

**Mechanismen molekularer Erkennung:
Charakterisierung der molekularen Details der
Wechselwirkungen des herpesviralen Tip-Proteins mit
SH3-Domänen**

Dissertation

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

vorgelegt von
Diplom-Biochemiker

Finn Bauer

aus Hamburg

Bayreuth, 2005

Die vorliegende Arbeit wurde von Januar 2002 bis Februar 2005 am Lehrstuhl für Struktur und Chemie der Biopolymere der Universität Bayreuth unter Anleitung von Prof. Dr. Heinrich Sticht 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 09.02.2005

Tag des wissenschaftlichen Kolloquiums 16.06.2005

Erster Gutachter: Prof. Dr. Heinrich Sticht

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Franz X. Schmid

God, grant me the SERENITY to accept
the things I cannot change,
the COURAGE to change the things I can,
and the WISDOM to know the difference.

Reinhold Neibuhr (1926)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Molekulare Interaktionen von Proteinen.....	1
1.1.1	NMR-Spektroskopie und Röntgenkristallografie.....	2
1.1.2	Elektronenmikroskopie und Elektronentomografie.....	3
1.1.3	Protein-Protein-Docken.....	4
1.1.4	Homologiemodellierung.....	5
1.1.5	Simulationen der Proteindynamik.....	6
1.2	Modulare Protein-Domänen.....	8
1.2.1	SH3-Domänen.....	9
1.3	Nicht-Rezeptor Tyrosinkinase der Src-Familie.....	14
1.4	Tip – ein herpesvirales Protein.....	18
2	Ziele der Arbeit.....	21
3	Materialien und Methoden.....	23
3.1	Materialien.....	23
3.1.1	Enzyme, Chemikalien und Säulenmaterialien.....	23
3.1.2	Verbrauchsmaterial.....	23
3.1.3	Nährmedien.....	24
3.1.4	Puffer.....	25
3.1.5	Bakterienstämme und Plasmide.....	27
3.1.6	Synthetische Oligonukleotide und Peptide.....	27
3.1.7	Laborgeräte.....	28
3.1.8	Hochleistungsrechner.....	29
3.1.9	Computerprogramme.....	30
3.1.10	Entwickelte Computerprogramme.....	30
3.2	Molekularbiologische Methoden für die Darstellung der P17G-Mutante der LckSH3... 33	33
3.2.1	Agarose-Gelelektrophorese.....	33
3.2.2	Isolierung von Plasmid-DNA.....	33
3.2.3	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	33
3.2.4	Ortsspezifische Mutagenese mit Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	34
3.2.5	Restriktion von DNA.....	34
3.2.6	Dephosphorylierung von 5'-überhängenden DNA-Fragmenten.....	34
3.2.7	Reinigung von DNA über Silikagelmembranen.....	35
3.2.8	Ligation von DNA.....	35
3.2.9	Butanol-fällung von DNA.....	35
3.2.10	CaCl ₂ -Transformation von Zellen.....	35
3.2.11	Kolonie-PCR.....	36
3.2.12	Sequenzierung von DNA.....	37
3.3	Mikrobiologische und präparative Methoden.....	38
3.3.1	Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	38
3.3.2	Herstellung von Dauerkulturen.....	38
3.3.3	Fermentation von Bakterien und Überexpression von Fusionsproteinen.....	38
3.3.4	Aufschluss von <i>E. coli</i> -Zellen.....	39
3.3.5	Metallionenaffinitätschromatografie.....	40
3.3.6	Glutathionaffinitätschromatografie.....	40
3.3.7	Proteolytische Abspaltung von Affinitätsanhängen.....	40
3.3.8	Größenausschlusschromatografie.....	41
3.3.9	Umkehrphasenchromatografie.....	41

3.3.10 Pufferwechsel durch Dialyse.....	41
3.3.11 Trocknen von Proteinen.....	42
3.4 Spektroskopische Methoden.....	43
3.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration durch UV-Spektroskopie.....	43
3.4.2 Bestimmung der Bakteriendichte durch Streulichtmessungen.....	43
3.4.3 Bestimmung der thermischen Stabilität durch CD-Spektroskopie.....	43
3.4.4 Bestimmung der Affinitätskonstanten durch Fluoreszenzspektroskopie.....	45
3.4.5 Bestimmung der Bindungskinetik durch schnelle Mischmethoden.....	46
3.5 NMR-Spektroskopie.....	48
3.5.1 Geräte.....	48
3.5.2 NMR-Proben und Messbedingungen.....	48
3.5.3 Prozessierung der Spektren.....	51
3.5.4 Abstandsbeschränkungen aus NOE-Kreuzresonanzen.....	52
3.5.5 Diederwinkelbeschränkungen aus $^3J(\text{H}^{\text{N}}, \text{H}^{\alpha})$ -Kopplungskonstanten.....	52
3.5.6 Ir-HNCO-Experiment zur Bestimmung von Wasserstoffbrücken.....	53
3.5.7 Residuale dipolare Kopplungskonstanten.....	53
3.5.8 Bestimmung der longitudinalen und transversalen ^{15}N -Relaxationsraten.....	54
3.5.9 Der heteronukleare $\{^1\text{H}\} ^{15}\text{N}$ -NOE.....	54
3.5.10 Bestimmung des Ordnungsparameters S^2	54
3.5.11 Bestimmung der schnellen Austauschraten der Amidresonanzen.....	54
3.5.12 Berechnung der Normverschiebung.....	55
3.6 Moleküldynamische Simulationen für die Strukturberechnung.....	56
3.6.1 Generierung der Startstrukturen.....	56
3.6.2 Strukturberechnung nach dem Prinzip des <i>simulated annealing</i>	57
3.6.3 Strukturverfeinerung mit residualen dipolaren Kopplungen.....	57
3.7 Freie Moleküldynamiksimulationen.....	58
3.7.1 Solvatisierung der Strukturen.....	58
3.7.2 Äquilibration der Systeme.....	58
3.7.3 Produktionsläufe.....	59
3.7.4 Analyse der Trajektorien.....	59
3.8 Moleküldynamische Nicht-Gleichgewichtssimulationen.....	60
3.8.1 Solvatisierung und Vorbereitung der Systeme.....	60
3.8.2 Simulation der thermischen Entfaltung.....	60
3.8.3 Auswertung der Trajektorien.....	61
3.9 Modellierung von Proteinstrukturen.....	62
3.9.1 Strukturen der LckSH3_P17G.....	62
3.9.2 Komplex der LckSH3 mit Tip(174-187).....	62
3.9.3 Abschätzung der freien Bindungsenergie unpolarer Gruppen.....	62
4 Experimente und Ergebnisse.....	63
4.1 Klonierung, Expression und Reinigung der zu analysierenden Komponenten.....	63
4.2 Charakterisierung der P17G-Mutante der LckSH3 im Vergleich zum Wildtyp.....	64
4.2.1 Bestimmung der Affinität zu Tip(168-187) mittels Tryptophanfluoreszenz.....	65
4.2.2 NMR-spektroskopische Titration von LckSH3_P17G mit Tip(167-199).....	65
4.2.3 Bestimmung der Bindungskinetik durch schnelle Mischmethoden.....	67
4.2.4 Bestimmung des Austauschraten der Amidresonanzen.....	70
4.2.5 Bestimmung der ^{15}N -Relaxationsdaten R_1 , R_2 und des heteronuklearen $\{^1\text{H}\} ^{15}\text{N}$ -NOEs.....	72
4.2.6 Korrelation der residualen dipolaren Kopplungen.....	75
4.2.7 Freie Moleküldynamiksimulationen.....	77
4.2.8 Bestimmung der thermodynamischen Stabilität mittels CD-Spektroskopie.....	85

4.2.9 Simulation der thermischen Entfaltung.....	86
4.3 Strukturbestimmung der LynSH3.....	91
4.3.1 Initiale NMR-spektroskopische Charakterisierung der LynSH3.....	91
4.3.2 Identifizierung der Spinsysteme und sequenzspezifische Zuordnung der Resonanzen.....	91
4.3.3 Bestimmung des heteronuklearen $\{^1\text{H}\} \text{ } ^{15}\text{N}$ -NOEs.....	94
4.3.4 Einschränkung der dihedralen Winkel aus $^3J(\text{H}^{\text{N}}, \text{H}^{\alpha})$ -Kopplungskonstanten.....	94
4.3.5 Identifizierung von Wasserstoffbrücken aus skalaren $^3J(\text{N}(i), \text{C}'(j))$ -Kopplungen.....	94
4.3.6 Identifizierung von langsam austauschenden Amidresonanzen.....	95
4.3.7 Abstandsbeschränkungen aus NOE-Kreuzresonanzen.....	96
4.3.8 Beschränkungen durch residuale dipolare Kopplungen.....	96
4.3.9 Berechnung der Tertiärstruktur der LynSH3.....	97
4.4 Identifizierung und Charakterisierung der LynSH3-Tip Interaktionen.....	103
4.4.1 Identifizierung der Spinsysteme und sequenzspezifische Zuordnung der Tip-Resonanzen im Komplex.....	103
4.4.2 Identifizierung der Spinsysteme und sequenzspezifische Zuordnung der LynSH3 Resonanzen im Komplex.....	106
4.4.3 Änderung der dynamischen und strukturellen Eigenschaften der LynSH3 bei Ligandenbindung.....	111
4.5 Strukturbestimmung des LynSH3-Tip-Komplexes.....	115
4.5.1 Einschränkung der dihedralen Winkel aus $^3J(\text{H}^{\text{N}}, \text{H}^{\alpha})$ -Kopplungskonstanten.....	115
4.5.2 Identifizierung von Wasserstoffbrücken.....	115
4.5.3 Abstandsbeschränkungen aus NOE-Kreuzresonanzen.....	116
4.5.4 Beschränkungen durch residuale dipolare Kopplungen.....	116
4.5.5 Identifizierung der Salzbrücke D26-R182.....	117
4.5.6 Berechnung der Tertiärstruktur des LynSH3-Tip-Komplexes.....	117
4.5.7 Bindung der PPII-Helix an die LynSH3.....	124
4.5.8 Beitrag des Bereichs COOH-terminal der PPII-Helix in Tip zur LynSH3-Bindung.....	127
4.6 Modellierung des LckSH3-Tip-Komplexes.....	130
4.6.1 Vergleich des Bindungsmodus von Tip an LckSH3 und LynSH3.....	130
4.6.2 Homologiemodellierung des LckSH3-Tip-Komplexes.....	132
4.6.3 Einfluss von L186 auf die Affinität zu LckSH3 und LynSH3.....	133
5 Diskussion.....	137
5.0 Affinität und Spezifität molekularer Erkennungsprozesse.....	137
5.1 Initiale Charakterisierung der Bindung von Tip an LckSH3 und LynSH3.....	138
5.2 Die P17G-Mutante der LckSH3.....	140
5.2.1 Auswahl der P17G-Mutante.....	140
5.2.2 Gleiche globale Struktur aber veränderte Dynamik auf verschiedenen Zeitskalen.....	140
5.2.3 Veränderte thermodynamische Stabilitäten und unterschiedliche Entfaltungswege.....	142
5.2.4 Eine veränderte Dynamik verschiebt das konformationelle Gleichgewicht in LckSH3_P17G vor der Bindung.....	144
5.2.5 Einfluss von Proteinflexibilität auf Protein-Liganden Wechselwirkungen.....	146
5.3 Komplexstruktur von LynSH3-Tip.....	149
5.3.1 Hocho aufgelöste Struktur der freien LynSH3.....	149
5.3.2 Initiale Charakterisierung der Bindungsregionen von Tip zeigt die Beteiligung flankierender Bereiche an der Bindung.....	149
5.3.3 Der LynSH3-Tip-Komplex – der erste SH3-Ligandenkomplex der Gruppe B der Src-Familie.....	150

5.3.4 Die PPII-Helix von Tip bindet in einer Typ II-Orientierung.....	151
5.3.5 Bindung der COOH-terminal flankierenden Bereiche von Tip.....	152
5.4 Interaktionen des LckSH3-Tip-Komplexes.....	153
5.4.1 Tip wird von LckSH3 und LynSH3 in gleicher Weise gebunden.....	153
5.4.2 Erweiterung der Bindungssequenz für Liganden der SH3-Domänen der Src-Familie.....	153
5.4.3 Mögliche Funktion der Bereiche der erweiterten Bindungssequenz.....	155
5.4.4 Rolle flankierender Bereiche bei klassischen Bindungsmotiven.....	156
5.5 Mechanismen molekularer Erkennung.....	159
6 Zusammenfassung.....	161
7 Summary.....	165
8 Abkürzungen.....	169
9 Literatur.....	171
10 Anhang.....	189
10.1 Nukleotidsequenz der GST-LckSH3_P17G.....	189
10.2 Reinigung und Verifizierung der rekombinant dargestellten Komponenten.....	190
10.3 Chemische Verschiebungen.....	193
10.4 Relaxations-, Bewegungs- und Austauschparameter.....	201
10.5 XPLOR-Protokolle und experimentelle Randbedingungen.....	206
10.6 Amber-Protokolle.....	226
10.6.1 Gleichgewichts-MD-Simulationen.....	226
10.6.2 MD-Simulationen bei hoher Temperatur.....	228
Eigene Publikationen.....	231
Danksagung.....	233
Lebenslauf.....	235
Erklärung.....	237

1 Einleitung

1.1 Molekulare Interaktionen von Proteinen

Nahezu alle Proteine werden erst durch Wechselwirkungen mit anderen biologischen Makromolekülen wie weiteren Proteinen, DNA und RNA oder anderen kleinen Molekülen zu funktionellen Einheiten. Protein-Protein-Wechselwirkungen sind allgegenwärtig und an allen zellulären und physiologischen Prozessen maßgeblich beteiligt. Im Zeitalter der Entschlüsselung ganzer Genome höherer Organismen binnen weniger Monate (Chen *et al.*, 2004) besteht die künftige Herausforderung der Wissenschaft weniger in der reinen Informationsbeschaffung über den Inhalt bestimmter Genome (Genomik), als vielmehr in ihrer jeweiligen Umsetzung auf Proteinebene (Proteomik) und der damit verbundenen Interaktion von Biomolekülen (Interaktomik). Das menschliche Genom besteht nach Schätzungen des *human genome projects* aus 20000 bis 25000 Genen (Nature **431**, 931-945 (2004)) und ist weitestgehend unverändert (statisch) in allen Zellen gleichermaßen vorhanden. Gleichzeitig gehen Schätzungen davon aus, dass diese relativ geringe Zahl an Genen in eine deutlich größeren Zahl (bis zu 500000) verschiedener Spleißvarianten und kovalenter Modifikationen der Proteine resultieren (Nature **409**, 861-921 (2001)). Die Zusammensetzung aller Proteine in einer Zelle zu einem bestimmten Zeitpunkt wird dabei als Proteom bezeichnet. Im Gegensatz zum statischen Genom ist das Proteom sehr dynamisch und kann sich von Minute zu Minute als Antwort auf zehntausende verschiedene intra- und extrazelluläre Signale ändern. Dabei kommt es zu Wechselwirkungen einzelner Proteine untereinander, die die entsprechenden Signale transferieren, modulieren, amplifizieren oder Effektoren in bestimmter Art und Weise agieren lassen.

Auch wenn aufgrund groß angelegter Aktivitäten binnen weniger Jahre Strukturinformationen von nahezu allen Proteinfaltungen bekannt sein sollten (Vitkup *et al.*, 2001), ist doch klar, dass die Anzahl der spezifischen Protein-Protein-Wechselwirkungen die Zahl möglicher Proteinfaltungen um mehrere Größenordnungen übertreffen wird (Wodak & Janin, 2003). Oftmals können bereits geringfügige Änderungen einzelner Aminosäuren eine große Rolle für die Affinität und Spezifität der molekularen Erkennung spielen (Fernandez-Ballester *et al.*, 2004; Rauh *et al.*, 2004), die bisher in den meisten Fällen nur unzureichend verstanden werden. Darüber hinaus erklärt oftmals erst die induzierte Passform, die von Rezeptor und/oder Ligand bei Bindung eingenommen wird, die beobachteten Unterschiede hinreichend genau (Engh *et al.*, 1996; Prade *et al.*, 1997; Davis & Teague, 1999; Fritz *et al.*, 2001). Dabei ist

die Flexibilität von Kontaktflächen eine entscheidende Voraussetzung für die Variabilität molekularer Interaktionen.

Diese macht deutlich, dass für ein Verständnis der großen Bandbreite der Variabilität der Erkennungsprozesse von Proteinen Wissen über die Struktur und Flexibilität der jeweiligen Kontaktflächen und somit Kenntnis der Geometrie und Dynamik der beteiligten Proteine nötig ist. Verschiedenen Möglichkeiten zur Analyse von Protein-Protein-Interaktionen sind in den folgenden Kapiteln näher beschrieben (Kap. 1.1.1 bis 1.1.5).

1.1.1 NMR-Spektroskopie und Röntgenkristallografie

Eine der besten Möglichkeiten molekulare Interaktionen von Proteinen zu verstehen ist ihre Analyse in atomarer Auflösung. Hierfür stehen sowohl die NMR-Spektroskopie als auch die Röntgenkristallografie zur Verfügung. Beide Methoden haben ihre intrinsischen Vor- und Nachteile.

Die Röntgenkristallografie ist eine sehr verbreitete Methode zur Analyse von Proteinstrukturen und Protein-Protein-Komplexen. Voraussetzung für ihre Anwendbarkeit ist die einheitliche Kristallisation der zu untersuchenden Proteine oder Proteinkomplexe, was häufig den 'Flaschenhals' der Methode darstellt. Sobald die Kristallisation geglückt ist und die anschließende Röntgenbeugung Daten mit hinreichend guter Streuung liefert, können auf Basis der erhaltenen Elektronendichten Strukturen berechnet werden, die Rückschlüsse zum Beispiel auf katalytische Mechanismen eines Enzyms oder spezifische Interaktionen zwischen zwei Proteinen zulassen. In der letzten Zeit konnten so die Strukturen mehrerer makromolekularer Komplexe aufgeklärt werden, wie zum Beispiel das 20S Proteasom (Whitby *et al.*, 2000), der Komplex des *action-related protein 2* und 3 (Arp2 und Arp3; Robinson *et al.*, 2001), die Struktur des pflanzlichen Photosystems I (Ben-Shem *et al.*, 2003), die Struktur eines Lichtsammelkomplexes (Liu *et al.*, 2004) oder der *signal recognition particle* (SRP)-Komplex (Egea *et al.*, 2004). Diese Beispiele verdeutlichen, dass für die Röntgenkristallografie die Größe der zu untersuchenden Proteinkomplexe keine Limitierung darstellen.

Die andere Methode, die Strukturinformationen mit atomaren Details liefern kann, ist die NMR-Spektroskopie. Ihr Nachteil gegenüber der Röntgenkristallografie besteht in der Größenlimitierung der routinemäßig zu untersuchenden Systeme (zirka 30-40 kDa; Homans, 2004), die bisher nur in Einzelfällen überwunden werden konnte (Fiaux *et al.*, 2002; Tugarinov *et al.*, 2005). Nichtsdestotrotz resultieren methodische Weiterentwicklungen der NMR-Spektroskopie in immer besseren Informationen über

Protein-Protein-Komplexe, wie zum Beispiel dem Bcl-xL-Bak Komplex (Sattler *et al.*, 1997), dem Gro-EL Gro-ES Komplex (Fiaux *et al.*, 2002), dem transienten Komplex des Photosystem I mit Zytocrom c6 (Diaz-Moreno *et al.*, 2004) oder der E2- und E3-Komponenten der Pyruvatdehydrogenase-Multienzymkomplexes (Allen *et al.*, 2005).

Eine besondere Stärke der Methode liegt in der Identifizierung von Aminosäuren und Oberflächenbereichen, die an Bindung von Interaktionspartnern beteiligt sind (Shuker *et al.*, 1996; Pellecchia *et al.*, 1999; Frickel *et al.*, 2002; Zuiderweg, 2002; Fernandes & Wider, 2003) beziehungsweise der Charakterisierung der Dynamik der Bindungspartner im freien und gebundenen Zustand (Kay *et al.*, 1989; Ghose *et al.*, 2001; Ferreon & Hilser, 2003; Dutta *et al.*, 2004). Somit ist die NMR-Spektroskopie in der Lage sowohl hochaufgelöste Komplexstrukturen, als auch Analysen der Dynamik von Komplexkomponenten zu liefern und erlauben somit eine umfassende Charakterisierung der Faktoren, die die Affinität molekularer Wechselwirkungen beeinflussen.

Der NMR-Spektroskopie und Röntgenkristallografie gemeinsam ist der oftmals erhebliche experimentelle Aufwand, Proben in geeigneter Menge und Reinheit zu erhalten, beziehungsweise, dass Proben den biophysikalischen und experimentellen Anforderungen der Methoden (zum Beispiel Kristallisierbarkeit oder ausreichende Löslichkeit) nicht genügen.

Obwohl die NMR-Spektroskopie und die Röntgenkristallografie das 'erste Mittel der Wahl' zur detaillierten Analyse von molekularen Interaktionen darstellen, ist aus den methodischen Anforderungen ersichtlich, dass nur ein kleiner Teil der Protein-Protein-Interaktionen in einer Zelle auf diese Weise untersucht werden kann.

1.1.2 Elektronenmikroskopie und Elektronentomografie

Eine weitere Möglichkeit zur Analyse von molekularen Interaktionen stellen die vielen verschiedenen Varianten der Elektronenmikroskopie (EM) dar, wie zum Beispiel die Einzelmolekül-cryo-EM (Frank, 2002), die Elektronentomografie (Baumeister *et al.*, 1999) oder die Elektronenkristallografie (Nogales *et al.*, 1998).

Für Moleküle mit einer Molekularmasse größer als 200 bis 500 kDa kann die Einzelmolekül-cryo-EM die Elektronendichte bis zu einer Auflösung von 8 Å bestimmen (Zhang *et al.*, 2003). Dazu werden aus verschiedenen Blickwinkeln eine Vielzahl zweidimensionaler Projektionen des zu analysierenden Moleküls aufgenommen, aus der sich die gesamte dreidimensionale Struktur rekonstruieren lässt. Dafür sind im Gegensatz zur NMR-Spektroskopie oder Röntgenkristallografie nur geringe Proteinmengen

erforderlich. Auch werden keine so hohen Anforderungen an die Löslichkeit oder Kristallisationsfähigkeit gestellt. Daher ist die Einzelmolekül-cryo-EM ein gutes Werkzeug zur Analyse der Struktur und Dynamik großer makromolekularer Komplexe (Gao *et al.*, 2003). Eine Darstellung von atomaren Details, wie sie die beiden vorher besprochenen Methoden liefern, ist durch die Einzelmolekül-cryo-EM hingegen gegenwärtig nicht zu erzielen. Nichtsdestotrotz können auf diese Weise Informationen über die Struktur und den Aufbau sehr großer molekularer Komplexe erhalten werden.

Eine der aufregendsten Entwicklungen im Bereich der Strukturbiologie der letzten Zeit ist die Methode der Elektronentomografie (Baumeister, 2002). Dazu werden von einem Objekt mehrere Ansichten aus definierten Winkeln aufgenommen, um daraus ein Gesamtbild zu rekonstruieren. Obwohl die Elektronentomografie auch zur Analyse von isolierten Makromolekülen oder Komplexen in der Lage ist, liegt ihre wahre Stärke in der ganzheitlichen Darstellung des unbeeinflussten Inneren einer Zelle mit einer Auflösung von bis zu 4-5 nm (Baumeister, 2002; Grunewald *et al.*, 2003).

Obwohl auf allen Gebieten der Elektronenmikroskopie große Fortschritte zu verzeichnen sind und diese Methoden wichtige Aussagen zum Beispiel über die Zusammensetzung großer Komplexe liefern können, sind bisher keine Detailaussagen über die Mechanismen von molekularer Erkennung durch diese Methoden möglich.

1.1.3 Protein-Protein-Docken

Wenn die atomaren Strukturen von zwei Proteinen bekannt sind und durch andere experimentellen Methoden gezeigt werden konnte, dass sie miteinander wechselwirken, stehen eine Reihe von computergestützten Methoden zur Verfügung, die versuchen die Komplexstruktur vorherzusagen (Gray *et al.*, 2003).

Die meisten dieser Methoden versuchen ein atomares Modell des Komplexes zu erstellen, indem sie die Komplementarität der wechselwirkenden Oberflächen sowohl in Form als auch im elektrostatischen Potential maximieren (Smith & Sternberg, 2002; Schneidman-Duhovny *et al.*, 2003). Dieses als 'Docken' bezeichnete Vorgehen erfolgt üblicherweise in zwei Schritten. Im ersten Schritt versuchen die Programme ein Ensemble möglicher relativer räumlicher Anordnungen der Bindungspartner zueinander zu generieren. In diesem Stadium sind die Algorithmen aber kaum in der Lage, zwischen physiologisch relevanten und nicht-physiologischen Lösungen zu unterscheiden. Im zweiten Schritt werden den Kontakte der einzelnen Komplexgeometrien nach verschiedenen Kriterien bewertet (*scoring*), wobei idealerweise die Orientierung mit dem

höchsten Wert dem nativen Komplex nahe kommt (Palma *et al.*, 2000; Camacho *et al.*, 2000; Russell *et al.*, 2004).

Schon früh wurden Algorithmen entwickelt, die ein schnelleres Absuchen des Konformationsraums eines Dockansatzes erlaubten, um deutlich größere Datensätze handhaben zu können (Katchalski-Katzir *et al.*, 1992). Trotz dieser Fortschritte bezüglich des ersten Schritts des Verfahrens sind die gegenwärtig verfügbaren Bewertungsfunktionen nicht für alle Fragestellungen in der Lage, zufriedenstellend zwischen physiologischen und nicht-physiologischen Komplexstrukturen zu diskriminieren. Während die Vorhersage der richtigen Geometrie von bekannten Interaktionen zumindest teilweise möglich ist, ist die *ab initio* Vorhersage der Bindungen von Proteinen problematisch (Mendez *et al.*, 2003; Vajda & Camacho, 2004). Aus diesem Grund wird das Docken von Proteinen zurzeit hauptsächlich in Kombination mit anderen experimentellen Methoden verwendet, wie zum Beispiel ortsgerechter Mutagenese (Morillas *et al.*, 2002), Wasserstoff-Deuterium-Austausch (Anand *et al.*, 2003), NMR-Spektroskopie (Dobrodumov & Gronenborn, 2003; Dominguez *et al.*, 2003) oder Oberflächenplasmonresonanz (Romijn *et al.*, 2003).

1.1.4 Homologiemodellierung

Protein-Protein-Interaktionen können auch aufgrund von Homologie zu bekannten Komplexstrukturen modelliert werden (Marti-Renom *et al.*, 2000; Aloy & Russell, 2002; Aloy *et al.*, 2004; Pieper *et al.*, 2004). Es konnte gezeigt werden, dass die Wechselwirkungen zwischen Proteinen desselben Faltungstyps ähnlich sind, wenn ihre Sequenzen zu mehr als 30 % identisch sind – oberhalb dieses Schwellenwerts stellt die Homologiemodellierung von Proteinkomplexen eine deutlich zuverlässigere Methode als das Docken von Proteinen dar (Aloy *et al.*, 2003).

Ausgehend von einer Komplexstruktur als Vorlage können oft Interaktionen zwischen einem Protein und mehreren möglichen Partnern in einem Organismus modelliert werden. Interessant sind daher die Wahrscheinlichkeiten, mit der diese Interaktionen *in vivo* tatsächlich beobachtet werden (Kortemme *et al.*, 2004).

Interaktionsflächen sind zwischen homologen Proteinen häufig stärker konserviert als die restlichen Proteinbereiche (Sanchez & Sali, 1998)), sodass sie eine Möglichkeit darstellen, Aussagen über die Wahrscheinlichkeit der Ausbildung eines Komplexes zu treffen. Dieses gelingt einerseits durch die Auswertung statistischer Paarpotenziale (*potentials of mean force*), die auf Basis bekannter Komplexstrukturen homologe Proteinpaare beurteilen

(Aloy *et al.*, 2002; Aloy *et al.*, 2003; Pieper *et al.*, 2004), oder andererseits durch Analyse der Kontakte durch die Überlagerung der Aminosäuresequenz des Zielproteins auf eine bekannte 3D-Struktur (*threading*) (Lu *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 2003).

In Bezug auf Proteinkontaktflächen sind statistische Potentiale bereits zur Vorhersage von Spezifität (Aloy *et al.*, 2002) und Bindungsenergie (Jiang *et al.*, 2002) der Komplexbildung verwendet worden.

1.1.5 Simulationen der Proteindynamik

Obwohl moleküldynamische Simulationen in absehbarer Zeit keine entscheidene Rolle bei der Identifizierung von neuen Protein-Protein-Interaktionen oder der Vorhersage ihrer Affinität im Hochdurchsatz spielen werden, können sie doch helfen die Dynamik von Protein-Protein-Interaktionen besser zu verstehen (Keskin *et al.*, 2002a; Keskin *et al.*, 2002b; Ming *et al.*, 2002; Tama *et al.*, 2002; Chacon *et al.*, 2003; Kong *et al.*, 2003; Kandasamy & Larson, 2004; Dedmon *et al.*, 2005).

Mittlerweile ist die Beschreibung immer größerer, thermisch äquilibrierter Systeme mit einer Vielzahl an Lösungsmittelmolekülen und Gegenionen durch Moleküldynamik- oder Monte Carlo-Simulationen standardmäßig etabliert und wurde zum Beispiel an Aquaporin (Tajkhorshid *et al.*, 2002), der β -Untereinheit der F1-ATPase (Böckmann & Grubmüller, 2003) oder dem Ras-Raf-Komplex (Gohlke *et al.*, 2004) angewendet. Ziel dabei ist es, die physikalischen Gegebenheiten möglichst realitätsnah nachzustellen. Problematisch ist lediglich der zum Teil sehr hohe Bedarf an Rechenzeit aufgrund der immer längeren Simulationsdauern oder der Simulation multipler Trajektorien. Aus diesem Grund wird einerseits durch die Entwicklung sogenannter impliziter Lösungsmittelmodelle (*continuum solvent models*) zusammen mit empirischen Korrekturfaktoren für hydrophobe Interaktionen basierend auf verborgenen Oberflächenarealen (Zou *et al.*, 1999; Bashford & Case, 2000; Tsui & Case, 2000) versucht, die zu simulierenden System klein und damit dem Bedarf an Rechenzeit niedrig zu halten. Andererseits wird versucht, durch Simulation bei hohen Temperaturen die kinetische Energie des Systems zu erhöhen, um somit den zur Verfügung stehenden Konformationsraum schneller abzusuchen (Daggett & Levitt, 1992 und 1993; Alonso & Daggett, 1995 und 1998; Tsai *et al.*, 1999; Grantcharova & Baker, 1997; Grantcharova *et al.*, 2000; Gsponer & Caflisch, 2001). Durch vergleichende Studien konnte dabei gezeigt werden, dass eine Erhöhung der Temperatur auf bis zu 498 K lediglich die Geschwindigkeit, nicht aber die Gesamtcharakteristik der beobachteten Prozesse beeinflusst (Day *et al.*, 2002). Somit stellt

die moleküldynamische Hochtemperatursimulation eine weit verbreitete Methode zur Proteincharakterisierung bei möglichst geringem Rechenzeitbedarf dar (Day *et al.*, 2002, Day & Daggett, 2003).

Weiterhin stellen Moleküldynamiksimulationen eine Methode zur Abschätzung von relativen Bindungsenergien und Affinitäten dar. Dabei werden zum Beispiel durch thermodynamische Integration (*thermodynamic integration*; TI), Freie-Energie-Störung (*free energy perturbation*; FEP) oder lineare Integrationsenergien (*linear interaction energy*; LIE) die energetischen Beiträge einer Komplexbildung ermittelt (Åqvist, 1996; Wang *et al.*, 1999; Kuhn & Kollman, 2000). Im Vergleich zu diesen 'klassischen' Verfahren zeichnet sich die semiempirische Methode MM/PBSA (*molecular mechanics Poisson-Boltzmann surface area*) durch einen geringeren Rechenzeitbedarf aus und ist dennoch in der Lage, für viele Systeme Bindungsenergien zu liefern, die in guter Übereinstimmung mit dem Experiment stehen (Kollman *et al.*, 2000). Neben der Untersuchung von Enzym-Inhibitor-Komplexen (Wang & Kollmann, 2001; Wang *et al.*, 2001a) wurde die MM/PBSA-Methode in den letzten Jahren auch für die Untersuchung von Protein-Protein-Komplexen angewendet, wie zum Beispiel SH3-Domänen-Peptid-Komplexen (Wang *et al.*, 2001b) und Hormon-Rezeptor-Komplexen (Huo *et al.*, 2002). Diese Methoden bedürfen aber alle noch einer mehr oder weniger aufwendigen Anpassung an das zu untersuchende System. Daher wird die Berechnung der freien Energien bei Ligandenbindung bisher nur für ausgewählte Systeme und nicht im Hochdurchsatz durchgeführt (Russell *et al.*, 2004).

Somit stellt die Simulation von moleküldynamischen Prozessen momentan eher eine Ergänzung zu den Methoden der Bestimmung hochaufgelöster Strukturen dar (Kap. 1.1.1), die Erklärungsansätze für biophysikalischen Befunde liefert, die aus den statischen Strukturen allein nicht erschöpfend erklärt werden können.

1.2 Modulare Protein-Domänen

Modulare Protein-Domänen wie zum Beispiel SH2-, PDZ-, WW-, PTB-, SH3- oder PH-Domänen sind kleine nicht-katalytische Proteinmodule bestehend aus 40 bis 200 Aminosäuren, die sich klar von anderen Teilen der Proteine abgrenzen und unabhängig von diesen in ihre native Struktur falten (Pawson, 1995; Bork *et al.*, 1996; Das & Smith, 2000).

Daher bieten modulare Protein-Domänen die Möglichkeit einer Minimierung bei der biochemischen und biophysikalischen Charakterisierung (*divide and conquer approach*) (Cesareni *et al.*, 2004). Dies bedeutet, dass die Domänen einzeln kloniert, exprimiert und gereinigt werden können, ohne dass ihre biophysikalischen Eigenschaften verloren gehen. Der Grund für diese Eigenschaft liegt in den relativ kleinen Interaktionsbereichen auf der Oberfläche der Proteinmodule, die sich im Gegensatz zu vielen Enzymen, deren aktive Zentren oft über zwei oder mehr Module verteilt sind, vollständig auf einer Domäne befinden (Cesareni *et al.*, 2004).

Die Interaktionsflächen werden als komplementäre 'Epitope' bezeichnet, die sich sowohl auf der Seite der Protein-Domäne, als auch auf der Seite des Zielliganden befinden und dort meist nur wenige Aminosäuren umfassen (Aasland *et al.*, 2002). Mit zum Teil nur $1\,000\text{ \AA}^2$ sind diese Kontaktflächen im Vergleich zu anderen Protein-Protein-Interaktionsflächen sehr klein (Lo Conte *et al.*, 1999; Wodak & Janin, 2003). Die kleinen Kontaktflächen stellen aber eine gute Erklärung für die meist geringe Affinität (typischerweise K_D zwischen 1 und $500\text{ }\mu\text{M}$) dar (Aasland *et al.*, 2002). Die hieraus resultierenden, wenig stabilen 1-zu-1-Komplexe ermöglichen schnelle Dissoziationen, die eine evolutionäre Anpassung der modularen Protein-Domänen an ihre Aufgaben in dynamischen Signalsystemen darstellen. Bei der Ausbildung von transienten Komplexen ist die Dissoziation (Abschaltung eines Signals) ebenso wichtig wie die Assoziation (Anschaltung eines Signals).

Die Hauptaufgabe von modularen Protein-Domänen in dynamischen Signalkaskaden stellt die Kolokalisation von Interaktionspartnern dar, die über die Verwendung von mehreren Modulen zu spezifischen Signalwegen, aber auch zur Möglichkeit der Kommunikation zwischen verschiedenen Signalwegen (*cross-talk*) sowie zu Redundanz führen (Janssen & Zhang, 2003). Da die Interaktionsflächen der modularen Protein-Domänen mit ihrer geringen Größe oft nur wenig Möglichkeiten für die Ausbildung von Spezifitäten bieten, kommt es oft zur Kontaktierung von zusätzlichen, nichtkanonischen Bindungsregionen innerhalb des Moduls und/oder zum Clustern von mehreren gleichen

oder verschiedenen Modulen (Ball *et al.*, 2002; Gale *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2003; Coulthard *et al.*, 2003; Bauer *et al.*, 2004).

Eine große Gruppe von modularen Protein-Domänen (SH3, WW, EVH1) bindet prolinreiche Sequenzen (Pawson & Nash, 2003), von denen die SH3-Domänen im folgenden Kapitel näher beschrieben werden.

1.2.1 SH3-Domänen

Eine der an häufigsten in eukaryontischen Genomen identifizierte modulare Protein-Domäne ist die Src-homologe 3 (SH3)-Domäne. Ein Überblick über eine nicht-redundante DNA- und Protein-Sequenzdatenbank mithilfe des SMART Domänenanalyse-Werkzeugs (Schultz *et al.*, 2000; Letunic *et al.*, 2004) liefert 4 112 verschiedene SH3-Domänen aus 3 160 unterschiedlichen Proteinen (Stand August 2004). Davon entfallen 900 (688) auf *Homo sapiens*, 733 (544) auf *Mus musculus*, 274 (192) auf *Drosophila melanogaster*, 120 (97) auf *Caenorhabditis elegans* und 30 (25) auf *Saccharomyces cerevisiae* – angegeben sind jeweils die Anzahlen identifizierter SH3-Domänen pro Spezies sowie in Klammern die Anzahl der Proteine mit SH3-Domänen. Diese Zahlen verdeutlichen, dass SH3-Domänen häufig in mehr als einer Kopie pro Protein vorkommen. Weiterhin ergibt die SMART-Analyse, dass in vielen Proteinen die nicht-katalytischen SH3-Domänen von anderen ebenfalls nicht-katalytischen Proteinmodulen, wie zum Beispiel Src-homologe 2 (SH2) oder Pleckstrin-Homologie (PH) Domänen flankiert werden. Diese Proteine werden als sogenannte 'Adapterproteine' bezeichnet und fungieren als molekulare Verbindungen bei der Aktivierung verschiedener Signalwege (Janssen & Zhang, 2003). SH3-Domänen werden aber auch in Gesellschaft von katalytischen Domänen gefunden. Dies sind oft Domänen mit einer Guanidin-Austausch- oder GTPase-aktivierenden-Funktion aber auch Domänen mit Kinaseaktivitäten. Nahezu alle SH3-Domänen findet man in intrazellulären Proteinen der Signaltransduktion und Regulation (Mayer & Saksela, 2004).

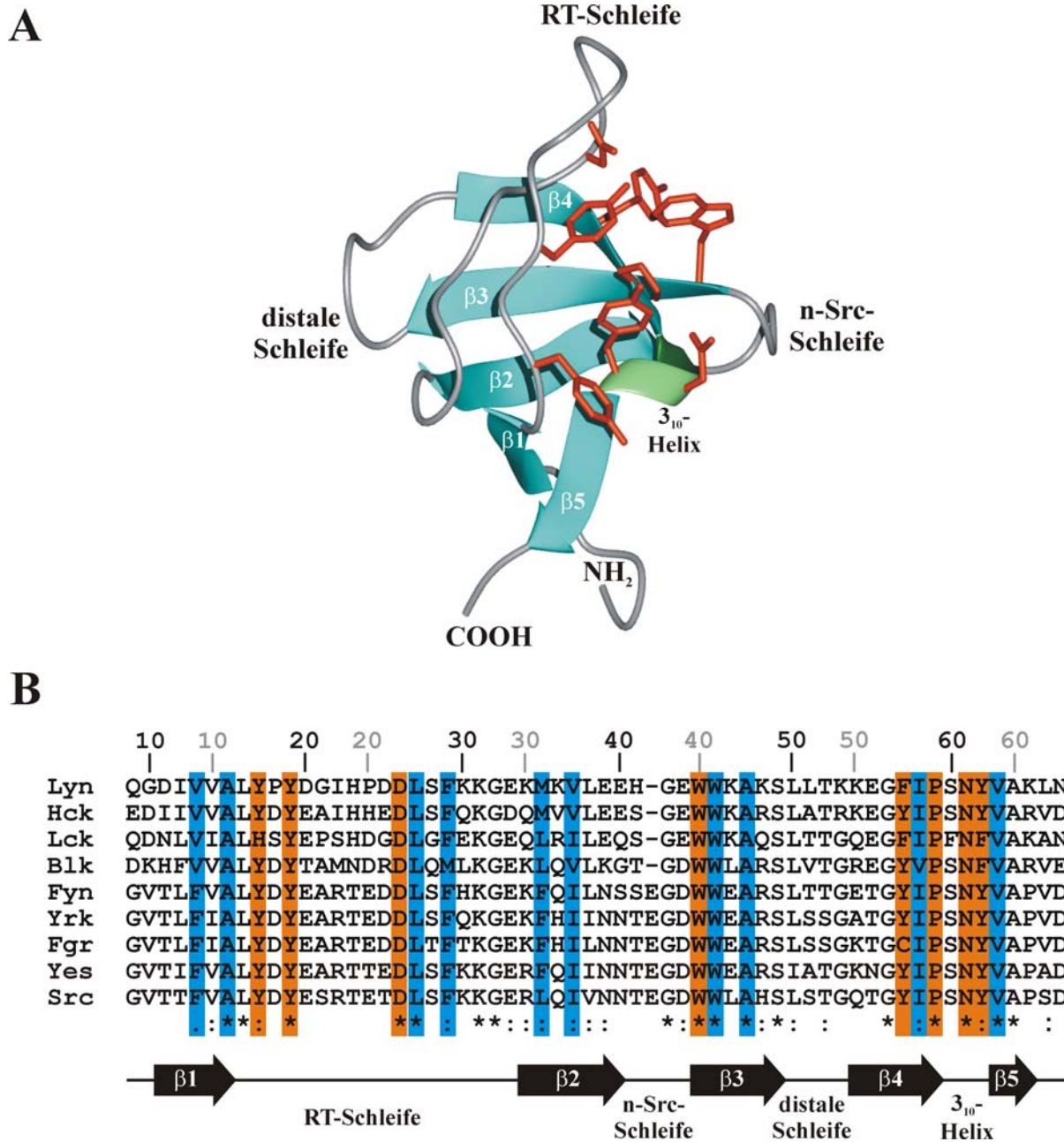


Abb 1.1 Exemplarische Darstellung der Strukturelemente und Sequenzvergleich verschiedener SH3-Domänen. (A) Schleifendarstellung der regulären Sekundärstrukturelemente einer SH3-Domäne am Beispiel der FynSH3 (Noble *et al.*, 1993). Die an der Ligandenbindung beteiligten konservierten Seitenketten sind in orange als Stäbchen dargestellt sowie die Sequenzabschnitte zwischen der β -Faltblattstängen beschriftet. Die Abbildung wurde mit Molmol erstellt (Koradi *et al.*, 1996). (B) Sequenzvergleich der SH3-Domänen aus den Kinasen der Src-Familie (Kap. 1.3). Die Positionen der Faltblattstränge sind unten schematisch dargestellt. Oben ist sowohl die in dieser Arbeit verwendete Nummerierung der LynSH3 (schwarz) als auch der LckSH3 (grau) wiedergegeben. Orange hinterlegt sind die Positionen der Aminosäuren, die an der Ligandenbindung beteiligt sind (vergleiche A). Die Positionen der Aminosäuren des hydrophoben Kerns der SH3-Domänen sind blau hinterlegt.

SH3-Domänen sind in der Regel aus zirka 60 Aminosäuren aufgebaut und stellen somit einen eher kleinen Vertreter der modularen Protein-Domänen dar. Aus einer Vielzahl von Lösungs- und Röntgenkristallografiestrukturen ist ein hoher Grad an struktureller Konserviertheit abzulesen (Musacchio *et al.*, 1992; Yu *et al.*, 1992; Koyama *et al.*, 1993; Noble *et al.*, 1993; Schweimer *et al.*, 2002).

Fünf β -Faltblattstränge bilden zwei antiparallele β -Faltblätter aus, die nahezu senkrecht aufeinander stehen (Abb. 1.1). Der β -Faltblattstrang $\beta 2$ ist dabei sowohl Teil des ersten ($\beta 512$) als auch des zweiten Faltblatts ($\beta 234$). Zusammen bilden sie eine kompakte β -Fasstruktur, die durch einen stark konservierten hydrophoben Kern stabilisiert wird. Die ersten vier β -Faltblattsträngen sich durch Schleifenbereiche verbunden, die aus historischen Gründen RT- (zwischen $\beta 1$ und $\beta 2$), n-Src- (zwischen $\beta 2$ und $\beta 3$) und distale Schleife (zwischen $\beta 3$ und $\beta 4$) genannt werden. Der vierte und fünfte β -Faltblattstrang wird durch eine 3_{10} -Helix verbunden.

Die Hauptaufgabe von SH3-Domänen besteht in der Bindung von prolinreichen Sequenzen. Ermöglicht wird dies durch eine hydrophobe Furche auf der Moleküloberfläche, die meist von acht hoch konservierten Aminosäuren gebildet wird (Abb. 1.1). Diese Furche ist an die Bindung von linkshändigen Polyprolin-II (PPII) Helix Konformationen angepasst (Abb 1.2). Proline nehmen in SH3-bindenden Liganden eine Schlüsselrolle ein. Einerseits ist nur die Aminosäure Prolin durch ihre einzigartige N-Substitution in der Lage, Wechselwirkungen mit der SH3-Domäne auszubilden, zu denen die anderen 19 natürlich vorkommenden Aminosäuren aufgrund des zusätzlichen Platzbedarfs ihrer Amidprotonen nicht befähigt sind (Lim *et al.*, 1994; Nguyen *et al.*, 1998). Andererseits begünstigen Proline die Ausbildung der PPII-Helix Konformation bereits von der Bindung und reduzieren somit die entropischen Verluste bei der Bindung (Musacchio, 2003).

Selektionsversuche mit Peptidbibliotheken mitte der 90'er Jahre ergaben übereinstimmend, dass fast immer ein PxxP-Motiv das Kernstück für die Interaktion mit verschiedenen SH3-Domänen darstellt – wobei 'x' jede beliebige Aminosäure repräsentieren kann, häufig aber eine hydrophobe Aminosäure verkörpert (Yu *et al.*, 1994; Sparks *et al.*, 1994; Rickles *et al.*, 1994; Feng *et al.*, 1995). Weiterhin wurde eine basische Aminosäure als flankierender Rest des PxxP-Motivs identifiziert. Überraschenderweise konnte diese basische Aminosäure sowohl NH₂- ([+]xxPxxP), als auch COOH-terminal (PxxPx[+]) des PxxP-Motivs in verschiedenen Peptiden lokalisiert werden (Feng *et al.*, 1994). Strukturanalysen von SH3-Domänen mit Peptiden beider Varianten zeigten, dass

SH3-Domänen beide Klassen von Liganden über den gleichen Oberflächenbereich binden, jedoch in umgekehrter Ligandenorientierung (Feng *et al.*, 1995). Je nach Orientierung werden seither die Liganden als Klasse I- beziehungsweise Klasse II-Liganden bezeichnet (Abb. 1.2).

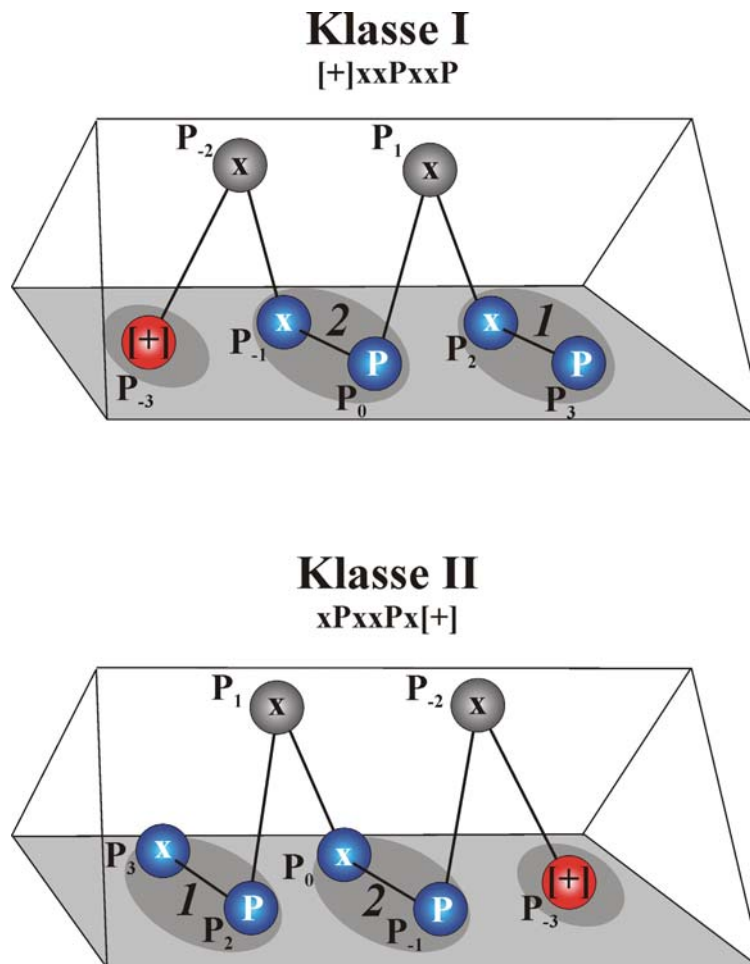


Abb 1.2 Schematische Darstellung der Strukturen einer PPII-Helix in Klasse I- und Klasse II-Orientierung. Die Reste der Liganden sind gemäß der Nomenklatur von Lim *et al.* (1994) bezeichnet. Fünf Reste stellen den Kontakt zur SH3-Domäne (graue Fläche) her: jeweils zwei Reste (blaue Kugeln) binden in die beiden xP-Dipeptid-Taschen 1 und 2 und ein basischer Rest (rote Kugel) in die Spezifitätstasche. Abhängig von der Orientierung besetzen die Proline des PxxP-Konsensus die Positionen P₀ und P₃ (Klasse I) oder P₋₁ und P₂ (Klasse II). Die Positionen P₋₁ für Klasse I und P₀ für Klasse II werden üblicherweise durch hydrophobe Aminosäuren besetzt (Musacchio, 2003). In beiden Orientierungen zeigen die Aminosäuren an der Position P₋₂ und P₁ von der SH3-Domäne weg und bilden keine direkten Kontakte aus (graue Kugeln).

Analysen der Komplexstrukturen zeigten bereits früh, dass die Bindung auf der Seite der SH3-Domänen nicht von einer durchgehenden Bindungsfläche erfolgt, sondern dass vielmehr eine Unterteilung in drei Taschen vorliegt (Musacchio, 2003). Die Taschen 1 und

2 sind hydrophob und nehmen jeweils ein xP-Dipeptid auf, die dritte Tasche, meist mit einem hoch konservierten Aspartat, bildet eine Salzbrücke mit der basischen Aminosäure des Liganden aus. Dadurch wird die Orientierung des Liganden relativ zur SH3-Domäne bestimmt, weshalb dieser Tasche auch als 'Spezifitätstasche' bezeichnet wird.

Gleichzeitig warfen die Analysen der Komplexstrukturen die Frage auf, wie SH3-Domänen einzelnen Liganden spezifisch erkennen und von anderen unterscheiden können. Das zentrale Bindungsmotiv (die PPII-Helix) besteht aus sieben Aminosäuren, von denen aber nur fünf Kontakte zur Oberfläche der SH3-Domäne haben. Von diesen fünf Aminosäuren sind zwei invariante Proline und eine die konservierte basische Aminosäure (meist Arginin). Dies verdeutlicht, dass innerhalb des zentralen Bindungsmotivs der PPII-Helix kaum Möglichkeiten für die Spezifitätsdeterminierung bestehen. Aus diesem Grund werden auf der Suche nach den molekularen Faktoren für Affinität und Spezifität verstärkt die flankierenden Bereiche der Prolinhelix untersucht. In zahlreichen Untersuchungen wurden SH3-Domänen identifiziert, die mit ihren variablen Schleifenbereichen bestimmte Sequenzabschnitte des Liganden NH₂- oder COOH-terminal des zentralen Bindungsmotivs erkennen und somit Spezifität erzeugen (Feng *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1996; Zhao *et al.*, 2000; Ghose *et al.*, 2001; Kami *et al.*, 2002).

Ihre weite Verbreitung und große Bedeutung für die Funktionen der Zelle sowie ihre sehr gute experimentelle Zugänglichkeit haben dazu geführt, dass viele experimentelle und theoretische Methoden zur Untersuchung von Protein-Domänen und Protein-Protein-Interaktionen an SH3-Domänen getestet und etabliert wurden (Tsai *et al.*, 1999; Horita *et al.*, 2000; Mok *et al.*, 2001; Korzhnev *et al.*, 2004).

1.3 Nicht-Rezeptor Tyrosinkinasen der Src-Familie

Ein Netzwerk verschiedener Kinasen, Phosphatasen und regulatorischer Faktoren führt durch vielseitige molekulare Interaktionen einen Großteil der Signaltransduktionsprozesse in eukaryontischen Zellen aus. Dabei ist die Tyrosinphosphorylierung nur im Unterreich der *Metazoa* zu finden und unterscheidet sich somit grundlegend von einzelligen Organismen (Shenk & Steele, 1993). Aufgrund der großen Zahl an Tyrosinkinasen ist die Regulation ihrer molekularen Aktivität ein zentraler Aspekt der Signaltransduktion.

Im Allgemeinen lassen sich zwei Arten von Tyrosinkinasen unterscheiden. Zum einen sind dies die membranständigen Rezeptortyrosinkinasen, die auf ihrer zytoplasmatischen Seite eine katalytische Aktivität zur Phosphorylierung von Tyrosinresten besitzen und auf der extrazellulären Seite zur Bindung von Signalmolekülen befähigt sind. In Folge der Bindung eines Signalmoleküls an den extrazellulären Bereich erfolgt die Weiterleitung des Signals durch strukturelle Änderungen des Proteins bis zur Kinasedomäne, die daraufhin spezifische Tyrosinreste in ihren Substratmolekülen phosphoryliert (Hubbard, 2002). Die zweite Art von Tyrosinkinasen kommt ausschließlich zytoplasmatisch vor und besitzt keine eigene Rezeptorfunktionalität. Aus diesem Grund werden diese Kinasen auch als Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen bezeichnet. Extrazelluläre Signale werden hier durch die Assoziation mit Rezeptorkomplexen wie dem T-Zell- oder B-Zell-Rezeptor in das Zellinnere weitergeleitet (Singer *et al.*, 2002).

Die Src-Familie stellt eine der bekanntesten Familien der Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen dar. Sie besteht aus neun Mitgliedern: Src, Yes, Fgr, Yrk, Fyn, Lyn, Hck, Lck und Blk (Courtneidge, 1994). Alle neun Mitglieder zeigen eine identische Domänenstruktur (Abb. 1.3). Die NH₂-terminale Unique-Domäne weist eine Myristylierungs- oder Palmitoylierungsstelle auf (Resh, 1994). Sie wird von einem regulatorischen Domänenpaar aus SH3- und SH2-Domäne gefolgt. Daran schließt sich die zweilappige Kinasedomäne an, deren aktives Zentrum in der inaktiven Form zwischen den beiden Lappen verborgen ist, weshalb diese Konformation auch als geschlossene Form bezeichnet wird (Williams *et al.*, 1998). Abschließend besitzen alle Mitglieder der Src-Familie einen regulatorischen COOH-Terminus mit einem hochkonservierten Tyrosinrest (Y527 in Src), der in phosphorylierter Form an die SH2-Domäne bindet und so die Kinaseaktivität reduziert (Brown & Cooper, 1996). In dieser inaktiven Form bindet zusätzlich die SH3-Domäne an die prolinreiche Verbindungsregion zwischen SH2- und Kinase-Domäne (Williams *et al.*, 1998) (Abb. 1.4).

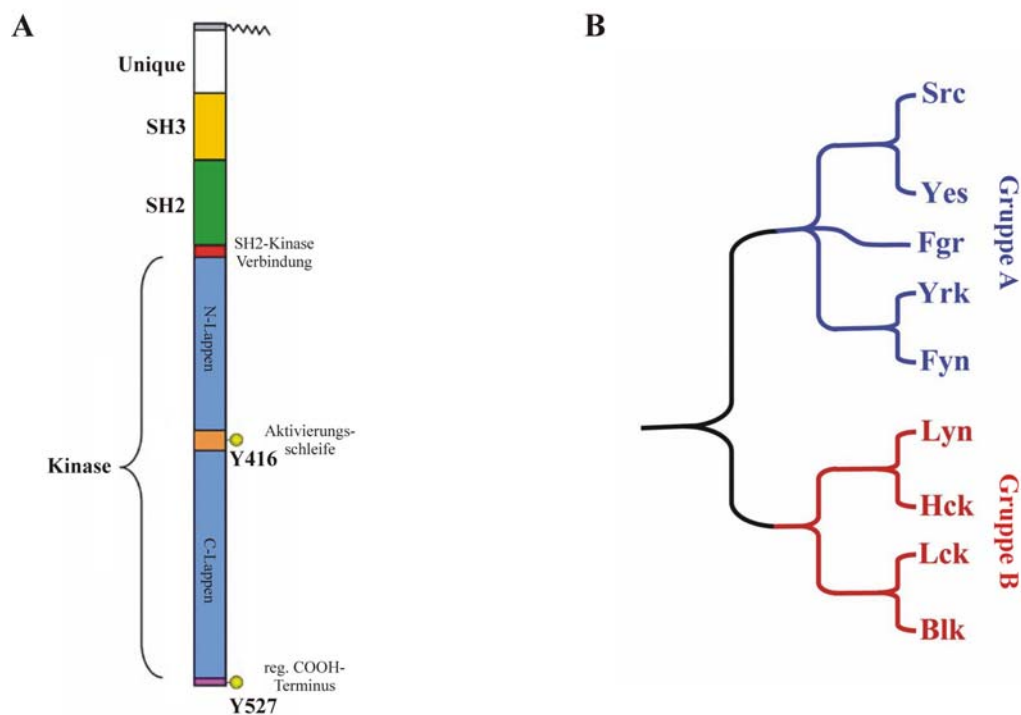


Abb. 1.3 Schematische Struktur und phylogenetische Verwandtschaft der Kinasen der Src-Familie. (A) Alle Mitglieder der Familie der Src-Kinasen weisen den selben Domänenbau auf. Die NH₂-terminale Unique-Domäne besitzt einen Membrananker (meist Myristylanker). Gefolgt wird sie von den beiden regulatorischen Domänen SH3 (gelb) und SH2 (grün), die über eine Verbindung (rot) mit der katalytischen Domäne (blau) verbunden sind. Die katalytische Domäne besteht aus zwei Lappen, die durch eine Aktivierungsschleife (orange) verbunden sind. Kinase-Domäne schließt sich der regulatorische COOH-Terminus (violett) an. Alle Mitglieder der Src-Familie weisen zwei hochkonservierte Tyrosine auf, die phosphoryliert werden können (Y416 und Y527 in Src). (B) Schematische Darstellung der phylogenetischen Verwandtschaft der Mitglieder der Src-Familie. Aufgrund der Verwandtschaft lässt sich die Familie in zwei Gruppen unterteilen. Gruppe A (blau): Src, Yes, Fgr, Yrk und Fyn und Gruppe B (rot): Lyn, Hck, Lck und Blk (Williams *et al.*, 1998).

Die Familie der Src-Kinasen lässt sich aufgrund sequenzieller Ähnlichkeiten in die Gruppe A und B unterteilen (Abb. 1.3 B). Diese beiden Gruppen unterscheiden sich hauptsächlich in drei Sequenzbereichen – der RT-Schleife der SH3-Domäne, der Verbindungsregion zwischen SH2-Domäne und Kinase-Domäne und der Schleife zwischen der α -Helix C und dem β -Faltblattstrang 4 der Kinase-Domäne (Williams *et al.*, 1998). Die Unterschiede bezüglich der SH3-Domäne sind in Abb. 1.1 B zu erkennen. Während alle Mitglieder der Gruppe A das RT-Dipeptid aufweisen, nach dem der entsprechende Schleifenbereich benannt wurde, weisen die Mitglieder der Gruppe B an dieser Stelle IH- (Lyn und Hck), SH- (Lck) oder MN-Dipeptid (Blk) auf. Weiterhin unterscheiden sich die Mitglieder von Gruppe B durch eine Verkürzung der n-Src-Schleife um eine Aminosäure gegenüber Gruppe A (Abb. 1.1).

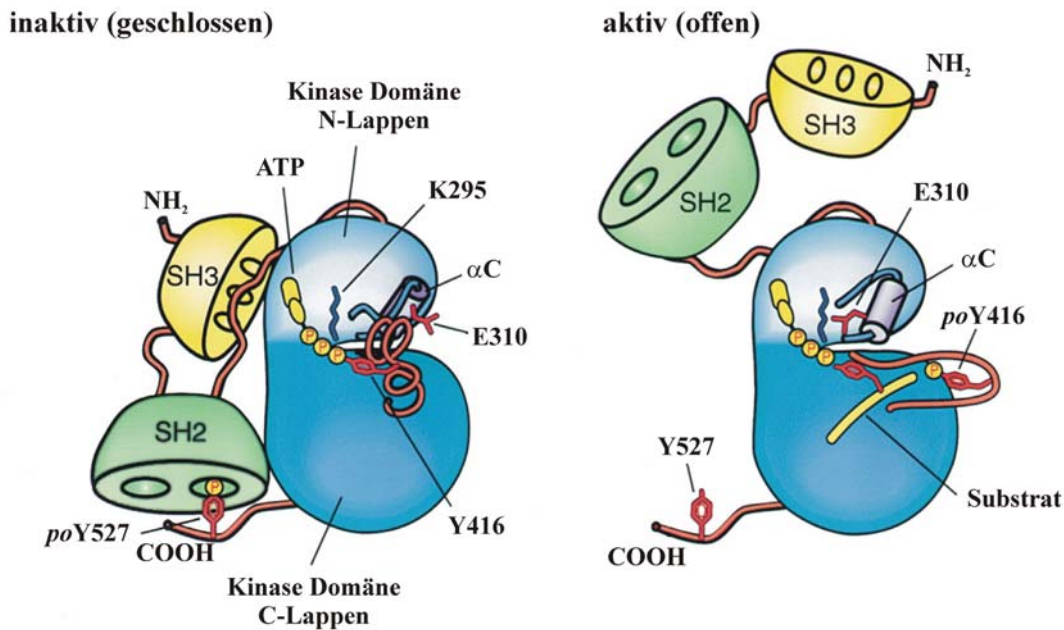


Abb. 1.4 Schematische Darstellung der inaktiven (geschlossenen) und aktiven (offenen) Konformation einer Src-Kinase. Die inaktive Konformation wird durch intramolekulare Wechselwirkungen stabilisiert. Einerseits bindet Y527 des regulatorischen COOH-Terminus (in Src) in phosphorylierter Form an die SH2-Domäne (grün), andererseits bindet die prolinreiche Verbindungsregion zwischen SH2- und Kinase-Domäne an die SH3-Domäne (gelb). In dieser Konformation sind die katalytischen Reste K295 und E310 (in Src) der Kinase-Domäne (blau) verborgen. Verlust der intramolekularen Kontakte sowie Phosphorylierung von Y416 (in Src) in der Aktivierungsschleife führen zu einem Öffnen der Konformation in der Substratmoleküle phosphoryliert werden können (nach Young *et al.*, 2001).

Einsichten in den Regulationsmechanismus der Kinasen der Src-Familie wurden aus den Röntgenkristallstrukturen der *c-Src* (Xu *et al.*, 1997; Williams *et al.*, 1997) und *Hck* (Sicheri *et al.*, 1997) gewonnen. Neben dem regulatorischen COOH-Terminus, fungieren auch die SH3- und SH2-Domäne zumindest teilweise als negative Regulatoren der Kinaseaktivität. Durch die Ausbildung ihrer intramolekularen Kontakte stabilisieren sie die inaktive (geschlossene) Konformation der Kinasedomäne (Abb. 1.4). Ein Aufbrechen der intramolekularen Kontakte entweder durch die Dephosphorylierung des Tyrosinrests am regulatorischen COOH-Terminus (Mustelin & Altman, 1990) oder durch die Bindung von Liganden an die SH2- und/oder SH3-Domäne (Moarefi *et al.*, 1997; Schindler *et al.*, 1999) führt zur Autophosphorylierung eines hochkonservierten Tyrosins in der Aktivierungsschleife zwischen den beiden Lappen der Kinasedomäne und somit zu einer Aktivierung der katalytischen Domäne (Watts *et al.*, 1994; Yamaguchi & Hendrickson, 1996; Johnson & O'Reilly, 1996). Diese aktive Konformation der Kinasedomäne wird analog zur geschlossenen Form als offene Form bezeichnet (Abb. 1.4). Obwohl sich die

Wechselwirkungen mit den regulatorischen Domänen weit vom aktiven Zentrum der Kinasedomäne entfernt ereignen, kommt ihnen eine große Bedeutung bei der Regulation und vor allem bei der Feinabstimmung der Kinaseaktivität zu, da die 'Klammer' bestehend aus den regulatorischen Domänen gelöst wird, die die Kinasedomäne vorher in ihrer inaktiven Form gehalten hat (Hartley *et al.*, 2000; Cannons & Schwartzberg, 2004).

1.4 Tip – ein herpesvirales Protein

Eine Infektion mit *Herpesvirus saimiri* (HVS), einem Rhadinovirus, führt in Neuweltprimaten zu akuten peripheren T-Zell-Lymphomen und lymphozytischer Leukämie – in seinem natürlichen Wirt, dem Totenkopffäffchen (*Saimiri sciureus*), ist das Virus hingegen apathogen (Fickenscher & Fleckenstein, 2001). Viren der Untergruppe C von HVS transformieren effizient menschliche Lymphozyten zu kontinuierlich proliferierenden T-Zell-Linien (Biesinger *et al.*, 1992; Medveczky *et al.*, 1993).

Für die Transformation sind zwei Proteine des Virusgenoms verantwortlich: STP-C (*saimiri transformation-associated protein, subgroup C*) und Tip (*tyrosine-kinase interacting protein*) (Jung *et al.*, 1991; Biesinger *et al.*, 1995). Während für den transformierten Phänotyp der kontinuierlich proliferierenden T-Lymphozyten beide Proteine erforderlich sind (Duboise *et al.*, 1998) konnte eine Entwicklung von T-Zell-Lymphomen in transgenen Mäuse gezeigt werden, die nur Tip exprimieren (Wehner *et al.*, 2001).

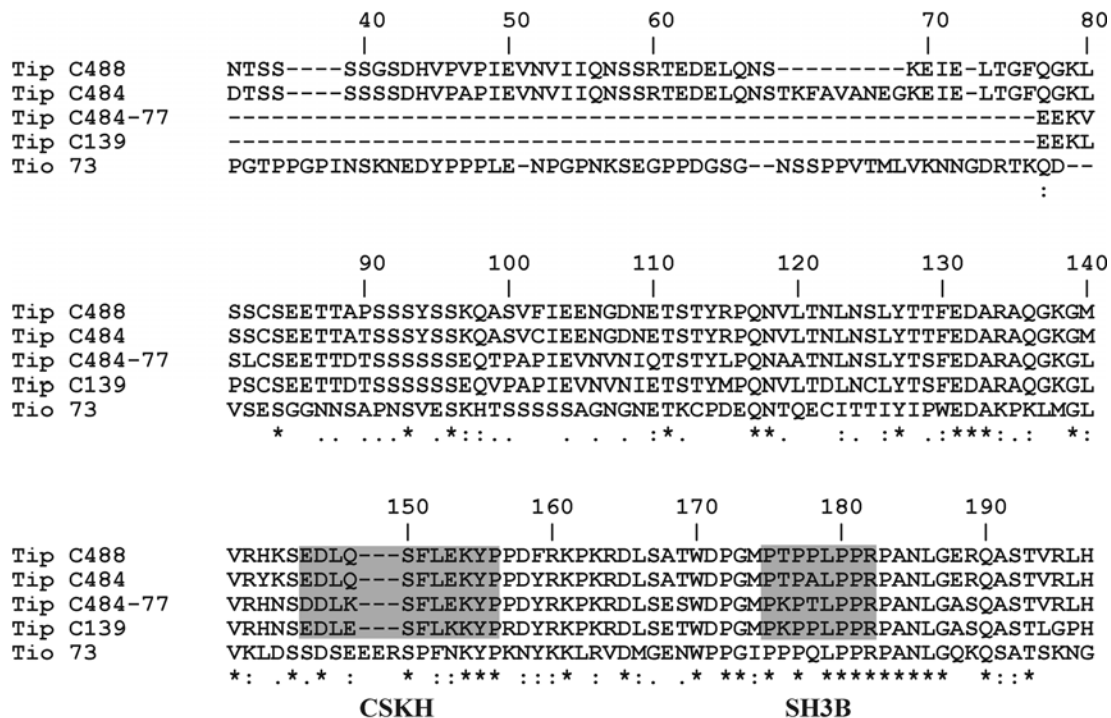


Abb. 1.5 Sequenzvergleich der Tip-Proteinen verschiedener *Herpesvirus saimiri* Untergruppe C Stämme und des homologen Tio-Proteins aus *Herpesvirus ateles* Stamm 73. Grau schattierte Bereiche heben das CSKH- (*COOH-terminal Src-related kinase homology*) und das SH3B-Motiv (*SH3 bindung*) in Tip hervor, die für die Interaktion mit LckSH3 notwendig und hinreichend sind (Jung *et al.*, 1995). Die in dieser Arbeit verwendete Nummerierung von Tip C488 ist angegeben.

Tip bindet affin an Lck, ein Mitglied der Src-Familie der Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen (Kap 1.3). Für die Lck-Bindung *in vitro* ist dabei ein 37 Aminosäuren langer Sequenzabschnitt sowohl notwendig als auch hinreichend (Jung *et al.*, 1995). Dieser Sequenzabschnitt beinhaltet zwei getrennte Sequenzmotive; einen prolinreichen Abschnitt (SH3B), der die Konsensussequenz für ein Klasse II-Polyprolinhelix enthält und an die SH3-Domäne bindet und einen zweiten Abschnitt (CSKH), der an die Kinase-Domäne der Lck bindet (Abb. 1.5; Jung *et al.*, 1995; Lund *et al.*, 1996; Hartley *et al.*, 2000). Da Lck eine wichtige Rolle bei der T-Zell-Aktivierung spielt, ist es wahrscheinlich, dass die Tip-Bindung an Lck ein wesentlicher Bestandteil der T-Zell-Transformation ist (Hartley *et al.*, 2000; Kjellen *et al.*, 2002).

2 Ziele der Arbeit

Die Wechselwirkung des Tip-Proteins aus *Herpesvirus saimiri* mit der Kinase Lck spielt eine zentrale Rolle für die Transformation von T-Zellen (Kap. 1.4). Die molekularen Details dieser Interaktion sind von großem Interesse da sie mögliche Ansatzpunkte für die Entwicklung von Wirkstoffen zur gezielten Kontrolle der Aktivität von Tyrosinkinasen liefern können. In dieser Arbeit sollten die Interaktionen der SH3-Domäne der Lck im Komplex mit Tip in atomarer Auflösung charakterisiert werden, um die molekularen Mechanismen bei der Aktivierung der Lck eingehender zu verstehen. Eine Charakterisierung mit atomarer Auflösung ist erforderlich, da Tip wie nahezu alle natürlichen SH3-Liganden in seinem klassischen SH3-Bindungsmotiv (PPII-Helix) nur sehr wenig Spielraum für eine Variabilität der Erkennung verschiedener SH3-Domänen aufweist (Kap. 1.2.1) und daher auf zusätzliche Kontakte außerhalb dieses kanonischen Strukturmotivs angewiesen ist (Bauer, 2001, Bauer *et al.*, 2004). In vorangegangenen Arbeiten konnte durch NMR-spektroskopische Untersuchungen gezeigt werden, dass Tip in einer Klasse II-Orientierung an die LckSH3 bindet (Bauer, 2001; Schweimer *et al.*, 2002; Bauer *et al.*, 2004).

Aufgrund ungünstiger Dynamik auf der NMR-Zeitskala stößt die Bestimmung der hochaufgelösten Komplexstruktur aber an die Grenzen der Methode. Trotzdem konnten mit geringer Auflösung Sequenzbereiche in Tip COOH-terminal der PPII-Helix identifiziert werden, die eine hydrophobe Tasche auf der Oberfläche der LckSH3 kontaktieren (Bauer, 2001; Bauer *et al.*, 2004). Eine homologiebasierte Modellierung des LckSH3-Tip-Komplexes auf der Basis bekannter Komplexstrukturen ist aufgrund der geringen sequenziellen Ähnlichkeit der flankierenden Bereiche der Liganden nicht möglich.

Aus diesem Grund sollte im Rahmen dieser Arbeit die Komplexstruktur der höher affinen, stark homologen LynSH3 mit Tip NMR-spektroskopisch bestimmt werden. Bindungspartner mit einer höheren Affinität stellen häufig geeignetere Systeme für eine strukturelle Charakterisierung dar.

Über die Strukturbestimmung dieses affineren Komplexes hinaus sollte in dieser Arbeit in einem zweiten Ansatz versucht werden, durch gezielte Einführung einer Punktmutation in LckSH3, die Affinität des Komplexes mit Tip zu erhöhen und somit das System einer NMR-spektroskopischen Strukturbestimmung zugänglich zu machen.

In beiden Fällen sollten die an den Wechselwirkungen beteiligten Reste nicht nur

strukturell, sondern auch bezüglich ihrer Dynamik untersucht und mit der LckSH3 verglichen werden. Sollte durch die Punktmutation der LckSH3 die Affinität zu Tip moduliert werden können, sollten die molekularen Ursachen im Detail untersucht werden. Dazu sollte eine Charakterisierung der jeweiligen Interaktionsflächen sowie der Dynamik vor und nach der Komplexbildung auf verschiedenen mit NMR- und Fluoreszenzspektroskopie beziehungsweise Moleküldynamiksimulationen zugänglichen Zeitskalen erfolgen.

Insgesamt sollte auf Basis der hochaufgelösten Strukturen der homologen LynSH3 und/oder der gezielt mutierten LckSH3 im Komplex mit Tip ein zuverlässiges Strukturmodell für den wildtyp-LckSH3-Tip Komplex erstellt werden, welches zu einem näheren Verständnis der Mechanismen der Tip-vermittelten Lck-Aktivierung führen sollte. Weiterhin sollten in diesem Zusammenhang die molekularen Faktoren eingehend charakterisiert werden, die eine Rolle für die Affinität der jeweiligen Komplexe spielen. Dieses soll helfen, ein umfassenderes Verständnis für die Vielseitigkeit der Mechanismen molekularer Erkennungsprozesse bei Protein-Protein-Wechselwirkungen zu erhalten.

3 Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Enzyme, Chemikalien und Säulenmaterialien

New England Biolabs (Schwalbach / Ts.): *Vent*-DNA-Polymerase, *Vent*-DNA-Polymerase-Puffer; MBI Fermentas (St.Leon-Rot): *Bam*HI, *Eco*RI, $10 \times Y^+$ /*Tango*-Puffer, *Taq*-DNA-Polymerase, *Taq*-DNA-Polymerase-Puffer, DNA Marker 2 (*Lam*da/*Hind*III), GeneRuler 100 bp Ladder, dNTP Set (100 mM); Gibco BRL Life Technologies (Karsruhe): *T4*-DNA-Ligase, $5 \times T4$ -DNA-Ligase-Puffer; Amersham Biosciences (Freiburg): *CIAP*, $10 \times CIAP$ -Puffer; Sigma (Steinheim): Lysozym.

Roth (Karlsruhe): Ampicillin, Trypton, Hefeextrakt, Dithiothreitol (DTT), Tris, Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), SDS, Glycin, Acrylamidlösungen, APS, TEMED, Essigsäure; Fluka (Buchs): Tetracyclin, β -Mercaptoethanol, TFA, Bromphenolblau, Coomassie Brilliantblau R 250, L-Glutathion (reduziert); Sigma (Steinheim): Triton X-100, red. Glutathion, Xylencyanol; Merck (Darmstadt): Nickel(II)-Sulfat, Tween 20, PMSF, Acetonitril, Glycerin, Methanol; Roche-Diagnostics (Mannheim): Protease-Inhibitor-Tabletten, DNase A1; Gerbu (Gaiberg): Ampicillin; Campro (Berlin): ^{15}N -Ammoniumchlorid, $^{13}\text{C}_6$ -Glucose.

Amersham Biosciences (Freiburg): 5 ml HiTrap Chelating HP Affinitätschromatografiesäulen, 5 ml GStrap FF Affinitätschromatografiesäulen, 364 ml Superdex 200 Größenausschlusschromatografiesäule mit 13 μm Partikelgröße; Waters (Eschborn): 25 mm C18-Säule PrepLC.

Alle anderen hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden im Reinheitsgrad p.A. oder vergleichbarer Qualität von den Firmen Fluka (Buchs), Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) und Sigma (Steinheim) bezogen.

3.1.2 Verbrauchsmaterial

Profos AG (Regensburg): *Pfl*-Phagensuspension; Macherey-Nagel (Düren): NucleoSpin Plasmid; Eppendorf (Hamburg): FastPlasmid Mini; QIAGEN (Hilden): QIAquick Gel Extraction Kit, QIAquick Nucleotide Removal Kit; Roth (Karlsruhe): Einweg-Pasteurpipetten (3 ml), Spectra/Por Dialysemembranen (MWCO 100, 1000 und 3500), Einmalspritzen (5 ml und 20 ml), Einmalkanülen 70 mm, Parafilm M (5 cm und 10 cm), Universal-Indikatorstäbchen pH-Fix; Greiner (Frickenhausen): PP-Röhrchen (15 ml und 50 ml); Sarstedt (Nümbrecht): Biosphere-Spitzen (20 μl , 200 μl , 1 ml),

Safe-seal Reagiergefäße (1,5 ml und 2,0 ml), Petrischalen mit Entlüftung, Gammasteril Impfschlingen (10 µl), Spritzenfilter Filtropur S 0,20 und 0,45, Serologische Pipetten (10 ml und 25 ml); Fisher (Schwerte): Sterilfiltrationssysteme PS mit Nylonmembran 0,2 (250 ml und 500 ml), Vivaspin 20 (MWCO 5 000 und 10 000), Halbmikro-Küvetten Plastibrand, UV-Halbmikro-Küvetten Plastibrand

3.1.3 Nährmedien

Alle Nährmedien für molekularbiologische Anwendungen wurden mit vollentsalztem Wasser angesetzt und vor Gebrauch 20 min bei 121 °C und 1 bar Überdruck autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurde den Nährmedien das jeweilige Antibiotikum zugesetzt (Endkonzentrationen: Ampicillin 100 µg/ml, Kanamycin 20 µg/ml). Zur Herstellung fester Nährböden wurden dem Medium 15 g/l Agar zugegeben. Hitzelabile Lösungen wurden mit 0,20 µm-Filtern sterilfiltriert.

Das verwendete M9-Minimalmedium (Sambrook *et al.*, 1989) wurde mit TS2-Supplementlösung (Meyer & Schlegel, 1983) ergänzt.

Tab. 3.1 Zusammensetzung der in dieser Arbeit verwendeten Nährmedien.

<i>Nährmedium</i>	<i>Zusammensetzung</i>	
LB-Medium (Luria Bertani)	Trypton	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	10 g
	Wasser	<i>ad</i> 1000 ml
5 × M9-Minimalmedium	Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	85,5 g
	KH ₂ PO ₄	15,0 g
	NaCl	2,5 g
	NH ₄ Cl	5,0 g
	Wasser	<i>ad</i> 1000 ml
TS2- Supplementlösung	ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	100 mg
	MnCl ₂ · 4 H ₂ O	30 mg
	H ₃ BO ₃	300 mg
	CoCl ₂ · 6 H ₂ O	200 mg
	NiCl ₂ · 6 H ₂ O	20 mg
	CuCl ₂ · 6 H ₂ O	10 mg
	Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	900 mg
	Na ₂ SeO ₃	20 mg
Wasser	<i>ad</i> 1000 ml	
1 × M9-Minimalmedium	5 × M9	200 ml
	TS2-Lösung	2 ml
	MgSO ₄ (1 M)	2 ml
	Fe(III)-citrat (10 mM)	1 ml
	Glucose (20 % (w/v))	20 ml
	CaCl ₂ (1 M)	100 µl
	Wasser	<i>ad</i> 1000 ml

3.1.4 Puffer

Alle Puffer für Affinitätschromatografien, Größenausschlusschromatografie und Umkehrphasenchromatografie (RP-HPLC) wurden mit deionisiertem Wasser hergestellt, filtriert (Porengröße 0,45 µm) und entgast. Alle weiteren Puffer wurden mit vollentsalztem Wasser angesetzt.

Tab. 3.2 Zusammensetzung der in dieser Arbeit verwendeten Pufferlösungen.

<i>Puffer</i>	<i>Zusammensetzung</i>
phosphatgepufferte Saline (5 × PBS)	NaCl (1 M) KCl (10 mM) Na ₂ HPO ₄ · 7 H ₂ O (20 mM) KH ₂ PO ₄ (7 mM)
Aufschlusspuffer	1 × PBS Triton X-100 (0,5 %) DTT (5 mM) Protease-Inhibitor-Tablette DNase A1 (20 µg/ml) Lysozym (20 µg/ml)
Lysispuffer	Tris/HCl (50 mM) NaCl (100 mM) β-Mercaptoethanol (1 mM) Protease-Inhibitor-Tablette DNase A1 (20 µg/ml) Lysozym (20 µg/ml)
GST-Bindungspuffer	1 × PBS Triton X-100 (0,1 %) DTT (5 mM)
GST-Elutionspuffer	Tris/HCl, pH 8.0 (50 mM) reduziertes Glutathion (10 mM)
GST-Regenerationspuffer 1	Tris/HCl, pH 8,5 (100 mM) NaCl (500 mM)
GST-Regenerationspuffer 2	Natriumacetat, pH 4,5 (100 mM) NaCl (500 mM)
Chelating-HP-Beladungspuffer	NiSO ₄ (50 mM)
Chelating-HP-Bindungspuffer	Imidazol (5 mM) NaCl (500 mM) Tris/HCl, pH 7,9 (20 mM)
Chelating-HP-Waschpuffer	Imidazol (60 mM) NaCl (500 mM) Tris/HCl, pH 7,9 (20 mM)
Chelating-HP-Elutionspuffer	Imidazol (1 M) NaCl (500 mM) Tris/HCl, pH 7,9 (20 mM)
Chelating-HP-Regenerationspuffer	EDTA (100 mM) NaCl (500 mM) Tris/HCl, pH 7,9 (20 mM)

<i>Puffer</i>	<i>Zusammensetzung</i>
PreScission-Spaltpuffer	Tris/HCl, pH 8,0 (50 mM) NaCl (150 mM) EDTA (1 mM) DTT (1 mM) PMSF (0,5 mM)
Thrombin-Spaltpuffer	Tris-HCl, pH 8,4 (20 mM) NaCl (150 mM) β -Mercaptoethanol (2,5 mM)
YUH-Spaltpuffer	Tris-HCl, pH 8,0 (50 mM) NaCl (100 mM) β -Mercaptoethanol (1 mM)
NMR-Dialysepuffer	Kaliumphosphat, pH 6,4 (2 mM) NaCl (1 mM)
HPLC-Puffer_1	TFA (0,1 %)
HPLC-Puffer_2	TFA (0,1 %) Acetonitril (80 %)
TAE-Puffer	Tris-Acetat, pH 8,0(10 mM) EDTA (1 mM)
DNA-Auftragspuffer:	EDTA (50 mM) Glycerin (50 % (v/v)) Bromphenolblau (0,15 % (w/v)) Xylencyanol (0,15 % (w/v))
SDS-Laufpuffer	Tris-HCl, pH 8,3 (25 mM) Glycin (192 mM) SDS (0,1 % (w/v))
Trenngellösung	Tris-HCl, pH 8,8 (375 mM) Acrylamid (19 % (w/v)) <i>N,N'</i> -Methylenbisacrylamid (0,46 % (w/v)) SDS (0,1 % (w/v))
Sammelgellösung	Tris-HCl, pH 6,4 (62 mM) Acrylamid (7,5 % (w/v)) <i>N,N'</i> -Methylenbisacrylamid (0,21 % (w/v)) SDS (0,1 % (w/v))
Coomassie-Färber	Coomassie Brilliant Blue R-2500 (0,5 % (w/v)) Methanol (45 % (v/v)) Essigsäure (9,2 % (v/v))
Entfärber I	Methanol (25 % (v/v)) Essigsäure (1 % (v/v))
Entfärber II	Methanol (5 % (v/v)) Essigsäure (7 % (v/v))

3.1.5 Bakterienstämme und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten *Escherichia coli* (*E. coli*) Stämme sind in Tabelle 3.3, die verwendeten und konstruierten Plasmide in Tabelle 3.4 aufgelistet.

Tab. 3.3 Genotypen und Referenzen der in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme.

<i>Bakterienstamm</i>	<i>Genotyp</i>	<i>Referenz</i>
<i>E. coli</i> TOP10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ□80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 deoR recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697</i> <i>galK rpsL(Str^R) endA1 nupG</i>	Grant <i>et al.</i> (1990)
<i>E. coli</i> BL21	F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm</i>	Studier & Moffatt (1986) Phillips <i>et al.</i> (1984)
<i>E. coli</i> BL21-CodonPlus™-RP	F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>dcm</i> ⁺ Tet ^r <i>gal endA Hte</i> [<i>argU proL Cam</i> ^r]	Studier & Moffatt (1986) Phillips <i>et al.</i> (1984)

Tab. 3.4 Resistenzen, Eigenschaften und Referenzen der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide.

<i>Plasmid</i>	<i>Resistenz</i>	<i>Eigenschaften</i>	<i>Referenz</i>
pGEX-4T-1	Amp	Expressionsvektor	Amersham Biosciences, Freiburg
pGEX-6P-2	Amp	Expressionsvektor	Amersham Biosciences, Freiburg
pTKK-19	Kan	Expressionsvektor	Kohno <i>et al.</i> , 1998
pGEX-6P-Lyn-SH3_4	Amp	pGEX-6P-2-Derivat mit LynSH3-Gen	Bauer, 2001
pGEX-Lck-SH3(59-120)_5	Amp	pGEX-4T-1-Derivat mit LckSH3-Gen	Schweimer <i>et al.</i> , 2002
pGEX-LckSH3_P17G	Amp	pGEX-4T-1-Derivat mit LckSH3_P17G-Gen	diese Arbeit
pTKK-19-Tip	Kan	pTKK-19-Derivat mit Tip(140-191)- Gen	Bauer <i>et al.</i> , 2004

3.1.6 Synthetische Oligonukleotide und Peptide

Die in dieser Arbeit verwendeten synthetischen Oligonukleotide (Tab. 3.5) wurden von der Firma BioTeZ (Berlin) bezogen.

Tab. 3.5 Nukleotidsequenzen der in dieser Arbeit verwendeten synthetischen Oligonukleotide

<i>Oligonukleotid</i>	<i>Nukleotidsequenz</i>	<i>Länge</i>
LckSH3_P17G-5'	5'-d[GGA GGA GGA TCC CCA CTG CAA GAC AAC ATG GTT ATC GCT CTG CAC AGC TAT GAG GGG TCT CAC GAC GGA GAT CTG GGC]-3'	78-mer
LckSH3-3'	5'-d[GGA GGA GAA TTC AGT TCG CTT TGG CCA CAA AAT TGA AGG GG]-3'	41-mer
pGEX-5'	5'-d[GGG CTG GCA AGC CAC GTT TGG TG]-3'	23-mer
pGEX-3'	5'-d[CCG GGA GCT GCA TGT GTG ACA GG]-3'	23-mer

Die in dieser Arbeit verwendeten synthetischen Peptide (Tab. 3.6) wurden von den Firmen Coring System Diagnostix (Gernsheim) und Biosyntan (Berlin) bezogen. Die NH₂- und COOH-Termini der Peptide wurden jeweils acetyliert (AcNH) beziehungsweise amidiert (CONH₂). Bei Tip(168-185) und Tip(168-187) wurde W170 der Tip-Sequenz (Abb. 1.5) durch Leucin ersetzt, um eine eindeutige Interpretierbarkeit der Fluoreszenzänderungen der SH3-Domänen bei Peptidzugabe zu gewährleisten.

Tab. 3.6 Aminosäuresequenzen der in dieser Arbeit verwendeten synthetischen Peptide

<i>Peptid</i>	<i>Aminosäuresequenz</i>	<i>Länge</i>
Tip(168-185)	AcNH-ATLDPGMPTPPLPPRPAN-CONH ₂	18-mer
Tip(168-187)	AcNH-ATLDPGMPTPPLPPRPANLG-CONH ₂	20-mer
Tip(167-199)	AcNH-SATWDPGMPTPPLPPRPANLGERQASTVRLHVK-CONH ₂	33-mer

3.1.7 Laborgeräte

Die in dieser Arbeit verwendeten Laborgeräte sind in Tabelle 3.7 aufgeführt.

Tab. 3.7 Liste der in dieser Arbeit verwendeten Laborgeräte

<i>Gerät</i>	<i>Hersteller</i>
ÄKTApurifier 10-System	Amersham Biosciences, Freiburg
P1-Pumpe	Amersham Biosciences, Freiburg
Sequential Stopped-Flow Spektrofluorimeter DX.17MV	Applied Photophysics, Leatherhead, UK
Microplate Reader Model 550	Bio-Rad, München
Geldokumentationssystem Gel-Doc 2000	Bio-Rad, München
PowerPac 300 und 3000	Bio-Rad, München
NMR-Spektrometer	DRX-400, DRX-600, Avance700 und Avance800 Bruker, Karlsruhe
SpeedVac vacuubrand ABM	Graffenberger Antriebstechnik, Marktredwitz
Dampfsterilisator Varioklav	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Universal 30RF	Hettich, Tuttlingen
Spektralfluorimeter F-4500	Hitachi, Tokyo, J
Gelkammern Mighty Small SE250/260	Hoefer, San Francisco, CA, USA
CD-Spektropolarimeter J-810 S mit Temperatur-Kontrolleinheit CDF-426S	JASCO International, Groß-Umstadt
Sicherheitswerkbank Heraeus HERAsafe HS	Kendro, Hanau
Tischzentrifugen Biofuge pico, fresco und stratos	Kendro, Hanau
Blockthermostat BT100	Kleinfeld Labortechnik, Gehrden
Kühlzentrifuge Centrikon T-124	Kontron, Eching
Kontron HPLC System	Kontron, Eching

<i>Gerät</i>	<i>Hersteller</i>
UV/VIS-Spektrometer Kontron 930	Kontron, Neufahrn
Gelkammer Agagel	Maxi Biometra, Göttingen
Autoklav 23	Melag, Berlin
Brutschrank Modell 200	Memmert, Schwabach
Incubator Shaker C25KC	New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA
PCR System GeneAmp 2400 und 9600	Perkin Elmer, Wellesley, MA, USA
Hochvakuumpumpe Balzers	Pfeiffer, ABlar
Seral Reinstwasser System	Ransbach, Baumbach
Feinwaage AC 1215 und Waage MC1	Sartorius, Göttingen
Christ LOC-1M Lyophylle	Sartorius BBI Systems, Melsungen
Christ CMC-1 SpeedVac	Sartorius BBI Systems, Melsungen
Fermenter Biostat B1 und B10 mit Frigomix 1000	Sartorius BBI Systems, Melsungen
Inkubatorschüttler Certomat HK/R	Sartorius BBI Systems, Melsungen
Sonifier Labsonic u	Sartorius BBI Systems, Melsungen
UV-Visible Spektrophotometer Helios γ	Thermo Spectronic, Cambridge, UK
Waters HPLC System	Waters, Eschborn
pH-Meter WTW inoLab und pH 535 MultiCal	WTW, Weilheim

3.1.8 Hochleistungsrechner

Für die in dieser Arbeit durchgeführten moleküldynamischen Simulationen und deren Auswertung wurden Hochleistungsrechner der Abteilung für Bioinformatik der Universität Erlangen-Nürnberg sowie der Rechenzentren Erlangen, Bayreuth und München verwendet (Tab. 3.8). Insgesamt wurden für die vorliegende Arbeit auf den verschiedenen Rechnern zirka 56 000 h Prozessorzeit verwendet.

Tab. 3.8 Typen, Prozessoren und Arbeitsspeicherkapazitäten (RAM) der in dieser Arbeit verwendeten Hochleistungsrechner.

<i>Rechner</i>	<i>Typ</i>	<i>Prozessoren</i>	<i>RAM</i>	<i>Standort</i>
janus	Linux-Server	2 x Intel PIII (733 MHz)	776 MB	Abt. Bioinformatik, Universität Erlangen
skylla	Linux-Server	2 x AMD Opteron (1,8 GHz)	2 GB	Abt. Bioinformatik, Universität Erlangen
mssgi1	SGI Origin 3400	28 x MIPS R14000 (500 MHz)	56 GB	Regionales Rechenzentrum Erlangen
sfront01	Linux-Cluster	82 Knoten mit 2 x Intel Xeon (2.66 GHz)	164 GB	Regionales Rechenzentrum Erlangen
lxsrv1	Linux-Cluster	163 Knoten verschiedener Bauarten	428 GB	Leibnitz-Rechenzentrum München
btvrx1	SGI Origin 200	4 x MIPS R 12000 (270 MHz)	2 GB	Rechenzentrum Bayreuth

<i>Rechner</i>	<i>Typ</i>	<i>Prozessoren</i>	<i>RAM</i>	<i>Standort</i>
btrvx2	SGI Octane MXE	2 x MIPS R 12000 (300 MHz)	1 GB	Rechenzentrum Bayreuth
btrvx3	SGI Octane MXE	2 x MIPS R 12000 (300 MHz)	1 GB	Rechenzentrum Bayreuth
btrvx4	SGI Octane MXE	2 x MIPS R 12000 (300 MHz)	1 GB	Rechenzentrum Bayreuth
btrzx3	Linux-Cluster	48 Knoten mit 2 x Intel Xeon (3,06 GHz)	96 GB	Rechenzentrum Bayreuth
btrzxp	SUN Fire V880	8 x Ultrasparc3 (700 MHz)	16 GB	Rechenzentrum Bayreuth
btrzxq	SUN Fire V880	8 x Ultrasparc3 (700 MHz)	16 GB	Rechenzentrum Bayreuth

3.1.9 Computerprogramme

Amber 7 (Perlman *et al.*, 1995); EdPDB (Zhang & Matthews, 1995); Matlab 6.5.0.180913a Release 13 (The MathWorks, Inc., Natick, MA, USA); MolMol 2.6 (Koradi, *et al.*, 1996); NDEE (SpinUp Inc., Dortmund); NMRCLUST (Kelley, *et al.*, 1996); NMR-View 5.0.4 (Johnson & Blevins, 1994); RasMol 2.6 (Sayle, R. A., University of Massachusetts, USA); Swiss-Pdb-Viewer (Guex & Peitsch, 1997); Sigmplot 8.0 (Systat Software, Inc., Point Richmond, CA, USA); SYBYL 6.5 (Tripos Associates Inc., 1998); Tensor 2 (Dosset *et al.*, 2000) VMD 1.8.2 (Humphrey *et al.*, 1996); Xplor-NIH 1.2.1 (Schwieters *et al.*, 2003).

3.1.10 Entwickelte Computerprogramme

Alle in dieser Arbeit entwickelten Programme wurden im Java 2 (Sun Microsystems, Inc., Santa Clara, California, USA) geschrieben und dienen der Auswertung von Schnappschüssen moleküldynamischer Simulationen, die mit *ptraj* (Teil des Amber 7 Programmpakets) erstellt wurden. Voraussetzung für ein einwandfreies Funktionieren der Programme ist die Speicherung der Schnappschüsse im PDB-Format sowie die Bezeichnung der Dateinamen nach dem Muster "Namensstamm" + "fortlaufende Nummer".

reference.java

Dieses Programm berechnet ausgehend von Gleichgewichts-MD-Simulationen die C^α-C^α-Kontakte und Wasserstoffbrückenbindungen eines Moleküls und gibt diejenigen Aminosäurepaare aus, die zu mehr als 67 % die jeweiligen Toleranzkriterien erfüllen (native Kontakte).

Eingaben	<i>file-root</i>	Namensstamm der Dateien der zu analysierenden Schnappschüsse
	<i>no of files</i>	Anzahl der Schnappschüsse
	<i>cut-off</i>	oberes Toleranzkriterium für C ^α -C ^α -Abstände (Å)
	<i>hbond-dist</i>	oberes Toleranzkriterium für HN···O-Abstand einer Wasserstoffbrücke (Å)
	<i>hbond-angle</i>	oberes Toleranzkriterium für den N-HN-O-Winkel einer Wasserstoffbrücke (°)
Ausgaben	<i>'file-root'.dist</i>	Wertepaare der Aminosäuren, die das ' <i>cut-off</i> ' Toleranzkriterium erfüllen
	<i>'file-root'.hb</i>	Wertepaare der Aminosäuren, die die ' <i>hbond-dist</i> ' und ' <i>hbond-angle</i> ' Toleranzkriterien erfüllen
	<i>'file-root'.dat</i>	Datei zur Visualisierung der Resultate mit <i>xmgacre</i>

disappear.java

Dieses Programm bestimmt die Abfolge der Verluste der nativen C^α-C^α-Kontakte einer Struktur während einer Hochtemperatur-Entfaltung-MD-Simulation. Den nativen Kontakten werden die jeweiligen *Q*-Werte (Anteil intakter nativer Kontakte des Gesamtsystems) zum Zeitpunkt des Verlusts zugewiesen.

Eingaben	<i>file-root</i>	Namensstamm der Dateien der zu analysierenden Schnappschüsse
	<i>no of files</i>	Anzahl der Schnappschüsse
	<i>time-step</i>	Zeitintervall zwischen den Schnappschüssen der Simulation
	<i>ref-file</i>	Datei mit nativen Kontakten der Struktur
	<i>cut-off</i>	oberes Toleranzkriterium für C ^α -C ^α -Abstände (Å)
Ausgaben	<i>disappear_q.dat</i>	Datei zur Visualisierung der Resultate mit <i>xmgacre</i>
	<i>nativeContacts.dat</i>	Anzahl nativer Kontakte in Abhängigkeit der Simulationsdauer
	<i>q_01.dat</i>	Zeitpunkt zu dem der <i>Q</i> -Wert länger als 75 x ' <i>time-step</i> ' kleiner als 0,1 ist
	<i>q-value.tab</i>	Tabelle der Kontaktverluste mit zugehörigem <i>Q</i> -Wert

qCombine.java

Dieses Programm berechnet aus verschiedenen Kontaktverlustkarten eine durchschnittliche Kontaktverlustkarte.

Eingaben	<i>file-root</i>	Namensstamm der Dateien der zu analysierenden Kontaktverlustkarten
	<i>no of files</i>	Anzahl der Kontaktverlustkarten
	<i>ref-file</i>	Referenzkoordinaten (PDB-Datei)
Ausgaben	<i>q_norm.dat</i>	Datei zur Visualisierung der Resultate mit <i>xmgacre</i>
	<i>q_norm.txt</i>	Tabelle der durchschnittlichen <i>Q</i> -Werte sowie Standardabweichung

qDiff.java

Dieses Programm berechnet die Differenz zwischen zwei Kontaktverlustkarten.

Eingaben	<i>file-1</i>	Kontaktverlustkarte 1
	<i>file-2</i>	Kontaktverlustkarte 2
	<i>ref-file</i>	Referenzkoordinaten (PDB-Datei)
Ausgaben	<i>q_diff.dat</i>	Datei zur Visualisierung der Resultate mit <i>xmgacre</i>
	<i>q_diff.txt</i>	Tabelle der Differenzen der <i>Q</i> -Werte

disappear_2D.java

Dieses Programm bestimmt die Abfolge der Verluste der nativen C^α-C^α-Kontakte für zwei Teilsysteme einer Struktur während einer Hochtemperatur-Entfaltungs-MD-Simulation und gibt den zeitlichen Verlauf der jeweiligen *Q*-Werte als 2D-Projektion aus.

Eingaben	<i>file-root</i>	Namensstamm der Dateien der zu analysierenden Schnappschüsse
	<i>no of files</i>	Anzahl der Schnappschüsse
	<i>ref-file_1</i>	Datei mit nativen Kontakten des Teilsystem 1
	<i>ref-file_2</i>	Datei mit nativen Kontakten des Teilsystem 2
	<i>cut-off</i>	oberes Toleranzkriterium für C ^α -C ^α -Abstände (Å)
Ausgaben	<i>disappear_2D.dat</i>	Datei zur Visualisierung der Resultate mit <i>xmgacre</i>

confSampling.java

Dieses Programm sucht auf der Basis einer Komplexstruktur die Schnappschüsse einer Gleichgewichts-MD-Simulation nach 'bindungsaktiven' Konformationen ab.

