den unterschiedlichen Phasen der Strukturberechnung verwendeten Protokolle sind im Anhang C.2 abgedruckt.

2.3.2.1. *Erstellung der Startstruktur.* Die Protokolle *generate\_structure.inp* und *generate\_template.inp* erzeugen die Struktur– beziehungsweise Koordinaten–Dateien für die Moleküldynamiksimulationen.

2.3.2.2. *Simulated annealing I.* Ausgehend von der generierten, gestreckten Startstruktur wird ein dreistufiges *simulated annealing* gemäß dem Protokoll *sa.inp* durchgeführt. In der Hochtemperaturphase wird über eine Molekulardynamik–Simulation für 120 ps bei 2000 K mit einer Schrittweite von 3 fs der Konformationsraum intensiv abgesucht. Anschließend wird das System in 120 ps auf 1000 K, und in weiteren 60 ps auf 100 K abgekühlt. Die Schrittweite für die Abkühlsschritte beträgt 2 fs, die Temperatur wird in 50 K–Intervallen herabgesetzt. Zuletzt nimmt das Protokoll eine 1000 Schritte umfassende Powell–Minimierung vor, wobei für die letzten 500 Schritte auf das Datenbankpotential in der Potentialfunktion verzichtet wird.

2.3.2.3. *Simulated annealing II.* Im Gegensatz zu der ersten Simulated Annealing–Strategie dient dieses Protokoll (*refine.inp*) zur Verfeinerung der aus dem *simulated annealing I* erhaltenen Strukturen. Die Hochtemperaturphase besteht daher aus einer Molekulardynamik–Simulation für lediglich 25 ps bei 1000 K. Die Abkühlung erfolgt über eine Dauer von 50 ps in 25 K–Schritten auf 300 K. Für beide Phasen wird eine Schrittweite von 0.5 fs verwendet. Auch dieses Protokoll führt zum Abschluß eine Powell–Minimierung durch, wobei die ersten 1000 Schritte mit, die letzten 200 Schritte ohne Datenbankterm gerechnet werden.

In beiden *simulated annealing*–Protokollen erfolgt die Zuordnung prochiraler Gruppen über *floating chirality* (Folmer *et al.*, 1997). Dabei wird die Kraftkonstante für *improper*–Winkel an Methylen– und Isopropylgruppen auf Null gesetzt, so daß die Protonen beziehungsweise die Methylgruppen an einem prochiralen Zentrum zwischen der *proS*– und *proR*–Konfiguration wechseln können. Die jeweilige Konfiguration wird aufgrund des Wertes der Zielfunktion ausgewählt.

**2.3.3. Analyse der Strukturen.** Die Analyse der Strukturen erfolgte mit Procheck 3.5.4 (Laskowski *et al.*, 1993; Morris *et al.*, 1992) sowie XPLOR–NIH 1.2.1 (Schwieters *et al.*, 2003).

Zur Berechnung des elektrostatischen Potentials von NusA(353–416) und NusA(431–490) wurde der in Molmol (Version 2K2) (Koradi *et al.*, 1996) implementierte CalcPot-Algorithmus (Nicholls und Honig, 1990) eingesetzt. Die Salzkonzentration betrug 150 mM, der Salzradius 2 Å. Für den minimalen Abstand zwischen dem Molekül und der Wasserbox, in der das elektrische Potential berechnet wird, wurde ein Wert von 15 Å gewählt. Die dielektrischen Konstanten für Protein und Wasser wurden auf 2 beziehungsweise 80 gesetzt. Die Partialladungen wurden dem Amber94 Kraftfeld (Cornell *et al.*, 1995) entnommen, wobei die Seitenkette von H353 als ungeladen betrachtet wurde. Die Berechnung der Helixwinkel erfolgte ebenfalls mit Molmol. Dazu ermittelt Molmol für jede Helix die Orientierung des Vektors, der sich durch eine Anpassung an die Schweratome mit der Methode der kleinsten Fehlerquadrate ergibt. Die Winkel lassen sich anschließend aus den relativen Orientierungen der Vektoren zueinander ermitteln.

## 2.4. Dynamik: Experimente und Analysen

**2.4.1. Hydrodynamische Radien aus der Translationsdiffusion.** Zur Messung der Translationsdiffusion wurden Proben mit unmarkiertem NusACTD(339–495) mit Konzentrationen von 175 µM, 350 µM und 700 µM in jeweils 100% D<sub>2</sub>O, 50 mM NaCl, 10 mM Kaliumphosphat (pH 6.4) sowie 0.5% Dioxan hergestellt. Die Messungen wurden bei 298 K und 400 MHz mit einer Reihe von 1D-PG-SLED Experimenten (Jones *et al.*, 1997) mit jeweils fünf Wiederholungen durchgeführt. Die spektrale Breite betrug jeweils 6410.3 Hz, die Anzahl der realen Datenpunkte 8192 und die Zahl der Wiederholungen 16. In jeder Serie wurden bei gleichbleibender Gradientenlänge von 7 ms und Echolänge von 70 ms die relativen Gradientenstärken  $G_{\text{rel}}$  von 5% bis 50% in Inkrementen von 5% und von 50% bis 100% in 6.25% Inkrementen variiert. Zur Auswertung der Proteinsignale wurden zunächst die Integrale in den Bereichen von 0.32 ppm bis 0.00 ppm sowie von 7.34 ppm bis 6.74 ppm ermittelt und jeweils über eine nichtlineare 2-Parameteranpassung

$$I_{\text{Protein}}(G_{\text{rel}}) = I_{\text{Protein}}(0) \cdot e^{-d_{\text{Protein}} \cdot G_{\text{rel}}^2}$$

mit Matlab 6.5.0.180913a Release 13 (The Mathworks Inc., Natick, MA, USA) die Konstante  $I_{\text{Protein}}(0)$  und die Zerfallsrate des Proteinsignals,  $d_{\text{Protein}}$  bestimmt, die proportional zum Translationskoeffizienten  $D_{\text{trans}}$  ist (Wilkins *et al.*, 1999). Da die Signale der Referenzsubstanz Dioxan von den Signalen des Proteins überlagert waren, wurden anschließend mit bekanntem  $d_{\text{Protein}}$  die Konstanten  $I_{\text{Protein}}$  und  $I_{\text{Dioxan}}$  sowie der relative Translationsdiffusionskoeffizient von Dioxan  $d_{\text{Dioxan}}$  aus den im Bereich von 3.50 ppm–4.10 ppm bestimmten Integralen über die Anpassung an folgende Funktion

$$I_{\text{total}}(G_{\text{rel}}) = I_{\text{Protein}}(0) \cdot e^{-d_{\text{Protein}} \cdot G_{\text{rel}}^2} + I_{\text{Dioxan}}(0) \cdot e^{-d_{\text{Dioxan}} \cdot G_{\text{rel}}^2}$$

ermittelt.

Über die indirekte Proportionalität des Translationsdiffusionskoeffizienten  $D_{\text{trans}}$  und hydrodynamischem Radius  $r_{\text{H}}$  gemäß der Stokes–Beziehung für die Translationsdiffusion (Korzhnev *et al.*, 2001)

$$D_{\text{trans}} = \frac{k_{\text{B}}T}{6\pi\eta r_{\text{H}}}$$

mit der Viskosität  $\eta$ , der Temperatur  $T$  und der Boltzmann–Konstante  $k_{\text{B}}$  erhält man den hydrodynamischen Radius des Proteins  $r_{\text{H}}^{\text{Protein}}$  aus dem bekannten hydrodynamischen Radius des Dioxans  $r_{\text{H}}^{\text{Dioxan}} = 2.12 \text{ \AA}$  und den gemessenen relativen Diffusionskoeffizienten

$$r_{\text{H}}^{\text{Protein}} = \frac{d_{\text{Dioxan}} \cdot r_{\text{H}}^{\text{Dioxan}}}{d_{\text{Protein}}}$$

(Wilkins *et al.*, 1999).

Für NusACTD(339–495) wurden für jedes der fünf Experimente die hydrodynamischen Radien des Proteins aus den zwei getrennten Bereichen im Spektrum berechnet und der Mittelwert sowie die Standardabweichung bestimmt.

#### 2.4.2. Dynamik aus $^{15}\text{N}$ –Relaxationsdaten.

2.4.2.1. *NMR–Proben.* Die Relaxationsdaten wurden mit  $^{15}\text{N}$ –markiertem NusACTD(339–495) unter Standardbedingungen (s. 2.1.1.3) aufgenommen, wobei zwei Proben mit unterschiedlichen Konzentrationen (Probe 1:  $630 \mu\text{M}$ ; Probe 2:  $500 \mu\text{M}$ ) eingesetzt wurden. Probe 1 wurde ausschließlich bei 600 MHz, Probe 2 bei 400 MHz und 600 MHz Protonenfrequenz vermessen. Die Aufnahmeparameter der NMR–Experimente bei 600 MHz waren für beide Proben identisch.

2.4.2.2. *NMR–Experimente.* Die longitudinalen und transversalen Relaxationsraten  $R_1$  und  $R_2$  und der  $\{^1\text{H}\}$ – $^{15}\text{N}$ –heteronukleare NOE *HetNOE* wurden mit Pulssequenzen aus Dayie und Wagner (1994) bestimmt, wobei zur Wasserunterdrückung gepulste Feldgradienten verwendet wurden. Die Sättigung der Protonen im gesättigten Subspektrum des *HetNOE* erfolgte über eine Reihe von  $120^\circ$ –Pulsen im Abstand von 5 ms während einem Zeitintervall von 3 s. Die Intervalle für die Bestimmung der Relaxationsraten wurden gemäß Jones *et al.* (1996) gewählt:

**R1: 600 MHz:** 6.88 (3x), 752.33 (3x), 1020.48 (3x), 1288.63 (3x) ms

**R2: 600 MHz:** 16.96 (3x), 84.4 (3x), 101.76(3x), 118.72 (3x) ms

**R1: 400 MHz:** 8.36 (3x), 697.1 (3x), 950.9(3x), 1197.4 (3x) ms

**R2: 400 MHz:** 16.83 (3x), 84.16 (3x), 100.99 (3x), 117.82 (3x) ms

Die restlichen Aufnahmeparameter sind in Tabelle 2.5 zusammengefaßt.



Dimension <sup>1</sup>	Kern	SW (Hz) <sup>2</sup>	TD <sup>3</sup>	FS <sup>4</sup> (MHz)	D1 <sup>5</sup> (s)
<i><sup>1</sup>H–<sup>15</sup>N–heteronuklearer NOE</i>					
F1	<sup>15</sup> N	989.4	192		
F2 (32)	<sup>1</sup> H	4789.3	512	400	3
<i>Transversale Relaxationsraten</i>					
F1	<sup>15</sup> N	989.4	192		
F2 (16)	<sup>1</sup> H	4789.3	512	400	2
<i>Longitudinale Relaxationsraten</i>					
F1	<sup>15</sup> N	989.4	192		
F2 (16)	<sup>1</sup> H	4789.3	512	400	2
<i><sup>1</sup>H–<sup>15</sup>N–heteronuklearer NOE</i>					
F1	<sup>15</sup> N	1484.0	192		
F2 (32)	<sup>1</sup> H	7183.9	512	600	3
<i>Transversale Relaxationsraten</i>					
F1	<sup>15</sup> N	1484.0	192		
F2 (16)	<sup>1</sup> H	7183.9	512	600	2
<i>Longitudinale Relaxationsraten</i>					
F1	<sup>15</sup> N	1484.0	160		
F2 (16)	<sup>1</sup> H	7183.9	512	600	2

**Tabelle 2.5:** Aufnahmeparameter der Relaxations-Experimente.

<sup>1</sup>In der Aufnahmedimension ist zusätzlich die Zahl der Wiederholungen des Experiments angegeben. <sup>2</sup>Spektrale Breite. <sup>3</sup>Zahl der realen Datenpunkte. <sup>4</sup>Magnetfeldstärke in Protonenresonanzfrequenz. <sup>5</sup>Wiederholungsintervall zwischen den Experimenten.

2.4.2.3. *Bestimmung der transversalen und longitudinalen Relaxationsraten.* Transversale und longitudinale Relaxationsraten werden über eine Serie von <sup>1</sup>H<sup>15</sup>N–HSQC Spektren mit einem veränderlichen Zeitintervall  $\delta$  aufgenommen, in dem die Relaxation stattfindet. Aus der exponentiellen Abhängigkeit der Signalintensitäten  $I$  von  $\delta$  kann für jedes getrenntes Signal im <sup>1</sup>H<sup>15</sup>N–HSQC über die Anpassung an

$$I = I_0 e^{-Rt}$$

die Rate  $R$  sowie die Intensität  $I_0$  bestimmt werden. Die Signalintensitäten wurden mit dem Programm NMRview5.0.4 (Johnson und Blevins, 1994) bestimmt, wobei als Maß für die Signalintensität die maximale Signalthöhe innerhalb eines gewählten Bereichs verwendet wurde. Die Anpassung der Signalintensitäten an die Exponentialfunktion wurde mit dem Programm Curvefit (Palmer A.G. III, *unveröffentlicht*) durchgeführt, wobei die Fehler der Raten über die Jackknife-Methode (Mosteller und Tukey, 1977, Kapitel 8.4.) ermittelt wurden.

2.4.2.4. *Bestimmung des  $\{^1H\}$ - $^{15}N$  heteronuklearen NOEs.* Der *HetNOE* ergibt sich aus dem Verhältnis der Intensitäten im gesättigten  $I_{sat}$  und ungesättigten  $I_{unsat}$  Subspektrum

$$HetNOE = \frac{I_{sat}}{I_{unsat}} .$$

Als Fehler wurde die Standardabweichung der aus drei (Probe 2, 600 MHz) beziehungsweise zwei (Probe 2, 400 MHz; Probe 1, 600 MHz) unabhängigen Messungen ermittelten *HetNOE*-Werte verwendet (Renner *et al.*, 2002).

2.4.2.5. *Theorie.* Zentral für die Interpretation von  $^{15}N$ -Relaxationsdaten ist die Leistungsdichte  $J(\omega)$ , da sie das Bindeglied zwischen den beobachteten Größen  $R_2$ ,  $R_1$  und *HetNOE* und der Bewegung des N-H<sup>N</sup>-Vektors im Rückgrat darstellt. Durch die Bewegung des N-H<sup>N</sup>-Vektors in Lösung kommt es in der Umgebung des  $^{15}N$ -Kerns zu Variationen der Magnetfeldstärke, die bei bestimmten Frequenzen  $\omega$  zu Relaxation führen. Die stochastische Bewegung des N-H<sup>N</sup>-Vektors läßt sich durch eine Korrelationsfunktion beschreiben, die die Bewegung durch eine oder mehrere Zeitkonstanten charakterisiert. Durch Fouriertransformation erhält man aus den Zeitkonstanten die Verteilung der Frequenzen beziehungsweise die Leistungsdichte  $J(\omega)$ .

In dem betrachteten Zweispin-System aus Amidproton und -stickstoff erfolgt die Relaxation des  $^{15}N$ -Kerns in einem diamagnetischen Protein primär durch die Modulation der Dipol-Dipol-Wechselwirkung zwischen dem  $^1H$ - und  $^{15}N$ -Kern und der Anisotropie der chemischen Verschiebung des  $^{15}N$ -Kerns. Unter Umständen beinhaltet die transversale Relaxationsrate einen Beitrag  $R_{ex}$  aus chemischem Austausch. Der Begriff *chemischer Austausch* umfaßt alle Prozesse in denen ein Kern zwischen zwei oder mehr Umgebungen hin- und herwechselt, die sich durch unterschiedliche chemische Verschiebung, Relaxation oder Kopplungskonstanten auszeichnen (Lian und Roberts, 1995, Kapitel 6). Die Relaxationsraten sowie der *HetNOE* sind durch folgende

Gleichungen gegeben

$$\begin{aligned}
 R_1 &= (d^2/4) [3J(\omega_N) + J(\omega_H - \omega_N) + 6J(\omega_H + \omega_N)] \\
 &\quad + c^2 J(\omega_N) \\
 R_2 &= (d^2/8) [4J(0) + 3J(\omega_N) + J(\omega_H - \omega_N) \\
 &\quad + 6J(\omega_H) + 6J(\omega_H + \omega_N)] \\
 &\quad + (c^2/6) [4J(0) + 3J(\omega_N)] + R_{ex} \\
 HetNOE &= 1 + (d^2/4) (\gamma_H/\gamma_N) [6J(\omega_H + \omega_N) - J(\omega_H - \omega_N)]/R_1
 \end{aligned}
 \tag{5}$$

mit  $d = (\mu_0 \gamma_H \gamma_N h)/(r_{NH}^3 8\pi^2)$  und  $c = \sqrt{1/3} \Delta\sigma \omega_N$ . Dabei steht  $\mu_0$  für das magnetische Moment,  $\gamma$  für das gyromagnetische Verhältnis,  $h$  für das Plank'sche Wirkungsquantum,  $\Delta\sigma$  für die Anisotropie der chemischen Verschiebung des  $^{15}\text{N}$ -Kerns und  $r_{NH}$  für den Abstand zwischen Amidproton und -stickstoff (Kay *et al.*, 1989).

2.4.2.6. *Interpretation mit der RSDM-Methode.* Die Relaxationzeiten  $R_1$ ,  $R_2$  und der *HetNOE* hängen vom Wert der Leistungsdichte bei den Frequenzen  $\omega_H + \omega_N$ ,  $\omega_H$ ,  $\omega_H - \omega_N$ ,  $\omega_N$  und  $\omega = 0$  ab. Typische Leistungsdichten für gefaltete Proteine sind im Bereich der Protonenresonanz  $\omega_H$  annähernd konstant. Damit können die Linearkombinationen von  $J(\omega_H + \omega_N)$ ,  $J(\omega_H - \omega_N)$  und  $J(\omega_H)$  zu einem mittleren Wert von  $J(0.87\omega_H)$  zusammengefaßt und die Gleichungen (5) auf drei Unbekannte reduziert werden, weshalb diese Technik als *reduced spectral density mapping* (RSDM) bezeichnet wird. Mit

$$\sigma_{NH} = R_1(HetNOE - 1)\gamma_N/\gamma_H$$

erhält man

$$\begin{aligned}
 J(0.87\omega_H) &= 4\sigma_{NH}/(5d^2) \\
 J(\omega_N) &= (4R_1 - 5\sigma_{NH})/(3d^2 + 4c^2) \\
 J_e(0) &= (6R_2 - 3R_1 - 2.72\sigma_{NH})/(3d^2 + 4c^2)
 \end{aligned}
 \tag{6}$$

wobei  $J_e(0)$  eventuell vorhandene Austauschsterme enthält.

Stehen  $R_{2-}$ ,  $R_{1-}$  und *HetNOE*-Daten bei zwei Feldern, 400 MHz und 600 MHz, zur Verfügung, können über die Feldabhängigkeit des chemischen Austausches eine um die Austauschterme korrigierte Leistungsdichte  $J(0)$

$$(7) \quad J(0) = (1/\beta) \{ [1/T_2^{600} - \kappa 1/T_2^{400}] - (3d^2/8)[J(\omega_N^{600}) - \kappa J(\omega_N^{400})] - (c_{600}^2/2)[J(\omega_N^{600}) - J(\omega_N^{400})] - (13d^2/8)[J(0.87\omega_H^{600}) - \kappa J(0.87\omega_H^{400})] \}$$

mit  $\kappa = (\omega_H^{600}/\omega_H^{400})^2$  sowie  $\beta = (d^2/2)(1 - \kappa)$  und die Austauschterme bei beiden Feldstärken

$$(8) \quad R_{ex}^{400} = 1/T_2^{400} - (d^2/2 + 2c_{400}^2/3)J(0) - (3d^2/2 + c_{400}^2/2)J(\omega_N^{400}) - (13d^2/8)J(0.87\omega_H^{400})$$

$$R_{ex}^{600} = \kappa R_{ex}^{400}$$

berechnet werden (Farrow *et al.*, 1995).

Die Auswertung der Relaxationsdaten von NusACTD(339–495) bei 400 MHz und 600 MHz Protonenfrequenz erfolgte mit einer für zwei Felder erweiterten Version des Programms mapsdf (Brendan Duggan, *unveröffentlicht*), wobei die N–H<sup>N</sup>–Bindungslänge 1.02 Å und die chemische Verschiebungsanisotropie -170 ppm betragen.

2.4.2.7. *Berechnung der Diffusionstensoren aus den  $\frac{R_2}{R_1}$ -Verhältnissen.* Die Reorientierung starrer Teilchen in Lösung läßt sich abhängig von der Form des Moleküls durch unterschiedliche Diffusionsmodelle beschreiben (Fushman *et al.*, 2004). Kugelförmige Moleküle werden dabei durch ein isotropes Diffusionsmodell mit einer Rotationskorrelationszeit  $\tau_c$  repräsentiert. Nicht-sphärische Teilchen lassen sich durch einen axialsymmetrischen oder anisotropen Diffusionstensor mit Eigenwerten  $D_{\perp}$  und  $D_{\parallel}$  beziehungsweise  $D_{zz}$ ,  $D_{yy}$ ,  $D_{xx}$  darstellen.

Zur Beschreibung der Abweichungen des Diffusionstensors von der Kugelform werden üblicherweise die Anisotropie  $\zeta$  sowie die Rhombizität  $\eta$  bestimmt (Fushman *et al.*, 2004). Für einen prolaten Tensor ( $D_{zz} - D_{yy} > D_{yy} - D_{xx}$ ) erhält man

$$\zeta = \frac{2D_{zz}}{D_{xx} + D_{yy}}$$

und

$$\eta = \frac{3}{2} \cdot \frac{D_{yy} - D_{xx}}{D_{zz}} \cdot \frac{\zeta}{\zeta - 1},$$

für einen oblaten Tensor ( $D_{zz} - D_{yy} < D_{yy} - D_{xx}$ ) lauten die Gleichungen

$$\zeta = \frac{2D_{xx}}{D_{zz} + D_{yy}}$$

und

$$\eta = \frac{3}{2} \cdot \frac{D_{yy} - D_{zz}}{D_{xx}} \cdot \frac{\zeta}{1 - \zeta}.$$

Anisotropien resultieren in  $\zeta > 1$  (Prolat) oder  $\zeta < 1$  (Oblat). Die Rhombizität nimmt Werte von  $0 < \eta < 1$  (Prolat) beziehungsweise  $0 > \eta > -1$  (Oblat) an. Werte von  $\eta \sim 0$  weisen auf eine kleine Rhombizität hin, während sich starke Rhombizitäten in Werten von  $\eta \sim 1$  oder  $\eta \sim -1$  manifestieren. Zusätzlich wurde jeweils über den Rotationsdiffusionskoeffizient  $D_{\text{iso}}$  die effektive Rotationskorrelationszeit  $\tau_{\text{c,eff}}$

$$(9) \quad D_{\text{iso}} = \frac{D_{xx} + D_{yy} + D_{zz}}{3}$$

$$\tau_{\text{c,eff}} = \frac{1}{6D_{\text{iso}}} = \frac{1}{2(D_{xx} + D_{yy} + D_{zz})}$$

berechnet. Entsprechende Ausdrücke gelten für den Spezialfall des prolat axialsymmetrischen Tensors ( $D_{\parallel} = D_{zz}$ ,  $D_{\perp} = D_{yy} = D_{xx}$ ) beziehungsweise des oblat axialsymmetrischen Tensors ( $D_{\parallel} = D_{xx}$ ,  $D_{\perp} = D_{yy} = D_{zz}$ ).

Für starre Reste können die Diffusionstensoren aus den  $\frac{R_2}{R_1}$ -Verhältnissen abgeschätzt werden (Kay *et al.*, 1989), wobei die Leistungsdichte je nach Symmetrie des Tensors eine unterschiedliche Form annimmt (Lee *et al.*, 1997). Die Leistungsdichte des anisotropen Diffusionstensors ist über

$$(10) \quad J(\omega) = \frac{2}{5} \sum_{j=1}^5 A_{ji} \frac{\tau_j}{1 + \omega^2 \tau_j^2}$$

mit

$$\tau_1 = [4D_{xx} + D_{yy} + D_{zz}]^{-1}$$

$$\tau_2 = [D_{xx} + 4D_{yy} + D_{zz}]^{-1}$$

$$\tau_3 = [D_{xx} + D_{yy} + 4D_{zz}]^{-1}$$

$$\tau_4 = [6D_{\text{iso}} + 6(D_{\text{iso}}^2 - L^2)^{1/2}]^{-1}$$

$$\tau_5 = [6D_{\text{iso}} - 6(D_{\text{iso}}^2 - L^2)^{1/2}]^{-1}$$

und

$$\begin{aligned}
A_{1i} &= 3y_i^2 z_i^2 \\
A_{2i} &= 3x_i^2 z_i^2 \\
A_{3i} &= 3x_i^2 y_i^2 \\
A_{4i} &= (1/4)\{3(x_i^4 + y_i^4 + z_i^4) - 1\} - (1/12)\{\delta_x(3x_i^4 + 6y_i^2 z_i^2 - 1) \\
&\quad + \delta_y(3y_i^4 + 6x_i^2 z_i^2 - 1) + \delta_z(3z_i^4 + 6x_i^2 y_i^2 - 1)\} \\
A_{5i} &= (1/4)\{3(x_i^4 + y_i^4 + z_i^4) - 1\} + (1/12)\{\delta_x(3x_i^4 + 6y_i^2 z_i^2 - 1) \\
&\quad + \delta_y(3y_i^4 + 6x_i^2 z_i^2 - 1) + \delta_z(3z_i^4 + 6x_i^2 y_i^2 - 1)\}
\end{aligned}$$

gegeben, wobei  $e_i = (x_i, y_i, z_i)$  die Richtungskosinus repräsentieren und  $D_{\text{iso}} = \text{Spur}(D)/3$ ,  $L^2 = (D_{xx}D_{yy} + D_{xx}D_{zz} + D_{yy}D_{zz})/3$ , sowie  $\delta_k = (D_{kk} - D_{\text{iso}})/(D_{\text{iso}}^2 - L^2)^{1/2}$  für  $k = x, y, z$ .

Im axialsymmetrischen Fall vereinfacht sich die Leistungsdichte wesentlich zu

$$(11) \quad J(\omega) = \frac{2}{5} \sum_{j=1}^3 A_{ji} \frac{\tau_j}{1 + \omega^2 \tau_j^2}$$

mit

$$\begin{aligned}
\tau_1 &= (6D_{\perp})^{-1} \\
\tau_2 &= (5D_{\perp} + D_{\parallel})^{-1} \\
\tau_3 &= (2D_{\perp} + 4D_{\parallel})^{-1}
\end{aligned}$$

und

$$\begin{aligned}
A_{1i} &= (1/4)(3 \cos^2 \theta_i - 1)^2 \\
A_{2i} &= 3 \sin^2 \theta_i \cos^2 \theta_i \\
A_{3i} &= (3/4) \sin^4 \theta_i .
\end{aligned}$$

Dabei ist  $\theta_i$  der Winkel zwischen dem N-H<sup>N</sup>-Bindungsvektor für den  $i$ -ten Spin und der einzigen Achse des Diffusionstensors.

Im isotropen Fall reduziert sich die Leistungsdichte zu

$$(12) \quad J(\omega) = \frac{2}{5} \left( \frac{\tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2} \right)$$

mit einer einzigen Rotationskorrelationszeit  $\tau_c = (6D_{\text{iso}})^{-1}$ . Im Gegensatz zum anisotropen oder axialsymmetrischen Fall besteht hier keine Winkelabhängigkeit, das heißt  $J(\omega)$  ist unabhängig von der Orientierung des N–H<sup>N</sup>–Bindungsvektors.

Die Koordinaten des Referenzmoleküls sind normalerweise in einem willkürlichen Koordinatensystem angegeben und müssen daher für das anisotrope oder axialsymmetrische Modell in das Hauptachsensystem des Diffusionstensors transformiert werden. Die Orientierung des willkürlichen Koordinatensystems relativ zum Hauptsachsensystem wird im anisotropen beziehungsweise axialsymmetrischen Fall durch die Euler–Winkel  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  beziehungsweise  $\theta$  und  $\phi$  definiert.

Die Anpassung der Relaxations– und Strukturdaten an die unterschiedlichen Diffusionsmodelle, sowie die Auswahl des jeweils passenden Diffusionsmodells (s. 2.4.2.8) erfolgte getrennt für jede Domäne bei jeweils 600 MHz und 400 MHz mit dem Programm Tensor2.0 (Dosset *et al.*, 2000). Als Strukturinformation für die beiden Domänen wurden die Strukturen von NusA(353–416) und NusA(431–490) mit der niedrigsten Zielfunktion verwendet. Die Zahl der Monte Carlo Simulationen betrug 100, der Winkel zwischen CSA- und Dipol-Dipol-Wechselwirkungen wurde auf 0°, der Abstand zwischen Stickstoff und Amidproton auf 1.02 Å gesetzt.

2.4.2.8. *Auswahl des Diffusionsmodells.* Für die Auswahl des passenden Diffusionsmodells wurde eine Modellselektion über Vergleich von  $\chi^2$ - und  $F$ -Statistiken durchgeführt. Die Grundlagen wurden dabei Press *et al.* (1990, Kapitel 13) entnommen.

Eine Anzahl von  $N$  Datenpunkten  $y_1 \dots y_N$  soll an ein Modell mit  $M$  Parametern  $a_1 \dots a_M$  angepaßt werden. Das Modell ist als explizite Funktion der Parameter und der abhängigen Variablen gegeben:

$$y = y(x; a_1 \dots a_M)$$

Ein allgemeiner Ansatz, die Parameter an die gemessenen Daten anzupassen, ist die Minimierung einer Ziel– oder Gütefunktion, die zum Beispiel als Summe der kleinsten Fehlerquadrate formuliert werden kann

$$\sum_{i=1}^N (y_i - y(x_i; a_1 \dots a_M))^2 .$$

Sind die Fehler  $\sigma_i$  der Meßwerte bekannt und sind diese unterschiedlich, ist eine Zielfunktion sinnvoller, in der jeder Summand mit dem Fehler der Meßgröße gewichtet ist:

$$(13) \quad \chi_{exp}^2 = \sum_{i=1}^N \left( \frac{y_i - y(x_i, a_1 \dots a_M)}{\sigma_i} \right)^2$$

Der Wert der Zielfunktion  $\chi_{exp}^2$  wird dabei umso kleiner, je weniger sich die gemessenen Meßwerte  $y_i$  von den Modellwerten  $y(x_i, a_1 \dots a_M)$  unterscheiden und je größer der Fehler ist.

Für verschiedene Meßwerte  $y_i$  erhält man unterschiedliche  $\chi_{exp}^2$ -Werte, deren Verteilung etwas über die Güte des Modells aussagt. Für lineare Modelle mit unabhängigen und normalverteilten Fehlern  $\sigma_i$  läßt sich zeigen, daß die Verteilungsfunktion der Minimalwerte der Gütefunktion die  $\chi^2$ -Verteilung für  $\nu = N - M$  Freiheitsgrade ist.

Die Güte des Modells läßt sich mit der  $\chi^2$ -Verteilung abschätzen:

$$Q(\nu, x < \chi_{exp}^2) = 1 - P(\nu, x < \chi_{exp}^2) = 1 - \frac{1}{2^n \Gamma(n)} \int_0^{\chi_{exp}^2} v^{n-1} e^{-v/2} dv$$

$P$  ist die Wahrscheinlichkeit, daß ein  $\chi^2$ -Wert  $x$  mit  $x > 0$  besser als der berechnete  $\chi_{exp}^2$ -Wert ist, wobei  $n = \nu/2$ .  $Q$  ist die Wahrscheinlichkeit daß ein  $\chi^2$ -Wert zufällig genauso schlecht oder schlechter als der mit Gleichung (13) berechnete Wert ist. Je kleiner  $Q$ , desto weniger passen Modell und Daten zueinander. Der Erwartungswert der  $\chi^2$ -Verteilung liegt bei  $\chi^2 = \nu$ , die Standardabweichung beträgt  $\sqrt{2\nu}$ . Gelegentlich wird auch die reduzierte  $\chi^2$ -Verteilung berechnet, das heißt die Verteilung von  $\chi^2/\nu$ , deren Erwartungswert gleich eins ist. Für  $Q > 0.1$  ist das Modell statistisch haltbar, für  $Q > 0.001$  kann das Modell verwendet werden, wenn die Fehler nicht normalverteilt oder unterschätzt worden sind, für  $Q < 0.001$  sollten das Modell oder die Berechnungsmethode der Parameter überprüft werden (Press *et al.*, 1990, Kapitel 13). Oft legt man vor der Analyse einen kritischen Wert von  $P$ , zum Beispiel  $P = 0.1$  fest. Man bestimmt den zugehörigen kritischen  $\chi^2$ -Wert,  $\chi_{0.1}^2$ , und vergleicht diesen Wert mit dem berechneten  $\chi_{exp}^2$ -Wert. Ist  $\chi_{exp}^2 < \chi_{0.1}^2$  wird das Modell mit einem 90 % Vertrauensbereich akzeptiert, im anderen Fall verworfen.

Angewendet auf die Bestimmung der Parameter der verschiedenen Diffusionsmodelle aus dem  $\frac{R_2}{R_1}$ -Verhältnis sowie den experimentellen Fehlern  $\sigma$  für  $i$  Spins, ist das Minimum der folgenden Gütefunktion gesucht (Dossset *et al.*, 2000):

$$(14) \quad \chi_{exp}^2 = \sum_i \left( \frac{R_2^{meas}/R_1^{meas} - R_2^{calc}/R_1^{calc}}{\sigma} \right)^2$$

Die hochgestellten Indizes *meas* und *calc* stehen dabei für die gemessenen beziehungsweise die nach der Parameterbestimmung aus dem Modell zurückgerechneten Relaxationsdaten.

Ein Modell mit zusätzlichen Parametern kann einen geringeren  $\chi_{exp}^2$ -Wert erreichen, als ein Modell mit weniger Parametern. Ein direkter Vergleich von  $\chi_{exp}^2$ -Werten reicht daher nicht aus, um zwischen Modellen mit einer unterschiedlichen Anzahl von Parametern eine Auswahl treffen zu



können und ist auch nicht sinnvoll, weil die  $\chi_{exp}^2$ -Werte  $\chi^2$ -Verteilungen mit anderen Freiheitsgraden angehören. Mit der F-Statistik ist es möglich,  $\chi^2$ -verteilte Zufallsvariablen  $\chi_1^2$  und  $\chi_2^2$  mit unterschiedlichen Freiheitsgraden  $\nu_1$  und  $\nu_2$  zu vergleichen. Dazu definiert man einen  $F$ -Wert, der das Verhältnis der reduzierten  $\chi^2$ -Werte darstellt (Bronstein *et al.*, 1995)

$$F = \left( \frac{\chi_1^2}{\nu_1} \right) / \left( \frac{\chi_2^2}{\nu_2} \right) .$$

Die  $F$ -Werte unterliegen einer Fisher- oder F-Verteilung, mit der geprüft werden kann, ob ein kleinerer  $\chi^2$ -Wert bei einem Modell mit mehr Parametern beziehungsweise weniger Freiheitsgraden auf eine bessere Übereinstimmung von Modell und Daten oder auf zusätzliche Parameter zurückzuführen ist. Analog zur  $\chi^2$ -Verteilung legt man einen Vertrauensbereich fest und bestimmt den  $F$ -Wert zu diesem Vertrauensbereich, zum Beispiel  $F_{0.2}$ . Für  $F$ -Werte  $F > F_{0.2}$  ist ein kleinerer  $\chi^2$ -Wert mit einem Vertrauensbereich von 80 % nicht nur auf zusätzliche Parameter zurückzuführen.

Ein Modell wird folglich angenommen, wenn der berechnete  $\chi^2$ -Wert kleiner als der  $\chi^2$ -Wert für den gewählten Vertrauensbereich ist, und kein Modell mit mehr Parametern existiert, das einen kleineren und aufgrund der  $F$ -Statistik signifikant besseren  $\chi^2$ -Wert aufweist.

2.4.2.9. *Hydrodynamische Modelle.* Theoretische Diffusionsparameter von NusA(353–416) und NusA(431–490) wurden mit dem Programm HYDRONMR (Version 5a) (Garcia *et al.*, 2000) ermittelt. Auf molekularer Ebene läßt sich die Diffusion eines Teilchens durch Reibung zwischen dem Teilchen und dem umgebenden Lösungsmittel beschreiben. HYDRONMR nähert dazu zunächst das Molekül durch Kugeln an, indem alle Schweratome durch eine Kugel mit dem Radius  $R$  ersetzt werden. Der Kugelradius berücksichtigt den Beitrag der Hydrathülle und ist deshalb größer als der entsprechende kovalente Radius. Dieses primäre Kugelmodell (*bead model*) wird über weitere Schritte in ein Schalenmodell (*shell model*) umgewandelt (Garcia *et al.*, 2000). Letztendlich wird dabei die Oberfläche des primären Modells durch kleinere Kugeln (*minibeads*) mit dem Radius  $\sigma$  ausgekleidet und eine Extrapolation des *minibead*-Radius auf Null durchgeführt. Zu diesem Zweck wird der Radius  $\sigma$  in einem Bereich von  $\sigma_{max}$  bis  $\sigma_{min}$  in  $n$  Schritten verkleinert. Der Radius des anfänglichen *bead models* betrug 3.1 Å, der Radius der *minibeads* wurde in  $n = 6$  Schritten von 2.0 Å auf 1.0 Å herabgesetzt. Für die Temperatur wurde ein Wert von  $T = 298$  K, für die Viskosität ein Wert von  $\eta = 0.001$  Pas verwendet.

2.4.2.10. *Interdomänendynamik mit dem erweiterten modellfreien Ansatz.* Ein physikalisches Modell zur Beschreibung der Dynamik von zwei über einen Linker verbundenen Domänen

wurde von Baber *et al.* (2001) vorgeschlagen. Langsame und schnelle Bewegungen werden darin relativ zu dem Diffusionstensor einer dynamisch gemittelten Durchschnittsstruktur bestimmt, wobei die langsame Bewegung der Domänenbewegung entspricht. Die einfachste Leistungsdichte, die eine anisotrope Gesamtbewegung, sowie Bewegungen auf schnellen und langsamen Zeitskalen näherungsweise beschreibt, erhält man durch Multiplikation der Korrelationsfunktion des entsprechenden Diffusionsmodells mit der von Clore *et al.* (1990) vorgeschlagenen Korrelationsfunktion (Baber *et al.*, 2001). Die internen Bewegungen werden dabei jeweils durch einen Ordnungsparameter  $S$  und eine Zeitskala  $\tau$  charakterisiert, wobei die tiefgestellten Indices  $s$  und  $f$  für die langsame beziehungsweise schnelle Bewegung stehen

$$C(t) = S_f^2 S_s^2 + (1 - S_f^2) e^{-t/\tau_f} + (S_f^2 - S_f^2 S_s^2) e^{-t/\tau_s} .$$

Unter der Annahme einer axialsymmetrischen globalen Reorientierung und einer vernachlässigbaren Zeitskala für die schnelle Bewegung  $\tau_f$  erhält man durch Fouriertransformation die entsprechende Leistungsdichte zu

$$(15) \quad J(\omega) = \sum_{j=1}^3 A_{ji} \left( S_f^2 S_s^2 \frac{\tau_j}{1 + (\omega\tau_j)^2} + S_f^2 (1 - S_s^2) \frac{\tau_{s,j}}{1 + (\omega\tau_{s,j})^2} \right) .$$

Die Koeffizienten für den  $i$ -ten Spin  $A_{ji}$  und Korrelationszeiten  $\tau_j$  entsprechen den Parametern des axialsymmetrischen Modells (Gl. (11), S. 54), für  $\tau_{s,j}$  gilt

$$\frac{1}{\tau_{s,j}} = \frac{1}{\tau_s} + \frac{1}{\tau_j} .$$

Da dieses Modell neben der Domänenbewegung keine anderen langsamen Bewegungen oder Austauschsterme berücksichtigt, wurden Reste mit zusätzlicher interner Dynamik (s. 3.2.4.2) von der Analyse ausgeschlossen. Für die verbleibenden Reste wurden die Parameter in Gleichung (15) aus den Relaxationsdaten bei 400 MHz und 600 MHz mit dem Programm Model-free4.16 (Palmer A.G., *unveröffentlicht*) über die Minimierung der Größe

$$\chi_{exp}^2 = \left( \frac{R_2^{meas} - R_2^{calc}}{\Delta R_2} \right)^2 + \left( \frac{R_1^{meas} - R_1^{calc}}{\Delta R_1} \right)^2 + \left( \frac{HetNOE^{meas} - HetNOE^{calc}}{\Delta HetNOE} \right)^2$$

bestimmt. Die hochgestellten Indizes *meas* und *calc* stehen dabei für die gemessenen beziehungsweise die nach der Parameterbestimmung aus dem Modell zurückgerechneten Relaxationsdaten, die  $\Delta$ -Werte repräsentieren die experimentell ermittelten Fehler. Dazu wurde zunächst der Parameterraum systematisch abgesucht (*Grid-Search*) und anschließend eine Powell-Minimierung durchgeführt. Die Optimierung erfolgte getrennt für die beiden Domänen von

NusACTD(339–495), wobei als Strukturdaten die energieärmsten Strukturen von NusA(353–416) und NusA(431–490) verwendet wurden.

### 2.4.3. NMR–Titrationsen.

2.4.3.1. *Experimente.* Für die Titrationsmessungen wurden Aliquots einer konzentrierten Stammlösung von unmarkiertem  $\alpha$ CTD(233–329) oder  $\lambda$ N(1–53) zu anfänglich 500  $\mu$ l einer 500  $\mu$ M Lösung von  $^{15}$ N–markiertem NusACTD(339–495) hinzugefügt und nach jedem Titrations-schritt ein  $^1\text{H}^{15}\text{N}$ –HSQC (Tab. 2.6) aufgenommen.

Dimension <sup>1</sup>	Kern	SW (Hz) <sup>2</sup>	TD <sup>3</sup>	SF0 (MHz) <sup>4</sup>	Referenz
$^1\text{H}^{15}\text{N}$ –HSQC					
F1	$^{15}\text{N}$	1731.4	192		
F2 (16/32)	$^1\text{H}$	9124.1	512	700	(Mori <i>et al.</i> , 1995)

**Tabelle 2.6:** Aufnahmeparameter des für die Titrationsexperimente verwendeten  $^1\text{H}^{15}\text{N}$ –HSQC–Experiments.

<sup>1</sup>In der Aufnahmedimension ist zusätzlich die Zahl der akkumulierten Wiederholungen des Experiments angegeben. <sup>2</sup>Spektrale Breite. <sup>3</sup>Zahl der realen Datenpunkte. <sup>4</sup>Magnetfeldstärke in Protonenresonanzfrequenz.

Um Artefakte durch unterschiedliche Probenbedingungen von Titrand und Titrator auszuschließen, wurden beide Komponenten in Standardpuffer aufgenommen und vor der Titration zweimalig 4 h gegen 250 ml einer Lösung aus Standardpuffer (s. 2.1.1.3) dialysiert. Die Titration wurde solange fortgesetzt, bis keine Veränderungen der Signalhöhe oder Signalposition mehr im Spektrum beobachtet werden konnten. Als signifikant wurden dabei Veränderungen der Signalposition von 0.4 ppm in der  $^{15}\text{N}$ –Dimension sowie 0.05 ppm in der  $^1\text{H}$ –Dimension angenommen.

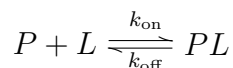
Es wurden folgende Stoffmengenverhältnisse untersucht:

$\alpha$ CTD(233–329)/ $^{15}\text{N}$ –NusACTD(339–495): 0, 0.5, 1.1, 1.5, 2.0, 2.5

$\lambda$ N(1–53)/ $^{15}\text{N}$ –NusACTD(339–495): 0, 0.4, 0.9, 1.3, 1.7, 2.1, 2.6, 3.0, 3.4, 3.8

2.4.3.2. *Auswertung der Titrationsexperimente.* Beobachtbare NMR–Parameter, wie die chemische Verschiebung eines Kerns, stellen zeitliche Ensemble–Mittelwerte über die Konformationen der Moleküle in Lösung dar. Die Zeitdauer der Mittelung relativ zu der Zeitskala des Prozesses bestimmt daher das Erscheinungsbild und den Informationsgehalt der Spektren (zusammengefaßt in Jardetzky und Roberts (1981, Kapitel 4)).

Unter der Annahme eines Zwei-Zustandssystems und einer Reaktion zweiter Ordnung für die Bindung eines Liganden  $L$  an ein Protein  $P$  erhält man folgendes Gleichgewicht für die Bildung des Komplexes  $PL$ :



Dabei stehen  $k_{\text{off}}$  und  $k_{\text{on}}$  für die Komplexbildungs- beziehungsweise Komplexzerfallsraten. Die Lebensdauer eines Kerns in den Zuständen  $PL$  und  $P$  beträgt damit

$$\tau_{PL} = \frac{1}{k_{\text{off}}}$$

beziehungsweise

$$\tau_P = \frac{1}{k_{\text{on}}[L]},$$

wobei festzuhalten ist, daß die Konzentration des freien Liganden  $[L]$  und damit  $\tau_P$  auch von der Konzentration des freien Proteins  $[P]$  abhängt. Analoge Betrachtungen gelten für den Liganden.

Ob man für den jeweils betrachteten Kern sowohl die Resonanzen für die freie als auch die ligandengebundene Form von  $P$ , oder einen Mittelwert über beide Formen im Spektrum beobachtet, wird durch die Umwandlungsrate  $k$

$$k = \frac{1}{\tau} = \frac{1}{\tau_L} + \frac{1}{\tau_{PL}}$$

relativ zu dem Unterschied der Resonanzfrequenzen  $\Delta\sigma$  (in Hz) im freien  $\sigma_P$  und gebundenen Zustand  $\sigma_{PL}$

$$\Delta\sigma = |\sigma_L - \sigma_{PL}|$$

bestimmt (Lian und Roberts, 1995, Abschnitt 6.2.).

Für  $k \ll \Delta\sigma$  spricht man von *langsamem Austausch*<sup>1</sup>, der sich phänomenologisch durch je ein Signal für die ligandengebundene und freie Form bei der jeweiligen Resonanzfrequenz auszeichnet. Im *schnellen Austausch* ist  $k \gg \Delta\sigma$  und man beobachtet ein Signal, dessen Lage im Spektrum dem populationsgewichteten Mittelwert der Resonanzfrequenzen der freien und ligandengebundenen Form entspricht. Erhöht man in einem Gedankenexperiment ausgehend vom schnellen Austausch für ein fixes  $\Delta\sigma$  die Austauschrate, beobachtet man eine zunehmende Verbreiterung der Resonanzen von freier und gebundener Form, bis es schließlich im *intermediären Austausch*  $k \sim \Delta\sigma$  zur Verschmelzung der beiden Signale kommt. Eine weitere Erhöhung führt zu zunehmend schärferen Linien, bis schließlich der Grenzfall des schnellen Austausches erreicht ist.

<sup>1</sup>gemeint ist *chemischer Austausch* (s. 2.4.2.5): Der Wechsel eines Kerns zwischen zwei Umgebungen, in denen er eine unterschiedliche Präzessionsgeschwindigkeit besitzt ist ein Spezialfall dieses Phänomens. Eine ausführliche Herleitung und Beschreibung der hier behandelten Fälle ist in Cavanagh (1996, Abschnitt 5.6) gegeben.

Im intermediären Austauschregime beobachtet man häufig eine derart starke Linienverbreiterung, daß die Signalhöhe unter die Detektionsgrenze abfällt (Wemmer und Williams, 1994). Eine Verbreiterung oder ein *Verschwinden* der Resonanzen während der Titration ist daher typisch für intermediären Austausch. Bei der Aufnahme von  $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren kann sich der Kern in Bezug auf  $\Delta\sigma$  in der  $^1\text{H}$ -Dimension und/oder der  $^{15}\text{N}$ -Dimension im intermediären Austausch befinden. Eine quantitative Auswertung über eine Linienformanalyse, wie sie in 1D-Spektren angewendet wird (Lian und Roberts, 1995, Abschnitt 4.1) ist daher in  $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren im allgemeinen nicht möglich.



## KAPITEL 3

### Ergebnisse

*E.coli* NusA besteht aus einem konservierten Kernbereich, der für die Bindung der großen Untereinheiten der RNAP sowie die Interaktion mit RNA verantwortlich ist, und einer carboxy-terminalen Domäne, die mit der  $\alpha$ -Untereinheit der RNAP und dem Protein N des Phagen  $\lambda$  wechselwirkt (s. 1.2.4).

Schwerpunkte dieser Arbeit waren zunächst die Aufklärung der Struktur in Lösung (s. 3.1) und die Untersuchung der Struktur und Dynamik (s. 3.2) von *E.coli* NusACTD mittels NMR-Spektroskopie. Zusätzlich wurden die Interaktionen mit  $\alpha$ CTD und  $\lambda$ N (s. 3.3) charakterisiert.

Für die dazu benötigten Proteine beziehungsweise Proteinfragmente NusACTD(339–495),  $\alpha$ CTD(233–329) sowie  $\lambda$ N(1–53) waren aus Vorarbeiten von Dr. S. Schwarz effektive Expressions- und Reinigungsstrategien vorhanden (s. 2.1.1.1).

#### 3.1. Strukturbestimmung der carboxyterminalen Domäne von *E.coli* NusA

Die Strukturaufklärung eines Proteins mittels NMR erfolgt in drei Schritten. Zunächst werden über Zuordnungsexperimente die Resonanzfrequenzen der magnetisch aktiven Atomkerne ermittelt (s. 3.1.1). In einem zweiten Schritt nutzt man diese Zuordnung, um experimentelle Beschränkungen für die Strukturberechnung zu erhalten. Unter anderem bestimmt man aus NOESY-Experimenten, welche Protonen räumlich benachbart sind. In der Praxis führen Protonen, die weniger als fünf Å voneinander entfernt sind, zu beobachtbaren NOE-Signalen. Die aus den NOESY-Experimenten gewonnenen Abstände zwischen Protonen (s. 3.1.5) stellen dabei die wichtigsten Beschränkungen zur Bestimmung einer unbekannt 3D-Struktur dar. Im letzten Schritt berechnet man aus den experimentellen Beschränkungen mit Methoden der Moleküldynamik eine Schar von möglichen Strukturen (s. 3.1.7).

Das wesentliche Problem bei der Interpretation der NOE-Signale ist die Frequenzdegeneration der Resonanzen, so daß eine eindeutige Zuordnung des Signals zu einem Abstand zwischen zwei Protonen häufig erst mit Hilfe der Struktur möglich ist. Schritt zwei und drei der Strukturaufklärung erfolgen daher iterativ. Die Zuordnung der NOE-Signale kann vor allem zu Beginn der

```

ppLhp1.G1G.ptApplhph          ppLhp1.G1G.ptApplhph
340-TVDDLQAKHQAEAAHAIDTF TKYLDI DEDFATVLVEEGFSTLEELAYVPMKELLEIEGLDEPTVEALRERAKNAL-414

ppLhp1.G1G.ptApplhph          ppLhp1.G1G.ptApplhph
415-ATIAQAQEEESLGDNKPADDLLNLE GVDRLAFKLAARGVCTLEDLAEQGIDDLADIEGLTDEKAGALIMAARNICWFGDEA-495

.:*:*:* * . *..***:** :.:* :**** : .. ** *:*

```

**Abbildung 3.1:** Die Sequenz von NusACTD weist eine Duplikation und Ähnlichkeit zu HhH-Motiven auf.

Die homologen Bereiche in NusACTD (gelb hinterlegt), NusA(364–414) und NusA(439–489), umfassen circa 51 Reste und zeigen eine Sequenzidentität von 37.3% beziehungsweise –ähnlichkeit von 33.3%. Der Sequenzvergleich zwischen den homologen Bereichen wurde mit CLUSTALW 1.82 (Thompson *et al.*, 1994) erstellt (\*: identisch; ’/’.: starke/schwache Ähnlichkeit). Über der Sequenz ist für die vermuteten HhH-Motive jeweils der 65%–Konsensus aus der SMART-Datenbank (Schultz *et al.*, 1998; Letunic *et al.*, 2004) dargestellt. Die für die Haarnadelschleife der HhH-Motive typische und in der Literatur als GhG-Muster (G: Gly; h: hydrophober Rest) bezeichnete Sequenz (Doherty *et al.*, 1996; Shao und Grishin, 2000) ist in blau hervorgehoben. Die Abkürzungen des Konsensus stehen für ’p’:CDEHKNQRST, ’l’:ILV, ’t’:ACDEGHKNQRST, ’h’:ACFGHIKLMRTVWY und ’.’:alle Aminosäuren.

Strukturberechnung erheblich erleichtert werden, wenn man bereits eine Vorstellung von der 3D-Struktur des Makromoleküls besitzt. Bei ausreichender Sequenzhomologie (> 30%; Aloy *et al.* (2003)) zu bekannten Proteinstrukturen kann man zum Beispiel die strukturelle Information eines Homologiemodells nutzen.

Die Sequenz von NusACTD (Abb. 3.1) zeichnet sich durch eine Duplikation in den Bereichen NusA(364–414) und NusA(439–489) aus (Mah *et al.*, 1999) (SwissProt-Eintrag: P03003; Apweiler *et al.* (2004); Boeckmann *et al.* (2003)). Jedoch konnte weder für die homologen Sequenzabschnitte noch für die Gesamtsequenz von NusACTD zum Zeitpunkt der Strukturberechnung eine geeignete Modellstruktur in der PDB (Protein Data Bank; Deshpande *et al.* (2005)) gefunden werden. Auf der Basis von Sequenzanalysen wird vermutet, daß NusACTD zwei (Mah *et al.*, 2000) beziehungsweise vier (Aravind *et al.*, 1999) HhH-Motive (HhH: *helix-hairpin-helix*; Doherty *et al.* (1996)) aufweist. Allerdings sind HhH-Motive sowohl auf Sequenz- als auch auf Strukturebene schlecht konserviert (Shao und Grishin, 2000), so daß sie für Homologiemodellierungen ungeeignet sind.

Aus diesem Grund wurde zunächst eine ausführliche Analyse der Sekundärstruktur durchgeführt, um dann mit eindeutigen NOE-Kreuzresonanzen zwischen den Sekundärstrukturelementen eine Vorstellung der räumlichen Struktur zu gewinnen. Information über Sekundärstruktur erhält man



zum einen aus den Werten der Resonanzfrequenzen selbst (s. 3.1.3.1), zum anderen aus der Messung des Deuteriumaustausches (s.3.1.3.2) oder aus skalaren Kopplungen (s. 3.1.3.3).

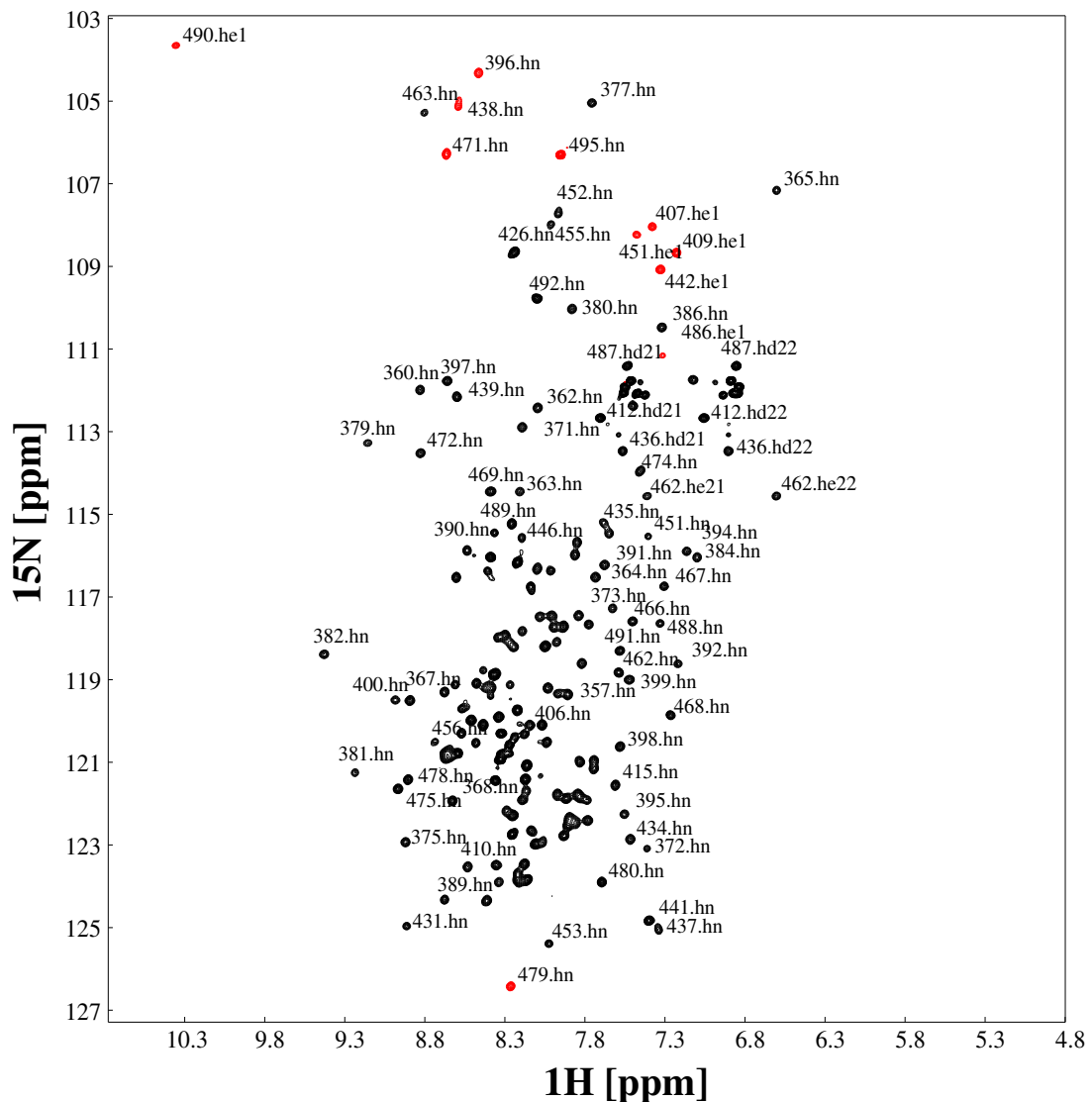
Zusätzlich können  $^{15}\text{N}$ -Relaxationsdaten Hinweise auf Domängengrenzen und flexible Bereiche geben. Die Kenntnis der Dynamik ist außerdem für die Interpretation von dipolaren Kopplungen und NOESY-Daten wichtig. Dipolare Kopplungen bieten am Ende der Strukturberechnung unter anderem eine Möglichkeit die Struktur zu verifizieren (s. 3.1.6).

**3.1.1. Charakterisierung des Systems.** Einen ersten Eindruck des Proteins vermitteln  $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC Spektren, in denen Korrelationen über  $^1\text{J}$ -Kopplungen zwischen Stickstoffen und direkt daran gebundenen Protonen zu sehen sind. Neben Stickstoff-Proton-Korrelationen in Asparagin-, Glutamin-, Arginin- und Tryptophan-Seitenketten sind vor allem Korrelationen zwischen Amidprotonen und -stickstoffen der Peptidgruppen des Proteinerückgrats von Interesse, da man für jede Aminosäure außer Prolin theoretisch ein Signal erhält und damit eine Sonde für die Umgebung nahezu jeder Aminosäure im Protein besitzt.

So sieht man zum Beispiel im  $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC (s. 3.2) von NusACTD(339–495) durch einfaches Abzählen der Signale, daß die Probe einheitlich ist und folglich keine störenden Fragmente oder Konformere durch cis-trans Isomerie der Proline vorliegen. Die weitestgehend identischen Signalhöhen beziehungsweise -breiten weisen auf ähnliche transversale Relaxationszeiten der Amidprotonen hin. Dies läßt auf eine gemeinsame Reorientierung der einzelnen Amidprotonen in Lösung und damit auf eine kompakte Struktur von NusACTD(339–495) schließen. Auch die relativ gute Dispersion der Amidprotonenresonanzen zwischen 6.6 ppm und 9.4 ppm ist ein Zeichen für ein gefaltetes Protein. Die geringe Anzahl der Resonanzen zwischen 9.0 ppm und 10.0 ppm deutet auf einen niedrigen Anteil an  $\beta$ -Strukturen hin.

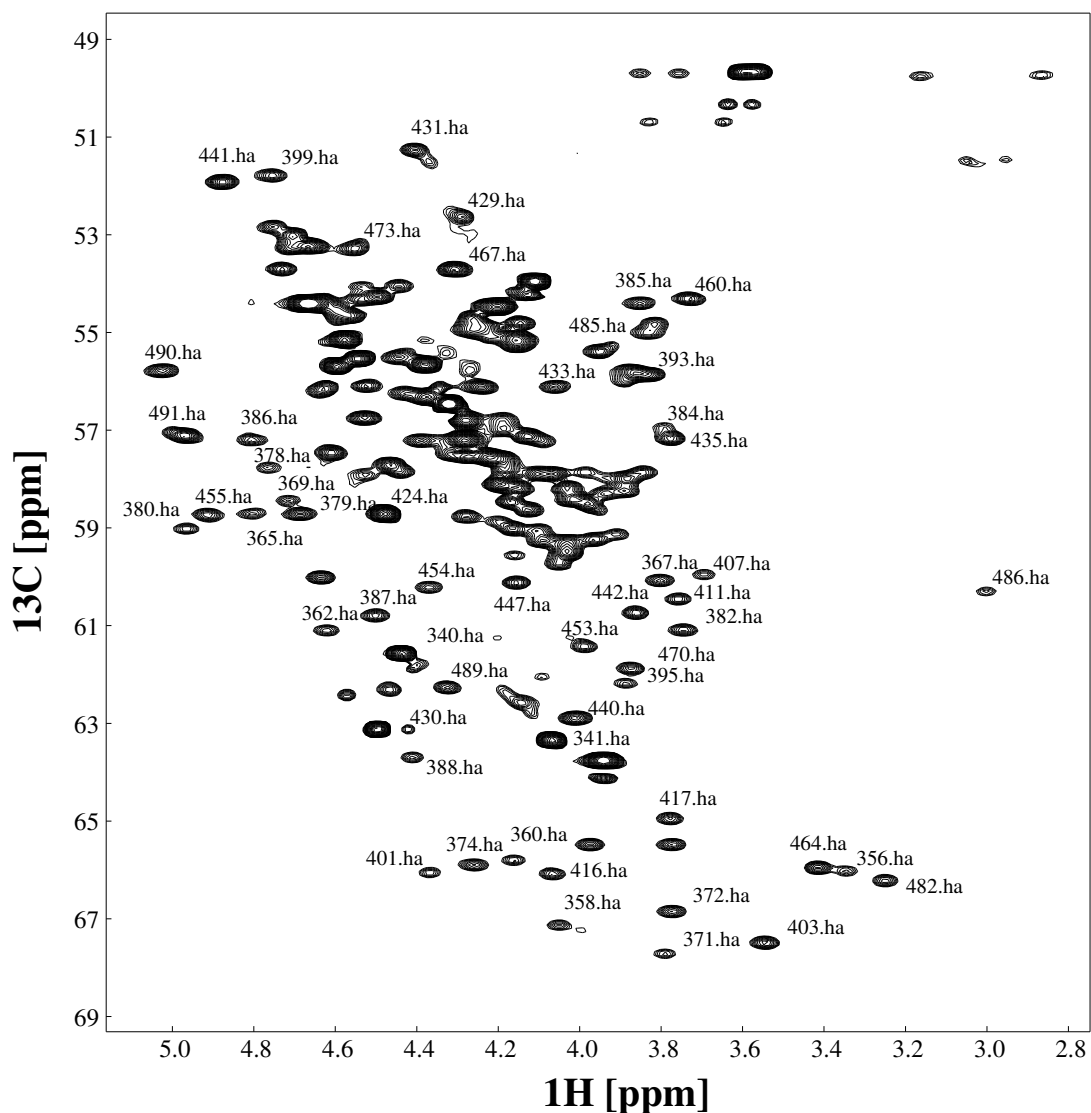
Verlässliche Aussagen über  $\alpha$ -helikale Sekundärstruktur lassen sich wegen der Abhängigkeit der Amidprotonenverschiebung von der Krümmung und Amphipathie der Helix aus den Resonanzfrequenzen der Amidprotonen alleine dagegen nicht treffen (Wishart und Sykes, 1994). Dafür liefert die Tieffeldverschiebung der  $\alpha$ -Kohlenstoffresonanzen zusammen mit der Hochfeldverschiebung der  $\alpha$ -Protonenresonanzen im  $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -HSQC (s. 3.3) klare Hinweise auf eine vorwiegend  $\alpha$ -helikale Sekundärstruktur von NusACTD(339–495). Quantitativ werden diese Effekte für die Berechnung des chemischen Verschiebungsindex (s. 3.1.3.1) ausgenutzt.

Da die Tertiärstruktur  $\alpha$ -helikaler Proteine im allgemeinen primär über hydrophobe Wechselwirkungen zwischen aliphatischen und aromatischen Seitenketten stabilisiert wird (Skalicky *et al.*,



**Abbildung 3.2:**  $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC Spektrum von  $^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ -NusACTD(339–495) bei 700 MHz (positive Signale: schwarz, negative Signale: rot).

In diesem Spektrentyp sind Kreuzresonanzen zwischen Stickstoffen und den direkt daran gebundenen Protonen zu sehen. Die Signale sind jeweils mit der Sequenzposition und dem Namen des Protons bezeichnet (hn: Amidproton des Proteinerückgrats; hd, he:  $\delta$ - und  $\epsilon$ -Protonen der Asparagin-, Glutamin-, Arginin- und Tryptophan-Seitenketten). In Bereichen mit starker Signalüberlagerung wurde auf eine Beschriftung verzichtet. Negative Signale sind in der indirekten  $^{15}\text{N}$ -Dimension gefaltet. (Meßbedingungen/Aufnahmeparameter: s. 2.2.1)



**Abbildung 3.3:**  $C^\alpha/H^\alpha$ -Bereich des  $^1H^{13}C$ -HSQC (800 MHz).

Ausschnitt aus dem  $^1H^{13}C$ -HSQC Spektrum von  $^{13}C,^{15}N$ -NusACTD(339–495), in dem die Korrelationen zwischen  $\alpha$ -Protonen und  $\alpha$ -Kohlenstoffen zu sehen sind. Die Zahl der Beschriftung gibt die Sequenzposition an. In Bereichen mit starker Signalüberlagerung wurde auf eine Beschriftung verzichtet. Glycine besitzen Kohlenstofffrequenzen von circa 43 ppm und sind daher in diesem Ausschnitt nicht zu beobachten. Die zu tieferem Feld verschobenen  $\alpha$ -Kohlenstoffresonanzen deuten zusammen mit den zu höherem Feld verschobenen  $\alpha$ -Protonenresonanzen auf vorwiegend  $\alpha$ -helikale Sekundärstrukturelemente in NusACTD(339–495) hin. (Meßbedingungen/Aufnahmeparameter: s. 2.2.1)

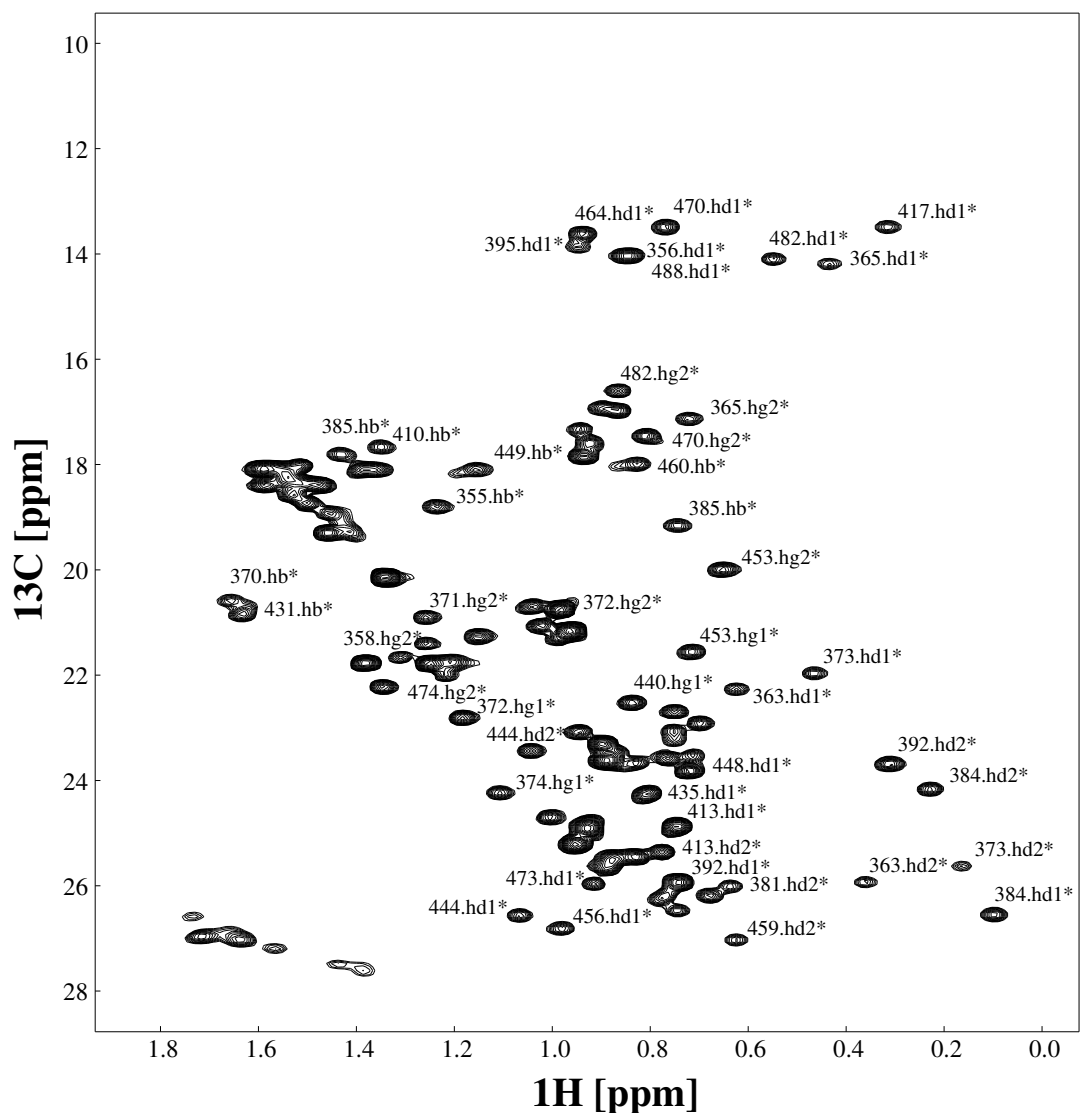
2001), ist eine gute Dispersion der entsprechenden Protonen- und Kohlenstoffresonanzen notwendig, um später die wechselwirkenden Protonen in den NOESY-Experimenten identifizieren zu können.

