

Institut für Organische Chemie und Biochemie
der Technischen Universität München

**NMR-spektroskopische Untersuchung der
Struktur und Dynamik von Proteinen**

Tammo Diercks

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. J. Firl

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. H. Kessler
2. Univ.-Prof. Dr. W. Hiller
3. apl. Prof. Dr. W. Baumeister

Die Dissertation wurde am 28.09.1999 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 07.12.1999 angenommen.

*I consider myself in nothing else so happy
as in a soul remembering good friends*

(William Shakespeare)

Für meine Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Mai 1995 bis Mai 1999 am Institut für organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität München unter der Leitung von Prof. Dr. Horst Kessler angefertigt. Bei ihm bedanke ich mich für die hervorragenden Arbeitsbedingungen, das große Vertrauen und die rückhaltlose Unterstützung meiner Arbeit.

Dem gesamten Arbeitskreis danke ich für die hilfsbereite und immer außerordentlich freundschaftliche Atmosphäre. Mein besonderer Dank gilt:

- dem "Känguruh" Dr. Murray Coles für die wunderbare Zusammenarbeit sowie die geteilte und vermittelte wissenschaftliche Begeisterung im Rahmen dieser Dissertation
- dem "wandelnden NMR-Archiv" Dr. Gerd Gemmecker für die stets kompetente Beratung bei allen Fragen der NMR-Spektroskopie, Oenologie und sonstigen Freizeitgestaltung
- dem "Ruf-Taxi" Eckart Planker für hochmotivierende Zusammenarbeit, anspruchsvolle Wissenschaft und selbstlose Fahrbereitschaft an die zentral gelegene TU-Garching
- dem Systemzerwarter Dr. Rainer Haessner für stets geduldige Hilfe für einen hoffnungslosen Computer-Legasteniker sowie den "Computer-Nerds" Jens Liermann und Dr. Michael Leutner für die professionelle Gelassenheit im Umgang mit einem wahren DAU
- den Advokaten Dr. Martin Bachelin und Dr. Martin Huenges für Tiefsinniges und Scharfsinniges rund um die Wissenschaft und das Leben
- dem "Black Hole" Mitbewohner Dr. Markus Born für den moralischen Beistand beim Zusammenschreiben
- Dr. Jürgen Peters (MPI für Biochemie, Martinsried) für den aufopferungsvollen, reibungslosen Protein-Expressdienst bei einem begeisternden Projekt (VAT-N)

I moreover sincerely thank Prof. Alexander Arseniev (Shemyakin and Ovchinnikov Institute, Moskau) and his group, in particular Dr. Vladislav Orekhov and Dr. Dmitry Korzhnev, for the most challenging and instructive cooperation on protein and peptide dynamics - and for the wonderful, memorable introduction to Russian friendship.

Ich danke vor allem meinen Eltern, daß sie mir dieses lange, herausfordernde Studium ermöglicht und mich immer mit Verständnis, Ermutigung und Vertrauen unterstützt haben.

Teile dieser Arbeit sind bereits erschienen:

Diercks, T., Schwaiger, M. & Kessler, H. "HSQC-based methyl group selection via gradients in multidimensional NMR spectroscopy of proteins". *Journal of Magnetic Resonance* **130**, 335-340 (1998).

Coles, M., Diercks, T., Muehlenweg, B., Bartsch, S., Zölzer, V., Tschesche, H. & Kessler, H. "The Solution Structure and Dynamics of Human Neutrophil Gelatinase-associated Lipocalin". *J. Mol. Biol.* **289**, 139-157 (1999).

Orekhov, V. Y., Korzhnev, D. M., Diercks, T., Kessler, H. & Arseniev, A. S. " ^1H - ^{15}N NMR dynamic study of an isolated α -helical peptide (1-36) bacteriorhodopsin reveals the equilibrium helix-coil transitions". *Journal of Biomolecular NMR* **14**, 345-356 (1999).

Coles, M., Diercks, T., Liermann, J., Gröger, A., Lupas, A., Peters, J., Koretke, C., Rockel, B., Baumeister, W. & Kessler, H. "The solution structure of VAT-N reveals a 'missing link' in the evolution of complex enzymes from a simple babb element". *Current Biology* **9**, 1158 - 1168 (1999).

Diercks, T., Coles, M. & Kessler, H. "An efficient strategy for assignment of cross-peaks in 3D heteronuclear NOESY experiments". *Journal of Biomolecular NMR* **15**, 177-180 (1999).

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VI
Einleitung und Zielsetzung	1
1. Aufklärung der Proteindynamik durch NMR-Spektroskopie	4
1.1 Grundlagen zur Spinrelaxation	4
1.1.1 Definition der Relaxation	4
1.1.2 Relaxationsarten und ihre Bedeutung in der NMR-Spektroskopie	5
1.1.3 Quellen lokaler magnetischer Felder und Wechselwirkungen	6
1.1.4 Mikroskopische Bewegungsprozesse zur Modulation von Wechselwirkungen	7
1.2 Klassische Behandlung der Spinrelaxation	8
1.2.1 Phänomenologische Beschreibung (Bloch)	8
1.2.2 Beschreibung durch Übergangswahrscheinlichkeiten (Solomon, BPP-Theorie)	9
1.2.3 Qualitative mikroskopische Betrachtung der Spinrelaxation	10
1.3 Quantenmechanische Behandlung der Spinrelaxation	12
1.3.1 Herleitung der Master-Gleichung der Relaxation	12
1.3.2 Herleitung der Redfield-Relaxationsmatrix	14
1.3.3 Auflösung der tensoriellen spektralen Dichte	16
1.3.4 Anschauliche Interpretation der Auto- und Kreuzkorrelation	19
1.3.5 Interpretation und Erklärung der Redfield-Relaxationsgleichung	19
1.3.6 Dynamische Verschiebungsänderung	21
1.4 Spin-Gitter-Wechselwirkungen und Kopplungskonstanten	22
1.4.1 Dipolare Wechselwirkung	22
1.4.2 CSA-Wechselwirkung	23
1.4.3 Wichtige Unterschiede zwischen dipolarer und CSA-Wechselwirkung	24
1.4.4 Weitere Wechselwirkungen	25
1.4.5 Kopplungskonstanten	27
1.5 Relaxationsraten	28
1.5.1 Berechnung von Relaxationsraten	28
1.5.2 Besonderheiten der Kreuzkorrelationen	29
1.5.3 Relaxationsraten des isolierten IS- $\frac{1}{2}$ -Spinsystemes mit axialsymmetrischem CSA-Tensor	29
1.5.4 Relaxationsraten in Multispin-Systemen	33
1.5.5 Rückrechnung und Aufzeichnung der spektralen Dichtewerte	34

1.6	Formalismus zur Beschreibung statistischer Bewegung	35
1.6.1	Grundlagen	35
1.6.2	Isotrope Molekülrotation	37
1.6.3	Explizite Bewegungsmodelle und zugehörige Dynamikparameter	38
1.6.4	Modellfreie Näherung für unbekanntes $C(\tau)$	38
1.6.5	Separationsansatz für überlagerte Korrelationsfunktionen	40
1.6.6	Erweiterung der Näherungsfunktion $C^{\text{app}}(\tau)$	42
1.6.7	Anisotropie der Molekülrotation	42
1.6.8	Modellfreie Näherungsfunktionen $J^{\text{app}}(\omega)$ für die Gesamtbewegung	44
1.6.9	Eigenschaften von $J(\omega)$	46
1.7	Simulation von Relaxationsraten im isolierten 2-Spin-System	48
1.7.1	Der heteronukleare I{S}-NOE im Gleichgewicht	48
1.7.2	Abhängigkeit von τ_R und der $J(\omega)$ -Modellfunktion	49
1.7.3	Abhängigkeit von der B_0 -Feldstärke	52
1.7.3	Abhängigkeit von Ordnungsparameter und lokaler Korrelationszeit	53
1.8	Linienerweiterung und Koaleszenzphänomene	57
1.8.1	Linienerweiterung durch kontinuierliche ω -Verteilung	57
1.8.2	Linienerweiterung bei diskreter ω -Verteilung (Koaleszenzeffekte)	58
1.8.3	Explizite Messung von $\Delta_{\text{Austausch}}$ -Beiträgen	59
1.8.4	Äquivalenz zwischen $\Delta_{\text{Austausch}}$ - und $J(0)$ -Beiträgen zu R_2	60
1.9	Experimentelle Hinweise zur NMR-Relaxationsmessung	61
1.9.1	Das Temperaturproblem	61
1.9.2	Wasserunterdrückung und Wassersättigung	63
1.9.3	Unterdrückung von Kreuzkorrelationseffekten und Kreuzrelaxation	64
1.9.4	Kompensation von Inhomogenitäten der Meßbedingungen	64
1.9.5	Wahl der Mischzeiten	65
1.9.6	Probleme bei $T_2/T_{1\rho}$ -Messungen	66
1.9.7	Die verwendeten Pulsprogramme	68
1.10	Auswertungshinweise	69
1.10.1	Datenprozessierung	69
1.10.2	Extraktion der Relaxationszeiten	70
1.10.3	Fehlerabschätzung	71
1.11	Modellfreie Auswertung	72
1.11.1	Das T_1/T_2 -Verhältnis als Meßgröße der Rotationskorrelationszeit τ_R	73
1.11.2	Selektion der Reste zur τ_R -Mittelung	78

1.11.3	Komplikationen: Domänenbewegung, Anisotropie der Rotation, Dimerisierung	82
1.11.4	Bestimmung der Dynamikparameter	84
1.11.5	Wahl der wahrscheinlichsten Modellfunktion	86
1.11.6	Komplikationen: Variabilität der Kopplungskonstanten	88
1.11.7	Hinweise auf Auswerteprogramme	90
1.12	Hydrodynamische Rechnungen	91
1.12.1	Zielsetzung	91
1.12.2	Diffusions- und Reibungstensoren	92
1.12.3	Durchführung hydrodynamischer Rechnungen nach dem bead-Modell	93
1.12.4	Skalierung der Diffusionstensoren, Rückrechnung der Hydratisierung	97
1.12.5	Der umgekehrte Weg: Strukturverfeinerung mit Relaxationsdaten	98
2.	Struktur und Dynamik von HNL	99
2.1	Biochemischer Hintergrund	99
2.1.1	Die Familie der Lipocaline	99
2.1.2.	Biochemische Funktion und medizinische Relevanz von HNL	101
2.2	Materialien, Methoden und Datenhinterlegung	104
2.2.1	Datenhinterlegung	105
2.3	Zuordnung der NMR-Resonanzen für HNL	106
2.3.1	Sequentielle Zuordnung (Signalzuordnung für das Proteinrückgrat)	106
2.3.2	Zuordnung der Seitenketten-Signale	110
2.3.3	Diastereotope Zuordnungen	110
2.4	Struktur von HNL	112
2.4.1	Sekundärstruktur und Faltungsmuster	112
2.4.2	Strukturrechnung	115
2.4.3	Die NMR-Struktur von HNL	119
2.5	Dynamik von HNL	123
2.5.1	Relaxationsmessungen und Extraktion der Relaxationsdaten	123
2.5.2	Untersuchung von Aggregation und Anisotropie	125
2.5.3	Modellfreie Auswertung der Relaxationsdaten (nach Lipari-Szabo)	127
2.5.4	Verteilung der Parameter lokaler Dynamik in HNL	131
2.5.5	Vergleichende Bewertung der Relaxationsdaten von Seitenketten-Amidgruppen	134
2.5.6	Die Dynamik des Proteinrückgrates von HNL	135
2.5.7	Die Seitenkettendynamik von HNL	139

3. Dynamik von hnps-PLA2	142
3.1 Biochemischer Hintergrund [164]	142
3.1.1 Die Familie der Phospholipasen	142
3.1.2 Funktion und Eigenschaften der Phospholipasen A ₂ (PLA2)	143
3.2 Struktur und funktionale Struktur motive von hnps-PLA2	145
3.2.1 Struktur von hnps-PLA2	145
3.2.2 Korrelation von Struktur und Funktion der sPLA2 (Gruppen I und II)	147
3.3 Dynamik von hnps-PLA2	151
3.3.1 Relaxationsmessungen und Extraktion der Relaxationsdaten	151
3.3.2 Qualitative Bewertung der Relaxationsdaten	153
3.3.3 Bestimmung der molekularen Korrelationszeit	154
3.3.4 Isotrope und anisotrope modellfreie Auswertung der Relaxationsdaten	157
3.3.5 Verteilung der Parameter lokaler Dynamik in hnps-PLA2	161
3.3.6 Bewertung der $\Delta_{\text{Austausch}}$ -Linienverbreiterungen	164
3.3.7 Beschreibung der Dynamik des Proteinrückgrats	167
3.3.8 Interpretation der Dynamik von hnps-PLA2	169
3.3.9 Dynamischer Erklärungsversuch der interfazialen Aktivierung	172
4. Struktur der N-terminalen Domäne von VAT (VAT-N)	174
4.1 Biochemischer Hintergrund	174
4.1.1 Die Familie der AAA-Proteine	174
4.1.2 VAT und die N-terminale Domäne VAT-N	175
4.2 Materialien, Methoden und Daten hinterlegung	176
4.2.1 Materialien	176
4.2.2 NMR-spektroskopische Untersuchungen	176
4.2.3 Daten hinterlegung	177
4.3 Zuordnung der NMR-Resonanzen für VAT-N	178
4.3.1 Sequentielle Zuordnung (Signalzuordnung für das Proteinrückgrat)	178
4.3.2 (Diastereotope) Zuordnung der Seitenketten-Signale	179
4.4 Ermittlung der Struktur von VAT-N	181
4.4.1 Sekundärstruktur und Faltungsmuster	181
4.4.2 NOE-Zuordnung, Strukturrechnung und Strukturgüte	181
4.5 Die Struktur von VAT-N	187
4.5.1 Struktur der N-terminalen Subdomäne VAT-Nn	187
4.5.2 Struktur der C-terminalen Subdomäne VAT-Nc	189
4.5.3 Relative Orientierung der Subdomänen und Gesamtstruktur von VAT-N	191

4.5.4	Oberfläche und Lage von VAT-N im hexameren VAT-Komplex	193
4.6	Diskussion von Struktur und Funktion von VAT-N	196
5.	Methodische Entwicklungen	198
5.1	Methylgruppenselektion im HSQC durch Quadrupel-Quanten-Filter (QQF-HSQC)	198
5.2	Auflösungsoptimierte Aufnahme-strategie für NOESY-Spektren und diagonalfreie 3D NOESY-Spektren durch orthogonale Isotopenfilter	203
	Zusammenfassung	208
	Anhang	211
A.	Spektrometerspezifikationen	211
B.	Datenanhang HNL	212
B.1	NMR-Spektralbereiche und Meßfenste für HNL	212
B.2	Verzeichnis der an HNL durchgeführten NMR-Experimente	213
B.2	Verzeichnis der an HNL durchgeführten NMR-Experimente	214
B.3	Gemessene ^{15}N -Relaxationsdaten für HNL	215
B.4	Parameter der ^{15}N - ^1H -Vektordynamik von HNL (nach Lipari-Szabo)	220
C.	Datenanhang PLA ₂	224
C.1	Gemessene ^{15}N -Relaxationsdaten für PLA ₂	224
C.2	Parameter der ^{15}N - ^1H -Vektordynamik von PLA ₂ (nach Lipari-Szabo)	227
D.	Datenanhang VAT-N	230
D.1	NMR-Spektralbereiche und Meßfenste für VAT-N	230
D.2	Verzeichnis der an VAT-N durchgeführten NMR-Experimente	230
E.	Pulsprogramme	232
	Pulsprogramm zur Bestimmung der ^{15}N -T ₁ Relaxationszeiten	232
	Pulsprogramm zur Bestimmung der ^{15}N -T ₂ Relaxationszeiten	236
	Pulsprogramm zur Bestimmung des $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ -NOE	239
	Pulsprogramm zur Bestimmung von Diffusionskonstanten	242
	Diagonalfreies 3D N,(CH)-NOESY	244
	Diagonalfreies 3D C,(NH)-NOESY (wahlweise constant time in F2)	247
	QQF-HSQC (wahlweise als constant time Version)	250
	Literaturverzeichnis	252

Abkürzungsverzeichnis

BBP	<u>B</u> ilin- <u>b</u> indendes <u>P</u> rotein
BMRB	<u>b</u> io <u>m</u> agnetic <u>r</u> esearch <u>b</u> ank
CSI	<u>c</u> hemical <u>s</u> hift <u>i</u> ndex
ct	<i>constant time</i> (Zeitdauer = 2·CT)
C(τ)	Korrelationsfunktion, entspricht dem zeitlichen Verlust an Zusammenhang zwischen zwei statistisch verteilten Größen
$\Delta_{\text{Austausch}}$	Linienverbreiterung (in Hz) durch langsame Austauschprozesse
DPFGE	doppeltes Feldgradienten-Echo (<i>double pulsed field gradient echo</i>)
EmrE	<u>E</u> inmal <u>m</u> ehr <u>r</u> Eisen (Projekt zur Beförderung des wissenschaftlichen Auswuchses)
f-MLF	N-Formyl-Met-Leu-Phe (N-fomyliertes Tripeptid)
HNGAL	<u>H</u> umanes <u>n</u> eutrophiles <u>G</u> elatinase- <u>a</u> ssoziiertes <u>L</u> ipocalin (entspricht HNL)
HNL	<u>H</u> umanes <u>n</u> eutrophiles <u>L</u> ipocalin (entspricht HNGAL)
hnps-PLA2	<u>h</u> umane <u>n</u> icht- <u>p</u> ankreatische <u>s</u> ekretierte <u>P</u> hospholipase <u>A</u> ₂
HMQC	heteronukleare Multi-Quanten-Kohärenz (<i>heteronuclear multi-quantum coherence</i>)
HQQC	heteronukleare Quadrupel-Quanten-Kohärenz (<i>heteronuclear quadruple quantum coherence</i>)
HSQC	heteronukleare Ein-Quanten-Kohärenz (<i>heteronuclear single quantum coherence</i>)
IP3	Inositol-Triphosphat
J(ω)	spektrale Dichtefunktion, entspricht dem Frequenzspektrum statistischer Bewegungen
kDa	Kilo-Dalton (= 10 ³ g/mol)
LED	Abklingdauer für Wirbelströme nach Gradienten (<i>longitudinal eddy current recovery delay</i>)
mM	milli-molar (Konzentrationsangabe)
MMP	<u>M</u> atrix- <u>M</u> etalloproteinase
NOE	<u>n</u> uclear <u>O</u> verhauser <u>e</u> ffect (Kern-Overhauser-Effekt)
NMR	<u>n</u> uclear <u>m</u> agnetic <u>r</u> esonance (Kernresonanz-Spektroskopie)
PAF	<u>P</u> lättchen- <u>a</u> ktivierender <u>F</u> aktor (<i>platelet activating factor</i>)
PAGE	<u>P</u> olyacrylamid- <u>G</u> eleelektrophorese

PASTA	<i>protein assignment by threshold accepting</i>
PDB	<i>protein data bank</i>
PLA2	<i>Phospholipase A₂</i>
PMNL	<i>Polymorphnukelare Leukozyten</i>
ppm	<i>parts per million</i> (= 10 ⁻⁶)
QQF	Quadrupel-Quanten-Filter
R ₁	longitudinale/ Spin-Gitter-Relaxationsrate
R ₂	transversale/ Spin-Spin-Relaxationsrate
ROE	<i>rotating frame nuclear Overhauser effect</i> (Kern-Overhauser-Effekt unter kontinuierlicher Querfeld-Einstrahlung = <i>Spin Lock</i>)
RMSD	Wurzel des mittleren Fehlerquadrats (<i>root mean square deviation</i>)
S ²	(generalisierter) Ordnungsparameter statistischer Bewegungen
S _f ²	Ordnungsparameter einer schnellen statistischen Bewegung
S _s ²	Ordnungsparameter einer langsamen statistischen Bewegung
SDS	<i>Sodiumdodecylsulfat</i>
T ₁	longitudinale/ Spin-Gitter-Relaxationszeit
T ₂	transversale/ Spin-Spin-Relaxationszeit
T _{1ρ}	Relaxationszeit unter <i>Spin Lock</i> (vgl. ROE)
τ _R	molekulare Rotationskorrelationszeit
τ _{R,i}	scheinbare <i>per residue</i> Korrelationszeit
τ _{R,iso}	isotrop gemittelte molekulare Rotationskorrelationszeit
TIMP	<i>tissue inhibitor of metalloproteinases</i>
TOCSY	<i>total correlation spectroscopy</i>
[U- ¹³ C/ ¹⁵ N]	vollständig (<i>universal</i>) ¹³ C/ ¹⁵ N-isotopenmarkiert
VAT	<i>VCP-artige ATPase von Thermoplasma</i>

Einleitung und Zielsetzung

Kernresonanzspektroskopie (NMR) und Röntgenkristallographie sind die beiden etablierten Methoden zur Aufklärung von Proteinstrukturen mit atomarer Auflösung. Die ältere Methode der Röntgenkristallographie ist heute verbreitet im industriellen Einsatz und bereits weitgehend automatisiert. Sie wird nur von der Kristallisierbarkeit des Proteins eingeschränkt. Die jüngere NMR-spektroskopische Strukturanalyse ^[1] steht erst am Beginn eines automatisierten Einsatzes in sog. *Strukturfabriken* (z.B. RIKEN, Japan). Methodische Weiterentwicklungen der NMR-Spektroskopie von den einfachsten eindimensionalen Spektren ^[2, 3] über zwei- ^[4], drei- ^[5, 6] und höherdimensionale ^[7] Spektren haben auch in jüngster Zeit wesentliche Fortschritte gebracht. Die wichtigste Neuerung ist der konstruktive Einsatz von kreuzkorrelierten Relaxationsprozessen (TROSY ^[8], CRINEPT ^[9]), die die traditionell niedrige Größenbeschränkung der NMR-untersuchbaren Proteine im Verbund mit der Volldeuterierung mindestens bis in den Gewichtsbereich von 10^2 - 10^3 kDa erhöht.

Die NMR-Spektroskopie ist gegenüber der Röntgenkristallographie erheblich vielseitiger. Während bei letzterer nur kristallisierte Festkörper analysiert werden können, arbeitet die NMR-Spektroskopie mit wäßrigen Proteinlösungen, die den physiologischen Bedingungen näher kommen. Der gelöste Zustand erlaubt außerdem die direkte Durchführung chemischer Reaktionen und Beobachtung intermolekularer Wechselwirkungen. Deshalb wird heute in der pharmazeutischen Industrie bereits mit der NMR-Titration von *protein targets* durch potentielle Liganden im Sinne eines *high throughput screening* experimentiert (*SAR-by-NMR* ^[10]). In Lösung kann sich ferner nicht nur die native Struktur der Proteine frei von Packungseffekten ausbilden, sondern auch ihre natürliche Dynamik entfalten. Diese Dynamik kann NMR-spektroskopisch durch Relaxationsmessungen erfaßt werden. Deren modellfreie Auswertung liefert ein Maß sowohl für die mittleren Amplituden (Ordnungsparameter S^2) als auch für die Perioden (Korrelationszeiten τ) lokaler Bewegungen. Der einzige "dynamische" Parameter aus der Röntgenkristallographie, der thermische B-Faktor, gibt dagegen im wesentlichen nur die lokale Unordnung im Kristall wieder.

Zum Verständnis der Aktivität von Proteinen interessiert nicht nur ihre Struktur, sondern auch ihre Dynamik. Es kann nicht angenommen werden, daß Proteine (oder Moleküle überhaupt) in Lösung starr sind, und es wurde schon in vielen Fällen beobachtet, daß die Substratbindung zu teilweise erheblichen konformativen Veränderungen im Protein führten (*induced fit*). Gerade die Mißachtung oder Fehleinschätzung dieser dynamischen

Anpassungsfähigkeit von Proteinen kann das häufige Versagen der computergestützten strukturbasierten Wirkstoffsuche erklären.

In der vorliegenden Arbeit wird die Struktur und Dynamik von insgesamt drei Proteinen NMR-spektroskopisch aufgeklärt und der beobachtete Zusammenhang zwischen Struktur und Dynamik im Hinblick auf die funktionale Bedeutung diskutiert.

Im ersten Teil der Arbeit (*Kapitel 1*) wird die Methodik zur Analyse der Proteindynamik durch NMR-Relaxationsmessungen ausführlich hergeleitet und untersucht, da die Literatur in diesem Bereich oft widersprüchlich und unvollständig ist. Dabei werden zunächst die quantenmechanischen Ausdrücke für die Relaxationsraten störungstheoretisch hergeleitet ^[11] und der sog. modellfreie Formalismus ^[12] zur Beschreibung statistischer Bewegungsprozesse dargestellt. Auf dieser Grundlage erfolgt die ausführliche Simulation der Abhängigkeit experimenteller Relaxationsraten von Parametern lokaler Dynamik. Diese Simulationen veranschaulichen die Indikatoren und NMR-spektroskopischen Erfassungsgrenzen lokaler Dynamik. Als praxisrelevante Zusammenfassung wird ein Flußdiagramm für die modellfreie Auswertung erstellt, in dem auch die Erkennung und Behandlung von wesentlichen Komplikationen - insbesondere durch Domänenbewegungen, Anisotropie der Molekülrotation und Dimerisierung - beschrieben wird. Das Kapitel endet mit einer Anleitung zur Durchführung hydrodynamischer Rechnungen ^[13], mit denen die Rotationsanisotropie berücksichtigt wird.

In *Kapitel 2* werden Struktur und Dynamik der *apo*-Form des humanen neutrophilen Lipocalins, eines extrazellulären Transportproteins mit enzymatischen Funktionen (u.a. Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen) beschrieben. Dies ist die erste NMR-spektroskopische Strukturuntersuchung an einem Lipocalin und die erste Studie über deren Dynamik. Zielsetzung ist es, nach Kenntnis der Struktur und Dynamik von HNL einen Modus für Ligandenbindung und Rezeptorerkennung vorzuschlagen.

In *Kapitel 3* wird die Dynamik der humanen nicht-pankreatischen sekretierten Phospholipase A₂ (hnp-PLA₂) untersucht. Dieses Phospholipid-spaltende Enzym hat aufgrund seiner Beteiligung an schweren chronischen Entzündungsprozessen hohe pharmakologische Bedeutung als *protein target*. Mit der hier vorgestellten ersten dynamischen Untersuchung einer PLA₂ soll ein neuer Zugang zum Verständnis des Phänomens der *interfazialen Aktivierung* dieser Enzyme erarbeitet werden, wonach die PLA₂ erst gegenüber aggregiertem Substrat (d.h. intakten Zellmembranen) ihre volle Aktivität entfalten.

In Kapitel 4 wird die erste Hochauflösungsstruktur der N-terminalen Domäne eines AAA-Proteines (VAT-N) präsentiert. VAT-N bindet und faltet entsprechendes Protein-Substrat, wirkt also als Chaperon. Es hat sich gezeigt, daß die Proteinbindung und -prozessierung durch die weit verbreiteten und homologen AAA-Proteine an deren N-terminaler Domäne abläuft, so daß die Aufklärung der VAT-N-Struktur von genereller Bedeutung für das Verständnis der vielfältigen Funktionen dieser Enzymklasse ist.

Im Verlauf dieser Arbeit wurde eine große Anzahl von NMR-Pulssequenzen auf den im Arbeitskreis befindlichen Spektrometern installiert, optimiert und kommentiert. Dabei ergaben sich die in *Kapitel 5* beschriebenen NMR-methodischen Neuentwicklungen.

1. Aufklärung der Proteindynamik durch NMR-Spektroskopie

1.1 Grundlagen zur Spinrelaxation

1.1.1 Definition der Relaxation

Relaxation ist Ausdruck des Bestrebens eines Systems, zurück in den Gleichgewichtszustand zu gelangen, der durch *minimale Enthalpie* und *maximale Entropie* gekennzeichnet ist.

Die **enthalpische Relaxation** ist bei allen spektroskopischen Methoden als Triebkraft für Systemübergänge elementare Voraussetzung, da ohne sie keine Emission und sofortige Sättigung eintritt. Sie kann beschrieben werden als

$$\frac{\delta}{\delta t} E_{\text{System}} = \hbar \omega_{kl} \frac{\delta}{\delta t} \Delta N_{kl} < 0 \quad [1.1]$$

und beruht auf der *zeitlichen Veränderung der Besetzungszahlen (Populationen)* ΔN_{kl} der Energieniveaus mit einer *konstanten* Energiedifferenz $\hbar \omega_{kl}$. Durch enthalpische Relaxation wird Energie vom betrachteten System an die Umgebung abgegeben, entweder als detektierbare Photonenemission oder durch direkten Energietransfer auf andere Freiheitsgrade. Die Gesamtheit anderer Freiheitsgrade wird als *Gitter (lattice)* bezeichnet.

Die **entropische Relaxation** beschreibt den zeitlichen *Verlust an Kohärenz* (Zunahme der *Phasendispersion* $\Delta \phi_{\text{System}}$) der stattfindenden Übergänge über das System-Ensemble. Sie ist deshalb *nicht für einzelne Oszillatoren definierbar*, sondern *ausschließlich eine Systemeigenschaft!* Die zunehmende *destruktive Interferenz* der emittierten elektromagnetischen Strahlung führt zur Abnahme der makroskopischen Beobachtungsgröße (elektromagnetische Induktion in der Empfängerspule) *ohne* die Systemenergie zu verändern. Entropische Relaxation bedeutet

$$\frac{\delta \Delta \phi_{\text{System}}}{\delta t} = \tau \frac{\delta \omega}{\delta t} + \omega \frac{\delta \tau}{\delta t} > 0 \quad [1.2]$$

und hat demnach zwei mögliche Ursachen:

1. die *Streuung der Übergangsfrequenzen (Linienverbreiterung* $\delta \omega / \delta t$) und
2. den *Verlust an Gleichzeitigkeit von Emissionsprozessen (Streuung der Zustandslebensdauer* $\delta \tau / \delta t$) bei einheitlicher Übergangsfrequenz. Daher setzt *Systemkohärenz* prinzipiell voraus, daß sich Übergänge durch eine *gemeinsame, gleichzeitige Ursache* auslösen lassen.

Der Vergleich zwischen [1.1] und [1.2] zeigt, daß die Streuung der Übergangsfrequenzen

ein nur der entropischen Relaxation eigener Mechanismus ist. Die Streuung der Zustandslebensdauer ist hingegen direkt mit der Veränderung von Populationen verbunden und wird durch dieselben Übergänge hervorgerufen, die auch zur enthalpischen Relaxation führen. Da jedoch bei der entropischen Relaxation die Systemenergie konstant bleibt, dürfen diese *Übergänge nur paarweise und entgegengesetzt* auftreten, so daß die von einem Oszillator abgegebene Energie sofort von einem anderen Oszillator aufgenommen wird.

1.1.2 Relaxationsarten und ihre Bedeutung in der NMR-Spektroskopie

Stimulierte Relaxation ist ein **Resonanzphänomen** zwischen den Übergangsfrequenzen eines atomaren Oszillators und elektromagnetischen Wechselfeldern des Hintergrundes, die diese Übergänge auslösen können. Dabei muß zwischen *kohärenter Stimulation* durch ein gemeinsames Ereignis und *inkohärenter Stimulation* durch zufällige, nur lokal wirksame Ursachen unterschieden werden. Nur kohärente Übergänge unter Photonenemission führen zu einer makroskopisch beobachtbaren elektromagnetischen Induktion.

Die **kohärent stimulierte Relaxation** wird durch *Photonen* ausgelöst. Das bei einem statistischen atomaren Übergang emittierte Photon kann in anderen Atomen denselben Übergang kohärent auslösen. Die Photonen können aus dem System selbst (vgl. LASER) oder von äußerer elektromagnetischer Einstrahlung (Pulse) herrühren.

In der NMR-Spektroskopie lassen sich durch elektromagnetische Pulse kohärente Spinübergänge anregen. Die makroskopische Meßgröße - *kohärente* elektromagnetische Strahlung - wird kurz als *Kohärenz* bezeichnet. Sowohl *Polarisation* (Populationsdifferenzen zwischen Kern-Zeeman-Niveaus) als auch *Kohärenz* (Phasenordnung der Kern-Zeeman-Übergänge) können zwischen mehreren Spinklassen übertragen bzw. erzeugt werden, was die Grundlage der modernen NMR-Korrelationsspektroskopie bildet.

Bei der **inkohärent stimulierten Relaxation** werden Übergänge nicht einheitlich durch Photonen, sondern durch *statistische lokale elektromagnetische Wechselfelder (Hintergrundschwingungen)* ausgelöst. Diese beruhen auf der zufälligen *Relativbewegung* zwischen atomarem Oszillator (Kernspin) und dem anisotropen magnetischen Hintergrund, z.B. durch die (*molekulare*) *Eigenbewegung* des Oszillators. Die Frequenzverteilung der statistischen Hintergrundschwingungen und damit der Relativbewegungen wird durch die **spektrale Dichte(funktion) $J(\omega)$** beschrieben. Je intensiver die Hintergrundschwingungen bei einer Übergangsfrequenz ω_{kl} sind, desto stärker kann der entsprechende Übergang $k \rightarrow l$ inkohärent angeregt werden, d.h. *die stimulierte Relaxationsrate $R_{k \rightarrow l}$ ist proportional zur Intensität $J(\omega_{kl})$* . Stimulierte Relaxation durch lokale magnetische

Wechselfelder dominiert in Lösung die Spinrelaxation. Dies ist die Voraussetzung für die Beobachtbarkeit von Moleküldynamik durch NMR-Relaxationsmessungen. Die spektrale Dichte $J(\omega)$ ist dabei das entscheidende Bindeglied zwischen den makroskopisch meßbaren Relaxationsraten und den statistischen mikroskopischen Bewegungsprozessen.

Die **spontane Relaxation** ist *kein Resonanzphänomen* und unabhängig von äußeren Einflüssen; als statistisches Ereignis ist sie prinzipiell inkohärent. Sie wird als Konkurrenz zur stimulierten Relaxation nur dann wichtig, wenn der Hintergrund zu wenige *resonante* Photonen oder Wechselfelder für den Übergang bereitstellt, d.h. $J(\omega_{kl}) \approx 0$ ist. Für die NMR-Spektroskopie mit ihren Übergangsfrequenzen im MHz-Bereich ist spontane Relaxation vernachlässigbar [14].

1.1.3 Quellen lokaler magnetischer Felder und Wechselwirkungen

Die wichtigsten Quellen lokaler magnetischer Felder $B_{\text{lokal}}(t)$ und Wechselwirkungen mit Spin I sowie ihre qualitative Abhängigkeit von Bewegungsprozessen sind in Tabelle 1.1 aufgelistet. Weitere Quellen lokaler magnetischer Anisotropie, z.B. Ringstromeffekte, sind denkbar.

Tab.1.1 Übersicht der Wechselwirkungen zwischen einem Kernspin I und lokalen magnetischen / elektrischen Feldern seiner Umgebung (mit Angabe ihrer Quellen sowie der Bewegungsprozesse, die zur Modulation der Wechselwirkung führen).

Wechselwirkung (WW)	mikroskopische Ursache und Quelle S der Kopplung mit dem Kernspin I	Modulation der Wechselwirkung
Dipol -WW	Kopplung zu benachbartem Kernspin durch den Raum	Rotation, Distanzänderung I-S
Skalare WW	J-Kopplung zu benachbartem Kernspin über die Bindungselektronen	S-Spinzustand, Torsionsbewegung
Paramagnetische WW	Kopplung zum Gesamtspin ungepaarter Elektronen (Elektron als Dipol)	Rotation, Distanzänderung I-S
CSA -WW	Kopplung mit orientierungsabhängigem B_0 -Feldanteil, der wegen anisotroper Abschirmung aufgrund der inhomogenen Elektronenhülle eines Kernspins auftritt (<i>Chemical Shielding Anisotropy</i>)	Rotation
Spin-Rotation-WW	Kopplung mit dem molekularen magnetischen Moment, das bei inhomogener molekularer Elektronenverteilung durch die Molekülrotation erzeugt wird.	veränderliche Rotationsfrequenz (durch molekulare Stöße)
Quadrupol-WW	Kopplung eines Kern-Quadrupols mit elektrischem Feldgradienten, der durch die lokale Ladungsverteilung erzeugt wird	Rotation

Für Kernspins mit Quadrupolmoment ($I > 1/2$) besteht ebenfalls eine Wechselwirkung (Kopplung) mit lokalen elektrischen Feldern $E_{\text{lokal}}(t)$, die zur Spinrelaxation führen kann und analog den magnetischen Wechselwirkungen behandelt wird. Es ist daher nachfolgend unter $B_{\text{lokal}}(t)$ immer auch $E_{\text{lokal}}(t)$ inbegriffen.

1.1.4 Mikroskopische Bewegungsprozesse zur Modulation von Wechselwirkungen

Die Wechselwirkungen zwischen Kernspin I und lokalen Hintergrundfeldern werden durch Distanz- und Winkeländerungen aufgrund der *statistischen molekularen Eigenbewegung* zeitmoduliert. Die *globale molekulare Bewegung* hat die Komponenten

- *Translationsdiffusion* D_{trans} zur Längenänderung von Wechselwirkungsvektoren
- und *Rotationsdiffusion* D_{rot} zur Reorientierung von Wechselwirkungsvektoren

Der globalen Molekülbewegung sind *lokale intramolekulare Bewegungen* überlagert, die sowohl Längen- als auch Winkeländerungen erzeugen können, beispielsweise:

- thermische Elektronenbewegungen ($10^{12} - 10^{14}$ Hz)
- Streck- und Beugeschwingungen einzelner Atombindungen ($10^{12} - 10^{14}$ Hz)
- komplexe Bewegungen von Atomgruppen - einzelne Peptidgruppen und Seitenketten, mehrere zusammenhängende Reste in flexiblen Termini, Schleifen etc. ($10^{10} - 10^6$ Hz)
- langsame konformative Austauschprozesse - cis/trans-Isomerisierung von Peptidbindungen, Umlagerung ganzer Molekülbereiche, Umklappen aromatischer Reste, Torsionsschwingungen der Disulfidbrücke in Cystinen etc. ($< 10^6$ Hz)
- chemische Austauschprozesse - z.B. Wasseraustausch der Amidprotonen ($< 10^6$ Hz)

Die Kombination dieser statistischen Bewegungen führt zur Modulation der vektoriellen Wechselwirkungen und erzeugt ein breites $B_{\text{lokal,I}}$ -Frequenzspektrum.

Es muß beachtet werden, daß einzelne Wechselwirkungen durch *unterschiedliche Bewegungsprozesse* moduliert werden (vgl. Tab.1.1) und daher prinzipiell mit einer jeweils eigenen spektralen Dichte $J(\omega)$ beschrieben werden müssen, die alle wirksamen Bewegungen berücksichtigt. Die globale **Molekülrotation**, die zur Reorientierung des Kopplungsvektors führt, ist jedoch an der Modulation fast aller Wechselwirkungen, insbesondere der starken *intramolekularen* Wechselwirkungen, beteiligt. *Lokale* Bewegungen können dann als Störungsbeiträge angesehen werden. Longitudinale Moleküldiffusion moduliert nur *intermolekulare* Prozesse, die aufgrund der meist viel größeren Spin-Feldquelle-Abstände aber vernachlässigbar sind.

1.2 Klassische Behandlung der Spinrelaxation

1.2.1 Phänomenologische Beschreibung (Bloch)

Die Bloch-Differentialgleichung ^[2] beschreibt die (makroskopische) Magnetisierungsentwicklung des Spinsystemes phänomenologisch und lautet im mit ω_0 mitrotierenden System (*rotating frame*):

$$\frac{d}{dt}\vec{M}(t) = (\gamma - \gamma_0)\vec{M}(t) \times \vec{B}(t) - R(\vec{M}(t) - \vec{M}(0)) \quad [1.3]$$

($\gamma_0 = \omega_0/B_0$ ist das gyromagnetische Verhältnis eines hypothetischen Spins mit der Anregungsfrequenz ω_0) mit der Relaxationsmatrix

$$R = \begin{pmatrix} 1/T_2 & 0 & 0 \\ 0 & 1/T_2 & 0 \\ 0 & 0 & 1/T_1 \end{pmatrix} \quad [1.4]$$

Hierbei wird von *monoexponentieller Relaxation* ausgegangen, die sich mit *einer einzigen Zeitkonstante = Relaxationszeit* T_i beschreiben läßt. Die **T₁-Relaxation** beeinflusst die makroskopische M_z -Magnetisierung und heißt daher *longitudinale Relaxation*; sie entspricht der photonenfreien *enthalpischen Spin-Gitter-Relaxation*. Die **T₂-Relaxation**, durch die die makroskopische M_x - bzw. M_y -Kohärenz abgebaut wird und die daher *transversale Relaxation* heißt, entspricht der *entropischen Spin-Spin-Relaxation*.

Die Lösung der Bloch-Gleichung nach Wirkung eines 90°_x -Anregungspulses lautet:

$$\begin{aligned} M_x(t) &= M_y(0) \sin[(\omega - \omega_0)t] \exp\left[-\frac{t}{T_2}\right] \\ M_y(t) &= M_y(0) \cos[(\omega - \omega_0)t] \exp\left[-\frac{t}{T_2}\right] \\ M_z(t) &= M_0 + (M_z(0) - M_0) \exp\left[-\frac{t}{T_1}\right] \end{aligned} \quad [1.5]$$

mit $M_y(0) = -M_0$ und $M_z(0) = 0$. Nach Fourier-Transformation erhält man daraus die Signalform in der Frequenzdomäne, die der kohärenten Magnetisierung entspricht:

$$\begin{aligned} M_x(\omega) &= M_y(0) \frac{(\omega - \omega_0)T_2^2}{1 + (\omega - \omega_0)^2 T_2^2} \\ M_y(\omega) &= M_y(0) \frac{T_2}{1 + (\omega - \omega_0)^2 T_2^2} \end{aligned} \quad [1.6]$$

Die Linienform entspricht also für $M_x'(\omega)$ einer dispersiven, für $M_y'(\omega)$ einer absorptiven Lorentzkurve. Die **Halbwerts-Linienbreite** $\Delta\nu_{1/2}$ des absorptiven Signales (bzw. die

Distanz zwischen den beiden Extrema des dispersiven Signales) wird durch die *effektive* transversale Relaxationszeit T_2^* bestimmt:

$$\Delta\nu_{1/2} = \frac{1}{\pi T_2^*} \quad [1.7]$$

Gl.1.7 folgt auch direkt aus der Unschärferelation zwischen Frequenz (Linienbreite $\Delta\nu_{1/2}$) und Lebensdauer (Relaxationszeit T_2) der Beobachtungsgröße (= *Kohärenz*).

Die Bloch-Gleichungen setzen *monoexponentielle Relaxation* voraus (s.o.), die nur von der Auslenkung des betrachteten Spins I aus seiner Gleichgewichtslage abhängt (*Autorelaxation*). Sie gilt daher streng nur für *isolierte* Spins. Die Behandlung der Relaxation von gekoppelten Magnetisierungen und Kohärenzen (z.B. $2I_zS_z$ und $2I_xS_z$) ist nicht vorgesehen. Eine weitere Analyse der Relaxation im Hinblick auf zugrundeliegende mikroskopische dynamische Prozesse ist nicht möglich.

Die Bloch-Gleichungen finden immer dann Anwendung, wenn nur die *phänomenologische* Berücksichtigung von Relaxation erforderlich ist, z.B. bei der Optimierung von Pulssequenzen, zur Spektrensimulation und zur Linienformanalyse (vgl. Kapitel 1.8).

1.2.2 Beschreibung durch Übergangswahrscheinlichkeiten (Solomon, BPP-Theorie)

Die enthalpische T_1 -Relaxation (aber nicht die entropische T_2 -Relaxation!) läßt sich mikroskopisch durch die zeitliche Veränderung von Populationen in *nicht-entarteten* dipolar gekoppelten Spinsystemen beschreiben. Aus dem zugehörigen Niveauschema gehen alle möglichen Spinübergänge mit zugehörigen Übergangsraten W_{nQC} hervor, wobei zu den Einquanten-Übergängen (*Single Quantum Coherence*) der isolierten Spins gekoppelte Null-(ZQC) und Mehrquanten-Übergänge im Multispinsystem hinzukommen. Im Realfall nicht-isolierter Spins ist also prinzipiell *nicht* mit monoexponentieller T_1 -Relaxation zu rechnen (gilt nicht für T_2 -Relaxation!), da die dipolar gekoppelten Übergänge den *Austausch von Populationen* zwischen den Spins ermöglichen. Diese *Kreuzrelaxationsprozesse* führen zu *multiexponentiellem* Verhalten und der Abhängigkeit der I-Spinrelaxation auch von der Auslenkung aller gekoppelten Spins S aus ihrer Gleichgewichtslage. Kreuzrelaxation ist die Ursache des NOE.

Dieses Verhalten läßt sich am idealen 2-Spin-1/2 System IS illustrieren. Die mikroskopische Betrachtung von Populationen führt zu gekoppelten Differentialgleichungen (Solomon-Gleichungen) und der Beschreibung der *biexponentiellen* T_1 -Relaxation [15]:

$$\frac{d}{dt} \begin{pmatrix} \gamma_I I_z \\ \gamma_S S_z \end{pmatrix} = - \begin{pmatrix} \rho_I & \sigma_{IS} \\ \sigma_{SI} & \rho_S \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} \gamma_I (I_z - I_0) \\ \gamma_S (S_z - S_0) \end{pmatrix} \quad [1.8]$$

Die *Diagonalelemente* der Relaxationsmatrix sind die *Autorelaxationsraten*

$$\rho_{I(S)} = [W_{0,IS} + 2W_{1,I(S)} + W_{2,IS}] \quad [1.9]$$

mit den Übergangsraten W_{0-2} für Null-, Ein- und Doppelquantenübergänge. Die übrigen Elemente sind *Kreuzrelaxationsraten*:

$$\sigma_{IS} = \sigma_{SI} = [W_{2,IS} - W_{0,IS}] \quad [1.10]$$

die zum Magnetisierungstransfer zwischen I und S führen und isoliert als NOE beobachtbar sind. Diese Differentialgleichung ist nur unter expliziter Annahme einer Ausgangsbedingung lösbar und lautet z.B. für $I_z(0) = -I_0$ und $S(0) = S_0$:

$$1 - \frac{I_z(t)}{I_0} = 2 \frac{\lambda_1 - \rho_S}{\lambda_1 - \lambda_2} \cdot \exp(-\lambda_1 t) + 2 \left(1 - \frac{\lambda_1 - \rho_S}{\lambda_1 - \lambda_2} \right) \cdot \exp(-\lambda_2 t) \quad [1.11]$$

mit $\lambda_1 = \frac{1}{2}(\rho_I + \rho_S) + \frac{1}{2}\sqrt{(\rho_I - \rho_S)^2 + 4\sigma_{IS}^2}$ und $\lambda_2 = \frac{1}{2}(\rho_I + \rho_S) - \frac{1}{2}\sqrt{(\rho_I - \rho_S)^2 + 4\sigma_{IS}^2}$.

Nur in Ausnahmefällen sind die Kreuzrelaxationsraten σ_{IS} Null und ermöglichen monoexponentielle Autorelaxation. *Im Regelfall wird die Kreuzrelaxation experimentell durch kontinuierliche Entkopplung des gekoppelten S-Spins unterbunden*, wodurch immer $S_z(t) = 0$ erhalten bleibt. Auch für die Grenzfälle $\rho_I \approx \rho_S$ und $|\rho_I - \rho_S| \gg \sigma_{IS}$ mit $\lambda_1 \approx \lambda_2 \approx \rho_I$ erhält man in guter Näherung monoexponentielle Relaxation mit $T_1(I_z) \approx \rho_I$.

Die vorgestellte Beschreibung der *enthalpischen* Relaxation durch Übergangswahrscheinlichkeiten und Betrachtung gekoppelter Kern-Zeeman-Niveauschemata ist zur Beschreibung des NOE (= Kreuzrelaxation) und der möglichen Übergangsfrequenzen gekoppelter Systeme geeignet, schafft aber ebenfalls keinen Zusammenhang mit den mikroskopischen dynamischen Prozessen, die die Relaxation auslösen. Diese Quantifizierung gelingt letztlich erst durch die quantenmechanische Behandlung.

1.2.3 Qualitative mikroskopische Betrachtung der Spinrelaxation

Spinübergänge werden von *zeitabhängigen* lokalen magnetischen Feldern $B_{\text{lokal}}(t)$ am Ort eines Spins I ausgelöst. Die Anregung von Spinübergängen durch diese Hintergrundfelder kann als lokal wirkender inkohärenter Puls aufgefaßt werden und erfordert deshalb *xy-polarisierte Wechselfelder* $B_{xy,\text{lokal}}(t)$. Im Gegensatz zu Pulsen besteht aber keine Kohärenz der Anregung, so daß während der T_1 -Relaxation keine beobachtbare Transversalmagnetisierung auftritt. Inkohärent ausgelöste Spinübergänge tragen dagegen auch zur entropischen T_2 -Relaxation bei.

Die **T₁-Zeit**, die ausschließlich durch Spinübergänge bestimmt wird, **durchläuft ein Minimum**, wenn die *mittlere* lokale Bewegungsfrequenz gleich der Larmorfrequenz des betrachteten Spins von ca. $10^7 - 10^9$ rad·Hz ist. Die primäre Abhängigkeit von **J(ω_l)** folgt aus der *Resonanzbedingung zwischen Übergangs- und Anregungsfrequenz* bei stimulierter Relaxation.

Die Streuung (Dispersion) von Übergangsfrequenzen ($\delta\omega$) ist ein zusätzlicher Auslöser nur der entropischen Relaxation, der zum Kohärenzverlust *ohne Induktion von Spinübergängen* führt (vgl.1.1.1). Die natürliche Streuung von ω verursachen lokale *z-polarisierte* Felder $B_{z,\text{lokal}}$ des Hintergrundes (Gl.1.3). Je länger diese statistischen $B_{z,\text{lokal}}$ -Felder bestehen bleiben, desto stärker dephasieren sie das Spinsystem und zerstören die Kohärenz. Für die entropische Relaxation besteht folglich zusätzlich eine Abhängigkeit von **J(0)**, der spektralen Dichte statischer $B_{z,\text{lokal}}$ -Felder. Diese überdeckt weitgehend die Resonanzbedingung zwischen Spinübergangs- und Anregungsfrequenzen für den T₁-analogen Anteil der T₂-Relaxation. Man beobachtet stattdessen mit abnehmenden relaxierenden Anregungsfrequenzen **monoton fallende T₂-Zeiten**.

1.3 Quantenmechanische Behandlung der Spinrelaxation

Die Quantifizierung der Spinrelaxation erfordert die quantenmechanische Behandlung der Relaxationsphänomene. Diese ist für alle Spinzustände möglich, also auch für gekoppelte Spinordnungen (z.B. $2I_zS_z$) und Kohärenzen (z.B. $2I_xS_z$, $2I_xS_x$). Infolgedessen muß zu jeder Relaxationsrate der betrachtete Spinzustand angegeben werden (z.B. $R(2I_xS_z)$); die phänomenologische Ratenbezeichnung $R_1 (= R(I_z))$ und $R_2 (= R(I_x))$ ist unzureichend.

Durch die quantenmechanische Behandlung wird der Zusammenhang zwischen den makroskopisch meßbaren Relaxationsraten und den mikroskopischen Wechselwirkungen und Bewegungsprozessen hergestellt. Die Relaxationsraten sind demnach abhängig von

- der spektralen Dichte $J(\omega)$ bei bestimmten Übergangsfrequenzen und
- der Stärke von Wechselwirkungen des betrachteten Spins mit Hintergrundfeldern, die durch entsprechende Kopplungskonstanten K quantifiziert werden

Die nachfolgende semi-quantenmechanische Abhandlung beschränkt sich auf die *störungstheoretische Herleitung* der spektralen Dichte als dem wesentlichen Bindeglied zwischen makroskopischen Relaxationsraten und mikroskopischen Bewegungsprozessen. Die statistischen Modulationen der Spin-Gitter-Wechselwirkung werden hierbei klassisch behandelt. Es wird auf entsprechende Lehrbücher ^[14, 16] hingewiesen.