Eingaben	<i>file-root</i>	Namensstamm der Dateien der zu analysierenden Schnappschüsse
	<i>no of files</i>	Anzahl der Schnappschüsse
	<i>ref-file</i>	Datei mit dem Aminosäuren der Bindungsregion
	<i>ref-coordinates</i>	Referenzkoordinaten (PDB-Datei)
	<i>tolerance</i>	oberes und unteres Toleranzkriterium für C ^α -C ^α -Abstände ermittelt aus ' <i>ref-coordinates</i> ' (Å), damit Kontakt als ' <i>intol</i> ' identifiziert wird
	<i>threshold</i>	oberes Toleranzkriterium für ' <i>intol</i> ' (%), damit 'bindungsaktive' Konformation erfüllt ist
	<i>time-step</i>	Zeitintervall zwischen den Schnappschüssen der Simulation
Ausgaben	<i>confSampling.dat</i>	Datei zur Visualisierung der Resultate mit <i>xmgacre</i>

3.2 Molekularbiologische Methoden für die Darstellung der P17G-Mutante der LckSH3

3.2.1 Agarose-Gelelektrophorese

Agarose-Gelelektrophorese wurde analytisch zur Überprüfung von Plasmidpräparationen und Restriktionen sowie zur präparativen Gewinnung von DNA-Fragmenten eingesetzt.

Dabei kamen 0,8 % beziehungsweise 1,5 % (w/v) Agaroselösungen zur Anwendung, die durch Aufkochen in TAE-Puffer (Kap. 3.1.4) hergestellt wurden. Nach Zugabe von 5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) pro 100 ml Gellösung wurde diese in eine 6 × 10 cm große Gelkammer gegossen. Die DNA-Proben wurden mit 0,25 Volumen DNA-Auftragspuffer (Kap. 3.1.4) versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 100 V in einem horizontalen Mini Sub DNA Cell-System (BioRad, München).

DNA-Banden wurden mit einem Transilluminator visualisiert und mit einem Geldokumentationssystem (GelDoc2000, BioRad, München) dokumentiert. Für präparative Anwendungen wurden entsprechende Banden mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die Extraktion der DNA aus dem Agarosegel erfolgte wie in Kap. 3.2.3 beschrieben.

3.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte durch ein kommerziell erhältliches, auf Anionenaustauschchromatografie basierendes System (NucleoSpin Plasmid, Macherey & Nagel, Düren). Die Durchführung erfolgte gemäß der Anleitung des Herstellers.

3.2.3 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Trennung von Plasmid-DNA oder DNA-Fragmenten nach PCR-Reaktionen von unerwünschten DNA-Fragmenten oder einzelnen Nukleotiden wurden präparative Agarose-Gelelektrophoresen (Kap. 3.2.1) durchgeführt. Das gewünschte DNA-Fragment wurde aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) isoliert. Die Durchführung der DNA-Reinigung erfolgte nach Herstellervorschrift. Eluiert wurde die DNA mit dem für die weitere Verwendung benötigten Puffern.

3.2.4 Ortsspezifische Mutagenese mit Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Aufgrund der terminusnahen Position der P17G-Punktmutation wurde eine ortsspezifische Mutagenese in einer Ein-Schritt-PCR-Reaktion durchgeführt. Dazu wurden der den Basenaustausch enthaltende 5'-Mutageneseprimer (LckSH3_P17G-5') und der schon für die Klonierung der LckSH3 verwendete 3'-Primer (LckSH3-3') verwendet (Kap. 3.1.6). Als Templat wurde das Pasmid pGEX-Lck-SH3(59-120)_5 (Kap. 3.1.5) verwendet. In einem PCR-Gefäß wurden 1 µl beider Oligonukleotide (100 pmol/µl), 3 µl pGEX-Lck-SH3(59-120)_5-Plasmid-DNA (Kap. 3.2.2), 2 µl dNTP's (je 10 mM), 10 µl Thermo-Pol-Puffer sowie 82 µl steriles Wasser vorgelegt. Anschließend wurde 1 U *Vent*-DNA-Polymerase auf Eis zupipettiert. Die Durchführung der PCR-Amplifikation erfolgte mit einem GeneAmp PCR 2400 System von Perkin Elmer (Norwalk, USA) nach folgendem Schema: 5 min Denaturierung des Ansatzes bei 95 °C; 25 Zyklen bestehend aus 30 s Denaturierung bei 95 °C, 20 s Primer-Hybridisierung bei 50 °C und 30 s Primer-Verlängerung bei 72 °C; zur Vervollständigung der Amplifikation wurde der letzte Primer-Verlängerungs-Schritt um 2 min verlängert und der PCR-Ansatz bis zur weiteren Verarbeitung bei 4 °C gelagert.

Das so erhaltene Amplifikat wurde über eine Agarosegelelektrophorese (Kap. 3.2.1) gereinigt und mittels Gelextraktion (Kap. 3.2.3) zurückgewonnen.

3.2.5 Restriktion von DNA

Der Verdau von DNA mit den Typ II Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Eco*RI erfolgte unter den vom Hersteller empfohlenen Pufferbedingungen ($2 \times Y^+$ /*Tango*-Puffer). Die DNA (jeweils 40 µl aus 3.2.3) wurde bei 37 °C über Nacht gleichzeitig mit je einer Einheit Enzym inkubiert. Anschließend wurden die Enzyme über Silikagelmembranen (Kap. 3.2.7) abgetrennt, die DNA-Fragmente über Agarosegelelektrophorese gereinigt (Kap. 3.2.1) und extrahiert (Kap. 3.2.3).

3.2.6 Dephosphorylierung von 5'-überhängenden DNA-Fragmenten

Dephosphorylierungsreaktionen wurden mit 1 U alkalischer Phosphatase (calf intestine phosphatase (CIP), MBI Fermentas, Vilna, Litauen) pro µg DNA in Dephosphorylierungspuffer *CIAP* durchgeführt. Die Inkubation erfolgte in zwei Schritten, wobei nach der ersten 30-minütigen Inkubation bei 37 °C erneut 1 U alkalische Phosphatase zum Ansatz hinzugegeben wurde und ein zweiter 30-minütiger Inkubationsschritt bei 37 °C folgte.

3.2.7 Reinigung von DNA über Silikagelmembranen

Zum Entsalzen von DNA und zum Entfernen von Enzymen aus DNA-Lösungen wurden Säulen mit Silikagelmembran verwendet (QIAquick spin columns, QIAquick Nucleotide Removal Kit, Qiagen, Hilden). Die Durchführung erfolgte entsprechend der Herstellerangaben. Die an die Silikagelmembran gebundene DNA wurde mit den für die weitere Verwendung benötigten Puffern eluiert.

3.2.8 Ligation von DNA

Die Ligation des dephosphorylierten Vektors pGEX-4T-1 und des DNA-Fragments der ortsspezifischen Mutagenese-PCR (Kap. 3.2.4) wurde in T4-Ligase-Puffer über Nacht bei 16 °C mit einer Einheit T4-Ligase (Invitrogen, Groningen, Niederlande) erzielt. Anschließend erfolgte eine Inaktivierung der Ligase durch zehnmündige Inkubation bei 65 °C.

3.2.9 Butanolfällung von DNA

Butanol als Fällungsmittel (Thomas, 1994) wurde zur Präzipitation von DNA aus Ligationansätzen verwendet (Kap. 3.2.8). Hierfür wurde das zehnfache Volumen *n*-Butanol zu einem entsprechenden Ansatz pipettiert und bis zur Aufhebung der Phasentrennung durch Schütteln gemischt. Anschließend wurde die DNA durch 30-minütige Zentrifugation (10 000 × g, 4 °C) präzipitiert. Das Lösungsmittel wurde vorsichtig abgezogen und das verbleibende DNA-Pellet nach vollständigem Trocknen in 10 µl *aqua bidest.* aufgenommen.

3.2.10 CaCl₂-Transformation von Zellen

Die CaCl₂-Transformation (Hanahan, 1983) wurde verwendet um das LckSH3_P17G-Plasmid (Kap. 3.2.8) in *E. coli* TOP10 und nach Kolonie-PCR (Kap. 3.2.11) und Validierung der DNA-Sequenz durch Sequenzierung (Kap. 3.2.12) in *E. coli* BL21 (Kap. 3.1.5) zu übertragen.

Zur Herstellung von kompetenten Zellen wurden 200 ml LB-Medium (Kap. 3.1.3) mit einer Übernachtskultur auf eine OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 bis 0,8 bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Die Zellen wurden anschließend durch Zentrifugation bei 2000 × g für 10 min bei 4 °C pelletiert, in 20 ml eiskalter CaCl₂-Lösung (50 mM CaCl₂, 10 mM RbCl, 15 % (v/v) Glycerin, 10 mM Tris/HCl, pH 8,0) resuspendiert und

erneut zentrifugiert ($3000 \times g$, 10 min, 4°C). Die Zellen wurden in 10 ml eiskalter CaCl_2 -Lösung aufgenommen, 30 min auf Eis inkubiert und durch erneutes Zentrifugieren pelletiert ($3000 \times g$, 10 min, 4°C). Nach Resuspension in 2 ml CaCl_2 -Lösung standen die Zellen für eine Transformation zur Verfügung. Nicht sofort verwendete Zellen wurden aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt.

Für die Transformation wurden $40 \mu\text{l}$ Aliquot der kompetenten Zellen mit 50 ng Plasmid-DNA versetzt, 30 min auf Eis inkubiert und einem zweiminütigem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt. Es erfolgte eine weitere zehnminütige Inkubation auf Eis. Nach Zugabe von 1 ml LB (Kap. 3.1.3) wurde der Transformationsansatz für 1 h bei 37°C und 180 rpm inkubiert. $100 \mu\text{l}$ der Zellsuspension und ein Konzentrat aus den restlichen pelletierten und in $50 \mu\text{l}$ LB resuspendierten Zellen wurden auf Selektivmedium-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

3.2.11 Kolonie-PCR

Zum Nachweis einer erfolgreichen Klonierung wurde DNA direkt aus Bakterienkolonien für eine PCR eingesetzt. Auf eine Präparation von plasmidaler DNA konnte so verzichtet werden. Als PCR-Primer dienten zwei Oligonukleotide pGEX-5' und pGEX-3' (Kap. 3.1.6), die stromaufwärts bzw. stromabwärts des klonierten Fragments hybridisierten. In einem PCR-Gefäß wurden $4 \mu\text{l}$ beider Oligonukleotide ($100 \text{ pmol}/\mu\text{l}$), $12 \mu\text{l}$ dNTP's (je 10 mM), $96 \mu\text{l}$ MgCl_2 (25 mM), $60 \mu\text{l}$ *Taq*-DNA-Polymerase-Puffer sowie $421 \mu\text{l}$ steriles Wasser vorgelegt. Anschließend wurde 3 U *Taq*-DNA Polymerase auf Eis zupipettiert. Mit einem sterilen Zahnstocher wurde eine gut separierte Kolonie von einer Agarplatte mit Transformanten abgenommen und in das PCR-Gefäß getaucht. Der identische Zahnstocher wurde anschließend in 5 ml LB-Medium mit Ampicillin überführt und bei 37°C über Nacht inkubiert. Der PCR-Ansatz wurde 5 min bei 95°C denaturiert. Es folgten 35 Zyklen mit 30 s Denaturierung bei 95°C , 20 s Primer-Annealing bei 50°C und 40 s Primer-Verlängerung bei 72°C . Der letzte Primer-Verlängerungsschritt wurde um 2 min verlängert. Die PCR-Ansätze wurde mittels Agarosegelelektrophorese (Kap. 3.2.1) analysiert. Von Kolonien, die nach PCR eine Amplifikation eines DNA-Fragments der Größe des klonierten Gens zeigten, wurde eine Plasmid-Präparation (Kap. 3.2.2) nach Übernachtskultivierung durchgeführt. Die präparierte DNA wurde einer DNA-Sequenzanalyse unterzogen (Kap. 3.2.12).

3.2.12 Sequenzierung von DNA

Plasmid-DNA wurde von der Firma AGOWA (Berlin) durch *cycle-sequencing* mit fluoreszenzmarkierten ddNTPs als Kettenterminator auf einem ABI-System sequenziert. Die Datenauswertung erfolgte mit der ABI-Prism-Software. Die Analyse der DNA-Sequenzen erfolgte mit dem Programmpaket GCG (Genetics Computer Group, Madison, USA).

3.3 Mikrobiologische und präparative Methoden

3.3.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

19 %ige-SDS-(*sodium dodecyl sulfate*, Natriumdodecylsulfat)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) wurde zur analytischen Trennung von Proteingemischen verwendet. Die diskontinuierlichen Elektrophoresen wurden in vertikalen Elektrophoresekammern durchgeführt. Die Molekularmassen der zu analysierenden Proteine wurden mit Hilfe des *low molecular weight*-Standards (BioRad, München) ermittelt.

Die Abmessung der Gele betrug $10 \times 8 \times 0,08$ cm, zu deren Herstellung eine Trenngellösung und eine Sammelgellösung (Kap. 3.1.4) hergestellt wurden. Die Polymerisation wurde durch Zugabe von $13 \mu\text{l}$ N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin (TEMED) und $150 \mu\text{l}$ 10 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat-Lösung (APS) pro 20 ml Gellösung gestartet. Die Elektrophorese wurde mit SDS-Laufpuffer (Kap. 3.1.4) bei einer konstanten Stromstärke von 24 mA durchgeführt. Die zu analysierenden Proben wurden in einem Verhältnis 1:4 (v/v) mit Roti-Load-4 \times -Laufpuffer (Roth, Karlsruhe) versetzt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Die Auftragsvolumina betrugen zwischen 5 und 20 μl .

Die Färbung der Proteinbanden erfolgte für 15 bis 30 min in Coomassie-Färbelösung (Kap. 3.1.4). Anschließend wurden die Gele für 30 min mit Entfärbelösung I (Kap. 3.1.4) und bis zur vollständigen Entfärbung des Gelhintergrundes mit Entfärbelösung II (Kap. 3.1.4) behandelt. Färbung und Entfärbung erfolgten unter leichtem Schwenken mittels eines Horizontalschüttlers. Protein-Banden wurden mit einem Transilluminator visualisiert und mit einem Geldokumentationssystem (GelDoc2000, BioRad, München) dokumentiert.

3.3.2 Herstellung von Dauerkulturen

Zur Herstellung von Dauerkulturen wurden frische LB-Übernachtskulturen verwendet. 1,5 ml Übernachtskultur wurden zu 350 μl sterilisiertem Glycerin pipettiert, vermengt und bei -80 °C aufbewahrt.

3.3.3 Fermentation von Bakterien und Überexpression von Fusionsproteinen

Die Anzucht von Bakterien in Volumina größer 3 l wurde im Fermenter Biostat B 10 mit Frigomix 1000 (Sartorius BBI Systems, Melsungen) durchgeführt. Das Medium für die Zellanzucht wurde im Kulturgefäß für 20 min bei 121 °C und 1 bar Überdruck im einem

Autoklav 23 (Melag, Berlin) sterilisiert. Anschließend wurde die pO_2 -Elektrode angeschlossen und mindestens 6 Stunden polarisiert. Danach erfolgte eine Ein-Punkt-Kalibrierung auf einen pO_2 von 1,0. Dies wurde erreicht, indem das sterile Medium mit 750 rpm bei gleichzeitigem Luftdurchstrom von 10 l/min gerührt wurde. Anschließend erfolgte die Animpfung mit einer Übernachtskultur zu einer optischen Dichte OD_{600} von 0,1.

Während der Fermentation wurde der pH-Wert des Mediums bei pH 7,1 gehalten. Im Bedarfsfall regelte der Fermenter den pH-Wert durch die Zugabe von 5 %iger H_2SO_4 bzw. 10 %iger NaOH automatisch nach. Der pO_2 -Sollwert wurde auf 1,0 gesetzt und die Sauerstoffsättigung im Bedarfsfall über die Luftzufuhr oder Drehzahl des Rührwerks gesteuert. Die maximale Drehzahl des Rührwerks betrug dabei 500 rpm. Die Schaumbildung wurde mittels einer Anti-Schaum-Sonde kontrolliert und bei Bedarf durch die Zugabe von Silikonöl (Antifoam A, Sigma, Steinheim) unterdrückt. Während der gesamten Fermentation wurde die Temperatur des Mediums bei konstant 35 °C gehalten (*Fundamentals of Fermentation: Techniques For Benchtop Fermentors, Part I - E. coli*; R & D Lab, New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA). Nach Erreichen einer OD_{600} von 0,7 bis 0,8 wurde die Expression des Zielproteins durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Die Zellen wurden nach vierstündiger Inkubation durch Zentrifugation ($5000 \times g$, 15 min, 4 °C) geerntet.

Die Markierung der Zielproteine mit den stabilen Isotopen ^{15}N und/oder ^{13}C erfolgte nach dem Protokoll von Marley & Bracken (2001). Dazu wurden 6 l LB-Medium (Kap. 3.1.3) im Fermenter Biostat B 10 bis zu einer OD_{600} von 0,6 angezogen und anschließend durch Zentrifugation geerntet ($5000 \times g$, 15 min, 4 °C). Die geernteten Zellen wurden in M9-Minimalmedium (Kap. 3.1.3) gewaschen und in mit ^{15}N -Ammoniumchlorid und/oder $^{13}C_6$ -Glucose angesetztem M9-Minimalmedium aufgenommen und zur Induktion in einen Fermenter Biostat B 1 überführt. Die Induktion erfolgt eine Stunde nach Überführung durch Zugabe von 1 mM IPTG. Nach vierstündiger Inkubation wurden die Zellen durch Zentrifugation ($5000 \times g$, 15 min, 4 °C) geerntet.

3.3.4 Aufschluss von *E. coli*-Zellen

Zellaufschlüsse wurden generell unter nativen Bedingungen durchgeführt. Hierzu wurde das bei -20 °C eingefrorene Zellpellet in dem sechsfachen Volumen an Aufschlusspuffer (SH3-Domänen) oder Lysispuffer (Tip) (Kap. 3.1.4) resuspendiert und 20 min auf Eis gerührt. Anschließend erfolgten drei 30 s Ultraschallbehandlungen (150 W, Labsonic U,

Sartorius BBI Systems, Melsungen), wobei die Probe ebenfalls auf Eis gehalten wurde. Die lösliche Fraktion wurde durch Zentrifugation ($13\,000 \times g$, 45 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) von Membranen und Zelltrümmern abgetrennt und stand für die nachfolgenden Chromatografien zur Verfügung.

3.3.5 Metallionenaffinitätschromatografie

Die Reinigung von Ubiquitin-Tip(140-191) mit NH_2 -terminalem Dekahistidin ((His)₁₀)-Anhang erfolgte mittels Ni^{2+} -Metallionenchromatografie an 3×5 ml HiTrap Chelatin HP Affinitätschromatografiesäulen (Amersham Bioscience, Freiburg). 60 ml des zellfreien Extrakts (Kap. 3.3.4) wurden mit einer Flussrate von 1 ml/min auf die mit Bindungspuffer (Kap. 3.1.4) voräquilibrierten Säulen aufgeragen. Nach Waschen der Säule mit Waschpuffer (Flussrate: 1,5 ml/min; 5 Säulenvolumen) wurde gebundenes Protein mit einem Stufengradienten von 0 bis 100 % Elutionspuffer (Kap. 3.1.4) eluiert. Saubere Fraktionen wurden vereinigt und gegen 5 l YUH-Spaltpuffer (Kap. 3.1.4) über Nacht bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ dialysiert.

3.3.6 Glutathionaffinitätschromatografie

Die Reinigung der GST-SH3-Domänen-Fusionsproteine erfolgte mittels 3×5 ml GSTrap FF Affinitätschromatografiesäulen (Amersham Bioscience, Freiburg). 60 ml des zellfreien Extrakts (Kap. 3.3.4) wurden mit einer Flussrate von 1 ml/min auf die mit Bindungspuffer (Kap. 3.1.4) voräquilibrierten Säulen aufgeragen. Nach Waschen der Säule mit Bindungspuffer (Flussrate: 1,5 ml/min; 7 Säulenvolumen) wurde gebundenes Protein mit Elutionspuffer (Kap. 3.1.4) eluiert. Saubere Fraktionen wurden vereinigt gegen 5 l PreScission- oder Thrombin-Spaltpuffer (Kap. 3.1.4) über Nacht bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ dialysiert.

3.3.7 Proteolytische Abspaltung von Affinitätsanhängen

Die nach den Affinitätschromatografien vereinigten sauberen Fraktionen der Fusionsproteine (Kap. 3.3.5 und 3.3.6) wurden entsprechend der beinhaltenden proteolytischen Spaltstellen gegen 5 l Spaltpuffer dialysiert.

Für die Spaltung von GST-LynSH3 wurde 1 U PreScission-Protease pro 10 mg Fusionsprotein in Lösung gegeben. Die Spaltung erfolgte über Nacht bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Zu den GST-LckSH3- und GST-LckSH3_P17G-Fusionsprotein-Lösungen wurden 0,2 U/ml Thrombin-Protease zugegeben. Gleichzeitig wurde CaCl_2 zu einer

Endkonzentration von 2,5 mM beigemischt. Die Spaltung erfolgte dann über Nacht bei Raumtemperatur und wurde am nächsten Tag durch die Zugabe von Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF) (Endkonzentration 1 mM) gestoppt.

Die Spaltung von (His)₁₀-Ubiquitin-Tip(140-191) wurde durch die Zugabe von 0,025 mg Ubiquitinhydrolase (YUH) pro Milligramm Fusionsprotein induziert und anschließend bei 37 °C über Nacht inkubiert.

3.3.8 Größenausschlusschromatografie

Zur Trennung der SH3-Domänen von ihren GST-Affinitätsanhängen wurde nach proteolytischer Spaltung (Kap. 3.3.7) eine Größenausschlusschromatografie mit einer Superdex 200-Säule (Amersham Biosciences, Freiburg) durchgeführt. Nach Äquilibrierung der Säule (Säulenvolumen: 364 ml) mit dem dreifachen Säulenvolumen des jeweils verwendeten Spaltpuffers wurden die Spaltansätze der Proben bei einer Flussrate von 1 ml/min aufgetragen. Die Elution erfolgte mit 1,5 Säulenvolumen Spaltpuffer bei unveränderter Flussrate.

3.3.9 Umkehrphasenchromatografie

Umkehrphasenchromatografie wurde für die präparative Trennung von Tip(140-191) von (His)₁₀-Ubiquitin nach YUH-Spaltung (Kap. 3.3.7) eingesetzt. Dafür wurde eine auf Octadecylphasen (C18) basierende Säule (25 mm PrepLC Modul, Water, Eschborn) verwendet. Filtrierte Proben wurden nach Spaltung mit 1 M HCl auf pH 3 eingestellt und mit 0,1 % (v/v) TFA versetzt. Die Elution erfolgte durch einen linearen Gradienten zwischen 0 und 80 % (v/v) Acetonitril in 0,1 % TFA (v/v) bei einer Flussrate von 5 ml/min. Die in den gewonnenen Fraktionen anfallenden Lösungsmittel wurden durch Vakuumkonzentration (SpeedVac Christ CMC-1, Sartorius BBI Systems, Melsungen) abgezogen. Die Detektion der Absorption erfolgte bei 220 und 280 nm.

3.3.10 Pufferwechsel durch Dialyse

Die vereinten Fraktionen nach der Größenausschlusschromatografie (Kap. 3.3.8) wurden in einer Dialysemembran (Spectra/PRO, MWCO 1000, Roth, Karlsruhe) gegen 5 l NMR-Puffer (Kap. 3.1.4) über Nacht bei 4 °C dialysiert.

3.3.11 Trocknen von Proteinen

Proteinlösungen der SH3-Domänen wurden nach Größenausschlusschromatografie (Kap. 3.3.8) und Pufferwechsel (Kap. 3.3.10) in einer Isopropanon/Trockeneis-Mischung gefroren und an einer CHRIST LOC-1M Lyophylle (Sartorius BBI Systems, Melsungen) zur Trockene eingengt.

3.4 Spektroskopische Methoden

3.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration durch UV-Spektroskopie

Die Absorptionsmessungen im UV-Bereich wurden mit einem Helios γ Spektrophotometer (Thermo Spectronic, Cambridge, UK) durchgeführt. Für Messungen wurden UV-Halbmikro-Küvetten Plastibrand (Fisher, Schwerte) mit einer Schichtdicke von 1 cm verwendet. Der verwendete Messbereich lag zwischen 0,05 und 0,8 Absorptionseinheiten. Lösungen mit höheren Werten wurden mit dem Referenzmedium verdünnt.

Die Konzentration von Proteinen bzw. Peptiden mit Tryptophanfluorophoren wurde über das Lambert-Beer'sche Gesetz durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt. Es gilt die Beziehung: $A = c \cdot d \cdot \epsilon$. Dabei ist A die im Photometer gemessene Absorption, c die molare Konzentration (mol/l), d die Schichtdicke (cm) und ϵ der molare Absorptionskoeffizient ($M^{-1} \cdot cm^{-1}$), der auf Basis der Aminosäuresequenz berechnet wurde (Gill & von Hippel, 1989).

Die Konzentrationen der verwendeten synthetischen Peptide ohne Tryptophanfluorophor (Kap. 3.1.6) wurden nach Einwaage des Herstellers (Kap. 3.1.6) bestimmt.

3.4.2 Bestimmung der Bakteriendichte durch Streulichtmessungen

Zur Bestimmung der Bakteriendichte wurden Streulichtmessungen bei einer Wellenlänge von 600 nm in Halbmikro-Küvetten Plastibrand (Fisher, Schwerte) mit einer Schichtdicke von 1 cm durchgeführt. Ab einer OD_{600} von 0,3 wurden die Proben mit entsprechendem Medium verdünnt. Eine Absorptionseinheit (OD_{600}) entspricht in etwa einer Bakteriendichte von 1×10^9 Zellen/ml.

3.4.3 Bestimmung der thermischen Stabilität durch CD-Spektroskopie

CD-spektroskopische Untersuchungen wurden an einem J-810 Spektrometer (JASCO International, Tokyo, Japan), welches mit einem CDF-426S Peltier Temperaturelement und einem Julabo F200 Wasserbad (Julabo Labortechnik GmbH, Groß-Umstadt) ausgerüstet war, durchgeführt. Die Spektren wurden in einer Quarzküvette (Hellma, Müllheim) mit einer Schichtdicke von 1 cm bei einer Aufnahmegeschwindigkeit von 20 nm/min und einer Auflösung von 0,2 nm aufgenommen. Proteinproben wurden in einer Konzentration von 10 μ M in 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7 vermessen.

Fern-UV-CD-Spektren wurden vor und nach jedem thermischen Übergang im Bereich 250 bis 200 nm achtmal gemessen, gemittelt und das Pufferspektrum subtrahiert. Die molare

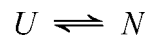
Elliptizität pro Aminosäurerest Θ_{MRW} ($\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$) wurde nach Gleichung 3.1 aus den gemessenen Werten berechnet.

$$\Theta_{MRW} = \frac{\Theta_{obs}}{c \cdot l \cdot n_r} \quad \text{Gleichung 3.1}$$

Dabei ist Θ_{obs} die beobachtete Elliptizität, n_r die Anzahl der Aminosäuren, l die Schichtdicke der Küvette und c die Proteinkonzentration.

Thermische Übergänge wurden durch die Detektion der Elliptizität bei 222 nm verfolgt. Die entsprechenden CD-Temperaturkurven wurden in einem Bereich von 5 bis 95 °C sowohl mit einer Heiz-, als auch Abkühlrate von 1 °C/min aufgenommen.

Die freie Enthalpie der Stabilisierung (ΔG_N) wurde aus den thermischen Übergängen unter der Annahme der Kooperativität der Entfaltung (Zwei-Zustands-Modell) sowie einer konstanten Wärmekapazität (ΔC_p) des Systems ermittelt.



Dabei entspricht N dem gefalteten Protein (*native*) und U der entfalteten Polypeptidkette (*unfolded*). Daraus ergibt sich die Gleichgewichtskonstante der Stabilisierung (K_N):

$$K_N = \frac{[N]}{[U]} \quad \text{Gleichung 3.2}$$

Da die Entfaltungsübergänge der SH3-Domänen auf der Basis eines Zwei-Zustands-Modells analysiert wurden, entsprechen nach Abb. 3.1 die gemessene Elliptizität $\Theta = f_N \Theta_N + f_U \Theta_U$, wobei Θ_N und Θ_U die Elliptizität des gefalteten beziehungsweise des entfalteten Proteins repräsentieren. Daraus ergeben sich f_N und f_U zu:

$$f_N = \frac{([\Theta] - [\Theta]_U)}{([\Theta]_N - [\Theta]_U)} \quad \text{Gleichung 3.3}$$

$$f_U = \frac{([\Theta]_N - [\Theta])}{([\Theta]_N - [\Theta]_U)} \quad \text{Gleichung 3.4}$$

Für die Gleichgewichtskonstante der Stabilisierung ergibt sich somit:

$$K_N = \frac{f_N}{f_U} = \frac{([\Theta] - [\Theta]_U)}{([\Theta]_N - [\Theta])} \quad \text{Gleichung 3.5}$$

Die Werte für Θ_N und Θ_U wurden durch Extrapolation der Grundlinien (LckSH3: 5 - 25 °C und 70 - 95 °C; LckSH3_P17G: 5 - 20 °C und 65 - 95 °C) erhalten.

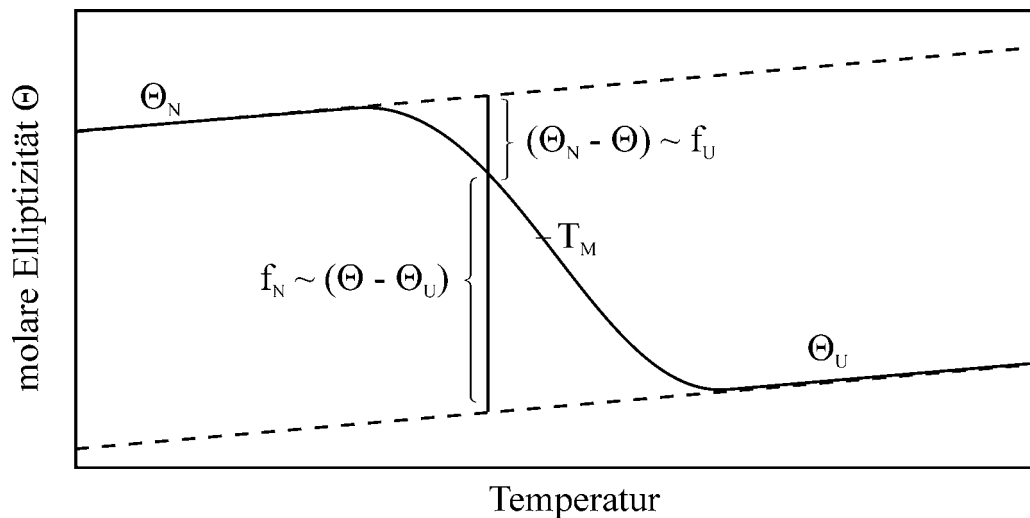


Abb. 3.1 Schematische Darstellung eines thermischen Entfaltungsübergangs

Die freie Enthalpie der Stabilisierung (ΔG_N), die Stabilisierungsenthalpie (ΔH_N) und die Stabilisierungsentropie (ΔS_N) ergeben sich entsprechend der Gleichungen 3.6 bis 3.8 zu:

$$\Delta G_N = -RT \ln(K_N) \quad \text{Gleichung 3.6}$$

$$\frac{\partial \ln K_N}{\partial \frac{1}{T}} = \frac{-\Delta H_N}{R} \quad \text{Gleichung 3.7}$$

$$\Delta S_N = \frac{\Delta H_N - \Delta G_N}{T} \quad \text{Gleichung 3.8}$$

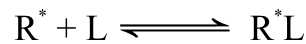
Entsprechend Gleichung 3.7 liefert die Auftragung von $\ln K_N$ aus Gleichung 3.5 gegen T^{-1} bei $\ln K = 0$ die Mittelpunktstemperatur (T_M). Aus der Steigung an T_M erhält man ΔH_N und nach Gleichung 3.6 und 3.8 ΔG_N und ΔS_N . Die Extrapolation auf 25 °C ergibt $\Delta G_N^{25^\circ\text{C}}$.

3.4.4 Bestimmung der Affinitätskonstanten durch Fluoreszenzspektroskopie

Alle Fluoreszenzmessungen wurden an einem F-4500 Fluorescence Spectrophotometer (Hitachi, Tokyo, Japan) in einer Halbmikro-Fluoreszenzrührküvetten (1,5 ml Füllvolumen, 1 cm Strahlengang) bei 18 °C durchgeführt. Bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm ergaben die Differenzspektren in Bereich von 290 bis 420 nm ein Maximum bei 340 nm.

Zu der vorgelegten Proteinlösung (700 μ l, 0,5 μ M SH3-Domane in 50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 7.4) wurden sukzessive 0,5 μ l bis 5 μ l Aliquots der Peptid-Stammlösung (0,625 mM, 1,25 mM, 2,5 mM oder 5 mM) zugegeben und jeweils 2 min inkubiert. Das Fluoreszenzsignal wurde über einen Zeitraum von 30 s aufgezeichnet, gemittelt und die Eigenfluoreszenz des Puffers subtrahiert sowie das Fluoreszenzsignal aufgrund der Verdünnung der Proteinlösung durch die Peptid-Zugabe korrigiert.

Die Dissoziationskonstante (K_D) beschreibt das Gleichgewicht zwischen den freien Spezies und dem Komplex (Gleichung 3.9).



$$K_D = \frac{[R^*] \cdot [L]}{[R^*L]} \quad \text{Gleichung 3.9}$$

Dabei entspricht die Konzentration der freien Komponenten $[L] = [L]_0 - [R^*L]$ und $[R^*] = [R^*]_0 - [R^*L]$, wobei $[L]_0$ und $[R^*]_0$ die jeweiligen Gesamtkonzentrationen der Komponenten angeben. Wählt man die Versuchsbedingungen so, dass die Konzentration des Liganden (L) deutlich größer als die des fluoreszierenden Rezeptors (R^*) ist, kann man $[L] \approx [L]_0$ setzen. Danach lässt sich Gleichung 3.9 nach Gleichung 3.10 umformen.

$$[R^*L] = \frac{[R^*]_0 \cdot [L]_0}{K_D + [L]_0} \quad \text{Gleichung 3.10}$$

Die ermittelten Amplituden der Fluoreszenzänderung (ΔF) sind während der Zugabe des Liganden proportional zu $[R^*L]$, da $[R^*]_0$ als konstant angesehen werden kann. Somit ergibt sich:

$$\Delta F = \frac{\Delta F_{max} \cdot [L]_0}{K_D + [L]_0} \quad \text{Gleichung 3.11}$$

wobei ΔF_{max} die maximale Fluoreszenzänderung darstellt.

3.4.5 Bestimmung der Bindungskinetik durch schnelle Mischmethoden

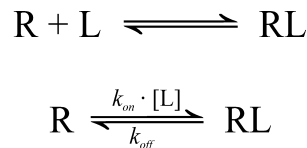
Die Assoziationsreaktionen von Tip(168-187) mit LckSH3 und LckSH3_P17G wurden mit einer *stopped-flow* Apparatur von Applied Photophysics (DX.17MV Sequential Stopped-flow Spektrofluorimeter, Applied Photophysics, Leatherhead, UK) durchgeführt. Die Assoziationsreaktion wurde durch schnelles Mischen der Protein- und Peptidlösung im

Verhältnis 1:1 anhand der Fluoreszenzänderungen der intrinsischen Fluoreszenz der SH3-Domänen nach Anregung bei 280 nm, oberhalb von 320 nm beobachtet (Küvette mit Aceton zwischen Mischkammer und Fotomultiplier). Die Kinetiken wurden mindestens zehnmal aufgenommen und gemittelt. Als Puffer wurde 50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl pH 7.4 verwendet. Die Proteinkonzentration betrug 0,5 μM für die SH3-Domänen und wurde für den Peptidliganden zwischen 0,5 und 10 μM variiert. Aus der beobachteten Fluoreszenzänderung in Bereich von 2 ms nach Mischung (Totzeit des Geräts) bis 100 ms nach Mischung wurde nach Gleichung 3.12 die apparente Assoziationsrate (k_{obs}) ermittelt.

$$F = F_{max} \cdot e^{-k_{obs} \cdot t} \quad \text{Gleichung 3.12}$$

Dabei ist F die gemessene Fluoreszenz, F_{max} der Maximalwert der Fluoreszenz und t die Zeit in Sekunden.

Unter der Annahme eines Zwei-Zustands-Mechanismus der Assoziationsreaktion und Versuchsbedingungen pseudo-erster-Ordnung ($[L] \gg [R]$), läßt sich das Gleichgewicht der Reaktion wie folgt beschreiben:



Dabei entspricht R dem Rezeptor (SH3-Domäne) und L dem Liganden (Peptid); k_{on} und k_{off} sind die Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation beziehungsweise Dissoziation. Aus Gleichung 3.13 ist ersichtlich, dass aus einer Auftragung der Konzentrationsabhängigkeit der apparenten Assoziationsrate (k_{obs}) die Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation (k_{on}) und der Dissoziation (k_{off}) bestimmt werden können.

$$k_{obs} = k_{off} + k_{on} \cdot [L] \quad \text{Gleichung 3.13}$$

3.5 NMR-Spektroskopie

3.5.1 Geräte

Alle NMR-Experimente wurden an Bruker Avance Spektrometern (DRX400, DRX600, AV700 oder AV800, Bruker, Karlsruhe) bei Protonenresonanzfrequenzen von 400,13, 600,13, 700,20 und 800,13 MHz durchgeführt. Dabei sind ausschließlich inverse $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -Probenköpfe mit aktiv abgeschirmten Gradientenspulen in z-Richtung (DRX400, AV700 und AV800) bzw. in alle drei Raumrichtungen (DRX600) verwendet worden. Die Temperatur wurde mittels einer BVT2000- bzw. BVT3000-Einheit (Bruker, Karlsruhe) reguliert. Die Referenzierung der ^1H chemischen Verschiebungen erfolgte relativ zu 2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonat (DSS) in D_2O als externen Standard. Die ppm-Werte der ^{13}C - und ^{15}N -Verschiebungen wurden indirekt über das Frequenzverhältnis der Nullpunktsfrequenzen ($\Xi(^1\text{H}) = 100,00000 \text{ MHz}$, $\Xi(^{13}\text{C}) = 25,1449530 \text{ MHz}$ und $\Xi(^{15}\text{N}) = 10,1329118 \text{ MHz}$; Markley *et al.*, 1998) geeicht. Als Signal für den Feld-Frequenz-Lock wurde die Resonanzfrequenz des zugesetzten D_2O verwendet. Die Messungen erfolgten im phasensensitiven Modus mit Quadraturdetektion in allen Zeitdimensionen unter Verwendung der States-TPPI-Technik (*time proportional phase incrementation*; States *et al.*, 1982; Marion *et al.*, 1989) bzw. bei Experimenten mit abschließendem Gradientenecho zur Kohärenz-Selektion (Sattler *et al.*, 1995; Schleucher *et al.*, 1994) mittels Echo/Antiecho-Technik (Kay *et al.*, 1992). Die Entkopplung der Heterokerne während der Aufnahme des FID (*free induction decay*) wurde durch die GARP-Sequenz (Shaka *et al.*, 1985) erreicht. Die Wasserresonanz wurde bei den Experimenten mit Detektion der Amidprotonen durch Verwendung einer 3-9-19 WATERGATE-Sequenz (Sklenar *et al.*, 1993) mit *waterflipback* (Grzesiek & Bax, 1993) und in den übrigen 3D-Experimenten durch Kohärenz-Selektion mit gepulsten Feldgradienten (Schleucher *et al.*, 1994) unterdrückt. Zur Breitbandentkopplung von Protonen diente die WALTZ-16-Sequenz (Shaka *et al.*, 1983).

3.5.2 NMR-Proben und Messbedingungen

NMR-Messungen erfolgten in Ultra Precision NMR Probenröhrchen (Norell, Inc., Landisville, NJ, USA). Die gefriergetrockneten Proteine (Kap. 3.3.11) wurden direkt vor den Messungen in *aqua bidest.* gelöst sowie 0,02 % (w/v) NaN_3 und 10 % (v/v) D_2O zugegeben. NMR-Experimente wurden jeweils bei 298 K mit Pulsprogrammen durchgeführt, die von Dr. K. Schweimer an die verwendeten Geräte angepasst und optimiert wurden.

Nachfolgend sind die Zusammensetzungen der eingesetzten Proteinproben angegeben sowie die jeweils durchgeführten NMR-Experimente tabellarisch dargestellt.

Neben der Angabe der Art der NMR-Experimente beinhaltet die tabellarische Darstellung die Anzahl der akkumulierten FIDs (NS), die Breite des spektralen Fensters in Hz (SW) sowie die Anzahl der gemessenen komplexen Datenpunkte (TD).

Alle NOESY-Experimente wurden mit einer Mischzeit von 120 ms, alle TOCSY-Experimente mit 14 ms Mischzeit und alle C(CO)NH-Experimente mit 43 ms Mischzeit aufgenommen.

Probe A: 1,6 mM ^{13}C , ^{15}N -LynSH3, 100 mM K-Phosphat, 50 mM NaCl, pH 6,4

Experiment	Spek.	NS	F1			F2			F3			F4			Referenz
			Kern	SW	TD	Kern	SW	TD	Kern	SW	TD	Kern	SW	TD	
^1H	600	386	^1H	9615	16384										McDonald & Phillips, 1970
^1H , ^{13}C -HSQC für Aromaten	700	8	^1H	9766	512	^{13}C	10565	128							Mori <i>et al.</i> , 1995
^1H , ^{13}C -CTHSQC	700	8	^1H	9766	512	^{13}C	12322	320							Vuister & Bax, 1992
^1H , ^{15}N -HSQC	700	8	^1H	8389	512	^{15}N	1717	192							Mori <i>et al.</i> , 1995
HNCA	600	8	^1H	7184	512	^{15}N	1509	32	^{13}C	4527	48				Grzesiek & Bax, 1992a
HNCO	600	8	^1H	7184	512	^{15}N	1610	32	^{13}C	2415	48				Grzesiek & Bax, 1992a
HNHA	400	16	^1H	4789	512	^{15}N	1000	30	^1H	3001	64				Vuister & Bax, 1993
HBHA(CO)NH	600	16	^1H	7184	512	^{15}N	1400	32	^1H	4200	80				Grzesiek & Bax, 1992b
CBCA(CO)NH	600	16	^1H	7184	512	^{15}N	1459	32	^{13}C	8753	52				Grzesiek & Bax, 1992b
C(CO)NH	700	8	^1H	8389	512	^{15}N	1660	32	^{13}C	11621	64				Grzesiek <i>et al.</i> , 1993
HC(C)H-TOCSY	700	8	^1H	9766	512	^{13}C	4901	32	^1H	4901	80				Kay <i>et al.</i> , 1993
(H)CCH-TOCSY für Aromaten	400	16	^1H	5208	512	^{13}C	2616	22	^{13}C	2616	24				Kay <i>et al.</i> , 1993
^1H , ^{13}C -NOESY-HSQC	700	8	^1H	8389	512	^1H	7702	128	^{13}C	12325	32				Cavanagh <i>et al.</i> , 1996
^1H , ^{13}C -NOESY-HSQC für Aromaten	700	8	^1H	8389	512	^1H	6691	128	^{13}C	3345	24				Cavanagh <i>et al.</i> , 1996
^1H , ^{15}N -NOESY-HSQC	700	8	^1H	8389	512	^1H	7702	128	^{15}N	1717	32				Talluri & Wagner, 1996
^1H , ^{13}C -HMQC-NOESY- ^1H , ^{13}C -HSQC	700	2	^1H	5580	256	^{13}C	5814	16	^{13}C	5814	16	^1H	5000	32	Clore <i>et al.</i> , 1991
^1H , ^{13}C -HMQC-NOESY- ^1H , ^{15}N -HSQC	700	4	^1H	8389	256	^{13}C	5814	16	^{15}N	1717	16	^1H	5000	32	Kay <i>et al.</i> , 1990

Probe B: 700 μM ^{13}C , ^{15}N -**Tip(140-191)**, 50 mM K-Phosphat, 25 mM NaCl, pH 6,4

Experiment	Spek.	NS	F1			F2			F3			Referenz
			Kern	SW	TD	Kern	SW	TD	Kern	SW	TD	
^1H , ^{13}C -HSQC	600	8	^1H	8389	512	^{13}C	6036	128				Mori <i>et al.</i> , 1995
^1H , ^{13}C -CTHSQC	600	8	^1H	8389	1024	^{13}C	9657	220				Vuister & Bax, 1992
^1H , ^{15}N -HSQC	600	8	^1H	7184	1024	^{15}N	1277	182				Mori <i>et al.</i> , 1995
HNCA	600	8	^1H	7184	512	^{15}N	1277	30	^{13}C	4226	40	Grzesiek & Bax, 1992a
HNCO	600	4	^1H	7184	512	^{15}N	1277	30	^{13}C	1509	40	Grzesiek & Bax, 1992a
HNHA	600	8	^1H	7184	512	^{15}N	1302	30	^1H	5000	80	Vuister & Bax, 1993
HNCACB	600	16	^1H	7184	512	^{15}N	1277	30	^{13}C	8753	52	Wittekind & Müller, 1993
CBCA(CO)NH	600	16	^1H	7184	512	^{15}N	1277	30	^{13}C	8753	56	Grzesiek & Bax, 1992b
C(CO)NH	600	16	^1H	7184	512	^{15}N	1277	30	^{13}C	9960	64	Grzesiek <i>et al.</i> , 1993
H(C)CH-COSY	600	8	^1H	8389	512	^{13}C	5583	32	^1H	3781	70	Ikura <i>et al.</i> , 1991
HC(CO)NH	600	16	^1H	7184	512	^{15}N	1277	30	^1H	3721	64	Grzesiek <i>et al.</i> , 1993
^1H , ^{13}C -NOESY-HSQC	600	8	^1H	8389	512	^1H	6602	128	^{13}C	5583	40	Cavanagh <i>et al.</i> , 1996
^1H , ^{15}N -NOESY-HSQC	600	8	^1H	7184	512	^1H	6601	128	^{15}N	1216	30	Talluri & Wagner, 1996

Probe C: 1,6 mM ^{13}C , ^{15}N -**LynSH3**, 3,4 mM **Tip(167-199)**, 100 mM K-Phosphat, 50 mM NaCl, pH 6,4

Experiment	Spek.	NS	F1			F2			F3			F4			Referenz
			Kern	SW	TD	Kern	SW	TD	Kern	SW	TD	Kern	SW	TD	
^1H , ^{13}C -HSQC für Aromaten	800	4	^1H	8804	512	^{13}C	5634	128							Mori <i>et al.</i> , 1995
^1H , ^{13}C -CTHSQC	800	16	^1H	10417	512	^{13}C	14085	360							Vuister & Bax, 1992
^1H , ^{15}N -HSQC	800	8	^1H	9615	512	^{15}N	2270	192							Mori <i>et al.</i> , 1995
HNCA	600	16	^1H	7184	512	^{15}N	1811	32	^{13}C	4527	48				Grzesiek & Bax, 1992a
HNHA	400	16	^1H	4789	512	^{15}N	1200	36	^1H	3001	64				Vuister & Bax, 1993
CBCA(CO)NH	600	16	^1H	7184	512	^{15}N	1751	32	^{13}C	8753	52				Grzesiek & Bax, 1992b
H(C)CH-COSY	600	16	^1H	8389	512	^{13}C	7201	32	^1H	3601	54				Ikura <i>et al.</i> , 1991
^1H , ^{13}C -NOESY-HSQC	800	8	^1H	10417	512	^1H	9281	128	^{13}C	6640	32				Cavanagh <i>et al.</i> , 1996
^1H , ^{13}C -NOESY-HSQC für Aromaten	800	8	^1H	8803	512	^1H	9281	128	^{13}C	3823	24				Cavanagh <i>et al.</i> , 1996
^1H , ^{15}N -NOESY-HSQC	800	8	^1H	9615	512	^1H	9281	128	^{15}N	2270	32				Talluri & Wagner, 1996
^1H , ^{13}C -HMQC-NOESY- ^1H , ^{13}C -HSQC	800	4	^1H	5580	256	^{13}C	6640	16	^{13}C	6640	16	^1H	5618	32	Clore <i>et al.</i> , 1991

Probe D: 1,6 mM ^{13}C , ^{15}N -Tip(140-191), 3,3 mM LynSH3, 100 mM K-Phosphat, 50 mM NaCl, pH 6,4

Experiment	Spek.	NS	F1			F2			F3			Referenz
			Kern	SW	TD	Kern	SW	TD	Kern	SW	TD	
$^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HSQC	600	16	^1H	8389	1024	^{13}C	10565	512				Mori <i>et al.</i> , 1995
$^1\text{H},^{13}\text{C}$ -CTHSQC	800	16	^1H	10417	512	^{13}C	14084	720				Vuister & Bax, 1992
$^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC	600	16	^1H	7788	512	^{15}N	1460	256				Mori <i>et al.</i> , 1995
$^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC	800	8	^1H	9615	512	^{15}N	1703	128				Mori <i>et al.</i> , 1995
HNCACB	600	16	^1H	7184	512	^{15}N	1347	30	^{13}C	8753	52	Wittekind & Müller, 1993
CBCA(CO)NH	600	16	^1H	7184	512	^{15}N	1347	30	^{13}C	8753	52	Grzesiek & Bax, 1992b
C(CO)NH	800	16	^1H	9615	512	^{15}N	1703	32	^{13}C	13280	64	Grzesiek <i>et al.</i> , 1993
HC(C)H-TOCSY	800	8	^1H	10417	512	^{13}C	7042	32	^1H	4801	80	Kay <i>et al.</i> , 1993
$^1\text{H},^{13}\text{C}$ -NOESY-HSQC	800	16	^1H	10417	512	^1H	9281	128	^{13}C	6640	32	Cavanagh <i>et al.</i> , 1996
$^1\text{H},^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC	800	8	^1H	9615	512	^1H	9602	128	^{15}N	2270	32	Talluri & Wagner, 1996

Für die Analysen der LckSH3_P17G wurden keine kompletten Datensätze an Spektren gemessen, als vielmehr einzelne vergleichende Experimente durchgeführt, die in den folgenden Kapiteln beschrieben werden (Kap. 3.5.7 bis 3.5.11).

3.5.3 Prozessierung der Spektren

Die Auswertung der erhaltenen Daten erfolgte mit Hilfe der Programmpakete NDEE (Spinup Inc., Dortmund) und NMR-View 5.0.4 (Johnson & Blevins, 1994) sowie durch am Lehrstuhl entwickelter Programme (Schweimer, 1997; Schweimer, 2000).

Zur Verbesserung der digitalen Auflösung wurden die FIDs der zweidimensionalen Datensätze entlang beider Dimensionen vor der Fouriertransformation (FT) auf die doppelte bis vierfache Länge mit Nullen aufgefüllt (*zerofilling*). Als Filterfunktionen wurden Sinus- und Sinusquadratfunktionen verwendet (Cavanagh *et al.*, 1996). Falls notwendig, wurde eine Basislinienkorrektur entlang der Aufnahmedimension mit dem Programm *base_fast* (Schweimer, 2000) durchgeführt. Für die meisten dreidimensionalen Spektren wurden die Aufnahmedimension und eine indirekte Dimension durch ein *zerofilling*, Multiplikation des FIDs mit einer Filterfunktion ($\pi/2$ oder $\pi/3$ phasenverschobene Sinus- oder Sinusquadratfunktion) und FT prozessiert. Bei der Prozessierung der verbleibenden indirekten Dimension erfolgte vor der FT eine Extrapolation durch *linear prediction*, um die Auflösung der Dimension zu erhöhen.

3.5.4 Abstandsbeschränkungen aus NOE-Kreuzresonanzen

Abstandsbeschränkungen wurden aus den Kreuzresonanzen der NOESY-Experimente gewonnen (Kap. 3.5.2). Entsprechend der Intensitäten der NOE-Kreuzresonanzen wurden diese in drei Abstandsklassen eingeteilt (Tab. 3.9). Die Intensitäten wurden aus den Spektren visuell geschätzt (Clore *et al.*, 1987).

Tab. 3.9 Beziehung der NOE-Intensitäten und Protonenabstände im Molekül.

NOE-Intensität [visuelle Abschätzung]	Abstand [\AA]
stark	< 2,7
mittel	< 3,5
schwach	< 5,0

3.5.5 Diederwinkelbeschränkungen aus ${}^3J(\text{H}^N, \text{H}^\alpha)$ -Kopplungskonstanten

Die Berechnung der ${}^3J(\text{H}^N, \text{H}^\alpha)$ -Kopplungskonstanten erfolgte nach Gleichung 3.14 aus dem Verhältnis der Intensitäten von Kreuzsignal (I_c) und Diagonalsignal (I_d) des HNHA-Experiments (Kap. 3.5.2). F_c entspricht einem empirischen Korrekturfaktor, der für Moleküle der Größe der untersuchten SH3-Domänen etwa 1,05 ist (Vuister & Bax, 1993; Kuboniwa *et al.*, 1994; Dux *et al.*, 1997).

$${}^3J(\text{H}^N, \text{H}^\alpha) = F_c \cdot \frac{1}{2 \cdot \pi \cdot 12,3 \text{ ms}} \cdot \arctan \sqrt{\frac{I_c}{I_d}} \quad \text{Gleichung 3.14}$$

Aminosäuren in Bereichen regulärer Sekundärstruktur weisen ${}^3J(\text{H}^N, \text{H}^\alpha)$ -Kopplungskonstanten entweder kleiner als 6 Hz (α -Helix) oder größer als 8 Hz (β -Faltblattstränge) auf (Cavanagh *et al.*, 1996). Aus theoretischen Berechnungen und Untersuchungen an Modellsystemen ist bekannt, dass die ${}^3J(\text{H}^N, \text{H}^\alpha)$ -Kopplungskonstanten vom Torsionswinkel ϕ abhängen (Karplus, 1959; Pardi *et al.*, 1984). Daher konnten für Aminosäuren mit einer Kopplungskonstante kleiner als 6 Hz der entsprechende ϕ -Winkel auf $-60^\circ \pm 20^\circ$ und für Aminosäuren mit einer Kopplungskonstante größer als 8 Hz auf $-120^\circ \pm 40^\circ$ beschränkt werden.

3.5.6 Ir-HNCO-Experiment zur Bestimmung von Wasserstoffbrücken

Für die Bestimmung von skalaren ${}^3\text{J}(\text{N}(i), \text{C}'(j))$ -Kopplungen wurde neben einem herkömmlichen HNCO-Experiment (Kap. 3.5.2) noch ein weitreichendes HNCO-Experiment (Ir-HNCO) durchgeführt. Beide Experimente unterscheiden sich bezüglich des Zeitintervalls für die De- und Rephasierung der Antiphase magnetisierung zwischen den Stickstoff- und Carbonylkohlenstoffatomen (Cordier & Grzesiek, 1999). Die Verlängerung dieses Intervalls von $2 \times 16,6$ ms auf $2 \times 50,0$ ms hat zur Folge, dass die skalaren ${}^2\text{J}(\text{N}(i), \text{C}'(i))$ - und ${}^1\text{J}(\text{N}(i), \text{C}'(i-1))$ -Kopplungen unterdrückt werden und falls skalare ${}^3\text{J}(\text{N}(i), \text{C}'(j))$ -Kopplungen zwischen dem ${}^{15}\text{N}$ -Atomen der Reste i und den ${}^{13}\text{C}'$ -Atomen der Reste j aktiv sind, entsprechende Kreuzresonanzen im Spektrum zu erkennen sind. Wasserstoffbrücken wurden als zusätzliche Abstandsbeschränkungen in die Strukturberechnung (Kap. 3.6) integriert.

3.5.7 Residuale dipolare Kopplungskonstanten

Dipolare Kopplungskonstanten enthalten viele Strukturinformationen, die sich aber normalerweise in isotropen Lösungen als Resultat der Rotationsdiffusion zu Null mitteln (Tjandra & Bax, 1997). Daher wurden die zu untersuchenden Proteinlösungen mit 10 bis 18 mg/ml *Pfl* Phagensuspension (Profos AG, Regensburg) versetzt, die zu einer geringfügigen Vorzugsorientierung der Proteine relativ zum homogenen Magnetfeld führt (Hansen *et al.*, 1998). Residuale dipolare $D_{\text{N HN}}$ - und $D_{\text{C}\alpha \text{H}\alpha}$ -Kopplungen wurden bei 600 MHz Protonenfrequenz durch Subtraktion der skalaren ${}^1\text{J}$ -Kopplungen aus J -modulierten ${}^1\text{H}, {}^{15}\text{N}$ HSQC-Experimenten (Tjandra *et al.*, 1997) in Gegenwart von *Pfl* Phagen und der jeweiligen skalaren ${}^1\text{J}$ -Kopplungen aus Referenzexperimenten ohne *Pfl* Phagen ermittelt. Für die Strukturberechnung wurden die residualen $D_{\text{C}\alpha \text{H}\alpha}$ -Kopplungen mit einem Gewichtungsfaktor von -0,4784 relativ zu den $D_{\text{N HN}}$ -Kopplungen normiert (Bax *et al.*, 2001).

3.5.8 Bestimmung der longitudinalen und transversalen ^{15}N -Relaxationsraten

Für die Bestimmung der longitudinalen (R_1) und transversalen (R_2) ^{15}N -Relaxationsraten wurden Serien von modifizierten $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC-Experimenten (Dayie & Wagner, 1994) bei einer Protonenfrequenz von 600 MHz durchgeführt. In Abhängigkeit des gewählten Relaxationszeitintervalls wurde aus den Signalintensitäten I (ermittelt mit NMR-View 5.0.4 (Johnson & Blevins, 1994)) die jeweilige Relaxationsrate R durch Anpassen an Gleichung 3.15 ermittelt.

$$I = I_0 \cdot e^{-R} \quad \text{Gleichung 3.15}$$

3.5.9 Der heteronukleare $\{^1\text{H}\}^{15}\text{N}$ -NOE

Der heteronukleare $\{^1\text{H}\}^{15}\text{N}$ -NOE wurde aus dem Verhältnis der Intensitäten der Amidresonanzen nach ^1H -Sättigung (I_{sat}) und der Referenzintensitäten ohne ^1H -Sättigung ($I_{no\ sat}$) bei einer Protonenfrequenz von 600 MHz ermittelt (Gleichung 3.16; Dayie & Wagner, 1994). Die ^1H -Sättigung wurde durch eine Abfolge von 120° -Pulsen mit hoher Leistung während der letzten 3 s des Experiments erreicht.

$$\{^1\text{H}\}^{15}\text{N} - \text{NOE} = \frac{I_{sat}}{I_{no\ sat}} \quad \text{Gleichung 3.16}$$

Die Bestimmung der Signalintensitäten erfolgte mit dem Programm NMR-View 5.0.4 (Johnson & Blevins, 1994).

3.5.10 Bestimmung des Ordnungsparameters S^2

Aus den longitudinalen (R_1) und transversalen (R_2) ^{15}N -Relaxationsraten (Kap. 3.5.8) sowie dem heteronuklearen $\{^1\text{H}\}^{15}\text{N}$ -NOE (Kap. 3.5.9) konnten mit Hilfe des Programms Tensor 2 (Dossset *et al.*, 2000) auf Basis des 'model-free'-Formalismus (Lipari & Szabo, 1981) der Ordnungsparameter S^2 für die interne Mobilität sowie die Rotationskorrelationszeit (τ_c) ermittelt werden. Dabei wurde die Analyse auf Aminosäuren beschränkt, bei denen der heteronukleare $\{^1\text{H}\}^{15}\text{N}$ -NOE Werte größer als 0,65 annimmt.

3.5.11 Bestimmung der schnellen Austauschraten der Amidresonanzen

Zur Bestimmung der schnellen Austauschraten der Amidresonanzen der LckSH3 und LckSH3_P17G wurde das NewMEXICO-FHSQC-Experiment verwendet (Schweimer,

2000; Mori *et al.*, 1995). Die variable Mischzeit (T_m) betrug dabei 5, 10, 15, 20, 25, 50, 100, 150, 200 und 300 ms. Die Austauschraten (k_{obs}) und Relaxationsraten (RI) der Amidresonanzen wurden durch eine nicht-lineare Zwei-Parameter-Anpassung an Gleichung 3.17 bestimmt.

$$S = \frac{fX_A \cdot k_{obs}}{RI_A + k_{obs} - RI_B} \cdot (e^{(-RI_B T_m)} - e^{[-(RI_A + k_{obs}) T_m]}) \quad \text{Gleichung 3.17}$$

S repräsentiert dabei die Signalintensität, f einen Proportionalitätsfaktor zwischen Molverhältnis und Signalintensität und X den Molenbruch. Die Indices A und B repräsentieren Amidprotonen beziehungsweise Protonen des Wassers.

Die Auswertung erfolgt mit dem Programm MATLAB 6.5 unter Verwendung der Skripten *lck_multifit2.m* und *wex_fit3.m* (Schweimer, unveröffentlicht). Dabei erfolgte eine Abschätzung der Standardabweichung aus dem Verhältnis der Signalintensität (S) relativ zur Signalintensität zweier Referenz-HSQC-Spektren.

3.5.12 Berechnung der Normverschiebung

Auf der Basis der chemischen Verschiebungen der LynSH3 vor und nach Tip-Bindung wurde eine so genannte Normverschiebung (Δ_{norm}) berechnet (Gleichung 3.18).

$$\Delta_{norm} = \frac{\sum |\Delta^1 H| + \sum \frac{|\Delta^{13} C|}{4} + \sum \frac{|\Delta^{15} N|}{10}}{N} \quad \text{Gleichung 3.18}$$

Dabei werden die gewichteten, betragsmässigen Differenzen der chemischen ^1H -, ^{13}C - und ^{15}N -Verschiebungen (in ppm) summiert und durch die Anzahl N der betrachteten Atome geteilt. Somit kann auch den Änderungen der chemischen Verschiebungen von Seitenkettenresonanzen bei Ligandenbindung besser Rechnung getragen werden.

3.6 Moleküldynamische Simulationen für die Strukturberechnung

Alle Strukturberechnungen sind mit dem Programmpaket XPLOR-NIH-1.2.1 (Schwieters *et al.*, 2003) auf Sun Fire V880 Workstations beziehungsweise auf dem Linux-Cluster des Rechenzentrums Bayreuth (Kap. 3.1.8) durchgeführt worden.

Ziel der Strukturberechnung war die Minimierung der Zielfunktion E_{pot} in Gleichung 3.19.

$$E_{pot} = E_{chem} + w_{exp} \cdot E_{exp} \quad \text{Gleichung 3.19}$$

$$E_{chem} = E_{bonds} + E_{angles} + E_{impropers} + E_{vdw} \quad \text{Gleichung 3.20}$$

$$E_{exp} = E_{NOE} + E_{cdih} (+ E_{sani}) \quad \text{Gleichung 3.21}$$

Gleichung 3.19 verdeutlicht, dass sich die Zielfunktion E_{pot} aus zwei Termen zusammensetzt – einem Term für das chemische Potenzial der Primärstruktur E_{chem} (Bindungslängen, Bindungswinkel und nicht-kovalente Wechselwirkungen zwischen den Atomen; Gleichung 3.20) und einem Term für die experimentellen Daten E_{exp} (Abstandsbeschränkungen aus NOE-Kreuzresonanzen, Wasserstoffbrüchen und Salzbrücken sowie Diederwinkelbeschränkungen aus $^3J(\text{H}^N, \text{H}^\alpha)$ -Kopplungskonstanten und Beschränkungen aus residualen dipolaren Kopplungen; Gleichung 3.21).

Grundlage für die Berechnung des chemischen Potenzials der Primärstruktur ist das CHARMM-Kraftfeld (Brooks *et al.*, 1983). Der Faktor w_{exp} in Gleichung 3.19 erlaubt eine unterschiedliche Gewichtung der chemischen und experimentellen Potenzialterme während verschiedener Phasen der Strukturberechnung.

3.6.1 Generierung der Startstrukturen

Als Startstrukturen wurden gestreckte Polypeptidketten mit korrekter lokaler Geometrie generiert. Auf der Basis der Primärsequenz wurden mit Hilfe der XPLOR-Standardprotokolle *generate_structure.inp* und *generate_template.inp* die jeweiligen Struktur- und Koordinatendateien erzeugt. Die Strukturdateien (*.psf-Dateien; *protein structure files*) enthalten alle Informationen über Ladung und Masse der einzelnen Atome sowie Informationen über kovalente Bindungen zwischen ihnen. Die Koordinatendateien (*.pdb-Dateien) waren im *protein data bank*-Format erstellt.

3.6.2 Strukturberechnung nach dem Prinzip des *simulated annealing*

Zu Beginn der Strukturberechnung wurden der jeweiligen Startstruktur (Kap. 3.6.1) zufällig gewählte Torsionswinkel für das Proteinrückgrat zugewiesen. Für eine möglichst vollständige Absuche der Potenzialfläche des Konformationsraums wurden 60 ps (3 fs Integrationsschritt) Moleküldynamiksimulationen bei 2 000 K durchgeführt. Dabei wurden nicht-kovalente Wechselwirkungen nur für die C^α-Atome und einem Kohlenstoffatom mit einem *van der Waal*-Radius von 2,25 Å für jede Seitenkette berücksichtigt. Anschließend folgte die erste Abkühlphase von 2 000 K auf 1 000 K in 60 ps (2 fs Integrationsschritt), wobei die nicht-kovalenten Wechselwirkungen für alle Atome berücksichtigt wurden und die einzelnen Kraftkonstanten sukzessive auf ihren endgültigen Wert erhöht wurden. In der zweiten Abkühlphase wurden über einen Simulationszeitraum von 30 ps (2 fs Integrationsschritt) die Temperatur von 1 000 K auf 100 K gesenkt, wobei alle Kraftkonstanten unverändert blieben. Abschließend wurden 400 Schritte einer Energieminimierung durchgeführt (Sticht et al., 1999).

3.6.3 Strukturverfeinerung mit residualen dipolaren Kopplungen

Für die 60 Strukturen mit den niedrigsten Werten der Zielfunktion E_{pot} aus (Kap. 3.6.2) wurde eine Verfeinerung mit Hilfe residualer dipolarer Kopplungen (Kap. 3.5.7) vorgenommen. Dabei wurden die Strukturen aus Kap. 3.6.2 für 2,5 ps (0,5 fs Integrationsschritt) bei 1 000 K moleküldynamisch simuliert und anschließend über einen Simulationszeitraum von 75 ps (0,5 ps Integrationsschritt) auf 300 K abgekühlt. Für jede zu verfeinernde Struktur wurden fünf unabhängige Lösungen berechnet und die bezüglich der Zielfunktion E_{pot} energetisch beste Struktur für die Analyse weiterverwendet.

Die Werte für die Anisotropie D_a und Rhombizität R des Vorzugsorientierungstensors D wurden aus den Extremwerten für $D_{NHN \min} = 2 D_a$ und $D_{NHN \max} = -D_a(1+3/2 R)$ (Kap. 3.5.7) abgeschätzt (Clare et al., 1998).

3.7 Freie Moleküldynamiksimulationen

Alle freien moleküldynamischen (MD) Simulationen wurden mit dem Programmpaket Amber 7 (Perlman *et al.*, 1995) unter Verwendung des Kraftfelds *ff99* (Cornell *et al.*, 1995; Cheatham *et al.*, 1999) in explizitem Wasser durchgeführt. Die Simulationen wurden auf Hochleistungsrechnern des Regionalen Rechenzentrums Erlangen sowie des Leibnitz-Rechenzentrums München (Kap. 3.1.8) berechnet.

3.7.1 Solvatisierung der Strukturen

Mit Hilfe der Programme *xLEaP* und *tLEaP* (Bestandteil des Amber 7 Programmpakets) wurden die Startstrukturen solvatisiert, sodass jeweils quadratische Boxen mit mindestens 10 Å Abstand zu jedem Atom der SH3-Domänen entstanden. Dazu waren zwischen 5 828 und 7 547 Wassermoleküle (TIP3P Wassermodell; Jorgensen *et al.*, 1983) erforderlich. Zusätzlich wurden Na⁺-Ionen in ausreichender Anzahl ergänzt, um die Nettoladungen der Systeme zu neutralisieren.

Anschließend wurden die Koordinaten (*.crd-Dateien) und Topologien (*.top-Dateien) der Systeme als Ausgangspunkte für die Moleküldynamiksimulationen generiert.

3.7.2 Äquilibration der Systeme

Die Moleküldynamiksimulationen wurden mit periodischen Randbedingungen unter Verwendung einer *Particle-Mesh-Ewald-Summation* (Darden *et al.*, 1993) und einer Ausschlussgrenze von 9 Å unter konstantem Druck mit Hilfe des *Sander*-Moduls (Bestandteil des Amber 7 Programmpakets) durchgeführt. Streckschwingungen von Bindungen, an denen Protonen beteiligt waren, wurden unterdrückt (SHAKE; Ryckaert *et al.*, 1977; Miyamoto & Kollman, 1992). Da die Schrittlänge der einzelnen Iterationen von der schnellsten zu simulierenden Bewegung abhängt, konnten somit Integrationschritte von 1,5 fs gewählt werden.

Nach der Solvatisierung der Systeme (Kap. 3.7.1) wurden 1 000 Zyklen einer SD-*(steepest descent)*-Energiminimierung der Wassermoleküle durchgeführt, indem die SH3-Domänen mit einer Kraftkonstante von 500 kcal · mol⁻¹ · Å⁻² fixiert wurden. Anschließend folgten 12 500 MD-Schritte zu je 1,5 fs ohne Berechnung der Elektrostatik während derer die Systeme auf 300 K erwärmt wurden. Daran schlossen sich weitere 12 500 MD-Schritte zu 1,5 fs bei 300 K unter Berücksichtigung der Elektrostatik an. Während beider MD-Simulationen wurden die SH3-Domänen mit einer Kraftkonstante von 500 kcal · mol⁻¹ · Å⁻² fixiert, damit sich die Hydrathüllen an die Proteine anpassen konnten.

Es folgten drei SD-Energieminimierungen zu je 1 000 Zyklen, wobei die Kraftkonstanten zur Fixierung der SH3-Domänen auf 250, 125 beziehungsweise 62,5 kcal · mol⁻¹ · Å⁻² gesenkt wurde.

Zur Verfeinerung der Interaktionen der Proteine mit den umgebenden Wassermolekülen wurden 2 000 MD-Schritte zu je 1,5 fs bei 300 K und einer Kraftkonstante von 30 kcal · mol⁻¹ · Å⁻² auf die Atomenpositionen der SH3-Domänen durchgeführt. Anschließend wurden die Beschränkungen der SH3-Domänen über fünf SD-Energieminimierungen zu je 600 Zyklen entfernt, indem die Kraftkonstanten von 20 auf 15, 10, 5 beziehungsweise 0 kcal · mol⁻¹ · Å⁻² gesenkt wurden.

Abschließend folgten 15 000 MD-Schritte zu je 1,5 fs bei 300 K, bei denen sich sowohl die Wassermoleküle als auch die SH3-Domänen frei bewegen konnten (Wang *et al.*, 2001c).

3.7.3 Produktionsläufe

Trajektorien der nach Kap. 3.7.2 äquilibrierten Systeme wurden durch MD-Simulationen von je 675 000 Schritten á 1,5 fs erhalten, wobei alle 500 Schritte die physikalischen Systemparameter und alle 1 000 Schritte eine Struktur gespeichert wurde. Dabei wurden alle 500 Schritte sowohl die Translations- als auch die Rotationsbewegungen aus den Simulationen entzogen. Die Wärmebadkopplung für die Temperaturkontrolle wurde auf 0,5 ps und die maximale Geschwindigkeit der Komponenten auf 20 Å · ps⁻¹ begrenzt.

3.7.4 Analyse der Trajektorien

Mit Hilfe des Programms *ptraj* (Bestandteil des Amber 7 Programmpakets) wurden alle Wassermoleküle aus den Trajektorien entfernt und die Strukturen der SH3-Domänen im PDB-Format gespeichert. Gleichzeitig wurden die atomaren Fluktuationen der C^α-, C'- und N^H-Atome ermittelt.

Anschließend wurden die Ensemble der Strukturdateien im PDB-Format mit dem Programm VMD 1.8.2 (Humphrey *et al.*, 1996) sowie der in dieser Arbeit entwickelten Programme *reference.java* und *confSampling.java* (Kap. 3.1.10) analysiert, die die nativen Kontakte beziehungsweise die 'bindungsaktiven' Konformationen der SH3-Domänen identifizierten. Weiterhin wurden aus den verschiedenen Trajektorien mit Hilfe des Programms NMRCLUST (Kelley, *et al.*, 1996) die Strukturen in Cluster gruppiert und aus den für jeden Cluster repräsentativen Strukturen ein repräsentatives Ensemble erstellt.

3.8 Moleküldynamische Nicht-Gleichgewichtssimulationen

Alle moleküldynamischen Entfaltungen bei hoher Temperatur wurden ebenfalls in explizitem Wasser mit dem Programmpaket Amber 7 (Perlman *et al.*, 1995) unter Verwendung des Kraftfelds *ff99* (Cornell *et al.*, 1995; Cheatham *et al.*, 1999) simuliert. Die Rechnungen wurden auf Hochleistungsrechnern des Regionalen Rechenzentrums Erlangen sowie des Leibnitz-Rechenzentrums München (Kap. 3.1.8) durchgeführt.

3.8.1 Solvatisierung und Vorbereitung der Systeme

Die Solvatisierung der zu untersuchenden SH3-Domänen erfolgte wie in Kap. 3.8.1 beschrieben. Simulationen wurden mit periodischen Randbedingungen unter Verwendung einer *Particle-Mesh-Ewald*-Summation (Darden *et al.*, 1993) und einer Ausschlussgrenze von 9 Å mit Hilfe des *Sander*-Moduls (Bestandteil des Amber 7 Programmpakets) durchgeführt. Streckschwingungen von Bindungen, an denen Protonen beteiligt waren, wurden unterdrückt (SHAKE; Ryckaert *et al.*, 1977; Miyamoto & Kollman, 1992), wodurch Integrationsschritte von 1,5 fs gewählt werden konnten.

Nach einer 1 000 Zyklen umfassenden SD-Energieminimierung der Wasserhülle, bei der die SH3-Domänen mit einer Kraftkonstante von $500 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{Å}^{-2}$ fixiert wurde, folgte eine MD-Simulation mit Integrationsschritten von 1,5 fs bei konstantem Druck bis das System eine Dichte von 0,829 g/ml (experimenteller Wert für 498 K; Day *et al.*, 2002) erreicht hatte. Alle weiteren Schritte wurden bei konstantem Volumen des Systems berechnet.

Die Wassermoleküle wurden zweimal in je einer 1 000 Zyklen umfassenden SD-Energieminimierung und einer 1 000 Schritte umfassenden MD-Simulation bei 300 K an die fixierten SH3-Domänen angepasst. Anschließend wurden die SH3-Domänen in gleicher Weise energieminiert und moleküldynamisch simuliert, wobei hingegen die Atome der Wassermoleküle mit einer Kraftkonstante von $500 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{Å}^{-2}$ fixiert wurden. Abschließend wurden der gleiche Zyklus ohne Fixierung einer der Komponenten wiederholt. Danach wurde über die ersten 5 000 Schritte einer 15 000 Schritte zu je 1,5 fs umfassenden MD-Simulation die Temperatur auf 498 K erhöht und anschließend konstant gehalten (Day *et al.*, 2002).

3.8.2 Simulation der thermischen Entfaltung

Trajektorien der Entfaltung der vorbereiteten Systeme (Kap. 3.8.1) wurden durch MD-Simulationen mit Integrationsschritten von 1,5 fs bei 498 K erhalten. Es wurden jeweils

Blöcke zu 250 000 Schritten simuliert. Dabei wurden alle 500 Schritte die physikalischen Systemparameter und alle 1 000 Schritte eine Struktur gespeichert. Gleichzeitig wurden alle 500 Schritte sowohl die Translations- als auch die Rotationsbewegungen aus den Simulationen entzogen. Die Wärmebadkopplung für die Temperaturkontrolle wurde auf 0,5 ps und die maximale Geschwindigkeit der simulierten Komponenten auf $20 \text{ \AA} \cdot \text{ps}^{-1}$ begrenzt.

Die Simulationen wurden beendet, sobald die vollständige Entfaltung der Proteine (Definition siehe Kap. 3.8.3) gezeigt werden konnte. Andernfalls wurde ein neuer Simulationsblock mit weiteren 250 000 Schritten gestartet.

3.8.3 Auswertung der Trajektorien

Die Strukturen der SH3-Domänen der MD-Simulation bei hoher Temperatur (Kap. 3.8.2) wurden mit Hilfe des Programms *ptraj* (Bestandteil des Amber 7 Programmpakets) nachdem alle Wassermoleküle entfernt waren im PDB-Format gespeichert.

Anschließend wurden die Strukturdateien mit VMD 1.8.2 sowie der in dieser Arbeit entwickelten Programme *disappear.java*, *disappear_2D.java*, *qCombine.java* und *qDiff.java* (Kap. 3.1.10) analysiert. Als Beobachtungsvariable wurde dabei der Anteil noch intakter, nativer Kontakte Q gewählt. Die nativen Kontakte der SH3-Domänen wurden aus freien MD-Simulationen identifiziert (Kap. 3.7.4). Sank der Q -Wert über einen Simulationszeitraum von mehr als 15 ps unter 0,1 ab, wurde das Protein als vollständig entfaltet angesehen und die MD-Simulation beendet.

3.9 Modellierung von Proteinstrukturen

3.9.1 Strukturen der LckSH3_P17G

Da aus der Korrelation der residualen dipolaren D_{NH} -Kopplungen des Wildtyps und der P17G-Mutante der LckSH3-Domäne hervorgeht, dass der Aminosäureaustausch keine Änderung der globalen Struktur der SH3-Domäne bewirkt (Kap. 4.2.6), wurden die Strukturen der LckSH3_P17G für die freie MD- (Kap. 3.7) und MD-Simulationen bei hoher Temperatur (Kap. 3.8) mit Hilfe des Programms SYBYL 6.5 (Tripos Associates Inc., 1998) durch Einführung der P17G-Mutation in die wildtyp LckSH3 (PDB: 1h92; Schweimer *et al.*, 2002) generiert.

3.9.2 Komplex der LckSH3 mit Tip(174-187)

Die Komplexstruktur der LckSH3 mit Tip(174-187) wurde als Homologiemodell auf Basis der LynSH3-Tip-Struktur mit Hilfe des Programms Swiss-Pdb-Viewers und des SWISS-MODEL Servers (Guex & Peitsch, 1997) entsprechend der Anleitung des Anbieters generiert.

Für das erhaltene Modell wurde unter der Verwendung der Programme RasMol 2.6 (Sayle, R. A., University of Massachusetts, USA) und MolMol 2.6 (Koradi *et al.*, 1996) die Erfüllung der experimentellen Daten des LckSH3-Tip-Komplexes aus Bauer (2001) und Bauer *et al.* (2004) bestätigt.

3.9.3 Abschätzung der freien Bindungsenergie unpolarer Gruppen

Auf Basis der Komplexstruktur der LynSH3 (Kap. 4.5.6) und des Komplexmodells der LckSH3 (Kap. 4.6) mit Tip wurde mit Hilfe des Programms MolMol (Koradi *et al.*, 1996) die Differenz der zugänglichen Oberfläche (ΔSA) von L186 aus Tip bei Bindung an die SH3-Domänen berechnet. Diese lässt sich nach Gleichung 3.22 in eine Differenz der freien Bindungsenergie unpolarer Gruppen (ΔG_{np}) umrechnen (Sitkoff *et al.*, 1994; Kuhn & Kollman, 2000).

$$\Delta G_{np} = 0,00524 \cdot \Delta SA + 0,92 \quad \text{Gleichung 3.22}$$

4 Experimente und Ergebnisse

4.1 Klonierung, Expression und Reinigung der zu analysierenden Komponenten

Aus vorangegangenen Arbeiten (Bauer, 2001; Schweimer *et al.*, 2002; Bauer *et al.*, 2004) ist bekannt, dass der Komplex aus LckSH3 und Tip eine auf der NMR-Zeitskala ungünstige Dynamik besitzt, die die Bestimmung einer hochaufgelösten Lösungsstruktur mittels NMR-Spektroskopie verhindert. Im Gegensatz dazu konnten in den selben Arbeiten gezeigt werden, dass die LynSH3-Domäne eine deutlich stärkere Bindung zu Tip aufweist sowie günstigere Eigenschaften der Komplexdynamik auf der NMR-Zeitskala zeigt und somit für eine Bestimmung der Komplexstruktur wesentlich erfolgsversprechender ist.

Um Wechselwirkungen von Tip mit LckSH3 eventuell doch NMR-spektroskopisch untersuchen zu können, wurde als alternativer Ansatz die Mutation P17G in LckSH3 eingefügt. Aus der Literatur ist bekannt, dass größere Affinitäten der SH3-Domänen der Src-Familie zumindest teilweise durch eine Erhöhung der Flexibilität der RT-Schleife zu erzielen sind (Arold *et al.*, 1998). Diese Mutation sollte die Flexibilität der RT-Schleife und damit die Affinität der Bindung erhöhen.

Die Darstellung der LckSH3_P17G erfolgte analog zur Klonierung der LckSH3 (Schweimer *et al.*, 2002), wobei abweichend ein längerer 5'-Primer mit entsprechendem Basenaustausch für die P17G-Punktmutation gewählt wurde (Kap. 3.2). Die korrekte Nukleinsäuresequenz des erhaltenen Plasmids pGEX-LckSH3_P17G (Anhang 10.1) wurde durch Sequenzierung bestätigt. Die Expression erfolgte analog zu LckSH3 in *E. coli* BL21 als GST-Fusionsprotein (Bauer, 2001).

Alle für diese Arbeit rekombinant dargestellten Proteine wurden durch GST- (Kap. 3.3.6) beziehungsweise Metallionenaffinitätschromatografie (Kap. 3.3.5), Thrombin- (LckSH3 und LckSH3_P17G) beziehungsweise PreScissionspaltung (LynSH3 und Tip(140-191)) (Kap. 3.3.7) und anschließender Größenausschlusschromatografie (Kap. 3.3.8) gereinigt (Anhang 10.2). Die Reinheit wurde durch SDS-PAGE (Kap. 3.3.1) und teilweise RP-HPLC (Kap. 3.3.9) überprüft sowie die korrekte Aminosäurezusammensetzung massenspektroskopisch festgestellt (Anhang 10.2). Für die NMR-spektroskopischen Untersuchungen konnten so Ausbeuten von bis zu 70 mg unmarkiertem beziehungsweise 40 mg ¹⁵N- oder ¹³C- und ¹⁵N-markiertem Protein pro Liter Anzuchtmedium isoliert werden.

4.2 Charakterisierung der P17G-Mutante der LckSH3 im Vergleich zum Wildtyp

Da zu Beginn dieser Arbeit die vollständige Bindungsregion des Tip-Proteins bei Wechselwirkungen mit LckSH3 und LynSH3 noch nicht exakt eingegrenzt war, wurden verschiedene Fragmente von Tip verwendet. Die initialen Charakterisierungen erfolgten mit dem rekombinant dargestellten Tip(140-191) (Kap. 4.4.1), das neben dem SH3B- auch das CSKH-Motiv beinhaltet (Kap. 1.4). Im Verlauf der hier dargelegten Studien wurden aus Gründen der Verfügbarkeit neben der rekombinant dargestellten Tip-Variante zwei weitere (synthetische) Tip-Fragmenten verwendet. Mit Tip(167-199) konnte die Beteiligung des CSKH-Motivs an der SH3-Bindung ausgeschlossen werden (Bauer *et al.*, 2004) und mit Tip(168-187) konnte ein minimales Tip-Fragment identifiziert werden, das alle an der SH3-Bindung beteiligten Aminosäuren umfasst. Aufgrund der Minimierung der Peptidlänge war es für die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und zur Berücksichtigung der biologischen Eigenschaften im Gesamtprotein erforderlich, die Endgruppen zu schützen. Daher wurden in dieser Arbeit nur Peptide mit NH₂-terminaler Acetylierung und COOH-terminaler Amidierung verwendet (Kap. 3.1.6). Diese Modifikationen haben zur Folge, dass die Peptide die Verhältnisse in einer intakten Peptidkette des Gesamtproteins besser wiedergeben (Chakrabarty *et al.*, 1993; Maillere & Herve, 1997). Weiterhin war für eine eindeutige Interpretierbarkeit der Resultate der Methoden beruhend auf den Fluoreszenzänderungen der SH3-Domänen bei Ligandenbindung (Kap. 3.4.4 und 3.4.5) erforderlich, W170 in Tip durch Leucin zu ersetzen. Dabei zeigten weder die COOH-terminale (Tip(167-199)) oder NH₂-terminale (Tip(140-191)) Verlängerung des Tip(168-187) Peptids, noch der W170L-Austausch einen signifikanten Einfluss auf die Affinitäten zu den untersuchten SH3-Domänen (E. Hofinger, persönliche Mitteilung; Schweimer *et al.*, 2002). Da aufgrund der W170L-Mutation in Tip eine zuverlässige Konzentrationsbestimmung durch UV-Spektroskopie (Kap. 3.4.1) nicht möglich war, wurde die Konzentration der synthetisierten Peptide aus der jeweiligen Einwaage nach Herstellerangaben berechnet. Um Relativaussagen für den Vergleich der einzelnen Systeme erhalten zu können, wurden die vergleichenden Untersuchungen der Bindungseigenschaften der LckSH3, LynSH3 und LckSH3_P17G immer mit den selben Ligandenstammlösungen durchgeführt; auf quantitative Vergleiche der Affinitäten verschiedener Liganden wurde verzichtet.

4.2.1 Bestimmung der Affinität zu Tip(168-187) mittels Tryptophanfluoreszenz

Die Bestimmung der Affinitäten der drei analysierten SH3-Domänen zu Tip(168-187) wurde durch Fluoreszenzspektroskopie ermittelt (Kap. 3.4.4).

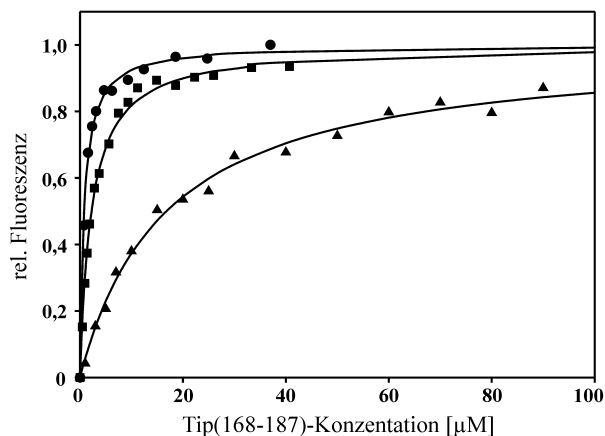


Abb. 4.1 Bestimmung des Einflusses der P17G-Mutation auf die Affinität von Tip(168-187) zu LckSH3 verglichen mit LynSH3 mittels Fluoreszenztitration - LckSH3 (Dreiecke), LckSH3_P17G (Quadrate) und LynSH3 (Kreise). Aufgetragen ist die relative Änderung der Fluoreszenz der Tryptophane der SH3-Domänen bei 340 nm gegen die Konzentration von Tip(168-187) (0,5 μM SH3 in 50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5). Die Affinität der Peptide ergeben Gleichgewichtskonstanten für LynSH3 von $0,83 \pm 0,05 \mu\text{M}$, für LckSH3 von $16,80 \pm 0,61 \mu\text{M}$ und für LckSH3_P17G von $2,23 \pm 0,26 \mu\text{M}$.

Die Auftragung der gemessenen Fluoreszenz sowie die nichtlinearen Anpassungen zur Bestimmung der Bindungskonstanten (Kap. 3.4.4, Gleichung 3.11) sind in Abhängigkeit der Ligandenkonzentration in Abb. 4.1 dargestellt. Die so erhaltenen Bindungskonstanten betragen für die Bindung von Tip(168-187) an LynSH3 $0,83 \pm 0,05 \mu\text{M}$, an LckSH3 $16,80 \pm 0,61 \mu\text{M}$ und an LckSH3_P17G $2,23 \pm 0,26 \mu\text{M}$. Somit bindet Tip(168-187) ungefähr um einen Faktor 20 stärker an LynSH3 als an LckSH3. Der Austausch der starren Aminosäure Prolin an Position 17 durch die flexible Aminosäure Glycin in LckSH3_P17G bewirkt eine um den Faktor acht stärkere Bindung verglichen mit dem Wildtyp. Dieser Austausch einer Aminosäure der RT-Schleife bewirkt, dass LckSH3_P17G Tip(168-187) annähernd mit der gleichen Affinität bindet wie LynSH3.

4.2.2 NMR-spektroskopische Titration von LckSH3_P17G mit Tip(167-199)

Da LckSH3_P17G verglichen mit dem Wildtyp eine deutlich höhere Affinität zu Tip aufweist (Kap. 4.2.1), wurden ihre NMR-spektroskopischen Eigenschaften näher untersucht. In Abb. 4.2 sind die Änderungen der chemischen Verschiebungen der ^{15}N -LckSH3_P17G unter schrittweiser Zugabe von unmarkiertem Tip(167-199) dargestellt.

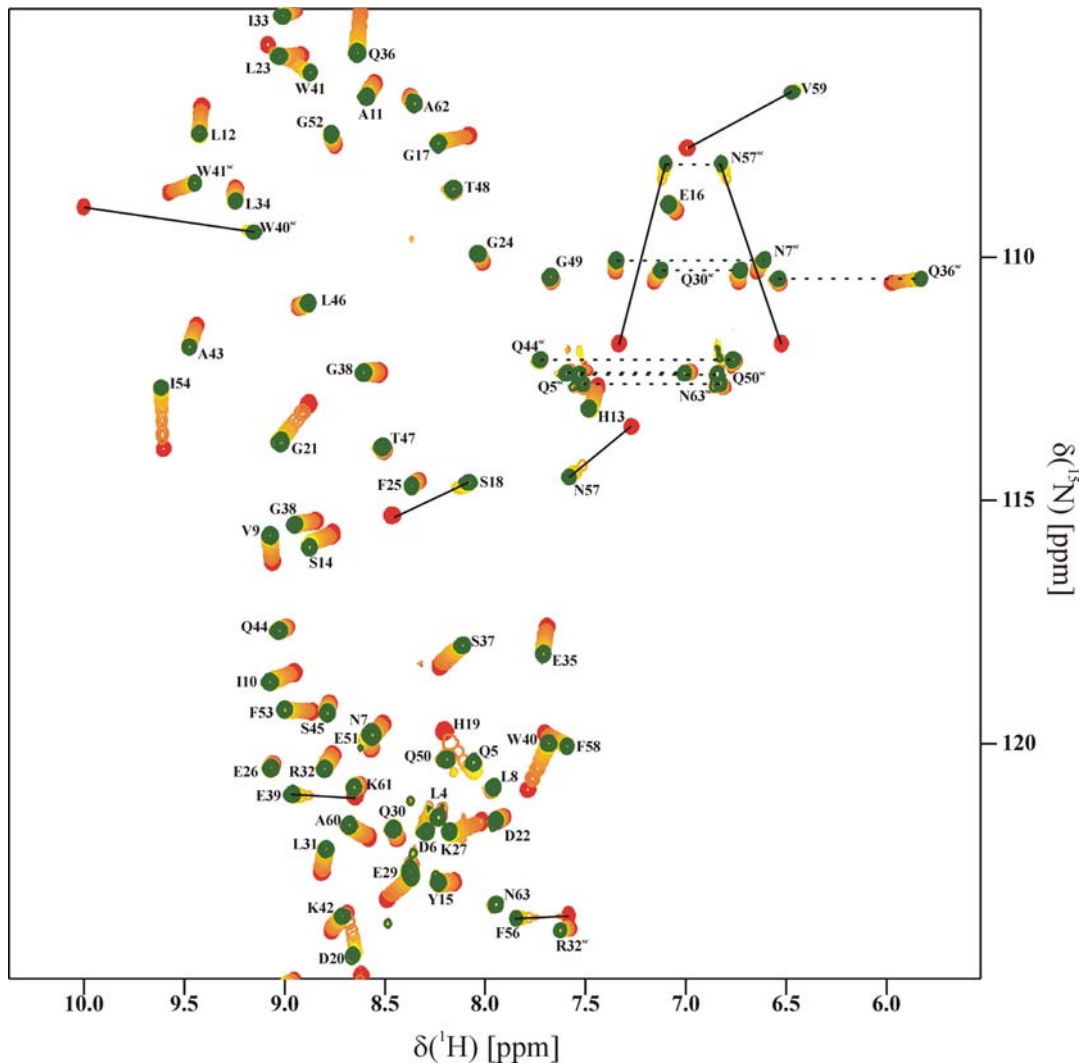


Abb. 4.2 NMR-Titrationsexperiment der LckSH3_P17G mit Tip(167-199). Überlagerung der $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren der freien, ^{15}N -markierten LckSH3_P17G (rot) unter gradueller Zugabe von Tip (Endkonzentrationen: 210 μM LckSH3_P17G, 1,12 mM Tip(167-199), 13 mM K-Phosphat, 7 mM NaCl, pH 6.4 bei 298 K und 600 MHz). Die Resonanzen der gebundenen LckSH3_P17G sind in grün dargestellt; alle Zwischenschritte verlaufen von Orange nach Gelb. Die Kreuzresonanzen der Aminosäuren im gebundenen Zustand sind mit ihrer zugehörigen Sequenzposition gekennzeichnet. Resonanzen, die sich im intermediären Austausch bei Ligandenbindung befinden, sind mit durchgezogenen Linien verbunden. Seitenkettenresonanzen sind mit 'sc' gekennzeichnet und für die Aminosäuren Asparagin und Glutamin mit einer gestrichelten Linie verknüpft.

Bei der NMR-spektroskopischen Titration werden deutliche Änderungen der chemischen Verschiebungen von LckSH3_P17G für die Reste G17-I23, E35-A43 und F53-N57, die im Bereich der RT- und n-Src-Schleife sowie in der 3_{10} -Helix zwischen den β -Faltblattsträngen β_4 und β_5 liegen, beobachtet. Weiterhin zeigen die Bereiche von I10-L12 sowie F58-A60 der Faltblattstränge β_1 und β_5 deutliche Änderungen bei Ligandenbindung. Die gleichen Veränderungen konnten in vorangegangenen Arbeiten

schon für den Wildtyp der LckSH3 bei Tip-Bindung beobachtet werden (Schweimer *et al.*, 2002). Diese Regionen sind aus der Literatur dafür bekannt, eine Hauptinteraktionsfläche bei der Ligandenbindung zu bilden (Larson & Davidson, 2000). Ein günstigeres Verhalten der Komplexdynamik (langsamer Austausch), wie es aus den Titrationsexperimenten der LynSH3 mit Tip abzulesen ist (Bauer, 2001), war für die LckSH3_P17G genau wie für den LckSH3-Wildtyp nicht zu erkennen.

Obwohl die LckSH3 durch die P17G-Punktmutation einen deutlichen Zuwachs der Affinität zu Tip erfährt (Kap. 4.2.1), ist aus den NMR-Titrationsexperimenten abzulesen, dass die Bestimmung einer hochaufgelösten Komplexstruktur aus LckSH3_P17G und Tip genauso wenig möglich ist, wie für den Wildtyp (Bauer, 2001; Schweimer *et al.*, 2002; Bauer *et al.*, 2004). Die Gewinnung einer ausreichenden Anzahl experimenteller Randbedingungen für die Bestimmung einer hochaufgelösten Komplexstruktur scheint nur für das LynSH3-Tip-System realistisch, das in den Kap. 4.4 und 4.5 näher untersucht wurde.

4.2.3 Bestimmung der Bindungskinetik durch schnelle Mischmethoden

Um die zirka zehnfach stärkere Bindung der P17G-Mutante von LckSH3 an Tip(168-187) näher zu charakterisieren, kamen schnellen Mischmethoden (*stopped-flow*) zum Einsatz (Kap. 3.4.5). Obwohl die Bestimmung der Komplexstruktur von LckSH3_P17G-Tip nicht realistisch erschien (Kap. 4.2.2), sollten so die Affinitätsunterschiede zur wildtyp LckSH3 näher analysiert werden.

Im Mittelpunkt des Interesses stand die Frage, ob die deutlich stärkere Bindung von LckSH3_P17G durch ein schnelleres konformationelles Abtasten (Effekt auf k_{on}) und/oder zusätzliche Wechselwirkungen im Komplex (Effekt auf k_{off}) herrührt. Zu diesem Zweck wurde die Bildung des Komplexes durch schnelle Mischung in einer *stopped-flow* Apparatur induziert und anhand der Änderung der Tryptophanfluoreszenz der LckSH3 beobachtet (Kap. 3.4.5). Die gemessenen Fluoreszenzänderungen bei unterschiedlichen Ligandenkonzentrationen in Abhängigkeit der Zeit sind in Abb. 4.3 dargestellt. Da die Fluoreszenzänderungen mit einer monoexponentiellen Formel gut beschrieben werden könnten (Kap. 3.4.5, Gleichung 3.12), ist davon auszugehen, dass die Komplexbildung nach einem Zweizustandsmodell erfolgt. Die Anpassung der gemessenen Werte an diese Funktion liefert die beobachteten Raten k_{obs} (Abb. 4.3), aus denen unter der Annahme einer Reaktion pseudoerster Ordnung die Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation (k_{on}) und Dissoziation (k_{off}) bestimmt werden können (Kap. 3.4.5, Gleichung 3.13).

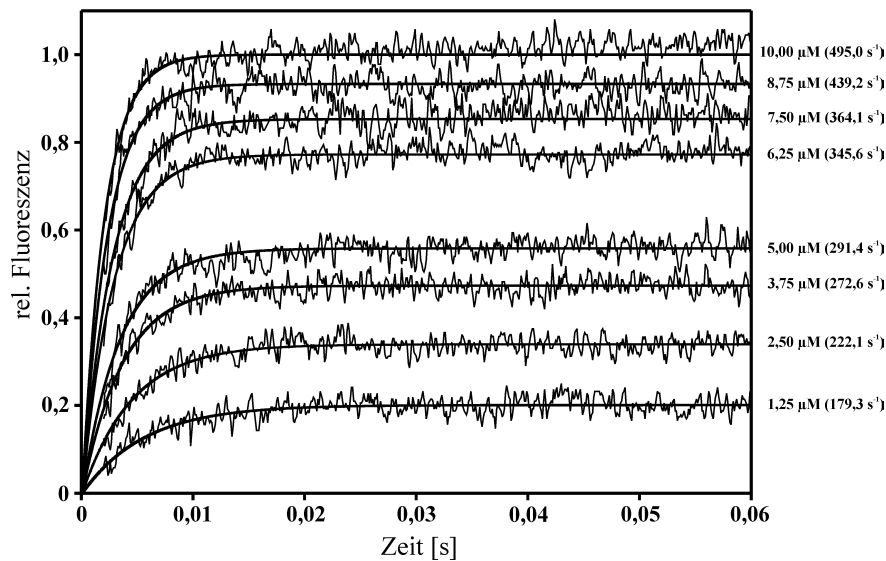


Abb. 4.3 Assoziationskinetik von Tip(168-187) mit LckSH3. Dargestellt sind die zeitlichen Verläufe der relativen Fluoreszenzänderungen gemittelt über mindestens zehn Messungen (dünne Linien) bei verschiedenen Ligandenkonzentrationen und gleicher LckSH3 Konzentration (0,5 μM SH3, 50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5). Die Anpassungen an eine monoexponentielle Funktion sind als dicke Linien hervorgehoben und die daraus resultierenden beobachteten Raten k_{obs} sowie die zugehörige Ligandenkonzentration sind angegeben.

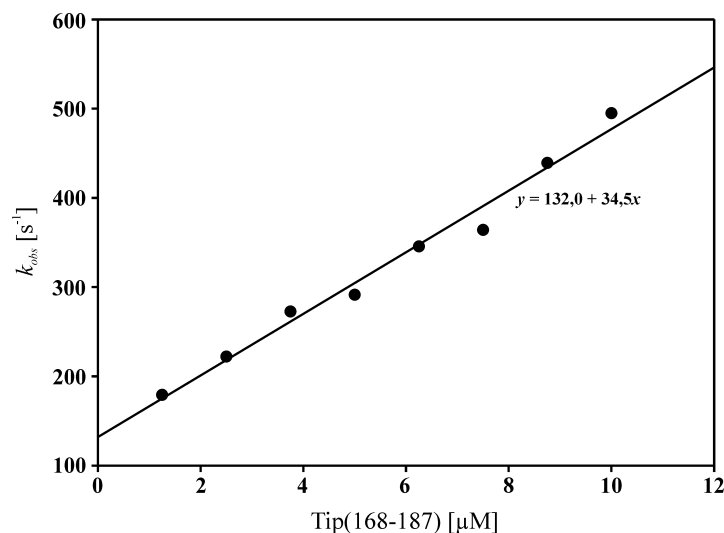


Abb. 4.4 Lineare Abhängigkeit der beobachteten Raten k_{obs} von der Ligandenkonzentration. Aus der Regressionsgerade (durchgezogene Linie) lässt sich die Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation $k_{off} = 132 \text{ s}^{-1}$ sowie der Assoziation $k_{on} = 3,5 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ablesen.