In dem gezeigten Ausschnitt aus dem  $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -HSQC von NusACTD(339–495) (Abb. 3.4) sind zunächst die Resonanzen der Methylgruppen der Alanine, Valine, Leucine, Isoleucine und Threonine zu sehen. Ungefähr die Hälfte der Methylgruppen zeigt ein isoliertes Signal, was einen weiteren Hinweis auf die intakte Tertiärstruktur von NusACTD(339–495) liefert. Eine starke Tief- oder Hochfeldverschiebung, wie sie zum Beispiel für die Resonanzen der  $\delta$ -Protonen des I417 zu beobachten ist, ist typisch für Kerne die sich in der Nähe von Aromaten befinden. Dennoch führt die große Anzahl der 24 Alanin- und 42 Leucin-Methylgruppenresonanzen teilweise zu einer mangelnden Auflösung in den entsprechenden Bereichen im Spektrum.

Die Korrelationen zwischen aromatischen Kohlenstoffen und den direkt daran gebundenen Protonen wurden aufgrund der unterschiedlichen Resonanzfrequenzen und Kopplungskonstanten unabhängig von den aliphatischen Kohlenstoffen und Protonen gemessen. Das  $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -HSQC, in dem die Signale der aromatischen Seitenketten zu sehen sind, ist in Abbildung 3.5 dargestellt. Das Spektrum wurde im Gegensatz zu dem  $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -HSQC der aliphatischen Kohlenstoffe und Protonen nicht mit einer *constant time* Evolution der  $^{13}\text{C}$ -Spins aufgenommen, so daß die C,C-Kopplung mit einer Kopplungskonstante von circa 55 Hz (Hesse *et al.*, 2002, Abschnitt 4.5) zwischen benachbarten aromatischen Kohlenstoffen zu beobachten ist. Ein benachbarter Kohlenstoff führt dabei zu einer Duplett-, zwei benachbarte Kohlenstoffe zu einer Triplettfineinstruktur der Resonanz in der  $^{13}\text{C}$ -Dimension.

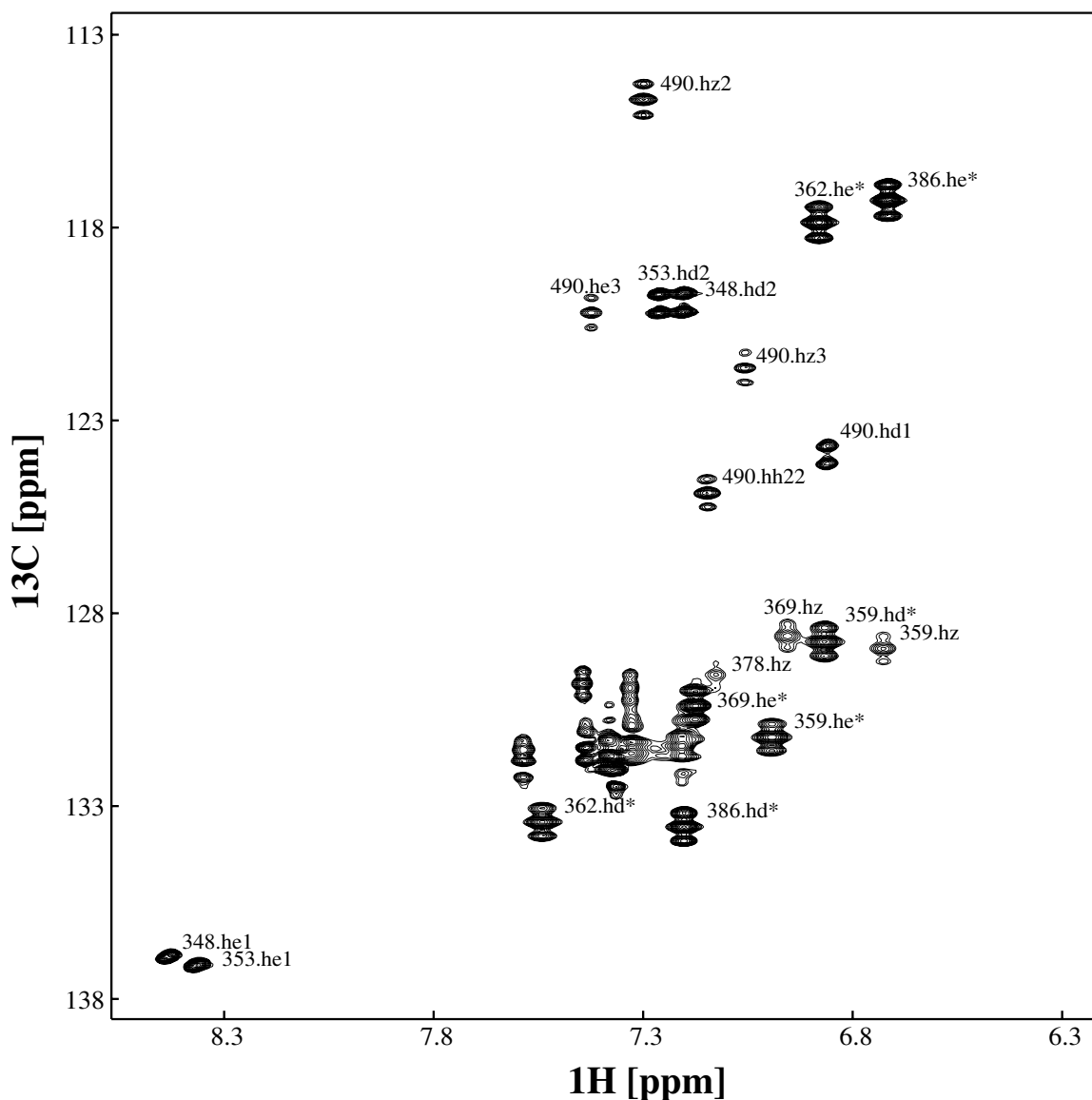
NusACTD(339–495) besitzt zwei Histidine, fünf Phenylalanine, zwei Tyrosine und ein Tryptophan. Während die Resonanzen für H353, H348, W490, Y362, Y386, F359 und F369 aufgelöst sind, fallen die Signale der restlichen Phenylalanine im Spektrum zusammen. Die berechnete Struktur (s. 3.1.7) zeigt, daß F378, F446 und F491 oberflächenexponiert sind.

Phenylalanine und Tyrosine weisen jeweils zwei stereochemisch äquivalente  $\delta$ - und  $\epsilon$ -Protonen beziehungsweise Kohlenstoffe auf. Obwohl die Umgebung der beiden  $\delta$ - beziehungsweise  $\epsilon$ -Kerne im hydrophoben Kern des Proteins im allgemeinen asymmetrisch ist, wurden bisher nur für circa 3.8% der Tyrosine und 1.5% der Phenylalanine aller in der BMRB (*BioMagResBank*) hinterlegten Tyrosine beziehungsweise Phenylalanine unterscheidbare Resonanzen beobachtet (Skalicky *et al.*, 2001). Auch die Resonanzen der  $\delta$ - und  $\epsilon$ -Protonen beziehungsweise -Kohlenstoffe der fünf Phenylalanine und zwei Tyrosine in NusACTD(339–495) sind frequenzdegeneriert.



**Abbildung 3.4:** Methylgruppenbereich des  $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -HSQC (800 MHz)

Ausschnitt aus dem  $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -HSQC Spektrum von  $^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ -NusACTD(339–495), in dem die Korrelationen zwischen Methyl-Protonen und den direkt daran gebundenen Kohlenstoffen zu sehen sind. Die Signale sind jeweils mit der Sequenzposition und dem Namen des Protons bezeichnet (hb\*:  $\beta$ -, hg\*:  $\gamma$ -, hd\*:  $\delta$ -Methylgruppen der Alanine, Valine, Leucine, Isoleucine und Threonine). Starke Signalüberlagerungen sind vor allem im Bereich der Alanin- ( $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ : 1.5 ppm/19 ppm) und Leucin-Verschiebungen ( $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ : 0.9 ppm/26 ppm und 0.9 ppm/23 ppm) zu beobachten. In Bereichen mit starker Frequenzdegeneration der Resonanzen wurde auf eine Beschriftung verzichtet. (Meßbedingungen/Aufnahmeparameter: s. 2.2.1)



**Abbildung 3.5:** Aromatenregion des  $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -HSQC (600 MHz)

Ausschnitt aus dem  $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -HSQC Spektrum von  $^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ -NusACTD(339–495), in dem die Korrelationen zwischen aromatischen Protonen und den direkt daran gebundenen Kohlenstoffen zu sehen sind. Die Signale sind jeweils mit der Sequenzposition und dem Namen des Protons bezeichnet (hd:  $\delta$ -, he:  $\epsilon$ -, hz:  $\zeta$ -, hh:  $\eta$ -Gruppen von Histidin, Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan). In Bereichen mit starken Signalüberlagerungen wurde auf eine Beschriftung verzichtet. (Meßbedingungen/Aufnahmeparameter: s. 2.2.1)

Dieses Phänomen zeigt, daß Proteinstrukturen meistens nicht starr sind, sondern atmen und sogenannte *Ringflips* von Tyrosinen und Phenylalaninen durch eine Drehung um die  $C^\beta-C^\gamma$ -Achse erlauben (Wüthrich, 1986, Abschnitt 3.1). Die Zeitskala der Bewegung muß eine Mittelung der chemischen Verschiebung der  $\delta$ - beziehungsweise  $\epsilon$ -Kerne ermöglichen und liegt damit zwischen  $10^2-10^5$  Hz (Skalicky *et al.*, 2001).

**3.1.2. Zuordnung der Resonanzen.** Die Zuordnung der Protonen-, Kohlenstoff- und Stickstoffresonanzen von NusACTD(339–495) erfolgte manuell auf der Basis von Tripelresonanz-, COSY-, TOCSY- und NOESY-Experimenten. Im folgenden soll kurz die Vorgehensweise bei der Zuordnung von NusACTD(339–495) umrissen werden. Die verwendeten Experimente und die jeweils beobachtbaren Korrelationen sind in Tab. 2.1 beziehungsweise Tab. 2.2 zusammengefaßt.

Ausgehend von den Resonanzen im  $^1H^{15}N$ -HSQC (Abb. 3.2) erhält man für jede  $^1H-^{15}N$ -Korrelation durch Kombination eines CBCA(CO)NH- mit einem HNCACB-Experiment die Verschiebungen der  $C^\alpha$  und  $C^\beta$  Spins der eigenen Aminosäure und der Vorgängeraminosäure. Ähnlich wie in einem Dominospiel erreicht man durch Aneinanderlegen passender  $C^\alpha$ - und  $C^\beta$ -Frequenzen des Vorgängers und Nachfolgers prinzipiell eine Zuordnung sämtlicher  $H^N$ -, N-,  $C^\alpha$ - und  $C^\beta$ -Verschiebungen.

Für NusACTD(339–495) wurden wegen der häufig frequenzdegenerierten Werte der  $C^\alpha$ - und  $C^\beta$ -Resonanzen zusätzliche Informationen benötigt. Das (H)CC(CO)NH-TOCSY liefert für jede  $^1H-^{15}N$ -Korrelation die chemischen Verschiebungen der aliphatischen Kohlenstoffe der Vorgängeraminosäure und somit deren Aminosäure- beziehungsweise Spinsystemtyp. Zusammen mit der bekannten Sequenz konnte das (H)CC(CO)NH-TOCSY somit die Zahl der möglichen Vorgänger einschränken.

Auch die den Kohlenstoffexperimenten entsprechenden Protonenexperimente HBHA(CBCA)(CO)NH und H(CC)(CO)NH-TOCSY wurden zur Auswertung hinzugezogen. Besonders hilfreich für die sequentielle Zuordnung waren das  $3D-^{15}N, ^{15}N^1H$ -HMQC-NOESY-HSQC und das  $3D-^1H, ^{15}N^1H$ -NOESY-HSQC. Die in diesen Experimenten beobachteten starken Kreuzresonanzen aufeinanderfolgender Amidprotonen unterstützten die eindeutige Zuordnung und deuteten auf eine  $\alpha$ -helikale Struktur hin, da in helikalen Sekundärstrukturen die Abstände aufeinanderfolgender Amidprotonen gering sind.

Mit Hilfe der H(C)CH–COSY– und H(C)CH–TOCSY–Experimente, in denen für jedes aliphatische Proton Korrelationen mit benachbarten Kohlenstoffen und Protonen eines Spinsystems zu sehen sind, konnten noch nicht vollständig zugeordnete aliphatische Seitenketten ergänzt werden. Die Verschiebungen der aromatischen Kohlenstoffe und Protonen wurden über das 3D– $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}^1\text{H}$ –NOESY–HSQC der Aromaten ermittelt. Die Zuordnung der Seitenketten–Amidgruppen der Asparagine sowie Glutamine erfolgte über ein entsprechend optimiertes CBCA(CO)NH–Experiment sowie über NOESY–Experimente. Zur Bestimmung der  $\delta$ –Stickstoff– und  $\delta$ –Proton–Frequenzen der Arginine wurden 3D– $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}^1\text{H}$ –NOESY–HSQC und 3D– $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}^1\text{H}$ –NOESY–HSQC Experimente eingesetzt. Die Verschiebungen der  $\epsilon$ –Methylgruppen der Methionine konnten über das 3D– $^{13}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}^1\text{H}$ –HMQC–NOESY–HSQC, das 3D– $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}^1\text{H}$ –NOESY–HSQC und das 4D– $^1\text{H}^{13}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}^1\text{H}$ –HMQC–NOESY–HSQC ermittelt werden. Für die Sekundärstrukturanalyse (s. 3.1.3.1) wurden außerdem mit Hilfe des HNCO die Verschiebungen der Carbonylkohlenstoffe der Peptidbindung zugeordnet.

Die Tripelresonanz– und NOESY–Experimente erlaubten somit bis auf die endständigen Aminosäuren, die C $^{\epsilon}$ /H $^{\epsilon}$ –Kerne von K347, sowie die CO–Kerne von V387, E400, E422, K429 und D493 die Zuordnung aller Spins im Rückgrat und in den aliphatischen Seitenketten. Eine Zuordnung der aromatischen Seitenketten war bis auf die Verschiebung des  $\zeta$ –Kohlenstoffs und  $\zeta$ –Protons von F491 möglich. Die Seitenkettenamide konnten bis auf Q345 und Q349, die  $\epsilon$ –Methylgruppen der Methionine bis auf M339 bestimmt werden. Insgesamt konnte für die untersuchten Kerne eine fast vollständige Zuordnung der chemischen Verschiebungen erreicht werden:

$^1\text{H}$ : 870 von 881 (98.8%)

$^{13}\text{C}$ : 837 von 847 (98.8%)

$^{15}\text{N}$ : 176 von 179 (98.3%)

Die Zuordnung ist in der BMRB–Datenbank (Kennung 5800) hinterlegt und im Anhang (s. C.1) abgedruckt.



### 3.1.3. Sekundärstruktur von NusACTD(339–495).

3.1.3.1. *Der chemische Verschiebungsindex.* Die Frequenzen der Kerne im Proteinerückgrat sind von der lokalen Geometrie des Rückgrats abhängig. Über die Bestimmung des chemischen Verschiebungsindex (CSI: *chemical shift index*) und unter Verwendung empirischer Regeln kann aus den Frequenzen der  $\alpha$ -Protonen und -Kohlenstoffe sowie der Carbonylkohlenstoffe die Sekundärstruktur positionsspezifisch vorhergesagt werden (s. 2.2.2).

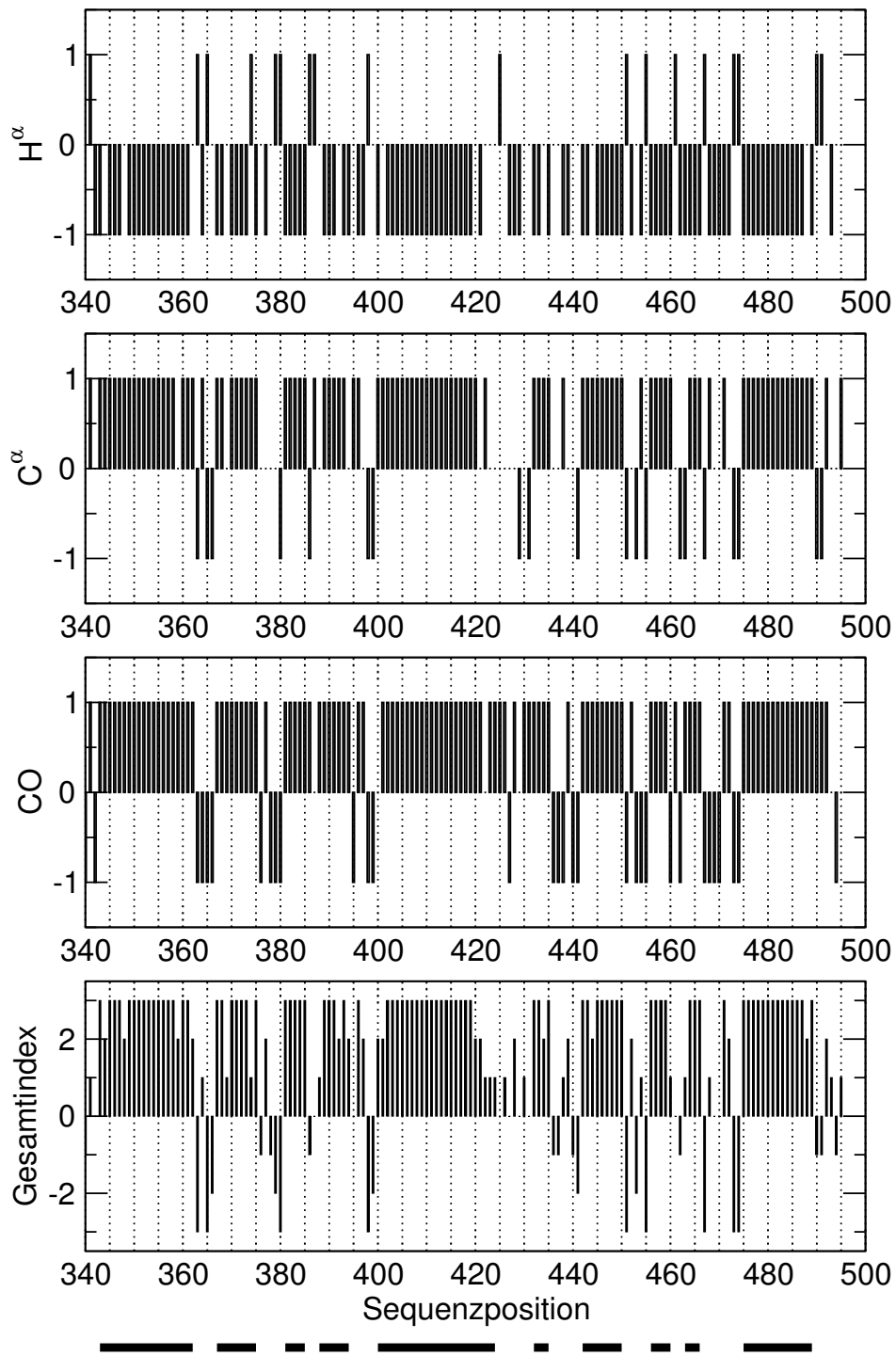
In Abbildung 3.6 ist der Index für die  $H^\alpha$ -,  $C^\alpha$  und CO-Kerne, sowie der daraus berechnete Gesamtindex in Abhängigkeit von der Sequenzposition aufgetragen. In Übereinstimmung mit weiteren Daten (Abb. 3.7) weist der Gesamtindex mit zehn Helices (H1:E343–Y362, H2:E367–E375, H3:L381–A385, H4:P388–E394, H5:E400–S424, H6:D432–L435, H7:R442–A450, H8:L456–A460, H9:G463–D466, H10:D475–C489) auf eine rein  $\alpha$ -helikale Sekundärstruktur von NusACTD(339–495) hin.

3.1.3.2. *Wasserstoffbrücken aus H/D-Austausch-Experimenten.* Amidprotonen tauschen über eine säure- oder basenkatalysierte Reaktion Protonen mit dem wässrigen Lösungsmittel aus (Wüthrich, 1986, Abschnitt 2.3). Die Rate des Austausches hängt unter anderem vom pH und der Zugänglichkeit der Amidprotonen ab. Amidprotonen, deren Austauschrate relativ zu der intrinsischen Austauschrate verlangsamt ist, finden sich vor allem in Sekundärstrukturelementen, in denen sie in Wasserstoffbrücken eingebunden sind, aber auch in vom umgebenden wässrigen Milieu abgeschlossenen Bereichen (Wüthrich, 1986, Abschnitt 3.4).

Für NusACTD(339–495) konnten 59 langsam austauschende Amidprotonen bestimmt werden (s. 2.2.4; s. B.0.6), die sich über die gesamte Sequenz verteilen (Abb. 3.7). Lediglich am Amino-Terminus sowie zwischen den Resten 420–430 konnten für größere Bereiche keine langsam austauschenden Amidprotonen beobachtet werden.

Wasserstoffbrücken aus H/D-Austauschexperimenten können erst in der Strukturberechnung verwendet werden, wenn der Akzeptor eindeutig aus der berechneten Strukturschar bestimmt werden kann. Für die Strukturberechnung von NusACTD(339–495) konnten 39 der 59 langsam austauschenden Amidprotonen in Form von zusätzlichen Abstandsbeschränkungen in der Strukturberechnung eingesetzt werden (s. C.3.1.3 und C.3.2.3).

3.1.3.3. *Diederwinkel aus skalaren Kopplungskonstanten.* Der Zusammenhang zwischen der skalaren  $^3J(H^N H^\alpha)$ -Kopplungskonstante und dem Rückgratwinkel  $\phi$  liefert zusätzliche Informationen über die Rückgratgeometrie (s. 2.2.5). Insgesamt konnten 98 Kopplungskonstanten aus den HNHA-Spektren einer  $^{15}N$ -markierten Probe von NusACTD(339–495) ermittelt werden



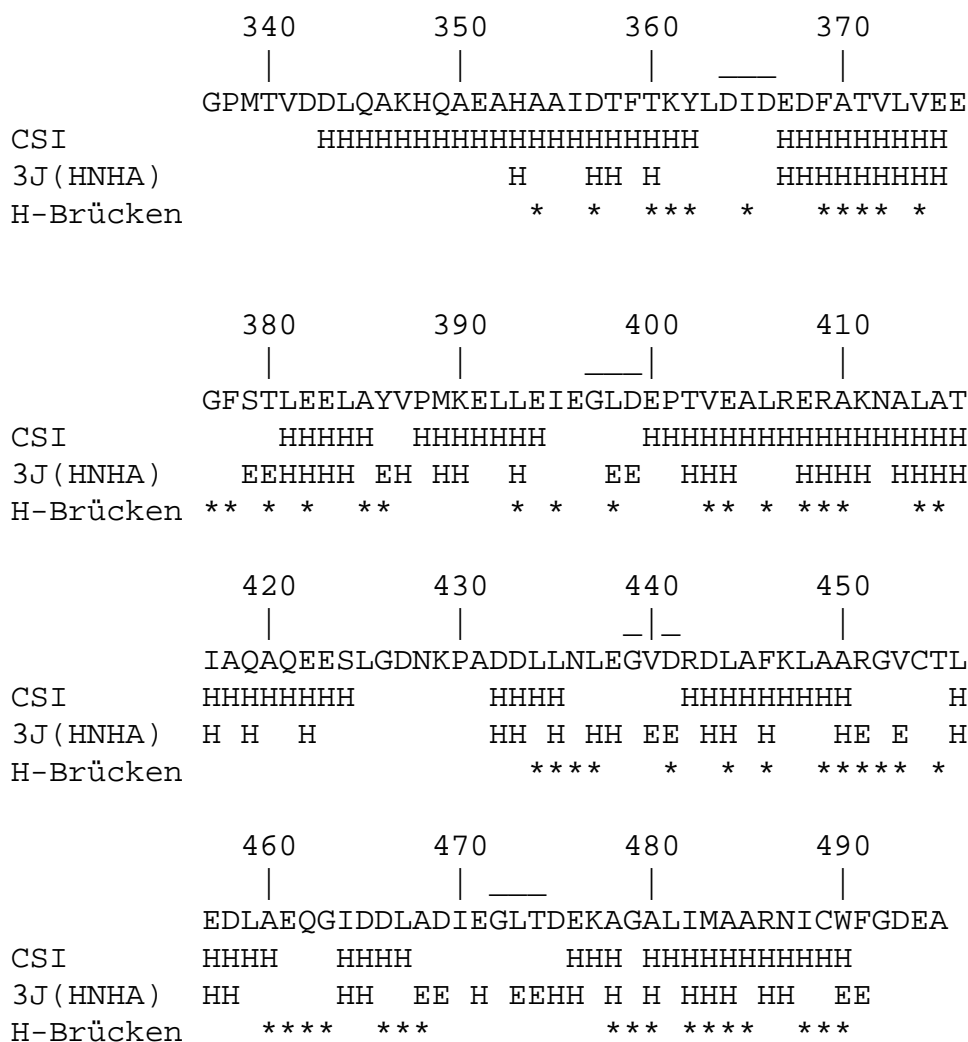
**Abbildung 3.6:** Chemischer Verschiebungsindex von NusACTD(339–495).

**zu Abbildung 3.6:** Die Abbildung zeigt die chemischen Verschiebungsindices der  $\alpha$ -Protonen, der  $\alpha$ -Kohlenstoffe und der Carbonylkohlenstoffe des Proteinrückgrats sowie den daraus ermittelten Gesamtindex in Abhängigkeit von der Sequenzposition. Der chemische Verschiebungsindex weist auf eine  $\alpha$ -helikale Sekundärstruktur von NusACTD(339–495) hin. Die Helices sind als schwarze Balken unter dem Gesamtindex dargestellt.

(s. B.0.4). 69 der bestimmten Kopplungskonstanten wiesen einen Wert  $< 6$  Hz auf, der typischerweise für Reste in helikaler Sekundärstruktur beobachtet wird. Für 15 Reste wurde ein Wert der Kopplungskonstante von  $> 8$  Hz ermittelt, der charakteristisch für Reste in  $\beta$ -Faltblattsträngen ist. Glycine wurden in der Auswertung nicht berücksichtigt. In Abb. 3.7 sind die Reste mit Kopplungskonstanten  $< 6$  Hz beziehungsweise  $> 8$  Hz weiteren sekundärstrukturspezifischen Daten gegenübergestellt. In die Strukturberechnung konnten 67 skalare Kopplungen in Form von Diederwinkelbeschränkungen einbezogen werden (s. C.3.1.2 und C.3.2.2).

3.1.3.4. *Zusammenfassung der sekundärstrukturspezifischen Daten.* In Abbildung 3.7 sind die aus dem chemischen Verschiebungsindex (s. 3.1.3.1) und den skalaren  $^3J(\text{H}^N\text{H}^\alpha)$ -Kopplungen (s. 3.1.3.3) vorhergesagten Sekundärstrukturen zusammen mit langsam austauschenden Amidprotonen (s. 3.1.3.2) in Abhängigkeit von der Sequenzposition dargestellt. Sowohl der chemische Verschiebungsindex als auch die Kopplungskonstanten deuten auf eine überwiegend helikale Sekundärstruktur von NusACTD(339–495) hin. Die Sekundärstruktur stimmt zudem mit den aus Sequenzanalysen vermuteten HhH-Motiven mit Haarnadelschleifen um D364-I365-D366, G397-L398-D399, G439-V440-D441 und G472-L473-T474 überein.

Langsam austauschende Amidprotonen tragen keine direkte Information über die Sekundärstruktur, sie liefern jedoch Hinweise auf Amidprotonen in Wasserstoffbrücken oder im hydrophoben Kern des Proteins. In NusACTD(339–495) sind langsam austauschende Amidprotonen innerhalb und außerhalb regulärer Sekundärstrukturelemente zu beobachten, so daß zusätzlich von einer intakten Tertiärstruktur ausgegangen werden kann.



**Abbildung 3.7:** NusACTD(339–495) besitzt eine überwiegend helikale Sekundärstruktur.

In der Abbildung sind die aus skalaren  $^3\text{J}(\text{H}^N\text{H}^\alpha)$ -Kopplungen (3J(HNHA)) und dem chemischen Verschiebungsindex (CSI) vorhergesagten Sekundärstrukturen zusammen mit langsam austauschenden Amidprotonen (H-Brücken) in Abhängigkeit von der Sequenz dargestellt. Langsam austauschende Amidprotonen liefern dabei keine direkte Information über die Art der Sekundärstruktur, sondern weisen auf Amidprotonen in Wasserstoffbrücken oder im wasserunzugänglichen hydrophoben Kern des Proteins hin. Insgesamt bestätigt die helikale Sekundärstruktur die vermuteten HhH-Motive (Abb. 3.1), deren typisches GhG-Motiv der Haarnadelschleife jeweils durch Striche über der Sequenz gekennzeichnet ist. (H: Helix; E: gestreckte Konformation; \*: langsam austauschendes Amidproton)

**3.1.4. Flexible Bereiche und Domänengrenzen aus  $^{15}\text{N}$ -Relaxationsdaten.**  $^{15}\text{N}$ -Relaxationsdaten enthalten Information über die Beweglichkeit der  $\text{N-H}^{\text{N}}$ -Vektoren im Proteinrückgrat. In globulären und relativ starren Proteinen setzt sich die Bewegung jedes  $\text{N-H}^{\text{N}}$ -Vektors aus der Reorientierung des Proteins in Lösung aufgrund der Brown'schen Molekularbewegung und der internen Mobilität des Rückgrats an dieser Stelle zusammen.

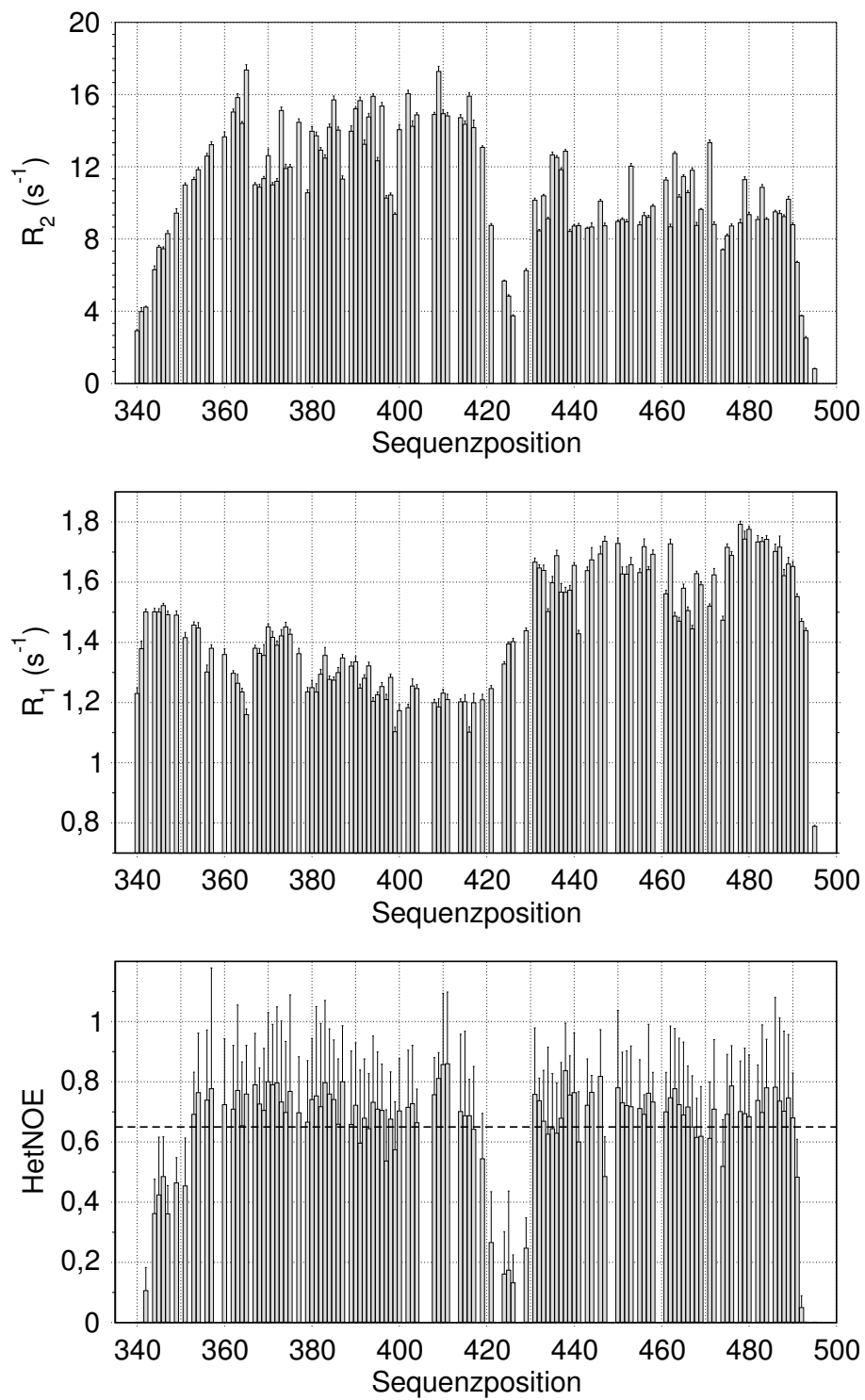
Dabei liefern relativ niedrige *HetNOE*-Werte Hinweise auf Bereiche mit erheblicher interner Dynamik, zum Beispiel unstrukturierte Schleifen- oder Linkerregionen. Typischerweise betrachtet man Reste mit *HetNOE*-Werten  $< 0.65$  bei einem Feld von 600 MHz als flexibel (Pawley *et al.*, 2001). Aus den Relaxationsraten lassen sich dagegen in Regionen mit vernachlässigbarer interner Dynamik Rückschlüsse auf das Reorientierungsverhalten des Moleküls in Lösung ziehen.

Die für  $^{15}\text{N}$ -NusACTD(339–495) bei 600 MHz aufgenommenen  $^{15}\text{N}$ -Relaxationsdaten (Probe 1; s. 2.4.2) sind in Abbildung 3.8 zu sehen und im Anhang abgedruckt (s. B.0.7). Eine erste qualitative Analyse (Tab. 3.1) zeigt drei größere Bereiche mit unterdurchschnittlichen Werten des *HetNOE*, am Amino-Terminus für die Reste M339–A352, am Carboxy-Terminus für die Reste F491–A495 und ungefähr in der Mitte der Sequenz für Aminosäuren I417–P430. Die dazwischenliegenden Regionen NusA(353–416) und NusA(431–490) weisen dagegen mit Werten für den *HetNOE* von  $0.72 \pm 0.06$  und  $0.70 \pm 0.07$  nicht auf eine ausgeprägte interne Dynamik hin.

Für diese beiden relativ starren Bereiche sind jedoch signifikante Unterschiede der durchschnittlichen  $R_2$ -Werte zu verzeichnen (Tab. 3.1). Da das  $\frac{R_2}{R_1}$ -Verhältnis für starre Reste von der Rotationskorrelationszeit  $\tau_c$  abhängt, deuten diese Unterschiede direkt auf unterschiedliche Zeitkonstanten der Reorientierung für diese Bereiche hin (Kay *et al.*, 1989).

Die Daten sprechen daher für eine Struktur aus zwei Domänen, NusA(353–416) und NusA(431–490), die über einen flexiblen Linker miteinander verbunden sind. Zudem stimmen die auf diese Weise ermittelten Domänengrenzen ungefähr mit den beiden homologen Sequenzabschnitten NusA(364–414) und NusA(439–489) (Abb. 3.1) überein.

Eine ausführlichere Analyse der Relaxationsdaten erfordert jedoch die hochaufgelösten Strukturen der beiden Domänen, sowie Daten bei einem weiteren Feld und wurde unter 3.2.4 vorgenommen.



**Abbildung 3.8:** Relaxationsdaten von NusACTD(339–495) bei 600 MHz (Probe 1).

**zu Abbildung 3.8:** Relaxationsdaten von NusACTD(339–495) bei 600 MHz (Probe 1). Die Abbildung zeigt die transversalen und longitudinalen Relaxationsraten  $R_2$  und  $R_1$  sowie den  $HetNOE$ . Reste mit negativen Werten des  $HetNOE$  am Amino- und Carboxy-Terminus (T340, V341, D493, A495) sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt. Die gestrichelte Linie entspricht einem  $HetNOE$ -Wert von 0.65.

NusA	340–352	353–416	417–430	431–490	491–495
$\langle HetNOE \rangle$	$0.21 \pm 0.36$	$0.72 \pm 0.06$	$0.31 \pm 0.20$	$0.70 \pm 0.07$	$-0.10 \pm 0.55$
$\langle R_2 \rangle$ (s <sup>-1</sup> )		$13.6 \pm 1.9$		$9.9 \pm 1.5$	
$\langle R_1 \rangle$ (s <sup>-1</sup> )		$1.3 \pm 0.1$		$1.6 \pm 0.9$	

**Tabelle 3.1:** Qualitative Auswertung der Relaxationsdaten von NusACTD(339–495) bei 600 MHz (Probe 1).

Auf Grundlage der Relaxationsdaten läßt sich NusACTD(339–495) in fünf Bereiche unterteilen. Die Amino- und Carboxy-Termini sowie NusA(417–430) weisen unterdurchschnittlich niedrige Werte des  $HetNOE$  auf, die auf erhebliche interne Dynamik des Rückgrats hindeuten. Dagegen ist für die dazwischenliegenden Bereiche NusA(353–416) und NusA(431–490) keine wesentliche interne Beweglichkeit auf der Pikosekunden-Zeitskala zu erwarten. Die unterschiedlichen Durchschnittswerte der Relaxationsraten für NusA(353–416) und NusA(431–490) weisen jedoch auf ein unterschiedliches Reorientierungsverhalten der beiden Bereiche hin. Es ist daher davon auszugehen, daß NusACTD(339–495) aus zwei Domänen besteht, die durch einen mobilen Linkerbereich voneinander getrennt sind. Die Domänengrenzen stimmen dabei näherungsweise mit den in Abb. 3.1 dargestellten homologen Sequenzabschnitten überein.

**3.1.5. Abstandsbeschränkungen aus NOESY-Experimenten.** Abstandsbeschränkungen können aus den Intensitäten der Kreuzresonanzen in NOESY-Spektren gewonnen werden (s. 2.2.3). In der Regel führen Protonen, die weniger als 5 Å voneinander entfernt sind, zu einem NOE-Kreuzsignal. Die in dieser Arbeit verwendeten NOESY-Experimente und die jeweils beobachteten Korrelationen sind in Tab. 2.1 zusammengefaßt. Sämtliche Kreuzresonanzen wurden manuell ausgelesen und quantifiziert (s. 2.2.3), wobei intraresiduale NOEs nur in Form von mehrdeutigen Abstandsbeschränkungen (s. 2.3.1) für die Strukturberechnung berücksichtigt wurden.

Zunächst wurden die Sekundärstrukturdaten aus  ${}^3J(\text{H}^N\text{H}^\alpha)$ -Kopplungen und CSI (s. 3.1.3.4) überprüft und ergänzt. Dazu wurden  $3\text{D-}^1\text{H}, {}^{13}\text{C}^1\text{H-NOESY-HSQC}$ ,  $3\text{D-}^1\text{H}, {}^{15}\text{N}^1\text{H-NOESY-HSQC}$  sowie  $3\text{D-}^{13}\text{C}, {}^{15}\text{N}^1\text{H-NOESY-HSQC}$  Spektren systematisch in Bezug auf helixtypische Kreuzsignale wie  $\text{H}^\alpha(i) \longrightarrow \text{H}^\beta(i+3)$ ,  $\text{H}^\alpha(i) \longrightarrow \text{H}^N(i+3)$  und  $\text{H}^\alpha(i) \longrightarrow \text{H}^N(i+4)$  analysiert.

Um eine Vorstellung von der Anordnung der Helices im Raum zu erhalten, wurden anschließend die NOESY-Spektren in den Bereichen der gut aufgelösten Methylgruppen der Leucine, Isoleucine und Valine, sowie der aromatischen Seitenketten nach eindeutigen NOEs durchsucht. Aufgrund der Signalüberlagerungen der Leucine im Methylgruppenbereich des  ${}^1\text{H}^{13}\text{C-HSQC}$  (Abb. 3.4) wurde mit erheblichen Schwierigkeiten bei der Zuordnung der Resonanzen in den 3D-Experimenten  $3\text{D-}^1\text{H}, {}^{13}\text{C}^1\text{H-NOESY-HSQC}$  und  $3\text{D-}^{13}\text{C}, {}^{13}\text{C}^1\text{H-HMQC-NOESY-HSQC}$  gerechnet. Durch die Aufnahme eines  $4\text{D-}^1\text{H}^{13}\text{C}, {}^{13}\text{C}^1\text{H-HMQC-NOESY-HSQC}$  konnte die Zuordnung zumindest teilweise erleichtert werden.

Am Beispiel der hochfeldverschobenen  $\delta$ -Methylgruppe von I417 soll der Vorteil des  $4\text{D-}^1\text{H}^{13}\text{C}, {}^{13}\text{C}^1\text{H-HMQC-NOESY-HSQC}$  illustriert werden (s. 3.9). Aus den 3D-Spektren können zwar die  ${}^1\text{H}$ - und  ${}^{13}\text{C}$ -Verschiebungen räumlich benachbarter Protonen beziehungsweise der daran gebundenen Kohlenstoffe ermittelt werden. Es ist jedoch nicht direkt zu sehen, welches Proton an welchen Kohlenstoff gebunden ist. Das  $4\text{D-}^1\text{H}^{13}\text{C}, {}^{13}\text{C}^1\text{H-HMQC-NOESY-HSQC}$  enthält diese Information durch die zusätzliche  ${}^1\text{H-}^{13}\text{C}$ -Korrelation. Zudem trennen sich Resonanzen in Bereichen mit Signalüberlagerungen in 3D-Spektren unter Umständen in der jeweiligen 2D-Ebene des  $4\text{D-}^1\text{H}^{13}\text{C}, {}^{13}\text{C}^1\text{H-HMQC-NOESY-HSQC}$  auf, wie dies für das Kreuzsignal I417.H $^{\delta^*}$  – A413.H $^{\beta^*}$  beobachtet werden kann. Insbesondere schränkt sich jedoch durch die eindeutige Korrelation einer Proton- mit einer Kohlenstoffverschiebung die Zahl der möglichen Wechselwirkungspartner ein. So erhält man zum Beispiel für eine  ${}^1\text{H}$ -Verschiebung von



$1.432 \pm 0.05$  ppm 21 potentielle Wechselwirkungspartner, für die Kombination mit der  $^{13}\text{C}$ -Verschiebung von  $18.9 \pm 0.4$  pm reduziert sich die Zahl der möglichen Wechselwirkungspartner auf drei.

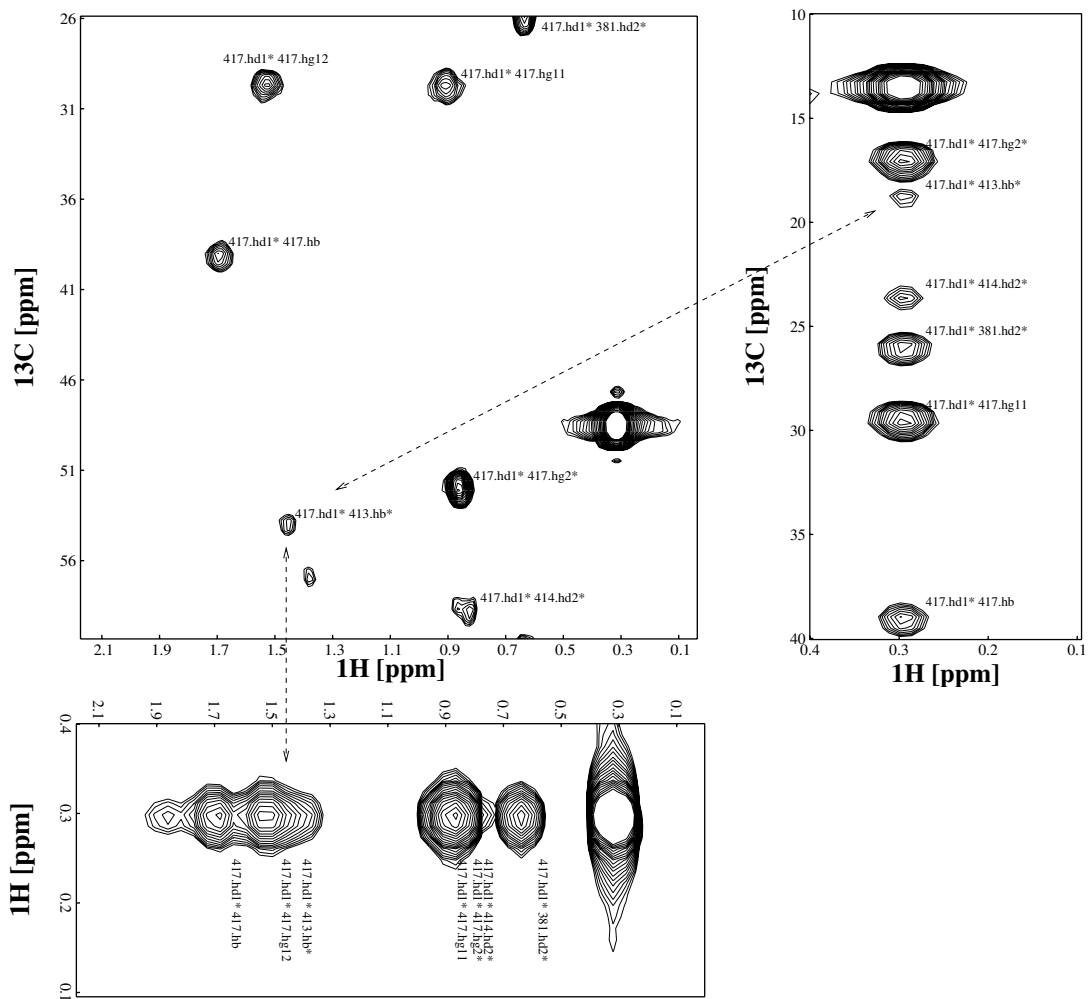
Eine weitere Analyse der Spektren zeigte, daß in den Bereichen NusA(339–350) ausschließlich intraresiduale NOEs auftraten und daß zwischen NusA(339–426) und NusA(426–495) keine NOE-Kreuzresonanzen zu beobachten waren. Dies steht in Einklang mit der Dynamik auf einer Pikosekunden-Zeitskala für NusA(339–352) und der vermuteten Zwei-Domänenstruktur aufgrund der unterschiedlichen Rotationskorrelationszeiten für NusA(353–417) und NusA(431–490) (s. 3.1.4).

In der nachfolgenden Auswertung und der Strukturberechnung wurde daher NusA(339–350) nicht berücksichtigt und NusACTD(339–495) bei der Aminosäure mit dem geringsten Wert des *HetNOE*, G426, in zwei Regionen aufgeteilt. Insgesamt konnten für NusA(351–426) 883 und für NusA(426–495) 699 Abstandsbeschränkungen gefunden werden (s. C.3.1.1 und C.3.2.1).

Die geringere Zahl von Abstandsbeschränkungen in NusA(426–495) ist vermutlich auf die Abwesenheit aromatischer Aminosäuren im hydrophoben Kern des Fragments und die daraus resultierende schlechtere Dispersion der Resonanzen zurückzuführen. Zwar konnten alle 42 Leucin-Methylgruppen von NusACTD(339–495) zugeordnet werden, aber in den NOESY-Spektren sind aufgrund der Frequenzdegeneration intra- und interresiduale Wechselwirkungen nicht zu unterscheiden. In neun (NusA(351–426)) beziehungsweise 24 (NusA(426–495)) Fällen wurden diese NOE-Signale in Form von mehrdeutigen Abstandsbeschränkungen (s. 2.3.1) in der Strukturberechnung eingesetzt.

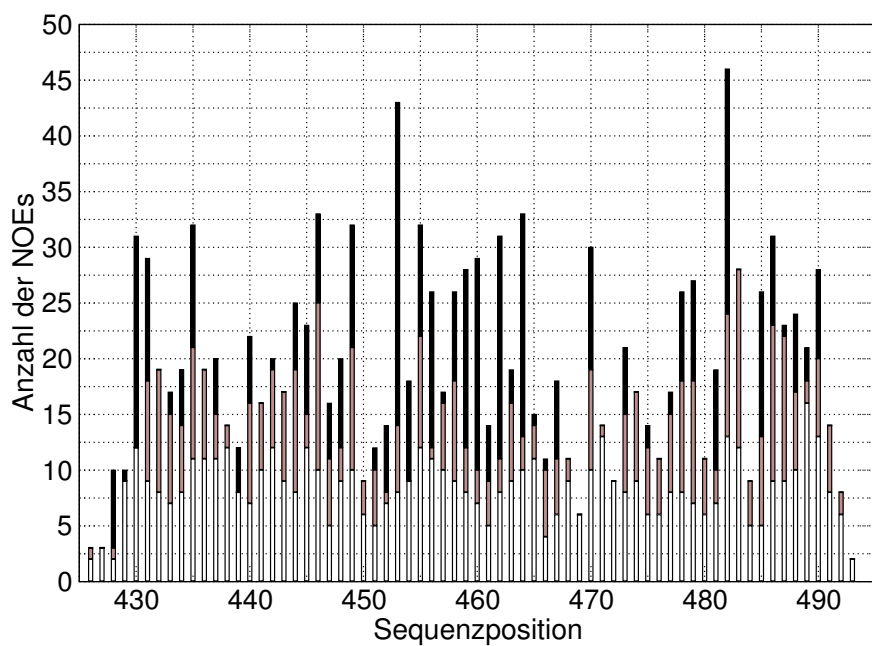
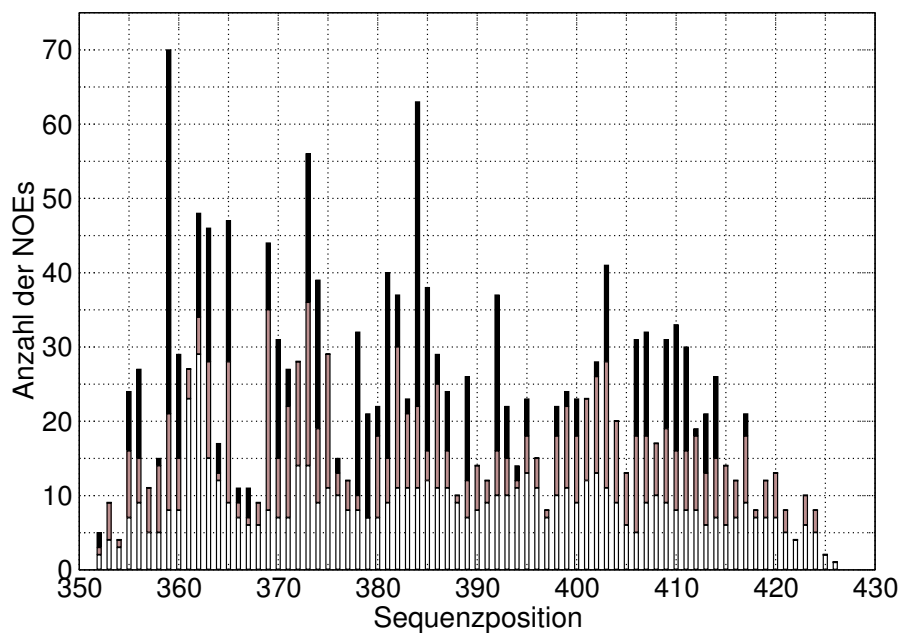
In Abbildung 3.10 ist die Verteilung der Abstandsbeschränkungen auf die Klassen *sequentiell*, ( $i, i + 1$ ), *mittelreichweitig* ( $i, i + 2$  bis  $i, i + 5$ ) und *langreichweitig* ( $i, > i + 5$ ) zu sehen, wobei  $i$  für die Sequenzposition der Aminosäure steht. Die mehrdeutigen Abstandsbeschränkungen wurden in der Auftragung nicht berücksichtigt.

Für die Proline konnte anhand der typischen  $\text{H}^\alpha(i)$  Pro- $\text{H}^\delta(i + 1)$  NOE-Signalen die trans-Konformation angenommen werden (Wüthrich, 1986, Abschnitt 7.3).



**Abbildung 3.9:** NOESY-Spektren von NusACTD(339–495) im Vergleich.

Gezeigt sind Ausschnitte aus den 2D-Ebenen des 4D- $^1\text{H}^{13}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}^1\text{H}$ -HMQC-NOESY-HSQC (links), des 3D- $^{13}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}^1\text{H}$ -HMQC-NOESY-HSQC (rechts) und des 3D- $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}^1\text{H}$ -NOESY-HSQC (unten) für die  $\delta$ -Methylgruppe von I417 ( $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ : 0.306 ppm/13.4 ppm). Die Kreuzsignale sind jeweils mit der Sequenzposition und dem Atomnamen des Protons gekennzeichnet (hb\*:  $\beta$ -, hg\*:  $\gamma$ -, hd\*:  $\delta$ -Methylgruppen der Alanine, Leucine, Isoleucine). Im 4D-Spektrum sind die Kreuzresonanzen von I417.hd1\* mit A413.hb\*, L414.hd2\* und I417.hg2\* sowie der unbeschriftete Diagonalpeak in  $^{13}\text{C}$ -Dimension gefaltet, die Resonanzen erscheinen daher um ganzzahlige Vielfache des spektralen Fensters (35 ppm) verschoben. Das schwache unbeschriftete Signal bei circa 1.4 ppm/22.0 ppm ( $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ ) stammt aus einer anderen Ebene des 4D-Spektrums. (Meßbedingungen/Aufnahmeparameter: s. 2.2.1)



**Abbildung 3.10:** Abstandsbeschränkungen in NusACTD(339–495).

Die Abstandsbeschränkungen für NusA(351–426) (oben) und NusA(426–495) (unten) sind getrennt aufgetragen, da zwischen den beiden Bereichen keine NOE-Kreuzresonanzen beobachtet werden konnten. Insgesamt konnten für NusA(351–426) 883 und für NusA(426–495) 699 Abstandsbeschränkungen erhalten werden. Die Einteilung der Abstandsbeschränkungen erfolgte in die Klassen *sequentiell* (weiß), *mittelreichweitig* (grau) und *langreichweitig* (schwarz).

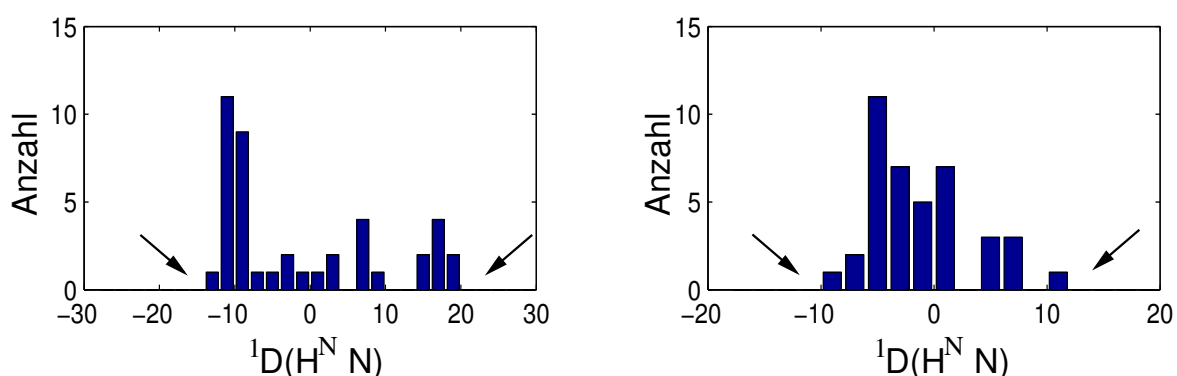
**3.1.6. Globale Beschränkungen aus dipolaren Restkopplungen.** Die Messung der skalaren Kopplungen sowie der Gesamtkopplungen zwischen Amidstickstoffen und  $\alpha$ -protonen ermöglichte die Bestimmung von 120 dipolaren Restkopplungen  $^1D(H^N N)$  für NusACTD(339–495) (s. 2.2.6). Die Werte der skalaren Kopplungen, der Gesamtkopplungen und der dipolaren Restkopplungen sind im Anhang (s. B.0.5) abgedruckt.

In der Strukturberechnung selbst werden Kopplungen von Aminosäuren mit  $HetNOE < 0.65$  nicht berücksichtigt, da sie niedrigen Werten des Ordnungsparameters  $S$  (Gl. (1), S. 38) entsprechen und demnach zu einer Reduktion der dipolaren Restkopplungen führen (Clore *et al.*, 1998). Insgesamt konnten somit 69 globale Beschränkungen aus dipolaren Restkopplungen für die Strukturberechnung gewonnen werden (s. C.3.1.4 und C.3.2.4).

Um dipolare Kopplungen in der Strukturberechnung einsetzen zu können, müssen die Axial- sowie Radialkomponente des Orientierungstensors bekannt sein. Ohne Strukturinformation lassen sich erste Schätzwerte aus Histogrammen gewinnen, in denen die Häufigkeit, mit der bestimmte Kopplungen gemessen werden, aufgetragen ist (Abb. 3.11) (Clore *et al.*, 1998). Wegen der vermuteten Zwei-Domänenstruktur von NusACTD(339–495) wurden getrennte Histogramme für die Kopplungen von NusA(339–426) und NusA(426–495) erstellt. Die stark unterschiedlichen Extremwerte der beiden Verteilungen weisen dabei auf eine erhebliche Dynamik zwischen den beiden Domänen hin (Braddock *et al.*, 2001, 2002). Aufgrund der ungünstigen Verteilung der Kopplungen wurden die Extremwerte nicht aus den Histogrammen extrapoliert, sondern direkt aus den Extremwerten der beobachteten Kopplungen bestimmt. Mit Werten von 19 Hz/–12.4 Hz für NusA(339–426) und 11.0 Hz/–8.3 Hz für NusA(426–495) konnten die Axial- und Radialkomponenten zu  $D_a = 9.5$  Hz und  $R = 0.2$  für NusA(339–426) beziehungsweise  $D_a = 5.5$  Hz und  $R = 0.3$  für NusA(426–495) abgeschätzt werden (s. 2.2.6.3).

Wegen der relativ geringen Anzahl der vorhandenen Kopplungen und der parallelen Orientierung der N–H<sup>N</sup>-Vektoren in helikalen Sekundärstrukturelementen ist die Annahme einer isotropen Verteilung für NusA(339–426) und NusA(426–495) nur näherungsweise gültig. Üblicherweise werden die Werte für  $D_a$  um 15%–20% unterschätzt und damit der Wert für  $R$  überschätzt (Clore *et al.*, 1998). Die genauen Werte für die Orientierungstensenoren wurden daher im Rahmen der Strukturberechnung ermittelt (s. 3.1.7).

**3.1.7. Berechnung der Tertiärstruktur.** Die Berechnung der Tertiärstruktur von NusACTD(339–495) erfolgte getrennt für NusA(351–426) und NusA(426–495), da keine NOE-Kreuzresonanzen zwischen den beiden Bereichen beobachtet wurden. NusA(339–350)



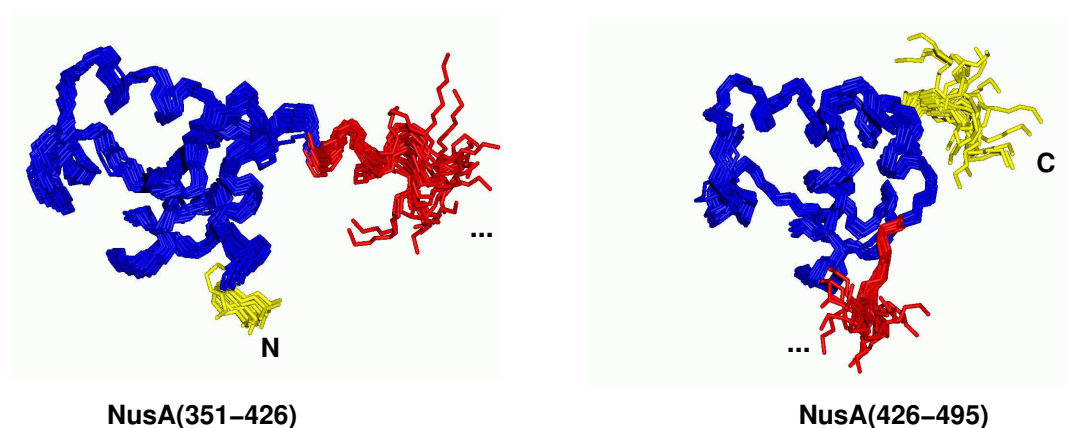
**Abbildung 3.11:** Verteilung der dipolaren Kopplungen von NusA(339–426) (links) und NusA(426–495) (rechts).

In den Histogrammen sind jeweils die Häufigkeiten der dipolaren Kopplungen in 2-Hz-Intervallen aufgetragen. Die unterschiedlichen Extremwerte der Verteilungen (Pfeile) weisen auf unterschiedliche Orientierungstensoren und damit auf eine erhebliche Dynamik (Braddock *et al.*, 2001, 2002) zwischen NusA(339–426) und NusA(426–495) hin.

wurde aufgrund fehlender interresidualer Abstandsbeschränkungen und der aus Relaxationsmessungen bekannten Flexibilität nicht für die Strukturberechnung verwendet.

Die Molekulardynamik-Rechnungen wurden in drei Schritten mit unterschiedlichen Zielfunktionen durchgeführt (s. 2.3.1). Zunächst wurden 90 Strukturen unter Berücksichtigung der Beschränkungen aus NOESY-Experimenten und skalaren Kopplungen mit einem dreistufigen *simulated annealing*-Protokoll (SA I) (s. 2.3.2.2) berechnet. Aus den jeweils 25 Strukturen mit den niedrigsten Werten der Zielfunktion wurden mögliche Wasserstoffbrücken ermittelt und in Form zusätzlicher Abstandsbeschränkungen in die nächste Stufe der Strukturberechnung einbezogen, sofern für das jeweilige Amidproton in H/D-Austauschexperimenten ein verlangsamter Austausch beobachtet werden konnte. Aus den wiederum mit dem SA I-Protokoll berechneten 90 Strukturen konnten 25 akzeptiert und in einem letzten Schritt unter Zuhilfenahme der dipolaren Kopplungen mit einem zweistufigen *simulated annealing*-Protokoll (SA II) (s. 2.3.2.3) verfeinert werden. Dazu wurden zunächst systematisch die Werte der unter 3.1.6 abgeschätzten Axial- und Radialkomponente variiert und jeweils eine Molekulardynamiksimulation durchgeführt. Die niedrigsten Werte der Zielfunktion ergaben sich für Werte der Axial- beziehungsweise Radialkomponenten von  $D_a = 10.25 \pm 0.25$  Hz und  $R = 0.3 \pm 0.05$  für NusA(351–426) sowie  $D_a = 6.25 \pm 0.25$  Hz,  $R = 0.2 \pm 0.05$  für NusA(426–495).

Von den im letzten Schritt berechneten 90 Strukturen für NusA(351–426) und NusA(426–495) wurden jeweils 19 akzeptiert und mit Procheck 3.5.4 (Laskowski *et al.*, 1993; Morris *et al.*, 1992)



**Abbildung 3.12:** Strukturenscharen von NusA(351–426) und NusA(426–495).

Die Abbildung zeigt die Überlagerung von jeweils 19 berechneten Strukturen mit den niedrigsten Werten der Zielfunktion. Die Strukturen von NusA(351–426) und NusA(426–495) wurden aufgrund fehlender NOE-Kreuzresonanzen zwischen den beiden Bereichen getrennt berechnet. NusA(351–426) und NusA(426–495) sind eigenständige Faltungseinheiten und besitzen keine definierte Orientierung zueinander. Die relativ starren Bereiche (blau) sind durch eine flexible Linkerregion (rot) getrennt. Flexible Bereiche am Amino- und Carboxy-Terminus sind in gelb gezeigt. Für die Berechnung der Überlagerung wurden die schweren Rückgratatomme der relativ starren Bereiche NusA(353–416) und NusA(431–490) verwendet. Die Abbildung wurde mit Molmol erstellt (Koradi *et al.*, 1996).

und XPLOR–NIH 1.2.1 (Schwieters *et al.*, 2003) analysiert. Die resultierenden Strukturenscharen sind in Abbildung 3.12 dargestellt und zeigen mit RMSD–Werten (RMSD: *root mean square deviation*) für die schweren Rückgratatomme (RMSD<sub>bb</sub>) von 0.34 Å (H353–T416) und 0.36 Å (A431–W490) eine gute Konvergenz.

92.1% der Reste von NusA(351–426) und 95.3% der Reste von NusA(426–495) weisen sterisch bevorzugte Kombinationen von  $\phi$ – $\psi$ –Winkeln auf. Zudem wurden nur geringe Verletzungen der experimentellen Randbedingungen bei gleichzeitig niedrigen Energien beobachtet. Insbesondere unterstreicht die gute Erfüllung der dipolaren Restkopplungen mit RMSD<sub>bb</sub>–Werten von 0.44 Å (H353–T416) und 0.17 Å (A431–490) zwischen den Durchschnitts–Strukturen mit und ohne dipolare Kopplungen die Qualität der Strukturen. Die im letzten Schritt eingesetzten experimentellen Beschränkungen sind mit der Analyse in Tab. 3.2 zusammengefaßt.

Insgesamt bestätigen die berechneten Strukturen, daß die homologen Sequenzbereiche in NusA(351–426) und NusA(426–495) selbständige Faltungseinheiten (s. 3.2.1) bilden. Wegen

	NusA(351–426)	NusA(426–495)
<b>Experimentelle Beschränkungen</b>		
Abstandsbeschränkungen		
<i>gesamt</i>	883	699
<i>sequentiell</i>	328	285
<i>mittelreichweitig</i>	278	191
<i>langreichweitig</i>	268	199
<i>intraresidual / mehrdeutig</i>	9	24
Diederwinkel	39	28
Dipolare Restkopplungen	37	32
Wasserstoffbrücken	19	20
<b>Molekulardynamiksimulation</b>		
Energien (kcal/mol)		
$E_{pot}$	$23.1324 \pm 1.7314$	$17.4150 \pm 1.1643$
$E_{bond}$	$1.0164 \pm 0.0879$	$0.8981 \pm 0.0962$
$E_{angle}$	$8.7168 \pm 0.8408$	$6.5624 \pm 0.6648$
$E_{impr}$	$2.6457 \pm 0.2801$	$1.6269 \pm 0.2001$
$E_{vdW}$	$5.2270 \pm 1.0387$	$2.8016 \pm 0.6186$
$E_{NOE}$	$4.0465 \pm 0.5038$	$3.4700 \pm 0.5815$
$E_{cdih}$	$0.0322 \pm 0.0495$	$0.0752 \pm 0.0846$
$E_{sani}$	$1.4478 \pm 0.4740$	$1.9808 \pm 0.4104$
RMSDs idealer Abstände (Å)		
<i>Bindungslängen</i>	$0.0007 \pm 0.0001$	$0.0009 \pm 0.0001$
<i>Abstandsbeschränkungen</i>	$0.0054 \pm 0.0004$	$0.0097 \pm 0.0008$
RMSDs idealer Winkel (Grad)		
<i>Bindungswinkel</i>	$0.1169 \pm 0.0065$	$0.1520 \pm 0.0075$
<i>Dihedrale Winkel</i>	$0.0655 \pm 0.0303$	$0.3179 \pm 0.2822$
RMSDs dipolarer Restkopplungen (Hz)	$0.1978 \pm 0.0327$	$0.2488 \pm 0.0249$

	NusA(351–426)	NusA(426–495)
<b>Atomare RMSDs der Strukturenschar (Å)</b>		
schwere Rückgratátome	0.34 (H353–T416)	0.36 (A431–W490)
schwere Átome	0.70 (H353–T416)	0.72 (A431–W490)
<b>Rückgrátwinkel</b>		
Anteil der Reste <sup>1</sup> mit sterisch		
günstigen $\phi$ – $\psi$ –Kombinationen	92.1%	95.3%
erlaubten $\phi$ – $\psi$ –Kombinationen	7.0%	4.4%

**Tabelle 3.2:** Zusammenfassung der Strukturberechnung von NusA(351–426) und NusA(426–495).

Für die Berechnung der RMSD–Werte und für die Procheck–Analyse wurden jeweils die 19 akzeptierten Strukturen des letzten Molekulardynamikschrittes verwendet. Die Energierme sind im Abschnitt 2.3.1 näher beschrieben.

<sup>1</sup>: ohne Berücksichtigung von Glycinen und Prolinen

der unterschiedlichen Axialkomponenten der Orientierungstensoren und der dadurch implizierten Domänendynamik mit einem Auslenkungswinkel von mindestens 20° (Braddock *et al.*, 2002) besitzen NusA(351–426) und NusA(426–495) keine definierte Orientierung zueinander und stellen somit eigenständige Domänen dar.

Die Strukturenscharen von NusA(351–426) und NusA(426–495) sind in der PDB unter den Kennungen 1WCL beziehungsweise 1WCN hinterlegt.