1.3.1 Herleitung der Master-Gleichung der Relaxation

Die Entwicklung des Spinsystems wird quantenmechanisch durch die Evolution der Spin-Dichtematrix σ erfaßt, für die die *Liouville-von-Neumann-Gleichung* gilt:

$$\frac{d}{dt}\sigma = -i[H(t), \sigma(t)] \quad [1.12]$$

Bei zeitabhängigem Hamilton-Operator ist diese Differentialgleichung nicht mehr exakt lösbar. Eine Vereinfachung erzielt man durch Eliminierung des *zeitunabhängigen* H_0 -Anteils von $H(t)$, der zur Larmorpräzession der Spins führt. Dies geschieht durch die Heisenberg-Transformation in den sog. *interaction frame*[⊕]:

$$H^\oplus(t) = \exp(iH_0 t)H(t)\exp(-iH_0 t) \quad [1.13]$$

die der Überführung aus dem statischen Laborsystem ins mitrotierende System entspricht. Die *Liouville-von-Neumann-Gleichung* behält bei dieser Transformation die gleiche Form. Redfield ^[11] näherte die Lösung der Differentialgleichung 1.14 *störungstheoretisch* an. Die Integralform von Gl.1.12 im *interaction frame*[⊕] lautet:

$$\sigma^{\oplus}(t) = \sigma^{\oplus}(0) + i \int_0^t [\sigma^{\oplus}(t_1), H^{\oplus}(t_1)] dt_1 \quad [1.14]$$

Substituiert man darin für $\sigma^{\oplus}(t_1)$ denselben Integralausdruck (= Störungsrechnung 2.Ordnung), so gelangt man zu:

$$\sigma^{\oplus}(t) = \sigma^{\oplus}(0) + i \int_0^t [\sigma^{\oplus}(0), H^{\oplus}(t_1)] dt_1 - \int_0^t dt_1 \int_0^{t_1} dt_2 [[\sigma^{\oplus}(t_2), H^{\oplus}(t_2)], H^{\oplus}(t_1)] \quad [1.15]$$

und nach Ableitung nach $dt_{(1)}$ zu einem der *Liouville-von-Neumann-Gleichung* analogen Ausdruck, erweitert um einen *Doppel-Kommutator* aus der Störungsrechnung für zeitabhängige $H(t)$ -Operatoren:

$$\frac{d}{dt} \sigma^{\oplus}(t) = i [\sigma^{\oplus}(0), H^{\oplus}(t)] - \int_0^t [[\sigma^{\oplus}(t_2), H^{\oplus}(t_2)], H^{\oplus}(t)] dt_2 \quad [1.16]$$

Nach Mittelung über das Spin-Ensemble entfällt der erste Term, da kein Zusammenhang zwischen dem *zufällig* modulierten Wechselwirkungsoperator $H^{\oplus}(t)$ und der *statischen* Dichtematrix $\sigma^{\oplus}(0)$ besteht. Substituiert man $t_2 = t - \tau$, so verbleibt:

$$\frac{d}{dt} \sigma^{\oplus}(t) = - \int_0^t [[\overline{\sigma^{\oplus}(t-\tau)}, \overline{H^{\oplus}(t-\tau)}], H^{\oplus}(t)] d\tau \quad [1.17]$$

Die zufällige Störung $H^{\oplus}(t)$ wird sich nicht schlagartig, sondern erst nach einer gewissen Dauer τ_c (= *Korrelationszeit*, 1.6.1) so stark geändert haben, daß der Ensemblemittelwert $\overline{H^{\oplus}(t-\tau) \cdot H^{\oplus}(t)}$ auf Null gefallen ist. Erst danach ist jeglicher zeitlicher Zusammenhang (Korrelation) der Störung abgeklungen und die Integrationsgrenze in Gl. 1.17 kann von t auf ∞ angehoben werden, wenn $t \gg \tau_c$ ist. Wenn sich gleichzeitig innerhalb von t die Dichtematrix nicht entscheidend ändert, also $t \ll T_1, T_2$, kann mit $\sigma^{\oplus}(t-\tau) = \sigma^{\oplus}(t)$ substituiert werden und man erhält unter Verwendung der allgemeinen Kommutatoreigenschaft $[A, B] = -[B, A]$ die **Master-Gleichung der Spinrelaxation**:

$$\frac{d}{dt} \sigma^{\oplus}(t) = - \int_0^{\infty} [\overline{H^{\oplus}(t)}, [\overline{H^{\oplus}(t-\tau)}, \sigma^{\oplus}(t)]] d\tau \quad [1.18]$$

Die Zeit t gilt hierbei bezüglich der Ausgangsdichte $\sigma^{\oplus}(0)$. Die Ensemblemittelung ist nur über den *statistischen* Wechselwirkungsoperator $H^{\oplus}(t)$ nötig. Die erwähnte *Redfield-Bedingung* $\tau_c \ll T_1, T_2$ schränkt ihre Allgemeingültigkeit ein, beispielsweise bei der Festkörper-NMR, wo die T_2 -Zeiten bis in den Bereich der Korrelationszeit absinken.

1.3.2 Herleitung der Redfield-Relaxationsmatrix

Mit den Substitutionen

$$A = H^{\oplus}(t), \quad B = H^{\oplus}(t - \tau) \text{ und } C = \sigma^{\oplus}(t) \quad [1.19]$$

lautet die Master-Gleichung für die einzelnen $\alpha\alpha'$ -Matrixelemente (die Zeilen- bzw. Spaltenindices α und α' stehen für Spinsystem-Eigenzustände $|\alpha\rangle$ und $|\alpha'\rangle$ mit der Übergangsfrequenz $\Delta\omega_{\alpha\alpha'}$):

$$[A, [B, C]]_{\alpha, \alpha'} = (ABC)_{\alpha, \alpha'} - (ACB)_{\alpha, \alpha'} - (BCA)_{\alpha, \alpha'} + (CBA)_{\alpha, \alpha'} \quad [1.20]$$

Der *Doppelkommutator* lautet ausgeschrieben:

$$[A, [B, C]]_{\alpha, \alpha'} = (ABC)_{\alpha, \alpha'} - (ACB)_{\alpha, \alpha'} - (BCA)_{\alpha, \alpha'} + (CBA)_{\alpha, \alpha'} \quad [1.21]$$

Die einzelnen Matrizenprodukt-Elemente berechnen sich zu:

$$\begin{aligned} (ABC)_{\alpha, \alpha'} &= \sum_{\beta, \beta'} A_{\alpha, \beta} B_{\beta, \beta'} C_{\beta', \alpha'} \stackrel{\beta' \rightarrow \beta}{=} \sum_{\beta, \beta'} \delta_{\alpha' \beta'} \left(\sum_{\gamma} A_{\alpha, \gamma} B_{\gamma, \beta} \right) C_{\beta, \beta'} \\ (ACB)_{\alpha, \alpha'} &= \sum_{\beta, \beta'} A_{\alpha, \beta} C_{\beta, \beta'} B_{\beta', \alpha'} = \sum_{\beta, \beta'} (A_{\alpha, \beta} B_{\beta', \alpha'}) C_{\beta, \beta'} \\ (BCA)_{\alpha, \alpha'} &= \sum_{\beta, \beta'} B_{\alpha, \beta} C_{\beta, \beta'} A_{\beta', \alpha'} = \sum_{\beta, \beta'} (A_{\beta', \alpha'} B_{\alpha, \beta}) C_{\beta, \beta'} \\ (CBA)_{\alpha, \alpha'} &= \sum_{\beta, \beta'} C_{\alpha, \beta} B_{\beta, \beta'} A_{\beta', \alpha'} \stackrel{\alpha \rightarrow \beta}{=} \sum_{\beta, \beta'} \delta_{\alpha \beta} \left(\sum_{\gamma} A_{\gamma, \alpha'} B_{\beta', \gamma} \right) C_{\beta, \beta'} \end{aligned} \quad [1.22]$$

wobei die angezeigten Indizes umbenannt sowie die Kommutativität der Matrixelemente und das Kronecker- δ zum Austausch eines Zeilen- bzw. Spaltenindex gegen eine Laufvariable eingesetzt wurden, um eine einheitliche Indizierung für $C = \sigma^{\oplus}(t)$ zu erhalten. Substitution von Gleichungen 1.22 und 1.21 in 1.20 liefert für die Master-Gleichung

$$\frac{d}{dt} \sigma^{\oplus}(t)_{\alpha, \alpha'} = - \sum_{\beta, \beta'} C_{\beta, \beta'} \cdot \int_0^{\infty} \left[- \overline{A_{\alpha, \beta} B_{\beta', \alpha'}} - \overline{A_{\beta', \alpha'} B_{\alpha, \beta}} + \sum_{\gamma} \left(\delta_{\alpha' \beta'} \overline{A_{\alpha, \gamma} B_{\gamma, \beta}} + \delta_{\alpha \beta} \overline{A_{\gamma, \alpha'} B_{\beta', \gamma}} \right) \right] d\tau \quad [1.23]$$

Das Integral wird als **Element der Redfield-Relaxationsmatrix** ^[11] zusammengefaßt:

$$R_{\alpha\alpha', \beta\beta'}^{\oplus} = \int_0^{\infty} \left[- \overline{A_{\alpha, \beta} B_{\beta', \alpha'}} - \overline{A_{\beta', \alpha'} B_{\alpha, \beta}} + \sum_{\gamma} \left(\delta_{\alpha' \beta'} \overline{A_{\alpha, \gamma} B_{\gamma, \beta}} + \delta_{\alpha \beta} \overline{A_{\gamma, \alpha'} B_{\beta', \gamma}} \right) \right] d\tau \quad [1.24]$$

und nach Resubstitution für C erhält man die *Master-Relaxationsgleichung* in der Form

$$\frac{d}{dt} \sigma^{\oplus}(t)_{\alpha, \alpha'} = - \sum_{\beta, \beta'} R_{\alpha\alpha', \beta\beta'}^{\oplus} \cdot \sigma^{\oplus}(t)_{\beta, \beta'} \quad [1.25]$$

Zur Berechnung der Redfield-Matrixelemente werden A und B aus Gl.1.19 in Gl.1.24 resubstituiert und die Rücktransformation aus dem *interaction frame*[⊕] nach der

Vorschrift:

$$H_{\alpha\beta}^{\oplus}(t) = \langle \alpha | \exp(iH_0 t) H(t) \exp(-iH_0 t) | \beta \rangle = H_{\alpha\beta}(t) \exp(i\Delta\omega_{\alpha\beta} t) \quad [1.26]$$

durchgeföhrt (Übergangsfrequenz $\Delta\omega_{\alpha\beta} = \omega_{\alpha} - \omega_{\beta}$). Für die einzelnen Summanden folgt:

$$\begin{aligned} \overline{A_{\alpha\beta} B_{\beta'\alpha'}} &= \overline{H_{\alpha\beta}^{\oplus}(t) \cdot H_{\beta'\alpha'}^{\oplus}(t-\tau)} \\ &= \overline{H_{\alpha\beta}(t) \cdot H_{\beta'\alpha'}(t-\tau) \exp(i(\Delta\omega_{\alpha\beta} + \Delta\omega_{\beta'\alpha'})t) \exp(-i\Delta\omega_{\beta'\alpha'}\tau)} \end{aligned} \quad [1.27]$$

Mit der t(Zeit)-unabhängigen, aber τ (Dauer)-abhängigen **Korrelationsfunktion**:

$$C_{\alpha\beta/\beta'\alpha'}(\tau) \equiv \overline{H_{\alpha\beta}(t) \cdot H_{\beta'\alpha'}(t-\tau)} \quad [1.28]$$

zur Beschreibung des Ordnungsverlustes der statistischen Störungen in Abhängigkeit von der Dauer τ erhält man für das Integral dieser Summanden (aus Gl.1.24):

$$\int_0^{\infty} \overline{A_{\alpha\beta} B_{\beta'\alpha'}} d\tau = \exp(i(\Delta\omega_{\alpha\beta} + \Delta\omega_{\beta'\alpha'})t) \int_0^{\infty} C_{\alpha\beta/\beta'\alpha'}(\tau) \exp(-i\Delta\omega_{\beta'\alpha'}\tau) d\tau \quad [1.29]$$

Dieses Integral ist die *Fourier-Transformation der Korrelationsfunktion* und entspricht der halben **spektralen Dichte J(ω)**:

$$\int_0^{\infty} C_{\alpha\beta/\beta'\alpha'}(\tau) \exp(-i\Delta\omega_{\alpha'\beta'}\tau) d\tau \equiv \frac{1}{2} J_{\alpha\beta/\alpha'\beta'}(\Delta\omega_{\alpha'\beta'}) \quad [1.30]$$

Jedes der beiden Indexpaare beschreibt einen Spinzustand, der durch den Übergang $\alpha \rightarrow \beta$ bzw. $\alpha' \rightarrow \beta'$ charakterisiert ist. Falls $\alpha = \beta$, entspricht der Spinzustand einer Polarisation, in allen anderen Fällen einer Kohärenz. Während ein Indexpaar nicht auseinandergerissen werden darf, ist ansonsten die Reihenfolge der Indizes beliebig:

$$J_{\alpha\beta/\alpha'\beta'}(\Delta\omega_{\alpha'\beta'}) = J_{\alpha'\beta'/\alpha\beta}(\Delta\omega_{\alpha'\beta'}) = J_{\alpha\beta/\beta'\alpha'}(\Delta\omega_{\alpha'\beta'}) \quad [1.31]$$

Die Summanden (Gl.1.29) vereinfachen sich noch weiter aufgrund der raschen Oszillation mit der Frequenz ($\Delta\omega_{\alpha\beta} + \Delta\omega_{\beta'\alpha'}$), die zur Zeitmittelung auf Null führt außer für die Summanden mit $\Delta\omega_{\alpha\beta} = -\Delta\omega_{\beta'\alpha'}$ (**Säkularbedingung**), d.h. für *Übergänge ohne Änderung der Kohärenzordnung* ($\alpha - \beta = \alpha' - \beta'$). Die gültigen *säkularen* Summanden lauten:

$$\int_0^{\infty} \overline{A_{\alpha\beta} B_{\beta'\alpha'}} d\tau = \frac{1}{2} J_{\alpha\beta/\beta'\alpha'}(\Delta\omega_{\beta'\alpha'}) \quad [1.32]$$

und die **Redfield-Matrizen** (vgl. Gl.1.24): [1.33]

$$R_{\alpha\alpha'\beta\beta'} = -\frac{1}{2} \left\{ J_{\alpha\beta/\beta'\alpha'}(\Delta\omega_{\alpha'\beta'}) + J_{\beta'\alpha'/\alpha\beta}(\Delta\omega_{\alpha\beta}) \right\} + \frac{1}{2} \sum_{\gamma} \left\{ \delta_{\alpha\beta} J_{\gamma\alpha'/\beta'\gamma}(\Delta\omega_{\gamma\beta'}) + \delta_{\alpha'\beta'} J_{\alpha\gamma/\gamma\beta}(\Delta\omega_{\gamma\beta}) \right\}$$

sind Summen von spektralen Dichten der Störungen $H(t)$ auf verschiedene Paare von Spin-Übergängen.

Einsetzen der rücktransformierten Dichtematrix:

$$\begin{aligned}\sigma_{\alpha\beta}^{\oplus}(t) &= \sigma_{\alpha\beta}(t) \exp(i\Delta\omega_{\alpha\beta}t) \\ \frac{d}{dt}\sigma_{\alpha\beta}^{\oplus}(t) &= \frac{d}{dt}\sigma_{\alpha\beta}(t) \exp(i\Delta\omega_{\alpha\beta}t) + i\Delta\omega_{\alpha\beta}\sigma_{\alpha\beta}(t) \exp(i\Delta\omega_{\alpha\beta}t)\end{aligned}\quad [1.34]$$

liefert die *Master*-Gleichung im Laborsystem, die sog. **Redfield-Relaxationsgleichung**:

$$\frac{d}{dt}\sigma_{\alpha\alpha'}(t) = -i\Delta\omega_{\alpha\alpha'}\sigma_{\alpha\alpha'}(t) - \sum_{\beta,\beta'}^{\text{säkular}} R_{\alpha\alpha'\beta\beta'} \cdot \sigma_{\beta\beta'}(t) = -i[H_0, \sigma(t)]_{\alpha\alpha'} - \sum_{\beta,\beta'}^{\text{säkular}} R_{\alpha\alpha'\beta\beta'} \cdot \sigma_{\beta\beta'}(t) \quad [1.35]$$

Die Summe läuft nur noch über die Säkularterme ($\alpha - \alpha' = \beta - \beta'$); H_0 ist diagonal.

1.3.3 Auflösung der tensoriellen spektralen Dichte

Die bislang definierte spektrale Dichte beschreibt Spin-Gitter-Wechselwirkungen, ausgedrückt durch den Kopplungsoperator $H(t)$, in Form eines *Tensors* mit den Elementen:

$$\hat{J}_{\alpha\beta/\alpha'\beta'}(\Delta\omega_{\alpha'\beta'}) = 2 \int_0^{\infty} \overline{H_{\alpha\beta}(t)H_{\alpha'\beta'}(t-\tau)} \exp(i\Delta\omega_{\alpha'\beta'}\tau) d\tau \quad [1.36]$$

Der Kopplungsoperator H^w jeder Wechselwirkung w läßt sich separieren in zwei kommutierende Anteile:

- Der *Spinanteil* \hat{I}^w (*Tensor-Operatoren*) wirkt alleine auf die Spin-Eigenzustände und kann aus der Ensemblemittelung ausgeklammert werden, da er zeitkonstant ist.
- Der *zeitabhängige Gitteranteil* $K^w(t)$ wirkt nicht auf die Spin-Eigenzustände und beschreibt allein die Gittermodulationen. Die Ensemblemittelung erfolgt nur über diese statistisch zeitmodulierten Gitteranteile.

Für den Kopplungsoperator H^w muß nun eine fundamentale Einteilung in 2 Klassen ^[16] beachtet werden:

1. Gehört das mit Spin I gekoppelte lokale Feld B_{lokal} *nicht* zum betrachteten Spinsystem, so ist H *linear* bezüglich Spinoperator \hat{I} mit der allgemeinen Form

$$H^w(t) = K^w(t) \cdot \hat{I} \quad [1.37]$$

Hierzu gehören die CSA- und Spin-Rotations-Wechselwirkung, aber auch die Wechselwirkung zu externen Spins (beispielsweise des Solvens), die schnell ihre Position wechseln, so daß der betrachtete Spin I den Mittelwert ihrer relativen Orientierungen erfährt und ihre mathematische Behandlung daher klassisch erfolgen kann.

2. Gehört die mit Spin I gekoppelte lokale Feldquelle aber selbst zum betrachteten Spinsystem (\Rightarrow Beschreibung durch Spinoperator S), so ist H *bilinear* bezüglich der

Spintensoren I und S und hat die allgemeine Form:

$$H^w(t) = \hat{S} \cdot K^w(t) \cdot \hat{I} \quad [1.38]$$

Hierzu gehören die dipolare Kernspin-Kernspin- und Elektronspin-Kernspin-Wechselwirkung. Die Quadrupol-Wechselwirkung ist quadratisch bezüglich Spinoperator \hat{I} , was formell einem Spezialfall der Bilinearität entspricht.

Der Gesamt-Kopplungsoperator $H(t)$ läßt sich somit ausdrücken als:

$$H(t) = \sum_q \sum_w K_q^w(t) \cdot (\hat{S}_q^w \cdot \hat{I}_q) \quad [1.39]$$

Für lineare Kopplungen entspricht S dem Einheitstensor, bei quadratischen Kopplungen ist $S = I$. Index w läuft über alle Spin-Gitter-Wechselwirkungen. Index q läuft über alle Komponenten der Spins I, S und - nach entsprechender Koordinatentransformation - Kopplungen K . Bei kartesischer Zerlegung entspräche Index q den *drei* Achsen x, y und z. Die Lösung der Schrödingergleichung für die Rotation eines längentreuen Quantenvektors (z.B. Spin) erfordert aber die Transformation in Polarkoordinaten und hat als Lösung die Legendre-Kugelfunktion 2. Ordnung, P_2 (vgl. Lehrbücher ^[17]). Deren maximal *fünf* Eigenwerte werden durch den Index q markiert ($q = \pm 2, \pm 1, 0$).

Die tensorielle Dichte (Gl.1.36) lautet nach dieser Zerlegung:

$$\hat{J}_{\alpha\beta/\alpha'\beta'}(\Delta\omega_{\alpha'\beta'}) = \sum_{q,q'} \sum_{w,w'} \left\{ (\hat{S}_q^w \cdot \hat{I}_q)_{\alpha\beta} (\hat{S}_{q'}^{w'} \cdot \hat{I}_{q'})_{\alpha'\beta'} 2 \int_0^\infty \overline{K_q^w(t) K_{q'}^{w'}(t-\tau)} \exp(i\Delta\omega_{\alpha'\beta'}\tau) d\tau \right\} \quad [1.40]$$

Da die einzelnen Gitterkomponenten K_q meist orthogonal und unkorreliert, d.h. ohne statistischen Zusammenhang untereinander sind, entfällt die Summation über q' . Ferner lassen sich die einzelnen Komponenten K_q oft als das Produkt des Kopplungsbetrages und eines zugehörigen Eigenvektors $\vec{\mu}_q^w$ (des Kopplungstensors K^w) darstellen:

$$K_q^w(t) = |K^w| \cdot \vec{\mu}_q^w \quad [1.41]$$

Damit kann nun eine neue Korrelationsfunktion $C^{w/w'}$ (vgl. Gl. 1.28) für die Einheitsvektoren definiert werden, die durch die angegebene Integration in die zugehörige *skalare* spektrale Dichte $J^{w/w'}$ (vgl. Gl. 1.30) überführt wird:

$$2 \int_0^\infty \overline{\vec{\mu}_q^w(t) \vec{\mu}_{q'}^{w'}(t-\tau)} \exp(i\Delta\omega_{\alpha'\beta'}\tau) d\tau \equiv 2 \int_0^\infty C^{w/w'} \exp(i\Delta\omega_{\alpha'\beta'}\tau) d\tau = J_q^{w/w'}(\Delta\omega_{\alpha'\beta'}) \quad [1.42]$$

Die tensorielle Dichte (Gl.1.40) zerfällt so nach:

$$\hat{J}_{\alpha\beta/\alpha'\beta'}(\Delta\omega_{\alpha'\beta'}) = \sum_{q=-2}^{+2} \sum_{w,w'} \left\{ |K^w K^{w'}| \cdot J_q^{w/w'}(\Delta\omega_{\alpha'\beta'}) \cdot \left[(\hat{S}_q^w \cdot \hat{I}_q)_{\alpha\beta} (\hat{S}_{q'}^{w'} \cdot \hat{I}_{q'})_{\alpha'\beta'} \right] \right\} \quad [1.43]$$

in (von rechts nach links):

- einen Spinanteil, der alleine den Tensorcharakter begründet,
- eine skalare spektrale Dichte, die ausschließlich die statistische Modulation von *Paaren* der Spin-Gitter-Kopplung beschreibt
- und das Produkt von *Paaren* von Kopplungskonstanten, die die Amplitude korrelierter Spin-Gitter-Kopplungen beschreibt (in rad·Hz)

Die Relaxationsraten (= Elemente der Redfield-Matrix nach Gl.1.33) werden also durch die *zeitliche Korrelation von Paaren von Spin-Gitter-Wechselwirkungen* (Kopplungen) bestimmt. Dabei ist zwischen *Autokorrelation* derselben Kopplung ($w = w'$) und *Kreuzkorrelation* verschiedener Kopplungen ($w \neq w'$) zu unterscheiden. Beide Prozesse werden im nachfolgenden Kapitel 1.3.4 näher beschrieben.

Die Auflösung des Spinanteils und seine Wirkung auf die Dichtematrix σ kann in entsprechenden Lehrbüchern nachvollzogen werden [14, 16]. Abhängig von der Art der Kopplung und der Korrelation ist der Spinanteil entscheidend für die Selektion möglicher Übergangsfrequenzen und Spin-Kopplungen bei verschiedenen Relaxationsprozessen:

1. Lineare Kopplungen ($S^w = \text{Einheitstensor}$) erlauben nur den Einquanten-Übergang des isolierten I-Spins mit der Übergangsfrequenz ω_I .
2. Bilineare Kopplungen zwischen zwei Spins I und S erweitern die möglichen Übergangsfrequenzen um ω_S und die gekoppelten Frequenzen $\omega_I \pm \omega_S$ der Null- und Doppelquantenübergänge.
3. Kreuzkorrelation unter Beteiligung mindestens einer bilinearen Kopplung führt zur Relaxation eines Spinzustandes I_x bzw. I_z auf den entsprechenden bilinearen Spinzustand $2I_xS_z$ bzw. $2I_zS_z$ (dies ist die Grundlage des CR-INEPT [9]). Die Kohärenzordnung (vgl. Säkularbedingung, 1.3.2) wird hierdurch nicht verändert! In allen anderen Fällen von Auto- und Kreuzkorrelation sind derartige gekoppelte Spinzustandsänderungen verboten; die Relaxation eines beliebigen Ausgangszustandes führt hierbei immer nur zu ihrem Gleichgewichtswert.

Darüber hinaus liefert der Spinanteil lediglich ganzzahlige Eigenwerte $a(q)_{\alpha\beta/\alpha'\beta'}^{w/w'}$ in Abhängigkeit der Spinkomponenten (q) sowie der korrelierten Wechselwirkungen (w, w') und Übergänge ($\alpha \rightarrow \beta, \alpha' \rightarrow \beta'$). Der Ausdruck der tensoriellen Dichte (Gl. 1.43) vereinfacht sich dadurch erheblich zu:

$$\hat{J}_{\alpha\beta/\alpha'\beta'}(\Delta\omega_{\alpha'\beta'}) = \sum_{w,w'} |K^w K^{w'}| \cdot \left\{ \sum_{q=-2}^{+2} a(q)_{\alpha\beta/\alpha'\beta'}^{w/w'} \cdot J_q^{w/w'}(\Delta\omega_{\alpha'\beta'}) \right\} \quad [1.44]$$

In Fällen *isotroper* Modulation der Spin-Gitter-Wechselwirkungen sind alle fünf Komponenten q gleichwertig und für diesen Sonderfall gilt:

$$\hat{J}_{\alpha\beta/\alpha'\beta'}^{\text{isotrop}}(\Delta\omega_{\alpha'\beta'}) = \sum_{w,w'} |K^w K^{w'}| \cdot a(q)_{\alpha\beta/\alpha'\beta'}^{w/w'} \cdot J_q^{w/w'}(\Delta\omega_{\alpha'\beta'}) \quad [1.45]$$

1.3.4 Anschauliche Interpretation der Auto- und Kreuzkorrelation

Die Wechselwirkungsenergie eines Spins I mit einem Hintergrund-Magnetfeld \vec{B}^w kann man klassisch ausdrücken durch die Präzessionsfrequenz \vec{K}^w :

$$\vec{K}^w(t) = \gamma_I \vec{B}^w(t) = \vec{\omega}_I^w(t) \quad [1.46]$$

die aufgrund der statistischen Natur der Quelle ihrerseits zeitmoduliert ist. Wenn diese Modulation nur durch Rotation eines längentreuen \vec{B}^w -Feldvektors zustande kommt, liefert das *mittlere Skalarprodukt (Autokorrelation)*:

$$\overline{\vec{B}^w(t) \vec{B}^w(t-\tau)} = |\vec{B}^w|^2 \overline{\cos(\omega\tau)} = |\vec{B}^w|^2 p(\omega) \cdot \cos(\omega\tau) \approx |\vec{B}^w|^2 p(\omega) \quad [1.47.a]$$

nach infinitesimal kleinen Zeitintervallen ($\tau \approx 0$, $\cos(0) = 1$) direkt die Verteilungsfunktion $p(\omega)$ der statistischen Modulationsfrequenzen. Diese entspricht jedoch der spektralen Dichte $J(\omega)$ für die statistische Modulation des betrachteten \vec{B}^w -Hintergrundfeldes durch die *eigene* Vektorreorientierung (*Autokorrelation*). Analog kann die Modulation des \vec{B}^w -Feldes auch durch *Interferenz* mit einem weiteren Hintergrundfeld $\vec{B}^{w'}$ -erfolgen. Dies wird durch die entsprechende *Kreuzkorrelation* zwischen \vec{B}^w und $\vec{B}^{w'}$ beschrieben.

1.3.5 Interpretation und Erklärung der Redfield-Relaxationsgleichung

Während die Diagonalelemente ($\alpha = \alpha'$) der Dichtematrix σ *Populationen* von Energieniveaus entsprechen und ihre Zeitentwicklung damit enthalpische Relaxation beschreibt, entsprechen die übrigen Elemente ($\alpha \neq \alpha'$) von $\sigma(t)$ *Kohärenzen* und ihre Zeitentwicklung folglich der entropischen Relaxation.

Die Redfield-Matrixelemente $R_{\alpha\alpha'\beta\beta'}$ sind die Raten der Relaxation eines gegebenen Ausgangs-Spinzustandes, ausgedrückt durch den Übergang $\alpha \rightarrow \alpha'$ (Polarisation für $\alpha = \alpha'$ und Kohärenz für $\alpha \neq \alpha'$), auf einen End-Spinzustand, ausgedrückt durch den Übergang $\beta \rightarrow \beta'$. Aufgrund der *Säkularbedingung* (vgl.1.3.2) sind Änderungen der Kohärenzordnung hierbei verboten (d.h. $\alpha - \beta = \alpha' - \beta'$), sodaß Ausgangs- und End-Spinzustand identisch sind. Falls zusätzlich $\alpha = \beta$ gilt, bleibt der betrachtete Spin derselbe und diese

Autorelaxation führt zum Erreichen des entsprechenden Gleichgewichtswertes des Spinzustandes (= Null für Kohärenzen und I_0 für Polarisationen).

Bei *kreuzkorrelierter Autorelaxation* kann aus dem Spinanteil die Zukopplung eines weiteren Spins resultieren (vgl. 1.3.3), wodurch z.B. Inphase-Kohärenz I_x (Ausgangszustand) in Antiphase-Kohärenz $2I_x S_z$ (Endzustand) überführt wird, *ohne* dabei die eigentliche Kohärenz(ordnung) zu ändern.

Für $\alpha \neq \beta$ ändert der Spin seine Identität und diese *Kreuzrelaxation* führt zum Übertrag der Gleichgewichtsabweichung eines Spins auf einen zweiten Spin.

Bei Kreuzrelaxation und u.U. kreuzkorrelierter Autorelaxation (s.o.) überlagert sich die Relaxation des betrachteten Spins I mit der Relaxation aller zugekoppelten Spins und der Verlauf der I-Spin-Relaxation weicht infolgedessen von *monoexponentiellem* Verhalten ab. Die Definition einer einzigen Relaxationszeit ist dann unmöglich! Die Unterbindung dieser Prozesse ist jedoch experimentell möglich (s.u. und Kapitel 1.4.3).

Für **Kohärenzen** ($\alpha \neq \alpha'$) vereinfacht im Falle *nicht-entarteter* Übergänge (Entartung besteht z.B. in CH_3 -Gruppen) die Säkularbedingung ($\beta = \alpha$ und $\beta' = \alpha'$) die *Redfield-Gleichung* 1.35 zu:

$$\frac{d}{dt} \sigma_{\alpha\alpha'}(t) = -i\Delta\omega_{\alpha\alpha'} \sigma_{\alpha\alpha'}(t) - R_{\alpha\alpha'\alpha\alpha'} \cdot \sigma_{\alpha\alpha'}(t) \quad [1.48]$$

Es tritt *für Kohärenzen keine Kreuzrelaxation* auf und ihre Zeitevolution (Integral von Gl. 1.48) entspricht einer *Präzession* (aufgrund des *Imaginäranteils*) unter *monoexponentieller Relaxation* (aufgrund des *Realanteils*) mit der R_2 -Relaxationsrate $\mathbf{R}_2 = \mathbf{R}_{\alpha\alpha'\alpha\alpha'}$:

$$\sigma_{\alpha\alpha'}(t) = \sigma_{\alpha\alpha'}(0) \exp(-i\Delta\omega_{\alpha\alpha'} t) \cdot \exp(R_{\alpha\alpha'\alpha\alpha'} t) \quad [1.49]$$

Das Redfield-Matrixelement (Gl.1.33) lautet wegen $\delta_{\alpha\alpha} = \delta_{\alpha'\alpha'} = 1$ und $\Delta\omega_{\alpha\alpha} = \Delta\omega_{\alpha'\alpha'} = 0$ und mit den Vertauschungsregeln für die Indizes (Gl.1.31):

$$R_{\alpha\alpha'\alpha\alpha'} = \frac{1}{2} \{ J_{\alpha\alpha/\alpha\alpha}(0) - 2J_{\alpha\alpha/\alpha'\alpha'}(0) + J_{\alpha'\alpha'/\alpha'\alpha'}(0) \} + \frac{1}{2} \left\{ \sum_{\gamma \neq \alpha} J_{\alpha\gamma/\alpha\gamma}(\Delta\omega_{\gamma\alpha}) + \sum_{\gamma \neq \alpha'} J_{\alpha'\gamma\alpha'\gamma}(\Delta\omega_{\gamma\alpha'}) \right\} \quad [1.50]$$

Die Summe aller $J(0)$ -Terme ist der *adiabatische Relaxationsanteil*, der durch zufällige $\delta\omega$ -Fluktuationen der Übergangsenergien (für $\alpha \rightarrow \alpha$ und $\alpha' \rightarrow \alpha'$) *ohne Spinübergänge* ($\Delta\omega = 0$) erfolgt. Diese $\delta\omega$ -Fluktuationen beruhen auf $H_z(t)$ -Komponenten, die mit H_0 kommutieren. Die Summe aller $J(\Delta\omega \neq 0)$ -Terme ist der *Lebensdauer-Anteil* aufgrund von Populationsänderungen zwischen den Eigenzuständen $|\alpha\rangle$ und $|\alpha'\rangle$. Diese Spinübergänge werden von $H_{xy}(t)$ -Anteilen ausgelöst, die nicht mit H_0 kommutieren.

Für **Polarisationen** ($\alpha = \alpha'$) folgt die Säkularbedingung $\beta = \beta'$ und die *Redfield-Gleichung* 1.35 vereinfacht sich zu:

$$\frac{d}{dt}\sigma(t)_{\alpha,\alpha} = -R_{\alpha\alpha\alpha\alpha} \cdot \sigma(t)_{\alpha,\alpha} - \sum_{\beta \neq \alpha} R_{\alpha\alpha\beta\beta} \cdot \sigma(t)_{\beta,\beta} \quad [1.51]$$

Wie erwartet entfällt für Polarisationen die Präzession, da kein Imaginäranteil mehr vorhanden ist. Es treten nun aber zusätzlich $\sigma_{\beta\beta}(t)$ -Anteile auf, die Polarisationen anderer Spins entsprechen. Dieser *Polarisationstransfer zwischen Spins* (NOE) erfolgt mit der **Kreuzrelaxationsrate** $R_{\alpha\alpha\beta\beta}$. Nur wenn die $\sigma_{\beta\beta}(t)$ -Anteile, d.h. die Polarisationen anderer Spins, durch *kontinuierliche Entkopplung* auf Null gemittelt werden, verbleibt eine *monoexponentielle enthalpische Relaxation* mit der Rate $R_1 = R_{\alpha\alpha\alpha\alpha}$. Dieses Redfield-Matrixelement (Gl.1.33) lautet wegen der Identität aller Indizes:

$$R_{\alpha\alpha\alpha\alpha} = \frac{1}{2} \left\{ 2 \cdot \sum_{\gamma \neq \alpha} J_{\alpha\gamma/\alpha\gamma}(\Delta\omega_{\gamma\alpha}) \right\} \quad [1.52]$$

Für die Relaxation von Polarisationen verschwindet der adiabatische Relaxationsanteil (keine $J(0)$ -Abhängigkeit!) und der Lebensdauer-Anteil entspricht dem *Doppelten* im Vergleich zur Kohärenz-Relaxation (Gl.1.50).

1.3.6 Dynamische Verschiebungsänderung

Die in Gl.1.30 definierte spektrale Dichte ist die komplexe Fourier-Transformierte der Störungskorrelationsfunktion und setzt sich aus einem Real- (cosinus) und einem Imaginäranteil (sinus) zusammen: [1.53]

$$\int_0^{\infty} C_{\alpha\beta/\beta'\alpha'}(\tau) \cos(\Delta\omega_{\alpha'\beta'}\tau) d\tau - i \int_0^{\infty} C_{\alpha\beta/\beta'\alpha'}(\tau) \sin(\Delta\omega_{\alpha'\beta'}\tau) d\tau \equiv \frac{1}{2} \left\{ J_{\alpha\beta/\alpha'\beta'}^{real}(\Delta\omega_{\alpha'\beta'}) - i J_{\alpha\beta/\alpha'\beta'}^{imaginär}(\Delta\omega_{\alpha'\beta'}) \right\}$$

Daher haben auch die Redfield-Matrixelemente einen Real- und einen Imaginäranteil und die vollständige Redfield-Gleichung 1.35 lautet für Kohärenzen:

$$\frac{d}{dt}\sigma(t)_{\alpha\alpha'} = -i(\Delta\omega_{\alpha\alpha'} + R_{\alpha\alpha'\alpha\alpha'}^{imaginär})\sigma(t) - R_{\alpha\alpha'\alpha\alpha'}^{real} \cdot \sigma(t)_{\alpha\alpha'} \quad [1.54]$$

Die *Relaxationsraten* werden also *ausschließlich vom Realanteil* der Redfield-Matrix (bzw. der enthaltenen spektralen Dichten) bestimmt, während der *Imaginäranteil* die Präzessionsfrequenzen verändert. Diese sog. *dynamische Verschiebungsänderung* trägt z.B. zur Wirkung paramagnetischer *Shift-Reagenzien* bei.

Nachfolgende Betrachtungen beschränken sich ausschließlich auf den relaxationswirksamen Realanteil der Redfield-Matrix bzw. der spektralen Dichtefunktionen!

1.4 Spin-Gitter-Wechselwirkungen und Kopplungskonstanten

Die in Tabelle 1.1 vorgestellten Spin-Gitter-Wechselwirkungen werden in diesem Kapitel näher untersucht und in Form ihrer Kopplungskonstanten quantifiziert.

1.4.1 Dipolare Wechselwirkung

In B_0 ausgerichtete *Spins* erzeugen distanz- und winkelabhängige magnetische *Dipolfelder* (Abb.1.1) mit den beiden Komponenten (Fernfeld-Näherung) für einen $S = 1/2$ -Spin:

$$\begin{aligned} B_{x,y}^S(t) &= \frac{\mu_0}{4\pi} \frac{\hbar\gamma_S}{2r(t)^3} P_2^{(1)}(\cos\theta(t)) \\ B_z^S(t) &= \frac{\mu_0}{4\pi} \frac{\hbar\gamma_S}{2r(t)^3} P_2^{(0)}(\cos\theta(t)) \end{aligned} \quad [1.55]$$

mit den zugeordneten Legendre-Kugelfunktionen zweiter Ordnung:

$$\begin{aligned} P_2^{(1)}(\cos\theta(t)) &= \frac{3}{2} \sin(2\theta(t)) \\ P_2^{(0)}(\cos\theta(t)) &= \frac{1}{2} (3\cos^2\theta(t) - 1) \end{aligned} \quad [1.56]$$

Die Dipolfelder sind rotationssymmetrisch um die zu B_0 parallele z -Achse. Der Azimutwinkel θ beschreibt die Orientierung des Distanzvektors r bezüglich B_0 . Die dipolare Kopplungskonstante D für einen $S = 1/2$ -Spin folgt aus Gl. 1.55 durch Multiplikation des Feldbetrages mit γ_I (vgl.1.3.5) und gibt dadurch die auf Spin I wirksame magnetische Energie aus B^S in Form einer Kreisfrequenz ($\omega = 2\pi\nu$ in [rad·Hz]; $1\text{rad} = 2\pi$) wieder:

$$D_{IS} = \frac{\mu_0}{4\pi} \frac{\hbar\gamma_I\gamma_S}{2r_{IS}^3} \quad [1.57]$$

Die Modulation der dipolaren Wechselwirkung erfolgt über die zeitliche Veränderung des Vektors $r(t)$ in Länge und Orientierung (Winkel θ) bezüglich B_0 . Die *intramolekulare* Reorientierung von r ergibt sich primär aus der Molekülrotation. Bei *intermolekularer* dipolarer Kopplung sind primär Längenänderungen wichtig, die durch diffusionskontrollierte Stöße moduliert werden. Die *intermolekularen* Distanzen sind aber in der Regel für wirksame dipolare Relaxation zu groß.

Während bei der Mittelung über alle Winkel $\theta(t)$ das transversale Dipolfeld $\overline{B_{x,y}^S(t)} = 0$ verschwindet, verbleibt ein z -Anteil $\overline{B_z^S(t)} \neq 0$. Diese winkelunabhängigen z -Anteile lokaler Dipolfelder bestimmen maßgeblich die chemische Verschiebung eines Spins.

Aufgrund der Abhängigkeit der dipolaren Kopplung vom gyromagnetischen Verhältnis produzieren die ungepaarten Elektronenspins paramagnetischer Komponenten die weitaus stärksten lokalen Felder, gefolgt von den Kernspins der Protonen.

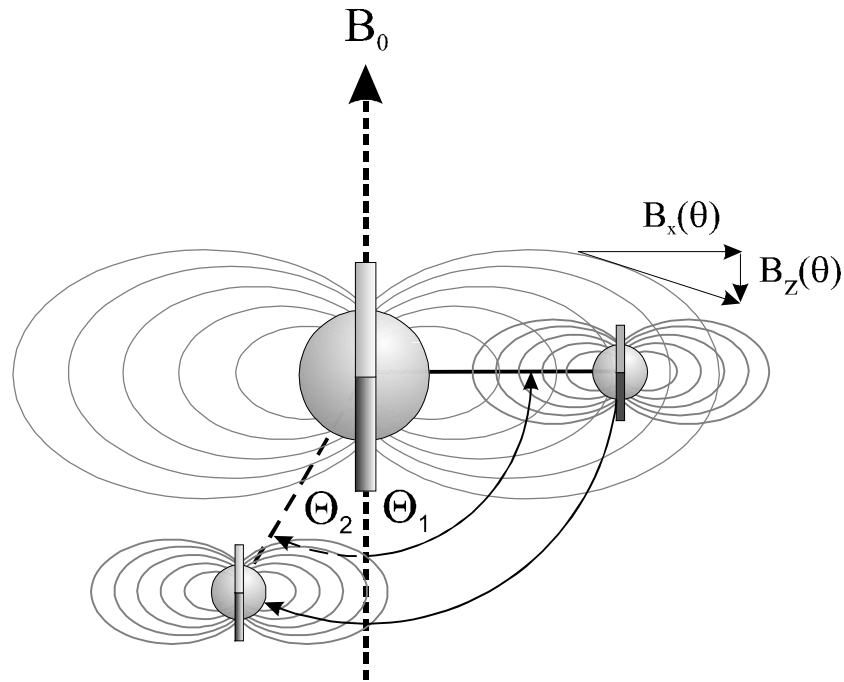


Abb.1.1 Das von einem im B_0 -Feld ausgerichteten Dipol erzeugte magnetische Dipolfeld ist rotationssymmetrisch um die durch B_0 festgelegte Dipolachse z , zu der der Azimutwinkel θ gemessen wird. Das Dipolfeld hat die eingetragenen distanz- und winkelabhängigen Komponenten B_{xy} und B_z .

Tab.1.2 Dipolare Kopplungskonstanten D_{XH} (definiert nach Gl.1.57) zwischen Heterokern X ($= 1/2$ -Spin) und einem Proton. $1 \text{ rad} = 2\pi$.

Heterokern	γ_X [$10^8 \cdot \text{rad} \cdot \text{Hz} / \text{T}$]	r_{XH} [\AA]	D_{XH} [$\text{rad} \cdot \text{Hz}$]
^1H	2.6752	1.78 (CH_2)	$6.7 \cdot 10^4$
^{15}N	-0.271044	1.02 (Amid)	$3.6 \cdot 10^4$
^{13}C	0.67265	1.095 ($\text{C}^\alpha\text{-H}^\alpha$)	$7.2 \cdot 10^4$

1.4.2 CSA-Wechselwirkung

Die magnetische Abschirmung der Kernspins gegenüber B_0 durch ihre Elektronenhülle wird durch den CSA-Tensor σ_{CSA} beschrieben (Chemical Shift Anisotropy). Er hat die drei Eigenvektoren = Hauptachsen σ_{1-3} mit den Eigenwerten σ_{11-33} (in ppm). Die normierte Spur des CSA-Tensors ist die *isotrop gemittelte* Verschiebung $\sigma_{\text{iso}} = 1/3 \text{Tr}\{\sigma\}$. Die Eigenwerte sind nach $\sigma_{11} > \sigma_{22} > \sigma_{33}$ geordnet. Andere Bezeichnungen sind $\sigma_{11} = \sigma_z$ (bei axialer Asymmetrie = σ_{\parallel}), $\sigma_{22} = \sigma_y$ und $\sigma_{33} = \sigma_x$ (bei axialer Asymmetrie zusammengefaßt = σ_{\perp}). Die Achsenbezeichnungen gelten im *Molekül-Koordinatensystem*. Weitere Größen sind die *Anisotropie* $\Delta\sigma$ und die *Rhombizität* $\Delta\eta$:

$$\Delta\sigma = \sigma_{11} - \frac{\sigma_{22} + \sigma_{33}}{2} = \frac{3}{2}(\sigma_{11} - \sigma_{\text{iso}}) \quad \text{und} \quad \Delta\eta = \frac{\sigma_{22} - \sigma_{33}}{\sigma_{11} - \sigma_{\text{iso}}} \quad [1.58]$$

Durch die Reskalierung bezüglich σ_{iso} werden Anisotropie und Rhombizität unabhängig von der absoluten chemischen Verschiebung.

Die **CSA-Kopplungskonstante C** gibt den Betrag der auf Spin I wirksamen Energie aus dem CSA-Feld ($B_{\text{CSA}} = \sigma_{\text{CSA}} B_0$) in [rad·Hz] an und ist das Produkt aus B_{CSA} und γ_I :

$$C = \frac{\gamma_I B_0 \Delta \sigma}{3} \sqrt{1 + \frac{\Delta \eta^2}{3}} \quad [1.59]$$

Im axialsymmetrischen Fall ist $\Delta \sigma_{\text{ax}} = \sigma_{\parallel} - \sigma_{\perp}$ und $\Delta \eta_{\text{ax}} = 0$. Als Maß für die Abschirmungsanisotropie gibt man den Quotienten $2\sigma_z/(\sigma_x + \sigma_y)$ an.

Die Modulation des magnetischen Feldes am Spin I durch seinen CSA-Tensor kann offensichtlich nicht durch Distanzänderungen, sondern *ausschließlich* durch Reorientierung der σ_{CSA} -Eigenvektoren im B_0 -Feld hervorgerufen werden.

Die CSA-Wechselwirkung ist der einzige Relaxationsmechanismus mit einer *direkten* B_0^2 -Feldabhängigkeit (aufgrund der C^2 -Abhängigkeit). Es muß aber beachtet werden, daß alle Relaxationsprozesse über die spektrale Dichte $J(\omega)$ eine *indirekte* Feldabhängigkeit aufweisen und daß die Linienverbreiterung durch Austauschprozesse (Kapitel 1.8) ebenfalls eine (skalierbare) $\Delta_{\text{Austausch}} \propto B_0^2$ Feldabhängigkeit produziert.

Tab.1.3 Eigenwerte und Kenngrößen von CSA-Tensoren sowie CSA-Kopplungskonstanten C (entsprechend der Literaturdefinition, Gl.1.59) bei 600 MHz ^1H -Larmorfrequenz. $1\text{rad} = 2\pi$.

Kern	$\sigma_{11}=\sigma_z$ [ppm]	$\sigma_{22}=\sigma_y$ [ppm]	$\sigma_{33}=\sigma_x$ [ppm]	$\Delta\sigma$ [ppm]	$\Delta\eta$	C [rad·Hz]
^{15}N (Amid)				-160/ -170	0	$2.1 \cdot 10^4$
$^{15}\text{N}^{\epsilon}$ (Indol)				-89		$1.1 \cdot 10^4$
^{13}CO	244	178	90	110	1.2	$4.2 \cdot 10^4$
$^{13}\text{C}^{\alpha}$				25		$0.8 \cdot 10^4$
$^{13}\text{C}^{\beta}$				32		$1.0 \cdot 10^4$

1.4.3 Wichtige Unterschiede zwischen dipolarer und CSA-Wechselwirkung

Wesentliche Unterschiede zwischen dipolarer (D) und CSA-Kopplung (C) sind:

1. Nur D ist abhängig von atomaren Abständen
2. Nur D führt zur Kreuzrelaxation
3. Nur D hängt vom Spinzustand des dipolar gekoppelten Partners S ab. Daher wird nur D durch Inversion von S invertiert, während eine Inversion des Spins I das Vorzeichen

sowohl von D als auch von C umkehrt. Da die Kopplungskonstante bei der Auto-Korrelation quadratisch, bei der Kreuz-Korrelation aber einfach eingeht (Gl.1.45), wird diese Inversion nur bei letzterer wirksam

4. Nur C hängt von B_0 ab. Daher kann bei einer gewissen Feldstärke $C = D$ werden.

Aspekte 1 und 2 sind Grundlage der NMR-Strukturaufklärung über die Messung des Kern-Overhauser-Effektes (*NOE*), der die Kreuzrelaxation zwischen zwei Spins I und S durch Autokorrelation ihrer dipolaren Kopplung darstellt. Aspekt 3 ermöglicht die Unterdrückung der Dipol/CSA-Kreuzkorrelation bei der Messung von Relaxationsraten. Die Kombination der Aspekte 3 und 4 ist die Grundlage des *TROSY*-Prinzips [8], bei dem die entropische Relaxation im gekoppelten Spinzustand IS bei einer bestimmten S-Spinorientierung (α bzw. β) wegen der weitgehenden Kompensation der CSA- und dipolaren Autokorrelation durch die Dipol/CSA-Kreuzkorrelation stark unterdrückt wird.

1.4.4 Weitere Wechselwirkungen

Neben den im gekoppelten IS-Spinsystem (I, S = Spin- $\frac{1}{2}$) wichtigsten dipolaren und CSA-Wechselwirkungen existieren weitere Spin-Gitter-Wechselwirkungen:

1. Skalare Wechselwirkung (Kopplungskonstante K_{SC}^2):

Neben der direkten Wechselwirkung (dipolare Kopplung) durch den Raum können Kernspins auch indirekt über ihre Bindungselektronen (*J*-Kopplung) kommunizieren. Obgleich die skalare *J*-Kopplung (ca. $10^0 - 10^3$ rad·Hz) immer um Größenordnungen kleiner als die vektorielle Dipol-Kopplung (bis 10^5 rad·Hz) ist, wird nur sie in Lösung beobachtet, da sie unabhängig von der Molekülorientierung im B_0 -Feld ist. Infolgedessen ist die *Molekülrotation* für die Modulation von *J* *unwirksam*. Eine Modulation von *J* kann jedoch durch raschen chemischen Austausch des gekoppelten Spins S (skalare Relaxation erster Art) oder durch die rasche Relaxation von S (skalare Relaxation zweiter Art) eintreten und die I-Spinrelaxation auslösen. Skalare Wechselwirkung induziert neben der dipolaren Wechselwirkung als einzige gekoppelte IS-Spinübergänge (Nullquanten-Übergänge) und führt damit zu Kreuzrelaxation und Abweichungen der I-Spinrelaxation von monoexponentiellem Verhalten. Skalare Relaxation ist nur von der Frequenzseparation $\omega_I - \omega_S =$ Nullquantenfrequenz abhängig und damit der Linienverbreiterung durch Austausch (die aber keine T_1 -Relaxation induziert) sehr ähnlich. Infolgedessen führt sie (im homonuklearen I = S Fall) zu Spektren höherer Ordnung mit veränderten Signallagen und -intensitäten.

2. Quadrupol-Wechselwirkung (Kopplungskonstante K_Q^2) [18]:

Kernspins mit $I > \frac{1}{2}$ besitzen ein Kern-Quadrupolmoment, über das sie auch mit elektrischen Feldern wechselwirken können. Lokale elektrische Felder beruhen auf der Asymmetrie der Ladungsverteilung in der unmittelbaren Spinumgebung und werden durch die Molekülrotation moduliert. Die Quadrupol-Kopplungskonstante kann außerordentlich groß werden ($>10^6$ rad·Hz) und führt zu rascher Relaxation, die über die skalare Wechselwirkung zweiter Art (s.o.) auch auf gekoppelte Spins S relaxierend wirken kann. Dies muß z.B. bei Relaxationsmessungen an deuterierten Molekülen beachtet werden. Für $I > 1$ ist die Quadrupol-Relaxation nicht mehr monoexponentiell, d.h. T_1 - und T_2 -Zeiten können nicht mehr definiert werden und die Linienform ist eine Überlagerung mehrerer Lorentzkurven.

3. Paramagnetische Wechselwirkung (Kopplungskonstante K_{eD}^2):

Ungepaarte Elektronenspins sind prinzipiell wie Kernspin-Dipole zu behandeln. Sie sind jedoch erheblich stärker ($\gamma_e/\gamma_H = 1836$) und die paramagnetische Relaxation dominiert in der Regel über alle anderen Relaxationsmechanismen. Durch die äußerst rasche Eigenrelaxation der Elektronenspins befinden sich diese immer im Boltzmann-Gleichgewicht, weshalb im Unterschied zur Kernspin-Dipol-Relaxation hier keine Abhängigkeit der I-Spinrelaxation von der Magnetisierung des Partnerspins (Elektronenspin) besteht. Diese verläuft daher grundsätzlich monoexponentiell, d.h. es tritt keine Kreuzrelaxation zwischen Kernspin I und Elektron auf. Für die paramagnetische Wechselwirkung ist neben der Molekülrotation vor allem die Elektronenbewegung wichtig. Sie entscheidet, ob ein Paramagnetikum primär als Relaxationsreagens (langsame Elektronenbewegung) oder als Verschiebungsreagens (schnelle Elektronenbewegung) wirkt (vgl. dynamische Verschiebungsänderung, Kapitel 1.3.6).