Die lineare Abhängigkeit der beobachteten Gleichgewichtskonstante k_{obs} von der Ligandenkonzentration wird aus Abb. 4.4 ersichtlich. Der y-Achsenabschnitt der

Regressionsgeraden gibt dabei die Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation von $k_{off} = 132 \text{ s}^{-1}$, die Steigung der Regressionsgeraden die Geschwindigkeitskonstante der Assoziation von $k_{on} = 3,5 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ des LckSH3-Tip(168-187)-Komplexes an.

Die aus den Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation und Dissoziation zu berechnende Bindungskonstante weicht mit $3,8 \text{ }\mu\text{M}$ zirka um einen Faktor vier von dem Ergebnis der Titration (Kap. 4.2.1) ab. Diese Abweichung des Absolutwerts der Affinität ist auf die eingangs erwähnte Problematik der Peptidkonzentrationsbestimmung (Kap. 4.2) zurückzuführen, stellt aber keine Beeinträchtigung der hier getroffenen relativen Aussagen dar.

Für die Assoziationskinetik von Tip(168-187) an LckSH3_P17G war eine Analyse nicht möglich, da die Reaktion deutlich schneller als beim Wildtyp verläuft. Lediglich für eine Ligandenkonzentration von $0,6 \text{ }\mu\text{M}$ konnte eine Rate k_{obs} von 406 s^{-1} bestimmt werden (Abb. 4.5). Eine weitere Absenkung der Ligandenkonzentration war wegen der geringen Signalamplitude und des schlechten Signal-zu-Rausch-Verhältnisses nicht möglich. Obwohl die exakte Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation und Dissoziation für die LckSH3_P17G nicht möglich waren, unterstreicht dieser Befund den signifikanten Affinitätszuwachs der LckSH3_P17G im Vergleich zu LckSH3.

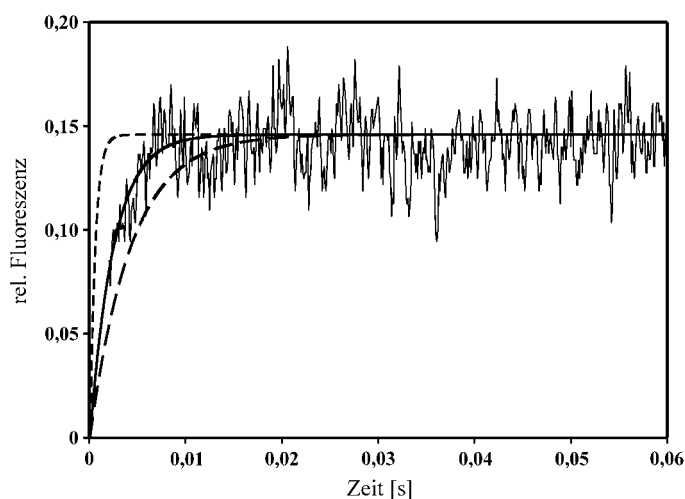


Abb. 4.5 Assoziationskinetik von Tip(168-187) an LckSH3_P17G. Zeitliche Verlauf der relativen Fluoreszenzänderung der LckSH3_P17G gemittelt über zehn Messungen bei $0,6 \text{ }\mu\text{M}$ Tip(168-187) und $0,5 \text{ }\mu\text{M}$ LckSH3_P17G (50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5). Die Anpassung für die Messwerte ist als durchgezogene Linie dargestellt. Weiterhin sind die theoretischen Anpassungen für $k_{on} = 2,8 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und $k_{off} = 132 \text{ s}^{-1}$ (kurz gestrichelt) und $k_{on} = 3,5 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und $k_{off} = 17 \text{ s}^{-1}$ (lang gestrichelt) eingezeichnet (Kap. 3.4.5, Gleichung 3.12).

Neben der Anpassung der Messwerte sind in Abb. 4.5 die theoretisch erwarteten Anpassungen für die Extremfälle, nämlich dass eine um den Faktor acht stärkere

Bindung als an LckSH3 entweder ausschließlich durch Effekte auf die Gleichgewichtskonstante der Assoziation beziehungsweise der Dissoziation hervorgerufen würde, aufgetragen. Der Vergleich der theoretischen und gemessenen Kurven zeigt, dass das Verhalten der LckSH3_P17G bei Tip-Bindung nur durch einen gleichzeitigen Einfluss der Mutation auf die Assoziation und Dissoziation des Komplexes zu erklären ist.

Änderungen bezüglich der Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation können nur auf Basis einer detaillierten Kenntnis der Wechselwirkungen im Komplex interpretiert werden. Im Gegensatz dazu wird die Assoziationsgeschwindigkeit durch die Struktur und Dynamik der freien LckSH3_P17G beeinflusst. Da die Bestimmung der Komplexstruktur von LckSH3_P17G mit Tip nicht möglich ist (Kap. 4.2.2), wird im weiteren die freie LckSH3_P17G analysiert, um zumindest ein besseres Verständnis der Effekte zu erzielen, die sich auf die Geschwindigkeitskonstante der Assoziation auswirken.

4.2.4 Bestimmung des Austauschraten der Amidresonanzen

Aus den Kapiteln 4.2.1 und 4.2.3 geht hervor, dass LckSH3_P17G Tip(168-187) deutlich stärker bindet und dass dieser Effekt zumindest teilweise auf einer größeren Assoziationsgeschwindigkeit (k_{on}) beruht. Daher sollen in den folgenden Kapiteln die Eigenschaften der freien LckSH3_P17G im Vergleich zum Wildtyp hinsichtlich einer möglichen Erklärung für die stärkere Bindung charakterisiert werden.

Die Bestimmung der Austauschraten der Amidprotonen erlaubt es, die Dynamik von Proteinen auf einer ms-h-Zeitskala zu charakterisieren. Zur Bestimmung der langsamen Austauschraten wurden Proben der ^{15}N -markierten LckSH3 und LckSH3_P17G im selben Dialysepuffer vorbereitet, um einheitliche Messbedingungen zu garantieren. Anschließend wurden die Proben gefriergetrocknet und erst kurz vor der Messung der NMR-Spektren in D_2O aufgenommen. Beobachtet wurden die Intensitätsverluste der einzelnen Amidprotonresonanzen im $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum. Unter den verwendeten Bedingungen waren nur im ersten $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum der LckSH3 (zirka sechs Minuten nach D_2O -Zugabe) die Resonanzen der Aminosäuren V9, I10, I33, L34, W41, K42 und I54 zu erkennen. In allen weiteren Spektren waren keine Resonanzen mehr detektierbar. Dieser Befund zeigt, dass der Austausch der Amidprotonen der beobachtbaren Resonanzen des ersten $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrums mit den Deuteronen des Lösungsmittels gegenüber dem intrinsischen Austausch verlangsamt ist. Eine Bestimmung der Austauschraten war aufgrund fehlender weiterer Daten nicht möglich.

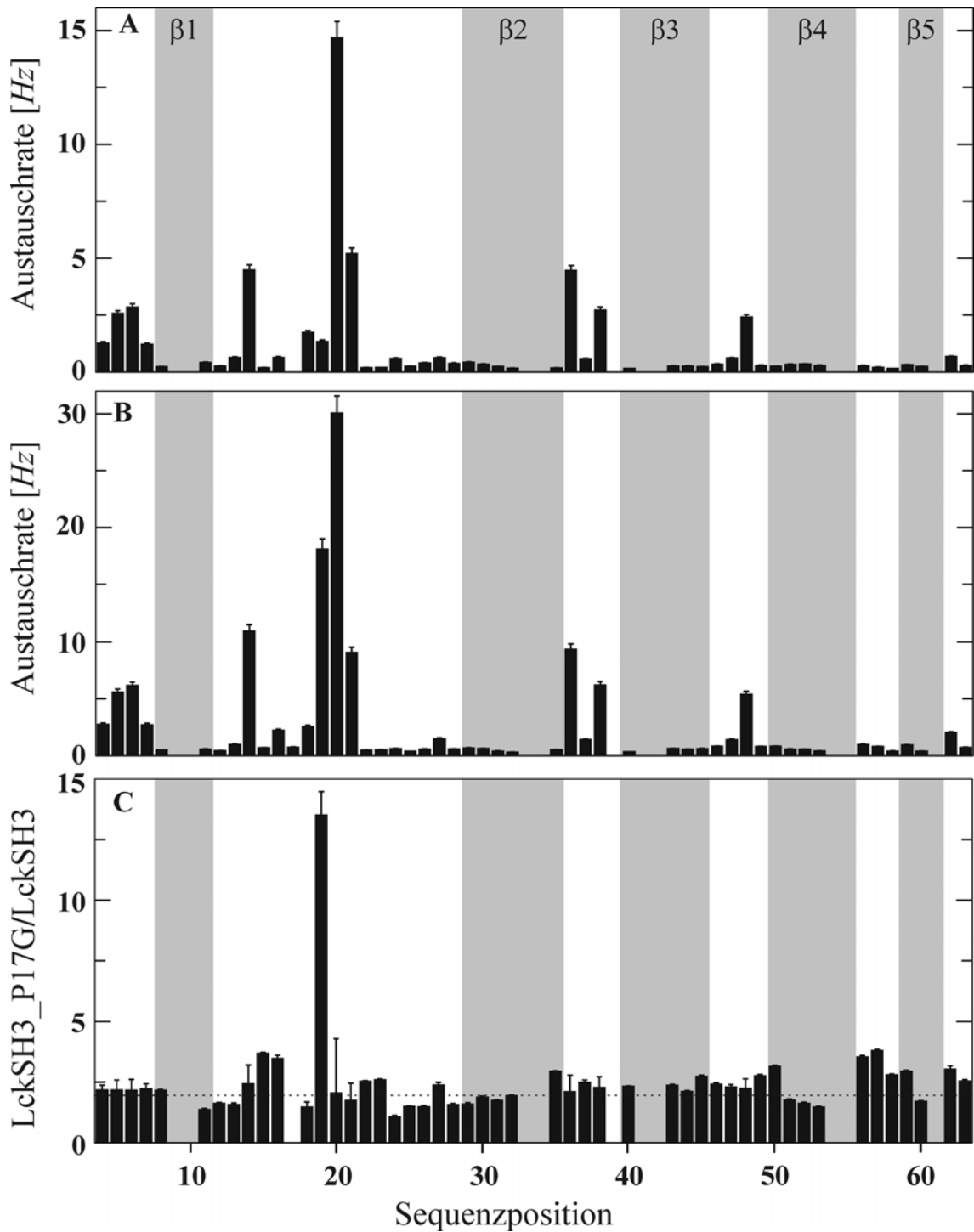


Abb. 4.6 Auftragung der schnellen Austauschraten der Amidprotonen der LckSH3 (A) und der LckSH3_P17G (B) sowie dem Verhältnis der Austauschraten zueinander (C) in Abhängigkeit der Sequenzposition. Die schnellsten Austauschraten sind sowohl beim Wildtyp als auch bei der Mutante in den Schleifenbereichen (vgl. Abb. 1.1) zwischen den β -Faltblattsträngen zu verzeichnen. Im Schnitt verdoppeln sich die Austauschraten durch die P17G-Mutation (gestrichelte Linie, unten). Deutlich überproportionale Änderungen ergeben sich vor allem für die RT-Schleife (besonders H19) sowie für die 3_{10} Helix. Die n-Src- und distale Schleife zeigen weniger ausgeprägte Änderungen. Grau schattierte Bereiche geben die Lage der β -Faltblattstränge wieder (vgl. Abb. 1.1). Jeweils 1,2 mM SH3, 40 mM K-Phosphat, 20 mM NaCl, pH 6.4 bei 298 K und 600 MHz.

Die Identifizierung langsam (min-h-Zeitskala) austauschender Amidprotonen der LckSH3_P17G war nicht möglich, da bereits sechs Minuten nach D₂O-Zugabe keine Resonanzen im ¹H,¹⁵N-HSQC-Spektrum mehr erkennbar waren. Aus diesem Grund wurden wasserselektive Magnetisierungstransferexperimente zur Bestimmung der schnellen Austauschraten der Amidresonanzen durchgeführt. Diese Methode erlaubt die Analyse der Protonen, die auf einer ms-s-Zeitskala mit dem Lösungsmittel austauschen.

Abb. 4.6 A bis C geben die bestimmten Austauschraten sowie ihr Verhältnis zueinander für die LckSH3 beziehungsweise die LckSH3_P17G wieder. Aus den Auftragungen der Austauschraten ist zu erkennen, dass die höchsten Raten im unstrukturierten NH₂-Terminus (L4-N7) sowie in den Bereichen der RT- (S14, H19, D20 und G21), n-Src- (Q36 und G38) und distalen Schleife (T48) zu verzeichnen sind. Deutlich sind die insgesamt niedrigeren Austauschraten des Wildtyps zu erkennen. Besonders sticht H19 hervor. Die Mutation von P17 zu G17 bewirkt eine deutliche Erhöhung der Austauschrate. In weitaus geringerem Maße, aber immer noch überdurchschnittlich erhöhen sich die Austauschraten der beiden Aminosäuren direkt NH₂-terminal der Mutation, Y15 und E16 sowie Teile der n-Src- (E36-E39) und distalen Schleife (L46-R49). Besonders fällt auf, dass die absolut gesehen relativ geringen Austauschraten der Aminosäuren der ₃₁₀-Helix (S56-Y58) insgesamt eine signifikante Erhöhung durch die P17G-Mutation erfahren. Die Aminosäuren der ₃₁₀-Helix bilden zusammen mit einigen stark konservierten Aminosäuren der RT-Schleife die Kontaktfläche für die Bindung prolinreicher Liganden (Kap. 1.2.1). Dabei befindet sich die ₃₁₀-Helix direkt gegenüber der Mutationsstelle in der RT-Schleife. Insgesamt deuten die Ergebnisse aus den Versuchen zur Bestimmung der langsamen und schnellen Austauschraten der LckSH3 und LckSH3_P17G darauf hin, dass die Mutation von P17 zu G17 nicht nur streng lokale Auswirkungen auf die direkte Umgebung der RT-Schleife hat, sondern dass auch andere Teile des Proteins beeinflusst werden.

4.2.5 Bestimmung der ¹⁵N-Relaxationsdaten R₁, R₂ und des heteronuklearen {¹H} ¹⁵N-NOEs

Neben der Charakterisierung der dynamischen Eigenschaften eines Proteins auf der ms-h-Zeitskala durch die Bestimmung der Amidprotonenaustauschraten besteht weiterhin die Möglichkeit, die Dynamik auf der ps-ns-Zeitskala durch ¹⁵N-Relaxationsmessungen zu charakterisieren (Abb. 4.7 A). Der Vergleich der Werte für den heteronuklearen {¹H} ¹⁵N-NOE bei 60,8 MHz Stickstofffrequenz zeigt eine gute Übereinstimmung für den Wildtyp und die P17G-Mutante.

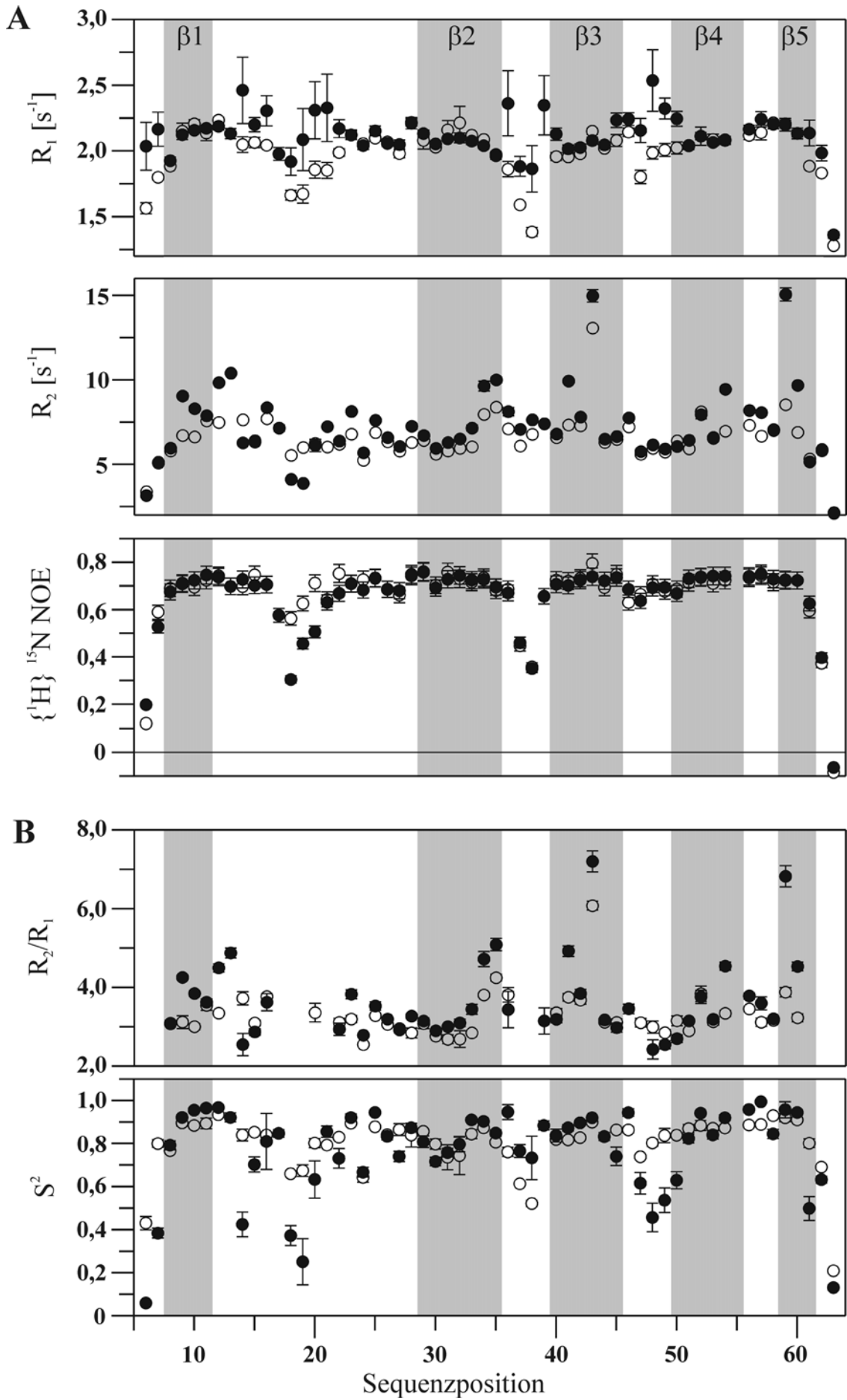


Abb. 4.7 ^{15}N -Relaxationsdaten der LckSH3 (offene Kreise) sowie der LckSH3_P17G (gefüllte Kreise) bei 60,8 MHz Stickstofffrequenz. (A) Auftragung der Messdaten der longitudinalen und transversalen Relaxationsraten R_1 und R_2 sowie des heteronukleare $\{^1\text{H}\}^{15}\text{N}$ -NOEs (Kap. 3.5.8 und 3.5.9). (B) Darstellung des R_2 -zu- R_1 -Verhältnisses und des nach dem 'model free' Ansatz berechneten Ordnungsparameter S^2 (Kap. 3.5.10). Durch die P17G-Mutation kommt es nur zu Änderung der Dynamik in den Schleifenbereichen. Grau schattierte Bereiche geben die Lage der β -Faltblattstränge wieder (vgl. Abb. 1.1). Jeweils 1,2 mM SH3, 40 mM K-Phosphat, 20 mM NaCl, pH 6.4 bei 298 K und 600 MHz Protonenfrequenz.

Die Aminosäuren in den Elementen regulärer Sekundärstruktur weisen Werte um 0,8 auf. Die geringe Abweichung zum theoretischen Maximalwert von 0,83 bei 600 MHz Protonenfrequenz für eine vollkommen starre Amidgruppe eines kugelförmigen Proteins (Kay *et al.*, 1989) zeigt die geringe Flexibilität dieser Bereiche auf der ps-ms-Zeitskala. Werte kleiner als 0,65, wie sie für einige Aminosäuren der RT- und n-Src-Schleife sowie für die NH_2 - und COOH -Termini der Fall sind, weisen hingegen auf eine erhöhte Flexibilität hin. Deutliche Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante sind lediglich im Bereich direkt COOH -terminal der Mutation zu verzeichnen. Die Werte für die Resonanzen der Aminosäuren S18, H19 und D20 fallen durch den Austausch von P17 durch Glycin von $0,56 \pm 0,03$ auf $0,31 \pm 0,02$, $0,63 \pm 0,03$ auf $0,46 \pm 0,02$ beziehungsweise $0,71 \pm 0,04$ auf $0,51 \pm 0,03$. Diese deutliche Abnahme der Werte spiegelt eine Zunahme der Flexibilität der Mutante in diesem Bereich wider, wie es nach einer Prolin-zu-Glycin Mutation zu erwarten war. Weiterhin können die Relaxationsdaten als R_2 -zu- R_1 -Verhältnis (Kap. 3.5.8) und nach den 'model free'-Formalismus in Form eines Ordnungsparameters (S^2) (Kap. 3.5.10) wiedergegeben werden (Abb. 4.7 B). Die Analyse von S^2 spiegelt durch die deutlich niedrigeren Werte für die Aminosäuren der RT-Schleife eine Zunahme der Flexibilität in der P17G-Mutante wider.

Während hinsichtlich des heteronuklearen $\{^1\text{H}\}^{15}\text{N}$ -NOEs keine signifikanten Unterschiede für die n-Src- oder distale Schleife zu erkennen sind, weisen die Werte für S^2 auf eine leichte Reduktion der Flexibilität der n-Src-Schleife und eine Erhöhung der Flexibilität der distalen Schleife hin.

Damit zeigen die Relaxationsdaten der LckSH3 und LckSH3_P17G, dass der Austausch von P17 durch Glycin zu der erwarteten erhöhten Flexibilität der RT-Schleife führt. Darüber hinaus liefert die Auswertung des Ordnungsparameters S^2 Hinweise darauf, dass neben der RT- auch die n-Src- und distale Schleife durch den Aminosäureaustausch in ihren dynamischen Eigenschaften beeinflusst werden.

4.2.6 Korrelation der residualen dipolaren Kopplungen

Nachdem die Analyse der dynamischen Eigenschaften Anhaltspunkte für Änderungen in der Mutante über den Bereich der Mutation hinaus liefert, stellte sich die Frage nach möglichen strukturellen Unterschieden der LckSH3_P17G verglichen zum Wildtyp.

Eine elegante Methode zum schnellen Vergleich der beiden Strukturen – ohne erst die vollständige Struktur der LckSH3_P17G berechnen zu müssen – stellt die Korrelation der residualen dipolaren $D_{N\ H^N}$ -Kopplungen dar. Residuale dipolare Kopplungen reagieren sehr empfindlich auf die Veränderung des Winkels der N-H^N-Bindungsvektoren relativ zum Orientierungstensor. Unterschiede in den Winkeln führen zu starken Änderungen der gemessenen Kopplungen (Mittermaier & Kay, 2004). Daher ist die vergleichende Auftragung der residualen dipolaren Kopplungen der LckSH3 und LckSH3_P17G ein sensitives Maß, um auch kleine strukturelle Änderungen zu detektieren. Im Gegensatz zu einer vollständigen Strukturberechnung ist für diese Art des Vergleichs nur eine Zuordnung der Amidresonanzen des Rückgrats und nicht eine vollständige Zuordnung der Rückgrat- und aller Seitenkettenresonanzen erforderlich. Bestimmt wurden die residualen dipolaren Kopplungen durch eine Reihe von J -modulierten $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren in einer schwach orientierenden *Pfl*-Phagen-Suspension (Kap. 3.5.7).

Die Auftragung der gemessenen residualen dipolaren Kopplungen der LckSH3 gegen die der LckSH3_P17G sind in Abb. 4.8 dargestellt. Aufgetragen wurden nur die Werte für die Aminosäuren, deren Resonanzen in beiden Proteinen eindeutig identifiziert werden konnten und die gleichzeitig keine Signalüberlappung mit anderen Resonanzen im $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum aufwiesen. Mit Ausnahme der Wertepaare für die Aminosäuren S14 und S18, die sich nahe der Mutationsstelle befinden, ergibt sich für die Auftragung der restlichen Wertepaare ein Korrelationskoeffizient von 0,95. Dieses zeigt, dass abgesehen von kleinen strukturellen Änderungen um die Mutationsstelle herum, keine globalen Änderungen der Struktur der LckSH3_P17G im Vergleich zu LckSH3 zu verzeichnen sind.

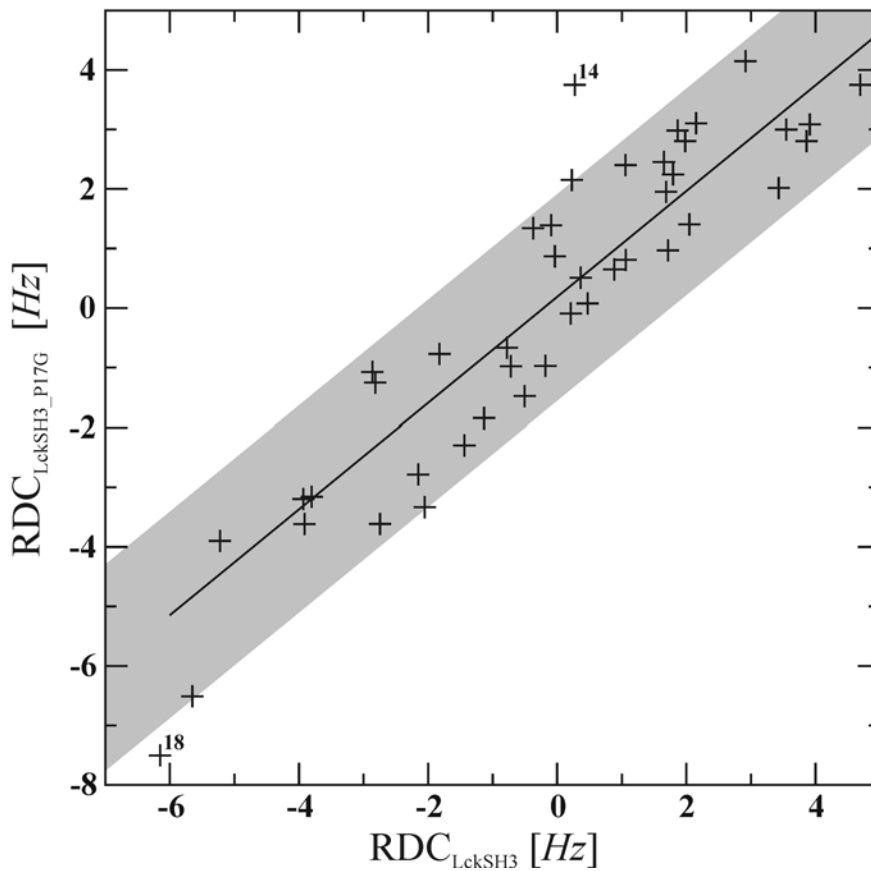


Abb. 4.8 Korrelation der gemessenen residualen dipolaren D_{NHN} -Kopplungen (RDC) der LckSH3 und LckSH3_P17G. Die durchgezogene Linie stellt eine lineare Regression für die grau hinterlegten Wertepaare mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,95 dar. Von der Regression ausgenommene Wertepaare (S14 und S18) sind beschriftet (1,2 mM SH3, 40 mM K-Phosphat, 20 mM NaCl, pH 6,4, 10 mg/ml *Pfl*-Phagen).

4.2.7 Freie Moleküldynamiksimulationen

Die Analyse des heteronuklearen $\{^1\text{H}\}^{15}\text{N}$ -NOEs sowie des Ordnungsparameters S^2 (Kap. 4.2.5) ergibt übereinstimmend eine Zunahme der Flexibilität der RT-Schleife durch die P17G-Mutation. Für die n-Src- und distale Schleife aber unterscheiden sich diese Befunde, sodass hier noch weiterer Klärungsbedarf besteht.

Neben der Bestimmung der Relaxationsdaten ist die freie Moleküldynamiksimulation (MD-Simulation) eine weitere Möglichkeit zur Charakterisierung von Bewegungen auf einer ps-ns-Zeitskala (Chandrasekhar *et al.*, 1992; Smith *et al.*, 1995; Chatfield *et al.*, 1998). Freie MD-Simulation ist eine Technik zur Berechnung der Gleichgewichtseigenschaften von klassischen Viel-Körper-Systemen. *Klassisch* bedeutet in diesem Zusammenhang, dass alle beobachteten Kernbewegungen der Komponenten den Gesetzen der *Newton'schen* Mechanik gehorchen – quantenmechanische Effekte werden bei dieser Art der Simulation nicht berücksichtigt. Der Vorteil dieser Methode liegt in der atomaren Darstellung ihrer Resultate. Im vorliegenden Fall wurden freie MD-Simulationen eingesetzt, um die Auswirkungen der P17G-Mutation in LckSH3 zu analysieren.

Als Startstrukturen für die Simulationen wurden sechs repräsentative Strukturen aus dem NMR-Strukturensemble der LckSH3 (PDB-Eintrag 1h92, Schweimer *et al.*, 2002) ausgewählt, um Abhängigkeiten von einer einzelnen Startstruktur zu vermeiden (Garcia-Vilova *et al.*, 2004). Die Äquilibration der Systeme erfolgte durch eine Alternierung verschiedener kurzer MD-Simulationen und Energieminimierungen, wobei die anfänglichen Beschränkungen der Flexibilität der SH3-Domänen schrittweise gelöst wurden (Kap. 3.7.2). Die Einstellung des Gleichgewichtszustands des Systems wird normalerweise anhand der zeitlichen Änderung der Parameter für die Gesamtenergie (E_{tot}), kinetische Energie (E_{kin}), potenzielle Energie (E_{pot}), Dichte, Druck, Temperatur und Volumen des Systems beobachtet (Abb. 4.9). Die Äquilibrationsphase umfasste 41 500 Schritte mit einer Schrittweite von 1,5 fs (entspricht 62,25 ps). Aus Abb. 4.9 ist ersichtlich, dass die beobachteten Parameter im Bereich zwischen 5-10 ps ihren Gleichgewichtswert erreichen, der über den gesamten Verlauf der Simulationen konstant blieb.

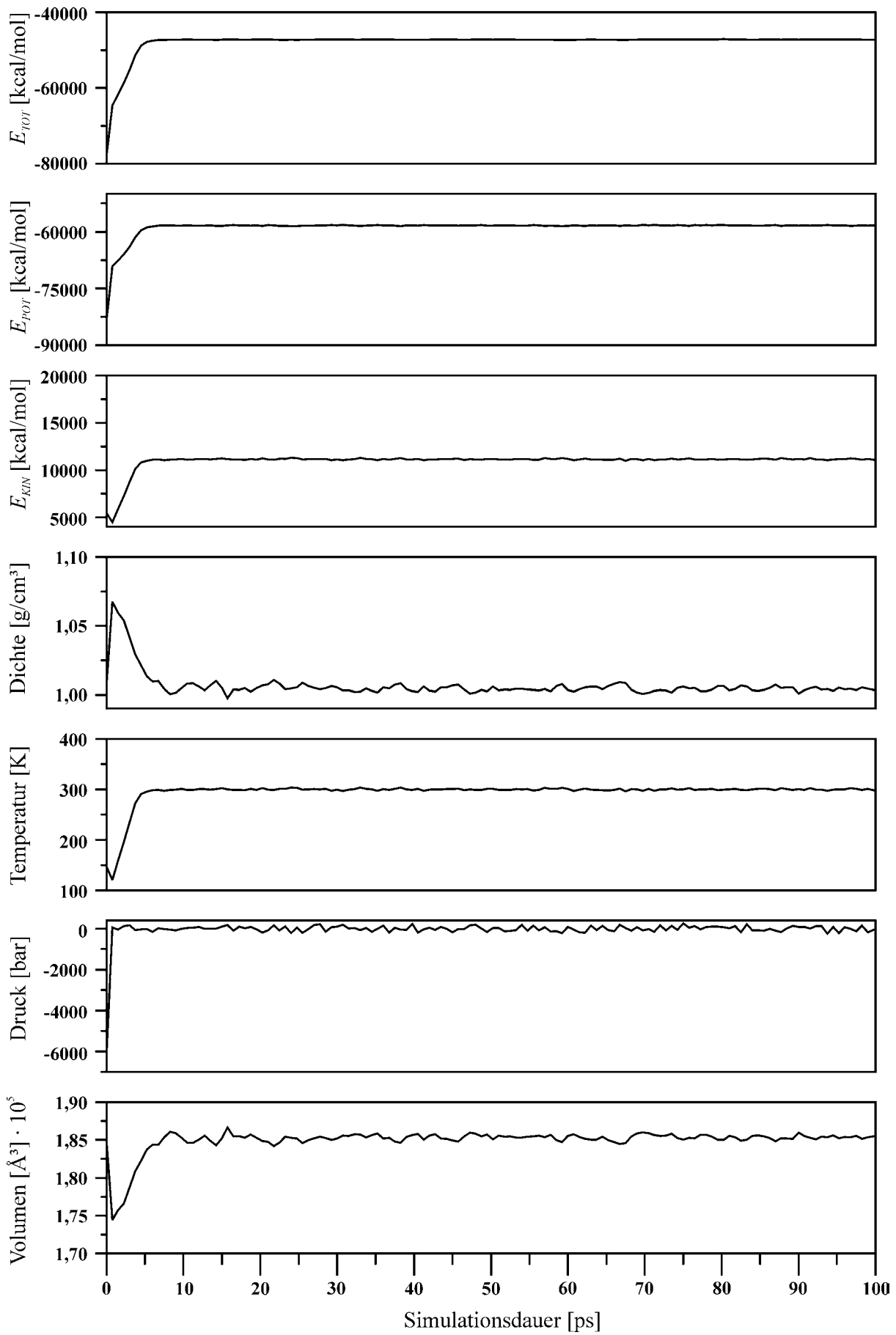


Abb. 4.9 Darstellung der beobachteten Parameter (E_{tot} , E_{kin} , E_{pot} , Dichte, Temperatur, Druck und Volumen) während der Äquilibrationsphase der MD-Simulation einer der sechs Startstrukturen. Nach spätestens 10 ps haben alle beobachteten Parameter ihren Gleichgewichtswert erreicht.

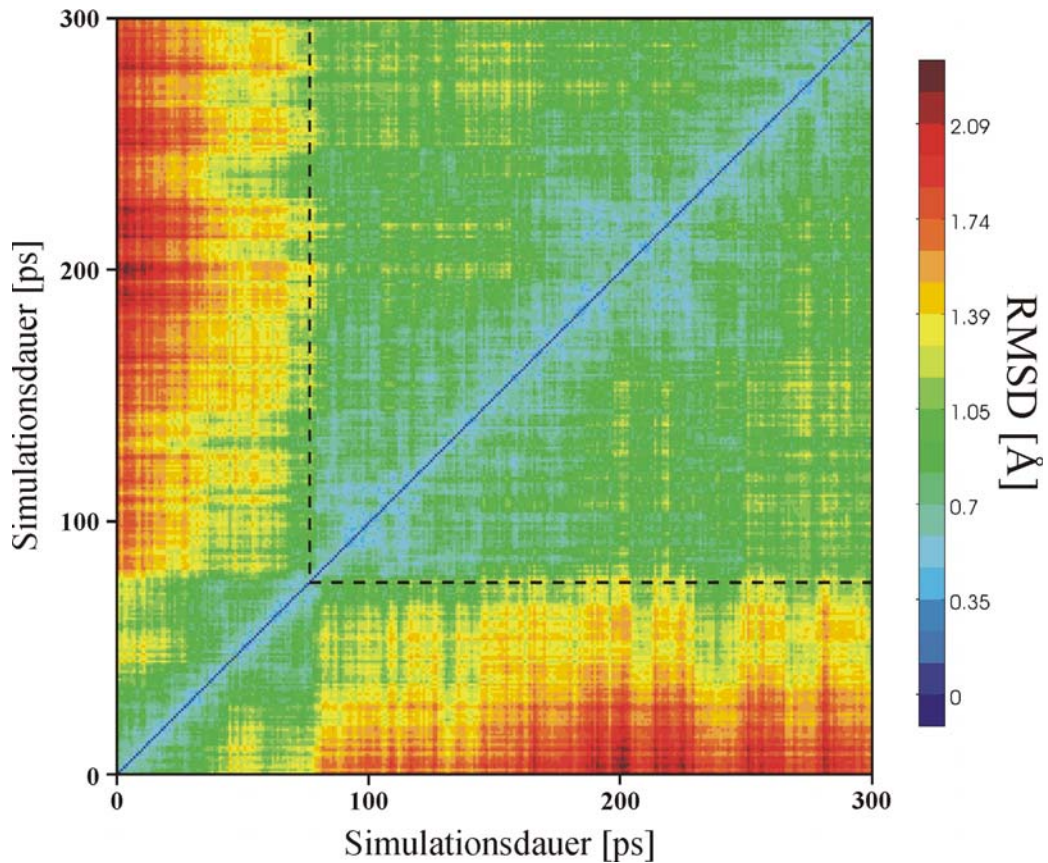


Abb. 4.10 2D-RMSD Darstellung der Äquilibrationsphase der MD-Simulation einer der sechs Startstrukturen. Die mittlere quadratische Abweichung (RMSD) der einzelnen Strukturen untereinander ist entsprechend der Farbskala wiedergegeben. Erst ab einer Simulationsdauer von 75 ps (gestrichelte Linie) zeigen alle Strukturpaare RMSD-Werte kleiner 1,45 Å, was als Grenzwertkriterium für eine Gleichgewichtseinstellung benutzt wurde.

Weiterhin stellt eine 2D-Auftragung der mittleren quadratischen Abweichungen der Atomkoordinaten (2D-RMSD) der SH3-Domänen ein signifikantes Maß für das Erreichen des Gleichgewichtszustands dar (Bös *et al.*, 2004). Eine entsprechende Darstellung der Äquilibrationsphase sowie von Teilen der Produktionsphase ist in Abb. 4.10 gezeigt. Sie verdeutlicht, dass obwohl die einzelnen beobachteten Parameter des Systems bereits ihren Maximalwert erreicht haben, erhebliche Änderungen der Atomkoordinaten der SH3-Domänen zu beobachten sind. Auf der Grundlage der 2D-RMSD-Darstellung wurde von einem Erreichen des Gleichgewichtszustands des Systems erst nach einer

Gesamtsimulationsdauer von 75 ps ausgegangen. Daher wurden zusätzlich zu den 62,25 ps der eigentlichen Äquilibrierungsphase noch die ersten 12,5 ps der Produktionsphase von den nachfolgenden Analysen ausgeschlossen. Die eigentliche Produktionsphase umfasste 675 000 Schritte zu je 1,5 fs (entspricht 1 012,5 ps) von denen aber wegen des noch nicht vollständig erreichten Gleichgewichtszustands nur die letzte Nanosekunde ausgewertet wurde (Kap. 3.7.3).

Clusteranalyse der MD-Simulationen der LckSH3 und Vergleich mit der bekannten NMR-Struktur

Über die gesamte Produktionsdauer von 1 ns wurden je Startstruktur 667 Schnappschüsse gespeichert (entspricht 1 Schnappschuss pro 1 000 Simulationsschritte beziehungsweise 1 Schnappschuss pro 1,5 ps; Kap. 3.7.3). Die Analyse der 4 002 Strukturen (6 Startstrukturen á 667 Schnappschüsse) erfolgte unter anderem mit dem Programm NMRCLUST (Kap. 3.7.4), das die Strukturen entsprechend ihrer mittleren quadratischen Abweichung der Atomkoordinaten in Gruppen zusammenfasst und jeweils eine Struktur pro Gruppe als Repräsentanten auswählt (Kelley *et al.*, 1996). Es konnten insgesamt 24 Strukturen identifiziert werden, die den Konformationsraum der SH3-Domäne während der MD-Simulation repräsentieren. Eine Überlagerung des Strukturensamble der Produktion der MD-Simulationen und des NMR-Strukturensamble der LckSH3 (PDB: 1h92; Schweimer *et al.*, 2002) zeigt eine mittlere quadratische Abweichung der Atomkoordinaten von $0,85 \pm 0,27 \text{ \AA}$ für das Rückgrat und $1,56 \pm 0,33 \text{ \AA}$ für alle Schweratome (Tab. 4.1). Die Abweichung unter den beiden Ensembles entspricht dabei ungefähr der Abweichung der Atomkoordinaten in jedem der einzelnen Ensemble (Tab. 4.1).

Die größten Abweichungen ist im Bereich von P17 der RT-Schleife zu verzeichnen (Abb. 4.11) und wird besonders durch die Kombination der ϕ - und ψ -Winkel ersichtlich. In der MD-Simulation nimmt P17 einen ϕ -Winkel von $-67^\circ \pm 12^\circ$ und einen ψ -Winkel von $146^\circ \pm 28^\circ$, verglichen mit $-71^\circ \pm 16^\circ$ und $93^\circ \pm 12^\circ$ in der NMR-Struktur ein. Die ϕ/ψ -Winkelkombination der Simulation kommt dabei der bevorzugten Kombination von $-65^\circ/135^\circ$ (Morris *et al.*, 1992) deutlich näher als die der NMR-Struktur.

Aus dem Vergleich der Ensemble wird deutlich, dass der Konformationsraum, der während der MD-Simulation abgetastet wird nur geringfügig größer ist als der Konformationsraum der NMR-Strukturenschar. Im Mittel stimmen die beiden

Konformationsräume aber gut überein. Weiterhin stimmen die Strukturen der MD-Simulation mit den experimentell bestimmten Randbedingungen, die für die Berechnung des NMR-Ensembles verwendet wurden, gut überein.

Tab. 4.1 Mittlere Abweichungen der Atomkoordinaten der Strukturen der LckSH3 aus NMR und MD-Simulationen. Die größten strukturellen Unterschiede treten in der RT-, n-Src- und distalen Schleife auf, während die β -Faltblätter nahezu unverändert bleiben.

	Rückgrat RMSD	RMSD aller Schweratome
MD-Simulation	$0,89 \pm 0,21$	$1,56 \pm 0,34$
NMR-Strukturschar	$0,52 \pm 0,11$	$1,20 \pm 0,18$
MD gegen NMR	$0,85 \pm 0,27$	$1,56 \pm 0,33$

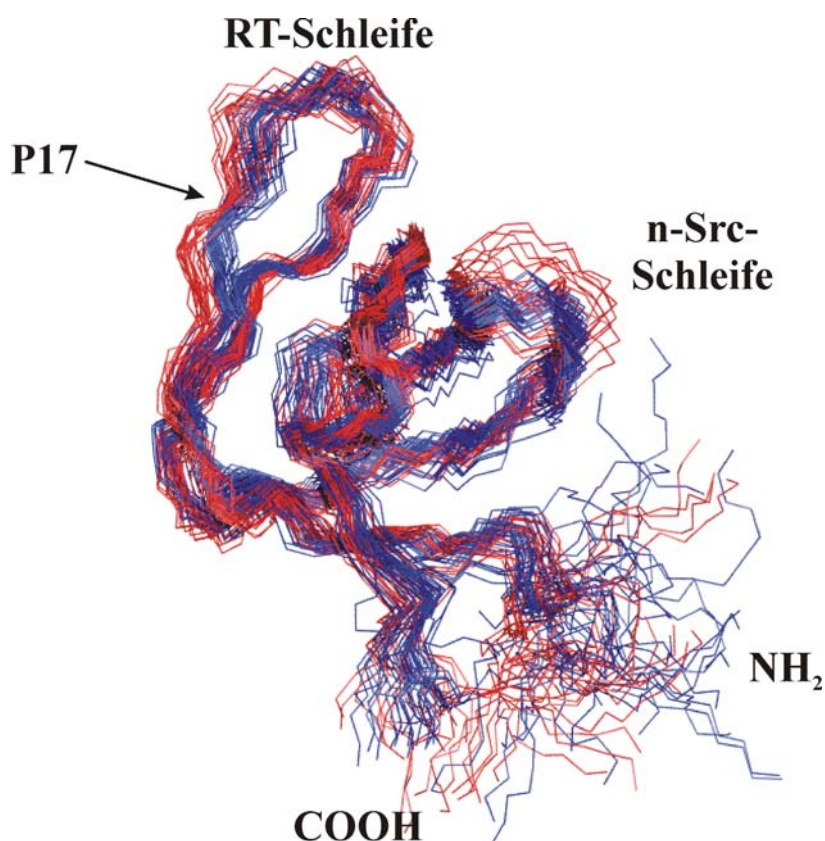


Abb. 4.11 Überlagerung der Rückgratstrukturen des Ensembles der LckSH3 aus den MD-Simulationen (rot) und der NMR-Strukturschar (blau) (PDB: 1h92; Schweimer *et al.*, 2002). Der Konformationsraum, der während der MD-Simulationen beschrieben wird ist geringfügig größer als der der NMR-Strukturen. Im Mittel stimmen aber beide Konformationsräume gut überein. Die Abbildung wurde mit Molmol erstellt (Koradi *et al.*, 1996).

Atomare Fluktuationen der schweren Rückgratome der LckSH3 und LckSH3–P17G

Da die MD-Simulation den Wildtyp der LckSH3 in guter Übereinstimmung zur experimentellen NMR-Struktur wiedergibt und da aus der Korrelation der residualen dipolaren $D_{N\text{HN}}$ -Kopplungen hervorgeht, dass die P17G-Mutation keine Änderung der globalen Struktur bewirkt (Kap. 4.2.6), wurden LckSH3_P17G in gleicher Weise untersucht (Kap. 3.7.3). Aus den einzelnen Schnappschüssen der MD-Simulationen lassen sich die Fluktuationen der Atomkoordinaten der LckSH3 und LckSH3_P17G berechnen. Für eine Beurteilung der Flexibilität des Rückgrats wurden die Fluktuationen der schweren Rückgratome über den gesamten Simulationszeitraum verfolgt und über die jeweils sechs durchgeführten Simulationen gemittelt (Abb. 4.12).

In beiden Simulationsansätzen ist die erhöhte Flexibilität der drei Schleifen, RT-, n-Src- und distale Schleife, zu erkennen. Die drei zentralen Faltblattstränge $\beta 2$, $\beta 3$ und $\beta 4$ weisen die geringste Fluktuation auf. $\beta 1$ und $\beta 5$, die terminalen Faltblattstränge, zeigen hingegen in den Bereichen zu den Termini hin eine starke Zunahme der Flexibilität. Ebenfalls flexibler als die zentralen Faltblattstränge sind die Reste F56 bis F58, die die 3_{10} -Helix bilden. Die Mutation von P17 zu Glycin verursacht eine leichte Zunahme der Flexibilität in direkter Nachbarschaft der Mutationsstelle. Zusätzlich zeigen die Bereiche der distalen Schleife eine erhöhte Fluktuation der Atomkoordinaten, während die n-Src-Schleife keine signifikanten Veränderungen erfährt.

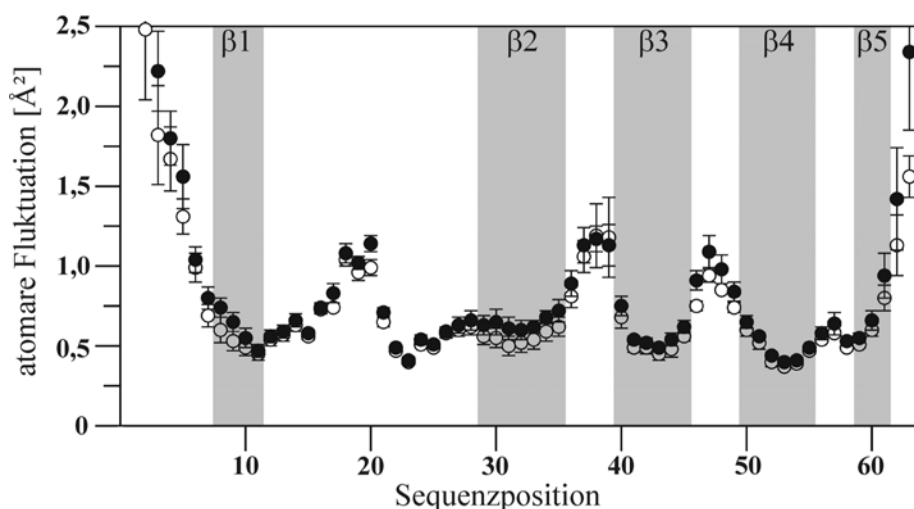


Abb. 4.12 Auftragung der atomaren Fluktuationen der C^α -, C' - und N^H -Atome der LckSH3 (offene Kreise) und LckSH3_P17G (geschlossene Kreise) gewonnen aus MD-Simulationen in Abhängigkeit der Sequenzposition. Deutlich ist die erhöhte Flexibilität der Schleifenbereiche gegenüber den Bereichen regulärer Sekundärstruktur zu erkennen. Grau schattierte Bereiche geben die Lage der β -Faltblattstränge wieder (vgl. Abb. 1.1).

Konformationelle Abstrakte der bindungsaktiven Konformation

Durch schnelle Mischmethoden konnte gezeigt werden, dass eine höhere Assoziationsrate für die höhere Affinität der LckSH3_P17G mitverantwortlich ist (Kap. 4.2.3). Eine höhere Geschwindigkeitskonstante der Assoziation (k_{on}) kann entweder durch zusätzliche elektrostatischen Anziehungskräfte (*encounter complex*) oder höhere Population der 'bindungsaktiven' Konformation erreicht werden (Selzer *et al.*, 2000). Da die P17G-Mutation als elektrostatisch neutral anzusehen ist, kommt für die LckSH3_P17G nur letzter Punkt in Betracht.

Auf der Grundlage des Modells des LckSH3-Tip-Komplexes (Kap. 4.6) wurde die 'bindungsaktive' Konformation definiert. Alle Aminosäuren der LckSH3, die mindestens ein Atom mit Abstand kleiner als 5 Å zu einem Atom von Tip(176-187) aufweisen, wurden zur Bindungsregion der LckSH3 gezählt (Abb. 4.13 A). Diese umfaßt die Aminosäuren H13-E16, S18, H19, D22, S37-W41, F53 und P55-F58. Aus den Positionen ihrer C^α-Atome konnte eine Matrix aus 136 paarweisen Abständen berechnet werden, die die Konformation der LckSH3 bei Tip-Bindung widerspiegeln (Abb. 4.13 B).

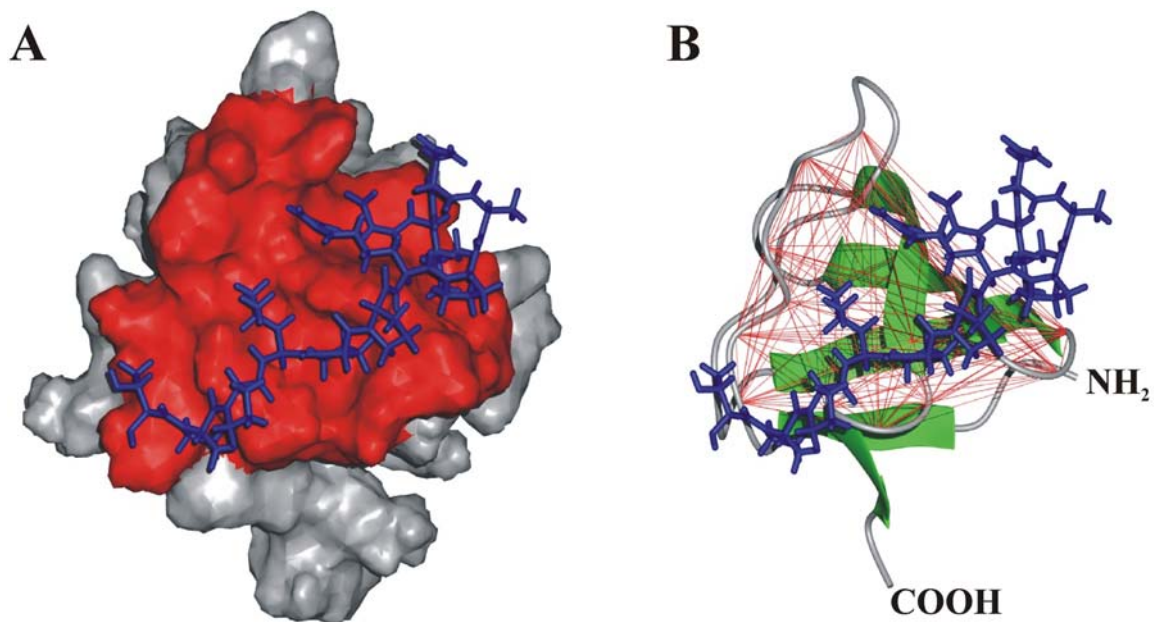


Abb. 4.13 Definition der Bindungsregion und der 'bindungsaktiven' Konformation der LckSH3. (A) Oberflächendarstellung des LckSH3-Tip(176-187) Modells, wobei alle Aminosäuren der Bindungsregion (mindestens ein Atom mit Abstand ≤ 5 Å zu einem Atom von Tip (Stäbchenmodell)) in rot dargestellt sind. (B) 136 paarweise C^α-Abstände (rot) der Aminosäuren der Bindungsregion definieren die 'bindungsaktive' Konformation. Die Abbildung wurde mit Molmol erstellt (Koradi *et al.*, 1996).

Im weiteren Verlauf wurden die Schnappschüsse aus den MD-Simulationen der freien LckSH3- und LckSH3_P17G-Domänen auf die Erfüllung der Abstände der 'bindungsaktiven' Konformation überprüft. Ein Schnappschuss der MD-Simulation wurde als 'bindungsaktiv' definiert, wenn alle 136 paarweisen C^α-Abstände innerhalb einer Toleranz von 0,5 Å beziehungsweise 1,0 Å zu den berechneten Abständen aus dem Modell lagen (Kap. 3.7.4). In Abb. 4.14 sind alle 'bindungsaktiven' Schnappschüsse mit einem schwarzen Balken in Abhängigkeit der Simulationsdauer dargestellt. Je nach Toleranz werden beim Wildtyp 21 beziehungsweise 174 Strukturen während der Produktionsdauer von sechs mal 1 ns der MD-Simulation als 'bindungsaktiv' identifiziert. Im gleichen Simulationszeitraum nimmt die P17G-Mutante der LckSH3 bei entsprechenden Toleranzgrenzen 42 beziehungsweise 379-mal diese Konformation ein. Somit tastet die LckSH3_P17G durch ihre erhöhte Flexibilität die 'bindungsaktive' Konformation in den MD-Simulationen doppelt so oft ab wie der Wildtyp.

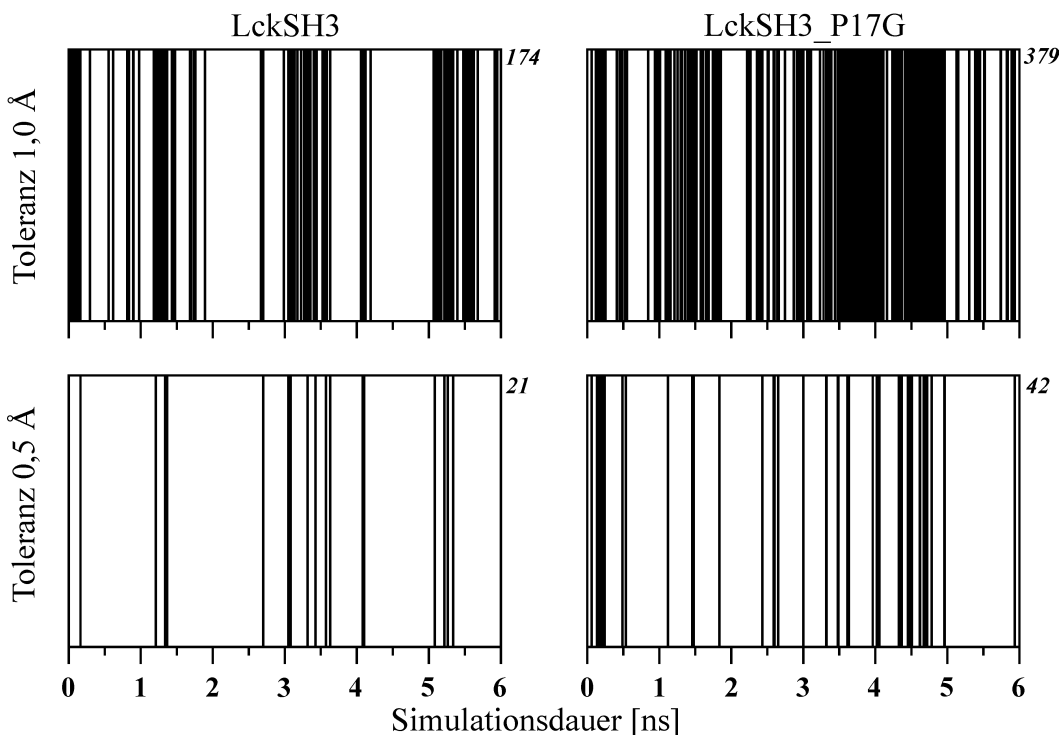


Abb. 4.14 Abtastraten der 'bindungsaktiven' Konformation der LckSH3 und LckSH3_P17G. Auf Basis des Modells des LckSH3-Tip-Komplexes (Kap. 4.6) wurden die Schnappschüsse der MD-Simulationen auf die Erfüllung der 136 paarweisen Abstände der C^α-Positionen der Bindungsregion überprüft (Kap. 3.7.4). Lagen alle ermittelten Abstände innerhalb der Toleranz (links), wurde dieses in Form eines schwarzen Balkens dargestellt. Die absolute Anzahl der Schnappschüsse mit 'bindungsaktiver' Konformation ist jeweils rechts oben angegeben. Unabhängig von der Toleranzgrenze tastet LckSH3_P17G im gleichen Zeitraum die 'bindungsaktive' Konformation ungefähr doppelt so oft ab wie der Wildtyp.

4.2.8 Bestimmung der thermodynamischen Stabilität mittels CD-Spektroskopie

Nachdem bisher die strukturellen und dynamischen Eigenschaften der LckSH3 und LckSH3_P17G im Gleichgewichtszustand analysiert wurden, stellte sich die Frage, ob sich die beiden SH3-Domänen auch hinsichtlich ihrer Nichtgleichgewichtseigenschaften unterscheiden. Hierzu wurde die thermodynamische Stabilität des LckSH3-Wildtyps und der LckSH3_P17G-Mutante anhand von CD-Schmelzkurven untersucht (Kap. 3.4.3). Dies sollte Aufschluss über einen möglichen Einfluss der P17G-Mutation auf die Gesamtproteininstabilität liefern (Abb. 4.15).

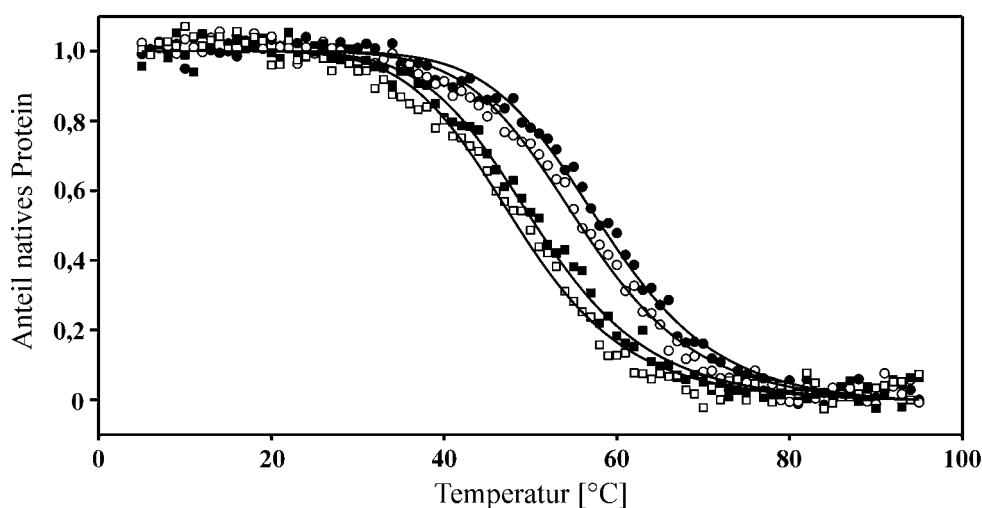


Abb. 4.15 Untersuchung der thermischen Stabilität von LckSH3 (Kreise) und LckSH3_P17G (Quadrate) mittels Fern-UV CD-Spektroskopie. Es sind sowohl die Aufheiz- (gefüllte Symbole) als auch die Abkühlkurven (offene Symbole) bei 222 nm dargestellt. Die Mittelpunktstemperatur (T_M) der Übergänge konnte auf $55,8 \pm 0,6$ °C für LckSH3 und auf $46,3 \pm 1,7$ °C für LckSH3_P17G bestimmt werden (Kap. 3.4.3). Die Messung erfolgte in einer 1-cm-Quarzküvette bei Proteinkonzentrationen von 10 μ M, 50 mM K-Phosphat, pH 6,4.

Die CD-Schmelzkurven beider SH3-Domänen zeigen ein für Eindomänenproteine typisches kooperatives Verhalten beim Entfaltungsübergang. Dieses wird auch durch die Überlagerungen der CD-Spektren vor und nach dem thermischen Übergang deutlich, die nur marginale Unterschiede aufweisen (Abb. 4.16).

Die Mittelpunktstemperatur (T_M) der Übergänge beträgt $55,8 \pm 0,6$ °C für LckSH3 und $46,3 \pm 1,7$ °C für LckSH3_P17G (Kap. 3.4.3). Aus der Steigung der Auftragung von $\ln K_N$ als Funktion von $1/T$ bei $\ln K_N = 0$ konnte die Stabilisierungsenthalpie ΔH_N und die freie Enthalpie der Stabilisierung ΔG_N sowie die Stabilisierungsentropie ΔS_N bestimmt werden (Kap. 3.4.3). Die Extrapolation auf 25 °C ergibt $\Delta G_N^{25^\circ\text{C}}$. Somit konnte die freie Enthalpie

der Stabilisierung bei 25 °C ($\Delta G_N^{25^\circ\text{C}}$) für LckSH3 auf $-12,09 \pm 0,63$ kJ/mol und für LckSH3_P17G auf $-8,40 \pm 0,76$ kJ/mol bestimmt werden. Daraus ergibt sich eine Destabilisierung der SH3-Domäne durch den Prolin-zu-Glycin-Austausch ($\Delta\Delta G_N^{25^\circ\text{C}}$) von $3,69 \pm 1,39$ kJ/mol.

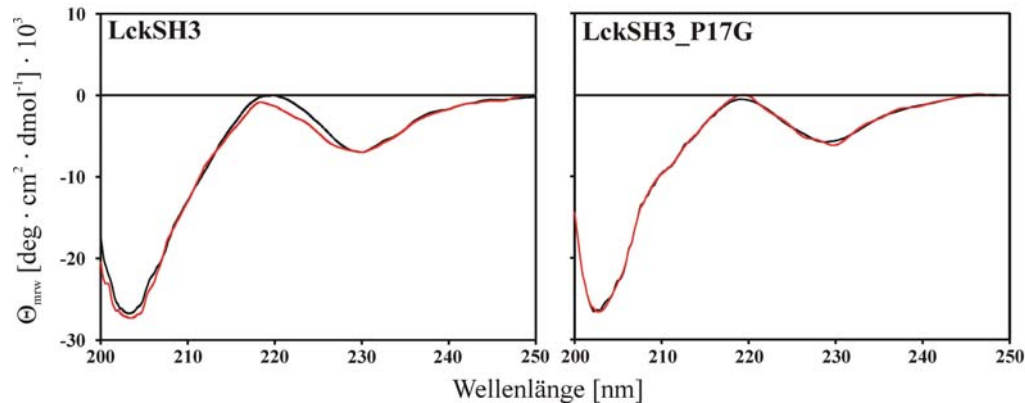


Abb. 4.16 CD-Spektren der LckSH3 (links) und LckSH3_P17G (rechts) vor der thermischen Entfaltung (schwarz) und nach Rückfaltung (rot). Die Spektren wurden bei einer Proteinkonzentration von 10 μM , 50 mM K-Phosphat, pH 6,4, 20 °C in einer 1-cm-Quarzküvette zwischen 200 und 250 nm aufgenommen. Die Messwerte wurden bei einer Abtastgeschwindigkeit von 20 nm/min durch achtfache Akkumulation erhalten.

4.2.9 Simulation der thermischen Entfaltung

Die Bestimmung der thermischen Stabilität der LckSH3 und LckSH3_P17G ergaben einen signifikanten Unterschied der freien Enthalpie der Stabilisierung bei 25 °C ($\Delta\Delta G_N^{25^\circ\text{C}}$) von $3,69 \pm 1,39$ kJ/mol (Kap. 4.2.8). Dieser Unterschied schlägt sich in einer um zirka 9 °C niedrigeren Übergangstemperatur (T_M) der P17G-Mutante der LckSH3 nieder. Neben der Frage der Auswirkungen der Mutation auf die Dynamik der SH3-Domäne (Kap. 4.2.4, 4.2.5 und 4.2.7), stellte sich somit auch die Frage nach möglichen Auswirkungen auf den Entfaltungsprozess.

Die Entfaltung der LckSH3 und LckSH3_P17G wurde ausgehend von den jeweils sechs Startstrukturen, die schon für die freie MD-Simulation verwendet wurden (Kap. 4.2.7), durchgeführt (Kap. 3.8.2). Insgesamt wurden so 12 Simulationen mit einer Gesamtsimulationszeit von 114 ns (zirka 36 000 h Prozessorzeit) durchgeführt. Wie bei zahlreichen anderen simulierten Entfaltungsstudien (Lazaridis & Karplus, 1997; Gsponer & Caflisch, 2001) wurde der Anteil nativer Kontakte Q als Beobachtungsvariable für die Beurteilung des Systems herangezogen. Als nativer Kontakt wurde ein C^α - C^α -Abstand zweier Aminosäuren kleiner als 6,5 Å identifiziert, wenn er in über 75 %

der Schnappschüsse der jeweiligen Kontrollsimulation bei 300 K erfüllt war (Kap. 4.2.7). Die Simulationen der Entfaltung wurden beendet, wenn die Anzahl nativer Kontakte über einen Zeitraum von 15 ps unter 10 % ($Q < 0,1$) abfielen. Nachfolgend wurde die Reihenfolge der Entfaltungsprozesse ausgewertet. Dabei wurden jedem C^α - C^α -Abstand der Kontaktkarte der Q -Wert zugeordnet, den das System aufwies, als der entsprechende Kontakt verloren ging. Somit weisen die Kontakten, die als erstes verloren gingen ein hoher Q -Wert (z.B. $Q = 0,95$) und die, die erst sehr spät verloren gingen ein kleiner Q -Wert (z.B. $Q = 0,15$) auf. Die Differenz der erhaltenen Kontaktkarten der LckSH3 und LckSH3_P17G ist in Abb. 4.17 dargestellt.

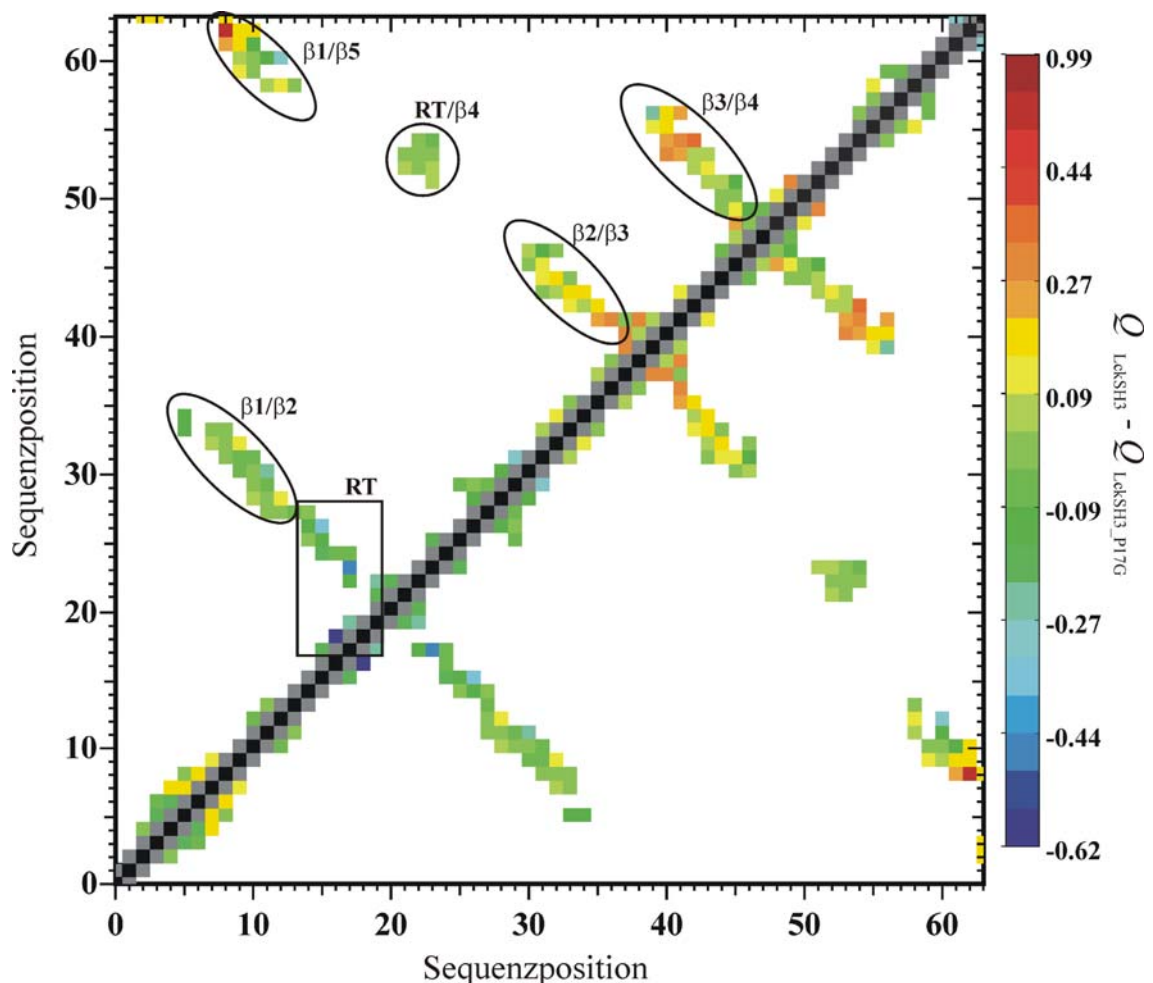
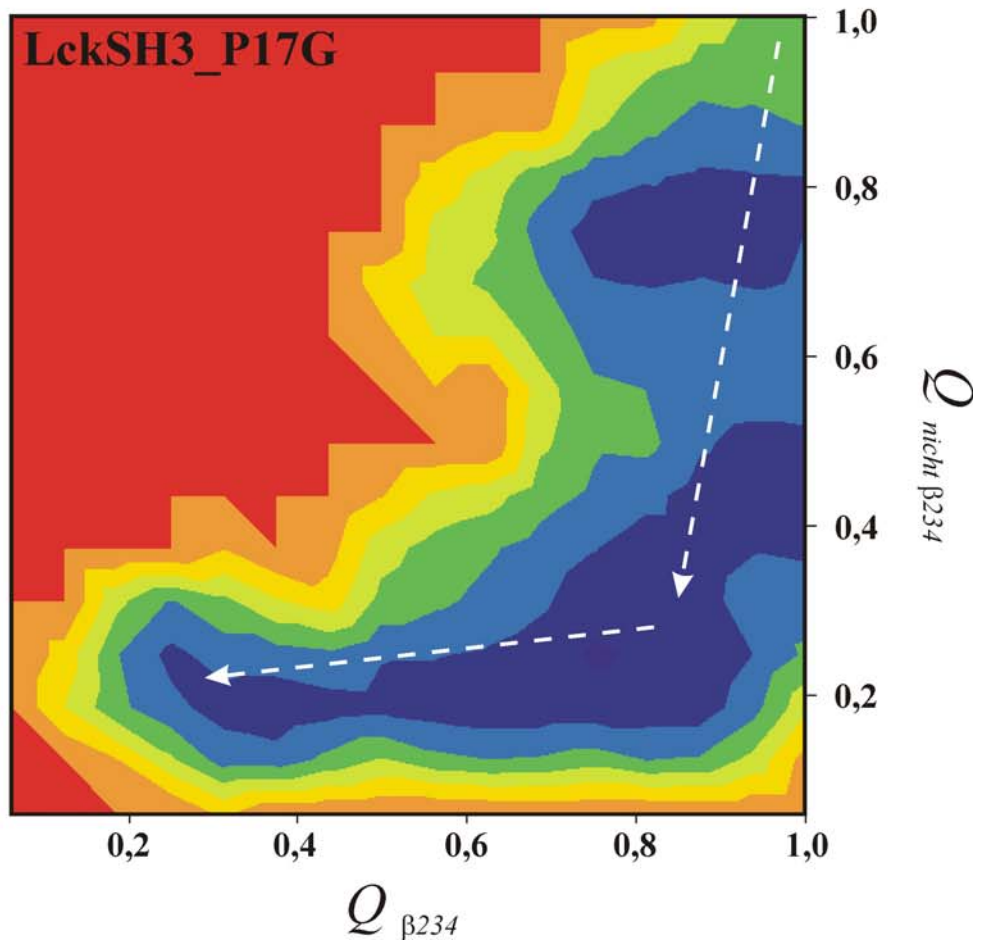
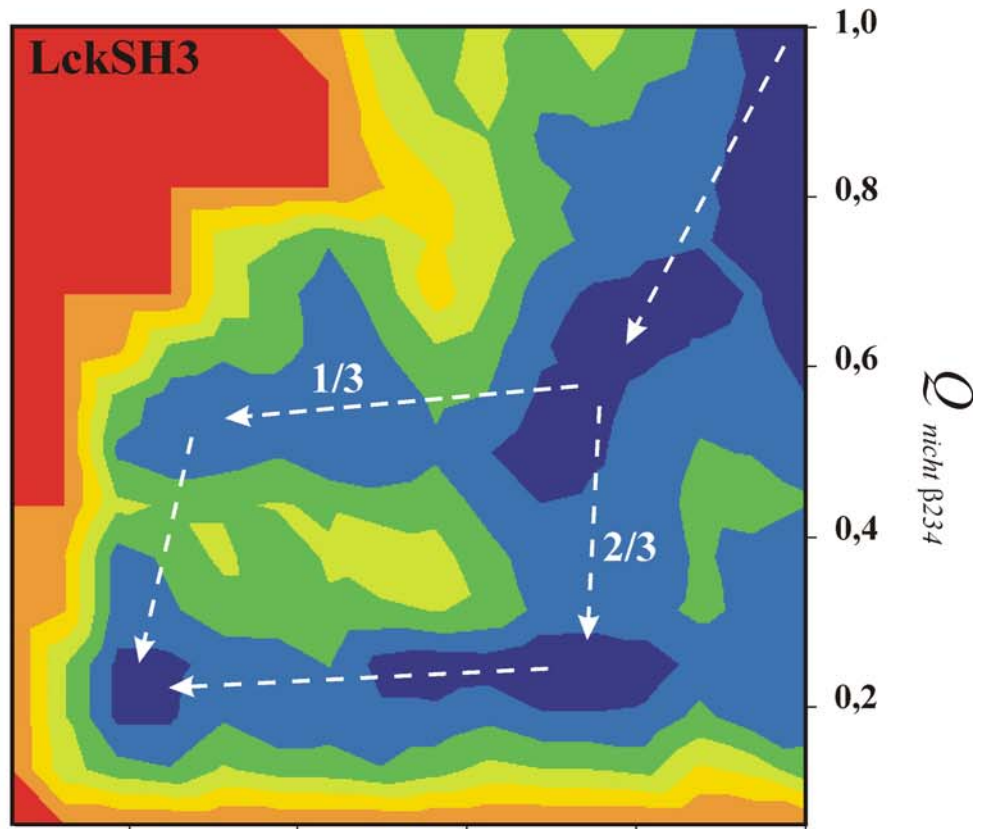
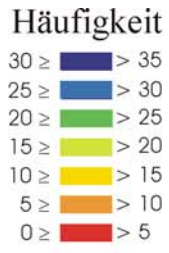


Abb. 4.17 Kontaktverlustkarte der LckSH3 und LckSH3_P17G koloriert nach der Differenz der zugehörigen Q -Werte. Ein C^α - C^α -Kontakt wurde als nativ identifiziert, wenn er in einer 1-ns-Kontroll-MD-Simulation in mehr als 75 % der Schnappschüsse erfüllt war. Die Zeitpunkte des ersten Verschwindens der Kontakte wurden als Funktion von Q über jeweils sechs MD-Simulationen gemittelt. Die Differenz der Q -Werte gibt an, ob der entsprechende Kontakt in der LckSH3_P17G früher (negativer Wert; blau) oder später (positiver Wert; rot) verglichen zum Wildtyp verloren geht. Die Kontakte der regulären Sekundärstrukturen und der RT-Schleife sind entsprechend gekennzeichnet.

Aus Abb. 4.17 ist ersichtlich, dass die Kontakte der Reste der RT-Schleife durch die P17G-Mutation schneller verloren gehen, als dieses im Wildtyp der Fall ist. Besonders gilt dies für die Kontakte E16/S18, P17G/L23 und Y15/E26. Außerdem ist zu erkennen, dass die Kontakte zwischen den Faltblattsträngen $\beta 2$ und $\beta 3$, $\beta 3$ und $\beta 4$ sowie $\beta 1$ und $\beta 5$ oft zu einem deutlich späteren Zeitpunkt aufbrechen. Die Kontakte zwischen den Faltblattsträngen $\beta 1$ und $\beta 2$ sowie zwischen der RT-Schleife und $\beta 4$ gehen in beiden Fällen zu etwa identischen Zeitpunkten verloren. Zusammenfassend lässt sich aus der Darstellung ableiten, dass im Gegensatz zum LckSH3-Wildtyp bei der P17G-Mutante das zentrale Faltblatt, bestehend aus den Faltblattsträngen $\beta 2$, $\beta 3$ und $\beta 4$ erst die Integrität verliert, nachdem alle sonstigen nativen Kontakte nicht mehr bestehen.

Um diese Beobachtung näher zu analysieren, wurde der bevorzugte Entfaltungsweg der beiden SH3-Domänen betrachtet. Dazu wurden die nativen Kontakte der SH3-Domänen in zwei Untersysteme eingeteilt, für die die Q -Werte separat ermittelt wurden (Kap. 3.8.3). Zum einen waren dies die Kontakte zwischen den Faltblattsträngen $\beta 2$, $\beta 3$ und $\beta 4$ ($Q_{\beta 234}$) und zum anderen die zwischen den Faltblattsträngen $\beta 1$ und $\beta 2$, $\beta 1$ und $\beta 5$ sowie die Kontakte innerhalb der RT-Schleife und zwischen der RT-Schleife und $\beta 4$ der SH3-Domänen ($Q_{\text{nicht } \beta 234}$). Der zeitliche Verlauf wurde über jeweils sechs Entfaltungs-MD-Simulationen summiert und in der $Q_{\beta 234}$, $Q_{\text{nicht } \beta 234}$ -Ebene in Abb. 4.18 aufgetragen. Dabei geben die Bereiche, die mit großer Häufigkeit populiert werden den bevorzugten Entfaltungsweg wieder.

Abb. 4.18 Auftragung der Erscheinungshäufigkeiten entlang der $Q_{\beta 234}$, $Q_{\text{nicht } \beta 234}$ -Ebene der Entfaltungs-MD-Simulationen der LckSH3 und LckSH3_P17G. Der zeitliche Verlauf der Entfaltungsereignisse wurde anhand der Q -Werte für das zentrale Faltblatt ($Q_{\beta 234}$) und der restlichen nativen Kontakte der SH3-Domänen ($Q_{\text{nicht } \beta 234}$) verfolgt und die Erscheinungshäufigkeiten der einzelnen $Q_{\beta 234}$, $Q_{\text{nicht } \beta 234}$ -Wertepaare über jeweils sechs MD-Simulationen summiert. Die Regionen mit den höchsten Erscheinungshäufigkeiten geben die statistisch bevorzugten Entfaltungswege wieder. Während bei LckSH3_P17G nur der Entfaltungsweg über ein fast vollständig intaktes zentrales Faltblatt als Faltungsimmediat bevorzugt wird, ist bei LckSH3 ein alternativer Entfaltungsweg zu erkennen (gestrichelte Pfeile).



Zu Beginn der Simulationen sind alle nativen Kontakte erfüllt ($Q_{\beta 234} = Q_{\text{nicht } \beta 234} = 1,0$). Für die LckSH3_P17G ist zu erkennen, dass gleichzeitig für $Q_{\beta 234}$ und $Q_{\text{nicht } \beta 234}$ der Anteil nativer Kontakte auf 80 % abfällt ($Q_{\beta 234} = Q_{\text{nicht } \beta 234} = 0,8$). Im weiteren Verlauf bleibt $Q_{\beta 234}$ konstant während $Q_{\text{nicht } \beta 234}$ sukzessive auf zirka 0,2 sinkt. Erst wenn nur noch 20 % der nativen Kontakte der restliche SH3-Domäne intakt sind, beginnt das zentrale Faltblatt seine Integrität zu verlieren. Die Ausbildung eines Faltungs- beziehungsweise Entfaltungsintermediats, bestehend aus dem zentralen Faltblatt, ist in der Vergangenheit für eine Vielzahl von SH3-Domänen gezeigt worden (Martinez *et al.*, 1998; Martinez & Serrano, 1999; Riddle *et al.*, 1999; Northey *et al.*, 2002; Ollerenshaw *et al.*, 2004; Korzhnev *et al.*, 2004). Aus den Häufigkeitsverteilungen der $Q_{\beta 234}$, $Q_{\text{nicht } \beta 234}$ -Wertepaare für den LckSH3-Wildtyp sind im Gegensatz zur P17G-Mutante zwei Entfaltungswege mit einer Wahrscheinlichkeit von 1/3 zu 2/3 zu erkennen. Neben dem schon für die LckSH3_P17G identifizierten Entfaltungsweg über das zentrale Faltblatt ist hier noch ein weiterer Weg erkennbar. Bei zirka 50 bis 60 % erhaltener nativer Kontakte außerhalb des zentralen Faltblatts verliert diese seine Integrität. Analysen der entsprechenden Trajektorien ergaben, dass in diesen Fällen der Kontakt zwischen den Faltblattsträngen $\beta 1$ und $\beta 2$ erhalten bleibt und erst als letztes verloren geht (Abb. 4.19).

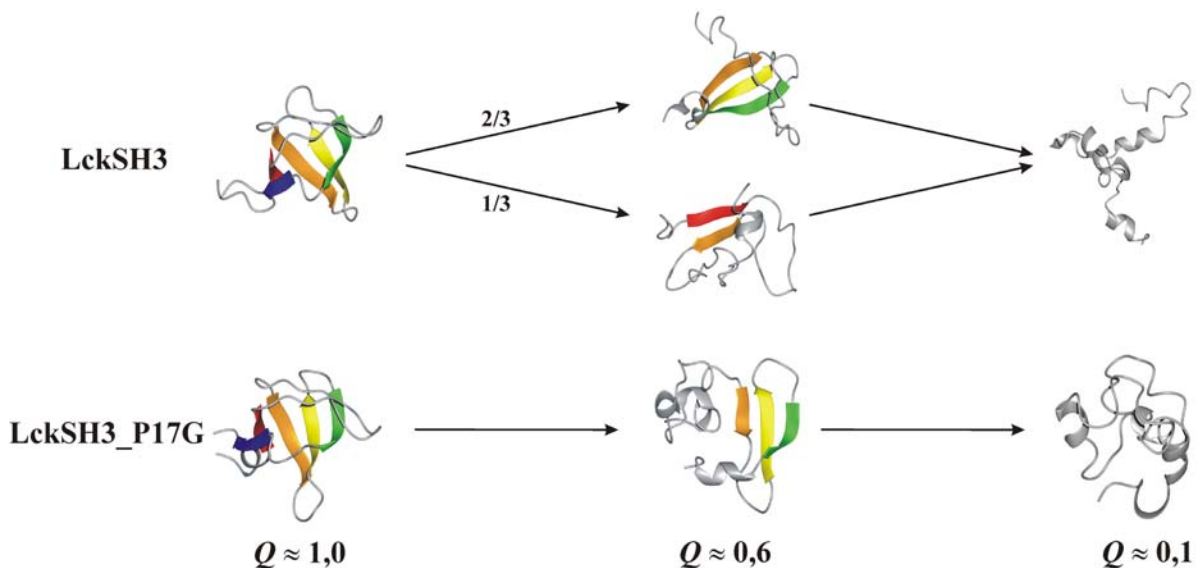


Abb. 4.19 Schematische Darstellung der Entfaltungswege der LckSH3 und LckSH3_P17G.

Die LckSH3_P17G zeigt den klassischen Entfaltungsweg vieler SH3-Domänen mit dem zentralen Faltblatt ($\beta 234$) als Faltungsintermediat. Im Gegensatz dazu kann die Entfaltung der LckSH3 auf zwei verschiedenen Wegen erfolgen. Einerseits ebenfalls über das zentrale Faltblatt aber auch über das Faltblatt $\beta 1/\beta 2$ als Faltungsintermediat. Die Faltblattstränge sind von rot nach blau entsprechend ihrer Reihenfolge $\beta 1$ - $\beta 5$ eingefärbt. Die Abbildung wurde mit Molmol erstellt (Koradi *et al.*, 1996).

4.3 Strukturbestimmung der LynSH3

4.3.1 Initiale NMR-spektroskopische Charakterisierung der LynSH3

Das 1D ^1H -NMR-Spektrum der LynSH3 (Abb. 4.20) zeigt eine gute Dispersion der chemischen Verschiebungen im Amidprotonenbereich (7 bis 10 ppm), die typisch für Proteine mit hohem β -Faltblattanteil ist. Weiterhin sind die scharfen Resonanzen der beiden $\text{H}^{\epsilon 1}$ -Protonen vom W44 und W45 bei 10,01 und 9,95 ppm deutlich zu erkennen. Zusätzlich ist die ebenfalls gute Dispersion der hochfeldverschobenen Methylgruppenresonanzen der Aminosäuren Isoleucin, Leucin und Valin im Bereich zwischen 0 und 1 ppm ersichtlich.

Wegen der guten Dispersion wurde für eine schnelle Zuordnung der Rückgratresonanzen ein teilweise automatisiertes Verfahren auf der Basis von (^1H , ^{13}C , ^{15}N) Tripelresonanzexperimenten verwendet (Kap. 3.5.2).

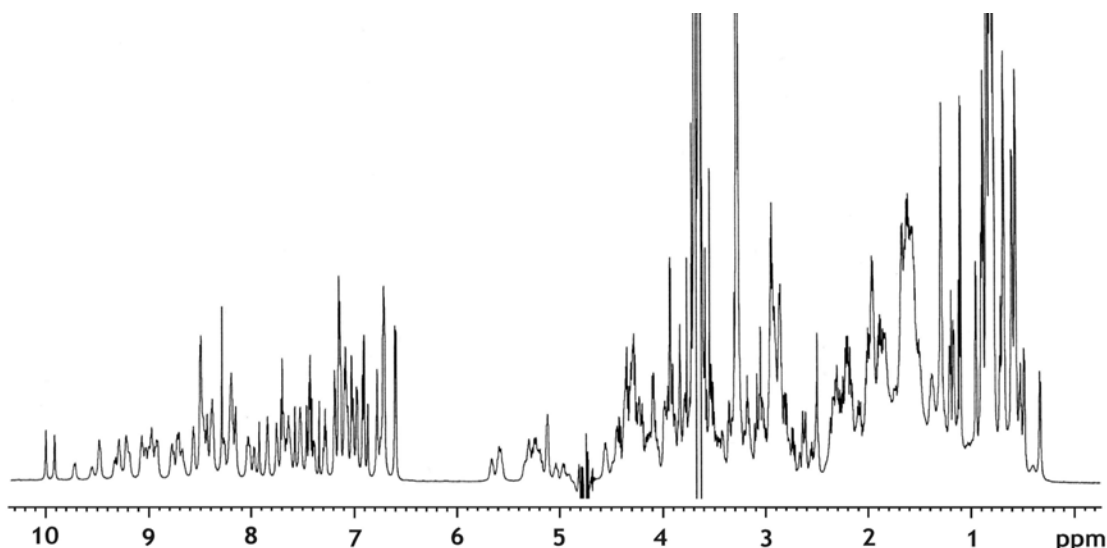


Abb. 4.20 1D ^1H -NMR-Spektrum von LynSH3 (1,6 mM in 100 mM K-Phosphat, 50 mM NaCl, pH 6,4; aufgenommen bei 800 MHz, 298 K). Das Spektrum weist eine, für β -Faltblattproteine typische, gute Dispersion der Signale auf. Die scharfen Resonanzen der beiden $\text{H}^{\epsilon 1}$ -Protonen vom W44 und W45 bei 10,01 und 9,95 ppm sind deutlich zu erkennen. Ebenfalls gut ist die Dispersion der hochfeldverschobenen Methylgruppenresonanzen im Bereich zwischen 0 und 1 ppm.

4.3.2 Identifizierung der Spinsysteme und sequenzspezifische Zuordnung der Resonanzen

Im ersten Schritt der sequenzspezifischen Zuordnung der Resonanzen wurden jeder $\text{H}^{\text{N}}(i)$, $\text{N}(i)$ Kreuzresonanz des ^1H , ^{15}N -HSQC-Spektrums (Abb. 4.21) die entsprechenden $\text{C}^{\alpha}(i)$ und $\text{C}^{\beta}(i)$ sowie die $\text{C}^{\alpha}(i-1)$ und $\text{C}^{\beta}(i-1)$ Resonanzen aus den HNCACB- und CBCA(CO)NH-Spektren (Kap. 3.5.2) zugeordnet.

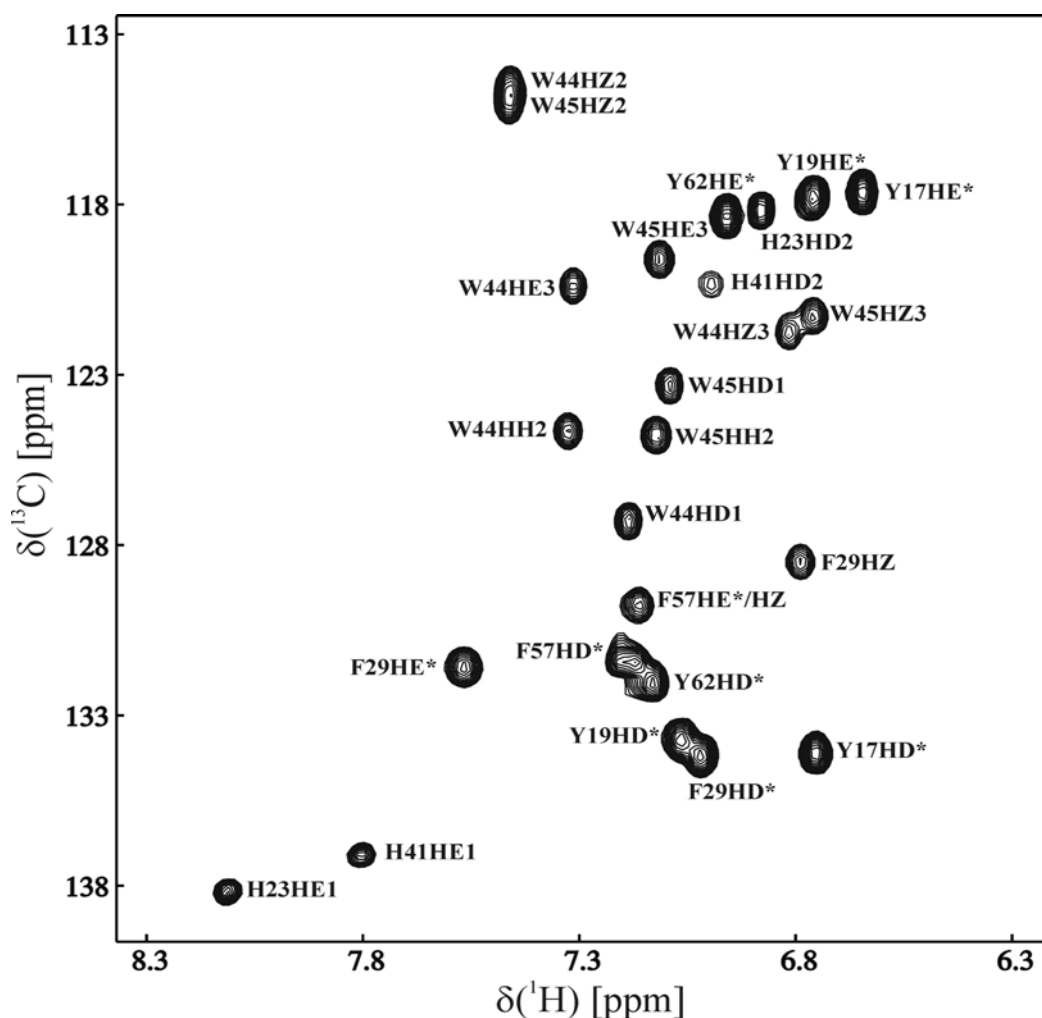


Abb. 4.22 Ausschnitt des Aromatenbereichs aus den 2D ^1H , ^{13}C -HSQC-Spektrum der LynSH3 (1,6 mM in 100 mM K-Phosphat, 50 mM NaCl, 10 % D_2O , pH 6,4; aufgenommen bei 700 MHz, 298 K). Der erste Buchstabe der Beschriftung entspricht der Einbuchstabenabkürzung der entsprechenden Aminosäure gefolgt von der entsprechenden Sequenzposition und der jeweiligen Atombezeichnung.

Die Vervollständigung der verbleibenden Resonanzen der aliphatischen Seitenketten der einzelnen Spinsysteme wurde durch die Auswertung der (H)CC(CO)NH- und H(C)CH-TOCSY-Spektren (Kap. 3.5.2) erzielt. Für die Zuordnung der aromatischen Seitenketten wurden CCH-TOCSY-, ^{13}C -NOESY-HSQC- und ^1H , ^{13}C -HSQC-Spektren (Abb. 4.22) herangezogen (Kap. 3.5.2). Auf diese Weise konnten alle Resonanzen der LynSH3 zugeordnet werden, mit Ausnahme der Resonanz der H^{N} -Protonen von G1. Da es sich hierbei um die schnell mit dem Lösungsmittel austauschende Aminogruppe des Aminoterminus handelt, ist eine entsprechende Resonanz in den Spektren nicht sichtbar. Die getroffene Zuordnung ist in der *BioMagResBank* (BMRB) unter der Kennung 6261 hinterlegt und im Anhang 10.3 abgedruckt.

4.3.3 Bestimmung des heteronuklearen $\{^1\text{H}\}^{15}\text{N}$ -NOEs

Um die Flexibilität der LynSH3 auf einer ps-ns-Zeitskala bestimmen zu können, wurde der heteronukleare $\{^1\text{H}\}^{15}\text{N}$ -NOE bei 600 MHz gemessen (Kap. 3.5.9). Die Auswertung des heteronuklearen $\{^1\text{H}\}^{15}\text{N}$ -NOEs zeigt deutlich die hohe Flexibilität des COOH- und NH_2 -Terminus an (Abb. 4.34). I22 ($0,53 \pm 0,03$) und H23 ($0,67 \pm 0,03$) der RT-Schleife sowie H41 ($0,62 \pm 0,03$), G42 ($0,52 \pm 0,03$) und E43 ($0,66 \pm 0,03$) der n-Src-Schleife weisen ebenfalls eine erhöhte Flexibilität auf. Die dritte Schleife, die distale Schleife der LynSH3 ist im Gegensatz zu den ersten beiden Schleifen mit Werten zwischen $0,72 \pm 0,04$ und $0,775 \pm 0,04$ ebenso starr wie die Abschnitte regulärer Sekundärstruktur. Somit erreichen die Werte der in den β -Faltblattbereichen befindlichen Amidgruppen fast den theoretischen Wert von 0,83 (Kay *et al.*, 1989) für eine vollkommen starre Amidgruppe in einem ideal kugelförmigen Protein bei einer Protonenfrequenz von 600 MHz.

4.3.4 Einschränkung der dihedralen Winkel aus $^3J(\text{H}^{\text{N}}, \text{H}^{\alpha})$ -Kopplungskonstanten

Auf der Grundlage des HNHA-Experiments (Kap. 3.5.5) lassen sich die $^3J(\text{H}^{\text{N}}, \text{H}^{\alpha})$ -Kopplungskonstanten ermitteln. Diese können entsprechend der Karplus-Beziehung (Karplus, 1954; Pardi *et al.*, 1984) in Beschränkungen der Diederwinkel ϕ des Rückgrats übersetzt werden (Kap. 3.5.5). Für helikale Bereiche werden auf diese Weise in der Regel Werte kleiner als 6 Hz, für Faltblattbereiche Werte größer 8 Hz beobachtet. Aus dem HNHA-Spektrum konnten wegen Signalüberlappung und unter Ausschluss der Aminosäuren Prolin und Glycin 55 $^3J(\text{H}^{\text{N}}, \text{H}^{\alpha})$ -Kopplungskonstanten bestimmt werden. Da nur Kopplungskonstanten kleiner 6 Hz und größer 8 Hz eindeutige Strukturinformationen enthalten, konnten nur 22 Beschränkungen der ϕ -Winkel für die Strukturberechnung herangezogen werden (Anhang 10.5).

4.3.5 Identifizierung von Wasserstoffbrücken aus skalaren $^3J(\text{N}(i), \text{C}'(j))$ -Kopplungen

Die Bestimmung von skalaren $^3J(\text{N}(i), \text{C}'(j))$ -Kopplungen aus einem weitreichenden HNCO-Experiment (lr-HNCO) (Kap. 3.5.6) eröffnet die Möglichkeit die Bindungspartner einer Wasserstoffbrücke direkt zu ermitteln (Cordier & Grzesiek, 1999; Cornilescu *et al.*, 1999). Im Gegensatz zur Identifizierung von Wasserstoffbrücken über langsam austauschenden Amidprotonen (Kap. 4.3.5) müssen somit die Akzeptoren der Wasserstoffbrücke nicht erst aus iterativen Strukturberechnungen abgeleitet werden, sondern werden direkt ermittelt. Beobachtet wird dabei eine elektronenvermittelte

Kopplung zwischen dem Amidstickstoff und dem an der Wasserstoffbrücke beteiligten Carbonylkohlenstoff. Überlagert man ein HNCO mit einem Ir-HNCO (Abb. 4.23), so erhält man zusätzliche Resonanzen, die zum einen auf skalare ${}^3J(\text{N}(i), \text{C}'(j))$ - (Wasserstoffbrücken), ${}^2J(\text{N}(i), \text{C}'(i))$ - sowie ${}^1J(\text{N}(i), \text{C}'(i-1))$ -Kopplungen, die nicht vollständig unterdrückt wurden, zurückgeführt werden können. Auf diese Weise konnten 14 Wasserstoffbrücken eindeutig identifiziert werden (Anhang 10.5).