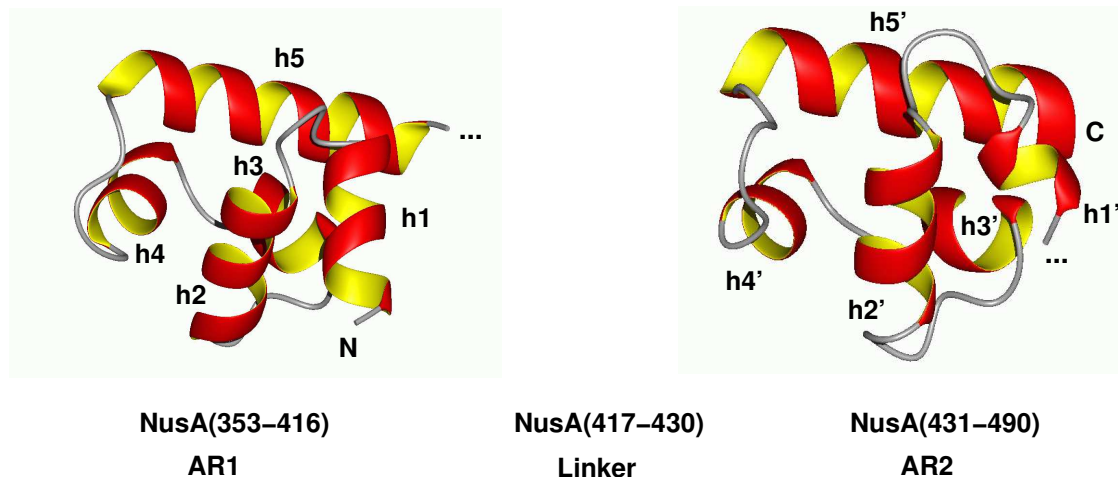
## 3.2. Struktur und Dynamik von NusACTD(339–495)

**3.2.1. Tertiärstruktur.** NusACTD(339–495) besteht aus zwei Domänen, die über einen flexiblen Linker miteinander verbunden sind. Als Domänengrenzen wurden anhand von Relaxationsdaten ( $HetNOE > 0.65$ ; s. 3.1.4) die Reste H353 und T416 beziehungsweise A431 und W490 festgelegt. NusA(353–416) und NusA(431–490) entsprechen ungefähr den bekannten sequenzhomologen Bereichen innerhalb der stark sauren NusACTD(339–495) (Abb. 3.1) und werden im folgenden mit den in der Literatur gebräuchlichen Namen (Mah *et al.*, 1999) AR1 und AR2 (AR: *acidic repeat*) bezeichnet. Jede Domäne enthält fünf Helices, wobei jeweils die ersten und letzten beiden Helices ein HhH-Motiv ausbilden. HhH-Motive bestehen aus zwei antiparallelen  $\alpha$ -Helices, die über eine Haarnadelschleife verbunden sind (Doherty *et al.*, 1996).

Die dreidimensionale Struktur der beiden Domänen ist in Abb. 3.13 dargestellt. Das aminoterminalen HhH-Motiv von AR1, HhH1, wird von den Helices h1 (H353–Y362) und h2 (E367–E376) gebildet und wechselwirkt mit dem carboxyterminalen HhH-Motiv HhH2, das Helices h4 (M389–394) und h5 (E400–T416) umfaßt. Die Packung der HhH-Motive in AR2, HhH1' und HhH2', erfolgt analog. HhH1' enthält Helices h1' (D432–L435) und h2' (R442–A449), HhH2' Helices h4' (I464–A468) und h5' (D475–C489). Der hydrophobe Kern jeder Domäne wird durch eine weitere Helix h3 (L381–Y386) beziehungsweise h3' (L456–A460) ergänzt. Eine Anordnung von zwei HhH-Motiven, die über eine sogenannte Verbindungs-Helix verknüpft sind, ist typisch für eine  $(HhH)_2$ -Faltung (Shao und Grishin, 2000).

**3.2.2. Vergleich von AR1 und AR2.** AR1 und AR2 weisen eine Sequenzhomologie beziehungsweise -identität von 29.0% und 27.5% auf. Strukturell spiegelt sich die ähnliche Sequenz in der gemeinsamen  $(HhH)_2$ -Faltung und in einem  $RMSD_{bb}$  von 1.9 Å zwischen den Durchschnittsstrukturen von AR1 und AR2 wider. Dabei korreliert die stärkere Sequenzhomologie im Bereich der Helices h2–h5/h2'–h5' mit einer größeren strukturellen Ähnlichkeit der Strukturen, die sich in der konservierten Lage und Orientierung der Helices h2–h5/h2'–h5' und einem geringeren  $RMSD_{bb}$  von 1.6 für die Durchschnittsstrukturen von NusA(367–416) und NusA(442–490) manifestiert (Abb. 3.14). Dagegen sind die Helices h1/h1' sowohl in der Sequenz als auch in der Länge sowie der räumlichen Anordnung in der Struktur unterschiedlich.

Da die Wechselwirkung von Proteinen mit Bindungspartnern im allgemeinen an deren Oberfläche erfolgt, wurden die Oberflächen von NusACTD(339–495) in Bezug auf die Verteilung

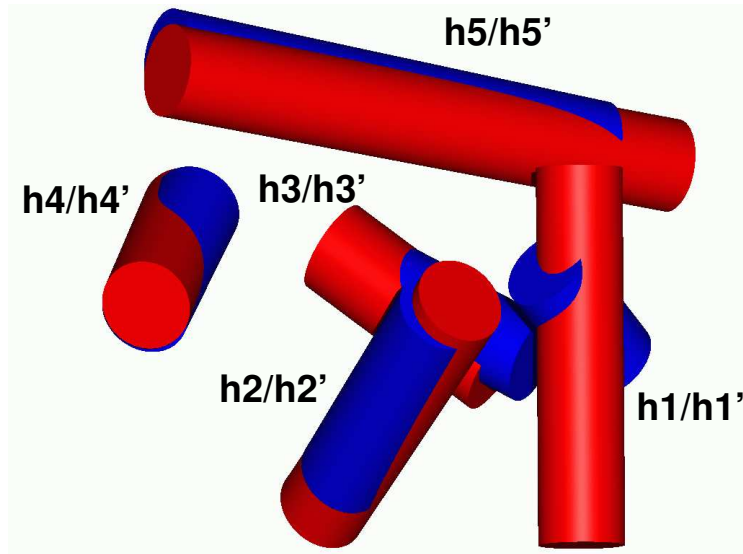


**Abbildung 3.13:** Schematische Darstellung der Tertiärstruktur von NusACTD(339–495).

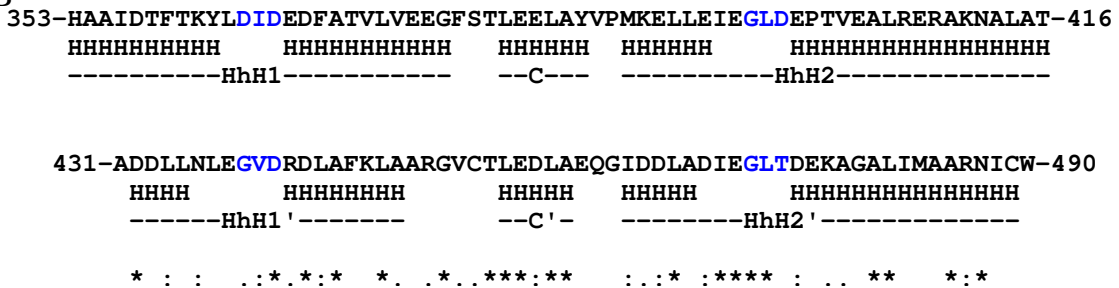
Gezeigt sind die starren Bereiche der beiden Domänen von NusACTD(339–495), wobei jeweils die Struktur mit dem niedrigsten Wert der Zielfunktion in *ribbon*-Darstellung zu sehen ist. NusACTD(339–495) besteht aus zwei Domänen, deren Kernbereiche AR1 und AR2 die Reste H353–T416 beziehungsweise A431–W490 umfassen. Beide Domänen beherbergen zwei HhH-Motive, die aus den Helices h1/h1' und h2/h2' beziehungsweise h4/h4' und h5/h5' gebildet werden. Das aminoternale und carboxyterminale HhH-Motiv packen jeweils gegeneinander und bilden auf diese Weise zusammen mit der Verbindungshelix h3/h3' einen kompakten hydrophoben Kern. Eine derartige Anordnung ist typisch für eine (HhH)<sub>2</sub>-Faltung. Die Abbildung wurde mit Molmol (Koradi *et al.*, 1996) erstellt.

hydrophober und polarer Reste sowie die Elektrostatik untersucht (Abb. 3.15). Beide Domänen sind mit Nettoladungen von -11 und -9 stark sauer und weisen einen theoretischen isoelektrischen Punkt von ungefähr 4 auf. Die Berechnung des elektrostatischen Potentials zeigt eine kontinuierlich negative Potentialoberfläche für beide Domänen. Dagegen ist die Verteilung der hydrophoben und hydrophilen Reste für beide Domänen unterschiedlich.

A

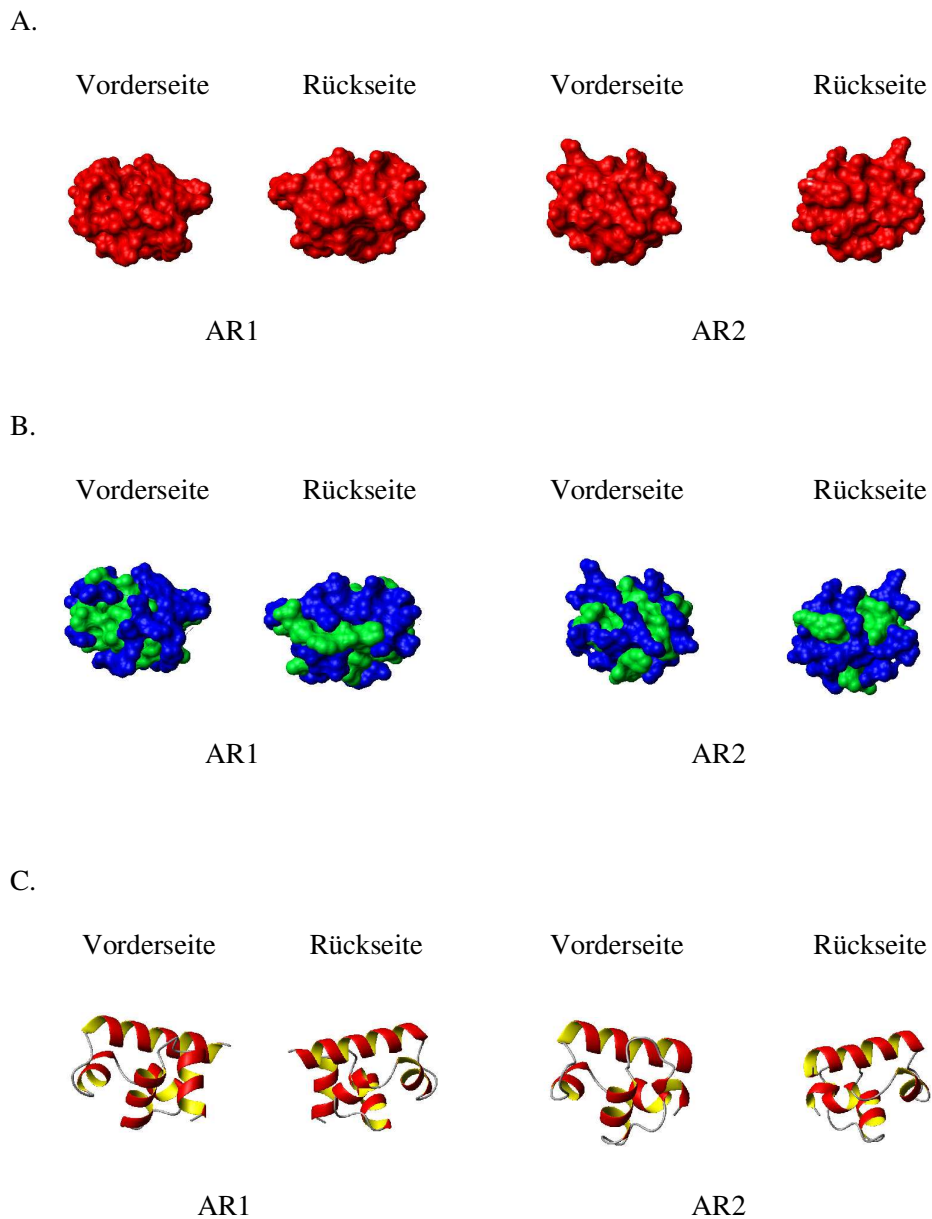


B



**Abbildung 3.14:** Vergleich der sequenzhomologen Bereiche von AR1 und AR2.

(A) Die Anordnung der Helices von AR1 (h1–h5) und AR2 (h1'–h5') im Raum ist durch rote beziehungsweise blaue Zylinder symbolisiert und zeigt eine ähnliche Faltung. Dabei sind bis auf die Helices h1 und h1' sowohl die Lage als auch die Orientierung der Helices konserviert. Unterschiede lassen sich in Bezug auf die Länge der Helices feststellen. Die Überlagerung wurde für die Schweratome des Rückgrats der Durchschnittsstrukturen von I356–A415 und A431–W490 mit Molmol berechnet und dargestellt (Koradi *et al.*, 1996). (B) Aus dem Konsensus des Sequenzvergleichs (\*: identisch; ':': starke/schwache Ähnlichkeit) von AR1 und AR2 ist zu sehen, daß die größeren strukturellen Unterschiede im Bereich der Helices h1/h1' mit einer geringeren Sequenzhomologie korrelieren. Dagegen ist eine hohe Sequenzidentität in der Region der Verbindungshelices sowie der Haarnadelschleifen der carboxyterminalen HhH-Motive zu beobachten. Unterhalb der Sequenz sind zusätzlich die Helices (H) und die Lage der HhH-Motive sowie der Verbindungshelix (C) angeben. Das konservierte GhG-Motiv der Haarnadelschleife ist in blau hervorgehoben. Der Sequenzvergleich wurde mit CLUSTALW 1.82 (Thompson *et al.*, 1994) berechnet.



**Abbildung 3.15:** Oberflächeneigenschaften von AR1 und AR2.

Unter (A) und (B) sind Oberflächendarstellungen der energieärmsten Strukturen von AR1 und AR2 in Bezug auf das elektrostatische Potential beziehungsweise die Verteilung polarer und hydrophober Reste abgebildet. Als Referenz sind unter (C) die jeweiligen Orientierungen der Moleküle in *ribbon*-Darstellung zu sehen. AR1 und AR2 zeigen keine Unterschiede des elektrostatischen Potentials (negativ: rot; positiv: blau; neutral: weiß). Jedoch weisen beide Domänen unterschiedliche Verteilungen der hydrophilen (grün) und polaren (blau) Reste auf.

**3.2.3. Oligomierzustand von NusACTD(339–495).** Wegen der bekannten Neigung von (HhH)<sub>2</sub>-Faltungen Homodimere und -oligomere zu bilden (s. 4.1.2) und des möglichen Einflusses eines Monomer–Dimer–Gleichgewichts auf die <sup>15</sup>N–Relaxationsdaten (Schurr *et al.*, 1994) wurde zunächst die Selbstdiffusion von NusACTD(339–495) in Abhängigkeit von der Konzentration untersucht.

Mit den unter 2.4.1 beschriebenen Experimenten wurden die hydrodynamischen Radien von NusACTD(339–495) relativ zu Dioxan bei NusACTD(339–495)–Konzentrationen von 175 μM, 350 μM und 700 μM bestimmt (Tab. 3.3). Die gemessenen hydrodynamischen Radien sind in dem untersuchten Konzentrationsbereich nicht von der Konzentration abhängig und weisen einen Wert von 25.5 ± 0.2 Å auf.

**Tabelle 3.3:** Selbstdiffusion von NusACTD(339–495).

In der Tabelle sind die hydrodynamischen Radien  $r_H$  von NusACTD(339–495) bei verschiedenen Konzentrationen  $c$  angegeben. Im Bereich von  $c = 175 \mu\text{M}$ – $700 \mu\text{M}$  konnte keine Konzentrationsabhängigkeit des hydrodynamischen Radius festgestellt werden. Zusammen mit theoretischen Berechnungen weisen die Daten daher auf ein vorwiegend monomeres NusACTD(339–495) in diesem Konzentrationsbereich hin.

$c$ (μM)	$r_H$ (Å)
175	25.6 ± 0.3
350	25.2 ± 0.2
700	25.6 ± 0.2

Für gefaltete, kugelförmige Proteine kann der hydrodynamische Radius über die Anzahl der Aminosäuren  $N$  mit Hilfe der empirischen Formel

$$r_H = (4.75 \pm 1.11)N^{0.29 \pm 0.02}$$

abgeschätzt werden (Wilkins *et al.*, 1999). NusACTD(339–495) besteht aus zwei näherungsweise sphärischen Domänen, die über einen flexiblen Linker miteinander verbunden sind (s. 3.1.4 und 3.2.1) und besitzt zudem einen 17 Aminosäuren umfassenden mobilen Aminoterminus. Der hydrodynamische Radius bei nicht–kugelförmigen Proteinen ist als Radius einer Kugel mit demselben Translationsdiffusionskoeffizient definiert (Wilkins *et al.*, 1999). Da die Kugel für eine gegebene Anzahl von Aminosäuren den kleinstmöglichen hydrodynamischen Radius aufweist, kann die Formel von Wilkins *et al.* (1999) lediglich eine untere Grenze für den mittleren Oligomierzustand von NusACTD(339–495) liefern. Die hydrodynamischen Radien für ein NusACTD(339–495)–Monomer  $N = 159$ , –Dimer  $N = 318$  sowie –Trimer  $N = 477$  betragen 20.7 Å, 25.3 Å und 28.4 Å und sprechen dafür, daß der mittlere Oligomierzustand maximal einem Dimer entspricht.

Um den Einfluß der Anisotropie eines Zwei-Domänen Proteins auf den hydrodynamischen Radius abschätzen zu können, wurde NusACTD(339–495) als zylinderförmiges Dimer aus zwei kugelförmigen Monomereinheiten NusA(353–416) und NusA(431–490) modelliert. Mit den Gleichungen für die Abhängigkeit des Rotations-Diffusionskoeffizienten des Dimers  $D^D$  von dem Rotations-Diffusionskoeffizienten des Monomers  $D^M$  aus Schurr *et al.* (1994) erhält man folgenden Zusammenhang zwischen dem Radius des Dimers  $r_H^D$  und dem Radius des Monomers  $r_H^M$ .

Nach Schurr *et al.* (1994) gilt für die Eigenwerte des axialsymmetrischen Diffusionstensors (s. 2.4.2.7) des Dimers  $D_{\perp}^D$  und  $D_{\parallel}^D$

$$D_{\perp}^D = D^M / 4.667$$

und

$$D_{\parallel}^D = D^M / 2$$

so daß man mit Gleichung (9) (S. 53)  $D^D$  zu

$$D^D = \frac{2D_{\perp}^D + D_{\parallel}^D}{3} = 0.31 \cdot D^M$$

erhält. Aus der Stokes-Einstein Beziehung für die Rotationsdiffusion,

$$D_{\text{iso}} = \frac{k_B T}{8\pi\eta(r_H)^3}$$

mit der Viskosität der Lösung  $\eta$ , der Temperatur  $T$  und der Boltzmann-Konstante  $k_B$  ist zu sehen, daß der Diffusionskoeffizient  $D_{\text{iso}}$  indirekt proportional zu  $r_H^3$  ist (Korzhnev *et al.*, 2001). Damit läßt sich der hydrodynamische Radius des Dimers aus dem Radius des Monomers mit  $r_H^M = 15.9 \text{ \AA}$  für  $N = 64$  über

$$r_H^D = r_H^M \sqrt[3]{\frac{D^M}{D^D}} = 1.47 \cdot r_H^M$$

zu  $23.3 \text{ \AA}$  abschätzen.

Im Vergleich zu dem experimentellen Wert von  $r_H = 25.5 \pm 0.2 \text{ \AA}$  ist der theoretisch ermittelte Wert um circa 10% geringer. Jedoch wurden für obige Überlegungen die aminoterminalen flexiblen Reste NusA(339–352) sowie die 14 Reste umfassende Linkerregion NusA(417–430) nicht berücksichtigt, so daß der Wert des theoretisch bestimmten hydrodynamischen Radius unterschätzt sein dürfte.

Insgesamt kann ein geringer Anteil an Dimer oder höheren Aggregaten in der Lösung nicht ausgeschlossen werden. Ein reversibles Monomer–Oligomer–Gleichgewicht ist in dem untersuchten Konzentrationsbereich von  $175 \mu\text{M}$ – $700 \mu\text{M}$  aufgrund der fehlenden Konzentrationsabhängigkeit des hydrodynamischen Radius jedoch unwahrscheinlich. Die im folgenden beschriebenen Relaxationsmessungen (s. 3.2.4) sollten daher nicht wesentlich durch Oligomerbildung beeinflusst sein. Zusätzlich liefern die theoretisch und experimentell bestimmten hydrodynamischen Radien eine Unter– beziehungsweise Obergrenze für die Rotationskorrelationszeit von NusACTD(339–495) bei  $T = 298 \text{ K}$ . Mit der Viskosität von  $\text{H}_2\text{O}$   $\eta^{298}(\text{H}_2\text{O}) = 89 \cdot 10^{-5} \text{ Pas}$  und  $k_B = 1.38 \cdot 10^{23} \text{ J/K}$  erhält man mit der Stokes–Einstein Beziehung und Gleichung (9) (S. 53)  $\tau_{c,\text{eff}} = 11.5 \text{ ns}$ – $15 \text{ ns}$ .

**3.2.4. Dynamik von NusACTD(339–495) aus  $^{15}\text{N}$ –Relaxationsdaten.** Für NusACTD(339–495) kann wegen der Domänenstruktur von Bewegungen auf mindestens drei Zeitskalen ausgegangen werden. Neben der Rotationskorrelationszeit, die die Bewegung des Gesamtmoleküls in Lösung beschreibt, erwartet man eine langsame Bewegung der Domänen auf einer Nanosekunden–Zeitskala sowie Bewegungen einzelner Reste auf einer Pikosekunden–Zeitskala. Die Charakterisierung eines Systems mit langsamen internen Bewegungen größerer Regionen erfordert Relaxationsdaten bei mindestens zwei Feldern (Korzhnev *et al.*, 1997), so daß zusätzliche Relaxationsexperimente mit einer zweiten Probe (Probe 2) von  $^{15}\text{N}$ –NusACTD(339–495) bei 400 MHz und 600 MHz durchgeführt wurden (s. 2.4.2). Die Relaxationsdaten von Probe 2 sind in Abbildung 3.16 dargestellt und im Anhang abgedruckt (s. B.0.7).

Die Auswertung der  $^{15}\text{N}$ –Relaxationsdaten erfolgt in drei Schritten. Zunächst werden die Rohdaten von Probe 2 analysiert und mit den bereits aufgenommenen Daten von Probe 1 verglichen (s. 3.2.4.1).

In einem zweiten Schritt werden Reste mit signifikanter interner Dynamik innerhalb der Domänen identifiziert (s. 3.2.4.2). Diese sind vor allem im Hinblick auf die Wechselwirkung von NusACTD(339–495) mit  $\lambda\text{N}$  und  $\alpha\text{CTD}$  interessant, da Dynamik häufig eine wichtige Rolle in Erkennungsprozessen spielt (Atkinson und Kieffer, 2004).

Zuletzt werden die Domänenbewegungen näher charakterisiert. Bisher hat sich kein rigoroser Standard–Ansatz für die Beschreibung von Domänenbewegungen mit größerer Amplitude etabliert, es gibt jedoch exemplarische Auswertungen für Proteine mit internen langsamen Bewegungen (Larsson *et al.*, 2003; Orekhov *et al.*, 1999) und Mehrdomänen–Proteine (Yoshida *et al.*, 2003; Chang *et al.*, 2003; Baber *et al.*, 2001; Ulmer *et al.*, 2002; Ghose *et al.*, 2001; Hwang

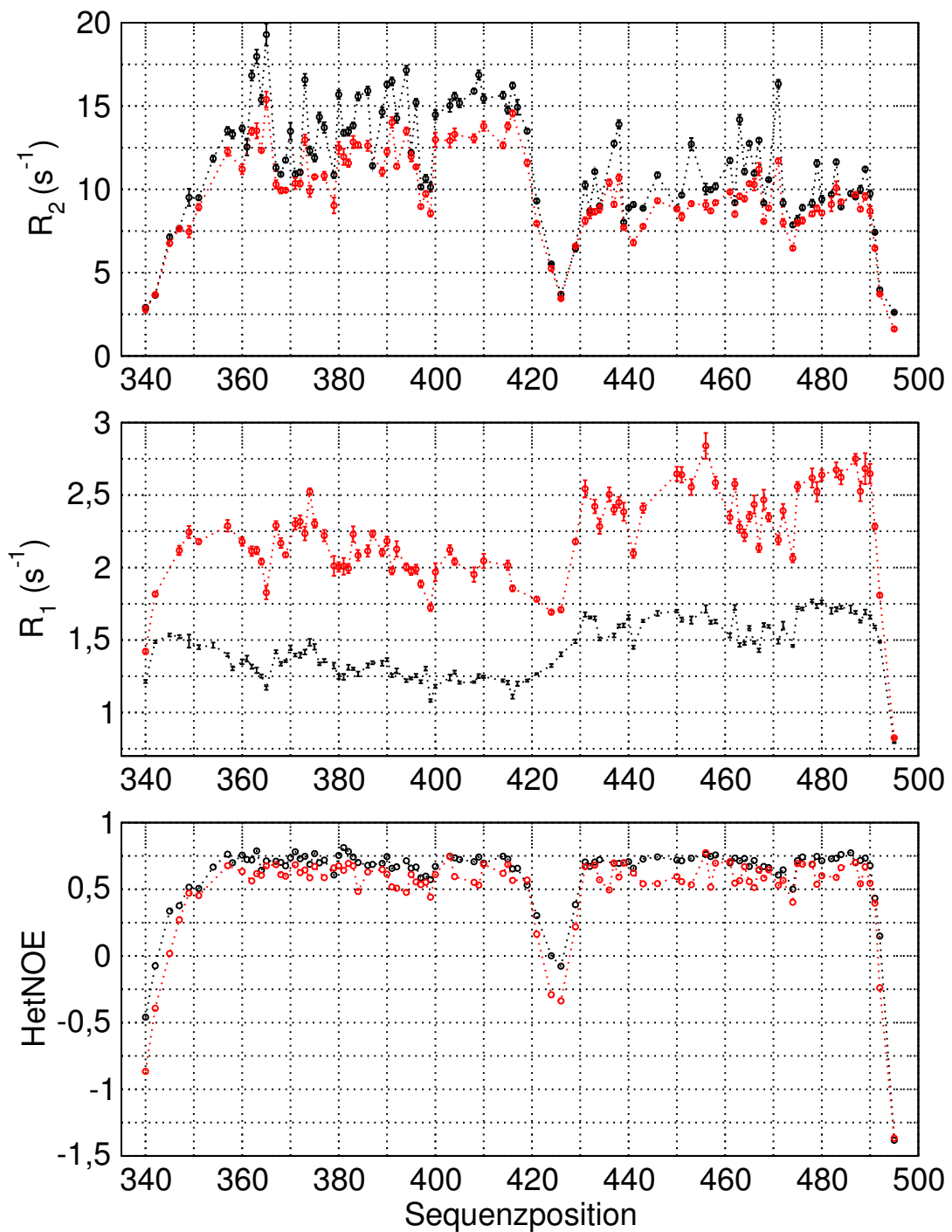
*et al.*, 2001; Bocharov *et al.*, 2004). Im folgenden werden mit der von Ulmer *et al.* (2002) und Bocharov *et al.* (2004) eingesetzten Methodik aus den  $\frac{R_2}{R_1}$ -Verhältnissen die Diffusionstensoren für die beiden Domänen berechnet und mit Daten aus hydrodynamischen Modellen verglichen. Dies erlaubt zum Beispiel die Bestimmung der mittleren Orientierung der Domänen zueinander (s. 3.2.4.3). Dagegen kann mit der von Baber *et al.* (2001) vorgeschlagenen Interpretation des erweiterten modellfreien Ansatzes von Clore *et al.* (1990) unter anderem die Amplitude und Zeitskala der Domänenbewegung ermittelt werden (s. 3.2.4.4).

3.2.4.1. *Analyse der Rohdaten.* Die Auswertung der Rohdaten von Probe 2 erfolgte analog zu Probe 1 (Tab. 3.1) und ist in Tabelle 3.4 zu sehen. Insgesamt konnten für 86 (400 MHz) beziehungsweise 105 (600 MHz) Amidstickstoffe des Rückgrats jeweils  $R_{1-}$ ,  $R_{2-}$  und *HetNOE*-Daten aus den Spektren gewonnen werden. Die durchschnittlichen Fehler der Relaxationsdaten von Probe 2 betragen bei 400 MHz 2.23% für  $R_2$ , 1.72% für  $R_1$  und 12.69% für den *HetNOE*, sowie bei 600 MHz 1.76% für  $R_2$ , 0.93% für  $R_1$  und 5.12% für den *HetNOE*. Die hohen Fehler des *HetNOE* sind auf die Insensitivität des *HetNOE*-Experiments zurückzuführen (Fischer *et al.*, 1998). Der Vergleich der durchschnittlichen  $R_{2-}$ ,  $R_{1-}$  und *HETNOE*-Werte von Probe 1 (s. 3.1.4) ( $R_2$ :  $10.88 \pm 0.15 \text{ s}^{-1}$ ,  $R_1$ :  $1.44 \pm 0.02 \text{ s}^{-1}$ , *HetNOE*:  $0.63 \pm 0.03$ ) und Probe 2 bei 600 MHz ( $R_2$ :  $11.61 \pm 0.20 \text{ s}^{-1}$ ,  $R_1$ :  $1.44 \pm 0.01 \text{ s}^{-1}$ , *HetNOE*:  $0.62 \pm 0.03$ ) zeigt bis auf eine Variation von  $R_2$  um circa 6% eine gute Reproduzierbarkeit der Daten. Die Schwierigkeiten bei der akkuraten Bestimmung von  $R_2$ -Raten sind bekannt (Lee und Wand, 1999) und könnten zum Beispiel auf off-Resonanz-Effekte zurückzuführen sein (Korzhnev *et al.*, 2000, 2001). Ein Einfluß der unterschiedlichen Konzentrationen (Probe 1: 630  $\mu\text{M}$ ; Probe 2: 500  $\mu\text{M}$ ) ist dagegen unwahrscheinlich, da im Falle einer konzentrationsabhängigen Oligomerisierung höhere  $R_2$ -Werte für die konzentriertere Probe erwartet werden würden. Zudem sprechen die hydrodynamischen Radien bei den in den Relaxationsexperimenten verwendeten Konzentrationen dafür, daß NusACTD(339–495) vorwiegend als Monomer vorliegt (s. 3.2.3).

3.2.4.2. *Reste mit interner Flexibilität.* Interne Flexibilität umfaßt neben Mobilität von Resten auf einer Pikosekunden-Zeitskala mit größerer Amplitude auch Reste, die chemischen Austausch zeigen.

Ein eventuell vorhandener Austauschbeitrag läßt sich mit Hilfe der RSDM-Methode (s. 2.4.2.6) aus den Rohdaten berechnen (Farrow *et al.*, 1995). Allerdings sind kleine Austauschbeiträge wegen der Bestimmung aus den Differenzen ähnlicher Größen (Gl. (7), S. 52; Gl. (8), S. 52) stark fehlerbehaftet, weshalb erst Reste mit Austauschbeiträgen  $R_{ex} > 1.5 \text{ s}^{-1}$  bei 400 MHz als





**Abbildung 3.16:** Relaxationsdaten bei 400 MHz und 600 MHz (Probe 2).

Die Abbildung zeigt transversale und longitudinale Relaxationsraten  $R_2$  und  $R_1$  sowie den *HetNOE* einer  $500 \mu\text{M}$   $^{15}\text{N}$ -NusACTD(339–495) Probe bei 400 MHz (rot) und 600 MHz (schwarz).

NusA	340–352	353–416 (AR1)	417–430	431–490 (AR2)	491–495
<i>600 MHz</i>					
$\langle \text{HetNOE} \rangle$	$0.14 \pm 0.40$	$0.70 \pm 0.06$	$0.30 \pm 0.29$	$0.70 \pm 0.05$	$-0.03 \pm 0.93$
$\langle R_2 \rangle$ (s <sup>-1</sup> )		$14.1 \pm 2.2$		$10.4 \pm 1.8$	
$\langle R_1 \rangle$ (s <sup>-1</sup> )		$1.3 \pm 0.1$		$1.6 \pm 0.9$	
<i>400 MHz</i>					
$\langle \text{HetNOE} \rangle$	$-0.01 \pm 0.53$	$0.61 \pm 0.07$	$0.06 \pm 0.38$	$0.61 \pm 0.08$	$-0.17 \pm 0.89$
$\langle R_2 \rangle$ (s <sup>-1</sup> )		$11.9 \pm 1.6$		$9.0 \pm 1.1$	
$\langle R_1 \rangle$ (s <sup>-1</sup> )		$2.1 \pm 0.2$		$2.5 \pm 0.2$	

**Tabelle 3.4:** Qualitative Auswertung der Relaxationsdaten von NusACTD(339–495) bei 600 MHz und 400 MHz (Probe 2).

In der Tabelle sind jeweils die durchschnittlichen  $R_2$ -,  $R_1$ - und *HetNOE*-Werte sowie deren Standardabweichungen zusammengefaßt. Die Ausschnitte aus NusACTD(339–495) wurden wie in der Auswertung unter 3.1.4 gewählt.

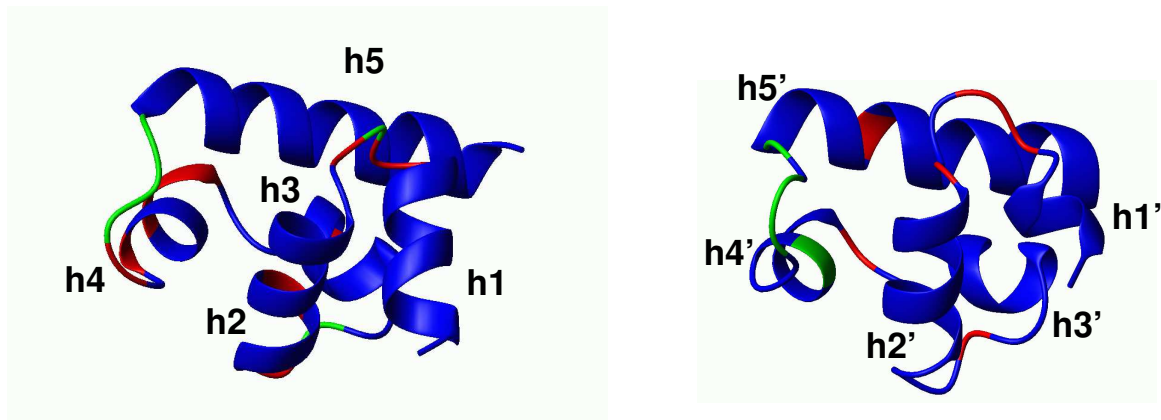
signifikant angenommen wurden. Insgesamt weisen 17 Aminosäuren einen wesentlichen Austauschbeitrag auf (Tab. 3.5), die meisten davon liegen in Schleifenbereichen oder an Helixenden (Abb. 3.17). Austauscheffekte an Helixenden können dabei auf *Helix-coil*-Übergänge zurückzuführen sein (Maciejewski *et al.*, 2000).

Reste mit *HetNOE* < 0.65 bei 600 MHz am Amino- und Carboxyterminus sowie im Linkerbereich weisen auf eine erhebliche Beweglichkeit auf einer Pikosekunden-Zeitskala hin. Aufgrund dieser deutlichen Unterschiede des *HetNOE* erfolgte bereits die Bestimmung der Domänengrenzen (s. 3.2.4 und 3.2.1). Innerhalb der Domänen zeigen nur neun Reste erniedrigte *HetNOE*-Werte (Tab. 3.5), so daß die Domänen in guter Näherung als starre Einheiten betrachtet werden können. Mit Ausnahme von L467 und S379 sind die flexiblen Reste in den Haarnadelschleifen der HhH-Motive zu finden (Abb. 3.17).

Dynamikuntersuchungen an der humanen DNA Polymerase  $\beta$  (Maciejewski *et al.*, 2000) und der  $\alpha$ -Untereinheit der *E.coli* RNA Polymerase (Jeon *et al.*, 1997), die ein beziehungsweise zwei HhH-Motive besitzen, konnten ebenfalls eine erhöhte Mobilität der Haarnadelschleifen nachweisen. Die HhH-Motive beider Proteine sind an Protein-DNA beziehungsweise Protein-Protein-Wechselwirkungen beteiligt (Benoff *et al.*, 2002; Maciejewski *et al.*, 2000).

AR1	AR2
<i>Reste mit Austauschbeitrag</i>	
Y362, L363, I365, L373, G377,	L437, E438, D441, V453, G463
Y386, M389, K390, E394, E396	E471, G479,
<i>Reste mit Mobilität auf Pikosekunden–Zeitskala</i>	
D364, S379, G397, L398, D399	L467, E471, G472, T474

**Tabelle 3.5:** Aminosäurereste in NusACTD(339–495) mit interner Flexibilität.

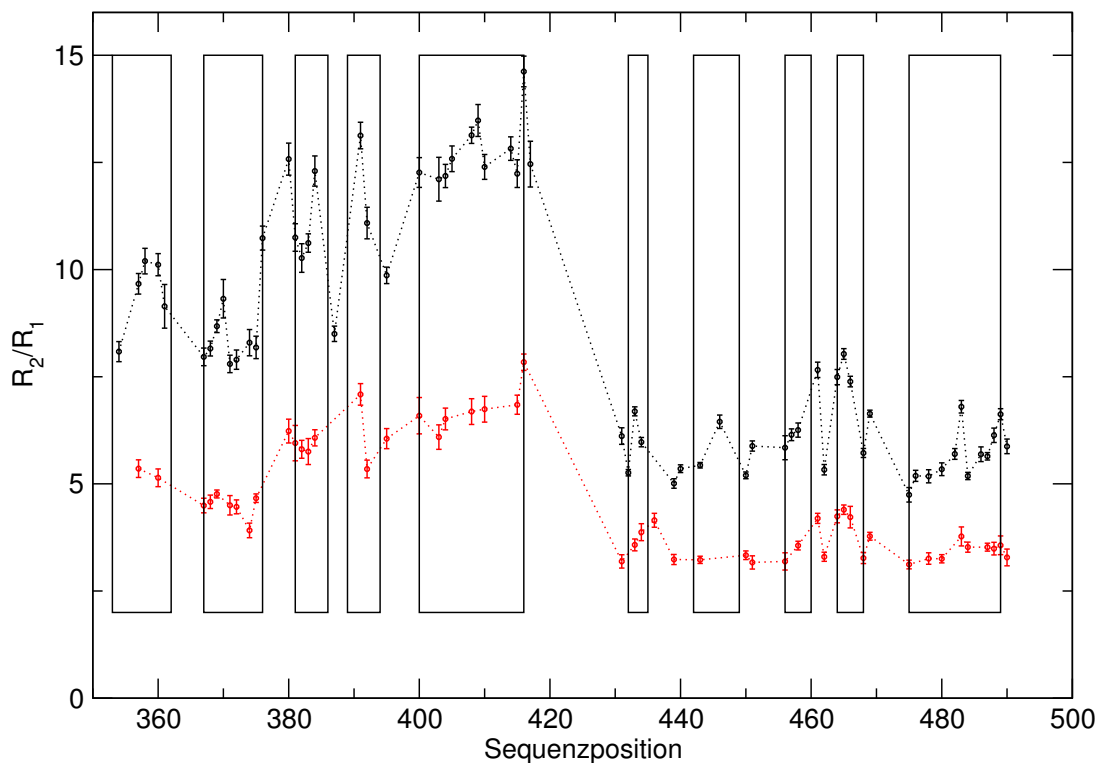


**Abbildung 3.17:** Interne Flexibilität von AR1 (links) und AR2 (rechts).

Die Abbildung zeigt die energieärmsten Strukturen der beiden Domänen von NusACTD(339–495), wobei Reste mit Austauschbeitrag in rot sowie Reste mit einer signifikanten Mobilität auf einer Pikosekunden–Zeitskala in grün eingezeichnet sind. Flexibilität auf den betrachteten Zeitskalen ist fast ausschließlich in den Schleifenregionen der HhH–Motive zu beobachten, während Reste in Sekundärstrukturelementen kaum interne Dynamik zeigen.

3.2.4.3. *Rotationsdiffusion der beiden Domänen.* Die Reorientierung starrer Teilchen in Lösung läßt sich abhängig von der Form des Moleküls durch unterschiedliche Diffusionsmodelle beschreiben (s. 2.4.2.7).

In Abb. 3.18 sind die zur Berechnung der Diffusionstensoren verwendeten  $\frac{R_2}{R_1}$ –Verhältnisse (s. 2.4.2.7) zusammen mit der Sekundärstruktur gegen die Sequenzposition aufgetragen. N–H<sup>N</sup>–Vektoren in Helices sind im allgemeinen nahezu parallel ausgerichtet, so daß für die Reste innerhalb einer Helix ähnliche  $\frac{R_2}{R_1}$ –Verhältnisse erwartet werden. In NusACTD(339–495) ist dies für längere Helices, vor allem h1, h2, h5 und h5' zu beobachten. Die Unterschiede zwischen den



**Abbildung 3.18:**  $\frac{R_2}{R_1}$ -Verhältnisse von NusACTD(339–495).

Die Abbildung zeigt die für die quantitative Auswertung der Rotationsdiffusion verwendeten  $\frac{R_2}{R_1}$ -Verhältnisse bei 400 MHz (rot) und 600 MHz (schwarz) in Abhängigkeit von der Sequenzposition. Die Lage der Helices ist durch schwarze Umrandungen gekennzeichnet. Aus den Unterschieden der durchschnittlichen  $\frac{R_2}{R_1}$ -Verhältnisse in den längeren Helices, zum Beispiel h2 und h5, kann auf eine anisotrope Reorientierung geschlossen werden.

mittleren  $\frac{R_2}{R_1}$ -Verhältnissen von Helices h1, h2 und h5 weisen auf eine anisotrope Reorientierung der Domänen hin. Höhere  $\frac{R_2}{R_1}$ -Verhältnisse entsprechen dabei einem kleineren Winkel zur Achse mit dem größten Eigenwert des Diffusionstensors.

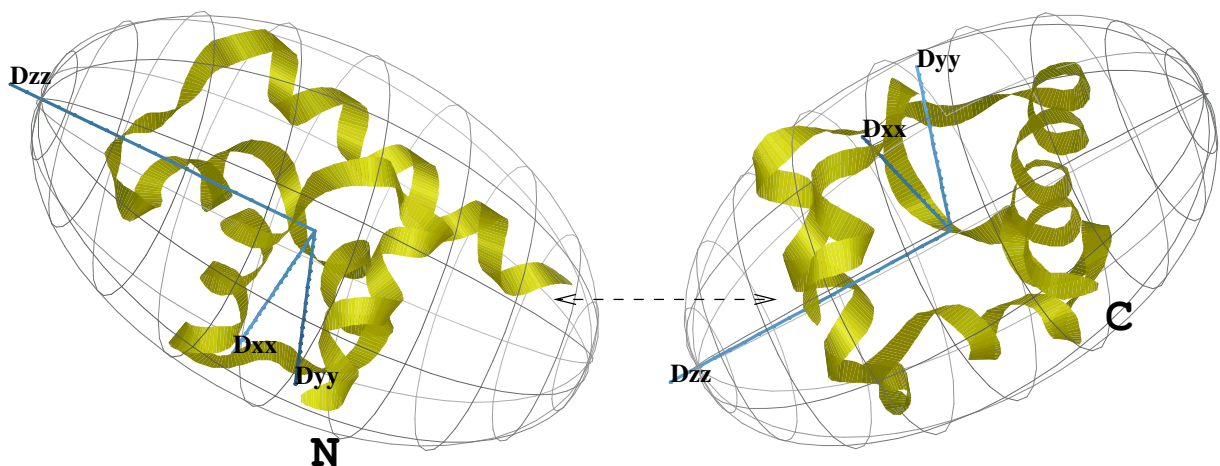
Die aus der Anpassung der Daten bei 400 MHz und 600 MHz für NusA(353–416) beziehungsweise NusA(431–490) erhaltenen Diffusionsparameter (s. 2.4.2.7) sind in Tab. 3.6 zusammengestellt. Der Vergleich der Rotationskorrelationszeiten  $\tau_{c,\text{eff}}$  der einzelnen Domänen von 9.5–10.2 ns beziehungsweise 7.0–7.6 ns mit der aus hydrodynamischen Daten und theoretischen Überlegungen abgeschätzten Rotationskorrelationszeit des Gesamtpartikels von 11.5–15 ns (s. 3.2.3) zeigt unmittelbar einen wesentlichen Einfluß der Domänenbewegung auf die Relaxationsdaten (Orekhov *et al.*, 1999). Dabei ist es bei langsamen Bewegungen größerer Teile des

	400 MHz		600 MHz	
	NusA(339–416)	NusA(431–495)	NusA(339–416)	NusA(431–495)
<i>isotrop</i>				
$\tau_c$ ( $10^{-9}$ s)	$9.90 \pm 0.03$	$7.49 \pm 0.02$	$9.68 \pm 0.02$	$7.03 \pm 0.01$
$\chi_{\text{exp}}^2$	$1.2 \cdot 10^3$	$4.4 \cdot 10^2$	$3.5 \cdot 10^3$	$2.6 \cdot 10^3$
$\chi_{5\%}^2$	$3.5 \cdot 10^1$	$3.5 \cdot 10^1$	$4.8 \cdot 10^1$	$4.3 \cdot 10^1$
<i>axialsymmetrisch (Prolat)</i>				
$D_{\perp}$ ( $10^7$ s $^{-1}$ )	$1.34 \pm 0.01$	$1.86 \pm 0.02$	$1.47 \pm 0.01$	$1.95 \pm 0.01$
$D_{\parallel}$ ( $10^7$ s $^{-1}$ )	$2.40 \pm 0.03$	$2.90 \pm 0.04$	$2.33 \pm 0.01$	$3.07 \pm 0.02$
$\zeta$	$1.79 \pm 0.03$	$1.56 \pm 0.04$	$1.59 \pm 0.01$	$1.57 \pm 0.02$
$\tau_{\text{c,eff}}$ ( $10^{-9}$ s)	$9.83 \pm 0.09$	$7.55 \pm 0.09$	$9.50 \pm 0.04$	$7.17 \pm 0.05$
$\chi_{\text{exp}}^2$	$2.5 \cdot 10^2$	$2.0 \cdot 10^2$	$9.2 \cdot 10^2$	$1.6 \cdot 10^3$
$\chi_{5\%}^2$	$3.3 \cdot 10^1$	$3.0 \cdot 10^1$	$4.3 \cdot 10^1$	$3.9 \cdot 10^1$
<i>axialsymmetrisch (Oblat)</i>				
$D_{\perp}$ ( $10^7$ s $^{-1}$ )	$1.93 \pm 0.01$	$2.53 \pm 0.03$	$2.0 \pm 0.01$	$2.59 \pm 0.01$
$D_{\parallel}$ ( $10^7$ s $^{-1}$ )	$1.05 \pm 0.02$	$1.76 \pm 0.03$	$1.2 \pm 0.01$	$2.02 \pm 0.02$
$\zeta$	$0.54 \pm 0.01$	$0.69 \pm 0.02$	$0.58 \pm 0.01$	$0.78 \pm 0.01$
$\tau_{\text{c,eff}}$ ( $10^{-9}$ s)	$10.18 \pm 0.08$	$7.29 \pm 0.09$	$9.69 \pm 0.05$	$6.94 \pm 0.04$
$\chi_{\text{exp}}^2$	$2.5 \cdot 10^2$	$3.2 \cdot 10^2$	$1.2 \cdot 10^3$	$2.3 \cdot 10^3$
$\chi_{5\%}^2$	$3.3 \cdot 10^1$	$3.1 \cdot 10^1$	$4.1 \cdot 10^1$	$3.9 \cdot 10^1$
<i>anisotrop</i>				
$D_{\text{xx}}$ ( $10^7$ s $^{-1}$ )	$1.13 \pm 0.02$	$1.61 \pm 0.03$	$1.27 \pm 0.01$	$1.75 \pm 0.02$
$D_{\text{yy}}$ ( $10^7$ s $^{-1}$ )	$1.61 \pm 0.02$	$2.07 \pm 0.04$	$1.69 \pm 0.01$	$2.13 \pm 0.02$
$D_{\text{zz}}$ ( $10^7$ s $^{-1}$ )	$2.23 \pm 0.03$	$3.03 \pm 0.05$	$2.25 \pm 0.01$	$3.20 \pm 0.02$
$\zeta$	$1.62 \pm 0.04$	$1.65 \pm 0.06$	$1.52 \pm 0.02$	$1.65 \pm 0.03$
$\eta$	$0.85 \pm 0.07$	$0.57 \pm 0.08$	$0.82 \pm 0.05$	$0.45 \pm 0.04$
$\tau_{\text{c,eff}}$ ( $10^{-9}$ s)	$10.06 \pm 0.14$	$7.45 \pm 0.13$	$9.58 \pm 0.08$	$7.07 \pm 0.06$
$\chi_{\text{exp}}^2$	$1.1 \cdot 10^2$	$1.6 \cdot 10^2$	$6.4 \cdot 10^2$	$1.4 \cdot 10^3$
$\chi_{5\%}^2$	$2.9 \cdot 10^1$	$2.7 \cdot 10^1$	$4.0 \cdot 10^1$	$3.6 \cdot 10^1$

**Tabelle 3.6:** Parameter der Rotationsdiffusion für NusACTD(339–495).

Moleküls prinzipiell nicht möglich bei einem Feld die Diffusionsparameter des Gesamtpartikels zu ermitteln (Korzhnev *et al.*, 1997). Die skalierten Diffusionsparameter erlauben dennoch Aussagen über das Zwei-Domänensystem. So bestätigen die unterschiedlichen Diffusionstensenoren für die beiden Domänen das bereits aus dipolaren Kopplungen abgeleitete Modell von zwei sich unkorreliert bewegenden Domänen, die über einen flexiblen Linker verbunden sind (s. 3.1.7). Durch den Vergleich mit Diffusionsparametern aus hydrodynamischen Modellen (2.4.2.9), die für die Kernbereiche der Domänen, NusA(353–416) und NusA(431–490), berechnet wurden, läßt sich zeigen, daß noch eine Kopplung zwischen den Domänen besteht. Insbesondere sind die daraus bestimmten Anisotropien von 1.2 beziehungsweise 1.1 kleiner als die experimentell bestimmten Anisotropien von 1.5–1.7. Der Einfluß der flexiblen Amino- und Carboxy-Termini auf die Anisotropie der isolierten Domänen wurde dabei vernachlässigt. Die graphische Darstellung der Diffusionstensenoren (Abb. 3.19) veranschaulicht die Anisotropie und zeigt, daß die  $z$ -Achsen der Tensenoren ungefähr mit der Verbindungsachse eines gestreckten NusACTD-Moleküls übereinstimmen, so daß von einer im Mittel elongierten Struktur von NusACTD in Lösung ausgegangen werden kann. Die Kopplung der Domänen beruht wahrscheinlich auf sterischen Beschränkungen durch die Linkerregion.

Anzumerken ist allerdings, daß die Kopplung der Gesamtbewegung mit der Domänenbewegung ein Grund für die schlechte Übereinstimmung der Daten mit den unterschiedlichen Diffusionsmodellen sein könnte, die sich in hohen Werten der Zielfunktion  $\chi_{\text{exp}}^2$  relativ zu den kritischen Werten der jeweils passenden  $\chi^2$ -Verteilung äußert. Die tabellierten kritischen Werte  $\chi_{5\%}^2$  entsprechen dabei einem Vertrauensbereich von 95% für die Hypothese, daß das Modell die Daten adequat wiedergeben kann (s. 2.4.2.8). Die Diffusionsmodelle können im Fall eines Zwei-Domänen Proteins ausschließlich die Grenzfälle des starren Zwei-Domänen Proteins oder der isolierten Domänen exakt beschreiben. Für alle zwischen den Grenzfällen liegenden, dynamisch gekoppelten *beads on a string* Systeme (Fushman *et al.*, 2004) stellen die verwendeten Gleichungen (Gl. (10), S. 53; Gl. (11), S. 54; Gl. (12), S. 54) gezwungenermaßen eine Näherung dar, so daß auf eine Selektion des am besten passenden Modells (s. 2.4.2.8) verzichtet wurde. Allerdings können hohe  $\chi_{\text{exp}}^2$ -Werte nicht nur durch den Näherungsfehler im Modell, sondern zusätzlich auch durch unterschätzte Fehler der Meßdaten entstehen (s. 3.2.4.1). So erhöht zum Beispiel eine anisotrope Verteilung der Bindungsvektoren, wie sie in helikalen Proteinen auftritt, die Unsicherheit der Diffusionstensorbestimmung (Pawley *et al.*, 2002). Zudem wurden in der



**Abbildung 3.19:** Diffusionstensoren von NusA(351–426) und NusA(426–495).

Die Abbildung zeigt die Diffusionstensoren, die für die energieärmsten Strukturen von NusA(351–426) (links) und NusA(426–495) (rechts) aus den Relaxationsraten bei 400 MHz berechnet wurden. Das eingezeichnete Achsensystem entspricht dem Hauptachsensystem, wobei die Länge der Achsen proportional zu den jeweiligen Eigenwerten ist. Die Anisotropie der beiden Diffusionstensoren ist deutlich zu sehen und ist vermutlich auf die Kopplung der beiden Domänen über die Linkerregion zurückzuführen. Die Lage der  $z$ -Achsen der Tensoren ist ungefähr kollinear zu der gedachten Verbindungsachse eines gestreckten NusACTD(339–495)-Moleküls und weist auf eine im Mittel elongierte NusACTD(339–495)-Struktur hin. In Übereinstimmung mit den  $\frac{R_2}{R_1}$ -Verhältnissen liegt die lange carboxyterminale Helix h5 von NusA(351–426) in etwa parallel zur Hauptachse mit dem größten Eigenwert. Der Doppelpfeil zeigt auf den Carboxy-Terminus von NusA(351–426) beziehungsweise den Amino-Terminus von NusA(426–495).

Analyse die Ungenauigkeiten der Struktur vernachlässigt, die unter der Annahme einer Unsicherheit von  $5^\circ$  einer Erhöhung der Fehler der Raten um jeweils  $\sqrt{2}$  entsprechen (Pawley *et al.*, 2002).

3.2.4.4. *Amplitude und Zeitskala der Domänenbewegung.* Ein physikalisches Modell zur Beschreibung der Dynamik von zwei über einen Linker gekoppelten Domänen wurde von Barber *et al.* (2001) vorgeschlagen. Langsame und schnelle Bewegungen werden darin relativ zu dem Diffusionstensor einer dynamisch gemittelten Durchschnittsstruktur bestimmt, wobei die langsame Bewegung der Domänenbewegung entspricht (s. 2.4.2.10). Wegen der Anisotropie des Gesamtpartikels wurde zudem eine axialsymmetrische globale Bewegung mit der Rotationskorrelationszeit  $\tau_{c,\text{eff}}$ , der Anisotropie  $\zeta$  sowie den Polarwinkeln  $\theta$  und  $\phi$  angenommen, die die Lage der Symmetrieachse im Koordinatensystem des Moleküls beschreiben (s. 2.4.2.7). Für die Parametrisierung der internen Bewegungen wurde das erweiterte Lipari–Szabo–Modell (Clore *et al.*,

1990) verwendet, in dem der Ordnungsparameter  $S_s$  und die Zeitkonstante  $\tau_s$  die Domänenbewegung repräsentieren und der Ordnungsparameter  $S_f$  schnelle Bewegungen mit kleiner Amplitude berücksichtigt (Clore *et al.*, 1990; Baber *et al.*, 2001) (s. 2.4.2.10).

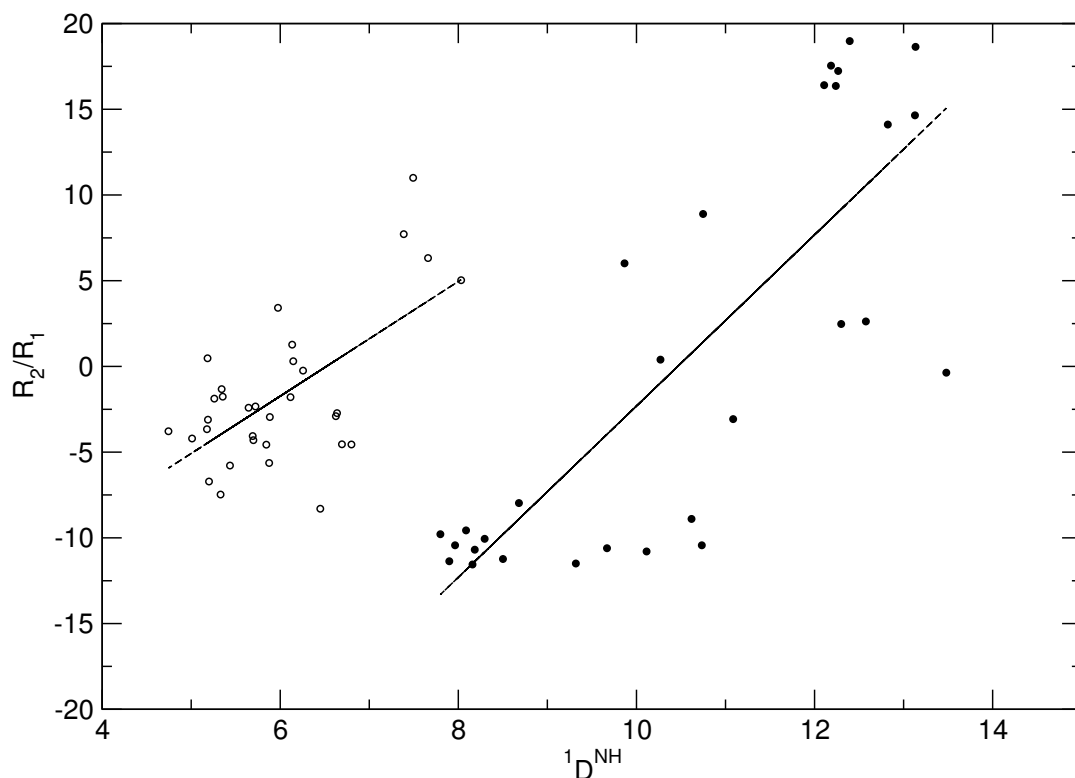
Die Abschätzung der globalen Parameter kann im Fall langsamer Domänenbewegungen nicht getrennt von der Analyse der internen Bewegungen erfolgen, so daß die globalen Parameter simultan mit den internen Parametern an die Relaxationsdaten bei zwei Feldern und die Strukturdaten angepaßt werden müssen. Die Optimierung der Parameter wurde dabei getrennt für NusA(353–416) und NusA(431–490) durch Kombination eines *Grid-Search* mit einer anschließenden Powell-Minimierung durchgeführt.

Die auf diese Weise ermittelten Parameter zeigten jedoch eine starke Abhängigkeit von der Schrittweite des *Grid-Search*. Als Ursache für dieses Verhalten konnten die geringen Unterschiede der Zielfunktion für verschiedene Parameterkombinationen von  $\tau_{c,\text{eff}}$ ,  $\zeta$ ,  $S_s$  und  $\tau_s$  identifiziert werden. Eine fehlende Konvergenz bei dieser Art von Analyse wurde bereits in den Studien von Orekhov *et al.* (1999), Chang *et al.* (2003) und Baber *et al.* (2001) beschrieben. Das Problem kann zum Beispiel durch zusätzliche Beschränkungen, wie die Vorgabe eines  $\tau_{c,\text{eff}}$ -Wertes (Baber *et al.*, 2001) oder temperaturabhängige Messungen bei mehreren Feldern (Chang *et al.*, 2003) umgangen werden.

Unabhängig von der Frage, ob ein geeigneter  $\tau_{c,\text{eff}}$ -Wert gefunden werden kann, und ob die Annahmen für die von Clore *et al.* (1990) vorgeschlagene Leistungsdichte überhaupt erfüllt sind, zeigen die Untersuchungen von Jin *et al.* (1997), daß eine Analyse von langsamen internen Bewegungen wegen des großen möglichen Lösungsbereichs im Parameterraum für fehlerbehaftete Daten hohe Anforderungen an die benötigte Genauigkeit der Messungen stellt. Kritisch für die akkurate Bestimmung der Bewegungsparameter sind vor allem präzise *HetNOE*-Werte bei niedrigen Feldstärken (Chang *et al.*, 2003), die jedoch aufgrund der inherenten Insensitivität des entsprechenden Experiments (Renner *et al.*, 2002) kaum zugänglich sind. Die Amplitude der relativen Domänenbewegung wurde daher alternativ aus dipolaren Restkopplungen  $^1D(\text{H}^N\text{N})$  bestimmt (s. 3.2.5).

**3.2.5. Amplitude der relativen Domänenbewegung aus dipolaren Kopplungen.** Die durch Phagen als Orientierungsmedium induzierte Ordnung der Makromoleküle relativ zum statischen  $B_0$ -Feld kann sowohl durch Wechselwirkung mit den Phagen, als auch durch die Form des Moleküls bedingt sein (Hansen *et al.*, 1998). Eine Interpretation der dipolaren Kopplungen in einem dynamischen Modell ist jedoch nur sinnvoll, wenn die Dynamik nicht durch Wechselwirkungen zwischen dem Molekül und dem Orientierungsmedium beeinflusst wird.





**Abbildung 3.20:** Vergleich der  $\frac{R_2}{R_1}$ -Verhältnisse und dipolaren  $^1D(H^N N)$ -Kopplungen.

In der Abbildung sind die  $\frac{R_2}{R_1}$ -Verhältnisse starrer Reste bei 600 MHz gegen die in Phagenmedium bei 800 MHz erhaltenen dipolaren Restkopplungen für AR1 (gefüllte Kreise) und AR2 (offene Kreise) aufgetragen. Die Korrelation zwischen den  $\frac{R_2}{R_1}$ -Verhältnissen und dipolaren Restkopplungen weist auf eine primär durch sterische Faktoren bedingte Ordnung von NusACTD(339–495) im Phagenmedium hin.

Für eine primär durch sterische Einflüsse bedingte Ausrichtung im Phagenmedium ist eine Korrelation des  $\frac{R_2}{R_1}$ -Verhältnisses und der dipolaren Kopplungen  $^1D(H^N N)$  zu erwarten (de Alba *et al.*, 1999). In Abbildung 3.20 sind die aus den  $^{15}\text{N}$ -Relaxationsdaten von Probe 2 (s. 3.2.4) ermittelten  $\frac{R_2}{R_1}$ -Verhältnisse (s. 3.2.4.2) bei 600 MHz gegen die unter Absatz 3.1.6 bestimmten dipolaren Kopplungen  $^1D(H^N N)$  aufgetragen. Flexible Reste mit  $\text{HetNOE} < 0.65$  und Reste mit Austauschbeitrag (s. 3.2.4.2) wurden nicht berücksichtigt. Die Korrelationskoeffizienten zwischen den  $\frac{R_2}{R_1}$ -Verhältnissen und den dipolaren Restkopplungen von 0.82 für NusA(353–416) und 0.63 für NusA(431–490) zeigen, daß der Einfluß von Wechselwirkungen zwischen den Phagen und NusACTD(339–495) eine untergeordnete Rolle spielen dürfte (Abb. 3.20).

Die unterschiedlichen Axialkomponenten der Orientierungstensoren (AR1:  $10.25 \pm 0.25$  Hz; AR2:  $6.25 \pm 0.25$  Hz) von AR1 und AR2 bei gleichzeitig moderaten Radialkomponenten (AR1:  $0.3 \pm 0.05$ ; AR2:  $0.2 \pm 0.05$ ) (s. 3.1.7) weisen auf eine isotrope Bewegung der Domänen hin (Tolman *et al.*, 2001). Geht man näherungsweise von einem axialsymmetrischen Orientierungstensor aus, entspricht die Skalierung der Axialkomponenten von AR1 relativ zu AR2 der Skalierung der Ordnungsparameter in  $z$ -Richtung  $A_{zz}$  (Gl. (4), S. 41).

Ein mögliches dynamisches Modell, das eine solche Skalierung der Ordnungsparameter beschreibt, ist das *wobble-in-a-cone*-Modell (Lipari und Szabo, 1982; Fischer *et al.*, 1999), in dem ein gegebener Bewegungsvektor frei in einem Kegel mit einem Halbwinkel  $\beta$  diffundiert. Der Ordnungsparameter  $S$  der Diffusionsbewegung ist über

$$S = \frac{1}{2} \cos\beta (1 + \cos\beta)$$

gegeben. Mit einem Skalierungsfaktor von  $\frac{10.25}{6.25} = 1.64$  wird der Ordnungsparameter  $S$ , der für eine starre Anordnung der Domänen einen Wert von eins annimmt, durch die Dynamik auf  $S = 0.61$  erniedrigt. Der Halbwinkel für die relative Domänenbewegung beträgt damit circa  $\beta = 45^\circ$ .

### 3.3. Charakterisierung der Komplexe von NusACTD mit $\lambda$ N und $\alpha$ CTD

NMR-Titrationsexperimente nutzen die Tatsache, daß sich durch die Komplexbildung im allgemeinen die elektronische Umgebung der an der Bindung beteiligten Kerne ändert. Die betroffenen Kerne können daher durch Änderungen ihrer chemischen Verschiebungen relativ zur ungebundenen Form identifiziert werden. In der Praxis wird häufig einer der Bindungspartner isotopenmarkiert vorgelegt und von der freien Form sowie nach Zugabe des unmarkierten Titranden nach jedem Titrationsschritt ein HSQC-Spektrum aufgenommen. Auf diese Weise lassen sich die sukzessiven Veränderungen der chemischen Verschiebungen bis zur Sättigung des Komplexes verfolgen. Der Magnetisierungstransfer über den  $^{15}\text{N}$ - beziehungsweise  $^{13}\text{C}$ -Kern in einem HSQC-Experiment führt dazu, daß nur  $^{15}\text{N}$ - beziehungsweise  $^{13}\text{C}$ -gebundene Protonen in dem Spektrum zu sehen sind. Die Resonanzen des Titranden sind aufgrund der geringen natürlichen Häufigkeit von  $^{13}\text{C}$  und  $^{15}\text{N}$  bei den verwendeten Konzentrationen nicht zu beobachten.

**3.3.1. Wechselwirkung von  $\lambda$ N mit NusACTD.**  $^{15}\text{N}$ -NusACTD(339–495) wurde mit unmarkiertem  $\lambda$ N(1–53) titriert, bis in den nach jedem Titrationsschritt aufgenommenen  $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren keine Veränderungen der Signalhöhe oder Signalposition mehr zu beobachten waren (s. 2.4.3.1).

In Abbildung 3.21 ist der Verlauf der Titration für ausgewählte Titrationsschritte dargestellt. Für ungefähr die Hälfte der Amidprotonenresonanzen ist bereits bei einem  $\lambda\text{N}(1-53)$ -NusACTD(339-495)-Verhältnis von 0.4 eine Verbreiterung der Linien und/oder eine Veränderung der Signalposition im Spektrum festzustellen, so daß von einer Wechselwirkung zwischen NusACTD(339-495) und  $\lambda\text{N}(1-53)$  ausgegangen werden kann. Dabei sind vor allem Aminosäuren in AR1 von der Bindung betroffen. In weiteren Titrationsschritten mit  $\lambda\text{N}(1-53)$ -NusACTD(339-495)-Verhältnissen von 0.9 bis 3.8 zeigen jedoch auch Amidprotonenresonanzen von Resten in AR2 Veränderungen der Lage oder Intensität. Insgesamt können für 98% (AR1) beziehungsweise 70% (AR2) der auswertbaren Amidprotonenresonanzen der freien Form signifikante Veränderungen (s. 2.4.3.1) während der Titration in den Spektren festgestellt werden (Tab. 3.7).

Die Linienverbreiterung führt für die meisten Resonanzen ab einem  $\lambda\text{N}(1-53)$ -NusACTD(339-495)-Verhältnis von 1.3 zu einem Signal unterhalb der Detektionsgrenze, so daß der Titrationsverlauf für diese Reste nicht verfolgt werden kann. Eine Verbreiterung der Linien oder ein *Verschwinden* der Signale während der Titration deutet darauf hin, daß sich die jeweils beobachteten Kerne im intermediären Austausch (s. 2.4.3.2) befinden. Ab einem 2.6-fachen Überschuß von  $\lambda\text{N}(1-53)$  sind Signale in den Spektren zu detektieren, die sich weder dem freien NusACTD(339-495) zuordnen lassen, noch wegen der Dispersion typisch für Abbaufragmente sind. Es kann daher davon ausgegangen werden, daß es sich dabei um die Resonanzen des  $\lambda\text{N}(1-53) \cdot \text{NusACTD}(339-495)$ -Komplexes handelt. Die Überlagerung der Spektren des freien NusACTD(339-495) sowie des wahrscheinlichen  $\lambda\text{N}(1-53)$ -NusACTD(339-495)-Komplexes sind in Abbildung 3.22 dargestellt. Eine Zuordnung der Resonanzen des  $\lambda\text{N}(1-53) \cdot \text{NusACTD}(339-495)$ -Komplexes erfordert eine erneute Aufnahme und Auswertung von Tripelresonanzexperimenten und wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht vorgenommen.