4. Spin-Rotations-Wechselwirkung (Kopplungskonstante K_{SR}^2):

Die inhomogene Elektronen- und Ladungsverteilung im Molekül induziert bei Rotation ein anisotropes molekulares Magnetfeld $B_{\text{molekular}}$ am Ort eines intramolekularen Kernspins I. Durch molekulare Stöße kommt es zur Modulation der Rotationsfrequenz und damit von $B_{\text{molekular}}$. Daher ist für diesen Relaxationsprozeß die Kollisionsrate entscheidend, die invers von der molekularen Rotationsrate abhängt (vgl. Tab.1.4). Die Spin-Rotations-Wechselwirkung hat deshalb gegenüber allen anderen WW eine *inverse Temperaturabhängigkeit* (Tab.1.4), d.h. ihre Relaxationsbeiträge Γ_1^{SR} steigen mit der Temperatur und sind für hochbewegliche Moleküle (in der Gasphase) dominant.

1.4.5 Kopplungskonstanten

Tabelle 1.4 gibt die Kopplungskonstanten der einzelnen Wechselwirkungen gemäß der Definition in Kapitel 1.3.5 und der allgemeinen Ratengleichung 1-56 an. Die effektive Korrelationszeit verdeutlicht, welche dynamischen Prozesse zur Modulation der Wechselwirkung nötig sind. Sie ist zur Konstruktion der in Kapitel 1.6 aufgeführten speziellen spektralen Dichtefunktionen nötig.

Tab.1.4 Übersicht der Spin-Gitter-Wechselwirkungen mit zugehörigen Kopplungskonstanten und effektiven Korrelationszeiten (vgl. Kapitel 1.6).

Wechselwirkung	Kopplungskonstante [rad·Hz]	effektive Korrelationszeit (vgl. Kapitel 1.6)
Dipol	$D = \sqrt{\frac{4}{3}} \cdot \left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right) \cdot \left(\frac{\gamma_I \gamma_S \hbar}{2r_{IS}^3}\right) \cdot \sqrt{S(S+1)}$	$\tau_R = \frac{1}{6D_R}$ der Rotation
für S = 1/2:	$D = \left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right) \cdot \left(\frac{\gamma_I \gamma_S \hbar}{2r_{IS}^3}\right)$	
CSA	$C = \left(\frac{\gamma_I B_{0\Delta} \sigma}{3}\right) \sqrt{1 + \frac{\Delta \eta^2}{3}}$	$\tau_R = \frac{1}{6D_R}$ der Rotation
Skalar	$K_{SC} = \sqrt{\frac{1}{3}} \cdot J \cdot \sqrt{S(S+1)}$	$\tau_{Austausch} = \frac{1}{k_{Austausch}}$ (skalare R.1.Art)
für S = 1/2:	$K_{SC} = \frac{J}{2}$	$\tau_S = T_1(S), T_2(S)$ (skalare R.2.Art)
Spin-Rotation	$K_{SR} = \sqrt{\left(\frac{C_{ax}^2 + 2C_{rad}^2}{3}\right) \cdot \left(\frac{I_m kT}{2\hbar^2}\right)}$	$\tau_{Sto\beta} = \frac{I_J}{6kT\tau_{Rot}}$
	$I_m =$ Trägheitsmoment	für intermolekulare Stöße
	$C =$ Spin-Rotations-Kopplung	
Quadrupol	$Q = \frac{\sqrt{3}}{8} \left(\frac{e^2 \mu_q q}{\hbar}\right) \cdot \sqrt{\left(1 + \frac{\Delta \eta^2}{3}\right)}$	$\tau_R = \frac{1}{6D_R}$ der Rotation
	$\mu_q =$ Kernquadrupolmoment	
	$q =$ elektr. z-Feldgradient	
	$\eta =$ Asymmetrieparam. des E-Feldes	

I = relaxierender Spin, S = gekoppelter Spin. Die paramagnetische Kopplung ist hier aufgrund der komplizierten Abhängigkeit von der Elektronenrelaxation nicht berücksichtigt.

1.5 Relaxationsraten

1.5.1 Berechnung von Relaxationsraten

Die Relaxationsraten entsprechenden Redfield-Matrixelemente (vgl. 1.3.5) werden analog zur spektralen Dichte (vgl. 1.3.3) in die **Relaxationsbeiträge** $\Gamma^{w/w'}$ aufgrund einzelner korrelierter Wechselwirkungen (Relaxationsmechanismen) w und w' unterteilt:

$$R_{\alpha\alpha'\beta\beta'} = \sum_{w,w'} \Gamma_{\alpha\alpha'\beta\beta'}^{w/w'} \quad [1.60]$$

Der Einsatz der isotropen spektralen Dichte (Gl.1.45) in die Definitionsgleichung der Redfield-Matrixelemente (Gl.1.33) liefert *Relaxationsbeiträge der allgemeinen Form*

$$\Gamma_{\delta}^{w/w'} = \frac{1}{2} \cdot |K^w K^{w'}| \cdot \sum_{i(\delta)} a_i^{w/w'} \cdot J^{w/w'}(\omega_i) \quad [1.61]$$

Die Faktoren und Indizes erklären sich wie folgt:

Indizes w und w' bezeichnen Paare korrelierter Spin-Gitter-Wechselwirkungen (Kopplungen), d.h. den betrachteten Relaxationsmechanismus (z.B. Dipol-Dipol-Relaxation).

K^w und $K^{w'}$ sind die in Kapitel 1.4 ausführlich behandelten Kopplungskonstanten, d.h. Amplituden der korrelierten Spin-Gitter-Wechselwirkungen.

Der **Index i** bezeichnet die möglichen Übergangsfrequenzen ω_i , die im betrachteten Redfield-Matrixelement (Gl.1.33), d.h. in der betrachteten Relaxationsrate, auftreten. Index i ist abhängig von Index δ .

Index δ bezeichnet den Relaxationsverlauf zwischen den betrachteten Ausgangs- und End-Spinzuständen, also Polarisationen wie z.B. I_z oder Kohärenzen wie z.B. I_x . Der End-Spinzustand hängt vom Relaxationsmechanismus (d.h. der Art der korrelierten Spin-Gitter-Wechselwirkungen) und davon ab, ob eine Auto- oder eine Kreuzrelaxation betrachtet wird (vgl. Kapitel 1.3.3 und 1.3.5). Bei autokorrelierten Spin-Gitter-Wechselwirkungen ($w = w'$) sind Ausgangs- und Endzustand identisch (z.B. $I_x \rightarrow I_x$), wobei im Fall der Kreuzrelaxation, die nur für Polarisationen möglich ist, der empfangende Spin ein anderer ist (z.B. $I_z \rightarrow S_z$). Bei kreuzkorrelierten Spin-Gitter-Wechselwirkungen ($w \neq w'$) entspricht der Endzustand ebenfalls dem Ausgangszustand bis auf die Möglichkeit, daß ein gekoppelter Spinzustand erreicht wird (z.B. $I_x \rightarrow 2I_x S_z$ oder $I_z \rightarrow 2I_z S_z$).

Der Faktor a_i ist der Eigenwert aus dem Spinanteil (Kapitel 1.3.3 und Gl.1.49)

Die **spektrale Dichte** $J^{w/w'}(\omega)$ beschreibt die Auto- bzw. Kreuzkorrelation von Paaren von Spin-Gitter-Kopplungen K^w und $K^{w'}$ bzw. deren Einheitsvektoren und ist in Gl. 1.42 (Kapitel 1.3.3) definiert

1.5.2. Besonderheiten der Kreuzkorrelationen

Bei der *Kreuzkorrelation* zweier verschiedener Spin-Gitter-Kopplungen K^w und $K^{w'}$ wird ein lokales Feld B^w durch Interferenz mit einem zweiten Feld $B^{w'}$ moduliert (Kapitel 1.3.4) *und umgekehrt*. Wegen dieser Reziprozität treten die Beiträge $\Gamma^{w/w'}$ in der Gesamtrate R *zweimal* auf. Bei der *Autokorrelation* ($w = w'$) sind beide Felder identisch und dürfen daher in der Gesamtrate R nur *einfach* gewertet werden.

Die spektrale Dichte der Kreuzkorrelation w/w' kann, *falls* derselbe modulierende Bewegungsmechanismus wirksam ist, aus derjenigen der Autokorrelation w/w durch Multiplikation mit dem *Ordnungsparameter der Kreuzkorrelation* $S^{w/w'}(\theta)$ erhalten werden (die Erklärungen hierzu erfolgen in Kapitel 1.6):

$$J^{w/w'}(\omega_i) = S^{w/w'}(\theta) \cdot J^{w/w}(\omega_i) \quad [1.62]$$

θ ist der Winkel zwischen den Einheitsvektoren, die die Spin-Gitter-Kopplungen K^w und $K^{w'}$ beschreiben (vgl. Gl.1.42).

Die Ausführungen in Kapitel 1.4.3. haben gezeigt, daß die Kreuzkorrelation im Gegensatz zur Autokorrelation *invertiert* werden kann.

Mit diesen drei Besonderheiten nehmen die Kreuzkorrelationsanteile die spezielle Form

$$\Gamma_{\delta}^{w/w'} = \pm S^{w/w'}(\theta) \cdot |K^w K^{w'}| \cdot \sum_{i(\delta)} a_i^{w/w'} \cdot J^{w/w(\text{auto})}(\omega_i) \quad [1.63]$$

an, in der im Vergleich zur allgemeinen Form 1.61 der Faktor $1/2$ durch $S^{w/w'}(\theta)$ ersetzt ist. Sie dürfen jetzt in der Summe 1.60 für die Gesamtrelaxationsraten ebenso wie die Autokorrelationen nur noch einfach gewertet werden!

Es wird nochmals betont, daß Kreuzkorrelation im Gegensatz zur Autokorrelation zu gekoppelten Spinzuständen führen *kann* (vgl. 1.3.3 und 1.5.1). Dies hat dann *multiexponentielle* Relaxation zur Folge [19].

1.5.3 Relaxationsraten des isolierten IS-1/2-Spinsystemes mit axialsymmetrischem CSA-Tensor

Im *isolierten* IS-Spinsystem ($I, S = 1/2$) mit chemischer Verschiebungsanisotropie CSA(I) des betrachteten Spins I sind im Regelfall die IS-Dipol- und I-CSA-Wechselwirkungen entscheidend. Sie liefern die entsprechenden Relaxationsanteile Γ^D und Γ^{CSA} . Wenn der

betrachtete Spin I ein Quadrupolmoment besitzt ($I > 1/2$), dominiert quadrupolare Relaxation; wenn der gekoppelte Spin S ein Quadrupolmoment besitzt, kann die skalare IS-Relaxation bedeutend werden. Dieser Fall liegt z.B. für die ^{15}N -Relaxation in $^{15}\text{N}^2\text{H}$ -Gruppen vor, da die Deuteriumrelaxation aufgrund des Quadrupol-Kopplungsmechanismus sehr rasch verläuft [20]. Bei paramagnetischer Verunreinigung tritt in der Regel dieser Relaxationsmechanismus in den Vordergrund.

Bei *axialer* Symmetrie des CSA-Tensors und wegen der gleichen Modulation der dipolaren und CSA-Kopplungen durch die Molekülrotation kann hier mit einer einzigen spektralen Dichtefunktion gerechnet werden (Gl.1.62), wenn die Molekülrotation *isotrop* ist. In diesem Modellsystem setzen sich die Gesamtrelaxationsraten für Spin I nach Gl.1.60 wie folgt zusammen:

$$\begin{aligned} R_1(I_z) &\equiv R(I_z) = \Gamma^D(I_z) + \Gamma^{\text{CSA}}(I_z) \pm \Gamma^{\text{D/CSA}}(I_z \rightarrow 2I_z S_z) \\ R_2(I_x) &\equiv R(I_x) = \Gamma^D(I_x) + \Gamma^{\text{CSA}}(I_x) \pm \Gamma^{\text{D/CSA}}(I_x \rightarrow 2I_x S_z) \\ \sigma_{\text{IS}} &\equiv R(I_z \leftrightarrow S_z) = \Gamma(I_z \leftrightarrow S_z) \end{aligned} \quad [1.64]$$

Durch periodische Inversion der $\Gamma^{\text{D/CSA}}$ -Kreuzkorrelation (vgl. 1.4.3), die zu gekoppelten Zuständen und multiexponentieller Relaxation führt, läßt sich dieser Relaxationsmechanismus experimentell unterdrücken. Kreuzrelaxation σ_{IS} kann durch kontinuierliche Sättigung des gekoppelten Spins S unterbunden werden. Dies ist Voraussetzung für *mono*-exponentielle R_1 -Relaxation (vgl.1.3.5) und wird nachfolgend immer vorausgesetzt!

Neben den Ein-Spin-Zuständen I_x und I_z (Analoges gilt für S) sind im selben IS-System auch die gekoppelten Zwei-Spin-Zustände $2I_x S_x$, $2I_x S_z$ und $2I_z S_z$ möglich, deren Gesamtrelaxationsraten sich wie für R_1 bzw. R_2 in Gl.1.64 bei Vernachlässigung der $\Gamma^{\text{D/CSA}}$ -Kreuzkorrelation nur aus den entsprechenden beiden Autokorrelationsbeiträgen Γ^D und Γ^{CSA} zusammensetzen.

Tabelle 1.5 listet auf, wie sich die partiellen Relaxationsraten $\Gamma(I)$ der Paare korrelierter Kopplungen im isolierten IS-Spinsystem ($I, S = 1/2$) unter Annahme eines *axial-symmetrischen* CSA-Tensors (mit Winkel θ bezüglich des IS-Verbindungsvektors) aus den spektralen Dichtewerten bei bestimmten Übergangsfrequenzen aufbauen. Zur Vollständigkeit sind auch Relaxationsraten für skalare (SC) und Quadrupol-Kopplung (Q) angegeben. Die allgemeine Formel Gl.1.61 bzw. 1.63 für Kreuzkorrelationen liegt zugrunde. Die tabellierten Wichtungsfaktoren der spektralen Dichtewerte entsprechen den Eigenwerten a_i aus den Spinanteilen. Nach Tab.1.5, erste Zeile, berechnet sich z.B. der longitudinale Relaxationsanteil aufgrund der Dipol-Dipol-Autokorrelation $\Gamma^D(I_z)$ zu:

$$\Gamma^D(I_z) = \frac{1}{2} D^2 \cdot \{6 \cdot J(\omega_I) + 2 \cdot J(\omega_I - \omega_S) + 12 \cdot J(\omega_I + \omega_S)\} \quad [1.65]$$

Die Formeln sind nur dann konsistent, wenn die in Tab.1.4 tabellierten Ausdrücke für die Kopplungskonstanten und die in Kapitel 1.6.2 beschriebene spektrale Dichtefunktion

$$J(\omega) = \frac{2}{5} \cdot \frac{\tau_R}{1 + \omega^2 \tau_R^2} \text{ der isotropen Molekülrotation eingesetzt werden!}$$

Im *homonuklearen* IS-Spinsystem reduziert sich wegen $\omega_I \approx \omega_S$ die Anzahl der Übergangsfrequenzen formal auf maximal 3. Es gilt dann $J(\omega_I) = J(\omega_S)$ und $J(\omega_I - \omega_S) = J(0)$ und die Vorfaktoren a_i sind entsprechend unter *einem* spektralen Dichtewert zu addieren.

Die Relaxationsraten in Tab.1.5 verdeutlichen die in Kapitel 1.3.3 und 1.3.5 angesprochenen Besonderheiten der einzelnen Relaxationsbeiträge Γ :

- Prinzipiell tritt der Ein-Quanten-Übergang des betrachteten Spins I auf (Übergangsfrequenz ω_I) außer beim skalaren Relaxationsmechanismus
- Nur bei der Relaxation von Kohärenzen tritt der adiabatische Relaxationsanteil (vgl.1.3.5) mit $J(0)$ -Abhängigkeit auf. Im homonuklearen IS-Spinsystem kann die Identität $J(\omega_I - \omega_S) = J(0)$ allerdings auch für Populationen formal zur $J(0)$ -Abhängigkeit führen (s.o.). Nur für die *Multiquantenkohärenz* $2I_x S_x$, entfällt die relaxationsdominante $J(0)$ -Abhängigkeit (vgl. aber Mehrspin-Effekte, Kapitel 1.5.4)
- Die *bilinearen* dipolaren, skalaren und (quadratischen) Quadrupol-Kopplungen (vgl.1.3.3) ermöglichen die weiteren Übergänge um ω_S und $\omega_I \pm \omega_S$, jedoch nur im Fall der Autokorrelation. Nur diese Kopplungen führen zur Kreuzrelaxation.

Die in Tab. 1.5 angegebenen Partialraten der Ein-Spin-Zustände gelten weitgehend für **^{15}N in Peptidgruppen** ($S = \text{H}^{\text{N}}$) und für **$^{13}\text{C}^\alpha$ in Aminosäuren** mit natürlicher ^{13}C -Häufigkeit ($S = \text{H}^\alpha$). In beiden Fällen ist der CSA-Tensor (vgl.Tab.1.3) axialsymmetrisch, so daß bei isotroper Molekülrotation dieselbe spektrale Dichte für Dipol- und CSA-Relaxationsmechanismen angenommen werden können. Die Hauptachsen verlaufen in guter Näherung parallel zum dipolaren D_{XH} -Kopplungsvektor, so daß auch bei anisotroper Molekülrotation angenähert dieselbe spektrale Dichte gilt. Bei ^{15}N liegt die Winkelabweichung bei ca. $10^\circ - 20^\circ$ [21], so daß der Ordnungsparameter $S^{\text{D/CSA}} = P_2(\cos\theta)$ für die $\Gamma^{\text{D/CSA}(^{15}\text{N})}$ -Kreuzkorrelation ca. 0.9 beträgt.

Tab.1.5 Berechnung partieller Relaxationsraten $\Gamma(I)$ (in Hz) im IS-Spinsystem ($I = \text{betrachteter } 1/2\text{-Spin}$, $S = \text{gekoppelter } 1/2\text{-Spin}$) mit axialsymmetrischem CSA-Tensor.

	$1/2 \cdot \mathbf{K}^w \mathbf{K}^{w'}$	$\mathbf{J}(0)^{1)}$	$\mathbf{J}(\omega_I)$	$\mathbf{J}(\omega_I - \omega_S)$	$\mathbf{J}(\omega_S)$	$\mathbf{J}(\omega_I + \omega_S)$
<u>Autokorrelationsraten:</u>						
T ₁ -Typ: $\Gamma^D(I_z)$	$1/2 \cdot D^2$		6	2		12
$\Gamma^{\text{CSA}}(I_z)$	$1/2 \cdot C^2$		6			
$\Gamma^{\text{SC}}(I_z)$	$1/2 \cdot (J/2)^2$			2 ²⁾		
$\Gamma^Q(I_z)^{4)}$	$1/2 \cdot Q^2$		2			8

T ₂ -Typ: $\Gamma^D(I_x)$	$1/2 \cdot D^2$	4	3	1	6	6
$\Gamma^{\text{CSA}}(I_x)$	$1/2 \cdot C^2$	4	3			
$\Gamma^{\text{SC}}(I_x)$	$1/2 \cdot (J/2)^2$	$I^3)$		$I^2)$		
$\Gamma^Q(I_x)^{4)}$	$1/2 \cdot Q^2$	3	5			2

gekoppelte Zustände:						
T ₁ -Typ: $\Gamma^D(2I_z S_z)$	$1/2 \cdot D^2$		6		6	
$\Gamma^{\text{CSA}}(2I_z S_z)$	$1/2 \cdot C^2$		6			

T ₂ -Typ: $\Gamma^D(2I_x S_z)$	$1/2 \cdot D^2$	4	3	1		6
$\Gamma^{\text{CSA}}(2I_x S_z)$	$1/2 \cdot C^2$	4	3			
$\Gamma^D(2I_x S_x)$	$1/2 \cdot D^2$		3	1	3	6
$\Gamma^{\text{CSA}}(2I_x S_x)$	$1/2 \cdot C^2$		3			

<u>Kreuzkorrelationsraten:</u> ⁵⁾	$S^{w/w'} = P_2(\cos\theta)$					
$\Gamma^{\text{D1/D2}}(I_z)$	$\pm S^{\text{D1/D2}} \cdot D_1 \cdot D_2$		6			
$\Gamma^{\text{D1/D2}}(I_x)$	$\pm S^{\text{D1/D2}} \cdot D_1 \cdot D_2$	4	3			
$\Gamma^{\text{D/CSA}}(I_z \rightarrow 2I_z S_z)$	$\pm S^{\text{D/CSA}} \cdot D \cdot C$		6			
$\Gamma^{\text{D/CSA}}(I_x \rightarrow 2I_x S_z)$	$\pm S^{\text{D/CSA}} \cdot D \cdot C$	4	3			

<u>Kreuzrelaxationsraten:</u> ⁶⁾						
$\Gamma^{\text{D1/D2}}(I_z \leftrightarrow S_z)$	$1/2 \cdot D^2$			- 2		12
$\Gamma^{\text{SC1/SC2}}(I_z \leftrightarrow S_z)$	$1/2 \cdot D^2$			- 2		

Kopplungskonstanten \mathbf{K}^w sind nach Tab.1.4 zu berechnen; D = Dipol-Kopplung, C = CSA-Kopplung, weitere Relaxationsmechanismen (SC = skalare, Q = Quadrupol-Kopplung) *kursiv*. Angegebene $\Gamma(I_z)$ -Raten setzen Unterdrückung der IS-Kreuzrelaxation voraus. Für die spektrale Dichte wird Gl.1.65 angenommen. ¹⁾ Bei T₂-Messungen unter Spin-Lock ist $\mathbf{J}(0)$ durch $\mathbf{J}(\omega_{\text{SL}})$ zu ersetzen. ^{2, 3)} Abweichende spektrale Dichtefunktion (vgl. Tab.1.4): ²⁾ $\tau_c = \tau_{\text{Austausch}}$ bzw. = T₂(S); ³⁾ $\tau_c = \tau_{\text{Austausch}}$ bzw. = T₁(S). ⁴⁾ Relaxation ist für $I > 1$ nicht mehr monoexponentiell. ⁵⁾ Das Vorzeichen der Kreuzkorrelationsraten hängt vom S-Spinzustand ab; der Ordnungsparameter $S^{w/w'}$ entspricht bei *isotroper* Bewegung der Kugelfunktion P_2 mit $\theta = \text{starrer Winkel}$ zwischen IS-Dipolvektor und der Hauptachse des *axialsymmetrischen* CSA-Tensors (vgl.1.6.3). ⁶⁾ Kreuzrelaxation tritt nur bei (dipolarer oder skalarer) *Kopplung zwischen zwei Spins* auf.

Die Abweichungen der Gesamtr relaxationsraten von Gl. 1.64 aufgrund von Mehrspineffekten (z.B. Kopplung H^N-H^α) des real nicht völlig isolierten 2-Spinsystemes betragen für ^{15}N ca. 3-4%, für C^α ca. 5-7% [22]. Dieser systematische Fehler ist bei der Fehlerbetrachtung zu berücksichtigen oder durch entsprechende Erweiterung der Gesamtr relaxationsraten um Mehrspin-Terme (vgl. 1.5.4) aufzuheben. Meist wird die systematische Abweichung aber einfach durch entsprechende Erhöhung der dipolaren D_{IS} -Kopplungskonstanten über einen verkürzten effektiven r_{IS} -Bindungsabstand kompensiert. Die Abweichungen sind bei Betrachtung der Relaxation gekoppelter Spinzustände (z.B. $2X_xH_x$) erheblich und Mehrspineffekte (vgl. 1.5.4) müssen berücksichtigt werden.

1.5.4 Relaxationsraten in Multispin-Systemen

Die Gesamtr relaxationsraten für höhere Spinsysteme können nach Tabelle 1.5 aufgebaut werden, indem man das Mehrspinsystem in einzelne IS-Systeme zerlegt und anschließend summiert. Für die Relaxation von $^{13}C'$ der Carbonylgruppe in $[U-^{15}N, ^{13}C]$ -markierten Aminosäuren [23] lauten die Gesamtraten der CSA- und (I-S)Dipol-Autokorrelation:

$$R_{1,2}^{\text{auto}} = \Gamma_{1,2}^{\text{CSA}} + \Gamma_{1,2}^{C'-N} + \Gamma_{1,2}^{C'-C\alpha} + \Gamma_{1,2}^{C'-H\alpha} + \Gamma_{1,2}^{C'-HN} \quad [1.66.a]$$

der CSA/(I-S)Dipol-Kreuzkorrelation:

$$R_{1,2}^{\text{CSA}/C'-S} = \Gamma_{1,2}^{\text{CSA}/C'-N} + \Gamma_{1,2}^{\text{CSA}/C'-C\alpha} + \Gamma_{1,2}^{\text{CSA}/C'-H\alpha} + \Gamma_{1,2}^{\text{CSA}/C'-HN} \quad [1.66.b]$$

der (I-S)Dipol/(I-S')Dipol-Kreuzkorrelation: [1.66.c]

$$R_{1,2}^{C'-S/C'-S'} = \Gamma_{1,2}^{C'-H\alpha/C'-HN} + \Gamma_{1,2}^{C'-H\alpha/C'-C\alpha} + \Gamma_{1,2}^{C'-H\alpha/C'-N} + \Gamma_{1,2}^{C'-C\alpha/C'-N} + \Gamma_{1,2}^{C'-C\alpha/C'-HN} + \Gamma_{1,2}^{C'-N/C'-HN}$$

und der $I \leftrightarrow S$ Kreuzrelaxation:

$$R(C'_z \leftrightarrow S_z) = \Gamma^{C' \leftrightarrow H\alpha} + \Gamma^{C' \leftrightarrow HN} + \Gamma^{C' \leftrightarrow C\alpha} + \Gamma^{C' \leftrightarrow N} \quad [1.66.d]$$

Diese Ausdrücke gelten für einen axialsymmetrischen CSA-Tensor. Für $^{13}C'$ ist der CSA-Tensor jedoch stark anisotrop und erfordert umfangreiche Korrekturen an den Relaxationsraten zur Berücksichtigung der Mischung verschieden orientierter spektraler Dichtefunktionen entsprechend den 3 Hauptachsen des CSA-Tensors [23].

Mehrspin-Effekte führen im IS-Spinsystem auch für die Multiquantenkohärenz $2I_xS_x$ wieder zu adiabatischen $J(0)$ -Beiträgen. Im $^{15}N-H^N$ -System koppelt das H^N -Proton z.B. mit weiteren Protonen H_i . Für $2N_xH_x^N$ lautet dann die Gesamtr relaxationsrate:

$$R(2N_xH_x^N) = \Gamma^{N-HN}(2N_xH_x^N) + \Gamma^{\text{CSA}}(2N_xH_x^N) + \sum_i \Gamma^{HN-Hi}(H_x^N) \quad [1.67]$$

Für die Relaxationsbeiträge $\Gamma^{\text{HN-Hi}}(\text{H}_x^{\text{N}})$ aufgrund dipolarer Kopplung zwischen den Protonen kann der in Tab.1.5 aufgeführte Ausdruck für $\Gamma^{\text{D}}(\text{I}_x)$ eingesetzt werden mit $\text{I} = \text{H}^{\text{N}}$ und $\text{S} = \text{H}_i$ (*homonuklearer Fall*). Diese Terme führen erneut zur $J(0)$ -Abhängigkeit.

Die ^{15}N -Relaxation in den **NH₂-Amidgruppen** der Seitenketten von Asparagin und Glutamin läßt sich analog verstehen [24]. Eine ausführliche Behandlung der dipolaren Relaxation in Multispin-Systemen findet sich in [25].

1.5.5 Rückrechnung und Aufzeichnung der spektralen Dichtewerte

Die hergeleiteten Ratenausdrücke erlauben die Rückrechnung der spektralen Dichtewerte bei diskreten Übergangsfrequenzen, $J(\omega_i)$, aus den gemessenen *Gesamt*-Relaxationsraten, wenn alle beitragenden Relaxationsmechanismen (Γ_i) bekannt sind und auf die Unterdrückung von Kreuzrelaxation und kreuzkorrelierter Relaxation (beide führen zu multiexponentieller Relaxation) geachtet wird.

Bei n Übergangsfrequenzen des gekoppelten Spinsystemes müssen zur eindeutigen Rückrechnung der n spektralen Dichtewerte $J(\omega_i)$ auch mindestens n unterschiedliche Relaxationsraten bestimmt werden. Dann ist die Aufzeichnung aller n möglichen spektralen Dichtewerte vollständig (*full spectral density mapping*) [26-28]. Oft kann man die n diskreten Übergangsfrequenzen ω_i in ($m < n$) Frequenzbänder zusammenfassen, wenn man annimmt, daß sich die spektrale Dichte innerhalb dieser Frequenzbänder nicht erheblich ändert. Diese Annahme ist umso besser erfüllt, je dichter einzelne Übergangsfrequenzen beieinander liegen. Dann kann zur Rückrechnung der spektralen *Frequenzband*-Dichtewerte die Anzahl der zu messenden unabhängigen Relaxationsraten auf ($m < n$) reduziert werden (*reduced spectral density mapping*) [29, 30].

Im Falle des praktisch wichtigsten isolierten 2-Spin-1/2-Systemes existieren 5 Übergangsfrequenzen. Für das isolierte ^{15}N - ^1H -Spinsystem lassen sich diese aufgrund des großen $\gamma_{\text{H}}/\gamma_{\text{N}}$ -Verhältnisses (≈ -10) in sehr guter Näherung zu 3 Frequenzbändern $\{\omega_0\}$, $\{\omega_{\text{N}}\}$ und $\{\omega_{\text{H-N}}, \omega_{\text{H}}, \omega_{\text{H+N}}\}$ zusammenfassen. Für das isolierte ^{13}C - ^1H -Spinsystem jedoch ist diese Reduktion aufgrund des viel kleineren $\gamma_{\text{H}}/\gamma_{\text{C}}$ -Verhältnisses (≈ 4) problematisch.

1.6 Formalismus zur Beschreibung statistischer Bewegung

Der Vergleich der rückgerechneten spektralen Dichtewerte (vgl.1.5.5) über die Proteinsequenz (*spectral density mapping*) zeigt an, für welche Reste *lokale* dynamische Prozesse mit Frequenzanteilen bei den jeweiligen Übergangsfrequenz vorliegen; die spektrale Dichte ist dann relativ erhöht. Um diese statistischen dynamischen Prozesse mit Hilfe *dynamischer Parameter* quantifizieren zu können, ist die *simultane Anpassung* aller gemessenen spektralen Dichtewerte an entsprechend parametrisierte *kontinuierliche Modellfunktionen* erforderlich. In diesem Kapitel werden Modelle von Korrelationsfunktionen und spektrale Dichtefunktionen für *explizite* Bewegungen und für generalisierte dynamische Prozesse beschrieben.

1.6.1 Grundlagen

Die Korrelationsfunktion $C(\tau)$ zur Beschreibung des Ordnungsverlustes zwischen Paaren statistisch modulierter Spin-Gitter-Wechselwirkungen (w, w') wurde in Gl.1.42 definiert:

$$C^{w/w'}(\tau) = \overline{\mu^w(t) \cdot \mu^{*w'}(t-\tau)} = \overline{\mu^w(0) \cdot \mu^{*w'}(\tau)} \quad [1.68]$$

Die Kopplungskonstanten wurden ausgeklammert, so daß die Korrelation nur von der Reorientierung der zugehörigen Einheitsvektoren $\vec{\mu}^w$ abhängt. Die Vektoren sind hier als komplexe Zahlen dargestellt ($\vec{\mu}^w = \mu^w$); der Realteil des Produktes einer komplexen mit einer komplex-konjugierten Zahl entspricht dem *Skalarprodukt* (vgl.1.3.4). Der Anfangszeitpunkt t der Betrachtung und das Vorzeichen von τ sind bei homogenen statistischen Bewegungen belanglos.

Die Korrelationsfunktion $C(\tau)$ gibt bei *Autokorrelation* ($w = w'$) die *Wahrscheinlichkeit* dafür an, einen Vektor nach der Dauer τ unverändert im Ausgangszustand anzutreffen. $C(\tau)$ kann daher nur Werte zwischen 0 und 1 einnehmen:

- Für $C(\tau) = 1$ sind Ausgangs- und Endorientierung von $\vec{\mu}^w$ identisch und es hat keine Reorientierung stattgefunden. Immer gilt daher $C(0) = 1$.
- Für $C(\tau) = 0$ besteht keinerlei Zusammenhang zwischen Ausgangs- und Endorientierung von $\vec{\mu}^w$ mehr und die Bewegungen sind völlig regellos.

Der zeitliche Verlauf von $C(\tau)$ hängt von der Art der zugrundeliegenden Bewegung ab. Für *diffusive (dispersive) statistische Bewegungen* sinkt $C(\tau)$ stetig auf einen Grenzwert ab. Eine Zunahme von $C(\tau)$ entspräche einer Entropieabnahme und ist unwahrscheinlich. Die Korrelationsfunktionen derartiger diffusiver oder sprunghafter statistischer (*Markov-artiger*) Bewegungen sind *Summen von Exponentialfunktionen*:

$$C_{\text{Markov}}(\tau) = a_0 + \sum_{i=1} a_i \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_i}\right) \quad [1.69]$$

Die Zeitkonstanten der überlagerten Bewegungsmoden i heißen *Korrelationszeiten* τ_i . Der Grenzwert $C(\tau \rightarrow \infty)$ ist der *quadratische Ordnungsparameter* S^2 , z.B.

$$\lim_{\tau \rightarrow \infty} C_{\text{Markov}}(\tau) \equiv S_{\text{Markov}}^2 = a_0 \quad [1.70]$$

Im Grenzfall $\tau \rightarrow \infty$ (*statistisches Gleichgewicht*) zerfällt $C(\tau)$ in das Produkt der mittleren Vektororientierungen

$$\lim_{\tau \rightarrow \infty} C(\tau) = \lim_{\tau \rightarrow \infty} \overline{\vec{\mu}^w(0) \cdot \vec{\mu}^{*w'}(\tau)} = \overline{\vec{\mu}^w(0)} \cdot \overline{\vec{\mu}^{*w'}(\infty)} \equiv S^2 \quad [1.71]$$

S^2 entspricht also dem komplexen Produkt zwischen *mittlerer* Ausgangs- und Endorientierung des betrachteten Vektors $\vec{\mu}^w$. S^2 ist daher ein *Maß für die räumliche Beschränkung statistischer Bewegungen* und nimmt Werte zwischen 0 und 1 ein. $S^2 = 1$ bedeutet, daß der Vektor keine Auslenkung erfährt, d.h. seinen Winkel nicht verändert. Für $S^2 = 0$ sind Anfangs- und Endorientierung statistisch unabhängig (*unkorreliert*), die mittlere Winkelauslenkung des Vektors ist 90° . Bei diesem *magischen* Winkel θ_{magisch} verschwindet also der Grenzwert der Korrelationsfunktion. Bei quantenmechanischer Betrachtung der Vektor-Rotation (vgl.1.6.2) weicht θ_{magisch} abhängig vom Bewegungsmodell von 90° ab (vgl.Tab.1.5). Die Differenz $1-S^2$ kann als Maß für die Winkelamplitude statistischer Bewegungen interpretiert werden.

Der Ausgangswert der Korrelationsfunktion

$$C^{w/w'}(0) \equiv S^{w/w'} \leq 1 \quad [1.72a]$$

ist nur dann gleich eins, wenn die korrelierten Vektoren $\vec{\mu}^w$ und $\vec{\mu}^{w'}$ *parallel* sind. Dies gilt bei *Autokorrelation* (mit $w = w'$) aufgrund der Identität der korrelierten Vektoren immer. Im Fall der *Kreuzkorrelation* (mit $w \neq w'$) muß man hingegen die statistische Winkelverteilung der korrelierten Vektoren über das Ensemble auch bei *identischem* Beobachtungszeitpunkt (d.h. $\tau = 0$) durch einen weiteren Ordnungsparameter $S^{w/w'}$ berücksichtigen. Da diese Ensemble-Winkelverteilung ihrerseits durch statistische Bewegungen hervorgerufen werden, gelten die für den *quadratischen* Ordnungsparameter S^2 der Bewegung gemachten Aussagen (s.o.) sowie die in Tab.1.6 aufgelisteten modellabhängigen Parameter auch für den *nicht quadratischen* Ordnungsparameter $S^{w/w'}$ der Kreuzkorrelation. Mit ihm läßt sich bei *identischen* statistischen Modulationsprozessen (i.d.R. *isotrope* Bewegungen) für die Orientierungen beider Vektoren $\vec{\mu}^w$ und $\vec{\mu}^{w'}$ die *Kreuzkorrelations-* durch die *Autokorrelationsfunktion* substituieren:

$$C^{w/w'}(\tau) = S^{w/w'} \cdot C^{w/w}(\tau) \quad [1.72b]$$

Die Fouriertransformierte der Korrelationsfunktion ist die zugehörige *spektrale Dichte*:

$$J^{w/w'}(\omega) = 2 \cdot \int_0^{\infty} \overline{\mu^w(0) \cdot \mu^{*w'}(\tau) \exp(i\omega\tau)} d\tau \quad [1.73]$$

Für *Markov*-artige Prozesse, deren Korrelationsfunktionen Summen von Exponentialfunktionen sind (Gl.1.69), erhält man für die (*realen*) spektralen Dichten Summen von Lorentzfunktionen:

$$J_{Markov}(\omega) = 2 \cdot \int_0^{\infty} [C_{Markov}(\tau) - a_0] \cos(\omega\tau) d\tau = 2 \cdot \sum_{i=1} \frac{a_i \tau_i}{1 + (\omega\tau_i)^2} \quad [1.74]$$

Längenänderungen von $\vec{\mu}^w$ können prinzipiell ähnlich behandelt werden, wenn die Kopplungskonstanten um die Distanzabhängigkeit reduziert werden, beispielsweise für dipolare Wechselwirkungen:

$$J^{D/D'}(\omega) = 2 \cdot \int_0^{\infty} \overline{\frac{1}{r^3(0)} \cdot \frac{1}{r^3(\tau)} \exp(i\omega\tau)} d\tau \quad \text{und} \quad D' = \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right) \cdot \left(\frac{\hbar \gamma_I \gamma_S}{2} \right) \quad [1.75]$$

Bewegungen unter Längenänderungen spielen zur Modulation von Spin-Gitter-Wechselwirkungen für die Relaxation jedoch meist nur eine untergeordnete Rolle (vgl. 1.4.1, 1.4.2 und Tabelle 1.4) und werden nachfolgend vernachlässigt.

1.6.2 Isotrope Molekülrotation

Die Korrelationsfunktion der *isotropen* Molekülrotation leitet sich von der Aufenthaltswahrscheinlichkeit eines längentreuen Quantenvektors auf der Einheitskugel ab. Die Lösung der zugehörigen Schrödinger-Gleichung ist die Kugelfunktion 2.Ordnung, P_2 :

$$P_2(\cos \theta) = \frac{1}{2} (3 \cos^2 \theta - 1) \quad [1.76]$$

Die Rotations-Korrelationsfunktion ist dann

$$C_R(\tau) = \overline{\vec{\mu}(0) \cdot \vec{\mu}(\tau)} = \overline{P_2(\cos \theta(0)) \cdot P_2(\cos \theta(\tau))} \quad [1.77]$$

Bei isotroper statistischer Rotation ist die Winkelverteilungsfunktion $p(\theta(\tau))$ homogen und es ergibt sich eine *monoexponentielle* Korrelationsfunktion:

$$C_R(\tau) = \frac{1}{5} \exp(-6D_R \tau) = \frac{1}{5} \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_R}\right) \quad [1.78]$$

Die charakteristische Zeitkonstante $\tau_R = 1/(6D_R)$ (D_R = Rotationsdiffusionskonstante) ist die **Rotationskorrelationszeit**, oft auch als molekulare Korrelationszeit τ_M bezeichnet. Das Quadrat des Ordnungsparameters ist $C_R(\tau \rightarrow \infty) = S_R^2 = 0$.

Die zugehörige spektrale Dichte $J_R(\omega)$ der isotropen molekularen Rotation lautet

$$2 \int_0^{\infty} C_R(\tau) \cos(\omega\tau) d\tau = J_R(\omega) = \frac{2}{5} \cdot \frac{\tau_R}{1 + \omega^2 \tau_R^2} \quad [1.79]$$

Die Unterschiede zwischen $J_R(\omega)$ und der allgemeinen Form (Gl.1.74) sind der Normierungsfaktor $1/5$ und der explizite Ausdruck $\tau_R = 1/(6D_R)$ für die Korrelationszeit.

1.6.3 Explizite Bewegungsmodelle und zugehörige Dynamikparameter

Für *explizite* Bewegungsmodelle lassen sich analytische Korrelationsfunktionen aufstellen und *exakte Dynamikparameter* (Ordnungsparameter S der Kreuzkorrelation bzw. quadratischer Ordnungsparameter S^2 der Bewegung und Korrelationszeiten, vgl. 1.6.1) angeben. Tabelle 1.6 faßt wichtige Beispiele für explizite Bewegungsmodelle zusammen.

Tab.1.6 Wichtige explizite Bewegungsmodelle und zugehörige Dynamikparameter.

Bewegungsmodell	Dynamikparameter
Freie isotrope Rotation (vgl.1.3.2.)	$S_R^2 = 0$ $\tau_R = 1/6D_R$
Axialsymmetrische Rotation auf Kegel mit Öffnungswinkel β ^[13] .	$S_W^2 = [P_2(\cos \beta)]^2 = \left[\frac{3\cos^2 \beta - 1}{2} \right]^2$ $\tau_W = \frac{3}{D_W} \sin^2 \beta \left(\cos^2 \beta + \frac{1}{16} \sin^2 \beta \right)$ $\beta_{\text{magisch}} = \arctan(\sqrt{2})$
Freie Diffusion im Kegel mit Öffnungswinkel β (<i>wobbling in a cone</i>) ^[12]	$S_C^2 = \left[\frac{1}{2} \cos \beta (1 + \cos \beta) \right]^2$ mit $\beta_{\text{magisch}} = \frac{\pi}{2}, \pi$ τ_C hängt von Diffusionskonstante D_C und β ab.
Sprungmodell für diskrete Positionen ^[12]	numerische Lösungen für S^2 und τ_{eff}

1.6.4 Modellfreie Näherung für unbekannte $C(\tau)$

Die *exakte* Wiedergabe der Korrelationsfunktion unbekannter *diffusiver* Bewegungen erfordert nach *Markov* (Gl.1.69) beliebig viele Dynamikparameter (a_i, τ_i). Diese Reihenentwicklung läßt sich jedoch durch nur einen einzigen Exponentialterm annähern ^[12, 31], so daß zur Definition dieser *modellfrei* (d.h. unabhängig von Bewegungsmodellen) *genäherten* Korrelationsfunktion $C^{\text{app}}(\tau)$ nur zwei *generalisierte* Dynamikparameter, der quadratische Ordnungsparameter S^2 und die effektive Korrelationszeit τ_{eff} , nötig sind:

$$C^{\text{app}}(\tau) = S^2 + (1 - S^2) \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_{\text{eff}}}\right) \quad [1.80]$$

Die zugehörige spektrale Dichte $J^{\text{app}}(\omega)$ zu $[C^{\text{app}}(\tau) - S^2]$ ist die Lorentzkurve

$$2 \int_0^{\infty} [C^{\text{app}}(\tau) - S^2] \cos(\omega\tau) d\tau = J^{\text{app}}(\omega) = 2 \frac{(1 - S^2) \tau_{\text{eff}}}{1 + \omega^2 \tau_{\text{eff}}^2} \quad [1.81]$$

τ_{eff} wird über die Forderung nach identischen Integralen für die tatsächliche $C(\tau)$ und die genäherte $C^{\text{app}}(\tau)$ erhalten (Normierungsbedingung):

$$\int_0^{\infty} [C^{\text{app}}(\tau) - S^2] d\tau = (1 - S^2) \tau_{\text{eff}} \equiv \int_0^{\infty} [C(\tau) - S^2] d\tau \quad [1.82]$$

τ_{eff} ist daher abhängig von $S^2 = C^{\text{app}}(\tau \rightarrow \infty)$, was dem *Markov*-Ordnungsparameter a_0 entspricht. Die Bestimmtheit von S^2 hängt wiederum von τ_{eff} ab, denn τ_{eff} ist die Referenz-Korrelationszeit, bezüglich derer sich die *Markov*-Reihe (Gl.1.69) in Terme mit $\tau_j < \tau_{\text{eff}}$ und Terme mit $\tau_k > \tau_{\text{eff}}$ zerlegen läßt. Letztere fallen langsamer gegen Null und tragen u.U. zum scheinbaren Grenzwert $S^2 \approx C^{\text{app}}(\tau \gg \tau_{\text{eff}})$ bei.

Die modellfreie Korrelationsfunktion ist unabhängig von der Art der diffusiven statistischen Bewegung. Die Näherungsfehler bestehen jedoch darin, daß mehrere mögliche Bewegungsmoden unterschiedlicher Frequenz nicht aufgelöst, sondern in *einem* Modus zusammengefaßt werden. Im Grenzfall $\tau_{\text{eff}} \rightarrow 0$ (*extreme narrowing limit*) vereinfacht sich $J^{\text{app}}(\omega)$ (Gl.1.81) zu:

$$\lim_{\tau_{\text{eff}} \rightarrow 0} J^{\text{app}}(\omega) = 2(1 - S^2) \tau_{\text{eff}} \equiv 2 \int_0^{\infty} [C(\tau) - S^2] d\tau \quad [1.83]$$

Nur dann ist $J^{\text{app}}(\omega) = J(\omega)$, d.h. die Näherung $C^{\text{app}}(\tau)$ geht in die tatsächliche, unbekannte $C(\tau)$ über. Mit zunehmender τ_{eff} nimmt die Wahrscheinlichkeit der Übereinstimmung zwischen $C^{\text{app}}(\tau)$ und $C(\tau)$ ab. Dies hat primär keine Konsequenzen für die generalisierten Dynamikparameter S^2 und τ_{eff} , führt aber zu höheren Fehlern bei der Rückrechnung der *expliziten* (vgl. Tab.1.6) aus den *generalisierten* (modellunabhängigen) Dynamikparametern. Für ihre Interpretation gilt:

- Der *generalisierte quadratische Ordnungsparameter* S^2 ist ein *modellunabhängiges* Maß für die räumliche Beschränkung bzw. die Winkel-Amplitude statistischer Bewegungen.
- Die *effektive Korrelationszeit* τ_{eff} hängt gemäß der Definitionsgleichung 1.61 sowohl von den tatsächlichen Korrelationszeiten als auch von der räumlichen Ausdehnung der statistischen Bewegungen ab. Die Rückführung von τ_{eff} auf tatsächliche Zeitkonstanten bzw. Diffusionskonstanten ist daher im Gegensatz zu S^2 nur *modellabhängig* möglich.

1.6.5 Separationsansatz für überlagerte Korrelationsfunktionen

Die Gesamtkorrelationsfunktion $C_{ges}(\tau)$ überlagerter statistischer Bewegungen lässt sich in das Produkt der Korrelationsfunktionen *unkorrelierter* Bewegungsmoden zerlegen [12]:

$$C_{ges}(\tau) = \prod_i C_i(\tau) \quad [1.84]$$

Die Moden $C_i(t)$ können nun in der Exponentialnäherung (Gl.1.80) dargestellt werden:

$$C_{ges}(\tau) = \prod_i \left[S_i^2 + (1 - S_i^2) \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_i}\right) \right] \quad [1.85]$$

Diese Produktentwicklung ist identisch mit der *Markov-Reihenentwicklung* (Gl.1.69), wenn die Vorfaktoren a_i mit den generalisierten Ordnungsparameter-Quadraten assoziiert werden. Für zwei Bewegungsmoden lautet die Produktentwicklung [1.86]

$$C_{ges}(\tau) = S_f^2 S_s^2 + S_s^2 (1 - S_f^2) \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_f}\right) + S_f^2 (1 - S_s^2) \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_s}\right) + (1 - S_f^2)(1 - S_s^2) \exp\left(-\tau \frac{\tau_f + \tau_s}{\tau_f \tau_s}\right)$$

Der Index *f* (*fast*) steht hierbei für die schnellere, der Index *s* (*slow*) für die langsamere der beiden Bewegungsmoden ($\tau_f < \tau_s$).

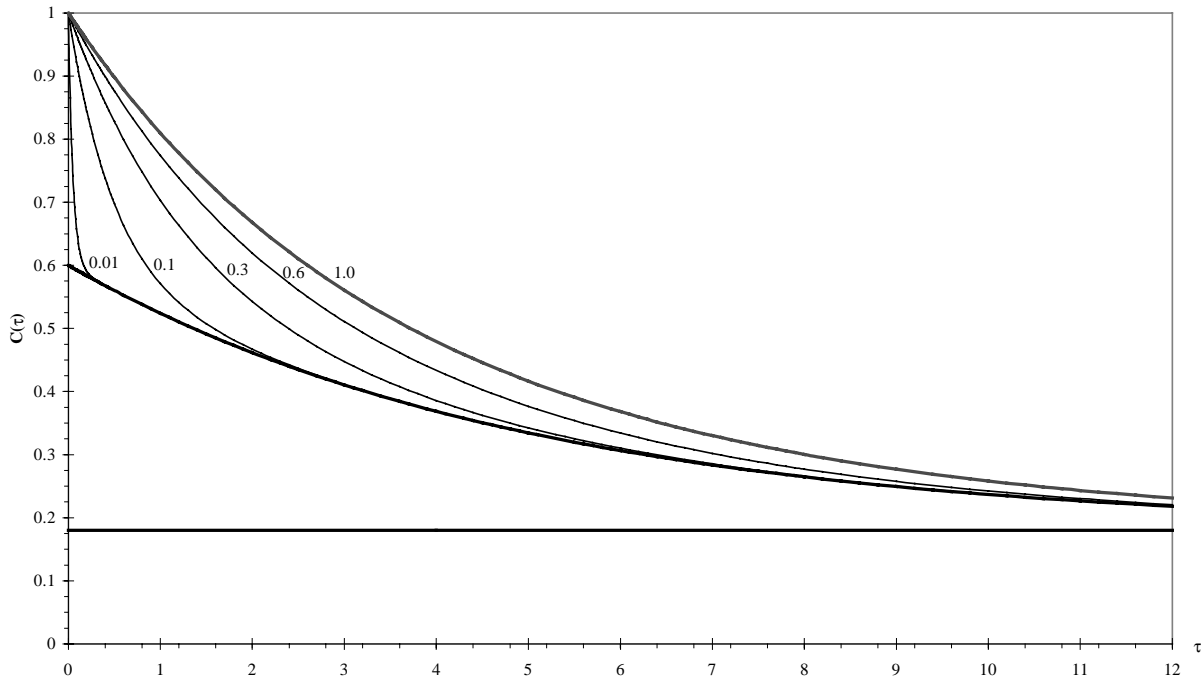


Abb.1.2 Verlauf der Korrelationsfunktion $C_{ges}(\tau)$ für 2 Bewegungsmoden, Gl.1.86, in Abhängigkeit vom angegebenen Verhältnis beider Korrelationszeiten, τ_f/τ_s . Vorgegebene Parameter sind $S_f^2 = 0.6$, $S_s^2 = 0.3$ und $\tau_s = 5$. Die *triexponentiellen* Kurven nähern sich für $\tau_f \ll \tau_s$ (*extreme narrowing limit*) asymptotisch an die *monoexponentielle* Näherungsgleichung Gl.1.87, die gegen den reduzierten Ordnungsparameter $S_f^2 S_s^2 = 0.18$ strebt.

Abb.1.2 zeigt den Verlauf dieser Funktion bei verschiedenen Verhältnissen der beiden Korrelationszeiten, τ_f/τ_s . Im Grenzfall $\tau_f \ll \tau_s$ vereinfacht sich Gl.1.86 zu

$$C_{ges}(\tau) \approx S_f^2 \left[S_s^2 + (1 - S_s^2) \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_s}\right) \right] = S_f^2 C_s(\tau) \quad [1.87]$$

Die rasche Bewegung ist fast sofort auf ihren Ordnungsparameter S_f^2 abgeklungen und trägt nicht mehr zur Gesamtkorrelationsfunktion bei - sie hat das *extreme narrowing limit* ($\tau_f \ll \tau_s$) erreicht. S_f^2 geht jedoch als *Skalierungsfaktor* in die nun monoexponentielle Näherungsfunktion (Gl.1.87) ein, die ansonsten identisch mit der Korrelationsfunktion für die langsamere Bewegung (für $C_s(\tau)$ gilt Gl.1.80) ist. Die Grenzwerte sind $C_{ges}(0) = S_f^2$ und $C_{ges}(\infty) = S_f^2 \cdot S_s^2$. Mit zunehmender Annäherung von τ_f an τ_s nimmt der Fehler, der durch *monoexponentielle* Näherung der Zwei-Moden-Korrelationsfunktion $C_{ges}(\tau)$ eintritt, zu und ist bei $\tau_f = \tau_s$ maximal. Der Fehler entspricht hierbei der Differenz der Zeitintegrale von $C_{ges}(\tau)$ nach Gl.1.86 und der monoexponentiellen Näherungsfunktion 1.87.