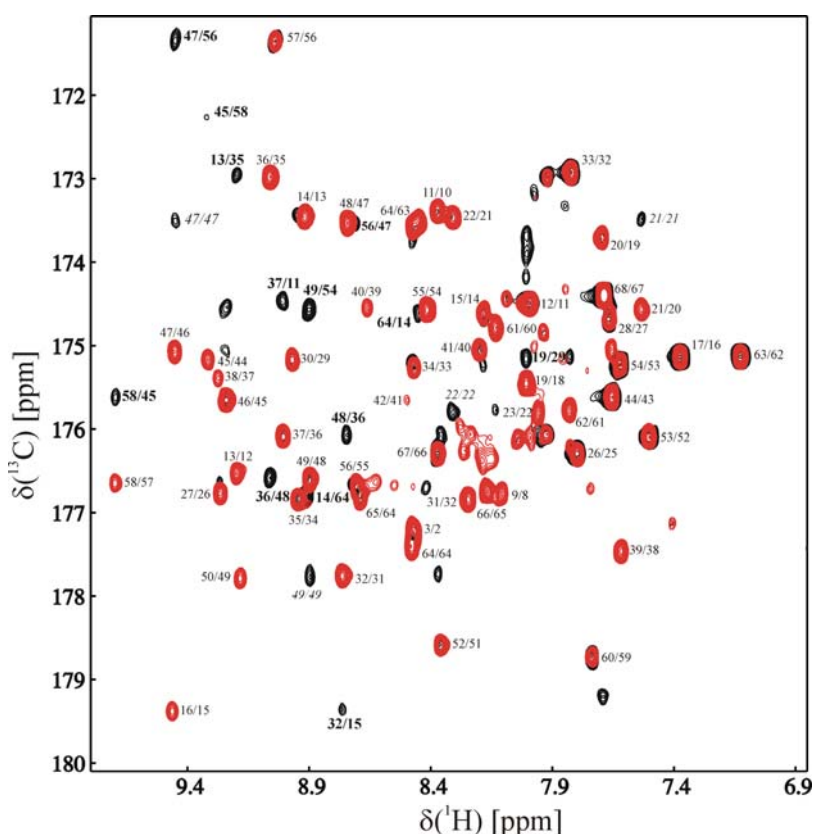


Abb. 4.23 Überlagerung der HNCO- (rot) und Ir-HNCO-Spektren (schwarz) der LynSH3 zur Identifizierung des Kohärenztransfers über Wasserstoffbrücken (Proteinkonzentration 1,6 mM, 100 mM K-Phosphat, 50 mM NaCl pH 6,4 bei 800 MHz und 298 K). Resonanzen durch den schwachen Kohärenztransfer über die skalare ${}^3J(\text{N}(i), \text{C}'(j))$ -Kopplung sind mit den entsprechenden Sequenzpositionen versehen und durch Fettdruck hervorgehoben. Die ${}^1J(\text{N}(i), \text{C}'(i-1))$ -Resonanzen (rot) sind mit den jeweiligen Sequenzpositionen gekennzeichnet. ${}^2J(\text{N}(i), \text{C}'(i))$ -Kopplungen sind kursiv beschriftet.

4.3.6 Identifizierung von langsam austauschenden Amidresonanzen

Zur Identifizierung langsam austauschender Amidresonanzen wurden ${}^1\text{H}, {}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren einer nach Gefriertrocknung in D_2O gelösten ${}^{15}\text{N}$ -markierten Probe in kurzer Folge hintereinander aufgenommen (Abb. 4.21). In den Spektren konnten zu Beginn 26 Resonanzen von Amidren identifiziert werden, darunter alle

14 Amidresonanzen, die nachweislich skalare ${}^3J(\text{N}(i), \text{C}'(j))$ -Kopplungen über Wasserstoffbrücken zeigen. Für drei weitere langsam austauschende Amidresonanzen konnte während iterativer Runden der Strukturberechnung der Akzeptor eindeutig identifiziert werden (Anhang 10.5).

4.3.7 Abstandsbeschränkungen aus NOE-Kreuzresonanzen

Die Abstandsbeschränkungen für die Berechnung der Tertiärstruktur der LynSH3 wurden in mehreren iterativen Runden aus NOESY-Experimenten gewonnen. Auf dem Kern-Overhauser-Effekt beruhend, können in NOESY-Spektren dipolare Wechselwirkungen räumlich naher Protonen beobachtet werden. Die Intensitäten dieser Wechselwirkungen sind näherungsweise proportional zu $1/r^6$, wobei r den Abstand der jeweiligen Protonen wiedergibt. Aufgrund dieser Korrelation ist es möglich, von den Intensitäten der Resonanzen auf die maximalen Abstände der beteiligten Protonen zu schließen. Um eventuell auftretende Überlagerungen zu vermeiden, wurden heteronuklear editierte NOESY-Experimente als 3D- beziehungsweise 4D-Datensätze aufgenommen. In diesen Fällen werden die Protonenresonanzen zusätzlich entlang der ${}^{13}\text{C}$ - und/oder ${}^{15}\text{N}$ -Dimension (3D beziehungsweise 4D) der kovalent an die Protonen gebundenen Kerne entzerrt. Im vorliegenden Fall wurden folgende NOESY-Experimente zur Auswertung herangezogen: 3D- ${}^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC, 3D- ${}^{13}\text{C}$ -NOESY-HSQC sowie 4D- ${}^{13}\text{C}$ -HMQC-NOESY- ${}^{15}\text{N}$ -HSQC und 4D- ${}^{13}\text{C}$ -HMQC-NOESY- ${}^{13}\text{C}$ -HSQC (Kap. 3.5.2). Durch die Auswertung dieser Spektren war es möglich, 638 Abstandsbeschränkungen eindeutig zuzuordnen. Davon entfallen 17 Abstandsbeschränkungen auf intraresiduale Kreuzresonanzen. Die Zahl der interresidualen Kreuzresonanzen setzt sich aus 222 sequenziellen, 83 mittelweitreichenden und 316 weitreichenden Abstandsinformationen zusammen (Tab. 4.2; Anhang 10.5).

4.3.8 Beschränkungen durch residuale dipolare Kopplungen

Die Beobachtung von residualen dipolaren Kopplungen in *Pfl*-Phagen-Suspension wurde durch die Auswertung J -modulierter HSQC-Spektren erzielt (Kap. 3.5.7). Für die Strukturberechnung wurden lediglich die Kopplungskonstanten der Aminosäuren mit einem Wert für den heteronuklearen $\{^1\text{H}\} {}^{15}\text{N}$ -NOE (Kap. 4.3.3) größer als 0,65 sowie die Aminosäuren, deren verwendeten Kreuzresonanzen keine Überlagerungen mit anderen Kreuzresonanzen aufwiesen herangezogen. Somit wurden 47 D_{NHN} - und 40 $D_{\text{C}\alpha\text{H}\alpha}$ -Kopplungskonstanten für die Berechnung der Tertiärstruktur ausgewählt (Anhang 10.5).

Die für die Strukturberechnung benötigten Werte für die Anisotropie D_a und Rhombizität R des Vorzugsorientierungstensors D wurden aus den Extremwerten $D_{\text{NHN (V63)}} = -22,44 \text{ Hz} = 2 D_a$ und $D_{\text{NHN (A47)}} = 18,56 \text{ Hz} = -D_a(1+3/2 R)$ zu $D_a = -11,22 \text{ Hz}$ und $R = 0,44 \text{ Hz}$ geschätzt (Kap. 3.6.3).

4.3.9 Berechnung der Tertiärstruktur der LynSH3

Die insgesamt 764 experimentellen Randbedingungen für die Aminosäuren Q9 bis T68 aus den Abschnitten 4.3.4 bis 4.3.8 dienten als Grundlage für die Strukturberechnung der LynSH3. Da aufgrund der Werte des heteronuklearen $\{^1\text{H}\}^{15}\text{N}$ -NOEs kleiner 0,2 für die Aminosäuren G1 bis E8 eine sehr hohe Flexibilität nachgewiesen werden konnte, wurde dieser Sequenzabschnitt nicht berücksichtigt. Bei der Berechnung der Tertiärstruktur wurde eine zweiphasige *Simulated-Annealing*-Strategie verwendet (Kap. 3.6.2 und 3.6.3). Im ersten Schritt wurden 120 Strukturen unter Verzicht auf 87 Randbedingungen aus dipolaren Kopplungskonstanten berechnet. Im zweiten Schritt wurden die 60 Strukturen mit den niedrigsten Werten der Zielfunktion E_{pot} aus dem ersten Schritt unter zusätzlicher Verwendung der Randbedingungen aus dipolaren Kopplungskonstanten verfeinert. Aus dem Ensemble der 60 verfeinerten Strukturen wurden die 20 Strukturen mit den niedrigsten Werten der Zielfunktion E_{pot} als konvergierende Strukturen akzeptiert (Abb. 4.24). Bei der akzeptierten Strukturenschar wurden keine der verwendeten Abstandsbeschränkungen um mehr als $0,13 \text{ \AA}$ verletzt sowie keine systematische Verletzung einer Abstandsbeschränkung um mehr als $0,12 \text{ \AA}$ beobachtet. Die Atomkoordinaten der 20 akzeptierten Strukturen wurde unter der Kennung 1W1F in der *Protein Data Bank* (PDB) hinterlegt. Eine Zusammenfassung der wichtigsten Strukturparameter findet sich in Tabelle 4.2. Die nachfolgende Analyse der Strukturen der LynSH3 bezieht sich auf die 'Kernstruktur' (Aminosäuren D11 bis L66) die sich durch Werte für den heteronuklearen $\{^1\text{H}\}^{15}\text{N}$ -NOE größer als 0,5 auszeichnet (Abb. 4.34). Dieser Bereich ist mit einer mittleren quadratischen Standardabweichung der Atomkoordinaten für das Rückgrat von $0,25 \text{ \AA}$ und für alle schweren Atome von $0,91 \text{ \AA}$ sehr gut definiert.

Kontrollrechnungen ohne residualen dipolaren Kopplungen ergeben eine mittlere quadratische Standardabweichung der Atomkoordinaten des Rückgrats von $0,35 \text{ \AA}$. Die Abweichung der jeweiligen gemittelten Strukturen von $0,61 \text{ \AA}$ zeigt, dass die Randbedingungen aus dipolaren Kopplungen die Rückgrattopologie, die aus den 'konventionellen' NMR Daten bestimmt wurden, bestätigen.

Tab. 4.2 Zusammenfassung der Strukturberechnung der LynSH3. Die Angaben stellen mit Ausnahme der experimentellen Randbedingungen die Mittelwerte und Standardabweichungen über die 20 akzeptierten Strukturen dar.

Für die Strukturberechnung der LynSH3 verwendete experimentelle Randbedingungen		
Abstandsbeschränkungen aus NOEs	insgesamt	638
intraresiduale NOEs		17
interresiduale NOEs	sequenziell	222
	mittelweitreichend	83
	weitreichend	316
Beschränkungen der Diederwinkel		22
Wasserstoffbrücken		17
dipolare Kopplungskonstanten	$D_{N\text{ HN}}$	47
	$D_{C\alpha\text{ H}\alpha}$	40
Statistik der Moleküldynamiksimulation		
Energien / (kcal/mol)	E_{pot}	43,9 ± 1,6
	E_{bonds}	1,6 ± 0,3
	E_{angles}	21,8 ± 0,9
	$E_{impropers}$	5,0 ± 0,4
	E_{vdw}	6,3 ± 1,0
	E_{NOE}	5,0 ± 0,5
	E_{cdih}	0,001 ± 0,003
	E_{sani}	4,1 ± 0,4
Standardabweichungen von den idealen Abständen / Å	Bindungslängen	0,00125 ± 0,0011
	Abstandsbeschränkungen	0,012 ± 0,001
Standardabweichungen von den idealen Winkeln / °	Bindungswinkel	0,282 ± 0,006
	Improperwinkel	0,347 ± 0,026
	Diederwinkelbeschränkungen	0,025 ± 0,060
Standardabweichungen von den idealen dipolaren Kopplungskonstanten / Hz	$D_{N\text{ HN}}$	0,144 ± 0,017
	$D_{C\alpha\text{ H}\alpha}$	0,278 ± 0,018
Atomare Standardabweichungen von der mittleren Struktur		
Kernstruktur ^a	Proteinrückgrat	Schwere Atome
	0,25 ± 0,08 Å	0,91 ± 0,11 Å

^a Aminosäuren 11 – 66

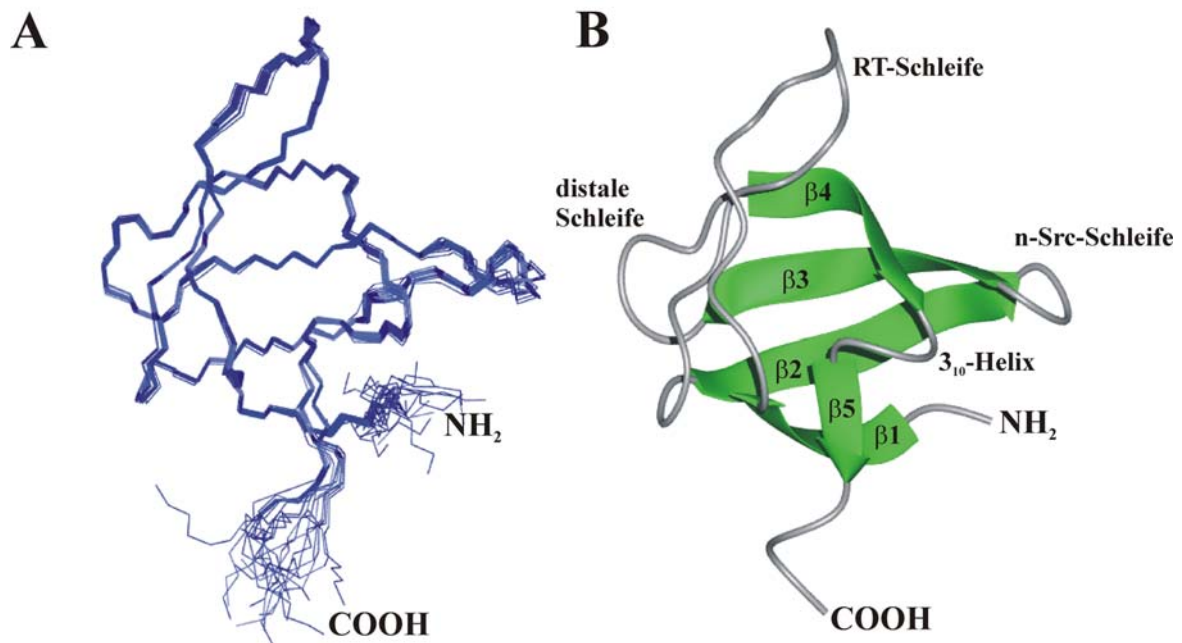


Abb. 4.24 Überlagerung des Proteinrückgrats der 20 akzeptierten Strukturen und schematische Darstellung der regulären Sekundärstrukturelemente anhand der Struktur mit dem niedrigsten Wert der Zielfunktion E_{pot} der LynSH3. (A) Dargestellt sind die Aminosäuren Q9 bis T68. Die Aminosäuren G1 bis E8 des NH_2 -Terminus wurden aufgrund des Fehlens experimenteller Randbedingungen nicht in die Strukturberechnung einbezogen. Mit Ausnahme der Reste Q9, G10 und L66 bis T68 des NH_2 - beziehungsweise COOH -Terminus, zeigen die berechneten 20 Strukturen eine sehr hohe Übereinstimmung. (B) Es sind fünf β -Faltblattstränge (D11-A15, K34-E40, W44-S49, K54-P59 und V63-K65) zu erkennen, die zwei anti-parallele dreisträngige Faltblätter bilden. Faltblatt 1 (β_5 , β_1 und β_2) steht dabei nahezu senkrecht auf Faltblatt 2 (β_2 , β_3 und β_4), wobei β_2 sowohl an Faltblatt 1 und 2 beteiligt ist. Die Faltblattstränge werden durch die RT- (zwischen β_1 und β_2), die n-Src- (zwischen β_2 und β_3) und die distale Schleife (zwischen β_3 und β_4) sowie eine 3_{10} -Helix (zwischen β_4 und β_5) verbunden. Die Abbildung wurde mit Molmol erstellt (Koradi *et al.*, 1996).

Mithilfe des Programms PROCHECK 3.4 (Laskowski *et al.*, 1996) wurden die regulären Sekundärstrukturelemente identifiziert. Diese sind in Abb. 4.24 B dargestellt. Gleichzeitig wurde eine Analyse der durch die Torsionswinkel ϕ und ψ charakterisierten Proteinrückgratkonformation erstellt (Abb. 4.25). Sie ergibt, dass 80,9 % der Aminosäuren sterisch besonders bevorzugte Konformationen einnehmen, obwohl auf die Verwendung eines Datenbankterms (Neudecker *et al.*, 2001) bei der Strukturberchnung verzichtet wurde. Weitere 17,0 % und 2,1 % der Aminosäuren nehmen ϕ / ψ -Winkelkombinationen ein, die sterisch begünstigt, beziehungsweise noch sterisch erlaubt sind.

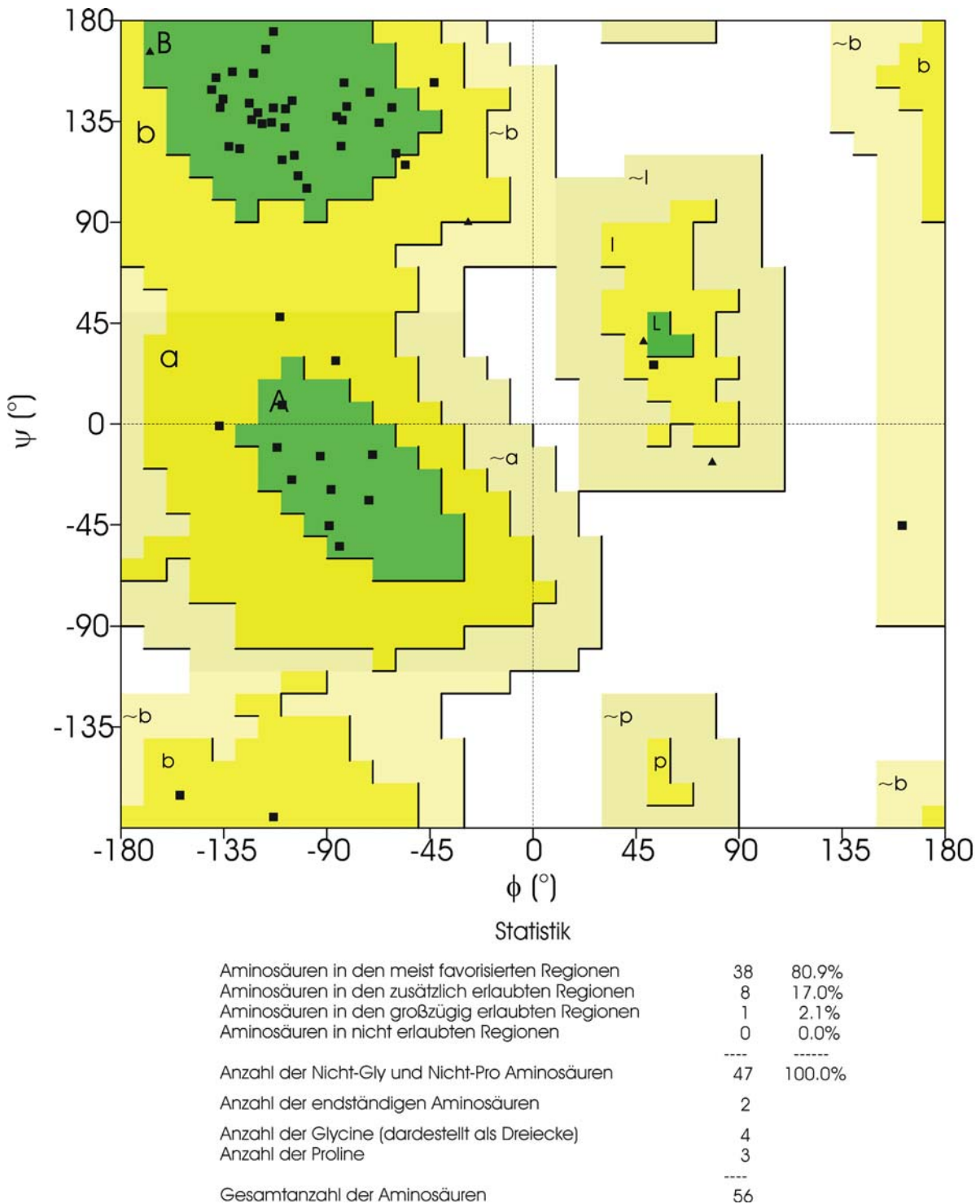


Abb. 4.25 Grafische Darstellung der ϕ/ψ Winkelkombinationen der Aminosäuren der LynSH3 nach Ramachandran. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde die Darstellung nur für die Struktur mit dem niedrigsten Wert der Zielfunktion E_{pot} dargestellt. Die in Strukturdatenbanken besonders häufig auftretenden Rückgratkonformationen sind grün eingefärbt. Die etwas selteneren Konformationen sind in gelb, die sehr seltenen blassgelb hinterlegt. In weiß sind die Regionen mit sterisch sehr ungünstigen Konformationen dargestellt (nicht erlaubte Regionen). Alle Aminosäuren der LynSH3 Struktur befinden sich in sterisch erlaubten Bereichen. Die Abbildung wurde mithilfe des Programms PROCHECK 3.4 (Laskowski *et al.*, 1996) erstellt.

Die Analyse der Verteilung der regulären Sekundärstrukturelemente ergibt, dass die LynSH3 aus fünf β -Faltblattsträngen aufgebaut ist. Diese bilden eine β -Fass-Struktur aus zwei antiparallelen dreisträngigen Faltblättern, die nahezu senkrecht aufeinander stehen (Abb. 4.24 B). Die Struktur beginnt am NH_2 -Terminus mit dem Faltblattstrang $\beta 1$ (D11 bis A15), der über die so genannte RT-Schleife mit dem Faltblattstrang $\beta 2$ (K34 bis E40) verbunden ist. Der Übergang von $\beta 1$ zur β -haarnadelähnlichen Struktur der RT-Schleife wird durch die Sequenz $^{15}\text{ALYPY}^{19}$ gebildet (Abb. 4.26 A). Diese Sequenz ist dem ALYDY Konsensus sehr ähnlich, der bei einer Vielzahl von SH3-Domänen konserviert ist (Masacchio, 2003) (Abb. 1.1). Nachdem der erste Teil von $\beta 2$ über Wasserstoffbrücken mit $\beta 1$ verbunden ist, knickt der zweite Teil von $\beta 2$ abrupt ab und bildet Wasserstoffbrücken mit $\beta 3$ (W44 bis S49) aus. Auf diese Weise ist $\beta 2$ sowohl Teil des Faltblattes 1, bestehend aus $\beta 5$ (V63 bis K65), $\beta 1$ und $\beta 2$, als auch Teil des Faltblattes 2, bestehend aus $\beta 2$, $\beta 3$ und $\beta 4$ (K54 bis P59). Die Faltblattstränge $\beta 2$ und $\beta 3$, sowie $\beta 3$ und $\beta 4$ werden durch die n-Src- beziehungsweise die distale Schleife verbunden. Das am stärksten unter SH3-Domänen konservierte Merkmal, das WW-Dipeptid (Masacchio, 2003), ist am Beginn von $\beta 3$ zu finden (Abb. 4.26 A). Ein ebenfalls unter SH3-Domänen weit verbreitetes Merkmal ist die PxxY-Konsensussequenz, die in der 3_{10} -Helix zwischen $\beta 4$ und $\beta 5$ zu finden ist. In den vorliegenden Strukturen nehmen die Reste $^{59}\text{PSNY}^{62}$ (Abb. 4.26 A) zwar helixtypische Kombinationen der ϕ und ψ Winkel ein, die Kriterien für eine Wasserstoffbrücke des Proteinerückgrats zwischen S60 und V63, wie für 3_{10} -Helices zu erwarten, ist nicht mit den experimentellen Randbedingungen aus den residualen dipolaren Kopplungen zu vereinbaren. Die β -Faltblattstränge und die RT-Schleife umschließen einen hydrophoben Kern, der von den Aminosäure V13, A15, L27, F29, M35, V37, A47, S49, G56, I58, P59 und V63 gebildet wird (Abb. 4.26 B). Die Überlagerung der mittleren Strukturen von LynSH3 und LckSH3 (Abb. 4.27) gibt ihre große Ähnlichkeit wieder. Die beiden SH3-Domänen, die eine 56 %ige Sequenzidentität und 72 %ige Sequenzähnlichkeit verbindet, weisen eine mittlere quadratische Abweichung der schweren Rückgratome von 1,11 Å auf. Beschränkt man sich bei dem Vergleich auf die β -Faltblätter, so fällt der Wert der mittleren quadratischen Abweichung auf 0,74 Å. Dies zeigt, dass die strukturellen Unterschiede der beiden SH3-Domänen hauptsächlich in den flexiblen Schleifenbereichen zwischen den Faltblattsträngen liegen.

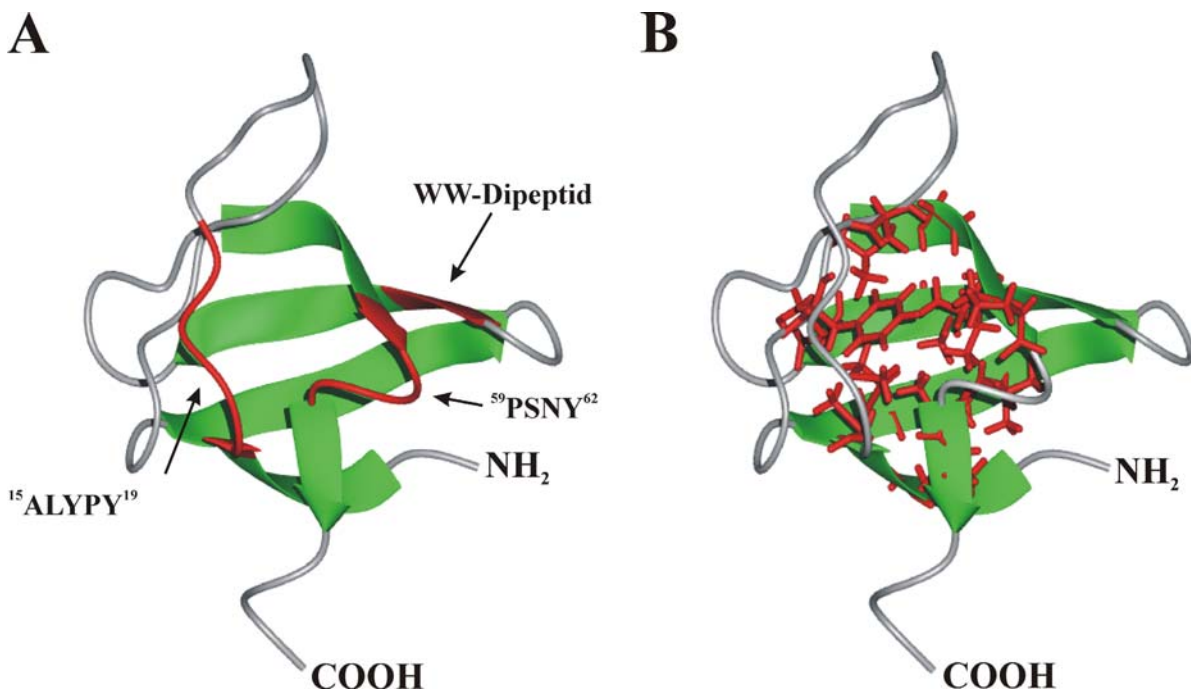
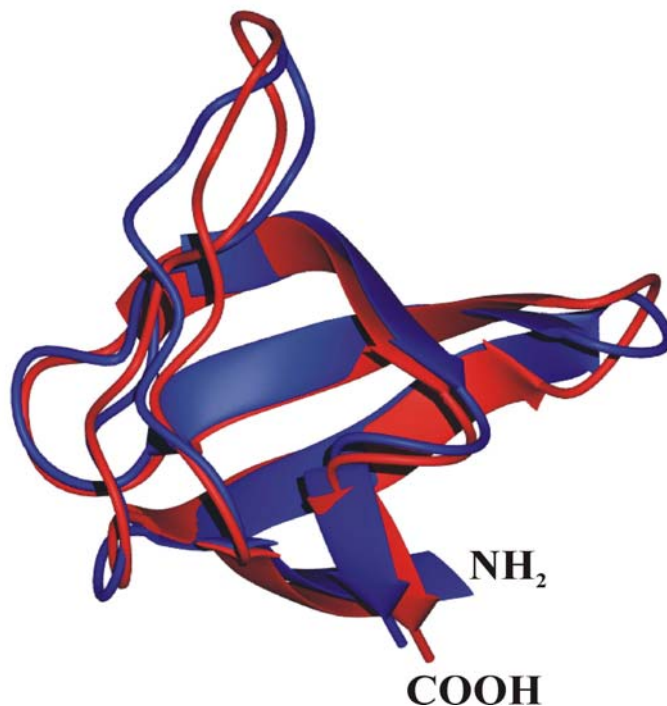


Abb. 4.26 Schematische Darstellung der für SH3-Domänen typischen Sequenzmerkmale und des hydrophoben Kerns der LynSH3. (A) In rot hervorgehoben sind die Positionen der drei wichtigsten Sequenzmerkmale für SH3-Domänen. Sequenzbereich A15 bis Y19 steht in guter Übereinstimmung mit der ALYDY Konsensussequenz am Übergang von $\beta 1$ zur RT-Schleife. $\beta 3$ beinhaltet mit W44 und W45, das WW-Dipeptid, eines der am stärksten konservierten Sequenzmerkmale der SH3-Domänen. P59 bis Y62 zwischen $\beta 4$ und $\beta 5$ bilden die 3_{10} -Helix aus und erfüllen die PxxY Konsensussequenz. (B) In Stäbchen-Darstellung und rot hervorgehoben sind die Aminosäuren V13, A15, L27, F29, M35, V37, A47, S49, G56, I58, P59 und V63, die den hydrophoben Kern des Proteins bilden. Die Abbildung wurde mit Molmol erstellt (Koradi *et al.*, 1996).

Abb. 4.27 Überlagerung der mittleren Strukturen der SH3-Domänen von Lyn und Lck. Die mittlere Struktur der LynSH3 (blau) weist eine sehr hohe Übereinstimmung mit der mittleren Struktur der LckSH3 (rot) auf. Strukturelle Unterschiede finden sich hauptsächlich in den flexiblen Schleifenbereichen, die die einzelnen β -Faltblattstränge verbinden. Die Abbildung wurde mit Molmol erstellt (Koradi *et al.*, 1996).



4.4 Identifizierung und Charakterisierung der LynSH3-Tip Interaktionen

Da in der NMR-Spektroskopie nur magnetisch aktive Kerne beobachtet werden können, besteht bei der Untersuchung von Komplexstrukturen die Möglichkeit, die einzelnen Komponenten bei der Komplexbildung separat zu beobachten. Zu diesem Zweck wurden ^{13}C , ^{15}N -markierte LynSH3 beziehungsweise Tip(140-191) mit dem jeweils anderen, unmarkierten Bindungspartner versetzt. Somit mussten die NMR-Spektren für die sequenzspezifische Zuordnung der Resonanzen und für die Bestimmung der experimentellen Randbedingungen zur Strukturberechnung doppelt (für jede markierte Komponente einmal) gemessen werden (Kap. 3.5.2). Diese Vorgehensweise hat den Vorteil, dass die Spektren der komplexierten LynSH3 ohne etwaige Signalüberlappungen von Aminosäuren aus Tip(140-191) eindeutig ausgewertet werden können und umgekehrt. Gleichzeitig ermöglicht die getrennte Charakterisierung beider Komponenten im Komplex eine schnellere Bestimmung experimenteller Randbedingungen für die Strukturberechnung.

4.4.1 Identifizierung der Spinsysteme und sequenzspezifische Zuordnung der Tip-Resonanzen im Komplex

Tip(140-191) ist bis auf die Ausbildung der Polyprolinhelix in Lösung unstrukturiert (Bauer *et al.*, 2004). Die hieraus resultierende Unstrukturiertheit eines Großteils des Proteins hat zur Folge, dass es zu einer starken Linienverbreiterung und Überlappung der einzelnen Resonanzen kommt, die eine eindeutige Identifizierung und sequenzspezifische Zuordnung der Spinsysteme im ungebundenen Zustand stark erschweren beziehungsweise unmöglich machen. Aus diesem Grund wurde auf diese Zuordnung für diesen Zustand verzichtet.

Nach Zugabe von LynSH3 sind im ^1H , ^{15}N -HSQC-Spektrum von Tip(140-191) nur 22 der theoretisch 51 erwarteten Resonanzen mit guter Dispersion und hohem Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu erkennen (Abb. 4.28). Die Resonanzen der Aminosäuren M140 bis T169 sind aufgrund der konformationellen Heterogenität der flexiblen Bereiche nur schwach oder gar nicht zu erkennen. Die Identifizierung und sequenzspezifische Zuordnung der Resonanzen mit hohem Signal-zu-Rausch-Verhältnis (W170 bis A191) wurde analog zur Vorgehensweise bei der freien LynSH3 vorgenommen (Kap. 4.3.2). Die Zuordnung der Rückgratresonanzen erfolgte über die vergleichende Auswertung der HNCACB- und CBCA(CO)NH-Spektren. Diese ermöglichte die sequenzspezifische Zuordnung aller nicht-Proline des Sequenzabschnitts von W170 bis A191 (Abb. 4.28). Die

Vervollständigung der verbleibenden Resonanzen der aliphatischen Seitenketten sowie die sequenzspezifische Zuordnung der Proline wurde durch Auswertung der (H)CC(CO)NH-, H(C)CH-TOCSY- sowie der 3D- ^{15}N -NOESY-HSQC und 3D- ^{13}C -NOESY-HSQC-Spektren (Kap. 3.5.2) erzielt. Auf diese Weise konnten über 93 % der Resonanzen der Aminosäuren T169 bis A191 zugeordnet werden. Nicht identifiziert werden konnte das H^{N} , N-Kreuzsignal von T169 sowie die H^{e1} -Kreuzsignale von R182 und R189. Des Weiteren konnte von der aromatischen Seitenkette von W170 nur H^{e1} eindeutig identifiziert werden. Die Zuordnung ist in der *BioMagResBank* (BMRB) unter der Kennung 6456 hinterlegt und im Anhang 10.3 abgedruckt.

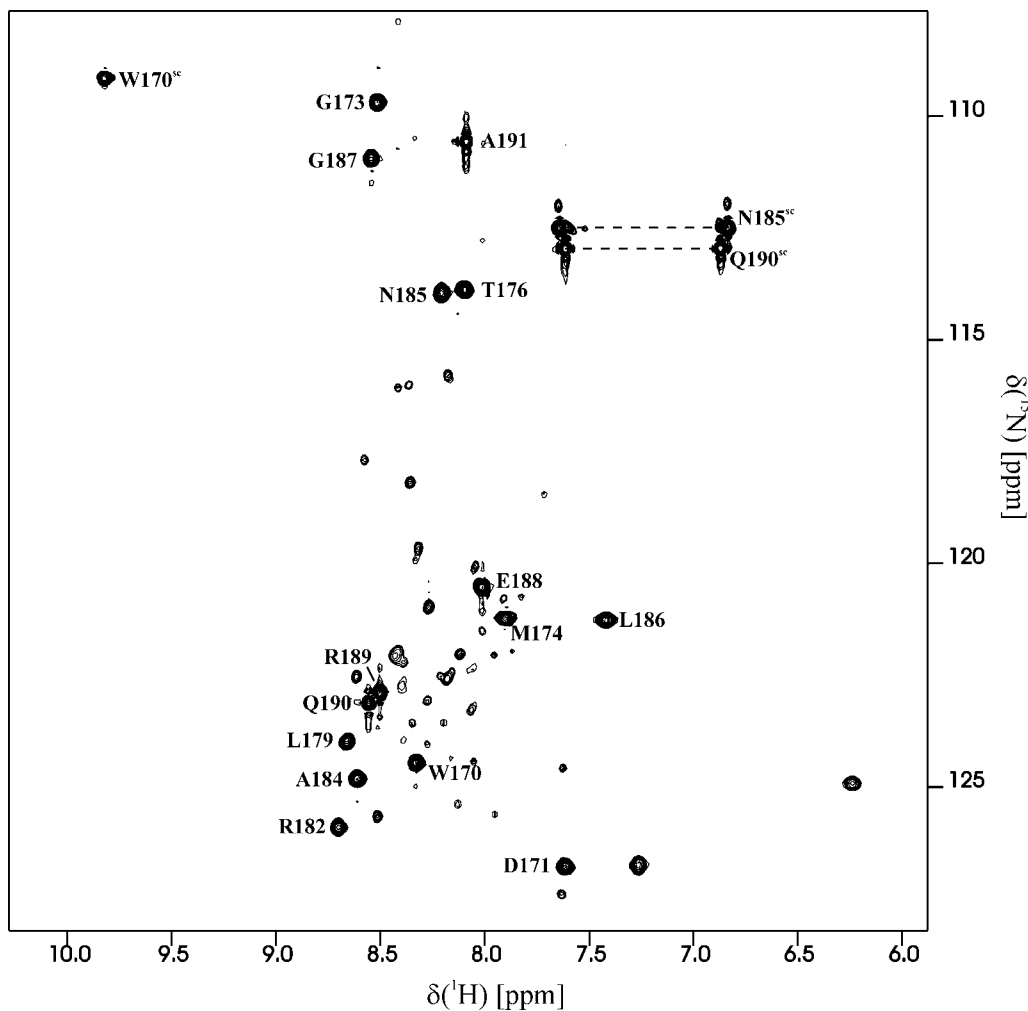


Abb. 4.28 2D- ^1H , ^{15}N -HSQC-Spektren von ^{15}N -markiertem Tip(140-191) in Gegenwart von LynSH3. 1,6 mM Tip(140-191), 3,3 mM LynSH3 100 mM K-Phosphat, 50 mM NaCl, pH 6,4 bei 298 K. Die Spektren wurden an einem Bruker Avance 700 Spektrometer aufgenommen. Die Kreuzresonanzen der Amide sind mit ihrer zugehörigen Sequenzposition gekennzeichnet. Resonanzen der Seitenketten sind mit 'sc' gekennzeichnet und für die Aminosäuren Asparagin und Glutamin mit einer gestrichelten Linie verbunden.

Interaktionsstellen in Tip bei LynSH3-Bindung

Wie aus Abb. 4.28 ersichtlich ist, erfahren nur die Resonanzen der Aminosäuren W170 bis A191 eine deutliche Verbesserung des Signal-zu-Rausch-Verhältnis gegenüber dem ungebundenen Zustand im Vergleich zu den restlichen Aminosäuren von Tip(140-191). Diese ist ein Indiz, dass diese Aminosäuren bei der Bindung von Tip an die LynSH3 eine Stabilisierung erfahren. Dieses kann einerseits durch die direkte Beteiligung an der Bindung oder durch von der Bindung induzierte Effekte hervorgerufen werden. Zur weiteren Charakterisierung der Flexibilität von Tip(140-191) auf einer ps-ns-Zeitskala bei LynSH3-Bindung, wurde der heteronukleare $\{^1\text{H}\}^{15}\text{N}$ -NOE ermittelt (Kap 3.5.9). Die Auftragung des heteronuklearen $\{^1\text{H}\}^{15}\text{N}$ -NOEs (Abb. 4.29) zeigt für die Aminosäuren W170, Q190 und A191 eine sehr hohe Flexibilität, erkennbar an den negativen Werten. Die Aminosäuren L179 und R182, die Teil der Polyprolin-Helix sind, weisen mit 0,76 und 0,72 die höchsten Werte für den heteronuklearen $\{^1\text{H}\}^{15}\text{N}$ -NOE und damit die eingeschränkste Flexibilität auf. T176, als einzige weitere nicht-Prolin Aminosäure der Polyprolin-Helix, weist mit einem Wert von 0,50 ebenfalls auf eine Einschränkung der Flexibilität des Rückgrats bei Bindung von LynSH3 hin.

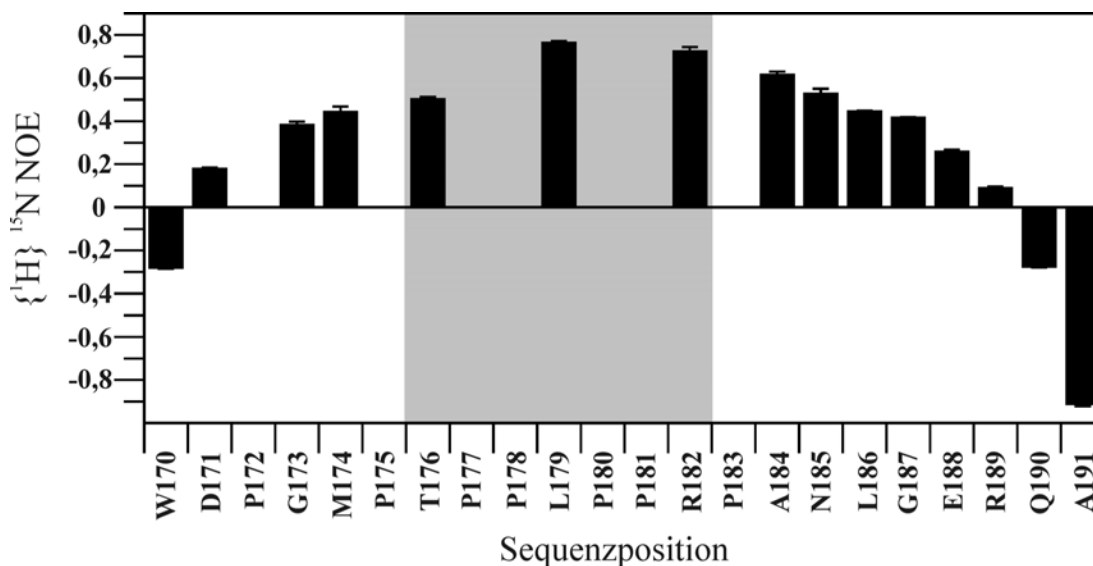


Abb. 4.29 Heteronuklearer $\{^1\text{H}\}^{15}\text{N}$ -NOE von Tip nach LynSH3-Bindung in Abhängigkeit der Sequenzposition bei 600 MHz. Dargestellt sind die gemittelten Werte sowie die Fehler, ermittelt aus zwei Messungen. Der Sequenzabschnitt der Polyprolin-Helix ist grau hinterlegt. Auffallend ist die eingeschränkte Flexibilität der Aminosäuren COOH-terminal der Polyprolin-Helix. Diese liefert einen Hinweis auf eine verlängerte Bindungsregion von Tip bei der LynSH3-Erkennung. 1,6 mM Tip(140-191), 3,3 mM LynSH3, 100 mM K-Phosphat, 50 mM NaCl, pH 6.4.

Vergleicht man die Werte des heteronuklearen $\{^1\text{H}\}^{15}\text{N}$ -NOEs NH_2 - und COOH -terminal der Polyprolin-Helix, so fällt auf, dass NH_2 -terminal nur M174 gerade noch einen Wert größer als 0,4 aufweist. COOH -terminal sind es aber alle Aminosäuren von A184 bis G187. Dieser Befund zeigt, dass neben den Aminosäuren der Polyprolin-Helix weitere Reste COOH -terminal eine wichtige Rolle bei der Bindung spielen, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die Aminosäuren M174 bis G187 an der Bindung beteiligt oder zumindest von ihr indirekt betroffen sind.

4.4.2 Identifizierung der Spinsysteme und sequenzspezifische Zuordnung der LynSH3 Resonanzen im Komplex

Im Gegensatz zu der Komplexbildung von LckSH3 und Tip, die sich durch einen auf der NMR-Zeitskala schnellen Austausch von freier und gebundener Form auszeichnet (Schweimer *et al.*, 2002; Bauer *et al.*, 2004), zeigt der Komplex aus LynSH3 und Tip(167-199) ein überwiegend intermediäres und langsames Austauschverhalten (Abb. 4.30). Dies bedeutet, dass bei der Titration in den $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren jeweils Resonanzen des freien und des gebundenen Zustands nebeneinander zu detektieren sind. Während der Titration bleiben die Positionen der einzelnen Resonanzen unverändert, lediglich ihre Intensitäten variieren mit dem Verhältnis aus freier zu gebundener Spezies. Aus diesem Grund ist eine neue Zuordnung des gebundenen Zustands erforderlich. Diese Zuordnung erfolgte analog der Zuordnung des freien LynSH3 (Kap. 4.3.2). Hierfür wurden die folgenden Experimente verwendet: CBCA(CO)NH, H(C)CH-TOCSY, HNCA, ^{15}N -NOESY-HSQC und ^{13}C -NOESY-HSQC (Kap. 3.5.2). Auf diese Weise konnten 99 % der Resonanzen identifiziert werden. Nicht zugeordnet werden konnte die Resonanz $\text{H}^{\beta*}$ von Y17 und $\text{H}^{\delta*}$ von P18. Die Zuordnung ist in der *BioMagResBank* (BMRB) unter der Kennung 6456 hinterlegt und im Anhang 10.5 abgedruckt.

Faltblattsträngen $\beta 4$ und $\beta 5$, Aminosäuren I58 bis Y62. Strukturell ähnliche Bereiche der LckSH3 zeigen unter der Zugabe von Tip ein sehr gleichartiges Verhalten (Schweimer *et al.*, 2002). Allgemein stellen diese Bereiche eine Hauptinteraktionsfläche bei der Bindung von Liganden mit prolinreichen Sequenzen dar (Larson & Davidson, 2000).

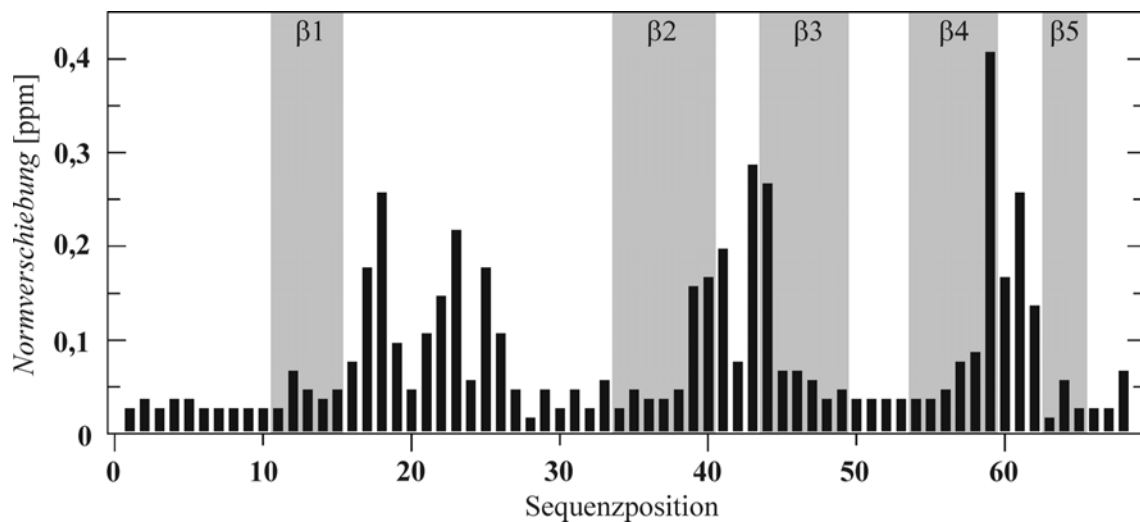


Abb. 4.31 Histogramm der normierten Verschiebung der ^1H -, ^{13}C - und ^{15}N -Resonanzen der LynSH3 bei Ligandenbindung in Abhängigkeit von der Sequenzposition. Starke Änderungen der chemischen Verschiebungen der durchschnittlichen Protonenresonanzen sind im Bereich der RT-Schleife, der n-Src-Schleife sowie im Bereich der 3_{10} -Helix zwischen $\beta 4$ und $\beta 5$ zu erkennen. Grau schattierte Bereiche geben die Lage der β -Faltblattstränge wieder (vgl. Abb. 1.1).

Abb. 4.31 stellt eine quantitative Beschreibung für alle Aminosäuren der LynSH3 dar. Hierbei wurden nicht nur die Änderungen der chemischen Verschiebungen im ^1H , ^{15}N -HSQC-Spektrum ausgewertet, sondern die Änderungen der Verschiebungen aller ^1H -, ^{13}C - und ^{15}N -Resonanzen der Aminosäuren mit in Betracht gezogen (Kap. 3.5.12). Für dieses Vorgehen ist eine vollständige Zuordnung der freien, sowie der Tip-gebundenen LynSH3 zwingend erforderlich. Der Vorteil dieser Darstellungsweise besteht einerseits darin, dass Proline, die keine H^{N} -Resonanz aufweisen und somit nicht im ^1H , ^{15}N -HSQC-Spektrum vertreten sind, ebenfalls dargestellt werden können. Andererseits werden auch Änderungen der chemischen Verschiebungen der Seitenketten registriert. Diese ist bei Ligandenbindung von großer Bedeutung, da eine Vielzahl der intermolekularen Kontakte nicht über das Proteinerückgrat, sondern über die Seitenketten der beteiligten Aminosäuren ausgebildet wird. Somit können die Resonanzen der Seitenketten bedeutende Änderungen ihrer chemischen Umgebung erfahren, ohne dass das

Proteinrückgrat nennenswert beeinflusst wird. E39 und Y62 sind zwei Beispiele für diese Art der Änderung der chemischen Verschiebungen bei Ligandenbindung (Abb. 4.32). Wie schon aus den $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum (Abb. 4.30) zu erkennen ist, erfahren die H^{N} Resonanzen beider Aminosäuren eine Verschiebung bei Ligandenbindung. Diese würde allein auf Grundlage des $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrums aber als eher unterdurchschnittlich gewertet werden. Die genauere Betrachtung der Normverschiebung der Aminosäuren (Abb. 4.31) beziehungsweise der Normverschiebungen geordnet nach den einzelnen Protonen (Abb. 4.32) zeigt aber, dass die $\text{H}^{\beta 1}$ und $\text{H}^{\beta 2}$ Resonanzen von E39 sowie die H^{ϵ^*} Resonanzen von Y62 sehr stark verschoben werden, was auf eine erhebliche Änderung der chemischen Umgebung beziehungsweise auf einen direkten Beitrag zur Ligandenbindung schließen lässt.

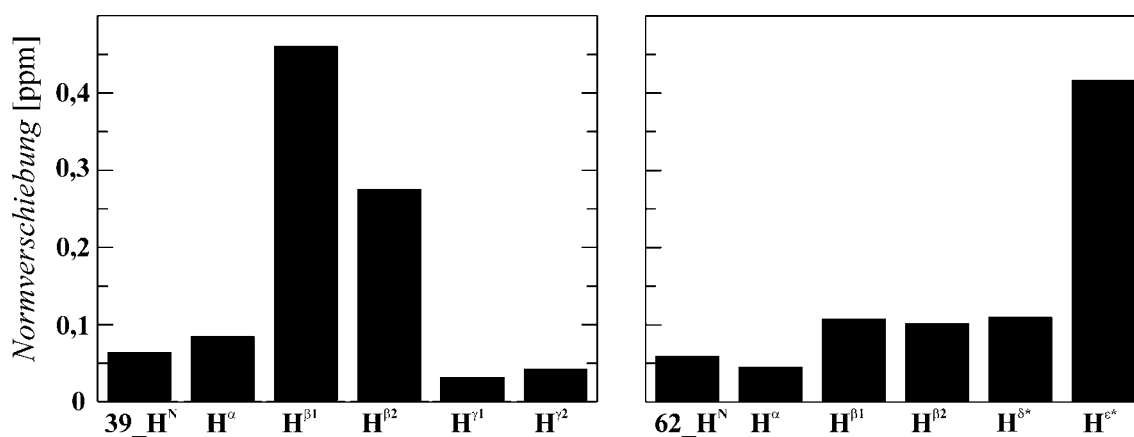


Abb. 4.32 Histogramm der normierten Verschiebungen der Protonen und zugehöriger Heterokerne der Aminosäuren E39 und Y62. E39 und Y62 sind zwei Beispiele für den zusätzlichen Informationsgewinn durch die Auswertung der normierten Verschiebungen (Kap. 3.5.12). Beide Aminosäuren zeichnen sich durch eine geringe Verschiebung der H^{N} -Resonanz aus. Die normierte Verschiebung der Resonanzen der Seitenkette verdeutlicht aber die erhebliche Änderung bei Ligandenbindung.

Aus eigenen Untersuchungen (Schweimer *et al.*, 2002) und der Literatur (Musacchio, 2003) ist bekannt, dass die aromatischen Aminosäuren der SH3-Domänen eine bedeutende Rolle bei der Bindung von prolinreichen Liganden spielen. Diese Tatsache spiegelt sich in der Überlagerung der Ausschnitte aus den ^1H , ^{13}C -HSQC Spektren der freien und der Tip-gebundenen LynSH3 wider. Mit Ausnahme von HE3 und HZ3 von W45 und HD* von Y19 und F57 erfahren alle beobachteten Resonanzen der aromatischen Seitenketten eine Veränderung bei der Ligandenbindung.

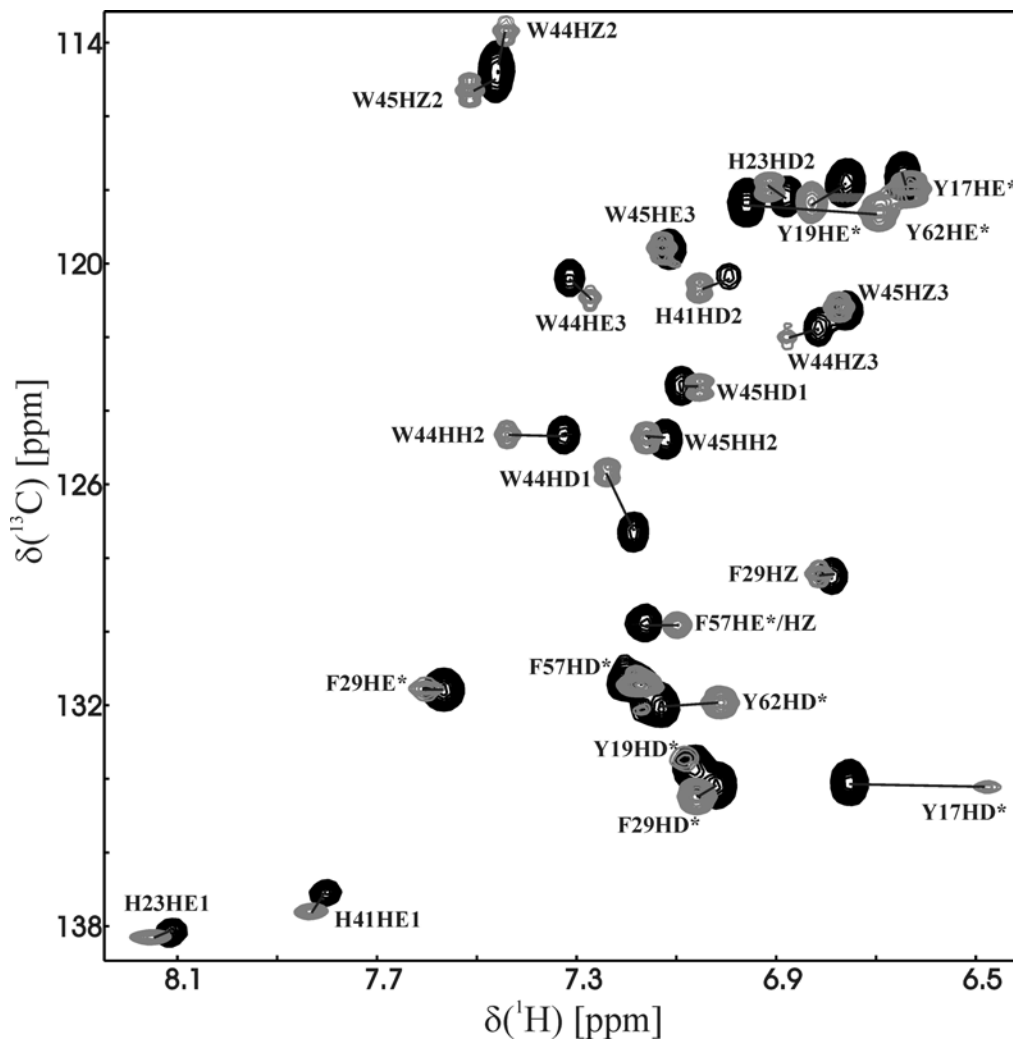


Abb. 4.33 Überlagerung des Ausschnitts der aromatischen Protonen aus dem ^1H , ^{13}C -HSQC-Spektrum der freien (schwarz) und der Tip-gebundenen LynSH3 (grau). Der erste Buchstabe der Beschriftung entspricht der Einbuchstabenabkürzung der entsprechenden Aminosäure gefolgt von der entsprechenden Sequenzposition und der jeweiligen Atombezeichnung. Resonanzen, die eine Veränderung der chemischen Verschiebung bei Ligandenbindung erfahren, sind mit durchgezogenen Linien verbunden. Jeweils 1,6 mM LynSH3, 100 mM K-Phosphat, 50 mM NaCl, pH 6.4; in gebundener Form mit 3,4 mM Tip(167-199).

4.4.3 Änderung der dynamischen und strukturellen Eigenschaften der LynSH3 bei Ligandenbindung

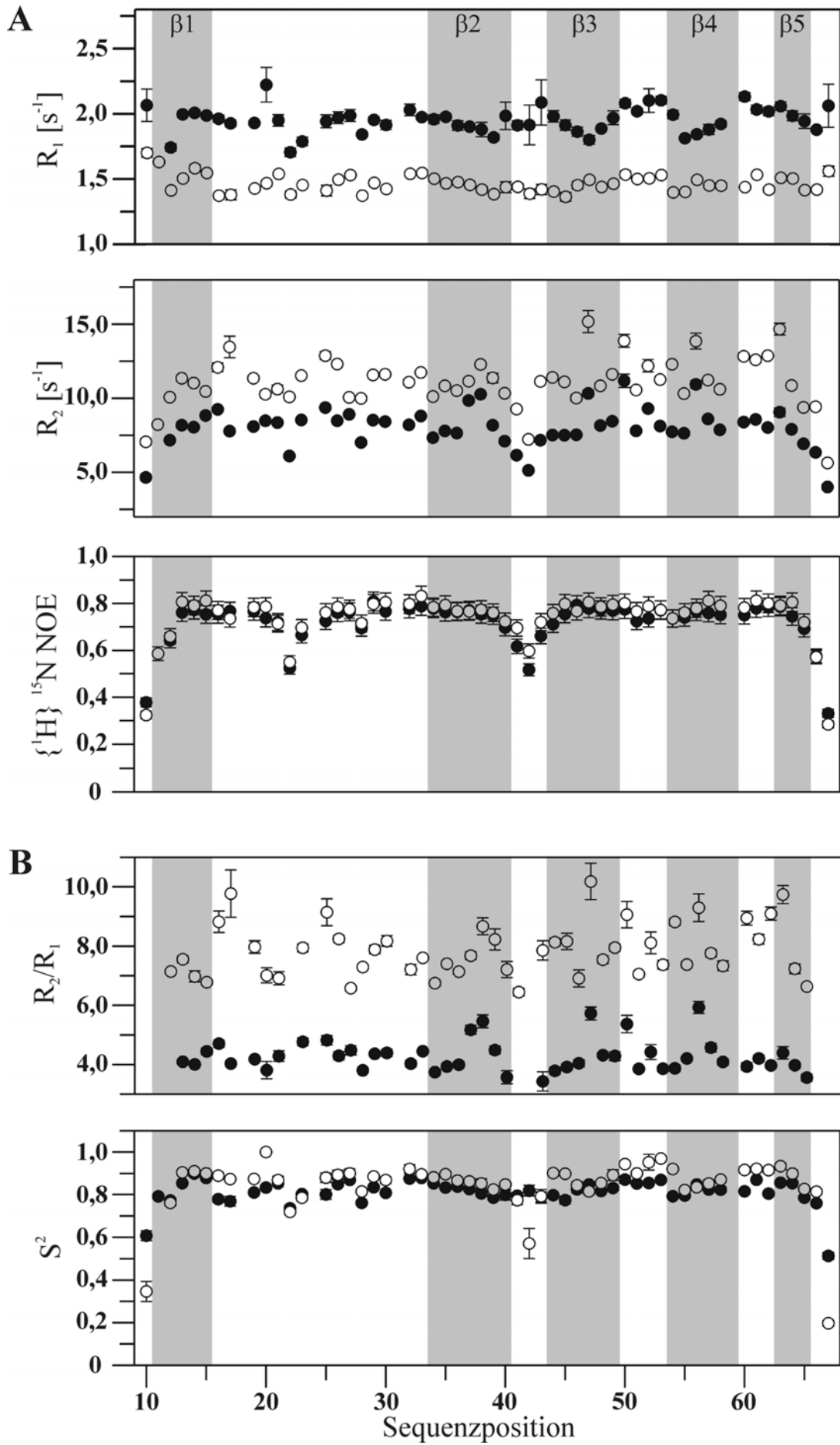
Zusätzlich zur Identifizierung der Interaktionsstellen der LynSH3 bei Ligandenbindung wurde die Dynamik auf einer ps-ns-Zeitskala anhand der Relaxationsdaten R_1 , R_2 und des heteronuklearen $\{^1\text{H}\}^{15}\text{N}$ -NOEs ermittelt (Abb. 4.34 A) (Kap. 3.5.8 und 3.5.9). Die Interpretation wurde anhand des R_2 -zu- R_1 -Verhältnisses und nach dem 'model free'-Formalismus mit dem Programm Tensor v2.0 (Dosset *et. al.*, 2000) in Form eines Ordnungsparameters (S^2) (Kap. 3.5.10) durchgeführt (Abb. 4.34 B). Aus der Auftragung der Messwerte für den heteronuklearen $\{^1\text{H}\}^{15}\text{N}$ -NOE und den Ordnungsparameter ergaben sich für den freien und Tip-gebundenen Zustand nur marginale Unterschiede ($< 5\%$). Dies stellt keine signifikante Änderung der dynamischen Eigenschaften der LynSH3-Domäne bei Ligandenbindung dar.

Die ungebundene LynSH3 weist nach dem Lipari-Szabo-Model eine Korrelationszeit der Rotationsdiffusion (τ_c) von 5,7 ns auf (Kap. 3.5.10). Für den Komplex aus LynSH3 und Tip(167-199) ergibt die Berechnung der Rotationskorrelationszeit hingegen einen Wert von 8,1 ns. Der Quotient der beiden Rotationskorrelationszeiten beträgt 0,70 und korreliert gut mit der größeren Masse des LynSH3-Tip-Komplexes. Das Verhältnis von R_2 zu R_1 hängt für starre Proteinbereiche in erster Näherung von der jeweiligen Rotationskorrelationszeit τ_c ab (Kay *et al.*, 1989). Betrachtet man die Unterschiede der R_2 -zu- R_1 -Verhältnisse der β -Faltblattstränge vor und nach der Ligandenbindung, so ergibt sich ein Quotient von $0,56 \pm 0,06$, der sich in derselben Größenordnung wie der Quotient der beiden Rotationskorrelationszeiten befindet. Somit sind die beobachteten Änderungen der Werte für das R_2 -zu- R_1 -Verhältnis allein durch die Massenzunahme bei der Komplexbildung aus LynSH3 und Tip zu erklären und liefern keinerlei Anhaltspunkte auf globale strukturelle Änderungen der LynSH3 bei Ligandenbindung.

Um mögliche kleinere strukturelle Änderungen der LynSH3 bei Ligandenbindung zu identifizieren, wurden die residualen dipolaren D_{NHN} -Kopplungen der freien und der gebundenen LynSH3 in Gegenwart von *Pfl* Phagen gegeneinander aufgetragen (Abb. 4.35) (Kap. 3.5.7). Unterschiede in der Orientierung oder konformationelle Änderungen des Proteins führen zu starken Abweichungen der jeweiligen gemessenen Kopplungen (Mittermaier & Kay, 2004). Daher ist die vergleichende Auftragung der dipolaren Kopplungen der freien und der ligandengebundenen LynSH3 ein sensibles Maß etwaiger struktureller Änderungen. Unter Ausschluss von zehn Wertepaaren, die größtenteils zu Aminosäuren gehören, die entweder selbst an der Ligandenbindung

beteiligt sind oder die sich in direkter Nachbarschaft zu Aminosäuren mit direkter Beteiligung befinden, ergibt sich für die Auftragung der Kopplungen ein Korrelationskoeffizient von 0,99. Die von der Korrelation ausgeschlossenen Wertepaare konnten zu 80 % der Bindungsregion zugeordnet werden (Abb. 4.35). Daraus lässt sich ableiten, dass die LynSH3-Domäne nur sehr geringe strukturelle Veränderung bei Ligandenbindung erfährt, was im Einklang mit früheren Strukturen steht (Larson & Davidson, 2000; Schweimer *et al.*, 2002).

Abb. 4.34 ^{15}N -Relaxationsdaten der freien LynSH3 (gefüllte Kreise) sowie der Tip(167-199)-gebundenen LynSH3 (offene Kreise) bei 60,8 MHz Stickstofffrequenz. (A) Auftragung der Rohdaten der longitudinalen und transversalen Relaxationsraten R_1 und R_2 sowie des heteronukleare $\{^1\text{H}\}^{15}\text{N}$ -NOEs. (B) Interpretation der Rohdaten als R_2 -zu- R_1 -Verhältnis (Kay *et al.*, 1989) und durch den nach dem 'model free'-Ansatz berechneten Ordnungsparameter S^2 (Lipari & Szabo, 1981). Die Unterschiede im R_2 -zu- R_1 -Verhältnis vor und nach Ligandenbindung korrelieren gut mit der Zunahme der Rotationskorrelationszeit und sind somit allein durch den Massenunterschied zu erklären (Kay *et al.*, 1989). Grau schattierte Bereiche geben die Lage der β -Faltblattstränge wieder (vgl. Abb. 1.1). Jeweils 1,6 mM LynSH3, 100 mM K-Phosphat, 50 mM NaCl, pH 6.4; in gebundener Form mit 3,4 mM Tip(167-199).



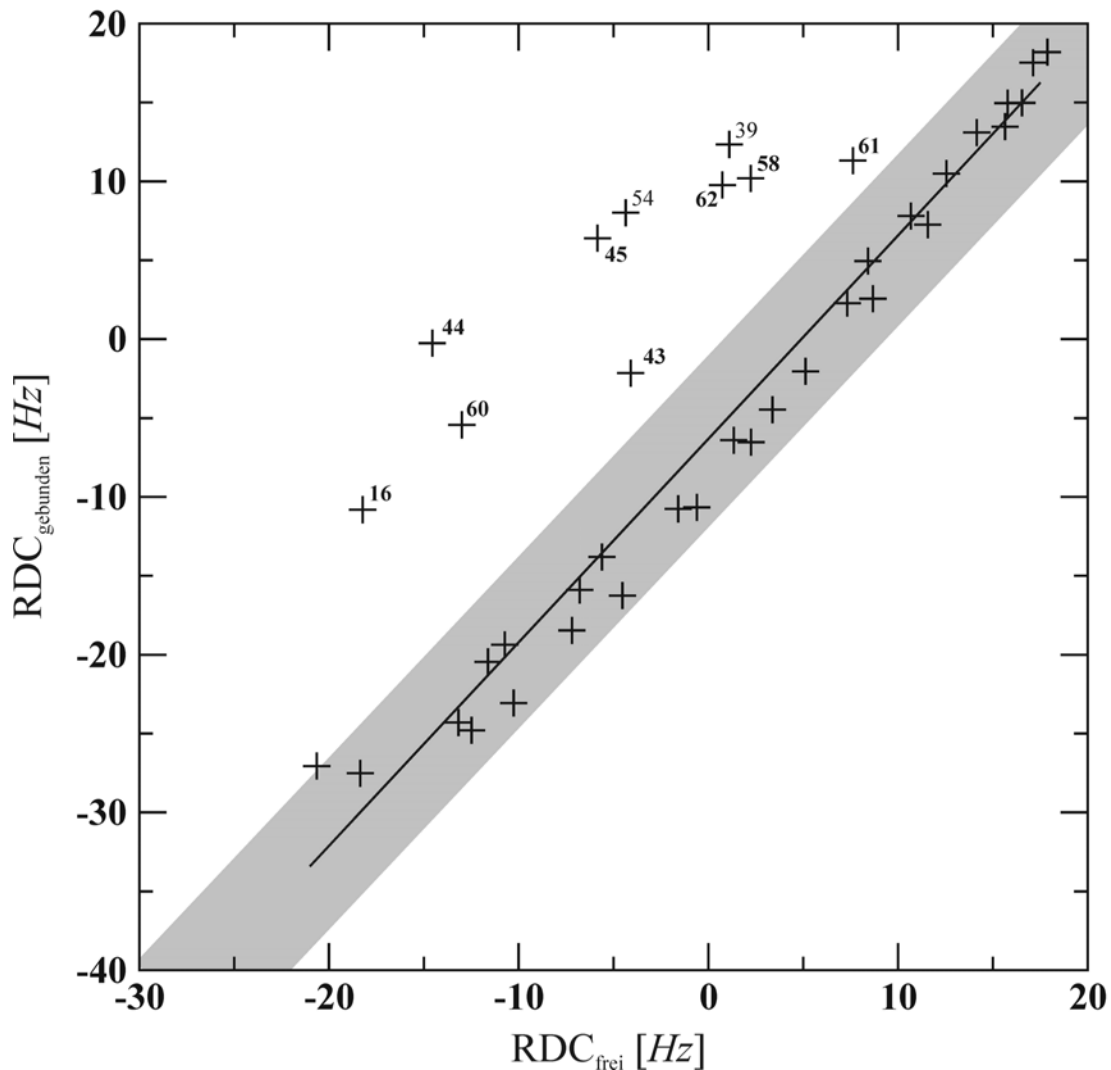


Abb. 4.35 Korrelation der gemessenen residualen dipolaren $D_{N_{HN}}$ -Kopplungen (RDC) der freien und der Tip(167-199)-gebundenen LynSH3. Die durchgezogene Linie stellt eine lineare Regression für die grau hinterlegten Wertepaare mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,99 dar. Von der Regression ausgenommene Wertepaare sind mit der entsprechenden Sequenzposition beschriftet. Durch Fettdruck hervorgehobene Sequenzpositionen weisen entweder selbst NOE-Kreuzresonanzen zum Tip Liganden auf oder stehen in direkter Nachbarschaft ($i+1$) zu Aminosäuren, die NOE-Kreuzresonanzen zum Liganden zeigen. Mit Ausnahme weniger, an der Bindung beteiligter Aminosäuren, zeigen die $D_{N_{HN}}$ -Vektoren der Aminosäuren der LynSH3 keine signifikante Änderung bei Ligandenbindung. Jeweils 1,6 mM LynSH3, 100 mM K-Phosphat, 50 mM NaCl, pH 6,4, 18 mg/ml *Pfl* Phagen; in gebundener Form mit 3,4 mM Tip(167-199).

4.5 Strukturbestimmung des LynSH3-Tip-Komplexes

Basierend auf der sequenziellen Zuordnung der Spinsysteme beider Komplexkomponenten konnten aus weiteren Experimenten Daten für die Strukturbestimmung ermittelt werden.

4.5.1 Einschränkung der dihedralen Winkel aus $^3J(\text{H}^{\text{N}}, \text{H}^{\alpha})$ -Kopplungskonstanten

Aus dem HNHA-Experiment (Kap. 3.5.5) der gebundenen LynSH3 konnten 50 $^3J(\text{H}^{\text{N}}, \text{H}^{\alpha})$ -Kopplungskonstanten bestimmt werden. Wegen der Beschränkung auf Kopplungskonstanten kleiner 6 Hz und größer 8 Hz konnten nach der Karplus-Beziehung (Karplus, 1954; Pardi *et al.*, 1984) 21 Beschränkungen der ϕ -Winkel für die Strukturberechnung der gebundenen LynSH3 herangezogen werden (Anhang 10.5).

Für das gebundene Tip(140-191) wurde auf die Auswertung eines HNHA-Experiments verzichtet, da aus Betrachtung der Proteinsequenz ersichtlich ist, dass der Großteil der an der Bindung beteiligten Aminosäuren Proline oder Glycine sind. Für diese Aminosäuretypen sind entweder keine Resonanzen im HNHA-Spektrum vorhanden oder die Resonanzen lassen sich nicht eindeutig in Beschränkungen des ϕ -Winkels übersetzen. Aus eigenen vorangegangenen CD-spektroskopischen Untersuchungen (Bauer, 2001; Schweimer *et al.*, 2002; Bauer *et al.*, 2004) ist bekannt, dass T176 bis P183 in Tip sowohl bei Bindung, als auch frei in Lösung eine Typ-II-Polyprolin (PPII)-Helix ausbilden. Die PPII-Helix zeichnet sich durch eine Beschränkung der dihedralen Winkel für Proline von $\phi = -75^\circ$ und $\psi = 145^\circ$ aus (Morton *et al.*, 1996). Trotz des experimentellen Nachweises der PPII-Helix konnte aufgrund der Vielzahl anderer experimenteller Randbedingungen bei der Berechnung der Komplexstruktur auf eine Beschränkung der dihedralen Winkel der Proline in Tip verzichtet werden.

4.5.2 Identifizierung von Wasserstoffbrücken

Da durch das hohe Maß an Korrelation der residualen dipolaren Kopplungen der freien und gebundenen LynSH3 gezeigt werden konnte, dass die Ligandenbindung nur zu sehr geringen strukturellen Änderungen führt (Kap. 4.4.3), wurde auf eine zusätzliche experimentelle Bestimmung der Wasserstoffbrücken aus $^3J(\text{N}(i), \text{C}'(j))$ skalaren Kopplungen oder langsamen Amidprotonenaustausch der gebundenen Form verzichtet. Alle 17 für die Berechnung der Struktur der freien LynSH3 verwendeten Wasserstoffbrücken konnten auch im Komplex während der iterativen Runden der Strukturberechnung ohne Verletzung anderer experimenteller Daten erfüllt werden.

4.5.3 Abstandsbeschränkungen aus NOE-Kreuzresonanzen

Die Abstandsbeschränkungen für die Berechnung der Tertiärstruktur des LynSH3-Tip-Komplexes wurde in mehreren iterativen Runden aus den durchgeführten NOESY-Experimenten gewonnen. Dabei wurden zwei verschiedene Proben verwendet, in denen jeweils nur einer der Bindungspartner mit den stabilen Isotopen ^{13}C und ^{15}N markiert war. Auf diese Weise konnte die Überlagerung von Signalen deutlich verringert und somit die eindeutige Zuordnung erleichtert werden. Im Fall der markierten LynSH3 wurden folgende NOESY-Experimente zur Auswertung herangezogen: 3D- ^{15}N -NOESY-HSQC, 3D- ^{13}C -NOESY-HSQC, 4D- ^{13}C -HMQC-NOESY- ^{13}C -HSQC (Kap. 3.5.2). NOE-Kreuzresonanzen von Tip(140-191) wurden durch die Auswertung der 3D- ^{15}N -NOESY-HSQC-, 3D- ^{13}C -NOESY-HSQC-Spektren (Kap. 3.5.2) identifiziert.

Durch die Auswertung dieser Spektren war es möglich, 914 Abstandsbeschränkungen eindeutig zuzuordnen. Davon entfallen 124 Abstandsbeschränkungen auf intermolekulare NOE-Kreuzresonanzen zwischen den beiden Komplexkomponenten. Für die LynSH3 wurden 658 Abstandsbeschränkungen identifiziert, von denen 19 intraresiduale Kreuzresonanzen darstellen. Die verbleibenden 639 interresidualen Kreuzresonanzen setzten sich aus 228 sequenziellen, 85 mittelweitreichenden und 326 weitreichenden Abstandsbeschränkungen zusammen. Für den Bereich W170 bis A191 von Tip(140-191) wurden 132 intramolekulare, interresiduale Abstandsbeschränkungen erhalten, 99 davon sequenziell und 33 mittelweitreichend. Die Gesamtheit der Abstandsbeschränkungen ist im Anhang 10.5 abgedruckt.

4.5.4 Beschränkungen durch residuale dipolare Kopplungen

In schwach orientierender *Pfl*-Phagen-Suspension konnten aus J -modulierten ^1H , ^{15}N -HSQC-Spektren 41 D_{NHN} - und 37 $D_{\text{C}\alpha\text{H}\alpha}$ -Kopplungskonstanten bestimmt werden (Kap. 3.5.7). Für die Strukturberechnung wurden lediglich die Kopplungskonstanten der Aminosäuren mit einem Wert für den heteronuklearen $\{^1\text{H}\}^{15}\text{N}$ -NOE größer als 0,65, sowie der Aminosäuren, deren Kreuzresonanzen keine Überlagerungen mit anderen Kreuzresonanzen aufweisen, herangezogen. Da im Gegensatz zur LynSH3 in Tip diese Kriterien maximal für die Aminosäuren L179 und A182 erfüllt worden wären (Abb. 4.29), wurde auf eine Bestimmung der D_{NHN} - und $D_{\text{C}\alpha\text{H}\alpha}$ -Kopplungskonstanten in diesem Fall verzichtet. Die für die Strukturberechnung benötigten Werte für die Anisotropie D_a und Rhombizität R des Vorzugsorientierungstensors D wurden aus den Extremwerten $D_{\text{NHN}}(\text{K34}) = -27,56 \text{ Hz} = 2 D_a$ und $D_{\text{NHN}}(\text{A47}) = 18,20 \text{ Hz} = -D_a(1+3/2 R)$ für die LynSH3 zu

$D_a = -13,76$ Hz und $R = 0,22$ Hz geschätzt (Kap. 3.6.3).

4.5.5 Identifizierung der Salzbrücke D26-R182

Das minimale Bindungselement eines kanonischen SH3-Liganden ist das so genannte xP-x-xP Motiv (Di-xP-Motiv), das entweder NH₂- (Klasse I) oder COOH-terminal (Klasse II) von einer 'Kompassaminosäure' flankiert wird, die die Orientierung des Peptids relativ zur SH3-Domäne bestimmt (Kap. 1.2.1). Aus Selektionsversuchen mit Peptidbibliotheken ist bekannt, dass diese 'Kompassposition' fast ausschließlich von Argininen besetzt wird, die eine Salzbrücke zu einem meist hochkonservierten Aspartat der SH3-Domäne ausbilden (Yu *et al.*, 1994; Feng *et al.*, 1994; Feng *et al.*, 1995). Das System aus LynSH3 und Tip(140-191) erfüllt mit D26 und R182 theoretisch die Anforderungen für die Ausbildung dieser Salzbrücke.

Ein Nachweis von Salzbrücken ist mit Hilfe von Abstandsbeschränkungen aus NOE-Kreuzresonanzen nicht möglich, da die an der Salzbrücke beteiligten H^{n*} Protonen des R182 schnell mit dem Lösungsmittel austauschen, sodass eine Zuordnung nicht möglich ist. Weiterhin ist der geringste Abstand zweier eindeutig identifizierter Resonanzen der beiden Spinsysteme (D26 H^{β*} zu R182 H^{ε*}) größer als 7,5 Å und damit zu groß, um NOE-Kreuzresonanzen detektieren zu können. Aus diesem Grund wurde nach den iterativen Runden zur Bestimmung der Abstandsbeschränkungen aus NOE-Kreuzresonanzen die erhaltene Struktur in einer freien Moleküldynamiksimulation in explizitem Wasser untersucht (Kap. 3.7). Dazu wurde die vorläufige Komplexstruktur in einer Wasserbox äquilibriert und anschließend über den Simulationszeitraum von 1 ns (675 Schnappschüsse) beobachtet. Eine Auswertung dieser Schnappschüsse ergab, dass zu 68 % des Simulationszeitraums die Abstände beider O^{δ*} Sauerstoffatome von D26 zu jeweils einem der beiden H^{n*} Protonen von R182 kleiner als 2,3 Å waren. In weiteren 17 % war zumindest einer der Abstände zwischen den O^{δ*} Sauerstoffen von D26 und einem H^{n*} Proton von R182 kleiner als 2,3 Å. Dieser Befund stützt die Annahme der Ausbildung einer Salzbrücke zwischen D26 und R182 im LynSH3-Tip-Komplex. Daher wurde die Salzbrücke in Form von zusätzlichen Abstandsbeschränkungen in die finale Runde der Strukturberechnungen mit einbezogen (Anhang 10.5).

4.5.6 Berechnung der Tertiärstruktur des LynSH3-Tip-Komplexes

Die insgesamt 1031 experimentellen Randbedingungen aus den Abschnitten 4.5.1 bis 4.5.5 dienten als Grundlage für die Berechnung der Komplexstruktur der LynSH3 und Tip. Da

lediglich experimentelle Randbedingungen für die Sequenzbereiche Q9 bis T68 von LynSH3 und W170 bis A191 von Tip eindeutig zugeordnet werden konnten, wurden nur diese Bereiche bei der Strukturberechnung berücksichtigt. Im ersten Schritt wurden 120 Strukturen unter Verzicht auf die 78 Randbedingungen aus dipolaren Kopplungskonstanten berechnet (Kap. 3.6.2). Im zweiten Schritt wurden die 60 Strukturen mit den niedrigsten Werten der Zielfunktion E_{pot} aus dem ersten Schritt unter zusätzlicher Verwendung der Randbedingungen aus dipolaren Kopplungskonstanten verfeinert (Kap. 3.6.3). Aus dem Ensemble der 60 verfeinerten Strukturen wurden die 20 Strukturen mit den niedrigsten Werten der Zielfunktion E_{pot} als konvergierende Strukturen akzeptiert (Abb. 4.36 A). Bei der akzeptierten Strukturschar wurden keine der verwendeten Abstandsbeschränkungen um mehr als 0,18 Å sowie keine systematische Verletzung einer Abstandsbeschränkung um mehr als 0,11 Å beobachtet. Die Atomkoordinaten wurden unter der Kennung 1WA7 in der *Protein Data Bank* (PDB) hinterlegt. Eine Zusammenfassung der wichtigsten Strukturparameter findet sich in Tabelle 4.3. Die nachfolgende Analyse der Strukturen des LynSH3-Tip-Komplexes bezieht sich auch die 'Kernstruktur' (Aminosäuren D11 bis L66 der LynSH3 und M174 bis G187 von Tip(140-191)), die sich durch Werte für den heteronuklearen $\{^1\text{H}\}^{15}\text{N}$ -NOE größer als 0,6 (LynSH3) beziehungsweise größer als 0,4 (Tip) auszeichnen (Abb. 4.34 und 4.29). Dadurch sollte der Tatsache Rechnung getragen werden, dass in die Werte des heteronuklearen $\{^1\text{H}\}^{15}\text{N}$ -NOEs sowohl die interne Dynamik als auch die Dynamik der Komplexbildung mit eingehen. Die mittlere quadratische Standardabweichung der Atomkoordinaten für das Rückgrat der LynSH3 beträgt dabei 0,34 Å und für die alle schweren Atome 0,96 Å. Der Ligand ist ebenfalls sehr gut definiert und weist eine mittlere quadratische Standardabweichung der Atomkoordinaten des Proteinrückgrats von 0,34 Å und aller schweren Atome von 0,82 Å auf.

Tab. 4.3 Zusammenfassung der Strukturberechnung des LynSH3-Tip-Komplexes. Die Angaben stellen mit Ausnahme der experimentellen Randbedingungen die Mittelwerte und Standardabweichungen über die 20 akzeptierten Strukturen dar.

Für die Strukturberechnung des LynSH3-Tip-Komplexes verwendete experimentelle Randbedingungen		
Abstandsbeschränkungen aus NOEs	insgesamt	914
intermolekular		124
intramolekular (LynSH3)	insgesamt	658
intraresiduale NOEs		19
interresiduale NOEs	sequenziell	228
	mittelweitreichend	85
	weitreichend	326
intramolekular (Tip)	insgesamt	132
interresiduale NOEs	sequenziell	99
	mittelweitreichend	33
Beschränkungen der Diederwinkel		21
Wasserstoffbrücken		17
Salzbrücken		1
dipolare Kopplungskonstanten	$D_{N\text{HN}}$	41
	$D_{C\alpha\text{H}\alpha}$	37
Statistik der Moleküldynamiksimulation		
Energien / (kcal/mol)	E_{pot}	101,0 ± 3,1
	E_{bonds}	3,7 ± 0,3
	E_{angles}	43,5 ± 3,2
	$E_{impropers}$	12,3 ± 1,1
	E_{vdw}	20,8 ± 2,3
	E_{NOE}	12,1 ± 1,5
	E_{cdih}	0,9 ± 0,4
	E_{sani}	7,9 ± 0,9
Standardabweichungen von den idealen Abständen / Å	Bindungslängen	0,00167 ± 0,00007
	Abstandsbeschränkungen	0,016 ± 0,001
Standardabweichungen von den idealen Winkeln / °	Bindungswinkel	0,342 ± 0,012
	Improperwinkel	0,384 ± 0,014
	Diederwinkelbeschränkungen	1,632 ± 0,376
Standardabweichungen von den idealen dipolaren Kopplungskonstanten / Hz	$D_{N\text{HN}}$	0,213 ± 0,027
	$D_{C\alpha\text{H}\alpha}$	0,367 ± 0,030
Atomare Standardabweichungen von der mittleren Struktur		
	Proteinrückgrat	Schwere Atome
Gesamtkomplex ^a	0,70 ± 0,13 Å	1,38 ± 0,17 Å
Kernstruktur ^b der LynSH3	0,34 ± 0,10 Å	0,96 ± 0,18 Å
erweitertes Bindungsmotiv von Tip ^c	0,34 ± 0,08 Å	0,82 ± 0,14 Å
Polyprolin-Helix von Tip ^d	0,22 ± 0,07 Å	0,46 ± 0,13 Å

^a Aminosäuren 11-66 der LynSH3 und 174-187 von Tip; ^b Aminosäuren 11 – 66; ^c Aminosäuren 174 – 187; ^d Aminosäuren 175 – 182

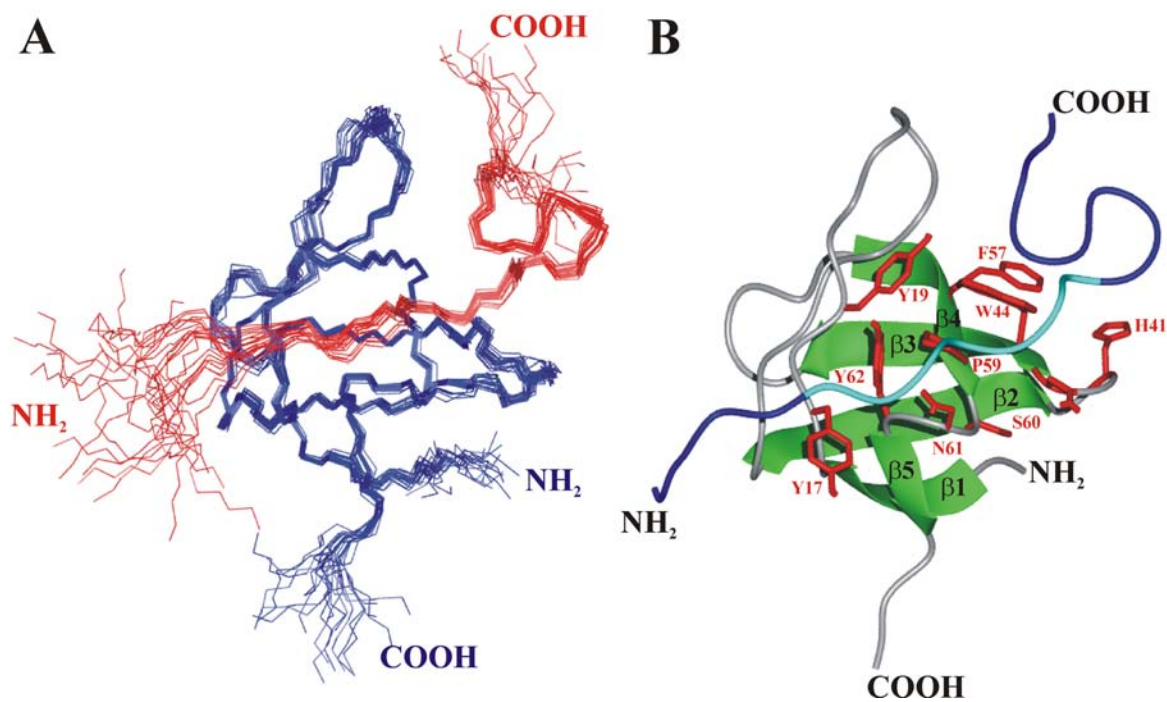
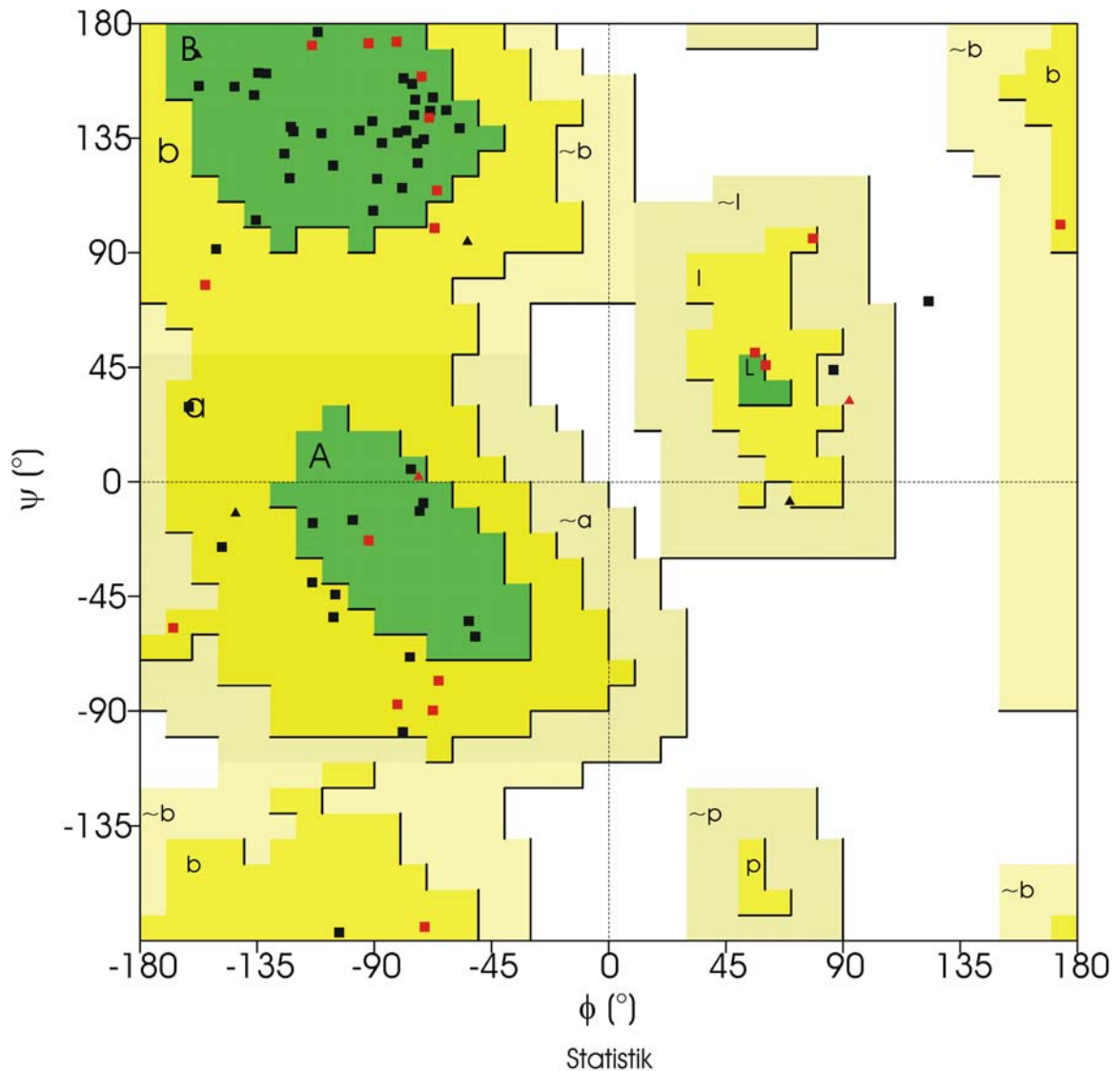


Abb. 4.36 Überlagerung des Proteinrückgrats der 20 akzeptierten Strukturen und schematische Darstellung der regulären Sekundärstrukturelemente anhand der Struktur mit dem niedrigsten Wert der Zielfunktion E_{pot} des LynSH3-Tip-Komplexes. (A) Dargestellt sind die Aminosäuren Q9 bis T68 der LynSH3 sowie W170 bis A191 von Tip. Die Aminosäuren G1 bis E8 der LynSH3 wurden aufgrund des Fehlens experimenteller Randbedingungen nicht in die Strukturberechnung einbezogen. Mit Ausnahme der jeweiligen NH_2 - und COOH -Termini zeigen die 20 berechneten Strukturen eine sehr hohe Übereinstimmung. (B) Dargestellt sind die fünf β -Faltblattstränge (D11-A15, K34-E39, W44-S49, K54-P59 und V63-K65) der LynSH3. Zusätzlich sind die zehn Reste, die NOE-Kreuzresonanzen zu Tip aufweisen als Stäbchenmodell in rot hervorgehoben und mit der entsprechenden Sequenzposition beschriftet. Das Rückgrat von Tip ist in blau und cyan (Polyprolin-Helix T176-P182) dargestellt. Die Abbildung wurde mit Molmol erstellt (Koradi *et al.*, 1996).

Kontrollrechnungen ohne experimentelle Randbedingungen aus residualen dipolaren Kopplungen ergaben eine mittlere quadratische Standardabweichung der Atomkoordinaten des Rückgrats der LynSH3 von ebenfalls 0,34 Å. Die Abweichung der jeweils gemittelten Strukturen von 0,68 Å zeigt, dass die Randbedingungen aus dipolaren Kopplungen die Rückgrattopologie, basierend auf den 'konventionellen' NMR-Daten, bestätigen.



	gesamt		LynSH3		Tip(170-191)	
Aminosäuren in den meist favorisierten Regionen	38	65.5%	36	76.6%	2	18.2%
Aminosäuren in den zusätzlich erlaubten Regionen	18	31.0%	9	19.1%	9	81.8%
Aminosäuren in den großzügig erlaubten Regionen	1	1.7%	1	2.1%	0	0.0%
Aminosäuren in nicht erlaubten Regionen	1	1.7%	1	2.1%	0	0.0%

Anzahl der Nicht-Gly und Nicht-Pro Aminosäuren	58	100.0%	47	100.0%	11	100.0%
Anzahl der endständigen Aminosäuren	4		2		2	
Anzahl der Glycine (dargestellt als Dreiecke)	6		4		2	
Anzahl der Proline	10		3		7	

Gesamtanzahl der Aminosäuren	78		56		22	

Abb. 4.37 Grafische Darstellung der ϕ/ψ -Winkelkombinationen der Aminosäuren des LynSH3Tip-Komplexes nach Ramachandran. Die Aminosäuren der LynSH3 sind durch schwarze, die des Tip Liganden durch rote Symbole wiedergegeben. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde die Darstellung nur für den Komplex mit dem niedrigsten Wert der Zielfunktion E_{pot} dargestellt. Die in Strukturdatenbanken besonders häufig auftretenden Rückgratkombinationen sind grün eingefärbt. Die etwas selteneren Konformationen sind in gelb, die sehr seltenen blassgelb hinterlegt. In weiß sind die Regionen mit sterisch sehr ungünstigen Konformationen dargestellt (nicht erlaubte Regionen). Die Abbildung wurde mithilfe des Programms PROCHECK 3.4 (Laskowski *et al.*, 1996) erstellt.

Die Analyse der durch die Torsionswinkel ϕ und ψ charakterisierten Proteinerückgratkonformationen ergibt, dass 76,6 % der Aminosäuren der LynSH3 sterisch besonders bevorzugte Konformationen einnehmen (Abb. 4.37), ohne das ein statistischer Datenbankterm (Neudecker *et al.*, 2001) bei der Strukturberechnung zur Anwendung kam. Weitere 19,1 % nehmen Torsionswinkelkombinationen ein, die sterisch erlaubt sind. Im Liganden nehmen 18,2 % und 81,8 % der Aminosäuren ϕ/ψ -Torsionswinkelkombinationen ein, die sterisch besonders bevorzugt beziehungsweise erlaubt sind.

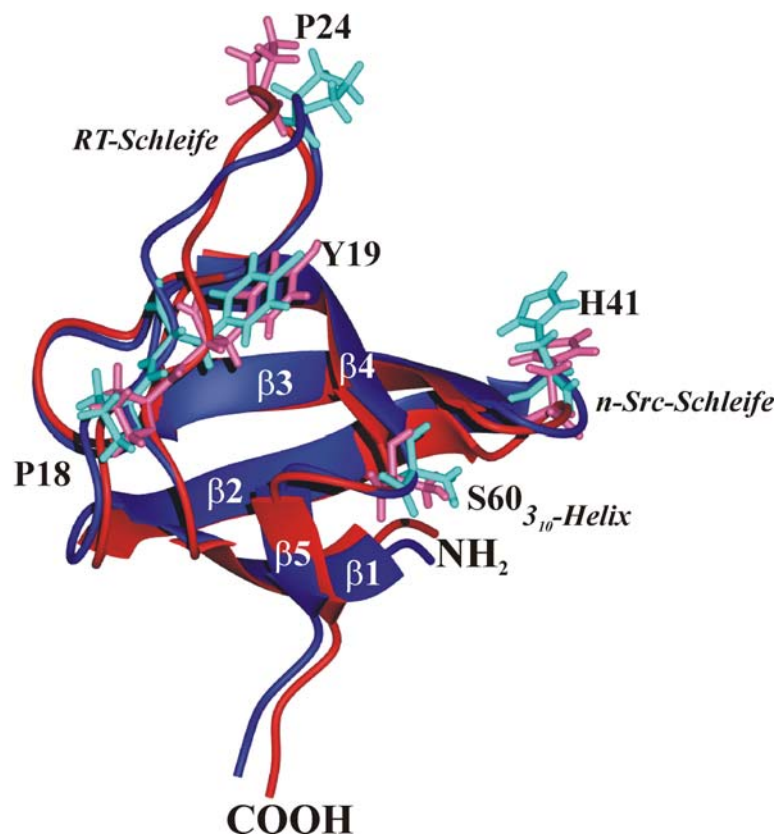


Abb. 4.38 Überlagerung der regulären Sekundärstrukturelemente der Durchschnittsstrukturen der freien LynSH3 (blau) und der Tip-gebundenen LynSH3 (rot). Die räumliche Orientierung der β -Faltblätter ist in beiden Fällen nahezu identisch, lediglich $\beta 2$ ist um eine Aminosäure verkürzt. Größere Unterschiede zeigen sich in den Schleifenbereichen – besonders der RT- und n-Src-Schleife. Aminosäuren mit einer Änderung des ϕ - und/oder ψ -Winkels größer 40° sind als Stäbchenmodell dargestellt und mit der entsprechenden Sequenzposition beschriftet. Die Abbildung wurde mit Molmol erstellt (Koradi *et al.*, 1996).

Tab. 4.4 Mittlere Abweichungen der Atomkoordinaten der Strukturen der freien und Tip-gebundenen LynSH3 bei Überlagerungen der Gesamtstrukturen. Die größten strukturellen Unterschiede treten in der RT-, n-Src-Schleife und der 3_{10} -Helix auf, während die distale Schleife sowie die β -Faltblätter nahezu unverändert bleiben.

	Rückgrat RMSD	RMSD der Schweratome
Kernstruktur ^a	0,91	1,26
β -Faltblätter ^b	0,63	0,97
RT-Schleife ^c	1,11	1,50
n-Src-Schleife ^d	1,48	1,77
distale Schleife ^e	0,50	0,62
3_{10} -Helix ^f	0,96	1,34

^a D11-L66; ^b D11-A15, K34-E40, W44-S49, K54-P59 und V63-K65; ^c L16-E33; ^d H41-E43;

^e L50-K53; ^f S60-Y62

Aus Tab. 4.4 und Abb. 4.38 ist ersichtlich, dass die größten strukturellen Unterschiede zwischen der LynSH3 in freien und gebundenen Zustand in der RT- und der n-Src-Schleife auftreten. Während der RMSD des Proteinrückgrats der Kernstruktur bei 0,91 Å und der β -Faltblätter bei 0,63 Å liegt, beträgt der Rückgrat-RMSD in der RT- und n-Src-Schleife 1,11 Å beziehungsweise 1,48 Å. Diesem Trend entgegengesetzt beträgt die mittlere Abweichung der Atomkoordinaten des Rückgrats der distalen Schleife lediglich 0,50 Å. Das gleiche Bild ergibt sich bei der Betrachtung der Differenzen der durchschnittlichen Änderung der ϕ - und ψ -Torsionswinkel (Abb. 4.39 und Abb. 4.38). Änderungen des ϕ -und/oder ψ -Winkels von mehr als 40 ° auf, die auf eine erhebliche Konformationsänderung des Proteinrückgrats schließen lassen, sind in den Bereichen der RT-Schleife, der n-Src-Schleife der 3_{10} -Helix zu finden. Die Rückgratkonformationsänderungen in der RT-Schleife begründen sich hauptsächlich auf Änderung des Wasserstoffbrücken-Netzwerks um das auf Sequenzebene hoch konservierte D26, das bei Bindung von Tip eine Salzbrücke mit R182 ausbildet. Sehr ähnliche Veränderungen des Wasserstoffbrücken-Netzwerks der RT-Schleife bei Ligandenbindung konnten auch schon für andere SH3-Domänen beschrieben werden (Arold *et al.*, 1997). Eine ebenfalls deutliche Änderung des ϕ -Winkels erfährt S60, welches in der 3_{10} -Helix liegend, direkt an der Bindung von Tip beteiligt ist. Die größten Unterschiede der ϕ -und ψ -Torsionswinkel weist aber H41 der n-Src-Schleife auf.