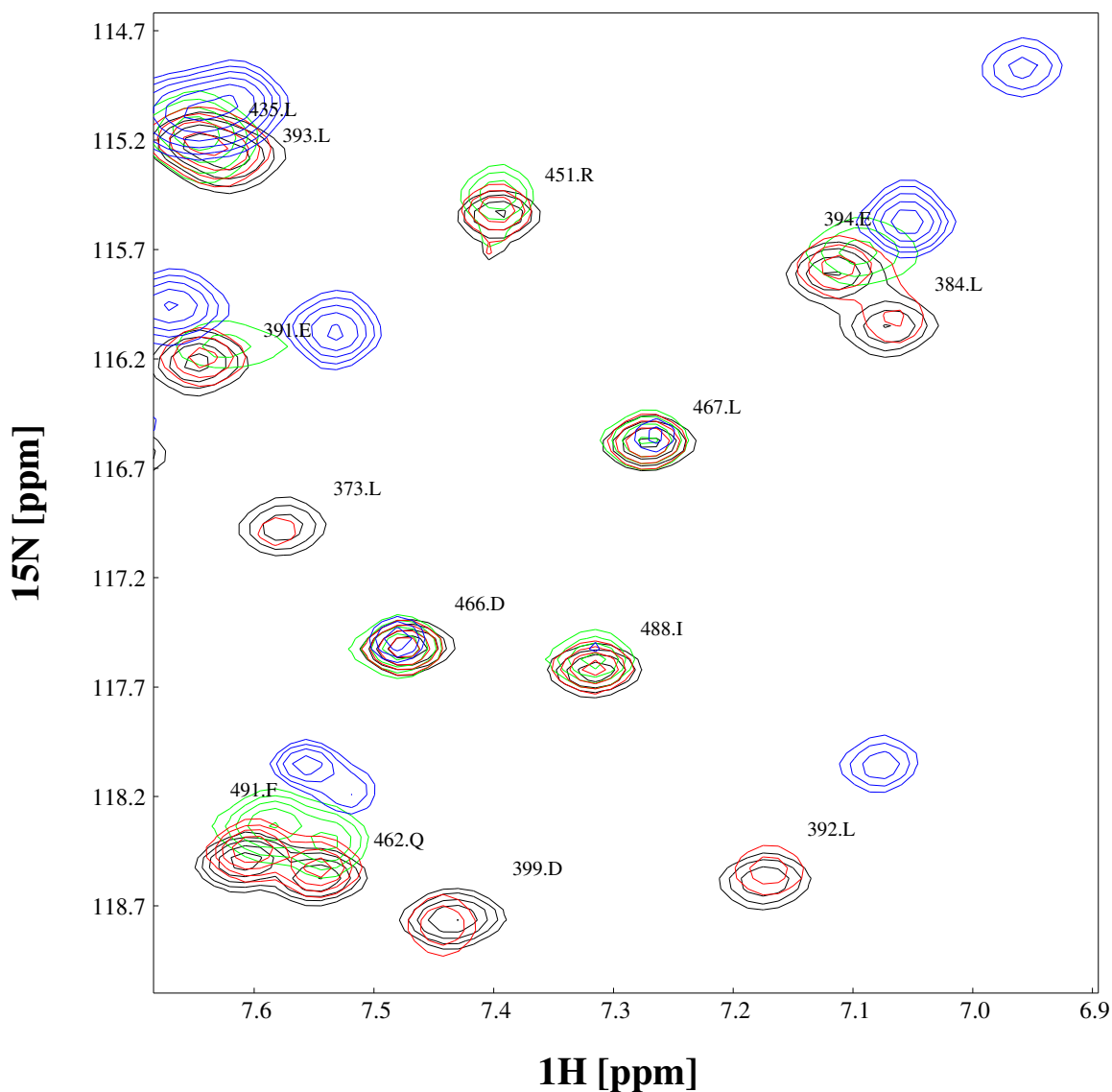
$\lambda\text{N}(1-53)$  scheint sowohl an AR1 als auch an AR2 zu binden, wobei die erst bei höheren Konzentrationen auftretenden Veränderungen in den Spektren auf eine schwächere Bindung hinweisen. Eine weitere Eingrenzung der Kontaktfläche ist nicht möglich, da im Fall von AR1 mehr als die Hälfte und im Fall von AR2 mehr als ein Drittel der Rückgratamidresonanzen von der Bindung betroffen sind, und die an der Bindung beteiligten Reste von NusACTD(339-495) über die gesamte Oberfläche von AR1 und AR2 verteilt sind. Dies bedeutet jedoch nicht unbedingt, daß es sich um eine unspezifische Bindung von  $\lambda\text{N}(1-53)$  an verschiedene Stellen auf NusACTD(339-495) handelt. Veränderungen der elektronischen Umgebung der Kerne können auch indirekt über konformationelle Änderungen bei der Bindung des Liganden auftreten (Zuiderweg, 2002). Eine quantitative Auswertung des Titrationsverlaufs in  $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren ist für Kerne, die sich

Signale im $^1\text{H}^{15}\text{N}$ HSQC	$\lambda\text{N}(1-53)$	$\alpha\text{CTD}(233-329)$
<i>AR1</i>		
gesamt	62 (2x Pro)	62 (2x Pro)
ausgewertet	42	46
verändert	41 (98%)	0 (0%)
<i>Linker</i>		
gesamt	13 (1x Pro)	13 (1x Pro)
ausgewertet	3	5
verändert	2	0
<i>AR2</i>		
gesamt	65	65
ausgewertet	37	49
verändert	26 (70%)	48 (98%)

**Tabelle 3.7:** Auswertung der Titrationsexperimente.

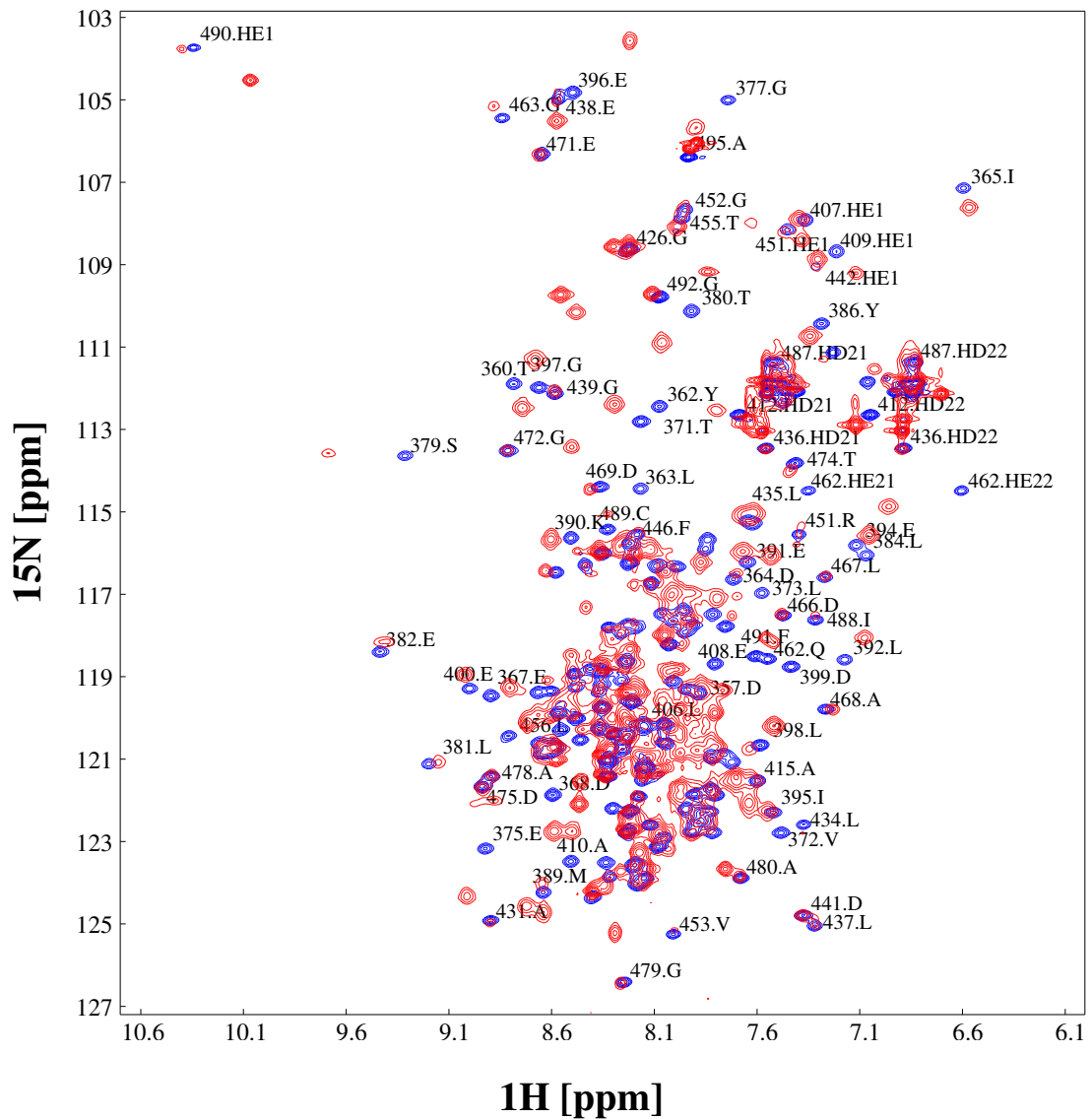
In der Tabelle sind die durch die Gegenwart von  $\lambda\text{N}(1-53)$  beziehungsweise  $\alpha\text{CTD}(233-329)$  verursachten Veränderungen in den  $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren von  $^{15}\text{N}$ -NusACTD(339-495) zusammengefaßt. Dabei wurde jeweils untersucht, ob für die Resonanzen der Rückgratamide in den Bereichen NusA(353-416) (AR1), NusA(417-430) (Linker) und NusA(431-495) (AR2) Änderungen in der Signalintensität oder -lage festgestellt werden konnten. Die Anzahl der durch die Bindung beeinflussten Resonanzen ist der Zahl der tatsächlich auswertbaren und der theoretisch vorhandenen Signale gegenübergestellt. Für AR1 und AR2 ist zusätzlich der Prozentsatz der veränderten Reste bezogen auf die auswertbaren Resonanzen angegeben. Die Titrationen weisen darauf hin, daß  $\lambda\text{N}(1-53)$  an AR1 und AR2 bindet, während  $\alpha\text{CTD}(233-329)$  ausschließlich mit AR2 interagiert.

im intermediären Austauschregime befinden, im allgemeinen nicht möglich (s. 2.4.3.2), intermediärer Austausch wird jedoch häufig für Kerne in Systemen mit einer Gleichgewichtskonstante der Dissoziation zwischen  $10^{-7}$ - $10^{-6}$  M beobachtet (Wemmer und Williams, 1994).



**Abbildung 3.21:** Verlauf der Titration von  $^{15}\text{N}$ -NusACTD(339–495) mit  $\lambda\text{N}(1-53)$ .

Der Ausschnitt aus den  $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren von NusACTD(339–495) bei verschiedenen  $\lambda\text{N}(1-53)/\text{NusACTD}(339-495)$ -Verhältnissen (schwarz: 0; rot: 0.4; grün: 1.3; blau: 3.4) demonstriert exemplarisch den Einfluß der Ligandenbindung auf die beiden Domänen von NusACTD(339–495). Dabei zeigen die meisten Reste in AR1 (z.B. L392, D399, L373, L384) bereits bei einem  $\lambda\text{N}(1-53)/\text{NusACTD}(339-495)$ -Verhältnis von 0.4 starke Veränderungen in der Signalintensität oder –position, während für AR2 (z.B. L467, D466, I488) signifikante Änderungen erst bei höheren Verhältnissen auftreten. Die blau eingefärbten Resonanzen entsprechen dem Endpunkt der Titration und stellen wahrscheinlich Signale des  $\lambda\text{N}(1-53)$ -NusACTD(339–495)-Komplexes dar. (Meßbedingungen/Aufnahmeparameter: s. 2.4.3)



**Abbildung 3.22:** Wechselwirkung von  $^{15}\text{N}$ -NusACTD(339–495) mit  $\lambda\text{N}(1-53)$ .

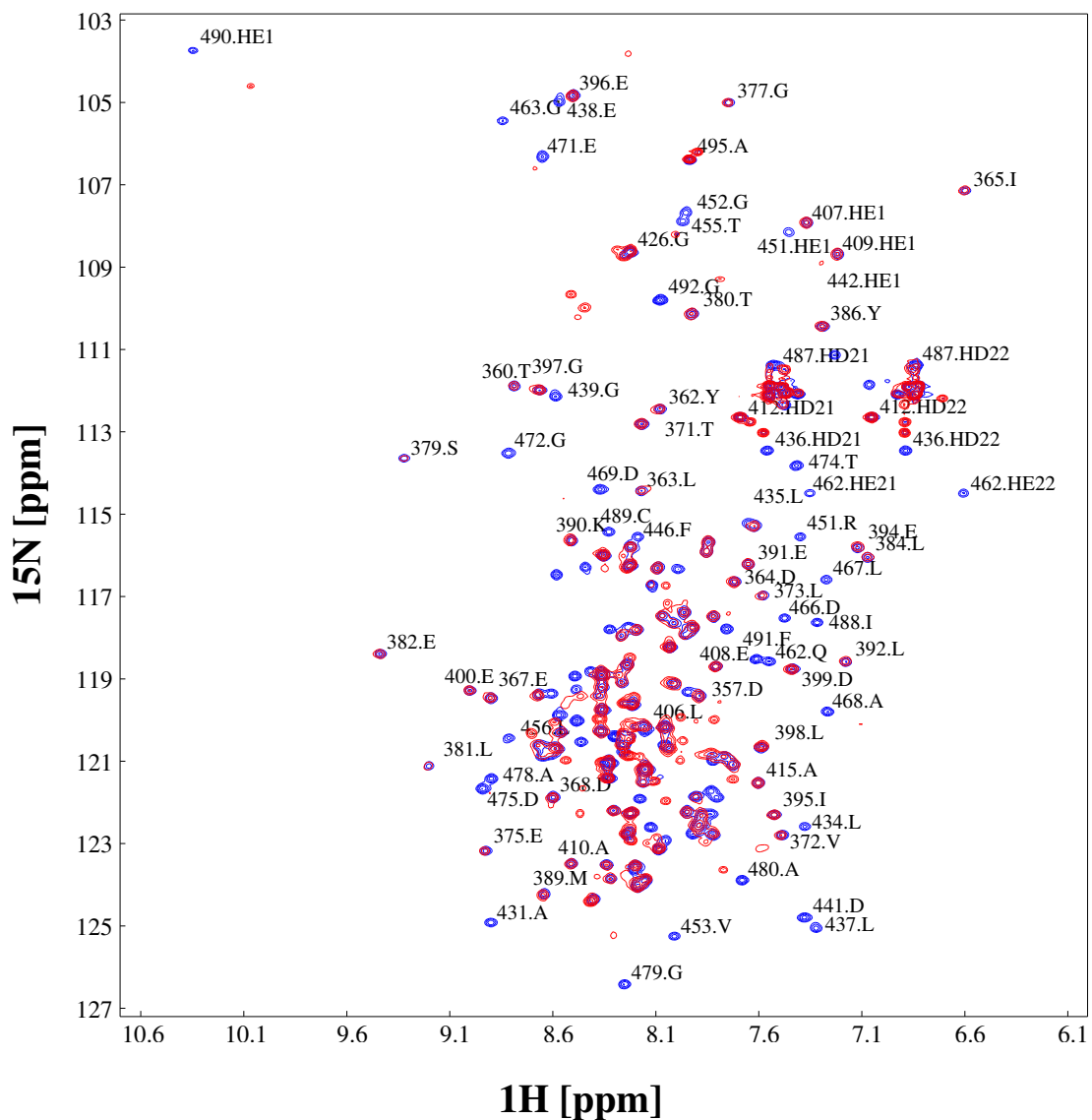
$^{15}\text{N}$ -NusACTD(339–495) wurde mit  $\lambda\text{N}(1-53)$  titriert, bis keine Veränderungen mehr im  $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC zu beobachten waren. Gezeigt sind die  $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren der Endpunkte der Titration, die dem freien NusACTD(339–495) (blau) und NusACTD(339–495) in Gegenwart eines 3.4-fachen Überschusses an  $\lambda\text{N}(1-53)$  (rot) entsprechen. (Meßbedingungen/Aufnahmeparameter: s. 2.4.3)

**3.3.2. Wechselwirkung von  $\alpha$ CTD mit NusACTD.**  $^{15}\text{N}$ -NusACTD(339–495) wurde mit unmarkiertem  $\alpha$ CTD(233–329) titriert, bis in den nach jedem Titrationsschritt aufgenommenen  $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren keine Veränderungen der Signalhöhe oder Signalposition mehr zu beobachten waren (s. 2.4.3.1).

In den Spektren kann bereits bei einem  $\alpha$ CTD(233–329)/NusACTD(339–495)-Verhältnis von 0.5 für ungefähr ein Drittel der Amidprotonenresonanzen eine deutliche Abschwächung der Signalintensität und/oder Veränderungen der Resonanzlage relativ zur freien Form von NusACTD(339–495) festgestellt werden. Die Analyse weiterer Spektren bei  $\alpha$ CTD(233–329)/NusACTD(339–495)-Verhältnissen von 1.1 bis 2.5 zeigt, daß für 98% der Reste in AR2 Veränderungen der Amidprotonenresonanzen auftreten, während die Signale der Amidprotonen von Resten in AR1 durch die Gegenwart von  $\alpha$ CTD(233–329) nicht beeinflußt werden (Tab. 3.7).

Ein Großteil der von der Bindung betroffenen Reste weist ab einem  $\alpha$ CTD(233–329)/NusACTD(339–495)-Verhältnis von 1.1 bis zum Endpunkt der Titration eine starke Linienverbreiterung auf und ist daher während der Titration nicht zu beobachten. Das *Verschwinden* der Resonanzen deutet darauf hin, daß sich die jeweiligen Kerne im intermediären Austauschregime (s. 2.4.3.2) befinden. Im Gegensatz zu der Titration von  $^{15}\text{N}$ -markiertem NusACTD(339–495) mit  $\lambda\text{N}(1-53)$  (s. 3.3.1) sind jedoch auch in den Spektren bei höheren  $\alpha$ CTD(233–329)/NusACTD(339–495)-Verhältnissen nur wenige Resonanzen eines möglichen  $\alpha$ CTD(233–329)-NusACTD(339–495)-Komplexes zu detektieren (Abb. 3.23). Der Endpunkt der Titration konnte daher nur anhand einiger Amidprotonensignale von Resten in AR2 mit mäßiger Linienverbreiterung abgeschätzt werden. Dies spricht dafür, daß sich viele Kerne auch noch unter den Konzentrationsverhältnissen im Sättigungsbereich des Komplexes im intermediären Austausch befinden. Es ist aber nicht auszuschließen, daß der Endpunkt der Titration nicht erreicht wurde und somit die Konzentration des  $\alpha$ CTD(233–329)-NusACTD(339–495)-Komplexes zu gering war, um in den Spektren zu beobachtbaren Signalen zu führen.

Ein weiteres Problem in diesem Zusammenhang stellt die bekannte Dimerisierungs-Neigung der  $\alpha$ CTD(233–329) dar (Jeon *et al.*, 1997). Die Gleichgewichtskonstante für das Dimerisierungsgleichgewicht ist nicht bekannt. Das Dimerisierungsgleichgewicht wurde daher für die Berechnung der  $\alpha$ CTD(233–329)/NusACTD(339–495)-Verhältnisse nicht berücksichtigt, so daß die bestimmten  $\alpha$ CTD(233–329)/NusACTD(339–495)-Verhältnisse wahrscheinlich überschätzt sind. Die Bildung eines größeren Komplexes aus mehreren AR2 und  $\alpha$ CTD(233–329)-Molekülen ist dagegen unwahrscheinlich, da aufgrund der erhöhten Rotationskorrelationszeit



**Abbildung 3.23:** Wechselwirkung von  $^{15}\text{N}$ -NusACTD(339–495) mit  $\alpha\text{CTD}$ (233–329).

$^{15}\text{N}$ -NusACTD(339–495) wurde mit  $\alpha\text{CTD}$ (233–329) titriert, bis keine Veränderungen mehr im  $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC zu beobachten waren. Gezeigt ist die Überlagerung der  $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren von freiem NusACTD(339–495) (blau) und von NusACTD(339–495) in Gegenwart eines 2.1-fachen Überschusses an  $\alpha\text{CTD}$ (233–329) (rot). (Meßbedingungen/Aufnahmeparameter: s. 2.4.3)



eines solchen Komplexes und der damit verbundenen Steigerung der transversalen Relaxationsrate keine Signale mehr für den  $\alpha$ CTD(233–329)/NusACTD(339–495)–Komplex im Spektrum erwartet werden würden.

Insgesamt sprechen die Daten für eine Bindung von  $\alpha$ CTD(233–329) an AR2. Eine weitere Eingrenzung der Kontaktfläche ist nicht möglich, da fast alle Amidprotonenresonanzen von Resten in AR2 Veränderungen im Spektrum in Gegenwart von  $\alpha$ CTD(233–329) zeigen. Dies bedeutet nicht, daß  $\alpha$ CTD(233–329) unspezifisch an unterschiedliche Stellen an AR2 bindet, da Änderungen der elektronischen Umgebung eines Kerns sowohl direkt über den Kontakt mit Liganden als auch indirekt über konformationelle Umlagerungen bei Ligandenbindung hervorgerufen werden können. Wie bei der Titration mit  $\lambda$ N(1–53) (s. 3.3.1) war eine quantitative Auswertung des Titrationsverlaufs nicht möglich, da sich sämtliche Kerne im intermediären Austausch befanden. Intermediärer Austausch wird jedoch häufig für Kerne in Systemen mit einer Gleichgewichtskonstante der Dissoziation zwischen  $10^{-7}$ – $10^{-6}$  M beobachtet (Wemmer und Williams, 1994).



## KAPITEL 4

### Diskussion

Die RNA-Synthese in der Zelle wird durch RNAPs katalysiert und läßt sich in die drei Phasen der Initiation, Elongation und Termination einteilen. Während bis etwa 2002 nur wenig strukturelle Daten über die RNAP bekannt waren, die zudem hauptsächlich Daten zur Initiation lieferten, konnten in den letzten Jahren durch die Strukturforschung insbesondere neue Erkenntnisse über die Phase der Elongation gewonnen werden (s. 1.1).

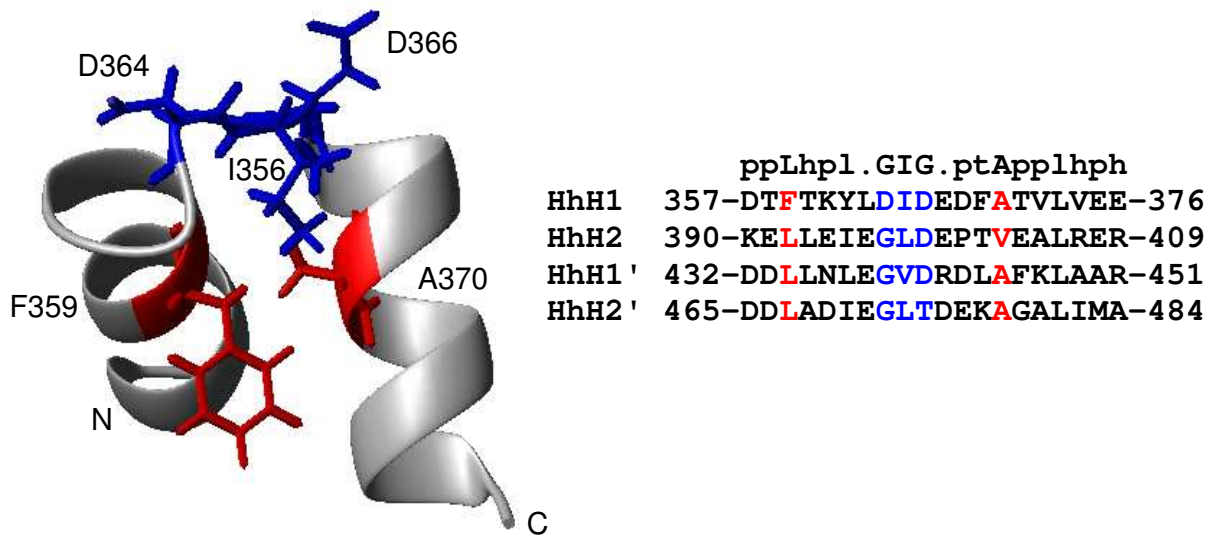
Das Modellsystem aus *E.coli* RNAP und NusA stellt zusammen mit dem Protein N aus dem Phagen  $\lambda$  ein Paradigma der Transkriptionseelongation und -regulation dar, und ist damit ein molekulargenetisch und biochemisch gut untersuchtes System (Greenblatt, 1972; Roberts, 1969; Greenblatt *et al.*, 1980; van Gilst und von Hippel, 2000). *E.coli* NusA ist Teil verschiedener Elongationskomplexe, wobei es über seine carboxyterminale Domäne mit der  $\alpha$ CTD sowie dem Antiterminator-Protein  $\lambda$ N wechselwirkt (s. 1.2.4).

In dieser Arbeit wurden an NusACTD(339–495) Struktur- und Dynamikuntersuchungen mittels NMR-Spektroskopie durchgeführt und die Wechselwirkungen von NusACTD(339–495) mit  $\alpha$ CTD(233–329) und  $\lambda$ N(1–53) charakterisiert. Auf der Grundlage der Ergebnisse soll im folgenden mit Hilfe biochemischer Daten sowie von Sequenz- und Strukturanalysen die Funktion von NusACTD(339–495) in Termination und Antitermination diskutiert werden.

#### 4.1. Analyse der Sequenz, Struktur und Funktion von NusACTD

NusACTD besteht aus zwei homologen Domänen, AR1 und AR2, die jeweils eine (HhH)<sub>2</sub>-Faltung aufweisen (s. 3.2.1; Abb. 3.13). Charakteristisch für die (HhH)<sub>2</sub>-Faltung sind jeweils zwei gegeneinander gepackte HhH-Motive, die zusammen mit der Verbindungshelix zwischen den Motiven einen kompakten hydrophoben Kern bilden.

**4.1.1. Die modifizierten HhH-Motive von AR1 und AR2 unterscheiden sich strukturell kaum von klassischen HhH-Motiven.** Klassische HhH-Motive zeichnen sich zum einen durch ein konserviertes GhG-Muster (s. 3.1) in der Haarnadelschleife aus, wobei das zweite



**Abbildung 4.1:** Sekundär- und Tertiärstruktur in HhH-Motiven.

Die Abbildung zeigt stellvertretend für ein HhH-Motiv die Struktur von HhH1' (links) sowie die Sequenzen der vier HhH-Motive von NusACTD im Vergleich zu dem 65%-Konsensus aus der SMART-Datenbank (Schultz *et al.*, 1998; Letunic *et al.*, 2004) (rechts). Obwohl die vier HhH-Motive von NusACTD insbesondere im Bereich des charakteristischen GhG-Musters (blau) auf Sequenzebene Unterschiede zu klassischen HhH-Motiven aufweisen, sind die kanonische Sekundär- und Tertiärstruktur konserviert. Die Tertiärstruktur wird dabei hauptsächlich durch die Wechselwirkung der Seitenketten des hydrophoben Rests des GhG-Motivs mit je einer weiteren konservierten hydrophoben Aminosäure (rot) in den amino- beziehungsweise carboxyterminalen Helices bestimmt. Der hydrophobe Rest in der carboxyterminalen Helix unterliegt wegen des spitzen Winkels in HhH-Motiven von  $25^{\circ}$ – $50^{\circ}$  sterischen Beschränkungen und ist daher eine kleine Aminosäure (Alanin oder Valin). Das zweite Glycin des GhG-Musters bildet typischerweise die aminoterminal Helixkappe der carboxyterminalen Helix. In NusACTD ist das Glycin in sämtlichen HhH-Motiven durch die in dieser Position der Helix häufiger vorkommenden Reste Aspartat oder Threonin ersetzt. Die Abkürzungen des Konsensus stehen für 'p':CDEHKNQRST, 'l':ILV, 't':ACDEGHKNQRST, 'h':ACFGHIKLMRTVWY und '.':alle Aminosäuren.

Glycin die aminoterminal Helixkappe der zweiten Helix bildet (Doherty *et al.*, 1996). Zum anderen nehmen die antiparallelen Helices typischerweise einen spitzen Winkel von  $\sim 25^{\circ}$ – $50^{\circ}$  gegeneinander ein (Doherty *et al.*, 1996; Shao und Grishin, 2000).

Die vier HhH-Motive in NusACTD wurden als erstes von Aravind *et al.* (1999) vermutet und wegen der Abweichung in der Sequenz gegenüber klassischen HhH-Motiven als modifizierte

HhH-Motive bezeichnet. So ist in allen vier HhH-Motiven das zweite Glycin des GhG-Musters durch Aspartat oder Threonin ersetzt, im ersten HhH-Motiv beobachtet man zusätzlich eine Substitution des ersten Glycins durch Aspartat (Abb. 4.1). In Übereinstimmung mit der kanonischen Sekundärstruktur von HhH-Motiven bilden Aspartat beziehungsweise Threonin jeweils die Helixkappe der carboxyterminalen Helix. Threonin und Aspartat treten dabei statistisch häufiger als Glycin an der Position der Helixkappe auf (Kumar und Bansal, 1998).

Die Unterschiede in der Sequenz der Haarnadelschleife korrelieren mit den im Vergleich zu klassischen HhH-Motiven größeren Helix-Winkeln von  $51^{\circ}$ – $61^{\circ}$  (HhH1:  $61^{\circ}$ , HhH2:  $56^{\circ}$ , HhH1':  $51^{\circ}$ , HhH2':  $58^{\circ}$ ), da Glycin im Gegensatz zu Aspartat oder Threonin keine Seitenkette besitzt und damit eine engere Haarnadelschleife ermöglicht. Die Ausrichtung der Helices zueinander erfolgt im wesentlichen über die hydrophobe Aminosäure des GhG-Motivs und jeweils eine weitere hydrophobe Aminosäure in den beiden Helices. Der hydrophobe Rest in der carboxyterminalen Helix unterliegt wegen der engen Haarnadelschleife sterischen Beschränkungen und ist daher eine kleine Aminosäure (Alanin oder Valin) (Doherty *et al.*, 1996). Trotz der Abweichungen der Winkel vom klassischen HhH-Motiv ist dieser Rest in allen HhH-Motiven von NusACTD konserviert.

Insgesamt konnte mit der in dieser Arbeit bestimmten Lösungsstruktur gezeigt werden, daß es sich bei den modifizierten HhH-Motiven trotz der Unterschiede in der Sequenz um HhH-Motive handelt, da weder in Bezug auf die Sekundär- noch auf die Tertiärstruktur größere Abweichungen der modifizierten HhH-Motive von klassischen HhH-Motiven zu beobachten sind.

**4.1.2. AR1 und AR2 stellen Module für Protein-Protein Wechselwirkungen dar.** Zum Vergleich mit bekannten Tertiärstrukturen wurde die PDB (Protein Data Bank; Deshpande *et al.* (2005)) unter Verwendung der Durchschnittsstrukturen von AR1 und AR2 mit dem Programm DALI (Holm und Sander, 1996) nach strukturell ähnlichen Proteinen durchsucht. Die zehn Treffer mit der höchsten Zielfunktion sind in Tab. 4.1 zusammengefaßt und können bis auf die Strukturen der DNA Polymerase I (1xwl) (Kiefer *et al.*, 1997), der Helikase RecG (1gm5) (Singleton *et al.*, 2001) und der DNA Polymerase  $\beta$  (1bpy) (Sawaya *et al.*, 1997) dem (HhH)<sub>2</sub>-Faltungstyp zugeordnet werden (Shao und Grishin, 2000). Auf der Basis ihrer Wechselwirkungspartner und Funktion lassen sich die meisten Treffer entweder in die Gruppe der DNA-bindenden Domänen von Reparatur-, Rekombinations- und Replikationsenzymen oder Protein-bindenden Domänen von Signalmolekülen einteilen.

Der ersten Gruppe gehören unter anderem die (HhH)<sub>2</sub>-Domänen der Rekombinase RuvA (1hjp) (Nishino *et al.*, 1998), der Exonuclease UvrC (1kft) (Singh *et al.*, 2002), einer Ligase (1dgs)

AR1				AR2			
PDB	Z-Wert	RMSD	WW-Partner	PDB	Z-Wert	RMSD	WW-Partner
1dgs-A	6.1	2.2	D	1dgs-A	5.6	2.2	D
1ngn-A	5.3	2.1	D	1ngn-A	5.5	2.1	D
1b4f-A	4.9	2.8	P	1qck-A	4.7	2.6	D
1bpy-A	4.6	2.2	D	1kw4-A	4.2	2.6	P
1xwl	4.4	2.6	D	1cok-A	4.1	2.7	P
1uqv-A	4.3	2.5	P	1b4f-A	4.1	2.7	P
1oxj-A	4.2	2.4	R	2abk	4.0	2.2	D
2abk	4.1	2.4	D	1mun	3.8	2.5	D
1hjp	4.0	2.5	D	1kft-A	3.5	2.8	D
1mun	3.8	2.9	D	1gm5-A	3.5	2.6	D

**Tabelle 4.1:** PDB-Einträge mit ähnlicher Tertiärstruktur.

Die Tabelle zeigt die zehn besten Treffer einer DALI-Suche (Holm und Sander, 1996) der PDB (Deshpande *et al.*, 2005) mit den Durchschnittsstrukturen von AR1 und AR2. Angegeben sind jeweils der PDB-Eintrag, der Wert der Zielfunktion  $Z$ , der RMSD der  $C^\alpha$ -Atome und die Angabe bekannter oder vermuteter Wechselwirkungspartner (D:DNA, R:RNA, P:Protein).

1b4f, EphB2 Rezeptor-Proteinkinase/SAM Domäne, *Homo sapiens*; 1bpy, DNA Polymerase  $\beta$ /N-terminale Domäne, *Homo sapiens*; 1cok, P73/C-terminale Domäne, *Homo sapiens*; 1dgs, Ligase, *Thermus filiformis*; 1gm5, Helicase RecG, *Thermotoga maritima*; 1hjp, Rekombinase RuvA, *Escherichia coli*; 1kft, Exonuclease ABC/C-terminale Domäne, *Escherichia coli*; 1kw4, Polyhomeotic/SAM Domäne, *Drosophila melanogaster*; 1mun, Adenin-Glykosylase (UvrC)/Katalytische Domäne, *Escherichia coli*; 1ngn, Methyl-Cpg bindendes Protein Mbd4/Thymin-Glykosylase-Domäne, *Mus musculus*; 1oxj, RNA-bindendes Protein Smaug/SAM Domäne, *Drosophila melanogaster*; 1qck, Barrier-To-Autointegration Factor, *Homo sapiens*; 1uqv, Ste50 Protein/SAM Domäne, *Saccharomyces cerevisiae*; 1xwl, DNA Polymerase I, *Bacillus stearothermophilus*; 2abk, Endonuklease III, *Escherichia coli*;

(Lee *et al.*, 2000) und mehrerer Glycosylasen (1ngn, 1mun, 2abk) (Wu *et al.*, 2003; Guan *et al.*, 1998; Thayer *et al.*, 1995) an. Die (HhH)<sub>2</sub>-Domänen einiger DNA-Glycosylasen zeigen neben der Wechselwirkung mit DNA eine Glycosylase-Aktivität (Shao und Grishin, 2000).

Die zweite Gruppe umfaßt die SAM-Domänen der EphB2 Rezeptortyrosinkinase (1bf4) (Smal-la *et al.*, 1999; Thanos *et al.*, 1999), des Ste50 Proteins (uqv) (Grimshaw *et al.*, 2004), des

Tumorsuppressor-Proteins p73 (1cok) (Chi *et al.*, 1999) und des Proteins Polyhomeotic (1kw4) (Kim *et al.*, 2002). SAM-Domänen treten in Proteinfamilien wie Rezeptortyrosinkinasen auf und sind an der Signalübertragung durch Oligomerisierung (Kim *et al.*, 2002; Kim und Bowie, 2003) oder Interaktion mit anderen Protein-Modulen wie SH2-Domänen (Stein *et al.*, 1996) beteiligt.

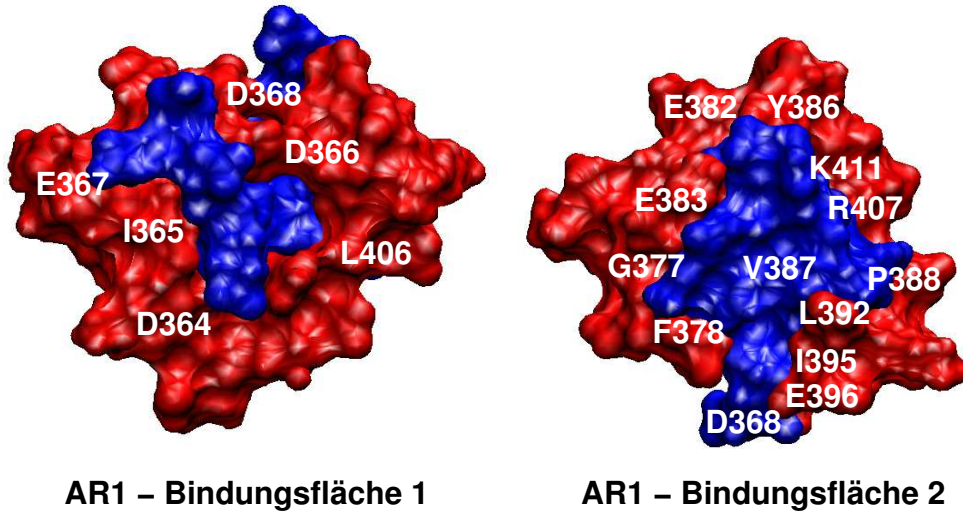
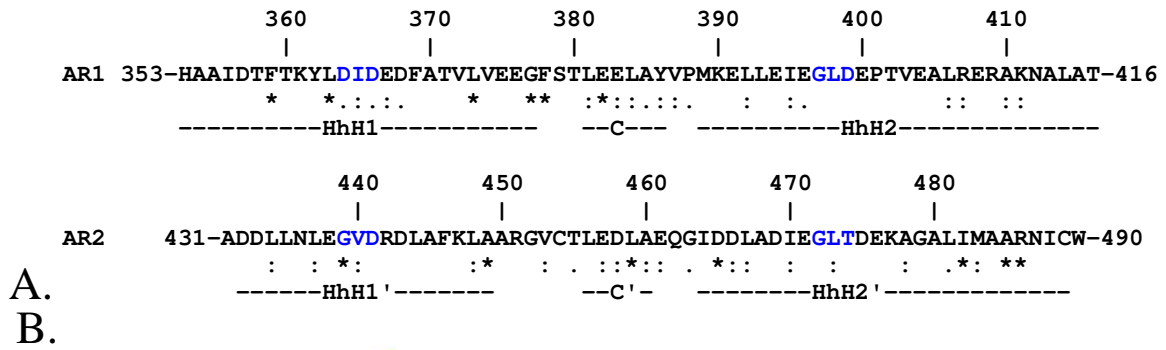
Ausnahmen der obigen Gruppen stellen die DNA-bindenden Proteine BAF (BAF: Barrier-To-Autointegration Factor) (1qck) (Cai *et al.*, 1998) und die RNA-bindende SAM-Domäne aus dem Protein SMAUG (1oxj) (Green *et al.*, 2003) dar.

Die DNA-Bindung an (HhH)<sub>2</sub>-Faltungen erfolgt im allgemeinen unspezifisch über Wechselwirkungen der Phosphate der DNA mit dem Proteinrückgrat im Bereich des charakteristischen GhG-Musters und positiv geladenen Seitenketten am aminoterminalen Ende der zweiten Helix des HhH-Motivs (Aravind *et al.*, 1999; Doherty *et al.*, 1996; Shao und Grishin, 2000). In Bezug auf die Protein-Bindung lassen sich keine allgemein gültigen Aussagen über bevorzugte Bindungsregionen treffen. So erfolgt die Wechselwirkung in der großen Gruppe der für Protein-Protein-Wechselwirkungen verantwortlichen SAM-Domänen auf verschiedene Art und Weise (Kim und Bowie, 2003).

Sowohl die diverse Funktion als auch die heterogene Erkennung ist typisch für Module, in denen im allgemeinen lediglich die Rückgratgeometrie, nicht jedoch die Oberflächeneigenschaften konserviert sind. Auf diese Weise können Module als Interaktionsfläche für verschiedene Makromoleküle dienen (Pickford und Campbell, 2004). Aufgrund der bekannten Wechselwirkung von NusACTD mit  $\alpha$ CTD und  $\lambda$ N kann jedoch davon ausgegangen werden, daß beide Domänen von NusACTD als Module für Protein-Protein-Wechselwirkungen dienen. Eine DNA-Bindung ist nicht auszuschließen, aber wegen des negativen elektrostatischen Potentials der beiden Domänen (s. 3.2.2) unwahrscheinlich.

#### **4.1.3. Homologe NusACTD-Sequenzen weisen auf mögliche Interaktionsflächen hin.**

Strukturelle Studien konnten zeigen, daß Reste in Proteinkontaktflächen stärker konserviert sind als durchschnittliche Reste einer Proteinsequenz (Teichmann, 2002). Um herauszufinden, welche Reste in NusACTD konserviert sind, wurden zunächst homologe NusACTD-Sequenzen über eine BLASTP2-Suche mit *E.coli* NusA(353–495) auf dem WU-BLAST2-Server (<http://dove.embl-heidelberg.de/Blast2>) gegen die nicht-redundante Datenbank SP-NRDB ermittelt. Als homolog wurden dabei Sequenzen mit einem Erwartungswert  $< 26 e^{-27}$  (*E-value*; Altschul *et al.* (1997)) betrachtet. Anschließend wurde für die auf diese Weise erhaltenen 35 Sequenzen mit Hilfe des Programms CLUSTALW1.82 (Thompson *et al.*, 1994) ein Sequenzvergleich durchgeführt. Aus dem Konsensus des Sequenzvergleichs (Abb. 4.2)



**Abbildung 4.2:** Konservierte Reste in NusACTD.

A. Die Abbildung zeigt die Sequenzen von AR1 und AR2 sowie, jeweils darunter, den aus einem Sequenzvergleich mit weiteren NusA-Proteinen (s. Text) ermittelten Konsensus (\*: identisch; ':': starke/schwache Ähnlichkeit). Der Konsensus weist dabei auf konservierte Reste in AR1 beziehungsweise AR2 hin. Zur Orientierung sind zusätzlich die HhH-Motive sowie die Verbindungshelices (C) eingezeichnet, die GhG-Muster sind in der Sequenz blau hervorgehoben. B. Während die konservierten Reste von AR2 im hydrophoben Kern und auf der Oberfläche verstreut sind (nicht gezeigt), bilden die oberflächenexponierten konservierten Reste von AR1 (weiße Beschriftung) zwei voneinander getrennte Bindungsflächen, die in den Oberflächenrepräsentationen von AR1 jeweils in blau eingefärbt sind.

ist zu sehen, daß die konservierten Reste in AR1 gehäuft im Bereich der Haarnadelschleife des ersten HhH-Motivs sowie in der Verbindungshelix auftreten, während die konservierten Reste in AR2 vorwiegend in der Verbindungshelix und dem zweiten HhH-Motiv zu beobachten sind.



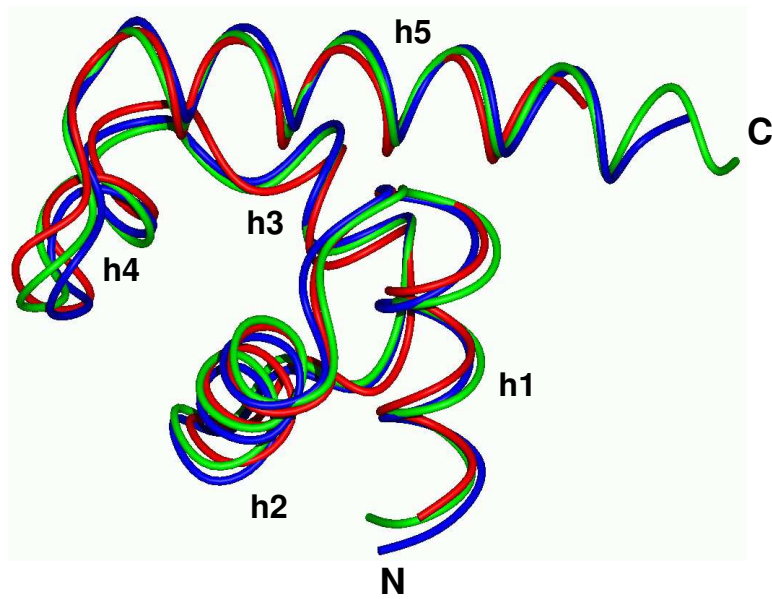
Die Interpretation der konservierten Reste im strukturellen Kontext von AR1 und AR2 zeigt, daß sich ein Großteil der Reste im hydrophoben Kern der beiden Domänen befindet. Für AR2 konnten trotz der bekannten Interaktion mit  $\alpha$ CTD und den RNA-bindenden Domänen von NusACTD (s. 4.2) keine größeren zusammenhängenden Flächen aus konservierten Resten an der Oberfläche gefunden werden. Dagegen bilden die oberflächenzugänglichen konservierten Reste im Fall von AR1 zwei größere voneinander getrennte Flächen (Abb. 4.2).

Die erste Fläche auf AR1 besteht dabei aus den Resten D364, I365, D366, E367 und D368, die sich im Bereich der Haarnadelschleife und der carboxyterminalen Helix h2 des ersten HhH-Motivs befinden, sowie L406, das in der gegenüberliegenden Helix h5 liegt. Eine zweite zusammenhängende Fläche auf AR1 wird durch die Reste der Helices h2, h3, h4 und h5 und den dazwischenliegenden Schleifen gebildet. Der größte Teil dieser Fläche ist hydrophob und wird durch die exponierten Seitenketten von G377 am Ende der Helix h2, F378 in der Schleife zwischen Helices h2 und h3, Y386 in der Helix h3, sowie V387 und P388 in der Schleife zwischen Helices h3 und h4 dominiert. Zusätzliche hydrophobe Reste L392 und I395 befinden sich in der Helix h4. Die geladenen Reste E382 und E383 in der Verbindungshelix sowie R407 und K411 in der Helix h5 bilden einen Rahmen um die hydrophoben Reste Y386 und V387.

Die Reste der ersten Fläche sind bis auf L406 an der Kontaktfläche mit dem  $\lambda$ N-Protein beteiligt (s. 4.1.4). Bisher sind für AR1 neben  $\lambda$ N keine weiteren Bindungspartner bekannt. Es ist jedoch denkbar, daß neben dem viralen  $\lambda$ N-Protein auch *E.coli*-Proteine an diese Kontaktfläche binden. Ob der zweite konservierte Bereich ebenfalls eine Bindungsfläche darstellt, kann ohne weitere Experimente nicht geklärt werden.

**4.1.4. Der Vergleich der Strukturen von NusACTD und NusACTD ·  $\lambda$ N ermöglicht Ein-sichten in die Erkennung durch (HhH)<sub>2</sub>-Faltungen.** Der erst vor kurzem mit Röntgenkristallographie bestimmte Komplex von  $\lambda$ N(34–47) mit zwei NusA-Fragmenten, die vom Umfang her ungefähr AR1 entsprechen, ermöglicht den Vergleich zwischen freiem und komplexierten AR1 (Bonin *et al.*, 2004a). Die Fragmente NusA(350–421) (AR1<sup>A</sup>) und NusA(350–424) (AR1<sup>B</sup>) sind kristallographisch unabhängig und mit einem RMSD<sub>bb</sub> von 0.67 Å für H353–T416 strukturell sehr ähnlich.

Beide Strukturen weichen mit RMSD<sub>bb</sub>-Werten von 1.20 Å (AR1<sup>A</sup>) und 1.10 Å (AR1<sup>B</sup>) nur geringfügig von der unkomplexierten Struktur von NusA(353–416) ab (Abb. 4.3). Unterschiede zwischen den freien und komplexierten Strukturen treten in der aminoterminalen Helix und der Haarnadelschleife des zweiten HhH Motivs auf, die die Aminosäuren M389–D399 umfassen. Für diese Reste können im freien Zustand erniedrigte Werte des heteronuklearen NOEs sowie



**Abbildung 4.3:** Überlagerung von freiem und mit  $\lambda$ N komplexierten AR1.

Die Abbildung zeigt die Überlagerung der unkomplexierten Durchschnittsstruktur von AR1 (rot, diese Arbeit) mit der Kristallstruktur 1U9L, in der zwei NusACTD-Moleküle, NusA(352–419) (AR1<sup>A</sup>, blau) und NusA(352–421) (AR1<sup>B</sup>, grün) einen Komplex mit  $\lambda$ N(34–47) bilden. AR1<sup>A</sup> und AR1<sup>B</sup> sind kristallographisch unabhängig, aber mit einem RMSD der schweren Rückgratome von 0.67 für die Reste 353–416 fast identisch. Beide Strukturen zeigen geringe Abweichungen von dem unkomplexierten NusA(353–416) mit einem RMSD der schweren Rückgratome von 1.20 für AR1<sup>A</sup> und 1.10 für AR1<sup>B</sup>. Die Überlagerung wurde mit Molmol (Koradi *et al.*, 1996) berechnet und dargestellt.

Austauschbeiträge beobachtet werden, die auf eine erhöhte Mobilität des Rückgrats hinweisen (s. 3.2.4.2).

Obwohl in der Kristallstruktur Interaktionen von  $\lambda$ N(34–47) mit AR1<sup>A</sup> und AR1<sup>B</sup> beobachtet werden, konnte mit Hilfe von Alanin-Austauschexperimenten gezeigt werden, daß die physiologisch relevante Wechselwirkung dem AR1<sup>B</sup> ·  $\lambda$ N-Komplex entspricht. In Tabelle 4.2 sind die von Bonin *et al.* (2004a) beschriebenen Schlüsselkontakte aus dem  $\lambda$ N(34–47) · AR1<sup>B</sup>-Komplex zusammengefaßt und nach Lage in der Struktur sowie der Kontaktart klassifiziert.

Danach sind die Interaktionen zwischen AR1 und  $\lambda$ N(34–47) sowohl elektrostatischer wie hydrophober Natur und finden auf AR1<sup>B</sup>-Seite primär über die Seitenketten statt. Die Kontaktfläche zu  $\lambda$ N (Tab. 4.2) wird dabei bis auf die Aminosäure Y362, die sich am Ende von Helix h1 befindet, durch die Reste in den Haarnadelschleifen und den carboxyterminalen Helices der beiden HhH-Motive gebildet. Die Erkennung von  $\lambda$ N erfolgt damit über die gleichen Bereiche,

$\lambda$ N	AR1 <sup>B</sup>	Lage	Kontaktart	AR2
R35	Y362	(h1)	H–Brücke / RG	L437
	D364	(hp1)	Salzbrücke / SK	G439
	E408	(h4)	H–Brücke / SK	M438
	R409	(h4)	H–Brücke / RG	A439
L38	I365	(hp1)	hydrophobe WW / SK	V440
	F369	(h2)	hydrophobe WW / SK	L444
S39	D366	(hp1)	H–Brücke / SK	D441
L40	F369	(h2)	hydrophobe WW / SK	L444
	V372	(h2)	hydrophobe WW / SK	K447
	L398	(hp2)	hydrophobe WW / SK	L473

**Tabelle 4.2:** Schlüsselkontakte im  $\lambda$ N(34–40) · AR1<sup>B</sup>–Komplex.

In der Tabelle sind die Kontakte von  $\lambda$ N mit AR1<sup>B</sup> zusammengefaßt. Zusätzlich ist für jede Aminosäure aus AR1<sup>B</sup> die Lage in der Struktur angegeben sowie die Art der Wechselwirkung näher spezifiziert. Zum Vergleich sind außerdem die Aminosäuren aus AR2 aufgelistet, die den Schlüsselresten aus AR1 im Sequenzvergleich (Abb. 3.14) entsprechen. (h: Helix; hp: Haarnadel; SK: Seitenkette; RG: Rückgrat)

die in DNA–bindenden HhH–Motiven Wechselwirkungen mit der DNA vermitteln (s. 4.1.2). Im Gegensatz zur unspezifischen Erkennung von DNA durch (HhH)<sub>2</sub>–Module (s. 4.1.2) bilden  $\lambda$ N und AR1<sup>B</sup> jedoch spezifische Kontakte über Seitenketten aus. Dies zeigt, daß prinzipiell dieselbe Region eines HhH–Motivs, je nach Beschaffenheit der Oberfläche, als Protein– oder DNA–Bindungsfläche agieren kann.

Die Relevanz der Oberflächeneigenschaften für die spezifische Erkennung demonstriert auch die Betrachtung von AR1 und AR2 in Bezug auf die Wechselwirkung mit  $\lambda$ N. Obwohl AR1 und AR2 bis auf die Helix h1/h1' eine konservierte Sequenz und Rückgratgeometrie besitzen (Abb. 3.14), zeigt ein Vergleich der Schlüsselreste in AR1 mit den Resten an den entsprechenden Sequenzpositionen in AR2, daß eine Bindung von  $\lambda$ N(34–40) an AR2 in derselben Art und Weise wie an AR1 unwahrscheinlich ist (Tab. 4.2). Zum einen fallen eine Salz– (D364 *versus* G439) und möglicherweise eine Wasserstoffbrücke (E408 *versus* M438) über die Seitenketten weg. Zum anderen dürften die Unterschiede in den hydrophoben Seitenketten (I356 *versus* V440; F369 *versus* L444; F369 *versus* L444) die geometrische Komplementarität der Oberflächen von AR1 und  $\lambda$ N zerstören. Der Austausch von V372 gegen K447 führt zu einer zusätzlichen positiven

Ladung auf der Kontaktfläche und verändert damit deren elektrostatische Eigenschaften. In der Summe dürften die Verluste an hydrophoben Interaktionen und die Veränderung der Elektrostatik der Oberfläche eine spezifische Komplexbildung verhindern.

Zusammenfassend konnte anhand der beiden homologen Domänen AR1 und AR2 sowie dem AR1<sup>B</sup>- $\lambda$ N-Komplex exemplarisch gezeigt werden, daß die Spezifität der Erkennung von Protein-Liganden durch (HhH)<sub>2</sub>-Module über die Oberflächeneigenschaften bestimmt wird. Trotz der Erkennung über Seitenkettenwechselwirkungen scheint die Flexibilität des Rückgrats eine Rolle bei der Komplexbildung zu spielen (s. 3.2.4.2). Da die Kontaktfläche auf AR1 mit 850 Å<sup>2</sup> sehr klein ist (Lo Conte *et al.*, 1999) und nur wenige Reste umfaßt (Bonin *et al.*, 2004a), genügen geringe Änderungen, um die Bindungsspezifität zu modulieren.

#### 4.2. Biologische Implikationen der Struktur und Dynamik von NusACTD

Die obige Struktur- und Funktionsanalyse führt zu dem Schluss, daß NusACTD zwei Protein-Protein-Interaktionsmodule beherbergt (s. 4.1.2). Experimentelle Daten weisen neben der regulatorischen Funktion von NusACTD auf eine zentrale Rolle dieser Module für die Stabilität der Transkriptionskomplexe aus RNAP und NusA (Terminationskomplex) beziehungsweise RNAP, NusA und  $\lambda$ N (Antiterminationskomplex) hin.

**4.2.1. AR2 entspricht der autoinhibitorischen Funktion von NusA.** Obwohl Sequenzvergleiche eine RNA-bindende Funktion von NusA vermuten ließen (s. 1.2.4) und Kreuzvernetzungs-Experimente von Liu und Hanna (1995) auf die Bindung naszierender RNA durch NusA in Transkriptionskomplexen hinwiesen, konnte keine Wechselwirkung zwischen RNA und isoliertem NusA beobachtet werden (Mogridge *et al.*, 1995). Erst Mah *et al.* (2000) konnten mit EMSA-Experimenten (EMSA: *electrophoretic mobility shift assay*) sowohl für eine carboxyterminale Deletionsmutante von NusA, NusA(1-416), als auch für NusA(1-495) in Gegenwart der  $\alpha$ CTD eine Wechselwirkung mit NUT-RNA nachweisen, so daß die Daten für eine Inhibition der RNA-Bindung durch die carboxyterminalen 80 Aminosäuren sprechen (s. 1.2.4).

Die Struktur- und Dynamikdaten von NusACTD(339-495) (s. 3.2.1) zeigen, daß die 80 carboxyterminalen Aminosäuren von NusA die flexible Linker-Region NusA(417-430) sowie das zweite (HhH)<sub>2</sub>-Modul, NusA(431-490), umfassen. In dieser Arbeit durchgeführte Titrationsexperimente (s. 3.3.2) von <sup>15</sup>N-markiertem NusACTD(339-495) mit unmarkiertem  $\alpha$ CTD(233-329) bestätigen die Wechselwirkung von AR2 mit  $\alpha$ CTD. Ob die Linkerregion ebenfalls in die Bindung involviert ist, konnte wegen der Signalüberlagerungen in diesem Bereich nicht ermittelt werden.

Bisher sind wenig strukturelle Details der Wechselwirkung zwischen  $\alpha$ CTD und AR2 bekannt.  $\alpha$ CTD besitzt wie AR1 beziehungsweise AR2 eine (HhH)<sub>2</sub>-Faltung (Jeon *et al.*, 1995; Shao und Grishin, 2000), die Interaktionen mit DNA und Proteinen auf unterschiedliche Art und Weise eingehen kann (Benoff *et al.*, 2002; Dangi *et al.*, 2004). Titrationsexperimente von Prasch (2004) zur Bestimmung der Kontaktfläche von NusACTD(339–495) auf  $\alpha$ CTD(233–329) sowie Studien von Szalewska-Palasz *et al.* (2003) und Mah *et al.* (2000) weisen auf eine Beteiligung von K271 der  $\alpha$ CTD an der  $\alpha$ CTD–NusACTD(339–495) Interaktion hin. Die entsprechenden Titrationsexperimente zur Ermittlung der an der  $\alpha$ CTD(233–329)–Bindung beteiligten Reste auf NusACTD(339–495) lieferten jedoch keine definierte Bindungsregion (s. 3.3.2).

Die Strukturen von homologen NusA–Proteinen zeigen drei potentielle RNA–Bindungsdomänen (Worbs *et al.*, 2001; Shin *et al.*, 2003; Gopal *et al.*, 2001), eine S1– und zwei KH–Domänen (Bycroft *et al.*, 1997; Gibson *et al.*, 1993), die vermutlich in einer elongierten Form vorliegen (Gill *et al.*, 1991; Worbs *et al.*, 2001). Mutationsdaten weisen auf eine Bindung von NusACTD an die S1–Domäne im autoinhibierten Zustand hin (Mah *et al.*, 2000; Mogridge *et al.*, 1995). Die Abmessungen der nebeneinander angeordneten S1–, KH1– und KH2–Domänen aus der Kristallstruktur von *T.maritima* NusA betragen etwa 60 Å entlang der Längsachse. AR1 und AR2 sind daher mit einem Durchmesser von jeweils 25–30 Å in der Lage, die Distanz zwischen dem Anknüpfungspunkt von AR1 und der S1–Domäne zu überbrücken. Die Arginin– und Lysin–Reste in *T.maritima* NusA(135–344), die in *E.coli* weitgehend konserviert sind, bilden eine positiv geladene Fläche, an die entweder RNA oder die stark negativ geladenen Domänen von NusACTD(339–495) (s. 3.15) binden könnten (Worbs *et al.*, 2001).

Bisher ist noch ungeklärt, über welchen Mechanismus die isolierte  $\alpha$ CTD die Autoinhibition wieder aufheben kann. Da AR2 hohen Grad an Flexibilität relativ zu AR1 aufweist (s. 3.2.5) könnte eine Möglichkeit eine Kompetition der  $\alpha$ CTD mit der S1–Domäne um eine überlappende Bindungsregion auf AR2 darstellen (Bonin *et al.*, 2004a).

Insgesamt erlauben die in dieser Arbeit aufgeklärte Struktur von NusACTD sowie Titrationsexperimente mit NusACTD und  $\alpha$ CTD die Eingrenzung der autoinhibitorischen Funktion auf AR2. Diese Funktion von AR2 steht im Einklang mit biochemischen Daten und der räumlichen Anordnung der Domänen in einem autoinhibierten Zustand. Die Dynamik von NusACTD, die mit <sup>15</sup>N–Relaxation untersucht wurde, liefert Hinweise darauf, wie die Autoinhibition aufgehoben werden könnte.

**4.2.2. Bindet  $\lambda$ N an AR2?** Mit Hilfe von Affinitätschromatographie mit  $\lambda$ N–Fragmenten konnte die minimale NusA–Bindungsregion von  $\lambda$ N auf die Reste N34–K47 eingegrenzt werden

(Mogridge *et al.*, 1998). Entsprechende Experimente mit NusA-Fragmenten konnten NusA(348–416) als minimale Bindungsregion für  $\lambda$ N identifizieren, eine Bindung an NusA(416–495) konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden (Mah *et al.*, 1999). Der kürzlich von Bonin *et al.* (2004a) veröffentlichte Komplex von  $\lambda$ N(34–47) mit NusA(350–424) (s. 4.1.4) bestätigt die spezifische Wechselwirkung von  $\lambda$ N(34–40) mit NusA(350–424).  $\lambda$ N(41–47) könnte damit für eine Bindung an AR2 zur Verfügung stehen.

Titrationsexperimente zur Bestimmung der NusACTD(339–495)-Bindungsstelle auf  $\lambda$ N(1–53) von Prasch (2004) konnten Veränderungen der chemischen Verschiebungen im Bereich von  $\lambda$ N(34–45) nachweisen. Zudem konnten Messungen des  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  heteronuklearen NOE eine Strukturierung des im ungebundenen Zustand ungefalteten  $\lambda$ N-Proteins in Gegenwart eines Überschusses von NusACTD(339–495) im Bereich von I37–K45 zeigen (Prasch, 2004). Die in dieser Arbeit durchgeführten Titrationsstudien von  $^{15}\text{N}$ -markiertem NusACTD(339–495) mit unmarkiertem  $\lambda$ N(1–53) liefern Hinweise auf eine Bindung von  $\lambda$ N(1–53) an AR1 und AR2 (s. 3.3.1).

Zusammen deuten diese Befunde auf eine Wechselwirkung zwischen AR1 und  $\lambda$ N(34–40) sowie AR2 und  $\lambda$ N(41–47) hin. Das von Mah *et al.* (2000) aufgestellte Modell der Regulation der RNA-Bindung an NusA geht davon aus, daß  $\lambda$ N genauso wie die  $\alpha$ CTD in der Lage ist, an NusACTD zu binden und die Autoinhibition aufzuheben. Da die Autoinhibition vermutlich durch AR2 vermittelt wird (s. 4.2.1) könnte die vermutete Interaktion von  $\lambda$ N(41–47) den Zugang zu den RNA-Bindungsstellen ermöglichen.

Neuere Untersuchungen von Bonin *et al.* (2004a) konnten keine RNA-Bindung an NusA in Gegenwart von  $\lambda$ N(34–47) feststellen. Zudem weisen die ähnlichen Gleichgewichtskonstanten der Dissoziation für den  $\lambda$ N(31–43)-NusA(350–495)-Komplex ( $K_D = 9.6 \mu\text{M}$ ) im Vergleich zu dem Komplex aus  $\lambda$ N(34–47) und NusA(350–495) ( $K_D = 3.5 \mu\text{M}$ ) darauf hin, daß  $\lambda$ N(41–47) nicht oder nur sehr schwach mit AR2 wechselwirkt (Bonin *et al.*, 2004a). Eine schwächere Wechselwirkung zwischen AR2 und  $\lambda$ N(1–53) war bereits aus den Titrationsdaten vermutet worden (s. 3.3.1). Zusammengefaßt ist damit eine Bindung von  $\lambda$ N an AR2 möglich, die Datenlage spricht jedoch für eine schwache und unspezifische Wechselwirkung.

**4.2.3. NusACTD stabilisiert den Terminations- und Antiterminationskomplex.** Neben der Aufhebung der Autoinhibition scheint die Wechselwirkung zwischen AR2 und  $\alpha$ CTD wesentlich zur Stabilität des NusA-RNAP-Komplexes beizutragen. Obwohl NusA auch über die aminoterminal Domäne mit der RNAP wechselwirkt (Mah *et al.*, 1999), konnte unter stringenten Bedingungen nur eine schwache Wechselwirkung mit dem *core*-Enzym der RNAP ohne

$\alpha$ CTD beobachtet werden (Liu *et al.*, 1996). Genauso führt die Deletion der carboxyterminalen 80 Aminosäuren von NusA zu einem Verlust der RNAP-Bindung in Affinitätschromatographie-Experimenten (Mah *et al.*, 2000). Die Gleichgewichtskonstante der Dissoziation für die Wechselwirkung von AR2 und  $\alpha$ CTD ist bisher nicht bekannt, jedoch sprechen die Titrationsexperimente für eine Wechselwirkung mit einer Gleichgewichtskonstante der Dissoziation von  $10^{-6}$ – $10^{-7}$  M (s. 3.3.2), während die Gleichgewichtskonstante der Dissoziation für den Komplex aus Gesamt-RNAP und Gesamt-NusA  $10^{-7}$ – $10^{-8}$  M beträgt (Greenblatt und Li, 1981; Schmidt und Chamberlin, 1984; Liu und Hanna, 1995; Burns *et al.*, 1998). Der Einfluß von NusACTD auf die Stabilität des NusA-RNAP-Komplexes könnte auch die Temperatursensitivität der *nusA134*-Mutante, die für ein carboxyterminal verkürztes NusA, NusA(1–343), codiert, erklären. *In vivo* äußert sich der temperatursensitive Phänotyp in Wachstum von *E.coli* bei 32°, jedoch nicht bei 42° (Tsugawa *et al.*, 1988). Ein Einfluß der *nusA134*-Mutante auf die Terminationseffizienz konnte nicht beobachtet werden.

Die Bindung von  $\lambda$ N an die RNAP ist mit einer geschätzten Gleichgewichtskonstante der Dissoziation von  $10^{-2} \geq K_D \geq 10^{-6}$  M relativ schwach (van Gilst und von Hippel, 2000) und erfolgt *in vitro* nur in Gegenwart unphysiologisch hoher  $\lambda$ N-Konzentrationen beziehungsweise erniedrigter Salzkonzentrationen. Dagegen bildet  $\lambda$ N zusammen mit NusA und RNAP *in vitro* unter physiologischen Bedingungen einen stabilen und antiterminationskompetenten Komplex (s. 1.2.5). Die Wechselwirkung zwischen NusACTD und  $\lambda$ N trägt mit einer Gleichgewichtskonstante der Dissoziation von circa 10  $\mu$ M (Bonin *et al.*, 2004a) entscheidend zur Stabilität des  $\lambda$ N-NusA-Komplexes und damit indirekt zur Stabilität der  $\lambda$ N-RNAP Interaktion bei. Obwohl für die Wechselwirkung der Vollängenproteine  $\lambda$ N und NusA in Gegenwart der NUT-RNA  $K_D$ -Werte zwischen  $10^{-8}$  M und  $10^{-7}$  M gemessen wurden (van Gilst und von Hippel, 1997; Xia *et al.*, 2003), konnte in EMSA-Experimenten die Bildung eines stabilen NusA- $\lambda$ N-NUT-RNA-Komplexes nur für NusA-Fragmente beobachtet werden, die die Region NusA(348–416) beziehungsweise NusA(348–495) enthielten (Mah *et al.*, 1999). Die NUTBOX-RNA liefert dabei keinen wesentlichen Beitrag zur Komplexstabilität (van Gilst und von Hippel, 1997).

*In vivo* konnte für die bereits erwähnte *nusA134*-Mutante eine verringerte Antitermination festgestellt werden (Tsugawa *et al.*, 1988). Der Vergleich der Struktur von AR1 im ungebundenen Zustand mit der kürzlich gelösten Röntgenkristallstruktur des NusA(350–424) ·  $\lambda$ N(34–47)-Komplexes unterstützt die Hypothese, daß die NusACTD- $\lambda$ N-Wechselwirkung lediglich der Stabilisierung dient und nicht direkt am Mechanismus der Antitermination beteiligt ist, da nur geringe konformationelle Änderungen an NusA durch die Komplexbildung beobachtet werden.

Insgesamt stehen die Daten in Einklang mit einer stabilisierenden Funktion von AR1 und AR2 im Antiterminations- beziehungsweise Terminationskomplex. Die stabilisierende Rolle von NusACTD im Antiterminationskomplex weist zudem mit den wahrscheinlich unterschiedlichen Wechselwirkungsbereichen von  $\lambda$ N (s. 4.2.2) und  $\alpha$ CTD (s. 4.2.1) auf NusACTD darauf hin, daß  $\lambda$ N und  $\alpha$ CTD gemeinsam an NusACTD binden können. Die Trennung der Domänen über eine mobile Linkerregion könnte dabei eine Anpassung an konformationelle Veränderungen der TEC-Struktur erlauben, die möglicherweise beim Übergang des TEC von einem Terminations- in einen Antiterminationskomplex auftreten.



## KAPITEL 5

### Zusammenfassung

Die RNA-Synthese in der Zelle wird durch RNAPs katalysiert und erfolgt in einem Zyklus aus Initiation, Elongation und Termination. In den letzten Jahren konnten durch die Aufklärung von Kristallstrukturen elongierender RNAPs vor allem Fortschritte im Verständnis der Elongationsphase erzielt werden, so daß die Elongation derzeit ein attraktives Forschungsgebiet darstellt.

Während der Elongation bildet die RNAP einen stabilen Komplex mit DNA und RNA, der als TEC bezeichnet wird, und über Tausende von Basenpaaren prozessiv ist, das heißt nicht dissoziiert. Lediglich an bestimmten DNA-Elementen, sogenannten Terminatoren, kann der TEC soweit destabilisiert werden, daß die Transkription beendet werden kann. Die Effizienz der Termination wird dabei durch Transkriptionsfaktoren reguliert.

In *E.coli* wird die Entscheidung *Elongation-versus-Termination* an einem Terminator durch den allgemeinen Transkriptionsfaktor NusA beeinflusst. NusA assoziiert während der Elongation mit dem TEC und fördert sowohl Pausen während der Transkription als auch die Termination. Dagegen wirkt NusA zusammen mit dem viralen Antiterminator-Protein  $\lambda$ N selbst als Antiterminator und setzt die Terminationseffizienz herab.

Sequenzvergleiche zwischen verschiedenen bakteriellen NusA-Proteinen sowie biochemische Daten weisen darauf hin, daß NusA aus drei funktionellen Domänen besteht. Dabei wechselwirkt die aminoterminal Domäne mit den großen Untereinheiten der RNAP während die zentrale Domäne RNA-Interaktionen vermittelt. Die ungefähr 160 Aminosäuren umfassende carboxyterminale Domäne, NusACTD, ist nur in einigen NusA-Proteinen vorhanden. NusACTD ist auffallend negativ geladen und enthält eine Sequenzwiederholung.

Für den konservierten aminoterminalen und zentralen Bereich von NusA wurden die Strukturen von *T.maritima* und *M.tuberculosis* mittels Röntgenkristallographie aufgeklärt. Eine hochaufgelöste Struktur für NusACTD konnte dagegen erst in dieser Arbeit mit NMR-Spektroskopie gewonnen werden. NusACTD besteht aus zwei strukturell ähnlichen Domänen NusA(353–416) (AR1) und NusA(431–490) (AR2), die ungefähr den zwei homologen sauren Sequenzbereichen

entsprechen. Mit  $^{15}\text{N}$ -Relaxationsdaten konnte gezeigt werden, daß die Domänen über eine flexible Linkerregion verbunden sind und keine definierte Orientierung zueinander einnehmen. Jede der Domänen weist fünf Helices auf, die eine  $(\text{HhH})_2$ -Faltung annehmen. Charakteristisch für die  $(\text{HhH})_2$ -Faltung sind jeweils zwei gegeneinander gepackte HhH-Motive, die zusammen mit der Verbindungshelix zwischen den Motiven einen kompakten hydrophoben Kern bilden.  $(\text{HhH})_2$ -Faltungen kommen häufig als selbständige Domänen vor, die DNA-Protein- und Protein-Protein-Wechselwirkungen vermitteln.