Aus Näherung 1.87 folgt direkt, daß eine *unbeschränkte rasche Bewegung* mit $S_f^2 = 0$ den Beitrag der langsameren Bewegung zu $C_{ges}(\tau \gg \tau_f)$ auslöscht. Gl.1.86 nimmt in diesem Fall die biexponentielle Form

$$C_{ges}(\tau, S_f^2 = 0) = S_s^2 \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_f}\right) + (1 - S_s^2) \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_{eff}}\right) \quad \text{mit} \quad \tau_{eff} = \frac{\tau_f \tau_s}{\tau_f + \tau_s} \quad [1.88]$$

an. Im *extreme narrowing limit* ($\tau_f \ll \tau_s$) wird $\tau_{eff} = \tau_f$ und der Beitrag der langsamen Bewegung zu $C_{ges}(\tau)$ entfällt vollständig. Der umgekehrte Fall der *unbeschränkten langsamen Bewegung* mit $S_s^2 = 0$ führt hingegen nicht zur Auslöschung des schnelleren Bewegungsmodus.

Die Betrachtung für 2 Bewegungsmoden lassen sich auf beliebig viele Bewegungsmoden erweitern. Es gelten die folgenden, wesentlichen Aussagen zum Separationsansatz:

- Weitere Bewegungsmoden können immer dann in $C_{ges}(\tau)$ vernachlässigt werden, wenn sie sich bezüglich der langsamsten Bewegung im *extreme narrowing limit* befinden ($\tau_i \rightarrow 0$). Allerdings gehen die Ordnungsparameter S_i^2 dieser rasch abklingenden Moden als Skalierungsfaktoren ein. Außerhalb des *extreme narrowing limit* nehmen die Fehler bei Vernachlässigung weiterer Moden zu.
- Ein unbeschränkter Bewegungsmodus mit $S_u^2 = 0$ löscht die Beiträge aller *wesentlich* langsameren Bewegungsmoden zur Gesamtkorrelationsfunktion aus. Daher tragen Bewegungen, die *wesentlich* langsamer als die *unbeschränkte Molekülrotation* verlaufen ($\tau_i \gg \tau_R$), nicht zur Spinrelaxation bei (vgl. aber die Linienverbreiterungseffekte

zur entropischen Relaxation, Kapitel 1.7). Ihre Berücksichtigung in $C_{\text{ges}}(\tau)$ ist sinnlos (Überparametrisierung).

- Bewegungsmoden mit $S_i^2 = 1$ haben keine Amplitude und tragen nicht zu $C_{\text{ges}}(\tau)$ bei.

1.6.6 Erweiterung der Näherungsfunktion $C^{\text{app}}(\tau)$

Es ist naheliegend, daß die Näherungsfunktion $C^{\text{app}}(\tau)$ (Gl.1.79) verfeinert werden kann, beispielsweise um ein weiteres Glied bei zusätzlicher Kenntnis des tatsächlichen $C(\tau)$ -Verlaufes um $\tau = 0$ [12]. $C^{\text{app}}(\tau)$ hat dann die Form:

$$C^{\text{app}}(\tau) = A + B \exp(-C\tau) + D \exp(-E\tau) \quad [1.89]$$

Dieser Ansatz wurde erst später [32] aufgegriffen und parametrisiert:

$$C^{\text{app}}(\tau) = S^2 + (1 - S_s^2) \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_f}\right) + (S_s^2 - S^2) \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_s}\right) \quad [1.90]$$

Hierbei steht Index f für eine sehr schnelle Bewegung, die den $C(\tau \approx 0)$ -Verlauf bestimmt und rasch auf ihren Grenzwert S_f^2 abklingt. Der Vergleich mit der Gesamtkorrelationsfunktion für 2 Komponenten f (*fast*) und s (*slow*) (Gl.1.86) zeigt Identität, falls

$$S^2 = S_f^2 \cdot S_s^2 \quad \text{und} \quad \tau_f \ll \tau_s \quad [1.91]$$

Die erweiterte Näherungsfunktion $C^{\text{app}}(\tau)$ und der Separationsansatz liefern genau dann das selbe Ergebnis, wenn eine Komponente bezüglich der anderen wesentlich rascher abklingt ($\tau_s/\tau_f > 10^2$ bzw. $\tau_f < \text{ca. } 25\text{ps}$ [33]). Eine weitere Entwicklung für $C^{\text{app}}(\tau)$, die im Grenzfall auf die exakte Reihenentwicklung für *Markov*-artige Prozesse hinausläuft (Gl.1.69), wird angesichts der niedrigen NMR-Auflösung für die meßbare spektrale Dichte $J(\omega)$ immer problematischer.

Das Grenzverhalten der erweiterten Näherungsfunktion folgt aus Kapitel 1.6.5:

- Für $S_f^2 = 1$ entfällt die rasche Komponente vollständig, man erhält die einfache Näherungsfunktion, Gl.1.80. Analoges gilt für $S_s^2 = 1$.
- Für $\tau_f \approx 0$ ($< \text{ca. } 10\text{ps}$) ist die rasche Bewegungskomponente abgeklungen und S_f^2 geht als Skalierungsfaktor in die einfache Näherungsfunktion für $C_s(\tau)$ ein.

1.6.7 Anisotropie der Molekülrotation

Bei anisotroper Molekülrotation ist die fünffache Entartung der Orientierungsquantelung aufgehoben und die zugehörige Rotationskorrelationsfunktion bzw. spektrale Dichte ist die Superposition von exakt fünf Komponenten (vgl. Kapitel 1.3.3):

$$C_{anis}(\tau) = \sum_{n=1}^5 A_n \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_n}\right) \xrightarrow{\text{Fourier-Transformation}} J(\omega) = 2 \sum_{n=1}^5 A_n \frac{\tau_n}{1 + \omega^2 \tau_n^2} \quad [1.92]$$

mit

$$\tau_1^{-1} = 4D_1 + D_2 + D_3$$

$$\tau_2^{-1} = D_1 + 4D_2 + D_3$$

$$\tau_3^{-1} = D_1 + D_2 + 4D_3$$

$$\tau_4^{-1} = 6 \left[D + \sqrt{D^2 - D'^2} \right]$$

$$\tau_5^{-1} = 6 \left[D - \sqrt{D^2 - D'^2} \right]$$

$$D = \frac{1}{3} [D_1 + D_2 + D_3]$$

$$D' = \sqrt{\frac{1}{3} [D_1 D_2 + D_1 D_3 + D_2 D_3]}$$

Die Diffusionskoeffizienten D_n sind Eigenwerte des Rotationsdiffusionstensors und bestimmen die fünf Rotationskorrelationszeiten τ_n . Die Vorfaktoren A_n der spektralen Dichtefunktion berechnen sich über die Legendre-Kugelfunktionen zweiter Ordnung (P_2) aus den Winkelcosini zwischen dem betrachteten Vektor $\vec{\mu}$ und den drei Hauptachsen des Rotations- bzw. Reaktionsdiffusionstensors [13].

Bei *axialer Anisotropie* ($\vartheta = 0$) reduziert sich die Anzahl der Bewegungsfreiheitsgrade auf drei und die Lösung für $C_{ax}(\tau)$ ist nurmehr dreifach geartet mit den Parametern:

$$\begin{aligned} \frac{1}{\tau_1} &= 4D_{\parallel} + 2D_{\perp} & A_1 &= \frac{2}{24} [P_2^{(2)}(\cos \theta)]^2 = \frac{3}{4} \sin^4 \theta \\ \frac{1}{\tau_2} &= D_{\parallel} + 5D_{\perp} & \text{und} & & A_2 &= \frac{2}{6} [P_2^{(1)}(\cos \theta)]^2 = \frac{3}{4} \sin^2 2\theta \\ \frac{1}{\tau_3} &= 6D_{\perp} & A_3 &= [P_2^{(0)}(\cos \theta)]^2 = \frac{1}{4} (3 \cos^2 \theta - 1)^2 \end{aligned} \quad [1.93]$$

Anisotropie erzeugt eine *Streuung effektiver Rotationskorrelationszeiten* für Vektoren einer gegebenen, festen Orientierung (ϑ, θ) im Molekülkoordinatensystem, die sich aus der Überlagerung der Eigenwerte τ_n ergibt. Statt einer einheitlichen τ_R kann nur noch eine *isotrop gemittelte Rotationskorrelationszeit* $\tau_{R,iso}$ angegeben werden, definiert über:

$$\int_0^{\infty} \sum_{n=1}^5 A_n \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_n}\right) d\tau = \int_0^{\infty} \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_{R,iso}}\right) d\tau \quad [1.94]$$

Durch die Anisotropie der Molekülrotation wird die wesentliche Voraussetzung des Separationsansatzes, die Unkorreliertheit zwischen globaler und lokaler Molekülbewegung, verletzt. Nunmehr bestehen *Vorzugsachsen* der Molekülrotation, mit denen

Kreuzkorrelationen für die Vektoren der Lokalbewegungen möglich sind (bei isotroper Molekülrotation existieren keine Vorzugsachsen). Dennoch bleibt der Separationsansatz in guter Näherung gültig, wenn

1. die Anisotropie gering ist, d.h. die τ_n nur gering streuen
2. interne Bewegungen wesentlich rascher als die Molekülrotation erfolgen, d.h. schnell abklingen

Bei Anisotropie lassen sich Kreuzkorrelationsfunktionen nicht mehr (exakt) durch Autokorrelationsfunktionen substituieren (1.72). Geeignete experimentelle Methoden können Kreuzkorrelationsbeiträge zur Gesamtrelaxation jedoch unterdrücken (vgl. 1.5.3).

1.6.8 Modellfreie Näherungsfunktionen $J^{app}(\omega)$ für die Gesamtbewegung

Jede Wechselwirkung wird durch bestimmte Bewegungen moduliert und erfordert entsprechende spektrale Dichtefunktionen $J(\omega)$ (vgl. Tab.1.4). In der Regel ist die Molekülrotation maßgeblich. Ihr sind u.U. lokale Bewegungen am betrachteten Spin I überlagert (vgl. 1.1.4). Die Gesamtkorrelationsfunktion der überlagerten Molekülbewegungen läßt sich über den Separationsansatz (1.84) aus der isotropen Rotationskorrelationsfunktion $C_R(\tau)$ (1.78) und der modellfreien Näherungsfunktionen $C^{app}(\tau)$ konstruieren (1.80):

$$C(\tau) = C_R(\tau)C_I^{app}(\tau) = \frac{S^2}{5} \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_R}\right) + \frac{(1-S^2)}{5} \exp\left(-\frac{\tau}{\tau'_{eff}}\right) \quad [1.95]$$

mit der bezüglich der Rotationskorrelationszeit *gewichteten lokalen Korrelationszeit*

$$\tau'_{eff} = \frac{\tau_{eff}\tau_R}{\tau_{eff} + \tau_R} \quad [1.96]$$

Bei Einsetzen der *erweiterten* Näherungsfunktion (Gl.1.90) erhält man:

$$C(\tau) = C_R(\tau)C_I^{app}(\tau) = \frac{S_f^2 S_s^2}{5} \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_R}\right) + \frac{(1-S_f^2)}{5} \exp\left(-\frac{\tau}{\tau'_f}\right) + \frac{S_f^2(1-S_s^2)}{5} \exp\left(-\frac{\tau}{\tau'_s}\right) \quad [1.97]$$

mit den gewichteten internen Korrelationszeiten

$$\tau'_f = \frac{\tau_f \tau_R}{\tau_f + \tau_R} \quad \text{und} \quad \tau'_s = \frac{\tau_s \tau_R}{\tau_s + \tau_R} \quad [1.98]$$

Die modellfreien Näherungsfunktionen $J^{app}(\omega)$ lassen sich als Summe von Lorentzkurven aufbauen. Diese sind mit den entsprechenden generalisierten quadratischen Ordnungsparametern skaliert; die effektiven Korrelationszeiten sind bezüglich τ_R (= Rotationskorrelationszeit) gewichtet (Gl.1.96, 1.98). *Die isotrope Molekülrotation ist Voraussetzung!*

Tabelle 1.7 stellt die behandelten $C^{\text{app}}(\tau)$ und abgeleiteten $J^{\text{app}}(\omega)$ zusammen, geordnet nach abnehmender Komplexität. Der Vorfaktor $^2/5$ aus der isotropen Rotationskorrelationsfunktion und der Fouriertransformation (Gl.1.74) wird zur Vereinfachung ausgeklammert. Die gewählte Indizierung der $J^{\text{app}}(\omega)$ ist literaturverbreitet und gilt nachfolgend immer.

Tab.1.7 Gebräuchliche modellfreie Näherungsfunktionen $J(\omega)$ der spektralen Dichte zur Beschreibung der Globalbewegung bei isotroper Molekülrotation.

Näherung	$C^{\text{app}}(\tau)$	$^5/2 \cdot J^{\text{app}}(\omega)$	Herleitung
$J_4(\omega)$	Gl. 1. 97	$\frac{S_f^2 S_s^2 \tau_R}{1 + \omega^2 \tau_R^2} + \frac{(1 - S_f^2) \tau_f'}{1 + \omega^2 \tau_f'^2} + \frac{S_f^2 (1 - S_s^2) \tau_s'}{1 + \omega^2 \tau_s'^2}$	
$J_3(\omega)$	Gl. 1. 97 ($\tau_f = 0$)	$\frac{S_f^2 S_s^2 \tau_R}{1 + \omega^2 \tau_R^2} + \frac{S_f^2 (1 - S_s^2) \tau_s'}{1 + \omega^2 \tau_s'^2}$	(3) = $\lim_{\tau_f \rightarrow 0}$ (4)
$J_2(\omega)$	Gl. 1.95	$\frac{S^2 \tau_R}{1 + \omega^2 \tau_R^2} + \frac{(1 - S^2) \tau_{\text{eff}}'}{1 + \omega^2 \tau_{\text{eff}}'^2}$	(2) = $\lim_{S_f^2 \rightarrow 1}$ (3,4) (2) = $\lim_{S_s^2 \rightarrow 1}$ (4)
$J_1(\omega)$	Gl. 1.95 ($\tau_{\text{eff}} = 0$)	$\frac{S^2 \tau_R}{1 + \omega^2 \tau_R^2}$	(1) = $\lim_{\tau_{\text{eff}} \rightarrow 0}$ (2) (1) = $\lim_{S_s^2 \rightarrow 1}$ (3)

$J(\omega)$ ist die reale Fouriertransformierte der angegebenen Korrelationsfunktion $C^{\text{app}}(\tau)$. Die komplizierteste literaturbekannte $J_4(\omega)$ -Näherung berücksichtigt 2 zeitlich um Größenordnungen getrennte interne Bewegungen; aus ihr lassen sich die einfacheren Näherungen $J_{1-3}(\omega)$ wie angegeben ableiten.

In Abb.1.3 ist der Verlauf der vier $J^{\text{app}}(\omega)$ -Modelle dargestellt. In doppelt-logarithmischer Darstellung erscheinen die zugrundeliegenden Lorentzkurven als Plateaukurven und erreichen bei der *Korrelationsfrequenz* $\omega = 1/\tau_R$ ihre Halbwertshöhe. Für Frequenzen $\omega < \omega_R$ erreicht $J(\omega)$ praktisch seinen Maximalwert $J(0)$.

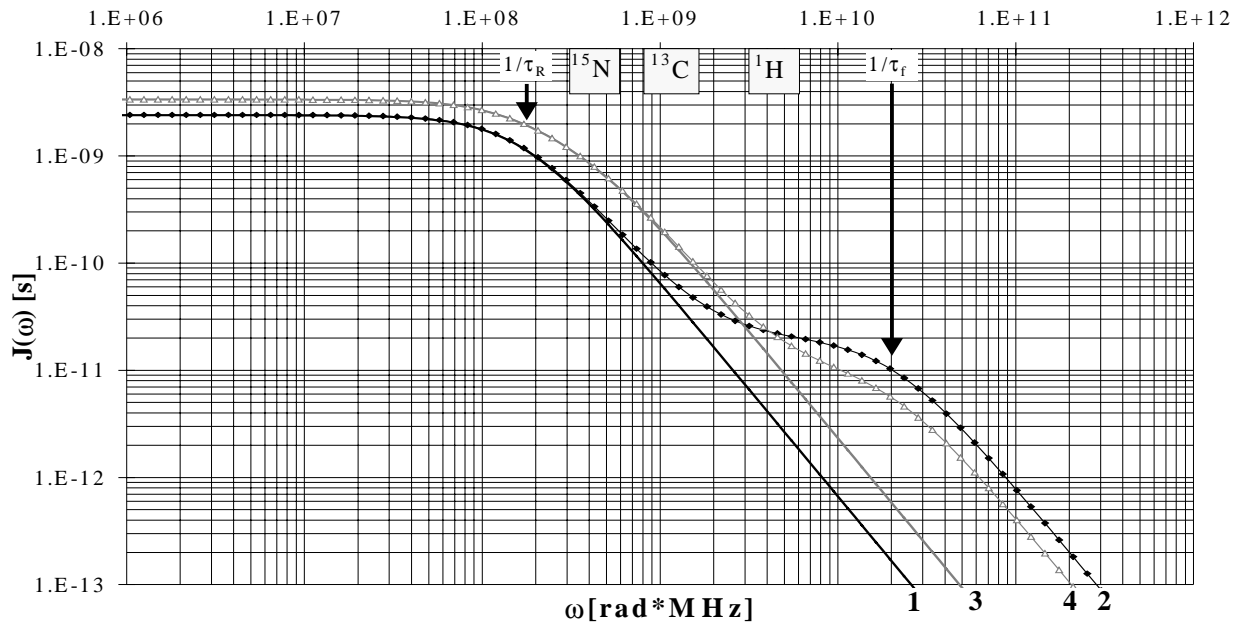


Abb.1.3 Simulation der (indizierten) Modellfunktionen 1 - 4 der spektralen Dichte $J(\omega)$ nach Tab.1.7 ($\tau_R = 6\text{ns}$; $\tau_f, \tau_{\text{eff}} = 50\text{ps}$; $\tau_s = 2\text{ns}$; $S_f^2 = 0.8$; $S_s^2 = 0.5$; $S^2 = S_f^2 S_s^2 = 0.4$). Durch Aufnahme einer schnellen lokalen Bewegung (Modelle 2 und 4) kommen hochfrequente, durch Aufnahme einer langsamen lokalen Bewegung (Modelle 3 und 4) mittel- und niederfrequente Anteile hinzu. Während der Anteil der raschen lokalen Bewegung deutlich separiert ist, sind die Lorentzkurven der Molekülrotation (τ_R) und der langsamen lokalen Bewegung (τ_s) koalesziert. Die Frequenzbänder der Übergangsfrequenzen für ^{15}N , ^{13}C und ^1H sind angegeben.

1.6.9 Eigenschaften von $J(\omega)$

$J(\omega)$ ist die Verteilungsfunktion (das *Spektrum*) der statistisch erzeugten Frequenzen und hat die Dimension [1/Hz]. Ihre in diesem Kapitel hergeleitete Stammform:

$$J(\omega)|_{\tau_R} = \frac{S^2 \tau_R}{1 + \omega^2 \tau_R^2} \tag{1.99}$$

entspricht in der *Frequenzdomäne* $J(\omega)$ einer absorptiven, in der *Zeitdomäne* $J(\tau_R)$ der zugeordneten dispersiven Lorentz-Resonanzkurve, zentriert um $\omega\tau_R = 0$. Der Funktionsverlauf in Abhängigkeit von ω und τ_R ist in Abb.1.4 für $S^2 = 1$ dargestellt.

Während $J(\omega)$ mit steigender Frequenz monoton gegen Null strebt, durchläuft $J(\tau_R)$ bei der Korrelationsfrequenz $\omega_R = 1/\tau_R$ ein *Maximum*. Eine gegebene Frequenz ω_i wird also statistisch genau dann maximal angeregt, wenn die **Optimum-Bedingung** gilt:

$$\omega_i = \omega_R = \frac{1}{\tau_R} \tag{1.100}$$

In der $J(\omega)$ -Dimension ist ω_R hingegen gleichzeitig Wendepunkt und *Halbwertsbreite*.

Näherungsfunktionen für die spektrale Dichte gelten bezüglich der *Optimum-Bedingung*:

- Im *extreme narrowing limit* $\omega_i \tau_R \ll 1$ sind die Frequenzen wesentlich kleiner als die Korrelationsfrequenz und es gilt die Taylor-Entwicklung erster Ordnung:

$$\omega_i \tau_R \ll 1: J(\omega, \tau_R) \approx S^2 \tau_R \quad [1.101]$$

Im *extreme narrowing limit* wird die spektrale Dichte frequenzunabhängig. Die Grenzwerte $J(\omega, 0) = 0$ und $J(0, \tau_R) = S^2 \tau_R$ sind infolgedessen verschieden.

- Im *slow tumbling limit* $\omega_i \tau_R \gg 1$ sind die Frequenzen wesentlich größer als die Korrelationsfrequenz. Der Summand 1 im Nenner von (1.99) kann hier vernachlässigt werden und man erhält die Näherung

$$\omega_i \tau_R \gg 1: J(\omega, \tau_R) \approx \frac{S^2}{\omega^2 \tau_R} \quad [1.102]$$

Die Frequenzabhängigkeit bleibt in diesem Grenzfall erhalten und die beiden asymptotischen Grenzwerte $J(\omega, \infty) = J(\infty, \tau_R) = 0$ sind infolgedessen gleich.

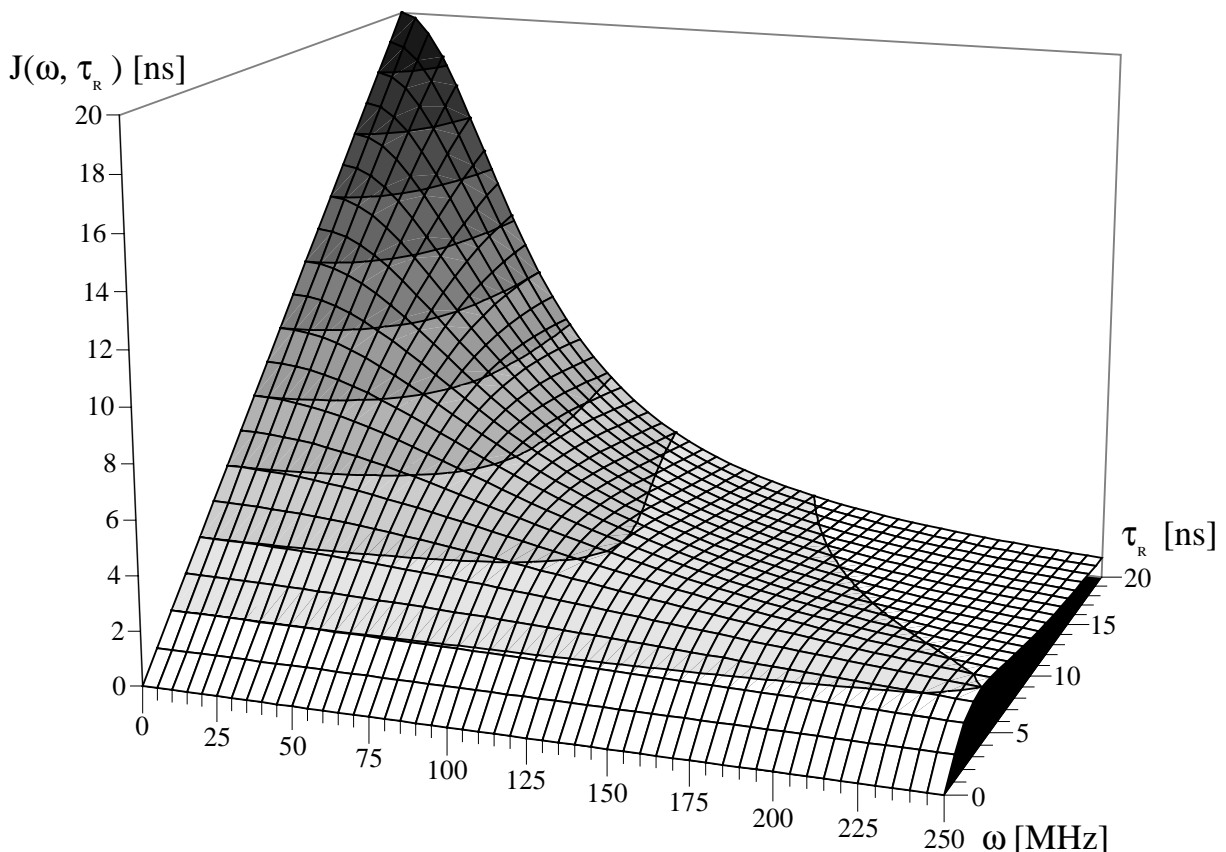


Abb.1.4 Abhängigkeit der Stammfunktion der spektralen Dichte $J(\omega)$ (Gl.1.99) in Abhängigkeit von der (molekularen Rotations-) Korrelationszeit τ_R und der Frequenz ω ($S^2 = 1$).

1.7 Simulation von Relaxationsraten im isolierten 2-Spin-System

Mit den in Kapitel 1.5 hergeleiteten Ausdrücken zur Berechnung von Relaxationsraten (Tab.1.5) und den in Kapitel 1.6 hergeleiteten modellfreien Näherungsfunktionen für die spektrale Dichte $J(\omega)$ (Tab.1.7) können die Relaxationsraten für das isolierte IS-Spinsystem ($I, S = 1/2$) simuliert werden.

Die nachfolgenden Simulationen der longitudinalen (R_1) und transversalen (R_2) Relaxationsraten und des heteronuklearen Gleichgewichts-NOE (vgl.1.7.1) gelten für die ^{15}N -Spins in Peptidgruppen ($I = ^{15}\text{N}$, $S = ^1\text{H}^{\text{N}}$). Zu den Simulationen gilt:

- Mehrspin-Effekte können zu Abweichungen bis ca. 4% führen (vgl.1.5.3)
- Linienverbreiterungen ($\Delta_{\text{Austausch}}$ -Beiträge zu R_2 , vgl. Kapitel 1.8) sind unberücksichtigt
- Die Unterdrückung der Kreuzkorrelation zwischen der ^{15}N -CSA- und der ^{15}N - $^1\text{H}^{\text{N}}$ -Dipol-Kopplung ist Voraussetzung (vgl.1.5.3)
- Die Unterdrückung der ($\text{N}_z \leftrightarrow \text{H}_z$)-Kreuzrelaxation bei T_1 ist Voraussetzung (vgl.1.5.3)

Die Kurvenverläufe in Abhängigkeit von den modellfreien Dynamikparametern (Ordnungsparameter S^2 , Korrelationszeiten τ_i) können mit den in Kapitel 1.6.9 besprochenen Eigenschaften der spektralen Dichtefunktion verstanden werden:

- Aufgrund der monotonen Abnahme von $J(\omega)$ mit steigender Frequenz bestimmt *primär* die niedrigste erlaubte Übergangsfrequenz ω_{min} die Relaxationsrate.
- Maximale Relaxationsraten bzw. minimale Relaxationszeiten werden dann erreicht, wenn die *primäre* Optimum-Bedingung $\omega_{\text{min}} = 1/\tau_{\text{R}}$ (Gl.1.100) für die niedrigste Übergangsfrequenz erreicht ist. Höhere Übergangsfrequenzen führen analog zu *sekundären* Optima.
- Für *Kohärenzen* ist der $J(\omega = 0)$ -Wert entscheidend, der mit steigender Rotationskorrelationszeit τ_{R} linear ansteigt (Gl.1.101).
- Für *Polarisationen* ist die Einquantenfrequenz ω_{SQC} (*Single Quantum Coherence*) die niedrigste erlaubte Übergangsfrequenz. Das primäre Relaxations-Optimum liegt daher bei $\omega_{\text{SQC}} = 1/\tau_{\text{R}}$.

1.7.1 Der heteronukleare I{S}-NOE im Gleichgewicht

Der heteronukleare I{S}-NOE im Gleichgewicht ist nach

$$I\{S\}\text{-NOE} = 1 + \frac{\gamma_{\text{S}}}{\gamma_{\text{I}}} \cdot \frac{R(I_z \leftrightarrow S_z)}{R(I_z)} \quad [1.103]$$

abhängig vom Verhältnis der Kreuzrelaxationsrate zur longitudinalen R_1 -Relaxationsrate. Nach Einsetzen der Raten aus Tab.1.5 unter Berücksichtigung der dipolaren und der CSA-Kopplung (Kopplungskonstanten D bzw. C) folgt

$$I\{S\}-\text{NOE} = 1 + \frac{\gamma_S}{\gamma_I} \cdot \frac{D^2 \{12J(\omega_2) - 2J(\omega_0)\}}{D^2 \{12J(\omega_2) + 2J(\omega_0) + 6J(\omega_1)\} + 6C^2 J(\omega_1)} \quad [1.104]$$

mit $\omega_0 = \omega_S - \omega_I$ und $\omega_S = \omega_S + \omega_I$. Im *extreme narrowing limit* bezüglich der höchsten Übergangsfrequenz ω_2 sind alle spektralen Dichtewerte frequenzunabhängig (Gl.1.101) und der NOE erreicht einen Grenzwert von

$$I\{S\}-\text{NOE}|_{\tau_R \rightarrow 0} = 1 + \frac{\gamma_S}{\gamma_I} \cdot \frac{10D^2}{20D^2 + 6C^2} \quad [1.105]$$

Im *slow tumbling limit* bezüglich der niedrigsten Übergangsfrequenz ω_1 gilt die $J(\omega)$ -Näherung 1.102 und ein zweiter Grenzwert wird erreicht:

$$I\{S\}-\text{NOE}|_{\tau_R \rightarrow \infty} = 1 + \frac{\gamma_S}{\gamma_I} \cdot \frac{D^2 \{12\omega_0^2 \omega_1^2 - 2\omega_2^2 \omega_1^2\}}{D^2 \{12\omega_0^2 \omega_1^2 + 2\omega_2^2 \omega_1^2 + 6\omega_2^2 \omega_2^2\} + 6C^2 \omega_2^2 \omega_2^2} \quad [1.106]$$

Der heteronukleare $I\{S\}$ -NOE erfährt zwischen diesen beiden Grenzwerten, also bei Korrelationszeiten τ_R im Bereich $1/\omega_I$ bis $1/\omega_2$, seine größte Abhängigkeit von vorliegenden Bewegungen. Außerhalb dieses Zeitbereiches ist er weitgehend unempfindlich gegenüber der Dynamik.

1.7.2 Abhängigkeit von τ_R und der $J(\omega)$ -Modellfunktion

Der Verlauf der T_1 -, T_2 - und $T_{1\rho}$ -Relaxationszeiten von ^{15}N in Abhängigkeit von der molekularen Rotationskorrelationszeit τ_R und der gewählten Modellfunktion für die spektrale Dichte $J(\omega)$ (vgl.Tab.1.7) ist in Abb.1.5.a gezeigt.

- Die **^{15}N - T_1 -Zeiten** durchlaufen bei $\tau_R \approx 1/\omega_N$ ($\omega_N =$ Übergangsfrequenz von ^{15}N) aufgrund der *primären* Optimum-Bedingung (Gl.1.100) ein Minimum. Bei Vorliegen einer weiteren Bewegungskomponente mit *fester* Korrelationszeit τ_{lokal} garantiert diese jedoch einen Grenzwert des relaxationsdominanten $J(\omega_N)$ -Wertes, der ansonsten im *slow tumbling limit* (Gl.1.102) asymptotisch gegen Null fiel. Infolgedessen laufen die ^{15}N - T_1 -Zeiten nur in diesem Fall gegen einen Grenzwert bei langen τ_R . Bei genauer Betrachtung fällt ein schwaches lokales Minimum bei $\tau_R \approx 1/\omega_H$ auf, das auf der Erfüllung der *sekundären* Optimum-Bedingung für das hochfrequente Übergangsfrequenzband um ω_H beruht.
- Für die **^{15}N - $T_{1\rho}$ -Zeiten** gelten diese Beobachtungen analog, nur daß die *primäre* Optimum-Bedingung nun $\tau_R \approx 1/\omega_{\text{SL}}$ ($\omega_{\text{SL}} =$ Spin-lock-Feldstärke) lautet.

- Die ^{15}N - T_2 -Zeiten fallen im Gegensatz dazu wegen der Dominanz von $J(0) = S^2\tau_R$ (Gl.1.101) mit $1/\tau_R$. Bei genauer Betrachtung fallen schwächere lokale Minima bei $\tau_R \approx 1/\omega_H$ und $\tau_R = 1/\omega_N$ auf, die auf der Erfüllung der sekundären Optimum-Bedingungen für diese hochfrequenten Übergangsfrequenzbänder beruht.
- Mit abnehmender Rotationskorrelationszeit τ_R steigen die T_{1-} , T_2 - und $T_{1\rho}$ -Relaxationszeiten und nähern sich einander an. Hier herrscht das *extreme narrowing limit*, in dem die spektrale Dichte frequenzunabhängig wird (Gl.1.101)

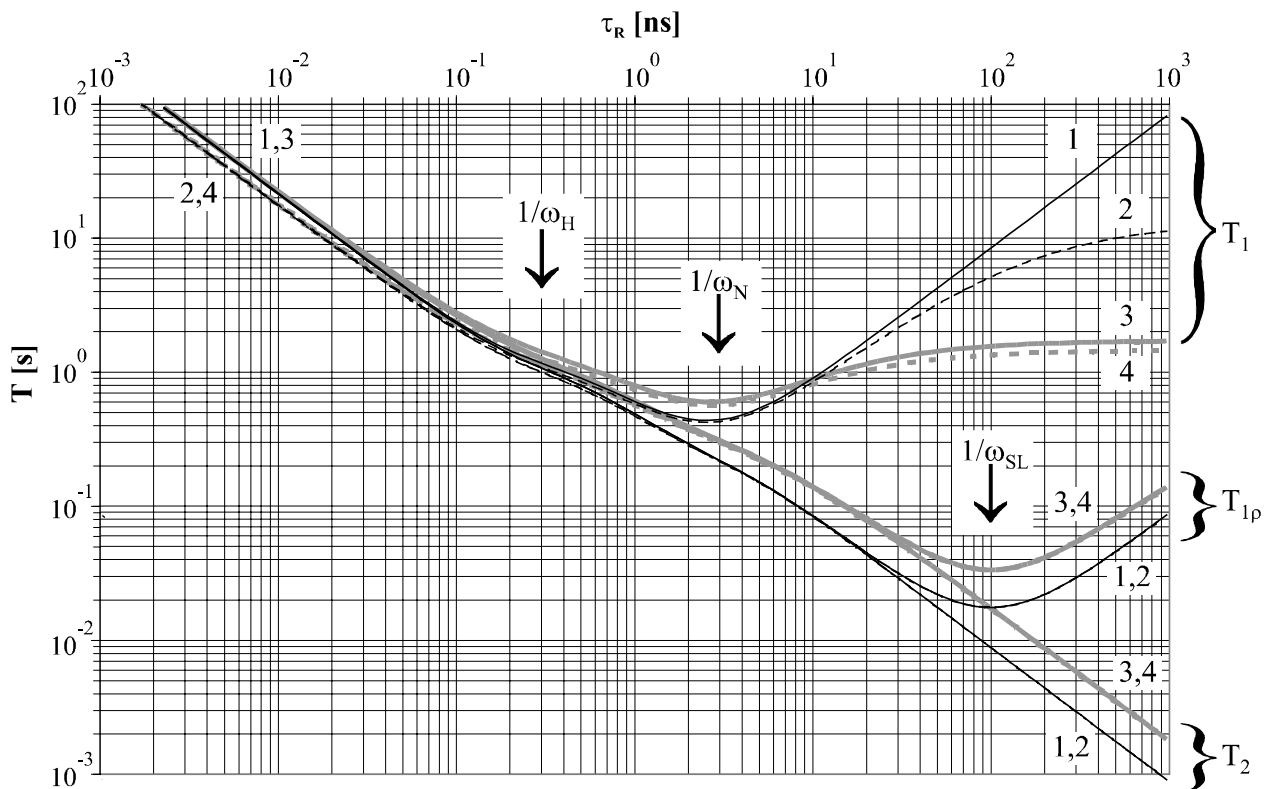


Abb.1.5.a T_{1-} , T_2 - und $T_{1\rho}$ -Relaxationszeiten von ^{15}N in Abhängigkeit von der molekularen Rotationskorrelationszeit τ_R und der gewählten Modellfunktion (Indizes 1 bis 4) der spektralen Dichte $J(\omega)$ (vgl.Tab.1.7). Die gewählten Dynamikparameter sind $S^2 = S_f^2 = 0.8$, $S_s^2 = 0.5$, $\tau_{\text{eff}} = \tau_f = 100$ ps und $\tau_s = 2$ ns. Die B_0 -Feldstärke ist 600 MHz. Die Stärke des SpinLock-Feldes, ω_{SL} , ist zur Verdeutlichung des $T_{1\rho}$ -Verlaufes auf unrealistische 10 MHz gesetzt.

Der $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ -NOE (Abb.1.5.b) wechselt für Rotationskorrelationszeiten τ_R im Bereich der inversen Übergangsfrequenzen $1/\omega_N$ bis $1/\omega_{N+H}$ (bei 600 MHz ca. 0.2 bis 2.5 ns) unter Nulldurchgang vom Grenzwert des *extreme narrowing limit* (-3.45; Gl.1.105) zum Grenzwert des *slow tumbling limit* (+0.91; Gl.1.106). Wegen der stärkeren Wichtigung des Doppelquanten-Überganges ist die Kreuzrelaxationsrate maximal, wenn die Optimum-Bedingung $\omega_H + \omega_N \approx 1/\tau_R$ erfüllt ist. Sie markiert ungefähr den Wendepunkt des

$^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ -NOE-Verlaufes. Bei schneller lokaler Beweglichkeit wird der *slow tumbling* Grenzwert oberhalb einer bestimmten τ_R erneut verlassen. Hier sinkt bei den erlaubten Übergangsfrequenzen der spektrale Dichtebeitrag der Molekülrotation unter den Beitrag der lokalen Bewegung. Der neue Grenzwert wird nun analog durch das Verhältnis der *lokalen* Korrelationszeiten τ_{lokal} bezüglich $1/\omega_N$ bis $1/\omega_{N+H}$ bestimmt. Bei langen τ_{lokal} tritt demnach keine merkliche Erniedrigung des $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ -NOE mehr ein.

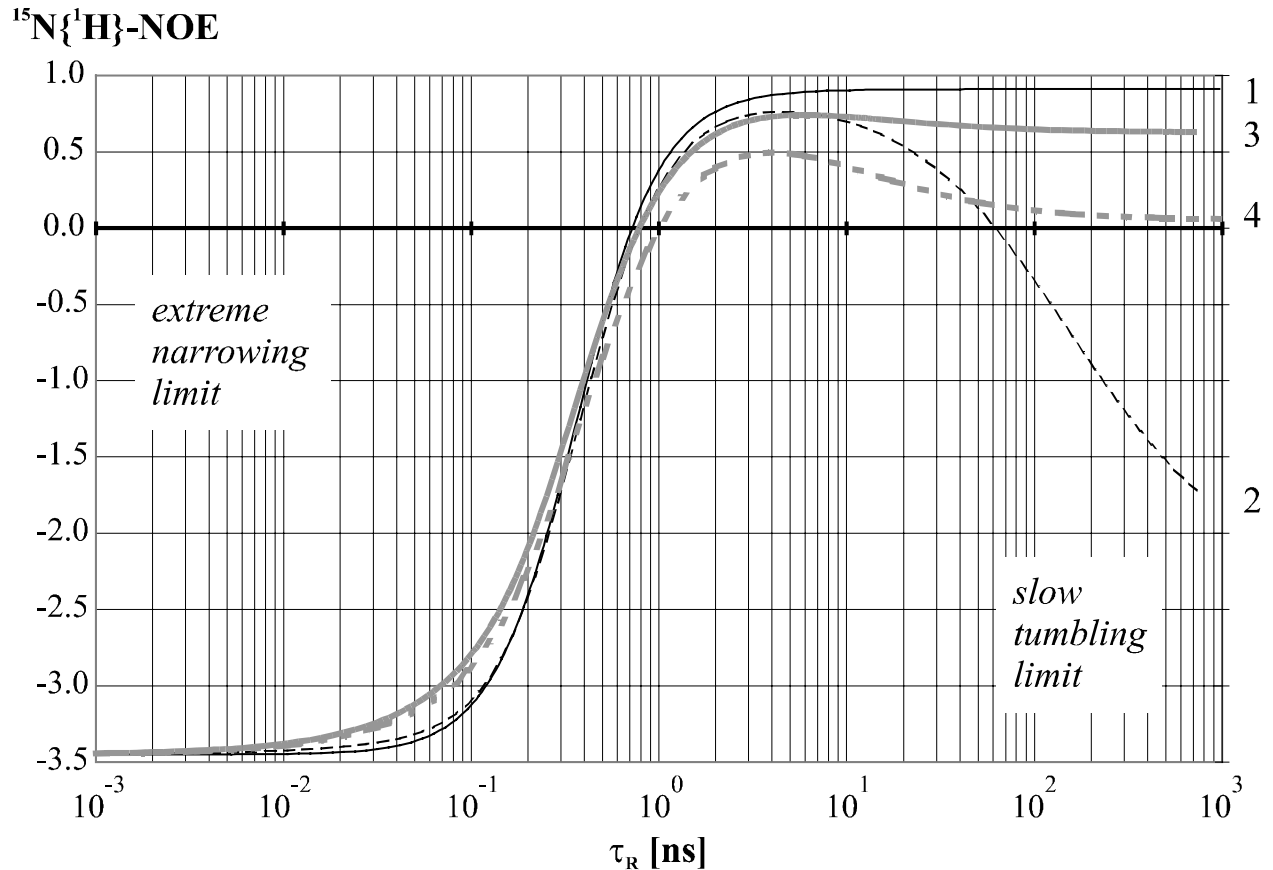


Abb.1.5.b $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ -NOE in Abhängigkeit von der molekularen Rotationskorrelationszeit τ_R und der gewählten Modellfunktion (Indizes 1 bis 4) der spektralen Dichte. Alle Parameter wie in Abb.1.5.a angegeben.

1.7.3 Abhängigkeit von der B_0 -Feldstärke

Der Verlauf der T_1 -, T_2 - und $T_{1\rho}$ -Relaxationszeiten von ^{15}N in Abhängigkeit von der Stärke des magnetischen Feldes B_0 ist in Abb.1.6.a gezeigt. Die Abhängigkeit wird nur bei langen Korrelationszeiten $\tau_R > 1/\omega_N$ deutlich:

- Das Minimum der ^{15}N - T_1 -Zeiten (1.100) wird aufgrund der $\omega_N \propto B_0$ -Proportionalität mit steigender Feldstärke bei kürzeren τ_R erreicht. Im *slow tumbling limit* sind die ^{15}N - T_1 -Zeiten konstant erhöht, was hier aus der $J(\omega) \propto 1/B_0^2$ -Abhängigkeit folgt (1.102)
- Die ^{15}N - $T_{1\rho}$ und ^{15}N - T_2 -Zeiten sinken hingegen im *slow tumbling limit* mit steigender Feldstärke. Dies ist *ausschließlich* auf die B_0^2 -Abhängigkeit der CSA-Konstanten zurückzuführen, da die hier geltenden Optimalbedingungen ($\tau_R \approx 1/\omega_{SL}$ bzw. $\tau_R \rightarrow 0$) *feldunabhängig* sind.

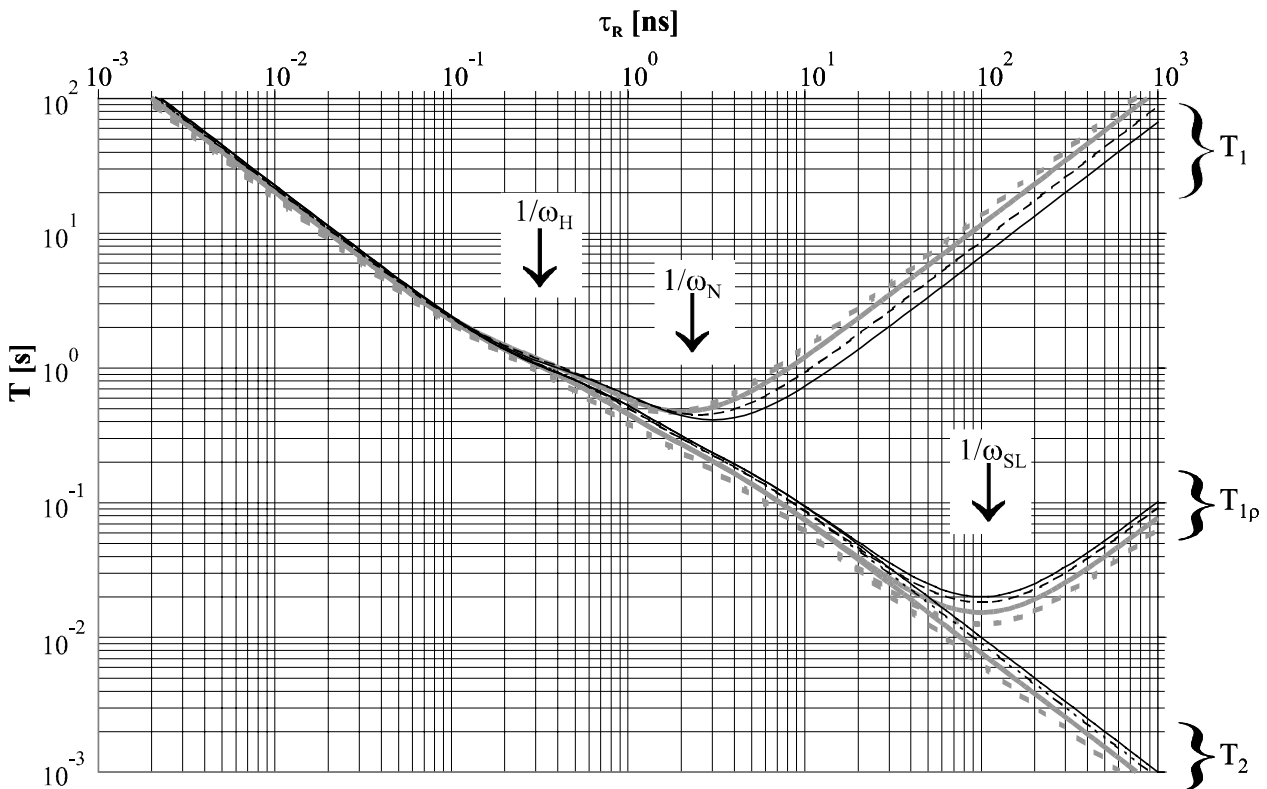


Abb.1.6.a T_1 -, $T_{1\rho}$ - und T_2 -Relaxationszeiten von ^{15}N in Abhängigkeit von der molekularen Rotationskorrelationszeit τ_R und der Magnetfeldstärke B_0 : 500 MHz (—), 600 MHz (---), 750 MHz (— · —) und 900 MHz (···). Simulation für Modell 1 mit $S^2 = 0.8$; $\omega_{SL} = 10$ MHz.

Der entsprechende Verlauf des $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ -NOE ist in Abb.1.6.b gezeigt. Der feldabhängige Übergangsbereich ($1/\omega_N$ bis $1/\omega_{N+H}$) wird für höhere B_0 -Felder bei kürzeren Korrelationszeiten erreicht. Die starke B_0 -Erhöhung des NOE-Grenzwertes im *extreme narrowing limit* (1.105) und seine schwache Erhöhung im *slow tumbling limit* (1.106) sind *ausschließlich* auf die B_0^2 -Abhängigkeit der CSA-Konstanten zurückzuführen.

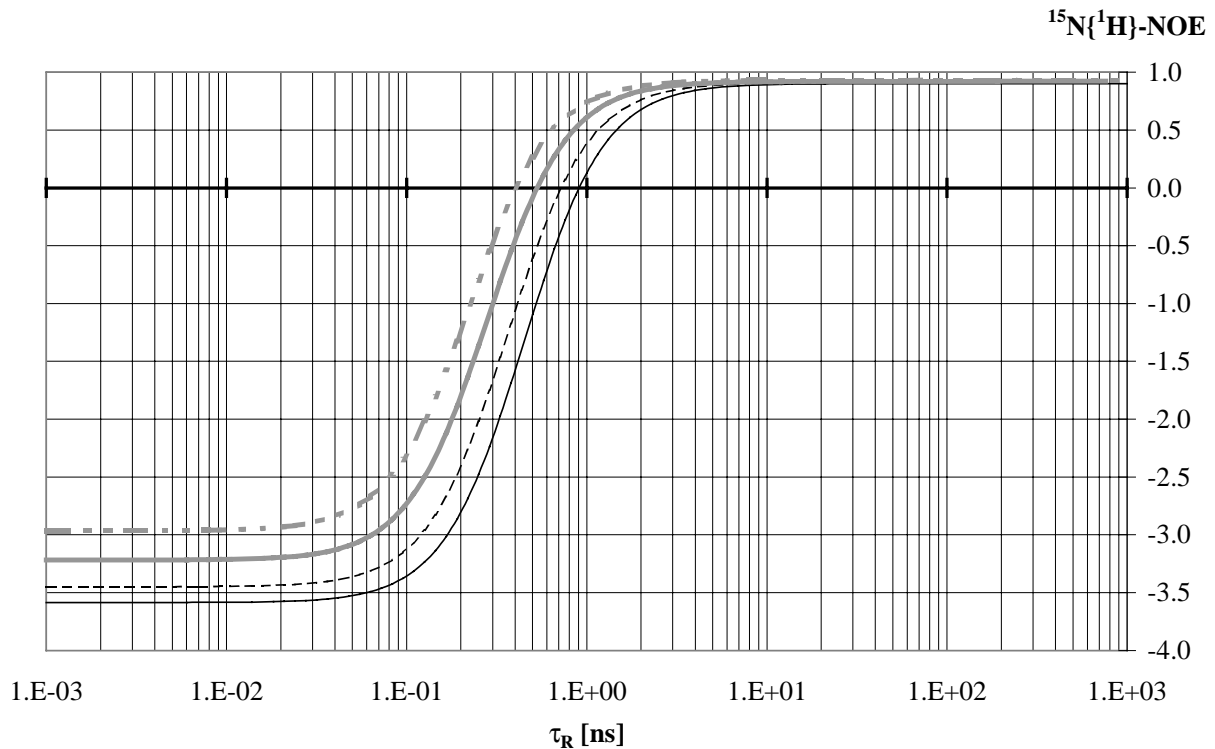


Abb.1.6.b $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ -NOE in Abhängigkeit von der molekularen Rotationskorrelationszeit τ_R und der Magnetfeldstärke B_0 : 500 MHz (—), 600 MHz (---), 750 MHz (— · —) und 900 MHz (···). Simulation für Modell 1 mit $S^2 = 0.8$; $\omega_{\text{SL}} = 10$ MHz.

1.7.3 Abhängigkeit von Ordnungsparameter und lokaler Korrelationszeit

Die Simulationen in diesem Kapitel gelten bei 600 MHz Feldstärke und einer globalen Korrelationszeit $\tau_R = 13.2$ ns, die dem Wert für das Protein HNL (Kapitel 2) entspricht. Unter diesen Bedingungen ist, wie für Proteine allgemein üblich, das *slow tumbling limit* bezüglich aller Übergangsfrequenzen ($\tau_R \gg 1/\omega_N$) erfüllt.

Die Abhängigkeit der ^{15}N -Relaxation von der Korrelationszeit *einer* lokalen Bewegung τ_{eff} (**Modell 2**) und ihres Ordnungsparameters S^2 ist in Abb.1.7.a gezeigt:

- Eine Erniedrigung des Ordnungsparameters S^2 , d.h. Erhöhung der Bewegungsamplitude, verschiebt in der spektralen Dichte $J(\omega)$ die relativen Anteile der Rotations- und der lokalen Bewegungskomponenten zugunsten letzterer. Niedrige S^2 betonen daher immer die durch lokale Beweglichkeit verursachten Trends in den Relaxationsraten. Der allgemein durch S^2 reduzierte Anteil der molekularen Rotation an der spektralen Dichte (**Modell 1**) kann durch den hinzukommenden Anteil aufgrund lokaler Bewegung (**Modell 2**) kompensiert werden, wenn gilt:

$$\frac{\tau'_{\text{eff}}}{1 + (\omega\tau'_{\text{eff}})^2} \geq \frac{\tau_R}{1 + (\omega\tau_R)^2} \quad [1.107.a]$$

Es existieren also pro Übergangsfrequenz maximal zwei kritische effektive lokale Korrelationszeiten $\tau'_{\text{eff,kritisch}}$, die unabhängig vom Ordnungsparameter S^2 sind:

$$\tau'_{\text{eff,kritisch}} = \frac{1}{\omega_N^2 \tau_R} \quad \text{und} \quad \tau'_{\text{eff,kritisch}} = \tau_R \quad [1.107.b]$$

Für Relaxationsraten sind jedoch die spektralen Dichtewerte bei *mehreren* Übergangsfrequenzen entscheidend, wodurch sich (Gl.1.107.a) erheblich kompliziert und die $\tau'_{\text{eff,kritisch}}$ nurmehr numerisch gelöst werden können bzw. nicht mehr existieren.