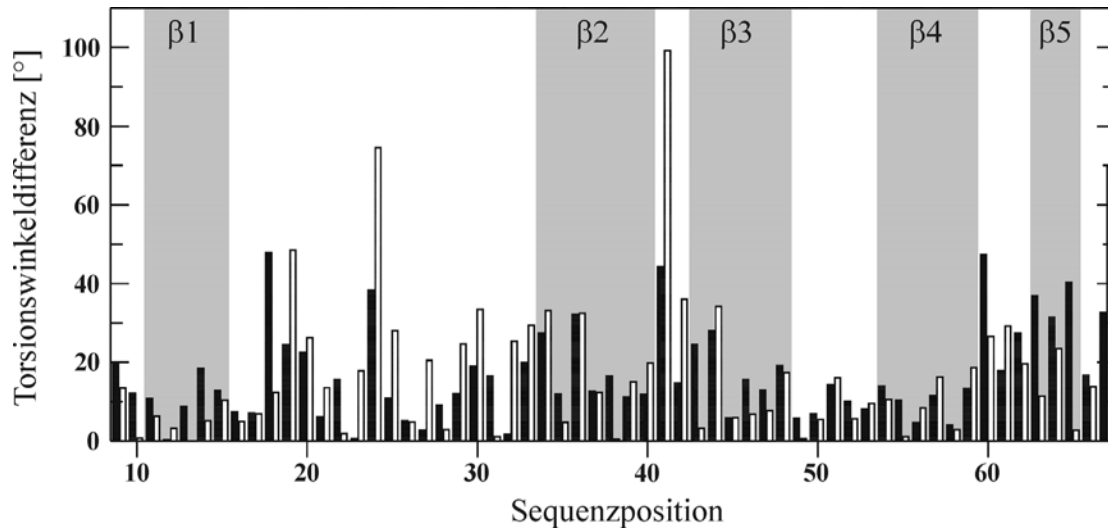


Abb. 4.39 Differenzen der ϕ - und ψ -Torsionswinkel zwischen den gemittelten Strukturen der freien und Tip-gebundenen LynSH3. Die Differenzwerte für die ϕ - und ψ -Torsionswinkel sind als schwarze beziehungsweise weiße Balken in Abhängigkeit der Sequenzposition dargestellt. Differenzwerte größer 40° , die auf eine erhebliche Konformationsänderung des Proteinrückgrats schließen lassen, sind für Bereiche der RT-Schleife, der n-Src Schleife und der 3_{10} Helix zu erkennen. Grauschattierte Bereiche geben die Lage der β -Faltblattstränge wieder (vgl. Abb. 1.1).

In der Struktur der freien LynSH3-Domäne kommt das H^N -Proton von H41 dem Carbonylsauerstoff von W44 näher als $2,3 \text{ \AA}$, sodass eine Wasserstoffbrücke ausgebildet werden kann. Nach der Bindung von Tip, an der unter anderem die Seitenketten von H41 und W44 beteiligt sind, wächst dieser Abstand auf über $4,8 \text{ \AA}$ an und verhindert die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke. Durch das Aufbrechen dieser Wasserstoffbrücke bei Ligandenbindung verkürzt sich der Faltblattstrang $\beta 2$ um eine Aminosäure (Abb. 4.38).

4.5.7 Bindung der PPII-Helix an die LynSH3

Der Sequenzabschnitt T176 bis R182 von Tip bildet eine Polyprolin-Helix aus, deren beide xP-Dipeptidmotive T176-P177 (P_3 / P_2) und L179-P180 (P_0 / P_{-1}) (Abb. 1.2; Nomenklatur nach Lim *et al.*, 1994) in die flachen, hydrophoben Tasche-1 und Tasche-2 der SH3-Domäne binden (Abb. 4.40 A). Dabei wird die Tasche-1 von den beiden Tyrosinen 17 und 62, Tasche-2 von Y62, Y19 und W44 gebildet (Abb. 4.40 A und 4.41). R182 an der Position P_{-3} packt gegen die Seitenkette von W44 und bildet eine Salzbrücke zu D26 der LynSH3 aus (Kap 4.5.5) und bestimmt somit die Klasse II-Orientierung des Liganden relativ zur SH3-Domäne.

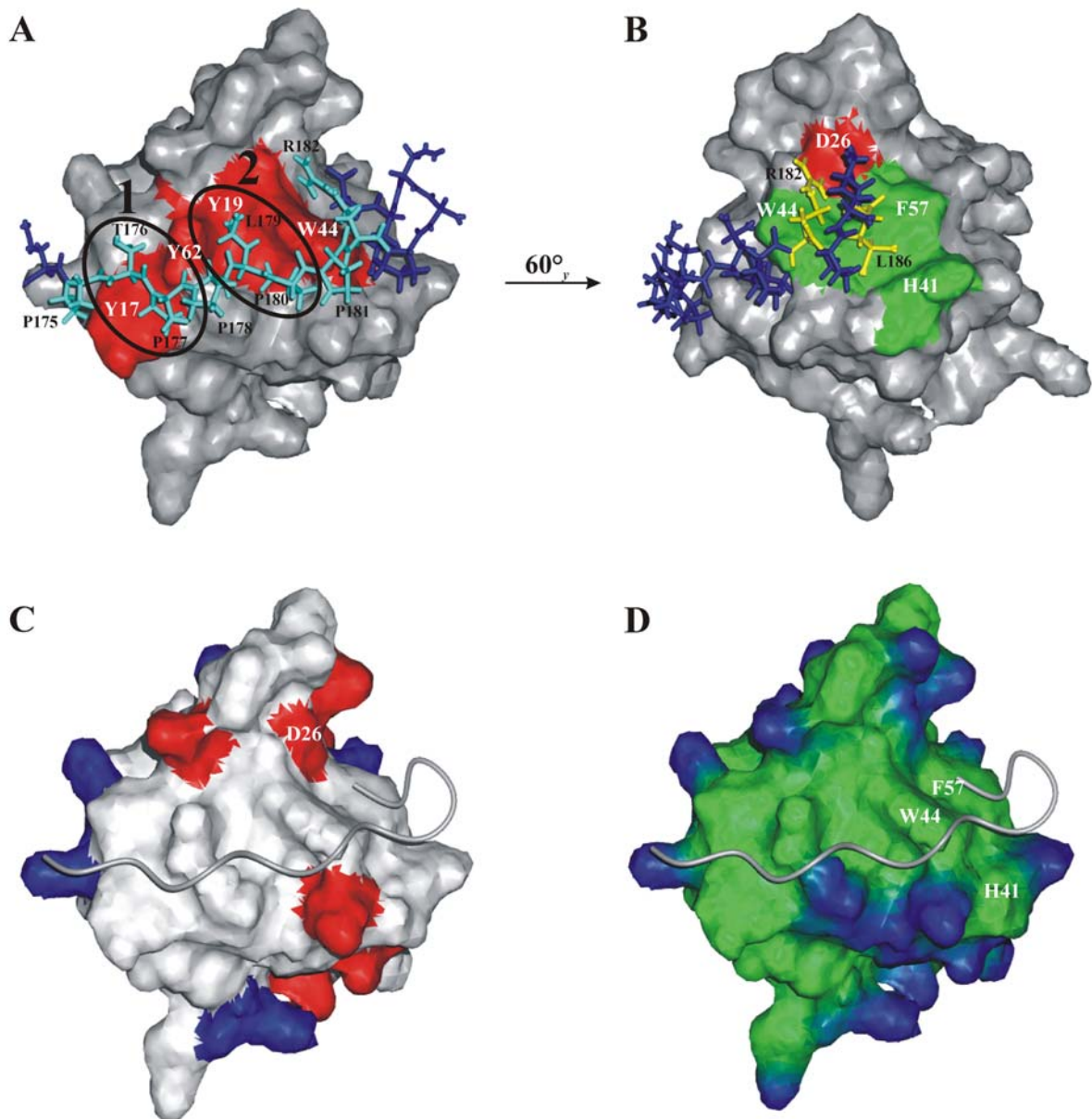


Abb. 4.40 Moleküloberflächendarstellung der LynSH3 im Komplex mit Tip. (A) Stäbchendarstellung von Tip(174-187) gebunden an LynSH3. Die Aminosäuren der PPII-Helix sind in cyan hervorgehoben und nummeriert. Die Moleküloberflächenareale von Y17, Y19, W44 und Y62, die die hydrophoben Bindungstaschen 1 und 2 (schwarze Ellipsen) bilden, sind in rot dargestellt und entsprechend beschriftet. (B) um 60° (entlang der y-Achse) relativ zu A, C und D gedrehte Darstellung der Bindungsbereiche COOH-terminal der PPII-Helix. R182 (gelb) bildet eine Salzbrücke zu D26 (rote Moleküloberflächendarstellung) aus, während L186 (gelb) in eine hydrophobe Tasche aus H41, W44 und F57 (grüne Moleküloberflächendarstellung) bindet. (C) Darstellung der elektrostatischen Oberflächenpotenziale der LynSH3 (negatives Potenzial in rot, positives Potenzial in blau). Abgesehen von D26, spielt das Oberflächenpotenzial der LynSH3 nur eine untergeordnete Rolle bei der Ligandenbindung. (D) Darstellung der Hydrophobizität der Moleküloberfläche der LynSH3 (hydrophobe Areale in grün, hydrophile Areale in blau). Die Tip-Bindung erfolgt fast ausschließlich über hydrophobe Wechselwirkungen mit der LynSH3. Die Abbildung wurde mit Molmol erstellt (Koradi *et al.*, 1996).

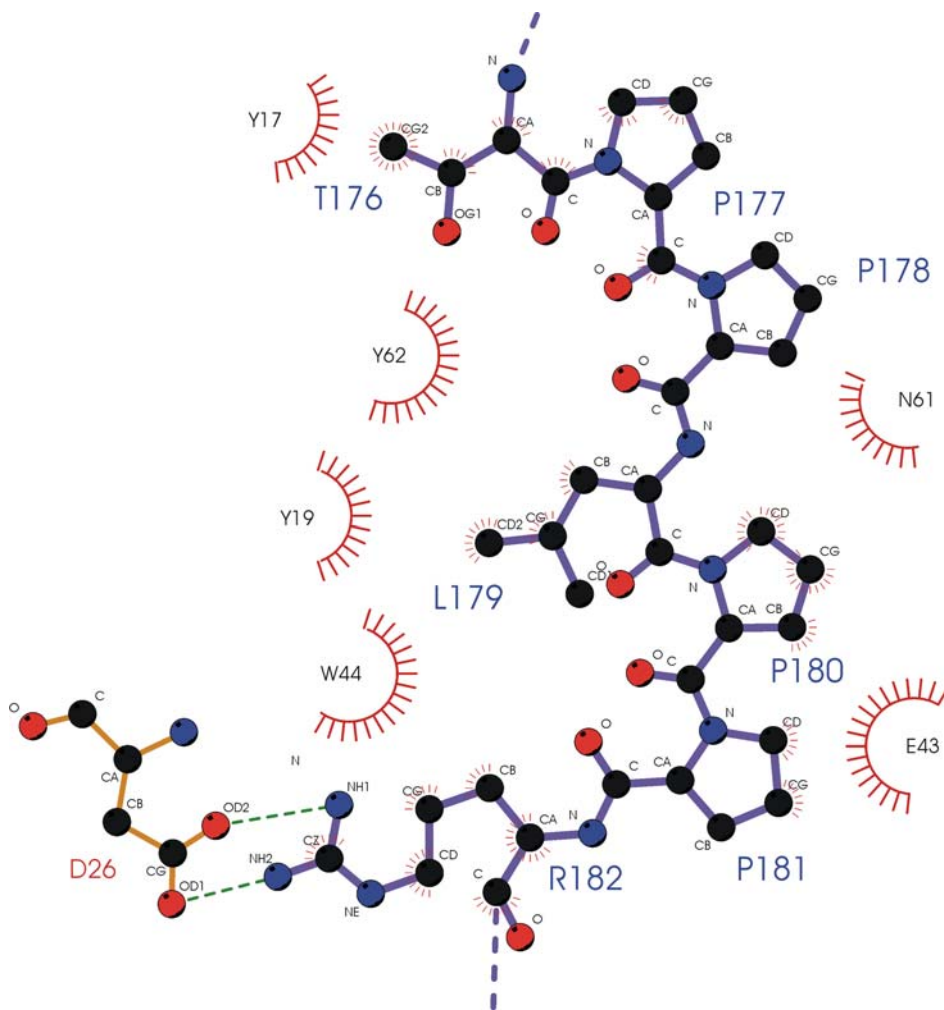


Abb. 4.41 Schematisches Diagramm der Wechselwirkungen der Bindungsregion der PPII-Helix von Tip mit der LynSH3. Als Kugel-Stäbchen-Modell dargestellt sind die Aminosäuren T176 bis R182 von Tip und D26 der LynSH3. Die Salzbrücke zwischen R182 und D26 ist durch zwei grün gestrichelte Linien eingezeichnet. Hydrophobe Wechselwirkungen sind durch rote Speichen um die beteiligten Atome des Liganden gekennzeichnet. Die entsprechenden Bindungspartner der LynSH3 sind durch rote Bögen mit Speichen und der zugehörigen Sequenzposition wiedergegeben. Die Darstellung wurde mit dem Programm LIGPLOT v.4.4.2 erstellt (Wallace *et al.*, 1995).

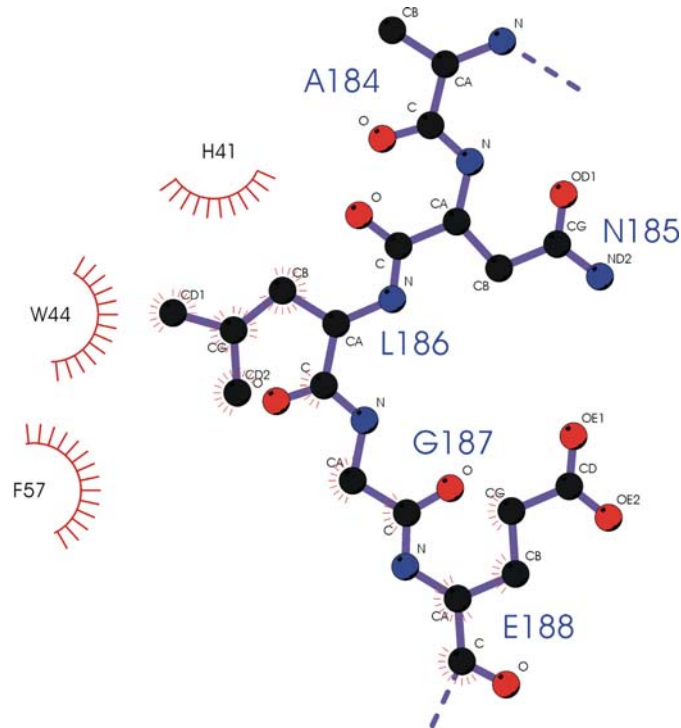


Abb. 4.42 Schematisches Diagramm der hydrophoben Wechselwirkungen von L186 von Tip mit den Resten H41, W44 und F57 der LynSH3. Als Kugel-Stäbchen-Modell dargestellt sind die Aminosäuren A184 bis E188 von Tip. Hydrophobe Wechselwirkungen sind durch rote Speichen um die beteiligten Atome des Liganden gekennzeichnet. Die entsprechenden Bindungspartner der LynSH3 sind durch rote Bögen mit Speichen und der zugehörigen Sequenzposition wiedergegeben. Die Darstellung wurde mit dem Programm LIGPLOT v.4.4.2 erstellt (Wallace *et al.*, 1995).

4.5.8 Beitrag des Bereichs COOH-terminal der PPII-Helix in Tip zur LynSH3-Bindung

Der Bereich COOH-terminal der PPII-Helix, P183 bis G187, ist auf der Sequenzebene unter Isolaten aus verschiedenen *Herpesvirus saimiri*-Stämmen und sogar unter Tio aus *Herpesvirus ateles* hoch konserviert (Abb. 1.5) (Ensser *et al.*, 2003, Bauer *et al.*, 2004). Dieser Bereich, bestehend aus fünf Aminosäuren, bindet unter Ausbildung einer Doppelschleife in die Furche zwischen RT- und n-Src-Schleife auf der Oberfläche der LynSH3. NOE-Kreuzresonanzen zwischen der H^β -, H^γ - und H^δ -Protonen von P183 und den H^α -, H^β -, und H^δ -Protonen L186 sowie NOE-Kreuzresonanzen zwischen H^α - und H^β -Protonen von N185 und den H^N -, H^β -, H^γ -Protonen von E188 zeigen ihre räumliche Nähe an. Somit bildet P183 bis L186 die erste Schleife und N185 bis E188 die zweite Schleife der Doppelschleife aus.

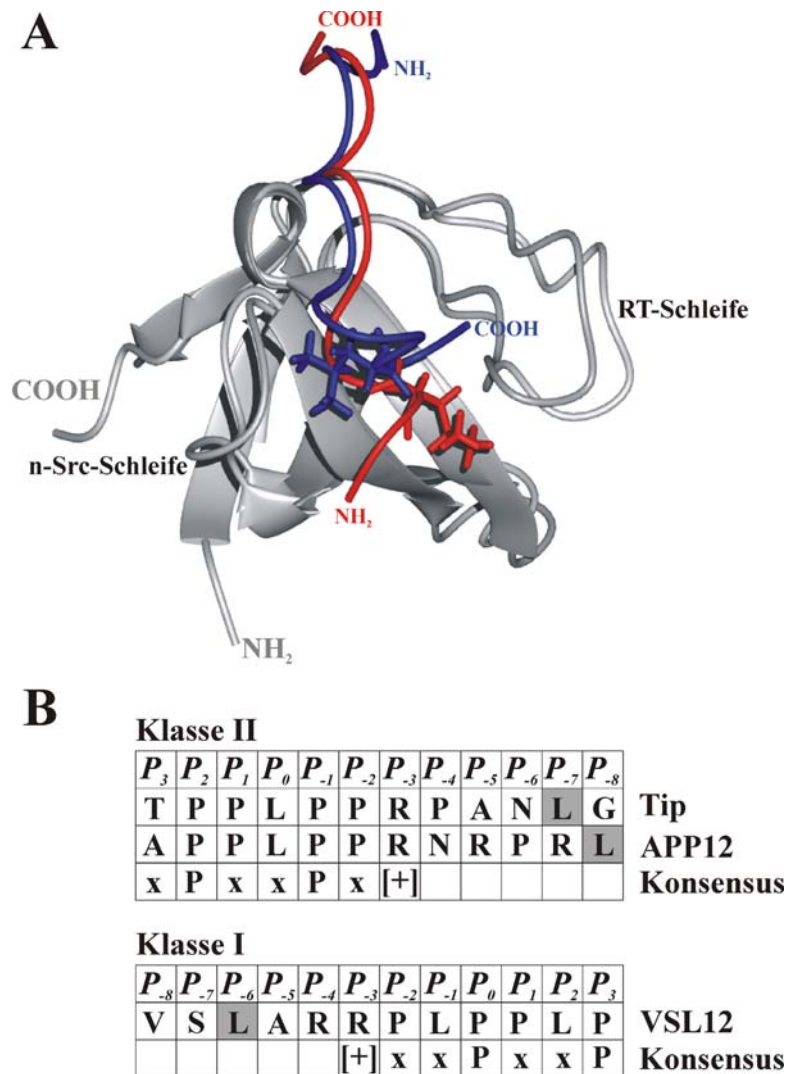


Abb. 4.43 Überlagerung der Strukturen des LynSH3-Tip mit dem SrcSH3-VSL12-Komplex (Feng *et al.*, 1995) sowie Sequenzvergleich von Tip, APP12 und VSL12. (A) Die überlagerten SH3-Domänen sind in hell- beziehungsweise dunkelgrau dargestellt. Tip (blau) als Klasse II Ligand bindet in umgekehrter Orientierung verglichen mit dem Klasse I Liganden VSL12 (rot). L186 (blaues Stäbchenmodell) bildet Kontakte zur n-Src-Schleife der LynSH3 aus, während L3 (rotes Stäbchenmodell) die RT-Schleife der SrcSH3 kontaktiert. Die Abbildung wurde mit Molmol erstellt (Koradi *et al.*, 1996). (B) Neben den Sequenzen von Tip, APP12 und VSL12 sind die Konsensi für SH3-Liganden der Klasse I und Klasse II angegeben (Feng *et al.*, 1995). Nomenklatur der Bindungsregion erfolgt nach Yu *et al.*, 1994. Leucinreste aussenhalb der Konsensussequenzen sind grau hinterlegt.

Die zentralen Reste der ersten Schleife, A184 und N185, zeigen von der Bindungsfläche weg und weisen keine NOE-Kreuzresonanzen zur LynSH3-Domäne auf. L186 und G187 in der zweiten Schleife binden hingegen in eine hydrophobe Tasche, die von den Aminosäuren H41, W44 und F57 der LynSH3 gebildet wird. Dabei liegt die lange Seitenkette von L186 direkt über dem aromatischen Ring von F57. Der Ringstromeffekt von F57 erklärt die starke Hochfeldverschiebung der Resonanzen der Seitenkettenprotonen

von L186 ($H^{\beta} = 1,03$ und $1,07$ ppm, $H^{\gamma} = 0,67$ ppm, $H^{\delta} = 0,34$ und $0,13$ ppm). Zusätzlich zeigt eine der δ -Methylgruppen NOE-Kreuzresonanzen zu H41 der n-*Src*-Schleife.

Ähnliche Kontakte eines Leucinrests an der Position P₆ wurden in der Vergangenheit für den Klasse I-Liganden VSL12 im Komplex mit der SrcSH3 beobachtet (Feng *et al.*, 1995). Als ein Ligand der Klasse I besitzt VSL12 NH₂-terminal flankierende Bereiche, die zusätzliche Kontakte zur SH3-Domäne ausbilden. Diese Bereiche kontaktieren ebenfalls die Furche zwischen RT- und n-*Src*-Schleife auf der Oberfläche der SH3-Domäne. Im Gegensatz zu Tip bilden die Reste an den Positionen P₄ bis P₆ ($^{\circ}$ RAL³) in VSL12 eine 'pseudozyklische' Struktur aus (Feng *et al.*, 1995), die zur Oberfläche der SH3-Domäne orientiert ist und nicht von ihr weg zeigt, wie A184 und N185 in Tip. Der aliphatische Teil der Seitenkette von R5 packt gegen die n-*Src*-Schleife, während A4 das Zentrum der Vertiefung ausfüllt. Die lange Seitenkette von L3 kommt, in gleicher Weise wie L186, direkt über dem aromatischen Ring von Y131 (äquivalent zu F57 der LynSH3) der SrcSH3 zu liegen. Im Gegensatz zum LynSH3-Tip-System, wo L186 die n-*Src*-Schleife kontaktiert, weist L3 im SrcSH3-VSL12-System Kontakte zur RT-Schleife auf. Ein weiterer wesentlicher Unterschied ist die Oberflächenzugänglichkeit der beiden Leucinreste. Während L3 in VSL12 nach der Bindung noch mit 52,7 % ($141,1 \text{ \AA}^2$) seiner Oberfläche Kontakt mit dem Lösungsmittel zeigt, sind es bei L186 im Tip nur 8,9 % ($23,8 \text{ \AA}^2$). Diese geringe Zugänglichkeit von L186 wird durch H41 der n-*Src*-Schleife erzielt, das eine Art Deckel über der hydrophoben Tasche aus W44 und F57 der LynSH3 (äquivalent zu W44 und Y57 in SrcSH3) darstellt. In der Studie zum SrcSH3-VSL12-Komplex haben Feng und Kollegen (1995) auch einen Klasse II-Liganden identifiziert – APP12. Auffallend ist, dass APP12 ebenso wie Tip und VSL12 ein Leucinrest COOH-terminal der PPII-Helix aufweist. Leider war aber in diesem Fall die Bestimmung der Orientierung der Leucinseitenkette mangels eindeutiger NOE-Kreuzresonanzen nicht möglich. Lediglich Änderungen der chemischen Verschiebungen der Resonanzen auf Seiten der SrcSH3 zeigten eine Beteiligung des Leucinrests in APP12 an der Bindung genau wie bei VSL12 an (Feng *et al.*, 1995).

4.6 Modellierung des LckSH3-Tip-Komplexes

Aufgrund des ungünstigen Austauschverhaltens bei der Bindung von Tip an die LckSH3, das zum Entwurf der P17G-Mutante geführt hat (Kap. 4.1), ist bisher nur die Generierung NMR-basierter Modelle mit relativ geringer Auflösung möglich gewesen (Bauer, 2001; Schweimer *et al.*, 2002; Bauer *et al.*, 2004). Weiterhin war die Kristallisation der LckSH3 mit verschiedenen Varianten des Tip-Liganden bis zu diesem Zeitpunkt nicht erfolgreich (Prof. Y. Muller, Lehrstuhl für Biotechnik, Universität Erlangen-Nürnberg, persönliche Mitteilung).

Durch die in dieser Arbeit bestimmte Lösungsstruktur des LynSH3-Tip-Komplexes (Kap. 4.5) steht zum ersten Mal eine hochaufgelöste Komplexstruktur für eine homologiebasierte Modellierung (Kap. 3.9.2) des LckSH3-Tip-Komplexes zur Verfügung.

4.6.1 Vergleich des Bindungsmodus von Tip an LckSH3 und LynSH3

Vor der Modellierung des LckSH3-Tip-Komplexes auf Basis des hochaufgelösten LynSH3-Tip-Komplexes wurde ein Vergleich der jeweils erhaltenen experimentellen Daten durchgeführt. Dies sollte sicherstellen, dass Tip auch tatsächlich auf identische Weise von LckSH3 und LynSH3 gebunden wird.

Alle bisherigen Modelle des LckSH3-Tip-Komplexes basierten aufgrund der Unzulänglichkeiten der entsprechenden NMR-Spektren nur auf einer geringen Anzahl intermolekularer Abstandsbeschränkungen aus NOE-Kreuzresonanzen (20 Stück) (Bauer, 2001; Schweimer *et al.*, 2002; Bauer *et al.*, 2004). Im Gegensatz dazu ist der Komplex aus LynSH3 und Tip mit insgesamt 124 intermolekularen Abstandsbeschränkungen sehr gut definiert (Kap. 4.5.6).

In Abb. 4.44 sind einige Schlüssel-NOE-Kreuzresonanzen des LckSH3-Tip- und LynSH3-Tip-Komplexes gegenübergestellt. Dargestellt sind die NOE-Kreuzresonanzen für die Amidprotonen der Aminosäuren T176 (erster Rest der PPII-Helix), R182 (letzter Rest und Kompassaminosäure der PPII-Helix) sowie G187 (letzte Aminosäure des erweiterten Bindungsmotivs) von Tip. Zusammen mit dem Sequenzvergleich der LckSH3 und LynSH3 (Abb. 1.1), der zeigt, dass sich W40 und F58 in LckSH3 an äquivalenter Positionen wie W44 und Y62 in LynSH3 befinden, wird aus dem Muster der intermolekularen NOE-Kreuzresonanzen einerseits die Klasse II-Orientierung von Tip auch bei LckSH3-Bindung und andererseits die Bindung des erweiterten Bindungsmotivs COOH-terminal der PPII-Helix analog zum LynSH3-Tip-Komplex bestätigt.

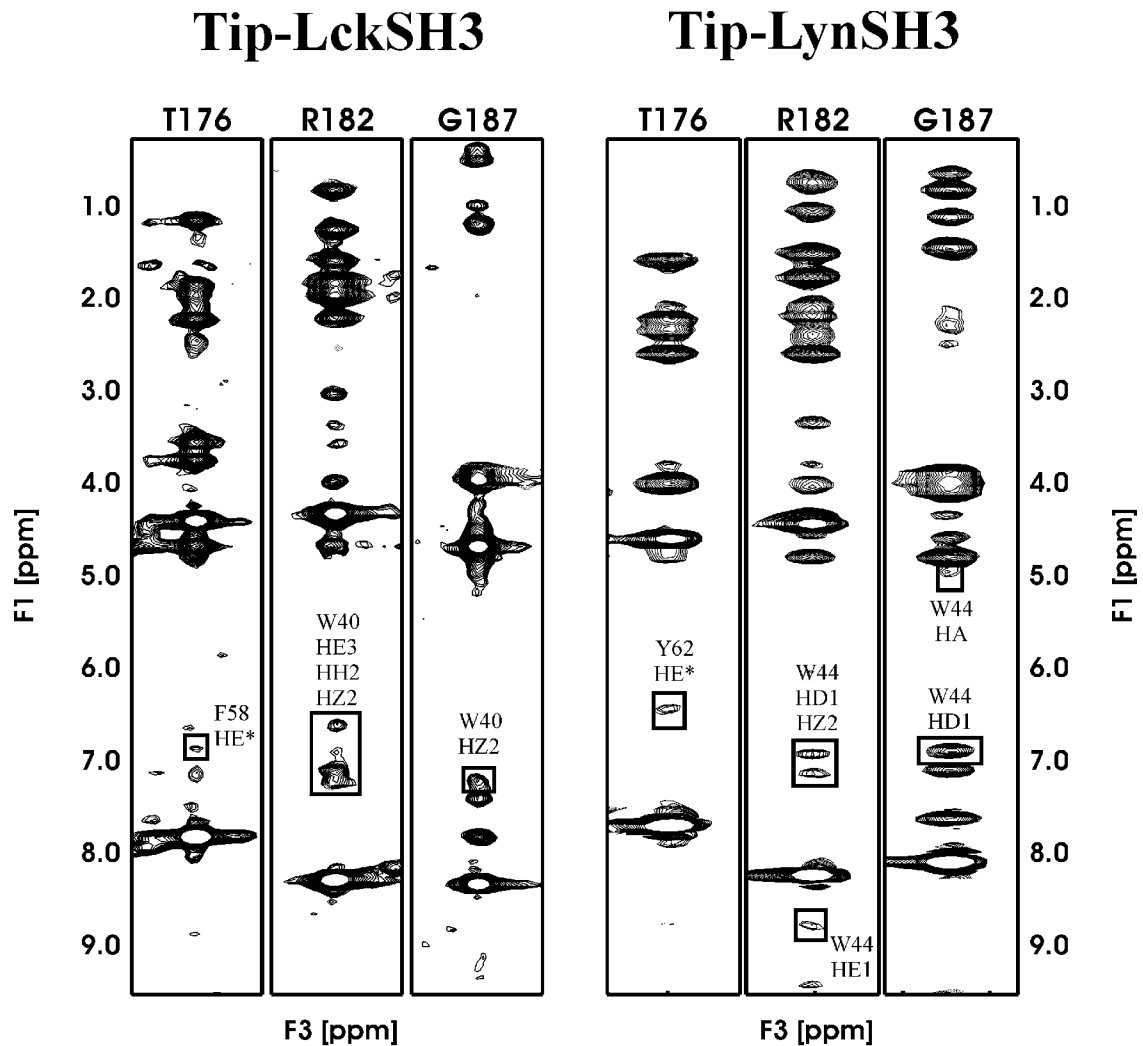


Abb. 4.44 Ausschnitte aus den ^{15}N -NOESY-HSQC-Spektren des LckSH3- ^{15}N -Tip- und LynSH3- ^{15}N -Tip-Komplexes. Die Streifen entsprechen den verschiedenen Ebenen der ^{15}N -Dimension der Amidprotonenresonanzen der Aminosäuren T176, R182 und G187 von ^{15}N -Tip(140-191). Eindeutig identifizierte intermolekulare NOE-Kreuzresonanzen sind beschriftet. Die Streifendarstellung der Tip-LckSH3-Wechselwirkungen wurde Bauer *et al.* (2004) entnommen und bearbeitet.

Die Bindung der Bereiche COOH-terminal der PPII-Helix wird auch durch den Vergleich der Werte des heteronuklearen $\{^1\text{H}\}^{15}\text{N}$ -NOEs von Tip bei LckSH3- und LynSH3-Bindung deutlich (Abb. 4.29 und 4.45). Wie schon bei der Bindung von Tip an LynSH3 zu beobachten, zeigen die Sequenzbereiche COOH-terminal der PPII-Helix ebenfalls Anzeichen geringerer Flexibilität, die auf eine gleichartige Bindungsbeteiligung schließen lassen.

Somit konnte gezeigt werden, dass Tip von LckSH3 und LynSH3 auf die gleiche Weise gebunden wird und somit LynSH3 eine geeignete Basis für die homologiebasierte Modellierung der LckSH3-Tip-Bindung darstellt.

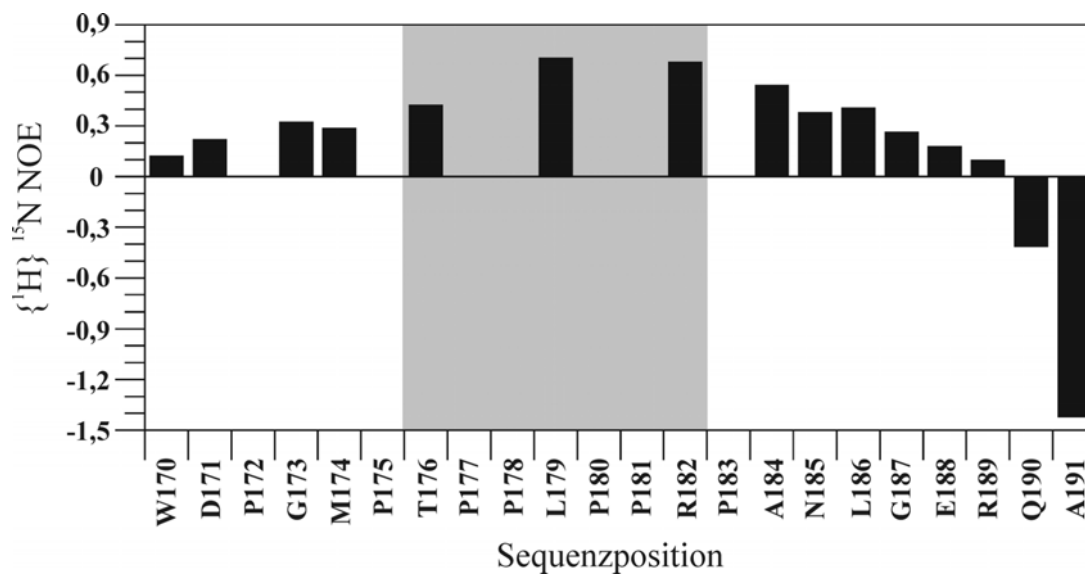


Abb. 4.45 Heteronuklearer $\{^1\text{H}\}^{15}\text{N}$ -NOE von Tip nach LckSH3-Bindung in Abhängigkeit der Sequenzposition bei 600 MHz. Der Sequenzabschnitt der Polyprolin-Helix ist grau hinterlegt. Auffallend ist die eingeschränkte Flexibilität der Aminosäuren COOH-terminal der Polyprolin-Helix. Diese liefern einen Hinweis auf eine verlängerte Bindungsregion von Tip bei der LckSH3-Erkennung und stimmen tendenziell mit dem Werten für die LynSH3-Bindung gut überein (Abb. 4.29). 1,5 mM Tip(140-191), 1,8 mM LckSH3, 80 mM K-Phosphat, 40 mM NaCl, pH 6.4.

4.6.2 Homologiemodellierung des LckSH3-Tip-Komplexes

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Tip die LckSH3 in gleicher Weise bindet wie die LynSH3 (Kap. 4.6.1) und da ein Vergleich der Sequenzen der beiden SH3-Domänen zeigt, dass sie zu 56 % identisch und zu 72 % ähnlich sind (Abb. 1.1), ist ersichtlich, dass der LynSH3-Tip-Komplex eine gute Vorlage für die Modellierung des Lck-Tip-Komplexes darstellt.

Der durch Homologiemodellierung (Kap. 3.9.2) erhaltene LckSH3-Tip-Komplex ist in Abb. 4.46 dargestellt und ist konsistent mit den zur Verfügung stehenden experimentellen Daten. Das hochaufgelöste Strukturmodell steht in guter Übereinstimmung zu (1) den intermolekularen NOE-Kreuzresonanzen zwischen Tip und LckSH3, (2) den intramolekularen NOE-Kreuzresonanzen innerhalb der LckSH3 nach Tip-Bindung (Schweimer *et al.*, 2002) und (3) den Änderungen der chemischen Verschiebungen der Resonanzen der Amidprotonen der LckSH3 bei Tip-Bindung (Schweimer *et al.*, 2002). Gleichzeitig ist ersichtlich, dass die Aminosäuren an Position 17 (Prolin oder Glycin) keine direkten Wechselwirkungen mit dem Liganden bei Bindung eingehen.

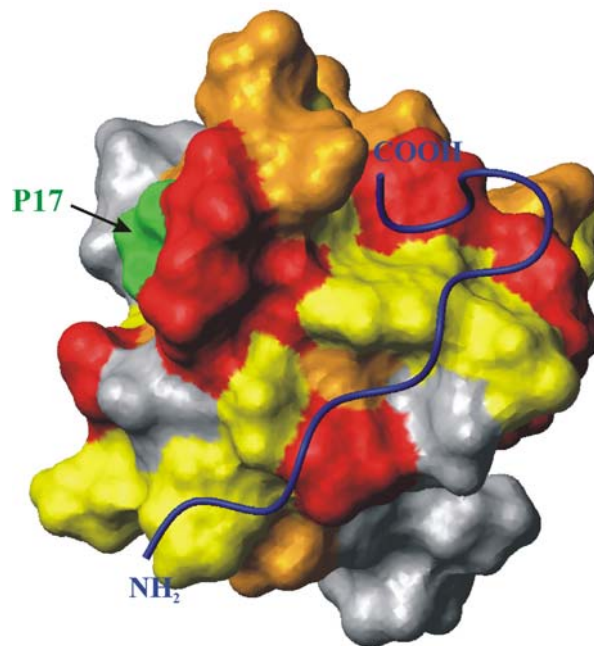


Abb. 4.46 Moleküloberflächendarstellung des Modells der LckSH3 im Komplex mit Tip. Das Proteinerückgrat von Tip(174-187) ist als Band in blau dargestellt. Die lösungsmittelzugängliche Oberfläche der LckSH3 ist in Abhängigkeit von der Änderung der jeweiligen chemischen Verschiebungen (Δ_{norm}) bei Zugabe von Tip eingefärbt: rot $\Delta_{\text{norm}} > 0,12$ ppm; orange $0,12 \text{ ppm} \geq \Delta_{\text{norm}} > 0,06$ ppm; gelb $0,06 \text{ ppm} \geq \Delta_{\text{norm}} > 0,04$ ppm; grau $\leq 0,04$ ppm. Die zugängliche Oberfläche von P17 (G17 in LckSH3_P17G) ist in grün dargestellt und verdeutlicht, dass die P17G-Mutation keine *van der Waals* Wechselwirkungen mit dem Liganden eingeht. Die Abbildung wurde mit Molmol erstellt (Koradi *et al.*, 1996).

4.6.3 Einfluss von L186 auf die Affinität zu LckSH3 und LynSH3

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Tip von LckSH3 in gleicher Weise gebunden wird wie von LynSH3 (Kap. 4.6.1), sollte der Einfluss des erweiterten Bindungsmotivs und hier vor allem der Einfluss von L186 von Tip auf die Affinität zu den beiden SH3-Domänen untersucht werden.

Zu diesem Zweck wurden die Affinitäten beider SH3-Domänen zu Tip(168-187) sowie zu einem um zwei Aminosäuren verkürzten Peptid als Negativkontrolle, Tip(168-185), mittels Tryptophanfluoreszenz verglichen (Abb. 4.47) (Kap. 3.4.4). Die so erhaltenen Bindungskonstanten betragen für die Bindung von Tip(168-187) an LynSH3 $0,8 \pm 0,1 \mu\text{M}$ und an LckSH3 $16,8 \pm 1,2 \mu\text{M}$. Entsprechende Titrations von Tip(168-185) ergaben für LynSH3 und LckSH3 Bindungskonstanten von $15,0 \pm 2,0 \mu\text{M}$ beziehungsweise $15,8 \pm 1,6 \mu\text{M}$. Während Tip(168-185) von beiden SH3-Domänen mit annähernd gleicher Affinität gebunden wird, ist durch L186 und G187 in Tip(168-187) bei LynSH3-Bindung ein signifikanter Affinitätsanstieg im Vergleich zur LckSH3 zu verzeichnen.

Betrachtet man die energetischen Unterschiede, die sich aus den unterschiedlichen Bindungskonstanten berechnen lassen, so ist zu erkennen, dass sich die Bindung von Tip(168-187) an LynSH3 und LckSH3 um 7,2 kJ/mol unterscheidet.

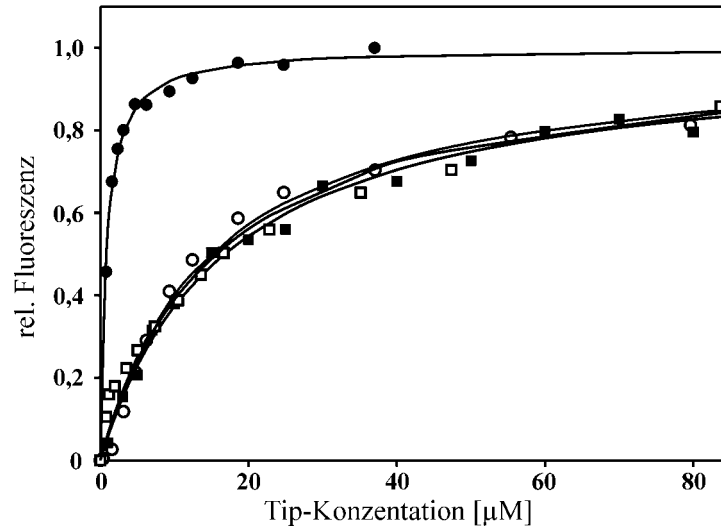


Abb. 4.47 Bestimmung des Einflusses von L186 und G187 auf die Affinität von Tip zur LynSH3 (gefüllte Symbole) und LckSH3 (offene Symbole) mittels Fluoreszenztitration. Aufgetragen sind die relativen Änderungen der Fluoreszenz der Tryptophane der SH3-Domänen bei steigenden Konzentrationen an Tip(168-185) (Kreise) und Tip(168-187) (Quadrate) zu 0,5 µM SH3 in 50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5 beobachtet bei 340 nm.

Tip wird von LckSH3 genau wie von LynSH3 als Klasse II-Ligand erkannt und sowohl über die Wechselwirkungen der PPII-Helix, als auch über Wechselwirkungen der erweiterten Bindungsregion COOH-terminal der PPII-Helix gebunden (Kap. 4.6.1). Trotzdem unterscheiden sich die Affinitäten der beiden SH3-Domänen zu Tip hinsichtlich der Anwesenheit oder Abwesenheit von L186 signifikant.

Einer der auffälligsten Unterschiede im Sequenzvergleich der beiden SH3-Domänen (Abb. 1.1) befindet sich an Position 41 der LynSH3. Während die LynSH3 mit H41 eine Art Deckel über der hydrophoben Tasche aus W44 und F57 bildet, besitzen alle anderen Mitglieder der Tyrosinkinase der Src-Familie ein Serin oder Threonin an der entsprechenden Position der SH3-Domäne. H41 bewirkt, dass L186 von Tip eine zugängliche Oberfläche von nur 23,8 Å² aufweist (Kap. 4.5.8). Im modellierten Komplex von Tip mit LckSH3 weist L186 hingegen eine Oberflächenzugänglichkeit von 114,5 Å² auf. Die Differenz in der Zugänglichkeit der Oberfläche von 90,7 Å² lässt sich in eine Differenz der freien Bindungsenergie unpolarer Gruppen (ΔG_{np}) von 5,9 kJ/mol umrechnen (Sitkoff *et al.*, 1994; Kuhn & Kollman, 2000) (Kap. 3.9.3) und stimmt damit gut mit dem

energetischen Unterschied von 7,2 kJ/mol überein, der aus den ermittelten K_D -Werten berechnet werden konnte. Ein ähnlicher Wert wird auch in der Literatur für den Transfer einer Isopropylgruppe von Wasser in eine hydrophobe *n*-Octanol-Phase beschrieben (7,4 kJ/mol; Hansch & Coats, 1970). Somit kann der beobachtete Affinitätsunterschied fast vollständig auf die unterschiedliche Oberflächenzugänglichkeit von L186 in Tip zurückgeführt werden.

Erst durch den Vergleich der hochaufgelösten LynSH3-Tip-Komplexstruktur und des hochaufgelösten Strukturmodells des LckSH3-Tip-Komplexes (Kap. 4.6.2), die eine detaillierte Interpretation erlauben, lässt sich das deutlich unterschiedliche Verhalten von LynSH3 und LckSH3 durch die Anwesenheit oder Abwesenheit von L186 und G187 in Tip erklären. Dies unterstreicht die Bedeutung hochaufgelöster Strukturen für das detaillierte Verständnis molekularer Erkennungsprozesse.

5 Diskussion

5.0 Affinität und Spezifität molekularer Erkennungsprozesse

In den vergangenen Jahren wurde eine ständig steigende Anzahl biologischer Systeme bekannt, in denen die jeweiligen Charakteristika molekularer Erkennung nicht allein durch Unterschiede in den statischen Proteinstrukturen der beteiligten Bindungspartner vollständig beschrieben werden konnten (Kap. 1.1). In diesen Fällen konnte erst eine detaillierte Betrachtung des Zusammenspiels von Struktur, Dynamik und Energetik der Bindung zu einem tieferen Verständnis der Prozesse führen. Obwohl bereits große Fortschritte auf diesem Gebiet gemacht wurden, sind die Ergebnisse meist nur in der Lage, das verwendete Modellsystem ausreichend genau zu beschreiben. Verallgemeinerungen oder Vorhersagen für andere Systeme sind aber trotz der Vielzahl verfügbarer Vorhersagemethoden (Kap. 1.1.3 bis 1.1.5) immer noch problematisch und liefern häufig falschen Vorhersagen bezüglich der Affinität molekularer Erkennung. Hieraus wird deutlich, dass wir noch weit von einem globalen Verständnis aller Facetten der molekularen Erkennung entfernt sind. Im Zeitalter der Genomik und Proteomik wird aber die (automatische) Vorhersagbarkeit und Quantifizierung von molekularen Interaktionen immer mehr an Bedeutung gewinnen und zeigt deutlich den hohen Forschungs- und Erkenntnisbedarf in diesem Bereich auf.

Aus diesem Grund sind in der vorliegenden Arbeit die Wechselwirkungen des Tip-Proteins aus *Herpesvirus saimiri* (Kap. 1.4) mit verschiedenen SH3-Domänen unter dem Aspekt der Identifizierung molekularer Faktoren, die die Affinität der Ligandenbindung beeinflussen, analysiert worden.

5.1 Initiale Charakterisierung der Bindung von Tip an LckSH3 und LynSH3

Das T-Zell-interagierende Protein Tip weist einen 37 Aminosäuren langen Sequenzbereich (L146 bis P183) auf, der für die Interaktion mit der Tyrosinkinase Lck notwendig und hinreichend ist (Kap. 1.4). Dieser Sequenzabschnitt wechselwirkt sowohl mit der SH3-Domäne, als auch mit der Kinase-Domäne der Lck (Hartley *et al.*, 2000). Da in der vorliegenden Arbeit lediglich die SH3-bindenden Eigenschaften von Tip Gegenstand der Analysen sein sollten, war eine Fokussierung auf die SH3-Bindesequenz von Tip sinnvoll, um so die Verwendung von kurzen synthetischen Peptiden zu ermöglichen. Aus Vorarbeiten war bekannt, dass Tip(168-187) deutlich stärker an die zu untersuchenden SH3-Domänen bindet als Tip(173-185), das die PPII-Helix von Tip darstellt (Schweimer *et al.*, 2002). Eine Erklärung für diesen Befund auf atomarer Ebene war nicht bekannt.

Um sicherzustellen, dass in dieser Arbeit alle SH3-Interaktionsbereiche im Liganden vorhanden sind, wurde die anfängliche Charakterisierung mit einem sehr langen, rekombinanten Tip(140-191)-Fragment durchgeführt (Kap. 4.4). Weitere Analysen erlaubten die Eingrenzung der SH3-bindenden Eigenschaften zuerst auf den Bereich Tip(167-199) und schließlich auf Tip(168-187) (Kap. 4.4.1).

Die in dieser Arbeit verwendeten synthetischen Peptide Tip(168-187) und Tip(167-199) sowie das rekombinant dargestellte Tip(140-191) weisen alle die gleichen Bindungseigenschaften auf (Kap. 4.2). Da zu keinem Zeitpunkt der Studien Einflüsse der Länge der verwendeten Fragmente von Tip auf die Ergebnisse zu verzeichnen waren, wurde wenn möglich wegen der leichteren Handhabbarkeit auf die synthetischen Peptide Tip(168-187) beziehungsweise Tip(167-199) zurückgegriffen. Für direkte Vergleiche verschiedener Tip-Interaktionspartner wurden immer die gleichen Peptidfragmente verwendet (Kap 4.2.1, 4.2.3 und 4.6.3),

Im Unterschied zu vorangegangenen Studien (Schweimer *et al.*, 2002) wurden in dieser Arbeit nur synthetische Peptide mit NH₂-terminaler Acetylierung und COOH-terminaler Amidierung verwendet. Diese Modifikation der NH₂- und COOH-Termini hat zur Folge, dass die Peptide die Eigenschaften des entsprechenden Sequenzabschnitts im Protein besser wiedergeben (Chakrabarty *et al.*, 1993; Maillere & Herve, 1997). Dies ist im vorliegenden Fall von besonders großer Bedeutung, da durch die Reduktion von Tip ein minimales Fragment identifiziert wurde, bei dem die COOH-terminale Aminosäure G187 noch Teil der Bindungsregion ist (Kap. 4.4.1). Ein freier COOH-Terminus innerhalb der Bindungsregion führt aufgrund der Ladung und ihrer pH-Abhängigkeit zu starken

Abweichungen und geringer Reproduzierbarkeit der Ergebnisse (E. Hofinger & H. Sticht, persönliche Mitteilung). Eine erneute Bestimmung der Affinitäten ergab, dass das Tip(168-187)-Fragment mit geschützten Endgruppen von der LynSH3 nicht nur mit vierfach (Schweimer *et al.*, 2002), sondern mit 20-fach höherer Affinität gebunden wird als von LckSH3 (Kap. 4.2.1).

Dieser größere Unterschied der Affinitäten steht mit dem beobachteten, unterschiedlichen Austauschverhalten auf der NMR-Zeitskala gut im Einklang. Für den LckSH3-Tip-Komplex wird überwiegend ein schnelles bis intermediäres Austauschverhalten der Amidresonanzen beobachtet (Bauer, 2001; Schweimer *et al.*, 2002; Bauer *et al.*, 2004), während beim LynSH3-Tip-Komplex überwiegend ein intermediäres bis langsames Austauschverhalten beobachtet wird (Kap. 4.4.2), das typisch für Rezeptor-Liganden Wechselwirkungen mit nanomolaren K_D -Werten ist (Lian *et al.*, 1994; Feng *et al.*, 1995). Aufgrund dieses Unterschieds im Austauschverhalten der beiden Komplexe resultiert, dass im Gegensatz zum LynSH3-Tip-Komplex der LckSH3-Tip-Komplex nicht oder nur sehr schwer mit NMR-spektroskopischen Methoden hochaufgelöst bestimmt werden kann (Bauer, 2001; Schweimer *et al.*, 2002; Bauer *et al.*, 2004). Daraus ergeben sich die beiden in dieser Arbeit verfolgten Ansätze zum Verständnis der Interaktionen von Tip bei SH3-Bindung. Zum einen sollte die Affinität der LckSH3 durch eine sich an der LynSH3 orientierenden Punktmutation gezielt erhöht werden (Kap. 5.2), zum anderen sollten die strukturellen Grundlagen der affineren LynSH3-Tip-Wechselwirkungen verstanden werden (Kap. 5.3 und 5.4).

5.2 Die P17G-Mutante der LckSH3

5.2.1 Auswahl der P17G-Mutante

Aus Arbeiten von Arold und Kollegen (1998) ist bekannt, dass höhere Affinitäten von SH3-Domänen mit größeren Flexibilitäten ihrer RT-Schleifen korreliert sind. Durch einen Sequenzvergleich der SH3-Domänen von Lck und Lyn (Abb. 1.1 B) fällt auf, dass der größte Unterschied der Sequenzen der RT-Schleife an Position 17 (beziehungsweise Position 21 nach LynSH3-Nummerierung) zu verzeichnen ist. Während die LckSH3 an Position 17 die Aminosäure Prolin mit seiner sehr eingeschränkten Rückgratflexibilität enthält, weist die LynSH3 an entsprechender Position ein flexibles Glycin auf. Zudem unterscheiden sich die beiden SH3-Domänen bezüglich ihrer Affinität zu Tip(168-187). Während LckSH3 mit einem K_D -Wert von $16,8 \pm 0,6 \mu\text{M}$ bindet, weist LynSH3 mit $0,8 \pm 0,1 \mu\text{M}$ einen deutlich niedrigeren K_D -Wert auf (Kap. 4.2.1). Aufgrund der hohen Sequenzidentität von 56 % der beiden analysierten SH3-Domänen (Abb. 1.1) ist zu vermuten, dass die deutlich höhere Affinität von LynSH3 zumindest teilweise durch eine größere Flexibilität der RT-Schleife begründet wird. Die P17G-Mutation der LckSH3 wurde ausgewählt, um diese Hypothese zu überprüfen.

Fluoreszenztitrationsexperimente konnten zeigen, dass LckSH3_P17G Tip(168-187) mit einer Bindungskonstante von $2,2 \pm 0,3 \mu\text{M}$ bindet (Kap. 4.2.1). Dies entspricht zwar einer achtfach stärkeren Bindung als LckSH3 aber immer noch eine dreifach schlechteren Bindung als LynSH3. Ebenso wie LckSH3 weist LckSH3_P17G aber im NMR-Titrationsexperiment überwiegend Amidresonanzen im schnellen oder intermediären Austausch auf (Kap. 4.2.2, Abb. 4.2). Dies hat zur Folge, dass durch die P17G-Mutation zwar der Wert der Bindungskonstante deutlich gesenkt werden konnte, die Bestimmung einer hochaufgelösten Komplexstruktur aus LckSH3_P17G und Tip genau wie für den Wildtyp nicht möglich ist.

Auch wenn keine Bestimmung einer hochaufgelösten Komplexstruktur möglich ist, machen die veränderte Ligandenbindungseigenschaften von LckSH3_P17G jedoch eine nähere Charakterisierung und einen Vergleich mit dem Wildtyp interessant.

5.2.2 Gleiche globale Struktur aber veränderte Dynamik auf verschiedenen Zeitskalen

Der Korrelationskoeffizient von 0,95 der gemessenen residualen dipolaren Kopplungen der LckSH3 und LckSH3_P17G (Kap. 4.2.6) zeigt eine gute Übereinstimmung der Orientierungen der jeweiligen Winkel der N-H^N-Bindungsvektoren. In der Literatur (Mittermaier & Kay, 2004) wird eine solche Korrelation als typisch für eine unveränderte

Tertiärstruktur genommen, was zeigt, dass die Prolin-zu-Glycin Mutation im zeitlichen Mittel keinen Einfluss auf die Gesamtstruktur der SH3-Domäne hat.

Aus dem Vergleich der Relaxationsdaten R_1 , R_2 und dem heteronuklearen $\{^1\text{H}\}^{15}\text{N}$ -NOE sowie dem daraus ermittelten Ordnungsparameter S^2 und dem R_2 -zu- R_1 -Verhältnis (Kap. 4.2.5) gehen für die fünf β -Faltblattstränge keine Änderungen der Dynamik auf der ps-ns-Zeitskala durch die P17G-Mutation hervor. Für die Schleifenbereiche unterscheiden sich die Befunde. Während einheitlich eine Zunahme der Flexibilität der RT-Schleife in direkter Nachbarschaft der Mutationsstelle angezeigt wird, zeigen der heteronukleare $\{^1\text{H}\}^{15}\text{N}$ -NOE und S^2 uneinheitliche Einflüsse auf die Flexibilität der n-*Src*- und distalen Schleife. Eine Änderung der Flexibilität auf dieser Zeitskala lässt sich auch aus der Auftragung der atomaren Fluktuationen während der MD-Simulationen erkennen (Kap. 4.2.7). Für die Bereiche der RT- und distalen Schleife sind erhöhte Fluktuationen des Rückgrats durch die Prolin-zu-Glycin Mutation zu verzeichnen, wo hingegen die Änderungen der Fluktuationen der Aminosäuren der n-*Src*-Schleife innerhalb der Standardabweichungen bleiben.

Ebenso wie auf der ps-ns-Zeitskala zeigen auf der ms-s-Zeitskala die ermittelten schnellen Austauschraten der Amidprotonen der LckSH3_P17G einen Einfluss der Mutation auf die direkte Nachbarschaft der Mutationsstelle (Kap. 4.2.4). Zusätzlich zu der unterschiedlichen Flexibilität der RT-Schleife werden auf dieser Zeitskala auch unterschiedliche Austauschraten für die 3_{10} -Helix (S56-Y58) identifiziert. Neben lokalen Auswirkungen auf die Schleifenbereiche ist durch die P17G-Mutation auch eine globale Änderung auf dieser Zeitskala zu verzeichnen. Im Verhältnis zur LckSH3 sind die Austauschraten der LckSH3_P17G näherungsweise doppelt so hoch (Abb. 4.6). Da die Proben für die entsprechenden Messungen in demselben Dialysepuffer vorbereitet wurden, ist sichergestellt, dass dieser Unterschied kein Artefakt der Messbedingungen, sondern eine Folge der P17G-Mutation ist.

Im Gegensatz zum Wildtyp der LckSH3 waren für die LckSH3_P17G keine D_2O -Austauschdaten zu erhalten (Kap. 4.2.4). Dies lässt auf der s-h-Zeitskala (ebenso wie auf der ms-s-Zeitskala) auf eine globale Änderung der dynamischen Eigenschaften durch die P17G-Mutation schließen.

Zusammenfassend betrachtet wird deutlich, dass die P17G-Mutation je nach analysierter Zeitskala unterschiedliche Einflüsse auf die SH3-Domäne ausübt. Auf den schnelleren Zeitskalen (ps-ns und ms-s) sind Änderungen der Dynamik der Schleifenbereiche zu erkennen. Änderungen auf dieser Zeitskala können eine wichtige Rolle bei den veränderten

Ligandenbindungseigenschaften spielen und werden daher im Kap. 5.2.4 eingehender beleuchtet. Auf den längeren Zeitskalen (ms-s und s-h) sind hingegen weitreichendere Änderungen der Eigenschaften der SH3-Domäne zu verzeichnen. Diese Unterschiede deuten auf eine globale Änderung der Stabilität der Domäne hin und sind Gegenstand des folgenden Kapitels.

5.2.3 Veränderte thermodynamische Stabilitäten und unterschiedliche Entfaltungswege

Da die Effekte der P17G-Mutation nicht nur lokal auf die RT-Schleife der LckSH3_P17G beschränkt sind, sondern auf längeren Zeitskalen (ms-h) globale Änderungen der Dynamik bewirken (Kap 5.2.2), wurde im Vergleich zum Wildtyp eine Destabilisierung der SH3-Domäne durch die Punktmutation erwartet. Daher wurden die beiden Domänen auf ihre thermodynamische Stabilität untersucht (Kap. 4.2.8). Aus den CD-Schmelzkurven ergaben sich Mittelpunktstemperaturen (T_M) von $55,8 \pm 0,6$ °C und $46,3 \pm 1,7$ °C für die LckSH3 und LckSH3_P17G, gleichzeitig konnte eine Destabilisierung von $3,7 \pm 1,4$ kJ/mol durch die P17G-Mutation ermittelt werden (Kap. 4.2.8).

Zusätzlich wurde die thermische Entfaltung der LckSH3 und LckSH3_P17G moleküldynamisch bei 498 K simuliert (Kap. 4.2.9), um den Entfaltungsweg genauer zu charakterisieren. Faltungs- und Entfaltungsprozesse von Proteinen ereignen sich üblicherweise auf einer Zeitskala von Mikrosekunden bis Minuten. Diese Zeitskala ist für eine moleküldynamische Simulation der entsprechenden Prozesse deutlich zu lang. Aus diesem Grund werden thermische Entfaltungen von Proteinen üblicherweise bei 498 K simuliert, wie zum Beispiel für BPTI (Daggett & Levitt, 1993), Ubiquitin (Alonso & Daggett, 1995, 1998), SrcSH3 (Tsai *et al.*, 1999; Grantcharova & Baker, 1997; Grantcharova *et al.*, 2000; Gsponer & Caflisch, 2001). Binnen weniger Nanosekunden verlieren die meisten Proteine bei 498 K ihre native Struktur, ein Zeitraum, der durch MD-Simulationen in explizitem Wasser zugänglich ist. Durch Studien konnte gezeigt werden, dass diese extreme Erhöhung der Temperatur lediglich die Geschwindigkeit, aber nicht die Gesamtcharakteristik und die Reihenfolge der Ereignisse der Entfaltungsprozesse beeinflusst (Day *et al.*, 2002). Weiterhin stehen bestimmte Charakteristika, wie das Übergangszustandsensemble der Strukturen und das entfaltete Ensemble, in guter Übereinstimmung mit experimentellen Ergebnissen (Day & Daggett, 2003).

Als Beobachtungsvariable wurde analog zu früheren Studien (Lazaridis & Karplus, 1997; Gsponer & Caflisch, 2001) der Anteil nativer C^α -Kontakte Q gewählt. Durch die Hochtemperatursimulation (Kap 3.8.2) ist zwar die Bestimmung eines spezifischen

Schmelzpunktes beziehungsweise einer Mittelpunktstemperatur nicht möglich; was ein intrinsisches Problem dieser Simulationsmethode darstellt (Day & Daggett, 2003). Die durchschnittliche Simulationsdauer bis zur vollständigen Entfaltung ($Q < 0,1$) korreliert aber für LckSH3 mit 10,5 ns und für LckSH3_P17G mit 8,5 ns gut mit den Messungen der CD-Schmelzkurven. Die Simulation bis zur vollständigen Entfaltung der LckSH3-Domänen mit ihrer höheren Mittelpunktstemperatur dauerte im Schnitt 19 % länger als die der LckSH3_P17G.

Neben der Beobachtung der reinen Dauer der Entfaltung ermöglichte die MD-Simulation Aussagen über einzelne Schritte entlang des Entfaltungswegs (Day & Daggett, 2003). Die Differenz der Kontaktverlustkarten der beiden SH3-Domänen verdeutlicht, dass vor allem die Kontakte E16/S18, G17/L23 und Y15/E26 der RT-Schleife in der Mutante zu einem deutlich früheren Punkt auf dem Entfaltungsweg verloren gehen, als dies beim Wildtyp der Fall ist (Abb. 4.17). Dies korreliert sehr gut mit den höheren Austauschraten der Amidresonanzen (Kap. 4.2.4) sowie den niedrigeren Werten des heteronuklearen $\{^1\text{H}\} ^{15}\text{N}$ -NOEs (Kap. 4.2.5) der P17G-Mutante für diesen Bereich, die auf erhöhte Flexibilität schließen lassen. Überraschender ist die Tatsache, dass die Verluste der Kontakte zwischen den Faltblattsträngen $\beta 2/\beta 3$ und $\beta 3/\beta 4$, die bei kinetischen Betrachtungen als die stabilsten gelten (Martinez & Serrano, 1999; Riddle *et al.*, 1999; Grantcharova *et al.*, 2000), bei der Mutante deutlich später im Entfaltungsweg zu verzeichnen sind (Abb. 4.17). Aufgrund der geringeren thermischen Stabilität der LckSH3_P17G (Kap. 4.2.4) wäre zu erwarten gewesen, dass diese Elemente ihren nativen Kontakte früher verlieren. Um diese Befund eingehender zu untersuchen, wurden $Q_{\beta 234}$ als Teilmenge der C^α Kontakte des zentralen Faltblatts ($\beta 234$) definiert. Eine zweidimensionale Auftragung der Häufigkeiten von $Q_{\beta 234}$ gegen $Q_{\text{nicht-}\beta 234}$ (Abb. 4.18) erlaubt eine übersichtlichere vergleichende Darstellung der Entfaltungswege der LckSH3 und LckSH3_P17G.

Im Fall der LckSH3_P17G bleiben im ersten Schritt der Entfaltung nahezu alle nativen C^α -Kontakte des zentralen Faltblatts intakt ($> 80 \%$), während die Kontakte außerhalb des zentralen Bereichs kontinuierlich abnehmen. Erst ab einem Wert von $Q_{\text{nicht-}\beta 234} \approx 0,2$ verliert das Faltblatt $\beta 234$ seinen Zusammenhalt. Dies steht in Übereinstimmung zum klassischerweise beobachteten Entfaltungsweg von SH3-Domänen (Borreguero *et al.*, 2002). Zuerst werden aufgrund der Flexibilität der RT-Schleife die Kontakte von selbiger und der benachbarten Faltblattstränge $\beta 1$ und $\beta 2$ sowie zwischen $\beta 4$ und der RT-Schleife aufgebrochen. Erst deutlich später gehen die Kontakte von $\beta 234$ verloren.

Bei den MD-Simulationen der LckSH3 ist vornehmlich (in vier von sechs Fällen) ebenfalls dieser Entfaltungsweg erkennbar (Abb. 4.18). In zwei weiteren Simulationen ist hingegen ein alternativer Entfaltungsweg zu beobachten.

Nachdem die Kontakte der terminalen Faltblattstränge $\beta 1$ und $\beta 5$ sowie Teile der RT-Schleife aufgebrochen waren, blieben die restlichen Kontakte der RT-Schleife sowie die Kontakte zwischen $\beta 1$ und $\beta 2$ erhalten. Erst nachdem die Kontakte des zentralen Faltblatts verloren waren, entfalteten als letzte noch verbliebene Elemente regulärer Sekundärstruktur auch die Faltblattstränge $\beta 1$ und $\beta 2$. Während aus der Literatur unterschiedliche Entfaltungswege für die Faltblattstränge des zentrale Faltblatt der α -SpectrinSH3- und SrcSH3-Domäne bekannt sind ($\beta 2/\beta 3$ vor $\beta 3/\beta 4$ und umgekehrt; Gsponer & Caflisch, 2001), ist die Beobachtung der Entfaltung über ein Entfaltungsintermediat $\beta 1/\beta 2$ neu. Eine mögliche Erklärung könnte die geringere Flexibilität der RT-Schleife des Wildtyps darstellen. Sie bewirkt, dass das Wasserstoffbrückennetzwerk der RT-Schleife zumindest teilweise erhalten bleibt. Dieser Erhalt der Schleifenstruktur stabilisiert die Wechselwirkungen zwischen den Faltblattsträngen $\beta 1$ und $\beta 2$ derart, dass ihre Kontakte erst nach denen des zentralen Faltblatts verloren gehen. Wird durch die P17G-Mutation die Flexibilität der RT-Schleife erhöht, fallen die stabilisierenden Effekte für $\beta 1/\beta 2$ weg und LckSH3_P17G entfaltet nach dem klassischen Weg, wie von Borreguero *et al.* (2002) beschrieben. P17 scheint in der LckSH3 als eine Art stabilisierender Anker zu wirken, der die Entfaltung der RT-Schleife verzögert.

5.2.4 Eine veränderte Dynamik verschiebt das konformationelle Gleichgewicht in LckSH3_P17G vor der Bindung

Durch die P17G-Mutation kommt es in LckSH3_P17G zu Änderungen der Dynamik der Schleifenbereiche, die Einfluss auf die Ligandenbindungseigenschaften haben können (Kap. 5.2.2). Durch schnelle Mischmethoden (*stopped-flow*) konnten die Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation und Dissoziation der wildtyp LckSH3-Tip(168-187)-Bindung zu $k_{on} = 3,5 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und $k_{off} = 132 \text{ s}^{-1}$ ermittelt werden (Kap. 4.2.3). Eine entsprechende quantitative Bestimmung der kinetischen Parameter der LckSH3_P17G-Tip-Bindung war nicht möglich, da die Reaktion deutlich schneller abläuft. Die Verminderung der eingesetzten Proteinkonzentrationen ermöglichte jedoch zumindest die Verlangsamung der Reaktion, sodass sie über einen Zeitraum größer als 2 ms (Totzeit des Geräts) ablief. Eine weitere Absenkung der Ligandenkonzentration war aber nicht

möglich, da ansonsten die Amplitude des resultierenden Signals nicht mehr signifikant vom Rauschen unterschieden werden kann (Abb. 4.5). Somit waren die Beiträge der P17G-Mutation auf die Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation und Dissoziation nur qualitativ abzuschätzen.

Theoretisch berechnete Kurven, die die achtfach stärkere Bindung (Kap. 4.2.1) ausschließlich aufgrund der Änderung eines der Parameter von k_{on} oder k_{off} wiedergeben, sind nicht mit den gemessenen Werten in Einklang zu bringen (Abb. 4.5). Dies bedeutet, dass sowohl die Geschwindigkeitskonstante der Assoziation, als auch die der Dissoziation durch die P17G-Mutation beeinflusst werden.

Eine langsamere Dissoziation des LckSH3_P17G-Tip-Komplexes wäre nur auf der Basis hochaufgelöster Strukturen der Komplexe des Wildtyps und der Mutante zu klären. Diese stehen aber weder durch NMR-spektroskopische (Kap. 5.2.1), noch durch röntgenkristallografische Methoden (Prof. Y. Muller, Lehrstuhl für Biotechnik, Universität Erlangen-Nürnberg, persönliche Mitteilung) zur Verfügung. Aus diesem Grund ist nur die Analyse der veränderten Geschwindigkeitskonstante der Assoziation durch die P17G-Mutation Gegenstand dieser Arbeit.

Die Assoziation eines Komplexes kann auf zwei Arten beschleunigt werden. Einerseits können durch Mutationen zusätzliche langreichweitige elektrostatische Wechselwirkungen begünstigt werden (*encounter complex*), andererseits kann ein höhere Population der 'bindungsaktiven' Konformation dazu führen, dass die Begegnungen von Rezeptor und Ligand häufiger zur Bindung führen (Selzer *et al.*, 2000). Da sowohl Prolin als auch Glycin kleine, neutrale Aminosäuren sind, können zusätzliche elektrostatische Effekte für den Unterschied der Affinität ausgeschlossen werden. Somit bleibt eine höhere Abtastrate (*sampling*) der 'bindungsaktiven' Konformation als Erklärungsansatz für die schnellere Assoziation.

Aus Kap. 5.2.2 ist ersichtlich, dass die P17G-Mutation eine Änderung der Dynamik in den Schleifenbereichen der LckSH3 auf einer schnellen Zeitskala (ps-ns) bewirkt. Dieser experimentelle Befund ist konsistent mit den Daten der atomaren Fluktuationen aus Moleküldynamiksimulationen (Kap. 4.2.7). Gleichzeitig ist aus der Überlagerung der Strukturen der Clusteranalyse der MD-Simulationen und der Schar der NMR-Strukturen der LckSH3 ersichtlich, dass in den moleküldynamischen Simulationen ein nur geringfügig größerer Konformationsraum abgetastet wird, der im Mittel gut mit den experimentellen Randbedingungen der NMR-Struktur übereinstimmt (Abb. 4.11). Im Unterschied zu den experimentellen Daten, liefern die MD-Simulationen aber Ergebnisse mit atomaren Details

sowohl für den LckSH3-Wildtyp, als auch für die Mutante. Somit stellen MD-Simulationen eine geeignete Methode zur weiterführenden Analyse der strukturellen und dynamischen Eigenschaften der beiden Domänen vor Ligandenbindung dar.

Ausgehend von der LynSH3-Tip-Komplexstruktur (Kap. 4.5.6) wurde der LckSH3-Tip-Komplex modelliert und die Bindungsregion sowie die 'bindungsaktive' Konformation definiert (Kap. 4.6.2 und Kap. 4.2.7). Nachfolgend wurden alle Schnappschüsse der MD-Simulationen der freien SH3-Domänen auf die Erfüllung der 'bindungsaktiven' Konformation untersucht. Unabhängig von den verwendeten Toleranzkriterien nimmt die LckSH3_P17G die 'bindungsaktive' Konformation im gleichen Zeitraum doppelt so oft ein wie der Wildtyp (Abb. 4.14).

Neben diesen Beobachtungen auf der ps-ns-Zeitskala ist natürlich nicht auszuschließen, dass auch veränderte Dynamiken auf anderen Zeitskalen die Population der 'bindungsaktiven' Konformation zusätzlich beeinflussen. Diese sind aber mit theoretischen oder experimentellen Methoden momentan kaum auf atomarer Ebene analysierbar (Hansson *et al.*, 2002).

Zusammenfassend betrachtet ist davon auszugehen, dass aufgrund der elektrostatisch neutralen P17G-Mutation die schnellere Assoziation des Liganden an LckSH3_P17G primär durch die erhöhte Flexibilität der Bindungsregion erklärt werden kann. Die größere Häufigkeit, mit der die Bindungsregion der LckSH3_P17G die 'bindungsaktive' Konformation einnimmt, lässt darauf schließen, dass das konformationelle Gleichgewicht zwischen bindender und nicht bindender Population durch die P17G-Mutation beeinflusst wird. Im Vergleich zum Wildtyp bewirkt die Punktmutation eine Verschiebung des Gleichgewichts hin zur bindenden Konformation.

5.2.5 Einfluss von Proteinflexibilität auf Protein-Liganden Wechselwirkungen

Aus NMR-spektroskopischen Charakterisierungen und moleküldynamischen Analysen der LckSH3 und LckSH3_P17G ist erkennbar, dass die höhere Affinität des Tip Liganden zu LckSH3_P17G zumindest teilweise durch das konformationelle Gleichgewicht der freien SH3-Domänen vor der Bindung beeinflusst wird (Kap. 5.2.4). Die Punktmutation P17G bewirkt in LckSH3_P17G eine Verschiebung dieses Gleichgewichts hin zu einer größeren Population der 'bindungsaktiven' Konformation, die mit einer schnelleren Assoziationsrate korreliert.

Der Einfluss von konformationellen Gleichgewichten auf die Bindungskinetik ist für verschiedene Systeme in der Literatur beschrieben worden, wie Thrombin (Engh *et al.*,

1996), cAMP-abhängige Proteinkinase (Pradde *et al.*, 1997), Östrogenrezeptor (Brzozowski *et al.*, 1997), Aldosereduktase (Urzhumtsev *et al.*, 1997; Davis *et al.*, 1999), Thymidylatsynthase (Fritz *et al.*, 2001), HIV-1 Protease (Perryman *et al.*, 2004; Wartha *et al.*, 2005) sowie eine Faktor Xa-Bindungsstelle inseriert in murines und bovines Trypsin (Rauh *et al.*, 2004). Im letzteren Fall waren Rauh und Kollegen (2004) sogar in der Lage, unterschiedliche Substrukturen zu kristallisieren und ihre Häufigkeit mit den jeweiligen Affinitäten zu korrelieren, da die Energiebarrieren für die Konformationsänderungen zwischen den einzelnen Substrukturen in diesem Fall sehr groß sind.

Im Fall der Thymidylatsynthase führte eine detaillierte Betrachtung der Flexibilität einzelner Bereiche innerhalb und außerhalb der Bindungsregion zur Entwicklung eines speziesspezifischen Thymidylatsynthaseinhibitors, ungeachtet der sehr hohen Konserviertheit der einzelnen Thymidylatsynthasen auf Sequenzebene (Fritz *et al.*, 2001). Erst kürzlich lieferten Perryman und Kollegen (2004) durch vergleichende MD-Simulationen des Wildtyps und der medikamentenresistenten V82F/I84V Variante der HIV-1 Protease eine Erklärung für die deutlich niedrigere Affinität der Doppelmutante. Die Autoren konnten eine Verschiebung des konformationellen Gleichgewichts von der so genannten geschlossenen Konformation des nicht ligandengebundenen Wildtyps hin zu einer semi-offenen Struktur der Mutante zeigen und somit einen neuartigen Resistenzmechanismus identifizieren (Perryman *et al.*, 2004).

Aus zahlreichen Studien ist bekannt, dass Flexibilität auch bei SH3-Domänen integraler Aspekt der Proteinfunktion ist (Arold *et al.*, 1997; Arold *et al.*, 1998; Horita *et al.*, 2000; Ferreon & Hilser, 2003; Ferreon *et al.*, 2003; Dutta *et al.*, 2004). Für die c-SH3 von Sem-5-SH3 konnte gezeigt werden, dass die RT-Schleife durch ihre ausgeprägte Flexibilität eine Vielzahl von Konformationen einnehmen kann (Ferreon & Hilser, 2003), sodass vor der Bindung eines Liganden ein konformationelles Gleichgewicht besteht. Weiterhin konnten Ferreon und Hilser (2003) zeigen, dass die Bindung eines Peptidliganden die Flexibilität der RT-Schleife und mit ihr die Vielzahl an möglichen Konformationen reduziert, die RT-Schleife aber eine gewisse Flexibilität behält. Daraus resultiert eine zweigeteilte Bindungsstelle der Sem-5-SH3, bestehend aus einer starren Gerüststruktur auf der einen Seite und einer flexiblen Oberfläche (RT-Schleife) auf der anderen. Weiterhin spekulieren die Autoren, dass die konformationelle Variabilität der flexiblen Komponente der Bindungsregion ein interessanter Angriffspunkt für die Änderung von Affinität oder Spezifität der SH3-Domäne darstellen könnte. Diese

Vermutung konnte hier für LckSH3 durch die P17G-Mutante bestätigt werden (Kap. 5.2.4).

5.3 Komplexstruktur von LynSH3-Tip

Aus eigenen Vorarbeiten ist bekannt, dass die LynSH3-Domäne im Komplex mit Tip für die NMR-spektroskopische Strukturbestimmung deutlich günstigere Voraussetzungen bietet als der LckSH3-Tip-Komplex (Bauer, 2001; Schweimer *et al.*, 2002; Bauer *et al.*, 2004). Das überwiegend intermediäre bis langsame Austauschverhalten der chemischen Verschiebungen der Amidresonanzen im LynSH3-Tip-Komplex (Kap 4.4.2) ließ die Bestimmung einer hochaufgelösten Komplexstruktur realistisch erscheinen. Daher sollte in dieser Arbeit die LynSH3-Tip-Kontakte im Detail analysiert und mit den LckSH3-Tip-Kontakten verglichen werden. Dabei wurde die Vorgehensweise bei der Strukturbestimmung so gewählt, dass eine möglichst optimale Automatisierung bei der späteren Gewinnung der Abstandsbeschränkungen möglich war.

5.3.1 Hochaufgelöste Struktur der freien LynSH3

Zu Beginn dieser Arbeit war die Struktur der freien LynSH3 noch nicht bekannt. Daher wurde im Rahmen der Aufklärung der LynSH3-Tip-Komplexstruktur zuerst die LynSH3-Struktur in Abwesenheit des Liganden gelöst (Kap. 4.3.9). Dazu konnten insgesamt 764 experimentelle Randbedingungen identifiziert werden (Tab. 4.2; Kap. 4.3.4 bis 4.3.8), die eine sehr hohe Auflösung der Struktur erlaubten (Rückgrat-RMSD-Wert $0,25 \pm 0,08 \text{ \AA}$). Die Anordnung der Elemente regulärer Sekundärstrukturen sowie der flexiblen Schleifenbereiche zwischen ihnen (Abb. 4.24 B, 4.26 A & B) entspricht der klassischerweise bekannten Anordnung für SH3-Domänen der Src-Familie (Kap. 1.2.1). Eine Überlagerung der gemittelten Strukturen der LynSH3 sowie der LckSH3 (PDB: 1h92; Schweimer *et al.*, 2002) lässt ein hohes Maß an Übereinstimmung, besonders in den Bereichen regulärer Sekundärstrukturen, erkennen (Abb. 4.27).

5.3.2 Initiale Charakterisierung der Bindungsregionen von Tip zeigt die Beteiligung flankierender Bereiche an der Bindung

Der Bestimmung der Komplexstruktur wurde eine initiale Charakterisierung aller direkt an der Bindung beteiligten Regionen vorangestellt (Kap. 4.4).

Aus der sehr guten Korrelation der residualen dipolaren Kopplungskonstanten der freien und ligandenbebundenen LynSH3 (Abb. 4.35) kann im Einklang zur Literatur (Mittermaier & Kay, 2004) geschlossen werden, dass die räumliche Struktur der SH3-Domänen bei Ligandenbindung nur geringfügig variiert.

Neben den wenigen Abweichungen der residualen dipolaren Kopplungskonstanten ändern

sich auch die dynamischen Eigenschaften der SH3-Domäne bei Ligandenbindung nur geringfügig (Abb. 4.34; Kap. 4.4.3). Dabei sind kleine strukturelle Änderungen auf die Ligandenbindungsregion beschränkt. Die beobachteten kleineren Änderungen der Dynamikdaten (Abb. 4.34) sind primär auf die veränderte Masse nach Ligandenbindung zurückzuführen (Kay *et al.*, 1989).

Insgesamt lassen die Werte des heteronuklearen $\{^1\text{H}\}^{15}\text{N}$ -NOEs sowie des Ordnungsparameters S^2 (Abb. 4.34) eine leichte Abnahme der Flexibilität durch die Bindung des Liganden erkennen, die typisch für SH3-Domänen ist (Ferreon & Hilser, 2003; Dutta *et al.*, 2004). Die maßgeblich an der Ligandenbindung beteiligten Aminosäuren wurden über die normierten Verschiebungen ihrer ^1H -, ^{13}C - und ^{15}N -Resonanzen identifiziert (Kap. 4.4.2). Im Gegensatz zur Auswertung der Verschiebungen des ^1H , ^{15}N -HSQC-Titrationsexperiments (Abb. 4.30) ist diese Vorgehensweise deutlich aufwendiger, da sie die vollständige Zuordnung aller Resonanzen im freien und gebundenen Zustand voraussetzt. Dafür liefert sie aber auch Aussagen über Proline und Aminosäuren, bei denen lediglich die Resonanzen der Seitenketten Änderungen bei der Ligandenbindung erfahren. Die größten Änderungen ergaben sich für die aromatischen Aminosäuren der Bereiche der RT- und n-Src-Schleife sowie die 3_{10} -Helix zwischen $\beta 4$ und $\beta 5$ (Abb. 4.31) und sind konsistent mit der Literatur (Larson & Davidson, 2000).

Ebenfalls konnten die Interaktionsstellen von Tip ermittelt werden (Kap. 4.4.1). Sie befinden sich in der PPII-Helix, aber auch in den NH_2 - und vor allem COOH -terminal angrenzenden Sequenzbereichen (Abb. 4.29).

Diese initiale Charakterisierung der Bindungsregionen zusammen mit dem Befund, dass in LynSH3 keine größeren strukturellen Änderungen bei Ligandenbindung auftreten, ermöglichte eine schnelle und gezielte Automatisierung bei der Gewinnung experimenteller Randbedingungen für die Berechnung der Komplexstruktur.

5.3.3 Der LynSH3-Tip-Komplex – der erste SH3-Ligandenkomplex der Gruppe B der Src-Familie

Insgesamt konnten 1031 experimentelle Randbedingungen für den LynSH3-Tip-Komplex gewonnen werden (Tab. 4.3; Kap. 4.5.1 bis 4.5.5). Die daraus resultierende Komplexstruktur stellt die erste hochaufgelöste Struktur eines Komplexes einer SH3-Domäne der Gruppe B der Familie der Src-Kinasen (Kap. 1.3) überhaupt dar (Kap. 4.5.6). Sowohl die Struktur des Liganden als auch die Struktur der SH3-Domäne

konnten durch die gewonnenen experimentellen Randbedingungen gleichermaßen gut definiert werden. Beide Teile weisen isoliert betrachtet, genau wie der Gesamtkomplex, eine mittlere Abweichung der schweren Rückgratátome von 0,34 Å auf (Tab. 4.3) und ermöglichen so die Identifizierung atomarer Details der Wechselwirkung.

5.3.4 Die PPII-Helix von Tip bindet in einer Typ II-Orientierung

Der Bereich der PPII-Helix (T176-R182) ist durch die starke konformationelle Einschränkung der vier enthaltenen Proline mit einer mittleren Abweichung der Atomkoordinaten der schweren Rückgratátome von 0,22 Å überdurchschnittlich gut definiert (Tab. 4.3; Abb. 4.36 A). Wie für zahlreiche anderen SH3-Liganden-Wechselwirkungen bekannt ist (Feng *et al.*, 1995; Larson & Davidson, 2000; Schweimer *et al.*, 2002; Bauer *et al.*, 2004), findet die Bindung der PPII-Helix hauptsächlich über hydrophobe Kontakte der Proline mit aromatischen Seitenketten der SH3-Domäne statt. Ein Teil der Wechselwirkungsenergien ergibt sich aus einer eher unkonventionellen C-H \cdots π Wechselwirkung zwischen den Atomen der Pyrrolidinringe der Proline und den Ringelektronen der Aromaten (Bhattacharyya & Chakrabarti, 2003). Im vorliegenden Fall kann aufgrund der berechneten Geometrien der Tip-LynSH3-Interaktionen bei P177-Y17 und P177-Y62 sowie P180-W44 von dieser Art der Wechselwirkung ausgegangen werden (Abb. 4.40 A). Dies liefert eine gute Erklärung für die extrem hohe Konserviertheit dieser Aminosäuren (Abb. 1.1 B und 1.5) im Laufe der Evolution.

Während diese Wechselwirkung der Proline mit den aromatischen Seitenketten der SH3-Domäne keinen Einfluss auf die Orientierung des Liganden haben, besitzt Tip im Bereich der PPII-Helix mit R182 eine so genannte Kompassaminosäure (Kap. 1.2.1), die die Orientierung des Liganden relativ zur SH3-Domäne vorgibt (Lim *et al.*, 1994). Abhängig von NH₂- oder COOH-terminaler Positionierung dieses meist hochkonservierten Arginins (oder Lysins) bindet der Ligand in einer Klasse I- oder Klasse II-Orientierung (Abb. 1.2). Für den LynSH3-Tip-Komplex konnte durch NOE-Abstandsbeschränkungen eindeutig die Klasse II-Orientierung des Liganden nachgewiesen werden (Abb. 4.44). Die Ausbindung einer Salzbrücke zwischen R182 von Tip und D26 von LynSH3 konnte nur über eine Kombination der verwendeten biophysikalischen Methoden mit theoretischen Moleküldynamiksimulationen in explizitem Wasser identifiziert werden, da die Abstände der durch NMR-Spektroskopie beobachtbaren Protonen der Salzbrücke zu groß sind (Kap. 4.5.5).

5.3.5 Bindung der COOH-terminal flankierenden Bereiche von Tip

Bereits in früheren Studien wurden neben dem Oberflächenbereich für die Erkennung der Polyprolinhelix über die Rolle benachbarter Oberflächenbereiche der SH3-Domänen und deren Bindung flankierender Sequenzen des Liganden diskutiert (Feng *et al.*, 1995; Dutta *et al.*, 2004), allerdings existieren diesbezüglich kaum strukturelle Daten.

Durch den LynSH3-Tip-Komplex (Kap. 4.5.6) konnte gezeigt werden, dass im herpesviralen Tip-Protein dieser flankierende Sequenzabschnitt direkt COOH-terminal an die PPII-Helix grenzt und die Aminosäuren P183 bis G187 umfasst. Diese Reste aus Tip bilden eine Doppelschleife aus, die mit L186 in eine hydrophobe Furche aus H41, W44 und F57 der LynSH3 zwischen RT- und n-Src-Schleife packt (Abb. 4.36 B, 4.40 B und 4.42). Der LynSH3-Tip-Komplex stellt dabei die erste hochaufgelöste Struktur dar, die für eine Klasse II-Orientierung Kontakte des Liganden zu dieser hydrophoben Tasche zeigt.

Die Positionierung von L186 direkt über dem aromatischen Ring von F57 konnte anhand zahlreicher eindeutiger NOE-Kreuzresonanzen identifiziert werden und liefert gleichzeitig eine gute Erklärung für die ausgeprägte Hochfeldverschiebung der Seitenkettenresonanzen der aliphatischen Aminosäure (Kap. 4.5.8).

Im Gegensatz zu L186 sind für die Aminosäuren A184 und N185, die zentralen Reste der ersten Schleife der Doppelschleifenstruktur, keine intermolekularen NOE-Kreuzresonanzen auffindbar. Beide Aminosäuren zeigen von der Bindungsfläche weg und weisen keine Interaktionen mit der SH3-Domäne auf (Abb. 4.42). Nichtsdestotrotz sind ihre Positionen, ebenso wie ihre sequenzielle Umgebung, hochgradig konserviert (Abb. 1.5).

Die große Bedeutung der Interaktionen dieser Sequenzbereiche und vor allem von L186 und G187 aus Tip mit der LynSH3 wird besonders durch die signifikant geringere Affinität von Tip(168-185), der um L186 und G187 verkürzten Variante von Tip(168-187), als Negativkontrolle deutlich (Kap. 4.6.3).

5.4 Interaktionen des LckSH3-Tip-Komplexes

5.4.1 Tip wird von LckSH3 und LynSH3 in gleicher Weise gebunden

Aus vorangegangenen Arbeiten (Bauer, 2001; Schweimer *et al.*, 2002; Bauer *et al.*, 2004) ist bekannt, dass eine hochaufgelöste Lösungsstruktur des LckSH3-Tip-Komplexes aufgrund des dynamischen Austauschverhaltens an die Grenzen der aktuellen NMR-Methodik stößt. Durch die P17G-Mutante der LckSH3 konnte zwar die Affinität erhöht werden (Kap. 4.2.1), eine Verbesserung der NMR-Spektren war aber nicht zu erkennen (Kap. 4.2.2). Ebenfalls ohne Erfolg waren die Versuche, LckSH3 oder LckSH3_P17G in Gegenwart von Tip zu kristallisieren (Prof. Y. Muller, Lehrstuhl für Biotechnik, Universität Erlangen-Nürnberg, persönliche Mitteilung). Aus diesem Grund wurde der LckSH3-Tip-Komplex auf der Basis des LynSH3-Tip-Komplexes modelliert (Kap. 4.6.2). Durch die 72 %-ige Sequenzähnlichkeit zwischen LckSH3 und LynSH3, die für die Bindungsregion (Definition siehe Kap. 4.2.7) sogar auf 88 % anwächst (Abb. 1.1), stellt die LynSH3 eine geeignete Vorlage für die Modellierung dar (Kap. 1.1.4).

Darüber hinaus konnte aus den Vergleichen der NOE-Muster (Abb. 4.44) sowie der Werte für den heteronuklearen $\{^1\text{H}\}^{15}\text{N}$ -NOE von Tip sowohl bei LynSH3-, als auch bei LckSH3-Bindung (Abb. 4.29 und 4.45) ein ähnliches Verhalten abgeleitet werden. Ebenso wie bei der Bindung an die LynSH3 zeigt Tip bei LckSH3-Bindung eine deutliche Zunahme der Rigidität des COOH-terminal flankierenden Bereichs der PPII-Helix, der die Aminosäuren P183 bis G187 umfasst. Für die chemischen Verschiebungen der Resonanzen von L186 in Tip konnte bei Bindung an LckSH3, genau wie bei Bindung an LynSH3 eine identische Hochfeldverschiebung festgestellt werden (Bauer, 2001; Kap. 4.5.8), die durch die Ringstromeffekte der Aromaten W40 und F53 (LckSH3) beziehungsweise W44 und F57 (LynSH3) verursacht werden, die die hydrophobe Tasche auf der Oberfläche der SH3-Domäne bilden (Abb. 4.40 und 1.1). Unterschiede bei der Bindung ergeben sich lediglich bezüglich des Grads der Lösungsmittelzugänglichkeit des Rests L186 von Tip, auf die in Kap. 5.4.2 näher eingegangen wird. Somit konnte gezeigt werden, dass Tip von LckSH3 in gleicher Weise gebunden wird wie von LynSH3.

5.4.2 Erweiterung der Bindungssequenz für Liganden der SH3-Domänen der Src-Familie

Nachdem gezeigt werden konnte, dass sowohl LckSH3 als auch LynSH3 als Vertreter der SH3-Domänen der Src-Familie den Leucinrest an Position 186 von Tip in gleicher Weise erkennen, stellte sich die Frage, ob ähnliche Interaktionen schon für andere SH3-Liganden-

Komplexe beobachtet werden konnten.

Feng und Kollegen waren 1995 in der Lage, eine hochaufgelöste NMR-Struktur der SrcSH3 (Gruppe A der Src-Familie; Kap. 1.3) mit dem Klasse I-Liganden VSL12 (VSLARRPLPPLP) aufzuklären. Im Vergleich zu Tip bindet VSL12 als Klasse I-Ligand in umgekehrter Orientierung, wobei das NH₂-terminal der PPII-Helix lokalisierte L3 eine ähnliche Position zwischen RT- und n-Src-Schleife der SH3-Domäne einnimmt, wie L186 in Tip (Abb. 4.43). Im Gegensatz zu L186, das die n-Src-Schleife kontaktiert, bindet allerdings L3 in Richtung der RT-Schleife. Zusammen mit der Struktur von SrcSH3 mit VSL12 wurde auch die Struktur von SrcSH3 mit APP12 (APPLPPRNRPRL) gelöst (Feng *et al.*, 1995). Für APP12, mit seiner Tip-analogen Klasse II-Orientierung, konnte keine definierte Struktur des Bereichs COOH-terminal der PPII-Helix bestimmt werden, da keine intermolekularen NOE-Kreuzresonanzen eindeutig zugeordnet werden konnten. Die Analyse der chemischen Verschiebungen der Amidresonanzen von SrcSH3 bei APP12-Zugabe zeigten jedoch auf, dass genau wie bei den Tip-Interaktionen mit LckSH3 (Abb. 4.44) und LynSH3 (Abb. 4.30) auch bei der APP12-SrcSH3-Interaktion zusätzliche COOH-terminal flankierende Ligandenbereiche der SH3-Bindung beteiligt sind (Feng *et al.*, 1995).

Interessanterweise besitzt APP12 an ähnlicher Sequenzposition wie L186 in Tip ebenfalls einen Leucinrest (L12). Genau wie bei der Bindung von Tip an LynSH3 und LckSH3 ($K_D = 0,8 \mu\text{M}$ und $16,8 \mu\text{M}$) (Abb. 4.1) unterscheiden sich VSL12 und APP12 bei SrcSH3-Bindung ($K_D = 8 \mu\text{M}$ und $59 \mu\text{M}$) deutlich in ihren Affinitäten (Feng *et al.*, 1995). In beiden Fällen waren nur für den jeweils stärker bindenden Liganden eindeutige Zuordnungen von NOE-Kreuzresonanzen und somit die Bestimmung einer hochaufgelösten Struktur möglich. Die jeweils schwächer bindenden Liganden liefern hingegen nur indirekte Befunde für die Bindung der flankierenden Bereiche (Feng *et al.*, 1995; Abb. 4.29, 4.30, 4.44 und 4.47).

Genau wie L186 bei LckSH3-Tip (Kap. 4.6.3) haben L12 bei SrcSH3-APP12 und L3 bei SrcSH3-VSL12 keinen nennenswerten Einfluss auf die Affinität des Liganden zu der entsprechenden SH3-Domäne (Feng *et al.*, 1995). Zusammengenommen legen diese Resultate den Schluss nahe, dass möglicherweise die Bindungssequenz für Liganden der SH3-Domänen der Src-Familie von 'RxLPPxP' für die Klasse I- und 'xPPLPxR' für die Klasse II-Orientierung (Feng *et al.*, 1995) auf 'LxxRxLPPxP' beziehungsweise 'xPPLPxRx(3,4)L' erweitert werden sollte, wobei 'x' jede beliebige Aminosäure darstellen kann. Das zusätzliche Leucin scheint dabei weniger eine Rolle für die Affinität des

Liganden, als vielmehr für die korrekte Orientierung relativ zur SH3-Domäne zu spielen.

5.4.3 Mögliche Funktion der Bereiche der erweiterten Bindungssequenz

Ein Unterschied zwischen LckSH3 und LynSH3 stellt ihre Affinität zu den Peptiden Tip(168-187) und Tip(168-185) dar (Kap. 4.6.3). Während Tip(168-187) durch die Anwesenheit von L186 und G187 deutlich stärker an LynSH3 bindet als Tip(168-185), zeigt LckSH3 keinen signifikanten Unterschied bezüglich der jeweiligen Affinitäten (Abb. 4.45). Eine mögliche Erklärung stellt H41 der LynSH3 dar. Alle anderen SH3-Domänen der Mitglieder der Src-Familie weisen an strukturell ähnlicher Position ein Serin oder Threonin auf (Abb. 1.1 B). Histidin an dieser Position kann als Deckel über der hydrophoben Tasche aus W44 und F57 fungieren und L186 bei Bindung fast vollständig der Lösungsmittelzugänglichkeit entziehen (Kap. 4.6.4). Die Differenz der Bindungsenthalpien von Tip(168-187) und Tip(168-185) bei LynSH3-Bindung stimmt gut mit dem theoretischen Werten überein, die sich aus dem Transfer einer Leucinseitenkette in eine unpolare Umgebung ergeben. Dies zeigt, dass hier der dominante Effekt für die Affinitätssteigerung identifiziert werden konnte und weitere strukturelle Aspekte nur eine untergeordnete Rolle spielen.

L186 in Tip hat im Gegensatz zur LynSH3-Bindung bei der LckSH3 keinen signifikanten Einfluss auf die Affinität. Trotzdem konnte gezeigt werden, dass die Bindung von L186 in ähnlicher Weise erfolgt (Kap. 4.6.2). Somit ist zu vermuten, dass L186 in Tip in seiner Funktion weniger die Affinität zu seinem Zielprotein modulieren soll, als vielmehr eine zweite Kompassaminosäure für eine zusätzliche Positionierung und richtige Orientierung des Liganden relativ zur SH3-Domäne der Lck als seinem physiologischen Zielprotein darstellt.

Aus der Komplexstruktur von Tip mit der LynSH3-Domäne ist nicht ersichtlich, dass A184 und N185 spezifische Interaktionen eingehen (Kap. 5.3.5), die ihr hohes Maß an Konserviertheit in verschiedenen Tip-Isolaten (Ensser *et al.*, 2003) erklären würden. Die Visualisierung der Lage von Tip in einem hypothetischen Komplex mit der geschlossenen Konformation der Gesamt-Lck zeigt eine Überlagerungen mit den Aminosäuren E234, D235 und E236 der Kinase-Domäne (Abb. 5.1). Diese sterischen Konflikte zwischen den Aminosäuren A184 und N185 von Tip und den Aminosäuren E234 bis E236 der Lck-Kinase könnten zu einem schnelleren Verlust der intramolekularen Kontakte der Lck-Domänen und somit zu einer schnelleren Überführung in den offenen, aktiven Zustand (Kap. 1.3; Abb. 1.4) der Kinase bei Ligandenbindung führen. L186 könnte mit

R182 (Kompassaminosäure, Kap. 1.2.1) eine bedeutende Rolle bei der Positionierung der Doppelschleifenstruktur (P183-G187) haben. Ein solcher Mechanismus könnte ein Grund für die hohe Konserviertheit des gesamten Sequenzabschnitts sein, der sich allein aus der Komplexstruktur mit der SH3-Domäne nicht erklären lässt.