*E. coli* NusACTD wechselwirkt mit dem viralen  $\lambda\text{N}$ -Protein sowie der  $\alpha$ -Untereinheit der *E. coli* RNAP. Zudem reguliert NusACTD die RNA-Bindung an die zentrale Domäne von NusA, indem es selbst mit den RNA-Bindungsstellen interagiert. Trotz ihrer strukturellen Ähnlichkeit erkennen AR1 und AR2  $\lambda\text{N}$  und  $\alpha\text{CTD}$  auf unterschiedliche Art und Weise. In dieser Arbeit durchgeführte Titrationsexperimente weisen darauf hin, daß  $\alpha\text{CTD}$  ausschließlich an AR2 bindet, während  $\lambda\text{N}$  wahrscheinlich nur mit AR1 spezifische Kontakte ausbildet. Die Wechselwirkung von  $\alpha\text{CTD}$  mit NusA ermöglicht *in vitro* eine RNA-Bindung an NusA. Es ist daher anzunehmen, daß AR2 eine autoinhibitorische Funktion besitzt. Zusätzlich scheinen die Wechselwirkungen von NusACTD und  $\alpha\text{CTD}$  zur Stabilisierung der RNAP-NusA-Interaktion beizutragen.

Die antiterminatorische Wirkung von  $\lambda\text{N}$  beruht auf einer direkten Interaktion zwischen der RNAP und einer Region von  $\lambda\text{N}$  außerhalb der NusA-Bindungsregion. Die  $\lambda\text{N}$ -NusA-Wechselwirkung steigert die Antiterminationseffizienz von NusA wahrscheinlich über eine Stabilisierung der schwachen RNAP- $\lambda\text{N}$ -Interaktion. Der Vergleich der Struktur von AR1 im ungebundenen Zustand mit der kürzlich gelösten Röntgenkristallstruktur des NusA(350–424) ·  $\lambda\text{N}$ (34–47)-Komplexes unterstützt die Hypothese, daß die NusA- $\lambda\text{N}$ -Wechselwirkung nicht direkt am Mechanismus der Antitermination beteiligt ist, da nur geringe konformationelle Änderungen durch die Komplexbildung beobachtet werden.

Insgesamt stellt NusACTD über seine beiden  $(\text{HhH})_2$ -Module eine vielseitige Interaktionsfläche bereit, die möglicherweise Bindungsstellen für weitere Proteine neben  $\alpha\text{CTD}$  und  $\lambda\text{N}$  bietet. Die Trennung der Domänen über eine mobile Linkerregion ermöglicht eine Anpassung an konformationelle Veränderungen in der TEC-Struktur, die zum Beispiel beim Übergang des TEC von einem Elongations- in einen Antiterminationszustand auftreten können. Die flexible Verbindung zwischen den Domänen ist zudem für den Mechanismus der Autoinhibition wichtig, da bei der Bindung von NusA an den TEC die RNA Zugang zu den Bindungsstellen erhält.

## KAPITEL 6

### Summary

RNA synthesis in cells is catalyzed by RNAP in a three-step process divided in an initiation, elongation, and termination phase. Recent research has mainly focused on transcription elongation as new incentives were provided by high resolution X-ray structures of elongating RNAPs. Transcribing RNAPs form an extremely stable yet conformationally flexible complex called TEC containing the DNA template, the RNA transcript, and the RNAP. Only at special template sites, called terminators, the TEC is destabilized such that it may dissociate. The efficiency of termination is highly regulated by transcription factors.

In *E.coli* the elongation/termination decision is considerably influenced by the general transcription factor NusA which associates tightly with the TEC. Generally NusA enhances transcription pausing and termination, but for example in the presence of the bacteriophage  $\lambda$ N antiterminator protein it also stimulates antitermination.

Sequence comparisons among NusA proteins of different bacterial species show a common domain organisation, harboring an amino-terminal RNAP binding domain, a central RNA binding domain, and an approximately 160 amino acid carboxy-terminal domain, NusACTD, which is only present in some species. NusACTD is characterized by its acidity and often by an internal sequence repeat of approximately 70 residues. While the structure of the conserved amino-terminal and RNA-binding domains is known from X-ray studies of homologous *T. maritima* and *M. tuberculosis* NusA, a structural basis for *E.coli* NusACTD could only be established in this work using NMR spectroscopy.

The solution structure of NusACTD shows two structurally similar subdomains NusA(353–416) (AR1) and NusA(431–490) (AR2), matching roughly the two homologous acidic sequence repeats.  $^{15}\text{N}$  relaxation data indicate that the domains are connected by a flexible linker region and do not interact. Both domains feature five helices which adopt a (HhH)<sub>2</sub> fold. (HhH)<sub>2</sub> folds consist of two HhH-motifs linked together by a so-called connector helix. Together, the helices of the HhH-motifs and the connector helix form a tight hydrophobic core. Commonly (HhH)<sub>2</sub> folds occur as independent domains mediating DNA-protein and protein-protein interactions.

In *E. coli* NusACTD interacts with the protein N of bacteriophage  $\lambda$  and the  $\alpha$  subunit of the *E. coli* RNAP. Furthermore NusACTD has been implicated in the regulation of RNA binding to the central domain of NusA. Despite their similarity, NusA(353–416) and NusA(431–490) recognize  $\alpha$ CTD and  $\lambda$ N differently. This could be shown in NMR titration experiments performed in this work.  $\alpha$ CTD interacts only with AR2, whereas  $\lambda$ N probably restricts its specific interactions to AR1. Since  $\alpha$ CTD can relieve the inhibitory effect of NusACTD *in vitro* these data indicate that AR2 functions as an autoinhibitory domain. Additionally, the interactions of NusACTD with  $\alpha$ CTD may serve to increase the stability of the NusA–RNAP interaction.

Though the antitermination effect of  $\lambda$ N is due to a direct  $\lambda$ N–RNAP interaction, which is exerted by parts of  $\lambda$ N other than the NusA binding region, the binding of  $\lambda$ N to NusA could stabilize the weak RNAP– $\lambda$ N interaction and thus render antitermination efficient. Comparison of the free AR1 structure with the recently solved X–ray structure of the NusA(350–424) ·  $\lambda$ N complex supports the idea that the NusA–N interaction is not involved in the antitermination mechanism *per se* as only minor conformational rearrangements are observed upon complex formation.

In summary, the structure of the carboxy–terminal domain suggests how NusACTD fulfills its role as a versatile interaction site, probably serving as a platform for binding partners beyond  $\alpha$ CTD and  $\lambda$ N. The separation of the domains via the mobile linker could provide a means to adjust to changes in TEC structure upon transition from the elongation to the antitermination state. Furthermore the flexible linker is crucial for the rearrangement of AR2 upon binding to the elongation complex to render access to the RNA binding sites of NusA.

## Literaturverzeichnis

- P. Aloy, H. Ceulemans, A. Stark, and R.B. Russell. The relationship between sequence and interaction divergence in proteins. *J Mol Biol*, 332:989–98, 2003.
- A.S. Altieri, M.J. Mazzulla, D.A. Horita, R.H. Coats, P.T. Wingfield, A. Das, D.L. Court, and R.A. Byrd. The structure of the transcriptional antiterminator NusB from *Escherichia coli*. *Nat Struct Biol*, 7:470–4, 2000.
- S.F. Altschul, T.L. Madden, A.A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D.J. Lipman. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, 25(17):3389–402, 1997.
- R. Apweiler, A. Bairoch, C.H. Wu, W.C. Barker, B. Boeckmann, S. Ferro, E. Gasteiger, H. Huang, R. Lopez, M. Magrane, M.J. Martin, D.A. Natale, C. O'Donovan, N. Redaschi, and L.S. Yeh. UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res*, 32:115–9, 2004.
- L. Aravind, D.R. Walker, and E.V. Koonin. Conserved domains in DNA repair proteins and evolution of repair systems. *Nucleic Acids Res*, 27:1223–42, 1999.
- I. Artsimovitch and R. Landick. Interaction of a nascent RNA structure with RNA polymerase is required for hairpin-dependent transcriptional pausing but not for transcript release. *Genes Dev*, 12:3110–22, 1998.
- A.R. Atkinson and B. Kieffer. The role of protein motions in molecular recognition: insights from heteronuclear NMR relaxation measurements. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc*, 44: 141–187, 2004.
- J.L. Baber, A. Szabo, and N. Tjandra. Analysis of slow interdomain motion of macromolecules using NMR relaxation data. *J Am Chem Soc*, 123:3953–9, 2001.
- H. Barkhuijsen, W. de Beer, M.M.J. Bovee, and D. van Ormondt. Retrieval of frequencies, amplitudes, damping factors, and phases from time-domain signals using a linear least-squares procedure. *J Magn Reson*, 61:465–81, 1985.
- A. Bax. Weak alignment offers new NMR opportunities to study protein structure and dynamics. *Protein Sci*, 12:1–16, 2003.

- A. Bax, G. Kontaxis, and N. Tjandra. Dipolar couplings in macromolecular structure determination. *Methods Enzymol*, 339:127–74, 2001.
- B. Benoff, H. Yang, C.L. Lawson, G. Parkinson, J. Liu, E. Blatter, Y.W. Ebright, H.M. Berman, and R.H. Ebright. Structural basis of transcription activation: the CAP-alpha CTD-DNA complex. *Science*, 297:1562–6, 2002.
- E.V. Bocharov, A.G. Sobol, K.V. Pavlov, D.M. Korzhnev, V.A. Jaravine, A.T. Gudkov, and A.S. Arseniev. From structure and dynamics of protein L7/L12 to molecular switching in ribosome. *J Biol Chem*, 279:17697–706, 2004.
- B. Boeckmann, A. Bairoch, R. Apweiler, M.C. Blatter, A. Estreicher, E. Gasteiger, M.J. Martin, K. Michoud, C. O’Donovan, I. Phan, S. Pilbout, and M. Schneider. The SWISS-PROT protein knowledgebase and its supplement TrEMBL in 2003. *Nucleic Acids Res*, 31:365–70, 2003.
- I. Bonin, R. Muhlberger, G.P. Bourenkov, R. Huber, A. Bacher, G. Richter, and M.C. Wahl. Structural basis for the interaction of Escherichia coli NusA with protein N of phage lambda. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101:13762–7, 2004a.
- I. Bonin, R. Robelek, H. Benecke, H. Urlaub, A. Bacher, G. Richter, and M.C. Wahl. Crystal structures of the antitermination factor NusB from Thermotoga maritima and implications for RNA binding. *Biochem J*, 383:419–28, 2004b.
- S. Borukhov and E. Nudler. RNA polymerase holoenzyme: structure, function and biological implications. *Curr Opin Microbiol*, 6:93–100, 2003.
- S. Borukhov and K. Severinov. Role of the RNA polymerase sigma subunit in transcription initiation. *Res Microbiol*, 153:557–62, 2002.
- D.T. Braddock, M. Cai, J.L. Baber, Y. Huang, and G.M. Clore. Rapid identification of medium- to large-scale interdomain motion in modular proteins using dipolar couplings. *J Am Chem Soc*, 123:8634–5, 2001.
- D.T. Braddock, J.M. Louis, J.L. Baber, D. Levens, and G.M. Clore. Structure and dynamics of KH domains from FBP bound to single-stranded DNA. *Nature*, 415:1051–6, 2002.
- A.T. Brünger. *XPLOR (Version 3.1) A System for X-ray Crystallography and NMR*. Yale University Press, New Haven, 1992.
- I.N. Bronstein, K.A. Semendjajew, G. Musiol, and H. Mühlig. *Taschenbuch der Mathematik*. Harri Deutsch, Thun and Frankfurt am Main, 2. Ausgabe, 1995.
- B.R. Brooks, R.E. Bruccoleri, B.D. Olafson, D.J. States, S. Swaminathan, and M. Karplus. A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *J Comp Chem*, 4:187–217, 1983.

- C.M. Burns, L.V. Richardson, and J.P. Richardson. Combinatorial effects of NusA and NusG on transcription elongation and Rho-dependent termination in *Escherichia coli*. *J Mol Biol*, 278: 307–16, 1998.
- M. Bycroft, T.J. Hubbard, M. Proctor, S.M. Freund, and A.G. Murzin. The solution structure of the S1 RNA binding domain: a member of an ancient nucleic acid-binding fold. *Cell*, 88: 235–42, 1997.
- M. Cai, Y. Huang, R. Zheng, S.Q. Wei, R. Ghirlando, M.S. Lee, R. Craigie, A.M. Gronenborn, and G.M. Clore. Solution structure of the cellular factor BAF responsible for protecting retroviral DNA from autointegration. *Nat Struct Biol*, 5:903–9, 1998.
- E.A. Campbell, N. Korzheva, A. Mustaev, K. Murakami, S. Nair, A. Goldfarb, and S.A. Darst. Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial RNA polymerase. *Cell*, 104:901–12, 2001.
- M.S. Carlomagno and A. Nappo. The antiterminator NusB enhances termination at a sub-optimal Rho site. *J Mol Biol*, 309:19–28, 2001.
- M.S. Carlomagno and A. Nappo. NusA modulates intragenic termination by different pathways. *Gene*, 308:115–28, 2003.
- Cavanagh. *Protein NMR Spectroscopy*. Acad. Press, San Diego, 1996.
- S.L. Chang, A. Szabo, and N. Tjandra. Temperature dependence of domain motions of calmodulin probed by NMR relaxation at multiple fields. *J Am Chem Soc*, 125(37):11379–84, 2003.
- S. Chattopadhyay, J. Garcia-Mena, J. DeVito, K. Wolska, and A. Das. Bipartite function of a small RNA hairpin in transcription antitermination in bacteriophage lambda. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92:4061–5, 1995.
- S.W. Chi, A. Ayed, and C.H. Arrowsmith. Solution structure of a conserved C-terminal domain of p73 with structural homology to the SAM domain. *EMBO J*, 18:4438–45, 1999.
- G.M. Clore and A.M. Gronenborn. New methods of structure refinement for macromolecular structure determination by NMR. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95:5891–8, 1998.
- G.M. Clore, A.M. Gronenborn, and A. Bax. A robust method for determining the magnitude of the fully asymmetric alignment tensor of oriented macromolecules in the absence of structural information. *J Magn Reson*, 133:216–21, 1998.
- G.M. Clore, A. Szabo, A. Bax, L.E. Kay, P.C. Driscoll, and A.M. Gronenborn. Deviations from the simple two-parameter model-free approach to the interpretation of nitrogen-15 nuclear magnetic relaxation of proteins. *J Am Chem Soc*, 112:4989–91, 1990.

- J.W. Conaway and R.C. Conaway. Transcription elongation and human disease. *Annu Rev Biochem*, 68:301–19, 1999.
- M.G. Cordingley, P.L. Callahan, V.V. Sardana, V.M. Garsky, and R.J. Colonno. Substrate requirements of human rhinovirus 3C protease for peptide cleavage in vitro. *J Biol Chem*, 265: 9062–5, 1990.
- W.D. Cornell, P. Cieplak, I.C. Bayly, I.R. Gould, K.M. Merz, D.M. Ferguson, Spellmeyer D.C., Fox T., Caldwell J.W., and P.A. Kollman. A second generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids, and organic molecules. *J Am Chem Soc*, 117(19):5179–97, 1995.
- P. Cramer. Multisubunit RNA polymerases. *Curr Opin Struct Biol*, 12:89–97, 2002.
- P. Cramer, D.A. Bushnell, J. Fu, A.L. Gnatt, B. Maier-Davis, N.E. Thompson, R.R. Burgess, A.M. Edwards, P.R. David, and R.D. Kornberg. Architecture of RNA polymerase II and implications for the transcription mechanism. *Science*, 288:640–9, 2000.
- P. Cramer, D.A. Bushnell, and R.D. Kornberg. Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 Angstrom resolution. *Science*, 292:1863–76, 2001.
- B. Dangi, A.M. Gronenborn, J.L. Rosner, and R.G. Martin. Versatility of the carboxy-terminal domain of the alpha subunit of RNA polymerase in transcriptional activation: use of the DNA contact site as a protein contact site for MarA. *Mol Microbiol*, 54:45–59, 2004.
- S.A. Darst. Bacterial RNA polymerase. *Curr Opin Struct Biol*, 11:155–62, 2001.
- Y. d'Aubenton Carafa, E. Brody, and C. Thermes. Prediction of Rho-independent Escherichia coli transcription terminators. a statistical analysis of their RNA stem-loop structures. *J Mol Biol*, 216:835–58, 1990.
- K.T. Dayie and G. Wagner. 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, 1994.
- E. de Alba, J. L. Baber, and N. Tjandra. The use of residual dipolar coupling in concert with backbone relaxation rates to identify conformational exchange by NMR. *J Am Chem Soc*, 121 (17):4282–3, 1999.
- B. de Crombrughe, M. Mudryj, R. DiLauro, and M. Gottesman. Specificity of the bacteriophage lambda N gene product (pN): nut sequences are necessary and sufficient for antitermination by pN. *Cell*, 18:1145–51, 1979.
- F. Delaglio, S. Grzesiek, G.W. Vuister, G. Zhu, J. Pfeifer, and A. Bax. NMRpipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J Biomol NMR*, 6:277–93, 1995.
- N. Deshpande, K.J. Address, W.F. Bluhm, J.C. Merino-Ott, W. Townsend-Merino, Q. Zhang, C. Knezevich, L. Xie, L. Chen, Z. Feng, R.K. Green, J.L. Flippen-Anderson, J. Westbrook, H.M. Berman, and P.E. Bourne. The RCSB protein data bank: a redesigned query system and



- relational database based on the mmCIF schema. *Nucleic Acids Res*, 33:233–7, 2005.
- J. DeVito and A. Das. Control of transcription processivity in phage lambda: Nus factors strengthen the termination-resistant state of RNA polymerase induced by N antiterminator. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91:8660–4, 1994.
- T. Diercks, M. Coles, and H. Kessler. An efficient strategy for assignment of cross-peaks in 3D heteronuclear NOESY experiments. *J Biomol NMR*, 15:177–80, 1999.
- A.J. Doherty, L.C. Serpell, and C.P. Ponting. The helix-hairpin-helix DNA-binding motif: a structural basis for non-sequence-specific recognition of DNA. *Nucleic Acids Res*, 24:2488–97, 1996.
- P. Dosset, J.C. Hus, Blackledge M., and D. Marion. Efficient analysis of macromolecular rotational diffusion from heteronuclear relaxation data. *J Biomol NMR*, 16:23–28, 2000.
- R.H. Ebright and S. Busby. The Escherichia coli RNA polymerase alpha subunit: structure and function. *Curr Opin Genet Dev*, 5:197–203, 1995.
- A. Eisenmann, Schwarz S., S. Prasch, K. Schweimer, and P. Rösch. NusA in termination and antitermination: The E.coli NusA carboxy-terminal domains are structurally similar and show specific RNAP and  $\lambda$ n interaction. *submitted*, 2005.
- A. Eisenmann, S. Schwarz, P. Rösch, and K. Schweimer. Sequence-specific  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  resonance assignments and secondary structure of the carboxyterminal domain of the E.coli transcription factor NusA. *J Biomol NMR*, 28:193–4, 2004.
- L. Emsley and G. Bodenhausen. Gaussian pulse cascades: New analytical functions for rectangular selective inversion and in-phase excitation in NMR. *Chem Phys Lett*, 165:469–76, 1990.
- V. Epshtein, A. Mustaev, V. Markovtsov, O. Bereshchenko, V. Nikiforov, and A. Goldfarb. Swing-gate model of nucleotide entry into the RNA polymerase active center. *Mol Cell*, 10:623–34, 2002.
- D.A. Erie. The many conformational states of RNA polymerase elongation complexes and their roles in the regulation of transcription. *Biochim Biophys Acta*, 1577:224–39, 2002.
- P.J. Farnham, J. Greenblatt, and T. Platt. Effects of NusA protein on transcription termination in the tryptophan operon of Escherichia coli. *Cell*, 29:945–51, 1982.
- N.A. Farrow, O. Zhang, A. Szabo, D.A. Torchia, and L.E. Kay. Spectral density function mapping using  $^{15}\text{N}$  relaxation data exclusively. *J Biomol NMR*, 6(2), 1995.
- M.W. Fischer, J.A. Losonczi, J.L. Weaver, and J.H. Prestegard. Domain orientation and dynamics in multidomain proteins from residual dipolar couplings. *Biochemistry*, 38:9013–22, 1999.

- M.W.F. Fischer, A. Majumdar, and E.R.P. Zuiderweg. Protein NMR relaxation: theory, applications and outlook. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc*, 33:207–272, 1998.
- R.F. Fisher and C. Yanofsky. Mutations of the beta subunit of RNA polymerase alter both transcription pausing and transcription termination in the trp operon leader region in vitro. *J Biol Chem*, 258:8146–50, 1983.
- R.H. Folmer, C.W. Hilbers, R.N. Konings, and M. Nilges. Floating stereospecific assignment revisited: application to an 18 kDa protein and comparison with J-coupling data. *J Biomol NMR*, 9:245–58, 1997.
- D. Fushman, R. Varadan, M. Assfalg, and O. Walker. Determining domain orientation in macromolecules by using spin-relaxation and residular dipolar coupling measurements. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc*, 44:189–214, 2004.
- D.e. Garcia, M.L. Huertas, and B. Carrasco. Calculation of hydrodynamic properties of globular proteins from their atomic-level structure. *Biophys J*, 78:719–30, 2000.
- R. Ghose, D. Fushman, and D. Cowburn. Determination of the rotational diffusion tensor of macromolecules in solution from NMR relaxation data with a combination of exact and approximate methods—application to the determination of interdomain orientation in multidomain proteins. *J Magn Reson*, 149:204–17, 2001.
- T.J. Gibson, J.D. Thompson, and J. Heringa. The KH domain occurs in a diverse set of RNA-binding proteins that include the antiterminator NusA and is probably involved in binding to nucleic acid. *FEBS Lett*, 324:361–6, 1993.
- S.C. Gill and P.H. von Hippel. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem*, 182:319–26, 1989.
- S.C. Gill, S.E. Weitzel, and P.H. von Hippel. Escherichia coli sigma 70 and NusA proteins. I. binding interactions with core RNA polymerase in solution and within the transcription complex. *J Mol Biol*, 220:307–24, 1991.
- A.L. Gnatt, P. Cramer, J. Fu, D.A. Bushnell, and R.D. Kornberg. Structural basis of transcription: an RNA polymerase II elongation complex at 3.3 Å resolution. *Science*, 292:1876–82, 2001.
- P. Gollnick and P. Babitzke. Transcription attenuation. *Biochim Biophys Acta*, 1577:240–50, 2002.
- B. Gopal, L.F. Haire, R.A. Cox, Jo Colston, S. Major, J.A. Brannigan, S.J. Smerdon, and G. Dodson. The crystal structure of NusB from Mycobacterium tuberculosis. *Nat Struct Biol*, 7: 475–8, 2000.
- B. Gopal, L.F. Haire, S.J. Gamblin, E.J. Dodson, A.N. Lane, K.G. Papavinasundaram, M.J. Colston, and G. Dodson. Crystal structure of the transcription elongation/anti-termination

- factor NusA from *Mycobacterium tuberculosis* at 1.7 Å resolution. *J Mol Biol*, 314:1087–95, 2001.
- S.L. Gotta, O.L. Miller, and S.L. French. rRNA transcription rate in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 173:6647–9, 1991.
- J.B. Green, C.D. Gardner, R.P. Wharton, and A.K. Aggarwal. RNA recognition via the SAM domain of Smaug. *Mol Cell*, 11:1537–48, 2003.
- J. Greenblatt. Positive control of endolysin synthesis in vitro by the gene N protein of phage lambda. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 69:3606–10, 1972.
- J. Greenblatt and J. Li. Interaction of the sigma factor and the nusa gene protein of *E. coli* with RNA polymerase in the initiation-termination cycle of transcription. *Cell*, 24:421–8, 1981.
- J. Greenblatt, J. Li, S. Adhya, D.I. Friedman, L.S. Baron, B. Redfield, H.F. Kung, and H. Weissbach. L factor that is required for beta-galactosidase synthesis is the nusa gene product involved in transcription termination. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77:1991–4, 1980.
- J. Greenblatt, J.R. Nodwell, and S.W. Mason. Transcriptional antitermination. *Nature*, 364:401–6, 1993.
- S.J. Grimshaw, H.R. Mott, K.M. Stott, P.R. Nielsen, K.A. Evetts, L.J. Hopkins, D. Nietlispach, and D. Owen. Structure of the sterile alpha motif (SAM) domain of the *Saccharomyces cerevisiae* mitogen-activated protein kinase pathway-modulating protein STE50 and analysis of its interaction with the STE11 SAM. *J Biol Chem*, 279:2192–201, 2004.
- S. Grzesiek, J. Anglister, and A. Bax. Correlation of backbone amide and aliphatic side-chain resonances in  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -enriched proteins by isotropic mixing of  $^{13}\text{C}$  magnetization. *J Magn Reson B*, 101(1):114–9, 1993.
- S. Grzesiek and A. Bax. Correlating backbone amide and side chain resonances in larger proteins by multiple relayed triple resonance NMR. *J Am Chem Soc*, 114:6291–3, 1992a.
- S. Grzesiek and A. Bax. Improved 3D triple-resonance NMR techniques applied to a 31 kDa protein. *J Magn Reson*, 96:432–40, 1992b.
- S. Grzesiek and A. Bax. Amino acid type determination in the sequential assignment procedure of uniformly  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -enriched proteins. *J Biomol NMR*, 3:185–204, 1993a.
- S. Grzesiek and A. Bax. The importance of not saturating water in protein NMR. application to sensitivity enhancement and NOE measurements. *J Am Chem Soc*, 115(26):12593–4, 1993b.
- R. Guajardo and R. Sousa. A model for the mechanism of polymerase translocation. *J Mol Biol*, 265:8–19, 1997.
- Y. Guan, R.C. Manuel, A.S. Arvai, S.S. Parikh, C.D. Mol, J.H. Miller, S. Lloyd, and J.A. Tainer. MutY catalytic core, mutant and bound adenine structures define specificity for DNA repair

- enzyme superfamily. *Nat Struct Biol*, 5:1058–64, 1998.
- I. Gusarov and E. Nudler. Control of intrinsic transcription termination by N and NusA: the basic mechanisms. *Cell*, 107:437–49, 2001.
- M.R. Hansen, L. Mueller, and A. Pardi. Tunable alignment of macromolecules by filamentous phage yields dipolar coupling interactions. *Nat Struct Biol*, 5:1065–74, 1998.
- T.M. Henkin. Transcription termination control in bacteria. *Curr Opin Microbiol*, 3:149–53, 2000.
- T.M. Henkin and C. Yanofsky. Regulation by transcription attenuation in bacteria: how RNA provides instructions for transcription termination/antitermination decisions. *Bioessays*, 24:700–7, 2002.
- M. Hesse, H. Meier, and B. Zeeh. *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*. Thieme, Stuttgart, 6. Ausgabe, 2002.
- L. Holm and C. Sander. Mapping the protein universe. *Science*, 273:595–603, 1996.
- P.M. Hwang, N.R. Skrynnikov, and L.E. Kay. Domain orientation in beta-cyclodextrin-loaded maltose binding protein: diffusion anisotropy measurements confirm the results of a dipolar coupling study. *J Biomol NMR*, 20:83–8, 2001.
- M. Ikura, A. Bax, G.M. Clore, and A.M. Gronenborn. Detection of nuclear overhauser effects between degenerate amide proton resonances by heteronuclear three-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Am Chem Soc*, 112:9020–2, 1990.
- M. Ikura, L.E. Kay, and A. Bax. Improved three-dimensional  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  correlation spectroscopy of a  $^{13}\text{C}$ -labeled protein using constant-time evolution. *J Biomol NMR*, 1:299–304, 1991a.
- M. Ikura, S. Spera, G. Barbato, L.E. Kay, M. Krinks, and A. Bax. Secondary structure and side-chain  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  resonance assignments of calmodulin in solution by heteronuclear multidimensional NMR spectroscopy. *Biochemistry*, 30:9216–28, 1991b.
- O. Jardetzky and G.C.K Roberts. *NMR in Molecular Biology*. Academic Press, New York, 1981.
- Y.H. Jeon, T. Negishi, M. Shirakawa, T. Yamazaki, N. Fujita, A. Ishihama, and Y. Kyogoku. Solution structure of the activator contact domain of the RNA polymerase alpha subunit. *Science*, 270:1495–7, 1995.
- Y.H. Jeon, T. Yamazaki, T. Otomo, A. Ishihama, and Y. Kyogoku. Flexible linker in the RNA polymerase alpha subunit facilitates the independent motion of the C-terminal activator contact domain. *J Mol Biol*, 267:953–62, 1997.

- D. Jin, M. Andrec, G.T. Montelione, and R.M. Levy. Propagation of experimental uncertainties using the Lipari-Szabo model-free analysis of protein dynamics. *J Am Chem Soc*, 119:6923–24, 1997.
- B.A. Johnson and R.A. Blevins. NMRView: A computer program for the visualization and analysis of NMR data. *J Biomol NMR*, 4:603–14, 1994.
- R.S. Jucker, J.R. Weeks, W.A. Zehring, and A.L. Greenleaf. Analysis of the gene encoding the largest subunit of RNA polymerase II in *Drosophila*. *Mol Gen Genet*, 215:266–75, 1989.
- J.A. Jones, P. Hodgkinson, A.L. Barker, and P.J. Hore. Optimal sampling strategies for the measurement of spin-spin relaxation times. *J Magn Reson*, 113:25–34, 1996.
- J.A. Jones, D.K. Wilkins, L.J. Smith, and C.M. Dobson. Characterization of protein unfolding by NMR diffusion measurements. *J Biomol NMR*, 10:199–203, 1997.
- D.L. Kaplan and M. O’Donnell. Rho factor: transcription termination in four steps. *Curr Biol*, 13:714–6, 2003.
- G.A. Kassavetis and M.J. Chamberlin. Pausing and termination of transcription within the early region of bacteriophage T7 DNA in vitro. *J Biol Chem*, 256:2777–86, 1981.
- L. Kay, E.P. Keifer, and T. Saarinen. Pure absorption gradient enhanced heteronuclear single quantum correlation spectroscopy with improved sensitivity. *J Am Chem Soc*, 114:10663–5, 1992.
- L.E. Kay, D.A. Torchia, and A. Bax. Backbone dynamics of proteins as studied by <sup>15</sup>N inverse detected heteronuclear NMR spectroscopy: application to staphylococcal nuclease. *Biochemistry*, 28(23):8972–9, 1989.
- H. Kettenberger, K.J. Armache, and P. Cramer. Complete RNA polymerase II elongation complex structure and its interactions with NTP and TFIIS. *Mol Cell*, 16:955–65, 2004.
- J.R. Kiefer, C. Mao, C.J. Hansen, S.L. Basehore, H.H. Hogrefe, J.C. Braman, and L.S. Bee-se. Crystal structure of a thermostable *Bacillus* DNA polymerase I large fragment at 2.1 Å resolution. *Structure*, 5:95–108, 1997.
- C.A. Kim and J.U. Bowie. SAM domains: uniform structure, diversity of function. *Trends Biochem Sci*, 28:625–8, 2003.
- C.A. Kim, M. Gingery, R.M. Pilpa, and J.U. Bowie. The SAM domain of polyhomeotic forms a helical polymer. *Nat Struct Biol*, 9:453–7, 2002.
- J.R. Knowlton, M. Bubunencko, M. Andrykovitch, W. Guo, K.M. Routzahn, D.S. Waugh, D.L. Court, and X. Ji. A spring-loaded state of NusG in its functional cycle is suggested by X-ray crystallography and supported by site-directed mutants. *Biochemistry*, 42:2275–81, 2003.

- N. Komissarova, J. Becker, S. Solter, M. Kireeva, and M. Kashlev. Shortening of RNA:DNA hybrid in the elongation complex of RNA polymerase is a prerequisite for transcription termination. *Mol Cell*, 10:1151–62, 2002.
- R. Koradi, M. Billeter, and K. Wuthrich. MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. *J Mol Graph*, 14:51–5, 1996.
- N. Korzheva and A. Mustaev. Transcription elongation complex: structure and function. *Curr Opin Microbiol*, 4:119–25, 2001.
- N. Korzheva, A. Mustaev, M. Kozlov, A. Malhotra, V. Nikiforov, A. Goldfarb, and S.A. Darst. A structural model of transcription elongation. *Science*, 289:619–25, 2000.
- D.M. Korzhnev, M. Billeter, A.S. Arseniev, and V.Y. Orekhov. NMR studies of Brownian tumbling and internal motions in proteins. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc*, 38:197–266, 2001.
- D.M. Korzhnev, V.Y. Orekhov, and A.S. Arseniev. Model-free approach beyond the borders of its applicability. *J Magn Reson*, 127:184–91, 1997.
- D.M. Korzhnev, E.V. Tischenko, and A.S. Arseniev. Off-resonance effects in  $^{15}\text{N}$  t2 cpmg measurements. *J Biomol NMR*, 17:231–7, 2000.
- J. Kraulis, G.M. Clore, M. Nilges, T.A. Jones, G. Pettersson, J. Knowles, and A.M. Gronenborn. Determination of the three-dimensional solution structure of the C-terminal domain of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. a study using nuclear magnetic resonance and hybrid distance geometry-dynamical simulated annealing. *Biochemistry*, 28:7241–57, 1989.
- S. Kumar and M. Bansal. Geometrical and sequence characteristics of alpha-helices in globular proteins. *Biophys J*, 75:1935–44, 1998.
- J. Kuszewski and G.M. Clore. Sources of and solutions to problems in the refinement of protein NMR structures against torsion angle potentials of mean force. *J Magn Reson*, 146:249–54, 2000.
- J. Kuszewski, A.M. Gronenborn, and G.M. Clore. Improving the quality of NMR and crystallographic protein structures by means of a conformational database potential derived from structure databases. *Protein Sci*, 5:1067–80, 1996.
- R. Landick. RNA polymerase clamps down. *Cell*, 105:567–70, 2001.
- R. Landick and C. Yanofsky. Stability of an RNA secondary structure affects in vitro transcription pausing in the trp operon leader region. *J Biol Chem*, 259:11550–5, 1984.
- G. Larsson, G. Martinez, J. Schleucher, and S.S. Wijmenga. Detection of nano-second internal motion and determination of overall tumbling times independent of the time scale of internal motion in proteins from NMR relaxation data. *J Biomol NMR*, 27:291–312, 2003.

- R.A. Laskowski, M.W. MacArthur, D.S. Moss, and J.M. Thornton. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J Appl Cryst*, 26:283–291, 1993.
- L.F. Lau, J.W. Roberts, and R. Wu. Transcription terminates at lambda tR1 in three clusters. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 79:6171–5, 1982.
- L.F. Lau, J.W. Roberts, and R. Wu. RNA polymerase pausing and transcript release at the lambda tR1 terminator in vitro. *J Biol Chem*, 258:9391–7, 1983.
- A.R. Leach. *Molecular Modelling; Principles and Applications*. Longman, Harlow, 1999.
- A.L. Lee and A.J. Wand. Assessing potential bias in the determination of rotational correlation times of proteins by NMR relaxation. *J Biomol NMR*, 13:101–12, 1999.
- J.Y. Lee, C. Chang, H.K. Song, J. Moon, J.K. Yang, H.K. Kim, S.T. Kwon, and S.W. Suh. Crystal structure of NAD(+)-dependent DNA ligase: modular architecture and functional implications. *EMBO J*, 19:1119–29, 2000.
- L.K. Lee, M. Rance, W.J. Chazin, and A.G. Palmer III. Rotational diffusion anisotropy of proteins from simultaneous analysis of <sup>15</sup>N and <sup>13</sup>C alpha nuclear spin relaxation. *J Biomol NMR*, 9(3):287–98, 1997.
- P. Legault, J. Li, J. Mogridge, L.E. Kay, and J. Greenblatt. NMR structure of the bacteriophage lambda N peptide/boxB RNA complex: recognition of a GNRA fold by an arginine-rich motif. *Cell*, 93:289–99, 1998.
- I. Letunic, R.R. Copley, S. Schmidt, F.D. Ciccarelli, T. Doerks, J. Schultz, C.P. Ponting, and P. Bork. SMART 4.0: towards genomic data integration. *Nucleic Acids Res*, 32:142–4, 2004.
- L.Y. Lian and G.C.K Roberts. *NMR of Macromolecules*. Oxford University Press, Oxford, 1995.
- G. Lipari and A. Szabo. Model-free approach to the interpretation of nuclear magnetic resonance relaxation in macromolecules. 1.theory and range of validity. *J Am Chem Soc*, 104:4546–59, 1982.
- K. Liu and M.M. Hanna. NusA interferes with interactions between the nascent RNA and the C-terminal domain of the alpha subunit of RNA polymerase in Escherichia coli transcription complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92:5012–6, 1995.
- K. Liu, Y. Zhang, K. Severinov, A. Das, and M.M. Hanna. Role of Escherichia coli RNA polymerase alpha subunit in modulation of pausing, termination and anti-termination by the transcription elongation factor NusA. *EMBO J*, 15:150–61, 1996.
- L. Lo Conte, C. Chothia, and J. Janin. The atomic structure of protein-protein recognition sites. *J Mol Biol*, 285:2177–98, 1999.
- H. Lutten, R. Robelek, R. Muhlberger, T. Diercks, S.C. Schuster, P. Kohler, H. Kessler, A. Bacher, and G. Richter. Transcriptional regulation by antitermination. interaction of RNA with

- NusB protein and NusB/NusE protein complex of Escherichia coli. *J Mol Biol*, 316:875–85, 2002.
- M.W. Maciejewski, D. Liu, R. Prasad, S.H. Wilson, and G.P. Mullen. Backbone dynamics and refined solution structure of the N-terminal domain of DNA polymerase beta. correlation with DNA binding and drp lyase activity. *J Mol Biol*, 296:229–53, 2000.
- T.F. Mah, K. Kuznedelov, A. Mushegian, K. Severinov, and J. Greenblatt. The alpha subunit of E.coli RNA polymerase activates RNA binding by NusA. *Genes Dev*, 14:2664–75, 2000.
- T.F. Mah, J. Li, A.R. Davidson, and J. Greenblatt. Functional importance of regions in Escherichia coli elongation factor NusA that interact with RNA polymerase, the bacteriophage lambda N protein and RNA. *Mol Microbiol*, 34:523–37, 1999.
- D. Marion, M. Ikura, R. Tschudin, and A. Bax. Rapid recording of 2D NMR spectra without phase cycling. application to the study of hydrogen exchange in proteins. *J Magn Reson*, 85:393–9, 1989.
- A. Markley, A. Bax, Y Arata, C.W. Hilbers, R. Kaptein, B.D. Sykes, P.E. Wright, and K. Wüthrich. Recommendations for the presentation of NMR structures of proteins and nucleic acids (IUPAC recommendations 1998). *Pure Appl Chem*, 70:117–42, 1998.
- S.W. Mason, J. Li, and J. Greenblatt. Direct interaction between two Escherichia coli transcription antitermination factors, NusB and ribosomal protein S10. *J Mol Biol*, 223:55–66, 1992a.
- S.W. Mason, J. Li, and J. Greenblatt. Host factor requirements for processive antitermination of transcription and suppression of pausing by the N protein of bacteriophage lambda. *J Biol Chem*, 267:19418–26, 1992b.
- J. Mogridge, P. Legault, J. Li, O.e.n.e. Van, L.E. Kay, and J. Greenblatt. Independent ligand-induced folding of the RNA-binding domain and two functionally distinct antitermination regions in the phage lambda N protein. *Mol Cell*, 1:265–75, 1998.
- J. Mogridge, T.F. Mah, and J. Greenblatt. A protein-RNA interaction network facilitates the template-independent cooperative assembly on RNA polymerase of a stable antitermination complex containing the lambda N protein. *Genes Dev*, 9:2831–45, 1995.
- R.A. Mooney, I. Artsimovitch, and R. Landick. Information processing by RNA polymerase: recognition of regulatory signals during RNA chain elongation. *J Bacteriol*, 180:3265–75, 1998.
- S. Mori, C. Abeygunawardana, M. O. Johnson, and P. C. M. Vanzijl. 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, 1995.



- A.L. Morris, M.W. MacArthur, E.G. Hutchinson, and J.M. Thornton. Stereochemical quality of protein structure coordinates. *Proteins*, 12:345–364, 1992.
- C. Mosrin-Huaman, C.L. Turnbough, and A.R. Rahmouni. Translocation of Escherichia coli RNA polymerase against a protein roadblock in vivo highlights a passive sliding mechanism for transcript elongation. *Mol Microbiol*, 51:1471–81, 2004.
- Mosteller and Tukey. *Data Analysis and Regression*. Addison-Weseley, Reading, MA, 1977.
- K.S. Murakami and S.A. Darst. Bacterial RNA polymerases: the whole story. *Curr Opin Struct Biol*, 13:31–9, 2003.
- P. Neudecker. *Strukturbestimmung von Birkenpollenallergenen und birkenpollenassoziierten Nahrungsmittelallergenen mit NMR-Spektroskopie*. Dissertation, Universität Bayreuth, 2003.
- P. Neudecker, J. Nerkamp, A. Eisenmann, A. Nourse, T. Lauber, K. Schweimer, K. Lehmann, S. Schwarzinger, F. Ferreira, and P. Rösch. Solution structure, dynamics, and hydrodynamics of the calcium-bound cross-reactive birch pollen allergen Bet v 4 reveal a canonical monomeric two EF-hand assembly with a regulatory function. *J Mol Biol*, 336:1141–57, 2004.
- P. Neudecker, H. Sticht, and P. Rösch. Improving the efficiency of the gaussian conformational database potential for the refinement of protein and nucleic acid structures. *J Biomol NMR*, 21:373–5, 2001.
- A. Nicholls and B. Honig. A rapid finite difference algorithm, utilizing successive over-relaxation to solve the Poisson–Boltzmann equation. *J Comp Chem*, 12:435–445, 1990.
- M. Nilges. Calculation of protein structures with ambiguous distance restraints. automated assignment of ambiguous NOE crosspeaks and disulphide connectivities. *J Mol Biol*, 245:645–60, 1995.
- T. Nishino, M. Ariyoshi, H. Iwasaki, H. Shinagawa, and K. Morikawa. Functional analyses of the domain structure in the Holliday junction binding protein RuvA. *Structure*, 6:11–21, 1998.
- E. Nudler. Transcription elongation: structural basis and mechanisms. *J Mol Biol*, 288:1–12, 1999.
- E. Nudler and M.E. Gottesman. Transcription termination and anti-termination in E.coli. *Genes Cells*, 7:755–68, 2002.
- E. Nudler, I. Gusarov, E. Avetisova, M. Kozlov, and A. Goldfarb. Spatial organization of transcription elongation complex in Escherichia coli. *Science*, 281:424–8, 1998.
- E. Nudler, A. Mustaev, E. Lukhtanov, and A. Goldfarb. The RNA-DNA hybrid maintains the register of transcription by preventing backtracking of RNA polymerase. *Cell*, 89:33–41, 1997.

- E.R. Olson, E.L. Flamm, and D.I. Friedman. Analysis of nutR: a region of phage lambda required for antitermination of transcription. *Cell*, 31:61–70, 1982.
- V.Y. Orekhov, D.M. Korzhnev, K.V. Pervushin, E. Hoffmann, and A.S. Arseniev. Sampling of protein dynamics in nanosecond time scale by  $^{15}\text{N}$  NMR relaxation and self-diffusion measurements. *J Biomol Struct Dyn*, 17:157–74, 1999.
- A. Pardi, M. Billeter, and K. Wuthrich. Calibration of the angular dependence of the amide proton-C alpha proton coupling constants,  $3\text{JHN}\alpha$ , in a globular protein. use of  $3\text{JHN}\alpha$  for identification of helical secondary structure. *J Mol Biol*, 180:741–51, 1984.
- N.H. Pawley, J.D. Gans, and L.K. Nicholson. Factors determining the reliable description of global tumbling parameters in solution NMR. *J Biomol NMR*, 24:215–29, 2002.
- N.H. Pawley, C. Wang, S. Koide, and L.K. Nicholson. An improved method for distinguishing between anisotropic tumbling and chemical exchange in analysis of  $^{15}\text{N}$  relaxation parameters. *J Biomol NMR*, 20:149–65, 2001.
- A.R. Pickford and I.D. Campbell. NMR studies of modular protein structures and their interactions. *Chem Rev*, 104:3557–66, 2004.
- S. Präsch. *Strukturelle Charakterisierung von Protein-Komplexen in der Antitermination mittels NMR-Spektroskopie*. Diplomarbeit, Universität Bayreuth, 2004.
- W.H. Press, B.P. Flannery, S.A. Teukolsky, and W.T. Vetterling. *Numerical Recipes in C*. Cambridge University Press, New York, 6. Ausgabe, 1990.
- J.H. Prestegard, C.M. Bougault, and A.I. Kishore. Residual dipolar couplings in structure determination of biomolecules. *Chem Rev*, 104:3519–40, 2004.
- W.A. Rees, S.E. Weitzel, A. Das, and P.H. von Hippel. Regulation of the elongation-termination decision at intrinsic terminators by antitermination protein N of phage lambda. *J Mol Biol*, 273:797–813, 1997.
- W.A. Rees, S.E. Weitzel, T.D. Yager, A. Das, and P.H. von Hippel. Bacteriophage lambda N protein alone can induce transcription antitermination in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93:342–6, 1996.
- C. Renner, M. Schleicher, L. Moroder, and T.A. Holak. Practical aspects of the 2D  $^{15}\text{N}$ -[ $^1\text{H}$ ]-NOE experiment. *J Biomol NMR*, 23:23–33, 2002.
- V.A. Rhodius and S.J. Busby. Positive activation of gene expression. *Curr Opin Microbiol*, 1:152–9, 1998.
- J.P. Richardson. Rho-dependent termination and ATPases in transcript termination. *Biochim Biophys Acta*, 1577:251–260, 2002.
- J.P. Richardson. Loading Rho to terminate transcription. *Cell*, 114:157–9, 2003.

- J.W. Roberts. Termination factor for RNA synthesis. *Nature*, 224:1168–74, 1969.
- M. Rosenberg, D. Court, H. Shimatake, C. Brady, and D.L. Wulff. The relationship between function and DNA sequence in an intercistronic regulatory region in phage lambda. *Nature*, 272:414–23, 1978.
- T.J. Santangelo and J.W. Roberts. RfaH, a bacterial transcription antiterminator. *Mol Cell*, 9: 698–700, 2002.
- M.R. Sawaya, R. Prasad, S.H. Wilson, J. Kraut, and H. Pelletier. Crystal structures of human DNA polymerase beta complexed with gapped and nicked DNA: evidence for an induced fit mechanism. *Biochemistry*, 36:11205–15, 1997.
- M. Scharpf, H. Sticht, K. Schweimer, M. Boehm, S. Hoffmann, and P. Rösch. Antitermination in bacteriophage lambda. the structure of the N36 peptide-boxB RNA complex. *Eur J Biochem*, 267:2397–408, 2000.
- M.C. Schmidt and M.J. Chamberlin. Binding of Rho factor to Escherichia coli RNA polymerase mediated by NusA protein. *J Biol Chem*, 259:15000–2, 1984.
- M.C. Schmidt and M.J. Chamberlin. NusA protein of Escherichia coli is an efficient transcription termination factor for certain terminator sites. *J Mol Biol*, 195:809–18, 1987.
- J. Schultz, F. Milpetz, P. Bork, and C.P. Ponting. SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95:5857–64, 1998.
- J.M. Schurr, H.P. Babcock, and B.S. Fujimoto. A test of the model-free formulas. effects of anisotropic rotational diffusion and dimerization. *J Magn Reson B*, 105:211–24, 1994.
- K. Schweimer. *Mehrdimensionale heteronukleare NMR Spektroskopie zur Bestimmung der Strukturen des Birkenpollenallergens Bet v 1, des Guillardia theta Rubredoxins und des [2Fe-2S] Ferredoxins aus Halobacterium salinarium*. Dissertation, Universität Bayreuth, 2000.
- K. Schweimer, S. Hoffmann, F. Bauer, U. Friedrich, C. Kardinal, S.M. Feller, B. Biesinger, and H. Sticht. Structural investigation of the binding of a herpesviral protein to the SH3 domain of tyrosine kinase Lck. *Biochemistry*, 41:5120–30, 2002.
- C.D. Schwieters, J.J. Kuszewski, N. Tjandra, and G.M. Clore. The Xplor-NIH NMR molecular structure determination package. *J Magn Reson*, 160:65–73, 2003.
- K. Severinov. RNA polymerase structure-function: insights into points of transcriptional regulation. *Curr Opin Microbiol*, 3:118–25, 2000.
- A.J. Shaka, P.B. Barker, and R. Freeman. Computer-optimized decoupling scheme for wideband applications and low-level operation. *J Magn Reson*, 64:547–52, 1985.
- A.J. Shaka, J. Keeler, and R. Freeman. Evaluation of a new broadband decoupling sequence: WALTZ-16. *J Magn Reson*, 53:313–40, 1983.

- X. Shao and N.V. Grishin. Common fold in helix-hairpin-helix proteins. *Nucleic Acids Res*, 28: 2643–50, 2000.
- D.H. Shin, H.H. Nguyen, J. Jancarik, H. Yokota, R. Kim, and S.H. Kim. Crystal structure of NusA from *Thermotoga maritima* and functional implication of the N-terminal domain. *Biochemistry*, 42:13429–37, 2003.
- I. Sidorenkov, N. Komissarova, and M. Kashlev. Crucial role of the RNA:DNA hybrid in the processivity of transcription. *Mol Cell*, 2:55–64, 1998.
- S. Singh, G.E. Folkers, A.M. Bonvin, R. Boelens, R. Wechselberger, A. Niztayev, and R. Kaptein. Solution structure and DNA-binding properties of the C-terminal domain of UvrC from *E.coli*. *EMBO J*, 21:6257–66, 2002.
- M.R. Singleton, S. Scaife, and D.B. Wigley. Structural analysis of DNA replication fork reversal by RecG. *Cell*, 107:79–89, 2001.
- J.J. Skalicky, J.L. Mills, S. Sharma, and T. Szyperski. Aromatic ring-flipping in supercooled water: implications for NMR-based structural biology of proteins. *J Am Chem Soc*, 123:388–97, 2001.
- V. Sklenar, M. Piotto, R. Leppik, and V. Saudek. Gradient-tailored water suppression for  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC experiments optimized to retain full sensitivity. *J Magn Reson A*, 102(2):241–5, 1993.
- E. Skordalakes and J.M. Berger. Structure of the Rho transcription terminator: mechanism of mRNA recognition and helicase loading. *Cell*, 114:135–46, 2003.
- M. Smalla, P. Schmieder, M. Kelly, L.a.a.k. Ter, G. Krause, L. Ball, M. Wahl, P. Bork, and H. Oschkinat. Solution structure of the receptor tyrosine kinase EphB2 SAM domain and identification of two distinct homotypic interaction sites. *Protein Sci*, 8:1954–61, 1999.
- V. Sosunov, E. Sosunova, A. Mustaev, I. Bass, V. Nikiforov, and A. Goldfarb. Unified two-metal mechanism of RNA synthesis and degradation by RNA polymerase. *EMBO J*, 22:2234–44, 2003.
- D.J. States, R.A. Haberkorn, and D.J. Ruben. A two-dimensional nuclear overhauser experiment with pure absorption phase in four quadrants. *J Magn Reson*, 48:286–92, 1982.
- E. Stein, D.P. Cerretti, and T.O. Daniel. Ligand activation of ELK receptor tyrosine kinase promotes its association with Grb10 and Grb2 in vascular endothelial cells. *J Biol Chem*, 271: 23588–93, 1996.
- D. Sweetser, M. Nonet, and R.A. Young. Prokaryotic and eukaryotic RNA polymerases have homologous core subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84:1192–6, 1987.
- A. Szalewska-Palasz, B. Strzelczyk, A. Herman-Antosiewicz, G. Wegrzyn, and M.S. Thomas. Genetic analysis of bacteriophage lambdaN-dependent antitermination suggests a possible role

- for the RNA polymerase alpha subunit in facilitating specific functions of NusA and NusE. *Arch Microbiol*, 180:161–8, 2003.
- S. Talluri and G. Wagner. An optimized 3D NOESY–HSQC. *J Magn Reson B*, 112:200–5, 1996.
- S.A. Teichmann. The constraints protein-protein interactions place on sequence divergence. *J Mol Biol*, 324:399–407, 2002.
- C.N. Tennyson, H.J. Klamut, and R.G. Worton. The human dystrophin gene requires 16 hours to be transcribed and is cotranscriptionally spliced. *Nat Genet*, 9:184–90, 1995.
- C.D. Thanos, S. Faham, K.E. Goodwill, D. Cascio, M. Phillips, and J.U. Bowie. Monomeric structure of the human EphB2 sterile alpha motif domain. *J Biol Chem*, 274:37301–6, 1999.
- M.M. Thayer, H. Ahern, D. Xing, R.P. Cunningham, and J.A. Tainer. Novel DNA binding motifs in the DNA repair enzyme endonuclease III crystal structure. *EMBO J*, 14:4108–20, 1995.
- J.D. Thompson, D.G. Higgins, and T.J. Gibson. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, 22(22):4673–80, 1994.
- N. Tjandra, D.S. Garrett, A.M. Gronenborn, A. Bax, and G.M. Clore. Defining long range order in NMR structure determination from the dependence of heteronuclear relaxation times on rotational diffusion anisotropy. *Nat Struct Biol*, 4(6):443–9, 1997.
- N. Tjandra, S. Grzesiek, and A. Bax. Magnetic field dependence of nitrogen–proton J splittings in <sup>15</sup>N–enriched human ubiquitin resulting from relaxation interference and residual dipolar couplings. *J Am Chem Soc*, 118:6264–72, 1996.
- J.R. Tolman, H.M. Al-Hashimi, L.E. Kay, and J.H. Prestegard. Structural and dynamic analysis of residual dipolar coupling data for proteins. *J Am Chem Soc*, 123:1416–24, 2001.
- M. Torres, J.M. Balada, M. Zellars, C. Squires, and C.L. Squires. In vivo effect of NusB and NusG on rRNA transcription antitermination. *J Bacteriol*, 186:1304–10, 2004.
- I. Touloukhonov, I. Artsimovitch, and R. Landick. Allosteric control of RNA polymerase by a site that contacts nascent RNA hairpins. *Science*, 292:730–3, 2001.
- A. Tsugawa, M. Saito, D.L. Court, and Y. Nakamura. nusa amber mutation that causes temperature-sensitive growth of Escherichia coli. *J Bacteriol*, 170:908–15, 1988.
- T.S. Ulmer, J.M. Werner, and I.D. Campbell. SH3-SH2 domain orientation in src kinases: NMR studies of fyn. *Structure (Camb)*, 10:901–11, 2002.
- S.M. Uptain, C.M. Kane, and M.J. Chamberlin. Basic mechanisms of transcript elongation and its regulation. *Annu Rev Biochem*, 66:117–72, 1997.
- F.J.M. van de Ven. *Multidimensional NMR in Liquids*. VCH, New York, 1995.

- M.R. van Gilst and P.H. von Hippel. Assembly of the N-dependent antitermination complex of phage lambda: NusA and RNA bind independently to different unfolded domains of the N protein. *J Mol Biol*, 274:160–73, 1997.
- M.R. van Gilst and P.H. von Hippel. Quantitative dissection of transcriptional control system: N-dependent antitermination complex of phage lambda as regulatory paradigm. *Methods Enzymol*, 323:1–31, 2000.
- E. Vieu and A.R. Rahmouni. Dual role of boxB RNA motif in the mechanisms of termination/antitermination at the lambda tR1 terminator revealed in vivo. *J Mol Biol*, 339:1077–87, 2004.
- D. Voet and J.G. Voet. *Biochemistry*. John Wiley and Sons, New York, 1995.
- U. Vogel and K.F. Jensen. The RNA chain elongation rate in *Escherichia coli* depends on the growth rate. *J Bacteriol*, 176:2807–13, 1994.
- U. Vogel and K.F. Jensen. NusA is required for ribosomal antitermination and for modulation of the transcription elongation rate of both antiterminated RNA and mRNA. *J Biol Chem*, 272:12265–71, 1997.
- P.H. von Hippel. An integrated model of the transcription complex in elongation, termination, and editing. *Science*, 281:660–5, 1998.
- P.H. von Hippel and Z. Pasman. Reaction pathways in transcript elongation. *Biophys Chem*, 101:401–23, 2002.
- G.W. Vuister and A. Bax. Resolution enhancement and spectral editing of uniformly  $^{13}\text{C}$ -enriched proteins by homonuclear broadband  $^{13}\text{C}$  decoupling. *J Magn Reson*, 98:428–35, 1992.
- G.W. Vuister and A. Bax. Quantitative J correlation: a new approach for measuring homonuclear three-bond J(hnh $\alpha$ ) coupling constants in  $^{15}\text{N}$ -enriched proteins. *J Am Chem Soc*, 115(17):7772–7, 1993.
- G.W. Vuister, G.M. Clore, A.M. Gronenborn, R. Powers, D.S. Garrett, R. Tschudin, and A. Bax. Increased resolution and improved spectral quality in four-dimensional  $^{13}\text{C}/^{13}\text{C}$ -separated HMQC-NOESY-HMQC spectra using pulsed field gradients. *J Magn Reson B*, 101(2):210–3, 1993.
- R.A. Weisberg and M.E. Gottesman. Processive antitermination. *J Bacteriol*, 181:359–67, 1999.
- D.E. Wemmer and P.G. Williams. Use of nuclear magnetic resonance in probing ligand-macromolecule interactions. *Methods Enzymol*, 239:739–67, 1994.
- W. Whalen, B. Ghosh, and A. Das. NusA protein is necessary and sufficient in vitro for phage lambda N gene product to suppress a Rho-independent terminator placed downstream of nutL.

- Proc Natl Acad Sci U S A*, 85:2494–8, 1988.
- S.S. Wijmenga, E. Steensma, and C.P.M Mierlo. Doubly sensitivity-enhanced 3D-HCCH-TOCSY of  $^{13}\text{C}$ -labeled proteins in H<sub>2</sub>O using heteronuclear cross polarization and pulsed field gradients. *J Magn Reson*, 124:459–67, 1997.
- D.K. Wilkins, S.B. Grimshaw, V. Receveur, C.M. Dobson, J.A. Jones, and L.J. Smith. Hydrodynamic radii of native and denatured proteins measured by pulse field gradient NMR techniques. *Biochemistry*, 38:16424–31, 1999.
- K.S. Wilson and P.H. von Hippel. Transcription termination at intrinsic terminators: the role of the RNA hairpin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92:8793–7, 1995.
- D.S. Wishart and B.D. Sykes. Chemical shifts as a tool for structure determination. *Methods Enzymol*, 239:363–92, 1994.
- M. Wittekind and L. Mueller. HNCACB, a high-sensitivity 3D NMR experiment to correlate amide-proton and nitrogen resonances with the alpha- and beta-carbon resonances in proteins. *J Magn Reson B*, 101:201–5, 1993.
- M. Worbs, G.P. Bourenkov, H.D. Bartunik, R. Huber, and M.C. Wahl. An extended RNA binding surface through arrayed S1 and KH domains in transcription factor NusA. *Mol Cell*, 7:1177–89, 2001.
- K. Wüthrich. *NMR of Proteins and Nucleic Acids*. John Wiley and Sons, New York, 1986.
- P. Wu, C. Qiu, A. Sohail, X. Zhang, A.S. Bhagwat, and X. Cheng. Mismatch repair in methylated DNA. structure and activity of the mismatch-specific thymine glycosylase domain of methyl-CpG-binding protein MBD4. *J Biol Chem*, 278:5285–91, 2003.
- T. Xia, H.C. Becker, C. Wan, A. Frankel, R.W. Roberts, and A.H. Zewail. The RNA-protein complex: direct probing of the interfacial recognition dynamics and its correlation with biological functions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100:8119–23, 2003.
- W.S. Yarnell and J.W. Roberts. Mechanism of intrinsic transcription termination and antitermination. *Science*, 284:611–5, 1999.
- H. Yin, I. Artsimovitch, R. Landick, and J. Gelles. Nonequilibrium mechanism of transcription termination from observations of single RNA polymerase molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96:13124–9, 1999.
- T. Yoshida, S. Oka, S. Uchiyama, H. Nakano, T. Kawasaki, T. Ohkubo, and Y. Kobayashi. Characteristic domain motion in the ribosome recycling factor revealed by  $^{15}\text{N}$  NMR relaxation experiments and molecular dynamics simulations. *Biochemistry*, 42:4101–7, 2003.
- X. Yu, T. Horiguchi, K. Shigesada, and E.H. Egelman. Three-dimensional reconstruction of transcription termination factor Rho: orientation of the N-terminal domain and visualization

- of an RNA-binding site. *J Mol Biol*, 299:1279–87, 2000.
- G. Zhang, E.A. Campbell, L. Minakhin, C. Richter, K. Severinov, and S.A. Darst. Crystal structure of *Thermus aquaticus* core RNA polymerase at 3.3 Å resolution. *Cell*, 98:811–24, 1999.
- W. Zhang, T.E. Smithgall, and W.H. Gmeiner. Three-dimensional structure of the Hck SH2 domain in solution. *J Biomol NMR*, 10:263–72, 1997.
- Y. Zhang and M.M. Hanna. NusA changes the conformation of *Escherichia coli* RNA polymerase at the binding site for the 3' end of the nascent RNA. *J Bacteriol*, 176:1787–9, 1994.
- C. Zheng and D.I. Friedman. Reduced Rho-dependent transcription termination permits NusA-independent growth of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91:7543–7, 1994.
- Y. Zhou, T.F. Mah, J. Greenblatt, and D.I. Friedman. Evidence that the KH RNA-binding domains influence the action of the *E.coli* NusA protein. *J Mol Biol*, 318:1175–88, 2002.
- G. Zhu and A. Bax. Improved linear prediction for truncated signals of known phase. *J Magn Reson*, 90:405–10, 1990.
- E.R. Zuiderweg. Mapping protein-protein interactions in solution by NMR spectroscopy. *Biochemistry*, 41:1–7, 2002.



## ANHANG A

### Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$ CTD	$\alpha$ Untereinheit der RNA Polymerase
$\lambda$ N	N Protein des Bakteriophagen $\lambda$
1D	eindimensional
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
4D	vierdimensional
Abb.	Abbildung
ATC	$\lambda$ N-abhängiger Antiterminationskomplex
ATP	Adenosintriphosphat
AR1	<i>acidic repeat 1</i> ; entspricht NusA(353–416)
AR2	<i>acidic repeat 2</i> ; entspricht NusA(431–490)
ARM	<i>arginine rich motif</i>
BMRB	<i>BioMagResBank</i>
C	Cytosin
CSA	<i>chemical shift anisotropy</i>
CSI	<i>chemical shift index</i>
COSY	<i>correlated spectroscopy</i>
ct-HSQC	<i>constant time heteronuclear single quantum coherence</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
EMSA	<i>electrophoretic mobility shift assay</i>
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FID	<i>free induction decay</i>
GhG-Motiv	Glycin — hydrophobe Aminosäure — Glycin – Motiv

Gl.	Gleichung
HhH–Motiv	<i>helix–hairpin–helix–Motiv</i>
HSQC	<i>heteronuclear single quantum coherence</i>
HMQC	<i>heteronuclear multi quantum coherence</i>
kDa	Kilodalton
KH	<i>K homology</i>
<i>M.tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
nut	N utilization
Nus	<i>N utilization substance</i>
NusACTD	carboxyterminale Domäne des NusA–Proteins
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NOE	<i>nuclear overhauser enhancement</i>
NOESY	<i>nuclear overhauser enhancement spectroscopy</i>
PDB	<i>protein data bank</i>
ppm	<i>parts per million</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RNAP	RNA Polymerase
rNTP	Ribonukleosidtriphosphat
RMSD	<i>root mean square deviation</i>
RMSD <sub>bb</sub>	<i>root mean square deviation of heavy backbone atoms</i>
RSDM	<i>reduced spectral density mapping</i>
rut	<i>rho utilization</i>
s.	siehe
S.	Seite
Tab.	Tabelle
TEC	<i>transcription elongation complex</i>
<i>T.aquaticus</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
<i>T.maritima</i>	<i>Thermotoga maritima</i>
tsp	<i>transcription stop point</i>
z.B.	zum Beispiel

## ANHANG B

### Rohdaten

**B.0.4. Skalare  ${}^3J(\text{H}^N\text{H}^\alpha)$ -Kopplungen.** Die Kopplungen sind in der Reihenfolge Sequenzposition und skalare Kopplung  ${}^3J(\text{H}^N\text{H}^\alpha)$  (in Hz) angegeben.

353	4.40	386	9.88	421	6.64	461	7.89
356	3.77	387	3.50	422	4.50	462	6.67
357	4.07	389	2.98	423	7.03	464	2.79
358	4.33	390	2.79	424	7.07	465	4.81
360	5.11	391	6.27	425	7.03	466	6.93
362	8.20	392	7.30	426	7.42	468	9.08
363	9.07	393	4.63	429	7.81	469	8.18
364	7.21	394	6.99	431	6.64	471	3.22
365	9.99	395	6.76	432	3.12	473	8.59
367	2.95	398	8.00	433	5.22	474	8.05
368	5.23	399	8.81	434	6.51	475	3.39
369	5.62	402	5.35	435	3.84	476	3.78
370	3.14	403	5.03	437	5.77	478	3.47
371	4.38	404	4.03	438	2.30	480	4.36
372	4.86	408	4.85	440	8.56	482	3.92
373	3.67	409	4.97	441	8.92	483	4.42
374	4.89	410	3.91	443	4.32	484	4.20
375	4.46	411	3.97	444	4.57	486	3.57
376	7.48	413	3.91	446	5.98	487	4.01
379	9.88	414	3.66	450	4.08	488	7.45
380	9.23	415	5.24	451	9.70	489	6.66
381	4.99	416	5.31	453	8.75	490	9.07
382	3.37	417	4.32	456	3.63	491	8.50
383	4.93	419	5.80	457	3.68		
384	5.77	420	4.81	458	4.72		

**B.0.5. Dipolare Restkopplungen.** Die Kopplungen sind in der Reihenfolge Sequenzposition, skalare Kopplung  ${}^1J(\text{H}^N\text{N})$ , Fehler der skalaren Kopplung, Gesamtkopplung  ${}^1J(\text{H}^N\text{N}) + {}^1D(\text{H}^N\text{N})$ , Fehler der Gesamtkopplung, dipolare Restkopplung  ${}^1D(\text{H}^N\text{N})$  und Fehler der dipolaren Restkopplung (jeweils in Hz) angegeben.