- Das Verhalten der ^{15}N - T_1 -Zeiten entspricht exakt der in Kapitel 1.7.2 beschriebenen Abhängigkeit von τ_R bei Gegenwart lokaler Bewegung, wenn τ_R (fest) und τ_{eff} (variabel) vertauscht werden: Mit der Annäherung der lokalen Korrelationszeit an die Optimum-Bedingung ($\tau_{\text{eff}} = 1/\omega_N$) wird ein T_1 -Minimum erreicht. Für $\tau_{\text{eff}} \rightarrow 0$ verschwindet der Beitrag der lokalen Bewegung zu $J(\omega)$, während der Beitrag der Molekülrotation proportional mit S^2 sinkt. Die T_1 -Zeiten steigen entsprechend an. Bei langen $\tau_{\text{eff}} \gg 1/\omega_N$ garantiert hingegen die dann schnellere Molekülrotation einen T_1 -Grenzwert. Man beachte, daß zwei sehr verschiedene τ_{eff} -Zeiten denselben T_1 -Wert produzieren können. Ferner existieren $\tau'_{\text{eff,kritisch}}$ (Gl.1.107) nur dann, wenn ungefähr $\omega_N \tau_R > 4$ gilt. Dieser Fall trifft für Abb.1.7.a zu, in der $\tau'_{\text{eff,kritisch}}$ als S^2 -unabhängiger Schnittpunkt aller T_1 -Kurven erkennbar wird.

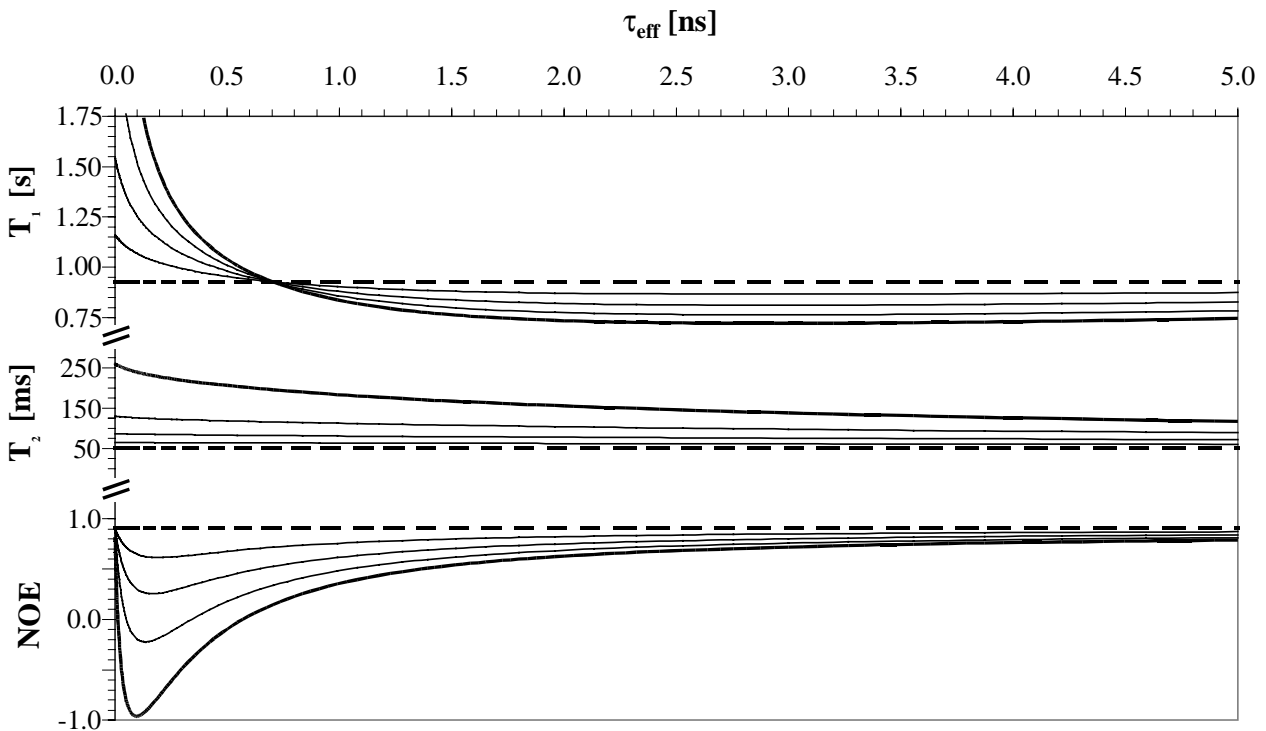


Abb.1.7.a Abhängigkeit der ^{15}N -Relaxation von der Korrelationszeit einer lokalen Bewegung τ_{eff} und ihres Ordnungsparameters S^2 (Modell 2). S^2 wird in Schritten von 0.2 von 1 (---, = Modell 1) bis 0.2 (—) reduziert. Simulation mit $\tau_R = 13.2 \text{ ns}$ bei 600 MHz.

- Die ^{15}N - T_2 -Zeiten werden von der $J(0)$ -Dichte dominiert, die sich für Modell 2 zu

$$J(0) = S^2 \tau_R + (1 - S^2) \cdot \tau'_{\text{eff}} \quad [1.108]$$

berechnet. Es existiert daher nur *eine* kritische effektive lokale Korrelationszeit $\tau'_{\text{eff,kritisch}} = \tau_R$. Dieser Wert wird für $\tau_{\text{eff}} \rightarrow \infty$ erreicht, weshalb immer $\tau_{\text{eff}} < \tau_{\text{eff,kritisch}}$ gilt und lokale Bewegung *immer* zur Verlängerung der ^{15}N - T_2 -Zeiten führen (s.o.)

- Die bereits in 1.7.2 diskutierte Reduktion des $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ -NOE bei lokaler Beweglichkeit durchläuft bei $\omega_{\text{H}} + \omega_{\text{N}} \approx 1/\tau'_{\text{eff}}$ ein Minimum.

Bei Überlagerung von zwei lokalen Bewegungen, von denen die schnellere augenblicklich auf ihren Ordnungsparameter S_f^2 abgeklungen ist (**Modell 3**), ergibt sich die in Abb.1.7.b gezeigte Abhängigkeit vom weiteren Parameter S_f^2 und der Korrelationszeit τ_s der langsameren lokalen Bewegung. S_f^2 kann als *allgemeiner Skalierungsfaktor*, analog zu S^2 im Modell 1, aus der spektralen Dichte ausgeklammert werden. Dies erklärt das Verhalten der Relaxationsraten: Während die ^{15}N - T_1 - und ^{15}N - T_2 -Zeiten generell mit $1/S_f^2$ ansteigen, zeigt der $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ -NOE *keine* S_f^2 -Abhängigkeit, da sich dieser Skalierungsfaktor im Quotienten $R(\text{N}_z \leftrightarrow \text{H}_z)/R(\text{N}_z)$ (Gl.1.103) herauskürzt.

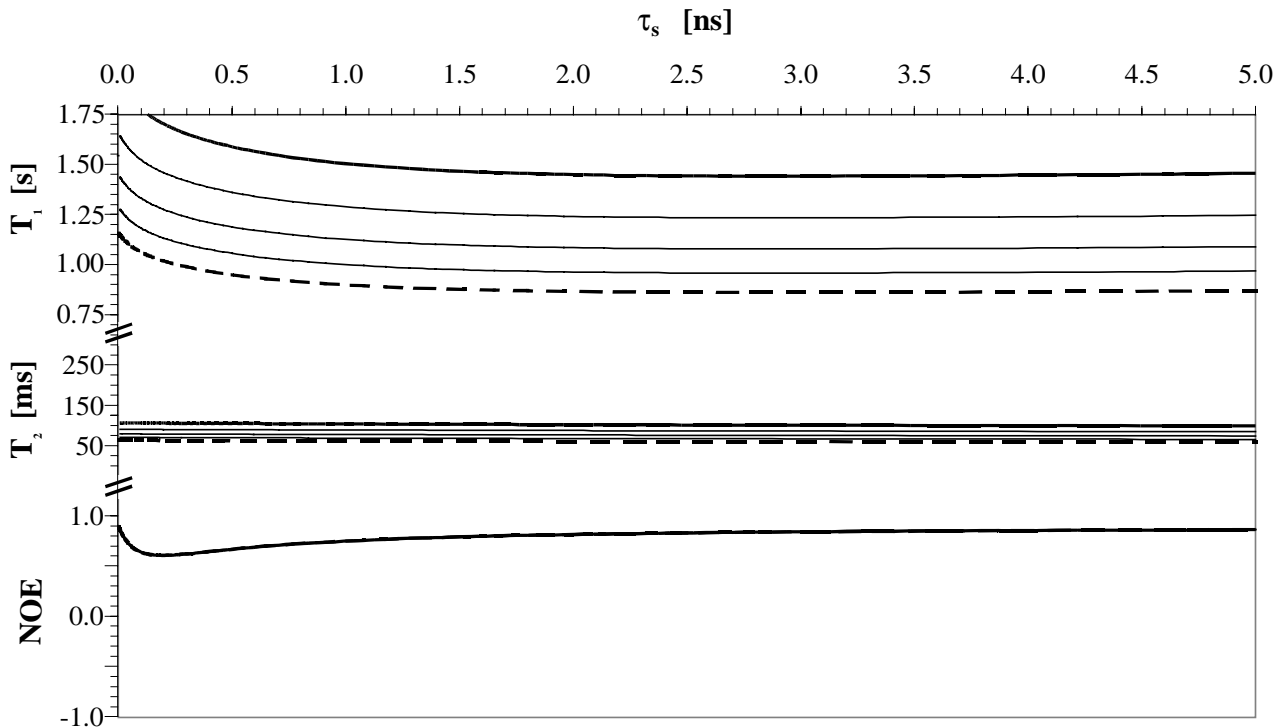


Abb.1.7.b Abhängigkeit der ^{15}N -Relaxation von der Korrelationszeit einer lokalen Bewegung τ_s und dem Ordnungsparameters S_f^2 einer überlagerten schnelleren Bewegung (Modell 3). S_f^2 wird in Inkrementen von 0.1 von 1.0 (--- = Modell 2) bis 0.6 (—) reduziert. Simulation mit $S_s^2 = 0.8$ und $\tau_R = 13.2$ ns bei 600 MHz.

Abb.1.7.c zeigt die Abhängigkeit der Relaxationsraten von den Korrelationszeiten τ_f (Scharparameter) und τ_s zweier überlagerter lokaler Bewegungen (**Modell 4**). In der (unsichtbaren) τ_f -Achse liegt weitgehend dieselbe Abhängigkeit vor wie in der sichtbaren τ_s -Achse, was aus der Analogie zwischen den $J(\omega)$ -Beiträgen beider Bewegungen folgt.

- Die ^{15}N - T_1 -Zeiten steigen proportional zu $1/\tau_f$, da sich die Übergangsfrequenzen bezüglich $1/\tau_f$ im *extreme narrowing limit* befinden (Gl.1.101)
- Die ^{15}N - T_2 -Zeiten sind nahezu unabhängig von τ_f , da sich der dominante $J(0)$ -Anteil gegenüber Modell 3 nur um den geringen Beitrag $(1 - S_f^2)\tau_f$ erhöht.
- Der $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ -NOE durchläuft aufgrund des $J(\omega)$ -Beitrag der weiteren Bewegung bei $\omega_H + \omega_N \approx 1/\tau_f$ ein Minimum.

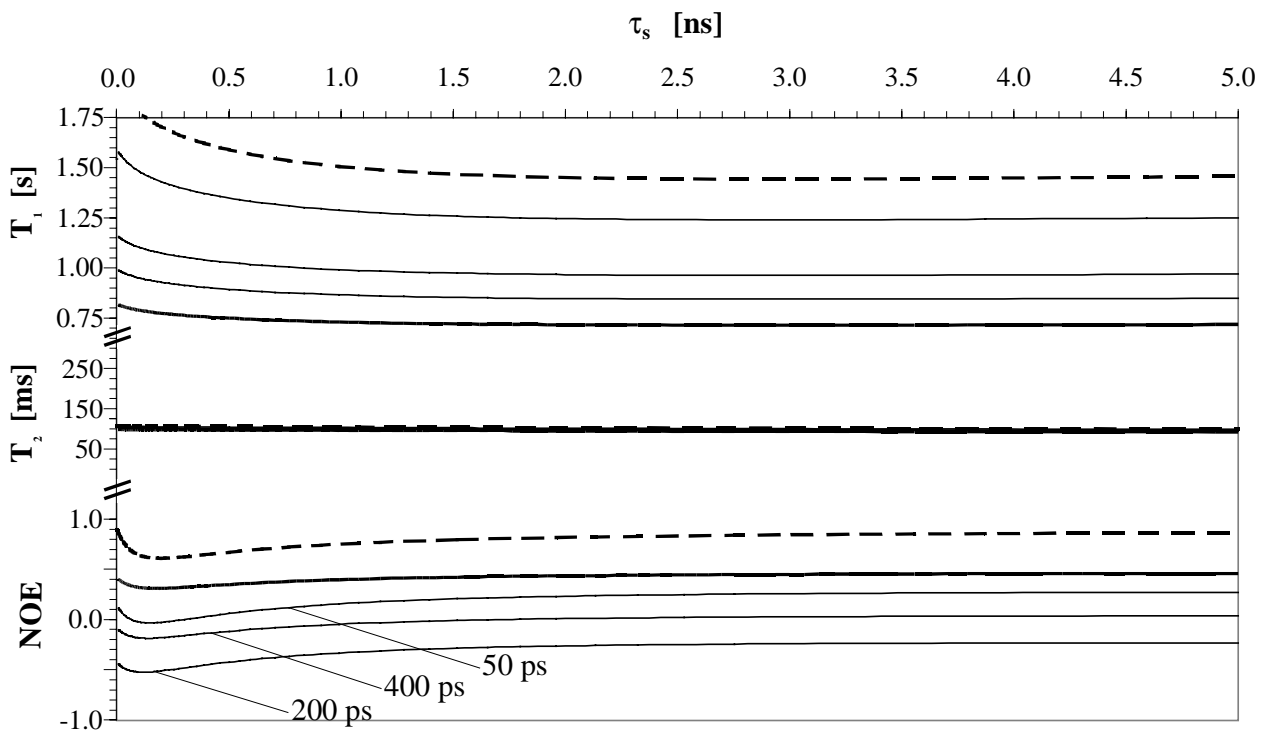


Abb.1.7.c Abhängigkeit der ^{15}N -Relaxation von den Korrelationszeiten τ_f (Scharparameter) und τ_s zweier überlagerter lokaler Bewegungen (Modell 4). $\tau_f = 0$ (---, = Modell 3), 50, 200, 400 und 800 ps (—). Simulation mit $S_f^2 = 0.6$, $S_s^2 = 0.8$ und $\tau_R = 13.2$ ns bei 600 MHz.

Die Existenz eines von der lokalen Korrelationszeit τ_{eff} (bzw. τ_s) abhängigen Minimums macht den $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ -NOE zu einem sehr wertvollen und rasch verfügbaren *Indikator lokaler Beweglichkeit mit Korrelationszeiten im Bereich von ca. 0.2 bis 2 ns* ($1/\omega_N$ bis $1/\omega_{N+H}$, vgl.1.7.2)!

1.8 Linienverbreiterung und Koaleszenzphänomene

Neben den behandelten Wechselwirkungen mit lokalen Feldern, die zur *natürlichen Linienbreite* (Gl.1.4) und $J(0)$ -Abhängigkeit führen, existieren weitere Ursachen für die Streuung von Übergangsfrequenzen ω als zusätzlicher Auslöser der *entropischen* Spinsystem-Relaxation. Sie können formell als außerordentliche Erhöhung der $J(0)$ -Dichte behandelt werden und äußern sich als *Linienverbreiterung* Δ (in Hz) bzgl. der natürlichen Linienbreite. Die Zustände unterschiedlicher Frequenz ω müssen hierzu eine gewisse Lebensdauer besitzen, da schnelle statistische Mischung zur effektiven Mittelung der ω -Verteilung führt. Während die Linienverbreiterung bei *kontinuierlicher* ω -Verteilung mit zunehmender Mischfrequenz monoton abnimmt, durchläuft sie bei *diskreter* ω -Verteilung ein Maximum (*Koaleszenz*), wenn die Mischfrequenz (*Austauschfrequenz*) im Bereich der Frequenzdifferenz $|\omega_A - \omega_B|$ liegt. Für diese *Koaleszenzphänomene* existieren also *scheinbare* Übergangsfrequenzen, die proportional zur B_0 -abhängigen Frequenzseparation sind und bei Resonanz mit der Austauschfrequenz zu einem maximalen entropischen Relaxationsbeitrag führen. Hierdurch eröffnet sich für die NMR-Beobachtbarkeit der Moleküldynamik neben dem hochfrequenten Fenster um die Spinübergangsfrequenzen ein niederfrequentes Fenster um die Frequenzseparationen $|\omega_A - \omega_B|$.

Die für Linienverbreiterungseffekte fehlende rasche statistische Mischung der magnetischen Zustände kann experimentell gezielt herbeigeführt werden. Dies ist der wesentliche Unterschied zur natürlichen (nicht-manipulierbaren) Linienbreite aufgrund der von der Moleküleigenbewegung modulierten statistischen Hintergrundfelder.

1.8.1 Linienverbreiterung durch kontinuierliche ω -Verteilung

Die maßgebliche *kontinuierliche* ω -Verteilung in Lösung beruht auf B_0 -Inhomogenitäten. Die Linienverbreiterung wird durch longitudinale Diffusion und durch langsame Probenrotation nur unvollständig gemittelt, kann aber durch Refokussion der chemischen Verschiebung (*Spin-Echo*) nach einer Echozeit 2δ aufgehoben werden. Ein Anteil der Kohärenz geht dabei aufgrund von Ortswechseln (durch longitudinale Diffusion) während des Spin-Echos verloren und kann nicht refokussiert werden. Hierauf beruht die Diffusionsmessung mit gepulsten Feldgradientenechos.

Bewußt werden hohe B_0 -Gradienten eingesetzt, um ungewollte Kohärenz rasch auszulöschen bzw. um longitudinale Diffusion zu messen. Die Linienverbreiterung durch einen rechteckigen z -Gradienten der Stärke G und Dauer δ beträgt

$$\Delta_{\text{Gradient}} = (\gamma\delta G)^2 \frac{D}{3} \quad [1.109]$$

Weitere *kontinuierliche* ω -Verteilungen können durch unvollständige Mittelung von Kopplungstensenoren (dipolarer und CSA-Tensor, vgl. 1.4) bei sehr langsamer molekularer Eigenbewegung verbleiben (Übergang zur Festkörper-Spektroskopie). Restliche dipolare Kopplungen lassen sich z.B. durch Probenrotation unter dem magischen Winkel mitteln.

1.8.2 Linienverbreiterung bei diskreter ω -Verteilung (Koaleszenzeffekte)

Die Mittelung einer *diskreten* $\Delta\omega$ -Dispersion durchläuft drei charakteristische Bereiche (s.u.) und einen *Punkt maximaler Linienbreite*. An diesem *Koaleszenzpunkt* bei $\Delta\omega_{AB} = k_{AB}$ besteht formell Resonanz zwischen Frequenzdifferenz (Übergangsfrequenz) $\Delta\omega_{AB}$ und Mischfrequenz (Anregungsfrequenz) k_{AB} , bei der maximale Systemdephasierung auftritt und die für die Festlegung des beobachtbaren Zeitfensters ausschlaggebend ist. Im Unterschied zu stimulierten Resonanzphänomenen führen hier aber auch nicht-resonante Mischfrequenzen zur (gedämpften) Relaxation; das Anregungsprofil entspricht einer Lorentz-Resonanzkurve. Die drei Bereiche werden nachfolgend am Beispiel des Austausches zwischen zwei Zuständen A und B mit der Differenzfrequenz $\Delta\omega_{AB}^0 = |\omega_A - \omega_B|$ und identischen Populationen und natürlichen Linienbreiten erklärt (Rechnungen für komplexere Systeme finden sich z.B. in [34, 35]):

1. Im Bereich des *langsamen Austausches*, $k_{AB} \ll \Delta\omega_{AB}^0$, sind die Signale A und B getrennt beobachtbar, jedoch reduziert sich ihre Frequenzseparation $\Delta\omega_{AB}(k_{AB})$ gemäß der Beziehung

$$\Delta\omega_{AB}(k_{AB}) = \sqrt{(\Delta\omega_{AB}^0)^2 - 2k_{AB}^2} \quad [1.110]$$

Die Lebensdauer der separaten Zustände A und B verkürzt sich auf $\tau = 1/k_{AB}$. Dies verursacht aufgrund der Unschärferelation eine zunehmende Linienverbreiterung um $\Delta_{\text{Austausch}} = k_{AB}$.

2. Am *Koaleszenzpunkt* $k_{AB} = \Delta\omega_{AB}^0$ fallen die Signale A und B bei der Frequenz eines *neuen (gemittelten) Zustandes C*, $\omega_C = \frac{1}{2}(\omega_A + \omega_B)$, zusammen. Der Systemzustand (A, B oder C) ist jetzt maximal undefiniert und die Linienverbreiterung $\Delta_{\text{Austausch}}$ ist gemäß der Unschärferelation ebenfalls maximal. Die Linienform läßt sich durch explizite Lösung der um Austauschprozesse erweiterten Bloch-Gleichungen lösen (vgl. 1.2.1).
3. Im Bereich des *schnellen Austausches*, $k_{AB} \gg \Delta\omega_{AB}^0$, existieren die Zustände A und B nicht mehr separat, sondern gehen immer mehr in Zustand C (bei ω_C) über. Mit zunehmender Austauschrate k_{AB} wird diese Zeitmittelung vollständiger und die Linienverbreiterung von ω_C geht gemäß Beziehung (1.111) zurück (*extreme narrowing limit*).

$$\Delta_{\text{Austausch}} = \frac{(\Delta\omega_{AB}^0)^2}{2k_{AB}} \quad [1.111]$$

Austauschprozesse verändern Signallage und Linienbreite in Abhängigkeit des Verhältnisses $\Delta\omega_{AB}^0/k_{AB}$ (Populationsunterschiede sind hierbei vernachlässigt) und sind daher nur innerhalb eines gewissen Zeitfensters um $\Delta\omega_{AB}^0 \approx k_{AB}$ relaxationswirksam. Betrachtet man Protonenresonanzen und setzt als Untergrenze für $\Delta\omega_{AB}^0$ die natürliche Linienbreite, so liegt das durch Austauschprozesse beobachtbare Zeitfenster bei ca. 10^{-6} bis 10^{-1} s [36, 37] ($\Delta\nu_{AB}^0$ ca. $10^0 - 10^3$ Hz), also im *Mikro- bis Millisekundenbereich*, in dem sich *langsame chemische und konformative Austauschprozesse* abspielen können (vgl. 1.1.4). Die genaue Rückrechnung der Austauschrate k_{AB} aus der Linienverbreiterung $\Delta_{\text{Austausch}}$ ist nur selten möglich, da diese auch von weiteren Unbekannten (Frequenzdifferenz $\Delta\omega_{AB}^0$, relative Populationen) abhängt.

Auch die *Relaxation durch skalare Kopplung* (Tab.1.4) wirkt als Koaleszenzeffekt, wenn ihre Modulationsfrequenzen zu langsam für Spinübergänge werden. Hierbei werden die Multiplettlinien eines S-gekoppelten Spins I entweder durch chemischen Austausch von S (skalare Relaxation erster Ordnung) oder durch die enthalpische T_1 -Relaxation von S (skalare Relaxation zweiter Ordnung) gemittelt.

1.8.3 Explizite Messung von $\Delta_{\text{Austausch}}$ -Beiträgen

Die Isolierung der Linienverbreiterung $\Delta_{\text{Austausch}}$ aus der natürlichen Linienbreite ist durch Messung bei verschiedenen magnetischen Feldstärken möglich aufgrund ihrer Abhängigkeit von $\Delta\omega_{AB}^0 = |\omega_A - \omega_B| = |\gamma_A - \gamma_B|B_0$. Im Bereich des schnellen Austausches ergibt sich daher eine charakteristische $\Delta_{\text{Austausch}} \propto B_0^2$ -Abhängigkeit (s.o.). Allerdings besteht über die CSA-Kopplungskonstante (Gl.1.59) ebenfalls eine allgemeine B_0^2 -Abhängigkeit (vgl. Kapitel 1.11.6). Sie ist zwar in den theoretischen Relaxationsraten berücksichtigt, doch führt jede Abweichung des tatsächlichen vom angenommenen CSA-Tensor zu verbleibender unkompensierter B_0 -Abhängigkeit [38, 39].

Bei *gleicher* B_0 -Feldstärke läßt sich $\Delta\omega_{AB}^0$ durch kontinuierliche oder diskontinuierliche Unterdrückung der chemischen Verschiebungsentwicklung reskalieren und so der $\Delta_{\text{Austausch}}$ -Anteil herausfiltern:

- **(periodische) Spin-Echo-Methode:** Eine Abfolge von 180° -Pulsen im Echo-Abstand von 2δ (*Carr-Purcell-Meiboom-Gill Sequenz*) refokussiert periodisch die Kohärenz. Ihre Dephasierung $\Delta\phi = \Delta\omega\tau$ wird durch Reduktion der freien Präzessionszeit τ auf die Echodauer 2δ reskaliert.

- **(kontinuierliche) Spin-Lock-Methode:** Das Anlegen eines resonanten Querfeldes B_{SL} durch permanente Einstrahlung bei ω_0 reskaliert die chemische Verschiebung ω gemäß

$$\Delta\omega_{AB,eff}(B_{SL}) = \sqrt{(\omega_A - \omega_0)^2 - (\gamma B_{SL})^2} - \sqrt{(\omega_B - \omega_0)^2 - (\gamma B_{SL})^2} \quad [1.112]$$

Die Dephasierung wird dadurch auf $\Delta\phi = \Delta\omega_{AB,eff} \cdot t$ reduziert, eine Funktion des Frequenzoffsets und der Spin-Lock-Feldstärke B_{SL} .

Beide Methoden führen zur *Reduktion* der tatsächlichen Dispersion $\Delta\omega_{AB}^0$ auf eine *effektive* Dispersion $\Delta\omega_{eff}$, die nun $\Delta\omega_{AB}^0$ in der Betrachtung der Austauschbereiche (vgl.1.8.2) ersetzt. Die Linienverbreiterung $\Delta_{Austausch}$ wird dadurch funktional abhängig von 2δ bzw. B_{SL} . Mit abnehmender Echodauer 2δ bzw. zunehmender Spin-Lock-Feldstärke B_{SL} wird die Linienverbreiterung durch Koaleszenzeffekte NMR-technisch minimiert, indem das System gezielt ins *extreme narrowing limit* bezüglich des Austausches gebracht wird. Ähnlich ist die Multipllett-Mittelung und Linienverschärfung durch kontinuierliche Entkopplung eines Spins I von seinen gebundenen Spins S zu verstehen. Eine ausführliche Behandlung beider Skalierungsverfahren und funktionale Abhängigkeiten findet man z.B. in [40-42].

1.8.4. Äquivalenz zwischen $\Delta_{Austausch}$ - und $J(0)$ -Beiträgen zu R_2

Da nur die R_2 -Relaxationsrate von $\Delta_{Austausch}$ -Beiträgen erhöht wird und gleichzeitig nur sie eine $J(0)$ -Abhängigkeit aufweist, können $\Delta_{Austausch}$ -Beiträge als *irreguläre Erhöhung des $J(0)$ -Wertes* angesehen werden. Da die R_2 -Relaxationsrate (Tab.1.5) vom Nullwert der spektralen Dichte, $J(0)$, dominiert wird, erhält man für ihre Erhöhung um $\Delta J(0)$:

$$R_2 + \Delta_{Austausch} \approx \frac{1}{2}(D^2 + C^2) \cdot 4J(0) + \Delta_{Austausch} \equiv \frac{1}{2}(D^2 + C^2) \cdot 4\{J(0) + \Delta J(0)\} \quad [1.113]$$

$$\Delta J(0) = \frac{\Delta_{Austausch}}{2(D^2 + C^2)}$$

1.9 Experimentelle Hinweise zur NMR-Relaxationsmessung

1.9.1 Das Temperaturproblem ^[43]

Um die Vergleichbarkeit von Relaxationsmessungen (z.B. bei verschiedenen Feldstärken) zu gewährleisten, müssen alle Parameter, die die Molekülbewegung einer gegebenen Probe beeinflussen, konstant gehalten werden. Die kritischen Parameter lassen sich anhand der Näherungsformel (1.114) für die molekulare Korrelationszeit kompakter, starrer, isotroper Rotatoren ableiten:

$$\tau_{rot, starr} = \frac{4}{3} \pi r^3 \frac{\eta}{kT} \quad [1.114]$$

Die kritischen experimentellen Probenparameter sind demnach:

- der *hydrodynamische Radius* r , der primär vom Aggregationszustand des Moleküls und seiner Solvatisierung bestimmt wird. Diese Größen hängen wiederum von der Konzentration, der Zusammensetzung, dem Alter und der Temperatur der Probe ab. Sekundär wird der hydrodynamische Radius auch durch Molekülflexibilität beeinflusst; dieser Effekt ist gleichfalls temperaturabhängig.
- die *Probenviskosität* η , die ebenfalls von Konzentration, Probenzusammensetzung und Temperatur abhängt. Die Temperaturabhängigkeit $\eta(T)$ kann Tabellenwerken ^[44] entnommen oder durch exponentiellen Verlauf genähert werden ^[17]:

$$\eta(T) = \eta_0 \exp\left(\frac{a}{T}\right) \quad [1.115]$$

- die *Probentemperatur* T , die als direkter (vgl. 1.114) und als schwer quantifizierbarer indirekter Parameter - vgl. $r(T)$ und $\eta(T)$ - in die Relaxationsmessungen eingeht.

Wenn Relaxationsmessungen mit derselben Probe kurz hintereinander durchgeführt werden, verbleibt praktisch nur die Temperatur als kritische Größe. In Abb.1.8 ist der Verlauf $\eta(T)/T$ für reines Wasser angegeben, um eine Abschätzung der nach Gl.1.114 zu erwartenden Veränderungen in der molekularen Korrelationszeit τ_R wassergelöster Moleküle zu ermöglichen. Im typischen Temperaturfenster beträgt die Abnahme von τ_R demnach ca. 2-3% pro Grad Temperaturzunahme.

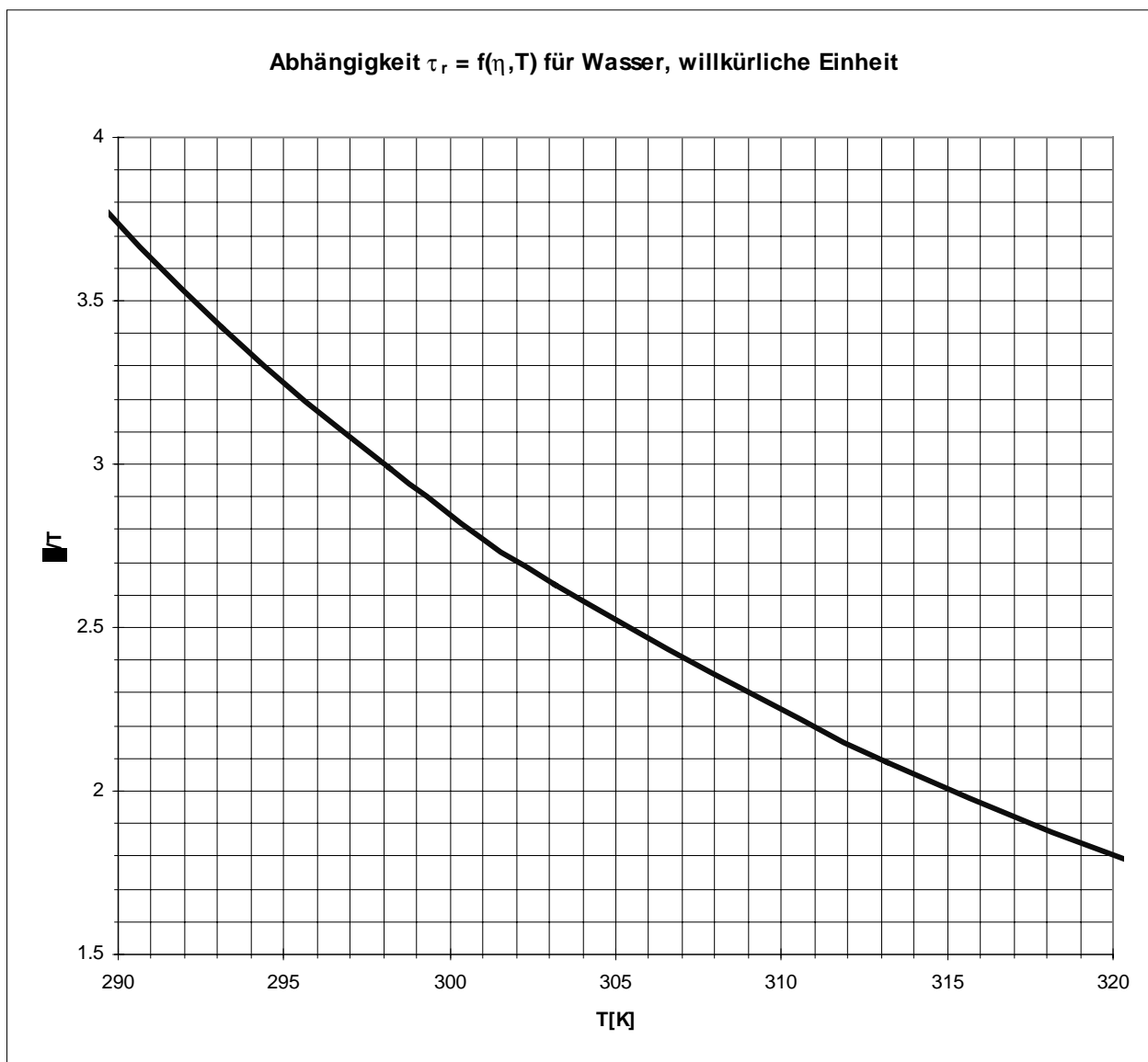


Abb.1.8 Simulation der Temperaturabhängigkeit der Rotationskorrelationszeit τ_R wassergelöster Moleküle über die Proportionalität $\tau_R \propto \eta(T)_{H_2O}/T$ (Gl.1.114). Es wurden tabellierte $\eta(T)_{H_2O}$ -Werte benutzt [44]. Über das meßtypische Temperaturfenster ergibt sich eine τ_R -Abnahme von 2-3% pro K Temperaturzunahme.

Zur Kalibrierung der Temperaturanzeige von NMR-Spektrometern bedient man sich Verbindungen, die Assoziate über Wasserstoffbrücken ausbilden können. Die Länge der Wasserstoffbrücken ist temperaturabhängig, und damit auch die chemische Verschiebung der betreffenden polaren Protonen. Aus der Verschiebungsdifferenz $\Delta\nu$ zu apolaren Protonen, die keine Wasserstoffbrückenbindungen eingehen können, kann man die tatsächliche Proben­temperatur errechnen. Für reines Methanol [45] und reinen Ethylenglycol [46] wurden die folgenden $\Delta\nu(T)$ -Beziehungen ermittelt ($\Delta\nu$ in ppm):

Methanol [175 - 330 K]: $T[K] = 403.0 - 29.46 \cdot \Delta\nu - 23.832 \cdot \Delta\nu^2$

Ethylenglycol [310 - 410K]: $T[K] = 466.0 - 101.64 \cdot \Delta\nu$

Nach Temperaturkalibrierung ist es möglich, die Probentemperaturen für verschiedene NMR-Spektrometer auf ca. $\pm 0.2\text{K}$ zur Übereinstimmung zu bringen. Dies gilt exakt nur für den Ruhezustand, denn während der Messung kommt es zu schwer quantifizierbarer Erwärmung der Probe durch die eingestrahlte Energie. Eine Erwärmung läßt sich dann, besonders für wäßrige Proben, anhand eines absinkenden LOCK-Signales erkennen [43]. Dieser interne Temperaturstandard kann durch eine eigene Temperaturreihe kalibriert werden, ist aber deutlich unempfindlicher als die o.a. Standards. Fehlergrenzen für die tatsächliche Temperatur bei subjektiv konstantem LOCK-Signal ergaben sich letztendlich aus der Auswertung von Relaxationsdaten (hnps-PLA2, HNL). Dabei schwankten die aus T_1/T_2 -Verhältnissen ermittelten molekularen Korrelationszeiten für Messungen auf verschiedenen Spektrometern um ca. 2%, was gemäß o.a. Abschätzung der Temperaturabhängigkeit von τ_R einem Temperaturfehler unter 1 K entspricht. Zur Minimierung der Probenerwärmung vgl. 1.9.4 bis 1.9.6.

1.9.2 Wasserunterdrückung und Wassersättigung

Wasserunterdrückung ist zur optimalen Aussteuerung der Signalvorverstärkung (*receiver gain*) für die Detektion schwacher Signale nötig. Außerdem reichen die Flanken des starken Wassersignales als Grundlinienstörungen oft bis in den Bereich der interessierenden Signale. Die Überlagerung der statistischen Intensitätsschwankung dieser Flanken über eine Meßreihe beeinträchtigt erheblich die Bestimmung von Relaxationsraten und läßt sich durch nachträgliche Grundlinienkorrektur bzw. Berücksichtigung eines Offsets in der Kurvenanpassung nicht befriedigend korrigieren (vgl. 1.10.1). Die Wasserunterdrückung durch Vorsättigung ist aber unbedingt zu vermeiden, da Sättigungstransfer zwischen Wasserprotonen und austauschenden Amidprotonen sowie intermolekulare Kreuzrelaxation (*NOE*) mit dem Wasser die gemessenen Relaxationsraten beeinflussen. Diese Störungen führen z.B. zur Überschätzung des gemessenen $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ -NOE [47, 48]. Die Rückführung des Wassers ins Gleichgewicht (*water flip-back*) und minimale Wasseranregung während des Experimentes sind daher entscheidend. Die Methode der Wahl zur Wasserunterdrückung ist der Einsatz von Gradienten in Kombination mit der *water flip-back* Technik [48, 49]. Durch Optimierung der Gradientenverhältnisse und Einsatz von Gradienten aus dem magischen Winkel können die Spektren erfahrungsgemäß völlig frei von Grundlinienstörungen erhalten werden.

1.9.3 Unterdrückung von Kreuzkorrelationseffekten und Kreuzrelaxation

Die Relaxationsraten von Kreuzkorrelationseffekten können das Doppelte der Autokorrelationseffekte erreichen (vgl.1.5.2). Sie führen zur Entstehung gekoppelter Kohärenzen (z.B. $I_x \leftrightarrow 2I_x S_z$) bzw. Polarisierungen (z.B. $I_z \leftrightarrow 2I_z S_z$) (vgl.1.3.3), die jeweils eigene Relaxationsraten aufweisen. In der Folge wird, ebenso wie bei Kreuzrelaxation, die Relaxation *multiexponentiell* und kann nicht mehr durch eine einzige Relaxationszeit beschrieben werden. Wenn nicht explizit die Messung von Kreuzkorrelationseffekten gewünscht ist, müssen diese daher unbedingt unterdrückt werden. Dies wird durch periodische Inversion nur des gekoppelten Spins erreicht ^[50] (vgl.1.4.3). Dieses Verfahren ist ebenso zur Unterdrückung der Kreuzrelaxation geeignet. Die Inversionsrate muß hierfür schneller als die zu unterdrückende Kreuzkorrelationsrate (bzw. Kreuzrelaxationsrate) sein (i.d.R. > 100 Hz). Da es sich beim gekoppelten Spin meist um Protonen handelt, muß hierbei auf Vermeidung der Wassersättigung geachtet werden (vgl.1.9.2). Dies erfolgt durch den Einsatz bandselektiver Inversionspulse, die die Wasserresonanz effektiv nicht anregen ^[50]. Hierdurch wird auch die Probenerwärmung minimiert.

1.9.4 Kompensation von Inhomogenitäten der Meßbedingungen

Die Messung von Relaxationsraten ist prinzipiell inhomogen, da unterschiedliche Systemstörungen erfolgen müssen (z.B. Sättigung/ keine Sättigung bei NOE-Messungen, verschiedene Mischzeiten bei Ratenmessungen). Diese haben zwangsläufig systematische Schwankungen der Meßbedingungen zur Folge. Besonders gravierend ist die *Schwankung der tatsächlichen Proben temperatur* (vgl. 1.9.1) aufgrund unterschiedlich langer bzw. starker Sättigungs-, Spin-Lock- und Spin-Echo-Sequenzen (nachfolgend als Mischsequenz zusammengefaßt). Dazu wurden verschiedene Lösungen vorgeschlagen:

1. Die Meßreihe wird mit konstanter Mischdauer durchgeführt, die der maximalen Mischzeit entspricht. Dabei wird jedoch für die Messungen mit kürzeren Mischzeiten der "überflüssige" Anteil der Mischsequenz in die Relaxationszeit vor dem nächsten *Scan* gelegt ^[51, 52]. Auf diese Weise ist die Probenerwärmung durch die Mischsequenz homogen, aber maximal. Die tatsächliche Proben temperatur kann nur schwer abgeschätzt werden mit den diskutierten Folgen für die Vergleichbarkeit mit weiteren Relaxationsmessungen (vgl.1.9.1).

2. Die Messungen mit verschiedenen Mischzeiten werden separat mit jeweils korrigierter Temperatur gemessen [43]. Zur Korrektur muß jedoch die schwer bestimmbare tatsächliche Proben temperatur *abgeschätzt* werden.
3. Nach jedem *Scan* wird ausreichend lange gewartet, damit die während des vorangegangenen *Scans* erfolgte Erwärmung wieder abgeführt werden kann [38]. Dadurch wird die Meßzeit erheblich verlängert; zudem ist die nötige Temperaturäquilibriumdauer ($>$ ca. 10 s) nur schwer abzuschätzen.
4. Nach *jedem Scan* wird eine kurze mit einer langen Mischzeit alterniert und die Aufnahme der gesamten Relaxationsmeßreihe derart *verschachtelt* durchgeführt [50]. Nun reichen kurze Temperaturäquilibriumdauern ($<$ ca. 2 s), da durch die rasche Alternation im Gegensatz zur unverschachtelten Aufnahme (Lösung 3) die kumulative Erwärmung für alle Mischzeiten gleich ist. Die Trägheit des Systems bezüglich Temperaturänderungen wird hier konstruktiv genutzt [43]. Durch die Alternation werden Langzeitinstabilitäten (z.B. Probenalterung, LOCK-Drift etc.) allgemein optimal homogenisiert.
5. In *jedem* Fall muß durch viele *Dummy Scans* vor Beginn der Aufnahme eine Temperaturäquilibrium ermöglicht werden. Wenn dabei der LOCK (als interner Temperatursensor, vgl. 1.9.1) deutlich absinkt, muß die Temperatur nachkorrigiert werden.

Die in dieser Arbeit benutzten Pulsprogramme zur Relaxationsmessung realisieren alle den verschachtelten Aufnahmemodus, der als optimale Methode zur Homogenisierung von Langzeitinstabilitäten angesehen wird. Die Listen der abzuarbeitenden Mischzeiten wurden so editiert, daß lange und kurze Mischzeiten paarweise abfolgen.

1.9.5 Wahl der Mischzeiten

Die Bestimmung der n Parameter der $I(t)$ -Abklingkurven ($n = 2$ bzw. 3 bei Grundlinienstörungen) kann analytisch durch Aufnahme von nur n Meßpunkten erfolgen, wodurch sich ein einfach bestimmtes Gleichungssystem ergibt. Eine statistische Bewertung des Ergebnisses durch nicht-analytische Optimierung ist aber erst für *überbestimmte* Gleichungssysteme möglich, da hierdurch die Streuung der experimentellen Daten erfaßt wird. Je größer die Überbestimmtheit, desto genauer wird die tatsächliche Parameterverteilung ausgeleuchtet (neben der höheren Genauigkeit der Optimierung ist dies der Hauptgrund dafür, eine Zielfunktion mit *minimaler* Anzahl Parametern zu realisieren, vgl. 1.9.2). Ein Kompromiß bezüglich der Meßzeit ist bei Relaxationsmessungen eine mindestens 3-fache Überbestimmtheit, d.h. die Aufnahme von *mindestens 6 bis 9 Meßpunkten*.

Die Verteilung der Mischzeiten auf die Meßpunkte wird bestimmt durch die zunehmende Genauigkeit der erfaßten $I(t)$ -Abklingkurve bei längeren Mischzeiten einerseits und dem gleichzeitigen Verlust an Signal-zu-Rausch-Verhältnis andererseits. Eine erste Abschätzung der T-Zeiten erhält man, indem man das Experiment mit einer kurzen (τ_1) und einer langen (τ_2) Mischzeit anlaufen läßt und die Signalintensitäten (z.B. aus den beiden ersten seriellen FID) umrechnet:

$$T = \frac{(\tau_2 - \tau_1)}{\ln\left(\frac{I(\tau_1)}{I(\tau_2)}\right)} \quad [1.116]$$

Bei einer Mischzeit von $1.5 T$ ist die Signalintensität auf ca. 25% abgefallen. Für die eigentliche Relaxationsmessung sollte die maximale Mischzeit τ_{\max} daher nicht über ca. $1.5 \cdot \sqrt{T_{\min} T_{\max}}$ liegen [53] (T_{\min} , T_{\max} = minimale bzw. maximale abgeschätzte Relaxationszeiten). Die minimale Mischzeit τ_{\min} ergibt sich aus der Mindestdauer der Mischsequenz. Die Verteilung der Mischzeiten im geschätzten Intervall $[\tau_{\min}, \tau_{\max}]$ kann nun z.B. äquidistant oder logarithmisch erfolgen, wobei kurze und lange Mischzeiten alternieren sollten (vgl. 1.9.4). Es existieren auch semi-analytische Lösungen zur Optimierung der Meßgenauigkeit, die auf rauschgewichteter Verteilung der Meßpunkte auf τ_{\min} und τ_{\max} beruhen [53, 54].

1.9.6 Probleme bei T_2 -/ $T_{1\rho}$ -Messungen

Messungen von T_2 [37, 40, 42, 55-66] und $T_{1\rho}$ [29, 36, 40, 42, 65-74] erfordern von allen Routine-Relaxationsmessungen die größte Umsicht und weisen die meisten systematischen Fehlerquellen auf. Die kritischen Parameter sind vor allem die Länge der Spin-Echo-Dauer 2δ bzw. die Stärke des Spin-Lock Feldes B_{SL} .

1. Die Probenerwärmung (vgl. 1.9.1) durch die Spin-Echo- bzw. Spin-Lock-Sequenz beeinträchtigt die Vergleichbarkeit von Relaxationsmessungen und die Probenstabilität. Sie kann durch lange 2δ bzw. schwache B_{SL} reduziert werden.
2. Das Ausmaß der Refokussion bzw. des Einfrierens der chemischen Verschiebungsentwicklung ist vom Frequenzoffset $|\omega - \omega_0|$ der Resonanzen abhängig [56, 59]. Diese Offsetabhängigkeit kann durch kurze 2δ und kurze, starke Refokussionspulse mit breitem Refokussionsprofil bzw. durch starke, homogene B_{SL} reduziert werden.
3. Die Linienverbreiterungen durch chemischen und konformativen Austausch sind von 2δ bzw. B_{SL} abhängig (vgl. 1.8.3). Zu ihrer Unterdrückung sollten 2δ kurz bzw. B_{SL} stark sein.

4. Während 2δ kommt es beim Spin-Echo-Experiment zur Entwicklung von Antiphase-Kohärenz ($X_x \rightarrow 2X_yH_z$) und die gemessene Relaxationsrate ist eine gewichtete Überlagerung von In- und Antiphase-Relaxation gemäß:

$$R_{2,\text{gemessen}} = (1 - \tan(\pi J\delta)) \cdot R_2(I_x) + \tan(\pi J\delta) \cdot R_2(2I_yS_z) \quad [1.117]$$

Deshalb müssen kurze $\delta \ll 1/[4J]$ eingesetzt werden [75]. Kurze Echozeiten sind auch zur Unterdrückung der Kreuzkorrelation nötig [61] (vgl. 1.4.3).

5. Während des Spin-Locks kann es zu Hartmann-Hahn- und ROE-Transfer auf gekoppelte bzw. benachbarte gleichartige Spins kommen. Diese Transferarten können durch schwache, inhomogene B_{SL} gedämpft werden.

6. Das Verhältnis von Inversionspulslänge p zu Echodauer 2δ beeinflusst die Mischung von T_1 - und T_2 -Relaxation im Spin-Echo-Experiment. Maximal gilt:

$$R_{2,\text{gemessen}} = \left(\frac{1}{2\frac{p}{\pi} + \delta} \right) \left\{ \left(\frac{p}{\pi} + \delta \right) \cdot R_2(I_x) + \left(\frac{p}{\pi} \right) \cdot R_1(I_z) \right\} \quad [1.118]$$

Deshalb müssen lange $\delta \gg p$ eingesetzt werden.

7. Pulsfehler des Refokussionspulses im Spin-Echo-Modul akkumulieren sich, sodaß wenige Pulse bzw. lange $\delta \gg p$ sinnvoll sind.

Bei ^{15}N - T_2 -Messungen liegt die Echodauer 2δ meist um 1 ms, wobei dieser Kompromiß maßgeblich durch Antiphase-Entwicklung und Probenerwärmung bestimmt ist. Bei $T_{1\rho}$ -Messungen scheint die Summe systematischer Fehler geringer zu sein; es werden häufig B_{SL} -Feldstärken um 5 kHz verwendet. Die Ausführungen verdeutlichen auch die Probleme bei der Bestimmung von $\Delta_{\text{Austausch}}$ -Linienverbreiterungen aus Meßreihen mit variabler Echodauer bzw. Spin-Lock-Feldstärke (1.8.3), da offensichtlich auch andere Prozesse eine δ - bzw. B_{SL} -Abhängigkeit aufweisen.

Bei der Programmierung von T_2 - und ebenfalls $T_{1\rho}$ -Experimenten dürfen *keine Gradienten während der Mischzeit* eingesetzt werden. Derartige Gradienten müßten als Gradientenechos realisiert werden, da sie auf *Kohärenz* wirken. Dann wird jedoch die Intensität-Zeit-Kurve nicht nur durch die gewünschte Kohärenz-Relaxationsrate, sondern auch durch Diffusion während des Gradientenechos moduliert, dessen Länge mit der Mischzeit anwächst. Das Problem besteht nicht bei T_1 -Messungen, da während der Mischzeit keine Kohärenz vorliegt und Gradienten hier als reine *z-spoils* wirken.

1.9.7 Die verwendeten Pulsprogramme

Die in dieser Arbeit verwendeten modulierten Pulsprogramme nach Kay ^[50] zur Messung von ^{15}N - T_1 , ^{15}N - T_2 und $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ -NOE (im Gleichgewicht) sind in Anhang E abgedruckt. Diese modulierten ^{15}N -HSQC-Experimente nutzen zur Kohärenzselektion und Wasserunterdrückung Gradienten aus dem magischen Winkel ^[76]. Die Signalintensitäten sind durch phasenmodulierten Re-INEPT Transfer optimiert (*sensitivity enhancement* ^[77]). Kreuzkorrelation ^[61] und Kreuzrelaxation werden durch H^{N} -bandselektive Inversionspulse ohne Anregung der Wasserresonanz (*Flip-Back* Technik) unterdrückt. Die Aufnahme der Datenmatrix ist zur Kompensation von Langzeit-Instabilitäten und differentieller Probenerwärmung maximal verschachtelt, indem die Mischzeiten (bzw. ^1H -Sättigung und Ruhephase im NOE-Experiment) noch vor dem Durchlauf von Phasenzyklen und Zeitinkrementation in der indirekten Dimension alterniert werden. Die erhaltene pseudo-dreidimensionale Datenmatrix nutzt die zweite indirekte Dimension lediglich als Index zur Ansteuerung der unterschiedlichen Mischzeiten. Sie darf daher nur in den konventionellen zwei Dimensionen (für ^1H und ^{15}N) fourier-transformiert werden.

1.10 Auswertungshinweise

1.10.1 Datenprozessierung

Zur Extraktion der Relaxationsdaten werden fast ausnahmslos Signalintensitäten herangezogen, da die Festlegung von Integrationsgrenzen problematischer ist. Um die Signalintensität exakt erfassen zu können, müssen die Signale möglichst hochaufgelöst sein. Die durch die Meßzeit begrenzte tatsächliche Auflösung kann durch Datenprozessierung nachträglich erhöht werden.

In der Frequenzdomäne können weitere Datenpunkte interpoliert werden, indem der FID durch Anhängen von Nullwerten (*zero-filling*) verlängert wird. Dieses "kosmetische" Verfahren ist informationsneutral und beeinflusst nur die dargestellte Datenauflösung, ohne die rechnerische Linienbreite zu verringern.