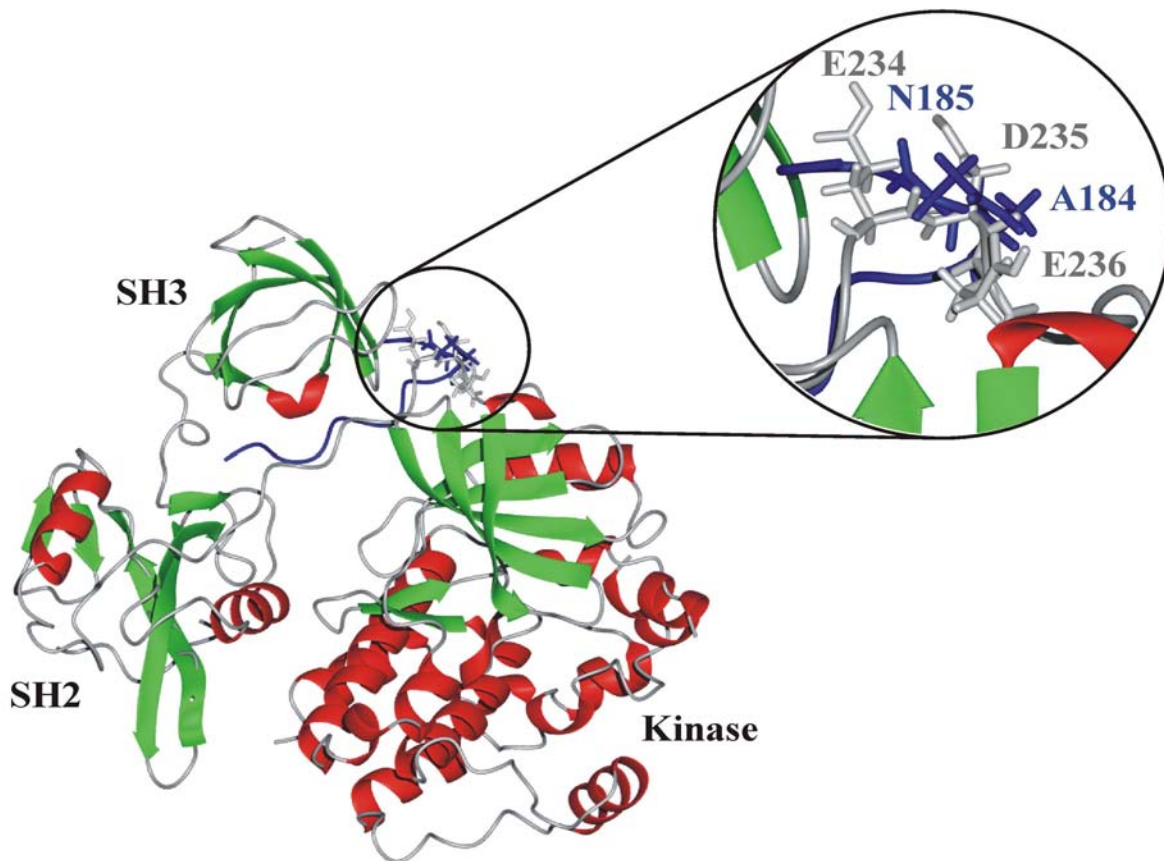


Abb. 5.1 Überlagerungen des LckSH3-Tip-Komplexes mit der LckSH3 der geschlossenen Konformation der Gesamt-Lck. Das Strukturmodell der Lck-Kinase wurde auf Basis der Struktur der Hck-Kinase (PDB: 1qcf; Schindler *et al.*, 1999) mithilfe des Programms Swiss-Model (Kap. 3.9.2; Guex & Peitsch, 1997) erstellt. Die Lck-Kinase ist in Form einer schematischen Darstellung der regulären Sekundärstrukturelemente und Tip(175-188) als blaue Schleifendarstellung wiedergegeben. Der sterische Konflikt der Aminosäuren A184 und N185 von Tip mit E234, D235 und E236 der Lck sind als Stäbchenmodell gezeigt und in der Vergrößerung beschriftet. Die Abbildung wurde mit Molmol erstellt (Koradi *et al.*, 1996).

5.4.4 Rolle flankierender Bereiche bei klassischen Bindungsmotiven

Die Erweiterung der Bindungssequenzen für Liganden der SH3-Domänen der Src-Familie hebt die Bedeutung der Aminosäuren außerhalb der PPII-Helix hervor (Kap. 5.4.2). Dieser Befund unterstützt die Beobachtung, dass SH3-Domänen spezifisch Interaktionen mit Sequenzbereichen außerhalb der prolinreichen Kernstücke ihrer Liganden ausbilden

können (Feng *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1996; Ghose *et al.*, 2001; Fazi *et al.*, 2002; Dutta *et al.*, 2004) und somit Wechselwirkungen über eine so genannte erweiterte Bindungsstelle eingehen.

Das dies nicht nur auf die SH3-Domänen der Src-Familie beschränkt sein muss, geht aus Selektionsversuchen mit Phagenbibliotheken für Abp1-SH3-Liganden hervor (Fazi *et al.*, 2002). In dieser Studie sind Liganden isoliert worden, die dem Konsensus '[+]xxxPxxPx[+]PxxL' gehorchen ('[+]' entspricht 'R' oder 'K'). Neben der Besonderheit, dass die prolinreiche Sequenz von zwei positiv geladenen Resten flankiert wird, fällt auf, dass genau wie bei Tip und APP12 ein Leucinrest COOH-terminal der positiv geladenen Aminosäure strukturell ähnlich zu R182 in Tip und R7 in APP12 als invariant identifiziert wurde.

Für die Wechselwirkung von CskSH3 mit PEP (*proline-enriched tyrosine phosphatase*) konnte kürzlich ebenfalls eine Wechselwirkung COOH-terminaler Bereiche der PPII-Helix nachgewiesen werden (Ghose *et al.*, 2001). Genau wie bei LynSH3-Tip oder LckSH3-Tip binden hydrophobe Reste (I625 und V626 bei PEP) des Liganden in eine hydrophobe Tasche zwischen RT- und n-Src-Schleife der SH3-Domäne.

Erweiterungen der klassischen Bindungsmotive sind aber nicht nur für SH3-Domänen, sondern auch für zahlreiche andere Protein-Protein-Wechselwirkungen beobachtet worden, unter anderem für PDZ-Domänen (Milewski *et al.*, 2005) für *activated protein C* (APC) und Faktor Va (Gale *et al.*, 2002), für Integrine und RGD-enthaltende Proteine (Li *et al.*, 2003), für den nukleären Hormonrezeptor und LxxLL-Motive (Coulthard *et al.*, 2003) und für EVH1 Domänen und prolinreiche Sequenzen (Ball *et al.*, 2002). Ein gut charakterisiertes Beispiel stellen in diesem Zusammenhang auch die Src-Homologie 2 (SH2)-Domänen dar (Gay *et al.*, 1997; Furet *et al.*, 1998; Bradshaw *et al.*, 1999; Verkhrivker *et al.*, 2002).

Eine der ersten bestimmten Strukturen einer SH2-Domäne mit entsprechendem Liganden war SrcSH2 mit einem moderat bindenden Phosphotyrosinliganden (Waksman *et al.*, 1992). Aus dieser Struktur erkannte man, dass der phosphorylierte Tyrosinrest (*poY*) von einer spezifischen Tasche auf der Oberfläche der SH2 Domäne, der so genannten Phosphotyrosinbindungstasche, aufgenommen wird. Aus dem Vergleich der Kristallstrukturen der nah verwandten SH2 Domänen von Src und Lck im Komplex mit dem Peptid *poYEEI*, wurde der Einfluss flankierender Sequenzbereiche auf die Bindung deutlich (Waksman *et al.*, 1992; Waksman *et al.*, 1993). Neben der Bindung des Phosphotyrosins in die Phosphotyrosinbindungstasche, die durch ein komplexes Netzwerk

an Wasserstoffbrückenbindungen und elektrostatischen Wechselwirkungen stabilisiert wird, erfolgt eine Bindung des Isoleucins, drei Positionen COOH-terminal von *poY* (*poY*+3), in eine hydrophobe Tasche (Waksman *et al.*, 1993). Aus diesem Grund wird die Interaktionsfläche von SH2 Domänen als “*two-holes socket*” und das entsprechende Bindungsmotiv des Liganden als “*two-pronged plug*” bezeichnet (Kuriyan & Cowburn, 1997). Die Bindung des Phosphotyrosinrests liefert dabei nur rund 50 % der Bindungsenergie, der Rest wird von Interaktionen der flankierenden Bereiche gestellt (Bradshaw *et al.*, 1999), wobei diese nicht zwangsläufig über die Position *poY*+3, sondern auch über *poY*+2 oder *poY*+5 maßgeblich realisiert werden können (Gay *et al.*, 1997).

5.5 Mechanismen molekularer Erkennung

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Mechanismen molekularer Erkennung, die die unterschiedlichen Affinitäten des Tip-Proteins aus *Herpesvirus saimiri* zu drei homologen SH3-Domänen bestimmen.

Die Affinität eines Liganden zu einem Rezeptor setzt sich aus zwei Beiträgen zusammen. Eine Komponente ist dabei die Geschwindigkeitskonstante der Assoziation (k_{on}). Sie gibt in Abhängigkeit der Zeit und der vorliegenden Konzentrationen wieder, wie viele Begegnungen zwischen Ligand und Rezeptor zur Ausbildung des Komplexes führen. Ihr gegenüber gibt die Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation (k_{off}) an, wie oft der Komplex aus Rezeptor und Ligand in einem bestimmten Zeitintervall durchschnittlich zerfällt. Der Quotient aus beiden Komponenten ($k_{off} / k_{on} = K_D$) gibt folglich die Affinität des betrachteten Komplexes wieder.

Eine effektive Vorhersage molekularer Interaktionen (qualitative Vorhersagen) aber noch vielmehr die Vorhersage von Affinitäten von molekularen Erkennungsprozessen (quantitative Vorhersagen) sind momentan noch schwer zu treffen (Kap. 1.1). Aktuelle Methoden liefern oft mehr als 10 % falsch-positive Treffer und über 40 % falsch-negative Treffer (Littler & Hubbard, 2005). Daher ist ersichtlich, dass in zukünftige Methoden beide affinitätsbestimmende Beiträge berücksichtigt werden müssen.

Die vergleichende Analyse der P17G-Mutante der LckSH3-Domäne mit ihrem Wildtyp stellt in dieser Arbeit ein Modellsystem für die Bestimmung des Effekts einer geänderten Assoziationsrate auf die Affinität dar (Kap. 4.2). Durch eine Kombination von experimentellen NMR-spektroskopischen Befunden (Kap. 4.2.4 bis 4.2.6) und theoretischen moleküldynamischen Simulationen (Kap. 4.2.7) konnte gezeigt werden, dass die P17G-Punktmutation zu einer Erhöhung der Flexibilität der an der Bindung beteiligten Schleifenbereiche der LckSH3_P17G führt. Diese erhöhte Flexibilität bewirkt ein häufigeres Abtasten der 'bindungsaktiven' Konformation und somit eine schnellere Assoziation des Komplexes (Kap. 4.2.7). Dieser Effekt lässt sich aus der alleinigen Betrachtung einer statischen Struktur nicht ableiten. Weiterhin wird deutlich, dass die Vorhersage von Affinitäten allein auf der Basis von Komplexstruktur mit Ungenauigkeiten behaftet sein kann, da Faktoren wie zum Beispiel konformationelle Flexibilität der einzelnen Komponenten naturgemäß nicht in die Betrachtung einfließen können. Aus diesem Grund wird in Zukunft für die korrekte Vorhersage von Affinitäten neben der Analyse des ausgebildeten Komplexes eine Analyse der einzelnen Komponenten im ungebundenen Zustand erforderlich sein.

Der Darstellung und Analyse der LckSH3_P17G war ein Sequenzvergleich der LynSH3 und LckSH3 vorausgegangen. Das Vorkommen eines Prolins in der RT-Schleife der LckSH3 und eines Glycins an entsprechender Stelle der LynSH3 führte zu der Annahme, dass die RT-Schleife der LynSH3 flexibler als die der LckSH3 sein und sich somit die unterschiedlichen Affinitäten erklären ließen (Kap. 5.2.1). Vergleicht man aber die experimentell festgestellten Flexibilitäten der RT-Schleifen (Abb. 4.7 und 4.34), so fällt auf, dass sie sich nur marginal unterscheiden und keine Erklärung für die unterschiedlichen Affinitäten darstellen. Dadurch wird ersichtlich, dass der Unterschied der Affinitäten des Tip-Proteins zu LynSH3 und LckSH3 (Kap. 4.2.1) nicht durch eine Änderung des Assoziationsverhaltens erklärt werden kann.

Der Vergleich der Komplexe der LynSH3 (Kap. 4.3.9) und LckSH3 (Kap. 4.6.2) mit Tip stellt in dieser Arbeit im Gegensatz zur P17G-Mutante der LckSH3 somit ein Modellsystem zur Analyse struktureller Eigenschaften auf die Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation dar. Voraussetzung für quantitative Analysen von Dissoziationsraten sind hochaufgelöste Komplexstrukturen (Kap. 1.1). Nur sie erlauben Aussagen über unterschiedliche Details molekularer Wechselwirkungen. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit die hochaufgelöste Struktur des LynSH3-Tip-Komplexes aufgeklärt (Kap. 4.3.9). Aufgrund ungünstigerer dynamischer Bedingungen konnte für den LckSH3-Tip-Komplex nur ein Strukturmodell erstellt werden (Kap. 4.6), dessen Qualität zwar für eine qualitative Analyse der Interaktionen und die Identifizierung der Beteiligung eines erweiterten Bindungsmotivs ausreicht, nicht jedoch für eine quantitative Berechnung der Wechselwirkungsenergien, wie sie für eine Bestimmung der Dissoziationsrate nötig wäre.

Zusammenfassend betrachtet konnte durch diese Arbeit verdeutlicht werden, dass ein erhöhter Bedarf an Informationen über die Rolle der Proteinflexibilität und über die Rolle einzelner Aminosäuren – außerhalb von klassischen Bindungsmotiven – für die Analyse der Mechanismen molekularer Erkennung besteht. Um Protein-Protein-Interaktionen qualitativ und quantitativ besser vorhersagen zu können, müssen diese Daten als Datenbasis Eingang in Vorhersagealgorithmen finden. Die vorliegende Arbeit soll hier auch einen Beitrag zur Vergrößerung dieser Datenbasis darstellen.

6 Zusammenfassung

Die Wechselwirkungen des Tip-Proteins aus *Herpesvirus saimiri* mit der T-Zell-spezifischen Kinase Lck sind entscheidend für die Aktivierung der Kinaseaktivität und nehmen somit eine zentrale Rolle bei der T-Zell-Transformation ein. Bis heute war es weder durch Röntgenkristallografie, noch durch NMR-Spektroskopie möglich, eine hochaufgelöste Struktur des LckSH3-Tip-Komplexes zu erhalten. Dies ist einerseits auf das Fehlen geeigneter Kristalle und andererseits auf eine ungünstige Dynamik der Komplexbildung bezüglich der NMR-Zeitskala zurückzuführen.

Eine Möglichkeit zur Vermeidung solcher Probleme, ist die Verwendung von stärker bindenden Interaktionspartnern, die sich oft besser für strukturelle Studien eignen. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit sowohl der Komplex von Tip mit LynSH3 charakterisiert, als auch eine Punktmutante der LckSH3 entworfen, die eine höhere Affinität zu Tip aufweist. Die Strukturinformationen, die aus der Charakterisierung dieser Systeme erhalten werden konnten, sollten als Basis für eine zuverlässige Modellierung des LckSH3-Tip-Komplexes dienen.

Die LynSH3 wurde untersucht, da sie neben der nahen Verwandtschaft zu LckSH3 auch eine höhere Affinität zu Tip aufweist. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der LynSH3-Tip-Komplex durch seine deutlich günstigere Komplexdynamik besser für die NMR-spektroskopische Charakterisierung geeignet ist. Ausgehend von einem Sequenzvergleich der LckSH3 und LynSH3 wurde eine P17G-Punktmutation in die RT-Schleife der LckSH3 eingeführt. Diese sollte für eine größere Flexibilität der RT-Schleife sorgen und somit die Affinität zu Tip erhöhen.

Obwohl LckSH3_P17G Tip mit nahezu gleicher Affinität bindet wie LynSH3, unterscheiden sich beide Komplexe bezüglich ihres Austauschverhaltens auf der NMR-Zeitskala erheblich. Dies hatte zur Folge, dass die Bestimmung der Struktur des LckSH3_P17G-Tip-Komplexes nicht möglich war. Weitere Analysen ergaben, dass die im Vergleich zur LckSH3 erhöhten Ligandenaffinitäten von LynSH3 und LckSH3_P17G auf unterschiedlichen Mechanismen basiert, obwohl beide SH3-Domänen einen Glycinrest an strukturell ähnlicher Position in der RT-Schleife aufweisen und somit ursprünglich ein identischer Mechanismus erwartet worden war.

Die im Vergleich zur wildtyp LckSH3 um nahezu eine Zehnerpotenz stärkere Bindung von LckSH3_P17G konnte durch Fluoreszenztitrationen und durch Analysen mit schnellen Mischmethoden zumindest teilweise auf eine schnellere Komplexbildung zurückgeführt

werden.

Eine detaillierte Erklärung dieses Unterschieds auf struktureller Ebene konnte durch Moleküldynamiksimulationen des Wildtyps und der Mutante der LckSH3 erhalten werden. So korreliert die schnellere Komplexbildung der Mutante gut mit einer stärkeren Population der 'bindungsaktiven' Konformation während des Simulationszeitraums.

Dabei zeichnet sich LckSH3_P17G nicht nur durch eine erhöhte konformationelle Abtastrate der 'bindungsaktiven' Konformation aufgrund gesteigerter RT-Schleifenflexibilität aus, sondern zeigt eine Zunahme der Gesamtflexibilität der SH3-Domäne im ps-s-Bereich auf. Weiterhin konnten durch die Analyse der thermischen Entfaltung mittels CD-Spektroskopie und MD-Simulationen bei hoher Temperatur eine globale Destabilisierung und ein veränderter Entfaltungsweg für die P17G-Mutante der LckSH3 gezeigt werden.

Der LynSH3-Tip-Komplex konnte in hoher Auflösung mit einer mittleren quadratischen Abweichung der Atomkoordinaten des Proteinrückgrats von 0,34 Å durch NMR-Spektroskopie bestimmt werden. Die auf 1031 experimentellen Randbedingungen basierende Struktur stellt die erste hochaufgelöste Struktur einer SH3-Domäne der Gruppe B der Src-Familie mit einem natürlichen Liganden in Klasse II-Orientierung dar. Analysen der Komplexstruktur ergaben, dass nicht nur die Prolinhelix, die bekannterweise Interaktionen mit SH3-Domänen ausbildet, sondern auch zusätzliche COOH-terminal flankierende Reste an der Bindung beteiligt sind. Eine besondere Rolle nimmt dabei L186 aus Tip ein. Es bindet in eine hydrophobe Tasche aus H41, W44 und F57 auf der Oberfläche der LynSH3.

Ausgehend von der LynSH3-Tip-Komplexstruktur konnte unter der Einbeziehung NMR-spektroskopischer Daten der LckSH3-Tip-Wechselwirkungen ein molekulares Modell des LckSH3-Tip-Komplexes erstellt werden. Obwohl die Bindung von L186 in die hydrophobe Tasche auf der Oberfläche für beide SH3-Domänen experimentell nachgewiesen werden konnte, zeigten Fluoreszenztitrationsexperimente mit einem verkürzten Tip-Peptid, dass L186 aus Tip nur im Komplex mit LynSH3 einen signifikanten Einfluss auf die Affinität hat. Weitere Untersuchungen ergaben, dass L186 bei Bindung in die hydrophobe Tasche der LynSH3 nahezu vollständig von H41 bedeckt wird. Das Serin an strukturell ähnlicher Position in LckSH3 bedeckt hingegen nur einen kleinen Teil von L186.

Die Differenz der gemessenen freien Bindungsenergien zwischen LynSH3 und LckSH3

bei Tip-Bindung kann nahezu quantitativ durch die theoretisch berechnete Differenz der freien Energien aufgrund der unterschiedlichen Lösungsmittelzugänglichkeit der Oberfläche von L186 aus Tip erklärt werden.

Daher bieten die außerhalb des klassischen Bindungsmotiv liegenden zusätzlichen hydrophoben Wechselwirkungen zwischen H41 aus LynSH3 und L186 aus Tip eine gute Erklärung für die stärkere Tip-Bindung von LynSH3 verglichen mit LckSH3. Die zusätzlichen Wechselwirkungen senken die Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation des Komplexes, was in guter Übereinstimmung mit dem unterschiedlichen Austauschverhalten auf der NMR-Zeitskala steht.

Eine Erklärung für die starke Konserviertheit von L186 in Tip-Isolaten von verschiedenen herpesviralen Stämmen ergibt sich aus dem strukturellen Vergleich mit anderen hoch affinen SrcSH3-Liganden-Komplexen. Diese weisen häufig ebenfalls ein Leucin an ähnlicher Position außerhalb der Kernbinderegion auf. Diese Konserviertheit, zusammen mit der Tatsache, dass L186 keinen maßgeblichen Einfluss auf die Affinität des LckSH3-Tip-Komplexes hat, legt die Vermutung nahe, dass dieser Leucinrest eher die Rolle einer zusätzlichen Kompassaminosäure bei der SH3-Bindung einnimmt. Er könnte helfen, die korrekte Orientierung des Liganden relativ zur SH3-Domäne sicherzustellen.

Diese Beobachtung legt eine Erweiterung der Bindungssequenz für die Liganden der SH3-Domänen der Src-Familie mit Klasse I- und Klasse II-Orientierung auf 'LxxRxLPPxP' beziehungsweise 'xPPLPxRx(3,4)L' nahe. Die Verlängerung der Bindungssequenzen soll die Wichtigkeit von flankierenden Sequenzbereichen klassischer Bindungsmotive bei molekularen Erkennungsprozessen unterstreichen.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit neben der Aufklärung der molekularen Grundlagen der Wechselwirkungen der LckSH3 mit dem herpesviralen Tip-Protein gezeigt werden, dass Affinität auch bei sehr nahe verwandten Proteinen auf unterschiedliche Weise erzielt werden kann. Weiterhin unterstreichen die Ergebnisse dieser Arbeit die Notwendigkeit der gleichzeitigen Charakterisierung der Struktur und Dynamik makromolekularer Interaktionen. Erst dieses kann zu einem detaillierteren Verständnis der Mechanismen molekularer Erkennung und darauf aufbauend zukünftig zu verlässlicheren Vorhersagen von molekularen Interaktionen führen.

7 Summary

The interaction of the herpesviral Tip protein with the T-cell specific kinase Lck is critical for kinase activation, thus playing a decisive role in T-cell transformation. Up to present, both X-Ray crystallography and NMR-spectroscopy failed to provide a high resolution structure of the LckSH3-Tip complex, resulting either from the lack of suitable crystals or from the unfavorable dynamics of complex formation on the NMR timescale.

One way to overcome these problems is the use of tighter binding interaction partners which are frequently more suitable for structural studies. For that reason the present study focused on the characterization of Tip in complex with LynSH3 and on the design of a single point Lck mutant which exhibits an increased affinity for Tip. The structural information deduced from these systems should serve as basis to generate a reliable model of the LckSH3-Tip complex.

LynSH3 was studied because it is closely related to LckSH3 in sequence but binds Tip with higher affinity and shows a dynamics of complex formation that is more suitable for NMR-spectroscopic investigations. Based on a sequence alignment of LckSH3 and LynSH3, a P17G point mutation was introduced in the RT loop of LckSH3 and was expected to increase ligand affinity by enhancing the RT-loop flexibility.

Although LckSH3_P17G binds Tip almost as tight as LynSH3, both complexes differ strikingly in their exchange behavior on the NMR timescale, rendering a structure determination of LckSH3_P17G-Tip complex impossible. Further analysis revealed that the increased ligand affinity of LynSH3 and LckSH3_P17G is achieved by different mechanisms, though, both SH3 domains have a flexible glycine residue at homolog position in the RT-loop and therefore originally the same mechanism was expected.

For LckSH3_P17G, the increased affinity by almost one order of magnitude compared to wildtype LckSH3 can at least partially be attributed to an increased rate of complex formation as evidenced by fluorescence titration and stopped-flow experiments.

A detailed structural explanation for these differences comes from molecular dynamics simulations of wildtype and mutant LckSH3 which revealed that the increased association rate of the mutant correlates with a higher population of binding-competent conformations over the simulation time.

LckSH3_P17G exhibits not only a faster local conformational sampling by enhanced RT-loop flexibility, but also an increased overall flexibility on different timescales throughout the entire domain. Moreover, thermal unfolding monitored by CD-spectroscopy

and high-temperature MD simulations revealed a global destabilization and an altered unfolding pathway of the LckSH3 P17G-mutant.

For the LynSH3-Tip complex a high resolution structure with a backbone rmsd of 0.34 Å was determined using NMR spectroscopy. This structure which is based on 1031 experimentally derived structural constraints represents the first high resolution complex structure of a src-family group B SH3 domain with a natural ligand binding in class II orientation. Analysis of the complex structure revealed that not only the polyproline helix, which is typically known to form the site of interaction with SH3 domains, but also the COOH-terminally adjacent residues are involved in SH3 binding. Particularly L186 of Tip binds into a hydrophobic pocket on the surface of LynSH3, formed by H41, W44 and F57. Based on the LynSH3-Tip complex structure and additional NMR-spectroscopic data available for the Tip-LckSH3 interaction, a molecular model of the LckSH3-Tip complex was generated. Although experimental data clearly proves that L186 interacts with a hydrophobic pocket on the SH3 surface in both complexes, fluorescence titration experiments using shorter Tip-peptides showed that the interactions of L186 only have a significant effect on the affinity in the LynSH3-Tip complex. Further analysis indicated that L186 of Tip bound to the hydrophobic pocket of LynSH3 is almost completely covered by H41, whereas the serine at homolog position in LckSH3 covers only small parts of L186.

The difference in the binding free energy measured between the LynSH3 and LckSH3 can almost quantitatively explained by the theoretically calculated binding free energy difference based on the solvent accessible surface area of L186 of Tip bound to either of the two SH3 domains.

Thus, the additional hydrophobic interactions between H41 of LynSH3 and L186 of Tip outside the classical ligand-binding motif offer a plausible explanation for the tighter Tip-binding of LynSH3 compared to LckSH3, thus resulting in a reduction of the dissociation rate, which is in good agreement with the different exchange behavior on the NMR timescale.

An explanation for the strict conservation of L186 in Tip from different herpesviral strains comes from the structural comparison to several high-affinity SrcSH3-ligand complexes which frequently also exhibit a leucine at a similar position outside the core interaction motif. This conservation, together with the fact that L186 plays no important role for

complex affinity in the Tip-LckSH3 complex suggests that leucine might rather act as an additional compass amino acid upon SH3-binding, which might help to ensure the proper orientation of the interaction motif.

This observation suggests an expansion of the binding sequences of class I and class II src-family SH3 ligands to 'LxxRxLPPxP' and 'xPPLPxRx(3,4)L', respectively, to take into account the importance of flanking sequences of classical binding motifs in contributing to molecular recognition processes.

Taken together, apart from elucidating the molecular basis of the interactions of LckSH3 with the herpesviral Tip protein, this study was able to show that affinity can be altered by entirely different mechanisms even for closely related proteins. Therefore, this study stresses the importance of a concomitant characterization of the structure and dynamics of macromolecular interactions to understand the mechanisms of molecular recognition in more detail and thus to allow more reliable predictions in the future.

8 Abkürzungen

1D	eindimensional
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
4D	vierdimensional
Abb.	Abbildung
BMRB	<i>BioMagResBank</i>
CD	Zirculardichroismus
COOH-	carboxy-
COSY	<i>correlated spectroscopy</i>
CSKH	<i>COOH-terminal src-related kinase homology</i>
DSS	2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonat
DTT	2,2'-Dithiodiethanol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
F1/2/3/4	Frequenzdimension 1/2/3/4
FHSQC	<i>fast heteronuclear single quantum coherence</i>
FID	<i>free induction decay</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
HSQC	<i>heteronuclear single quantum coherence</i>
IPTG	Isopropyl-1-thio- β -D-galaktopyranosid
Kap.	Kapitel
Lck	<i>lymphocyte-specific protein tyrosine kinase</i>
Lyn	<i>lck/yes-related novel tyrosine kinase</i>
MD	Moleküldynamik
MEXICO	<i>measurement of exchange rate in labeled compounds</i>
MWCO	Ausschlusswert bezüglich Molekulargewicht
NH ₂ -	amino-
NMR	kernmagnetische Resonanzspektroskopie
NOE	<i>nuclear overhauser effect</i>
NOESY	<i>nuclear overhauser (effect) spectroscopy</i>
PCR	Polymerasekettenreaction
PDB	<i>protein data bank</i>
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PPII-Helix	Polyprolin-Helix des Typ II
ppm	<i>parts per million</i>
RP-HPLC	<i>reversed phase high-performance liquid chromatography</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
SD	<i>steepest descent</i>
SH2	Src-Homologie 2
SH3	Src-Homologie 3
SH3B	SH3-Bindungs-Motiv
Tab.	Tabelle
TFA	Tetrafluoressigsäure
Tip	<i>tyrosine kinase interacting protein</i>
TOCSY	<i>total correlation spectroscopy</i>
TPPI	<i>time proportional phase incrementation</i>
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen je Volumen
w/v	Gewicht je Volumen

Aminosäurenbezeichnung in 1- bzw. 3-Buchstabencode:

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cyc	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin
			x		beliebige Aminosäure
			[+]		R oder K
			<i>po</i>		Phosphorylierung

9 Literatur

- Aasland, R., Abrams, C., Ampe, C., Ball, L. J., Bedford, M. T., Cesareni, G., Gimona, M., Hurley, J. H., Jarchau, T., Lehto, V. P., Lemmon, M. A., Linding, R., Mayer, B. J., Nagai, M., Sudol, M., Walter, U. & Winder, S. J. (2002). Normalization of nomenclature for peptide motifs as ligands of modular protein domains. *FEBS Lett* 513, 141-4.
- Allen, M. D., Broadhurst, R. W., Solomon, R. G. & Perham, R. N. (2005). Interaction of the E2 and E3 components of the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex of *Bacillus stearothermophilus*. Use of a truncated protein domain in NMR spectroscopy. *Febs J* 272, 259-68.
- Alonso, D. O. & Daggett, V. (1995). Molecular dynamics simulations of protein unfolding and limited refolding: characterization of partially unfolded states of ubiquitin in 60 % methanol and in water. *J Mol Biol* 247, 501-20.
- Alonso, D. O. & Daggett, V. (1998). Molecular dynamics simulations of hydrophobic collapse of ubiquitin. *Protein Sci* 7, 860-74.
- Aloy, P. & Russell, R. B. (2002). Interrogating protein interaction networks through structural biology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 5896-901.
- Aloy, P., Ciccarelli, F. D., Leutwein, C., Gavin, A. C., Superti-Furga, G., Bork, P., Bottcher, B. & Russell, R. B. (2002). A complex prediction: three-dimensional model of the yeast exosome. *EMBO Rep* 3, 628-35.
- Aloy, P., Ceulemans, H., Stark, A. & Russell, R. B. (2003). The relationship between sequence and interaction divergence in proteins. *J Mol Biol* 332, 989-98.
- Aloy, P. & Russell, R. B. (2003). InterPreTS: protein interaction prediction through tertiary structure. *Bioinformatics* 19, 161-2.
- Aloy, P., Bottcher, B., Ceulemans, H., Leutwein, C., Mellwig, C., Fischer, S., Gavin, A. C., Bork, P., Superti-Furga, G., Serrano, L. & Russell, R. B. (2004). Structure-based assembly of protein complexes in yeast. *Science* 303, 2026-9.
- Anand, G. S., Law, D., Mandell, J. G., Snead, A. N., Tsigelny, I., Taylor, S. S., Ten Eyck, L. F. & Komives, E. A. (2003). Identification of the protein kinase A regulatory RIalpha-catalytic subunit interface by amide H/2H exchange and protein docking. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 13264-9.
- Aqvist, J., Luzhkov, V. B. & Brandsdal, B. O. (2002). Ligand binding affinities from MD simulations. *Acc Chem Res* 35, 358-65.
- Arold, S., Franken, P., Strub, M. P., Hoh, F., Benichou, S., Benarous, R. & Dumas, C. (1997). The crystal structure of HIV-1 Nef protein bound to the Fyn kinase SH3 domain suggests a role for this complex in altered T cell receptor signaling. *Structure* 5, 1361-72.
- Arold, S., O'Brien, R., Franken, P., Strub, M. P., Hoh, F., Dumas, C. & Ladbury, J. E. (1998). RT loop flexibility enhances the specificity of Src family SH3 domains for HIV-1 Nef. *Biochemistry* 37, 14683-91.
- Ball, L. J., Jarchau, T., Oschkinat, H. & Walter, U. (2002). EVH1 domains: structure, function and interactions. *FEBS Lett* 513, 45-52.

- Bashford, D. & Case, D. A. (2000). Generalized Born models of macromolecular solvation effects. *Annu Rev Phys Chem* 51, 129-52.
- Bauer, F. (2001). Strukturelle Charakterisierung der Interaktionen des Tip-Proteins aus Herpesvirus saimiri mit Tyrosinkinasen. *Dipolmarbeit, Universität Bayreuth*.
- Bauer, F., Schweimer, K., Kluver, E., Conejo-Garcia, J. R., Forssmann, W. G., Rösch, P., Adermann, K. & Sticht, H. (2001). Structure determination of human and murine beta-defensins reveals structural conservation in the absence of significant sequence similarity. *Protein Sci* 10, 2470-9.
- Bauer, F., Hofinger, E., Hoffmann, S., Rösch, P., Schweimer, K. & Sticht, H. (2004). Characterization of Lck-binding elements in the herpesviral regulatory Tip protein. *Biochemistry* 43, 14932-9.
- Baumeister, W., Grimm, R. & Walz, J. (1999). Electron tomography of molecules and cells. *Trends Cell Biol* 9, 81-5.
- Baumeister, W. (2002). Electron tomography: towards visualizing the molecular organization of the cytoplasm. *Curr Opin Struct Biol* 12, 679-84.
- Bax, A., Kontaxis, G. & Tjandra, N. (2001). Dipolar couplings in macromolecular structure determination. *Methods Enzymol.* 339, 127-74.
- Ben-Shem, A., Frolov, F. & Nelson, N. (2003). Crystal structure of plant photosystem I. *Nature* 426, 630-5.
- Bhattacharyya, R. & Chakrabarti, P. (2003). Stereospecific interactions of proline residues in protein structures and complexes. *J Mol Biol* 331, 925-40.
- Biesinger, B., Muller-Fleckenstein, I., Simmer, B., Lang, G., Wittmann, S., Platzer, E., Desrosiers, R. C. & Fleckenstein, B. (1992). Stable growth transformation of human T lymphocytes by herpesvirus saimiri. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 3116-9.
- Biesinger, B., Tsygankov, A. Y., Fickenschner, H., Emmrich, F., Fleckenstein, B., Bolen, J. B. & Broker, B. M. (1995). The product of the Herpesvirus saimiri open reading frame 1 (tip) interacts with T cell-specific kinase p56lck in transformed cells. *J Biol Chem* 270, 4729-34.
- Böckmann, R. A. & Grubmüller, H. (2003). Conformational dynamics of the F1-ATPase beta-subunit: a molecular dynamics study. *Biophys J* 85, 1482-91.
- Bös, F., Curre-Linde, N., Lindner, P., Schmid, R. D. & Pleiss, J. (2004). High-throughput molecular dynamics simulations: Long and short range effects of mutations on substrate specificity. *LNI-Proceedings* 53, 123-30
- Bork, P., Downing, A. K., Kieffer, B. & Campbell, I. D. (1996). Structure and distribution of modules in extracellular proteins. *Q Rev Biophys* 29, 119-67.
- Borreguero, J. M., Dokholyan, N. V., Buldyrev, S. V., Shakhnovich, E. I. & Stanley, H. E. (2002). Thermodynamics and folding kinetics analysis of the SH3 domain from discrete molecular dynamics. *J Mol Biol* 318, 863-76.
- Bradshaw, J. M., Mitaxov, V. & Waksman, G. (1999). Investigation of phosphotyrosine recognition by the SH2 domain of the Src kinase. *J Mol Biol* 293, 971-85.
- Brooks, B. R., Bruccoleri, R. E., Olafson, B. D., States, D. J., Swaminathan, S. & Karplus, M. (1983). CHARMM: A Program for Macromolecular Energy, Minimization, and Dynamics Calculations. *J Comput Chem* 4, 187-217.

- Brown, M. T. & Cooper, J. A. (1996). Regulation, substrates and functions of src. *Biochim Biophys Acta* 1287, 121-49.
- Brzozowski, A. M., Pike, A. C., Dauter, Z., Hubbard, R. E., Bonn, T., Engstrom, O., Ohman, L., Greene, G. L., Gustafsson, J. A. & Carlquist, M. (1997). Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature* 389, 753-8.
- Camacho, C. J., Gatchell, D. W., Kimura, S. R. & Vajda, S. (2000). Scoring docked conformations generated by rigid-body protein-protein docking. *Proteins* 40, 525-37.
- Cannons, J. L. & Schwartzberg, P. L. (2004). Fine-tuning lymphocyte regulation: what's new with tyrosine kinases and phosphatases? *Curr Opin Immunol* 16, 296-303.
- Cavanagh, J., Fairbrother, W. J., Palmer III, A. G. & Skelton, N. J. (1996). Protein NMR Spectroscopy. *Academic Press, New York, NY*.
- Cesareni, G., Gimona, M., Sudol, M. & Yaffe, M. B. (2004). Modular Protein Domains. *Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim*.
- Chacon, P., Tama, F. & Wriggers, W. (2003). Mega-Dalton biomolecular motion captured from electron microscopy reconstructions. *J Mol Biol* 326, 485-92.
- Chakrabarty, A., Doig, A. J. & Baldwin, R. L. (1993). Helix capping propensities in peptides parallel those in proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 11332-6.
- Chandrasekhar, I., Clore, G. M., Szabo, A., Gronenborn, A. M. & Brooks, B. R. (1992). A 500 ps molecular dynamics simulation study of interleukin-1 beta in water. Correlation with nuclear magnetic resonance spectroscopy and crystallography. *J Mol Biol* 226, 239-50.
- Chatfield, D. C., Szabo, A. & Brooks, B. R. (1998). Molecular dynamics of staphylococcal nuclease: Comparison of simulation with ¹⁵N and ¹³C NMR relaxation data. *J Am Chem Soc* 120, 5301-11.
- Cheatham, T. E., 3rd, Cieplak, P., and Kollmann, P. A. (1999). A modified version of the Cornell et al. force field with improved sugar pucker phases and helical repeat. *J Biomol Struct Dyn* 16, 845-62.
- Chen, R., Sodergren, E., Weinstock, G. M. & Gibbs, R. A. (2004). Dynamic building of a BAC clone tiling path for the Rat Genome Sequencing Project. *Genome Res* 14, 679-84.
- Cieplak, P., Caldwell, J. & Kollman, P. A. (2001). Molecular mechanical models for organic and biological systems going beyond the atom-centered two-body additive approximation: aqueous free energies of methanol and N-methyl acetamide, nucleic acid base, and amide hydrogen bonding and chloroform/water partition coefficients of nucleic acid bases. *J Comput Chem* 22, 1048-57.
- Clore, G. M., Gronenborn, A. M., Nilges, M. & Ryan, C. A. (1987). Three-dimensional structure of potato carboxypeptidase inhibitor in solution. A study using nuclear magnetic resonance, distance geometry, and restrained molecular dynamics. *Biochemistry* 26, 8012-23.
- Clore, G. M., Kay, L. E., Bax, A. & Gronenborn, A. M. (1991). Four-dimensional ¹³C/¹³C-edited nuclear Overhauser enhancement spectroscopy of a protein in solution: application to interleukin 1 beta. *Biochemistry* 30, 12-18.
- Clore, G. M., Gronenborn, A. M. & Tjandra, N. (1998). Direct structure refinement against residual dipolar couplings in the presence of rhombicity of unknown magnitude. *J Magn Reson* 131, 159-62

- Cordier, F. & Grzesiek, S. (1999). Direct Observation of Hydrogen Bonds in Proteins by Interresidue $^3\text{hJNC}'$ Scalar Couplings. *J Am Chem Soc* 121, 1601-2.
- Cornell, W. D., Cieplak, P., Bayly, C. L., Gould, I. R., Merz, K. M., Jr., Ferguson, D. M., Spellmeyer, D. C., Fox, T., Caldwell, J. W., and Kollman, P. A. (1995). A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids and Organic Molecules. *J Am Chem Soc* 117, 5179-97.
- Cornilescu, G., Hu, J. S. & Bax, A. (1999). Identification of the Hydrogen Bonding Network in a Protein by Scalar Couplings. *J Am Chem Soc* 121, 2949-50.
- Coulthard, V. H., Matsuda, S. & Heery, D. M. (2003). An extended LXXLL motif sequence determines the nuclear receptor binding specificity of TRAP220. *J Biol Chem* 278, 10942-51.
- Courtneidge, S. A. (1994). Non-receptor Protein Tyrosine Kinases. *Oxford University Press*.
- Daggett, V. & Levitt, M. (1993). Protein unfolding pathways explored through molecular dynamics simulations. *J Mol Biol* 232, 600-19.
- Darden, T., York, D. & Pedersen, L. (1993). Particle mesh Ewald - an $N\log(N)$ method for Ewald sums in large systems. *J Chem Phys* 98, 10089-92.
- Das, S. & Smith, J. F. (2000). Identifying nature's protein Lego set. *Adv Protein Chem* 54, 159-83.
- Davis, A. & Teague, S. (1999). Hydrogen bonding, hydrophobic interactions, and failure of the rigid receptor hypothesis. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 38, 736-49.
- Day, R., Bennion, B. J., Ham, S. & Daggett, V. (2002). Increasing temperature accelerates protein unfolding without changing the pathway of unfolding. *J Mol Biol* 322, 189-203.
- Day, R. & Daggett, V. (2003). All-atom simulations of protein folding and unfolding. *Adv Protein Chem* 66, 373-403.
- Dayie, K. T. & G., W. (1994). Relaxation-Rate Measurements for ^{15}N - ^1H Groups with Pulsed-Field Gradients and Preservation of Coherence Pathways. *J Magn Reson* 111, 121-6.
- Dedmon, M. M., Lindorff-Larsen, K., Christodoulou, J., Vendruscolo, M. & Dobson, C. M. (2005). Mapping Long-Range Interactions in alpha-Synuclein using Spin-Label NMR and Ensemble Molecular Dynamics Simulations. *J Am Chem Soc* 127, 476-7.
- Diaz-Moreno, I., Diaz-Quintana, A., Molina-Heredia, F. P., Nieto, P. M., Hansson, O., De la Rosa, M. A. & Karlsson, B. G. (2004). NMR analysis of the transient complex between membrane photosystem I and soluble cytochrome c6. *J Biol Chem*. Dec. 16. [Epub ahead of print].
- Dobrodumov, A. & Gronenborn, A. M. (2003). Filtering and selection of structural models: combining docking and NMR. *Proteins* 53, 18-32.
- Dominguez, C., Boelens, R. & Bonvin, A. M. (2003). HADDOCK: a protein-protein docking approach based on biochemical or biophysical information. *J Am Chem Soc* 125, 1731-7.
- Dosset, P., Hus, J. C., Blackledge, M. & Marion, D. (2000). Efficient analysis of macromolecular rotational diffusion from heteronuclear relaxation data. *J Biomol NMR* 16, 23-8.

- Duboise, S. M., Guo, J., Czajak, S., Desrosiers, R. C. & Jung, J. U. (1998). STP and Tip are essential for herpesvirus saimiri oncogenicity. *J Virol* 72, 1308-13.
- Dutta, K., Shi, H., Cruz-Chu, E. R., Kami, K. & Ghose, R. (2004). Dynamic influences on a high-affinity, high-specificity interaction involving the C-terminal SH3 domain of p67phox. *Biochemistry* 43, 8094-106.
- Düx, P., Whitehead, B., Boelens, R., Kaptein, R. & Vuister, G. W. (1997). Measurement of ¹⁵N-¹H coupling constants in uniformly ¹⁵N-labeled proteins: Application to the photoactive yellow protein. *J Biomol NMR* 10, 301-6.
- Egea, P. F., Shan, S. O., Napetschnig, J., Savage, D. F., Walter, P. & Stroud, R. M. (2004). Substrate twinning activates the signal recognition particle and its receptor. *Nature* 427, 215-21.
- Engh, R. A., Brandstetter, H., Sucher, G., Eichinger, A., Baumann, U., Bode, W., Huber, R., Poll, T., Rudolph, R. & von der Saal, W. (1996). Enzyme flexibility, solvent and 'weak' interactions characterize thrombin-ligand interactions: implications for drug design. *Structure* 4, 1353-62.
- Ensser, A., Thureau, M., Wittmann, S. & Fickenscher, H. (2003). The genome of herpesvirus saimiri C488 which is capable of transforming human T cells. *Virology* 314, 471-87.
- Fazi, B., Cope, M. J., Douangamath, A., Ferracuti, S., Schirwitz, K., Zucconi, A., Drubin, D. G., Wilmanns, M., Cesareni, G. & Castagnoli, L. (2002). Unusual binding properties of the SH3 domain of the yeast actin-binding protein Abp1: structural and functional analysis. *J Biol Chem* 277, 5290-8.
- Feng, S., Chen, J. K., Yu, H., Simon, J. A. & Schreiber, S. L. (1994). Two binding orientations for peptides to the Src SH3 domain: development of a general model for SH3-ligand interactions. *Science* 266, 1241-7.
- Feng, S., Kasahara, C., Rickles, R. J. & Schreiber, S. L. (1995). Specific interactions outside the proline-rich core of two classes of Src homology 3 ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 12408-15.
- Fernandez, C. & Wider, G. (2003). TROSY in NMR studies of the structure and function of large biological macromolecules. *Curr Opin Struct Biol* 13, 570-80.
- Fernandez-Ballester, G., Blanes-Mira, C. & Serrano, L. (2004). The tryptophan switch: changing ligand-binding specificity from type I to type II in SH3 domains. *J Mol Biol* 335, 619-29.
- Ferreon, J. C. & Hilser, V. J. (2003). Ligand-induced changes in dynamics in the RT loop of the C-terminal SH3 domain of Sem-5 indicate cooperative conformational coupling. *Protein Sci* 12, 982-96.
- Ferreon, J. C., Volk, D. E., Luxon, B. A., Gorenstein, D. G. & Hilser, V. J. (2003). Solution structure, dynamics, and thermodynamics of the native state ensemble of the Sem-5 C-terminal SH3 domain. *Biochemistry* 42, 5582-91.
- Fiaux, J., Bertelsen, E. B., Horwich, A. L. & Wuthrich, K. (2002). NMR analysis of a 900K GroEL GroES complex. *Nature* 418, 207-11.
- Fickenscher, H. & Fleckenstein, B. (2001). Herpesvirus saimiri. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356, 545-67.
- Frank, J. (2002). Single-particle imaging of macromolecules by cryo-electron microscopy. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 31, 303-19.

- Frickel, E. M., Riek, R., Jelesarov, I., Helenius, A., Wuthrich, K. & Ellgaard, L. (2002). TROSY-NMR reveals interaction between Erp57 and the tip of the calreticulin P-domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 1954-9.
- Fritz, T. A., Tondi, D., Finer-Moore, J. S., Costi, M. P. & Stroud, R. M. (2001). Predicting and harnessing protein flexibility in the design of species-specific inhibitors of thymidylate synthase. *Chem Biol* 8, 981-95.
- Furet, P., Gay, B., Caravatti, G., Garcia-Echeverria, C., Rahuel, J., Schoepfer, J. & Fretz, H. (1998). Structure-based design and synthesis of high affinity tripeptide ligands of the Grb2-SH2 domain. *J Med Chem* 41, 3442-9.
- Gale, A. J., Tsavaler, A. & Griffin, J. H. (2002). Molecular characterization of an extended binding site for coagulation factor Va in the positive exosite of activated protein C. *J Biol Chem* 277, 28836-40.
- Gao, H., Sengupta, J., Valle, M., Korostelev, A., Eswar, N., Stagg, S. M., Van Roey, P., Agrawal, R. K., Harvey, S. C., Sali, A., Chapman, M. S. & Frank, J. (2003). Study of the structural dynamics of the E coli 70S ribosome using real-space refinement. *Cell* 113, 789-801.
- Garcia-Viloca, M., Poulsen, T. D., Truhlar, D. G. & Gao, J. (2004). Sensitivity of molecular dynamics simulations to the choice of the X-ray structure used to model an enzymatic reaction. *Protein Sci* 13, 2341-54.
- Gay, B., Furet, P., Garcia-Echeverria, C., Rahuel, J., Chene, P., Fretz, H., Schoepfer, J. & Caravatti, G. (1997). Dual specificity of Src homology 2 domains for phosphotyrosine peptide ligands. *Biochemistry* 36, 5712-8.
- Ghose, R., Fushman, D. & Cowburn, D. (2001). 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.
- Ghose, R., Shekhtman, A., Goger, M. J., Ji, H. & Cowburn, D. (2001). A novel, specific interaction involving the Csk SH3 domain and its natural ligand. *Nat Struct Biol* 8, 998-1004.
- Gill, S. C. & von Hippel, P. H. (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* 182, 319-26.
- Gohlke, H., Kuhn, L. A. & Case, D. A. (2004). Change in protein flexibility upon complex formation: analysis of Ras-Raf using molecular dynamics and a molecular framework approach. *Proteins* 56, 322-37.
- Gorfe, A. A., Pellarin, R. & Caffisch, A. (2004). Membrane localization and flexibility of a lipidated ras peptide studied by molecular dynamics simulations. *J Am Chem Soc* 126, 15277-86.
- Grant, S. G., Jessee, J., Bloom, F. R. & Hanahan, D. (1990). Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into Escherichia coli methylation-restriction mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 4645-9.
- Grantcharova, V. P. & Baker, D. (1997). Folding dynamics of the src SH3 domain. *Biochemistry* 36, 15685-92.
- Grantcharova, V. P., Riddle, D. S. & Baker, D. (2000). Long-range order in the src SH3 folding transition state. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 7084-9.

- Gray, J. J., Moughon, S. E., Kortemme, T., Schueler-Furman, O., Misura, K. M., Morozov, A. V. & Baker, D. (2003). Protein-protein docking predictions for the CAPRI experiment. *Proteins* 52, 118-22.
- Grunewald, K., Medalia, O., Gross, A., Steven, A. C. & Baumeister, W. (2003). Prospects of electron cryotomography to visualize macromolecular complexes inside cellular compartments: implications of crowding. *Biophys Chem* 100, 577-91.
- Grzesiek, S. & Bax, A. (1992). Improved 3D Triple-Resonance NMR Techniques Applied to a 31 kDa Protein. *J Magn Reson* 96, 432-40.
- Grzesiek, S. & Bax, A. (1992). Correlating Backbone Amide and Side Chain Resonances in Larger Proteins by Multiple Relayed Triple Resonance NMR. *J Am Chem Soc* 114, 6291-3.
- Grzesiek, S., Anglister, J. & Bax, A. (1993). Correlation of Backbone Amide and Aliphatic Side-Chain Resonances in ¹³C/¹⁵N-Enriched Proteins by Isotropic Mixing of ¹³C Magnetization. *J Magn Reson* 101, 114-9.
- Grzesiek, S. & Bax, A. (1993). The Importance of Not Saturating H₂O in Protein NMR. Application to Sensitivity Enhancement and NOE Measurements. *J Am Chem Soc* 115, 12593 - 4.
- Gsponer, J. & Caflisch, A. (2001). Role of native topology investigated by multiple unfolding simulations of four SH3 domains. *J Mol Biol* 309, 285-98.
- Guex, N. & Peitsch, M. C. (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18, 2714-23.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-80.
- Hansch, C. & Coats, E. (1970). Alpha-chymotrypsin: a case study of substituent constants and regression analysis in enzymic structure--activity relationships. *J Pharm Sci* 59, 731-43.
- Hansen, M. R., Mueller, L. & Pardi, A. (1998). Tunable alignment of macromolecules by filamentous phage yields dipolar coupling interactions. *Nat Struct Biol* 5, 1065-74.
- Hansson, T., Oostenbrink, C. & van Gunsteren, W. (2002). Molecular dynamics simulations. *Curr Opin Struct Biol* 12, 190-6.
- Hartley, D. A., Amdjadi, K., Hurley, T. R., Lund, T. C., Medveczky, P. G. & Sefton, B. M. (2000). Activation of the Lck tyrosine protein kinase by the Herpesvirus saimiri tip protein involves two binding interactions. *Virology* 276, 339-48.
- Homans, S. W. (2004). NMR spectroscopy tools for structure-aided drug design. *Angew Chem Int Ed Engl* 43, 290-300.
- Horita, D. A., Zhang, W., Smithgall, T. E., Gmeiner, W. H. & Byrd, R. A. (2000). Dynamics of the Hck-SH3 domain: comparison of experiment with multiple molecular dynamics simulations. *Protein Sci* 9, 95-103.
- Hubbard, S. R. (2002). Protein tyrosine kinases: autoregulation and small-molecule inhibition. *Curr Opin Struct Biol* 12, 735-41.
- Humphrey, W., Dalke, A. & Schulten, K. (1996). VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph* 14, 33-8, 27-8.
- Huo, S., Massova, I. & Kollman, P. A. (2002). Computational alanine scanning of the 1:1 human growth hormone-receptor complex. *J Comput Chem* 23, 15-27.

- Ikura, M., Kay, L. E. & Bax, A. (1991). Improved three-dimensional ^1H - ^{13}C - ^1H correlation spectroscopy of a ^{13}C -labeled protein using constant-time evolution. *J Biomol NMR* 1, 299-304.
- Janssen, E. & Zhang, W. (2003). Adaptor proteins in lymphocyte activation. *Curr Opin Immunol* 15, 269-76.
- Jiang, L., Gao, Y., Mao, F., Liu, Z. & Lai, L. (2002). Potential of mean force for protein-protein interaction studies. *Proteins* 46, 190-6.
- Johnson, B. A. & Blevins, R. A. (1994). NMRView: A computer program for the visualization and analysis of NMR data. *J Biomol NMR* 4, 603-14.
- Johnson, L. N. & O'Reilly, M. (1996). Control by phosphorylation. *Curr Opin Struct Biol* 6, 762-9.
- Jorgensen, W. L., Chandrasekhar, J., Madura, D. J., Impey, R. W. & Klein, M. L. (1983). Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J Chem Phys* 79, 926-35.
- Jung, J. U., Trimble, J. J., King, N. W., Biesinger, B., Fleckenstein, B. W. & Desrosiers, R. C. (1991). Identification of transforming genes of subgroup A and C strains of Herpesvirus saimiri. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 7051-5.
- Jung, J. U., Lang, S. M., Friedrich, U., Jun, T., Roberts, T. M., Desrosiers, R. C. & Biesinger, B. (1995). Identification of Lck-binding elements in tip of herpesvirus saimiri. *J Biol Chem* 270, 20660-7.
- Kami, K., Takeya, R., Sumimoto, H. & Kohda, D. (2002). Diverse recognition of non-PxxP peptide ligands by the SH3 domains from p67(phox), Grb2 and Pex13p. *Embo J* 21, 4268-76.
- Kaminski, G. A., Stern, H. A., Berne, B. J., Friesner, R. A., Cao, Y. X., Murphy, R. B., Zhou, R. & Halgren, T. A. (2002). Development of a polarizable force field for proteins via ab initio quantum chemistry: first generation model and gas phase tests. *J Comput Chem* 23, 1515-31.
- Kandasamy, S. K. & Larson, R. G. (2004). Molecular Dynamics Study of the Lung Surfactant Peptide SP-B1-25 with DPPC monolayers : Insights into Interactions and Peptide Position and Orientation. *Biophys J*. Dec. 13. [Epub ahead of print].
- Karplus, M. (1959). Contact Electron-Spin Coupling of Nuclear Magnetic Moments. *J Chem Phys* 30, 11 - 5.
- Katchalski-Katzir, E., Shariv, I., Eisenstein, M., Friesem, A. A., Aflalo, C. & Vakser, I. A. (1992). Molecular surface recognition: determination of geometric fit between proteins and their ligands by correlation techniques. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 2195-9.
- Kay, L. E., Torchia, D. A. & Bax, A. (1989). Backbone dynamics of proteins as studied by ^{15}N inverse detected heteronuclear NMR spectroscopy: application to staphylococcal nuclease. *Biochemistry* 28, 8972-9.
- Kay, L. E., Clore, G. M., Bax, A. & Gronenborn, A. M. (1990). Four-dimensional heteronuclear triple-resonance NMR spectroscopy of interleukin-1 beta in solution. *Science* 249, 411-4.
- Kay, L. E., Keifer, P. & Saarinen, T. (1992). Pure Absorption Gradient Enhanced Heteronuclear Single Quantum Correlation Spectroscopy with Improved Sensitivity. *J Am Chem Soc* 114, 10663-5.

- Kay, L. E., Xu, G. Y., Singer, A. U., Muhandiram, D. R. & Forman-Kay, J. D. (1993). A gradient-enhanced HCCH TOCSY experiment for recording side-chain ^1H and ^{13}C correlations in H_2O samples of proteins. *J Magn Reson* 101, 333-7.
- Kelley, L. A., Gardner, S. P. & Sutcliffe, M. J. (1996). An Automated Approach For Clustering An Ensemble Of NMR-Derived Protein Structures Into Conformationally-Related Subfamilies. *Protein Engineering* 9, 1063-5.
- Keskin, O., Bahar, I., Flatow, D., Covell, D. G. & Jernigan, R. L. (2002a). Molecular mechanisms of chaperonin GroEL-GroES function. *Biochemistry* 41, 491-501.
- Keskin, O., Durell, S. R., Bahar, I., Jernigan, R. L. & Covell, D. G. (2002b). Relating molecular flexibility to function: a case study of tubulin. *Biophys J* 83, 663-80.
- Kjellen, P., Amdjadi, K., Lund, T. C., Medveczky, P. G. & Sefton, B. M. (2002). The herpesvirus saimiri tip484 and tip488 proteins both stimulate lck tyrosine protein kinase activity in vivo and in vitro. *Virology* 297, 281-8.
- Kollman, P. A., Massova, I., Reyes, C., Kuhn, B., Huo, S., Chong, L., Lee, M., Lee, T., Duan, Y., Wang, W., Donini, O., Cieplak, P., Srinivasan, J., Case, D. A. & Cheatham, T. E., 3rd. (2000). Calculating structures and free energies of complex molecules: combining molecular mechanics and continuum models. *Acc Chem Res* 33, 889-97.
- Kong, Y., Ming, D., Wu, Y., Stoops, J. K., Zhou, Z. H. & Ma, J. (2003). Conformational flexibility of pyruvate dehydrogenase complexes: a computational analysis by quantized elastic deformational model. *J Mol Biol* 330, 129-35.
- Koradi, R., Billeter, M. & Wuthrich, K. (1996). MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. *J Mol Graph* 14, 51-5, 29-32.
- Kortemme, T., Joachimiak, L. A., Bullock, A. N., Schuler, A. D., Stoddard, B. L. & Baker, D. (2004). Computational redesign of protein-protein interaction specificity. *Nat Struct Mol Biol* 11, 371-9.
- Korzhev, D. M., Salvatella, X., Vendruscolo, M., Di Nardo, A. A., Davidson, A. R., Dobson, C. M. & Kay, L. E. (2004). Low-populated folding intermediates of Fyn SH3 characterized by relaxation dispersion NMR. *Nature* 430, 586-90.
- Koyama, S., Yu, H., Dalgarno, D. C., Shin, T. B., Zydowsky, L. D. & Schreiber, S. L. (1993). Structure of the PI3K SH3 domain and analysis of the SH3 family. *Cell* 72, 945-52.
- Kuboniwa, H., Grzesiek, S., Delaglio, F. & Bax, A. (1994). Measurements of HN-Ha J couplings in calcium-free calmodulin using new 2D and 3D water flip-back methods. *J Biomol NMR* 4, 871-8.
- Kuhn, B. & Kollman, P. A. (2000). Binding of a diverse set of ligands to avidin and streptavidin: an accurate quantitative prediction of their relative affinities by a combination of molecular mechanics and continuum solvent models. *J Med Chem* 43, 3786-91.
- Kuntz, I. D. & Agard, D. A. (2003). Assessment of the role of computations in structural biology. *Adv Protein Chem* 66, 1-25.
- Kuriyan, J. & Cowburn, D. (1997). Modular peptide recognition domains in eukaryotic signaling. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 26, 259-88.
- Larson, S. M. & Davidson, A. R. (2000). The identification of conserved interactions within the SH3 domain by alignment of sequences and structures. *Protein Sci* 9, 2170-80.

- Laskowski, R. A., Rullmannn, J. A., MacArthur, M. W., Kaptein, R. & Thornton, J. M. (1996). AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. *J Biomol NMR* 8, 477-86.
- Lazaridis, T. & Karplus, M. (1997). "New view" of protein folding reconciled with the old through multiple unfolding simulations. *Science* 278, 1928-31.
- Lee, C. H., Saksela, K., Mirza, U. A., Chait, B. T. & Kuriyan, J. (1996). Crystal structure of the conserved core of HIV-1 Nef complexed with a Src family SH3 domain. *Cell* 85, 931-42.
- Letunic, I., Copley, R. R., Schmidt, S., Ciccarelli, F. D., Doerks, T., Schultz, J., Ponting, C. P. & Bork, P. (2004). SMART 4.0: towards genomic data integration. *Nucleic Acids Res* 32 Database issue, D142-4.
- Li, R., Hoess, R. H., Bennett, J. S. & DeGrado, W. F. (2003). Use of phage display to probe the evolution of binding specificity and affinity in integrins. *Protein Eng* 16, 65-72.
- Lian, L. Y., Barsukov, I. L., Sutcliffe, M. J., Sze, K. H. & Roberts, G. C. (1994). Protein-ligand interactions: exchange processes and determination of ligand conformation and protein-ligand contacts. *Methods Enzymol* 239, 657-700.
- Lim, W. A., Richards, F. M. & Fox, R. O. (1994). Structural determinants of peptide-binding orientation and of sequence specificity in SH3 domains. *Nature* 372, 375-9.
- Lipari, G. & Szabo, A. (1981). Nuclear magnetic resonance relaxation in nucleic acid fragments: models for internal motion. *Biochemistry* 20, 6250-6.
- Littler, S. J. & Hubbard, S. J. (2005). Conservation of orientation and sequence in protein domain-domain interactions. *J Mol Biol* 345, 1265-79.
- Liu, Z., Yan, H., Wang, K., Kuang, T., Zhang, J., Gui, L., An, X. & Chang, W. (2004). Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72 Å resolution. *Nature* 428, 287-92.
- Lo Conte, L., Chothia, C. & Janin, J. (1999). The atomic structure of protein-protein recognition sites. *J Mol Biol* 285, 2177-98.
- Lu, L., Lu, H. & Skolnick, J. (2002). MULTIPROSPECTOR: an algorithm for the prediction of protein-protein interactions by multimeric threading. *Proteins* 49, 350-64.
- Lu, L., Arakaki, A. K., Lu, H. & Skolnick, J. (2003). Multimeric threading-based prediction of protein-protein interactions on a genomic scale: application to the *Saccharomyces cerevisiae* proteome. *Genome Res* 13, 1146-54.
- Lund, T., Medveczky, M. M., Neame, P. J. & Medveczky, P. G. (1996). A herpesvirus saimiri membrane protein required for interleukin-2 independence forms a stable complex with p56lck. *J Virol* 70, 600-6.
- Maillere, B. & Herve, M. (1997). The specificity of antibodies raised against a T cell peptide is influenced by peptide amidation. *Mol Immunol* 34, 1003-9.
- Marion, D., Ikura, M. & Bax, A. (1989). Improved Solvent Suppression in One- and Two- Dimensional NMR Spectra by Convolution of Time-Domain Data. *J Magn Reson* 84, 425-30.

- Markley, J. L., Bax, A., Arata, Y., Hilbers, C. W., Kaptein, R., Sykes, B. D., Wright, P. E. & Wuthrich, K. (1998). Recommendations for the presentation of NMR structures of proteins and nucleic acids. IUPAC-IUBMB-IUPAB Inter-Union Task Group on the Standardization of Data Bases of Protein and Nucleic Acid Structures Determined by NMR Spectroscopy. *J Biomol NMR* 12, 1-23.
- Marley, J., Lu, M. & Bracken, C. (2001). A method for efficient isotopic labeling of recombinant proteins. *J Biomol NMR* 20, 71-5.
- Martinez, J. C., Pisabarro, M. T. & Serrano, L. (1998). Obligatory steps in protein folding and the conformational diversity of the transition state. *Nature Struct Biol* 5, 721-9.
- Martinez, J. C. & Serrano, L. (1999). The folding transition state between SH3 domains is conformationally conformationally restricted and evolutionarily conserved. *Nat Struct Biol* 6, 1010-6.
- Marti-Renom, M. A., Stuart, A. C., Fiser, A., Sanchez, R., Melo, F. & Sali, A. (2000). Comparative protein structure modeling of genes and genomes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 29, 291-325.
- McDonald, C. C. & Phillips, W. D. (1970). In: Fasman, G.D. & Timasheff, S.N. (Hrsg.): *Finestructure of Proteins and Nucleic acids*. Dekker, New York.
- Medveczky, M. M., Geck, P., Vassallo, R. & Medveczky, P. G. (1993). Expression of the collagen-like putative oncoprotein of Herpesvirus saimiri in transformed T cells. *Virus Genes* 7, 349-65.
- Mendez, R., Leplae, R., De Maria, L. & Wodak, S. J. (2003). Assessment of blind predictions of protein-protein interactions: current status of docking methods. *Proteins* 52, 51-67.
- Meyer, O. & Schlegel, H. G. (1983). Biology of aerobic carbon monoxide-oxidizing bacteria. *Annu Rev Microbiol* 37, 277-310.
- Milewski, M. I., Lopez, A., Jurkowska, M., Larusch, J. & Cutting, G. R. (2005). PDZ-binding motifs are unable to ensure correct polarized protein distribution in the absence of additional localization signals. *FEBS Lett* 579, 483-7.
- Ming, D., Kong, Y., Wakil, S. J., Brink, J. & Ma, J. (2002). Domain movements in human fatty acid synthase by quantized elastic deformational model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 7895-9.
- Mittermaier, A. & Kay, L. E. (2004). The response of internal dynamics to hydrophobic core mutations in the SH3 domain from the Fyn tyrosine kinase. *Protein Sci* 13, 1088-99.
- Miyamoto, S. & Kollman, P. A. (1992). SETTLE: An analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithm for rigid water models. *J Comput Chem* 13, 952-62.
- Moarefi, I., LaFevre-Bernt, M., Sicheri, F., Huse, M., Lee, C. H., Kuriyan, J. & Miller, W. T. (1997). Activation of the Src-family tyrosine kinase Hck by SH3 domain displacement. *Nature* 385, 650-3.
- Mok, Y. K., Elisseeva, E. L., Davidson, A. R. & Forman-Kay, J. D. (2001). Dramatic stabilization of an SH3 domain by a single substitution: roles of the folded and unfolded states. *J Mol Biol* 307, 913-28.

- Mori, S., Abeygunawardana, C., O'Neil Johnson, M. & van Zijl, P. C. M. (1995). Improved Sensitivity of HSQC Spectra of Exchanging Protons at Short Interscan Delays Using a New Fast HSQC (FHSQC) Detection Scheme That Avoids Water Saturation. *J Magn Reson B* 108, 94-8.
- Morillas, M., Gomez-Puertas, P., Rubi, B., Clotet, J., Arino, J., Valencia, A., Hegardt, F. G., Serra, D. & Asins, G. (2002). Structural model of a malonyl-CoA-binding site of carnitine octanoyltransferase and carnitine palmitoyltransferase I: mutational analysis of a malonyl-CoA affinity domain. *J Biol Chem* 277, 11473-80.
- Morris, A. L., MacArthur, M. W., Hutchinson, E. G. & Thornton, J. M. (1992). Stereochemical quality of protein structure coordinates. *Proteins* 12, 345-64.
- Morton, C. J., Pugh, D. J., Brown, E. L., Kahmann, J. D., Renzoni, D. A. & Campbell, I. D. (1996). Solution structure and peptide binding of the SH3 domain from human Fyn. *Structure* 4, 705-14.
- Musacchio, A. (2003). How SH3 domains recognize proline. *Adv Protein Chem* 61, 211-68.
- Mustelin, T. & Altman, A. (1990). Dephosphorylation and activation of the T cell tyrosine kinase pp56lck by the leukocyte common antigen (CD45). *Oncogene* 5, 809-13.
- Neudecker, P., Sticht, H. & Rösch, P. (2001). Improving the efficiency of the Gaussian conformational database potential for the refinement of protein and nucleic acid structures. *J Biomol NMR* 21, 373-5.
- Nguyen, J. T., Turck, C. W., Cohen, F. E., Zuckermann, R. N. & Lim, W. A. (1998). Exploiting the basis of proline recognition by SH3 and WW domains: design of N-substituted inhibitors. *Science* 282, 2088-92.
- Noble, M. E., Musacchio, A., Saraste, M., Courtneidge, S. A. & Wierenga, R. K. (1993). Crystal structure of the SH3 domain in human Fyn; comparison of the three-dimensional structures of SH3 domains in tyrosine kinases and spectrin. *Embo J* 12, 2617-24.
- Nogales, E., Wolf, S. G. & Downing, K. H. (1998). Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography. *Nature* 391, 199-203.
- Northey, J. G., Di Nardo, A. A. & Davidson, A. R. (2002). Hydrophobic core packing in the SH3 domain folding transition state. *Nat Struct Biol* 9, 126-30.
- Ollerenshaw, J. E., Kaya, H., Chan, H. S. & Kay, L. E. (2004). Sparsely populated folding intermediates of the Fyn SH3 domain: matching native-centric essential dynamics and experiment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 14748-53.
- Palma, P. N., Krippahl, L., Wampler, J. E. & Moura, J. J. (2000). BiGGER: a new (soft) docking algorithm for predicting protein interactions. *Proteins* 39, 372-84.
- Pardi, A., Billeter, M. & Wuthrich, K. (1984). Calibration of the angular dependence of the amide proton-C alpha proton coupling constants, 3JHN alpha, in a globular protein. Use of 3JHN alpha for identification of helical secondary structure. *J Mol Biol* 180, 741-51.
- Pawson, T. (1995). Protein modules and signalling networks. *Nature* 373, 573-80.
- Pawson, T. & Nash, P. (2003). Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains. *Science* 300, 445-52.

- Pellecchia, M., Sebbel, P., Hermanns, U., Wuthrich, K. & Glockshuber, R. (1999). Pilus chaperone FimC-adhesin FimH interactions mapped by TROSY-NMR. *Nat Struct Biol* 6, 336-9.
- Perlman, D. A., Case, D. A., Caldwell, J. W., Ross, W. S., Cheatham III, T. E., DeBold, S., Ferguson, D., Seibel, G. & Kollmann, P. (1995). AMBER, a package of computer programs for applying molecular mechanics, normal mode analysis, molecular dynamics and free energy calculations to simulate the structure and energetic properties of molecules. *Comp. Phys. Commun.* 91, 1-41.
- Perryman, A. L., Lin, J. H. & McCammon, J. A. (2004). HIV-1 protease molecular dynamics of a wild-type and of the V82F/I84V mutant: possible contributions to drug resistance and a potential new target site for drugs. *Protein Sci* 13, 1108-23.
- Phillips, T. A., VanBogelen, R. A. & Neidhardt, F. C. (1984). Ion gene product of *Escherichia coli* is a heat-shock protein. *J Bacteriol* 159, 283-7.
- Pieper, U., Eswar, N., Braberg, H., Madhusudhan, M. S., Davis, F. P., Stuart, A. C., Mirkovic, N., Rossi, A., Marti-Renom, M. A., Fiser, A., Webb, B., Greenblatt, D., Huang, C. C., Ferrin, T. E. & Sali, A. (2004). MODBASE, a database of annotated comparative protein structure models, and associated resources. *Nucleic Acids Res* 32 Database issue, D217-22.
- Pieper, U., Eswar, N., Stuart, A. C., Ilyin, V. A. & Sali, A. (2002). MODBASE, a database of annotated comparative protein structure models. *Nucleic Acids Res* 30, 255-9.
- Prade, L., Engh, R. A., Girod, A., Kinzel, V., Huber, R. & Bossemeyer, D. (1997). Staurosporine-induced conformational changes of cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit explain inhibitory potential. *Structure* 5, 1627-37.
- Rauh, D., Klebe, G. & Stubbs, M. T. (2004). Understanding protein-ligand interactions: the price of protein flexibility. *J Mol Biol* 335, 1325-41.
- Resh, M. D. (1994). Myristylation and palmitoylation of Src family members: the fats of the matter. *Cell* 76, 411-3.
- Rickles, R. J., Botfield, M. C., Weng, Z., Taylor, J. A., Green, O. M., Brugge, J. S. & Zoller, M. J. (1994). Identification of Src, Fyn, Lyn, PI3K and Abl SH3 domain ligands using phage display libraries. *Embo J* 13, 5598-604.
- Riddle, D. S., Grantcharova, V. P., Santiago, J. V., Alm, E., Ruczinski, I. & Baker, D. (1999). Experiment and theory highlight role of native state topology in SH3 folding. *Nat Struct Biol* 6, 1016-24.
- Robinson, R. C., Turbedsky, K., Kaiser, D. A., Marchand, J. B., Higgs, H. N., Choe, S. & Pollard, T. D. (2001). Crystal structure of Arp2/3 complex. *Science* 294, 1679-84.
- Romijn, R. A., Westein, E., Bouma, B., Schiphorst, M. E., Sixma, J. J., Lenting, P. J. & Huizinga, E. G. (2003). Mapping the collagen-binding site in the von Willebrand factor-A3 domain. *J Biol Chem* 278, 15035-9.
- Russell, R. B., Alber, F., Aloy, P., Davis, F. P., Korkin, D., Pichaud, M., Topf, M. & Sali, A. (2004). A structural perspective on protein-protein interactions. *Curr Opin Struct Biol* 14, 313-24.
- Ryckaert, J. P., Ciccotti, G. & Berendsen, H. J. C. (1977). Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: Molecular dynamics of n-alkanes. *J Comput Phys* 23, 327-41.

- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, New York.*
- Sánchez, R. & Sali, A. (1998). Large-scale protein structure modeling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13597-602.
- Sattler, M., Schwendinger, M. G., Schleucher, J. & Griesinger, C. (1995). Novel strategies for the sensitivity enhancement in heteronuclear multidimensional NMR experiments employing pulsed field gradients. *J Biomol NMR* 5, 11-22.
- Sattler, M., Liang, H., Nettlesheim, D., Meadows, R. P., Harlan, J. E., Eberstadt, M., Yoon, H. S., Shuker, S. B., Chang, B. S., Minn, A. J., Thompson, C. B. & Fesik, S. W. (1997). Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science* 275, 983-6.
- Schindler, T., Sicheri, F., Pico, A., Gazit, A., Levitzki, A. & Kuriyan, J. (1999). Crystal structure of Hck in complex with a Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. *Mol Cell* 3, 639-48.
- Schleucher, J., Schwendinger, M., Sattler, M., Schmidt, P., Schedletzky, O., Glaser, S. J., Sorensen, O. W. & Griesinger, C. (1994). A general enhancement scheme in heteronuclear multidimensional NMR employing pulsed field gradients. *J Biomol NMR* 4, 301-6.
- Schneidman-Duhovny, D., Inbar, Y., Polak, V., Shatsky, M., Halperin, I., Benyamini, H., Barzilai, A., Dror, O., Haspel, N., Nussinov, R. & Wolfson, H. J. (2003). Taking geometry to its edge: fast unbound rigid (and hinge-bent) docking. *Proteins* 52, 107-12.
- Schultz, J., Copley, R. R., Doerks, T., Ponting, C. P. & Bork, P. (2000). SMART: a web-based tool for the study of genetically mobile domains. *Nucleic Acids Res* 28, 231-4.
- Schweimer, K. (1997). Linear Prediction, spektrale Dekonvolution und digitale Filter - Hilfsmittel zur Prozessierung mehrdimensionaler NMR-Daten. *Diplomarbeit, Universität Bayreuth.*
- Schweimer, K. (2000). Mehrdimensionale heteronukleare NMR Spektroskopie zur Bestimmung der Strukturen des Birkenpollenallergens Bet v 1, des Guillardia theta Rubredoxins und des [2Fe-2S] Ferredoxins aus Halobacterium salinarum. *Dissertation, Universität Bayreuth.*
- Schweimer, K., Hoffmann, S., Bauer, F., Friedrich, U., Kardinal, C., Feller, S. M., Biesinger, B. & Sticht, H. (2002). Structural investigation of the binding of a herpesviral protein to the SH3 domain of tyrosine kinase Lck. *Biochemistry* 41, 5120-30.
- Schwieters, C. D., Kuszewski, J. J., Tjandra, N. & Clore, G. M. (2003). The Xplor-NIH NMR molecular structure determination package. *J Magn Reson* 160, 65-73.
- Selzer, T., Albeck, S. & Schreiber, G. (2000). Rational design of faster associating and tighter binding protein complexes. *Nat Struct Biol* 7, 537-41.
- Shaka, A. J., Keeler, J. & Freeman, R. (1983). Evaluation of a New Broadband Decoupling Sequence: WALTZ-16. *J Magn Reson* 53, 313-40.
- Shaka, A. J., Barker, P. B. & Freeman, R. (1985). Computer-Optimized Decoupling Scheme for Wideband Applications and Low-Level Operation. *J Magn Reson* 64, 547-52.

- Shenk, M. A. & Steele, R. E. (1993). A molecular snapshot of the metazoan 'Eve'. *Trends Biochem Sci* 18, 459-63.
- Shuker, S. B., Hajduk, P. J., Meadows, R. P. & Fesik, S. W. (1996). Discovering high-affinity ligands for proteins: SAR by NMR. *Science* 274, 1531-4.
- Sicheri, F., Moarefi, I. & Kuriyan, J. (1997). Crystal structure of the Src family tyrosine kinase Hck. *Nature* 385, 602-9.
- Singer, A. L. & Koretzky, G. A. (2002). Control of T cell function by positive and negative regulators. *Science* 296, 1639-40.
- Sitkoff, D., Sharp, K. A. & Honig, B. (1994). Correlating solvation free energies and surface tensions of hydrocarbon solutes. *Biophys Chem* 51, 397-403; discussion 404-9.
- Sklenar, V., Piotto, M., Leppik, R. & Saudek, V. (1993). Gradient-Tailored Water Suppression for 1H-15N HSQC Experiments Optimized to Retain Full Sensitivity. *J Magn Reson* 102, 241-5.
- Smith, G. R. & Sternberg, M. J. (2002). Prediction of protein-protein interactions by docking methods. *Curr Opin Struct Biol* 12, 28-35.
- Smith, L. J., Mark, A. E., Dobson, C. M. & van Gunsteren, W. F. (1995). Comparison of MD simulations and NMR experiments for hen lysozyme. Analysis of local fluctuations, cooperative motions, and global changes. *Biochemistry* 34, 10918-31.
- Sparks, A. B., Quilliam, L. A., Thorn, J. M., Der, C. J. & Kay, B. K. (1994). Identification and characterization of Src SH3 ligands from phage-displayed random peptide libraries. *J Biol Chem* 269, 23853-6.
- States, D. J., Haberkorn, R. A. & Ruben, D. J. (1982). A Two-Dimensional Nuclear Overhauser Experiment with Pure Absorption Phase in Four Quadrants. *J Magn Reson* 48, 286-92.
- Sticht, H., Escher, S. E., Schweimer, K., Forssmann, W. G. Rösch, P. & Adermann, K. (1999). Solution structure of the human CC chemokine 2: A monomeric representative of the CC chemokine subtype. *Biochemistry* 38, 5995-6002.
- Studier, F. W. & Moffatt, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 189, 113-30.
- Tajkhorshid, E., Nollert, P., Jensen, M. O., Miercke, L. J., O'Connell, J., Stroud, R. M. & Schulten, K. (2002). Control of the selectivity of the aquaporin water channel family by global orientational tuning. *Science* 296, 525-30.
- Talluri, S. & Wagner, G. (1996). An Optimized 3D NOESY-HSQC. *J Magn Reson* 112, 200-5.
- Tama, F., Wriggers, W. & Brooks, C. L., 3rd. (2002). Exploring global distortions of biological macromolecules and assemblies from low-resolution structural information and elastic network theory. *J Mol Biol* 321, 297-305.
- Thomas, M. R. (1994). Simple, effective cleanup of DNA ligation reactions prior to electro-transformation of *E. coli*. *Biotechniques* 16, 988-90.
- Tjandra, N. & Bax, A. (1997). Direct measurement of distances and angles in biomolecules by NMR in a dilute liquid crystalline medium. *Science* 278, 1111-4.
- Tjandra, N., Omichinski, J. G., Gronenborn, A. M., Clore, G. M. & Bax, A. (1997). Use of dipolar 1H-15N and 1H-13C couplings in the structure determination of magnetically oriented macromolecules in solution. *Nat Struct Biol* 4, 732-8.

- Tsai, J., Levitt, M. & Baker, D. (1999). Hierarchy of structure loss in MD simulations of src SH3 domain unfolding. *J Mol Biol* 291, 215-25.
- Tsui, V. & Case, D. A. (2000). Theory and applications of the generalized Born solvation model in macromolecular simulations. *Biopolymers* 56, 275-91.
- Tugarinov, V., Choy, W. Y., Orekhov, V. Y. & Kay, L. E. (2005). Solution NMR-derived global fold of a monomeric 82-kDa enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 622-7.
- Urzhumtsev, A., Tete-Favier, F., Mitschler, A., Barbanton, J., Barth, P., Urzhumtseva, L., Biellmann, J. F., Podjarny, A. & Moras, D. (1997). A 'specificity' pocket inferred from the crystal structures of the complexes of aldose reductase with the pharmaceutically important inhibitors tolrestat and sorbinil. *Structure* 5, 601-12.
- Vajda, S. & Camacho, C. J. (2004). Protein-protein docking: is the glass half-full or half-empty? *Trends Biotechnol* 22, 110-6.
- Verkhivker, G. M., Bouzida, D., Gehlhaar, D. K., Rejto, P. A., Schaffer, L., Arthurs, S., Colson, A. B., Freer, S. T., Larson, V., Luty, B. A., Marrone, T. & Rose, P. W. (2001). Hierarchy of simulation models in predicting molecular recognition mechanisms from the binding energy landscapes: structural analysis of the peptide complexes with SH2 domains. *Proteins* 45, 456-70.
- Verkhivker, G. M., Bouzida, D., Gehlhaar, D. K., Rejto, P. A., Schaffer, L., Arthurs, S., Colson, A. B., Freer, S. T., Larson, V., Luty, B. A., Marrone, T. & Rose, P. W. (2002). Hierarchy of simulation models in predicting structure and energetics of the Src SH2 domain binding to tyrosyl phosphopeptides. *J Med Chem* 45, 72-89.
- Vitkup, D., Melamud, E., Moulton, J. & Sander, C. (2001). Completeness in structural genomics. *Nat Struct Biol* 8, 559-66.
- Vuister, G. W. & Bax, A. (1992). Resolution Enhancement and Spectral Editing of Uniformly ¹³C-Enriched Proteins by Homonuclear Broadband ¹³C Decoupling. *J Magn Reson* 98, 428-35.
- Vuister, G. W. & Bax, A. (1993). Quantitative J Correlation: A New Approach for Measuring Homonuclear Three-Bond J(HNHa) Coupling Constants in ¹⁵N-Enriched Proteins. *J Am Chem Soc* 115, 7772-7.
- Waksman, G., Kominos, D., Robertson, S. C., Pant, N., Baltimore, D., Birge, R. B., Cowburn, D., Hanafusa, H., Mayer, B. J., Overduin, M. & et al. (1992). Crystal structure of the phosphotyrosine recognition domain SH2 of v-src complexed with tyrosine-phosphorylated peptides. *Nature* 358, 646-53.
- Waksman, G., Shoelson, S. E., Pant, N., Cowburn, D. & Kuriyan, J. (1993). Binding of a high affinity phosphotyrosyl peptide to the Src SH2 domain: crystal structures of the complexed and peptide-free forms. *Cell* 72, 779-90.
- Wallace, A. C., Laskowski, R. A. & Thornton, J. M. (1995). LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein Eng* 8, 127-34.
- Wang, J., Dixon, R. & Kollman, P. A. (1999). Ranking ligand binding affinities with avidin: a molecular dynamics-based interaction energy study. *Proteins* 34, 69-81.
- Wang, J., Morin, P., Wang, W. & Kollman, P. A. (2001a). Use of MM-PBSA in reproducing the binding free energies to HIV-1 RT of TIBO derivatives and predicting the binding mode to HIV-1 RT of efavirenz by docking and MM-PBSA. *J Am Chem Soc* 123, 5221-30.

- Wang, W., Lim, W. A., Jakalian, A., Wang, J., Luo, R., Bayly, C. I. & Kollman, P. A. (2001b). An analysis of the interactions between the Sem-5 SH3 domain and its ligands using molecular dynamics, free energy calculations, and sequence analysis. *J Am Chem Soc* 123, 3986-94.
- Wang, W., Lim, W. A., Jakalian, A., Wang, J., Wang, J., Luo, R., Bayly, C. I. & Kollman, P. A. (2001c). An analysis of the interactions between the Sem-5 SH3 domain and its ligands using molecular dynamic, free energy calculations, and sequence analysis. *J Am Chem Soc* 123, 3986-94.
- Wang, W. & Kollman, P. A. (2001). Computational study of protein specificity: the molecular basis of HIV-1 protease drug resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 14937-42.
- Wartha, F., Horn, A. H. C., Meiselbach, H. & Sticht, H. (2005). Molecular dynamics simulations of HIV-protease suggest different mechanisms contributing to drug resistance. *J Chem Theory and Comput*, submitted
- Watts, J. D., Affolter, M., Krebs, D. L., Wange, R. L., Samelson, L. E. & Aebersold, R. (1994). Identification by electrospray ionization mass spectrometry of the sites of tyrosine phosphorylation induced in activated Jurkat T cells on the protein tyrosine kinase ZAP-70. *J Biol Chem* 269, 29520-9.
- Wehner, L. E., Schroder, N., Kamino, K., Friedrich, U., Biesinger, B. & Ruther, U. (2001). Herpesvirus saimiri Tip gene causes T-cell lymphomas in transgenic mice. *DNA Cell Biol* 20, 81-8.
- Whitby, F. G., Masters, E. I., Kramer, L., Knowlton, J. R., Yao, Y., Wang, C. C. & Hill, C. P. (2000). Structural basis for the activation of 20S proteasomes by 11S regulators. *Nature* 408, 115-20.
- Wijmenga, S. S., Steensma, E. & van Mierlo, C. P. M. (1997). Doubly Sensitivity-Enhanced 3D HCCH-TOCSY of ¹³C-Labeled Proteins in H₂O Using Heteronuclear Cross Polarization and Pulsed Field Gradients. *J Magn Reson* 124, 459-67.
- Williams, J. C., Weijland, A., Gonfloni, S., Thompson, A., Courtneidge, S. A., Superti-Furga, G. & Wierenga, R. K. (1997). The 2.35 Å crystal structure of the inactivated form of chicken Src: a dynamic molecule with multiple regulatory interactions. *J Mol Biol* 274, 757-75.
- Williams, J. C., Wierenga, R. K. & Saraste, M. (1998). Insights into Src kinase functions: structural comparisons. *Trends Biochem Sci* 23, 179-84.
- Wittekind, M. & Mueller, L. (1993). 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* 101, 201-5.
- Wodak, S. J. & Janin, J. (2003). Structural basis of macromolecular recognition. *Adv Protein Chem* 61, 9-73.
- Xu, W., Harrison, S. C. & Eck, M. J. (1997). Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src. *Nature* 385, 595-602.
- Yamaguchi, H. & Hendrickson, W. A. (1996). Structural basis for activation of human lymphocyte kinase Lck upon tyrosine phosphorylation. *Nature* 384, 484-9.
- Young, M. A., Gonfloni, S., Superti-Furga, G., Roux, B. & Kuriyan, J. (2001). Dynamic coupling between the SH2 and SH3 domains of c-Src and Hck underlies their inactivation by C-terminal tyrosine phosphorylation. *Cell* 105, 115-26.

- Yu, H., Rosen, M. K., Shin, T. B., Seidel-Dugan, C., Brugge, J. S. & Schreiber, S. L. (1992). Solution structure of the SH3 domain of Src and identification of its ligand-binding site. *Science* 258, 1665-8.
- Yu, H., Chen, J. K., Feng, S., Dalgarno, D. C., Brauer, A. W. & Schreiber, S. L. (1994). Structural basis for the binding of proline-rich peptides to SH3 domains. *Cell* 76, 933-45.
- Zhang, X. & Matthews, B. W. (1995). EdPDB: A multi- functional tool for protein structure analysis. *J Appl Cryst* 28, 624-630.
- Zhang, X., Walker, S. B., Chipman, P. R., Nibert, M. L. & Baker, T. S. (2003). Reovirus polymerase lambda 3 localized by cryo-electron microscopy of virions at a resolution of 7.6 Å. *Nat Struct Biol* 10, 1011-8.
- Zhao, Z. S., Manser, E. & Lim, L. (2000). Interaction between PAK and nck: a template for Nck targets and role of PAK autophosphorylation. *Mol Cell Biol* 20, 3906-17.
- Zou, X., Sun, Y. & Kuntz, I. D. (1999). Inclusion of solvation in ligand binding free energy calculation using the generalized-Born model. *J Amer Chem Soc* 121, 8033-8043.
- Zuiderweg, E. R. (2002). Mapping protein-protein interactions in solution by NMR spectroscopy. *Biochemistry* 41, 1-7.

10 Anhang

10.1 Nukleotidsequenz der GST-LckSH3_P17G

```

                                BamHI
                                |
GCGACCATCCTCCAAAATCGGATCTGGTTCCGCGTGGATCCCCACTGCAAGACAACCTGG
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
CGCTGGTAGGAGGTTTGTAGCCTAGACCAAGGCGCACCTAGGGGTGACGTTCTGTTGGACC

    D H P P K S D L V P R G S P L Q D N L V -

TTATCGCTCTGCACAGCTATGAGGGCTCTCACGACGGAGATCTGGGCTTTGAGAAGGGGG
61  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
AATAGCGAGACGTGTCGATACTCCCGAGAGTGCTGCCTCTAGACCCGAAACTCTTCCCCC

    I A L H S Y E G S H D G D L G F E K G E -

AACAGCTCCGCATCCTGGAGCAGAGCGGCGAGTGGTGGGAAGGCGCAGTCCCTGACCACGG
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
TTGTGCGAGGCGTAGGACCTCGTCTCGCCGCTCACCACCTTCCGCGTCAGGGACTGGTGCC

    Q L R I L E Q S G E W W K A Q S L T T G -

                                EcoRI
                                |
GCCAGGAAGGCTTCATCCCCTTCAATTTTGTGGCCAAAGCGAACTGAATTCCCGGGTCTGA
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
CGGTCCTTCCGAAGTAGGGGAAGTTAAAACACCGTTTCGCTTGACTTAAGGGCCCAGCT

    Q E G F I P F N F V A K A N * I P G S T -

```

10.2 Reinigung und Verifizierung der rekombinant dargestellten Komponenten

Die einzelnen Schritte der Reinigung und Verifizierung der rekombinant dargestellten Komponenten sind exemplarisch für LynSH3 beziehungsweise Tip(140-191) gezeigt (Bauer, 2001).

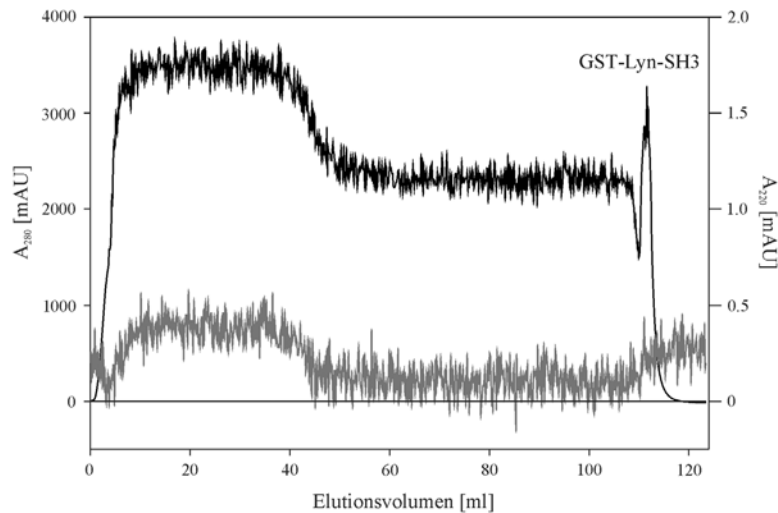


Abb. 10.1 GST-Affinitätschromatografie am Beispiel der GST-LynSH3, beobachtet bei 280 (schwarz) und 220 nm (grau) in Abhängigkeit des Elutionsvolumen (Ev). Probenauftrag (bis 30 ml Ev), Waschen (30 bis 100 ml Ev) und Elution (100 bis 125 ml Ev) bei einem Säulenvolumen von 10 ml (2×5 ml GSTrap™). Die Elution der GST-LynSH3 erfolgte zwischen 110 und 115 ml Ev (Abb. aus Bauer, 2001).

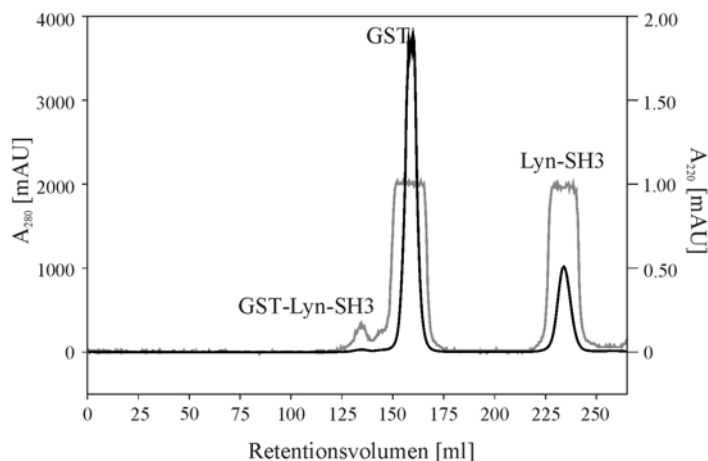


Abb. 10.2 Größenausschlusschromatografie nach proteolytischer Spaltung am Beispiel der LynSH3, beobachtet bei 280 (schwarz) und 220 nm (grau) in Abhängigkeit des Retentionsvolumen (Rv). Die Elution des GST-Affinitätsanhangs erfolgte bei 138 bis 170 ml Rv, LynSH3 eluierte deutlich getrennt zwischen 230 bis 252 ml Rv unter Verwendung einer Superdex 200 Größenausschlusschromatografiesäule (364 ml Säulenvolumen) (Abb. aus Bauer, 2001).

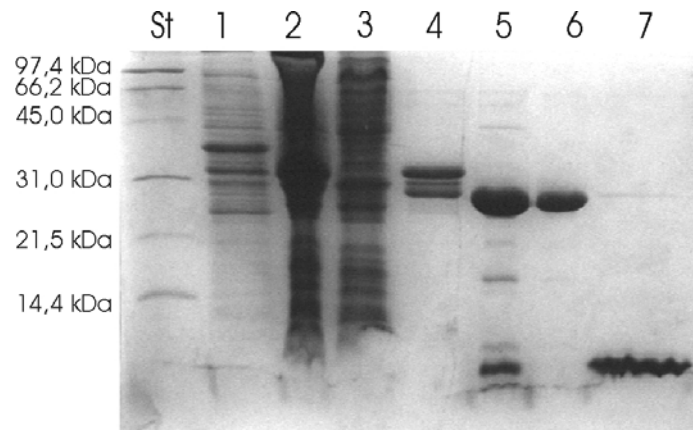


Abb. 10.3 19 %ige SDS-PAGE der Reinigungsschritte am Beispiel der LynSH3. St: Bio-Rad-Proteinstandard; Bahn 1: Zellpellet nach Aufschluss; Bahn 2: Rohextrakt; Bahn 3: Durchbruch der GST-Affinitätssäule; Bahn 4: vereinigte Fraktionen zwischen 110 und 115 ml Elutionsvolumen der GST-Affinitätschromatografie (GST-LynSH3); Bahn 5: Reaktionsansatz nach PreScission-Spaltung; Bahn 6: vereinigte Fraktionen zwischen 138 und 170 ml Retentionsvolumen der Größenausschlusschromatografie (GST-Affinitätsanhang); Bahn 7: vereinigte Fraktionen zwischen 230 und 252 ml Retentionsvolumen der Größenausschlusschromatografie (LynSH3) (Abb. aus Bauer, 2001).

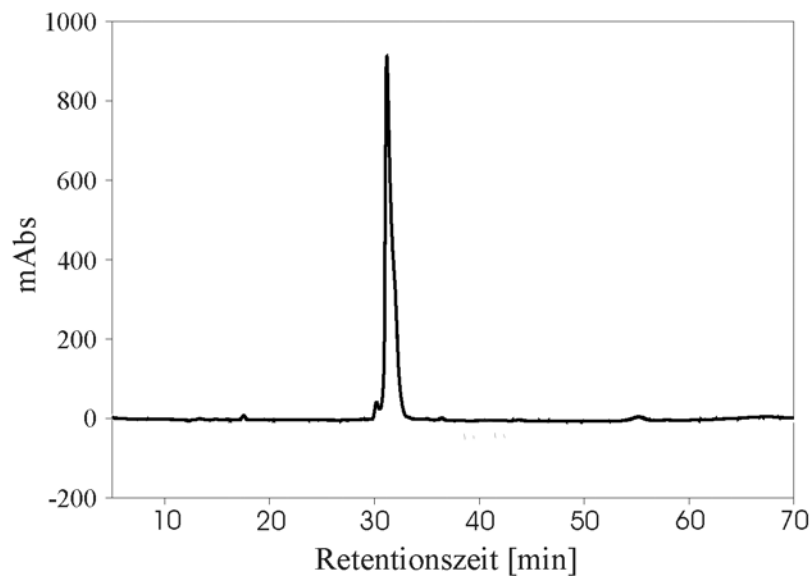


Abb. 10.4 RF-HPLC-Chromatogramm am Beispiel von Tip(140-191) bei 220 nm. Die Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten von 0 % bis 80 % (v/v) Acetonitril in 0,1 % (v/v) TFA von einer C18-PrepLC-Säule (Abb. aus Bauer, 2001).

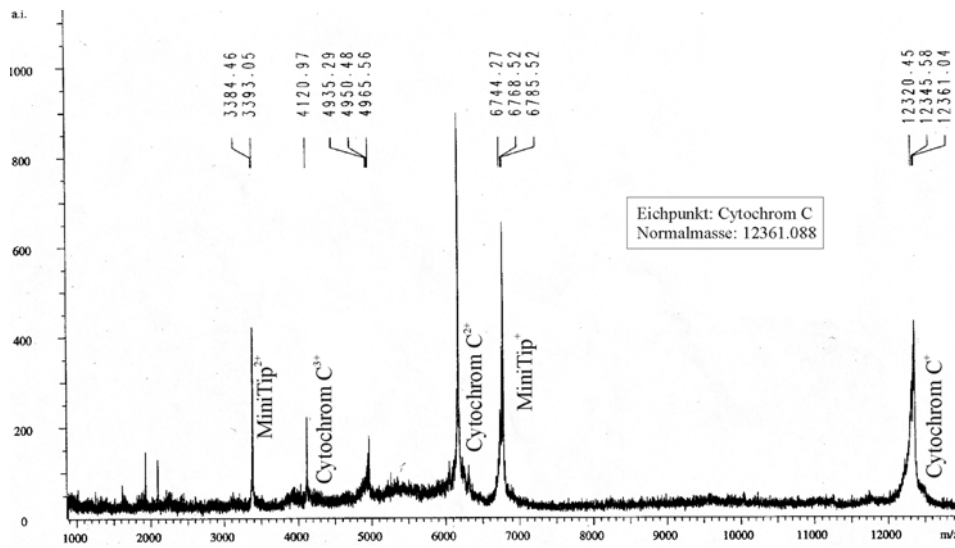


Abb. 10.5 Bestimmung der Molekularmasse am Beispiel von Tip(140-191). Die theoretisch berechnete Molekularmasse von Tip(140-191) beträgt 6784,7 Da (Abb. aus Bauer, 2001).