340	-93.34	0.01	-92.73	0.02	0.60	0.03
341	-92.76	0.03	-93.49	0.02	-0.73	0.05
342	-93.59	0.03	-94.73	0.03	-1.14	0.06
344	-93.64	0.02	-96.14	0.03	-2.50	0.05
345	-93.57	0.03	-98.47	0.03	-4.90	0.06
346	-94.23	0.02	-99.55	0.02	-5.32	0.04
347	-93.54	0.01	-98.98	0.02	-5.44	0.03
349	-93.76	0.01	-100.12	0.01	-6.36	0.02
350	-94.33	0.02	-101.59	0.02	-7.25	0.04
351	-93.93	0.01	-98.52	0.02	-4.59	0.03
353	-93.83	0.01	-102.00	0.01	-8.17	0.02
354	-94.40	0.01	-103.97	0.02	-9.56	0.03

356	-93.29	0.01	-101.58	0.02	-8.28	0.03
357	-94.17	0.01	-104.78	0.02	-10.61	0.03
360	-94.08	0.01	-104.88	0.02	-10.79	0.03
362	-93.14	0.01	-101.88	0.02	-8.73	0.03
363	-92.81	0.01	-102.78	0.01	-9.97	0.02
364	-93.54	0.01	-85.60	0.01	7.94	0.02
365	-91.10	0.01	-84.76	0.02	6.35	0.03
367	-92.71	0.01	-103.15	0.02	-10.44	0.03
368	-94.51	0.01	-106.06	0.01	-11.56	0.02
369	-93.70	0.01	-101.67	0.01	-7.97	0.02
370	-94.41	0.01	-105.91	0.01	-11.50	0.02
371	-92.78	0.01	-102.57	0.02	-9.79	0.03
372	-93.47	0.01	-104.84	0.02	-11.37	0.03
373	-94.31	0.01	-104.69	0.02	-10.38	0.03
374	-93.92	0.01	-103.98	0.02	-10.06	0.03
375	-94.59	0.01	-105.28	0.01	-10.69	0.02
377	-92.88	0.01	-105.21	0.01	-12.34	0.02
378	-94.31	0.01	-88.01	0.02	6.31	0.03
379	-91.09	0.01	-101.88	0.01	-10.80	0.02
380	-93.36	0.01	-90.73	0.02	2.62	0.03
381	-93.14	0.01	-84.25	0.01	8.89	0.02
382	-92.81	0.01	-92.41	0.01	0.39	0.02
383	-94.50	0.01	-103.40	0.01	-8.90	0.02
384	-93.47	0.01	-91.00	0.01	2.47	0.02
385	-93.86	0.01	-87.12	0.03	6.74	0.04
386	-91.63	0.01	-100.26	0.02	-8.64	0.03
387	-94.64	0.01	-105.88	0.02	-11.24	0.03
389	-93.12	0.01	-95.49	0.02	-2.38	0.03
390	-93.61	0.02	-97.71	0.02	-4.11	0.04
391	-92.79	0.01	-78.14	0.01	14.64	0.02
392	-92.71	0.01	-95.78	0.01	-3.08	0.02
393	-93.48	0.01	-97.20	0.02	-3.72	0.03
394	-93.50	0.01	-78.93	0.02	14.57	0.03
395	-93.16	0.01	-87.15	0.02	6.01	0.03
396	-94.14	0.01	-103.95	0.02	-9.81	0.03
397	-93.53	0.01	-92.80	0.02	0.73	0.03
398	-94.50	0.01	-102.88	0.02	-8.39	0.03
399	-93.13	0.01	-90.71	0.01	2.42	0.02
400	-92.13	0.01	-74.89	0.02	17.23	0.03
403	-93.81	0.01	-77.41	0.01	16.41	0.02
404	-94.22	0.01	-76.67	0.02	17.54	0.03
408	-93.74	0.01	-75.10	0.01	18.64	0.02
409	-94.17	0.01	-94.53	0.01	-0.36	0.02
410	-94.79	0.02	-75.81	0.01	18.98	0.03
414	-94.44	0.01	-80.33	0.01	14.11	0.02
415	-94.33	0.01	-77.97	0.02	16.36	0.03
417	-93.19	0.01	-76.26	0.01	16.94	0.02
418	-94.02	0.01	-82.63	0.02	11.40	0.03
419	-93.61	0.01	-78.92	0.01	14.69	0.02
421	-93.49	0.02	-89.43	0.03	4.07	0.05
424	-93.26	0.02	-92.01	0.02	1.26	0.04
425	-93.46	0.03	-94.68	0.03	-1.23	0.06
426	-94.19	0.02	-90.90	0.02	3.29	0.04
429	-93.41	0.02	-97.16	0.02	-3.75	0.04
431	-94.51	0.01	-96.30	0.02	-1.80	0.03
432	-93.23	0.03	-95.11	0.03	-1.88	0.06
433	-94.11	0.02	-98.65	0.02	-4.54	0.04
434	-92.75	0.01	-89.33	0.01	3.42	0.02
435	-93.44	0.01	-95.59	0.02	-2.15	0.03

437	-94.87	0.01	-90.46	0.02	4.41	0.03
438	-94.04	0.02	-89.25	0.02	4.79	0.04
439	-93.59	0.02	-97.80	0.02	-4.21	0.04
440	-93.72	0.02	-95.49	0.02	-1.76	0.04
441	-92.97	0.01	-98.40	0.01	-5.42	0.02
443	-93.92	0.02	-99.70	0.04	-5.79	0.06
444	-94.36	0.02	-99.18	0.01	-4.82	0.03
446	-94.86	0.02	-103.16	0.02	-8.30	0.04
447	-94.36	0.01	-99.03	0.02	-4.67	0.03
450	-94.63	0.02	-101.34	0.02	-6.71	0.04
451	-92.41	0.01	-95.37	0.01	-2.95	0.02
452	-93.56	0.01	-92.56	0.02	1.00	0.03
453	-93.09	0.01	-93.03	0.02	0.06	0.03
454	-91.88	0.01	-97.76	0.02	-5.88	0.03
455	-93.03	0.01	-98.96	0.02	-5.92	0.03
456	-93.15	0.01	-97.71	0.01	-4.57	0.02
457	-93.55	0.01	-93.25	0.02	0.30	0.03
458	-94.46	0.01	-94.71	0.02	-0.24	0.03
461	-93.46	0.01	-87.14	0.03	6.32	0.04
462	-94.31	0.01	-101.79	0.02	-7.48	0.03
463	-92.40	0.01	-84.41	0.01	7.99	0.02
464	-93.20	0.01	-82.20	0.01	11.00	0.02
465	-93.82	0.02	-88.79	0.03	5.03	0.05
466	-93.32	0.02	-85.60	0.02	7.71	0.04
467	-92.35	0.01	-80.65	0.01	11.70	0.02
468	-93.29	0.02	-95.63	0.02	-2.34	0.04
469	-93.60	0.01	-96.32	0.02	-2.73	0.03
471	-94.07	0.01	-87.64	0.02	6.43	0.03
472	-93.62	0.01	-97.50	0.02	-3.88	0.03
473	-93.91	0.01	-93.14	0.02	0.78	0.03
474	-92.55	0.01	-97.83	0.02	-5.28	0.03
475	-93.89	0.02	-97.67	0.02	-3.78	0.04
476	-93.15	0.02	-96.25	0.02	-3.11	0.04
477	-93.93	0.01	-92.79	0.01	1.14	0.02
478	-94.36	0.02	-98.02	0.02	-3.66	0.04
479	-94.85	0.01	-99.51	0.02	-4.66	0.03
480	-94.70	0.02	-96.03	0.03	-1.33	0.05
482	-93.37	0.01	-97.68	0.01	-4.31	0.02
483	-93.83	0.01	-98.39	0.02	-4.55	0.03
484	-94.70	0.02	-94.22	0.03	0.47	0.05
486	-94.31	0.01	-98.37	0.02	-4.06	0.03
487	-94.65	0.02	-97.06	0.02	-2.41	0.04
488	-93.02	0.01	-91.75	0.02	1.27	0.03
489	-92.85	0.01	-95.75	0.01	-2.91	0.02
490	-93.06	0.01	-98.69	0.02	-5.63	0.03
491	-92.63	0.02	-92.30	0.02	0.33	0.04
492	-94.34	0.03	-92.30	0.03	2.04	0.06
493	-93.53	0.05	-95.33	0.03	-1.81	0.08
495	-93.07	0.06	-93.05	0.06	0.03	0.12

**B.0.6. Wasserstoffbrücken.** Für folgende Reste konnte ein verlangsamer Amidprotonenaustausch beobachtet werden:

A354, D357, T360, K361, Y362, I365, F369, A370, T371, V372, V374, G377, F378, T380, E382, A385, Y386, L393, I395, L398, V403, E404, L406, E408, R409, A410, L414, A415, L434, L435, N436, L437, D441, L444, F446, A449, A450, R451, G452, V453, T455, A460, E461, N462, G463, D466, L467, A468, A478, G479, A480, I482, M483, A484, A485, I488, C489, W490

**B.0.7.  $^{15}\text{N}$ -Relaxationsdaten.** Angegeben sind die Sequenzposition, die longitudinale Relaxationsrate und deren Fehler, die transversale Relaxationsrate und deren Fehler (jeweils in  $\text{s}^{-1}$ ) sowie der  $\{^1\text{H}\}$ - $^{15}\text{N}$  heteronukleare NOE und dessen Fehler (dimensionslos).

**B.0.7.1. 600 MHz (Probe 1).**

340	1.230	0.019	2.920	0.063	-0.502	0.039
341	1.379	0.026	3.987	0.220	-0.273	0.006
342	1.501	0.010	4.228	0.053	0.106	0.008
344	1.502	0.012	6.301	0.218	0.363	0.018
345	1.501	0.011	7.551	0.106	0.423	0.029
346	1.522	0.007	7.460	0.111	0.485	0.025
347	1.492	0.011	8.301	0.161	0.361	0.001
349	1.490	0.014	9.436	0.244	0.464	0.002
351	1.416	0.017	10.997	0.117	0.454	0.003
353	1.458	0.010	11.296	0.124	0.693	0.028
354	1.448	0.018	11.835	0.121	0.764	0.003
356	1.301	0.024	12.591	0.155	0.742	0.052
357	1.380	0.012	13.224	0.171	0.779	0.020
360	1.360	0.019	13.665	0.260	0.725	0.068
362	1.297	0.009	15.034	0.163	0.710	0.035
363	1.264	0.030	15.832	0.223	0.771	0.104
364	1.235	0.012	14.408	0.105	0.654	0.064
365	1.160	0.019	17.360	0.297	0.760	0.037
367	1.381	0.010	11.009	0.117	0.790	0.025
368	1.363	0.016	10.877	0.153	0.726	0.010
369	1.357	0.036	11.348	0.120	0.705	0.012
370	1.451	0.010	12.618	0.372	0.803	0.075
371	1.417	0.020	11.002	0.127	0.789	0.011
372	1.390	0.014	11.200	0.155	0.795	0.017
373	1.422	0.021	15.120	0.194	0.733	0.050
374	1.451	0.016	11.906	0.237	0.699	0.016
375	1.427	0.016	11.988	0.141	0.770	0.030
377	1.362	0.018	14.462	0.194	0.698	0.049
379	1.236	0.015	10.560	0.167	0.666	0.006
380	1.249	0.025	13.972	0.247	0.743	0.058
381	1.235	0.028	13.720	0.204	0.754	0.012
382	1.294	0.016	12.922	0.142	0.718	0.017
383	1.357	0.026	12.485	0.180	0.797	0.015
384	1.277	0.012	14.189	0.182	0.760	0.067
385	1.274	0.011	15.703	0.216	0.741	0.001
386	1.300	0.017	14.034	0.167	0.658	0.011
387	1.348	0.012	11.317	0.184	0.801	0.049
389	1.321	0.013	13.969	0.294	0.658	0.084
390	1.335	0.017	15.211	0.084	0.724	0.061
391	1.248	0.013	15.665	0.195	0.596	0.010
392	1.281	0.012	13.245	0.246	0.679	0.055
393	1.322	0.012	14.760	0.201	0.644	0.027
394	1.204	0.012	15.906	0.126	0.732	0.063
395	1.226	0.010	12.331	0.189	0.709	0.002
396	1.253	0.013	15.362	0.198	0.705	0.021
397	1.210	0.017	10.272	0.136	0.537	0.017
398	1.284	0.011	10.439	0.111	0.677	0.035
399	1.103	0.015	9.366	0.089	0.574	0.014
400	1.173	0.020	14.054	0.289	0.703	0.010
402	1.183	0.011	16.051	0.188	0.715	0.012
403	1.255	0.024	14.242	0.300	0.727	0.049

404	1.247	0.013	14.876	0.117	0.664	0.007
408	1.200	0.011	14.898	0.117	0.757	0.022
409	1.186	0.027	17.278	0.286	0.811	0.011
410	1.231	0.013	14.941	0.219	0.860	0.054
411	1.210	0.018	14.818	0.193	0.862	0.080
414	1.202	0.010	14.721	0.169	0.701	0.002
415	1.203	0.023	14.357	0.193	0.687	0.011
416	1.102	0.017	15.908	0.187	0.687	0.021
417	1.199	0.031	14.172	0.420	0.644	0.062
419	1.209	0.018	13.076	0.085	0.545	0.032
421	1.246	0.010	8.761	0.100	0.267	0.041
424	1.328	0.008	5.681	0.046	0.162	0.028
425	1.395	0.007	4.842	0.071	0.171	0.075
426	1.402	0.011	3.748	0.060	0.132	0.012
429	1.438	0.009	6.254	0.116	0.247	0.014
431	1.667	0.014	10.149	0.116	0.758	0.005
432	1.647	0.010	8.459	0.076	0.737	0.008
433	1.639	0.018	10.398	0.078	0.669	0.040
434	1.502	0.009	9.120	0.088	0.624	0.072
435	1.598	0.021	12.662	0.157	0.644	0.027
436	1.688	0.018	12.519	0.108	0.629	0.015
437	1.567	0.028	11.837	0.102	0.679	0.038
438	1.566	0.017	12.859	0.097	0.837	0.014
439	1.573	0.016	8.421	0.122	0.756	0.024
440	1.656	0.010	8.718	0.074	0.764	0.003
441	1.429	0.011	8.741	0.124	0.600	0.040
443	1.638	0.012	8.599	0.057	0.722	0.034
444	1.674	0.041	8.665	0.225	0.765	0.004
446	1.694	0.025	10.097	0.101	0.819	0.034
447	1.736	0.016	8.738	0.145	0.485	0.025
450	1.729	0.017	8.973	0.088	0.782	0.094
451	1.627	0.024	9.089	0.091	0.730	0.020
452	1.626	0.026	8.954	0.130	0.722	0.047
453	1.658	0.024	12.035	0.149	0.718	0.037
455	1.632	0.013	8.785	0.167	0.711	0.009
456	1.718	0.025	9.299	0.178	0.692	0.000
457	1.641	0.010	9.203	0.110	0.762	0.027
458	1.692	0.014	9.821	0.092	0.733	0.011
461	1.561	0.012	11.265	0.134	0.700	0.006
462	1.727	0.015	8.682	0.147	0.748	0.017
463	1.487	0.013	12.743	0.096	0.779	0.057
464	1.470	0.013	10.329	0.138	0.725	0.069
465	1.580	0.014	11.464	0.091	0.689	0.045
466	1.505	0.012	10.574	0.112	0.715	0.004
467	1.445	0.012	11.809	0.126	0.650	0.015
468	1.629	0.008	8.752	0.172	0.615	0.003
469	1.591	0.010	9.646	0.052	0.619	0.034
471	1.520	0.007	13.336	0.149	0.613	0.050
472	1.624	0.021	8.809	0.144	0.709	0.004
474	1.474	0.013	7.412	0.045	0.519	0.034
475	1.716	0.012	8.186	0.095	0.692	0.027
476	1.689	0.013	8.723	0.114	0.786	0.019
478	1.792	0.011	8.893	0.209	0.702	0.040
479	1.743	0.026	11.291	0.157	0.694	0.067
480	1.776	0.010	9.353	0.117	0.686	0.060
482	1.734	0.021	9.084	0.157	0.738	0.020
483	1.735	0.013	10.864	0.152	0.697	0.035
484	1.742	0.012	9.099	0.087	0.780	0.024
486	1.702	0.025	9.508	0.084	0.780	0.069

487	1.717	0.037	9.414	0.159	0.740	0.069
488	1.622	0.021	9.242	0.100	0.702	0.001
489	1.661	0.022	10.201	0.166	0.745	0.018
490	1.652	0.017	8.794	0.106	0.680	0.004
491	1.552	0.009	6.709	0.064	0.483	0.012
492	1.470	0.009	3.751	0.024	0.050	0.000
493	1.439	0.008	2.519	0.086	-0.080	0.005
495	0.789	0.004	0.817	0.026	-0.844	0.018

### B.0.7.2. 400 MHz (Probe 2).

340	1.421	0.018	2.804	0.201	-0.866	0.049
342	1.817	0.016	3.677	0.067	-0.393	0.037
347	2.119	0.032	7.626	0.147	0.272	0.003
349	2.245	0.042	7.460	0.343	0.471	0.030
351	2.179	0.018	8.928	0.195	0.457	0.078
357	2.288	0.040	12.254	0.255	0.678	0.026
360	2.179	0.030	11.204	0.297	0.635	0.105
362	2.113	0.033	13.484	0.222	0.571	0.094
363	2.118	0.025	13.513	0.456	0.616	0.053
364	2.041	0.022	12.342	0.127	0.607	0.077
365	1.828	0.047	15.393	0.472	0.679	0.085
367	2.290	0.030	10.293	0.253	0.685	0.013
368	2.169	0.034	9.936	0.184	0.611	0.033
369	2.087	0.017	9.943	0.114	0.598	0.032
371	2.301	0.040	10.356	0.340	0.689	0.107
372	2.317	0.044	10.343	0.181	0.625	0.047
373	2.235	0.047	12.969	0.325	0.643	0.077
374	2.524	0.023	9.880	0.341	0.587	0.075
375	2.304	0.029	10.751	0.092	0.671	0.099
377	2.221	0.039	10.806	0.247	0.593	0.134
379	2.011	0.068	9.032	0.476	0.662	0.092
380	2.004	0.032	12.490	0.358	0.679	0.116
381	2.009	0.058	11.956	0.485	0.651	0.121
382	1.993	0.032	11.574	0.231	0.699	0.162
383	2.231	0.053	12.837	0.371	0.676	0.003
384	2.084	0.036	12.659	0.176	0.485	0.022
386	2.115	0.040	12.614	0.312	0.636	0.075
389	2.105	0.026	11.054	0.251	0.653	0.098
390	2.183	0.032	12.259	0.218	0.615	0.030
391	1.977	0.025	14.012	0.321	0.518	0.079
392	2.128	0.054	11.378	0.151	0.515	0.104
394	2.004	0.025	13.492	0.223	0.477	0.015
395	1.976	0.027	11.966	0.299	0.611	0.005
396	1.989	0.031	11.345	0.090	0.555	0.007
397	1.886	0.024	8.966	0.113	0.536	0.057
399	1.724	0.025	8.556	0.187	0.440	0.089
400	1.969	0.061	12.977	0.431	0.617	0.168
403	2.122	0.033	12.927	0.406	0.747	0.053
404	2.042	0.024	13.302	0.363	0.598	0.109
408	1.952	0.050	13.053	0.252	0.552	0.007
410	2.046	0.049	13.794	0.285	0.689	0.028
415	2.015	0.033	13.795	0.223	0.692	0.219
416	1.857	0.021	14.558	0.189	0.568	0.007
421	1.782	0.016	7.952	0.096	0.164	0.031



424	1.692	0.017	5.257	0.164	-0.291	0.020
426	1.709	0.018	3.447	0.054	-0.337	0.060
429	2.179	0.018	6.592	0.084	0.219	0.025
431	2.544	0.059	8.116	0.207	0.670	0.065
433	2.421	0.047	8.658	0.167	0.680	0.056
434	2.284	0.052	8.845	0.249	0.571	0.033
436	2.505	0.049	10.400	0.203	0.494	0.026
437	2.400	0.033	9.097	0.166	0.697	0.022
438	2.450	0.037	10.698	0.205	0.603	0.134
439	2.385	0.062	7.717	0.078	0.699	0.070
441	2.097	0.031	6.801	0.173	0.621	0.031
443	2.410	0.033	7.777	0.096	0.541	0.029
450	2.647	0.049	8.827	0.103	0.595	0.020
451	2.640	0.054	8.362	0.236	0.559	0.065
453	2.555	0.054	9.138	0.134	0.535	0.016
456	2.840	0.089	9.062	0.287	0.790	0.261
458	2.585	0.042	9.203	0.114	0.696	0.001
461	2.346	0.043	9.840	0.096	0.706	0.008
462	2.577	0.035	8.502	0.157	0.546	0.039
463	2.280	0.040	9.580	0.169	0.565	0.051
464	2.223	0.041	9.431	0.163	0.669	0.004
465	2.351	0.034	10.339	0.107	0.558	0.065
466	2.435	0.062	10.284	0.350	0.514	0.009
467	2.136	0.029	11.210	0.376	0.655	0.134
468	2.468	0.070	8.069	0.091	0.588	0.126
469	2.348	0.029	8.871	0.107	0.645	0.059
471	2.191	0.032	11.705	0.154	0.530	0.126
472	2.391	0.048	7.997	0.233	0.567	0.013
474	2.065	0.029	6.470	0.117	0.404	0.088
475	2.560	0.031	7.985	0.163	0.693	0.026
478	2.618	0.066	8.528	0.135	0.690	0.028
479	2.523	0.068	8.859	0.193	0.539	0.139
480	2.639	0.036	8.582	0.136	0.600	0.067
483	2.674	0.052	10.091	0.395	0.590	0.042
484	2.622	0.048	9.239	0.138	0.671	0.121
487	2.750	0.035	9.689	0.130	0.701	0.023
488	2.526	0.068	8.813	0.135	0.540	0.086
489	2.683	0.107	9.568	0.204	0.666	0.055
490	2.647	0.068	8.694	0.294	0.547	0.130
491	2.284	0.021	6.472	0.123	0.396	0.019
492	1.809	0.016	3.720	0.059	-0.239	0.035
495	0.826	0.006	1.623	0.080	-1.368	0.055

### B.0.7.3. 600 MHz (Probe 2).

340	1.214	0.011	2.910	0.106	-0.459	0.006
342	1.488	0.010	3.646	0.076	-0.074	0.003
345	1.535	0.011	7.133	0.161	0.337	0.013
347	1.523	0.011	7.658	0.047	0.377	0.019
349	1.493	0.045	9.517	0.513	0.519	0.065
351	1.451	0.015	9.495	0.134	0.504	0.023
354	1.464	0.018	11.838	0.197	0.665	0.055
357	1.398	0.011	13.517	0.230	0.763	0.030
358	1.304	0.014	13.298	0.247	0.699	0.029
360	1.350	0.016	13.654	0.187	0.758	0.066

361	1.372	0.021	12.543	0.507	0.723	0.024
362	1.316	0.015	16.829	0.304	0.723	0.065
363	1.291	0.019	17.966	0.417	0.790	0.059
364	1.251	0.011	15.377	0.274	0.643	0.013
365	1.169	0.012	19.286	0.661	0.712	0.048
367	1.419	0.011	11.300	0.204	0.710	0.056
368	1.336	0.013	10.900	0.126	0.703	0.027
369	1.354	0.007	11.752	0.140	0.678	0.049
370	1.447	0.016	13.486	0.502	0.738	0.057
371	1.397	0.010	10.894	0.206	0.782	0.057
372	1.396	0.018	11.025	0.172	0.729	0.020
373	1.417	0.016	16.576	0.351	0.748	0.026
374	1.484	0.024	12.309	0.255	0.689	0.039
375	1.453	0.019	11.891	0.224	0.767	0.028
376	1.336	0.009	14.341	0.277	0.698	0.039
377	1.358	0.011	13.706	0.316	0.719	0.038
379	1.323	0.021	10.861	0.184	0.609	0.054
380	1.247	0.016	15.684	0.264	0.754	0.039
381	1.246	0.020	13.392	0.185	0.813	0.026
382	1.312	0.018	13.474	0.252	0.784	0.022
383	1.302	0.009	13.826	0.184	0.742	0.009
384	1.266	0.016	15.572	0.249	0.701	0.020
386	1.323	0.015	15.912	0.258	0.680	0.049
387	1.343	0.010	11.417	0.156	0.686	0.013
389	1.339	0.017	14.634	0.287	0.694	0.034
390	1.364	0.012	16.293	0.176	0.746	0.035
391	1.255	0.011	16.475	0.244	0.657	0.018
392	1.287	0.017	14.268	0.285	0.670	0.074
394	1.220	0.010	17.145	0.276	0.714	0.028
395	1.236	0.007	12.194	0.168	0.659	0.018
396	1.255	0.012	15.206	0.230	0.668	0.018
397	1.212	0.011	10.144	0.113	0.586	0.015
398	1.303	0.014	10.647	0.227	0.598	0.010
399	1.083	0.009	10.130	0.277	0.572	0.050
400	1.180	0.011	14.473	0.274	0.672	0.026
403	1.241	0.021	15.026	0.379	0.748	0.040
404	1.279	0.010	15.584	0.225	0.738	0.074
405	1.206	0.008	15.178	0.260	0.723	0.004
408	1.210	0.006	15.892	0.150	0.707	0.013
409	1.251	0.014	16.863	0.277	0.742	0.025
410	1.246	0.008	15.444	0.262	0.698	0.031
414	1.220	0.009	15.644	0.218	0.749	0.041
415	1.206	0.013	14.760	0.232	0.727	0.036
416	1.110	0.015	16.231	0.178	0.653	0.007
417	1.198	0.015	14.928	0.453	0.657	0.051
419	1.220	0.008	13.494	0.135	0.532	0.038
421	1.267	0.006	9.305	0.121	0.303	0.007
424	1.324	0.011	5.522	0.048	0.001	0.065
426	1.401	0.014	3.696	0.095	-0.077	0.019
429	1.491	0.012	6.446	0.184	0.385	0.025
431	1.676	0.015	10.249	0.232	0.705	0.048
432	1.656	0.007	8.710	0.086	0.672	0.016
433	1.652	0.011	11.056	0.101	0.704	0.040
434	1.508	0.010	9.009	0.104	0.722	0.030
437	1.532	0.013	12.746	0.157	0.695	0.022
438	1.597	0.011	13.898	0.258	0.694	0.008
439	1.601	0.013	8.021	0.112	0.699	0.032
440	1.660	0.013	8.888	0.082	0.708	0.035
441	1.450	0.011	9.087	0.145	0.658	0.020

443	1.631	0.008	8.865	0.062	0.726	0.029
446	1.684	0.017	10.861	0.155	0.744	0.017
450	1.699	0.009	8.834	0.088	0.721	0.047
451	1.641	0.015	9.654	0.107	0.714	0.012
453	1.637	0.025	12.715	0.370	0.732	0.025
456	1.714	0.026	10.016	0.327	0.761	0.025
457	1.622	0.012	9.969	0.148	0.747	0.049
458	1.627	0.012	10.178	0.195	0.758	0.025
461	1.531	0.015	11.728	0.159	0.699	0.050
462	1.725	0.017	9.194	0.119	0.733	0.028
463	1.466	0.013	14.184	0.290	0.714	0.048
464	1.477	0.012	11.066	0.172	0.731	0.016
465	1.588	0.010	12.753	0.116	0.671	0.027
466	1.483	0.009	10.955	0.116	0.715	0.006
467	1.429	0.013	12.943	0.115	0.644	0.035
468	1.604	0.013	9.177	0.094	0.671	0.015
469	1.594	0.009	10.581	0.070	0.662	0.028
471	1.491	0.016	16.333	0.238	0.608	0.047
472	1.600	0.027	9.185	0.215	0.644	0.019
474	1.460	0.007	7.865	0.133	0.501	0.039
475	1.722	0.009	8.171	0.250	0.716	0.043
476	1.715	0.010	8.898	0.170	0.743	0.042
478	1.770	0.010	9.163	0.219	0.687	0.028
479	1.735	0.015	11.568	0.195	0.745	0.030
480	1.762	0.011	9.413	0.204	0.714	0.007
482	1.701	0.021	9.693	0.095	0.730	0.048
483	1.712	0.015	11.642	0.150	0.731	0.033
484	1.726	0.011	8.947	0.090	0.762	0.051
486	1.713	0.026	9.749	0.146	0.775	0.068
487	1.690	0.010	9.538	0.090	0.699	0.023
488	1.628	0.008	9.986	0.224	0.716	0.018
489	1.693	0.017	11.216	0.106	0.734	0.031
490	1.658	0.012	9.741	0.212	0.677	0.053
491	1.591	0.009	7.420	0.063	0.433	0.025
492	1.488	0.005	3.974	0.108	0.148	0.015
495	0.792	0.003	2.617	0.055	-1.382	0.033



## ANHANG C

### Strukturberechnung

#### C.1. Chemische Verschiebungen für NusACTD

Die chemischen Verschiebungen (in ppm) sind in einem verkürzten BMRB-Format angegeben und sind unter der Kennung 5800 in elektronischer Form erhältlich. Die Nummerierung der Aminosäuren von 1–159 ist dabei auf das Konstrukt GP-NusA(339–495) (s. 2.1.1.1) bezogen.

1	1	GLY	H	@	960	79	ALA	H	7.59
2	1	GLY	HA2	@	961	79	ALA	HA	4.25
3	1	GLY	HA3	@	962	79	ALA	HB	1.54
5	1	GLY	CA	@	963	79	ALA	C	180.04
6	1	GLY	N	@	964	79	ALA	CA	54.89
7	2	PRO	HA	4.47	965	79	ALA	CB	18.02
8	2	PRO	HB2	1.94	966	79	ALA	N	121.53
9	2	PRO	HB3	2.31	967	80	THR	H	8.08
10	2	PRO	HG2	2.01	968	80	THR	HA	4.05
11	2	PRO	HG3	2.01	969	80	THR	HB	4.43
12	2	PRO	HD2	3.61	971	80	THR	HG2	1.35
13	2	PRO	HD3	3.56	972	80	THR	C	176.97
14	2	PRO	C	176.84	973	80	THR	CA	66.03
15	2	PRO	CA	63.02	974	80	THR	CB	69.06
16	2	PRO	CB	32.26	976	80	THR	N	116.30
17	2	PRO	CG	27.06	977	81	ILE	H	8.32
18	2	PRO	CD	50.26	978	81	ILE	HA	3.75
20	3	MET	H	8.58	979	81	ILE	HB	1.68
21	3	MET	HA	4.57	980	81	ILE	HG12	1.50
22	3	MET	HB2	2.03	981	81	ILE	HG13	0.89
23	3	MET	HB3	2.10	982	81	ILE	HG2	0.84
24	3	MET	HG2	2.57	983	81	ILE	HD1	0.31
25	3	MET	HG3	2.64	984	81	ILE	C	178.09
26	3	MET	HE	@	985	81	ILE	CA	64.83
27	3	MET	C	176.46	986	81	ILE	CB	38.96
28	3	MET	CA	55.56	987	81	ILE	CG1	29.46
29	3	MET	CB	33.27	988	81	ILE	CG2	16.91
30	3	MET	CG	32.00	989	81	ILE	CD1	13.43
31	3	MET	CE	@	990	81	ILE	N	123.88
32	3	MET	N	120.73	991	82	ALA	H	7.87
33	4	THR	H	8.36	992	82	ALA	HA	4.21
34	4	THR	HA	4.41	993	82	ALA	HB	1.50
35	4	THR	HB	4.30	994	82	ALA	C	179.73
37	4	THR	HG2	1.22	995	82	ALA	CA	54.38
38	4	THR	C	174.73	996	82	ALA	CB	18.28
39	4	THR	CA	61.50	997	82	ALA	N	122.30
40	4	THR	CB	70.34	998	83	GLN	H	7.91
42	4	THR	N	116.03	999	83	GLN	HA	4.16
43	5	VAL	H	8.33	1000	83	GLN	HB2	2.17
44	5	VAL	HA	4.06	1001	83	GLN	HB3	2.17

45	5	VAL	HB	2.10	1002	83	GLN	HG2	2.47
46	5	VAL	HG1	0.94	1003	83	GLN	HG3	2.47
47	5	VAL	HG2	0.94	1004	83	GLN	HE21	7.49
48	5	VAL	C	176.34	1005	83	GLN	HE22	6.87
49	5	VAL	CA	63.21	1006	83	GLN	C	177.17
50	5	VAL	CB	32.49	1007	83	GLN	CA	57.45
51	5	VAL	CG1	20.95	1008	83	GLN	CB	28.69
52	5	VAL	CG2	20.95	1009	83	GLN	CG	33.87
53	5	VAL	N	121.43	1011	83	GLN	N	117.69
54	6	ASP	H	8.24	1012	83	GLN	NE2	111.80
55	6	ASP	HA	4.54	1013	84	ALA	H	7.89
56	6	ASP	HB2	2.61	1014	84	ALA	HA	4.29
57	6	ASP	HB3	2.70	1015	84	ALA	HB	1.50
58	6	ASP	C	176.69	1016	84	ALA	C	178.98
59	6	ASP	CA	54.70	1017	84	ALA	CA	53.56
60	6	ASP	CB	40.91	1018	84	ALA	CB	18.50
62	6	ASP	N	122.77	1019	84	ALA	N	122.51
63	7	ASP	H	8.15	1020	85	GLN	H	8.03
64	7	ASP	HA	4.55	1021	85	GLN	HA	4.25
65	7	ASP	HB2	2.70	1022	85	GLN	HB2	2.14
66	7	ASP	HB3	2.70	1023	85	GLN	HB3	2.14
67	7	ASP	C	177.59	1024	85	GLN	HG2	2.47
68	7	ASP	CA	55.68	1025	85	GLN	HG3	2.47
69	7	ASP	CB	41.94	1026	85	GLN	HE21	7.45
71	7	ASP	N	121.29	1027	85	GLN	HE22	6.85
72	8	LEU	H	8.22	1028	85	GLN	C	176.97
73	8	LEU	HA	4.15	1029	85	GLN	CA	56.75
74	8	LEU	HB2	1.55	1030	85	GLN	CB	28.99
75	8	LEU	HB3	1.74	1031	85	GLN	CG	33.88
76	8	LEU	HG	1.62	1033	85	GLN	N	118.18
77	8	LEU	HD1	0.91	1034	85	GLN	NE2	112.05
78	8	LEU	HD2	0.87	1035	86	GLU	H	8.14
79	8	LEU	C	178.83	1036	86	GLU	HA	4.21
80	8	LEU	CA	56.90	1037	86	GLU	HB2	2.06
81	8	LEU	CB	41.64	1038	86	GLU	HB3	2.06
82	8	LEU	CG	27.16	1039	86	GLU	HG2	2.33
83	8	LEU	CD1	25.10	1040	86	GLU	HG3	2.33
84	8	LEU	CD2	24.10	1041	86	GLU	C	@
85	8	LEU	N	122.26	1042	86	GLU	CA	57.57
86	9	GLN	H	8.21	1043	86	GLU	CB	30.18
87	9	GLN	HA	4.16	1044	86	GLU	CG	36.45
88	9	GLN	HB2	2.11	1046	86	GLU	N	121.13
89	9	GLN	HB3	2.11	1047	87	GLU	H	8.31
90	9	GLN	HG2	2.39	1048	87	GLU	HA	4.25
91	9	GLN	HG3	2.45	1049	87	GLU	HB2	2.04
92	9	GLN	HE21	@	1050	87	GLU	HB3	2.04
93	9	GLN	HE22	@	1051	87	GLU	HG2	2.33
94	9	GLN	C	177.71	1052	87	GLU	HG3	2.33
95	9	GLN	CA	57.97	1053	87	GLU	C	176.97
96	9	GLN	CB	28.49	1054	87	GLU	CA	57.08
97	9	GLN	CG	33.90	1055	87	GLU	CB	30.10
99	9	GLN	N	119.68	1056	87	GLU	CG	36.45
100	9	GLN	NE2	@	1058	87	GLU	N	120.93
101	10	ALA	H	8.08	1059	88	SER	H	8.21
102	10	ALA	HA	4.16	1060	88	SER	HA	4.46
103	10	ALA	HB	1.41	1061	88	SER	HB2	3.91
104	10	ALA	C	179.89	1062	88	SER	HB3	3.91
105	10	ALA	CA	54.27	1064	88	SER	C	174.88
106	10	ALA	CB	18.43	1065	88	SER	CA	58.67

107	10	ALA	N	123.04	1066	88	SER	CB	63.75
108	11	LYS	H	8.05	1067	88	SER	N	116.15
109	11	LYS	HA	4.16	1068	89	LEU	H	8.14
110	11	LYS	HB2	1.81	1069	89	LEU	HA	4.34
111	11	LYS	HB3	1.81	1070	89	LEU	HB2	1.62
112	11	LYS	HG2	1.45	1071	89	LEU	HB3	1.71
113	11	LYS	HG3	1.35	1072	89	LEU	HG	1.68
114	11	LYS	HD2	1.63	1073	89	LEU	HD1	0.93
115	11	LYS	HD3	1.63	1074	89	LEU	HD2	0.87
116	11	LYS	HE2	@	1075	89	LEU	C	178.08
117	11	LYS	HE3	@	1076	89	LEU	CA	55.51
119	11	LYS	C	177.96	1077	89	LEU	CB	42.30
120	11	LYS	CA	58.35	1078	89	LEU	CG	27.08
121	11	LYS	CB	32.56	1079	89	LEU	CD1	25.11
122	11	LYS	CG	24.77	1080	89	LEU	CD2	23.43
123	11	LYS	CD	29.22	1081	89	LEU	N	123.83
124	11	LYS	CE	@	1082	90	GLY	H	8.22
125	11	LYS	N	120.12	1083	90	GLY	HA2	3.95
127	12	HIS	H	8.26	1084	90	GLY	HA3	3.95
128	12	HIS	HA	4.57	1085	90	GLY	C	173.96
129	12	HIS	HB2	3.27	1086	90	GLY	CA	45.44
130	12	HIS	HB3	3.27	1087	90	GLY	N	108.62
132	12	HIS	HD2	7.20	1088	91	ASP	H	8.26
133	12	HIS	HE1	8.37	1089	91	ASP	HA	4.62
135	12	HIS	C	176.72	1090	91	ASP	HB2	2.58
136	12	HIS	CA	57.24	1091	91	ASP	HB3	2.70
137	12	HIS	CB	28.99	1092	91	ASP	C	176.09
139	12	HIS	CD2	119.95	1093	91	ASP	CA	54.38
141	12	HIS	N	118.25	1094	91	ASP	CB	41.19
144	13	GLN	H	8.39	1096	91	ASP	N	120.61
145	13	GLN	HA	4.17	1097	92	ASN	H	8.35
146	13	GLN	HB2	2.12	1098	92	ASN	HA	4.64
147	13	GLN	HB3	2.12	1099	92	ASN	HB2	2.66
148	13	GLN	HG2	2.41	1100	92	ASN	HB3	2.66
149	13	GLN	HG3	2.41	1101	92	ASN	HD21	6.92
150	13	GLN	HE21	@	1102	92	ASN	HD22	7.40
151	13	GLN	HE22	@	1103	92	ASN	C	177.59
152	13	GLN	C	177.59	1104	92	ASN	CA	53.14
153	13	GLN	CA	58.05	1105	92	ASN	CB	38.87
154	13	GLN	CB	28.66	1107	92	ASN	N	118.87
155	13	GLN	CG	34.10	1108	92	ASN	ND2	112.10
157	13	GLN	N	120.16	1109	93	LYS	H	8.02
158	13	GLN	NE2	@	1110	93	LYS	HA	4.53
159	14	ALA	H	8.18	1111	93	LYS	HB2	1.64
160	14	ALA	HA	4.25	1112	93	LYS	HB3	1.75
161	14	ALA	HB	1.50	1113	93	LYS	HG2	1.42
162	14	ALA	C	180.34	1114	93	LYS	HG3	1.42
163	14	ALA	CA	54.89	1115	93	LYS	HD2	1.71
164	14	ALA	CB	18.28	1116	93	LYS	HD3	1.71
165	14	ALA	N	123.49	1117	93	LYS	HE2	3.05
166	15	GLU	H	8.34	1118	93	LYS	HE3	3.05
167	15	GLU	HA	4.12	1120	93	LYS	C	@
168	15	GLU	HB2	2.11	1121	93	LYS	CA	53.18
169	15	GLU	HB3	2.11	1122	93	LYS	CB	33.20
170	15	GLU	HG2	2.46	1123	93	LYS	CG	24.50
171	15	GLU	HG3	2.31	1124	93	LYS	CD	29.17
172	15	GLU	C	178.84	1125	93	LYS	CE	42.22
173	15	GLU	CA	58.56	1126	93	LYS	N	120.49
174	15	GLU	CB	29.34	1128	94	PRO	HA	4.40

175	15	GLU	CG	36.47	1129	94	PRO	HB2	2.29
177	15	GLU	N	119.82	1130	94	PRO	HB3	1.92
178	16	ALA	H	8.19	1131	94	PRO	HG2	2.01
179	16	ALA	HA	4.13	1132	94	PRO	HG3	2.01
180	16	ALA	HB	1.37	1133	94	PRO	HD2	3.62
181	16	ALA	C	178.97	1134	94	PRO	HD3	3.81
182	16	ALA	CA	54.75	1135	94	PRO	C	176.72
183	16	ALA	CB	18.05	1136	94	PRO	CA	63.04
184	16	ALA	N	123.91	1137	94	PRO	CB	32.14
185	17	HIS	H	8.23	1138	94	PRO	CG	27.66
186	17	HIS	HA	4.27	1139	94	PRO	CD	50.65
187	17	HIS	HB2	3.28	1141	95	ALA	H	8.90
188	17	HIS	HB3	3.28	1142	95	ALA	HA	4.37
190	17	HIS	HD2	7.26	1143	95	ALA	HB	1.61
191	17	HIS	HE1	8.43	1144	95	ALA	C	178.07
193	17	HIS	C	176.53	1145	95	ALA	CA	51.22
194	17	HIS	CA	58.70	1146	95	ALA	CB	20.69
195	17	HIS	CB	28.61	1147	95	ALA	N	124.93
197	17	HIS	CD2	119.96	1148	96	ASP	H	8.56
199	17	HIS	N	115.45	1149	96	ASP	HA	4.29
202	18	ALA	H	7.95	1150	96	ASP	HB2	2.57
203	18	ALA	HA	4.21	1151	96	ASP	HB3	2.57
204	18	ALA	HB	1.49	1152	96	ASP	C	177.40
205	18	ALA	C	179.84	1153	96	ASP	CA	57.47
206	18	ALA	CA	54.83	1154	96	ASP	CB	40.52
207	18	ALA	CB	17.97	1156	96	ASP	N	119.82
208	18	ALA	N	121.98	1157	97	ASP	H	8.43
209	19	ALA	H	7.81	1158	97	ASP	HA	4.21
210	19	ALA	HA	3.82	1159	97	ASP	HB2	2.62
211	19	ALA	HB	1.21	1160	97	ASP	HB3	2.71
212	19	ALA	C	178.46	1161	97	ASP	C	177.48
213	19	ALA	CA	54.94	1162	97	ASP	CA	56.09
214	19	ALA	CB	18.74	1163	97	ASP	CB	39.06
215	19	ALA	N	122.43	1165	97	ASP	N	116.26
216	20	ILE	H	7.95	1166	98	LEU	H	7.37
217	20	ILE	HA	3.33	1167	98	LEU	HA	4.07
218	20	ILE	HB	1.82	1168	98	LEU	HB2	1.07
219	20	ILE	HG12	0.87	1169	98	LEU	HB3	1.84
220	20	ILE	HG13	0.87	1170	98	LEU	HG	1.37
221	20	ILE	HG2	0.92	1171	98	LEU	HD1	0.73
222	20	ILE	HD1	0.81	1172	98	LEU	HD2	0.73
223	20	ILE	C	178.22	1173	98	LEU	C	177.34
224	20	ILE	CA	65.92	1174	98	LEU	CA	57.24
225	20	ILE	CB	38.05	1175	98	LEU	CB	42.93
226	20	ILE	CG1	29.73	1176	98	LEU	CG	27.90
227	20	ILE	CG2	17.27	1177	98	LEU	CD1	25.10
228	20	ILE	CD1	13.85	1178	98	LEU	CD2	25.10
229	20	ILE	N	117.99	1179	98	LEU	N	122.75
230	21	ASP	H	7.89	1180	99	LEU	H	7.65
231	21	ASP	HA	4.37	1181	99	LEU	HA	3.76
232	21	ASP	HB2	2.69	1182	99	LEU	HB2	1.46
233	21	ASP	HB3	2.69	1183	99	LEU	HB3	1.72
234	21	ASP	C	178.29	1184	99	LEU	HG	1.42
235	21	ASP	CA	57.13	1185	99	LEU	HD1	0.79
236	21	ASP	CB	40.49	1186	99	LEU	HD2	0.81
238	21	ASP	N	119.35	1187	99	LEU	C	177.87
239	22	THR	H	7.97	1188	99	LEU	CA	57.08
240	22	THR	HA	4.02	1189	99	LEU	CB	42.60
241	22	THR	HB	4.26	1190	99	LEU	CG	27.33



243	22	THR	HG2	1.36	1191	99	LEU	CD1	24.22
244	22	THR	C	176.09	1192	99	LEU	CD2	25.40
245	22	THR	CA	67.07	1193	99	LEU	N	115.21
246	22	THR	CB	68.64	1194	100	ASN	H	7.48
248	22	THR	N	117.54	1195	100	ASN	HA	4.68
249	23	PHE	H	8.64	1196	100	ASN	HB2	2.66
250	23	PHE	HA	4.51	1197	100	ASN	HB3	2.92
251	23	PHE	HB2	2.96	1198	100	ASN	HD21	7.57
252	23	PHE	HB3	3.37	1199	100	ASN	HD22	6.93
253	23	PHE	HD1	6.86	1200	100	ASN	C	174.84
254	23	PHE	HD2	6.86	1201	100	ASN	CA	53.01
255	23	PHE	HE1	6.99	1202	100	ASN	CB	39.34
256	23	PHE	HE2	6.99	1204	100	ASN	N	112.32
257	23	PHE	HZ	6.73	1205	100	ASN	ND2	113.45
258	23	PHE	C	178.76	1206	101	LEU	H	7.32
259	23	PHE	CA	57.92	1207	101	LEU	HA	4.12
260	23	PHE	CB	37.54	1208	101	LEU	HB2	1.46
267	23	PHE	N	120.69	1209	101	LEU	HB3	1.88
268	24	THR	H	8.80	1210	101	LEU	HG	1.74
269	24	THR	HA	4.13	1211	101	LEU	HD1	0.86
270	24	THR	HB	4.30	1212	101	LEU	HD2	0.72
272	24	THR	HG2	1.30	1213	101	LEU	C	176.69
273	24	THR	C	179.34	1214	101	LEU	CA	55.25
274	24	THR	CA	65.76	1215	101	LEU	CB	41.85
275	24	THR	CB	68.75	1216	101	LEU	CG	25.53
277	24	THR	N	111.91	1217	101	LEU	CD1	23.56
278	25	LYS	H	7.74	1218	101	LEU	CD2	25.65
279	25	LYS	HA	4.00	1219	101	LEU	N	125.04
280	25	LYS	HB2	1.59	1220	102	GLU	H	8.57
281	25	LYS	HB3	1.86	1221	102	GLU	HA	3.95
282	25	LYS	HG2	1.06	1222	102	GLU	HB2	1.89
283	25	LYS	HG3	0.51	1223	102	GLU	HB3	2.02
284	25	LYS	HD2	1.38	1224	102	GLU	HG2	2.23
285	25	LYS	HD3	1.45	1225	102	GLU	HG3	2.23
286	25	LYS	HE2	2.78	1226	102	GLU	C	176.34
287	25	LYS	HE3	2.72	1227	102	GLU	CA	58.49
289	25	LYS	C	178.97	1228	102	GLU	CB	29.13
290	25	LYS	CA	59.27	1229	102	GLU	CG	35.91
291	25	LYS	CB	32.84	1231	102	GLU	N	129.02
292	25	LYS	CG	24.58	1232	103	GLY	H	8.58
293	25	LYS	CD	29.22	1233	103	GLY	HA2	3.61
294	25	LYS	CE	42.10	1234	103	GLY	HA3	4.23
295	25	LYS	N	120.94	1235	103	GLY	C	174.36
297	26	TYR	H	8.07	1236	103	GLY	CA	44.68
298	26	TYR	HA	4.60	1237	103	GLY	N	112.15
299	26	TYR	HB2	2.83	1238	104	VAL	H	7.89
300	26	TYR	HB3	3.05	1239	104	VAL	HA	3.99
301	26	TYR	HD1	7.54	1240	104	VAL	HB	2.43
302	26	TYR	HD2	7.54	1241	104	VAL	HG1	0.81
303	26	TYR	HE1	6.88	1242	104	VAL	HG2	0.74
304	26	TYR	HE2	6.88	1243	104	VAL	C	174.59
306	26	TYR	C	177.34	1244	104	VAL	CA	62.78
307	26	TYR	CA	60.95	1245	104	VAL	CB	31.50
308	26	TYR	CB	39.70	1246	104	VAL	CG1	22.50
315	26	TYR	N	112.43	1247	104	VAL	CG2	23.80
316	27	LEU	H	8.18	1248	104	VAL	N	121.81
317	27	LEU	HA	4.51	1249	105	ASP	H	7.37
318	27	LEU	HB2	1.37	1250	105	ASP	HA	4.85
319	27	LEU	HB3	1.97	1251	105	ASP	HB2	2.70

320	27	LEU	HG	2.00	1252	105	ASP	HB3	3.03
321	27	LEU	HD1	0.62	1253	105	ASP	C	175.53
322	27	LEU	HD2	0.36	1254	105	ASP	CA	51.73
323	27	LEU	C	175.46	1255	105	ASP	CB	42.08
324	27	LEU	CA	53.97	1257	105	ASP	N	124.80
325	27	LEU	CB	41.71	1258	106	ARG	H	8.64
326	27	LEU	CG	27.60	1259	106	ARG	HA	3.84
327	27	LEU	CD1	22.22	1260	106	ARG	HB2	1.91
328	27	LEU	CD2	25.85	1261	106	ARG	HB3	1.82
329	27	LEU	N	114.45	1262	106	ARG	HG2	1.76
330	28	ASP	H	7.72	1263	106	ARG	HG3	1.67
331	28	ASP	HA	4.42	1264	106	ARG	HD2	3.19
332	28	ASP	HB2	2.42	1265	106	ARG	HD3	3.23
333	28	ASP	HB3	3.03	1271	106	ARG	C	177.85
334	28	ASP	C	174.59	1272	106	ARG	CA	60.65
335	28	ASP	CA	55.38	1273	106	ARG	CB	29.98
336	28	ASP	CB	39.41	1274	106	ARG	CG	28.00
338	28	ASP	N	116.62	1275	106	ARG	CD	43.30
339	29	ILE	H	6.59	1277	106	ARG	N	120.86
340	29	ILE	HA	4.78	1281	107	ASP	H	8.11
341	29	ILE	HB	2.10	1282	107	ASP	HA	4.44
342	29	ILE	HG12	1.28	1283	107	ASP	HB2	2.73
343	29	ILE	HG13	0.82	1284	107	ASP	HB3	2.64
344	29	ILE	HG2	0.69	1285	107	ASP	C	178.97
345	29	ILE	HD1	0.41	1286	107	ASP	CA	57.80
346	29	ILE	C	174.83	1287	107	ASP	CB	40.88
347	29	ILE	CA	58.67	1289	107	ASP	N	116.73
348	29	ILE	CB	41.23	1290	108	LEU	H	8.18
349	29	ILE	CG1	24.30	1291	108	LEU	HA	4.14
350	29	ILE	CG2	17.06	1292	108	LEU	HB2	1.83
351	29	ILE	CD1	14.09	1293	108	LEU	HB3	1.87
352	29	ILE	N	107.14	1294	108	LEU	HG	1.60
353	30	ASP	H	8.35	1295	108	LEU	HD1	1.05
354	30	ASP	HA	4.72	1296	108	LEU	HD2	1.02
355	30	ASP	HB2	2.79	1297	108	LEU	C	178.48
356	30	ASP	HB3	3.09	1298	108	LEU	CA	57.69
357	30	ASP	C	176.41	1299	108	LEU	CB	41.24
358	30	ASP	CA	52.81	1300	108	LEU	CG	27.43
359	30	ASP	CB	42.05	1301	108	LEU	CD1	26.51
361	30	ASP	N	119.21	1302	108	LEU	CD2	23.39
362	31	GLU	H	8.89	1303	108	LEU	N	121.86
363	31	GLU	HA	3.77	1304	109	ALA	H	8.64
364	31	GLU	HB2	2.06	1305	109	ALA	HA	3.80
365	31	GLU	HB3	2.13	1306	109	ALA	HB	1.33
366	31	GLU	HG2	2.28	1307	109	ALA	C	179.72
367	31	GLU	HG3	2.28	1308	109	ALA	CA	55.76
368	31	GLU	C	179.04	1309	109	ALA	CB	18.05
369	31	GLU	CA	60.08	1310	109	ALA	N	120.86
370	31	GLU	CB	29.68	1311	110	PHE	H	8.18
371	31	GLU	CG	36.95	1312	110	PHE	HA	4.12
373	31	GLU	N	119.48	1313	110	PHE	HB2	3.22
374	32	ASP	H	8.60	1314	110	PHE	HB3	3.22
375	32	ASP	HA	4.42	1315	110	PHE	HD1	7.58
376	32	ASP	HB2	2.71	1316	110	PHE	HD2	7.58
377	32	ASP	HB3	2.83	1317	110	PHE	HE1	7.32
378	32	ASP	C	178.34	1318	110	PHE	HE2	7.32
379	32	ASP	CA	57.79	1319	110	PHE	HZ	7.33
380	32	ASP	CB	39.58	1320	110	PHE	C	179.16
382	32	ASP	N	121.89	1321	110	PHE	CA	62.48

383	33	PHE	H	8.33	1322	110	PHE	CB	38.56
384	33	PHE	HA	4.68	1329	110	PHE	N	115.53
385	33	PHE	HB2	3.13	1330	111	LYS	H	8.04
386	33	PHE	HB3	3.45	1331	111	LYS	HA	4.14
387	33	PHE	HD1	7.38	1332	111	LYS	HB2	1.88
388	33	PHE	HD2	7.38	1333	111	LYS	HB3	2.13
389	33	PHE	HE1	7.17	1334	111	LYS	HG2	1.56
390	33	PHE	HE2	7.17	1335	111	LYS	HG3	1.56
391	33	PHE	HZ	6.95	1336	111	LYS	HD2	1.63
392	33	PHE	C	177.84	1337	111	LYS	HD3	1.79
393	33	PHE	CA	58.45	1338	111	LYS	HE2	2.98
394	33	PHE	CB	38.60	1339	111	LYS	HE3	2.98
401	33	PHE	N	123.51	1341	111	LYS	C	179.99
402	34	ALA	H	8.56	1342	111	LYS	CA	60.06
403	34	ALA	HA	3.86	1343	111	LYS	CB	32.91
404	34	ALA	HB	1.63	1344	111	LYS	CG	26.50
405	34	ALA	C	178.34	1345	111	LYS	CD	29.50
406	34	ALA	CA	55.89	1346	111	LYS	CE	42.00
407	34	ALA	CB	20.45	1347	111	LYS	N	122.92
408	34	ALA	N	120.30	1349	112	LEU	H	8.64
409	35	THR	H	8.17	1350	112	LEU	HA	3.86
410	35	THR	HA	3.78	1351	112	LEU	HB2	2.05
411	35	THR	HB	4.49	1352	112	LEU	HB3	1.70
413	35	THR	HG2	1.25	1353	112	LEU	HG	1.77
414	35	THR	C	175.71	1354	112	LEU	HD1	0.69
415	35	THR	CA	67.71	1355	112	LEU	HD2	0.75
416	35	THR	CB	68.84	1356	112	LEU	C	179.53
418	35	THR	N	112.85	1357	112	LEU	CA	58.18
419	36	VAL	H	7.49	1358	112	LEU	CB	39.90
420	36	VAL	HA	3.76	1359	112	LEU	CG	27.00
421	36	VAL	HB	2.40	1360	112	LEU	CD1	23.50
422	36	VAL	HG1	1.17	1361	112	LEU	CD2	26.10
423	36	VAL	HG2	1.01	1362	112	LEU	N	120.86
424	36	VAL	C	178.10	1363	113	ALA	H	8.20
425	36	VAL	CA	66.75	1364	113	ALA	HA	3.80
426	36	VAL	CB	31.52	1365	113	ALA	HB	1.15
427	36	VAL	CG1	22.76	1366	113	ALA	C	180.90
428	36	VAL	CG2	20.96	1367	113	ALA	CA	54.85
429	36	VAL	N	122.79	1368	113	ALA	CB	18.01
430	37	LEU	H	7.63	1369	113	ALA	N	123.66
431	37	LEU	HA	3.95	1370	114	ALA	H	7.82
432	37	LEU	HB2	2.16	1371	114	ALA	HA	4.16
433	37	LEU	HB3	1.24	1372	114	ALA	HB	1.54
434	37	LEU	HG	1.47	1373	114	ALA	C	179.09
435	37	LEU	HD1	0.44	1374	114	ALA	CA	54.48
436	37	LEU	HD2	0.14	1375	114	ALA	CB	18.00
437	37	LEU	C	178.90	1376	114	ALA	N	120.96
438	37	LEU	CA	58.60	1377	115	ARG	H	7.39
439	37	LEU	CB	41.65	1378	115	ARG	HA	4.55
440	37	LEU	CG	26.05	1379	115	ARG	HB2	1.88
441	37	LEU	CD1	21.80	1380	115	ARG	HB3	2.14
442	37	LEU	CD2	25.60	1381	115	ARG	HG2	1.75
443	37	LEU	N	117.03	1382	115	ARG	HG3	1.81
444	38	VAL	H	8.01	1383	115	ARG	HD2	3.13
445	38	VAL	HA	4.28	1384	115	ARG	HD3	3.24
446	38	VAL	HB	2.10	1390	115	ARG	C	175.94
447	38	VAL	HG1	1.09	1391	115	ARG	CA	54.52
448	38	VAL	HG2	0.97	1392	115	ARG	CB	29.95
449	38	VAL	C	181.72	1393	115	ARG	CG	26.90

450	38	VAL	CA	65.84	1394	115	ARG	CD	43.15
451	38	VAL	CB	32.06	1396	115	ARG	N	115.50
452	38	VAL	CG1	24.16	1400	116	GLY	H	7.95
453	38	VAL	CG2	21.27	1401	116	GLY	HA2	3.60
454	38	VAL	N	119.15	1402	116	GLY	HA3	4.20
455	39	GLU	H	8.92	1403	116	GLY	C	173.84
456	39	GLU	HA	4.06	1404	116	GLY	CA	45.38
457	39	GLU	HB2	2.14	1405	116	GLY	N	107.71
458	39	GLU	HB3	2.29	1406	117	VAL	H	8.01
459	39	GLU	HG2	2.56	1407	117	VAL	HA	3.97
460	39	GLU	HG3	2.37	1408	117	VAL	HB	1.99
461	39	GLU	C	178.91	1409	117	VAL	HG1	0.70
462	39	GLU	CA	59.19	1410	117	VAL	HG2	0.63
463	39	GLU	CB	28.84	1411	117	VAL	C	172.36
464	39	GLU	CG	36.34	1412	117	VAL	CA	61.34
466	39	GLU	N	123.10	1413	117	VAL	CB	29.88
467	40	GLU	H	8.00	1414	117	VAL	CG1	21.51
468	40	GLU	HA	4.34	1415	117	VAL	CG2	19.94
469	40	GLU	HB2	2.19	1416	117	VAL	N	125.27
470	40	GLU	HB3	2.49	1417	118	CYS	H	8.46
471	40	GLU	HG2	2.66	1418	118	CYS	HA	4.36
472	40	GLU	HG3	2.42	1419	118	CYS	HB2	2.90
473	40	GLU	C	175.86	1420	118	CYS	HB3	3.16
474	40	GLU	CA	56.15	1422	118	CYS	C	173.85
475	40	GLU	CB	28.62	1423	118	CYS	CA	60.19
476	40	GLU	CG	35.66	1424	118	CYS	CB	30.28
478	40	GLU	N	117.61	1425	118	CYS	N	119.22
479	41	GLY	H	7.74	1426	119	THR	H	7.97
480	41	GLY	HA2	3.53	1427	119	THR	HA	4.89
481	41	GLY	HA3	4.09	1428	119	THR	HB	4.76
482	41	GLY	C	174.04	1430	119	THR	HG2	1.18
483	41	GLY	CA	44.95	1431	119	THR	C	175.19
484	41	GLY	N	105.00	1432	119	THR	CA	58.71
485	42	PHE	H	8.15	1433	119	THR	CB	72.34
486	42	PHE	HA	4.72	1435	119	THR	N	107.89
487	42	PHE	HB2	2.94	1436	120	LEU	H	8.78
488	42	PHE	HB3	2.79	1437	120	LEU	HA	3.87
489	42	PHE	HD1	7.20	1438	120	LEU	HB2	1.27
490	42	PHE	HD2	7.20	1439	120	LEU	HB3	1.60
491	42	PHE	HE1	7.18	1440	120	LEU	HG	1.47
492	42	PHE	HE2	7.18	1441	120	LEU	HD1	0.96
493	42	PHE	HZ	7.12	1442	120	LEU	HD2	0.86
494	42	PHE	C	174.47	1443	120	LEU	C	178.09
495	42	PHE	CA	57.85	1444	120	LEU	CA	58.09
496	42	PHE	CB	39.22	1445	120	LEU	CB	41.81
503	42	PHE	N	121.53	1446	120	LEU	CG	26.96
504	43	SER	H	9.26	1447	120	LEU	CD1	26.79
505	43	SER	HA	4.68	1448	120	LEU	CD2	25.42
506	43	SER	HB2	3.76	1449	120	LEU	N	120.45
507	43	SER	HB3	3.95	1450	121	GLU	H	8.48
509	43	SER	C	173.59	1451	121	GLU	HA	3.99
510	43	SER	CA	58.73	1452	121	GLU	HB2	2.06
511	43	SER	CB	65.46	1453	121	GLU	HB3	1.93
512	43	SER	N	113.54	1454	121	GLU	HG2	2.45
513	44	THR	H	7.90	1455	121	GLU	HG3	2.45
514	44	THR	HA	4.94	1456	121	GLU	C	178.68
515	44	THR	HB	4.79	1457	121	GLU	CA	59.56
517	44	THR	HG2	1.20	1458	121	GLU	CB	28.51
518	44	THR	C	174.74	1459	121	GLU	CG	36.63

519	44	THR	CA	58.91	1461	121	GLU	N	118.96
520	44	THR	CB	72.34	1462	122	ASP	H	7.75
522	44	THR	N	110.09	1463	122	ASP	HA	4.29
523	45	LEU	H	9.20	1464	122	ASP	HB2	3.00
524	45	LEU	HA	3.95	1465	122	ASP	HB3	2.80
525	45	LEU	HB2	1.20	1466	122	ASP	C	179.21
526	45	LEU	HB3	1.84	1467	122	ASP	CA	57.09
527	45	LEU	HG	1.83	1468	122	ASP	CB	41.96
528	45	LEU	HD1	0.88	1470	122	ASP	N	117.74
529	45	LEU	HD2	0.62	1471	123	LEU	H	7.81
530	45	LEU	C	178.59	1472	123	LEU	HA	3.82
531	45	LEU	CA	57.89	1473	123	LEU	HB2	1.09
532	45	LEU	CB	42.22	1474	123	LEU	HB3	1.89
533	45	LEU	CG	27.03	1475	123	LEU	HG	1.30
534	45	LEU	CD1	23.48	1476	123	LEU	HD1	0.73
535	45	LEU	CD2	25.93	1477	123	LEU	HD2	0.61
536	45	LEU	N	121.16	1478	123	LEU	C	177.09
537	46	GLU	H	9.44	1479	123	LEU	CA	57.90
538	46	GLU	HA	3.72	1480	123	LEU	CB	41.20
539	46	GLU	HB2	2.02	1481	123	LEU	CG	26.63
540	46	GLU	HB3	2.15	1482	123	LEU	CD1	23.08
541	46	GLU	HG2	2.33	1483	123	LEU	CD2	26.95
542	46	GLU	HG3	2.59	1484	123	LEU	N	122.18
543	46	GLU	C	178.64	1485	124	ALA	H	8.26
544	46	GLU	CA	60.96	1486	124	ALA	HA	3.73
545	46	GLU	CB	29.00	1487	124	ALA	HB	0.81
546	46	GLU	CG	37.57	1488	124	ALA	C	177.44
548	46	GLU	N	118.38	1489	124	ALA	CA	54.26
549	47	GLU	H	7.81	1490	124	ALA	CB	18.02
550	47	GLU	HA	4.08	1491	124	ALA	N	118.25
551	47	GLU	HB2	2.19	1492	125	GLU	H	7.07
552	47	GLU	HB3	2.57	1493	125	GLU	HA	4.42
553	47	GLU	HG2	2.42	1494	125	GLU	HB2	2.14
554	47	GLU	HG3	2.42	1495	125	GLU	HB3	2.36
555	47	GLU	C	178.41	1496	125	GLU	HG2	2.66
556	47	GLU	CA	58.98	1497	125	GLU	HG3	2.89
557	47	GLU	CB	30.36	1498	125	GLU	C	178.19
558	47	GLU	CG	37.31	1499	125	GLU	CA	56.13
560	47	GLU	N	117.45	1500	125	GLU	CB	29.82
561	48	LEU	H	7.07	1501	125	GLU	CG	35.51
562	48	LEU	HA	3.77	1503	125	GLU	N	111.80
563	48	LEU	HB2	1.03	1504	126	GLN	H	7.55
564	48	LEU	HB3	1.54	1505	126	GLN	HA	4.12
565	48	LEU	HG	1.45	1506	126	GLN	HB2	1.97
566	48	LEU	HD1	0.08	1507	126	GLN	HB3	2.36
567	48	LEU	HD2	0.20	1508	126	GLN	HG2	1.91
568	48	LEU	C	176.96	1509	126	GLN	HG3	3.16
569	48	LEU	CA	56.90	1510	126	GLN	HE21	7.36
570	48	LEU	CB	42.65	1511	126	GLN	HE22	6.60
571	48	LEU	CG	26.63	1512	126	GLN	C	174.84
572	48	LEU	CD1	26.53	1513	126	GLN	CA	55.06
573	48	LEU	CD2	24.07	1514	126	GLN	CB	29.32
574	48	LEU	N	116.02	1515	126	GLN	CG	34.15
575	49	ALA	H	7.84	1517	126	GLN	N	118.63
576	49	ALA	HA	3.82	1518	126	GLN	NE2	114.51
577	49	ALA	HB	0.73	1519	127	GLY	H	8.83
578	49	ALA	C	178.24	1520	127	GLY	HA2	3.65
579	49	ALA	CA	54.34	1521	127	GLY	HA3	4.64
580	49	ALA	CB	19.04	1522	127	GLY	C	175.89

581	49	ALA	N	115.92	1523	127	GLY	CA	43.33
582	50	TYR	H	7.29	1524	127	GLY	N	105.37
583	50	TYR	HA	4.77	1525	128	ILE	H	8.46
584	50	TYR	HB2	2.79	1526	128	ILE	HA	3.39
585	50	TYR	HB3	3.29	1527	128	ILE	HB	1.76
586	50	TYR	HD1	7.20	1528	128	ILE	HG12	1.03
587	50	TYR	HD2	7.20	1529	128	ILE	HG13	1.62
588	50	TYR	HE1	6.72	1530	128	ILE	HG2	0.92
589	50	TYR	HE2	6.72	1531	128	ILE	HD1	0.91
591	50	TYR	C	177.21	1532	128	ILE	C	178.72
592	50	TYR	CA	57.11	1533	128	ILE	CA	65.90
593	50	TYR	CB	39.47	1534	128	ILE	CB	38.12
600	50	TYR	N	110.41	1535	128	ILE	CG1	29.00
601	51	VAL	H	7.81	1536	128	ILE	CG2	17.77
602	51	VAL	HA	4.49	1537	128	ILE	CD1	13.53
603	51	VAL	HB	2.53	1538	128	ILE	N	120.55
604	51	VAL	HG1	1.16	1539	129	ASP	H	8.58
605	51	VAL	HG2	1.00	1540	129	ASP	HA	4.34
606	51	VAL	C	@	1541	129	ASP	HB2	2.55
607	51	VAL	CA	60.68	1542	129	ASP	HB3	2.66
608	51	VAL	CB	31.73	1543	129	ASP	C	178.20
609	51	VAL	CG1	21.28	1544	129	ASP	CA	56.30
610	51	VAL	CG2	20.99	1545	129	ASP	CB	39.81
611	51	VAL	N	122.63	1547	129	ASP	N	116.47
612	52	PRO	HA	4.38	1548	130	ASP	H	7.47
613	52	PRO	HB2	1.89	1549	130	ASP	HA	4.51
614	52	PRO	HB3	2.45	1550	130	ASP	HB2	2.94
615	52	PRO	HG2	2.04	1551	130	ASP	HB3	3.02
616	52	PRO	HG3	2.22	1552	130	ASP	C	176.80
617	52	PRO	HD2	3.72	1553	130	ASP	CA	56.71
618	52	PRO	HD3	3.99	1554	130	ASP	CB	41.83
619	52	PRO	C	177.84	1556	130	ASP	N	117.51
620	52	PRO	CA	63.67	1557	131	LEU	H	7.27
621	52	PRO	CB	32.21	1558	131	LEU	HA	4.42
622	52	PRO	CG	28.37	1559	131	LEU	HB2	1.63
623	52	PRO	CD	51.40	1560	131	LEU	HB3	1.54
625	53	MET	H	8.66	1561	131	LEU	HG	1.63
626	53	MET	HA	3.86	1562	131	LEU	HD1	0.72
627	53	MET	HB2	1.93	1563	131	LEU	HD2	0.67
628	53	MET	HB3	1.93	1564	131	LEU	C	176.40
629	53	MET	HG2	2.52	1565	131	LEU	CA	53.97
630	53	MET	HG3	2.52	1566	131	LEU	CB	42.39
631	53	MET	HE	2.07	1567	131	LEU	CG	27.60
632	53	MET	C	177.59	1568	131	LEU	CD1	26.21
633	53	MET	CA	59.20	1569	131	LEU	CD2	23.05
634	53	MET	CB	32.29	1570	131	LEU	N	116.57
635	53	MET	CG	32.30	1571	132	ALA	H	7.27
636	53	MET	CE	17.10	1572	132	ALA	HA	4.08
637	53	MET	N	124.39	1573	132	ALA	HB	1.41
638	54	LYS	H	8.52	1574	132	ALA	C	177.16
639	54	LYS	HA	3.95	1575	132	ALA	CA	54.20
640	54	LYS	HB2	1.76	1576	132	ALA	CB	19.15
641	54	LYS	HB3	1.93	1577	132	ALA	N	119.82
642	54	LYS	HG2	1.44	1578	133	ASP	H	8.35
643	54	LYS	HG3	1.44	1579	133	ASP	HA	4.47
644	54	LYS	HD2	1.67	1580	133	ASP	HB2	2.71
645	54	LYS	HD3	1.67	1581	133	ASP	HB3	2.71
646	54	LYS	HE2	2.98	1582	133	ASP	C	176.23
647	54	LYS	HE3	2.98	1583	133	ASP	CA	54.13

649	54	LYS	C	177.84	1584	133	ASP	CB	39.93
650	54	LYS	CA	59.13	1586	133	ASP	N	114.30
651	54	LYS	CB	32.32	1587	134	ILE	H	7.79
652	54	LYS	CG	24.59	1588	134	ILE	HA	3.84
653	54	LYS	CD	29.38	1589	134	ILE	HB	1.90
654	54	LYS	CE	41.90	1590	134	ILE	HG12	0.92
655	54	LYS	N	115.62	1591	134	ILE	HG13	1.60
657	55	GLU	H	7.64	1592	134	ILE	HG2	0.79
658	55	GLU	HA	4.16	1593	134	ILE	HD1	0.75
659	55	GLU	HB2	2.10	1594	134	ILE	C	176.10
660	55	GLU	HB3	2.26	1595	134	ILE	CA	61.92
661	55	GLU	HG2	2.37	1596	134	ILE	CB	37.08
662	55	GLU	HG3	2.37	1597	134	ILE	CG1	28.35
663	55	GLU	C	179.22	1598	134	ILE	CG2	17.41
664	55	GLU	CA	58.84	1599	134	ILE	CD1	13.46
665	55	GLU	CB	29.30	1600	134	ILE	N	121.88
666	55	GLU	CG	36.97	1601	135	GLU	H	8.65
668	55	GLU	N	116.23	1602	135	GLU	HA	3.99
669	56	LEU	H	7.17	1603	135	GLU	HB2	1.89
670	56	LEU	HA	4.16	1604	135	GLU	HB3	1.97
671	56	LEU	HB2	1.33	1605	135	GLU	HG2	2.31
672	56	LEU	HB3	1.72	1606	135	GLU	HG3	2.24
673	56	LEU	HG	1.37	1607	135	GLU	C	177.02
674	56	LEU	HD1	0.64	1608	135	GLU	CA	58.38
675	56	LEU	HD2	0.28	1609	135	GLU	CB	29.36
676	56	LEU	C	177.64	1610	135	GLU	CG	35.93
677	56	LEU	CA	56.85	1612	135	GLU	N	130.35
678	56	LEU	CB	42.73	1613	136	GLY	H	8.82
679	56	LEU	CG	27.54	1614	136	GLY	HA2	3.67
680	56	LEU	CD1	26.18	1615	136	GLY	HA3	4.27
681	56	LEU	CD2	23.68	1616	136	GLY	C	173.97
682	56	LEU	N	118.56	1617	136	GLY	CA	45.14
683	57	LEU	H	7.62	1618	136	GLY	N	113.49
684	57	LEU	HA	4.01	1619	137	LEU	H	7.88
685	57	LEU	HB2	1.71	1620	137	LEU	HA	4.71
686	57	LEU	HB3	1.63	1621	137	LEU	HB2	1.33
687	57	LEU	HG	1.69	1622	137	LEU	HB3	1.89
688	57	LEU	HD1	0.87	1623	137	LEU	HG	1.63
689	57	LEU	HD2	0.73	1624	137	LEU	HD1	0.89
690	57	LEU	C	177.34	1625	137	LEU	HD2	0.90
691	57	LEU	CA	56.06	1626	137	LEU	C	175.59
692	57	LEU	CB	41.47	1627	137	LEU	CA	53.57
693	57	LEU	CG	27.00	1628	137	LEU	CB	43.04
694	57	LEU	CD1	25.30	1629	137	LEU	CG	29.50
695	57	LEU	CD2	22.60	1630	137	LEU	CD1	26.10
696	57	LEU	N	115.31	1631	137	LEU	CD2	24.80
697	58	GLU	H	7.10	1632	137	LEU	N	122.70
698	58	GLU	HA	4.16	1633	138	THR	H	7.42
699	58	GLU	HB2	2.00	1634	138	THR	HA	4.62
700	58	GLU	HB3	2.23	1635	138	THR	HB	4.72
701	58	GLU	HG2	2.56	1637	138	THR	HG2	1.33
702	58	GLU	HG3	2.33	1638	138	THR	C	174.80
703	58	GLU	C	176.95	1639	138	THR	CA	59.97
704	58	GLU	CA	56.93	1640	138	THR	CB	71.67
705	58	GLU	CB	29.65	1642	138	THR	N	113.82
706	58	GLU	CG	36.44	1643	139	ASP	H	8.94
708	58	GLU	N	115.72	1644	139	ASP	HA	4.25
709	59	ILE	H	7.52	1645	139	ASP	HB2	2.66
710	59	ILE	HA	3.86	1646	139	ASP	HB3	2.66