Der FID kann durch das Verfahren der linearen Vorhersage (*linear prediction, LP*) auch weitergerechnet werden, wodurch die Linienbreite *verringert* wird. Der Algorithmus paßt dazu den FID an eine vorgegebene Anzahl Signale in Intensität, Phase, Linienbreite und Frequenz an. Mit diesen Parametern kann die Oszillation im FID um eine angegebene Anzahl Zeitpunkte weitergerechnet werden. Während die Anpassung der periodisch auftretenden Frequenzen und Phasen sehr gut definiert ist, stellt die Anpassung der aperiodischen Intensität und Dämpfung (Linienbreite) eine hohe Anforderung an die Qualität der Ausgangsdaten. Besonders bei schwachen Signalen kann es zu Artefakten in der Intensität der weitergerechneten Signale kommen. Da das Ausmaß der Artefakte mit der weitergerechneten Zeitdauer wächst, darf diese nicht zu lange gewählt werden. Ferner dürfen weder zuwenig noch zuviel Signale als anpassbar angegeben werden. Im ersten Fall würden schwache Signale nicht mehr vom LP-Algorithmus erkannt und weiterberechnet werden. Im zweiten Fall würden neben tatsächlichen Signalen auch schwache Artefakte (besonders die Flanken starker Signale und Rausch-Artefakte) durch LP verstärkt werden. Auch die Wahl des korrekten LP-Algorithmus spielt eine Rolle: In schlecht programmierten LP-Algorithmen fehlt bisweilen die Randbedingung einer positiven Dämpfung und schwache Signale können im weitergerechneten FID unphysikalisch exponentiell ansteigen. Bei den constant time Experimenten tritt außerdem keine zeitabhängige Signaldämpfung durch Relaxation ein und die theoretische Linienform entspricht der Delta-Funktion. Dann kann auf die Berechnung der Linienbreite durch den LP-Algorithmus ganz verzichtet werden, wodurch die Verlässlichkeit der FID-Anpassung deutlich zunimmt (vgl. *Mirror Image Linear Prediction*). Eigene Erfahrungen mit dem LP-Modul

unter XWINNMR (Fa. BRUKER) zeigten, daß oberhalb 100% Linear Prediction (entsprechend einer Verdoppelung des FID) deutliche Intensitätsschwankungen eintraten.

Vor der Fouriertransformation wird der FID in jeder Dimension mit einer *Fensterfunktion* $W(t)$ multipliziert, um ihn stetig gegen Null zu führen (*Apodisierung*). Die Vielzahl möglicher Fensterfunktionen unterscheiden sich in der Auflösung und dem Signal-zu-Rausch-Verhältnis des erhaltenen Spektrums. Aus eigener Erfahrung wird routinemäßig eine Multiplikation mit der \cos^2 -Fensterfunktion empfohlen.

Basislinienstörungen im Spektrum addieren sich lokal auf Signalintensitäten. Sind diese Abweichungen innerhalb aller Spektren einer Relaxationsmessung konstant, so wird der erwartete exponentielle Intensitätsabfall nicht mehr gegen Null, sondern gegen einen bestimmten Offset konvergieren. Variable Basislinienstörungen innerhalb einer Relaxationsreihe führen hingegen zu einer zufälligen Streuung der Intensitäten um die erwartete Exponentialkurve. Basislinienstörungen können bis zu einem gewissen Grade nachträglich aus den Spektren herausgerechnet werden, doch muß beachtet werden, daß auch diese Rechenverfahren zufällige Streuungen einführen können. Es ist deshalb in jedem Fall vorzuziehen, Basislinienstörungen bereits bei der Messung zu minimieren. Sie entstehen insbesondere durch unzureichende Unterdrückung des Wassersignales (vgl. 1.9.2).

1.10.2 Extraktion der Relaxationszeiten

Der Zeitverlauf der Signalintensitäten wird aus der Kurvenanpassung an die Idealfunktion

$$I(T) = I_0 \exp\left(-\frac{t}{T}\right) \quad [1.119]$$

erhalten, wobei ein Abklingen ohne Offset angenommen wird. In dieser Form liesse sich die Kurvenanpassung nach Logarithmierung als lineare Regression durchführen, wodurch allerdings die einzelnen Meßpunkte gleich gewichtet würden. Tatsächlich haben die Meßpunkte den gleichen Absolutfehler (die mittlere Rauschamplitude) und müssen daher direkt, d.h. im Verhältnis ihrer relativen Intensitäten gewichtet werden! Deshalb empfiehlt sich auch für die Idealform (Gl. 1.119) die *nicht-lineare Minimierung*. Die Anfangswerte für die anzugleichenden Parameter I_0 und T , die die Konvergenz der Minimierung bestimmen, lassen sich hierbei gut abschätzen.

Die Erweiterung der Idealform um einen dritten Parameter für einen Offset reduziert die Güte der Anpassung und kann zur Überparametrisierung führen, erkennbar an einer hohen Abhängigkeiten der Parameter untereinander. Bei Abweichung von monoexponentiellem Verhalten (vgl. Kreuzrelaxation, Kreuzkorrelation) wird Gl. 1.119 ungültig.

1.10.3 Fehlerabschätzung

Eine korrekte Angabe der Fehler experimenteller Relaxationsdaten ist Voraussetzung für die statistische Unterscheidbarkeit der $J(\omega)$ -Modellfunktionen (vgl. 1.11.5).

Bei der Einzelmessung des Gleichgewichts-NOE wird der Meßfehler jedes NOE über die mittlere Rauschamplitude berechnet:

$$\Delta NOE[\%] = \sqrt{\Delta I_0^2[\%] + \Delta I_{sat}^2[\%]} \quad [1.120]$$

Bei der Einzelmessung von Relaxationsraten liefert die Kurvenanpassung an die Signalintensitäten die über alle Meßpunkte berechneten, verlässlicheren Standardabweichungen. Erfahrungsgemäß werden meist Standardabweichungen unter 2% erhalten und höhere Standardabweichungen (> 5%) können auf einzelne abweichende Meßpunkte hinweisen, die dann aus der erneuten Anpassung ausgeklammert werden.

Diese experimentellen Fehler von Einzelmessungen geben nur einen Teil der tatsächlichen Fehler wieder. Hierzu gehören besonders methodische Fehler (z.B. durch Anteile konkurrierender Relaxationsprozesse an der gemessenen Relaxationsrate, vgl. Mehrspineffekte (1.5.3), Kreuzkorrelation und Antiphase-Relaxation (1.9.3, 1.9.6) und systematische experimentelle Fehler, die im wesentlichen auf der Unsicherheit in der tatsächlichen Proben temperatur beruhen. Die realistische Annahme einer Temperaturabweichung um 0.5 K führt zu systematischen Fehlern in den Relaxationsdaten von ca. 2% (vgl. 1.9.1). Die *prozentualen* Fehleranteile summieren sich nach Gauss gemäß:

$$\Delta R[\%] = \sqrt{\Delta R_{\text{experimentell}}^2[\%] + \Delta R_{\text{Temperatur}}^2[\%] + \Delta R_{\text{methodisch}}^2[\%] + \dots} \quad [1.121]$$

Eigene Wiederholungsmessungen lieferten durchschnittliche Abweichungen von 2 - 3% für ^{15}N -Relaxationsraten und 0.05 für $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ -NOE. Eine hinreichend große Zahl an Wiederholungsmessungen zur genauen Bestimmung der statistischen Fehleranteile schließt sich aber meist aus Gründen der Meßzeit und Probenstabilität aus. Deshalb werden, in Übereinstimmung mit den meisten veröffentlichten Relaxationsmessungen [22], die folgenden *Mindestfehler* angenommen:

$\Delta R(\text{N}_z), \Delta R(\text{N}_y)$	$\Delta R(2\text{N}_z\text{H}_z)$	$\Delta R(2\text{N}_y\text{H}_z)$	$\Delta R(\text{H}_z)$	$^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ -NOE
2-3 %	3 %	3.5 %	4 %	3-5 %

1.11 Modellfreie Auswertung

Mit der modellfreien Auswertung [12, 32], der Anpassung experimentell bestimmter spektraler Dichtewerte $J(\omega_n)$ ($n = \text{Index erlaubter Übergangsfrequenzen}$) an Näherungsfunktionen $J^{\text{app}}(\omega)$, wird die lokale Molekülbewegung mit einem Minimum an Dynamikparametern (Ordnungsparameter S_i^2 und Korrelationszeiten τ_i) *quantifiziert*, die weitgehend unabhängig von der tatsächlichen Art der statistischen Bewegungen sind (*modellfrei*):

- Die *Ordnungsparameter* S_i^2 ($i = \text{Index der Bewegungsmoden}$) sind näherungsweise invers proportional zur mittleren Bewegungsamplitude (vgl.1.6.4).
- Die *Korrelationszeiten* τ_i sind ein (grobes) Maß für die mittlere Periode der statistischen Bewegungen (vgl.1.6.4).

Die hierzu gebräuchlichen $J^{\text{app}}(\omega)$ -Modellfunktionen wurden in Kapitel 1.6 hergeleitet. Die modellfreie Analyse erfordert zwar keine Annahmen über die *Art* der zugrundeliegenden diffusiven Bewegungsprozesse, jedoch explizit über die *Anzahl separierbarer Bewegungsmoden*. Dies ist der kritische Schritt der modellfreien Analyse, der für die Wahl der $J^{\text{app}}(\omega)$ -Näherungsfunktion (Tab.1.7) ausschlaggebend ist. Die *relative Zeitskala* der Bewegungsmoden beeinflusst nicht die *Gültigkeit*, wohl aber die *Genauigkeit* der Auswertung (Fehlerpropagation) [78, 79].

Der modellfreie Ansatz verlangt, daß die Bewegungsmoden untereinander unkorreliert sind. Dies ist bei anisotroper Molekülbewegung, bei der Rotationsvorzugsachsen bestehen, *prinzipiell nicht* der Fall. Die Faktorisierung der globalen Korrelationsfunktion in molekulare Rotation und interne Bewegungen gilt hier nur noch näherungsweise [31, 80, 81] (vgl. Kapitel 1.6.7). Die modellfreie Auswertung muß dann unter expliziter Berücksichtigung der Rotationsanisotropie durchgeführt werden (Kapitel 1.11.3)

Der *Schlüsselparameter* für die modellfreie Auswertung von Relaxationsdaten ist die *molekulare Rotationskorrelationszeit* τ_R [38], die die interne Zeitachse zur Bewertung lokaler Bewegungen festlegt:

- Wesentlich langsamere dynamische Prozesse ($\tau_{\text{lokal}} \geq 10^{-5}$ s) sind nur als Linienverbreiterung ($\Delta_{\text{Austausch}}$ -Beiträge) zur transversalen R_2 -Relaxationsrate erkennbar (Kap. 1.8).
- Die (natürlichen) Relaxationsraten werden ansonsten nur von lokalen Bewegungen beeinflusst, deren Korrelationszeiten maximal in der Größenordnung von τ_R liegen. Diese *Obergrenze* von ca. 10^2 ns resultiert aus der notwendigen Wichtung von τ_{lokal} bezüglich τ_R (Gl. 1.96, 1.98) bzw. aus der Auslöschung der Gesamt-Korrelations-

funktion $C^{\text{ges}}(\tau)$ durch die *unbeschränkte* Molekülrotation mit Ordnungsparameter $S^2 = 0$, der für Zeiten $\tau \gg \tau_R$ erreicht wird (vgl. 1.6.5). Die *Untergrenze* für τ_{lokal} ergibt sich aus dem Verschwinden des lokalen Bewegungsbeitrages zur gesamten spektralen Dichte aufgrund der *extreme narrowing* Näherung $J(\tau_R \rightarrow 0) \approx S^2 \tau_R \approx 0$ (Gl. 1.101) und ist bei ca. 10^{-2} ns erreicht. Noch schnellere Bewegungen skalieren die spektrale Dichte über ihren Ordnungsparameter S_i^2 (vgl. Modell 3).

Es ist also für die Identifizierung und Quantifizierung ^[38] lokaler Beweglichkeit entscheidend, die molekulare Rotationskorrelationszeit τ_R möglichst exakt zu bestimmen. Da jedoch die scheinbare bzw. experimentell zugängliche Korrelationszeit umgekehrt von überlagerter lokaler Dynamik verfälscht wird, ist es im Prinzip unmöglich, τ_R exakt aus NMR-Relaxationsdaten zu bestimmen. Nur das gewissenhafte Beachten aller verfügbaren Indikatoren lokaler Beweglichkeit kann das Risiko der τ_R -Fehlbestimmung, und damit möglicherweise die Fehlinterpretation der gesamten Proteindynamik, vermindern.

1.11.1 Das T_1/T_2 -Verhältnis als Meßgröße der Rotationskorrelationszeit τ_R

Die Abhängigkeit der Relaxationszeiten von der (effektiven) Rotationskorrelationszeit (Kapitel 1.7.2) zeigt:

- Die T_1 -Zeiten sind über fast den gesamten Zeitbereich von τ_R abhängig. Aufgrund des Minimums bei $\tau_R \approx 1/\omega_N$ sind diese Relaxationszeiten aber *nicht eindeutig* für τ_R , die entweder im *extreme narrowing* oder im *slow tumbling* Bereich liegen kann. Um das Minimum ist die Empfindlichkeit gegenüber τ_R deutlich reduziert (vgl. Abb.1.5.a). Die T_1 -Zeiten zeigen im *slow tumbling* Bereich eine mit τ_R *zunehmende Abweichung* bei Vorliegen lokaler Beweglichkeit (Abb.1.5.a).
- Die T_2 -Zeiten zeigen im Gegensatz zu T_1 eine *eindeutige* Abhängigkeit von τ_R . Sie werden durch $\Delta_{\text{Austausch}}$ -Beiträge reduziert und durch lokale Beweglichkeit erhöht (Abb.1.5.a).
- Der $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ -NOE ist ausschließlich im Übergangsbereich zwischen den beiden Grenzwerten des *extreme narrowing* und *slow tumbling* abhängig von τ_R (Abb.1.5.b) und damit in weiten Bereichen als Sensor der Korrelationszeit *ungeeignet*. Wenn jedoch der *slow tumbling* Grenzwert beobachtet wird, liefert dies eine Untergrenze für $\tau_R > 1/\omega_N$ (Abb.1.5.b).

Alle Relaxationsraten sind offensichtlich für sich allein nicht ausreichend, um τ_R frei von Beeinflussungen durch lokale Beweglichkeit zu erfassen. Eine geeignete Kombination

der Daten kann aber die Empfindlichkeit gegenüber τ_R erhöhen und zumindest einen Teil der Abhängigkeit von lokaler Dynamik eliminieren.

Durch die *Bildung des T_1/T_2 -Quotienten* ^[50] entfallen alle Parameter, die vor die spektrale Dichte $J(\omega)$ ausgeklammert werden können (vgl. Tab.1.7). Dadurch verschwindet für die einfachste $J(\omega)$ -Näherung (Modell 1, Tab. 1.7) der *einzige* Parameter lokaler Dynamik, Ordnungsparameter S^2 . Die aus dem T_1/T_2 -Verhältnis (Tab.1.5) unter *expliziter* Annahme von Modell 1 ^[50] berechneten scheinbaren *per residue* Korrelationszeiten $\tau'_{R,i}$ entsprechen also *nur* in diesem Fall genau der gesuchten globalen Korrelationszeit τ_R , fehlende $\Delta_{\text{Austausch}}$ -Beiträge vorausgesetzt. Die Überprüfung dieser essentiellen Voraussetzung für die korrekte τ_R -Bestimmung wird in 1.11.2 behandelt. Für alle anderen $J(\omega)$ -Näherungen verbleibt im T_1/T_2 -Quotienten ein Einfluß lokaler Dynamik und verfälscht die berechneten $\tau'_{R,i}$; lediglich für Modell 3 kürzt sich noch der Ordnungsparameter S_f^2 der schnellsten Bewegungen heraus.

Der Verlauf des ^{15}N - T_1/T_2 -Verhältnisses als *Indikator* der effektiven Rotationskorrelationszeit ist in Abb.1.9.a für *Modell 1* und mehrere B_0 -Feldstärken im für Proteine typischen Zeitbereich bis 15 ns dargestellt. Er wird mit sinkender Korrelationszeit immer unempfindlicher gegenüber τ_R und strebt im *extreme narrowing limit* asymptotisch gegen 1. Der T_1/T_2 -Quotient ist zur Bestimmung kleiner Korrelationszeiten damit unbrauchbar. Wie erwähnt besteht für Modell 1 *keine* S^2 -Abhängigkeit.

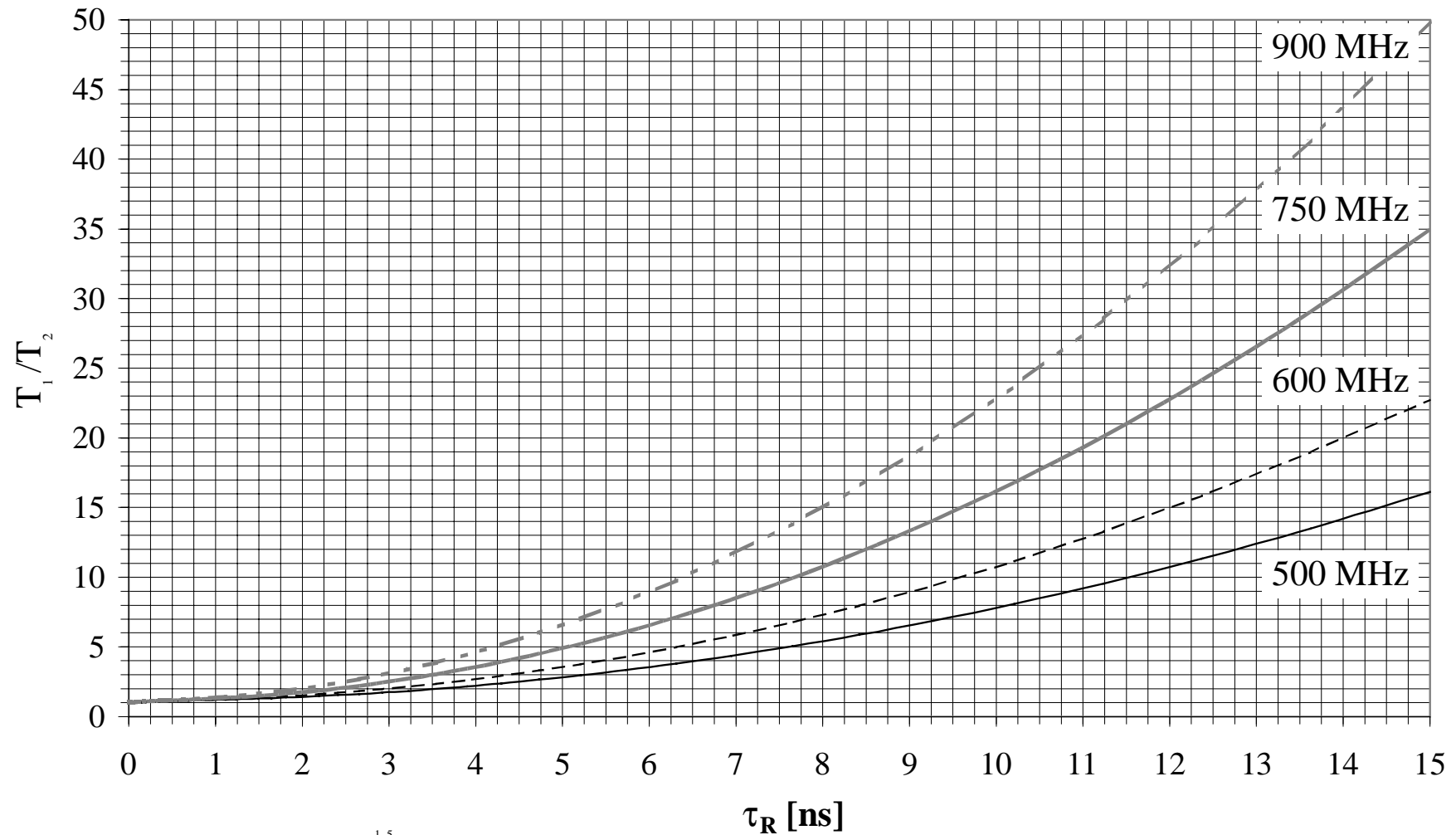


Abb.1.9.a Abhängigkeit des T_1/T_2 -Verhältnisses von der molekularen Rotationskorrelationszeit τ_R und der eingetragenen Magnetfeldstärke B_0 . Die Simulation setzt Modell 1 der spektralen Dichte $J(\omega)$ voraus und ist dann unabhängig vom Ordnungsparameter S^2 .

Nachfolgend wird die *Verfälschung* des T_1/T_2 -Verhältnisses durch lokale Dynamikparameter (außer dem einfachen S^2 in Modell 1) untersucht.

Die Abhängigkeit des ^{15}N - T_1/T_2 -Verhältnisses von der Korrelationszeit τ_{eff} und dem Ordnungsparameter S^2 einer überlagerten lokalen Bewegung ist in Abb.1.9.b für eine feste globale Rotationskorrelationszeit $\tau_R = 13.2$ ns (gültig für HNL, vgl. Kapitel 1.2) bei einer Feldstärke von 600 MHz dargestellt. Der Verlauf gilt sowohl für *Modell 2* als auch für *Modell 3*, in dem sich die S_f^2 -Abhängigkeit herauskürzt (s.o.). Die Kurven zeigen eine starke, zu S^2 proportionale Reduktion des ^{15}N - T_1/T_2 -Verhältnisses fast über den gesamten Zeitbereich und liefern damit bereits bei geringen Abweichungen von Modell 1 deutlich verzerrte (reduzierte) Korrelationszeiten τ_R . Nur für sehr kleine ($\tau_{\text{eff}} < \text{ca. } 20$ ps) und sehr große lokale Korrelationszeiten ($\tau_{\text{eff}} \gg \tau_R$) sowie für Ordnungsparameter nahe 1 verschwindet die Reduktion innerhalb der experimentellen Auflösung. In diesen Fällen gehen die Modellfunktionen 2 bis 4 in Modell 1 über (Tab.1.7). Für Modell 4 gelten dieselben Abhängigkeiten zusätzlich für τ_f und S_f^2 .

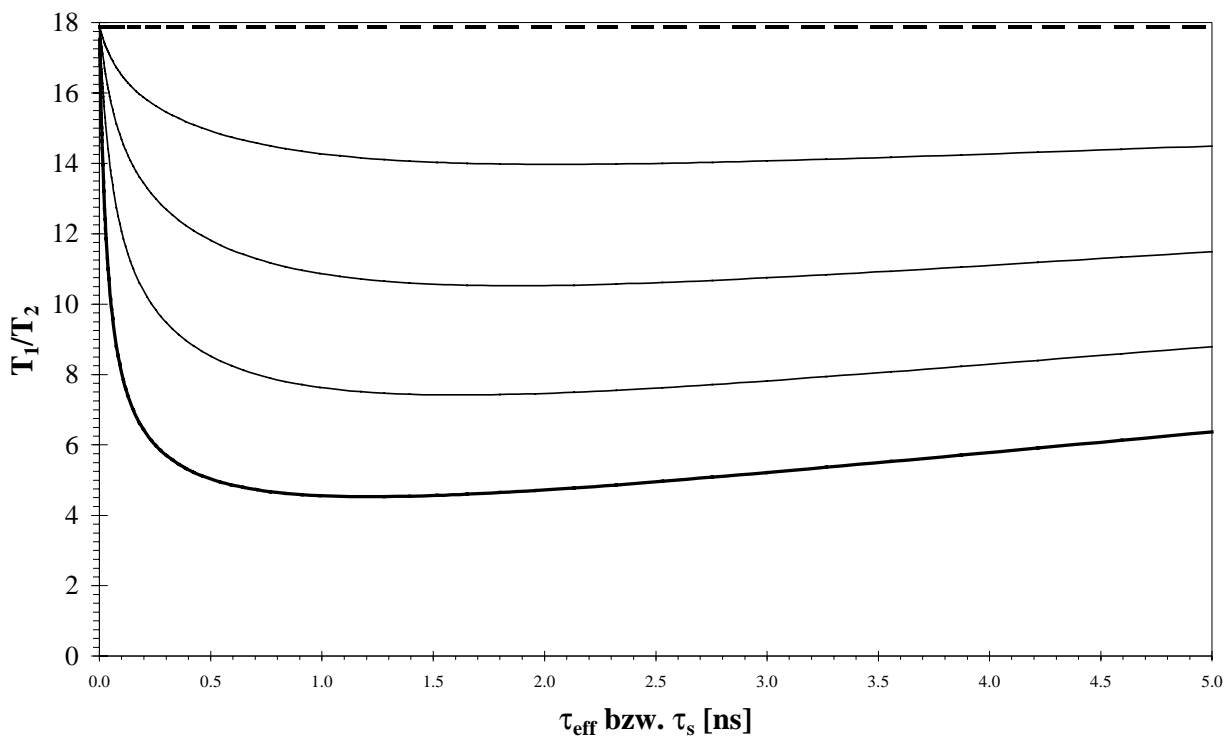


Abb.1.9.b Abhängigkeit des ^{15}N - T_1/T_2 -Verhältnisses von der Korrelationszeit einer lokalen Bewegung τ_{eff} und ihrem Ordnungsparameter S^2 (Modell 2). S^2 wird in Inkrementen von 0.2 von 1 (---, = Modell 1) bis 0.2 (—) reduziert. Simulation mit $\tau_R = 13.2$ ns bei 600 MHz.

Zum direkten Vergleich von T_1/T_2 -Verhältnisse bei unterschiedlichen B_0 -Feldern sind nur die *relativen Abweichungen vom Mittelwert* geeignet:

$$\Delta_{\text{relativ}}(T_1/T_2)_i = \frac{(T_1/T_2)_i - \overline{T_1/T_2}}{\overline{T_1/T_2}} \quad [1.122]$$

In diesen Relativabweichungen ist die allgemeine B_0 -Abhängigkeit aufgrund der Molekülrotation (Abb.1.9.a) herausgerechnet und es verbleibt nur die Feldabhängigkeit aufgrund des lokalen Bewegungsbeitrages. Die Relativabweichungen sind in Abb.1.9.c gegen die Korrelationszeit τ_{eff} einer lokalen Bewegung aufgetragen. Für die Simulation wurde der Mittelwert, der unabhängig von lokaler Bewegung sein soll, über Modell 1 berechnet. Abbildung 1.9.c zeigt, daß diese relativen Abweichungen weitgehend proportional zu B_0 sind. Nur für sehr kurze $\tau_{\text{eff}} \ll 100$ ps ist die relative Reduktion annähernd feldunabhängig (die Kurven *konvergieren*) [22].

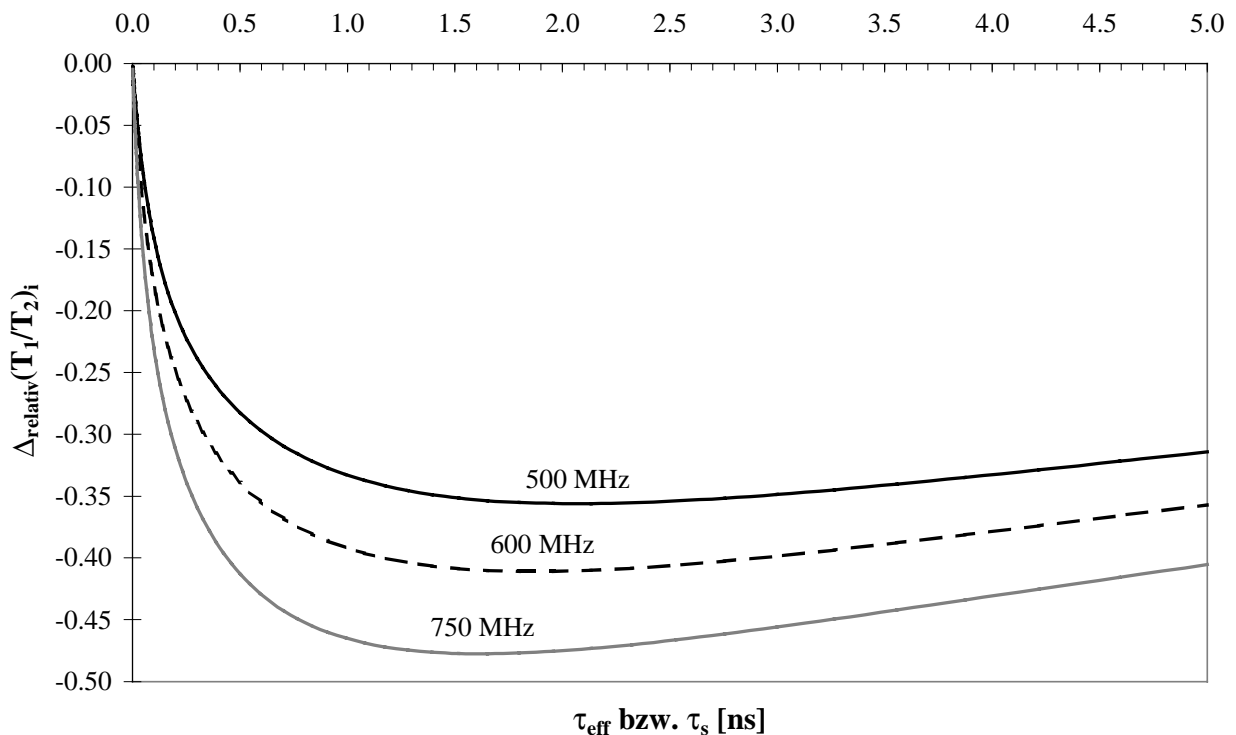


Abb.1.9.c Abhängigkeit der *relativen Mittelwert-Abweichung* (Gl.1.122) des ^{15}N - T_1/T_2 -Verhältnisses von lokaler Korrelationszeit τ_{eff} (Modelle 2, 3) und der angegebenen B_0 -Feldstärke. Simulation mit $S^2 = 0.6$ und $\tau_R = 13.2$ ns.

Eine lokale *Erhöhung des ^{15}N - T_1/T_2 -Verhältnisses* beobachtet man bei langsamen Prozessen mit Korrelationszeiten $\tau_{\text{Austausch}}$ im Bereich von ca. 10^{-5} bis 10^{-2} s, die zu $\Delta_{\text{Austausch}}$ -Beiträgen zu R_2 führen. Hierdurch werden *nur* die T_2 -Zeiten proportional zu B_0^{-2} verkürzt (vgl. 1.8.2), während die T_1 -Zeiten unbeeinflusst bleiben. Infolgedessen sind die relativen ^{15}N - T_1/T_2 -Abweichungen (1.122) proportional zu B_0^2 erhöht.

Natürlich sind auch andere Kombinationen von Relaxationsdaten zur Bestimmung von τ_R geeignet [38, 82]. Beispielsweise wird die Zweideutigkeit der T_1 -Zeiten durch Hinzunahme

des $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ -NOE aufgehoben [82], der in den Grenzbereichen des *extreme narrowing* und des *slow tumbling* deutlich verschiedene Werte hat. Die modellfreie Analyse entspricht der Berücksichtigung *aller* gemessenen Relaxationsdaten (bei allen vermessenen B_0 -Feldern) gleichzeitig, was Abweichungen einzelner Relaxationsdaten vom Erwartungswert aus den theoretischen Ratenausdrücken (Kapitel 1.5) besser kompensieren kann. Die modellfreie Analyse wird hierzu ohne Angabe einer *global festen* Korrelationszeit τ_R durchgeführt und für *jeden* Rest einzeln die scheinbare *per-residue* Korrelationszeit $\tau'_{R,i}$ neben allen anderen erforderlichen Dynamikparametern optimiert [81, 83].

Letztlich sind diese Verfahren mit der Bestimmung von τ_R aus den T_1/T_2 -Verhältnissen gleichwertig, da in jedem Fall die Selektion der geeigneten Reste zur τ_R -Mittlung erforderlich ist.

1.11.2 Selektion der Reste zur τ_R -Mittlung

Während die Empfindlichkeit der NMR-Relaxationsdaten gegenüber lokaler Beweglichkeit die Voraussetzung zur Erfassung der Moleküldynamik ist, macht sie prinzipiell die unbeeinflusste Bestimmung der *globalen* Korrelationszeit τ_R unmöglich. Diese ist aber als Bezugsgröße zur Entdeckung und Quantifizierung lokaler Beweglichkeit Voraussetzung. So hängen alle aus den individuellen T_1/T_2 -Abweichungen gewonnenen Aussagen über lokale Dynamik vom T_1/T_2 -Mittelwert ab, der aber nicht notwendigerweise die globale Korrelationszeit τ_R korrekt wiedergibt, sondern seinerseits durch Beweglichkeiten verzerrt wird. Wenn z.B. sehr viele Reste $\Delta_{\text{Austausch}}$ -Beiträge aufweisen, erhöht dies den T_1/T_2 -Mittelwert und verdeckt dadurch kleine $\Delta_{\text{Austausch}}$ -Beiträge. Gleichzeitig fallen nun für mehr Reste die T_1/T_2 -Verhältnisse unter diesen *scheinbaren* Mittelwert und täuschen schnelle Beweglichkeit vor (vgl. hnpS-PLA2, Kapitel 1.3).

Bei der Ermittlung der *globalen* τ_R aus individuellen *per residue* Daten ist es daher entscheidend, Reste mit lokaler Dynamik, die nicht mehr mit Modell 1 beschrieben werden kann, *unabhängig* von Annahmen über die gesuchte globale τ_R sicher zu erkennen und aus der Mittelung auszuschließen. Zwei NMR-Parameter zeigen unter bestimmten Voraussetzungen lokale Beweglichkeit tatsächlich weitgehend *unabhängig* von τ_R an:

1. Proteine befinden sich allgemein im *slow tumbling limit* des $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ -NOE, wo einheitlich der τ_R -unabhängige positive Grenzwert (1.106) gilt. Jede deutliche Reduktion des $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ -NOE weist daher *eindeutig* auf lokale Beweglichkeit mit Korrelationszeiten $\tau_{\text{eff}} \ll 1$ ns und kleinem Ordnungsparameter hin (vgl. Abb.1.7.a). Als kritischer Wert wird hierbei meist ein $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ -NOE von 0.6 angenommen [38, 82].

2. Langsame Bewegungsprozesse mit Korrelationszeiten zwischen ca. 10^{-6} und 10^{-1} s bewirken $\Delta_{\text{Austausch}}$ -Beiträge zu R_2 , die über ihre Abhängigkeit von experimentellen Parametern wie B_0 -Feldstärke [84], CPMG-Echodauer [37, 40, 42, 57, 65, 66] oder *SpinLock*-Feldstärke [29, 40, 42, 67, 68] unabhängig erkannt werden können (vgl. 1.8.3). Allerdings können Abweichungen des angenommenen CSA-Tensors zur gleichen B_0 -Feldabhängigkeit führen [85] (vgl. 1.8.3). Die Probleme bei den CPMG- und $T_{1\rho}$ -Messungen wurden in Kapitel 1.9.6 diskutiert [56, 59].

Diese beiden Indikatoren müssen *vor* allen anderen Selektionskriterien berücksichtigt werden! Erst danach können die individuellen T_1/T_2 -Verhältnisse auch nach *statistischen* Kriterien weitgehend mittelwert- bzw. τ_R -unabhängig selektiert werden. Typischerweise werden daher Werte, deren T_1/T_2 -Verhältnis um mehr als eine Standardabweichung vom Mittelwert abweicht [50], aus der Mittelung ausgeschlossen. Überdurchschnittliche T_1/T_2 -Verhältnisse zeigen dabei konformative $\Delta_{\text{Austausch}}$ -Beiträge, unterdurchschnittliche T_1/T_2 -Verhältnisse schnelle Beweglichkeit an (vgl. 1.11.1). Die Wahl einer Standardabweichung als Ausschlußkriterium für bewegliche Reste ist allerdings willkürlich (*statistisch*) und nur dann ausreichend, wenn die Streuung der T_1/T_2 -Verhältnisse klein bzw. die Anzahl verfügbarer Werte zur sicheren Mittelwertbildung groß ist. Je kleiner die Standardabweichung ist, desto kleinere Abweichungen können aufgelöst werden. Durch *Iteration* des Verfahrens wird die Standardabweichung generell kleiner und das Selektionsraster entsprechend schärfer. Allerdings ist diese Verfeinerung statistisch nur dann abgesichert, wenn sich der Mittelwert dadurch nicht entscheidend verändert!

Die *Auftragung der T_1/T_2 -Verhältnisse gegen die Aminosäuresequenz* erlaubt die Identifizierung von und kontrollierte Mittelung über Bereiche mit offensichtlich homogenem T_1/T_2 -Verhältnis. Falls mehrere solcher Bereiche vorliegen, deren jeweilige Mittelwerte erkennbar *differieren* und mit *Sekundärstruktur-Elementen* korrelieren, ist dies ein starker experimenteller *Hinweis auf Anisotropie* der Molekülbewegung [83, 86, 87] (vgl. 1.11.3). Unterschiedliche Mittelwerte können aber auch mit verschiedenen *Domänen* des Proteins korrelieren [83]. Dann sollte statt mit *einer globalen* Korrelationszeit mit verschiedenen *Domänenkorrelationszeiten* für jede Domäne ausgewertet werden (vgl. 1.11.3). Anhand der sequentiellen Auftragung der T_1/T_2 -Verhältnisse kann außerdem für jeden Rest bereits eine Vorab-Zuordnung der lokalen Beweglichkeit gemäß beobachteter Abweichungen (vgl. 1.11.1, Tab. 1.8) noch vor der eigentlichen modellfreien Auswertung versucht werden.

Bei Kenntnis der Proteinstruktur kann die Auswahl der Reste zur τ_R -Mittelung weiter abgesichert werden, indem man nur Reste in Bereichen mit definierter Sekundärstruktur berücksichtigt, für die eingeschränkte Flexibilität wahrscheinlicher ist. Allerdings können auch hier - zumeist zusammenhängende - Bewegungen auftreten, beispielsweise Helixschwingungen [37, 43, 88-93] oder Cystin-vermittelte bzw. induzierte konformative Beweglichkeit [93-96] (vgl. HNL und hnps-PLA2, Kapitel 2 und 3). Derartige Beweglichkeit von bzw. innerhalb Sekundärstruktur-Elementen kann wohl nur bei sehr kompakter Tertiärstruktur sicher ausgeschlossen werden.

Nach Möglichkeit sollten die T_1/T_2 -Verhältnisse bei mehreren B_0 -Feldstärken gleichzeitig betrachtet werden, was sinnvoll über ihre relativen lokalen Abweichungen (Gl.1.122) erfolgt. Dies sichert zum einen die statistische Verlässlichkeit ab. Zum anderen werden hieraus die beschriebenen feldabhängigen Effekte als weitere wichtige Indikatoren lokaler Beweglichkeit erkennbar.

Tabelle 1.8 faßt die aus den T_1/T_2 -Verhältnissen ableitbaren Aussagen über lokale Beweglichkeit und Komplikationen zusammen. Abb.1.10 zeigt das Flußdiagramm des vorgeschlagenen Selektionsverfahrens zur Bestimmung der molekularen Korrelationszeit τ_R . Dieses gilt sinngemäß auch für andere *per residue* Meßgrößen der Korrelationszeit.

Tab.1.8 Beobachtete relative lokale T_1/T_2 -Abweichungen vom Mittelwert (Gl.1.122) und ihre Interpretation.

Indikator	Interpretation
$\Delta_{\text{relativ}}(T_1/T_2)_i \propto B_0^2 > 0$	langsame lokale Prozesse mit $\tau_{\text{Austausch}}$ ca. 10^{-5} bis 10^{-2} s ($\Delta_{\text{Austausch}}$ -Beiträge)
$\Delta_{\text{relativ}}(T_1/T_2)_i \propto B_0^{-1} < 0$	schnelle lokale Bewegungen mit τ_{eff} ca. 10^{-2} bis 10^2 ns bei annähernder Feldunabhängigkeit: $\tau_{\text{eff}} \ll 10^{-2}$ ns
$\Delta_{\text{relativ}}(T_1/T_2)_i$ -Dispersion $\propto B_0$	anisotrope Molekülrotation (insbesondere bei Korrelation mit der ^{15}N - ^1H -Vektororientierung)
$\overline{T_1/T_2}$ regional verschieden	Bei Korrelation mit Sekundärstruktur-Elementen: \Rightarrow anisotrope Molekülrotation Bei Korrelation mit Protein-Domänen: \Rightarrow verschiedenen Domänen-Korrelationszeiten

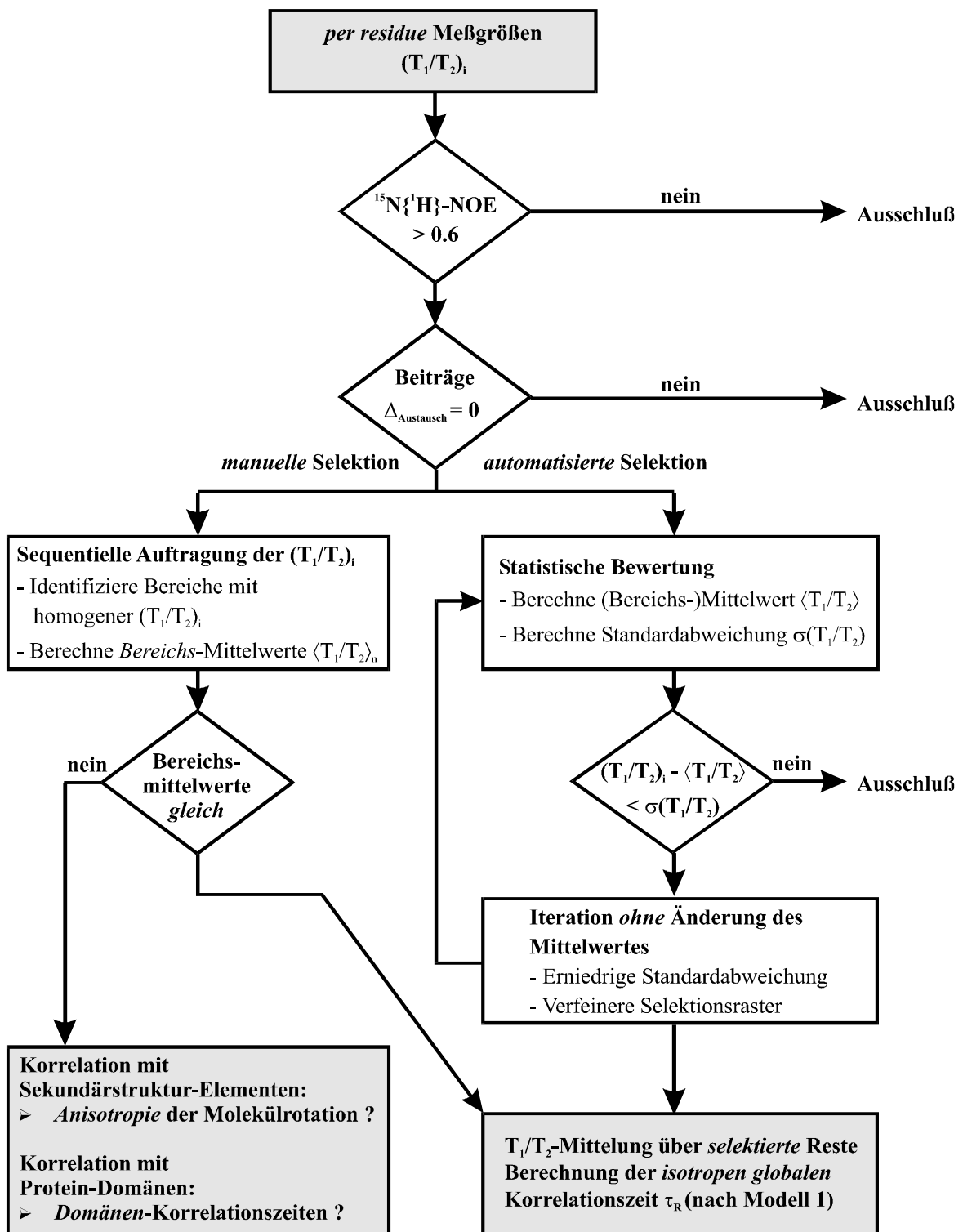


Abb.1.10 Empfohlenes Selektionsschema zur Bestimmung der globalen (molekularen) Rotationskorrelationszeit aus experimentellen per residue T_1/T_2 -Verhältnissen. Das Selektionsschema soll gewährleisten, daß für die letztlich ausgewählten Reste mit größter Wahrscheinlichkeit Modell 1 der spektralen Dichte gilt, für die allein die berechnete Korrelationszeit der globalen Korrelationszeit entspricht. Das Selektionsschema liefert ebenfalls Hinweise auf anisotrope Rotation und unterschiedliche Domänen-Beweglichkeit. Diese beiden Komplikationen verbieten im Prinzip die Definition einer einzigen globalen Korrelationszeit. Stattdessen muß die modellfreie Auswertung dann mit einzelnen, von der $N-H^N$ -Vektororientierung abhängigen Korrelationszeit bzw. mit jeweiligen Domänen-Korrelationszeiten erfolgen.

1.11.3 Komplikationen: Domänenbewegung, Anisotropie der Rotation, Dimerisierung

Die modellfreie Auswertung beruht auf der Annahme einer *einheitlichen* Bezugszeit. Jede lokale Abweichung der scheinbaren von dieser globalen Korrelationszeit wird durch die modellfreie Auswertung *ausschließlich* als lokale Beweglichkeit interpretiert und entsprechend in Dynamikparametern quantifiziert. Die in diesem Kapitel besprochenen Komplikationen ^[81] führen aber dazu, daß im Prinzip *keine global einheitliche Rotationskorrelationszeit* mehr definiert werden darf. Abweichungen von einer angenommenen einheitlichen Korrelationszeit können dann auch andere Ursachen als lokale Bewegungen haben. Diese *zusätzliche Streuung* der *per residue* Korrelationszeiten $\tau'_{R,i}$ bzw. ihrer Meßgrößen T_1/T_2 muß also vor der modellfreien Auswertung abgezogen werden, denn nur die Differenz ist wirklich auf lokale Beweglichkeit zurückzuführen. Andernfalls erhält man fehlerhafte Dynamikparameter, falsche Zuordnung der $J(\omega)$ -Modellfunktionen und insgesamt ein verfälschtes Bild über die Proteindynamik ^[81].

In modular aufgebauten Proteinen können sich einzelne Domänen relativ zueinander bewegen ^[83] und daher verschiedene **Domänen-Korrelationszeiten** $\tau_{\text{Domäne}}$ besitzen. Bei Auswertung mit einer *globalen* τ_R ergibt sich dann ein trügerisches Bild für die Proteindynamik. Die modellfreie Auswertung kompensiert $\tau_{\text{Domäne}} > \tau_R$ z.B. durch artifizielle $\Delta_{\text{Austausch}}$ -Beiträge und täuscht damit langsame konformative Bewegung der gesamten Domäne mit μs - bis ms -Korrelationszeiten vor. Diese kann nur durch explizite Messung der $\Delta_{\text{Austausch}}$ -Beiträge ausgeschlossen werden. Im umgekehrten Fall für $\tau_{\text{Domäne}} < \tau_R$ erscheint die Domäne flexibel im Nanosekunden-Bereich mit überschätzten Amplituden (unterschätzten Ordnungsparametern; vgl. Abhängigkeit des T_1/T_2 -Verhältnisses in Abb.1.9.b). Durch modellfreie Auswertung mit individuellen *Domänen*-Korrelationszeiten wird die äußere Relativbewegung ausgeblendet und nur noch die lokale Beweglichkeit *innerhalb* der Domänen bewertet. Die Relativbewegung der Domänen ergibt sich dann im korrekten Zeitbereich durch die Unterschiede ihrer Domänen-Korrelationszeiten nach Abzug des *Anisotropie-Anteils* (s.u.). Entsprechend können Domänen-Bewegungen nur in der *sequentiellen Auftragung* der T_1/T_2 -Verhältnisse (oder gleichwertiger Indikatoren der effektiven lokalen Korrelationszeit) durch *unterschiedliche Mittelwerte für die einzelnen Domänen* erkannt werden.

Durch **Anisotropie der Molekülrotation** wird die *per-residue* Korrelationszeit $\tau'_{R,i}$ und daher das individuelle T_1/T_2 -Verhältnis abhängig von der ^{15}N - ^1H -Vektororientierung im Molekül (vgl. 1.6.7). Die $\tau'_{R,i}$ streuen entsprechend um eine isotrop gemittelte Rotationskorrelationszeit $\tau_{R,\text{iso}}$ (Gl. 1.94). Diese *orientierungsabhängige* Streuung der T_1/T_2 -Ver-

hältnisse kann aus der Molekülstruktur zurückgerechnet werden (vgl. 1.12) und steigt mit der B_0 -Feldstärke (vgl. Abb.1.9.a) . Sie muß von den experimentellen T_1/T_2 -Verhältnissen abgezogen werden, um die Fehlinterpretation von Abweichungen als lokale Dynamik zu vermeiden. Bei axialer Anisotropie ist das T_1/T_2 -Verhältnis für die ^{15}N - ^1H -Vektoren parallel zur Hauptachse (Zylinderachse) D_{\parallel} reduziert, was Nanosekunden-Beweglichkeit (Modelle 3 und 4) vortäuscht [81]. Für die ^{15}N - ^1H -Vektoren senkrecht zur Hauptachse (Zylinderachse) ist das T_1/T_2 -Verhältnis erhöht; dies täuscht langsame lokale Prozesse vor, entsprechend lokalen $\Delta_{\text{Austausch}}$ -Beiträgen (vgl. hnps-PLA2, Kapitel 3). Nach *Aggregation* (s.u.) können auch isotrope Monomere stark anisotrope Molekülbewegung aufweisen [81].

Bei bekannter Struktur soll in jedem Fall die Anisotropie der Molekülrotation aus dem Achsenverhältnis des berechneten Rotationstensors abgeschätzt werden (vgl. 1.12). Ab einem Hauptachsenverhältnis größer ca. 1.5:1 [81] wird die strukturell bedingte Streuung der *per residue* Korrelationszeiten bezüglich der experimentellen Auflösung signifikant. Für die *experimentelle Entdeckung* anisotroper Molekülrotation aus der Auftragung der einzelnen T_1/T_2 -Verhältnisse ist von entscheidender Bedeutung, daß die ^{15}N - ^1H -Vektoren innerhalb eines Sekundärstruktur-Elementes einheitlich orientiert sind: sie liegen innerhalb von Helices parallel zur Helixachse und innerhalb von β -Faltblättern senkrecht zum β -Strang. Zusätzlich ist in Sekundärstrukturen die dynamische Verfälschung der gemessenen T_1/T_2 -Verhältnisse unwahrscheinlicher als in ungeordneten Bereichen. Daher ist eine beobachtete *Korrelation zwischen deutlich verschiedenen T_1/T_2 -Bereichsmittelwerten und einzelnen nicht-parallelen Sekundärstruktur-Elementen* ein starker Hinweis auf anisotrope Molekülrotation. Die strukturell bedingte Streuung der *per residue* Korrelationszeiten bzw. der relativen T_1/T_2 -Abweichungen steigt gemäß Abb. 1.9.a mit der B_0 -Feldstärke. Beispielsweise werden in hnps-PLA2 (Kapitel 3) für zwei *parallele* α -Helices die *gleichen* Mittelwerte, für eine dritte, diagonal liegende Helix aber ein deutlich niedrigerer Mittelwert beobachtet (Abb.3.6). Die experimentelle Beobachtbarkeit anisotroper Molekülrotation erfordert also mindestens zwei *nicht-parallele* Sekundärstruktur-Elemente (genauer: nicht-parallele ^{15}N - ^1H -Vektoren). Für eine einzelne Helix ist sie experimentell nicht beobachtbar und in diesem Sonderfall kann auch die *isotrope* modellfreie Auswertung direkt durchgeführt werden [97, 98]. Ein weiteres Problem ist mögliche *kooperative* Dynamik des ganzen Sekundärstruktur-Elementes, die die T_1/T_2 -Verhältnisse *einheitlich* verfälscht und die strukturell bedingte T_1/T_2 -Verschiebung überdeckt. Derartige kooperative Bewegungen wurden bereits für Helices nachgewiesen [37, 89-91]; sie sind vermutlich für β -Faltblätter weniger relevant.

Anisotropie der Molekülrotation muß auch bei der Bewertung unterschiedlicher Domänen-Korrelationszeiten berücksichtigt werden, da deren Streuung nicht nur durch die *Relativbewegung*, sondern auch durch die *Relativorientierung* der Domänen beeinflusst wird. Zusammengefaßt sind eine mit der B_0 -Feldstärke steigende Dispersion der relativen T_1/T_2 -Abweichungen [69], ihre hohe Korrelation mit der orientierungsabhängig rückgerechneten Verteilung [69, 83, 84, 86, 99] sowie unterschiedliche Bereichs-Korrelationszeiten [83] Indikatoren für die Anisotropie der Molekülrotation (vgl. Tab.1.8, Abb.1.10).