10.3 Chemische Verschiebungen

LynSH3 (frei)

1	GLY	HA2	H	3.94	7	GLU	C	C	177.39	13	VAL	CG2	C	18.67	19	TYR	HD1	H	7.06
1	GLY	HA3	H	3.94	8	GLU	H	H	8.20	13	VAL	N	N	118.95	19	TYR	HD2	H	7.06
1	GLY	CA	C	43.49	8	GLU	HA	H	4.00	13	VAL	C	C	176.49	19	TYR	HE1	H	6.76
2	PRO	HA	H	4.45	8	GLU	HB2	H	1.94	14	VAL	H	H	8.95	19	TYR	HE2	H	6.76
2	PRO	HB2	H	1.93	8	GLU	HB3	H	2.06	14	VAL	HA	H	4.95	19	TYR	CA	C	57.17
2	PRO	HB3	H	2.30	8	GLU	HG2	H	2.24	14	VAL	HB	H	1.73	19	TYR	CB	C	42.37
2	PRO	HG2	H	1.99	8	GLU	HG3	H	2.24	14	VAL	HG1	H	0.84	19	TYR	N	N	119.17
2	PRO	HG3	H	1.99	8	GLU	CA	C	56.52	14	VAL	HG2	H	0.82	19	TYR	C	C	175.43
2	PRO	HD2	H	3.54	8	GLU	CB	C	30.28	14	VAL	CA	C	58.48	20	ASP	H	H	7.72
2	PRO	HD3	H	3.54	8	GLU	CG	C	36.43	14	VAL	CB	C	35.48	20	ASP	HA	H	4.58
2	PRO	CA	C	63.17	8	GLU	N	N	121.15	14	VAL	CG1	C	21.74	20	ASP	HB2	H	2.22
2	PRO	CB	C	32.35	8	GLU	C	C	176.70	14	VAL	CG2	C	19.59	20	ASP	HB3	H	2.41
2	PRO	CG	C	27.08	9	GLN	H	H	8.22	14	VAL	N	N	117.90	20	ASP	CA	C	52.88
2	PRO	CD	C	49.67	9	GLN	HA	H	4.33	14	VAL	C	C	173.46	20	ASP	CB	C	41.64
3	LEU	H	H	8.51	9	GLN	HB2	H	1.97	15	ALA	H	H	8.22	20	ASP	N	N	127.08
3	LEU	HA	H	4.32	9	GLN	HB3	H	2.14	15	ALA	HA	H	4.41	20	ASP	C	C	173.73
3	LEU	HB2	H	1.59	9	GLN	HG2	H	2.35	15	ALA	HB	H	1.72	21	GLY	H	H	7.57
3	LEU	HB3	H	1.66	9	GLN	HG3	H	2.35	15	ALA	CA	C	52.76	21	GLY	HA2	H	3.50
3	LEU	HG	H	1.55	9	GLN	HE21	H	7.48	15	ALA	CB	C	21.84	21	GLY	HA3	H	3.58
3	LEU	HD1	H	0.88	9	GLN	HE22	H	6.80	15	ALA	N	N	126.84	21	GLY	CA	C	46.58
3	LEU	HD2	H	0.88	9	GLN	CA	C	55.95	15	ALA	C	C	174.58	21	GLY	N	N	108.36
3	LEU	CA	C	55.42	9	GLN	CB	C	29.70	16	LEU	H	H	9.50	21	GLY	C	C	174.56
3	LEU	CB	C	42.23	9	GLN	CG	C	33.93	16	LEU	HA	H	3.94	22	ILE	H	H	8.34
3	LEU	CG	C	27.13	9	GLN	N	N	120.60	16	LEU	HB2	H	0.66	22	ILE	HA	H	4.10
3	LEU	CD1	C	25.55	9	GLN	NE2	N	112.46	16	LEU	HB3	H	0.96	22	ILE	HB	H	1.61
3	LEU	N	N	122.26	9	GLN	C	C	176.34	16	LEU	HG	H	1.34	22	ILE	HG12	H	1.05
3	LEU	C	C	176.92	10	GLY	H	H	8.30	16	LEU	HD1	H	0.64	22	ILE	HG13	H	1.05
4	GLY	H	H	8.38	10	GLY	HA2	H	3.91	16	LEU	HD2	H	0.64	22	ILE	HG2	H	0.61
4	GLY	HA2	H	3.95	10	GLY	HA3	H	4.01	16	LEU	CA	C	55.77	22	ILE	HD1	H	0.82
4	GLY	HA3	H	3.95	10	GLY	CA	C	45.46	16	LEU	CB	C	42.46	22	ILE	CA	C	61.73
4	GLY	CA	C	45.10	10	GLY	N	N	109.03	16	LEU	CG	C	26.89	22	ILE	CB	C	40.22
4	GLY	N	N	109.87	10	GLY	C	C	176.25	16	LEU	CD1	C	25.29	22	ILE	CG1	C	26.66
4	GLY	C	C	177.93	11	ASP	H	H	8.40	16	LEU	CD2	C	21.74	22	ILE	CG2	C	17.05
5	SER	H	H	8.18	11	ASP	HA	H	4.60	16	LEU	N	N	127.23	22	ILE	CD1	C	13.27
5	SER	HA	H	4.77	11	ASP	HB2	H	2.53	16	LEU	C	C	179.32	22	ILE	N	N	120.39
5	SER	HB2	H	3.87	11	ASP	HB3	H	2.68	17	TYR	H	H	7.41	22	ILE	C	C	173.47
5	SER	HB3	H	3.87	11	ASP	CA	C	54.04	17	TYR	HA	H	4.89	23	HIS	H	H	7.99
5	SER	CA	C	56.51	11	ASP	CB	C	40.90	17	TYR	HB2	H	2.37	23	HIS	HA	H	4.81
5	SER	CB	C	63.45	11	ASP	N	N	119.96	17	TYR	HB3	H	3.31	23	HIS	HB2	H	2.85
5	SER	N	N	117.00	11	ASP	C	C	173.32	17	TYR	HD1	H	6.75	23	HIS	HB3	H	3.12
5	SER	C	C	173.85	12	ILE	H	H	8.03	17	TYR	HD2	H	6.75	23	HIS	HD2	H	6.88
6	PRO	HA	H	4.39	12	ILE	HA	H	4.99	17	TYR	HE1	H	6.64	23	HIS	HE1	H	8.11
6	PRO	HB2	H	1.91	12	ILE	HB	H	1.93	17	TYR	HE2	H	6.64	23	HIS	CA	C	53.99
6	PRO	HB3	H	2.29	12	ILE	HG12	H	1.34	17	TYR	CA	C	52.97	23	HIS	CB	C	29.60
6	PRO	HG2	H	2.03	12	ILE	HG13	H	1.50	17	TYR	CB	C	40.49	23	HIS	CD2	C	118.18
6	PRO	HG3	H	2.03	12	ILE	HG2	H	0.89	17	TYR	N	N	114.54	23	HIS	N	N	122.33
6	PRO	HD2	H	3.75	12	ILE	HD1	H	0.75	17	TYR	C	C	175.12	23	HIS	C	C	175.86
6	PRO	HD3	H	3.82	12	ILE	CA	C	59.04	18	PRO	HA	H	4.59	24	PRO	HA	H	4.29
6	PRO	CA	C	63.94	12	ILE	CB	C	37.72	18	PRO	HB2	H	2.13	24	PRO	HB2	H	1.85
6	PRO	CB	C	32.03	12	ILE	CG1	C	27.43	18	PRO	HB3	H	2.44	24	PRO	HB3	H	2.35
6	PRO	CG	C	27.48	12	ILE	CG2	C	18.32	18	PRO	HG2	H	2.20	24	PRO	HG2	H	1.94
6	PRO	CD	C	50.77	12	ILE	CD1	C	11.14	18	PRO	HG3	H	2.20	24	PRO	HG3	H	1.94
7	GLU	H	H	8.52	12	ILE	N	N	120.64	18	PRO	HD2	H	3.72	24	PRO	HD2	H	3.24
7	GLU	HA	H	4.20	12	ILE	C	C	174.51	18	PRO	HD3	H	3.97	24	PRO	HD3	H	3.75
7	GLU	HB2	H	1.92	13	VAL	H	H	9.24	18	PRO	CA	C	62.34	24	PRO	CA	C	65.53
7	GLU	HB3	H	2.02	13	VAL	HA	H	5.16	18	PRO	CB	C	32.58	24	PRO	CB	C	32.14
7	GLU	HG2	H	2.24	13	VAL	HB	H	1.89	18	PRO	CG	C	26.89	24	PRO	CG	C	27.59
7	GLU	HG3	H	2.24	13	VAL	HG1	H	0.83	18	PRO	CD	C	49.81	24	PRO	CD	C	50.62
7	GLU	CA	C	57.15	13	VAL	HG2	H	0.61	19	TYR	H	H	8.04	25	ASP	H	H	8.94
7	GLU	CB	C	30.01	13	VAL	CA	C	57.83	19	TYR	HA	H	4.61	25	ASP	HA	H	4.91
7	GLU	CG	C	36.43	13	VAL	CB	C	35.57	19	TYR	HB2	H	0.88	25	ASP	HB2	H	2.92
7	GLU	N	N	119.74	13	VAL	CG1	C	22.00	19	TYR	HB3	H	2.27	25	ASP	HB3	H	2.99

25 ASP CA	C	53.76	31 LYS HG3	H	1.21	36 LYS HE3	H	2.94	42 GLY HA3	H	4.26
25 ASP CB	C	40.28	31 LYS HD2	H	1.62	36 LYS CA	C	54.29	42 GLY CA	C	46.81
25 ASP N	N	114.81	31 LYS HD3	H	1.62	36 LYS CB	C	35.48	42 GLY N	N	111.97
25 ASP C	C	176.81	31 LYS HE2	H	2.98	36 LYS CG	C	24.99	42 GLY C	C	175.56
26 ASP H	H	7.85	31 LYS HE3	H	2.98	36 LYS CD	C	29.76	43 GLU H	H	9.02
26 ASP HA	H	5.32	31 LYS CA	C	59.29	36 LYS CE	C	41.93	43 GLU HA	H	4.02
26 ASP HB2	H	2.93	31 LYS CB	C	32.66	36 LYS N	N	122.24	43 GLU HB2	H	1.83
26 ASP HB3	H	2.93	31 LYS CG	C	25.27	36 LYS C	C	172.92	43 GLU HB3	H	1.88
26 ASP CA	C	54.99	31 LYS CD	C	30.20	37 VAL H	H	9.04	43 GLU HG2	H	2.05
26 ASP CB	C	42.76	31 LYS CE	C	42.44	37 VAL HA	H	3.79	43 GLU HG3	H	2.11
26 ASP N	N	121.06	31 LYS N	N	119.69	37 VAL HB	H	1.92	43 GLU CA	C	57.65
26 ASP C	C	176.26	31 LYS C	C	176.25	37 VAL HG1	H	0.86	43 GLU CB	C	29.88
27 LEU H	H	9.30	32 GLY H	H	8.80	37 VAL HG2	H	0.51	43 GLU CG	C	36.60
27 LEU HA	H	4.60	32 GLY HA2	H	3.47	37 VAL CA	C	64.56	43 GLU N	N	125.61
27 LEU HB2	H	0.80	32 GLY HA3	H	4.31	37 VAL CB	C	31.84	43 GLU C	C	174.38
27 LEU HB3	H	1.88	32 GLY CA	C	45.23	37 VAL CG1	C	23.83	44 TRP H	H	7.69
27 LEU HG	H	0.71	32 GLY N	N	115.22	37 VAL CG2	C	21.76	44 TRP HA	H	5.21
27 LEU HD1	H	0.84	32 GLY C	C	177.69	37 VAL N	N	126.82	44 TRP HB2	H	3.04
27 LEU HD2	H	0.84	33 GLU H	H	7.86	37 VAL C	C	176.06	44 TRP HB3	H	3.08
27 LEU CA	C	54.04	33 GLU HA	H	4.09	38 LEU H	H	9.31	44 TRP HD1	H	7.19
27 LEU CB	C	43.89	33 GLU HB2	H	2.16	38 LEU HA	H	4.38	44 TRP HE1	H	10.01
27 LEU CG	C	26.05	33 GLU HB3	H	2.41	38 LEU HB2	H	1.30	44 TRP HE3	H	7.31
27 LEU CD1	C	24.80	33 GLU HG2	H	2.33	38 LEU HB3	H	1.62	44 TRP HZ2	H	7.46
27 LEU N	N	127.03	33 GLU HG3	H	2.33	38 LEU HG	H	1.64	44 TRP HZ3	H	6.75
27 LEU C	C	176.68	33 GLU CA	C	58.04	38 LEU HD1	H	0.72	44 TRP HH2	H	7.32
28 SER H	H	7.70	33 GLU CB	C	31.76	38 LEU HD2	H	0.72	44 TRP CA	C	55.66
28 SER HA	H	4.76	33 GLU CG	C	36.19	38 LEU CA	C	55.73	44 TRP CB	C	31.06
28 SER HB2	H	3.83	33 GLU N	N	124.20	38 LEU CB	C	43.01	44 TRP N	N	119.91
28 SER HB3	H	4.01	33 GLU C	C	172.96	38 LEU CG	C	27.04	44 TRP NE1	N	129.02
28 SER CA	C	58.05	34 LYS H	H	8.50	38 LEU CD1	C	25.54	44 TRP C	C	175.65
28 SER CB	C	64.65	34 LYS HA	H	5.34	38 LEU CD2	C	22.21	45 TRP H	H	9.35
28 SER N	N	117.47	34 LYS HB2	H	1.59	38 LEU N	N	128.40	45 TRP HA	H	5.64
28 SER C	C	174.77	34 LYS HB3	H	1.81	38 LEU C	C	175.33	45 TRP HB2	H	2.99
29 PHE H	H	8.51	34 LYS HG2	H	1.29	39 GLU H	H	7.65	45 TRP HB3	H	3.25
29 PHE HA	H	5.16	34 LYS HG3	H	1.67	39 GLU HA	H	4.42	45 TRP HD1	H	7.09
29 PHE HB2	H	2.92	34 LYS HD2	H	1.65	39 GLU HB2	H	1.88	45 TRP HE1	H	9.95
29 PHE HB3	H	3.20	34 LYS HD3	H	1.65	39 GLU HB3	H	1.96	45 TRP HE3	H	7.11
29 PHE HD1	H	7.02	34 LYS HE2	H	2.90	39 GLU HG2	H	2.06	45 TRP HZ2	H	7.46
29 PHE HD2	H	7.02	34 LYS HE3	H	2.90	39 GLU HG3	H	2.29	45 TRP HZ3	H	6.76
29 PHE HE1	H	7.57	34 LYS CA	C	55.39	39 GLU CA	C	55.38	45 TRP HH2	H	7.12
29 PHE HE2	H	7.57	34 LYS CB	C	34.72	39 GLU CB	C	34.78	45 TRP CA	C	53.09
29 PHE HZ	H	6.79	34 LYS CG	C	26.18	39 GLU CG	C	35.99	45 TRP CB	C	31.71
29 PHE CA	C	55.90	34 LYS CD	C	29.53	39 GLU N	N	114.71	45 TRP N	N	123.60
29 PHE CB	C	40.37	34 LYS CE	C	42.14	39 GLU C	C	177.49	45 TRP NE1	N	128.71
29 PHE N	N	115.86	34 LYS N	N	124.33	40 GLU H	H	8.69	45 TRP C	C	175.18
29 PHE C	C	173.62	34 LYS C	C	175.16	40 GLU HA	H	4.15	46 LYS H	H	9.28
30 LYS H	H	9.01	35 MET H	H	8.98	40 GLU HB2	H	1.48	46 LYS HA	H	4.53
30 LYS HA	H	4.70	35 MET HA	H	5.08	40 GLU HB3	H	1.66	46 LYS HB2	H	1.41
30 LYS HB2	H	1.88	35 MET HB2	H	1.42	40 GLU HG2	H	0.62	46 LYS HB3	H	1.66
30 LYS HB3	H	2.00	35 MET HB3	H	1.61	40 GLU HG3	H	1.25	46 LYS HG2	H	0.65
30 LYS HG2	H	1.51	35 MET HG2	H	2.05	40 GLU CA	C	55.69	46 LYS HG3	H	1.07
30 LYS HG3	H	1.57	35 MET HG3	H	2.26	40 GLU CB	C	30.83	46 LYS HD2	H	1.33
30 LYS HD2	H	1.68	35 MET HE	H	0.86	40 GLU CG	C	34.81	46 LYS HD3	H	1.33
30 LYS HD3	H	1.68	35 MET CA	C	54.13	40 GLU N	N	123.99	46 LYS HE2	H	2.55
30 LYS HE2	H	2.98	35 MET CB	C	39.33	40 GLU C	C	174.58	46 LYS HE3	H	2.58
30 LYS HE3	H	2.98	35 MET CG	C	32.76	41 HIS H	H	8.23	46 LYS CA	C	56.09
30 LYS CA	C	53.93	35 MET CE	C	17.29	41 HIS HA	H	4.98	46 LYS CB	C	34.27
30 LYS CB	C	34.78	35 MET N	N	119.81	41 HIS HB2	H	3.33	46 LYS CG	C	25.72
30 LYS CG	C	24.76	35 MET C	C	176.83	41 HIS HB3	H	3.33	46 LYS CD	C	28.89
30 LYS CD	C	29.08	36 LYS H	H	9.10	41 HIS HD2	H	6.99	46 LYS CE	C	41.83
30 LYS CE	C	42.12	36 LYS HA	H	4.94	41 HIS HE1	H	7.80	46 LYS N	N	123.90
30 LYS N	N	120.53	36 LYS HB2	H	1.54	41 HIS CA	C	54.52	46 LYS C	C	175.64
30 LYS C	C	175.18	36 LYS HB3	H	1.67	41 HIS CB	C	30.23	47 ALA H	H	9.49
31 LYS H	H	8.40	36 LYS HG2	H	1.16	41 HIS CD2	C	120.34	47 ALA HA	H	5.38
31 LYS HA	H	3.46	36 LYS HG3	H	1.30	41 HIS N	N	123.81	47 ALA HB	H	1.21
31 LYS HB2	H	1.42	36 LYS HD2	H	1.53	41 HIS C	C	174.97	47 ALA CA	C	50.81
31 LYS HB3	H	1.75	36 LYS HD3	H	1.53	42 GLY H	H	8.54	47 ALA CB	C	25.02
31 LYS HG2	H	1.12	36 LYS HE2	H	2.85	42 GLY HA2	H	3.76	47 ALA N	N	107.32

47	ALA	C	C	175.12	53	LYS	HA	H	4.17	58	ILE	H	H	9.74	63	VAL	CG1	C	21.47
48	LYS	H	H	8.78	53	LYS	HB2	H	2.02	58	ILE	HA	H	5.27	63	VAL	CG2	C	18.05
48	LYS	HA	H	5.25	53	LYS	HB3	H	2.32	58	ILE	HB	H	1.63	63	VAL	N	N	108.70
48	LYS	HB2	H	1.54	53	LYS	HG2	H	1.39	58	ILE	HG12	H	1.23	63	VAL	C	C	175.06
48	LYS	HB3	H	1.67	53	LYS	HG3	H	1.39	58	ILE	HG13	H	1.51	64	ALA	H	H	8.49
48	LYS	HG2	H	1.08	53	LYS	HD2	H	1.72	58	ILE	HG2	H	1.14	64	ALA	HA	H	4.80
48	LYS	HG3	H	1.18	53	LYS	HD3	H	1.72	58	ILE	HD1	H	0.56	64	ALA	HB	H	1.33
48	LYS	HD2	H	1.62	53	LYS	HE2	H	2.98	58	ILE	CA	C	57.31	64	ALA	CA	C	50.36
48	LYS	HD3	H	1.62	53	LYS	HE3	H	2.98	58	ILE	CB	C	40.56	64	ALA	CB	C	22.92
48	LYS	HE2	H	2.90	53	LYS	CA	C	58.45	58	ILE	CG1	C	25.01	64	ALA	N	N	120.87
48	LYS	HE3	H	2.98	53	LYS	CB	C	29.52	58	ILE	CG2	C	22.12	64	ALA	C	C	173.52
48	LYS	CA	C	53.61	53	LYS	CG	C	25.60	58	ILE	CD1	C	14.91	65	LYS	H	H	8.73
48	LYS	CB	C	37.53	53	LYS	CD	C	29.86	58	ILE	N	N	113.13	65	LYS	HA	H	4.40
48	LYS	CG	C	24.38	53	LYS	CE	C	42.30	58	ILE	C	C	176.57	65	LYS	HB2	H	1.78
48	LYS	CD	C	30.20	53	LYS	N	N	113.90	59	PRO	HA	H	3.72	65	LYS	HB3	H	1.88
48	LYS	CE	C	42.12	53	LYS	C	C	176.08	59	PRO	HB2	H	1.04	65	LYS	HG2	H	1.38
48	LYS	N	N	118.20	54	LYS	H	H	7.65	59	PRO	HB3	H	1.42	65	LYS	HG3	H	1.64
48	LYS	C	C	173.52	54	LYS	HA	H	4.34	59	PRO	HG2	H	0.44	65	LYS	HD2	H	1.70
49	SER	H	H	8.94	54	LYS	HB2	H	1.71	59	PRO	HG3	H	0.69	65	LYS	HD3	H	1.70
49	SER	HA	H	4.59	54	LYS	HB3	H	1.88	59	PRO	HD2	H	2.93	65	LYS	HE2	H	2.81
49	SER	HB2	H	4.17	54	LYS	HG2	H	1.49	59	PRO	HD3	H	2.97	65	LYS	HE3	H	2.90
49	SER	HB3	H	4.17	54	LYS	HG3	H	1.49	59	PRO	CA	C	60.86	65	LYS	CA	C	57.40
49	SER	CA	C	58.58	54	LYS	HD2	H	1.77	59	PRO	CB	C	29.90	65	LYS	CB	C	32.88
49	SER	CB	C	62.98	54	LYS	HD3	H	1.77	59	PRO	CG	C	26.43	65	LYS	CG	C	26.00
49	SER	N	N	119.47	54	LYS	HE2	H	3.07	59	PRO	CD	C	50.02	65	LYS	CD	C	29.36
49	SER	C	C	176.61	54	LYS	HE3	H	3.07	60	SER	H	H	7.77	65	LYS	CE	C	42.20
50	LEU	H	H	9.22	54	LYS	CA	C	56.89	60	SER	HA	H	2.67	65	LYS	N	N	120.92
50	LEU	HA	H	4.26	54	LYS	CB	C	33.65	60	SER	HB2	H	1.74	65	LYS	C	C	176.81
50	LEU	HB2	H	1.70	54	LYS	CG	C	25.92	60	SER	HB3	H	2.16	66	LEU	H	H	8.28
50	LEU	HB3	H	1.70	54	LYS	CD	C	29.12	60	SER	CA	C	60.96	66	LEU	HA	H	4.32
50	LEU	HG	H	1.61	54	LYS	CE	C	42.36	60	SER	CB	C	60.95	66	LEU	HB2	H	1.42
50	LEU	HD1	H	0.99	54	LYS	N	N	120.45	60	SER	N	N	121.85	66	LEU	HB3	H	1.59
50	LEU	HD2	H	0.85	54	LYS	C	C	175.24	60	SER	C	C	178.78	66	LEU	HG	H	1.55
50	LEU	CA	C	56.92	55	GLU	H	H	8.45	61	ASN	H	H	8.17	66	LEU	HD1	H	0.81
50	LEU	CB	C	40.47	55	GLU	HA	H	5.70	61	ASN	HA	H	4.61	66	LEU	HD2	H	0.81
50	LEU	CG	C	28.47	55	GLU	HB2	H	1.82	61	ASN	HB2	H	2.69	66	LEU	CA	C	55.42
50	LEU	CD1	C	23.25	55	GLU	HB3	H	1.84	61	ASN	HB3	H	2.96	66	LEU	CB	C	42.89
50	LEU	CD2	C	22.93	55	GLU	HG2	H	2.01	61	ASN	HD21	H	7.45	66	LEU	CG	C	27.13
50	LEU	N	N	106.22	55	GLU	HG3	H	2.22	61	ASN	HD22	H	6.62	66	LEU	CD1	C	24.34
50	LEU	C	C	177.77	55	GLU	CA	C	53.71	61	ASN	CA	C	53.68	66	LEU	N	N	124.22
51	LEU	H	H	8.51	55	GLU	CB	C	34.07	61	ASN	CB	C	36.65	66	LEU	C	C	176.85
51	LEU	HA	H	4.49	55	GLU	CG	C	36.28	61	ASN	N	N	115.76	67	ASN	H	H	8.58
51	LEU	HB2	H	1.86	55	GLU	N	N	117.99	61	ASN	ND2	N	111.48	67	ASN	HA	H	4.82
51	LEU	HB3	H	1.86	55	GLU	C	C	174.65	61	ASN	C	C	174.67	67	ASN	HB2	H	2.77
51	LEU	HG	H	1.55	56	GLY	H	H	8.75	62	TYR	H	H	7.86	67	ASN	HB3	H	2.85
51	LEU	HD1	H	0.92	56	GLY	HA2	H	3.96	62	TYR	HA	H	4.75	67	ASN	HD21	H	7.59
51	LEU	HD2	H	0.87	56	GLY	HA3	H	4.16	62	TYR	HB2	H	3.35	67	ASN	HD22	H	6.89
51	LEU	CA	C	56.86	56	GLY	CA	C	45.50	62	TYR	HB3	H	3.64	67	ASN	CA	C	53.34
51	LEU	CB	C	43.43	56	GLY	N	N	107.58	62	TYR	HD1	H	7.13	67	ASN	CB	C	39.01
51	LEU	CG	C	27.13	56	GLY	C	C	176.69	62	TYR	HD2	H	7.13	67	ASN	N	N	120.28
51	LEU	CD1	C	24.92	57	PHE	H	H	9.08	62	TYR	HE1	H	7.12	67	ASN	ND2	N	113.07
51	LEU	CD2	C	23.54	57	PHE	HA	H	5.59	62	TYR	HE2	H	7.12	67	ASN	C	C	176.62
51	LEU	N	N	121.11	57	PHE	HB2	H	3.12	62	TYR	CA	C	58.57	68	THR	H	H	7.72
51	LEU	C	C	177.18	57	PHE	HB3	H	3.17	62	TYR	CB	C	39.26	68	THR	HA	H	4.13
52	THR	H	H	8.40	57	PHE	HD1	H	7.17	62	TYR	N	N	119.61	68	THR	HB	H	4.24
52	THR	HA	H	4.36	57	PHE	HD2	H	7.17	62	TYR	C	C	175.70	68	THR	HG2	H	1.24
52	THR	HB	H	4.49	57	PHE	HE1	H	7.16	63	VAL	H	H	7.16	68	THR	CA	C	63.19
52	THR	HG2	H	1.32	57	PHE	HE2	H	7.16	63	VAL	HA	H	5.30	68	THR	CB	C	70.77
52	THR	CA	C	61.83	57	PHE	HZ	H	7.16	63	VAL	HB	H	1.73	68	THR	N	N	119.14
52	THR	CB	C	71.32	57	PHE	CA	C	58.99	63	VAL	HG1	H	0.38	68	THR	C	C	174.38
52	THR	N	N	106.39	57	PHE	CB	C	41.12	63	VAL	HG2	H	0.61					
52	THR	C	C	178.65	57	PHE	N	N	119.57	63	VAL	CA	C	58.26					
53	LYS	H	H	7.54	57	PHE	C	C	171.31	63	VAL	CB	C	35.88					

Tip (frei)

169	THR	H	H	8.00	175	PRO	HB3	H	1.90	180	PRO	CA	C	@	186	LEU	HB3	H	1.67
169	THR	HA	H	4.28	175	PRO	HG2	H	2.04	180	PRO	CB	C	@	186	LEU	HG	H	1.71
169	THR	HB	H	4.17	175	PRO	HG3	H	2.04	180	PRO	CG	C	@	186	LEU	HD1	H	0.94
169	THR	HG2	H	1.16	175	PRO	HD2	H	3.84	180	PRO	CD	C	@	186	LEU	HD2	H	0.88
169	THR	CA	C	61.50	175	PRO	HD3	H	3.63	181	PRO	HA	H	@	186	LEU	CA	C	55.79
169	THR	CB	C	69.55	175	PRO	CA	C	63.11	181	PRO	HB2	H	@	186	LEU	CB	C	42.20
169	THR	N	N	112.80	175	PRO	CB	C	32.00	181	PRO	HB3	H	@	186	LEU	CG	C	26.83
170	TRP	H	H	8.06	175	PRO	CG	C	27.44	181	PRO	HG2	H	@	186	LEU	CD1	C	25.02
170	TRP	HA	H	4.70	175	PRO	CD	C	50.65	181	PRO	HG3	H	@	186	LEU	CD2	C	23.47
170	TRP	HB2	H	3.24	176	THR	H	H	8.22	181	PRO	HD2	H	@	186	LEU	N	N	122.63
170	TRP	HB3	H	3.24	176	THR	HA	H	4.54	181	PRO	HD3	H	@	187	GLY	H	H	8.40
170	TRP	HD1	H	@	176	THR	HB	H	4.12	181	PRO	CA	C	@	187	GLY	HA2	H	4.04
170	TRP	HE1	H	10.09	176	THR	HG2	H	1.25	181	PRO	CB	C	@	187	GLY	HA3	H	3.93
170	TRP	HE3	H	@	176	THR	CA	C	59.83	181	PRO	CG	C	@	187	GLY	CA	C	45.19
170	TRP	HZ2	H	@	176	THR	CB	C	69.90	181	PRO	CD	C	@	187	GLY	N	N	109.14
170	TRP	HZ3	H	@	176	THR	N	N	117.17	182	ARG	H	H	@	188	GLU	H	H	8.18
170	TRP	HH2	H	@	177	PRO	HA	H	@	182	ARG	HA	H	@	188	GLU	HA	H	4.30
170	TRP	CA	C	57.33	177	PRO	HB2	H	@	182	ARG	HB2	H	@	188	GLU	HB2	H	2.09
170	TRP	CB	C	29.70	177	PRO	HB3	H	@	182	ARG	HB3	H	@	188	GLU	HB3	H	1.96
170	TRP	N	N	123.67	177	PRO	HG2	H	@	182	ARG	HG2	H	@	188	GLU	HG2	H	2.28
170	TRP	NE1	N	@	177	PRO	HG3	H	@	182	ARG	HG3	H	@	188	GLU	HG3	H	2.28
171	ASP	H	H	7.90	177	PRO	HD2	H	@	182	ARG	HD2	H	@	188	GLU	CA	C	56.38
171	ASP	HA	H	4.62	177	PRO	HD3	H	@	182	ARG	HD3	H	@	188	GLU	CB	C	30.16
171	ASP	HB2	H	1.57	177	PRO	CA	C	@	182	ARG	CA	C	@	188	GLU	CG	C	36.40
171	ASP	HB3	H	1.57	177	PRO	CB	C	@	182	ARG	CB	C	@	188	GLU	N	N	120.59
171	ASP	CA	C	52.71	177	PRO	CG	C	@	182	ARG	CG	C	@	189	ARG	H	H	8.00
171	ASP	CB	C	42.18	177	PRO	CD	C	@	182	ARG	CD	C	@	189	ARG	HA	H	4.33
171	ASP	N	N	125.23	178	PRO	HA	H	4.43	182	ARG	N	N	@	189	ARG	HB2	H	1.82
172	PRO	HA	H	4.20	178	PRO	HB2	H	2.26	183	PRO	HA	H	4.43	189	ARG	HB3	H	1.70
172	PRO	HB2	H	2.30	178	PRO	HB3	H	1.90	183	PRO	HB2	H	2.26	189	ARG	HG2	H	@
172	PRO	HB3	H	1.94	178	PRO	HG2	H	1.97	183	PRO	HB3	H	1.90	189	ARG	HG3	H	@
172	PRO	HG2	H	1.94	178	PRO	HG3	H	1.97	183	PRO	HG2	H	2.04	189	ARG	HD2	H	@
172	PRO	HG3	H	1.94	178	PRO	HD2	H	3.77	183	PRO	HG3	H	2.04	189	ARG	HD3	H	@
172	PRO	HD2	H	3.70	178	PRO	HD3	H	3.60	183	PRO	HD2	H	3.84	189	ARG	CA	C	54.41
172	PRO	HD3	H	3.51	178	PRO	CA	C	62.82	183	PRO	HD3	H	3.60	189	ARG	CB	C	32.56
172	PRO	CA	C	63.66	178	PRO	CB	C	32.01	183	PRO	CA	C	62.83	189	ARG	CG	C	@
172	PRO	CB	C	32.07	178	PRO	CG	C	27.42	183	PRO	CB	C	32.01	189	ARG	CD	C	@
172	PRO	CG	C	26.94	178	PRO	CD	C	50.53	183	PRO	CG	C	27.41	189	ARG	N	N	123.14
172	PRO	CD	C	50.63	179	LEU	H	H	8.21	183	PRO	CD	C	50.61	190	GLN	H	H	@
173	GLY	H	H	8.46	179	LEU	HA	H	4.61	184	ALA	H	H	8.45	190	GLN	HA	H	4.32
173	GLY	HA2	H	3.96	179	LEU	HB2	H	1.67	184	ALA	HA	H	4.27	190	GLN	HB2	H	2.07
173	GLY	HA3	H	3.96	179	LEU	HB3	H	1.67	184	ALA	HB	H	1.39	190	GLN	HB3	H	2.07
173	GLY	CA	C	45.38	179	LEU	HG	H	@	184	ALA	CA	C	52.85	190	GLN	HG2	H	2.14
173	GLY	N	N	108.16	179	LEU	HD1	H	@	184	ALA	CB	C	19.31	190	GLN	HG3	H	2.14
174	MET	H	H	7.88	179	LEU	HD2	H	@	184	ALA	N	N	124.34	190	GLN	HE21	H	@
174	MET	HA	H	4.80	179	LEU	CA	C	52.90	185	ASN	H	H	8.39	190	GLN	HE22	H	@
174	MET	HB2	H	2.09	179	LEU	CB	C	42.17	185	ASN	HA	H	4.59	190	GLN	CA	C	55.99
174	MET	HB3	H	1.98	179	LEU	CG	C	@	185	ASN	HB2	H	2.85	190	GLN	CB	C	29.11
174	MET	HG2	H	2.58	179	LEU	CD1	C	@	185	ASN	HB3	H	2.80	190	GLN	CG	C	33.36
174	MET	HG3	H	2.58	179	LEU	CD2	C	@	185	ASN	HD21	H	@	190	GLN	N	N	@
174	MET	HE	H	2.12	179	LEU	N	N	123.36	185	ASN	HD22	H	@	190	GLN	NE2	N	@
174	MET	CA	C	53.41	180	PRO	HA	H	@	185	ASN	CA	C	52.86	191	ALA	H	H	8.04
174	MET	CB	C	32.82	180	PRO	HB2	H	@	185	ASN	CB	C	38.62	191	ALA	HA	H	4.15
174	MET	CG	C	30.94	180	PRO	HB3	H	@	185	ASN	N	N	117.17	191	ALA	HB	H	1.36
174	MET	CE	C	17.08	180	PRO	HG2	H	@	185	ASN	ND2	N	@	191	ALA	CA	C	53.82
174	MET	N	N	120.90	180	PRO	HG3	H	@	186	LEU	H	H	8.25	191	ALA	CB	C	20.25
175	PRO	HA	H	4.41	180	PRO	HD2	H	@	186	LEU	HA	H	4.05	191	ALA	N	N	131.50
175	PRO	HB2	H	2.26	180	PRO	HD3	H	@	186	LEU	HB2	H	1.67					

LynSH3 (Tip-gebunden)

1	GLY	HA2	H	4.00	8	GLU	HG3	H	2.28	15	ALA	HB	H	1.74	22	ILE	HA	H	4.17
1	GLY	HA3	H	4.00	8	GLU	CA	C	56.50	15	ALA	CA	C	52.89	22	ILE	HB	H	1.77
1	GLY	CA	C	43.49	8	GLU	CB	C	30.26	15	ALA	CB	C	21.82	22	ILE	HG12	H	1.10
2	PRO	HA	H	4.49	8	GLU	CG	C	36.44	15	ALA	N	N	127.14	22	ILE	HG13	H	1.18
2	PRO	HB2	H	2.34	8	GLU	N	N	121.14	16	LEU	H	H	9.48	22	ILE	HG2	H	0.75
2	PRO	HB3	H	1.96	9	GLN	H	H	8.26	16	LEU	HA	H	3.96	22	ILE	HD1	H	0.88
2	PRO	HG2	H	2.03	9	GLN	HA	H	4.36	16	LEU	HB2	H	1.14	22	ILE	CA	C	61.66
2	PRO	HG3	H	2.03	9	GLN	HB2	H	2.17	16	LEU	HB3	H	0.69	22	ILE	CB	C	39.95
2	PRO	HD2	H	3.59	9	GLN	HB3	H	1.99	16	LEU	HG	H	1.39	22	ILE	CG1	C	26.59
2	PRO	HD3	H	3.59	9	GLN	HG2	H	2.38	16	LEU	HD1	H	0.64	22	ILE	CG2	C	17.26
2	PRO	CA	C	63.21	9	GLN	HG3	H	2.38	16	LEU	HD2	H	0.68	22	ILE	CD1	C	13.72
2	PRO	CB	C	32.38	9	GLN	HE21	H	6.82	16	LEU	CA	C	55.54	22	ILE	N	N	119.79
2	PRO	CG	C	27.09	9	GLN	HE22	H	7.50	16	LEU	CB	C	43.07	23	HIS	H	H	7.95
2	PRO	CD	C	49.72	9	GLN	CA	C	55.96	16	LEU	CG	C	26.92	23	HIS	HA	H	4.83
3	LEU	H	H	8.56	9	GLN	CB	C	29.72	16	LEU	CD1	C	21.71	23	HIS	HB2	H	3.08
3	LEU	HA	H	4.36	9	GLN	CG	C	33.94	16	LEU	CD2	C	25.40	23	HIS	HB3	H	2.89
3	LEU	HB2	H	1.69	9	GLN	N	N	120.60	16	LEU	N	N	127.40	23	HIS	HD2	H	7.07
3	LEU	HB3	H	1.62	9	GLN	NE2	N	112.42	17	TYR	H	H	7.44	23	HIS	HE1	H	8.17
3	LEU	HG	H	1.58	10	GLY	H	H	8.35	17	TYR	HA	H	4.84	23	HIS	CA	C	54.16
3	LEU	HD1	H	0.90	10	GLY	HA2	H	4.03	17	TYR	HD1	H	6.49	23	HIS	CB	C	30.58
3	LEU	HD2	H	0.90	10	GLY	HA3	H	3.92	17	TYR	HD2	H	6.49	23	HIS	CD2	C	120.68
3	LEU	CA	C	55.46	10	GLY	CA	C	45.42	17	TYR	HE1	H	6.65	23	HIS	CE1	C	138.29
3	LEU	CB	C	42.26	10	GLY	N	N	108.99	17	TYR	HE2	H	6.65	23	HIS	N	N	122.41
3	LEU	CG	C	27.14	11	ASP	H	H	8.46	17	TYR	CA	C	53.35	24	PRO	HA	H	4.36
3	LEU	CD1	C	25.52	11	ASP	HA	H	4.62	17	TYR	CD1	C	134.22	24	PRO	HB2	H	2.38
3	LEU	CD2	C	25.52	11	ASP	HB2	H	2.69	17	TYR	CD2	C	134.22	24	PRO	HB3	H	1.94
3	LEU	N	N	122.28	11	ASP	HB3	H	2.56	17	TYR	CE1	C	117.98	24	PRO	HG2	H	1.97
4	GLY	H	H	8.43	11	ASP	CA	C	54.05	17	TYR	CE2	C	117.98	24	PRO	HG3	H	1.97
4	GLY	HA2	H	3.98	11	ASP	CB	C	40.88	17	TYR	N	N	113.83	24	PRO	HD2	H	3.74
4	GLY	HA3	H	3.98	11	ASP	N	N	119.99	18	PRO	HA	H	4.61	24	PRO	HD3	H	3.16
4	GLY	CA	C	45.12	12	ILE	H	H	8.08	18	PRO	HB2	H	2.42	24	PRO	CA	C	65.17
4	GLY	N	N	109.90	12	ILE	HA	H	5.03	18	PRO	HB3	H	2.09	24	PRO	CB	C	32.06
5	SER	H	H	8.22	12	ILE	HB	H	1.96	18	PRO	HG2	H	1.97	24	PRO	CG	C	27.58
5	SER	HA	H	4.80	12	ILE	HG12	H	1.37	18	PRO	HG3	H	1.84	24	PRO	CD	C	50.74
5	SER	HB2	H	3.90	12	ILE	HG13	H	1.52	18	PRO	CA	C	62.29	25	ASP	H	H	9.33
5	SER	HB3	H	3.90	12	ILE	HG2	H	0.91	18	PRO	CB	C	32.49	25	ASP	HA	H	4.89
5	SER	CA	C	56.49	12	ILE	HD1	H	0.78	18	PRO	CG	C	24.81	25	ASP	HB2	H	3.11
5	SER	CB	C	63.47	12	ILE	CA	C	59.02	19	TYR	H	H	8.05	25	ASP	HB3	H	3.00
5	SER	N	N	117.01	12	ILE	CB	C	37.70	19	TYR	HA	H	4.52	25	ASP	CA	C	53.75
6	PRO	HA	H	4.42	12	ILE	CG1	C	27.44	19	TYR	HB2	H	2.26	25	ASP	CB	C	39.91
6	PRO	HB2	H	2.33	12	ILE	CG2	C	18.32	19	TYR	HB3	H	0.85	25	ASP	N	N	115.71
6	PRO	HB3	H	1.94	12	ILE	CD1	C	11.11	19	TYR	HD1	H	7.10	26	ASP	H	H	7.93
6	PRO	HG2	H	2.06	12	ILE	N	N	120.68	19	TYR	HD2	H	7.10	26	ASP	HA	H	5.48
6	PRO	HG3	H	2.06	13	VAL	H	H	9.31	19	TYR	HE1	H	6.84	26	ASP	HB2	H	3.01
6	PRO	HD2	H	3.85	13	VAL	HA	H	5.20	19	TYR	HE2	H	6.84	26	ASP	HB3	H	3.01
6	PRO	HD3	H	3.78	13	VAL	HB	H	1.91	19	TYR	CA	C	56.86	26	ASP	CA	C	55.02
6	PRO	CA	C	63.97	13	VAL	HG1	H	0.64	19	TYR	CB	C	41.96	26	ASP	CB	C	42.82
6	PRO	CB	C	32.04	13	VAL	HG2	H	0.86	19	TYR	CD1	C	133.49	26	ASP	N	N	121.14
6	PRO	CG	C	27.49	13	VAL	CA	C	57.81	19	TYR	CD2	C	133.49	27	LEU	H	H	9.35
6	PRO	CD	C	50.80	13	VAL	CB	C	35.50	19	TYR	CE1	C	118.35	27	LEU	HA	H	4.62
7	GLU	H	H	8.56	13	VAL	CG1	C	18.67	19	TYR	CE2	C	118.35	27	LEU	HB2	H	1.90
7	GLU	HA	H	4.23	13	VAL	CG2	C	21.80	19	TYR	N	N	118.78	27	LEU	HB3	H	0.76
7	GLU	HB2	H	2.04	13	VAL	N	N	119.01	20	ASP	H	H	7.79	27	LEU	HG	H	0.75
7	GLU	HB3	H	1.95	14	VAL	H	H	9.05	20	ASP	HA	H	4.57	27	LEU	HD1	H	0.86
7	GLU	HG2	H	2.28	14	VAL	HA	H	4.97	20	ASP	HB2	H	2.44	27	LEU	HD2	H	0.86
7	GLU	HG3	H	2.28	14	VAL	HB	H	1.75	20	ASP	HB3	H	2.27	27	LEU	CA	C	54.05
7	GLU	CA	C	57.18	14	VAL	HG1	H	0.84	20	ASP	CA	C	52.92	27	LEU	CB	C	43.96
7	GLU	CB	C	30.01	14	VAL	HG2	H	0.86	20	ASP	CB	C	41.48	27	LEU	CG	C	26.38
7	GLU	CG	C	36.44	14	VAL	CA	C	58.44	20	ASP	N	N	127.31	27	LEU	CD1	C	24.81
7	GLU	N	N	119.73	14	VAL	CB	C	35.47	21	GLY	H	H	7.49	27	LEU	CD2	C	24.81
8	GLU	H	H	8.24	14	VAL	CG1	C	19.50	21	GLY	HA2	H	3.60	27	LEU	N	N	127.20
8	GLU	HA	H	4.30	14	VAL	CG2	C	21.80	21	GLY	HA3	H	3.47	28	SER	H	H	7.71
8	GLU	HB2	H	2.09	14	VAL	N	N	118.19	21	GLY	CA	C	47.04	28	SER	HA	H	4.74
8	GLU	HB3	H	1.97	15	ALA	H	H	8.31	21	GLY	N	N	107.98	28	SER	HB2	H	4.01
8	GLU	HG2	H	2.28	15	ALA	HA	H	4.42	22	ILE	H	H	8.01	28	SER	HB3	H	3.82

28 SER CA	C	57.99	34 LYS HA	H	5.36	39 GLU HB2	H	2.41	45 TRP HE1	H	9.91
28 SER CB	C	64.63	34 LYS HB2	H	1.83	39 GLU HB3	H	2.16	45 TRP HE3	H	7.14
28 SER N	N	117.69	34 LYS HB3	H	1.62	39 GLU HG2	H	2.31	45 TRP HZ2	H	7.53
29 PHE H	H	8.58	34 LYS HG2	H	1.68	39 GLU HG3	H	2.10	45 TRP HZ3	H	6.79
29 PHE HA	H	5.19	34 LYS HG3	H	1.32	39 GLU CA	C	55.26	45 TRP HH2	H	7.18
29 PHE HB2	H	3.23	34 LYS HD2	H	1.68	39 GLU CB	C	34.74	45 TRP CA	C	52.73
29 PHE HB3	H	2.93	34 LYS HD3	H	1.68	39 GLU CG	C	35.92	45 TRP CB	C	31.98
29 PHE HD1	H	7.07	34 LYS HE2	H	2.92	39 GLU N	N	114.39	45 TRP CD1	C	123.38
29 PHE HD2	H	7.07	34 LYS HE3	H	2.92	40 GLU H	H	8.85	45 TRP CE3	C	119.59
29 PHE HE1	H	7.62	34 LYS CA	C	55.43	40 GLU HA	H	4.43	45 TRP CZ2	C	115.32
29 PHE HE2	H	7.62	34 LYS CB	C	34.78	40 GLU HB2	H	1.79	45 TRP CZ3	C	121.19
29 PHE HZ	H	6.83	34 LYS CG	C	26.18	40 GLU HB3	H	1.62	45 TRP CH2	C	124.74
29 PHE CA	C	55.78	34 LYS CD	C	29.55	40 GLU HG2	H	1.38	45 TRP N	N	123.63
29 PHE CB	C	40.38	34 LYS CE	C	42.15	40 GLU HG3	H	0.74	45 TRP NE1	N	128.64
29 PHE CD1	C	134.48	34 LYS N	N	124.36	40 GLU CA	C	55.81	46 LYS H	H	9.49
29 PHE CD2	C	134.48	35 MET H	H	9.06	40 GLU CB	C	30.94	46 LYS HA	H	4.59
29 PHE CE1	C	131.55	35 MET HA	H	5.12	40 GLU CG	C	34.61	46 LYS HB2	H	1.75
29 PHE CE2	C	131.55	35 MET HB2	H	1.65	40 GLU N	N	123.86	46 LYS HB3	H	1.52
29 PHE CZ	C	128.43	35 MET HB3	H	1.45	41 HIS H	H	8.43	46 LYS HG2	H	1.12
29 PHE N	N	115.78	35 MET HG2	H	2.29	41 HIS HA	H	4.96	46 LYS HG3	H	0.65
30 LYS H	H	9.04	35 MET HG3	H	2.08	41 HIS HB2	H	3.30	46 LYS HD2	H	1.38
30 LYS HA	H	4.71	35 MET HE	H	0.87	41 HIS HB3	H	3.30	46 LYS HD3	H	1.38
30 LYS HB2	H	2.03	35 MET CA	C	54.17	41 HIS HD2	H	6.93	46 LYS HE2	H	2.60
30 LYS HB3	H	1.91	35 MET CB	C	39.58	41 HIS HE1	H	7.85	46 LYS HE3	H	2.57
30 LYS HG2	H	1.60	35 MET CG	C	32.76	41 HIS CA	C	54.46	46 LYS CA	C	56.11
30 LYS HG3	H	1.54	35 MET CE	C	17.27	41 HIS CB	C	30.21	46 LYS CB	C	34.37
30 LYS HD2	H	1.66	35 MET N	N	119.91	41 HIS CD2	C	117.93	46 LYS CG	C	25.82
30 LYS HD3	H	1.66	36 LYS H	H	9.18	41 HIS CE1	C	137.59	46 LYS CD	C	28.91
30 LYS HE2	H	3.03	36 LYS HA	H	4.96	41 HIS N	N	124.52	46 LYS CE	C	41.88
30 LYS HE3	H	3.03	36 LYS HB2	H	1.70	42 GLY H	H	8.54	46 LYS N	N	124.03
30 LYS CA	C	53.90	36 LYS HB3	H	1.57	42 GLY HA2	H	4.35	47 ALA H	H	9.54
30 LYS CB	C	34.79	36 LYS HG2	H	1.32	42 GLY HA3	H	3.81	47 ALA HA	H	5.43
30 LYS CG	C	24.77	36 LYS HG3	H	1.18	42 GLY CA	C	46.52	47 ALA HB	H	1.25
30 LYS CD	C	29.01	36 LYS HD2	H	1.57	42 GLY N	N	111.57	47 ALA CA	C	50.74
30 LYS CE	C	42.15	36 LYS HD3	H	1.57	43 GLU H	H	9.13	47 ALA CB	C	25.03
30 LYS N	N	120.71	36 LYS HE2	H	2.98	43 GLU HA	H	4.23	47 ALA N	N	131.79
31 LYS H	H	8.47	36 LYS HE3	H	2.88	43 GLU HB2	H	2.05	48 LYS H	H	8.85
31 LYS HA	H	3.46	36 LYS CA	C	54.46	43 GLU HB3	H	1.90	48 LYS HA	H	5.30
31 LYS HB2	H	1.78	36 LYS CB	C	35.58	43 GLU HG2	H	2.39	48 LYS HB2	H	1.71
31 LYS HB3	H	1.36	36 LYS CG	C	24.98	43 GLU HG3	H	2.22	48 LYS HB3	H	1.58
31 LYS HG2	H	1.24	36 LYS CD	C	29.77	43 GLU CA	C	57.18	48 LYS HG2	H	1.22
31 LYS HG3	H	1.09	36 LYS CE	C	41.96	43 GLU CB	C	30.76	48 LYS HG3	H	1.10
31 LYS HD2	H	1.64	36 LYS N	N	122.29	43 GLU CG	C	37.75	48 LYS HD2	H	1.65
31 LYS HD3	H	1.64	37 VAL H	H	9.10	43 GLU N	N	123.31	48 LYS HD3	H	1.65
31 LYS HE2	H	3.02	37 VAL HA	H	3.79	44 TRP H	H	8.04	48 LYS HE2	H	2.92
31 LYS HE3	H	3.02	37 VAL HB	H	1.94	44 TRP HA	H	5.01	48 LYS HE3	H	2.92
31 LYS CA	C	59.30	37 VAL HG1	H	0.54	44 TRP HB2	H	3.03	48 LYS CA	C	53.62
31 LYS CB	C	32.52	37 VAL HG2	H	0.88	44 TRP HB3	H	3.03	48 LYS CB	C	37.62
31 LYS CG	C	25.33	37 VAL CA	C	64.69	44 TRP HD1	H	7.25	48 LYS CG	C	24.38
31 LYS CD	C	29.76	37 VAL CB	C	31.79	44 TRP HE1	H	9.31	48 LYS CD	C	30.20
31 LYS CE	C	42.46	37 VAL CG1	C	21.62	44 TRP HE3	H	7.29	48 LYS CE	C	42.15
31 LYS N	N	119.77	37 VAL CG2	C	23.80	44 TRP HZ2	H	7.46	48 LYS N	N	118.34
32 GLY H	H	8.85	37 VAL N	N	127.05	44 TRP HZ3	H	6.89	49 SER H	H	9.00
32 GLY HA2	H	4.34	38 LEU H	H	9.36	44 TRP HH2	H	7.45	49 SER HA	H	4.63
32 GLY HA3	H	3.49	38 LEU HA	H	4.41	44 TRP CA	C	56.77	49 SER HB2	H	4.20
32 GLY CA	C	45.20	38 LEU HB2	H	1.65	44 TRP CB	C	30.82	49 SER HB3	H	4.20
32 GLY N	N	115.31	38 LEU HB3	H	1.36	44 TRP CD1	C	125.67	49 SER CA	C	58.57
33 GLU H	H	7.93	38 LEU HG	H	1.67	44 TRP CE3	C	120.93	49 SER CB	C	63.04
33 GLU HA	H	4.12	38 LEU HD1	H	0.75	44 TRP CZ2	C	113.69	49 SER N	N	119.57
33 GLU HB2	H	2.44	38 LEU HD2	H	0.75	44 TRP CZ3	C	122.00	50 LEU H	H	9.27
33 GLU HB3	H	2.20	38 LEU CA	C	55.85	44 TRP CH2	C	124.65	50 LEU HA	H	4.28
33 GLU HG2	H	2.43	38 LEU CB	C	43.19	44 TRP N	N	120.75	50 LEU HB2	H	1.74
33 GLU HG3	H	2.43	38 LEU CG	C	27.08	44 TRP NE1	N	129.97	50 LEU HB3	H	1.64
33 GLU CA	C	58.00	38 LEU CD1	C	25.62	45 TRP H	H	9.26	50 LEU HG	H	1.64
33 GLU CB	C	31.86	38 LEU CD2	C	22.17	45 TRP HA	H	5.75	50 LEU HD1	H	0.88
33 GLU CG	C	36.10	38 LEU N	N	128.30	45 TRP HB2	H	3.31	50 LEU HD2	H	1.02
33 GLU N	N	124.33	39 GLU H	H	7.72	45 TRP HB3	H	2.99	50 LEU CA	C	57.01
34 LYS H	H	8.55	39 GLU HA	H	4.50	45 TRP HD1	H	7.07	50 LEU CB	C	40.50

50	LEU	CG	C	28.58	54	LYS	CG	C	25.97	59	PRO	HG2	H	1.00	64	ALA	HB	H	1.36
50	LEU	CD1	C	23.02	54	LYS	CD	C	29.15	59	PRO	HG3	H	0.06	64	ALA	CA	C	50.40
50	LEU	CD2	C	23.25	54	LYS	CE	C	42.38	59	PRO	HD2	H	3.00	64	ALA	CB	C	22.95
50	LEU	N	N	130.51	54	LYS	N	N	120.47	59	PRO	HD3	H	2.75	64	ALA	N	N	120.69
51	LEU	H	H	8.56	55	GLU	H	H	8.50	59	PRO	CA	C	60.51	65	LYS	H	H	8.78
51	LEU	HA	H	4.58	55	GLU	HA	H	5.77	59	PRO	CB	C	29.55	65	LYS	HA	H	4.42
51	LEU	HB2	H	1.88	55	GLU	HB2	H	1.86	59	PRO	CG	C	25.80	65	LYS	HB2	H	1.91
51	LEU	HB3	H	1.88	55	GLU	HB3	H	1.82	59	PRO	CD	C	49.22	65	LYS	HB3	H	1.80
51	LEU	HG	H	1.58	55	GLU	HG2	H	2.23	60	SER	H	H	7.70	65	LYS	HG2	H	1.66
51	LEU	HD1	H	0.88	55	GLU	HG3	H	2.05	60	SER	HA	H	2.66	65	LYS	HG3	H	1.42
51	LEU	HD2	H	0.95	55	GLU	CA	C	53.71	60	SER	HB2	H	2.06	65	LYS	HD2	H	1.73
51	LEU	CA	C	57.00	55	GLU	CB	C	34.21	60	SER	HB3	H	1.49	65	LYS	HD3	H	1.73
51	LEU	CB	C	43.48	55	GLU	CG	C	36.22	60	SER	CA	C	61.24	65	LYS	HE2	H	2.92
51	LEU	CG	C	27.14	55	GLU	N	N	117.68	60	SER	CB	C	61.31	65	LYS	HE3	H	2.84
51	LEU	CD1	C	23.49	56	GLY	H	H	8.79	60	SER	N	N	119.96	65	LYS	CA	C	57.43
51	LEU	CD2	C	24.93	56	GLY	HA2	H	4.18	61	ASN	H	H	8.31	65	LYS	CB	C	32.90
51	LEU	N	N	121.11	56	GLY	HA3	H	4.03	61	ASN	HA	H	4.62	65	LYS	CG	C	25.93
52	THR	H	H	8.47	56	GLY	CA	C	45.43	61	ASN	HB2	H	3.00	65	LYS	CD	C	29.39
52	THR	HA	H	4.38	56	GLY	N	N	107.17	61	ASN	HB3	H	2.75	65	LYS	CE	C	42.19
52	THR	HB	H	4.51	57	PHE	H	H	9.09	61	ASN	HD21	H	7.30	65	LYS	N	N	120.98
52	THR	HG2	H	1.35	57	PHE	HA	H	5.67	61	ASN	HD22	H	6.84	66	LEU	H	H	8.33
52	THR	CA	C	61.87	57	PHE	HB2	H	3.27	61	ASN	CA	C	53.68	66	LEU	HA	H	4.36
52	THR	CB	C	71.35	57	PHE	HB3	H	3.27	61	ASN	CB	C	35.19	66	LEU	HB2	H	1.62
52	THR	N	N	106.46	57	PHE	HD1	H	7.19	61	ASN	N	N	115.50	66	LEU	HB3	H	1.45
53	LYS	H	H	7.60	57	PHE	HD2	H	7.19	61	ASN	ND2	N	108.83	66	LEU	HG	H	1.58
53	LYS	HA	H	4.21	57	PHE	HE1	H	7.11	62	TYR	H	H	7.87	66	LEU	HD1	H	0.84
53	LYS	HB2	H	2.36	57	PHE	HE2	H	7.11	62	TYR	HA	H	4.76	66	LEU	HD2	H	0.84
53	LYS	HB3	H	2.04	57	PHE	HZ	H	7.11	62	TYR	HB2	H	3.61	66	LEU	CA	C	55.46
53	LYS	HG2	H	1.43	57	PHE	CA	C	59.42	62	TYR	HB3	H	3.35	66	LEU	CB	C	42.90
53	LYS	HG3	H	1.43	57	PHE	CB	C	41.19	62	TYR	HD1	H	7.03	66	LEU	CG	C	27.14
53	LYS	HD2	H	1.75	57	PHE	CD1	C	131.47	62	TYR	HD2	H	7.03	66	LEU	CD1	C	24.35
53	LYS	HD3	H	1.75	57	PHE	CD2	C	131.47	62	TYR	HE1	H	6.71	66	LEU	N	N	124.34
53	LYS	HE2	H	3.02	57	PHE	CE1	C	129.83	62	TYR	HE2	H	6.71	67	ASN	H	H	8.63
53	LYS	HE3	H	3.02	57	PHE	CE2	C	129.83	62	TYR	CA	C	58.40	67	ASN	HA	H	4.84
53	LYS	CA	C	58.46	57	PHE	CZ	C	129.83	62	TYR	CB	C	38.86	67	ASN	HB2	H	2.86
53	LYS	CB	C	29.50	57	PHE	N	N	119.53	62	TYR	CD1	C	131.93	67	ASN	HB3	H	2.80
53	LYS	CG	C	25.62	58	ILE	H	H	9.81	62	TYR	CD2	C	131.93	67	ASN	HD21	H	6.92
53	LYS	CD	C	29.98	58	ILE	HA	H	5.25	62	TYR	CE1	C	118.63	67	ASN	HD22	H	7.61
53	LYS	CE	C	42.46	58	ILE	HB	H	1.63	62	TYR	CE2	C	118.63	67	ASN	CA	C	53.35
53	LYS	N	N	113.93	58	ILE	HG12	H	1.44	62	TYR	N	N	120.18	67	ASN	CB	C	39.04
54	LYS	H	H	7.70	58	ILE	HG13	H	1.12	63	VAL	H	H	7.20	67	ASN	N	N	120.35
54	LYS	HA	H	4.37	58	ILE	HG2	H	1.34	63	VAL	HA	H	5.30	67	ASN	ND2	N	113.04
54	LYS	HB2	H	1.92	58	ILE	HD1	H	0.59	63	VAL	HB	H	1.76	68	THR	H	H	7.77
54	LYS	HB3	H	1.73	58	ILE	CA	C	57.29	63	VAL	HG1	H	0.38	68	THR	HA	H	4.16
54	LYS	HG2	H	1.54	58	ILE	CB	C	40.85	63	VAL	HG2	H	0.64	68	THR	HB	H	4.26
54	LYS	HG3	H	1.54	58	ILE	CG1	C	24.90	63	VAL	CA	C	58.22	68	THR	HG2	H	1.17
54	LYS	HD2	H	1.80	58	ILE	CG2	C	21.72	63	VAL	CB	C	35.86	68	THR	CA	C	63.19
54	LYS	HD3	H	1.80	58	ILE	CD1	C	14.90	63	VAL	CG1	C	21.44	68	THR	CB	C	70.78
54	LYS	HE2	H	3.11	58	ILE	N	N	112.14	63	VAL	CG2	C	18.10	68	THR	N	N	119.17
54	LYS	HE3	H	3.11	59	PRO	HA	H	3.09	63	VAL	N	N	108.96					
54	LYS	CA	C	56.92	59	PRO	HB2	H	0.15	64	ALA	H	H	8.60					
54	LYS	CB	C	33.63	59	PRO	HB3	H	1.50	64	ALA	HA	H	4.83					

Tip (LynSH3-gebunden)

169	THR	HA	H	4.32	175	PRO	CB	C	32.20	180	PRO	CD	C	50.45	186	LEU	HG	H	0.67
169	THR	HB	H	4.15	175	PRO	CG	C	27.47	181	PRO	HA	H	4.42	186	LEU	HD1	H	0.34
169	THR	HG2	H	1.21	175	PRO	CD	C	50.57	181	PRO	HB2	H	2.34	186	LEU	HD2	H	0.13
169	THR	CA	C	62.45	176	THR	H	H	8.08	181	PRO	HB3	H	2.60	186	LEU	CA	C	56.01
169	THR	CB	C	69.85	176	THR	HA	H	3.95	181	PRO	HG2	H	2.03	186	LEU	CB	C	41.48
169	THR	CG2	C	21.74	176	THR	HB	H	3.89	181	PRO	HG3	H	2.03	186	LEU	CG	C	26.15
170	TRP	H	H	8.32	176	THR	HG2	H	1.20	181	PRO	HD2	H	3.70	186	LEU	CD1	C	24.12
170	TRP	HA	H	4.66	176	THR	CA	C	59.40	181	PRO	HD3	H	3.86	186	LEU	CD2	C	24.12
170	TRP	HB2	H	3.26	176	THR	CB	C	68.21	181	PRO	CA	C	63.28	186	LEU	N	N	121.26
170	TRP	HB3	H	3.26	176	THR	CG2	C	22.42	181	PRO	CB	C	32.13	187	GLY	H	H	8.53
170	TRP	CA	C	58.04	176	THR	N	N	113.93	181	PRO	CG	C	27.47	187	GLY	HA2	H	3.79
170	TRP	CB	C	30.49	177	PRO	HA	H	4.39	181	PRO	CD	C	50.57	187	GLY	HA3	H	4.02
170	TRP	N	N	124.35	177	PRO	HB2	H	1.46	182	ARG	H	H	8.69	187	GLY	CA	C	45.05
171	ASP	H	H	7.61	177	PRO	HB3	H	1.46	182	ARG	HA	H	4.33	187	GLY	N	N	110.89
171	ASP	HA	H	4.80	177	PRO	HG2	H	1.24	182	ARG	HB2	H	1.12	188	GLU	H	H	8.01
171	ASP	HB2	H	2.32	177	PRO	HG3	H	1.34	182	ARG	HB3	H	1.39	188	GLU	HA	H	4.29
171	ASP	HB3	H	2.51	177	PRO	HD2	H	1.76	182	ARG	HG2	H	0.26	188	GLU	HB2	H	1.95
171	ASP	CA	C	51.88	177	PRO	HD3	H	2.09	182	ARG	HG3	H	0.60	188	GLU	HB3	H	2.05
171	ASP	CB	C	42.44	177	PRO	CA	C	61.91	182	ARG	HD2	H	1.76	188	GLU	HG2	H	2.22
171	ASP	N	N	126.64	177	PRO	CB	C	30.23	182	ARG	HD3	H	1.76	188	GLU	HG3	H	2.22
172	PRO	HA	H	4.09	177	PRO	CG	C	27.24	182	ARG	CA	C	53.06	188	GLU	CA	C	56.43
172	PRO	HB2	H	1.89	177	PRO	CD	C	49.56	182	ARG	CB	C	31.34	188	GLU	CB	C	30.47
172	PRO	HB3	H	2.26	178	PRO	HA	H	4.44	182	ARG	CG	C	26.73	188	GLU	CG	C	36.23
172	PRO	HG2	H	1.99	178	PRO	HB2	H	1.81	182	ARG	CD	C	42.33	188	GLU	N	N	120.41
172	PRO	HG3	H	1.99	178	PRO	HB3	H	2.36	182	ARG	N	N	125.87	189	ARG	H	H	8.50
172	PRO	HD2	H	3.54	178	PRO	HG2	H	2.00	183	PRO	HA	H	4.39	189	ARG	HA	H	4.35
172	PRO	HD3	H	3.59	178	PRO	HG3	H	2.16	183	PRO	HB2	H	1.84	189	ARG	HB2	H	1.78
172	PRO	CA	C	63.79	178	PRO	HD2	H	3.70	183	PRO	HB3	H	2.38	189	ARG	HB3	H	1.85
172	PRO	CB	C	31.86	178	PRO	HD3	H	3.86	183	PRO	HG2	H	2.01	189	ARG	HG2	H	1.64
172	PRO	CG	C	27.20	178	PRO	CA	C	62.46	183	PRO	HG3	H	2.16	189	ARG	HG3	H	1.64
172	PRO	CD	C	50.47	178	PRO	CB	C	32.23	183	PRO	HD2	H	3.18	189	ARG	HD2	H	3.19
173	GLY	H	H	8.51	178	PRO	CG	C	27.83	183	PRO	HD3	H	3.97	189	ARG	HD3	H	3.19
173	GLY	HA2	H	3.88	178	PRO	CD	C	50.90	183	PRO	CA	C	62.75	189	ARG	CA	C	56.17
173	GLY	HA3	H	3.95	179	LEU	H	H	8.65	183	PRO	CB	C	32.22	189	ARG	CB	C	30.91
173	GLY	CA	C	45.26	179	LEU	HA	H	4.45	183	PRO	CG	C	27.75	189	ARG	CG	C	27.11
173	GLY	N	N	109.46	179	LEU	HB2	H	1.57	183	PRO	CD	C	51.03	189	ARG	CD	C	43.38
174	MET	H	H	7.90	179	LEU	HB3	H	1.85	184	ALA	H	H	8.60	189	ARG	N	N	122.89
174	MET	HA	H	4.74	179	LEU	HG	H	1.95	184	ALA	HA	H	4.02	190	GLN	H	H	8.56
174	MET	HB2	H	1.90	179	LEU	HD1	H	1.28	184	ALA	HB	H	1.36	190	GLN	HA	H	4.34
174	MET	HB3	H	2.14	179	LEU	HD2	H	0.68	184	ALA	CA	C	53.66	190	GLN	HB2	H	1.90
174	MET	HG2	H	2.55	179	LEU	CA	C	52.78	184	ALA	CB	C	18.71	190	GLN	HB3	H	2.14
174	MET	HG3	H	2.55	179	LEU	CB	C	41.36	184	ALA	N	N	124.76	190	GLN	HG2	H	2.39
174	MET	HE	H	2.10	179	LEU	CG	C	27.15	185	ASN	H	H	8.20	190	GLN	HG3	H	2.39
174	MET	CA	C	53.79	179	LEU	CD1	C	26.37	185	ASN	HA	H	4.57	190	GLN	HE21	H	7.61
174	MET	CB	C	32.47	179	LEU	CD2	C	24.33	185	ASN	HB2	H	2.73	190	GLN	HE22	H	6.87
174	MET	CG	C	32.26	179	LEU	N	N	123.93	185	ASN	HB3	H	2.85	190	GLN	CA	C	55.77
174	MET	CE	C	17.04	180	PRO	HA	H	4.82	185	ASN	HD21	H	7.64	190	GLN	CB	C	29.67
174	MET	N	N	121.11	180	PRO	HB2	H	1.69	185	ASN	HD22	H	6.84	190	GLN	CG	C	33.89
175	PRO	HA	H	4.60	180	PRO	HB3	H	2.38	185	ASN	CA	C	52.70	190	GLN	N	N	123.12
175	PRO	HB2	H	1.93	180	PRO	HG2	H	1.28	185	ASN	CB	C	37.87	190	GLN	NE2	N	112.95
175	PRO	HB3	H	2.36	180	PRO	HG3	H	1.60	185	ASN	N	N	113.88	191	ALA	H	H	8.08
175	PRO	HG2	H	2.03	180	PRO	HD2	H	2.96	185	ASN	ND2	N	112.50	191	ALA	HA	H	4.12
175	PRO	HG3	H	2.03	180	PRO	HD3	H	3.99	186	LEU	H	H	7.42	191	ALA	HB	H	1.34
175	PRO	HD2	H	3.70	180	PRO	CA	C	61.06	186	LEU	HA	H	3.91	191	ALA	CA	C	53.89
175	PRO	HD3	H	3.86	180	PRO	CB	C	30.34	186	LEU	HB2	H	1.07	191	ALA	CB	C	20.18
175	PRO	CA	C	63.18	180	PRO	CG	C	26.44	186	LEU	HB3	H	1.03	191	ALA	N	N	110.05

10.4 Relaxations-, Bewegungs- und Austauschparameter

LckSH3

Aminosäure	R1 [s ⁻¹]	R2 [s ⁻¹]	{ ¹ H} ¹⁵ N-NOE	S ²	Atomare Fluktuationen [Å ²]	Aminprotonaustauschraten [s ⁻¹]
1	-	-	-	-	3,66 ± 0,61	-
2	-	-	-	-	2,48 ± 0,44	-
3	-	-	-	-	1,82 ± 0,31	-
4	-	-	-	-	1,67 ± 0,20	1,26 ± 0,06
5	-	-	-	-	1,31 ± 0,11	2,57 ± 0,13
6	1,56 ± 0,04	3,37 ± 0,04	0,12 ± 0,01	0,43 ± 0,03	0,99 ± 0,09	2,85 ± 0,14
7	1,80 ± 0,02	5,07 ± 0,02	0,59 ± 0,03	0,80 ± 0,02	0,69 ± 0,07	1,21 ± 0,06
8	1,88 ± 0,02	5,79 ± 0,03	0,69 ± 0,03	0,77 ± 0,01	0,60 ± 0,08	0,23 ± 0,01
9	2,15 ± 0,06	6,70 ± 0,16	0,71 ± 0,04	0,90 ± 0,02	0,53 ± 0,06	-
10	2,21 ± 0,03	6,61 ± 0,07	0,69 ± 0,03	0,88 ± 0,01	0,49 ± 0,05	-
11	2,14 ± 0,06	7,57 ± 0,07	0,72 ± 0,04	0,89 ± 0,02	0,45 ± 0,04	0,42 ± 0,02
12	2,23 ± 0,02	7,47 ± 0,06	0,74 ± 0,04	0,93 ± 0,01	0,54 ± 0,04	0,27 ± 0,01
13	-	-	-	-	0,57 ± 0,04	0,63 ± 0,03
14	2,05 ± 0,06	7,62 ± 0,12	0,70 ± 0,03	0,84 ± 0,03	0,63 ± 0,04	4,48 ± 0,22
15	2,06 ± 0,04	6,39 ± 0,02	0,75 ± 0,04	0,85 ± 0,01	0,56 ± 0,02	0,19 ± 0,01
16	2,04 ± 0,01	7,69 ± 0,10	0,71 ± 0,04	0,84 ± 0,01	0,73 ± 0,03	0,64 ± 0,03
17	-	-	-	-	0,74 ± 0,02	-
18	1,66 ± 0,04	5,52 ± 0,06	0,56 ± 0,03	0,66 ± 0,01	1,04 ± 0,04	1,74 ± 0,09
19	1,67 ± 0,07	5,99 ± 0,14	0,63 ± 0,03	0,67 ± 0,03	0,96 ± 0,05	1,34 ± 0,07
20	1,86 ± 0,07	6,23 ± 0,22	0,71 ± 0,04	0,80 ± 0,02	0,99 ± 0,05	14,67 ± 0,73
21	1,85 ± 0,06	6,02 ± 0,04	0,64 ± 0,03	0,79 ± 0,01	0,65 ± 0,03	5,19 ± 0,26
22	1,99 ± 0,03	6,18 ± 0,12	0,75 ± 0,04	0,83 ± 0,01	0,47 ± 0,02	0,19 ± 0,01
23	2,12 ± 0,03	6,77 ± 0,10	0,71 ± 0,04	0,89 ± 0,01	0,40 ± 0,01	0,20 ± 0,01
24	2,06 ± 0,02	5,23 ± 0,04	0,73 ± 0,04	0,64 ± 0,02	0,51 ± 0,02	0,59 ± 0,03
25	2,10 ± 0,02	6,88 ± 0,05	0,73 ± 0,04	0,88 ± 0,01	0,49 ± 0,02	0,26 ± 0,01
26	2,07 ± 0,02	6,33 ± 0,07	0,68 ± 0,03	0,84 ± 0,01	0,58 ± 0,03	0,39 ± 0,02
27	1,98 ± 0,03	5,78 ± 0,05	0,66 ± 0,03	0,86 ± 0,03	0,60 ± 0,04	0,62 ± 0,03
28	2,21 ± 0,04	6,28 ± 0,16	0,74 ± 0,04	0,84 ± 0,05	0,62 ± 0,05	0,38 ± 0,02
29	2,08 ± 0,06	6,41 ± 0,06	0,76 ± 0,04	0,86 ± 0,01	0,56 ± 0,05	0,43 ± 0,02
30	2,03 ± 0,03	5,59 ± 0,05	0,70 ± 0,04	0,80 ± 0,02	0,55 ± 0,06	0,34 ± 0,02
31	2,16 ± 0,07	5,79 ± 0,05	0,76 ± 0,04	0,74 ± 0,06	0,50 ± 0,06	0,24 ± 0,01
32	2,21 ± 0,13	5,94 ± 0,14	0,73 ± 0,04	0,74 ± 0,09	0,52 ± 0,06	0,17 ± 0,01
33	2,12 ± 0,01	6,03 ± 0,06	0,72 ± 0,04	0,84 ± 0,02	0,54 ± 0,06	-
34	2,09 ± 0,02	7,94 ± 0,06	0,73 ± 0,04	0,87 ± 0,01	0,59 ± 0,06	-
35	1,97 ± 0,01	8,37 ± 0,13	0,68 ± 0,03	0,81 ± 0,01	0,62 ± 0,06	0,18 ± 0,01
36	1,86 ± 0,06	7,09 ± 0,13	0,69 ± 0,03	0,76 ± 0,02	0,81 ± 0,07	4,46 ± 0,22
37	1,59 ± 0,02	6,07 ± 0,05	0,45 ± 0,02	0,61 ± 0,01	1,06 ± 0,10	0,57 ± 0,03
38	1,38 ± 0,03	6,77 ± 0,02	0,36 ± 0,02	0,52 ± 0,01	1,19 ± 0,20	2,72 ± 0,14
39	-	-	-	-	1,18 ± 0,25	-
40	1,96 ± 0,03	6,57 ± 0,11	0,72 ± 0,04	0,82 ± 0,01	0,68 ± 0,07	0,15 ± 0,01
41	1,95 ± 0,02	7,32 ± 0,13	0,72 ± 0,04	0,82 ± 0,01	0,49 ± 0,03	-
42	1,98 ± 0,02	7,27 ± 0,14	0,73 ± 0,04	0,83 ± 0,01	0,49 ± 0,04	-

Aminosäure	R1 [s ⁻¹]	R2 [s ⁻¹]	{ ¹ H} ¹⁵ N-NOE	S ²	Atomare Fluktuationen [Å ²]	Amindprotonaustauschraten [s ⁻¹]
43	2,15 ± 0,02	13,05 ± 0,10	0,80 ± 0,04	0,90 ± 0,01	0,45 ± 0,04	0,27 ± 0,01
44	2,02 ± 0,02	6,29 ± 0,04	0,69 ± 0,03	0,83 ± 0,01	0,48 ± 0,05	0,27 ± 0,01
45	2,08 ± 0,04	6,46 ± 0,05	0,75 ± 0,04	0,86 ± 0,01	0,56 ± 0,03	0,23 ± 0,01
46	2,14 ± 0,03	7,21 ± 0,04	0,63 ± 0,03	0,86 ± 0,01	0,75 ± 0,03	0,34 ± 0,02
47	1,80 ± 0,05	5,59 ± 0,04	0,66 ± 0,03	0,74 ± 0,01	0,94 ± 0,04	0,61 ± 0,03
48	1,99 ± 0,05	5,94 ± 0,17	0,71 ± 0,04	0,80 ± 0,02	0,85 ± 0,02	2,40 ± 0,12
49	2,01 ± 0,05	5,72 ± 0,03	0,68 ± 0,03	0,84 ± 0,03	0,74 ± 0,03	0,29 ± 0,01
50	2,02 ± 0,05	6,38 ± 0,11	0,69 ± 0,03	0,84 ± 0,01	0,60 ± 0,04	0,26 ± 0,01
51	2,04 ± 0,02	5,92 ± 0,03	0,71 ± 0,04	0,87 ± 0,02	0,52 ± 0,04	0,33 ± 0,02
52	2,11 ± 0,07	8,10 ± 0,15	0,74 ± 0,04	0,88 ± 0,02	0,40 ± 0,03	0,35 ± 0,02
53	2,09 ± 0,04	6,52 ± 0,06	0,71 ± 0,04	0,87 ± 0,01	0,37 ± 0,02	0,29 ± 0,01
54	2,08 ± 0,03	6,96 ± 0,06	0,72 ± 0,04	0,87 ± 0,01	0,39 ± 0,01	-
55	-	-	-	-	0,47 ± 0,02	-
56	2,12 ± 0,03	7,31 ± 0,03	0,73 ± 0,04	0,89 ± 0,01	0,54 ± 0,02	0,28 ± 0,01
57	2,14 ± 0,06	6,66 ± 0,05	0,74 ± 0,04	0,89 ± 0,01	0,58 ± 0,02	0,21 ± 0,01
58	2,21 ± 0,02	6,99 ± 0,07	0,72 ± 0,04	0,93 ± 0,01	0,49 ± 0,02	0,15 ± 0,01
59	2,20 ± 0,05	8,52 ± 0,08	0,73 ± 0,04	0,92 ± 0,02	0,51 ± 0,02	0,32 ± 0,02
60	2,13 ± 0,04	6,88 ± 0,09	0,72 ± 0,04	0,91 ± 0,01	0,60 ± 0,04	0,24 ± 0,01
61	1,88 ± 0,02	5,31 ± 0,07	0,59 ± 0,03	0,80 ± 0,02	0,80 ± 0,08	-
62	1,83 ± 0,01	5,79 ± 0,05	0,37 ± 0,02	0,69 ± 0,01	1,13 ± 0,19	0,67 ± 0,03
63	1,28 ± 0,01	2,13 ± 0,02	-0,08 ± 0,01	0,21 ± 0,01	1,56 ± 0,13	0,29 ± 0,01

LckSH3_P17G

Aminosäure	R1 [s ⁻¹]	R2 [s ⁻¹]	{ ¹ H} ¹⁵ N-NOE	S ²	Atomare Fluktuationen [Å ²]	Amindprotonaustauschraten [s ⁻¹]
1	-	-	-	-	5,11 ± 0,43	-
2	-	-	-	-	3,23 ± 0,30	-
3	-	-	-	-	2,22 ± 0,25	-
4	-	-	-	-	1,80 ± 0,17	2,75 ± 0,14
5	-	-	-	-	1,56 ± 0,20	5,59 ± 0,28
6	2,04 ± 0,18	3,15 ± 0,03	0,20 ± 0,01	0,06 ± 0,01	1,04 ± 0,08	6,16 ± 0,31
7	2,17 ± 0,13	5,11 ± 0,04	0,53 ± 0,03	0,38 ± 0,02	0,80 ± 0,07	2,71 ± 0,14
8	1,93 ± 0,03	5,95 ± 0,06	0,67 ± 0,03	0,79 ± 0,02	0,74 ± 0,06	0,50 ± 0,03
9	2,12 ± 0,02	9,03 ± 0,04	0,71 ± 0,04	0,92 ± 0,01	0,65 ± 0,06	-
10	2,16 ± 0,02	8,29 ± 0,05	0,72 ± 0,04	0,95 ± 0,01	0,55 ± 0,06	-
11	2,17 ± 0,02	7,87 ± 0,10	0,75 ± 0,04	0,97 ± 0,01	0,47 ± 0,04	0,58 ± 0,03
12	2,19 ± 0,03	9,82 ± 0,10	0,74 ± 0,04	0,97 ± 0,01	0,56 ± 0,04	0,44 ± 0,02
13	2,13 ± 0,04	10,39 ± 0,08	0,70 ± 0,03	0,92 ± 0,02	0,59 ± 0,04	0,99 ± 0,05
14	2,46 ± 0,25	6,26 ± 0,06	0,73 ± 0,04	0,42 ± 0,06	0,66 ± 0,04	10,91 ± 0,55
15	2,20 ± 0,05	6,31 ± 0,03	0,70 ± 0,04	0,70 ± 0,04	0,58 ± 0,02	0,70 ± 0,04
16	2,30 ± 0,12	8,34 ± 0,08	0,71 ± 0,04	0,81 ± 0,13	0,74 ± 0,03	2,22 ± 0,11
17	1,98 ± 0,05	7,14 ± 0,19	0,58 ± 0,03	0,85 ± 0,02	0,83 ± 0,06	0,75 ± 0,04
18	1,92 ± 0,10	4,10 ± 0,04	0,30 ± 0,02	0,37 ± 0,05	1,08 ± 0,06	2,56 ± 0,13
19	2,09 ± 0,24	3,87 ± 0,10	0,46 ± 0,02	0,25 ± 0,11	1,02 ± 0,04	18,11 ± 0,91

Aminosäure	R1 [s ⁻¹]	R2 [s ⁻¹]	{ ¹ H} ¹⁵ N-NOE	S ²	Atomare Fluktuationen [Å ²]	Amindprotonaustauschraten [s ⁻¹]
20	2,31 ± 0,22	6,11 ± 0,37	0,51 ± 0,03	0,63 ± 0,09	1,14 ± 0,05	30,05 ± 1,50
21	2,33 ± 0,26	7,22 ± 0,11	0,63 ± 0,03	0,86 ± 0,03	0,71 ± 0,03	9,08 ± 0,45
22	2,17 ± 0,07	6,36 ± 0,13	0,67 ± 0,03	0,73 ± 0,05	0,49 ± 0,01	0,48 ± 0,02
23	2,12 ± 0,04	8,12 ± 0,11	0,71 ± 0,04	0,92 ± 0,02	0,41 ± 0,02	0,52 ± 0,03
24	2,04 ± 0,03	5,68 ± 0,02	0,68 ± 0,03	0,67 ± 0,02	0,54 ± 0,03	0,63 ± 0,03
25	2,15 ± 0,04	7,59 ± 0,11	0,73 ± 0,04	0,94 ± 0,01	0,51 ± 0,02	0,39 ± 0,02
26	2,06 ± 0,02	6,57 ± 0,02	0,69 ± 0,03	0,83 ± 0,02	0,59 ± 0,03	0,58 ± 0,03
27	2,05 ± 0,03	6,05 ± 0,03	0,68 ± 0,03	0,74 ± 0,02	0,63 ± 0,05	1,48 ± 0,07
28	2,22 ± 0,03	7,24 ± 0,02	0,75 ± 0,04	0,87 ± 0,02	0,66 ± 0,06	0,60 ± 0,03
29	2,13 ± 0,03	6,70 ± 0,10	0,76 ± 0,04	0,81 ± 0,03	0,63 ± 0,06	0,69 ± 0,03
30	2,05 ± 0,02	5,95 ± 0,04	0,69 ± 0,03	0,72 ± 0,02	0,65 ± 0,08	0,64 ± 0,03
31	2,09 ± 0,02	6,28 ± 0,03	0,73 ± 0,04	0,76 ± 0,02	0,61 ± 0,07	0,42 ± 0,02
32	2,10 ± 0,04	6,50 ± 0,08	0,74 ± 0,04	0,80 ± 0,03	0,60 ± 0,06	0,33 ± 0,02
33	2,07 ± 0,03	7,14 ± 0,18	0,72 ± 0,04	0,91 ± 0,01	0,62 ± 0,04	-
34	2,07 ± 0,03	9,63 ± 0,29	0,73 ± 0,04	0,90 ± 0,01	0,68 ± 0,04	-
35	1,96 ± 0,03	9,99 ± 0,16	0,69 ± 0,03	0,85 ± 0,01	0,72 ± 0,07	0,53 ± 0,03
36	2,36 ± 0,25	8,11 ± 0,24	0,67 ± 0,03	0,95 ± 0,03	0,89 ± 0,08	9,36 ± 0,47
37	1,88 ± 0,08	7,06 ± 0,03	0,46 ± 0,02	0,77 ± 0,03	1,13 ± 0,11	1,42 ± 0,07
38	1,86 ± 0,18	7,62 ± 0,11	0,35 ± 0,02	0,73 ± 0,10	1,17 ± 0,08	6,20 ± 0,31
39	2,35 ± 0,23	7,39 ± 0,07	0,66 ± 0,03	0,88 ± 0,02	1,13 ± 0,13	-
40	2,13 ± 0,05	6,79 ± 0,05	0,71 ± 0,04	0,84 ± 0,03	0,75 ± 0,06	0,35 ± 0,02
41	2,02 ± 0,03	9,92 ± 0,12	0,70 ± 0,04	0,87 ± 0,01	0,54 ± 0,02	-
42	2,03 ± 0,03	7,79 ± 0,11	0,72 ± 0,04	0,90 ± 0,01	0,52 ± 0,03	-
43	2,08 ± 0,03	14,96 ± 0,36	0,74 ± 0,04	0,92 ± 0,01	0,49 ± 0,02	0,64 ± 0,03
44	2,05 ± 0,02	6,49 ± 0,03	0,72 ± 0,04	0,83 ± 0,02	0,54 ± 0,04	0,57 ± 0,03
45	2,23 ± 0,05	6,64 ± 0,09	0,74 ± 0,04	0,74 ± 0,04	0,62 ± 0,04	0,63 ± 0,03
46	2,24 ± 0,05	7,74 ± 0,11	0,69 ± 0,03	0,94 ± 0,02	0,91 ± 0,06	0,82 ± 0,04
47	2,16 ± 0,09	5,74 ± 0,08	0,64 ± 0,03	0,62 ± 0,05	1,09 ± 0,10	1,40 ± 0,07
48	2,54 ± 0,23	6,14 ± 0,05	0,69 ± 0,03	0,46 ± 0,07	0,98 ± 0,09	5,40 ± 0,27
49	2,32 ± 0,08	5,91 ± 0,04	0,69 ± 0,03	0,54 ± 0,06	0,84 ± 0,06	0,80 ± 0,04
50	2,24 ± 0,06	6,05 ± 0,06	0,67 ± 0,03	0,63 ± 0,04	0,65 ± 0,04	0,82 ± 0,04
51	2,04 ± 0,03	6,41 ± 0,02	0,73 ± 0,04	0,82 ± 0,02	0,56 ± 0,02	0,58 ± 0,03
52	2,04 ± 0,03	7,94 ± 0,25	0,74 ± 0,04	0,94 ± 0,01	0,44 ± 0,01	0,57 ± 0,03
53	2,06 ± 0,02	6,58 ± 0,03	0,74 ± 0,04	0,84 ± 0,02	0,40 ± 0,02	0,43 ± 0,02
54	2,08 ± 0,03	9,43 ± 0,08	0,74 ± 0,04	0,92 ± 0,01	0,41 ± 0,01	-
55	-	-	-	-	0,49 ± 0,01	-
56	2,16 ± 0,03	8,18 ± 0,05	0,74 ± 0,04	0,96 ± 0,01	0,58 ± 0,04	0,99 ± 0,05
57	2,24 ± 0,06	8,06 ± 0,16	0,75 ± 0,04	0,99 ± 0,01	0,64 ± 0,07	0,80 ± 0,04
58	2,20 ± 0,03	7,04 ± 0,01	0,73 ± 0,04	0,84 ± 0,02	0,53 ± 0,03	0,42 ± 0,02
59	2,21 ± 0,03	15,04 ± 0,39	0,72 ± 0,04	0,96 ± 0,04	0,55 ± 0,03	0,94 ± 0,05
60	2,13 ± 0,03	9,67 ± 0,12	0,72 ± 0,04	0,94 ± 0,01	0,66 ± 0,06	0,41 ± 0,02
61	2,14 ± 0,10	5,14 ± 0,02	0,63 ± 0,03	0,50 ± 0,06	0,94 ± 0,14	-
62	1,98 ± 0,06	5,87 ± 0,07	0,40 ± 0,02	0,63 ± 0,02	1,42 ± 0,32	2,04 ± 0,10
63	1,36 ± 0,02	2,10 ± 0,02	-0,06 ± 0,01	0,13 ± 0,01	2,34 ± 0,49	0,74 ± 0,04

LynSH3/LynSH3-Tip

Aminosäure	LynSH3				LynSH3-Tip			
	R1 [s ⁻¹]	R2 [s ⁻¹]	{ ¹ H} ¹⁵ N-NOE	S ²	R1 [s ⁻¹]	R2 [s ⁻¹]	{ ¹ H} ¹⁵ N-NOE	S ²
10	2,07 ± 0,12	4,66 ± 0,20	0,32 ± 0,02	0,35 ± 0,05	1,70 ± 0,03	7,06 ± 0,21	0,38 ± 0,02	0,61 ± 0,02
11	-	-	-	-	1,63 ± 0,02	8,22 ± 0,10	0,59 ± 0,03	0,79 ± 0,01
12	1,74 ± 0,03	7,17 ± 0,09	0,66 ± 0,03	0,76 ± 0,01	1,41 ± 0,01	10,07 ± 0,05	0,64 ± 0,03	0,77 ± 0,01
13	2,00 ± 0,02	8,19 ± 0,05	0,81 ± 0,04	0,90 ± 0,01	1,50 ± 0,02	11,35 ± 0,06	0,76 ± 0,04	0,85 ± 0,01
14	2,01 ± 0,02	8,05 ± 0,03	0,79 ± 0,04	0,91 ± 0,01	1,58 ± 0,03	11,02 ± 0,12	0,77 ± 0,04	0,90 ± 0,01
15	1,99 ± 0,02	8,84 ± 0,12	0,81 ± 0,04	0,90 ± 0,01	1,54 ± 0,02	10,47 ± 0,04	0,75 ± 0,04	0,88 ± 0,01
16	1,97 ± 0,03	9,25 ± 0,10	0,77 ± 0,04	0,89 ± 0,01	1,37 ± 0,02	12,09 ± 0,29	0,75 ± 0,04	0,78 ± 0,01
17	1,93 ± 0,03	7,78 ± 0,05	0,74 ± 0,04	0,87 ± 0,01	1,38 ± 0,04	13,46 ± 0,72	0,77 ± 0,04	0,77 ± 0,02
18	-	-	-	-	-	-	-	-
19	1,93 ± 0,01	8,09 ± 0,05	0,78 ± 0,04	0,87 ± 0,01	1,43 ± 0,02	11,36 ± 0,16	0,77 ± 0,04	0,81 ± 0,01
20	2,23 ± 0,13	8,49 ± 0,14	0,79 ± 0,04	0,87 ± 0,01	1,47 ± 0,02	10,27 ± 0,21	0,77 ± 0,04	0,83 ± 0,01
21	1,95 ± 0,04	8,36 ± 0,16	0,71 ± 0,04	0,87 ± 0,02	1,54 ± 0,01	10,62 ± 0,27	0,72 ± 0,04	0,85 ± 0,01
22	1,71 ± 0,03	6,10 ± 0,05	0,55 ± 0,03	0,72 ± 0,01	1,38 ± 0,03	10,09 ± 0,19	0,53 ± 0,03	0,74 ± 0,01
23	1,79 ± 0,03	8,54 ± 0,07	0,55 ± 0,03	0,79 ± 0,02	1,45 ± 0,01	11,53 ± 0,14	0,67 ± 0,03	0,80 ± 0,01
24	-	-	-	-	-	-	-	-
25	1,94 ± 0,05	9,38 ± 0,07	0,76 ± 0,04	0,88 ± 0,02	1,41 ± 0,04	12,88 ± 0,27	0,73 ± 0,04	0,80 ± 0,02
26	1,97 ± 0,05	8,48 ± 0,08	0,78 ± 0,04	0,89 ± 0,02	1,49 ± 0,01	12,31 ± 0,09	0,76 ± 0,04	0,85 ± 0,01
27	1,99 ± 0,05	8,92 ± 0,11	0,78 ± 0,04	0,90 ± 0,02	1,53 ± 0,01	10,06 ± 0,09	0,76 ± 0,04	0,87 ± 0,01
28	1,84 ± 0,02	7,02 ± 0,05	0,72 ± 0,04	0,82 ± 0,01	1,37 ± 0,01	9,99 ± 0,05	0,70 ± 0,04	0,76 ± 0,01
29	1,96 ± 0,02	8,53 ± 0,05	0,80 ± 0,04	0,89 ± 0,01	1,47 ± 0,01	11,57 ± 0,16	0,81 ± 0,04	0,84 ± 0,00
30	1,92 ± 0,04	8,43 ± 0,07	0,81 ± 0,04	0,87 ± 0,02	1,42 ± 0,02	11,62 ± 0,10	0,77 ± 0,04	0,81 ± 0,01
31	-	-	-	-	-	-	-	-
32	2,03 ± 0,04	8,20 ± 0,04	0,80 ± 0,04	0,92 ± 0,02	1,54 ± 0,01	11,08 ± 0,17	0,78 ± 0,04	0,88 ± 0,01
33	1,98 ± 0,02	8,80 ± 0,06	0,83 ± 0,04	0,90 ± 0,01	1,54 ± 0,01	11,74 ± 0,05	0,79 ± 0,04	0,88 ± 0,00
34	1,96 ± 0,03	7,34 ± 0,04	0,78 ± 0,04	0,88 ± 0,01	1,50 ± 0,01	10,12 ± 0,09	0,78 ± 0,04	0,85 ± 0,01
35	1,98 ± 0,02	7,79 ± 0,10	0,79 ± 0,04	0,90 ± 0,01	1,46 ± 0,01	10,84 ± 0,06	0,76 ± 0,04	0,83 ± 0,01
36	1,91 ± 0,04	7,65 ± 0,05	0,77 ± 0,04	0,87 ± 0,02	1,47 ± 0,01	10,52 ± 0,04	0,76 ± 0,04	0,84 ± 0,01
37	1,90 ± 0,02	9,85 ± 0,20	0,77 ± 0,04	0,86 ± 0,01	1,45 ± 0,01	11,16 ± 0,08	0,77 ± 0,04	0,83 ± 0,01
38	1,88 ± 0,06	10,28 ± 0,11	0,77 ± 0,04	0,85 ± 0,02	1,42 ± 0,02	12,28 ± 0,20	0,75 ± 0,04	0,81 ± 0,01
39	1,82 ± 0,02	8,18 ± 0,13	0,76 ± 0,04	0,82 ± 0,01	1,38 ± 0,02	11,37 ± 0,33	0,75 ± 0,04	0,79 ± 0,01
40	1,99 ± 0,10	7,10 ± 0,07	0,72 ± 0,04	0,85 ± 0,01	1,44 ± 0,04	10,34 ± 0,09	0,70 ± 0,04	0,80 ± 0,02
41	1,91 ± 0,03	6,16 ± 0,04	0,70 ± 0,03	0,77 ± 0,02	1,44 ± 0,02	9,27 ± 0,04	0,62 ± 0,03	0,80 ± 0,01
42	1,92 ± 0,15	5,13 ± 0,05	0,60 ± 0,03	0,57 ± 0,07	1,39 ± 0,04	7,23 ± 0,12	0,52 ± 0,03	0,82 ± 0,03
43	2,09 ± 0,17	7,17 ± 0,08	0,72 ± 0,04	0,79 ± 0,03	1,42 ± 0,04	11,14 ± 0,15	0,66 ± 0,03	0,79 ± 0,02
44	1,98 ± 0,04	7,52 ± 0,07	0,76 ± 0,04	0,90 ± 0,01	1,40 ± 0,01	11,40 ± 0,09	0,71 ± 0,04	0,80 ± 0,01
45	1,92 ± 0,04	7,51 ± 0,04	0,80 ± 0,04	0,90 ± 0,01	1,36 ± 0,03	11,10 ± 0,10	0,76 ± 0,04	0,77 ± 0,02
46	1,87 ± 0,04	7,54 ± 0,08	0,77 ± 0,04	0,84 ± 0,02	1,45 ± 0,03	10,01 ± 0,21	0,79 ± 0,04	0,83 ± 0,02
47	1,80 ± 0,03	10,33 ± 0,20	0,81 ± 0,04	0,82 ± 0,02	1,49 ± 0,02	15,18 ± 0,74	0,78 ± 0,04	0,85 ± 0,01
48	1,89 ± 0,01	8,16 ± 0,03	0,79 ± 0,04	0,86 ± 0,01	1,44 ± 0,01	10,84 ± 0,08	0,77 ± 0,04	0,82 ± 0,01
49	1,97 ± 0,05	8,45 ± 0,08	0,79 ± 0,04	0,89 ± 0,03	1,46 ± 0,01	11,61 ± 0,06	0,77 ± 0,04	0,83 ± 0,01
50	2,08 ± 0,03	11,18 ± 0,45	0,80 ± 0,04	0,94 ± 0,01	1,53 ± 0,03	13,88 ± 0,44	0,77 ± 0,04	0,87 ± 0,02
51	2,02 ± 0,02	7,80 ± 0,08	0,77 ± 0,04	0,90 ± 0,01	1,50 ± 0,01	10,56 ± 0,07	0,72 ± 0,04	0,85 ± 0,01
52	2,10 ± 0,09	9,30 ± 0,13	0,79 ± 0,04	0,95 ± 0,04	1,50 ± 0,02	12,19 ± 0,42	0,74 ± 0,04	0,86 ± 0,01
53	2,11 ± 0,03	8,13 ± 0,07	0,77 ± 0,04	0,97 ± 0,01	1,53 ± 0,01	11,26 ± 0,12	0,77 ± 0,04	0,87 ± 0,01

Aminosäure	LynSH3				LynSH3-Tip			
	R1 [s ⁻¹]	R2 [s ⁻¹]	{ ¹ H} ¹⁵ N-NOE	S ²	R1 [s ⁻¹]	R2 [s ⁻¹]	{ ¹ H} ¹⁵ N-NOE	S ²
54	2,00 ± 0,03	7,73 ± 0,08	0,74 ± 0,04	0,92 ± 0,01	1,40 ± 0,01	12,30 ± 0,06	0,74 ± 0,04	0,79 ± 0,01
55	1,82 ± 0,01	7,63 ± 0,06	0,76 ± 0,04	0,82 ± 0,01	1,40 ± 0,01	10,32 ± 0,06	0,74 ± 0,04	0,80 ± 0,01
56	1,85 ± 0,02	10,94 ± 0,25	0,78 ± 0,04	0,84 ± 0,01	1,49 ± 0,02	13,86 ± 0,54	0,77 ± 0,04	0,85 ± 0,01
57	1,88 ± 0,04	8,61 ± 0,09	0,81 ± 0,04	0,85 ± 0,02	1,45 ± 0,01	11,23 ± 0,07	0,76 ± 0,04	0,82 ± 0,01
58	1,92 ± 0,02	7,87 ± 0,10	0,79 ± 0,04	0,87 ± 0,01	1,45 ± 0,02	10,61 ± 0,07	0,75 ± 0,04	0,82 ± 0,01
59	-	-	-	-	-	-	-	-
60	2,13 ± 0,03	8,39 ± 0,15	0,78 ± 0,04	0,92 ± 0,02	1,44 ± 0,02	12,84 ± 0,19	0,75 ± 0,04	0,82 ± 0,01
61	2,04 ± 0,03	8,57 ± 0,09	0,81 ± 0,04	0,78 ± 0,04	1,53 ± 0,01	12,59 ± 0,18	0,78 ± 0,04	0,87 ± 0,01
62	2,02 ± 0,03	8,03 ± 0,05	0,80 ± 0,04	0,92 ± 0,01	1,42 ± 0,02	12,88 ± 0,12	0,78 ± 0,04	0,81 ± 0,01
63	2,06 ± 0,03	9,06 ± 0,29	0,79 ± 0,04	0,93 ± 0,01	1,51 ± 0,01	14,67 ± 0,40	0,79 ± 0,04	0,86 ± 0,00
64	1,99 ± 0,04	7,91 ± 0,05	0,81 ± 0,04	0,90 ± 0,02	1,50 ± 0,02	10,86 ± 0,12	0,74 ± 0,04	0,85 ± 0,01
65	1,95 ± 0,06	6,93 ± 0,03	0,72 ± 0,04	0,83 ± 0,01	1,41 ± 0,01	9,38 ± 0,03	0,69 ± 0,04	0,79 ± 0,01
66	0,83 ± 0,01	6,34 ± 0,03	0,57 ± 0,03	0,81 ± 0,01	1,42 ± 0,01	9,43 ± 0,07	0,58 ± 0,03	0,76 ± 0,01
67	2,06 ± 0,17	4,01 ± 0,04	0,28 ± 0,01	0,20 ± 0,01	1,56 ± 0,04	5,64 ± 0,05	0,33 ± 0,02	0,51 ± 0,02