711	59	ILE	HB	2.03	1647	139	ASP	C	179.09
712	59	ILE	HG12	1.05	1648	139	ASP	CA	57.44
713	59	ILE	HG13	1.81	1649	139	ASP	CB	39.44
714	59	ILE	HG2	0.87	1651	139	ASP	N	121.68
715	59	ILE	HD1	0.93	1652	140	GLU	H	8.49
716	59	ILE	C	175.84	1653	140	GLU	HA	4.00
717	59	ILE	CA	62.18	1654	140	GLU	HB2	1.93
718	59	ILE	CB	36.93	1655	140	GLU	HB3	2.06
719	59	ILE	CG1	27.97	1656	140	GLU	HG2	2.28
720	59	ILE	CG2	16.84	1657	140	GLU	HG3	2.28
721	59	ILE	CD1	13.86	1658	140	GLU	C	179.21
722	59	ILE	N	122.23	1659	140	GLU	CA	59.39
723	60	GLU	H	8.50	1660	140	GLU	CB	29.55
724	60	GLU	HA	3.99	1661	140	GLU	CG	36.43
725	60	GLU	HB2	2.01	1663	140	GLU	N	119.93
726	60	GLU	HB3	2.01	1664	141	LYS	H	7.83
727	60	GLU	HG2	2.28	1665	141	LYS	HA	4.14
728	60	GLU	HG3	2.28	1666	141	LYS	HB2	1.84
729	60	GLU	C	177.09	1667	141	LYS	HB3	1.84
730	60	GLU	CA	58.21	1668	141	LYS	HG2	1.36
731	60	GLU	CB	29.39	1669	141	LYS	HG3	1.51
732	60	GLU	CG	35.59	1670	141	LYS	HD2	1.79
734	60	GLU	N	128.83	1671	141	LYS	HD3	1.79
735	61	GLY	H	8.67	1672	141	LYS	HE2	2.88
736	61	GLY	HA2	3.65	1673	141	LYS	HE3	2.95
737	61	GLY	HA3	4.21	1675	141	LYS	C	178.34
738	61	GLY	C	174.53	1676	141	LYS	CA	58.94
739	61	GLY	CA	45.04	1677	141	LYS	CB	32.63
740	61	GLY	N	111.93	1678	141	LYS	CG	25.78
741	62	LEU	H	7.56	1679	141	LYS	CD	29.24
742	62	LEU	HA	4.51	1680	141	LYS	CE	42.46
743	62	LEU	HB2	1.28	1681	141	LYS	N	121.74
744	62	LEU	HB3	1.84	1683	142	ALA	H	8.88
745	62	LEU	HG	1.53	1684	142	ALA	HA	3.82
746	62	LEU	HD1	0.87	1685	142	ALA	HB	1.48
747	62	LEU	HD2	0.69	1686	142	ALA	C	179.10
748	62	LEU	C	175.22	1687	142	ALA	CA	55.74
749	62	LEU	CA	54.27	1688	142	ALA	CB	18.65
750	62	LEU	CB	42.09	1689	142	ALA	N	121.41
751	62	LEU	CG	27.17	1690	143	GLY	H	8.25
752	62	LEU	CD1	25.14	1691	143	GLY	HA2	3.63
753	62	LEU	CD2	23.83	1692	143	GLY	HA3	3.90
754	62	LEU	N	120.59	1693	143	GLY	C	175.83
755	63	ASP	H	7.44	1694	143	GLY	CA	47.35
756	63	ASP	HA	4.73	1695	143	GLY	N	102.41
757	63	ASP	HB2	2.77	1696	144	ALA	H	7.68
758	63	ASP	HB3	3.01	1697	144	ALA	HA	4.13
759	63	ASP	C	175.34	1698	144	ALA	HB	1.50
760	63	ASP	CA	51.66	1699	144	ALA	C	181.15
761	63	ASP	CB	42.77	1700	144	ALA	CA	55.06
763	63	ASP	N	118.81	1701	144	ALA	CB	18.16
764	64	GLU	H	9.00	1702	144	ALA	N	123.90
765	64	GLU	HA	4.06	1703	145	LEU	H	8.26
766	64	GLU	HB2	2.13	1704	145	LEU	HA	4.04
767	64	GLU	HB3	2.13	1705	145	LEU	HB2	1.27
768	64	GLU	HG2	2.36	1706	145	LEU	HB3	1.96
769	64	GLU	HG3	2.33	1707	145	LEU	HG	1.91
770	64	GLU	C	@	1708	145	LEU	HD1	0.72
771	64	GLU	CA	62.07	1709	145	LEU	HD2	0.72



772	64	GLU	CB	27.12	1710	145	LEU	C	178.22
773	64	GLU	CG	36.94	1711	145	LEU	CA	57.85
775	64	GLU	N	119.33	1712	145	LEU	CB	42.34
776	65	PRO	HA	4.36	1713	145	LEU	CG	26.14
777	65	PRO	HB2	1.84	1714	145	LEU	CD1	26.34
778	65	PRO	HB3	2.30	1715	145	LEU	CD2	23.05
779	65	PRO	HG2	2.13	1716	145	LEU	N	120.76
780	65	PRO	HG3	1.98	1717	146	ILE	H	7.95
781	65	PRO	HD2	3.73	1718	146	ILE	HA	3.22
782	65	PRO	HD3	3.83	1719	146	ILE	HB	1.57
783	65	PRO	C	180.37	1720	146	ILE	HG12	1.00
784	65	PRO	CA	66.00	1721	146	ILE	HG13	1.54
785	65	PRO	CB	30.64	1722	146	ILE	HG2	0.83
786	65	PRO	CG	28.19	1723	146	ILE	HD1	0.53
787	65	PRO	CD	49.65	1724	146	ILE	C	178.60
789	66	THR	H	7.83	1725	146	ILE	CA	66.17
790	66	THR	HA	3.97	1726	146	ILE	CB	39.28
791	66	THR	HB	4.25	1727	146	ILE	CG1	28.70
793	66	THR	HG2	1.25	1728	146	ILE	CG2	16.55
794	66	THR	C	177.20	1729	146	ILE	CD1	14.03
795	66	THR	CA	67.18	1730	146	ILE	N	119.31
796	66	THR	CB	67.93	1731	147	MET	H	7.99
798	66	THR	N	115.65	1732	147	MET	HA	4.08
799	67	VAL	H	8.30	1733	147	MET	HB2	2.14
800	67	VAL	HA	3.52	1734	147	MET	HB3	2.06
801	67	VAL	HB	2.21	1735	147	MET	HG2	2.67
802	67	VAL	HG1	0.97	1736	147	MET	HG3	2.67
803	67	VAL	HG2	0.93	1737	147	MET	HE	2.10
804	67	VAL	C	177.47	1738	147	MET	C	178.61
805	67	VAL	CA	67.43	1739	147	MET	CA	58.38
806	67	VAL	CB	31.44	1740	147	MET	CB	31.42
807	67	VAL	CG1	24.60	1741	147	MET	CG	32.07
808	67	VAL	CG2	23.06	1742	147	MET	CE	16.66
809	67	VAL	N	122.19	1743	147	MET	N	116.36
810	68	GLU	H	8.66	1744	148	ALA	H	8.12
811	68	GLU	HA	4.03	1745	148	ALA	HA	4.23
812	68	GLU	HB2	2.06	1746	148	ALA	HB	1.54
813	68	GLU	HB3	2.06	1747	148	ALA	C	180.59
814	68	GLU	HG2	2.25	1748	148	ALA	CA	55.18
815	68	GLU	HG3	2.42	1749	148	ALA	CB	18.00
816	68	GLU	C	177.59	1750	148	ALA	N	122.63
817	68	GLU	CA	59.70	1751	149	ALA	H	8.15
818	68	GLU	CB	29.09	1752	149	ALA	HA	3.94
819	68	GLU	CG	36.42	1753	149	ALA	HB	1.42
821	68	GLU	N	119.36	1754	149	ALA	C	179.84
822	69	ALA	H	7.71	1755	149	ALA	CA	55.26
823	69	ALA	HA	4.21	1756	149	ALA	CB	17.76
824	69	ALA	HB	1.54	1757	149	ALA	N	120.24
825	69	ALA	C	180.23	1758	150	ARG	H	8.42
826	69	ALA	CA	54.97	1759	150	ARG	HA	3.00
827	69	ALA	CB	18.04	1760	150	ARG	HB2	1.41
828	69	ALA	N	121.04	1761	150	ARG	HB3	1.74
829	70	LEU	H	8.14	1762	150	ARG	HG2	0.03
830	70	LEU	HA	3.91	1763	150	ARG	HG3	1.54
831	70	LEU	HB2	1.54	1764	150	ARG	HD2	2.89
832	70	LEU	HB3	1.84	1765	150	ARG	HD3	2.89
833	70	LEU	HG	1.71	1771	150	ARG	C	178.29
834	70	LEU	HD1	0.73	1772	150	ARG	CA	60.26
835	70	LEU	HD2	0.75	1773	150	ARG	CB	29.83

836	70	LEU	C	178.41	1774	150	ARG	CG	28.19
837	70	LEU	CA	58.11	1775	150	ARG	CD	44.00
838	70	LEU	CB	42.52	1777	150	ARG	N	118.79
839	70	LEU	CG	26.52	1781	151	ASN	H	8.33
840	70	LEU	CD1	25.00	1782	151	ASN	HA	4.59
841	70	LEU	CD2	25.30	1783	151	ASN	HB2	2.92
842	70	LEU	N	120.08	1784	151	ASN	HB3	2.92
843	71	ARG	H	8.26	1785	151	ASN	HD21	7.51
844	71	ARG	HA	3.68	1786	151	ASN	HD22	6.84
845	71	ARG	HB2	1.86	1787	151	ASN	C	176.84
846	71	ARG	HB3	1.86	1788	151	ASN	CA	56.12
847	71	ARG	HG2	1.76	1789	151	ASN	CB	38.01
848	71	ARG	HG3	1.76	1791	151	ASN	N	117.91
849	71	ARG	HD2	3.12	1792	151	ASN	ND2	111.40
850	71	ARG	HD3	3.12	1793	152	ILE	H	7.32
856	71	ARG	C	178.67	1794	152	ILE	HA	3.91
857	71	ARG	CA	59.98	1795	152	ILE	HB	1.77
858	71	ARG	CB	30.55	1796	152	ILE	HG12	1.10
859	71	ARG	CG	27.17	1797	152	ILE	HG13	1.71
860	71	ARG	CD	45.40	1798	152	ILE	HG2	0.91
862	71	ARG	N	117.97	1799	152	ILE	HD1	0.83
866	72	GLU	H	7.80	1800	152	ILE	C	178.09
867	72	GLU	HA	4.00	1801	152	ILE	CA	64.08
868	72	GLU	HB2	2.14	1802	152	ILE	CB	39.41
869	72	GLU	HB3	2.14	1803	152	ILE	CG1	29.09
870	72	GLU	HG2	2.36	1804	152	ILE	CG2	17.56
871	72	GLU	HG3	2.36	1805	152	ILE	CD1	13.75
872	72	GLU	C	179.16	1806	152	ILE	N	117.62
873	72	GLU	CA	59.18	1807	153	CYS	H	8.34
874	72	GLU	CB	29.28	1808	153	CYS	HA	4.32
875	72	GLU	CG	35.92	1809	153	CYS	HB2	2.45
877	72	GLU	N	118.67	1810	153	CYS	HB3	2.94
878	73	ARG	H	8.26	1812	153	CYS	C	175.85
879	73	ARG	HA	4.12	1813	153	CYS	CA	62.06
880	73	ARG	HB2	1.97	1814	153	CYS	CB	28.61
881	73	ARG	HB3	1.97	1815	153	CYS	N	115.43
882	73	ARG	HG2	1.76	1816	154	TRP	H	8.60
883	73	ARG	HG3	2.05	1817	154	TRP	HA	4.98
884	73	ARG	HD2	3.08	1818	154	TRP	HB2	2.79
885	73	ARG	HD3	3.33	1819	154	TRP	HB3	2.96
891	73	ARG	C	179.72	1820	154	TRP	HD1	6.82
892	73	ARG	CA	59.44	1821	154	TRP	HE1	10.35
893	73	ARG	CB	30.18	1822	154	TRP	HE3	7.42
894	73	ARG	CG	27.88	1823	154	TRP	HZ2	7.30
895	73	ARG	CD	43.97	1824	154	TRP	HZ3	7.05
897	73	ARG	N	119.07	1825	154	TRP	HH2	7.14
901	74	ALA	H	8.51	1826	154	TRP	C	176.97
902	74	ALA	HA	3.86	1827	154	TRP	CA	55.84
903	74	ALA	HB	1.33	1828	154	TRP	CB	29.43
904	74	ALA	C	178.47	1837	154	TRP	N	119.21
905	74	ALA	CA	55.65	1838	154	TRP	NE1	127.82
906	74	ALA	CB	17.57	1839	155	PHE	H	7.59
907	74	ALA	N	123.51	1840	155	PHE	HA	4.94
908	75	LYS	H	8.19	1841	155	PHE	HB2	3.13
909	75	LYS	HA	3.73	1842	155	PHE	HB3	3.43
910	75	LYS	HB2	1.88	1843	155	PHE	HD1	7.36
911	75	LYS	HB3	1.88	1844	155	PHE	HD2	7.36
912	75	LYS	HG2	1.27	1845	155	PHE	HE1	7.43
913	75	LYS	HG3	1.59	1846	155	PHE	HE2	7.43

914	75	LYS	HD2	1.67	1847	155	PHE	HZ	@
915	75	LYS	HD3	1.67	1848	155	PHE	C	176.47
916	75	LYS	HE2	2.88	1849	155	PHE	CA	57.02
917	75	LYS	HE3	2.88	1850	155	PHE	CB	39.39
919	75	LYS	C	179.96	1857	155	PHE	N	118.32
920	75	LYS	CA	60.43	1858	156	GLY	H	8.07
921	75	LYS	CB	32.28	1859	156	GLY	HA2	4.03
922	75	LYS	CG	26.19	1860	156	GLY	HA3	4.03
923	75	LYS	CD	29.30	1861	156	GLY	C	174.10
924	75	LYS	CE	42.07	1862	156	GLY	CA	45.82
925	75	LYS	N	117.79	1863	156	GLY	N	109.74
927	76	ASN	H	8.35	1864	157	ASP	H	8.30
928	76	ASN	HA	4.50	1865	157	ASP	HA	4.64
929	76	ASN	HB2	2.87	1866	157	ASP	HB2	2.57
930	76	ASN	HB3	2.87	1867	157	ASP	HB3	2.74
931	76	ASN	HD21	7.68	1868	157	ASP	C	@
932	76	ASN	HD22	7.04	1869	157	ASP	CA	54.39
933	76	ASN	C	177.90	1870	157	ASP	CB	41.29
934	76	ASN	CA	56.03	1872	157	ASP	N	120.38
935	76	ASN	CB	38.21	1873	158	GLU	H	8.31
937	76	ASN	N	118.87	1874	158	GLU	HA	4.29
938	76	ASN	ND2	112.67	1875	158	GLU	HB2	1.93
939	77	ALA	H	8.40	1876	158	GLU	HB3	2.10
940	77	ALA	HA	4.21	1877	158	GLU	HG2	2.28
941	77	ALA	HB	1.43	1878	158	GLU	HG3	2.28
942	77	ALA	C	179.47	1879	158	GLU	C	175.34
943	77	ALA	CA	55.08	1880	158	GLU	CA	56.51
944	77	ALA	CB	18.88	1881	158	GLU	CB	30.68
945	77	ALA	N	124.34	1882	158	GLU	CG	36.44
946	78	LEU	H	8.06	1884	158	GLU	N	120.93
947	78	LEU	HA	3.86	1885	159	ALA	H	7.93
948	78	LEU	HB2	1.46	1886	159	ALA	HA	@
949	78	LEU	HB3	1.93	1887	159	ALA	HB	1.32
950	78	LEU	HG	1.74	1889	159	ALA	CA	53.91
951	78	LEU	HD1	0.73	1890	159	ALA	CB	20.17
952	78	LEU	HD2	0.81	1891	159	ALA	N	130.28
953	78	LEU	C	179.73					
954	78	LEU	CA	57.91					
955	78	LEU	CB	41.64					
956	78	LEU	CG	29.21					
957	78	LEU	CD1	26.11					
958	78	LEU	CD2	23.64					
959	78	LEU	N	117.46					

## C.2. XPLOR–Protokolle für die Strukturberechnung von NusA(351–426) und NusA(426–495)

Aus Platzgründen sind lediglich die Protokolle zur Strukturberechnung von NusA(351–426) aufgelistet. Die für die Strukturberechnung von NusA(426–495) verwendeten Protokolle sind im wesentlichen identisch.

## C.2.1. Erzeugung der Strukturdatei – generate\_structure.inp.

```
remarks  Generate structure file for a protein
remarks  using the SA parameter and topology files

topology
@../PARAMETER/topallhdg.pn
end

parameter
@../PARAMETER/parallhdg_min.pn
end

segment
name=""
chain
@./toph19.pep
link pept head - * tail + * end
first prop tail + pro end          ! special n-ter for PRO
first nter   tail + * end
last cter head - * end
sequence @../PSF/NusA_CTD.seq end
end
end

delete
  selection=(resid 1:14 and name *)
end

delete
  selection=(resid 91:159 and name *)
end

write structure output=../PSF/NusA_dom1_pn.psf end

stop
```

## C.2.2. Erzeugung der Koordinatendatei – generate\_template.inp.

```
remarks  file  nmr/generate_template.inp
remarks  generates a "template" coordinate set.  This produces
remarks  an arbitrary extended conformation with ideal geometry.
remarks  author: Axel T. Brunger

{====>}
structure @../PSF/NusA_dom1_pn.psf end          {* read structure file *}

parameter
{====>}
@../PARAMETER/parallhdg_min500.pn             {* read parameters *}
end
```

```

topology
  residue NDIS
    delete bond 1SG 2SG
    delete angle 1CB 1SG 2SG
    delete angle 1SG 2SG 2CB
  end
end

{====>}
{* if your protein contains S-S bridges appropriately modify and *}
{* then uncomment the following lines.                            *}

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

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

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

flags exclude * include bond angle vdw end

minimize powell nstep=50 nprint=10 end

flags include impr end

minimize powell nstep=50 nprint=10 end

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

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

minimize powell nstep=100 nprint=25 end

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

flags exclude vdw elec end
vector do (mass=1.) ( name h* )

```

```

hbuild selection=( name h* ) phistep=360 end
flags include vdw elec end

minimize powell nstep=1000 nprint=50 end
                                     { * write coordinates * }
remarks produced by nmr/generate_template.inp
write coordinates output=../PSF/NusA_dom1_pn.pdb end

stop

```

### C.2.3. Simulated Annealing I – sa.inp.

```

remarks sa_1.inp
remarks Author: Michael Nilges

evaluate ($ini_count = 0)
evaluate ($end_count = 15)

evaluate ($iniseed = 100046)
evaluate ($iniseed2 = 554321)
evaluate ($iniseed3 = 204875)
evaluate ($iniseed4 = 395164)

evaluate ($init_t = 2000 ) { * initial simulated annealing temperature * }
evaluate ($high_steps = 40000) !20000
evaluate ($cool1_steps = 60000) !30000
evaluate ($cool2_steps = 30000) !15000

evaluate ($fileroot = "../LINUX/RUN_21_RAM_A_HBONDS_2/NusA_")
evaluate ($template = "../PSF/NusA_dom1_pn.pdb")

structure @@../PSF/NusA_dom1_pn.psf end

parameter @@../PARAMETER/parallhdg_min.pn end

noe
  reset
  nrestraints = 5000    ! allocate space for NOEs
  ceiling 100

class
  dist @../LINUX/RUN_21_RAM_A_HBONDS_2/noe_dom1_130704.list
      @../LINUX/RUN_21_RAM_A_HBONDS_2/hbonds_270804_dom1.list

set echo on message on end

averaging * sum
  potential * soft
  scale * 1.0
  sqconstant * 1.0
  sqexponent * 2
  soexponent * 1
  rswitch * 1.0
  sqoffset * 0.0
  asymptote * 2.0

```

```

end

restraints dihedral
  nassign=1000
  @../LINUX/RUN_21_RAMA_HBONDS_2/phi_dom1_130704.list
end

evaluate ($krama = 1.0)
evaluate ($ramacoff = 10.0)
rama
  nres=10000
  @../PARAMETER/gaussians/shortrange_gaussians.tbl
  @../PARAMETER/gaussians/new_shortrange_force.tbl
end

set message on echo on end
@../PARAMETER/gaussians/newshortrange_setup.tbl

flags exclude * include bonds angle impr vdw noe cdih end

set echo on message on end

@setup_swap_orig.hs

vector ident (store2) (store1)
parameter
  improper (store2) (store2) (all) (all) 0.0 TOKEN TOKEN
  improper (all) (all) (store2) (store2) 0.0 TOKEN TOKEN
end

set echo false message false end

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

evaluate ($kcdih = 5)
restraints dihedral
  scale=$kcdih
end

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

  evaluate ($count=$count+1)
  evaluate ($nreassign = 0)

  coor @$template

  evaluate ($seed =$count*$iniseed)

  if ($count > 60) then
    evaluate ($seed =($count-60)*$iniseed2)
  end if

  if ($count > 120) then
    evaluate ($seed =($count-120)*$iniseed3)
  end if

```

```

if ($count > 180) then
  evaluate ($seed = ($count-180)*$iniseed4)
end if

set seed $seed end
@sa_l_randomchain.xplor

evaluate ($cpul = $cpu)

evaluate ($final1_t = 1000)      { K }
evaluate ($final2_t = 100)      { K }
evaluate ($tempstep = 50)       { K }

evaluate ($ncycle = ($init_t-$final1_t)/$tempstep)
evaluate ($nstep = int($cooll_steps/$ncycle))

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

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

@@sa_l_reduced.xplor { defines store1 }

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

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

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

flags include bond angl impr vdw noe cdih end

@sa_cyto_hightemp.xplor

flags include bond angl impr vdw noe cdih rama end

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

@sa_cyto_cooll.xplor

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

@sa_cyto_cool2.xplor

```



```

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

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

minimize powell nstep=500 drop=10.0 nprint=25 end

flags exclude * include bond angl impr vdw noe cdih end

minimize powell nstep=500 drop=10.0 nprint=25 end

flags include bond angl impr vdw noe cdih rama end

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

evaluate ($filename=$fileroot+ encode($count)+ ".pdb")
evaluate ($fname=$fileroot+ encode($count)+ ".prt")
evaluate ($aname=$fileroot+ encode($count)+ ".ang")
evaluate ($dname=$fileroot+ encode($count)+ ".dih")

print threshold=0.3 noe
evaluate ($rms_noe=$result)
evaluate ($violations_noe=$violations)
print threshold=5. cdih
evaluate ($rms_cdih=$result)
evaluate ($violations_cdih=$violations)
print thres=0.05 bonds
evaluate ($rms_bonds=$result)
print thres=0.5 angles
evaluate ($rms_angles=$result)
print thres=5. impropers
evaluate ($rms_improppers=$result)
remarks initial random number seed: $seed
remarks =====
remarks          overall,bonds,angles,improper,vdw,noe,cdih
remarks energies: $ener, $bond, $angl, $impr, $vdw, $noe, $cdih
remarks =====
remarks          bonds,angles,improppers,noe,cdih
remarks rms-dev.: $rms_bonds,$rms_angles,$rms_improppers,$rms_noe,$rms_cdih
remarks =====
remarks          noe, cdih
remarks violations.: $violations_noe, $violations_cdih
remarks =====
write coordinates sele= (not (resid 500)) output =$filename end

set print = $fname end
noe print thresh = 0.1 end
close $fname end

set print = $dname end
print thresh = 0.1 cdih
close $dname end

set print = $aname end
print thresh = 0.5 angles

```

```

close $aname end

end loop main

stop

```

## C.2.4. Simulated Annealing II – refine.inp.

```

remarks sa_1.inp
remarks Author: Michael Nilges

evaluate ($ini_count = 1)
evaluate ($end_count = 4)
evaluate ($ini_zeit = 0)
evaluate ($end_zeit = 5)

evaluate ($iniseed = 100046)
evaluate ($iniseed2 = 554321)
evaluate ($iniseed3 = 204875)
evaluate ($iniseed4 = 395164)

evaluate ($init_t = 1000 ) { * initial simulated annealing temperature * }
evaluate ($high_steps = 50000)
evaluate ($cool_steps = 100000)

evaluate ($fileroot = "../LINUX/REFINEMENT/RUN_21_RAMAHBONDS/Nusa_dc")

structure @@../PSF/Nusa_dom1.psf end
structure @../PSF/axis_hs.psf end

parameter @@../PARAMETER/parallhdg_min.pn end
param @../PARAMETER/para_axis_3.pro end

noe
  reset
  nrestraints = 6500 ! allocate space for NOEs

  class
  dist @../LINUX/REFINEMENT/RUN_21_RAMAHBONDS/noe_dom1_130704.list
      @../LINUX/REFINEMENT/RUN_21_RAMAHBONDS/hbonds_260804_dom1.list

  set echo on message on end

ceiling=1000
averaging * sum
potential * square
scale * 50.
sqoffset * 0.0
sqconstant * 1.0
sqexponent * 2
rswitch * 0.5

```

```

end

restraints dihedral
  nassign=1000
  @../LINUX/REFINEMENT/RUN_21_RAMAHBONDS/phi_dom1_130704.list
end

evaluate ($ksani = 0.01)
sani
  nres=400
  class JNH
  force $ksani
  potential harmonic
  coeff 0.0 10.5 0.2
  @../LINUX/REFINEMENT/RUN_21_RAMAHBONDS/dnh_dom1_270804.list.071103
end

sani class JNH force 0 end

parameter                {*Parameters for the repulsive energy term.*}
  nbonds
    repel=0.75             {*Initial value for repel--modified later.*}
    rexp=2 irexp=2 rcon=1.
    nbxmod=3
    wmin=0.01
    cutnb=4.5 ctonnb=2.99 ctofnb=3.
    tolerance=0.5
  end
end

restraints dihedral
  scale=5.
end

set echo off message off end

evaluate ($krama = 1.0)
evaluate ($ramacoff = 10.0)
rama
  nres=10000
  @../PARAMETER/gaussians/shortrange_gaussians.tbl
  @../PARAMETER/gaussians/new_shortrange_force.tbl
end

set message on echo on end
@../PARAMETER/gaussians/newshortrange_setup.tbl

flags exclude * include bonds angle impr vdw noe cdih coup sani harm rama end

set echo on message on end

@setup_swap_orig.hs

vector ident (store2) (store1)
parameter
  improper (store2) (store2) (all) (all) 0.0 TOKEN TOKEN
  improper (all) (all) (store2) (store2) 0.0 TOKEN TOKEN
end

```

```

evaluate ($count = $ini_count)
while ($count < $end_count ) loop main
  evaluate ($count=$count+1)
  evaluate ($nreassign = 0)
  evaluate ($e_prev = 10000)
  evaluate ($e_act = 10000)

  evaluate ($template = "../LINUX/REFINEMENT/RUN_21_RAMO_HBONDS/
                        rnk_Nusa_" + encode($count) + ".pdb")

  evaluate ($zeit = $ini_zeit)
  while ($zeit < $end_zeit ) loop intra
    evaluate ($zeit=$zeit+1)
    evaluate ($nreassign = 0)

    coor @@ $template
    coor @../PSF/axis.pdb

    evaluate ($seed = ($count+$zeit)*$iniseed)

    if ($count > 60) then
      evaluate ($seed = ($count-60)*$iniseed2)
    end if

    if ($count > 120) then
      evaluate ($seed = ($count-120)*$iniseed3)
    end if

    if ($count > 180) then
      evaluate ($seed = ($count-180)*$iniseed4)
    end if

    set seed $seed end

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

    {*Uniform heavy masses to speed molecular dynamics.*}
    vector do (mass=100) (not (resid 500 or resid 600))
    vector do (mass = 30.0) (resid 500 or resid 600)

    ! Fixing the axis using harmonic restraint
    ! leave out, let both rotate

    vector do (refx=x) (all)
    vector do (refy=y) (all)
    vector do (refz=z) (all)

    constraints fix ((resid 500 or resid 600) and name OO) end

    !Original part from RNA-refinement protocol

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

    !swap adopted from Nilges Protocol

```

```

evaluate ($swap = 1.001)
flags exclude * include noe end
@swap15v.xplor
flags exclude * include bond angl impr vdw noe cdih coup sani harm rama end

restraints dihedral scale=5. end
noe asymptote * 1.0 end

constraints interaction
  (all) (all) weights * 1 end end

{* ===== High-temperature dynamics.*}

minimize powell nstep=500 drop=10. nprint=25 end

constraints interaction (all) (all)
  weights * 1 end end

eval ($init_kcdih=50)
eval ($end_kcdih=55)
eval ($cdihstep=1)
eval ($kcdih=49)
eval ($ncycle=($end_kcdih-$kcdih)/$cdihstep)
eval ($nstep= int($high_steps/$ncycle))
eval ($i_cdih=0)

while ($i_cdih < $ncycle) loop cdih1
  eval ($i_cdih = $i_cdih+1)
  eval ($kcdih = $kcdih+$cdihstep)

  restraints dihedral scale=$kcdih end

  dynamics verlet
    nstep=$nstep timestep=0.0005 iasvel=current firstt=$init_t
    tcoupling=true tbath=$init_t nprint=50 ipfrfq=0
  end

end loop cdih1

constraints interaction (all) (all) weights * 1 end end

restraints dihedral scale=50. end

evaluate ($final_t = 300) { K }
evaluate ($tempstep = 25) { K }

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

evaluate ($ini_rad = 0.9) evaluate ($fin_rad = 0.75)
evaluate ($ini_con= 0.003) evaluate ($fin_con= 4.0)

evaluate ($ini_sani = 0.01) evaluate ($fin_sani = 1.0)
evaluate ($sani_fac = ($fin_sani/$ini_sani)^(1/$ncycle))
evaluate ($ksani = $ini_sani)
evaluate ($ksani_CH = 1.0*$ksani)
sani class JNH force $ksani end

```

```

sani class JCH force $ksani_CH end

evaluate ($bath = $init_t)
evaluate ($k_vdw = $ini_con)
evaluate ($k_vdwfact = ($fin_con/$ini_con)^(1/$ncycle))
evaluate ($radius= $ini_rad)
evaluate ($radfact = ($fin_rad/$ini_rad)^(1/$ncycle))

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

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

  evaluate ($ksani = $ksani*$sani_fac)
  evaluate ($ksani_CH = 1.0*$ksani)
  sani class JNH force $ksani end
  sani class JCH force $ksani_CH end

parameter nbonds repel=$radius end end
constraints interaction (not name SG) (all)
  weights * 1. vdw $k_vdw end end

dynamics verlet
  nstep=$nstep time=0.0005 iasvel=current firstt=$bath
  tcoup=true tbath=$bath nprint=$nstep iprfrq=0
end

evaluate ($critical=$temp/$bath)

if ($critical > 10. ) then
  display ****&&&& rerun job with smaller timestep (i.e., 0.003)
  stop
end if

end loop cool

{* ===== Final minimization.*}

constraints interaction (all) (all) weights * 1. vdw 1. end end
parameter
  nbonds
    repel=0.75 !changed HS, original value 0.80
    rexp=2 irexp=2 rcon=1.
    nbxmod=3
    wmin=0.01
    cutnb=6.0 ctonnb=2.99 ctofnb=3.
    tolerance=1.5
  end
end

minimize powell nstep=1000 drop=10.0 nprint=25 end

flags exclude * include bond angl impr vdw noe cdih coup sani harm end

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

```

```

flags exclude * include bond angl impr vdw noe cdih coup sani harm rama end

sani class JNH force 0 end

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

evaluate ($filename=$fileroot+ encode($count)+ ".pdb")
evaluate ($outname=$fileroot+ encode($count)+ ".axis")
evaluate ($fname=$fileroot+ encode($count)+ ".prt")
evaluate ($sname=$fileroot+ encode($count)+ ".sani")
evaluate ($dname=$fileroot+ encode($count)+ ".dih")
evaluate ($aname=$fileroot+ encode($count)+ ".ang")

print threshold=0.3 noe
evaluate ($rms_noe=$result)
evaluate ($violations_noe=$violations)
print threshold=5. cdih
evaluate ($rms_cdih=$result)
evaluate ($violations_cdih=$violations)
print thres=0.05 bonds
evaluate ($rms_bonds=$result)
print thres=0.5 angles
evaluate ($rms_angles=$result)
print thres=5. impropers
evaluate ($rms_improprs=$result)
remarks initial random number seed: $seed
remarks =====
remarks          overall,bonds,angles,improper,vdw,noe,cdih
remarks energies: $ener, $bond, $angl, $impr, $vdw, $noe, $cdih, $sani
remarks =====
remarks          bonds,angles,improprs,noe,cdih
remarks rms-dev.: $rms_bonds,$rms_angles,$rms_improprs,$rms_noe,$rms_cdih
remarks =====
remarks          noe, cdih
remarks violations.: $violations_noe, $violations_cdih
remarks =====

evaluate ($e_act = $ener)

if ($e_act < $e_prev) then
  evaluate ($e_prev = $e_act)
  write coordinates sele= (resid 500) output =$outname end
  write coordinates sele= (not (resid 500)) output =$filename end
  set print = $fname end
  noe print thresh = 0.1 end
  close $fname end

  set print = $dname end
  print thresh = 0.1 cdih end
  close $dname end

  set print = $aname end
  print thresh = 0.5 angles end
  close $aname end

  set print = $sname end

```

```

    sani print thresh = 0.0 end
    close $sname end
  end
end if

end loop intra

end loop main

stop

```

### C.3. Experimentelle Randbedingungen für NusA(351–426) und NusA(426–495)

Die experimentellen Randbedingungen sind in einem verkürzten XPLOR-Format angegeben. Die Randbedingungen sind auch in elektronischer Form unter den PDB-Einträgen 1XWL und 1XWN für NusA(351–426) beziehungsweise NusA(426–495) erhältlich.

#### C.3.1. Randbedingungen für NusA(351–426).

##### C.3.1.1. Abstandsbeschränkungen aus NOESY-Spektren.

```

(352 name HA ) (355 name HB* ) 3.5   (373 name HN ) (372 name HB ) 5.0
(352 name HN ) (353 name HN ) 5.0   (373 name HN ) (372 name HG2*) 3.5
(353 name HA ) (356 name HB ) 3.5   (373 name HN ) (370 name HA ) 3.5
(353 name HN ) (354 name HN ) 3.5   (373 name HD1*) (369 name HD*) 5.0
(354 name HA ) (357 name HB* ) 3.5   (373 name HD1*) (369 name HE* ) 3.5
(355 name HA ) (358 name HB ) 3.5   (373 name HD1*) (378 name HD* ) 5.0
(355 name HB* ) (356 name HA ) 5.0   (373 name HD1*) (372 name HG2*) 5.0
(355 name HB* ) (359 name HE* ) 5.0   (373 name HD1*) (392 name HD2*) 3.5
(355 name HB* ) (359 name HZ ) 5.0   (373 name HD1*) (384 name HD2*) 5.0
(355 name HB* ) (374 name HG1*) 3.5   (373 name HD1*) (376 name HB1 ) 5.0
(355 name HB* ) (374 name HG2*) 5.0   (373 name HD1*) (376 name HB2 ) 5.0
(355 name HB* ) (379 name HA ) 3.5   (373 name HD1*) (372 name HB ) 5.0
(355 name HB* ) (379 name HB1 ) 3.5   (373 name HD1*) (370 name HA ) 5.0
(355 name HB* ) (379 name HB2 ) 3.5   (373 name HD2*) (406 name HD1*) 5.0
(355 name HN ) (356 name HN ) 5.0   (373 name HD2*) (365 name HD1*) 3.5
(356 name HA ) (359 name HB1 ) 5.0   (373 name HD1*) (365 name HD1*) 5.0
(356 name HA ) (359 name HB2 ) 5.0   (374 name HA ) (375 name HN ) 3.5
(356 name HN ) (357 name HN ) 5.0   (374 name HA ) (359 name HD* ) 5.0
(357 name HN ) (356 name HA ) 3.5   (374 name HA ) (359 name HE* ) 3.5
(357 name HN ) (356 name HB ) 3.5   (374 name HA ) (379 name HA ) 5.0
(357 name HN ) (359 name HN ) 5.0   (374 name HA ) (379 name HB1 ) 5.0
(357 name HN ) (358 name HN ) 5.0   (374 name HA ) (379 name HB2 ) 5.0
(358 name HA ) (361 name HB1 ) 3.5   (374 name HA ) (355 name HB* ) 5.0
(358 name HA ) (361 name HB2 ) 3.5   (374 name HB ) (375 name HN ) 3.5
(358 name HG2*) (381 name HN ) 5.0   (374 name HB ) (371 name HG2*) 5.0
(358 name HN ) (356 name HA ) 5.0   (371 name HG2*) (356 name HD1*) 3.5
(358 name HN ) (359 name HN ) 3.5   (371 name HG2*) (375 name HG1 ) 5.0
(359 name HB1 ) (365 name HD1*) 3.5   (371 name HG2*) (375 name HG2 ) 5.0
(359 name HB2 ) (365 name HD1*) 3.5   (371 name HG2*) (375 name HN ) 5.0
(359 name HB1 ) (370 name HB* ) 3.5   (371 name HG2*) (374 name HN ) 5.0

```



(359 name HB2 ) (370 name HB\* ) 3.5 (374 name HG1\*) (379 name HA ) 5.0  
(359 name HN ) (358 name HB ) 3.5 (374 name HG1\*) (375 name HN ) 5.0  
(359 name HN ) (360 name HN ) 3.5 (374 name HG2\*) (375 name HN ) 3.5  
(360 name HA ) (365 name HN ) 2.7 (374 name HG2\*) (379 name HA ) 5.0  
(360 name HB ) (365 name HN ) 5.0 (374 name HG2\*) (352 name HA ) 3.5  
(360 name HN ) (359 name HD\* ) 5.0 (374 name HG2\*) (352 name HB\* ) 3.5  
(360 name HN ) (365 name HN ) 5.0 (375 name HB1 ) (376 name HN ) 5.0  
(360 name HN ) (361 name HN ) 3.5 (375 name HB2 ) (376 name HN ) 5.0  
(361 name HN ) (359 name HN ) 5.0 (375 name HG1 ) (376 name HN ) 5.0  
(361 name HN ) (360 name HA ) 5.0 (375 name HG2 ) (376 name HN ) 5.0  
(361 name HN ) (360 name HB ) 5.0 (376 name HN ) (378 name HD\* ) 5.0  
(362 name HN ) (360 name HN ) 5.0 (376 name HN ) (375 name HA ) 5.0  
(363 name HD2\*) (359 name HA ) 3.5 (376 name HG1 ) (395 name HD1\*) 5.0  
(363 name HD2\*) (362 name HN ) 5.0 (376 name HG2 ) (395 name HD1\*) 5.0  
(363 name HD2\*) (384 name HD1\*) 3.5 (377 name HN ) (376 name HG1 ) 5.0  
(363 name HD2\*) (410 name HB\* ) 5.0 (377 name HN ) (376 name HG2 ) 5.0  
(363 name HN ) (360 name HA ) 5.0 (377 name HN ) (374 name HG1\*) 5.0  
(363 name HN ) (364 name HN ) 3.5 (377 name HN ) (374 name HG2\*) 5.0  
(364 name HN ) (365 name HN ) 3.5 (377 name HN ) (376 name HA ) 5.0  
(365 name HD1\*) (359 name HA ) 5.0 (378 name HN ) (375 name HN ) 5.0  
(365 name HD1\*) (363 name HB1 ) 5.0 (378 name HA ) (384 name HD2\*) 5.0  
(365 name HD1\*) (363 name HB2 ) 5.0 (378 name HB1 ) (384 name HD2\*) 3.5  
(365 name HD1\*) (363 name HD2\*) 3.5 (378 name HB2 ) (384 name HD2\*) 3.5  
(365 name HD1\*) (360 name HA ) 5.0 (378 name HB1 ) (373 name HD1\*) 5.0  
(365 name HD1\*) (366 name HN ) 3.5 (378 name HB2 ) (373 name HD1\*) 5.0  
(365 name HD1\*) (369 name HD\* ) 2.7 (378 name HB1 ) (379 name HN ) 5.0  
(365 name HD1\*) (369 name HE\* ) 3.5 (378 name HB2 ) (379 name HN ) 5.0  
(365 name HG2\*) (366 name HN ) 3.5 (379 name HB2 ) (380 name HN ) 5.0  
(365 name HN ) (363 name HN ) 5.0 (380 name HN ) (382 name HN ) 5.0  
(367 name HA ) (370 name HB\* ) 3.5 (380 name HN ) (381 name HN ) 5.0  
(367 name HN ) (366 name HA ) 3.5 (381 name HN ) (359 name HZ ) 5.0  
(367 name HN ) (368 name HN ) 3.5 (381 name HN ) (380 name HB ) 5.0  
(368 name HA ) (371 name HB ) 5.0 (381 name HA ) (382 name HN ) 5.0  
(368 name HN ) (366 name HB1 ) 5.0 (381 name HA ) (410 name HB\* ) 5.0  
(368 name HN ) (366 name HB2 ) 5.0 (381 name HA ) (384 name HD1\*) 5.0  
(368 name HN ) (367 name HA ) 3.5 (381 name HB1 ) (382 name HN ) 5.0  
(368 name HN ) (369 name HN ) 5.0 (381 name HB2 ) (382 name HN ) 5.0  
(369 name HA ) (372 name HB ) 5.0 (381 name HD2\*) (382 name HN ) 5.0  
(369 name HN ) (365 name HB ) 5.0 (381 name HD2\*) (413 name HN ) 5.0  
(369 name HN ) (368 name HB1 ) 5.0 (381 name HD2\*) (362 name HE\* ) 5.0  
(369 name HN ) (370 name HN ) 5.0 (381 name HD2\*) (362 name HB1 ) 5.0  
(370 name HA ) (365 name HD1\*) 3.5 (381 name HD2\*) (362 name HB2 ) 5.0  
(370 name HA ) (373 name HB2 ) 3.5 (381 name HD2\*) (358 name HG2\*) 3.5  
(370 name HB\* ) (359 name HD\* ) 5.0 (381 name HD2\*) (413 name HB\* ) 5.0  
(370 name HN ) (365 name HD1\*) 3.5 (381 name HD2\*) (362 name HD\* ) 3.5  
(370 name HN ) (369 name HB1 ) 5.0 (382 name HN ) (380 name HA ) 5.0  
(370 name HN ) (369 name HD\* ) 5.0 (382 name HA ) (385 name HN ) 3.5  
(370 name HN ) (372 name HN ) 5.0 (382 name HG1 ) (414 name HD1\*) 5.0  
(370 name HN ) (373 name HD2\*) 5.0 (382 name HG2 ) (414 name HD1\*) 5.0  
(370 name HN ) (371 name HN ) 5.0 (382 name HG1 ) (414 name HD2\*) 5.0  
(371 name HA ) (374 name HB ) 3.5 (382 name HG2 ) (414 name HD2\*) 3.5  
(371 name HN ) (370 name HB\* ) 5.0 (383 name HB1 ) (384 name HN ) 5.0  
(371 name HN ) (372 name HN ) 3.5 (383 name HB2 ) (384 name HN ) 5.0  
(372 name HG1\*) (373 name HD2\*) 5.0 (384 name HN ) (386 name HN ) 5.0  
(372 name HN ) (373 name HD1\*) 5.0 (384 name HN ) (383 name HA ) 5.0  
(372 name HN ) (373 name HD2\*) 5.0 (384 name HN ) (381 name HA ) 5.0  
(372 name HN ) (373 name HN ) 5.0 (384 name HN ) (383 name HG\* ) 5.0  
(373 name HD1\*) (369 name HZ ) 5.0 (384 name HA ) (385 name HN ) 3.5  
(373 name HD1\*) (395 name HD1\*) 3.5 (384 name HB1 ) (385 name HN ) 3.5

(373 name HD2\*) (359 name HD\* ) 5.0 (384 name HB1 ) (410 name HB\* ) 3.5  
(373 name HD2\*) (365 name HG2\*) 5.0 (384 name HB2 ) (410 name HB\* ) 3.5  
(373 name HD2\*) (369 name HD\* ) 3.5 (384 name HD1\*) (381 name HN ) 5.0  
(373 name HD2\*) (369 name HE\* ) 3.5 (384 name HD1\*) (363 name HN ) 5.0  
(373 name HD2\*) (370 name HA ) 3.5 (384 name HD1\*) (359 name HD\* ) 5.0  
(373 name HD2\*) (370 name HB\* ) 5.0 (384 name HD1\*) (378 name HB1 ) 5.0  
(373 name HG ) (369 name HD\* ) 5.0 (384 name HD1\*) (378 name HB2 ) 5.0  
(373 name HG ) (369 name HE\* ) 5.0 (384 name HD1\*) (381 name HD1\*) 5.0  
(373 name HG ) (369 name HZ ) 5.0 (384 name HD1\*) (373 name HD1\*) 5.0  
(373 name HN ) (374 name HN ) 3.5 (384 name HD2\*) (359 name HE\* ) 5.0  
(374 name HA ) (377 name HN ) 5.0 (384 name HD2\*) (359 name HD\* ) 5.0  
(374 name HG1\*) (355 name HA ) 3.5 (384 name HD2\*) (373 name HA ) 5.0  
(374 name HG1\*) (359 name HD\* ) 3.5 (384 name HD2\*) (373 name HN ) 5.0  
(374 name HG1\*) (359 name HE\* ) 3.5 (384 name HD2\*) (406 name HD1\*) 5.0  
(374 name HG1\*) (371 name HA ) 5.0 (384 name HD2\*) (406 name HD2\*) 5.0  
(374 name HG1\*) (373 name HD2\*) 5.0 (384 name HD2\*) (392 name HD1\*) 5.0  
(374 name HN ) (372 name HA ) 5.0 (384 name HD2\*) (392 name HD2\*) 3.5  
(374 name HN ) (373 name HD1\*) 5.0 (384 name HD2\*) (395 name HD1\*) 5.0  
(374 name HN ) (373 name HD2\*) 5.0 (384 name HD2\*) (387 name HG1\*) 5.0  
(374 name HN ) (375 name HN ) 3.5 (385 name HN ) (410 name HB\* ) 5.0  
(375 name HN ) (373 name HD1\*) 5.0 (385 name HA ) (407 name HD\* ) 5.0  
(375 name HN ) (373 name HD2\*) 5.0 (385 name HA ) (410 name HB\* ) 5.0  
(375 name HN ) (373 name HN ) 5.0 (385 name HB\* ) (382 name HG2 ) 5.0  
(375 name HN ) (376 name HN ) 3.5 (386 name HN ) (384 name HA ) 5.0  
(376 name HN ) (377 name HN ) 3.5 (386 name HN ) (382 name HA ) 5.0  
(377 name HA1 ) (378 name HN ) 5.0 (386 name HN ) (383 name HA ) 5.0  
(377 name HA2 ) (378 name HN ) 5.0 (387 name HN ) (386 name HA ) 5.0  
(377 name HN ) (375 name HN ) 5.0 (387 name HN ) (386 name HB2 ) 5.0  
(377 name HN ) (378 name HD\* ) 5.0 (387 name HG1\*) (392 name HD1\*) 5.0  
(377 name HN ) (378 name HN ) 3.5 (387 name HG2\*) (384 name HA ) 5.0  
(378 name HD\* ) (384 name HD2\*) 5.0 (387 name HG2\*) (388 name HD1 ) 5.0  
(378 name HN ) (379 name HN ) 5.0 (387 name HG2\*) (388 name HD2 ) 5.0  
(379 name HN ) (380 name HN ) 2.7 (387 name HG2\*) (407 name HD\* ) 5.0  
(379 name HN ) (378 name HD\* ) 5.0 (387 name HG2\*) (392 name HD2\*) 5.0  
(380 name HG2\*) (381 name HN ) 3.5 (387 name HG2\*) (384 name HD2\*) 5.0  
(380 name HG2\*) (382 name HN ) 5.0 (387 name HG2\*) (392 name HD1\*) 5.0  
(380 name HN ) (359 name HZ ) 3.5 (389 name HN ) (388 name HG1 ) 5.0  
(380 name HN ) (379 name HB1 ) 5.0 (389 name HN ) (388 name HG2 ) 5.0  
(381 name HN ) (359 name HE\* ) 5.0 (389 name HN ) (407 name HD\* ) 5.0  
(381 name HN ) (380 name HA ) 3.5 (389 name HA ) (407 name HD\* ) 5.0  
(381 name HN ) (383 name HN ) 5.0 (389 name HA ) (390 name HN ) 5.0  
(381 name HN ) (382 name HN ) 5.0 (389 name HG\* ) (390 name HN ) 5.0  
(382 name HA ) (386 name HD\* ) 5.0 (389 name HG\* ) (407 name HD\* ) 5.0  
(382 name HA ) (385 name HB\* ) 3.5 (389 name HG\* ) (403 name HG2\*) 5.0  
(382 name HG1 ) (386 name HD\* ) 5.0 (389 name HE\* ) (400 name HN ) 5.0  
(382 name HG2 ) (386 name HD\* ) 5.0 (389 name HE\* ) (390 name HN ) 3.5  
(382 name HN ) (380 name HB ) 5.0 (389 name HE\* ) (407 name HE ) 5.0  
(382 name HN ) (414 name HD1\*) 3.5 (389 name HE\* ) (400 name HA ) 2.7  
(382 name HN ) (383 name HN ) 3.5 (389 name HE\* ) (407 name HD\* ) 5.0  
(383 name HN ) (380 name HA ) 5.0 (389 name HE\* ) (394 name HG1 ) 5.0  
(383 name HN ) (380 name HB ) 5.0 (389 name HE\* ) (394 name HG2 ) 5.0  
(383 name HN ) (382 name HA ) 5.0 (389 name HE\* ) (393 name HD2\*) 5.0  
(383 name HN ) (382 name HB2 ) 3.5 (407 name HD\* ) (408 name HN ) 5.0  
(383 name HN ) (384 name HN ) 2.7 (407 name HD\* ) (404 name HA ) 5.0  
(384 name HD1\*) (359 name HE\* ) 5.0 (407 name HD\* ) (392 name HD1\*) 3.5  
(384 name HD1\*) (359 name HZ ) 5.0 (407 name HD\* ) (392 name HD2\*) 5.0  
(384 name HD1\*) (385 name HN ) 5.0 (407 name HD\* ) (403 name HG2\*) 3.5  
(384 name HD1\*) (410 name HB\* ) 3.5 (407 name HE ) (408 name HN ) 5.0  
(384 name HD2\*) (359 name HZ ) 5.0 (407 name HE ) (403 name HG2\*) 5.0

(384 name HD2\*) (378 name HN ) 5.0 (390 name HN ) (391 name HN ) 3.5  
(384 name HD2\*) (385 name HN ) 5.0 (390 name HN ) (388 name HA ) 5.0  
(384 name HD2\*) (410 name HB\* ) 5.0 (390 name HA ) (392 name HN ) 5.0  
(384 name HN ) (382 name HN ) 5.0 (391 name HN ) (392 name HN ) 2.7  
(384 name HN ) (385 name HN ) 2.7 (391 name HN ) (390 name HB1 ) 3.5  
(385 name HB\* ) (411 name HD\* ) 5.0 (391 name HN ) (390 name HB2 ) 3.5  
(385 name HB\* ) (411 name HE\* ) 3.5 (391 name HA ) (392 name HN ) 5.0  
(385 name HB\* ) (411 name HG1 ) 5.0 (391 name HB1 ) (387 name HG1\*) 5.0  
(385 name HB\* ) (411 name HG2 ) 3.5 (391 name HB2 ) (387 name HG1\*) 5.0  
(385 name HB\* ) (386 name HD\* ) 5.0 (392 name HN ) (387 name HG1\*) 5.0  
(385 name HB\* ) (386 name HE\* ) 3.5 (392 name HN ) (387 name HG2\*) 5.0  
(385 name HN ) (384 name HB2 ) 3.5 (392 name HN ) (391 name HG\* ) 5.0  
(385 name HN ) (386 name HN ) 2.7 (392 name HN ) (391 name HB1 ) 5.0  
(386 name HE\* ) (382 name HA ) 3.5 (392 name HN ) (391 name HB2 ) 5.0  
(386 name HE\* ) (382 name HB1 ) 5.0 (392 name HB1 ) (393 name HN ) 5.0  
(386 name HE\* ) (382 name HB2 ) 5.0 (392 name HB2 ) (393 name HN ) 5.0  
(386 name HE\* ) (382 name HG1 ) 3.5 (392 name HD1\*) (407 name HE ) 5.0  
(386 name HE\* ) (382 name HG2 ) 3.5 (392 name HD2\*) (384 name HA ) 5.0  
(386 name HE\* ) (382 name HN ) 5.0 (392 name HD2\*) (387 name HB ) 5.0  
(386 name HN ) (385 name HB\* ) 3.5 (392 name HD2\*) (395 name HG2\*) 5.0  
(386 name HN ) (387 name HN ) 2.7 (393 name HN ) (392 name HA ) 5.0  
(387 name HN ) (386 name HB1 ) 5.0 (393 name HA ) (394 name HN ) 3.5  
(388 name HD1 ) (387 name HA ) 3.5 (393 name HA ) (403 name HG1\*) 5.0  
(388 name HD1 ) (387 name HB ) 5.0 (393 name HB1 ) (390 name HA ) 3.5  
(388 name HD2 ) (387 name HA ) 3.5 (393 name HB1 ) (394 name HN ) 5.0  
(388 name HD2 ) (387 name HB ) 5.0 (393 name HB2 ) (394 name HN ) 5.0  
(389 name HA ) (392 name HB1 ) 5.0 (393 name HD2\*) (394 name HN ) 5.0  
(389 name HA ) (392 name HB2 ) 5.0 (393 name HD2\*) (399 name HA ) 3.5  
(389 name HN ) (388 name HA ) 5.0 (395 name HN ) (394 name HA ) 5.0  
(389 name HN ) (390 name HN ) 5.0 (395 name HN ) (394 name HB1 ) 5.0  
(390 name HA ) (393 name HB2 ) 3.5 (395 name HN ) (394 name HB2 ) 5.0  
(391 name HN ) (389 name HN ) 5.0 (395 name HN ) (394 name HG1 ) 5.0  
(391 name HN ) (390 name HA ) 5.0 (395 name HN ) (394 name HG2 ) 5.0  
(392 name HD2\*) (387 name HG1\*) 5.0 (395 name HB ) (396 name HN ) 5.0  
(392 name HD2\*) (403 name HG1\*) 5.0 (395 name HB ) (398 name HD2\*) 5.0  
(392 name HD2\*) (403 name HG2\*) 5.0 (395 name HG11) (396 name HN ) 5.0  
(392 name HN ) (390 name HN ) 5.0 (395 name HG12) (396 name HN ) 5.0  
(392 name HN ) (393 name HN ) 2.7 (395 name HD1\*) (396 name HN ) 5.0  
(393 name HN ) (390 name HA ) 5.0 (397 name HN ) (396 name HA ) 3.5  
(393 name HN ) (392 name HD2\*) 5.0 (397 name HN ) (396 name HB\* ) 3.5  
(393 name HN ) (394 name HN ) 5.0 (397 name HN ) (396 name HG\* ) 3.5  
(394 name HN ) (395 name HN ) 2.7 (398 name HN ) (396 name HB\* ) 5.0  
(395 name HD1\*) (392 name HD2\*) 3.5 (398 name HN ) (396 name HG\* ) 5.0  
(395 name HN ) (396 name HN ) 5.0 (398 name HA ) (403 name HG1\*) 5.0  
(396 name HN ) (395 name HA ) 3.5 (399 name HN ) (398 name HB1 ) 3.5  
(396 name HN ) (395 name HG2\*) 3.5 (399 name HN ) (398 name HB2 ) 5.0  
(396 name HN ) (397 name HN ) 5.0 (399 name HN ) (398 name HG ) 5.0  
(397 name HN ) (395 name HG2\*) 5.0 (399 name HN ) (398 name HD1\*) 5.0  
(397 name HN ) (398 name HN ) 2.7 (399 name HA ) (393 name HD1\*) 5.0  
(398 name HD2\*) (369 name HD\* ) 5.0 (399 name HA ) (401 name HD1 ) 5.0  
(398 name HD2\*) (369 name HE\* ) 3.5 (399 name HA ) (401 name HD2 ) 5.0  
(398 name HD2\*) (369 name HZ ) 3.5 (399 name HB1 ) (400 name HN ) 3.5  
(398 name HD2\*) (399 name HN ) 5.0 (399 name HB2 ) (400 name HN ) 3.5  
(398 name HN ) (395 name HG2\*) 5.0 (399 name HB1 ) (401 name HD1 ) 5.0  
(398 name HN ) (396 name HA ) 5.0 (399 name HB2 ) (401 name HD1 ) 5.0  
(398 name HN ) (397 name HA1 ) 3.5 (399 name HB1 ) (401 name HD2 ) 5.0  
(398 name HN ) (397 name HA2 ) 3.5 (399 name HB2 ) (401 name HD2 ) 5.0  
(398 name HN ) (399 name HN ) 5.0 (400 name HA ) (401 name HD2 ) 5.0  
(399 name HN ) (398 name HA ) 2.7 (400 name HA ) (402 name HN ) 5.0

(399 name HN ) (402 name HB ) 3.5 (400 name HA ) (403 name HG2\*) 5.0  
(399 name HN ) (402 name HG2\*) 5.0 (400 name HA ) (393 name HD2\*) 3.5  
(399 name HN ) (402 name HN ) 5.0 (400 name HA ) (403 name HB ) 3.5  
(399 name HN ) (403 name HN ) 5.0 (400 name HA ) (403 name HG1\*) 3.5  
(399 name HN ) (400 name HN ) 5.0 (400 name HB\*) (401 name HD1 ) 3.5  
(400 name HN ) (393 name HD2\*) 3.5 (400 name HB\*) (401 name HD2 ) 3.5  
(400 name HN ) (399 name HA ) 3.5 (400 name HB\*) (393 name HD2\*) 3.5  
(400 name HN ) (401 name HD1 ) 5.0 (401 name HA ) (402 name HN ) 5.0  
(400 name HN ) (401 name HD2 ) 5.0 (401 name HA ) (405 name HN ) 5.0  
(400 name HN ) (402 name HN ) 5.0 (401 name HA ) (404 name HG1 ) 5.0  
(401 name HA ) (404 name HB\*) 3.5 (401 name HA ) (404 name HG2 ) 5.0  
(402 name HA ) (405 name HB\*) 3.5 (402 name HN ) (399 name HA ) 5.0  
(402 name HN ) (401 name HB1 ) 5.0 (402 name HN ) (401 name HG1 ) 5.0  
(402 name HN ) (401 name HB2 ) 5.0 (402 name HN ) (401 name HG2 ) 5.0  
(402 name HN ) (401 name HD1 ) 5.0 (402 name HA ) (403 name HN ) 5.0  
(402 name HN ) (401 name HD2 ) 5.0 (402 name HA ) (405 name HN ) 5.0  
(402 name HN ) (404 name HN ) 5.0 (402 name HB ) (403 name HN ) 5.0  
(403 name HA ) (406 name HB2 ) 3.5 (402 name HB ) (398 name HA ) 5.0  
(403 name HN ) (400 name HA ) 5.0 (402 name HB ) (403 name HG1\*) 5.0  
(403 name HN ) (400 name HN ) 5.0 (402 name HB ) (398 name HD1\*) 5.0  
(403 name HN ) (402 name HG2\*) 5.0 (402 name HB ) (398 name HD2\*) 5.0  
(403 name HN ) (404 name HN ) 3.5 (402 name HG2\*) (369 name HE\* ) 3.5  
(404 name HA ) (407 name HB\*) 5.0 (402 name HG2\*) (369 name HZ ) 2.7  
(404 name HN ) (401 name HA ) 5.0 (403 name HN ) (405 name HN ) 5.0  
(404 name HN ) (403 name HA ) 5.0 (403 name HN ) (402 name HN ) 3.5  
(404 name HN ) (403 name HB ) 3.5 (403 name HA ) (406 name HN ) 5.0  
(404 name HN ) (403 name HG1\*) 3.5 (403 name HA ) (406 name HD1\*) 5.0  
(404 name HN ) (403 name HG2\*) 5.0 (403 name HA ) (406 name HB1 ) 3.5  
(404 name HN ) (405 name HB\*) 5.0 (403 name HA ) (406 name HG ) 5.0  
(404 name HN ) (405 name HN ) 3.5 (403 name HA ) (402 name HG2\*) 5.0  
(405 name HN ) (403 name HA ) 5.0 (403 name HB ) (393 name HD2\*) 5.0  
(405 name HN ) (406 name HN ) 3.5 (403 name HB ) (392 name HD1\*) 5.0  
(406 name HN ) (407 name HN ) 5.0 (403 name HB ) (389 name HE\* ) 5.0  
(407 name HA ) (410 name HB\*) 3.5 (403 name HG1\*) (389 name HE\* ) 5.0  
(409 name HA ) (412 name HB\*) 3.5 (403 name HG1\*) (400 name HN ) 5.0  
(409 name HN ) (410 name HN ) 3.5 (403 name HG2\*) (389 name HE\* ) 5.0  
(410 name HA ) (413 name HB\*) 3.5 (403 name HG2\*) (392 name HB1 ) 5.0  
(410 name HN ) (408 name HN ) 5.0 (403 name HG2\*) (392 name HB2 ) 5.0  
(410 name HN ) (411 name HN ) 3.5 (403 name HG2\*) (392 name HD1\*) 5.0  
(411 name HA ) (414 name HB1 ) 3.5 (404 name HN ) (406 name HN ) 5.0  
(411 name HA ) (414 name HB2 ) 3.5 (404 name HN ) (400 name HA ) 5.0  
(411 name HN ) (412 name HN ) 3.5 (404 name HG1 ) (405 name HN ) 5.0  
(412 name HN ) (413 name HN ) 5.0 (404 name HG2 ) (405 name HN ) 5.0  
(413 name HA ) (416 name HB ) 3.5 (406 name HN ) (405 name HA ) 3.5  
(413 name HN ) (412 name HA ) 5.0 (406 name HN ) (404 name HA ) 5.0  
(413 name HN ) (415 name HN ) 5.0 (406 name HA ) (409 name HD1 ) 5.0  
(413 name HN ) (414 name HN ) 3.5 (406 name HA ) (409 name HD2 ) 5.0  
(414 name HA ) (417 name HB ) 5.0 (406 name HB1 ) (407 name HN ) 5.0  
(414 name HN ) (415 name HN ) 5.0 (406 name HB2 ) (407 name HN ) 5.0  
(415 name HN ) (416 name HN ) 3.5 (406 name HD1\*) (369 name HE\* ) 3.5  
(416 name HA ) (419 name HB\*) 3.5 (406 name HD1\*) (369 name HZ ) 3.5  
(416 name HN ) (417 name HN ) 3.5 (406 name HD1\*) (363 name HD2\*) 5.0  
(417 name HD1\*) (362 name HD\*) 5.0 (406 name HD1\*) (384 name HD1\*) 5.0  
(417 name HD1\*) (362 name HE\*) 5.0 (406 name HD2\*) (369 name HE\* ) 3.5  
(417 name HD1\*) (381 name HD2\*) 3.5 (406 name HD2\*) (369 name HZ ) 3.5  
(417 name HD1\*) (413 name HB\*) 5.0 (406 name HD2\*) (373 name HD1\*) 5.0  
(417 name HD1\*) (414 name HD2\*) 5.0 (407 name HA ) (385 name HA ) 5.0  
(417 name HD1\*) (416 name HA ) 5.0 (407 name HA ) (408 name HN ) 5.0  
(417 name HD1\*) (416 name HN ) 5.0 (407 name HA ) (409 name HN ) 5.0

(417 name HD1\* ) (418 name HN ) 5.0 (407 name HA ) (410 name HN ) 5.0  
(417 name HN ) (418 name HN ) 3.5 (407 name HA ) (411 name HN ) 5.0  
(418 name HN ) (419 name HN ) 5.0 (407 name HB\* ) (408 name HN ) 5.0  
(419 name HN ) (420 name HN ) 5.0 (407 name HG\* ) (408 name HN ) 5.0  
(420 name HA ) (423 name HB\* ) 3.5 (408 name HN ) (404 name HA ) 5.0  
(421 name HA ) (424 name HB\* ) 3.5 (408 name HN ) (405 name HA ) 5.0  
(421 name HN ) (422 name HN ) 3.5 (408 name HN ) (406 name HN ) 5.0  
(424 name HN ) (425 name HN ) 5.0 (408 name HN ) (409 name HN ) 3.5  
(425 name HN ) (426 name HN ) 5.0 (408 name HN ) (407 name HN ) 5.0  
(353 name HN ) (355 name HN ) 5.0 (408 name HG\* ) (412 name HD21) 3.5  
(353 name HN ) (352 name HA ) 5.0 (408 name HG\* ) (412 name HD22) 3.5  
(353 name HA ) (354 name HN ) 3.5 (409 name HN ) (408 name HA ) 5.0  
(353 name HA ) (355 name HN ) 5.0 (409 name HN ) (406 name HA ) 5.0  
(354 name HN ) (355 name HN ) 3.5 (409 name HN ) (408 name HB\* ) 5.0  
(355 name HN ) (374 name HG2\* ) 5.0 (409 name HN ) (408 name HG\* ) 5.0  
(356 name HN ) (353 name HA ) 5.0 (409 name HN ) (363 name HD1\* ) 5.0  
(356 name HN ) (355 name HA ) 3.5 (409 name HA ) (363 name HD1\* ) 5.0  
(356 name HN ) (355 name HB\* ) 3.5 (409 name HA ) (410 name HN ) 5.0  
(356 name HN ) (374 name HG1\* ) 5.0 (409 name HA ) (412 name HN ) 5.0  
(356 name HA ) (370 name HB\* ) 5.0 (409 name HA ) (413 name HN ) 5.0  
(356 name HA ) (374 name HG1\* ) 5.0 (409 name HA ) (412 name HD21) 5.0  
(356 name HG2\* ) (355 name HB\* ) 5.0 (409 name HE ) (363 name HA ) 5.0  
(356 name HD1\* ) (355 name HB\* ) 5.0 (409 name HE ) (363 name HD1\* ) 5.0  
(357 name HN ) (355 name HA ) 5.0 (410 name HN ) (412 name HN ) 5.0  
(357 name HN ) (355 name HB\* ) 5.0 (410 name HN ) (409 name HB\* ) 5.0  
(357 name HN ) (353 name HA ) 5.0 (410 name HN ) (409 name HG1 ) 5.0  
(358 name HN ) (355 name HA ) 3.5 (410 name HN ) (409 name HG2 ) 5.0  
(358 name HN ) (357 name HB\* ) 3.5 (410 name HN ) (384 name HD1\* ) 5.0  
(358 name HA ) (360 name HN ) 5.0 (410 name HN ) (363 name HD2\* ) 5.0  
(358 name HA ) (359 name HN ) 3.5 (410 name HN ) (385 name HB\* ) 5.0  
(358 name HA ) (361 name HN ) 5.0 (410 name HB\* ) (411 name HN ) 5.0  
(358 name HA ) (362 name HD\* ) 3.5 (410 name HB\* ) (407 name HD\* ) 5.0  
(358 name HA ) (362 name HE\* ) 5.0 (411 name HN ) (408 name HA ) 5.0  
(359 name HN ) (362 name HB2 ) 5.0 (411 name HN ) (409 name HA ) 5.0  
(359 name HA ) (360 name HN ) 5.0 (411 name HN ) (410 name HA ) 5.0  
(359 name HA ) (381 name HD1\* ) 5.0 (411 name HN ) (363 name HD1\* ) 5.0  
(359 name HA ) (363 name HD1\* ) 5.0 (411 name HN ) (385 name HB\* ) 5.0  
(359 name HB1 ) (360 name HN ) 5.0 (411 name HA ) (412 name HN ) 5.0  
(359 name HB2 ) (360 name HN ) 5.0 (411 name HA ) (415 name HN ) 5.0  
(359 name HB2 ) (370 name HA ) 5.0 (411 name HB\* ) (412 name HN ) 5.0  
(360 name HA ) (362 name HN ) 5.0 (411 name HG1 ) (412 name HN ) 5.0  
(360 name HA ) (364 name HN ) 5.0 (411 name HG2 ) (412 name HN ) 5.0  
(360 name HA ) (365 name HG2\* ) 5.0 (412 name HA ) (415 name HN ) 3.5  
(360 name HA ) (370 name HB\* ) 5.0 (413 name HN ) (410 name HA ) 5.0  
(360 name HA ) (357 name HA ) 5.0 (413 name HN ) (412 name HB\* ) 5.0  
(361 name HA ) (362 name HN ) 5.0 (413 name HB\* ) (362 name HE\* ) 3.5  
(361 name HB1 ) (362 name HD\* ) 5.0 (413 name HB\* ) (362 name HD\* ) 3.5  
(361 name HB2 ) (362 name HD\* ) 5.0 (413 name HB\* ) (381 name HD1\* ) 5.0  
(361 name HB1 ) (362 name HE\* ) 5.0 (414 name HN ) (411 name HA ) 5.0  
(361 name HB2 ) (362 name HE\* ) 5.0 (414 name HN ) (412 name HA ) 5.0  
(361 name HG1 ) (362 name HN ) 5.0 (414 name HN ) (413 name HA ) 5.0  
(361 name HG2 ) (362 name HN ) 5.0 (414 name HN ) (410 name HA ) 5.0  
(361 name HG1 ) (362 name HD\* ) 5.0 (414 name HN ) (413 name HB\* ) 5.0  
(361 name HG2 ) (362 name HD\* ) 5.0 (414 name HB1 ) (415 name HN ) 5.0  
(361 name HG1 ) (362 name HE\* ) 5.0 (414 name HB2 ) (415 name HN ) 5.0  
(361 name HG2 ) (362 name HE\* ) 5.0 (414 name HD1\* ) (386 name HD\* ) 5.0  
(361 name HD1 ) (362 name HD\* ) 5.0 (414 name HD1\* ) (386 name HE\* ) 5.0  
(361 name HD2 ) (362 name HD\* ) 5.0 (414 name HD2\* ) (382 name HN ) 5.0  
(361 name HD1 ) (362 name HE\* ) 3.5 (415 name HN ) (413 name HA ) 5.0