Durch **Dimerisierung** wird in der Regel die Anisotropie des Moleküles und damit der Molekülrotation erhöht. Der für das Monomer berechnete Rotationstensor ist zur Rückrechnung der strukturellen T_1/T_2 -Streuung dann fehlerhaft. Verläuft die Aggregation *reversibel* mit Austausch-Korrelationszeiten im μ s- bis ms-Zeitbereich, so führt dies an der Dimerisierungsseite auch für tatsächlich (in diesem Zeitbereich) starre Reste zu $\Delta_{\text{Austausch}}$ -Beiträgen. Neben der möglichen Fehlinterpretation dieser $\Delta_{\text{Austausch}}$ -Beiträge als *intra-* statt *intermolekulare* Bewegungsprozesse wird hierdurch auch die Korrelationszeit erhöht, wenn diese vermeintlich starren Reste zur τ_R -Mittelung herangezogen werden. Die Korrelationszeiten werden aber auch ganz allgemein durch die gewichtete Mittelung über Monomer und Dimer erhöht.

Asymmetrische Dimere können NMR-spektroskopisch einfach nachgewiesen werden. Für symmetrische Homodimere sind die Spektren von Homomer und Dimer jedoch identisch. In diesem Fall sind z.B. Diffusionsmessungen und Messungen der Sedimentation in der Ultrazentrifuge hilfreich (vgl. HNL, Kapitel 2). Reversible Dimerisierung kann auch über *konzentrationsabhängige* Relaxationsmessungen nachgewiesen werden, wobei allerdings der Einfluß der Proteinkonzentration auf die Probenviskosität oft nur schwer abzuschätzen ist. Sowohl erhöhte Viskosität als auch Dimerisierung können daher für eine beobachtete Zunahme der Rotationskorrelationszeit bei höheren Proteinkonzentrationen verantwortlich sein (vgl.1.9.1).

1.11.4 Bestimmung der Dynamikparameter

Die automatisierte Anpassung der experimentellen Relaxationsdaten an die Modellfunktionen der spektralen Dichte $J(\omega)$ (Tab.1.7), jeweils unter Berücksichtigung möglicher $\Delta_{\text{Austausch}}$ -Beiträge zu R_2 , erfolgt durch nicht-lineare Minimierung einer Zielfunktion X^2 . X^2 faßt die aktuellen Abweichungen der berechneten von den experimentellen Daten, gewichtet mit ihren jeweiligen angenommenen Fehlern, zusammen. Die einzelnen Summanden werden quadriert (*Fehlerquadrate*), um die Kompensation positiver durch

negative Abweichungen zu vermeiden. Man definiert die gewichtete Fehlerquadrat-Summe als Zielfunktion X^2 :

$$X^2(\zeta; n - m) = \sum_i^n \left(\frac{V(\zeta_m)^{\text{berechnet}} - V^{\text{gemessen}}}{\Delta V^{\text{angenommen}}} \right)_i^2 \quad [1.123]$$

Der Index i läuft über alle n eingesetzten Meßpunkte V (z.B. T_1 , T_2 , NOE bei verschiedenen Feldstärken). Der Satz ζ eingestellter Variabler (Ordnungsparameter, Korrelationszeiten und $\Delta_{\text{Austausch}}$ -Beitrag) besteht aus den m zu minimierenden Parametern der gewählten Modellfunktion (1 bis 4, Tab.1.7). Die Wahl der besten Modellfunktion wird im nachfolgenden Kapitel 1.11.5 beschrieben. Jedes Abweichungsquadrat wird mit dem angenommenen experimentellen Fehlerquadrat ΔV^2 gewichtet (vgl.1.10.3).

Die Probleme bei nicht-linearer Minimierung beruhen auf der Vorlage mehrerer, eventuell entarteter Minima der Zielfunktion. Die Wahl der Schätzwerte (Anfangswerte) der zu berechnenden Parameter hat daher meist entscheidenden Einfluß darauf, ob die Minimierung gut konvergiert und zum gesuchten globalen Minimum führt. Die Weite des Suchgitters für einzelne Parameter (Schrittweite der Minimierung) ist ebenfalls kritisch. Sie bestimmt die Rechenzeit bzw. den abgesuchten Funktionsraum und die Genauigkeit der Minimierung. Sie hat aber auch Einfluß auf das Auffinden von Minima, da zu scharfe Minima nicht mehr erfaßt werden. In der Praxis müssen insbesondere die Anfangswerte realistisch gewählt werden. Zusätzlich sollte die Minimierung mit mehreren Anfangswerten, die sich um Größenordnungen unterscheiden, wiederholt werden. Dadurch vergrößert sich der abgesuchte Funktionsraum und lokale Minima können unterschieden werden. Zur nicht-linearen Minimierung ^[100] verwendet man meist den Levenberg-Marquardt-Algorithmus als das bislang robusteste Verfahren (bezüglich der Wahl der Anfangswerte), aber auch das klassische Newton-Raphson-Verfahren. Letzteres ist zwar weniger robust, kann aber durch Randbedingungen oft sinnvoll eingeschränkt werden und konvergiert im Regelfall von allen Verfahren am schnellsten.

Die Fehler in den berechneten Parametern lassen sich einerseits nach dem klassischen, aber rechenintensiven Monte-Carlo Verfahren ermitteln. Hierbei werden die Meßdaten zufällig innerhalb ihrer experimentellen Fehler variiert und die Minimierung erneut durchgeführt. Die Monte-Carlo-Würfe wiederholt man so oft, bis sich eine statistische Verteilung der berechneten Parameter zeigt (signifikant nach ca. 100 Würfeln). Aus dieser Verteilung ist dann die Standardabweichung der Parameter erhältlich. Alternativ erhält man Varianzen der berechneten Parameter direkt als Nebenprodukt der Minimierung in Form der Kovarianzmatrix.

Neben dieser automatisierten Bestimmung durch nicht-lineare Optimierung wurde auch die (manuelle) grafische Ermittlung der Dynamikparameter und ihrer Fehler vorgeschlagen [78, 79]. Ebenfalls wurde eine statistische Bestimmungsmethode nach *Bayes* (ähnlich der *maximum likelihood* Methode) vorgeschlagen [101].

1.11.5 Wahl der wahrscheinlichsten Modellfunktion

Die minimierten Zielwerte X^2_{\min} sind gleichzeitig *Zufallsvariable* und als Testgröße für statistische Bewertungen geeignet [102], wenn die Meßfehler klein, unkorreliert und normalverteilt sind und keine Beschränkung von X^2 durch Parameterwerte vorliegt, die an einen vorgegebenen Grenzwert angeschlagen haben. Unter diesen nachfolgend näher erläuterten Voraussetzungen sind die X^2_{\min} statistisch verteilt und es gilt in guter Näherung die χ^2 -Verteilung mit $(m-n)$ Freiheitsgraden (das nicht-lineare Gleichungssystem ist $(m-n)$ -fach überbestimmt).

Tests zur Bewertung der Gültigkeit der Modellfunktionen lassen sich als Akzeptanztest oder als Alternativentest formulieren. Beim **Akzeptanztest** wird untersucht, ob die zugrundegelegte Modellfunktion zu einem akzeptablen X^2_{\min} -Wert führt oder ob dieser so hoch ist, daß das Modell verworfen werden muß. Als Akzeptanztest kann näherungsweise ein analytischer χ^2 -Test durchgeführt werden. Dazu wird aus der tabellierten $\chi^2(n-m)$ -Verteilung der kritische Wert χ^2_{krit} für 5% Restwahrscheinlichkeit (das sog. 5%-Quantil) bestimmt. Diese Restwahrscheinlichkeit wird üblicherweise als nicht signifikant angesehen. Ist $X^2_{\min} > \chi^2_{\text{krit}}$, so wird die Modellfunktion verworfen. Will man auf die χ^2 -Näherung verzichten, um Mehrdeutigkeiten und Entartungen der zu X^2_{\min} gehörigen Minima zu berücksichtigen, so kann die tatsächliche Verteilung von X^2_{\min} nach der Monte-Carlo-Methode erzeugt werden. Dazu werden die experimentellen durch die berechneten (*hypothetischen*) Meßpunkte ersetzt und innerhalb der angenommenen experimentellen Fehler variiert. Nach der Minimierung erhält man ein neues X^2_{\min} . Mit ca. 100 Monte-Carlo-Würfen hat man die tatsächliche X^2_{\min} -Verteilung hinreichend genau erfaßt, um den empirischen kritischen $X^2_{\min,\text{krit}}$ -Wert für das 5%-Quantil zu bestimmen. Wiederum wird für $X^2_{\min} > X^2_{\min,\text{krit}}$ die benutzte Modellfunktion verworfen.

Beim **Alternativentest** wird untersucht, ob die Reduktion des X^2_{\min} -Wertes bei Anwendung einer komplizierteren Modellfunktion (d.h. mit mehr Parametern) signifikant ist, um sie gegenüber einer einfacheren Modellfunktion vorzuziehen. Dieser Test wird als direkter *paarweiser* Vergleich von $X^2_{\min,1}$ - und $X^2_{\min,2}$ -Fehlerquadraten aus unterschiedlichen Modellfunktionen 1 und 2 nach Fisher durchgeführt (**F-Test**). Es ist

$$F_{n_1, n_2} = \frac{n_2 \cdot \chi_{n_1}^2}{n_1 \cdot \chi_{n_2}^2} \quad [1.124]$$

mit $n_i = [n-m]_i$ = Anzahl der Freiheitsgrade der Modellfunktion i . Aus den tabellierten Werten der F-Verteilung entnimmt man den kritischen F_{krit} -Wert für das 5%-Quantil und bevorzugt nur dann die höherparametrisierte Modellfunktion, wenn $F > F_{\text{krit}}$.

Der Vorteil des F-Tests gegenüber den Akzeptanztests ist die größere Unabhängigkeit der Aussage von den angenommenen experimentellen Fehlern, da diese bei der Quotientenbildung $X_{\text{min},1}^2/X_{\text{min},2}^2$ weitgehend herausgemittelt werden. Bei den Akzeptanztests ist eine realistische Fehlerangabe (vgl. 1.10.3) hingegen kritisch. Zu niedrige Fehlerannahmen führen hier zur Ablehnung auch der kompliziertesten Modelle (*fälschliche Hypothesenverwerfung*), während zu hohe Fehlerannahmen zur Akzeptanz immer auch der einfachsten Modellfunktion führen (*fälschliche Hypothesenannahme*).

Alle beschriebenen statistischen Bewertungsverfahren gehen von der *statistischen Gleichwertigkeit* der Zufallsvariablen X_{min}^2 aus. Sind für einzelne Parameter nach der Minimierung einschränkende Randbedingungen wirksam geworden, so erhält man ein $X^2 \neq X_{\text{min}}^2$, das einer anderen Verteilung gehorcht als X_{min}^2 . Die Näherung einer χ^2 -Verteilung, die auch dem F-Test zugrunde liegt, ist dann ungültig. In diesem Fall muß die gewählte Modellfunktion als überparametrisiert verworfen werden, und zwar unabhängig von einer (scheinbaren) Reduktion der X^2 -Fehlerquadrate. Aus analogen Erwägungen muß natürlich auch für die zugrundeliegenden Meßdaten statistische Gleichwertigkeit gelten. Systematische Abweichungen einzelner Meßpunkte (z.B. aufgrund verschiedener Temperaturen, unterschiedlich langer CPMG-Echos, unterschiedliche geräteabhängige Fehler bei verschiedenen Feldstärken etc.) führen dazu, daß der Erwartungswert von X_{min}^2 nicht mehr gleich Null ist und müssen berücksichtigt werden. Falls die betroffenen Meßpunkte nicht von ihrer systematischen Abweichung bereinigt werden können, müssen sie aus der Zielfunktion X^2 eliminiert werden. Im Fall unterschiedlicher Temperaturen ist z.B. eine Reskalierung der Meßpunkte möglich (vgl. HNL, 2.5.3), wenn die Temperaturdifferenz nicht zu groß und hinreichend genau bekannt ist.

Für die Wahl der wahrscheinlichsten Näherungsfunktion für die spektrale Dichte ist die korrekte Wahl der globalen Korrelationszeit τ_R (bzw. bei anisotroper Molekülrotation nach Abzug der strukturellen Streuung der *per residue* Korrelationszeiten die isotrop gemittelte Korrelationszeit $\tau_{R,\text{iso}}$ (vgl. 1.11.3) elementare Voraussetzung. Dabei entscheidet fast ausschließlich der gewählte *Startwert* von τ_R (vgl. 1.11.2), denn eine nachträg-

liche globale Optimierung von τ_R führt zum *lokalen* Minimum von X^2_{\min} und bestätigt weitgehend nur die getroffene Modellzuordnung.

Dennoch muß nach der Zuordnung der wahrscheinlichsten Modellfunktionen τ_R als *globaler* Parameter verfeinert werden. Zum einen kann der optimierte τ_R -Wert in einigen Fällen doch für die Wahl einer Modellfunktion entscheidend werden. Zum anderen hängt aber nicht nur die Wahl des Bewegungsmodells, sondern auch der Wert und insbesondere die Präzision der optimierten Parameter lokaler Dynamik von τ_R ab [38]. Die τ_R -Abhängigkeit ist für die Korrelationszeiten lokaler Bewegungen dabei erheblich größer als für die Ordnungsparameter.

Da τ_R seinerseits von den gewählten Modellzuordnungen beeinflusst wird, sind zur unverzerrten τ_R -Optimierung die Reste mit fraglicher Zuordnung auszuschließen. Mit der optimierten Rotationskorrelationszeit wird nun die Modellzuordnung insbesondere in fraglichen Fällen erneut überprüft und dann wiederum τ_R global optimiert. Nach einigen Iterationen sollten die Modellzuordnungen gesichert sein und sowohl die Parameter lokaler Dynamik als auch der Parameter τ_R der globalen Dynamik konvergieren.

1.11.6 Komplikationen: Variabilität der Kopplungskonstanten

Bislang wurde bei der Berechnung von Relaxationsraten und der modellfreien Auswertung immer von exakt bekannten, konstanten und einheitlichen Kopplungskonstanten ausgegangen. Dies ist jedoch nur eine (gute) Näherung; mögliche Ursachen und Auswirkungen von Variationen in den Kopplungskonstanten werden nachfolgend untersucht.

Unsicherheiten in den berechneten *dipolaren Kopplungskonstanten* D sind auf die in Gl. 1.57 eingesetzten Abstände zurückzuführen. Die kristallographisch nur hinreichend genau bestimmten Abstände gelten für Modellsysteme und können z.B. im Fall der ^{15}N - ^1H -Bindung in Amidgruppen durch Wasserstoffbrücken lokal aufgeweitet sein. Eine spezielle Fehlerquelle sind auch übersehene dipolare Kopplungen zwischen Spin I und weiteren Spins X (Mehrspineffekte, vgl. 1.5.3). Infolgedessen wäre die *effektive* Dipol-Dipol-Kopplungskonstante $D_{\text{IS,eff}}$ gegenüber dem idealen 2-Spin-System (IS) vergrößert, was durch Einführung eines verkürzten, effektiven Radius in die D_{IS} -Kopplungskonstante (1.57) kompensiert wird:

$$r_{\text{IS,eff}}^{-3} = r_{\text{IS}}^{-3} + \sum_X r_{\text{IX}}^{-3} \quad [1.124]$$

Die Mittelung des Radius in der dipolaren Kopplungskonstanten erfolgt jedoch in inverser dritter Potenz und in den Relaxationsraten, die die Quadrate D^2 enthalten, sogar

in inverser sechster Potenz. Daher müssen Abstandsfehler bei der Auswertung von Relaxationsraten im Rahmen der experimentellen Fehler in der Regel nicht berücksichtigt werden. Ansonsten würden *einheitlich überschätzte* (effektive) Radien zu einer *allgemeinen Unterschätzung* der partiellen Dipol-Relaxationsraten (Tab.1.5) führen. Sie würden z.B. für Modell 1 durch Kompensation zur *Überschätzung* des quadratischen Ordnungsparameters S^2 führen, der als allgemeiner Skalierungsfaktor wirkt [43].

Viel wichtiger sind die *Unsicherheiten im CSA-Tensor*. Wenn die *Lage seiner Hauptachsen* vom Erwartungswert abweichen, werden hiervon die Ordnungsparameter $S^{\text{CSA/Dipol}}$ der Kreuzkorrelation beeinflusst [39] (Gl. 1.72). Bei der üblichen Unterdrückung der Kreuzkorrelation werden diese Fehler aufgehoben. Bei anisotroper Molekülrotation gelingt aber nun die korrekte Rückrechnung der orientierungsabhängigen Streuung der *per residue* Korrelationszeiten nicht mehr (vgl. 1.11.3). Fehler in den *Eigenwerten* (CSA) des CSA-Tensors sind im Realfall noch gravierender. Eine *Unterschätzung* der CSA führt zur *Unterschätzung* der CSA-Relaxationsbeiträge und damit zur *Überschätzung* des quadratischen Ordnungsparameters S^2 (s.o.). Die Fehler verstärken sich aufgrund der B_0^2 -Abhängigkeit der CSA-Kopplungskonstanten mit steigendem Feld [38, 85] (Abb.1.11). Da hiervon alle Relaxationsraten betroffen sind, kürzt sich die CSA-Abhängigkeit allerdings im $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ -NOE und in den relativen T_1/T_2 -Verhältnissen weitgehend heraus. Hierin besteht der wesentliche Unterschied zu $\Delta_{\text{Austausch}}$ -Beiträgen, die ebenfalls mit B_0^2 steigen, aber ausschließlich R_2 erhöhen, und damit auch das T_1/T_2 -Verhältnis.

Die aus NMR-Messungen an Peptidkristallen bestimmte isotrope ^{15}N -CSA von -160 ppm wird heute als zu gering angesehen und dürfte im Mittel bei ca. -170 ppm liegen [69]. Die CSA kann im Verlauf der modellfreien Auswertung als globaler Parameter optimiert werden. Allerdings hat sich mittlerweile gezeigt, daß die ^{15}N -CSA innerhalb von Proteinen nicht einheitlich groß sind [21, 103], sondern im Bereich zwischen ca. -150 und -200 ppm schwanken können. Bei ausreichender Anzahl insbesondere bei verschiedenen Feldstärken gemessener Relaxationsraten kann zusätzlich zu den Parametern lokaler Dynamik auch die *per residue* Optimierung der ^{15}N -CSA versucht werden. Noch besser ist die explizite Messung der ^{15}N -CSA über CSA/Dipol-Kreuzkorrelationsraten [21, 103-106].

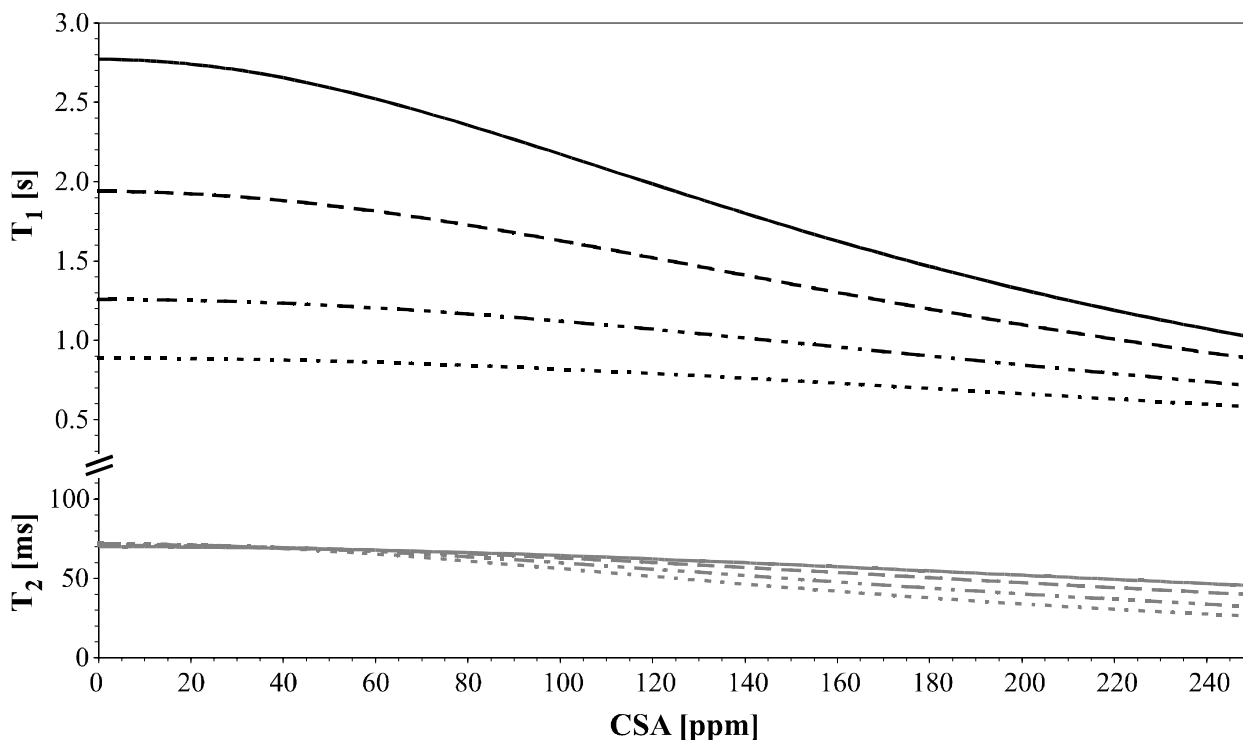


Abb.1.11 Abhängigkeit der ^{15}N - T_1 - und T_2 -Zeiten von der CSA und der B_0 -Feldstärke: 500 MHz ($\cdot\cdot$), 600 MHz ($-\cdot$), 750 MHz ($---$) und 900 MHz ($---$). Simulation für $\tau_R = 13.2$ ns und Modell 1 ($S^2 = 1$).

1.11.7 Hinweise auf Auswerteprogramme

Die in dieser Arbeit durchgeführte modellfreie Auswertung der Relaxationsdaten wurde mit dem Programmpaket DASHA ^[107], Version 3.44, durchgeführt. Es ist unter der Internet-Adresse www.nmr.ru verfügbar. Zu diesem Programmpaket gehört ebenso das DFIT-Modul zur Extraktion der Relaxationszeiten aus den zeitabhängigen Intensitätsverläufen und das DIFFC-Modul zur Durchführung hydrodynamischer Rechnungen (Kapitel 1.12).

Das Programm *ModelFree* zur modellfreien Auswertung, das mittlerweile ebenfalls über ein Modul zur Durchführung hydrodynamischer Rechnungen verfügt und aus dem Arbeitskreis von Arthur Palmer stammt, ist unter der Internet-Adresse cpmcnet.columbia.edu/dept/gsas/biochem/labs/palmer/software.html verfügbar.

1.12 Hydrodynamische Rechnungen

1.12.1 Zielsetzung

Durch hydrodynamische Rechnungen wird die Bewegung von Molekülen in Lösung simuliert. Die statistische Molekülbewegung wird durch Translations- und Rotationsdiffusion beschrieben und erzeugt das Spektrum spinrelaxierender Hintergrundschwingungen, ausgedrückt in der spektralen Dichte $J(\omega)$. Die Diffusionsprozesse werden durch die Teilchenreibung in Lösung bestimmt, so daß die hydrodynamischen Rechnungen auf die Berechnung der dynamisch wirksamen *Reibungstensoren* aus vorgegebenen Molekülstrukturen hinauslaufen (1.12.2). Hierzu wird die Molekülstruktur durch starre kugelförmige Punktreibungsquellen angenähert (*bead* Modell, 1.12.3).

Für die Spin-Relaxation ist die statistische Reorientierung eines Kopplungsvektors (Dipol-Dipol-Vektor, CSA-Hauptachsen etc.) entscheidend (vgl. 1.6.1). Die statistische Reorientierung ist bei *anisotroper* Molekülrotation geartet, d.h. sie erfolgt mit unterschiedlichen Korrelationszeiten um die drei *verschiedenen* Rotationsachsen des Moleküls (bei isotroper Rotation fallen die drei Rotationsachsen in einem Punkt zusammen). Obgleich der *Massen-*gewichtete Trägheitstensor bereits eine grobe Abschätzung über die zu erwartende Rotationsanisotropie liefert, wird diese allein vom *Oberflächen-*gewichteten hydrodynamischen Reibungstensor bestimmt. Aus der Orientierung eines betrachteten Vektors bezüglich den Rotationshauptachsen ergeben sich die Wichtungsfaktoren A_n der maximal fünf orientierten spektralen Dichtefunktionen ^[13] (vgl. 1.6.7, Gl. 1.93). Die zugehörigen orientierten Korrelationszeiten τ_{1-5} sind aus den Komponenten des Rotations-Diffusionstensors erhältlich (Gl. 1.92 und 1.93). Die hydrodynamische Rechnung liefert also die strukturell bedingte Streuung der lokalen Korrelationszeiten $\tau'_{R,i}$, deren Kenntnis Voraussetzung für die weitere modellfreie Analyse lokaler Beweglichkeit ist.

Die isotrop gemittelte Translations-Diffusionskonstante $D_{\text{trans,iso}}$ ist durch Diffusionsmessungen auch NMR-spektroskopisch experimentell zugänglich. Es besteht damit die Möglichkeit, die Ergebnisse der hydrodynamischen Messungen an den Meßwerten zu skalieren (1.12.4). Dadurch ist eine Aussage über das Ausmaß der Hydrathülle möglich. Außerdem kann die molekulare Rotationskorrelationszeit τ_R , deren Bestimmung aus NMR-Relaxationsdaten stark durch lokale Beweglichkeit beeinflusst wird (Kapitel 1.11), über den Zusammenhang zwischen Rotations- und Translationsreibung aus der von intramolekularer Dynamik unabhängigen $D_{\text{trans,iso}}$ hergeleitet werden.

1.12.2 Diffusions- und Reibungstensoren

Auf eine Reibungsquelle i wirkt in Lösung die Stokes'sche Reibungskraft \vec{F}_R :

$$\vec{F}_R = 6\pi\eta\sigma_i \cdot \vec{v} \equiv f_R \cdot \vec{v} \quad [1.125]$$

mit der mikroskopischen Viskosität η , dem hydrodynamisch wirksamen Reibungsradius σ_i und der mittleren Teilchengeschwindigkeit \vec{v} . Die Proportionalität der Reibungskraft zu \vec{v} wird im Reibungskoeffizienten f_R zusammengefaßt.

Wenn die Reibungsquelle im Abstand $\vec{r}_{i,0}$ um einen Rotationsmittelpunkt starr befestigt ist, bewirkt der *tangentiale* Angriff der Reibungskraft ein *Reibungsmoment* $\vec{M}_{R,i}$:

$$\vec{M}_{R,i} = \vec{r}_{i,0} \times \vec{F}_R = \vec{r}_{i,0} \times f_{R,i} \vec{v}_i = f_{R,i} (\vec{r}_{i,0} \times \vec{\omega} \times \vec{r}_{i,0}) \quad [1.126]$$

Die Teilchengeschwindigkeit \vec{v}_i in der Reibungskraft (1.125) muß hierbei durch das Kreuzprodukt aus der einheitlichen mittleren Winkelgeschwindigkeit $\vec{\omega}$ und dem Abstand $\vec{r}_{i,0}$ zum Rotationsmittelpunkt ersetzt werden.

Die Reibungskräfte bewirken einen Energieverlust, der dem Produkt aus Reibungskraft und mittlerer Weglänge λ bzw. dem Produkt aus Reibungsmoment und mittlerem Drehwinkel θ zwischen zwei intermolekularen Stößen entspricht. Dieser Energieverlust muß durch die mittlere kinetische Energie bzw. die mittlere Rotationsenergie

$$\overline{W}_{\text{kin}} = \overline{W}_{\text{rot}} = \frac{3}{2} k_B T \quad [1.127]$$

ausgeglichen werden. Aus den Gleichgewichtsbedingungen ergibt sich die kinetische *Stokes-Einstein-Definition der Translations- bzw. Rotationsdiffusionskonstanten* D_{trans} und D_{rot} . Sie lautet z.B. für die x-Komponenten:

$$D_{\text{trans},x} = \frac{k_B T \cdot v_x}{F_{R,x}} = \frac{k_B T}{6\pi\eta\sigma_{i,x}} \quad \text{in [m}^2/\text{s]} \quad [1.128.a]$$

$$D_{\text{rot},x} = \frac{k_B T \cdot \omega_x}{M_{R,x}} = \frac{k_B T}{6\pi\eta\sigma_{i,x}} \cdot \frac{\omega_x}{(\vec{r}_{i,0} \times \vec{\omega} \times \vec{r}_{i,0})} \quad \text{in [rad}^2/\text{s]} \quad [1.128.b]$$

Für die y- und z-Komponenten lauten die Ausdrücke entsprechend, wobei sich insbesondere der hydrodynamische Radius σ ändern kann (Anisotropie der Reibungsquelle). Dies hebt die Entartung der einzelnen Raumkomponenten der Diffusionskonstanten auf.

In kompakter Schreibweise ist der *Diffusionstensor* D proportional zum inversen Reibungstensor R (vgl. Analogie zu 1.128):

$$\begin{pmatrix} D_{\text{trans}} \\ D_{\text{rot}} \end{pmatrix} = k_B T \cdot \begin{pmatrix} \Xi_{\text{trans}} \\ \Xi_{\text{rot}} \end{pmatrix}^{-1} \quad [1.129]$$

$$\hat{D} = k_B T \cdot \hat{R}^{-1}$$

Die *meßbaren isotropen* Diffusionskonstanten $D_{\text{trans,iso}}$ und $D_{\text{rot,iso}}$ entsprechen der Spur der Diffusionstensoren, die isotrop gemittelte Rotationskorrelationszeit $\tau_{R,iso}$ der halben inversen Spur des D_{rot} -Tensors:

$$D_{\text{trans,iso}} = \frac{1}{3} \text{Tr} \{ \hat{D}_{\text{trans}} \}$$

$$D_{\text{rot,iso}} = \frac{1}{3} \text{Tr} \{ \hat{D}_{\text{rot}} \} \quad [1.130]$$

$$\tau_{R,iso} = \frac{1}{6D_{\text{rot,iso}}} = \frac{1}{2\text{Tr} \{ \hat{D}_{\text{rot}} \}}$$

Gl.1.129 ist allerdings nur eine (gute) Näherung, die die *Kopplung zwischen Translation und Rotation* unberücksichtigt läßt. Es ist aber leicht ersichtlich, daß sich z.B. ein zylinderförmiges Molekül bei der Translation bevorzugt ausrichten wird (mit der Zylinderachse senkrecht zur Translationsrichtung), was zur Rotation um einen kleinen Winkel führt. Die korrekte Formulierung von 1.129 berücksichtigt diese *Rotations-Translations-Kopplung* $D_{t/r}$ (*generalisierte Stokes-Einstein-Beziehung* nach Brenner ^[108, 109]):

$$\begin{pmatrix} D_{\text{trans}} & D_{t/r} \\ D_{r/t} & D_{\text{rot}} \end{pmatrix} = k_B T \cdot \begin{pmatrix} \Xi_{\text{trans}} & \Xi_{t/r} \\ \Xi_{r/t} & \Xi_{\text{rot}} \end{pmatrix}^{-1} \quad [1.131]$$

Da das Ausmaß der Translations-Rotations-Kopplung aber meist gering ist ^[98], gelten (1.129) und (1.130) hinreichend genau.

1.12.3 Durchführung hydrodynamischer Rechnungen nach dem bead-Modell

Für die hydrodynamischen Rechnungen nach dem *bead* Modell für starre Körper ^[109-111] wird das Protein als Satz von räumlich angeordneten kugelförmigen Reibungsquellen (*beads*) dargestellt. Diesen *beads* werden Reibungskoeffizienten $f_{R,i}$ entsprechend ihren effektiven hydrodynamisch wirksamen Radien zugeordnet und daraus die Reibungs- und Diffusionstensoren berechnet (vgl. 1.12.2). Die nachfolgenden Ausführungen sind eng an das Modul DIFFC des DASHA-Auswertungsprogrammes ^[107] angelehnt.

Aufbauend auf der vorgegebenen und als *starr* angenommenen Molekülstruktur können die einzelnen *beads* (mit zunehmender Verfeinerung des Modells) in Proteindomänen und -bereichen, in den Atomen einzelner Atomgruppen (z.B. alle Schweratome oder nur die Atome des Protein-Rückgrates) oder auch in allen Atomen zentriert werden ^[83]. Die

bead-Radien können z.B. einheitlich oder entsprechend der Van-der-Waals-Radien der Atome skaliert gewählt werden.

Falls Molekülbereiche *flexibel* bzw. *undefiniert* sind, könnte eine falsche Konformationsannahme Auswirkungen auf den berechneten Reibungstensor haben. In solchen Fällen muß der Reibungstensor für jede mögliche Konformation neu berechnet und zuletzt über alle berechneten Reibungstensoren gemittelt werden [86]. In der Praxis wird dieses aufwendige Verfahren meist vereinfacht, indem die flexiblen Bereiche aus der Struktur *eliminiert* werden [86] (vgl. HNL, Kapitel 2). Die dabei gemachten Fehler steigen mit dem Verhältnis zwischen undefinierten und definierten Strukturbereichen.

Um den Rechenaufwand erheblich zu vereinfachen, muß die *bead*-Liste sinnvoll minimiert werden. Es wird dabei angenommen, daß die kleinen Protonen nur dann reibungswirksam werden, wenn sie mit dem polaren Lösungsmittel elektrostatisch wechselwirken können, was ihren hydrodynamischen Radius entsprechend erhöhen würde. Daher werden zunächst alle *apolaren* Protonen aus der *bead*-Liste entfernt. Anschließend werden alle vom Solvens abgeschirmten *inneren beads* eliminiert, die zur Reibung nicht beitragen. Sie werden ermittelt, indem für jede *bead* die solvenszugängliche Oberfläche A_{SAS} (*Solvent Accessible Surface*) nach dem Algorithmus von Lee & Richards [112] berechnet wird. Hierbei wird jede *bead* um den hydrodynamischen Radius eines Wassermoleküls (1.6 Å) vergrößert und danach das mit anderen *beads* überlappende Volumen abgezogen. Der verbleibende Teil der *bead*-Oberfläche entspricht ihrer solvenszugänglichen Oberfläche $A_{\text{SAS},i}$, die zur Berechnung eines jeweiligen *effektiven hydrodynamischen Radius* $\sigma_{\text{eff},i}$ dient:

$$\sigma_{\text{eff},i} = \sqrt{\frac{A_{\text{SAS},i}}{4\pi}} \quad [1.132]$$

Reibungsquellen mit einem $\sigma_{\text{eff},i}$ kleiner als ein vorgegebener Minimalradius (typischerweise 0.1 Å), also *beads* im Proteininneren oder innerhalb zu kleiner Kavitäten der Proteinoberfläche, werden als hydrodynamisch unwirksam aus der *bead*-Liste eliminiert. Den verbleibenden *beads* wird ein Reibungskoeffizient f_R entsprechend ihrem $\sigma_{\text{eff},i}$ (1.132) zugeordnet [113]. Da die *beads* und die reibenden Wassermoleküle aber vergleichbar groß sind, ist der klassisch berechnete Reibungskoeffizient (Gl.1.125, *stick*-Bedingung) um ca. 50% zu groß und es wird ein entsprechend reduzierter f'_R vorgeschlagen [99, 108, 114] (*slip*-Bedingung):

$$f'_{R,i} = 4\pi\eta\sigma_{\text{eff},i} \quad [1.133]$$

Die verbliebenen solvensexponierten *beads* können (besonders in hydrophilen Seitenketten) effektive Radien $\sigma_{\text{eff},i}$ größer als die zugehörigen Van-der-Waals-Radien haben. Die resultierenden Überlappungen führen zu redundanten Beiträgen zum Reibungstensor, der hierdurch erheblich verzerrt werden kann [115]. Ein einfacher Korrekturalgorithmus eliminiert zunächst vollständig überlappte *beads*. Die verbleibenden überlappenden *beads* werden danach ab einer vorgegebenen minimalen Volumenüberlappung (z.B. 10%) geringfügig in ihrer Position variiert (typischerweise um maximal 0.1 Å), was das Ausmaß der Überlappungen stark reduziert, ohne gleichzeitig die Molekülgeometrie und damit den Reibungstensor entscheidend zu verändern.

Mit der derart minimierten *bead*-Liste können nun die Reibungs- und Diffusionstensoren berechnet werden und daraus weiterhin die Korrelationszeiten τ_{1-5} der orientierten spektralen Dichten (vgl. 1.6.7), die Wichtungsfaktoren A_{1-5} für jeden ^{15}N - ^1H -Vektor und damit die strukturell bedingte Streuung der *per residue* Korrelationszeiten $\tau'_{R,i}$, die für die anschließende modellfreie Analyse der Proteindynamik Voraussetzung ist (1.11.3). Nach Gl.1.94 bzw. 1.130 können außerdem die isotrop gemittelte Rotationskorrelationszeit $\tau_{R,\text{iso}}$ und die isotrop gemittelte Translations-Diffusionskonstante $D_{\text{trans,iso}}$ berechnet werden, die auch experimentell zugänglich sind und zur Skalierung der Ergebnisse der hydrodynamischen Rechnungen benötigt werden (1.12.4).

Der beschriebene Ablauf der hydrodynamischen Rechnungen ist in Abb.1.12 zusammengefaßt.

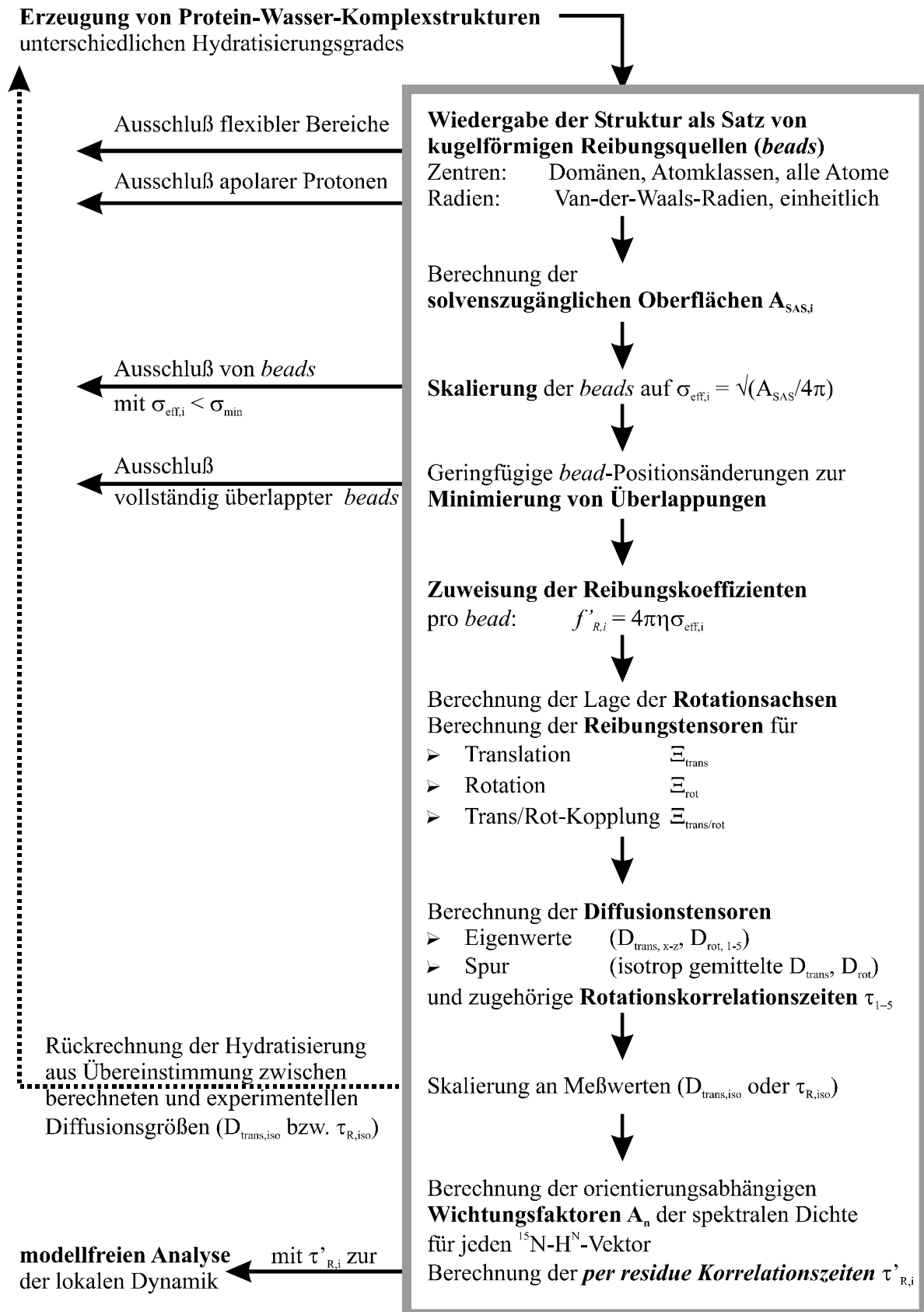


Abb.1.12 Schematischer Ablauf der hydrodynamischen Rechnung zur Berechnung der strukturellen Streuung der *per residue* Korrelationszeiten $\tau'_{R,i}$ aus einer vorgegebenen Proteinstruktur (vgl. 1.12.3). Der einheitliche Ablauf ist grau umrahmt und kann zur Rückrechnung des Hydratisierungsgrades entsprechend ergänzt werden (vgl. 1.12.4).

1.12.4 Skalierung der Diffusionstensoren, Rückrechnung der Hydratisierung

Zwei Faktoren führen in der Praxis meist dazu, daß die hydrodynamisch berechneten isotropen Diffusionskonstanten nicht mit den experimentell zugänglichen Größen übereinstimmen: die *mikroskopische Viskosität* und der *Hydratisierungsgrad* des Proteins. Der Einfluß beider Fehlerquellen ist jedoch *isotrop*, so daß das Achsenverhältnis der Reibungs- bzw. Diffusionstensoren nicht verändert wird (*isotrope Skalierung*).

Die oft schwer abzuschätzende *mikroskopische Viskosität*, die aufgrund von mikroskopischer Heterogenität des Lösungsmittels und Beiträgen durch Puffer, Ionen und das gelöste Protein manchmal erheblich von der (makroskopischen) Viskosität reiner Lösungsmittel abweichen kann, skaliert alle Reibungskoeffizienten $f'_{R,i}$ gleichermaßen (Gl.1.133).

Bezüglich der Dicke der durchschnittlichen Hydrathülle von Proteinen, die für spezielle Proteine auch nicht maßgeblich sein muß, bestehen große Unsicherheiten. Zur Reproduktion der experimentell bestimmten Translationsdiffusionskonstanten sind ca. 20-70% einer einfachen Bedeckung des Proteins mit dem Solvens nötig ^[116]. Kalorimetrische und spezifische Volumenmessungen ergaben hingegen einen Hydratisierungsgrad von 0.3-0.5 g(H₂O)/g(Protein) ^[117], was ungefähr einer einfachen Bedeckung entspricht.

Der Einfluß beider Unbekannten kann in der Praxis durch Skalierung der berechneten Werte mit einem *experimentell bestimmten Wert* aufgehoben werden. Dafür bieten sich die isotrop gemittelte Rotationskorrelationszeit $\tau_{R,iso}$ (aus Relaxationsdaten, vgl. 1.11.2) und die Translationsdiffusionskonstante $D_{trans,iso}$ an, die experimentell direkt bestimmt werden kann und - im Gegensatz zu $\tau_{R,iso}$ - *unabhängig* von *intramolekularen* Bewegungen ist.

Anhand der Skalierung gegen einen Meßwert kann die *Hydratisierung des Proteins rückgerechnet* werden, wenn der zweite unbekannte Skalierungsfaktor, die mikroskopische Viskosität, hinreichend genau bekannt ist. Dazu wird das Protein in einer großen Zahl ($\geq 10^3$) Wassermoleküle vollständig und homogen solvatisiert und anschließend sukzessive (z.B. in Schritten von 100 Molekülen) die Wassermoleküle in dem Maße eliminiert, wie ihr Abstand zum Protein abnimmt (gemessen zu den C ^{α} und C ^{β} -Atomen). Bei den hydrodynamischen Rechnungen werden in diesen Protein-Wasser-Komplexen die Wassermoleküle als fester Teil der Struktur berücksichtigt und ebenfalls als reibungswirksame *beads* mit dem Van-der-Waals-Radius des Sauerstoffs gewertet. Die *bead*-Liste wird nach dem in 1.12.3 beschriebene Verfahren minimiert. Aus dem Protein-Wasser-Komplex, für den die berechnete und gemessene Diffusionsgröße ($D_{trans,iso}$ oder $\tau_{R,iso}$) übereinstimmen, kann der erforderliche Hydratisierungsgrad des

Proteins abgeleitet werden. Da die experimentellen Diffusionsgrößen nur die Spur der Diffusionstensoren wiedergeben, kann die Geometrie des Protein-Wasser-Komplexes innerhalb gewisser Grenzen schwanken. Dadurch können sich geringe Ungenauigkeiten in den Eigenwerten (x,y,z -Komponenten der Diffusionskonstanten bzw. die fünf orientierten Rotationskorrelationszeiten) ergeben. Durch das o.a. Protokoll zur Erzeugung der unterschiedlich großen Protein-Wasser-Komplexe werden die Schwankungen in der Geometrie des Komplexes bei unterschiedlichem Hydratisierungsgrad minimiert. Auf jeden Fall aber werden $D_{\text{trans,iso}}$ und $\tau_{\text{R,iso}}$ gleichermaßen beeinflusst (Gl. 1.130).

1.12.5 Der umgekehrte Weg: Strukturverfeinerung mit Relaxationsdaten

Die Winkelabhängigkeit der ^{15}N - T_1/T_2 -Verhältnisse bzw. der *per residue* Korrelationszeiten $\tau'_{\text{R},i}$ bezüglich des Rotationsdiffusionstensors kann umgekehrt zur Verfeinerung der Strukturen eingesetzt werden. Gegenüber den "klassischen" experimentellen Strukturparametern - NOE und skalare ^3J -Kopplungen - haben die ^{15}N - T_1/T_2 -Verhältnisse (ebenso wie die residualen dipolaren Kopplungen in partiell ausgerichteten Molekülen) den Vorteil, daß sie sich auf das molekulare Koordinatensystem des Rotationstensors beziehen und nicht auf einzelne lokale Bezugspunkte. Infolgedessen verbessern sie insbesondere die *Weitbereichsdefinition* der Struktur. Entsprechende Arbeiten wurden bereits durchgeführt [118-121]. Es wurde sogar versucht, ohne Kenntnis der Struktur allein aus dem T_1/T_2 -Histogramm den Rotationsdiffusionstensor rückzurechnen [122]. Bei diesen Verfahren ist die Grundvoraussetzung, daß beobachtete Abweichungen der experimentellen T_1/T_2 -Verhältnisse nicht durch lokale Bewegungen verfälscht sind, sondern ausschließlich die orientierungsabhängige Streuung wiedergeben [123].

2. Struktur und Dynamik von HNL

2.1 Biochemischer Hintergrund

2.1.1 Die Familie der Lipocaline

Humanes Neutrophiles Lipocalin (HNL) ist ein Mitglied der Lipocalinfamilie. Diese Proteinfamilie ist durch eine weitgehend einheitliche Topologie, Funktion und Struktur bei bemerkenswert niedriger Sequenzhomologie (bis unter 20%) und hoher Ligandenvielfalt gekennzeichnet.

Lipocaline sind extrazelluläre Proteine, die als Transporter kleiner, hydrophober Moleküle im Blut und der Gewebeflüssigkeit fungieren. Sie besitzen spezifische Zelloberflächenrezeptoren und spielen damit eine Rolle bei diversen chemotaktischen Prozessen wie Zellregulation, Immunreaktionen und Geruchsvermittlung [124, 125]. Neben Ligandenbindung und -transport haben viele Lipocaline auch weitere Funktionen, entweder als Enzyme, wie z.B. Prostaglandin D Synthase [126], oder als Regulatoren durch Komplexbildung mit größeren Proteinen, wie z.B. HNL (vgl. hierzu Kapitel 2.1.2). Diese Protein-Protein-Komplexe sind über ein Cystin kovalent verbrückt. Vielfach liegen Lipocaline auch homodimer vor.

Die Lipocaline werden hinsichtlich ihrer Sequenzhomologie und ihrer Liganden in zwei Gruppen eingeteilt. Die *Kernlipocaline*, zu denen auch HNL gehört, haben eine höhere Sequenzhomologie untereinander und binden ein relativ kleines Spektrum hydrophober Liganden, typischerweise Retinoide oder Steroide. Die Gruppe der *Außenseiter-Lipocaline* zeigt nur sehr geringe Sequenzhomologie und bindet ein viel breiteres Spektrum an Liganden, das Pheromone und Odoranten einschließt.

Die hohe Strukturhomologie der Lipocaline ist angesichts der Vielfalt an Liganden und der sehr geringen Sequenzhomologie überraschend. Alle bislang untersuchten Kristallstrukturen von Lipocalinen weisen ein aus 8 antiparallelen β -Faltblattsträngen aufgebautes trichterförmiges β -Faß mit einem weiten, offenen Ende und einem engen geschlossenen Ende auf. Dieses β -Faß fungiert als lipophile Tasche, in die der hydrophobe Ligand je nach Größe mehr oder weniger tief durch das offene Ende eingelagert wird. Neben ihrem strukturellen Kern ist den Lipocalinen auch eine C-terminale α -Helix gemeinsam, deren funktionale Bedeutung noch unklar ist. Während die Lipocaline im Bereich des β -Fasses sehr gut übereinandergelegt werden können, unterscheiden sie sich jedoch in den Schleifenbereichen deutlich. Diese lokale strukturelle Variabilität der Lipocaline reflektiert wohl die strukturelle und chemische Vielfalt ihrer Liganden [127].

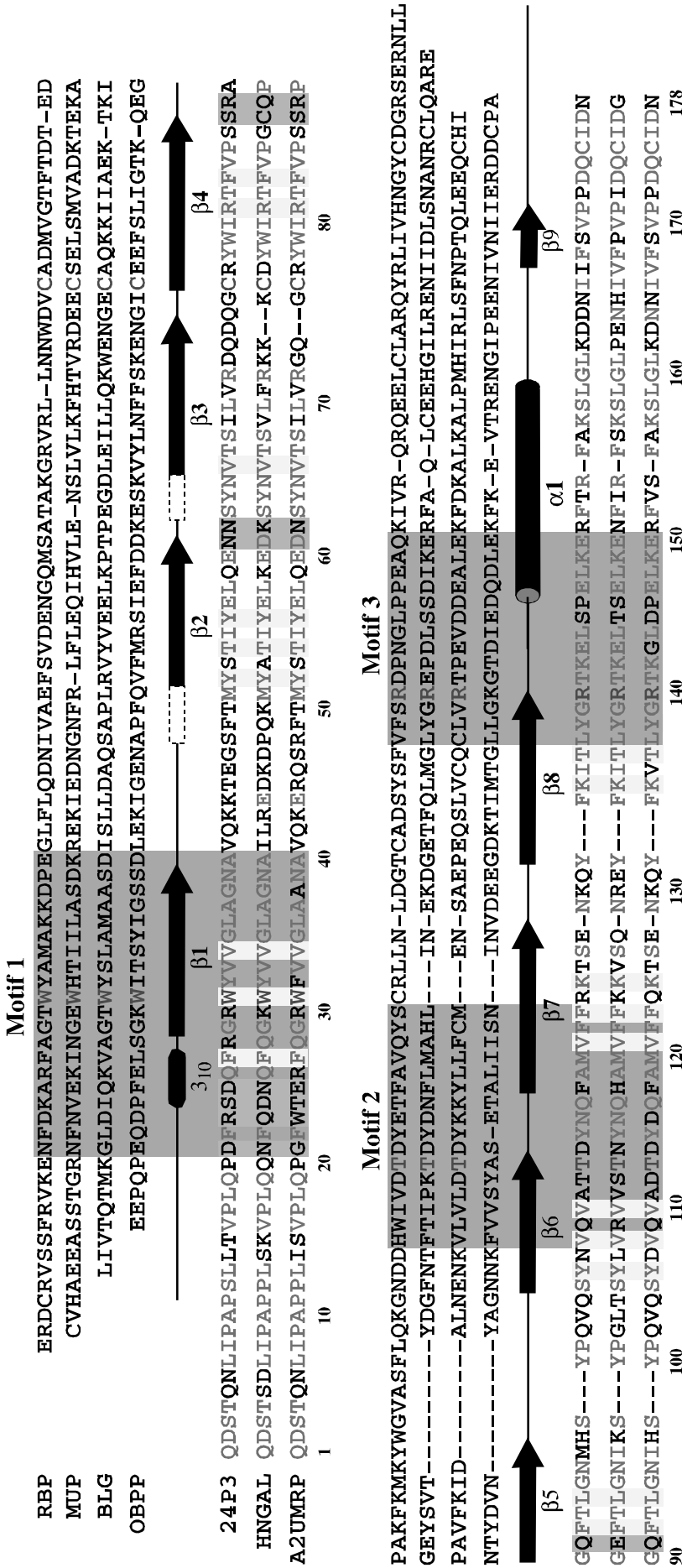


Abb.2.1. Sequenzvergleich einiger Lipocaline^[128, 129]. N-terminale Signalsequenzen fehlen. Für RBP (Retinol bindendes Protein), MUP (Major Urinary Protein der Ratte), BLG (β-Lactalbumin des Rindes) und das Außenseiter-Lipocalin OBPP (Odorant bindendes Protein des Schweines) sind die Kristallstrukturen bekannt. Aus diesen wurden auch die zugeordneten Sekundärstrukturelemente erhalten. Darunter stehen die Sequenzen für HNL und seine nächsten Homologen, 24p3 der Maus und A2MGRP der Ratte, deren Sequenzidentität grün dargestellt ist. Positionen, an denen Identitäten bzw. Unterschiede in den Sequenzen bestehen, auf die in der Strukturdiskussion näher eingegangen wird, sind gelb bzw. blau unterlegt. Die drei von Flower vorgeschlagenen Motive^[128] sind orange unterlegt. Rot markierte Aminosäuren sind in allen Lipocalinen hoch konserviert und nehmen feste Positionen innerhalb der Proteinstruktur ein. Das hochkonservierte Cystein (C76 in HNL) bildet in allen Lipocalinen eine Disulphidbrücke zum C-terminalen Cystein aus (C175 in HNL).