10.5 XPLOR-Protokolle und experimentelle Randbedingungen

sa_LynSH3.inp

```

remarks sa_l.inp
remarks Author: Michael Nilges
evaluate ($ini_count = 0)
evaluate ($end_count = 120)
evaluate ($iniseed = 100046)
evaluate ($iniseed2 = 554321) !changed HS
evaluate ($iniseed3 = 204875) !changed HS
evaluate ($iniseed4 = 395164) !changed HS
evaluate ($init_t = 2000) { * initial simulated annealing temperature * }
evaluate ($high_steps = 20000)
evaluate ($cool1_steps = 30000)
evaluate ($cool2_steps = 15000)
evaluate ($fileroot = "../sa_lynSH3_")
evaluate ($template = "../PSF/lynSH3_start.pdb")
structure @@../PSF/lynSH3_start.psf end
parameter @@../PARAMETER/parallhdg_min.pn end
noe

        reset
        nrestraints = 5000                ! allocate space for NOEs
        ceiling 100
        class      dist @../lynSH3.noe
                   @../lynSH3.hbonds
        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
        @@../lynSH3.phi
end
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
vector do (fbeta=10) (all)    { * friction coefficient for MD heatbath, in 1/ps * }
vector do (mass=100) (all)
evaluate ($kcdih = 5)
restraints dihedral
        scale=$kcdih
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 $seed end
@sa_l_randomchain.xplor
evaluate ($cpu1 = $cpu)
evaluate ($final1_t = 1000)      { K }
evaluate ($final2_t = 100)      { K }
evaluate ($tempstep = 50)       { K }
evaluate ($ncycle = ($init_t-$final1_t)/$tempstep)
evaluate ($nstep = int($cool1_steps/$ncycle))
@@sa_l_initial_values.xplor
parameter
  angle (store2) (all) (store2) $ini_flt TOKEN
  angle (all) (all) (store2) $ini_flt TOKEN
end
parameter nbonds
  atom cutnb 12 tolerance 3.5 repel=1.2 wmin 0.5
  rexp=2 irexp=2 rcon=1. nbxmod 4
end end
@sa_l_reduced.xplor { defines store1 }
constraints
  interaction (all) (not store1) weights * 1 angl 1.0 impr 1.0 vdw 0.0 elec 0 end
  interaction (store1) (store1) weights * 1 angl 1.0 impr 1.0 vdw 0.1 elec 0 end
end
{* 1 ===== initial minimization *}
restraints dihedral scale=5. end
noe potential * soft scale * 1.0 asymptote * 2.0 end
minimize powell nstep=50 drop=10. nprint=25 end
{* 2 ===== high temperature dynamics *}
flags include bond angl impr vdw noe cdih end
@sa_cyto_hightemp.xplor
flags include bond angl impr vdw noe cdih end
{* 3 ===== cooling 1 *}
@sa_cyto_cool1.xplor
{* 4 ===== cooling 2 *}
@sa_cyto_cool2.xplor
{* 5 ===== final minimization *}
evaluate ($swap = 1.001)
flags exclude * include noe end
@swap15v.xplor
flags include bond angl impr vdw noe cdih end
minimize powell nstep=400 drop=10.0 nprint=25 end
flags include bond angl impr vdw noe cdih end
{* 6 ===== write out the final structure(s) *}
evaluate ($filename=$fileroot+ encode($count)+ ".pdb")
evaluate ($fname=$fileroot+ encode($count)+ ".prt")
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
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, $violations_cdih
remarks =====
write coordinates sele= (not (resid 500)) output =$filename end
set print = $fname end
noe print thresh = 0.1 end
close $fname end
end loop main
stop

```

rdc_LynSH3.inp

```

remarks sa_l.inp
remarks Author: Michael Nilges
evaluate ($ini_count = 0)
evaluate ($end_count = 60)
evaluate ($ini_zeit = 0)
evaluate ($end_zeit = 5)
evaluate ($iniseed = 100046)
evaluate ($iniseed2 = 554321) !changed HS
evaluate ($iniseed3 = 204875) !changed HS
evaluate ($iniseed4 = 395164) !changed HS
evaluate ($init_t = 1000) { * initial simulated annealing temperature *}
evaluate ($high_steps = 5000)
evaluate ($cool_steps = 150000)
evaluate ($fileroot = "../rdc_LynSH3_")
structure @@../PSF/lynSH3_start.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 @../lynSH3.noe
        @../lynSH3.hbonds
    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
    @@../lynSH3.phi
end
evaluate ($ksani = 0.01)
evaluate ($ksani_CH = 1.0*$ksani)
sani
    nres=400
    class JNH
    force $ksani
    potential harmonic
    coeff 0.0 -13.93 0.37
    @../lynSH3.Dnh
    class JCH
    force $ksani_CH
    potential harmonic
    coeff 0.0 -13.93 0.37
    @../lynSH3.Dcaha
end
sani class JNH force 0 end

```



```

sani class JCH 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
flags exclude * include bonds angle impr vdw noe cdih coup sani 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 ($template = "../SA_LynSH3/rnk_lynSH3_"+ encode($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 $seed end
    {*Friction coefficient for MD heatbath, in 1/ps. *}
vector do (fbeta=10) (all)
    {*Uniform heavy masses to speed molecular dynamics.*}
vector do (mass=100) (not (resid 500 or resid 600))
vector do (mass = 30.0) (resid 500 or resid 600)
vector do (refx=x) (all)
vector do (refy=y) (all)
vector do (refz=z) (all)
  evaluate ($swap = 1.001)
  flags exclude * include noe end
  @swap15v.xplor
  flags exclude * include bond angl impr vdw noe cdih coup sani end
  restraints dihedral scale=5. end
  noe asymptote * 1.0 end
  constraints interaction
    (all) (all) weights * 1 end end
! minimize powell nstep=500 drop=10. nprint=25 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_cdi=0)
while ($i_cdi < $ncycle) loop cdi1
eval ($i_cdi = $i_cdi+1)
eval ($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 iprfrq=0
  end
end loop cdi1
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 ($fin_con= 4.0)
!inserted HS
evaluate ($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*$radfact))
  !inserted HS
  evaluate ($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=$bath
    tcoupling=true tbath=$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=1200 drop=10.0 nprint=25 end
flags exclude * include bond angl impr vdw noe cdih coup sani harm end
sani class JNH force 0 end
sani class JCH 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($count)+ ".dih")
evaluate ($angname=$fileroot+ encode($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 ($rms_improppers=$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, $sani
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, $violations_cdih
remarks =====
evaluate ($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 = $sname end
    sani print thresh = 0.0 end
    close $sname end
    end
    set print = $dname end
    print thresh = 0.001 cdih end
    close $dname end
    set print = $angname end
    print thresh = 0.8 angles end
    close $angname end
end if
end loop intra
end loop main
stop

```

lynSH3.noe

55	HA	48	HA	2.70	62	HA	63	HN	3.50	28	HN	27	HB1	5.00	41	HN	40	HG2	5.00
55	HA	56	HN	2.70	61	HA	62	HN	3.50	14	HN	13	HB	3.50	41	HN	40	HG1	5.00
55	HA	49	HN	3.50	16	HA	17	HN	3.50	14	HN	63	HA	5.00	46	HN	45	HB2	5.00
57	HA	46	HA	2.70	67	HA	68	HN	3.50	14	HN	13	HN	5.00	46	HN	45	HA	2.70
57	HA	58	HN	2.70	57	HN	27	HN	3.50	55	HN	54	HG*	5.00	46	HN	45	HB1	3.50
57	HA	47	HN	3.50	59	HG1	29	HZ	5.00	48	HN	35	HB1	5.00	46	HN	39	HB2	5.00
56	HN	47	HN	3.50	59	HG2	29	HZ	5.00	48	HN	36	HB1	5.00	46	HN	39	HB1	5.00
54	HN	53	HA	3.50	62	HB1	59	HG1	5.00	13	HN	12	HN	5.00	46	HN	40	HA	5.00
54	HN	54	HA	3.50	62	HB2	29	HZ	3.50	13	HN	12	HB	5.00	33	HN	34	HN	5.00
52	HN	51	HA	3.50	62	HB1	29	HZ	3.50	13	HN	35	HB2	5.00	33	HN	32	HA1	3.50
52	HA	53	HN	5.00	50	HN	49	HB*	5.00	68	HN	67	HB1	5.00	33	HN	32	HA2	3.50
54	HA	55	HN	3.50	50	HN	35	HG2	5.00	68	HN	67	HB2	5.00	66	HN	65	HB2	5.00
49	HN	48	HA	2.70	50	HN	35	HG1	5.00	68	HN	67	HN	5.00	66	HN	65	HB1	5.00
47	HN	46	HA	2.70	50	HN	51	HN	3.50	19	HN	18	HB2	5.00	34	HN	33	HB2	5.00
58	HN	45	HN	3.50	52	HN	51	HB*	3.50	19	HN	18	HB1	5.00	34	HN	33	HB1	5.00
58	HN	46	HA	3.50	52	HN	49	HB*	3.50	49	HN	48	HG1	5.00	43	HN	42	HA2	3.50
59	HN	45	HN	5.00	52	HN	53	HN	3.50	49	HN	48	HG2	5.00	43	HN	42	HA1	3.50
45	HN	44	HA	3.50	52	HN	50	HN	5.00	57	HN	26	HN	5.00	37	HN	36	HG1	5.00
59	HA	44	HA	3.50	47	HN	46	HG1	5.00	57	HN	26	HA	2.70	37	HN	36	HG2	5.00
60	HN	44	HA	3.50	47	HN	46	HB2	5.00	57	HN	56	HA1	2.70	37	HN	36	HB2	5.00
59	HA	60	HN	2.70	56	HN	55	HG2	5.00	57	HN	56	HA2	2.70	37	HN	36	HB1	5.00
47	HA	37	HA	2.70	56	HN	55	HB*	5.00	62	HN	61	HB1	5.00	37	HN	11	HB2	5.00
47	HA	38	HN	3.50	56	HN	55	HG1	5.00	35	HN	34	HB1	5.00	37	HN	11	HB1	5.00
47	HA	48	HN	2.70	56	HN	46	HD*	5.00	35	HN	34	HG2	5.00	15	HN	16	HN	5.00
48	HN	36	HN	3.50	56	HN	46	HE1	5.00	35	HN	34	HN	5.00	27	HN	56	HA1	5.00
36	HN	35	HA	2.70	21	HN	20	HA	3.50	44	HN	45	HN	5.00	27	HN	56	HA2	5.00
36	HN	49	HA	5.00	21	HN	20	HB1	5.00	44	HN	43	HN	3.50	27	HN	57	HB1	5.00
50	HN	49	HA	2.70	21	HN	20	HB2	5.00	44	HN	43	HG1	5.00	27	HN	26	HB*	3.50
49	HA	35	HA	3.50	63	HN	62	HB2	5.00	44	HN	43	HB2	5.00	27	HN	26	HA	2.70
50	HN	35	HA	3.50	63	HN	62	HB1	5.00	44	HN	42	HA2	5.00	20	HN	19	HB2	5.00
37	HA	38	HN	2.70	63	HN	61	HA	5.00	44	HN	41	HB*	5.00	20	HN	19	HB1	5.00
39	HA	40	HN	2.70	63	HN	62	HN	3.50	44	HN	42	HA1	5.00	38	HN	37	HB	5.00
40	HA	41	HN	2.70	63	HN	64	HN	5.00	11	HN	12	HN	5.00	15	HN	33	HB2	5.00
41	HA	42	HN	5.00	10	HN	9	HA	3.50	11	HN	10	HA1	3.50	15	HN	33	HB1	5.00
43	HA	44	HN	3.50	42	HN	43	HN	5.00	11	HN	10	HA2	3.50	31	HN	18	HD2	5.00
42	HA	43	HN	3.50	58	HN	57	HB2	5.00	67	HN	66	HN	5.00	31	HN	18	HB1	5.00
38	HA	39	HN	5.00	58	HN	57	HB1	5.00	22	HN	23	HN	2.70	17	HN	31	HA	5.00
36	HA	37	HN	2.70	53	HN	51	HB*	5.00	22	HN	21	HA*	2.70	30	HN	33	HB1	3.50
34	HA	35	HN	2.70	53	HN	52	HB	5.00	54	HN	49	HB*	5.00	30	HN	33	HB2	3.50
33	HA	34	HN	2.70	17	HN	16	HB2	5.00	30	HN	29	HB1	5.00	19	HN	29	HN	3.50
32	HA	33	HN	3.50	17	HN	16	HN	3.50	30	HN	29	HA	2.70	19	HN	29	HD*	5.00
33	HN	15	HN	5.00	17	HN	16	HB1	5.00	12	HN	11	HB1	5.00	19	HN	29	HB2	5.00
34	HA	14	HA	2.70	17	HN	15	HA	5.00	12	HN	11	HB2	5.00	19	HB1	29	HN	5.00
34	HA	15	HN	3.50	17	HN	16	HG	5.00	64	HN	65	HN	5.00	19	HB2	29	HN	3.50
14	HA	15	HN	2.70	39	HN	38	HN	3.50	64	HN	63	HB	2.70	20	HN	19	HD*	3.50
14	HA	35	HN	3.50	39	HN	38	HB2	5.00	65	HN	66	HN	5.00	20	HN	21	HN	5.00
35	HN	13	HN	3.50	39	HN	38	HB1	5.00	65	HN	13	HA	5.00	21	HN	26	HB*	5.00
12	HA	13	HN	2.70	25	HN	23	HB1	5.00	26	HN	24	HA	5.00	21	HN	28	HB1	5.00
36	HA	13	HN	5.00	25	HN	23	HB2	5.00	26	HN	25	HB2	3.50	21	HN	28	HB2	5.00
13	HA	14	HN	2.70	25	HN	26	HN	2.70	51	HN	50	HG	5.00	21	HN	28	HA	3.50
12	HA	37	HN	3.50	25	HN	24	HA	3.50	51	HN	50	HA	5.00	21	HN	19	HE*	5.00
10	HA	11	HN	3.50	25	HN	24	HB2	5.00	51	HN	49	HB*	5.00	22	HN	26	HB*	3.50
38	HA	11	HN	5.00	25	HN	24	HB1	5.00	60	HN	59	HB2	5.00	25	HN	23	HA	5.00
15	HA	16	HN	2.70	32	HN	31	HB2	5.00	60	HN	59	HB1	5.00	26	HN	19	HE*	5.00
13	HA	65	HA	2.70	32	HN	31	HB1	2.70	36	HN	35	HG1	5.00	26	HN	25	HA	3.50
65	HA	66	HN	2.70	32	HN	31	HE*	5.00	36	HN	35	HG2	5.00	26	HN	23	HB1	3.50
65	HA	14	HN	3.50	32	HN	31	HA	2.70	23	HN	22	HB	3.50	58	HA	59	HD1	2.70
13	HA	66	HN	3.50	32	HN	31	HG1	5.00	23	HN	22	HA	3.50	19	HB2	29	HD*	3.50
66	HA	67	HN	3.50	32	HN	33	HN	3.50	23	HN	21	HA2	5.00	19	HE*	26	HB*	2.70
64	HA	65	HN	2.70	61	HN	60	HA	5.00	23	HN	21	HA1	5.00	29	HZ	59	HD1	3.50
64	HN	14	HN	3.50	61	HN	59	HA	5.00	45	HN	59	HA	5.00	29	HZ	59	HD2	3.50
13	HA	64	HN	5.00	61	HN	62	HN	3.50	41	HN	40	HN	5.00	27	HB1	56	HA1	3.50
63	HA	64	HN	2.70	61	HN	59	HB1	5.00	41	HN	45	HA	3.50	27	HB1	56	HA2	3.50
63	HA	15	HA	3.50	61	HN	59	HB2	5.00	41	HN	40	HB1	5.00	59	HG1	62	HD*	3.50
63	HA	16	HN	3.50	29	HN	28	HB2	5.00	41	HN	40	HB2	5.00	59	HG2	62	HD*	5.00

19	HD*	26	HB*	3.50	58	HD1*	45	HB1	5.00	15	HB*	63	HA	5.00	45	HE1	40	HG1	5.00
17	HB2	62	HD*	3.50	58	HD1*	45	HB2	5.00	15	HB*	30	HN	3.50	45	HE1	40	HB2	5.00
17	HB1	62	HD*	3.50	58	HD1*	45	HN	5.00	15	HB*	29	HD*	2.70	45	HE1	40	HA	5.00
49	HB*	53	HN	3.50	22	HG2*	23	HN	5.00	15	HB*	33	HB2	3.50	45	HE1	43	HA	5.00
18	HD2	31	HA	5.00	63	HG2*	60	HA	3.50	15	HB*	33	HB1	3.50	45	HD1	40	HG2	3.50
18	HD1	31	HA	5.00	63	HG2*	15	HA	5.00	15	HB*	29	HB2	3.50	45	HD1	41	HA	5.00
41	HN	45	HD1	2.70	16	HD1*	15	HA	5.00	15	HB*	32	HA2	5.00	45	HH2	60	HB1	5.00
18	HA	31	HN	3.50	16	HD1*	63	HA	5.00	15	HB*	35	HE*	3.50	45	HH2	63	HG2*	3.50
35	HE*	63	HB	3.50	16	HD1*	17	HE*	5.00	15	HN	35	HE*	3.50	45	HE3	37	HB	5.00
29	HE*	62	HD*	3.50	16	HD1*	17	HD*	5.00	17	HN	15	HB*	3.50	19	HE*	58	HA	5.00
29	HE*	35	HE*	3.50	38	HD2*	47	HB*	5.00	32	HN	15	HB*	3.50	19	HE*	21	HA*	3.50
29	HE*	62	HB1	3.50	38	HD2*	48	HN	5.00	48	HN	47	HB*	2.70	29	HZ	19	HB1	5.00
29	HE*	62	HB2	3.50	56	HN	38	HD*	5.00	36	HN	47	HB*	3.50	29	HZ	19	HB2	3.50
18	HG*	31	HN	5.00	63	HN	35	HE*	5.00	56	HN	47	HB*	5.00	29	HZ	63	HG1*	3.50
15	HA	35	HE*	3.50	39	HN	37	HG2*	3.50	14	HN	64	HB*	5.00	17	HN	63	HG1*	5.00
13	HN	35	HB1	5.00	39	HN	38	HD1*	5.00	65	HN	64	HB*	3.50	17	HN	63	HA	5.00
21	HN	19	HD*	5.00	39	HN	38	HD2*	5.00	27	HD*	52	HG2*	5.00	17	HN	62	HA	5.00
41	HN	42	HN	5.00	61	HN	63	HG2*	5.00	12	HD1*	36	HA	3.50	17	HN	62	HB1	5.00
41	HB*	44	HB2	5.00	14	HN	13	HG2*	5.00	35	HE*	29	HB1	3.50	19	HN	15	HB*	5.00
30	HA	31	HN	2.70	14	HN	13	HG1*	3.50	35	HE*	29	HB2	3.50	19	HN	30	HA	3.50
60	HA	63	HN	5.00	14	HN	63	HG1*	5.00	15	HB*	31	HA	3.50	33	HN	31	HA	3.50
40	HA	45	HD1	3.50	55	HN	27	HD*	5.00	45	HE3	37	HG1*	2.70	37	HN	37	HB	3.50
40	HA	45	HA	5.00	48	HN	38	HD1*	5.00	45	HE3	37	HG2*	2.70	45	HN	58	HG11	5.00
41	HB*	45	HD1	3.50	13	HN	12	HG2*	5.00	45	HB1	37	HG1*	5.00	45	HN	58	HG12	5.00
40	HA	45	HB1	5.00	62	HN	63	HG2*	5.00	45	HB2	37	HG1*	5.00	47	HN	46	HG2	3.50
41	HB*	45	HA	5.00	35	HN	12	HG2*	5.00	45	HE3	58	HD1*	5.00	48	HN	55	HA	5.00
44	HN	45	HD1	5.00	35	HN	13	HG2*	3.50	45	HZ3	37	HG1*	3.50	48	HN	35	HA	5.00
41	HN	45	HB1	5.00	54	HN	52	HG2*	5.00	45	HZ3	37	HG2*	5.00	51	HN	53	HN	5.00
45	HZ2	60	HB1	5.00	64	HN	63	HG1*	5.00	13	HG2*	37	HG1*	3.50	49	HN	27	HG	3.50
45	HZ2	60	HB2	5.00	64	HN	13	HG2*	5.00	13	HG2*	58	HD1*	2.70	51	HN	49	HA	5.00
45	HZ3	60	HA	5.00	64	HN	16	HD1*	5.00	52	HG2*	53	HN	3.50	49	HA	35	HG1	3.50
44	HB1	59	HA	5.00	64	HN	16	HD2*	5.00	37	HG1*	58	HD1*	3.50	49	HA	35	HG2	3.50
44	HB1	57	HD*	5.00	64	HN	63	HG2*	5.00	14	HG2*	32	HA1	5.00	49	HA	35	HB1	5.00
44	HB2	57	HD*	5.00	64	HN	13	HG1*	5.00	27	HD*	49	HN	3.50	29	HZ	58	HA	5.00
44	HD1	59	HA	5.00	64	HN	14	HG2*	3.50	30	HG2	31	HN	5.00	29	HD*	58	HA	5.00
60	HN	61	HN	3.50	64	HN	35	HE*	5.00	30	HG1	31	HN	5.00	60	HA	45	HH2	5.00
53	HB1	54	HN	5.00	36	HN	12	HD1*	5.00	54	HD*	55	HN	5.00	63	HA	16	HG	3.50
53	HB2	54	HN	5.00	36	HN	50	HD2*	5.00	12	HN	12	HB	2.70	63	HA	13	HB	5.00
27	HB2	28	HN	5.00	23	HN	22	HD1*	5.00	16	HN	16	HG	3.50	18	HA	32	HA	3.50
23	HN	26	HB*	3.50	46	HN	37	HG2*	5.00	22	HN	22	HG1*	3.50	18	HA	29	HD*	3.50
10	HN	9	HB1	3.50	33	HN	14	HG1*	5.00	22	HN	22	HB	3.50	18	HA	29	HE*	5.00
10	HN	9	HB2	3.50	34	HN	14	HG1*	5.00	27	HN	19	HE*	5.00	35	HN	35	HB1	5.00
33	HG*	34	HN	3.50	15	HN	14	HG1*	2.70	35	HN	35	HE*	3.50	35	HN	35	HB2	2.70
33	HG*	30	HN	3.50	15	HN	14	HG2*	5.00	39	HN	37	HA	5.00	36	HN	35	HB1	2.70
52	HG2*	51	HB*	3.50	16	HN	63	HG1*	3.50	39	HN	46	HN	3.50	36	HN	35	HB2	5.00
52	HG2*	49	HB*	5.00	16	HN	63	HG2*	5.00	41	HN	45	HE1	5.00	12	HA	36	HA	3.50
52	HG2*	51	HG	3.50	38	HN	37	HG2*	3.50	48	HN	37	HA	5.00	13	HG2*	35	HB1	3.50
52	HG2*	51	HD1*	3.50	38	HN	37	HG1*	5.00	60	HN	60	HB2	2.70	13	HG2*	35	HB2	3.50
52	HG2*	54	HE*	5.00	15	HN	63	HG1*	5.00	60	HN	60	HB1	5.00	37	HN	13	HG2*	5.00
49	HN	53	HA	3.50	32	HN	14	HG1*	5.00	60	HN	45	HN	5.00	37	HN	12	HD1*	5.00
48	HD*	53	HB2	5.00	23	HN	22	HG1*	5.00	60	HN	43	HA	5.00	37	HN	47	HB*	3.50
52	HA	53	HG*	5.00	15	HA	63	HG1*	2.70	62	HN	62	HB2	2.70	15	HB*	29	HE*	3.50
49	HN	54	HN	5.00	58	HG2*	63	HG1*	5.00	62	HN	62	HB1	5.00	12	HN	11	HA	2.70
19	HD*	22	HN	5.00	14	HG1*	32	HA2	5.00	62	HN	59	HB1	3.50	13	HN	34	HA	5.00
19	HE*	22	HN	2.70	14	HG1*	32	HA1	5.00	62	HN	59	HB2	5.00	14	HN	66	HN	5.00
28	HN	27	HA	2.70	47	HB*	58	HD1*	2.70	64	HN	13	HB	3.50	28	HN	27	HD*	3.50
28	HN	21	HA1	5.00	29	HE*	63	HG1*	3.50	51	HN	49	HG	5.00	28	HN	19	HD*	5.00
28	HN	21	HA2	5.00	11	HN	37	HG1*	3.50	53	HN	49	HG	5.00	29	HN	28	HA	2.70
28	HN	21	HN	5.00	14	HG2*	64	HB*	3.50	54	HN	49	HG	5.00	29	HN	19	HA	5.00
63	HG1*	62	HB1	5.00	16	HD1*	64	HB*	2.70	62	HN	61	HB2	3.50	29	HN	28	HB1	3.50
63	HG1*	62	HB2	5.00	29	HD*	63	HG1*	5.00	62	HN	59	HG1	3.50	28	HN	28	HB1	5.00
63	HG1*	13	HB	5.00	13	HB	63	HG2*	2.70	62	HN	59	HG2	5.00	28	HN	28	HB2	2.70
63	HG1*	15	HB*	3.50	14	HG2*	66	HN	5.00	45	HE1	60	HB1	5.00	30	HN	29	HD*	5.00
63	HG1*	35	HE*	2.70	13	HG2*	63	HB	3.50	59	HG2	19	HE*	3.50	30	HN	29	HB2	3.50
63	HG1*	58	HD1*	2.70	13	HG1*	65	HA	5.00	59	HG2	62	HB1	5.00	30	HN	33	HA	5.00
37	HG2*	45	HB1	3.50	22	HD1*	19	HE*	5.00	59	HG2	62	HB2	5.00	56	HN	48	HA	3.50
37	HG2*	45	HB2	3.50	33	HN	15	HB*	3.50	59	HG1	62	HB2	3.50	58	HN	44	HE3	5.00
58	HD1*	35	HE*	2.70	16	HN	15	HB*	3.50	45	HE1	40	HG2	3.50	12	HD1*	36	HE*	5.00

12	HD1*	36	HB*	3.50	53	HN	50	HN	5.00	57	HN	27	HB1	5.00	47	HN	58	HG2*	3.50
12	HD1*	50	HD*	5.00	39	HN	47	HA	5.00	57	HN	27	HB2	5.00	48	HN	58	HG2*	5.00
47	HN	55	HA	5.00	39	HN	45	HA	5.00	44	HN	41	HN	5.00	29	HD*	58	HG2*	2.70
27	HG	55	HA	5.00	39	HN	45	HB2	5.00	30	HN	33	HN	5.00	29	HE*	58	HG2*	2.70
27	HD*	55	HA	5.00	39	HN	38	HD*	5.00	54	HN	52	HB	5.00	29	HZ	58	HG2*	5.00
48	HG1	55	HA	5.00	25	HN	24	HD1	5.00	54	HN	27	HD*	5.00	29	HB2	58	HG2*	5.00
48	HG2	55	HA	5.00	61	HN	59	HG2	5.00	65	HN	16	HD*	5.00	29	HB1	58	HG2*	5.00
48	HB1	55	HA	5.00	25	HN	24	HD2	5.00	65	HN	13	HG1*	5.00	46	HA	58	HG2*	5.00
48	HB2	55	HA	5.00	32	HN	15	HN	5.00	26	HN	21	HA2	5.00	35	HG1	58	HG2*	5.00
52	HN	51	HD1*	5.00	32	HN	16	HD2*	5.00	45	HN	44	HE3	5.00	46	HN	57	HE*	5.00
52	HN	51	HG	5.00	61	HN	60	HB1	5.00	45	HN	60	HB2	5.00	49	HN	27	HD*	3.50
52	HN	49	HG	3.50	61	HN	60	HB2	5.00	46	HN	41	HN	5.00	49	HN	35	HG1	5.00
52	HN	49	HN	5.00	61	HN	62	HB2	5.00	40	HN	39	HG1	5.00	49	HN	35	HG2	5.00
47	HN	57	HD*	5.00	29	HN	15	HB*	5.00	41	HN	45	HB2	5.00	64	HN	16	HG	5.00
47	HN	37	HA	5.00	28	HN	54	HB2	5.00	33	HN	29	HB2	5.00	26	HN	23	HB1	3.50
47	HN	27	HB1	5.00	28	HN	56	HA1	5.00	15	HN	31	HA	5.00	52	HN	54	HN	5.00
47	HN	46	HB1	5.00	55	HN	48	HA	5.00	15	HN	32	HN	5.00	23	HN	19	HE*	5.00
56	HN	46	HB1	5.00	55	HN	27	HG	5.00	15	HN	29	HD*	5.00	32	HN	16	HA	5.00
56	HN	27	HG	3.50	55	HN	27	HD*	5.00	15	HN	34	HN	5.00	31	HN	15	HB*	5.00
21	HN	29	HN	5.00	48	HN	37	HN	5.00	16	HN	64	HN	5.00	35	HN	15	HN	5.00
63	HN	16	HN	5.00	48	HN	49	HA	5.00	38	HN	48	HN	5.00	62	HN	60	HA	5.00
63	HN	61	HN	5.00	48	HN	35	HG2	5.00	45	HE1	60	HB2	3.50	46	HN	57	HD*	5.00
63	HN	29	HZ	5.00	19	HN	29	HA	5.00	19	HN	18	HA	2.70	41	HD2	46	HN	5.00
63	HN	59	HD1	5.00	19	HN	29	HE*	5.00	22	HN	21	HA2	2.70	41	HD2	41	HN	5.00
58	HN	47	HN	5.00	19	HN	28	HB1	5.00	56	HN	27	HB2	2.70	41	HD2	41	HA	5.00
58	HN	57	HD*	3.50	62	HN	63	HG1*	5.00	56	HN	27	HB1	5.00	41	HD2	45	HA	5.00
58	HN	46	HB2	5.00	62	HN	29	HZ	5.00	56	HN	46	HG2	3.50					
53	HN	49	HN	5.00	57	HN	46	HA	5.00	27	HN	58	HG2*	3.50					

lynSH3.hbonds

16	HN	62	O	2.3	13	HN	35	O	2.3	56	HN	47	O	2.3	33	HN	30	O	2.3
16	N	62	O	3.3	13	N	35	O	3.3	56	N	47	O	3.3	33	N	30	O	3.3
64	HN	14	O	2.3	37	HN	11	O	2.3	47	HN	56	O	2.3	49	HN	54	O	2.3
64	N	14	O	3.3	37	N	11	O	3.3	47	N	56	O	3.3	49	N	54	O	3.3
14	HN	64	O	2.3	36	HN	48	O	2.3	58	HN	45	O	2.3					
14	N	64	O	3.3	36	N	48	O	3.3	58	N	45	O	3.3					
15	HN	33	O	2.3	48	HN	36	O	2.3	45	HN	58	O	2.3					
15	N	33	O	3.3	48	N	36	O	3.3	45	N	58	O	3.3					
35	HN	13	O	2.3	38	HN	46	O	2.3	19	HN	29	O	2.3					
35	N	13	O	3.3	38	N	46	O	3.3	19	N	29	O	3.3					

lynSH3.phi

12	c	13	n		24	c	25	n		40	c	41	n		51	c	52	n					
13	ca	13	c	-120	40	25	ca	25	c	-120	40	41	ca	41	c	-120	40	52	ca	52	c	-120	40
13	c	14	n		25	c	26	n		43	c	44	n		54	c	55	n					
14	ca	14	c	-120	40	26	ca	26	c	-60	20	44	ca	44	c	-120	40	55	ca	55	c	-120	40
14	c	15	n		29	c	30	n		44	c	45	n		57	c	58	n					
15	ca	15	c	-60	20	30	ca	30	c	-120	40	45	ca	45	c	-120	40	58	ca	58	c	-120	40
19	c	20	n		37	c	38	n		46	c	47	n		62	c	63	n					
20	ca	20	c	-120	40	38	ca	38	c	-120	40	47	ca	47	c	-120	40	63	ca	63	c	-120	40
21	c	22	n		39	c	40	n		47	c	48	n		67	c	68	n					
22	ca	22	c	-120	40	40	ca	40	c	-120	40	48	ca	48	c	-120	40	68	ca	68	c	-120	40

lynSH3.Dnh

!	3	LEU	H	3	LEU	N	0.09	!	11	ASP	H	11	ASP	N	-7.40	19	TYR	H	19	TYR	N	-4.45	
!	4	GLY	H	4	GLY	N	0.10		12	ILE	H	12	ILE	N	14.65	20	ASP	H	20	ASP	N	-1.52	
!	5	SER	H	5	SER	N	0.55		13	VAL	H	13	VAL	N	5.38	21	GLY	H	21	GLY	N	-5.52	
!	7	GLU	H	7	GLU	N	-1.20		14	VAL	H	14	VAL	N	-7.13	!	22	ILE	H	22	ILE	N	5.02
!	8	GLU	H	8	GLU	N	-1.65		15	ALA	H	15	ALA	N	-10.13	23	HIS	H	23	HIS	N	12.91	
!	9	GLN	H	9	GLN	N	0.72		16	LEU	H	16	LEU	N	-18.07	25	ASP	H	25	ASP	N	-10.66	
!	10	GLY	H	10	GLY	N	2.61		17	TYR	H	17	TYR	N	-1.83	26	ASP	H	26	ASP	N	17.61	

27 LEU H 27 LEU N -6.74	41 HIS H 41 HIS N -9.06	55 GLU H 55 GLU N 11.08
28 SER H 28 SER N -0.53	42 GLY H 42 GLY N 10.81	56 GLY H 56 GLY N 17.14
29 PHE H 29 PHE N 3.53	43 GLU H 43 GLU N -4.04	57 PHE H 57 PHE N 17.45
30 LYS H 30 LYS N 7.63	44 TRP H 44 TRP N -14.46	58 ILE H 58 ILE N 2.41
!31 LYS H 31 LYS N 6.08	45 TRP H 45 TRP N -5.74	60 SER H 60 SER N -12.90
32 GLY H 32 GLY N -20.42	46 LYS H 46 LYS N 5.56	61 ASN H 61 ASN N 7.90
33 GLU H 33 GLU N 11.92	47 ALA H 47 ALA N 18.56	62 TYR H 62 TYR N 0.85
34 LYS H 34 LYS N -18.20	48 LYS H 48 LYS N 16.17	63 VAL H 63 VAL N -22.44
35 MET H 35 MET N 2.42	49 SER H 49 SER N 14.70	!64 ALA H 64 ALA N -16.59
36 LYS H 36 LYS N 9.07	50 LEU H 50 LEU N 1.46	65 LYS H 65 LYS N -13.04
37 VAL H 37 VAL N 16.38	!51 LEU H 51 LEU N -11.52	!66 LEU H 66 LEU N 4.41
38 LEU H 38 LEU N 16.61	52 THR H 52 THR N -12.43	!67 ASN H 67 ASN N -0.85
39 GLU H 39 GLU N 1.21	53 LYS H 53 LYS N 8.68	!68 THR H 68 THR N -2.47
40 GLU H 40 GLU N 5.43	54 LYS H 54 LYS N -4.30	

LynSH3.Dcaha (Normierungsfaktor: -0,4784)

! 2 PRO HA 2 PRO CA -0.27	25 ASP HA 25 ASP CA -9.08	!48 LYS HA 48 LYS CA 17.32
! 5 SER HA 5 SER CA 0.29	26 ASP HA 26 ASP CA 2.20	49 SER HA 49 SER CA 3.72
! 6 PRO HA 6 PRO CA 0.70	28 SER HA 28 SER CA -6.72	50 LEU HA 50 LEU CA 3.46
! 7 GLU HA 7 GLU CA -1.12	29 PHE HA 29 PHE CA -10.48	51 LEU HA 51 LEU CA -3.85
! 8 GLU HA 8 GLU CA -1.28	30 LYS HA 30 LYS CA 11.57	52 THR HA 52 THR CA -19.87
! 9 GLN HA 9 GLN CA 0.80	31 LYS HA 31 LYS CA -18.97	53 LYS HA 53 LYS CA 6.49
12 ILE HA 12 ILE CA 12.10	33 GLU HA 33 GLU CA -14.27	!54 LYS HA 54 LYS CA 4.64
13 VAL HA 13 VAL CA 10.29	34 LYS HA 34 LYS CA -8.56	55 GLU HA 55 GLU CA 10.78
14 VAL HA 14 VAL CA -2.77	35 MET HA 35 MET CA -4.39	57 PHE HA 57 PHE CA 14.79
15 ALA HA 15 ALA CA -21.40	37 VAL HA 37 VAL CA 16.82	58 ILE HA 58 ILE CA 8.25
16 LEU HA 16 LEU CA -3.65	!38 LEU HA 38 LEU CA 9.14	59 PRO HA 59 PRO CA -17.26
17 TYR HA 17 TYR CA -11.02	!39 GLU HA 39 GLU CA -0.95	60 SER HA 60 SER CA -6.27
18 PRO HA 18 PRO CA 7.74	40 GLU HA 40 GLU CA -5.03	61 ASN HA 61 ASN CA 17.11
19 TYR HA 19 TYR CA 4.44	!41 HIS HA 41 HIS CA 7.93	!62 TYR HA 62 TYR CA 3.45
20 ASP HA 20 ASP CA -5.66	44 TRP HA 44 TRP CA -11.92	63 VAL HA 63 VAL CA -19.82
22 ILE HA 22 ILE CA -3.32	45 TRP HA 45 TRP CA -12.05	64 ALA HA 64 ALA CA -20.70
23 HIS HA 23 HIS CA 14.60	46 LYS HA 46 LYS CA 12.75	!65 LYS HA 65 LYS CA 2.66
24 PRO HA 24 PRO CA -15.13	47 ALA HA 47 ALA CA 14.80	!67 ASN HA 67 ASN CA -6.25

sa_LynSH3Tip.inp

```

remarks sa_l.inp
remarks Author: Michael Nilges
evaluate ($ini_count = 0)
evaluate ($end_count = 120)
evaluate ($iniseed = 567313)
evaluate ($init_t = 2000) { * initial simulated annealing temperature * }
evaluate ($high_steps = 30000)
evaluate ($cool1_steps = 40000)
evaluate ($cool2_steps = 30000)
evaluate ($fileroot = "../sa_lynTip_")
structure @../PSF/lynSH3_start.psf end
structure @../PSF/tip_start.psf end
parameter @../PARAMETER/parallhdg_min.pn end
parameter nbfix S S 462 13.6 462 13.6 end
parameter
    bond (name sg) (name sg) 0.0 TOKEN
    angle (all) (name sg) (name sg) 0.0 TOKEN
end
noe
    reset
    nrestraints = 5000 ! allocate space for NOEs
    ceiling 100
    class dist @../lynTip.noe
        @../lynSH3.hbonds
        @../lynTip.sb
    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
@@../lynSH3Tip.phi
end
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
vector do (fbeta=10) (all) { * friction coefficient for MD heatbath, in 1/ps * }
vector do (mass=100) (all)
evaluate ($kcdih = 5)
restraints dihedral
    scale=$kcdih
end
evaluate ($count = $ini_count)
while ($count < $end_count ) loop main
    evaluate ($count=$count+1)
    evaluate ($nreassign = 0)
coor @@../rnk_rdc_LynSH3_1.pdb
coor @@../PSF/tip_start.pdb
evaluate ($cpu1 = $cpu)
evaluate ($final1_t = 1000) { K }
evaluate ($final2_t = 100) { K }
evaluate ($tempstep = 50) { K }
evaluate ($ncycle = ($init_t-$final1_t)/$tempstep)
evaluate ($nstep = int($cool1_steps/$ncycle))
@@sa_l_initial_values.xplor
parameter
    angle (store2) (all) (store2) $ini_flt TOKEN
    angle (all) (all) (store2) $ini_flt TOKEN
end
parameter nbonds
    atom cutnb 12 tolerance 3.5 repel=1.2 wmin 0.5
    rexp=2 irexp=2 rcon=1. nbxmod 4
end end
@@sa_l_reduced.xplor { defines store1 }
constraints
    interaction (all) (not store1) weights * 1 angl 1.0 impr 1.0 vdw 0.0 elec 0 end
    interaction (store1) (store1) weights * 1 angl 1.0 impr 1.0 vdw 0.1 elec 0 end
end
{ * 1 ===== initial minimization * }
restraints dihedral scale=5. end
noe potential * soft scale * 1.0 asymptote * 2.0 end
minimize powell nstep=50 drop=10. nprint=25 end
{ * 2 ===== high temperature dynamics * }
@sa_pth_hightemp.xplor
{ * 3 ===== cooling 1 * }
@sa_pth_cool1.xplor
{ * 4 ===== cooling 2 * }
@sa_pth_cool2.xplor
{ * 5 ===== final minimization * }
evaluate ($swap = 1.001)
flags exclude * include noe end
@swap15v.xplor

```



```

flags include bond angl impr vdw noe cdih end
minimize powell nstep=400 drop=10.0 nprint=25 end
{* 6 ===== write out the final structure(s) *}
evaluate ($filename=$fileroot+ encode($count)+ ".pdb")
evaluate ($fname=$fileroot+ encode($count)+".prt")
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 ($rms_impropers=$result)
remarks initial random number seed: $seed
remarks =====
remarks          overall,bonds,angles,improper,vdw,noe,cdih
remarks energies: $ener, $bond, $angl, $impr, $vdw, $noe, $cdih
remarks =====
remarks          bonds,angles,impropers,noe,cdih
remarks rms-dev.: $rms_bonds,$rms_angles,$rms_impropers,$rms_noe,$rms_cdih
remarks =====
remarks          noe, cdih
remarks violations.: $violations_noe, $violations_cdih
remarks =====
write coordinates sele= (all) output =$filename end
set print = $fname end
noe print thresh = 0.1 end
close $fname end
end loop main
stop

```

rdc_LynSH3Tip.inp

```

remarks sa_l.inp
remarks Author: Michael Nilges
evaluate ($ini_count = 0)
evaluate ($end_count = 60)
evaluate ($ini_zeit = 0)
evaluate ($end_zeit = 5)
evaluate ($iniseed = 100046)
evaluate ($iniseed2 = 554321) !changed HS
evaluate ($iniseed3 = 204875) !changed HS
evaluate ($iniseed4 = 395164) !changed HS
evaluate ($init_t = 1000 ) {* initial simulated annealing temperature *}
evaluate ($high_steps = 5000)
evaluate ($cool_steps = 150000)
evaluate ($fileroot = "rdc_lynSH3Tip_")
structure @../PSF/lynSH3_start.psf end
structure @../PSF/tip_start.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 @lynSH3Tip.noe
              @lynSH3.hbonds
              @lynSH3Tip.sb
    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
    @@lynSH3Tip.phi
end
evaluate ($ksani = 0.01)
evaluate ($ksani_CH = 1.0*$ksani)
sani
    nres=400
    class JNH
    force $ksani
    potential harmonic
    coeff 0.0 -13.93 0.37
    @lynSH3Tip.Dnh
    class JCH
    force $ksani_CH
    potential harmonic
    coeff 0.0 -13.93 0.37
    @lynSH3Tip.Dcaha
end
sani class JNH force 0 end
sani class JCH force 0 end
parameter                                {*Parameters for the repulsive energy term.*}
    nbonds
    repel=0.75                            {*Initial value for repel--modified later.*}
    rexp=2 irexp=2 rcon=1.
    nbxmod=3
    wmin=0.01
    cutnb=4.5 ctonnb=2.99 ctofnb=3.
    tolerance=0.5
end
end
restraints dihedral
    scale=5.
end
set echo off message off end
evaluate ($krama = 1.0)
evaluate ($ramacoff = 10.0)
flags exclude * include bonds angle impr vdw noe cdih coup sani end
set echo on message on end
@setup_swap_orig.hs
vector ident (store2) (store1)
parameter
    improper (store2) (store2) (all) (all) 0.0 TOKEN TOKEN
    improper (all) (all) (store2) (store2) 0.0 TOKEN TOKEN
end
evaluate ($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 ($template = "../rnk_sa_lynTip_"+ encode($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)*$iniseed)
    end while
    if ($count > 60) then
        evaluate ($seed =($count-60)*$iniseed2)
    end if
end while

```

```

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)
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
!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 end
  restraints dihedral scale=5. end
  noe asymptote * 1.0 end
  constraints interaction
    (all) (all) weights * 1 end end
! minimize powell nstep=500 drop=10. nprint=25 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 iprfrq=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 ($fin_con= 4.0)
!inserted HS
evaluate ($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*$radfact))
!inserted HS
evaluate ($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 ($critical > 10. ) then
    display ****&&&& rerun job with smaller timestep (i.e., 0.003)
    stop
  end if
end loop cool
{* ===== Final minimization.*}
constraints interaction (all) (all) weights * 1. vdw 1. end end
parameter
  nbonds
    repel=0.75          !changed HS, original value 0.80
    rexp=2 irexp=2 rcon=1.
    nbxmod=3
    wmin=0.01
    cutnb=6.0 ctonnb=2.99 ctofnb=3.
    tolerance=1.5
  end
end
minimize powell nstep=200 drop=10.0 nprint=25 end
flags exclude * include bond angl impr vdw noe cdih coup sani harm rama end
minimize powell nstep=1000 drop=10.0 nprint=25 end
flags exclude * include bond angl impr vdw noe cdih coup sani harm end
sani class JNH force 0 end
sani class JCH force 0 end
{* 6 ===== write out the final structure(s) *}
evaluate ($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 ($angname=$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_impropers=$result)
remarks initial random number seed: $seed
remarks =====
remarks          overall,bonds,angles,improper,vdw,noe,cdih
remarks energies: $ener, $bond, $angl, $impr, $vdw, $noe, $cdih, $sani
remarks =====
remarks          bonds,angles,impropers,noe,cdih
remarks rms-dev.: $rms_bonds,$rms_angles,$rms_impropers,$rms_noe,$rms_cdih
remarks =====

```

```

remarks          noe, cdih
remarks violations.: $violations_noe, $violations_cdih
remarks =====
evaluate ($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 = $sname end
  sani print thresh = 0.0 end
  close $sname end
end
set print = $dname end
print thresh = 0.001 cdih end
close $dname end
set print = $angname end
print thresh = 0.8 angles end
close $angname end
end if
end loop intra
end loop main
stop

```

lynSH3Tip.noe

55 HA	48 HA	2.70	34 HA	35 HN	2.70	50 HN	35 HG2	5.00	25 HN	24 HA	3.50
55 HA	56 HN	2.70	33 HA	34 HN	2.70	50 HN	35 HG1	5.00	25 HN	24 HB2	5.00
55 HA	49 HN	3.50	32 HA	33 HN	3.50	50 HN	51 HN	3.50	25 HN	24 HB1	5.00
57 HA	46 HA	2.70	33 HN	15 HN	5.00	52 HN	51 HB*	3.50	32 HN	31 HB2	5.00
57 HA	58 HN	2.70	34 HA	14 HA	2.70	52 HN	49 HB*	3.50	32 HN	31 HB1	2.70
57 HA	47 HN	3.50	34 HA	15 HN	3.50	52 HN	53 HN	3.50	32 HN	31 HE*	5.00
56 HN	47 HN	3.50	14 HA	15 HN	2.70	52 HN	50 HN	5.00	32 HN	31 HA	2.70
54 HN	53 HA	3.50	14 HA	35 HN	3.50	47 HN	46 HG1	5.00	32 HN	31 HG1	5.00
54 HN	54 HA	3.50	35 HN	13 HN	3.50	47 HN	46 HB2	5.00	32 HN	33 HN	3.50
52 HN	51 HA	3.50	12 HA	13 HN	2.70	56 HN	55 HG2	5.00	61 HN	60 HA	5.00
52 HA	53 HN	5.00	36 HA	13 HN	5.00	56 HN	55 HB*	5.00	61 HN	59 HA	5.00
54 HA	55 HN	3.50	13 HA	14 HN	2.70	56 HN	55 HG1	5.00	61 HN	62 HN	3.50
49 HN	48 HA	2.70	12 HA	37 HN	3.50	56 HN	46 HD*	5.00	61 HN	59 HB1	5.00
47 HN	46 HA	2.70	10 HA	11 HN	3.50	56 HN	46 HE1	5.00	61 HN	59 HB2	5.00
58 HN	45 HN	3.50	38 HA	11 HN	5.00	21 HN	20 HA	3.50	29 HN	28 HB2	5.00
58 HN	46 HA	3.50	15 HA	16 HN	2.70	21 HN	20 HB1	5.00	28 HN	27 HB1	5.00
59 HN	45 HN	5.00	13 HA	65 HA	2.70	21 HN	20 HB2	5.00	14 HN	13 HB	3.50
45 HN	44 HA	3.50	65 HA	66 HN	2.70	63 HN	62 HB2	5.00	14 HN	63 HA	5.00
59 HA	44 HA	3.50	65 HA	14 HN	3.50	63 HN	62 HB1	5.00	14 HN	13 HN	5.00
60 HN	44 HA	3.50	13 HA	66 HN	3.50	63 HN	61 HA	5.00	55 HN	54 HG*	5.00
59 HA	60 HN	2.70	66 HA	67 HN	3.50	63 HN	62 HN	3.50	48 HN	35 HB1	5.00
47 HA	37 HA	2.70	64 HA	65 HN	2.70	63 HN	64 HN	5.00	48 HN	36 HB1	5.00
47 HA	38 HN	3.50	64 HN	14 HN	3.50	10 HN	9 HA	3.50	13 HN	12 HN	5.00
47 HA	48 HN	2.70	13 HA	64 HN	5.00	42 HN	43 HN	5.00	13 HN	12 HB	5.00
48 HN	36 HN	3.50	63 HA	64 HN	2.70	58 HN	57 HB*	5.00	13 HN	35 HB2	5.00
36 HN	35 HA	2.70	63 HA	15 HA	3.50	53 HN	51 HB*	5.00	68 HN	67 HB1	5.00
36 HN	49 HA	5.00	63 HA	16 HN	3.50	53 HN	52 HB	5.00	68 HN	67 HB2	5.00
50 HN	49 HA	2.70	62 HA	63 HN	3.50	17 HN	16 HB2	5.00	68 HN	67 HN	5.00
49 HA	35 HA	3.50	61 HA	62 HN	3.50	17 HN	16 HN	3.50	19 HN	18 HB2	5.00
50 HN	35 HA	3.50	16 HA	17 HN	3.50	17 HN	16 HB1	5.00	19 HN	18 HB1	5.00
37 HA	38 HN	2.70	67 HA	68 HN	3.50	17 HN	15 HA	5.00	49 HN	48 HG1	5.00
39 HA	40 HN	2.70	57 HN	27 HN	3.50	17 HN	16 HG	5.00	49 HN	48 HG2	5.00
40 HA	41 HN	2.70	59 HG1	29 HZ	5.00	39 HN	38 HN	3.50	57 HN	26 HA	5.00
41 HA	42 HN	5.00	59 HG2	29 HZ	5.00	39 HN	38 HB2	5.00	57 HN	26 HA	2.70
43 HA	44 HN	3.50	62 HB1	59 HG1	5.00	39 HN	38 HB1	5.00	57 HN	56 HA1	2.70
42 HA	43 HN	3.50	62 HB2	29 HZ	3.50	25 HN	23 HB1	5.00	57 HN	56 HA2	2.70
38 HA	39 HN	5.00	62 HB1	29 HZ	3.50	25 HN	23 HB2	5.00	62 HN	61 HB1	5.00
36 HA	37 HN	2.70	50 HN	49 HB*	5.00	25 HN	26 HN	2.70	35 HN	34 HB1	5.00

35 HN	34 HG2	5.00	27 HN	57 HB1	5.00	45 HZ2	60 HB1	5.00	64 HN	13 HG2*	5.00
35 HN	34 HN	5.00	27 HN	26 HB*	3.50	45 HZ2	60 HB2	5.00	64 HN	16 HD1*	5.00
44 HN	45 HN	5.00	27 HN	26 HA	2.70	45 HZ3	60 HA	5.00	64 HN	16 HD2*	5.00
44 HN	43 HN	3.50	20 HN	19 HB2	5.00	44 HB1	59 HA	5.00	64 HN	63 HG2*	5.00
44 HN	43 HG1	5.00	20 HN	19 HB1	5.00	44 HB1	57 HD*	5.00	64 HN	13 HG1*	5.00
44 HN	43 HB2	5.00	38 HN	37 HB	5.00	44 HB2	57 HD*	5.00	64 HN	14 HG2*	3.50
44 HN	42 HA2	5.00	15 HN	33 HB2	5.00	44 HD1	59 HA	5.00	64 HN	35 HE*	5.00
44 HN	41 HB*	5.00	15 HN	33 HB1	5.00	60 HN	61 HN	3.50	36 HN	12 HD1*	5.00
44 HN	42 HA1	5.00	31 HN	18 HD2	5.00	53 HB1	54 HN	5.00	36 HN	50 HD2*	5.00
11 HN	12 HN	5.00	31 HN	18 HB1	5.00	53 HB2	54 HN	5.00	23 HN	22 HD1*	5.00
11 HN	10 HA1	3.50	17 HN	31 HA	5.00	27 HB2	28 HN	5.00	46 HN	37 HG2*	5.00
11 HN	10 HA2	3.50	30 HN	33 HB1	3.50	23 HN	26 HB*	3.50	33 HN	14 HG1*	5.00
67 HN	66 HN	5.00	30 HN	33 HB2	3.50	10 HN	9 HB1	3.50	34 HN	14 HG1*	5.00
22 HN	23 HN	2.70	19 HN	29 HN	3.50	10 HN	9 HB2	3.50	15 HN	14 HG1*	2.70
22 HN	21 HA*	2.70	19 HN	29 HD*	5.00	33 HG*	34 HN	3.50	15 HN	14 HG2*	5.00
54 HN	49 HB*	5.00	19 HN	29 HB2	5.00	33 HG*	30 HN	3.50	16 HN	63 HG1*	3.50
30 HN	29 HB1	5.00	19 HB1	29 HN	5.00	52 HG2*	51 HB*	3.50	16 HN	63 HG2*	5.00
30 HN	29 HA	2.70	19 HB2	29 HN	3.50	52 HG2*	49 HB*	5.00	38 HN	37 HG2*	3.50
12 HN	11 HB1	5.00	20 HN	19 HD*	3.50	52 HG2*	51 HG	3.50	38 HN	37 HG1*	5.00
12 HN	11 HB2	5.00	20 HN	21 HN	5.00	52 HG2*	51 HD1*	3.50	15 HN	63 HG1*	5.00
64 HN	65 HN	5.00	21 HN	26 HB*	5.00	52 HG2*	54 HE*	5.00	32 HN	14 HG1*	5.00
64 HN	63 HB	2.70	21 HN	28 HB1	5.00	49 HN	53 HA	5.00	23 HN	22 HG1*	5.00
65 HN	66 HN	5.00	21 HN	28 HB2	5.00	48 HD*	53 HB2	5.00	15 HA	63 HG1*	2.70
65 HN	13 HA	5.00	21 HN	28 HA	5.00	52 HA	53 HG*	5.00	58 HG2*	63 HG1*	5.00
26 HN	24 HA	5.00	21 HN	19 HE*	5.00	49 HN	54 HN	5.00	14 HG1*	32 HA2	5.00
26 HN	25 HB2	3.50	22 HN	26 HB*	3.50	19 HD*	22 HN	5.00	14 HG1*	32 HA1	5.00
51 HN	50 HG	5.00	25 HN	23 HA	5.00	19 HE*	22 HN	5.00	47 HB*	58 HD1*	2.70
51 HN	50 HA	5.00	26 HN	19 HE*	5.00	28 HN	27 HA	2.70	29 HE*	63 HG1*	3.50
51 HN	49 HB*	5.00	26 HN	25 HA	3.50	28 HN	21 HA1	5.00	11 HN	37 HG1*	3.50
60 HN	59 HB2	5.00	26 HN	23 HB1	3.50	28 HN	21 HA2	5.00	14 HG2*	64 HB*	3.50
60 HN	59 HB1	5.00	58 HA	59 HD1	2.70	63 HG1*	62 HB1	5.00	16 HD1*	64 HB*	2.70
36 HN	35 HG1	5.00	58 HA	59 HD2	2.70	63 HG1*	62 HB2	5.00	29 HD*	63 HG1*	5.00
36 HN	35 HG2	5.00	19 HB2	29 HD*	3.50	63 HG1*	13 HB	5.00	13 HB	63 HG2*	2.70
23 HN	22 HB	3.50	19 HE*	26 HB*	2.70	63 HG1*	15 HB*	3.50	14 HG2*	66 HN	5.00
23 HN	22 HA	3.50	29 HZ	59 HD1	3.50	63 HG1*	35 HE*	2.70	13 HG2*	63 HB	3.50
23 HN	21 HA2	5.00	29 HZ	59 HD2	3.50	63 HG1*	58 HD1*	2.70	13 HG1*	65 HA	5.00
23 HN	21 HA1	5.00	27 HB1	56 HA1	3.50	37 HG2*	45 HB1	3.50	22 HD1*	19 HE*	5.00
45 HN	59 HA	5.00	27 HB1	56 HA2	3.50	37 HG2*	45 HB2	3.50	33 HN	15 HB*	3.50
41 HN	40 HN	5.00	59 HG1	62 HD*	3.50	58 HD1*	35 HE*	2.70	16 HN	15 HB*	3.50
41 HN	45 HA	3.50	59 HG2	62 HD*	5.00	58 HD1*	45 HB1	5.00	15 HB*	63 HA	5.00
41 HN	40 HB1	5.00	19 HD*	26 HB*	3.50	58 HD1*	45 HB2	5.00	15 HB*	30 HN	3.50
41 HN	40 HB2	5.00	17 HB2	62 HD*	3.50	58 HD1*	45 HN	5.00	15 HB*	29 HD*	2.70
41 HN	40 HG2	5.00	17 HB1	62 HD*	3.50	22 HG2*	23 HN	5.00	15 HB*	33 HB2	3.50
41 HN	40 HG1	5.00	49 HB*	53 HN	3.50	63 HG2*	60 HA	3.50	15 HB*	33 HB1	3.50
46 HN	45 HB2	5.00	18 HD2	31 HA	5.00	63 HG2*	15 HA	5.00	15 HB*	29 HB2	3.50
46 HN	45 HA	2.70	18 HD1	31 HA	5.00	16 HD1*	15 HA	5.00	15 HB*	32 HA2	5.00
46 HN	45 HB1	3.50	41 HN	45 HD1	3.50	16 HD1*	63 HA	5.00	15 HB*	35 HE*	3.50
46 HN	39 HB2	5.00	18 HA	31 HN	3.50	16 HD1*	17 HE*	5.00	15 HN	35 HE*	3.50
46 HN	39 HB1	5.00	35 HE*	63 HB	3.50	16 HD1*	17 HD*	5.00	17 HN	15 HB*	3.50
46 HN	40 HA	5.00	29 HE*	62 HD*	3.50	38 HD2*	47 HB*	5.00	32 HN	15 HB*	3.50
33 HN	34 HN	5.00	29 HE*	35 HE*	3.50	38 HD2*	48 HN	5.00	48 HN	47 HB*	2.70
33 HN	32 HA1	3.50	29 HE*	62 HB1	3.50	56 HN	38 HD*	5.00	36 HN	47 HB*	5.00
33 HN	32 HA2	3.50	29 HE*	62 HB2	3.50	63 HN	35 HE*	5.00	56 HN	47 HB*	5.00
66 HN	65 HB2	5.00	18 HG*	31 HN	5.00	39 HN	37 HG2*	3.50	14 HN	64 HB*	5.00
66 HN	65 HB1	5.00	15 HA	35 HE*	3.50	39 HN	38 HD1*	5.00	65 HN	64 HB*	3.50
34 HN	33 HB2	5.00	13 HN	35 HB1	5.00	39 HN	38 HD2*	5.00	27 HD*	52 HG2*	5.00
34 HN	33 HB1	5.00	21 HN	19 HD*	5.00	61 HN	63 HG2*	5.00	12 HD1*	36 HA	3.50
43 HN	42 HA2	3.50	41 HN	42 HN	5.00	14 HN	13 HG2*	5.00	35 HE*	29 HB1	3.50
43 HN	42 HA1	3.50	41 HB*	44 HB2	5.00	14 HN	13 HG1*	3.50	35 HE*	29 HB2	3.50
37 HN	36 HG1	5.00	30 HA	31 HN	2.70	14 HN	63 HG1*	5.00	15 HB*	31 HA	3.50
37 HN	36 HG2	5.00	60 HA	63 HN	5.00	55 HN	27 HD*	5.00	45 HE3	37 HG1*	2.70
37 HN	36 HB2	5.00	40 HA	45 HD1	3.50	48 HN	38 HD1*	5.00	45 HE3	37 HG2*	2.70
37 HN	36 HB1	5.00	40 HA	45 HA	5.00	13 HN	12 HG2*	5.00	45 HB1	37 HG1*	5.00
37 HN	11 HB2	5.00	41 HB*	45 HD1	3.50	62 HN	63 HG2*	5.00	45 HB2	37 HG1*	5.00
37 HN	11 HB1	5.00	40 HA	45 HB1	5.00	35 HN	12 HG2*	5.00	45 HE3	58 HD1*	5.00
15 HN	16 HN	5.00	41 HB*	45 HA	5.00	35 HN	13 HG2*	3.50	45 HZ3	37 HG1*	3.50
27 HN	56 HA1	5.00	44 HN	45 HD1	5.00	54 HN	52 HG2*	5.00	45 HZ3	37 HG2*	5.00
27 HN	56 HA2	5.00	41 HN	45 HB1	5.00	64 HN	63 HG1*	5.00	13 HG2*	37 HG1*	3.50

13	HG2*	58	HD1*	2.70	51	HN	49	HA	5.00	39	HN	45	HB2	5.00	35	HN	15	HN	5.00
52	HG2*	53	HN	3.50	49	HA	35	HG1	3.50	39	HN	38	HD*	5.00	62	HN	60	HA	5.00
37	HG1*	58	HD1*	3.50	49	HA	35	HG2	3.50	25	HN	24	HD1	5.00	46	HN	57	HD*	5.00
14	HG2*	32	HB1	5.00	49	HA	35	HB1	5.00	61	HN	59	HG2	5.00	41	HD2	46	HN	5.00
27	HD*	49	HN	3.50	29	HZ	58	HA	5.00	25	HN	24	HD2	5.00	41	HD2	41	HN	5.00
30	HG2	31	HN	5.00	29	HD*	58	HA	5.00	32	HN	15	HN	5.00	41	HD2	41	HA	5.00
30	HG1	31	HN	5.00	60	HA	45	HH2	5.00	32	HN	16	HD2*	5.00	41	HD2	45	HA	5.00
54	HD*	55	HN	5.00	63	HA	16	HG	3.50	61	HN	60	HB1	5.00	44	HE3	57	HA	5.00
12	HN	12	HB	2.70	63	HA	13	HB	5.00	61	HN	60	HB2	5.00	44	HE3	58	HA	5.00
16	HN	16	HG	3.50	18	HA	32	HA	3.50	61	HN	62	HB2	5.00	44	HE3	44	HA	5.00
22	HN	22	HG1*	3.50	18	HA	29	HD*	3.50	29	HN	15	HB*	5.00	44	HE3	57	HB*	2.70
22	HN	22	HB	3.50	18	HA	29	HE*	5.00	28	HN	54	HB2	5.00	44	HE3	44	HB*	2.70
27	HN	19	HB*	5.00	35	HN	35	HB1	5.00	28	HN	56	HA1	5.00	44	HZ3	58	HA	5.00
35	HN	35	HB*	3.50	35	HN	35	HB2	2.70	55	HN	48	HA	5.00	44	HZ3	59	HD1	5.00
39	HN	37	HA	5.00	36	HN	35	HB1	2.70	55	HN	27	HG	5.00	44	HZ3	59	HD2	3.50
39	HN	46	HN	3.50	36	HN	35	HB2	5.00	48	HN	37	HN	5.00	44	HZ3	59	HG1	5.00
41	HN	45	HE1	5.00	12	HA	36	HA	3.50	48	HN	49	HA	5.00	44	HZ3	57	HB*	5.00
48	HN	37	HA	5.00	13	HG2*	35	HB1	3.50	48	HN	35	HG2	5.00	57	HB*	46	HA	5.00
60	HN	60	HB2	2.70	13	HG2*	35	HB2	3.50	19	HN	29	HA	5.00	57	HB*	44	HB*	3.50
60	HN	60	HB1	5.00	37	HN	13	HG2*	5.00	19	HN	29	HE*	5.00	59	HA	60	HB2	5.00
60	HN	45	HN	5.00	37	HN	12	HD1*	5.00	19	HN	28	HB1	5.00	59	HD1	62	HD*	5.00
60	HN	43	HA	5.00	37	HN	47	HB*	3.50	62	HN	63	HG1*	5.00	59	HD2	62	HD*	5.00
62	HN	62	HB2	2.70	15	HB*	29	HE*	3.50	62	HN	29	HZ	5.00	59	HD1	62	HE*	5.00
62	HN	62	HB1	5.00	12	HN	11	HA	2.70	57	HN	46	HA	5.00	59	HD2	62	HE*	5.00
62	HN	59	HB1	3.50	13	HN	34	HA	5.00	57	HN	27	HB1	5.00	59	HD1	58	HB	5.00
62	HN	59	HB2	5.00	14	HN	66	HN	5.00	57	HN	27	HB2	5.00	59	HD2	58	HG2*	5.00
64	HN	13	HB	3.50	28	HN	27	HD*	3.50	44	HN	41	HN	5.00	59	HD1	58	HG2*	5.00
51	HN	49	HG	5.00	28	HN	19	HD*	5.00	30	HN	33	HN	5.00	59	HD2	58	HB	5.00
53	HN	49	HG	5.00	29	HN	28	HA	2.70	54	HN	27	HD*	5.00	62	HD*	19	HB2	3.50
54	HN	49	HG	5.00	29	HN	19	HA	5.00	65	HN	16	HD*	5.00	62	HD*	19	HB1	5.00
62	HN	61	HB2	3.50	29	HN	28	HB1	3.50	65	HN	13	HG1*	5.00	61	HD21	177	HG2	5.00
62	HN	59	HG1	3.50	28	HN	28	HB1	5.00	26	HN	21	HA2	5.00	61	HD21	177	HG1	5.00
62	HN	59	HG2	5.00	28	HN	28	HB2	2.70	45	HN	44	HE3	5.00	61	HD22	177	HG2	5.00
45	HE1	60	HB1	5.00	30	HN	29	HD*	5.00	45	HN	60	HB2	5.00	61	HD22	177	HB*	5.00
59	HG2	19	HE*	3.50	30	HN	29	HB2	3.50	46	HN	41	HN	5.00	61	HD22	177	HB*	5.00
59	HG2	62	HB1	5.00	30	HN	33	HA	5.00	40	HN	39	HG1	5.00	61	HD21	179	HB1	5.00
59	HG2	62	HB2	5.00	56	HN	48	HA	3.50	41	HN	45	HB2	5.00	61	HD22	179	HB1	5.00
59	HG1	62	HB2	3.50	58	HN	44	HE3	5.00	33	HN	29	HB2	5.00	61	HD21	178	HG*	5.00
45	HE1	40	HG2	3.50	12	HD1*	36	HE*	5.00	15	HN	31	HA	5.00	61	HD22	177	HD1	5.00
45	HE1	40	HG1	5.00	12	HD1*	36	HB*	3.50	15	HN	29	HD*	5.00	61	HD21	180	HD1	5.00
45	HE1	40	HB2	5.00	12	HD1*	50	HD*	5.00	15	HN	34	HN	5.00	61	HD22	180	HD1	5.00
45	HE1	40	HA	5.00	47	HN	55	HA	5.00	16	HN	64	HN	5.00	61	HD21	179	HA	5.00
45	HE1	43	HA	5.00	27	HG	55	HA	5.00	38	HN	48	HN	5.00	61	HD22	179	HA	5.00
45	HD1	40	HG2	3.50	27	HD*	55	HA	5.00	45	HE1	60	HB2	3.50	44	HE1	182	HG2	5.00
45	HD1	41	HA	5.00	48	HG1	55	HA	5.00	21	HN	22	HN	5.00	44	HE1	182	HG1	5.00
45	HH2	60	HB1	5.00	48	HG2	55	HA	5.00	19	HN	18	HA	2.70	44	HE1	182	HB2	5.00
45	HH2	63	HG2*	3.50	48	HB1	55	HA	5.00	22	HN	21	HA2	2.70	44	HE1	180	HG2	5.00
45	HE3	37	HB	5.00	48	HB2	55	HA	5.00	56	HN	27	HB2	2.70	44	HE1	182	HB1	5.00
19	HE*	58	HA	5.00	52	HN	51	HD1*	5.00	56	HN	27	HB1	5.00	44	HE1	182	HD*	5.00
19	HE*	21	HA*	3.50	52	HN	51	HG	5.00	56	HN	46	HG2	3.50	44	HE1	181	HG*	5.00
29	HZ	19	HB1	5.00	52	HN	49	HG	5.00	27	HN	58	HG2*	3.50	44	HE1	181	HB1	5.00
29	HZ	19	HB2	3.50	47	HN	37	HA	5.00	47	HN	58	HG2*	3.50	44	HE1	180	HD2	5.00
29	HZ	63	HG1*	3.50	47	HN	27	HB1	5.00	48	HN	58	HG2*	5.00	44	HE1	181	HA	5.00
17	HN	63	HG1*	5.00	47	HN	46	HB1	5.00	29	HD*	58	HG2*	2.70	44	HE1	182	HA	3.50
17	HN	63	HA	5.00	56	HN	46	HB1	5.00	29	HE*	58	HG2*	2.70	44	HE1	182	HN	5.00
17	HN	62	HA	5.00	56	HN	27	HG	3.50	29	HZ	58	HG2*	5.00	44	HD1	182	HN	5.00
17	HN	62	HB1	5.00	21	HN	29	HN	5.00	29	HB2	58	HG2*	5.00	44	HD1	182	HG2	5.00
19	HN	15	HB*	5.00	63	HN	16	HN	5.00	29	HB1	58	HG2*	5.00	44	HD1	182	HG1	5.00
19	HN	30	HA	3.50	63	HN	61	HN	5.00	46	HA	58	HG2*	5.00	44	HD1	182	HB2	5.00
33	HN	31	HA	3.50	63	HN	29	HZ	5.00	35	HG1	58	HG2*	5.00	44	HD1	182	HB1	5.00
37	HN	37	HB	3.50	63	HN	59	HD1	5.00	46	HN	57	HE*	5.00	44	HD1	180	HG2	5.00
45	HN	58	HG11	5.00	58	HN	47	HN	5.00	49	HN	35	HG1	5.00	44	HD1	180	HG1	5.00
45	HN	58	HG12	5.00	58	HN	57	HD*	3.50	49	HN	35	HG2	5.00	44	HD1	182	HD*	5.00
47	HN	46	HG2	3.50	58	HN	46	HB2	5.00	64	HN	16	HG	5.00	44	HD1	183	HD2	3.50
48	HN	55	HA	5.00	53	HN	49	HN	5.00	52	HN	54	HN	5.00	44	HD1	183	HD1	3.50
48	HN	35	HA	5.00	53	HN	50	HN	5.00	23	HN	19	HE*	5.00	44	HD1	181	HD1	3.50
51	HN	53	HN	5.00	39	HN	47	HA	5.00	32	HN	16	HA	5.00	44	HD1	182	HA	3.50
49	HN	27	HG	3.50	39	HN	45	HA	5.00	31	HN	15	HB*	5.00	44	HH2	179	HD1*	3.50

44	HH2	179	HD2*	3.50	62	HD*	177	HD1	5.00	186	HN	187	HN	3.50	182	HB1	183	HD2	5.00
44	HH2	179	HB2	3.50	62	HD*	177	HD2	5.00	187	HN	186	HD2*	5.00	182	HB2	44	HZ2	5.00
44	HH2	179	HB1	5.00	62	HD*	179	HG	5.00	187	HN	186	HD1*	3.50	184	HA	185	HA	5.00
44	HH2	180	HD2	5.00	62	HE*	179	HG	5.00	187	HN	186	HG	5.00	184	HA	186	HN	5.00
44	HZ2	179	HD1*	3.50	62	HE*	179	HD1*	5.00	187	HN	186	HB*	3.50	184	HB*	183	HA	5.00
44	HZ2	179	HD2*	3.50	62	HE*	179	HD2*	5.00	187	HN	188	HB2	5.00	184	HB*	185	HA	5.00
44	HZ2	179	HB2	2.70	62	HE*	177	HD1	5.00	187	HN	188	HA	5.00	185	HA	186	HB*	5.00
44	HZ2	179	HB1	3.50	62	HE*	177	HD2	5.00	187	HN	185	HA	5.00	185	HB1	184	HB*	5.00
44	HZ2	180	HD1	5.00	170	HN	169	HG2*	5.00	187	HN	188	HN	3.50	185	HB2	188	HB*	5.00
44	HZ2	180	HD2	5.00	170	HN	171	HA	3.50	188	HN	186	HD2*	5.00	185	HB1	188	HB*	5.00
44	HZ2	179	HA	5.00	170	HN	169	HA	2.70	188	HN	186	HB*	5.00	186	HD1*	183	HB2	5.00
44	HZ2	180	HA	5.00	170	HN	171	HN	3.50	188	HN	185	HB2	5.00	186	HD2*	183	HB2	5.00
44	HZ2	182	HN	5.00	170	HE1	169	HG2*	5.00	188	HN	185	HB1	5.00	186	HD1*	183	HB1	5.00
44	HA	187	HN	5.00	171	HN	172	HB2	5.00	188	HN	187	HA1	3.50	186	HD1*	183	HG2	5.00
17	HE*	177	HG2	3.50	171	HN	172	HB1	5.00	188	HN	187	HA2	3.50	186	HD2*	183	HG2	5.00
17	HE*	177	HG1	3.50	171	HN	170	HB*	2.70	189	HN	188	HB1	3.50	186	HD1*	183	HG1	5.00
17	HE*	177	HD1	5.00	171	HN	172	HD2	3.50	189	HN	188	HG*	5.00	186	HD1*	183	HD2	5.00
17	HE*	177	HD2	5.00	171	HN	170	HA	2.70	189	HN	188	HN	3.50	186	HD2*	183	HD2	5.00
17	HE*	176	HA	5.00	173	HN	172	HB1	3.50	190	HN	189	HG*	5.00	186	HD1*	183	HD1	5.00
17	HE*	175	HB1	5.00	173	HN	172	HB2	3.50	190	HN	189	HB1	5.00	186	HD2*	183	HD1	5.00
17	HE*	175	HA	5.00	173	HN	174	HG*	5.00	176	HA	62	HE*	5.00	186	HD1*	44	HB*	3.50
17	HD*	177	HG2	5.00	173	HN	172	HD*	3.50	176	HA	177	HD1	2.70	186	HD2*	44	HB*	3.50
17	HD*	175	HB*	5.00	173	HN	174	HN	2.70	176	HA	177	HD2	2.70	186	HD1*	57	HB*	5.00
17	HD*	175	HD2	5.00	174	HN	175	HD2	5.00	176	HA	177	HG1	5.00	186	HD1*	57	HD*	3.50
17	HD*	175	HA	5.00	174	HN	175	HD1	3.50	176	HB	62	HE*	5.00	186	HD2*	57	HD*	3.50
19	HE*	179	HD2*	3.50	174	HN	173	HA2	3.50	176	HB	62	HD*	5.00	186	HD1*	41	HD2	5.00
19	HE*	179	HD1*	3.50	174	HN	173	HA1	5.00	176	HB	177	HD1	5.00	186	HB1	183	HB2	5.00
19	HE*	179	HB2	5.00	176	HN	177	HD2	5.00	176	HB	177	HD2	5.00	186	HB2	183	HB2	5.00
19	HD*	179	HD2*	5.00	176	HN	175	HB2	3.50	176	HG2*	17	HD*	5.00	186	HB1	183	HD1	5.00
19	HD*	179	HD1*	5.00	176	HN	177	HD1	3.50	176	HG2*	17	HE*	5.00	186	HB2	183	HD1	5.00
19	HD*	180	HD2	5.00	176	HN	175	HB1	3.50	176	HG2*	17	HN	5.00	186	HB1	187	HN	5.00
57	HD*	186	HG	5.00	176	HN	175	HD2	5.00	176	HG2*	62	HE*	5.00	186	HB2	187	HN	5.00
57	HD*	187	HN	5.00	176	HN	175	HA	2.70	176	HG2*	62	HD*	5.00	186	HA	184	HB*	5.00
57	HE*	186	HG	5.00	179	HN	180	HD2	5.00	176	HG2*	175	HA	5.00	186	HA	183	HG2	5.00
57	HZ	186	HG	5.00	179	HN	180	HD1	5.00	176	HG2*	177	HD1	5.00	186	HA	187	HN	3.50
57	HE*	187	HN	5.00	182	HN	181	HG*	5.00	176	HG2*	177	HD2	5.00	186	HA	188	HN	5.00
17	HE*	175	HD2	5.00	182	HN	181	HB2	3.50	177	HB*	178	HA	5.00	186	HA	57	HD*	5.00
41	HB*	186	HD1*	3.50	182	HN	183	HD2	5.00	178	HA	179	HN	2.70	187	HA1	186	HD1*	5.00
41	HB*	183	HG2	5.00	182	HN	181	HD2	5.00	178	HA	179	HD2*	5.00	187	HA1	186	HG	5.00
43	HB1	180	HB2	5.00	182	HN	183	HD1	5.00	179	HA	180	HD1	2.70	187	HA2	186	HD1*	5.00
43	HB2	180	HB2	5.00	184	HN	183	HB2	5.00	179	HA	180	HD2	2.70	187	HA2	186	HG	5.00
43	HG1	181	HD1	5.00	184	HN	183	HG2	5.00	179	HA	62	HD*	5.00	187	HA2	186	HB*	5.00
43	HG2	181	HD1	5.00	184	HN	183	HB1	5.00	179	HA	62	HE*	5.00	187	HA1	57	HD*	3.50
44	HD1	186	HD2*	5.00	184	HN	183	HA	2.70	179	HB1	180	HD1	5.00	187	HA2	57	HD*	3.50
59	HB1	179	HD2*	5.00	184	HN	185	HN	3.50	179	HB1	180	HD2	5.00	188	HG*	185	HA	5.00
59	HB2	179	HD2*	5.00	185	HN	186	HB*	5.00	179	HB2	180	HD1	5.00	188	HB1	185	HB1	5.00
59	HB1	180	HD1	5.00	185	HN	184	HB*	5.00	179	HB2	180	HD2	5.00	188	HB1	185	HB2	5.00
59	HB1	180	HD2	5.00	185	HN	184	HA	2.70	179	HD1*	44	HZ3	5.00	188	HB2	185	HB1	5.00
59	HB2	180	HD1	5.00	185	HN	183	HA	5.00	179	HD2*	180	HD1	5.00	188	HB2	185	HB2	5.00
59	HB2	180	HD2	5.00	185	HN	186	HN	3.50	179	HD2*	180	HD2	5.00	188	HB1	185	HA	5.00
60	HN	180	HD2	5.00	185	HD21	184	HB*	5.00	179	HD2*	44	HZ3	5.00	188	HB2	185	HA	5.00
60	HN	180	HG1	5.00	185	HD22	184	HB*	5.00	179	HD2*	62	HD*	5.00	188	HA	189	HN	3.50
60	HN	180	HG2	5.00	186	HN	185	HB2	5.00	182	HA	183	HD1	2.70	189	HA	190	HG*	5.00
60	HN	180	HB1	5.00	186	HN	185	HB1	5.00	182	HA	183	HD2	2.70					
60	HN	180	HB2	5.00	186	HN	185	HA	2.70	182	HB1	183	HD1	5.00					

lynSH3Tip.phi

14 c 15 n	49 c 50 n	57 c 58 n	37 c 38 n
15 ca 15 c -60 20	50 ca 50 c -60 20	58 ca 58 c -120 40	38 ca 38 c -120 40
32 c 33 n	36 c 37 n	44 c 45 n	40 c 41 n
33 ca 33 c -60 20	37 ca 37 c -60 20	45 ca 45 c -120 40	41 ca 41 c -120 40
64 c 65 n	6 c 7 n	12 c 13 n	21 c 22 n
65 ca 65 c -60 20	7 ca 7 c -60 20	13 ca 13 c -120 40	22 ca 22 c -120 40
48 c 49 n	47 c 48 n	45 c 46 n	
49 ca 49 c -60 20	48 ca 48 c -120 40	46 ca 46 c -120 40	
25 c 26 n	62 c 63 n	67 c 68 n	
26 ca 26 c -60 20	63 ca 63 c -120 40	68 ca 68 c -120 40	
53 c 54 n	54 c 55 n	13 c 14 n	
54 ca 54 c -60 20	55 ca 55 c -120 40	14 ca 14 c -120 40	

lynSH3Tip.Dnh

! 7 GLU H 7 GLU N -1.37	30 LYS H 30 LYS N 2.28	50 LEU H 50 LEU N -6.40
!10 GLY H 10 GLY N 2.86	32 GLY H 32 GLY N -27.06	51 LEU H 51 LEU N -20.46
13 VAL H 13 VAL N -2.03	33 GLU H 33 GLU N 7.26	52 THR H 52 THR N -24.80
14 VAL H 14 VAL N -18.46	34 LYS H 34 LYS N -27.52	53 LYS H 53 LYS N 4.95
15 ALA H 15 ALA N -23.06	35 MET H 35 MET N -6.54	54 LYS H 54 LYS N 8.01
16 LEU H 16 LEU N -10.80	36 LYS H 36 LYS N 2.56	55 GLU H 55 GLU N 7.81
19 TYR H 19 TYR N -16.25	37 VAL H 37 VAL N 14.96	56 GLY H 56 GLY N 14.98
20 ASP H 20 ASP N -10.76	39 GLU H 39 GLU N 12.35	58 ILE H 58 ILE N 10.19
21 GLY H 21 GLY N -13.80	41 HIS H 41 HIS N 0.17	60 SER H 60 SER N -5.43
22 ILE H 22 ILE N 3.58	42 GLY H 42 GLY N 11.97	61 ASN H 61 ASN N 11.32
23 HIS H 23 HIS N 10.49	43 GLU H 43 GLU N -2.15	62 TYR H 62 TYR N 9.77
25 ASP H 25 ASP N -19.38	44 TRP H 44 TRP N -0.25	!65 LYS H 65 LYS N -24.30
26 ASP H 26 ASP N 17.54	45 TRP H 45 TRP N 6.40	!66 LEU H 66 LEU N 6.16
27 LEU H 27 LEU N -15.89	47 ALA H 47 ALA N 18.20	!68 THR H 68 THR N -0.64
28 SER H 28 SER N -10.66	48 LYS H 48 LYS N 13.47	
29 PHE H 29 PHE N -4.47	49 SER H 49 SER N 13.10	

LynSH3Tip.Dcaha (Normierungsfaktor: -0,4784)

! 2 PRO HA 2 PRO CA -1.95	26 ASP HA 26 ASP CA 1.94	49 SER HA 49 SER CA -2.77
! 6 PRO HA 6 PRO CA 1.91	28 SER HA 28 SER CA -18.89	52 THR HA 52 THR CA 5.58
12 ILE HA 12 ILE CA 10.71	29 PHE HA 29 PHE CA -22.85	53 LYS HA 53 LYS CA 3.91
13 VAL HA 13 VAL CA 6.37	30 LYS HA 30 LYS CA 7.53	54 LYS HA 54 LYS CA 7.18
14 VAL HA 14 VAL CA -13.16	31 LYS HA 31 LYS CA -16.42	55 GLU HA 55 GLU CA 10.49
15 ALA HA 15 ALA CA -21.26	33 GLU HA 33 GLU CA -22.75	57 PHE HA 57 PHE CA 16.91
16 LEU HA 16 LEU CA -2.96	34 LYS HA 34 LYS CA -20.60	58 ILE HA 58 ILE CA 12.84
18 PRO HA 18 PRO CA 3.60	35 MET HA 35 MET CA -15.49	59 PRO HA 59 PRO CA -8.73
19 TYR HA 19 TYR CA -15.32	39 GLU HA 39 GLU CA 14.49	62 TYR HA 62 TYR CA 9.09
20 ASP HA 20 ASP CA -9.29	44 TRP HA 44 TRP CA 1.10	63 VAL HA 63 VAL CA -12.97
22 ILE HA 22 ILE CA -1.90	45 TRP HA 45 TRP CA -1.12	64 ALA HA 64 ALA CA -23.84
23 HIS HA 23 HIS CA 14.22	46 LYS HA 46 LYS CA 16.54	!65 LYS HA 65 LYS CA -3.05
24 PRO HA 24 PRO CA -9.96	47 ALA HA 47 ALA CA 18.14	!67 ASN HA 67 ASN CA -0.93
25 ASP HA 25 ASP CA -20.46	48 LYS HA 48 LYS CA 16.04	

LynSH3Tip.sb

182 HH22 26 OD1 2.3
182 NH2 26 OD1 3.3
182 HH12 26 OD2 2.3
182 NH1 26 OD2 3.3

10.6 Amber-Protokolle

10.6.1 Gleichgewichts-MD-Simulation

run.sander_min_ntr

```
&cntrl
  ntp  = 10,      ntwx  = 0,      cut   = 9.0,      nsnb  = 10,
  ntr  = 1,      imin  = 1,      maxcyc = 1000,    ncyc  = 5000,
  dx0  = 0.1,    ntt   = 0,      t     = 0.0,      dt    = 0.001,
  tempi = 300.0,  vlimit = 20.0,  ntc   = 1,      tol   = 0.0005,
&end
  keep all atoms frozen (force constant 500 kcal mol-1 A-2)
500
RES 1 63
```

run.sander_md_ntr

```
&cntrl
  nmropt = 1,      ntp  = 100,    ntwx  = 100,    ntf   = 2,
  ntb    = 2,      dielc = 0.0,    cut   = 9.0,    nsnb  = 10,
  ntr    = 1,      nstlim = 12500, t     = 0.0,    dt    = 0.0015,
  temp0  = 300.0,  tempi  = 100.0,  heat  = 0.0,    ntt   = 1,
  tautp  = 0.1,    vlimit = 15.0,  ntp   = 1,     pres0 = 1.0,
  comp   = 44.6,   taup  = 0.2,   npscal = 1,    ntc   = 2,
  tol    = 0.00001,
&end
&wt
  type='TEMP0',  istep1=0,      istep2=2500,
                  value1=100.0,  value2=300.0,
&end
Hold the solute fixed
500.0
RES 1 63
```

run.sander_md_ew_ntr

```
&cntrl
  ntp  = 100,    ntwx  = 500,    ntf   = 2,      ntb   = 2,
  cut  = 9.0,    nsnb  = 10,     ntr   = 1,     nstlim = 12500,
  t    = 0.0,    dt    = 0.0015,  tempi  = 100.0,  ntt   = 1,
  tautp = 0.2,  vlimit = 20.0,  ntp   = 1,     pres0 = 1.0,
  taup  = 0.2,  npscal = 1,    ntc   = 2,     tol   = 0.00001,
&end
Hold the SH3 fixed
500.0
RES 1 63
```

run.sander_eqiul_min1-3

```
&cntrl
  ntp  = 500,    ntwx  = 0,      ntb   = 1,      cut   = 9.0,    nsnb  = 10,
  ntr  = 1,      imin  = 1,      maxcyc = 1000,  ncyc  = 5000,  dx0   = 0.1,
  ntc  = 1,      tol   = 0.0005,
&end
```

```
Hold the sh3 fixed
250.0 (125.0, 67.5)
RES 1 63
```

run.sander_eqiul_md1

```
&cntrl
  ntpr = 500,      ntwx = 500,      ntf = 2,      ntb = 2,
  cut = 9.0,      nsnb = 10,      ntr = 1,      nstlim = 2000,
  t = 0.0,        dt = 0.0015,   ntt = 1,      tautp = 0.2,
  vlimit = 20.0,  ntp = 1,      pres0 = 1.0,  comp = 44.6,
  taup = 0.2,     npscal = 1,   ntc = 2,      tol = 0.0005,
&end
Hold the sh3 fixed
30.0
RES 1 63
```

run.sander_eqiul_min4a-e

```
&cntrl
  ntpr = 500,      ntwx = 0,      ntb = 1,      cut = 9.0,      nsnb = 10,
  ntr = 1,         imin = 1,      maxcyc = 600,  ncyc = 5000,   dx0 = 0.1,
  ntc = 1,         tol = 0.0005,
&end
Hold the sh3 fixed
20.0 (15, 10, 5, 0)
RES 1 63
```

run.sander_eqiul_md2

```
&cntrl
  nmropt = 1,      ntpr = 500,      ntwx = 1000,   ntf = 2,      ntb = 2,
  cut = 9.0,      nsnb = 10,      nstlim = 15000, dt = 0.0015,  tempi = 100.0,
  ntt = 1,        tautp = 0.2,   vlimit = 20.0,  ntp = 1,      pres0 = 1.0,
  taup = 0.2,     npscal = 1,   ntc = 2,      tol = 0.0005,
&end
&wt
  type='TEMP0',   istep1=0,      istep2=2500,
                  value1=100.0, value2=300.0,
&end
```

run.sander_production

```
&cntrl
  timlim = 999999., ntx = 7,      irect = 1,      ntpr = 500,      ntwx = 1000,
  ntf = 2,         ntb = 2,      cut = 9.0,      nsnb = 10,      scnb = 2.0,
  scee = 1.2,      maxcyc = 500,  ncyc = 5000,   dx0 = 0.1,      nstlim = 135000,
  ndfmin = 0,      ntcn = 1,      nscm = 500,    dt = 0.0015,   ntt = 1,
  dtemp = 0.0,     tautp = 0.5,   vlimit = 20.0,  ntp = 1,      pres0 = 1.0,
  taup = 0.5,     npscal = 1,   ntc = 2,      tol = 0.00005,  fcap = 1.5,
&end
```

10.6.2 MD-Simulation bei hoher Temperatur

run.sander_min_h2o_cp

```
&cntrl
  ntp  = 50,      ntwx  = 0,      cut   = 9.0,      nsnb  = 10,      imin  = 1,
  maxcyc = 1000,  ncy  = 5000,  dx0   = 0.1,      dxm   = 0.5,      drms  = 0.0001,
  tautp  = 0.2,   vlimit = 20.0,  ntc   = 1,       tol   = 0.0005,
&end
  keep all atoms frozen (force constant 500 kcal mol-1 A-2)
500
RES 1 63
```

run.sander_md_h2o_cp

```
&cntrl
  nmropt = 1,      ntwr  = 50,      ntf   = 2,      ntb   = 2,      cut   = 9.0,
  nsnb  = 10,      ntr   = 1,      nstlim = 1000,  nscm  = 0,      t     = 0.0,
  dt    = 0.0015,  temp1 = 100.0,  tautp  = 0.1,   vlimit = 15.0,  pres0 = 1.0,
  taup  = 0.2,    npscal = 1,    ntc   = 2,      tol   = 0.00001,
&end
&wt
  type='TEMP0',  istep1=0,      istep2=1000,
                  value1=100.0,  value2=300.0,
&end
Hold the solute fixed
500.0
RES 1 63
```

run.sander_min_h2o_1

```
&cntrl
  ntp  = 10,      ntwx  = 0,      cut   = 9.0,      nsnb  = 10,      ntr   = 1,
  imin = 1,      maxcyc = 1000,  ncy  = 5000,  ntmin = 1,      dx0   = 0.1,
  dxm  = 0.5,    drms  = 0.0001,  tautp  = 0.2,   vlimit = 20.0,  ntc   = 1,
  tol  = 0.0005,
&end
  keep all atoms frozen (force constant 500 kcal mol-1 A-2)
500
RES 1 63
```

run.sander_md_h2o

```
&cntrl
  nmropt = 1,      ntp  = 100,      ntwx  = 100,      ntf   = 2,      ntb   = 1,
  cut    = 9.0,    nsnb  = 10,      nstlim = 1000,  nscm  = 0,      dt    = 0.0015,
  tempi  = 100.0,  tautp  = 0.1,    vlimit = 15.0,   tol   = 0.00001,
&end
&wt
  type='TEMP0',  istep1=0,      istep2=1000,
                  value1=100.0,  value2=300.0,
&end
Hold the solute fixed
500.0
RES 1 63
```

run.sander_min_h2o_2

```

&cntrl
  ntp  = 10,          ntwx  = 0,          cut   = 9.0,          nsnb  = 10,          ntr   = 1,
  imin = 1,          maxcyc = 1000,    ntcyc = 5000,    ntmin = 1,          dx0   = 0.1,
  dxm  = 0.5,          drms  = 0.0001,  tautp  = 0.2,          vlimit = 20.0,    ntc   = 1,
  tol  = 0.0005,
&end
  keep all atoms frozen (force constant 500 kcal mol-1 A-2)
500
RES 1 63

```

run.sander_min_prot

```

&cntrl
  ntp  = 10,          cut   = 9.0,          nsnb  = 10,          ntr   = 1,          imin  = 1,
  maxcyc = 1000,    ntcyc = 5000,    ntmin = 1,          dx0   = 0.1,          dxm   = 0.5,
  drms  = 0.0001,  tautp  = 0.2,          vlimit = 20.0,    ntc   = 1,          tol   = 0.0005,
&end
  keep all atoms frozen (force constant 500 kcal mol-1 A-2)
500
RES 64 7218

```

run.sander_min_ges

```

&cntrl
  ntp  = 10,          ntwx  = 0,          cut   = 9.0,          nsnb  = 10,          imin  = 1,
  maxcyc = 1000,    ntcyc = 5000,    ntmin = 1,          dx0   = 0.1,          dxm   = 0.5,
  drms  = 0.0001,  ntc   = 1,          tol   = 0.0005,
&end

```

run.sander_md_heat

```

&cntrl
  nmropt = 1,          ntx   = 1,          irect = 0,          ntrx  = 1,          ntco  = 1,
  ntp  = 100,         ntwx  = 100,         ntf   = 2,          ntb   = 1,          cut   = 9.0,
  nsnb  = 10,         nstlim = 15000,     dt    = 0.0015,     temp0  = 498.0,     tempi  = 100.0,
  tautp = 0.2,         vlimit = 20.0,     ntp   = 0,          ntc   = 2,          tol   = 0.0005,
&end
&wt
  type='TEMP0', istep1=0,          istep2=5000,
                      value1=100.0, value2=498.0,
&end

```

run.sander_production

```

&cntrl
  timlim = 999999., iwrap  = 1,          ntx   = 7,          irect = 1,          ntp  = 500,
  ntwx  = 1000,     ioutfm = 0,          ntwprt = 0,         ntwr  = 500,         ntf  = 2,
  ntb   = 1,        cut   = 9.0,         nsnb  = 5,          ntmin = 1,          dx0  = 0.1,
  dxm  = 0.5,       drms  = 0.0001,    nstlim = 250000,   nscm  = 500,         t    = 0.0,
  dt   = 0.0015,   temp0  = 498.0,     tautp  = 0.5,       vlimit = 20.0,     ntc  = 2,
  tol  = 0.00005,  fcap  = 1.5,
&end

```


Eigene Publikationen

Schweimer, K., Hoffmann, S., Bauer, F., Friedrich, U., Kardinal, C., Feller, S. M., Biesinger, B. & Sticht, H. (2002). Structural investigation of the binding of a herpesviral protein to the SH3 domain of tyrosine kinase Lck. *Biochemistry* 41, 5120-30.

Schweimer, K., Kiessling, A., Bauer, F., Hör, S., Hoffmann, S., Rösch, P. & Sticht, H. (2003). Sequence-specific ¹H, ¹³C and ¹⁵N resonance assignments of the SH3-SH2 domain pair from the human tyrosine kinase Lck. *J Biomol NMR* 27, 405-6.

Breitinger, U., Breitinger, H. G., Bauer, F., Fahmy, K., Glockenhammer, D. & Becker, C. M. (2004). Conserved high affinity ligand binding and membrane association in the native and refolded extracellular domain of the human glycine receptor [alpha]1-subunit. *J Biol Chem* 279, 1627-36.

Hör, S., Prizer, H., Dumoutier, L., Bauer, F., Wittmann, S., Sticht, H., Renauld, J. C., de Wall-Malefyt, R. & Fickenscher, H. (2004). The T-cell lymphokine interleukin-26 targets epithelial cells through the interleukin-20 receptor 1 and interleukin-10 receptor 2 chains. *J Biol Chem* 279, 33343-51.

Bauer, F., Hofinger, E., Hoffmann, S., Rösch, P., Schweimer, K. & Sticht, H. (2004). Characterization of Lck-binding elements in the herpesviral regulatory Tip-protein. *Biochemistry*, 43, 14932-9.

Hofmann, G., Schweimer, K., Kiessling, A., Hofinger, E., Bauer, F., Hoffmann, S., Rösch, P., Campbell, I. D., Werner, J. M. & Sticht, H. (2005). Binding, domain orientation and dynamics of the Lck SH3-SH2 domain pair and comparison with other Src-family kinases. *eingereicht*

Bauer, F., Schweimer, K., Hoffmann, S., Rösch, P. & Sticht, H. (2005). Structural of the LynSH3 complex with a Herpesviral protein reveals an extended recognition motif. *in Vorbereitung*.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von Januar 2002 bis Februar 2005 am Lehrstuhl für Struktur und Chemie der Biopolymere der Universität Bayreuth angefertigt. Prof. Dr. Heinrich Sticht möchte ich für das interessante Thema und sein Interesse am Fortgang und Gelingen der Arbeit danken. Besonders danke ich ihm für zahllose wissenschaftliche und nichtwissenschaftliche Diskussionen.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Prof. Dr. Paul Rösch für die gastfreundliche Aufnahme an seinem Lehrstuhl und die damit verbundenen hervorragenden Arbeitsmöglichkeiten im Rahmen eines SFB-Kooperationsprojekts. Prof. Dr. Franz Xaver Schmid danke ich für die großzügigen Möglichkeiten, Fluoreszenztitrationen und *stopped-flow*-Experimente in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu können.

Dr. Kristian Schweimer danke ich für die Aufnahme der NMR-Spektren sowie die Einführung in die Gewinnung und Interpretation der darin enthaltenen Daten.

Rainer Hofmann danke ich für den einwandfreien Zustand des Computernetzwerks sowie viele computerbezogene und allgemein gültige Denkanstöße. Ebenso danken möchte ich Dr. Gerhard Wellein vom HPC des RRZE für die flexible Vergabe von Rechenzeitkontingenten bei unterschiedlichem Ressourcenbedarf.

Bei Ulrike Persau bedanke ich mich für die unzähligen Tipps und Tricks im Laboralltag, die in keinem Lehrbuch zu finden sind. Weiterhin danke ich ihr sowie Nadine Herz, Andrea Hager und Katrin Weiß für den unermüdlichen Einsatz eine angenehme Arbeitsatmosphäre zu schaffen.

Gudrun Wagner und Angela Rössler danke ich für Hilfestellungen in Verwaltungsangelegenheiten. Allen aktiven und ehemaligen Mitarbeitern der Abteilung für Bioinformatik des Instituts für Biochemie der Universität Erlangen sowie des Lehrstuhls für Struktur und Chemie der Biopolymere der Universität Bayreuth, besonders Anke Eisenmann und Klaus Vitzithum, möchte ich für die Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre in den Arbeitsgruppen danken.

Weiterhin danke ich der Deutschen Forschungsgesellschaft, die diese Arbeit im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 466 "Lymphoproliferation und Virale Immundefizienz" finanziell gefördert hat.

Schließlich möchte ich mich bei Bianca und Zoe Deepa für ihre Unterstützung durch Zuspruch beziehungsweise Durchschlafen bedanken.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Finn Bauer
Geburtsdatum: 27. Mai 1975
Geburtsort: Hamburg
Familienstand: verheiratet mit Bianca Bauer geb. Dorth
Tochter Zoe Deepa

Bildungsgang

1995 Erwerb der allgemeinen Hochschulreife (Abitur) am Goerdeler-Gymnasium, Paderborn
1995-1996 Zivildienst als Rettungssanitäter im Rettungsdienst und Krankentransport der Feuerwehr Paderborn
1996 Beginn des Studiums der Biochemie an der Universität Bayreuth
1998 Vordiplom der Biochemie der Universität Bayreuth
1999-2000 ERASMUS-Stipendium am Imperial College of Science, Technology and Medicine, London (GB)
2001 Diplom der Biochemie der Universität Bayreuth
2001 Praktikum in der Abteilung für Modelling und Bioinformatik der Bayer-AG, Leverkusen
2002 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl Struktur und Chemie der Biopolymere der Universität Bayreuth
seit 2003 Wissenschaftlicher Mitarbeiter der Abteilung Bioinformatik, Institut für Biochemie, Emil-Fischer-Zentrum, Universität Erlangen-Nürnberg

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Ferner erkläre ich, dass ich nicht diese oder eine gleichartige Doktorprüfung an einer anderen Hochschule endgültig nicht bestanden habe.

Bayreuth, den 09.02.2005

Finn Bauer