(361 name HD2 ) (362 name HE\* ) 3.5 (415 name HN ) (417 name HN ) 5.0  
(362 name HN ) (361 name HB1 ) 5.0 (415 name HN ) (414 name HA ) 5.0  
(362 name HN ) (361 name HB2 ) 5.0 (415 name HN ) (412 name HB\* ) 5.0  
(362 name HN ) (361 name HN ) 3.5 (415 name HN ) (411 name HD\* ) 5.0  
(362 name HA ) (413 name HB\* ) 5.0 (415 name HB\* ) (412 name HA ) 5.0  
(362 name HA ) (363 name HN ) 5.0 (416 name HN ) (418 name HN ) 5.0  
(362 name HA ) (361 name HG1 ) 5.0 (416 name HN ) (415 name HB\* ) 3.5  
(362 name HA ) (361 name HG2 ) 5.0 (416 name HA ) (417 name HN ) 5.0  
(362 name HA ) (363 name HD1\* ) 5.0 (416 name HA ) (419 name HN ) 3.5  
(362 name HB1 ) (363 name HN ) 5.0 (416 name HB ) (417 name HN ) 3.5  
(362 name HB1 ) (413 name HB\* ) 5.0 (416 name HB ) (419 name HN ) 5.0  
(362 name HB1 ) (381 name HD1\* ) 5.0 (417 name HN ) (414 name HA ) 5.0  
(362 name HB1 ) (363 name HD1\* ) 5.0 (417 name HA ) (418 name HN ) 5.0  
(362 name HB1 ) (363 name HD2\* ) 5.0 (417 name HD1\* ) (420 name HN ) 5.0  
(362 name HB2 ) (363 name HN ) 5.0 (418 name HN ) (417 name HB ) 3.5  
(362 name HB2 ) (413 name HB\* ) 5.0 (419 name HN ) (417 name HN ) 5.0  
(362 name HB2 ) (381 name HD1\* ) 5.0 (419 name HN ) (417 name HA ) 5.0  
(362 name HB2 ) (363 name HD1\* ) 5.0 (419 name HN ) (418 name HA ) 5.0  
(362 name HB2 ) (363 name HD2\* ) 5.0 (419 name HN ) (418 name HB\* ) 5.0  
(363 name HA ) (409 name HD1 ) 3.5 (420 name HN ) (421 name HN ) 5.0  
(363 name HA ) (409 name HD2 ) 3.5 (420 name HN ) (419 name HA ) 5.0  
(363 name HA ) (364 name HN ) 5.0 (420 name HN ) (419 name HB\* ) 5.0  
(363 name HB1 ) (364 name HN ) 5.0 (420 name HN ) (419 name HG\* ) 5.0  
(363 name HB2 ) (364 name HN ) 5.0 (420 name HA ) (421 name HN ) 3.5  
(363 name HD1\* ) (364 name HN ) 5.0 (420 name HA ) (423 name HN ) 5.0  
(363 name HD1\* ) (410 name HN ) 5.0 (420 name HA ) (424 name HN ) 5.0  
(363 name HD1\* ) (409 name HD1 ) 5.0 (420 name HB\* ) (417 name HA ) 3.5  
(363 name HD1\* ) (409 name HD2 ) 5.0 (420 name HB\* ) (421 name HN ) 5.0  
(363 name HD1\* ) (384 name HD1\* ) 5.0 (420 name HB\* ) (423 name HN ) 5.0  
(363 name HD1\* ) (410 name HB\* ) 3.5 (421 name HN ) (423 name HN ) 5.0  
(363 name HD2\* ) (359 name HB1 ) 3.5 (422 name HN ) (423 name HN ) 5.0  
(363 name HD2\* ) (359 name HB2 ) 3.5 (422 name HN ) (421 name HA ) 5.0  
(363 name HD2\* ) (381 name HD1\* ) 5.0 (422 name HA ) (423 name HN ) 5.0  
(363 name HD2\* ) (365 name HG2\* ) 5.0 (424 name HN ) (423 name HN ) 5.0  
(364 name HN ) (409 name HD1 ) 5.0 (424 name HN ) (423 name HA ) 5.0  
(364 name HN ) (409 name HD2 ) 5.0 (424 name HN ) (423 name HB\* ) 5.0  
(364 name HN ) (363 name HD2\* ) 5.0 (424 name HN ) (423 name HG\* ) 5.0  
(364 name HN ) (365 name HG2\* ) 5.0 (424 name HN ) (421 name HB\* ) 5.0  
(364 name HN ) (365 name HD1\* ) 5.0 (379 name HA ) (359 name HZ ) 2.7  
(364 name HB2 ) (409 name HD1 ) 5.0 (380 name HA ) (359 name HZ ) 5.0  
(364 name HB2 ) (409 name HD2 ) 5.0 (381 name HA ) (359 name HZ ) 5.0  
(365 name HN ) (366 name HN ) 5.0 (378 name HB1 ) (359 name HZ ) 5.0  
(365 name HN ) (364 name HA ) 3.5 (378 name HB2 ) (359 name HZ ) 5.0  
(365 name HN ) (364 name HB1 ) 5.0 (384 name HG ) (359 name HZ ) 5.0  
(365 name HN ) (364 name HB2 ) 5.0 (363 name HD2\* ) (359 name HD\* ) 3.5  
(365 name HN ) (363 name HD2\* ) 5.0 (378 name HD\* ) (392 name HD2\* ) 5.0  
(365 name HN ) (370 name HB\* ) 5.0 (378 name HD\* ) (383 name HB1 ) 2.7  
(365 name HB ) (369 name HD\* ) 5.0 (378 name HD\* ) (383 name HB2 ) 5.0  
(365 name HB ) (369 name HB1 ) 5.0 (378 name HD\* ) (384 name HG ) 5.0  
(365 name HB ) (369 name HB2 ) 5.0 (378 name HD\* ) (384 name HA ) 5.0  
(365 name HG2\* ) (369 name HD\* ) 3.5 (378 name HD\* ) (373 name HA ) 5.0  
(365 name HG2\* ) (369 name HE\* ) 3.5 (378 name HD\* ) (395 name HD1\* ) 3.5  
(365 name HG2\* ) (369 name HB1 ) 5.0 (359 name HE\* ) (380 name HA ) 5.0  
(365 name HG2\* ) (369 name HB2 ) 5.0 (359 name HE\* ) (381 name HA ) 3.5  
(406 name HD2\* ) (403 name HA ) 5.0 (359 name HE\* ) (378 name HB1 ) 5.0  
(406 name HD2\* ) (402 name HG2\* ) 5.0 (359 name HE\* ) (378 name HB2 ) 5.0  
(406 name HD2\* ) (373 name HD2\* ) 5.0 (359 name HE\* ) (379 name HA ) 3.5  
(406 name HD2\* ) (384 name HD1\* ) 5.0 (359 name HE\* ) (381 name HD2\* ) 5.0  
(365 name HD1\* ) (369 name HB1 ) 5.0 (359 name HE\* ) (381 name HD1\* ) 3.5

(365 name HD1\* ) (369 name HB2 ) 5.0 (359 name HE\* ) (363 name HD2\*) 5.0  
(365 name HD1\* ) (370 name HB\* ) 3.5 (359 name HE\* ) (373 name HB2 ) 2.7  
(365 name HD1\* ) (359 name HD\* ) 3.5 (359 name HE\* ) (381 name HG ) 3.5  
(366 name HN ) (367 name HN ) 5.0 (396 name HN ) (394 name HA ) 3.5  
(366 name HB1 ) (367 name HN ) 3.5 (370 name HN ) (356 name HD1\*) 5.0  
(366 name HB2 ) (367 name HN ) 3.5 (370 name HN ) (356 name HG2\*) 5.0  
(367 name HA ) (360 name HG2\*) 3.5 (374 name HN ) (359 name HE\* ) 5.0  
(367 name HA ) (356 name HG2\*) 5.0 (374 name HN ) (359 name HD\* ) 5.0  
(360 name HG2\*) (367 name HN ) 5.0 (380 name HN ) (383 name HB1 ) 5.0  
(360 name HG2\*) (366 name HN ) 5.0 (380 name HN ) (383 name HB2 ) 5.0  
(360 name HG2\*) (365 name HN ) 5.0 (380 name HN ) (383 name HG\* ) 5.0  
(360 name HG2\*) (367 name HG\* ) 5.0 (386 name HN ) (387 name HB ) 5.0  
(360 name HG2\*) (356 name HG2\*) 5.0 (407 name HE ) (389 name HA ) 5.0  
(360 name HG2\*) (365 name HD1\*) 5.0 (409 name HE ) (405 name HB\* ) 3.5  
(360 name HG2\*) (366 name HA ) 5.0 (386 name HE\* ) (385 name HN ) 5.0  
(368 name HA ) (369 name HN ) 5.0 (386 name HE\* ) (411 name HG2 ) 5.0  
(368 name HB2 ) (369 name HN ) 3.5 (386 name HE\* ) (411 name HD\* ) 5.0  
(369 name HN ) (370 name HB\* ) 5.0 (393 name HN ) (389 name HE\* ) 5.0  
(369 name HN ) (365 name HD1\*) 5.0 (379 name HN ) (359 name HE\* ) 5.0  
(370 name HA ) (359 name HD\* ) 5.0 (379 name HN ) (359 name HZ ) 5.0  
(370 name HB\* ) (360 name HG2\*) 5.0 (379 name HB1 ) (359 name HZ ) 5.0  
(370 name HB\* ) (356 name HG2\*) 3.5 (379 name HB2 ) (359 name HZ ) 5.0  
(370 name HB\* ) (365 name HG2\*) 5.0 (380 name HN ) (384 name HN ) 5.0  
(371 name HA ) (375 name HN ) 5.0 (380 name HN ) (359 name HE\* ) 5.0  
(371 name HA ) (374 name HN ) 3.5 (381 name HN ) (359 name HD\* ) 5.0  
(371 name HA ) (372 name HN ) 5.0 (381 name HD2\*) (414 name HN ) 3.5  
(371 name HA ) (373 name HN ) 5.0 (381 name HD2\*) (410 name HA ) 3.5  
(371 name HA ) (356 name HA ) 5.0 (382 name HA ) (414 name HD2\*) 5.0  
(371 name HA ) (370 name HB\* ) 5.0 (382 name HG1 ) (383 name HN ) 5.0  
(371 name HA ) (356 name HG2\*) 5.0 (382 name HG2 ) (383 name HN ) 5.0  
(371 name HA ) (356 name HD1\*) 3.5 (383 name HN ) (381 name HA ) 5.0  
(371 name HB ) (372 name HN ) 3.5 (383 name HN ) (380 name HG2\*) 5.0  
(371 name HB ) (372 name HG1\*) 5.0 (383 name HN ) (382 name HB1 ) 3.5  
(371 name HB ) (375 name HN ) 5.0 (383 name HA ) (386 name HD\* ) 5.0  
(371 name HB ) (375 name HG1 ) 3.5 (384 name HN ) (378 name HD\* ) 3.5  
(371 name HB ) (375 name HG2 ) 3.5 (384 name HN ) (359 name HZ ) 5.0  
(371 name HB ) (356 name HD1\*) 3.5 (384 name HN ) (410 name HB\* ) 5.0  
(372 name HN ) (374 name HN ) 5.0 (384 name HD1\*) (373 name HB\* ) 5.0  
(372 name HN ) (369 name HD\* ) 5.0 (384 name HD1\*) (406 name HG ) 5.0  
(372 name HN ) (369 name HA ) 5.0 (385 name HA ) (410 name HN ) 5.0  
(372 name HA ) (375 name HN ) 3.5 (385 name HA ) (411 name HN ) 5.0  
(372 name HA ) (373 name HN ) 5.0 (385 name HA ) (411 name HB\* ) 5.0  
(372 name HA ) (375 name HB1 ) 3.5 (385 name HA ) (407 name HB\* ) 5.0  
(372 name HA ) (375 name HB2 ) 3.5 (385 name HA ) (407 name HG\* ) 5.0  
(372 name HA ) (375 name HG1 ) 5.0 (385 name HA ) (411 name HG1 ) 5.0  
(372 name HA ) (375 name HG2 ) 5.0 (385 name HA ) (411 name HG2 ) 5.0  
(372 name HG1\*) (375 name HN ) 5.0 (385 name HB\* ) (411 name HA ) 2.7  
(372 name HG1\*) (373 name HN ) 5.0 (385 name HB\* ) (386 name HA ) 5.0  
(372 name HG1\*) (369 name HD\* ) 5.0 (385 name HB\* ) (414 name HD1\*) 5.0  
(372 name HG1\*) (369 name HA ) 3.5 (385 name HB\* ) (412 name HN ) 5.0  
(373 name HN ) (371 name HN ) 5.0 (385 name HB\* ) (382 name HN ) 5.0  
(373 name HN ) (369 name HD\* ) 5.0 (385 name HB\* ) (411 name HB\* ) 5.0  
(373 name HN ) (359 name HE\* ) 5.0 (385 name HB\* ) (410 name HB\* ) 3.5

Mehrdeutige NOEs:

((417 name HD1\* ) ((358 name HG2\* ) or (416 name HG2\* )) 5.0  
((359 name HN ) ((358 name HG2\* ) or (416 name HG2\* )) 3.5  
((361 name HN ) ((358 name HG2\* ) or (416 name HG2\* )) 5.0  
((362 name HD\* ) ((358 name HG2\* ) or (416 name HG2\* )) 3.5

((362 name HE\* )) ((358 name HG2\*) or (416 name HG2\*)) 3.5  
 ((362 name HB1 )) ((358 name HG2\*) or (416 name HG2\*)) 5.0  
 ((362 name HB2 )) ((358 name HG2\*) or (416 name HG2\*)) 5.0  
 ((359 name HA )) ((358 name HG2\*) or (416 name HG2\*)) 5.0  
 ((417 name HN )) ((358 name HG2\*) or (416 name HG2\*)) 3.5

### C.3.1.2. *Beschränkung der Diederwinkel aus skalaren Kopplungen.*

(352 name c) (353 name n) (353 name ca) (353 name c) -60 20  
 (355 name c) (356 name n) (356 name ca) (356 name c) -60 20  
 (356 name c) (357 name n) (357 name ca) (357 name c) -60 20  
 (357 name c) (358 name n) (358 name ca) (358 name c) -60 20  
 (359 name c) (360 name n) (360 name ca) (360 name c) -60 20  
 (361 name c) (362 name n) (362 name ca) (362 name c) -120 40  
 (366 name c) (367 name n) (367 name ca) (367 name c) -60 20  
 (367 name c) (368 name n) (368 name ca) (368 name c) -60 20  
 (369 name c) (370 name n) (370 name ca) (370 name c) -60 20  
 (370 name c) (371 name n) (371 name ca) (371 name c) -60 20  
 (371 name c) (372 name n) (372 name ca) (372 name c) -60 20  
 (372 name c) (373 name n) (373 name ca) (373 name c) -60 20  
 (373 name c) (374 name n) (374 name ca) (374 name c) -60 20  
 (374 name c) (375 name n) (375 name ca) (375 name c) -60 20  
 (380 name c) (381 name n) (381 name ca) (381 name c) -60 20  
 (381 name c) (382 name n) (382 name ca) (382 name c) -60 20  
 (382 name c) (383 name n) (383 name ca) (383 name c) -60 20  
 (383 name c) (384 name n) (384 name ca) (384 name c) -60 20  
 (386 name c) (387 name n) (387 name ca) (387 name c) -60 20  
 (388 name c) (389 name n) (389 name ca) (389 name c) -60 20  
 (389 name c) (390 name n) (390 name ca) (390 name c) -60 20  
 (392 name c) (393 name n) (393 name ca) (393 name c) -60 20  
 (397 name c) (398 name n) (398 name ca) (398 name c) -120 40  
 (398 name c) (399 name n) (399 name ca) (399 name c) -120 40  
 (401 name c) (402 name n) (402 name ca) (402 name c) -60 20  
 (402 name c) (403 name n) (403 name ca) (403 name c) -60 20  
 (403 name c) (404 name n) (404 name ca) (404 name c) -60 20  
 (407 name c) (408 name n) (408 name ca) (408 name c) -60 20  
 (408 name c) (409 name n) (409 name ca) (409 name c) -60 20  
 (409 name c) (410 name n) (410 name ca) (410 name c) -60 20  
 (410 name c) (411 name n) (411 name ca) (411 name c) -60 20  
 (412 name c) (413 name n) (413 name ca) (413 name c) -60 20  
 (413 name c) (414 name n) (414 name ca) (414 name c) -60 20  
 (414 name c) (415 name n) (415 name ca) (415 name c) -60 20  
 (415 name c) (416 name n) (416 name ca) (416 name c) -60 20  
 (416 name c) (417 name n) (417 name ca) (417 name c) -60 20  
 (418 name c) (419 name n) (419 name ca) (419 name c) -60 20  
 (419 name c) (420 name n) (420 name ca) (420 name c) -60 20  
 (421 name c) (422 name n) (422 name ca) (422 name c) -60 20

### C.3.1.3. *Abstandsbeschränkungen aus H/D–Austauschexperimenten.*

(354 name HN) (351 name O) 2.3 (386 name N ) (382 name O) 3.3  
 (354 name N ) (351 name O) 3.3 (393 name HN) (389 name O) 2.3



(360 name HN)	(356 name O)	2.3	(393 name N )	(389 name O)	3.3
(360 name N )	(356 name O)	3.3	(395 name HN)	(392 name O)	2.3
(361 name HN)	(358 name O)	2.3	(395 name N )	(392 name O)	3.3
(361 name N )	(358 name O)	3.3	(403 name HN)	(399 name O)	2.3
(361 name HN)	(357 name O)	2.3	(403 name N )	(399 name O)	3.3
(361 name N )	(357 name O)	3.3	(404 name HN)	(400 name O)	2.3
(362 name HN)	(358 name O)	2.3	(404 name N )	(400 name O)	3.3
(362 name N )	(358 name O)	3.3	(406 name HN)	(402 name O)	2.3
(370 name HN)	(366 name O)	2.3	(406 name N )	(402 name O)	3.3
(370 name N )	(366 name O)	3.3	(408 name HN)	(404 name O)	2.3
(374 name HN)	(370 name O)	2.3	(408 name N )	(404 name O)	3.3
(374 name N )	(370 name O)	3.3	(410 name HN)	(407 name O)	2.3
(378 name HN)	(373 name O)	2.3	(410 name N )	(407 name O)	3.3
(378 name N )	(373 name O)	3.3	(414 name HN)	(410 name O)	2.3
(385 name HN)	(381 name O)	2.3	(414 name N )	(410 name O)	3.3
(385 name N )	(381 name O)	3.3	(415 name HN)	(411 name O)	2.3
(386 name HN)	(382 name O)	2.3	(415 name N )	(411 name O)	3.3

#### C.3.1.4. *Beschränkungen aus dipolaren Restkopplungen.*

(353 name N)	(353 name HN)	-8.170	(380 name N)	(380 name HN)	2.622
(354 name N)	(354 name HN)	-9.563	(381 name N)	(381 name HN)	8.894
(356 name N)	(356 name HN)	-8.281	(382 name N)	(382 name HN)	0.393
(360 name N)	(360 name HN)	-10.794	(384 name N)	(384 name HN)	2.473
(362 name N)	(362 name HN)	-8.731	(389 name N)	(389 name HN)	-2.378
(364 name N)	(364 name HN)	7.939	(390 name N)	(390 name HN)	-4.107
(365 name N)	(365 name HN)	6.346	(392 name N)	(392 name HN)	-3.077
(367 name N)	(367 name HN)	-10.436	(394 name N)	(394 name HN)	14.566
(368 name N)	(368 name HN)	-11.557	(395 name N)	(395 name HN)	6.011
(369 name N)	(369 name HN)	-7.970	(396 name N)	(396 name HN)	-9.811
(370 name N)	(370 name HN)	-11.497	(398 name N)	(398 name HN)	-8.386
(371 name N)	(271 name HN)	-9.790	(400 name N)	(400 name HN)	17.234
(372 name N)	(372 name HN)	-11.368	(403 name N)	(403 name HN)	16.408
(373 name N)	(373 name HN)	-10.383	(404 name N)	(404 name HN)	17.542
(374 name N)	(374 name HN)	-10.056	(408 name N)	(408 name HN)	18.638
(375 name N)	(375 name HN)	-10.689	(410 name N)	(410 name HN)	18.976
(376 name N)	(376 name HN)	-12.339	(414 name N)	(414 name HN)	14.108
(378 name N)	(378 name HN)	6.307	(415 name N)	(415 name HN)	16.362
(379 name N)	(379 name HN)	-10.795			

### C.3.2. **Randbedingungen für NusA(426–495).**

#### C.3.2.1. *Abstandsbeschränkungen aus NOESY-Experimenten.*

(431 name HN )	(434 name HN )	5.0	(490 name HA )	(491 name HN )	3.5
(432 name HB*)	(431 name HA )	5.0	(490 name HB1 )	(491 name HN )	3.5
(440 name HG1*)	(435 name HA )	5.0	(490 name HB2 )	(491 name HN )	3.5
(441 name HN )	(440 name HB )	5.0	(490 name HN )	(491 name HN )	3.5
(443 name HA )	(446 name HD*)	5.0	(491 name HA )	(492 name HN )	3.5
(453 name HG2*)	(458 name HB1 )	5.0	(491 name HN )	(492 name HN )	3.5
(453 name HG2*)	(458 name HB2 )	5.0	(492 name HN )	(490 name HB1 )	5.0

(455 name HN ) (456 name HN ) 5.0 (492 name HN ) (490 name HB2 ) 5.0  
(459 name HN ) (460 name HN ) 3.5 (492 name HN ) (491 name HB1 ) 3.5  
(466 name HN ) (465 name HB1 ) 5.0 (492 name HN ) (491 name HB2 ) 3.5  
(466 name HN ) (465 name HB2 ) 5.0 (492 name HN ) (493 name HN ) 5.0  
(470 name HG2\*) (447 name HB1 ) 5.0 (430 name HA ) (431 name HN ) 3.5  
(470 name HG2\*) (447 name HB2 ) 5.0 (430 name HA ) (454 name HB1 ) 5.0  
(472 name HN ) (471 name HA ) 2.7 (430 name HA ) (431 name HB\* ) 5.0  
(472 name HN ) (471 name HG1 ) 3.5 (430 name HA ) (445 name HB\* ) 5.0  
(472 name HN ) (471 name HG2 ) 3.5 (430 name HB1 ) (431 name HN ) 5.0  
(476 name HN ) (477 name HN ) 3.5 (430 name HB2 ) (431 name HN ) 5.0  
(477 name HN ) (478 name HN ) 2.7 (430 name HB2 ) (445 name HB\* ) 5.0  
(478 name HN ) (475 name HA ) 5.0 (430 name HD2 ) (429 name HA ) 3.5  
(485 name HA ) (437 name HD1\*) 3.5 (430 name HD1 ) (429 name HB1 ) 5.0  
(486 name HG2 ) (490 name HZ2 ) 5.0 (430 name HD2 ) (429 name HB1 ) 5.0  
(487 name HN ) (488 name HN ) 3.5 (430 name HD1 ) (429 name HB2 ) 5.0  
(489 name HA ) (488 name HG2\*) 3.5 (430 name HD2 ) (429 name HB2 ) 5.0  
(489 name HN ) (456 name HD1\*) 5.0 (430 name HD1 ) (429 name HG\* ) 5.0  
(491 name HB1 ) (487 name HA ) 5.0 (430 name HD2 ) (429 name HG\* ) 5.0  
(491 name HB2 ) (487 name HA ) 3.5 (431 name HN ) (434 name HB1 ) 5.0  
(426 name HA\* ) (427 name HN ) 2.7 (431 name HN ) (434 name HB2 ) 5.0  
(426 name HA\* ) (428 name HN ) 3.5 (431 name HA ) (432 name HN ) 3.5  
(426 name HN ) (427 name HN ) 5.0 (431 name HA ) (455 name HG2\*) 5.0  
(427 name HN ) (428 name HN ) 5.0 (431 name HB\* ) (455 name HA ) 3.5  
(428 name HD21) (452 name HA1 ) 5.0 (434 name HD2\*) (459 name HD2\*) 5.0  
(428 name HD21) (452 name HA2 ) 5.0 (434 name HD1\*) (459 name HD2\*) 5.0  
(428 name HD21) (452 name HN ) 5.0 (434 name HD2\*) (481 name HD2\*) 5.0  
(428 name HD22) (452 name HA1 ) 5.0 (432 name HN ) (431 name HB\* ) 3.5  
(428 name HD22) (452 name HA2 ) 5.0 (432 name HA ) (433 name HN ) 5.0  
(428 name HD22) (452 name HN ) 5.0 (432 name HA ) (435 name HD2\*) 3.5  
(428 name HN ) (429 name HN ) 5.0 (432 name HB\* ) (433 name HN ) 3.5  
(430 name HD1 ) (429 name HA ) 2.7 (432 name HB\* ) (436 name HD21) 5.0  
(431 name HA ) (433 name HN ) 5.0 (432 name HB\* ) (436 name HD22) 3.5  
(431 name HB\* ) (433 name HN ) 5.0 (432 name HB\*) (435 name HD2\*) 5.0  
(431 name HB\* ) (434 name HN ) 3.5 (433 name HN ) (435 name HN ) 5.0  
(431 name HB\* ) (455 name HB ) 5.0 (433 name HA ) (434 name HN ) 5.0  
(431 name HB\* ) (455 name HG2\*) 2.7 (433 name HA ) (436 name HD21) 5.0  
(431 name HN ) (432 name HN ) 5.0 (433 name HA ) (436 name HD22) 5.0  
(431 name HN ) (433 name HN ) 5.0 (434 name HN ) (431 name HA ) 5.0  
(431 name HN ) (435 name HN ) 5.0 (434 name HN ) (433 name HB1 ) 5.0  
(431 name HN ) (455 name HA ) 3.5 (434 name HN ) (433 name HB2 ) 5.0  
(432 name HA ) (435 name HB1 ) 3.5 (435 name HN ) (432 name HA ) 3.5  
(432 name HA ) (435 name HB2 ) 5.0 (435 name HN ) (434 name HB1 ) 3.5  
(432 name HB\* ) (431 name HB\* ) 5.0 (435 name HN ) (434 name HB2 ) 3.5  
(432 name HN ) (433 name HN ) 3.5 (435 name HA ) (445 name HB\* ) 3.5  
(433 name HA ) (436 name HB1 ) 5.0 (435 name HB1 ) (436 name HN ) 3.5  
(433 name HA ) (436 name HB2 ) 5.0 (435 name HB2 ) (436 name HN ) 3.5  
(433 name HN ) (434 name HN ) 2.7 (435 name HB1 ) (436 name HD21) 5.0  
(434 name HA ) (435 name HN ) 3.5 (435 name HB2 ) (436 name HD21) 5.0  
(434 name HN ) (432 name HN ) 5.0 (435 name HG ) (432 name HA ) 5.0  
(434 name HN ) (435 name HN ) 3.5 (435 name HD1\*) (445 name HB\* ) 2.7  
(435 name HA ) (436 name HN ) 3.5 (435 name HD1\*) (430 name HD1 ) 5.0  
(435 name HA ) (437 name HN ) 5.0 (435 name HD2\*) (430 name HD1 ) 5.0  
(435 name HA ) (440 name HB ) 5.0 (435 name HD2\*) (430 name HD2 ) 5.0  
(435 name HD1\*) (442 name HA ) 2.7 (435 name HD2\*) (436 name HN ) 5.0  
(435 name HN ) (436 name HN ) 3.5 (436 name HB1 ) (437 name HN ) 5.0  
(436 name HN ) (437 name HN ) 2.7 (436 name HB2 ) (437 name HN ) 3.5  
(437 name HN ) (438 name HN ) 5.0 (436 name HD21) (432 name HN ) 5.0  
(438 name HN ) (439 name HN ) 5.0 (436 name HD22) (432 name HN ) 5.0  
(439 name HN ) (440 name HN ) 2.7 (437 name HN ) (435 name HN ) 5.0

(440 name HA ) (444 name HB1 ) 3.5 (437 name HN ) (436 name HA ) 3.5  
(440 name HG1\* ) (441 name HA ) 5.0 (437 name HA ) (438 name HN ) 2.7  
(440 name HN ) (438 name HA ) 5.0 (437 name HB1 ) (438 name HN ) 5.0  
(440 name HN ) (438 name HG\* ) 5.0 (437 name HB2 ) (438 name HN ) 5.0  
(440 name HN ) (439 name HA1 ) 3.5 (437 name HB1 ) (440 name HB ) 5.0  
(440 name HN ) (439 name HA2 ) 3.5 (437 name HB2 ) (440 name HB ) 5.0  
(440 name HN ) (444 name HD1\* ) 5.0 (437 name HG ) (438 name HN ) 5.0  
(440 name HN ) (441 name HN ) 5.0 (438 name HN ) (437 name HD1\* ) 5.0  
(442 name HN ) (443 name HN ) 2.7 (438 name HN ) (437 name HD2\* ) 5.0  
(443 name HN ) (444 name HN ) 5.0 (438 name HA ) (439 name HN ) 5.0  
(444 name HD1\* ) (440 name HA ) 3.5 (438 name HG\* ) (439 name HN ) 5.0  
(444 name HN ) (445 name HN ) 2.7 (438 name HB1 ) (439 name HN ) 5.0  
(445 name HB\* ) (430 name HB1 ) 5.0 (438 name HB2 ) (439 name HN ) 5.0  
(445 name HB\* ) (430 name HD1 ) 5.0 (439 name HA1 ) (481 name HD1\* ) 3.5  
(445 name HB\* ) (440 name HG1\* ) 2.7 (439 name HA2 ) (481 name HD1\* ) 3.5  
(445 name HB\* ) (442 name HA ) 3.5 (439 name HA1 ) (481 name HD2\* ) 3.5  
(445 name HB\* ) (446 name HA ) 5.0 (439 name HA2 ) (481 name HD2\* ) 3.5  
(445 name HB\* ) (446 name HB\* ) 5.0 (440 name HA ) (444 name HN ) 5.0  
(445 name HB\* ) (446 name HD\* ) 5.0 (440 name HA ) (441 name HN ) 2.7  
(445 name HN ) (446 name HN ) 2.7 (440 name HB ) (456 name HD2\* ) 5.0  
(446 name HA ) (430 name HD1 ) 5.0 (440 name HB ) (445 name HB\* ) 5.0  
(446 name HA ) (430 name HD2 ) 5.0 (440 name HG2\* ) (481 name HD1\* ) 5.0  
(446 name HA ) (449 name HN ) 5.0 (444 name HD1\* ) (477 name HE1 ) 5.0  
(446 name HN ) (447 name HN ) 2.7 (444 name HD1\* ) (477 name HE2 ) 5.0  
(447 name HA ) (450 name HB\* ) 3.5 (444 name HD2\* ) (470 name HG2\* ) 3.5  
(447 name HN ) (446 name HA ) 5.0 (444 name HD2\* ) (470 name HD1\* ) 5.0  
(447 name HN ) (446 name HB\* ) 2.7 (441 name HN ) (442 name HN ) 5.0  
(447 name HN ) (448 name HN ) 2.7 (441 name HN ) (444 name HN ) 5.0  
(448 name HN ) (449 name HN ) 2.7 (441 name HN ) (444 name HD1\* ) 3.5  
(449 name HB\* ) (429 name HA ) 2.7 (441 name HA ) (442 name HB1 ) 5.0  
(449 name HB\* ) (430 name HA ) 5.0 (441 name HA ) (442 name HB2 ) 5.0  
(449 name HB\* ) (430 name HB1 ) 3.5 (441 name HA ) (444 name HN ) 5.0  
(449 name HB\* ) (430 name HB2 ) 3.5 (441 name HA ) (442 name HN ) 3.5  
(449 name HB\* ) (430 name HD1 ) 3.5 (441 name HB1 ) (442 name HN ) 3.5  
(449 name HB\* ) (430 name HD2 ) 3.5 (441 name HB2 ) (442 name HN ) 3.5  
(449 name HB\* ) (431 name HN ) 5.0 (442 name HA ) (443 name HN ) 3.5  
(449 name HB\* ) (446 name HA ) 3.5 (442 name HB1 ) (443 name HN ) 5.0  
(449 name HB\* ) (450 name HN ) 3.5 (442 name HB2 ) (443 name HN ) 5.0  
(449 name HB\* ) (454 name HA ) 3.5 (442 name HG1 ) (443 name HN ) 5.0  
(449 name HN ) (450 name HN ) 2.7 (442 name HG2 ) (443 name HN ) 5.0  
(450 name HN ) (451 name HN ) 3.5 (442 name HG1 ) (446 name HD\* ) 5.0  
(451 name HN ) (449 name HA ) 5.0 (442 name HG2 ) (446 name HD\* ) 5.0  
(451 name HN ) (449 name HN ) 5.0 (443 name HN ) (441 name HA ) 5.0  
(451 name HN ) (450 name HA ) 3.5 (443 name HN ) (441 name HB1 ) 5.0  
(451 name HN ) (452 name HN ) 2.7 (443 name HN ) (441 name HB2 ) 5.0  
(452 name HN ) (449 name HA ) 5.0 (443 name HA ) (446 name HB\* ) 3.5  
(452 name HN ) (451 name HA ) 3.5 (443 name HB1 ) (444 name HN ) 5.0  
(452 name HN ) (453 name HN ) 5.0 (443 name HB2 ) (444 name HN ) 5.0  
(453 name HN ) (449 name HA ) 5.0 (444 name HA ) (445 name HN ) 3.5  
(453 name HN ) (449 name HB\* ) 5.0 (444 name HA ) (447 name HB1 ) 3.5  
(453 name HA ) (458 name HB1 ) 3.5 (444 name HA ) (447 name HB2 ) 3.5  
(453 name HA ) (458 name HB2 ) 3.5 (444 name HB1 ) (445 name HN ) 5.0  
(453 name HG1\* ) (458 name HB1 ) 3.5 (444 name HB2 ) (445 name HN ) 5.0  
(453 name HG1\* ) (458 name HB2 ) 3.5 (444 name HD2\* ) (445 name HN ) 3.5  
(453 name HG1\* ) (459 name HA ) 5.0 (444 name HD2\* ) (447 name HN ) 5.0  
(453 name HG1\* ) (459 name HB1 ) 3.5 (444 name HD2\* ) (440 name HA ) 5.0  
(453 name HG1\* ) (459 name HB2 ) 3.5 (445 name HA ) (446 name HN ) 3.5  
(453 name HG1\* ) (462 name HE21 ) 3.5 (445 name HA ) (448 name HB1 ) 5.0  
(453 name HG1\* ) (462 name HE22 ) 3.5 (445 name HA ) (448 name HB2 ) 3.5

(453 name HG1\* ) (462 name HG1 ) 5.0 (445 name HB\* ) (446 name HN ) 3.5  
(453 name HG1\* ) (462 name HG2 ) 5.0 (445 name HB\* ) (446 name HE\* ) 5.0  
(453 name HG2\* ) (452 name HA1 ) 5.0 (446 name HN ) (443 name HA ) 3.5  
(453 name HG2\* ) (452 name HA2 ) 5.0 (446 name HN ) (443 name HB2 ) 5.0  
(453 name HG2\* ) (459 name HA ) 5.0 (446 name HD\* ) (449 name HB\* ) 5.0  
(453 name HG2\* ) (462 name HG1 ) 3.5 (446 name HD\* ) (435 name HD1\* ) 5.0  
(453 name HG2\* ) (462 name HG2 ) 3.5 (446 name HD\* ) (430 name HD1 ) 5.0  
(453 name HN ) (454 name HN ) 5.0 (446 name HE\* ) (430 name HD1 ) 5.0  
(454 name HA ) (431 name HN ) 3.5 (446 name HE\* ) (442 name HG1 ) 5.0  
(454 name HA ) (449 name HA ) 2.7 (446 name HE\* ) (442 name HG2 ) 5.0  
(454 name HA ) (455 name HN ) 3.5 (446 name HE\* ) (449 name HB\* ) 5.0  
(454 name HB1 ) (431 name HN ) 5.0 (446 name HE\* ) (435 name HD1\* ) 5.0  
(454 name HB1 ) (455 name HN ) 3.5 (446 name HZ ) (435 name HD1\* ) 5.0  
(454 name HB2 ) (431 name HN ) 5.0 (446 name HZ ) (442 name HG1 ) 5.0  
(454 name HB2 ) (455 name HN ) 5.0 (446 name HZ ) (442 name HG2 ) 5.0  
(454 name HN ) (455 name HN ) 3.5 (446 name HZ ) (430 name HD1 ) 5.0  
(455 name HG2\* ) (431 name HN ) 5.0 (447 name HN ) (443 name HA ) 5.0  
(455 name HG2\* ) (454 name HB1 ) 3.5 (447 name HA ) (448 name HN ) 5.0  
(455 name HG2\* ) (454 name HB2 ) 5.0 (447 name HA ) (450 name HN ) 5.0  
(456 name HD1\* ) (488 name HD1\* ) 5.0 (448 name HA ) (449 name HN ) 5.0  
(456 name HD1\* ) (488 name HG2\* ) 3.5 (448 name HB1 ) (453 name HB ) 5.0  
(456 name HN ) (457 name HN ) 3.5 (448 name HB2 ) (453 name HB ) 5.0  
(457 name HN ) (458 name HN ) 3.5 (448 name HD2\* ) (454 name HA ) 5.0  
(458 name HA ) (462 name HE22) 5.0 (449 name HN ) (448 name HB1 ) 5.0  
(458 name HN ) (459 name HN ) 5.0 (449 name HN ) (448 name HB2 ) 5.0  
(459 name HD2\* ) (482 name HA ) 3.5 (449 name HN ) (448 name HD1\* ) 5.0  
(459 name HD2\* ) (485 name HB\* ) 2.7 (449 name HN ) (448 name HD2\* ) 5.0  
(460 name HA ) (482 name HA ) 5.0 (449 name HB\* ) (451 name HN ) 5.0  
(460 name HB\* ) (490 name HE1 ) 3.5 (449 name HB\* ) (448 name HD2\* ) 5.0  
(460 name HN ) (461 name HN ) 3.5 (449 name HB\* ) (454 name HB1 ) 5.0  
(461 name HN ) (457 name HA ) 5.0 (449 name HB\* ) (428 name HB\* ) 3.5  
(461 name HN ) (458 name HA ) 5.0 (450 name HN ) (446 name HA ) 3.5  
(461 name HN ) (459 name HA ) 5.0 (450 name HN ) (449 name HA ) 3.5  
(461 name HN ) (460 name HA ) 3.5 (450 name HB\* ) (451 name HN ) 3.5  
(461 name HN ) (462 name HN ) 2.7 (451 name HN ) (448 name HA ) 5.0  
(462 name HE21) (453 name HG2\* ) 3.5 (451 name HN ) (453 name HN ) 5.0  
(462 name HE22) (453 name HG2\* ) 3.5 (453 name HN ) (452 name HA1 ) 3.5  
(462 name HN ) (463 name HN ) 5.0 (453 name HN ) (452 name HA2 ) 3.5  
(463 name HA1 ) (464 name HN ) 3.5 (453 name HA ) (454 name HN ) 3.5  
(463 name HA2 ) (464 name HN ) 3.5 (453 name HG1\* ) (448 name HD2\* ) 5.0  
(463 name HN ) (462 name HA ) 3.5 (453 name HG1\* ) (448 name HD1\* ) 5.0  
(463 name HN ) (462 name HB1 ) 3.5 (453 name HG1\* ) (459 name HD1\* ) 5.0  
(463 name HN ) (462 name HB2 ) 3.5 (453 name HG1\* ) (454 name HN ) 5.0  
(463 name HN ) (462 name HG1 ) 5.0 (453 name HG1\* ) (458 name HA ) 5.0  
(463 name HN ) (462 name HG2 ) 5.0 (453 name HG1\* ) (462 name HN ) 5.0  
(463 name HN ) (464 name HN ) 5.0 (453 name HG1\* ) (460 name HN ) 5.0  
(464 name HA ) (465 name HN ) 3.5 (453 name HG2\* ) (449 name HA ) 5.0  
(464 name HA ) (466 name HN ) 5.0 (454 name HA ) (430 name HA ) 5.0  
(464 name HB ) (465 name HN ) 3.5 (455 name HN ) (453 name HA ) 5.0  
(464 name HD1\* ) (479 name HA1 ) 3.5 (455 name HN ) (458 name HB1 ) 5.0  
(464 name HD1\* ) (479 name HA2 ) 3.5 (455 name HN ) (458 name HB2 ) 5.0  
(464 name HG11) (465 name HN ) 5.0 (455 name HN ) (458 name HA ) 5.0  
(464 name HG12) (465 name HN ) 5.0 (455 name HN ) (453 name HG1\* ) 5.0  
(464 name HN ) (465 name HN ) 5.0 (455 name HN ) (431 name HB\* ) 5.0  
(465 name HA ) (468 name HB\* ) 3.5 (455 name HA ) (456 name HN ) 3.5  
(465 name HN ) (463 name HA1 ) 5.0 (455 name HA ) (457 name HN ) 5.0  
(465 name HN ) (463 name HA2 ) 5.0 (455 name HA ) (434 name HB1 ) 5.0  
(465 name HN ) (464 name HD1\* ) 5.0 (455 name HA ) (434 name HB2 ) 5.0  
(465 name HN ) (464 name HG2\* ) 3.5 (455 name HA ) (456 name HB1 ) 5.0

(465 name HN ) (466 name HN ) 2.7 (455 name HA ) (456 name HB2 ) 5.0  
(466 name HN ) (463 name HA2 ) 3.5 (455 name HA ) (448 name HD2\*) 5.0  
(466 name HN ) (463 name HN ) 3.5 (455 name HG2\*) (456 name HN ) 3.5  
(466 name HN ) (465 name HA ) 3.5 (456 name HN ) (455 name HB ) 3.5  
(467 name HA ) (470 name HG11) 5.0 (456 name HA ) (457 name HN ) 5.0  
(467 name HA ) (470 name HG12) 5.0 (456 name HB1 ) (457 name HN ) 5.0  
(467 name HD2\*) (453 name HG2\*) 5.0 (456 name HB2 ) (457 name HN ) 5.0  
(467 name HD2\*) (462 name HB1 ) 5.0 (456 name HD1\*) (457 name HN ) 5.0  
(467 name HD2\*) (462 name HB2 ) 5.0 (456 name HD1\*) (485 name HN ) 5.0  
(467 name HD2\*) (462 name HE21) 5.0 (456 name HD1\*) (485 name HA ) 5.0  
(467 name HD2\*) (462 name HE22) 5.0 (456 name HD1\*) (433 name HB1 ) 3.5  
(467 name HD2\*) (462 name HG2 ) 5.0 (456 name HD1\*) (433 name HB2 ) 3.5  
(467 name HN ) (468 name HN ) 5.0 (456 name HD1\*) (485 name HB\* ) 2.7  
(468 name HN ) (467 name HA ) 5.0 (457 name HN ) (459 name HN ) 5.0  
(468 name HA ) (469 name HN ) 3.5 (457 name HN ) (455 name HB ) 5.0  
(468 name HN ) (469 name HN ) 5.0 (457 name HN ) (455 name HG2\*) 5.0  
(469 name HN ) (470 name HN ) 3.5 (456 name HN ) (456 name HD2\*) 5.0  
(470 name HD1\*) (451 name HD1 ) 5.0 (458 name HN ) (456 name HN ) 5.0  
(470 name HD1\*) (451 name HD2 ) 5.0 (458 name HN ) (460 name HN ) 5.0  
(470 name HD1\*) (467 name HA ) 3.5 (458 name HN ) (455 name HN ) 5.0  
(470 name HD1\*) (471 name HN ) 3.5 (458 name HN ) (455 name HB ) 5.0  
(470 name HG11) (471 name HN ) 5.0 (458 name HN ) (457 name HA ) 3.5  
(470 name HG12) (471 name HN ) 5.0 (458 name HN ) (457 name HG\* ) 5.0  
(470 name HG2\*) (471 name HN ) 3.5 (458 name HN ) (457 name HB1 ) 3.5  
(470 name HN ) (471 name HN ) 5.0 (458 name HN ) (457 name HB2 ) 3.5  
(471 name HN ) (470 name HA ) 2.7 (458 name HN ) (453 name HA ) 5.0  
(471 name HN ) (472 name HN ) 5.0 (459 name HN ) (461 name HN ) 5.0  
(472 name HN ) (473 name HN ) 3.5 (459 name HN ) (458 name HA ) 5.0  
(473 name HB1 ) (470 name HB ) 5.0 (459 name HN ) (458 name HB1 ) 5.0  
(473 name HB1 ) (470 name HG2\*) 5.0 (459 name HN ) (458 name HB2 ) 5.0  
(473 name HB2 ) (470 name HB ) 5.0 (459 name HB1 ) (485 name HB\* ) 5.0  
(473 name HB2 ) (470 name HG2\*) 5.0 (459 name HB2 ) (485 name HB\* ) 5.0  
(473 name HD2\*) (478 name HN ) 3.5 (459 name HB1 ) (460 name HN ) 5.0  
(473 name HN ) (474 name HN ) 5.0 (459 name HB2 ) (460 name HN ) 5.0  
(474 name HA ) (475 name HN ) 2.7 (459 name HD2\*) (460 name HN ) 5.0  
(474 name HA ) (476 name HN ) 5.0 (459 name HD2\*) (481 name HB1 ) 5.0  
(474 name HB ) (475 name HN ) 2.7 (459 name HD2\*) (481 name HB2 ) 5.0  
(474 name HG2\*) (475 name HN ) 2.7 (460 name HA ) (482 name HG2\*) 3.5  
(474 name HN ) (473 name HD2\*) 2.7 (460 name HA ) (486 name HE ) 3.5  
(474 name HN ) (477 name HB\* ) 3.5 (460 name HA ) (486 name HD\* ) 3.5  
(474 name HN ) (475 name HN ) 5.0 (460 name HA ) (486 name HG1 ) 3.5  
(475 name HA ) (478 name HB\* ) 3.5 (460 name HB\* ) (461 name HN ) 3.5  
(475 name HN ) (476 name HN ) 3.5 (460 name HB\* ) (457 name HA ) 3.5  
(476 name HN ) (474 name HB ) 5.0 (460 name HB\* ) (489 name HB1 ) 3.5  
(476 name HN ) (474 name HG2\*) 5.0 (460 name HB\* ) (489 name HB2 ) 3.5  
(476 name HN ) (475 name HA ) 5.0 (461 name HN ) (490 name HZ2 ) 5.0  
(477 name HN ) (474 name HB ) 5.0 (461 name HN ) (482 name HG2\*) 5.0  
(477 name HN ) (475 name HN ) 5.0 (461 name HA ) (462 name HN ) 5.0  
(478 name HA ) (481 name HB1 ) 5.0 (461 name HA ) (490 name HZ2 ) 3.5  
(478 name HB\* ) (464 name HA ) 3.5 (461 name HG2 ) (490 name HZ2 ) 5.0  
(478 name HB\* ) (475 name HN ) 5.0 (462 name HN ) (460 name HN ) 5.0  
(478 name HB\* ) (479 name HN ) 2.7 (462 name HN ) (459 name HN ) 5.0  
(478 name HB\* ) (482 name HD1\*) 3.5 (462 name HN ) (453 name HG2\*) 5.0  
(478 name HN ) (474 name HN ) 3.5 (462 name HN ) (482 name HG2\*) 5.0  
(478 name HN ) (476 name HN ) 5.0 (463 name HN ) (466 name HB1 ) 5.0  
(478 name HN ) (477 name HA ) 3.5 (463 name HN ) (466 name HB2 ) 5.0  
(478 name HN ) (480 name HN ) 5.0 (463 name HA1 ) (466 name HN ) 5.0  
(478 name HN ) (479 name HN ) 3.5 (464 name HA ) (467 name HD1\*) 5.0  
(479 name HA1 ) (464 name HG11) 5.0 (464 name HA ) (467 name HB1 ) 5.0

(479 name HA1 ) (464 name HG12) 5.0 (464 name HG11) (482 name HD1\*) 3.5  
(479 name HA1 ) (464 name HG2\*) 5.0 (464 name HG12) (482 name HD1\*) 5.0  
(479 name HA1 ) (478 name HB\* ) 5.0 (464 name HG11) (478 name HB\* ) 3.5  
(479 name HA1 ) (480 name HN ) 3.5 (464 name HG12) (478 name HB\* ) 3.5  
(479 name HA1 ) (483 name HN ) 5.0 (464 name HD1\*) (478 name HB\* ) 5.0  
(479 name HA2 ) (464 name HG11) 5.0 (468 name HN ) (470 name HN ) 5.0  
(479 name HA2 ) (464 name HG12) 5.0 (468 name HN ) (467 name HB1 ) 5.0  
(479 name HA2 ) (464 name HG2\*) 5.0 (468 name HN ) (467 name HB2 ) 5.0  
(479 name HA2 ) (480 name HN ) 3.5 (468 name HN ) (467 name HD1\*) 5.0  
(479 name HA2 ) (482 name HB ) 3.5 (468 name HN ) (467 name HD2\*) 5.0  
(479 name HA2 ) (483 name HN ) 5.0 (469 name HN ) (468 name HB\* ) 3.5  
(479 name HN ) (464 name HD1\*) 3.5 (469 name HA ) (470 name HN ) 3.5  
(479 name HN ) (475 name HA ) 5.0 (469 name HB\* ) (470 name HN ) 3.5  
(479 name HN ) (476 name HA ) 5.0 (470 name HB ) (473 name HD1\*) 5.0  
(479 name HN ) (477 name HN ) 5.0 (470 name HG2\*) (447 name HA ) 5.0  
(479 name HN ) (480 name HN ) 3.5 (470 name HG2\*) (447 name HD1 ) 3.5  
(480 name HN ) (481 name HN ) 3.5 (470 name HG2\*) (447 name HD2 ) 5.0  
(481 name HN ) (482 name HN ) 3.5 (470 name HD1\*) (448 name HA ) 5.0  
(482 name HA ) (459 name HD1\*) 3.5 (470 name HD1\*) (448 name HD1\*) 5.0  
(482 name HA ) (485 name HB\* ) 3.5 (471 name HN ) (470 name HB ) 5.0  
(482 name HD1\*) (462 name HB1 ) 3.5 (471 name HB1 ) (472 name HN ) 5.0  
(482 name HD1\*) (462 name HB2 ) 3.5 (471 name HB2 ) (472 name HN ) 5.0  
(482 name HD1\*) (462 name HN ) 5.0 (473 name HN ) (471 name HN ) 5.0  
(482 name HD1\*) (463 name HA1 ) 3.5 (473 name HN ) (472 name HA1 ) 5.0  
(482 name HD1\*) (463 name HA2 ) 5.0 (473 name HN ) (472 name HA2 ) 5.0  
(482 name HD1\*) (463 name HN ) 3.5 (473 name HD1\*) (444 name HD1\*) 5.0  
(482 name HD1\*) (464 name HA ) 3.5 (473 name HD2\*) (444 name HD1\*) 5.0  
(482 name HD1\*) (464 name HB ) 5.0 (473 name HD2\*) (478 name HA ) 5.0  
(482 name HD1\*) (464 name HN ) 3.5 (473 name HD2\*) (478 name HB\* ) 5.0  
(482 name HD1\*) (465 name HN ) 5.0 (473 name HD2\*) (477 name HB\* ) 5.0  
(482 name HD1\*) (466 name HN ) 5.0 (474 name HN ) (477 name HN ) 5.0  
(482 name HD1\*) (479 name HA2 ) 5.0 (474 name HN ) (473 name HA ) 2.7  
(482 name HD1\*) (483 name HN ) 5.0 (474 name HN ) (473 name HB1 ) 5.0  
(482 name HN ) (479 name HA2 ) 5.0 (474 name HN ) (473 name HB2 ) 5.0  
(482 name HN ) (480 name HN ) 5.0 (474 name HN ) (477 name HD\* ) 5.0  
(482 name HN ) (481 name HB1 ) 3.5 (475 name HA ) (464 name HG2\*) 3.5  
(482 name HN ) (481 name HB2 ) 3.5 (475 name HB\* ) (464 name HD1\*) 5.0  
(482 name HN ) (481 name HD2\*) 5.0 (475 name HB\* ) (478 name HN ) 5.0  
(482 name HN ) (483 name HN ) 5.0 (476 name HA ) (477 name HN ) 5.0  
(483 name HE\* ) (479 name HA1 ) 5.0 (477 name HN ) (476 name HB1 ) 5.0  
(483 name HE\* ) (479 name HA2 ) 5.0 (477 name HN ) (476 name HG\* ) 5.0  
(483 name HE\* ) (486 name HD\* ) 5.0 (478 name HN ) (477 name HB\* ) 5.0  
(483 name HE\* ) (487 name HD21) 5.0 (478 name HN ) (477 name HG2 ) 5.0  
(483 name HE\* ) (487 name HD22) 5.0 (478 name HN ) (473 name HA ) 5.0  
(483 name HG\* ) (480 name HA ) 5.0 (478 name HA ) (481 name HB2 ) 5.0  
(483 name HG\* ) (482 name HD1\*) 5.0 (479 name HN ) (478 name HA ) 5.0  
(483 name HG\* ) (482 name HG2\*) 5.0 (479 name HA1 ) (482 name HB ) 5.0  
(483 name HG\* ) (484 name HN ) 5.0 (481 name HN ) (480 name HA ) 5.0  
(483 name HG\* ) (487 name HD21) 5.0 (481 name HN ) (480 name HB\* ) 5.0  
(483 name HG\* ) (487 name HD22) 5.0 (481 name HA ) (437 name HD1\*) 5.0  
(483 name HN ) (484 name HN ) 5.0 (481 name HA ) (484 name HB\* ) 3.5  
(484 name HN ) (483 name HA ) 3.5 (482 name HA ) (483 name HN ) 3.5  
(484 name HN ) (486 name HN ) 5.0 (482 name HA ) (459 name HG ) 5.0  
(484 name HN ) (485 name HN ) 5.0 (482 name HB ) (483 name HN ) 5.0  
(485 name HA ) (456 name HD2\*) 5.0 (482 name HG2\*) (486 name HG2 ) 5.0  
(485 name HN ) (486 name HN ) 3.5 (482 name HG2\*) (486 name HD\* ) 5.0  
(485 name HA ) (488 name HB ) 3.5 (482 name HD1\*) (467 name HD1\*) 3.5  
(485 name HA ) (488 name HD1\*) 5.0 (482 name HD1\*) (462 name HA ) 5.0  
(485 name HA ) (488 name HN ) 3.5 (483 name HN ) (482 name HG11) 5.0

(485 name HB\* ) (460 name HA ) 3.5 (483 name HN ) (482 name HG12) 5.0  
 (485 name HN ) (482 name HA ) 5.0 (483 name HN ) (482 name HG2\*) 5.0  
 (486 name HA ) (460 name HB\* ) 2.7 (483 name HA ) (486 name HG2 ) 5.0  
 (486 name HA ) (490 name HN ) 5.0 (483 name HA ) (486 name HD\* ) 5.0  
 (486 name HE ) (482 name HG2\*) 5.0 (483 name HB1 ) (480 name HA ) 3.5  
 (486 name HG2 ) (460 name HA ) 3.5 (483 name HB2 ) (480 name HA ) 3.5  
 (486 name HG2 ) (460 name HB\* ) 3.5 (485 name HN ) (484 name HA ) 3.5  
 (486 name HG2 ) (487 name HN ) 5.0 (485 name HA ) (459 name HD2\*) 5.0  
 (486 name HG2 ) (490 name HH2 ) 5.0 (485 name HA ) (460 name HB\* ) 5.0  
 (486 name HN ) (460 name HA ) 3.5 (485 name HA ) (488 name HG2\*) 5.0  
 (486 name HN ) (483 name HA ) 3.5 (485 name HB\* ) (456 name HA ) 5.0  
 (486 name HN ) (485 name HA ) 3.5 (485 name HB\* ) (437 name HD1\*) 5.0  
 (486 name HN ) (485 name HB\* ) 3.5 (486 name HE ) (460 name HB\* ) 5.0  
 (486 name HN ) (488 name HN ) 5.0 (487 name HN ) (460 name HB\* ) 5.0  
 (486 name HN ) (487 name HN ) 5.0 (487 name HN ) (486 name HG1 ) 5.0  
 (487 name HA ) (488 name HN ) 3.5 (487 name HA ) (491 name HD\* ) 3.5  
 (487 name HA ) (491 name HN ) 5.0 (487 name HD21) (484 name HB\* ) 5.0  
 (487 name HB\* ) (488 name HN ) 5.0 (487 name HD22) (484 name HB\* ) 5.0  
 (487 name HN ) (483 name HA ) 3.5 (488 name HG2\*) (489 name HN ) 5.0  
 (487 name HN ) (485 name HA ) 5.0 (488 name HG2\*) (456 name HD2\*) 5.0  
 (487 name HN ) (486 name HA ) 5.0 (488 name HD1\*) (437 name HD2\*) 5.0  
 (487 name HN ) (486 name HB1 ) 3.5 (488 name HD1\*) (437 name HD1\*) 5.0  
 (487 name HN ) (486 name HB2 ) 3.5 (489 name HN ) (490 name HD1 ) 5.0  
 (488 name HA ) (489 name HN ) 3.5 (489 name HN ) (486 name HA ) 5.0  
 (488 name HB ) (489 name HN ) 3.5 (489 name HA ) (490 name HN ) 3.5  
 (488 name HN ) (456 name HD1\*) 5.0 (489 name HA ) (490 name HD1 ) 5.0  
 (488 name HN ) (456 name HD2\*) 5.0 (489 name HB1 ) (490 name HD1 ) 5.0  
 (488 name HN ) (485 name HB\* ) 5.0 (489 name HB2 ) (490 name HD1 ) 5.0  
 (488 name HN ) (490 name HN ) 5.0 (490 name HD1 ) (460 name HB\* ) 5.0  
 (488 name HN ) (489 name HN ) 3.5 (490 name HE1 ) (457 name HA ) 5.0  
 (489 name HB1 ) (490 name HN ) 3.5 (490 name HE1 ) (489 name HB1 ) 5.0  
 (489 name HB2 ) (490 name HN ) 3.5 (490 name HE3 ) (486 name HG2 ) 5.0  
 (489 name HN ) (488 name HD1\*) 5.0 (490 name HH2 ) (461 name HA ) 5.0  
 (489 name HN ) (488 name HG12) 5.0 (490 name HZ2 ) (460 name HB\* ) 5.0  
 (489 name HN ) (491 name HN ) 5.0 (491 name HE\* ) (487 name HA ) 5.0  
 (489 name HN ) (490 name HN ) 3.5 (492 name HA\* ) (493 name HN ) 5.0

Mehrdeutige NOEs:

((459 name HD2\*)) ((481 name HA ) or (434 name HA )) 5.0  
 ((460 name HB\* )) ((486 name HE ) or (488 name HN )  
 or (437 name HN )) 5.0  
 ((466 name HB1 )) ((467 name HN ) or (468 name HN )) 5.0  
 ((466 name HB2 )) ((467 name HN ) or (468 name HN )) 5.0  
 ((482 name HD1\*)) ((467 name HN ) or (468 name HN )) 5.0  
 ((465 name HA )) ((467 name HN ) or (468 name HN )) 5.0  
 ((464 name HA )) ((467 name HN ) or (468 name HN )) 3.5  
 ((465 name HN )) ((467 name HN ) or (468 name HN )) 5.0  
 ((466 name HA )) ((467 name HN ) or (468 name HN )) 3.5  
 ((466 name HN )) ((467 name HN ) or (468 name HN )) 3.5  
 ((430 name HA )) ((448 name HD2\*) or (467 name HD1\*)  
 or (481 name HD1\*)) 5.0  
 ((430 name HB1 )) ((448 name HD2\*) or (467 name HD1\*)  
 or (481 name HD1\*)) 5.0  
 ((430 name HB2 )) ((448 name HD2\*) or (467 name HD1\*)  
 or (481 name HD1\*)) 5.0  
 ((431 name HN )) ((448 name HD2\*) or (467 name HD1\*)  
 or (481 name HD1\*)  
 or (437 name HD2\*)) 5.0  
 ((431 name HB\* )) ((448 name HD2\*) or (435 name HD2\*))

or (437 name HD2\*) ) 5.0  
 ((435 name HD1\*)) ((442 name HN ) or (445 name HN )  
 or (448 name HN )  
 or (471 name HN ) ) 5.0  
 ((440 name HA ) ) ((442 name HN ) or (445 name HN )  
 or (448 name HN )  
 or (471 name HN ) ) 5.0  
 ((444 name HD1\*)) ((481 name HD2\*) or (459 name HD1\*)) 3.5  
 ((456 name HD1\*)) ((481 name HA ) or (434 name HA ) ) 5.0  
 ((462 name HG1 ) ) ((448 name HA ) or (456 name HA )  
 or (459 name HA ) ) 3.5  
 ((462 name HG2 ) ) ((448 name HA ) or (456 name HA )  
 or (459 name HA ) ) 3.5  
 ((462 name HG2 ) ) ((448 name HD2\*) or (467 name HD1\*)  
 or (481 name HD1\*)) 5.0  
 ((460 name HB\* ) ) ((485 name HB\* ) or (480 name HB\* ) ) 5.0

### C.3.2.2. Beschränkung der Diederwinkel aus skalaren Kopplungen.

(431 name c) (432 name n) (432 name ca) (432 name c) -60 20  
 (432 name c) (433 name n) (433 name ca) (433 name c) -60 20  
 (434 name c) (435 name n) (435 name ca) (435 name c) -60 20  
 (436 name c) (437 name n) (437 name ca) (437 name c) -60 20  
 (437 name c) (438 name n) (438 name ca) (438 name c) -60 20  
 (439 name c) (440 name n) (440 name ca) (440 name c) -120 40  
 (440 name c) (441 name n) (441 name ca) (441 name c) -120 40  
 (442 name c) (443 name n) (443 name ca) (443 name c) -60 20  
 (443 name c) (444 name n) (444 name ca) (444 name c) -60 20  
 (449 name c) (450 name n) (450 name ca) (450 name c) -60 20  
 (450 name c) (451 name n) (451 name ca) (451 name c) -120 40  
 (452 name c) (453 name n) (453 name ca) (453 name c) -120 40  
 (455 name c) (456 name n) (456 name ca) (456 name c) -60 20  
 (456 name c) (457 name n) (457 name ca) (457 name c) -60 20  
 (457 name c) (458 name n) (458 name ca) (458 name c) -60 20  
 (463 name c) (464 name n) (464 name ca) (464 name c) -60 20  
 (464 name c) (465 name n) (465 name ca) (465 name c) -60 20  
 (472 name c) (473 name n) (473 name ca) (473 name c) -120 40  
 (473 name c) (474 name n) (474 name ca) (474 name c) -120 40  
 (474 name c) (475 name n) (475 name ca) (475 name c) -60 20  
 (475 name c) (476 name n) (476 name ca) (476 name c) -60 20  
 (477 name c) (478 name n) (478 name ca) (478 name c) -60 20  
 (479 name c) (480 name n) (480 name ca) (480 name c) -60 20  
 (481 name c) (482 name n) (482 name ca) (482 name c) -60 20  
 (482 name c) (483 name n) (483 name ca) (483 name c) -60 20  
 (483 name c) (484 name n) (484 name ca) (484 name c) -60 20  
 (485 name c) (486 name n) (486 name ca) (486 name c) -60 20  
 (486 name c) (487 name n) (487 name ca) (487 name c) -60 20

### C.3.2.3. Abstandsbeschränkungen aus H/D–Austauschexperimenten.

(434 name HN) (431 name O) 2.3 (466 name HN) (463 name O) 2.3  
 (434 name N ) (431 name O) 3.3 (466 name N ) (463 name O) 3.3



(435 name HN)	(431 name O)	2.3	(467 name HN)	(463 name O)	2.3
(435 name N )	(431 name O)	3.3	(467 name N )	(463 name O)	3.3
(436 name HN)	(432 name O)	2.3	(478 name HN)	(474 name O)	2.3
(436 name N )	(432 name O)	3.3	(478 name N )	(474 name O)	3.3
(446 name HN)	(443 name O)	2.3	(480 name HN)	(476 name O)	2.3
(446 name N )	(443 name O)	3.3	(480 name N )	(476 name O)	3.3
(449 name HN)	(445 name O)	2.3	(482 name HN)	(478 name O)	2.3
(449 name N )	(445 name O)	3.3	(482 name N )	(478 name O)	3.3
(450 name HN)	(446 name O)	2.3	(483 name HN)	(479 name O)	2.3
(450 name N )	(446 name O)	3.3	(483 name N )	(479 name O)	3.3
(451 name HN)	(448 name O)	2.3	(484 name HN)	(480 name O)	2.3
(451 name N )	(448 name O)	3.3	(484 name N )	(480 name O)	3.3
(452 name HN)	(449 name O)	2.3	(488 name HN)	(484 name O)	2.3
(452 name N )	(449 name O)	3.3	(488 name N )	(484 name O)	3.3
(460 name HN)	(456 name O)	2.3	(489 name HN)	(485 name O)	2.3
(460 name N )	(456 name O)	3.3	(489 name N )	(485 name O)	3.3
(462 name HN)	(459 name O)	2.3	(490 name HN)	(486 name O)	2.3
(462 name N )	(459 name O)	3.3	(490 name N )	(486 name O)	3.3

#### C.3.2.4. *Beschränkungen aus dipolaren Restkopplungen.*

(431 name N)	(431 name HN)	-1.797	(461 name N)	(461 name HN)	6.319
(432 name N)	(432 name HN)	-1.882	(462 name N)	(462 name HN)	-7.475
(433 name N)	(433 name HN)	-4.542	(463 name N)	(463 name HN)	7.992
(437 name N)	(437 name HN)	4.410	(464 name N)	(464 name HN)	11.001
(438 name N)	(438 name HN)	4.793	(472 name N)	(472 name HN)	-3.878
(439 name N)	(439 name HN)	-4.208	(475 name N)	(475 name HN)	-3.783
(440 name N)	(440 name HN)	-1.764	(476 name N)	(476 name HN)	-3.106
(443 name N)	(443 name HN)	-5.785	(480 name N)	(480 name HN)	-1.328
(444 name N)	(444 name HN)	-4.822	(482 name N)	(482 name HN)	-4.305
(446 name N)	(446 name HN)	-8.303	(483 name N)	(483 name HN)	-4.554
(450 name N)	(450 name HN)	-6.712	(484 name N)	(484 name HN)	0.472
(451 name N)	(451 name HN)	-2.952	(486 name N)	(486 name HN)	-4.061
(452 name N)	(452 name HN)	0.999	(487 name N)	(487 name HN)	-2.413
(456 name N)	(456 name HN)	-4.565	(488 name N)	(488 name HN)	1.269
(457 name N)	(457 name HN)	0.302	(489 name N)	(489 name HN)	-2.905
(458 name N)	(458 name HN)	-0.244	(490 name N)	(490 name HN)	-5.633



## ANHANG D

### **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl für Struktur und Chemie der Biopolymere an der Universität Bayreuth unter der Leitung von Prof. Dr. Paul Rösch verfaßt. An dieser Stelle möchte ich ihm für die Überlassung des Themas und die hervorragenden Arbeitsmöglichkeiten danken.

Zudem danke ich Dr. Kristian Schweimer für den fachkundigen Rat bei allen theoretischen und praktischen Problemen rund um die NMR und Datenanalyse. Dr. Sabine Schwarz und Stefan Prasch möchte ich für die Unterstützung bei der Protein-Herstellung sowie für die Zusammenarbeit am NusA- $\lambda$ N-System danken.

Vor allem danke ich auch Dr. Klaus Vitzithum, Finn Bauer und Dr. Philipp Neudecker, die immer als Ansprechpartner für Fragen zur Verfügung standen.

Ferner danke ich Ulrich Scheckenhofer für die Aufnahme von ESI-Massenspektren, Rainer Hofmann für die kompetente Hilfe bei Computerproblemen, Gudrun Wagner und Angela Rösler für die Übernahme von Verwaltungsarbeiten sowie Andrea Hager, Nadine Herz, Ulrike Herzing und Katrin Weiß für die Unterstützung im Labor.

Allen weiteren aktiven und ehemaligen Mitarbeitern des Lehrstuhls möchte ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die stetige Hilfsbereitschaft danken.



## ANHANG E

### **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Ferner erkläre ich, daß ich noch nicht anderweitig mit oder ohne Erfolg versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder mich der Doktorprüfung zu unterziehen.

Bayreuth, den

Die vorliegende Arbeit wurde von Februar 2002 bis März 2005 am Lehrstuhl für Struktur und Chemie der Biopolymere der Universität Bayreuth unter Leitung von Prof. Dr. Paul Rösch angefertigt.

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.).

Promotionsgesuch eingereicht am: 08.03.2005

Tag des wissenschaftlichen Kolloquiums: 26.08.2005

Erster Gutachter: Prof. Dr. Paul Rösch

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Matthias Ballauff