Abb. 2.1 zeigt einen Sequenzvergleich mit eingetragenen Sekundärstrukturelementen für HNL und einige Lipocaline mit bekannter Kristallstruktur [128, 129]. Die Sequenzhomologie zwischen HNL und seinen nächsten Verwandten, dem Mäuseonkogen 24p3 und dem α -2-Mikroglobulin-verwandten Protein der Ratte (A2MGRP), beträgt 70%. Diese hohe Sequenzhomologie korreliert mit der Ligandenaffinität: auch 24p3 bindet wie HNL N-Formylpeptide. Die Homologie zu RBP, MUP, BLG und OBPP ist jedoch sehr niedrig. Innerhalb der Lipocalinfamilie sind nur drei kurze Sequenzmotive konserviert [128]. In jedem dieser Motive tritt eine hochkonservierte Aminosäure auf, deren Position bezüglich der Lipocalinfaltung invariant ist (W31, T113 und R140 bei HNL). Diese sehr geringen Anforderungen an die Primärstruktur zur Erzeugung der typischen Lipocalin-Faltung machen diese Proteinfamilie zu hochinteressanten Objekten für rationelles Protein-Design [127, 130], indem durch vielfältige Mutationen Ligandenaffinitäten ohne wesentliche Störung der Tertiärstruktur verändert werden können. In entsprechenden Arbeiten am Kernlipocalin BBP [127] (Bilin-bindendes Protein) konnte gezeigt werden, daß selbst die zufällige Mutation zentraler Seitenketten in der Bindungstasche keine strukturellen Auswirkungen hat. Die erhaltenen BBP-Mutanten zeigten unterschiedliche Spezifität gegenüber kleinen Liganden und sind damit komplementär zum natürlichen Vorbild für Protein-Design, den Immunglobulinen, die wesentlich größere Liganden (Proteine) binden.

2.1.2 Biochemische Funktion und medizinische Relevanz von HNL

HNL wurde 1989 erstmals als 24 kDa großes Protein aus den spezifischen Granuli von humanen Neutrophilen durch Bindung an das N-Formyltripeptid f-MLF aufgefunden [131]. Kurz darauf wurde HNL durch SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen als *Gelatinase-assoziiertes Protein* in der 125kDa-Form der neutrophilen Gelatinase B wieder aufgefunden [132]. Daher wird HNL in der Literatur alternativ auch als HNGAL (*H*umanes *N*eutrophiles *G*elatinase-*a*ssoziiertes *L*ipocalin) bezeichnet. 1992 gelang eine Teilauflösung der Aminosäuresequenz und damit durch Homologievergleich die Zuordnung des Proteins zur Lipocalin-Familie [133]. 1993 wurde die komplette Aminosäuresequenz von HNL aufgeklärt [134]; das Protein besteht aus 178 Aminosäuren und hat ein Molgewicht von 20,5 kDa. Es wurde in den spezifischen Granula der polymorphnuklearen Leukozyten (PMNL) lokalisiert [135, 136]. Neben der über ein Cystin Gelatinase-assoziierten Form wurde dabei HNL auch in freier monomerer und homodimerer Form aufgefunden. Eine N-Glykosylierungsstelle liegt bei Asparagin 65; die Glykosylierungsstruktur des ca. 3 kDa schweren Oligosaccharids [133] ist bislang noch unbekannt.

HNL bindet kleine bakterielle N-Formylpeptide (Tri- bis Pentapeptide), die die Leukodiapedese auslösen können [137]. Leukodiapedese ist die Wanderung der Leukozyten durch das Gewebe zum Entzündungsherd und damit Bestandteil der Immunantwort. Gerichtete Zellwanderung wird meist durch ein ansteigendes Konzentrationsgefälle (*Chemotaxis*) eines Boten- oder Lockstoffes (das *Chemotaxin*) gesteuert. Die Zellwanderung im Organismus erfordert die (lokale) Auflösung von Bindegewebe und Zellen. Die wandernde Zelle setzt dazu Matrixproteinasen (zur Auflösung der Proteinfilamente des Bindegewebes) oder auch Phospholipasen (zur Auflösung von Zellmembranen) frei. Die Zelle speichert diese Enzyme in sekretorischen Vesikeln (*Granula*). Ihre Freisetzung kann durch Induktoren (oft das Chemotaxin selbst) ausgelöst werden und wird als *Degranulation* bezeichnet. Die von HNL gebundenen kleinen bakteriellen N-Formylpeptide können als Chemotaxine und Induktoren der Degranulation in Leukozyten wirken [137].

HNL wirkt immunsuppressiv durch *direkte* Wechselwirkung mit den polymorph-nuklearen Leukozyten (PMNL). Dabei wird sowohl die Chemotaxis als auch die Degranulation unabhängig von der Glykosylierung und der Stimulierung durch den bekannten Liganden f-MLF gehemmt [138]. Dies beweist, daß HNL nicht indirekt durch Abfangen dieses Chemotaxins wirkt. Die Bindung von HNL auf der Zelloberfläche der PMNL konnte zudem rasterelektronenmikroskopisch sichtbar gemacht werden. Ein spezifischer Zellrezeptor kann aber bislang nur vermutet werden. Die Beteiligung von HNL an der Signalkaskade zur Vermittlung entzündlicher Prozesse ist denkbar. Es wird in diesem Zusammenhang bereits als diagnostischer Marker für die Neutrophilenaktivität in chronisch entzündlichen Prozessen wie der chronischen obstruktiven Pulmonitis und Asthma [139] sowie der Arteriosklerose [140] diskutiert. Bemerkenswert ist, daß das Homodimer des HNL immunsuppressiv nur einfach, d.h. wie ein Monomer wirkt.

Von besonderem Interesse ist die kovalente Assoziation von HNL mit dem Proenzym der Matrix-Metalloproteinase-9 (Pro-MMP-9, Pro-Gelatinase B) über ein Cystin [133]. Hierin besteht wohl der größte Unterschied zu den beiden nächstverwandten Lipocalinen, 24p3 und A2MGRP, die beide aufgrund des Fehlens eines freien Cysteins keine kovalenten Assoziate ausbilden können. Pro-MMP-9 kommt u.a. in Monocyten und den spezifischen und Gelatinase-haltigen Granulozyten des Immunsystems vor [134]. Nach Aktivierung durch N-terminale Spaltung spielt MMP-9 vermutlich eine wichtige Rolle bei der Leukodiapedese, da sie Hauptbestandteile der Basalmembran (Kollagen der Typen IV, V, und XI sowie Gelatin) zu hydrolysieren vermag. In den neutrophilen Granulozyten wurden bislang drei Formen der pro-MMP-9 mit 95 kDa, 125 kDa und 220 kDa

Molgewicht nachgewiesen. Davon ist die 95 kDa-Form C-terminal nicht-kovalent mit dem Gewebeinhibitor der Metalloproteinase-1 (TIMP-1) verbunden. TIMP-1 ist ein starker Inhibitor aktiver MMP-9 mit Komplexdissoziationskonstanten zwischen 10^{-9} und 10^{-11} [141] und kommt ebenfalls in Monocyten und Granulocyten vor.

Die Assoziation von pro-MMP-9 mit HNL geht der Bildung eines ternären Komplexes mit TIMP-1 voraus [142]. In diesem Komplex ist TIMP-1 ausnahmsweise über seinen C-Terminus an pro-MMP-9 gebunden, während alle aktiven Formen der MMP-9 durch die N-terminale Domäne von TIMP-1 inhibiert werden. Möglicherweise deshalb läßt sich die pro-MMP-9 im ternären Komplex aktivieren, wobei die Gelatinaseaktivität des resultierenden MMP-9-Komplexes aber drastisch reduziert ist [142]. Über seine freie N-terminale Domäne kann TIMP-1 des ternären Komplexes HNL/pro-MMP-9/TIMP-1 ein weiteres Molekül MMP-9 binden und inhibieren. Dieser quartäre Komplex besitzt nach Aktivierung der pro-MMP-9 im Gegensatz zum ternären Komplex eine stark erhöhte Gelatinaseaktivität [142]. Obgleich die Rolle von HNL in den multimeren MMP-9/TIMP-1 Komplexen noch nicht aufgeklärt ist, läßt sich ein regulatorischer Einfluß auf die Gelatinaseaktivität durch Gegenwirken des HNL auf die Inhibition durch TIMP-1 vermuten.

Neueste Untersuchungen zeigen, daß HNL auch allgemein Matrixmetalloproteinasen aktivieren kann [143]. HNL beschleunigt demnach die autolytische Aktivierung von Pro-Matrixmetalloproteinasen wie Leukozyten-Prokollagenase (pro-MMP-8) und Typ IV Prokollagenase (pro-MMP-3) durch N-terminale Bindung. Die N-terminale Konsensussequenz der pro-MMP (das *Cystein Switch* Motiv) hemmt die Proteinaseaktivität der Proenzyme durch Cystein-Bindung des katalytisch notwendigen Zn^{2+} -Ions in einer inaktiven Konformation. Zur Aktivierung der pro-MMP muß das N-terminale *Cystein Switch* Motiv abgepalten werden, wonach sich die Proteinase in ihre aktive Konformation mit frei zugänglichem Zn^{2+} -Ion umlagert. Offensichtlich kann HNL die Abspaltung des *Cystein Switch* Motivs der pro-MMP simulieren, indem dieses N-terminale Motiv in der Bindungstasche von HNL versteckt und so die Autoblockade der pro-MMP aufgehoben wird.

In den letzten Jahren ist das Interesse an der Beteiligung von Matrix-Metalloproteinasen an destruktiven Gewebeveränderungen, besonders im Zusammenhang mit invasiven Prozessen und der Tumormetastase [144], gewachsen. Beispielsweise wurde die Überexpression von MMP-9 in Leberkrebszellen mit deren invasivem Potential in Verbindung gebracht [145]. Eine regulatorische Beteiligung von HNL an diesen Prozessen ist nach den o.a. Ausführungen denkbar und wird durch die Beobachtung gestützt, daß der mRNA-Spiegel für HNL in Pankreas-Krebszellen und anderen Geweben erhöht ist [146].

2.2 Materialien, Methoden und Datenhinterlegung

Rekombinantes HNL-Protein wurde im Arbeitskreis von Prof. H. Tschesche an der Universität Bielefeld durch Stefan Bartsch, Bernd Mühlenweg und Volker Zölzer in *E.coli* exprimiert und gereinigt [138, 147]. Dort wurden auch Stabilitätsuntersuchungen an HNL bezüglich der Wahl der Pufferlösung, des pH-Wertes sowie der Temperatur durchgeführt.

Das rekombinante Protein hat ein Molekulargewicht von 20.66 kDa (20.9 kDa bei [U-¹⁵N]- und 21.84 bei [U-¹³C, ¹⁵N]-Markierung). Aufgrund des prokaryotischen Expressionssystems ist die Sequenz um ein N-terminales Methionin auf insgesamt 179 Aminosäuren verlängert. Dieses Methionin wird in der sequentiellen Numerierung des untersuchten Proteines nicht mitgezählt und als M0 bezeichnet.

Für die NMR-spektroskopischen Untersuchungen wurden eine 1.4 mM [U-¹⁵N]-markierte und eine 1.15 mM [U-¹³C, ¹⁵N]-markierte wäßrige HNL-Probe benutzt. Die Proteinlösungen waren durch einen 50 mM NaAc/AcOH-Puffer auf pH = 6.0 gepuffert; die NaCl-Konzentration betrug ebenfalls ca. 50 mM. Zur Konservierung wurden Spuren von NaN₃ zugesetzt; die wäßrige Lösung enthielt ca. 10% D₂O. Die Meßtemperatur für HNL lag bei kalibrierten 297.3K (\pm 0.2K).

Alle NMR-spektroskopischen Untersuchungen wurden an DMX-Spektrometern der Firma BRUKER bei Protonenfrequenzen von 500, 600 und 750 MHz durchgeführt. Geräteausstattungen und Spezifizierungen sind in Anhang A zusammengefaßt. Die aufgefundenen Spektralbereiche einzelner Spingruppen und die daraus abgeleiteten Meßfenster für die NMR-Experimente sind in Anhang B.1 aufgeführt.

Die NMR-Experimente an HNL wurden weitgehend bei 600 MHz durchgeführt. Alle NOESY-Experimente (außer dem ¹⁵N-NOESY-HSQC) und das HCCH-TOCSY-Experiment wurden bei 750 MHz gemessen. ¹⁵N-Relaxationsmessungen wurden mit der [U-¹⁵N]-markierten Probe bei allen 3 verfügbaren Feldern (500, 600 und 750 MHz) durchgeführt. In Anhang B.2 sind alle an HNL durchgeführten NMR-Experimente mit wesentlichen Meßparametern aufgelistet; dort sind auch alle Literaturzitate der benutzten NMR-Experimente angegeben. Alle heteronuklearen Korrelationsexperimente basierten auf Kohärenzselektion mit Empfindlichkeitssteigerung [77] durch Gradienten aus dem magischen Winkel [76], die optimale Wasserunterdrückung gewährleisteten. Zudem wurde bei vielen H^N-detektierenden Experimenten (vgl. Pulsprogramme in Anhang E) durch Optimierung von Phasenzykeln und den Einsatz flankierender 90°-Pulse um Protonen-

entkopplersequenzen eine Gleichgewichtsrückführung der Wassermagnetisierung vor der Aufnahme durchgeführt (*FlipBack* Technik).

Alle NMR-Experimente sowie die Auswertung der HNL-Dynamik wurden in eigener Arbeit durchgeführt. Die spektrale Zuordnung, Auswertung und Berechnung der Lösungsstruktur erfolgte durch Dr. Murray Coles.

2.2.1 Datenhinterlegung

Die Daten und Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind vollständig in allgemein zugänglichen Internet-Datenbanken hinterlegt worden. Alle NMR-Daten (zugeordnete chemische Verschiebungen, Relaxationsdaten und Dynamikparameter) sind in der BMRB-Datenbank (BioMagnetic Research Bank) der University of Wisconsin (Internet-Adresse: www.bmrb.wisc.edu) unter Zugriffsnummer 4267 archiviert. Die minimierte gemittelte Struktur ist in der PDB-Datenbank (Protein Data Bank) unter Zugriffscode 1NGL hinterlegt (Internet-Adresse: www.rcsb.org/pdb/index.html).

Die Ergebnisse der strukturellen und dynamischen Untersuchung von HNL wurden publiziert ^[148].

2.3 Zuordnung der NMR-Resonanzen für HNL

2.3.1 Sequentielle Zuordnung (Signalzuordnung für das Proteinrückgrat)

Die sequentielle Zuordnung der NMR-Resonanzen von HNL erfolgte halbautomatisch mit Hilfe des Zuordnungsprogrammes PASTA [149]. Zur Erstellung der benötigten Pseudorest-Liste wurde primär ein hochaufgelöstes, gefaltetes ^{15}N -HSQC-Spektrum herangezogen. Die maximal zu erwartende Anzahl an Signalen im ^{15}N -HSQC-Spektrum errechnet sich für HNL wie folgt:

$$178 - 11 (\text{P}) + 44 (11 \text{ Q: NH}_2 + \text{NHD}) + 40 (4 \text{ N: NH}_2 + \text{NHD}) + 2 (\text{H: NH}^\epsilon) + 7 (\text{R: NH}^\epsilon) = 260$$

Dabei wurde vorausgesetzt, daß aufgrund des raschen $\text{H}^{\text{N}}\text{-H}_2\text{O}$ -Austausches weder der N-Terminus noch die 16 Lysin-Seitenketten- H^{N} erfaßbar sind (letztere waren bisweilen zum Teil schwach sichtbar bei genauer Vermeidung der Wassersättigung). Nach automatischer Signalsuche mit einer Mindestintensität, die der maximalen Rauschamplitude in signalfreien Bereichen entsprach, wurde eine Pseudorest-Liste mit ca. 300 Signalen erhalten. Darin wurden die Seitenkettensignale der sichtbaren Arginine, Histidine und Lysine (bestimmt aus einem ungefalteten ^{15}N -HSQC) sowie die Seitenkettensignale der NH_2 -Gruppen von Asparagin und Glutamin (bestimmt durch Inversion aller NH-Gruppen nach einer $^1\text{J}_{\text{NH}}$ -Kopplungsentwicklung um 180°) identifiziert und eliminiert. Anhand eines HNCQ-Spektrums konnten Artefaktsignale eliminiert, Überlagerungen in der H,N-Ebene aufgelöst und die Pseudorest-Liste entsprechend ergänzt werden. Diese wurde nun, wie nachfolgend beschrieben, um sequentielle Information für C^α , C^β und H^α vervollständigt.

Das intensitätsstarke CBCA(CO)NH-Experiment lieferte neben den C^α - und C^β -Zuordnungen in (i-1)-Position auch die Information über die minimalen spektralen Bereiche der sichtbaren C^α - und C^β -Signale für HNL. Mit diesen minimalen Bandbreiten war es möglich, die sequentiellen Korrelationsexperimente HNCACB und HNCA auflösungsoptimiert durchzuführen. Insbesondere das HNCA-Spektrum lieferte dabei aufgrund seiner inhärent hohen Auflösung einige wesentliche (i,i-1)-Konnektivitäten für C^α , die im HNCACB überlagert waren. Die Erfassung der C^β -Resonanzen im HNCACB war erwartungsgemäß unvollständig (ca. 70% durch Transfer- und Relaxationsverluste) und konnte deshalb bei einigen Überlagerungen nicht die nötige Unterscheidung liefern. Weiterhin wurde sequentielle Information über die H^α -Signale aus einer Kombination von HNHA- und HN(COCA)HA-Experimenten erhalten, da sich nachträglich herausstellte, daß das mit der von *Seip et al.* [150] vorgeschlagenen Methode aufgenommene

HN(CA)HA-Spektrum weitgehend unbrauchbar war. In dieser Version des HN(CA)HA-Experiments wird während der Evolutionszeit der H^α -Verschiebung Multiquantenkohärenz zwischen H^α und seinem gebundenen C^α aufrechterhalten, um den relaxationsdominanten Effekt der dipolaren Wechselwirkung zwischen beiden Kernen zu unterbinden. Dabei wurde offensichtlich übersehen, daß sich während der H^α -Evolutionszeit auch die homonukleare $^1J_{C^\alpha C^\beta}$ -Kopplung entwickelt und somit zu einer entsprechenden 35 Hz-Amplitudenmodulation in dieser Dimension führt. Das vorgeschlagene Experiment wäre deshalb nur als *constant-time*-Version geeignet, wobei jedoch der angestrebte Intensitätsgewinn der Multiquantenkohärenz durch die Relaxationsverluste während der wesentlich längeren *constant-time*-Evolutionszeit vollständig zunichte gemacht werden (dies gilt hingegen nicht für partiell deuterierte Proben, mit denen aufgrund ihrer mehrfach längeren Relaxationszeiten ohne weiteres *constant-time*-Experimente durchführbar sind). Für HNL konnte auf eine Wiederholung des (korrigierten) HN(CA)HA-Experimentes verzichtet werden, da auch das HNHA-Experiment die benötigte H^α_i -Information liefert. Bei diesem Experiment ist die H^α -Signalintensität mit der $^3J_{H^\alpha HN}$ -Kopplung amplitudenmoduliert und kann deshalb in helikalen Bereichen (kleine $^3J_{H^\alpha HN} \leq 5$ Hz) unter Umständen nicht mehr detektierbar sein. HNL besitzt jedoch größtenteils β -Faltblattstrukturen, in denen die $^3J_{H^\alpha HN}$ -Kopplungen Maximalwerte erreichen. Deshalb war es lediglich in Ausnahmefällen nötig, ein fehlendes H^α_i -Signal im HN(CA)HA-Spektrum zu überprüfen.

Die sequentielle Information für C^α , C^β und H^α reichte aus, um mit dem Zuordnungsprogramm PASTA 170 der 179 Aminosäuren eindeutig auf die Proteinsequenz abzubilden. Die 11 Proline konnten dabei aus Mangel an detektierbaren Amidprotonen mit den beschriebenen Experimenten nicht direkt beobachtet werden, so daß die zugeordneten Sequenzenbruchstücke hier N-terminal abbrechen. Proline sind jedoch von ihrer (i+1)-ständigen Aminosäure erfaßbar und können über ihre charakteristischen C^α - und C^β -Verschiebungen eindeutig bestimmt werden. Damit können diese Sequenzbruchstücke wiederum mit Prolin als Ankerpunkt auf die Proteinsequenz abgebildet werden. Weitere Ankerpunkte liefern Aminosäuren mit charakteristischen C^α - und C^β -Verschiebungen (vor allem Threonin, Serin, Alanin) und charakteristischen Spinsystemen (Glycin, Asparagin und Glutamin, vgl. 2.3.2). Nur Prolin 11, das (i-1)-ständig zu Prolin 12 nicht erfaßbar ist und weitere 8 Aminosäuren von HNL konnten über die beschriebenen Tripelresonanzexperimente nicht zugeordnet werden. Diese fehlenden Aminosäuren lagen zu meist im Bereich der Reste 40 bis 50 und um 175, wo die Signalintensitäten signifikant abnehmen. Für diese Bereiche ergaben die Relaxationsmessungen (vgl. 2.5.3.) ausgespro-

chene konformative Flexibilität, die naturgemäß zu rascher transversaler Relaxation und damit niedrigen Signalintensitäten führt und die Zuordnungslücken physikalisch erklärbar macht. Bei der späteren Auswertung des ^{15}N -NOESY-HSQC wurden noch vier (D45, K74, Q174, C175) der fehlenden Aminosäuren über sequentielle $d_{\alpha\text{N}(i+1)}$ NOE-Konnektivitäten aufgefunden. Mit dieser H^{N} -Information konnte daraufhin in den Tripelresonanzexperimenten auch für diese vier Aminosäuren die Zuordnung der Rückgrat-Resonanzen weitgehend vervollständigt werden, obgleich die Signalintensitäten in diesen Fällen allgemein sehr niedrig waren. P11 konnte im ^{13}C -NOESY-HSQC durch entsprechende NOE-Kontakte aufgefunden werden. Die sequentielle Zuordnung von HNL ist damit bis auf M0, Q1, Q49 und K50 vollständig.

Abb.2.2 faßt experimentellen Aufwand und Ablauf der sequentiellen Zuordnung des Proteinrückgrates für HNL zusammen. Abb.2.3 zeigt das vollständig zugeordnete ^{15}N -HSQC-Spektrum von HNL.

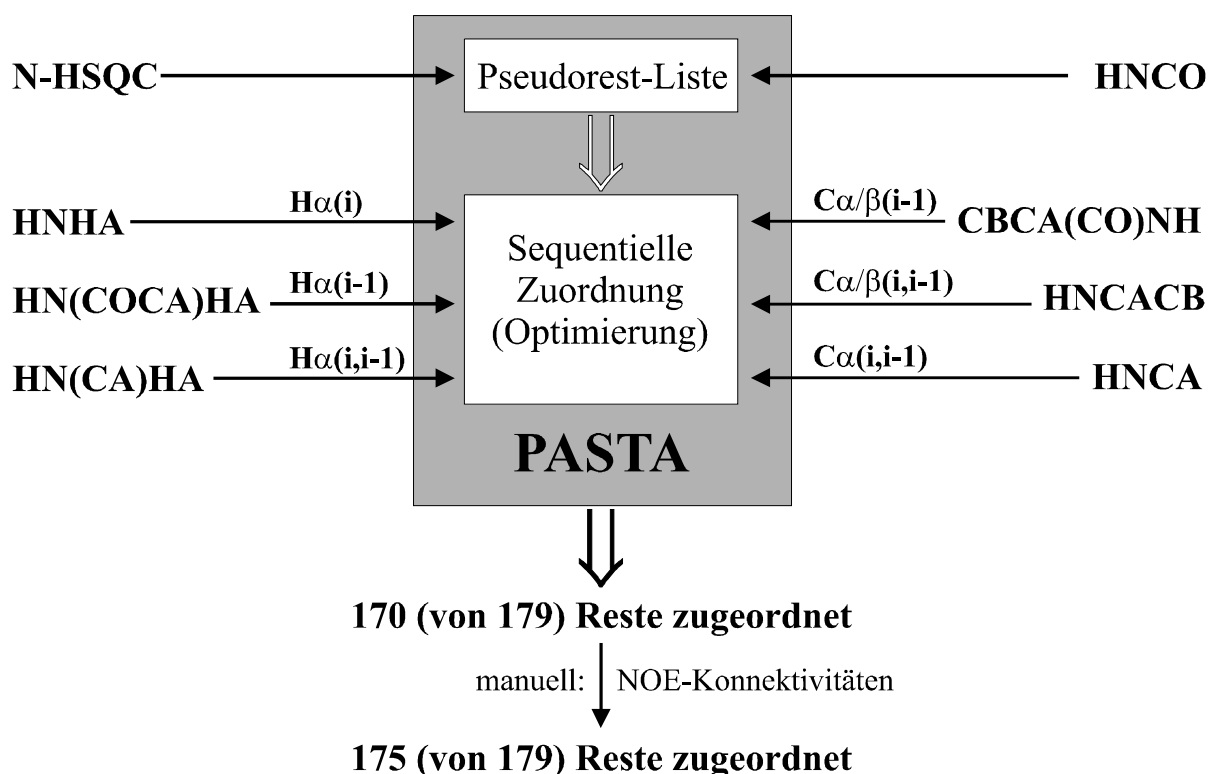


Abb.2.2 Schematischer Ablauf der sequentiellen Zuordnung von HNL mit dem Zuordnungsprogramm PASTA [149].

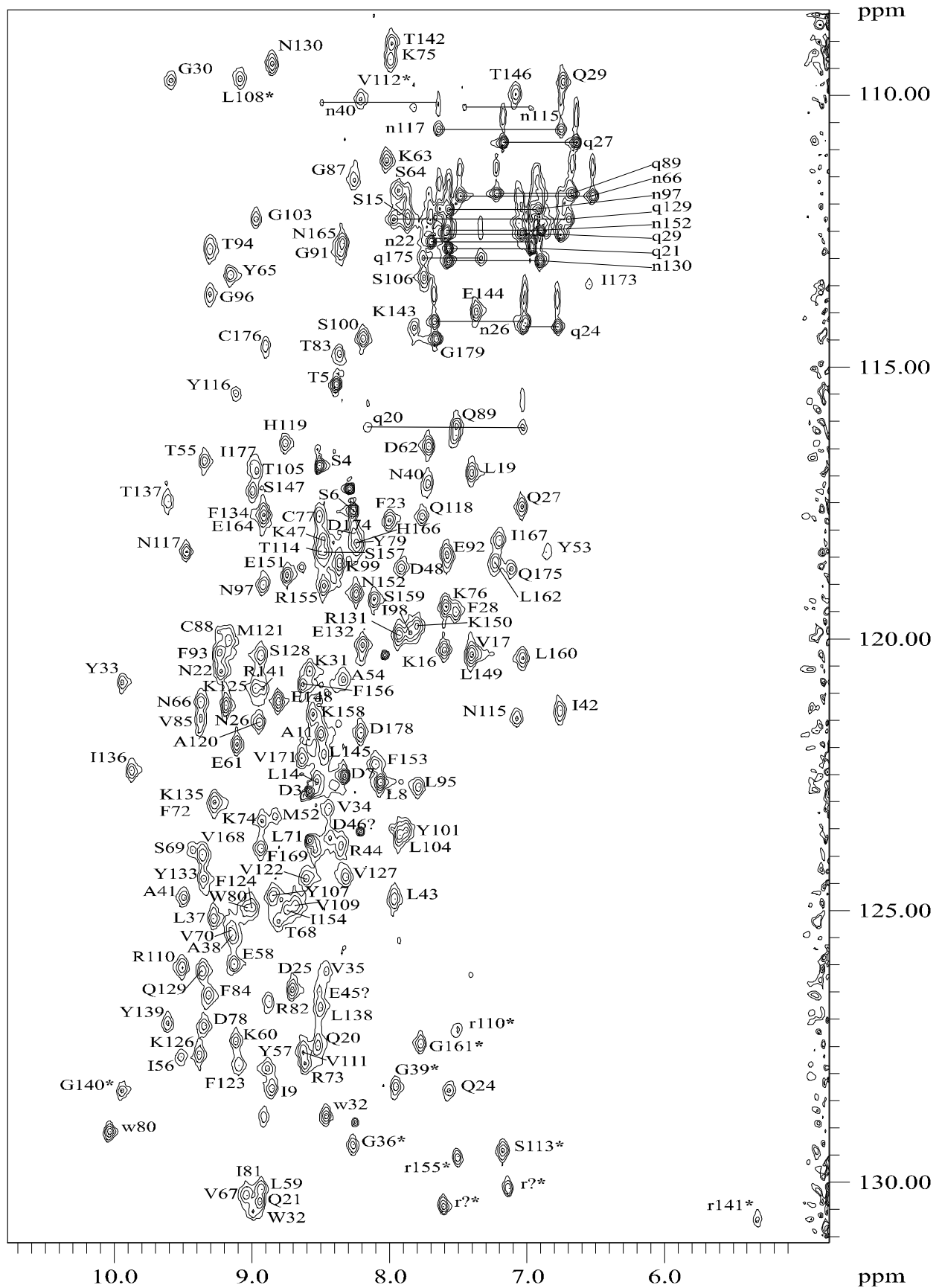


Abb.2.3 ^{15}N -HSQC von HNL mit Zuordnungen. (*) kennzeichnet gefaltete Signale, klein-geschriebene Zuordnungen beziehen sich auf Seitenketten- ^1H .

2.3.2 Zuordnung der Seitenketten-Signale

Die Zuordnung der H^β -Signale als wichtige Ankerpunkte der Seitenkettenzuordnung gelang über das HNHB- und das HBHA(CBCACO)NH-Experiment. Die skalare Korrelation aller Seitenkettensignale war für HNL jedoch deutlich durch ungünstige Relaxationseigenschaften erschwert, so daß keine komplette Verknüpfung der gesamten Spinsysteme am selben Proton möglich war. Im ^{15}N -TOCSY-HSQC konnten nur ausnahmsweise Protonensignale jenseits der H^β aufgefunden werden. Auch im HCCH-TOCSY gelang der Transfer nur sehr schlecht und in der Regel kaum weiter als über eine Kohlenstoffbindung. Damit war der Informationsgehalt dieses Experimentes weitgehend identisch mit dem des HCCH-COSY, welches mit höherer Intensität und besserer Phasenhomogenität gelang. Letztendlich wurde die Seitenkettenzuordnung größtenteils über das ^{13}C -NOESY-HSQC durch dipolare Korrelation erhalten. Dabei wurde das HCCH-COSY herangezogen, um zwischen intra- und interresidualen Korrelationen unterscheiden zu können. Nur ca. 5% der Seitenkettenresonanzen (in der Regel die H^γ und H^δ Protonen von Arginin und Lysin, die stark überlagerten aromatischen Protonen sowie die Seitenkettenintensitätsschwacher Reste) blieben nicht zugeordnet.

Die Konnektivität der Seitenketten- NH_2 Gruppen der Asparagine und Glutamine ergab sich bereits aus dem CBCA(CO)NH-Spektrum, in dem das C^β -Atom und für Asparagin auch das C^α -Atom sowohl von der Rückgrat-Amidgruppe in (i+1)-Position als auch von der Seitenketten-Amidgruppe aus beobachtet wird. Dieses typische Korrelationsmuster diente ebenfalls der Aminosäureerkennung als wichtige Zusatzinformation zur sequentiellen Zuordnung.

2.3.3 Diastereotope Zuordnungen

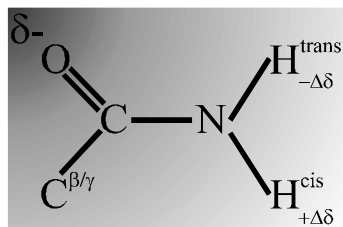
Die diastereotope Zuordnung der H^β -Protonen gelang für 98 Aminosäuren aus der Kombination der H^α - H^β -NOE-Korrelationsmuster mit den $^3J_{\text{NH}\beta}$ -Kopplungskonstanten, die aus dem HNHB-Spektrum qualitativ abgeschätzt wurden (Tab.2.1). Analog wurde die diastereotope Zuordnung aller aufgelösten prochiralen Valin-Methylgruppen nach Festlegung der H^β -Stereotopie über charakteristische NOE-Kontakte der Methylprotonen zum H^N , H^α und H^β -Proton erreicht. Die diastereotope Zuordnung aller NMR-aufgelösten Leucin-Methylgruppen sowie der H^α -Protonen von Glycin erfolgte hingegen erst im Verlauf der Strukturrechnung mit wechselnden Chiralitäten (*floating chiralities*).

Tab.2.1 Diastereotope Zuordnung der H^β -Protonen

Strukturparameter (Observable)	Rotamer I	Rotamer II	Rotamer III
	$(\chi_1 = -60^\circ)$	$(\chi_1 = 180^\circ)$	$(\chi_1 = 60^\circ)$
$^3J(N, H^\beta_{\text{proR}})$	klein	klein	groß
$^3J(N, H^\beta_{\text{proS}})$	groß	klein	klein
NOE ($H^\alpha, H^\beta_{\text{proR}}$)	klein	groß	groß
NOE ($H^\alpha, H^\beta_{\text{proS}}$)	groß	klein	groß
NOE ($H^N, H^\beta_{\text{proR}}$)	groß	groß	klein
NOE ($H^N, H^\beta_{\text{proS}}$)	klein	groß	groß

Aminosäure-Seitenketten können die drei gezeigten Vorzugs-Rotamere mit χ_1 -Winkeln (gemessen zwischen C^γ und N) von $\pm 60^\circ$ und 180° einnehmen, was sich im angegebenen charakteristischen Muster von Strukturparametern widerspiegelt.

Die diastereotope Unterscheidung der Seitenketten-Amidprotonen von Asparagin und Glutamin gelang mit dem H_2NCO -E.COSY-Experiment [151]. Dabei zeigte sich ausnahmslos die Korrelation zwischen chemischer Verschiebung und Stereotopie, die zu erwarten ist, wenn der abschirmende Effekt des elektronegativen Carbonyl-Sauerstoffatoms alle anderen lokalen Einflüsse auf die chemische Verschiebung der Amidprotonen überwiegt: die größere $^3J_{HNC\omega}$ -Kopplungskonstante von ca. 5.5 bis 7.5 Hz entspricht der *trans*-Stellung zu C^β (Asn) bzw. C^γ (Gln) und wird allgemein für das Amidproton mit der kleineren chemischen Verschiebung ($-\Delta\delta$ [ppm]) gefunden, das *cis*-ständig zum abschirmenden Sauerstoffatom liegt:



2.4 Struktur von HNL

2.4.1 Sekundärstruktur und Faltungsmuster

Die Sekundärstruktur von HNL wurde aus der Kombination des chemischen Verschiebungsindex *CSI* [152, 153] (für C^α , C^β , C' und H^α), der charakteristischen NOE- und der $^3J_{\text{HNH}\alpha}$ -Kopplungsmuster bestimmt (Abb. 2.4).

Die neun β -Faltblattstränge sowie die C-terminale α -Helix, die typisch für die Lipocaline sind, konnten eindeutig und mit großer Übereinstimmung aller Sekundärstrukturindikatoren zugeordnet werden. Dabei fallen innerhalb $\beta 1$ und $\beta 6$ je ein (i+2)-NOE-Kontakt zwischen Y32 und V34 bzw. zwischen L103 und S105 auf. Diese Kontakte ergeben sich durch Knicke (β -*bulge*) in den betreffenden β -Strängen, die an den dazwischen liegenden Resten V33 bzw. T104 lokalisiert sind. Ein weiterer β -*bulge* in $\beta 6$ deutet sich in der Unterbrechung des CSI- und des $^3J_{\text{HNH}\alpha}$ -Kopplungsmusters um V112 an, obgleich ein entsprechender NOE-Kontakt nicht identifiziert werden konnte. Diagnostisch für die β -*bulges* sind jedoch die hier auftretenden Verschiebungen im Muster der $(H^N/H^\alpha)_i - (H^N/H^\alpha)_j$ NOE-Konnektivitäten zwischen den β -Faltblättern. Beispielsweise verschiebt sich das NOE-Konnektivitätsmuster zwischen $\beta 6$ und $\beta 7$ in der Reihe F123 - L108, M121 - R110 nach A119 - S113 statt A119 - V112 aufgrund des β -*bulge* an V112.

Im Bereich der N-terminalen 3_{10} -Helix (D24 bis F27) waren die Sekundärstrukturindikatoren nicht eindeutig, sprachen aber deutlich gegen ungeordnete Strukturen. Während das $^3J_{\text{HNH}\alpha}$ -Kopplungsmuster und der H^α -CSI eine helikale Struktur anzeigen, sind der Konsensus-CSI und das NOE-Korrelationsmuster widersprüchlich. Insbesondere fehlen die für α -Helices typischen (i+3)-Kontakte zwischen einzelnen Helixwindungen, die sich hingegen für $\alpha 1$ sehr gut beobachten lassen.

Prognostizierte Enden der Sekundärstrukturelemente korrelieren gut mit den aus einer MEXICO-Experimentreihe [154, 155] abgeschätzten Amidprotonen-Austauschraten. Hohe Austauschraten werden fast nur in den ungeordneten Bereichen (N-Terminus, Schleifenbereiche zwischen den Sekundärstrukturelementen) beobachtet. Ausnahmsweise werden einzelne erhöhte Austauschraten im Bereich der vermuteten 3_{10} -Helix, zu Beginn der $\alpha 1$ -Helix und zu Beginn des $\beta 6$ -Stranges gefunden.

Über NOE-Weitbereichskontakte zwischen H^N - und H^α -Protonen wurde nach Zuordnung der Sekundärstruktur das für Lipocaline typische, aus den Faltsträngen $\beta 1$ bis $\beta 8$ beste-

hende β -Faß aufgebaut. Das aufgefundene Faltungsmuster von HNL ist in Abbildung 2.5 dargestellt.

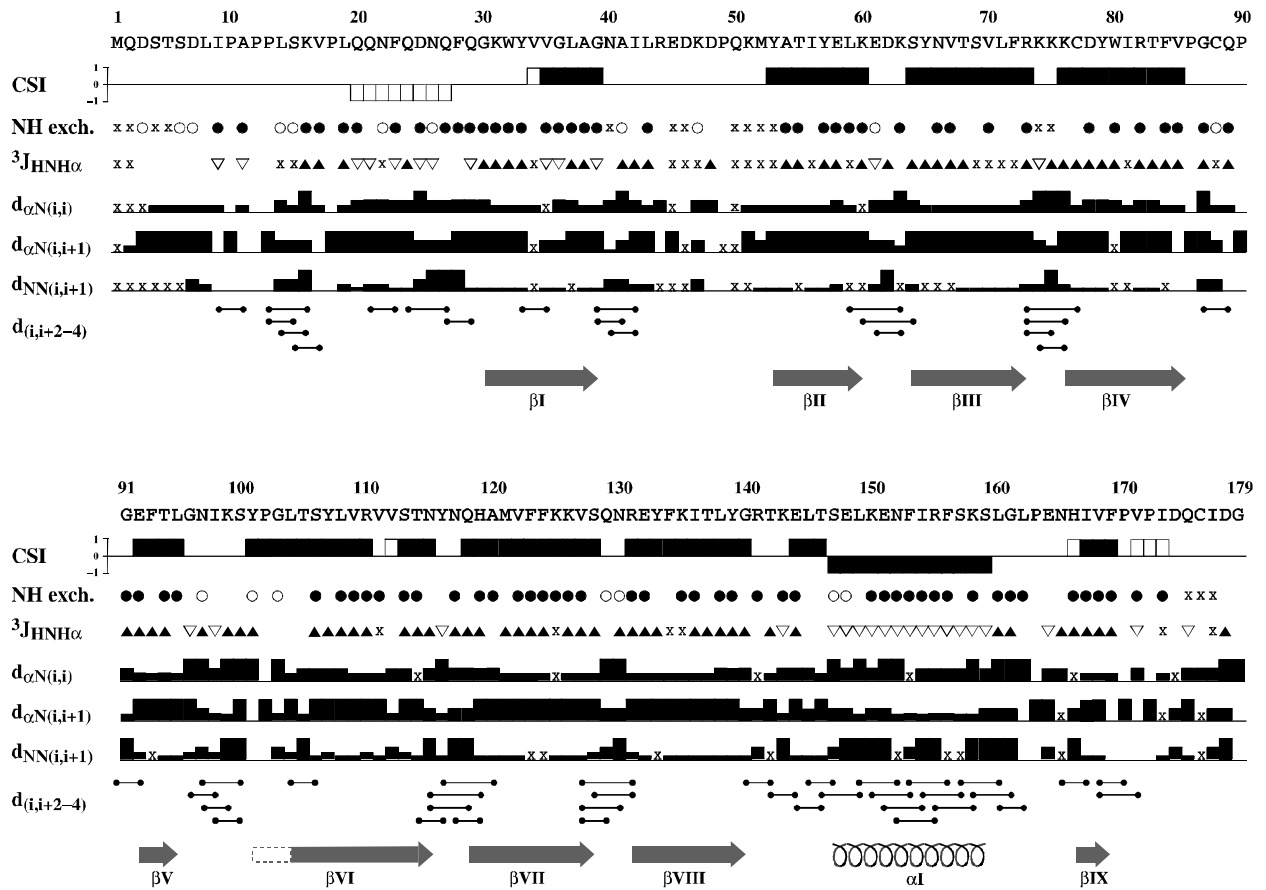


Abb.2.4 Übersicht der Sekundärstrukturindikatoren für HNL. (x) steht für unaufgelöste bzw. nicht zugeordnete Werte. Der CSI gibt die Konsensuswerte (über C^α , C^β , CO und H^α) an mit Ausnahme der offenen Balken, die nur die H^α -Werte wiedergeben. H^N -Wasseraustauschraten (\circ = schnell, \bullet langsam) wurden mit dem MEXICO-Experiment ermittelt. $^3J_{\text{HNH}\alpha}$ -Kopplungen ($\nabla < 6\text{Hz}$, $\blacktriangle > 8\text{Hz}$) wurden aus dem HNHA-Experiment ermittelt. Die Höhe der Balken der angegebenen intramolekularen und sequentiellen NOE entspricht der relativen Intensität des Kontaktes (eingeteilt in 4 Klassen). Beobachtete Weitbereichskontakte bis $i+4$ sind durch entsprechende Verbindungslinien dargestellt. Die sich aus der Summe dieser Indikatoren ergebenden Sekundärstrukturelemente sind in der untersten Zeile angegeben.

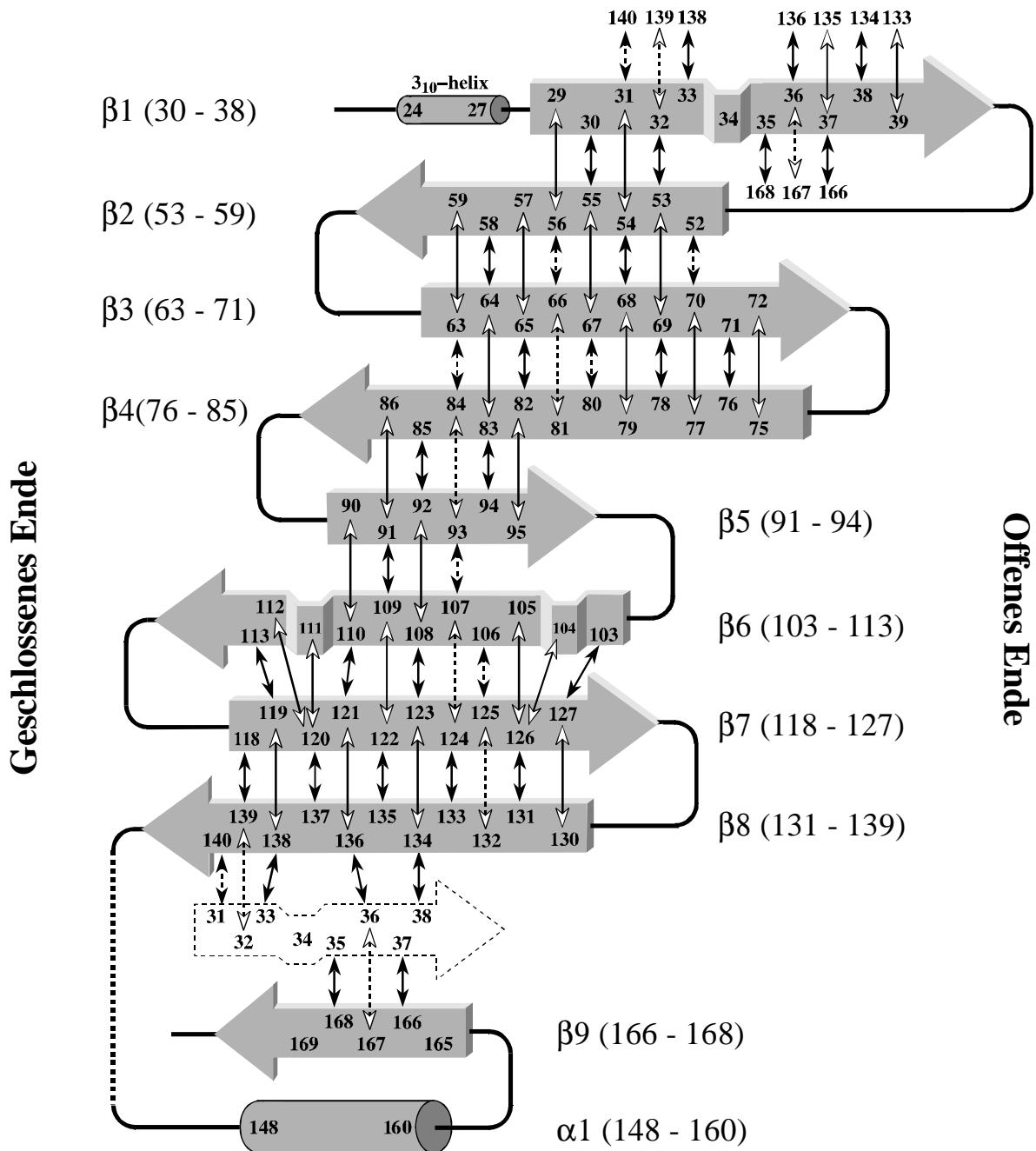


Abb.2.5 Faltungsmuster von HNL. Beobachtete NOE-Konnektivitäten zur Verknüpfung der Sekundärstrukturelemente sind durch Pfeile angezeigt. Offene Pfeile entsprechen aufgefundenen H^N-H^N -Kontakten, geschlossene Pfeile aufgefundenen $H^\alpha-H^\alpha$ -Kontakten. Erwartete, doch aufgrund von Überlagerungen nicht beobachtete Kontakte sind durch gestrichelte Pfeile markiert. Unterbrechungen im regulären NOE-Muster identifizieren die drei β -bulges in den Strängen $\beta 1$ und $\beta 6$. Die angegebenen Ausdehnungen der Sekundärstrukturelemente entsprechen der Identifizierung nach Kabsch-Sander in der endgültigen Struktur, während die grafischen Darstellungen sich allein an den beobachteten NOE-Mustern orientieren. Die Orientierung der Enden des zentralen β -Fasses, gebildet aus den Strängen $\beta 1$ bis $\beta 8$, ist ebenfalls angegeben.

2.4.2 Strukturrechnung

Die experimentellen Strukturdaten für HNL wurden aus den NMR-Experimenten ^1H , ^1H -NOESY, ^{15}N -NOESY-HSQC, ^{13}C -NOESY-HSQC, HNHA und HNHB erhalten. Die NOE-Korrelationssignale der NOESY-HSQC wurden dabei gemäß der Intensitätsverteilung der zugrundeliegenden HSQC-Experimente skaliert und ebenso wie für das ^1H , ^1H -NOESY in vier Klassen eingeteilt (entsprechend Distanzobergrenzen von 2.8, 3.3, 4.2 und 5.0 Å). Die Strukturrechnung erfolgte mit dem Programmpaket XPLOR [156].

Da nur wenige NOE-Kontakte allein aufgrund ihrer chemischen Verschiebungen eindeutig zugeordnet werden konnten, wurde zur Vermeidung fehlerhafter Verzerrungen zunächst von einer Modellstruktur ausgegangen, in der Standardgeometrien für die aufgefundenen Sekundärstrukturelemente vorgegeben wurden. Über die gesicherten Weiterbildungskontakte wurde daraus das Lipocalin-typische β -Faß gebaut. Anhand dieser Modellstruktur wurden weitere NOE-Kontakte aufgefunden und zunehmend die aus der Vorgabe der Standardgeometrien folgenden Winkel- und Distanzbedingungen aufgehoben, bis verzerrungsfreie Strukturen allein aus experimentellen Daten erhalten wurden. Mit Hilfe der experimentellen Struktur wurden alle weiteren NOE-Kontakte zugeordnet und die Proteinstruktur iterativ verfeinert.

Der endgültige Struktursatz für HNL wurde mit 1772 NOE-Kontakten, davon 418 Weiterbildungskontakte, und 208 Torsionswinkelbedingungen berechnet. 117 gemessene $^3J_{\text{HNHa}}$ -Kopplungen wurden dabei in ϕ -Winkelvorgaben umgerechnet ($130^\circ \pm 20^\circ$ für $J > 8$ Hz $60^\circ \pm 20^\circ$ für $J < 6$ Hz) und nur für Glycine und Aminosäuren in Bereichen ohne Sekundärstruktur direkt als Vorgabe verwendet. Für 91 Aminosäuren konnte im Verlauf der Strukturrechnung ein Vorzugsrotamer für χ_1 identifiziert (vgl. Kapitel 2.3.3) und als weitere Torsionswinkelbedingung (mit Toleranz von $\pm 45^\circ$) eingesetzt werden.

Wo sich im Verlauf der Strukturrechnung intramolekulare Wasserstoffbrücken andeuteten, wurden diese durch Vorgabe einer Distanz-Obergrenze ($\text{H}^{\text{N}}\text{-O} = 2.5\text{Å}$) stabilisiert, sofern die betreffenden Amidprotonen innerhalb definierter Sekundärstrukturbereiche lagen und auch in der MEXICO-Experimentreihe erkennbar niedrige Austauschraten mit Wasser zeigten. Insgesamt wurden so 61 Wasserstoffbrücken vorgegeben.

Die Strukturen wurden durch Anwendung von CSI-Potentialen für C^α -, C^β -, H^α - und weitere auffällige Protonenverschiebungen innerhalb definierter Sekundärstrukturbereiche verfeinert [157-159]. Im letzten Schritt der Strukturrechnung wurde ein empirisches Datenbank-Potential für Proteinstrukturen berücksichtigt [160, 161].

Die Lösungsstruktur von HNL wurde erhalten, indem aus den Koordinaten des endgültigen Struktursatzes der 20 energieärmsten Strukturen eine gemittelte Struktur erzeugt und anschließend erneut gegen alle beschriebenen Potentiale (experimentelle Strukturdaten, Wasserstoffbrücken, CSI, Datenbank-Abgleich) abgeglichen wurde. Tab.2.1 faßt die experimentell ermittelten Strukturparameter sowie ihre mittleren Verletzungen im endgültigen Struktursatz und in der Lösungsstruktur zusammen.

Tab.2.1 Übersicht der mittleren Quadratwurzelabweichungen (RMSD) experimenteller Strukturparameter für den endgültigen Struktursatz bzw. die minimierte gemittelte Struktur (Lösungsstruktur) von HNL.

Experimenteller Strukturparameter	Anzahl	Endgültiger Struktursatz (20 Strukturen)	minimierte gemittelte Struktur
<i>1) Distanzen</i>			
a) NOE insgesamt	1772	0.033 Å	0.034 Å
intraresidual	494	0.033 Å	0.028 Å
sequentiell	559	0.043 Å	0.043 Å
mittlere Reichweite	179	0.029 Å	0.032 Å
Weitbereich	418	0.029 Å	0.024 Å
b) Wasserstoffbrücken	61	0.032 Å	0.036 Å
<i>2) Winkel</i>			
Dihedralwinkel (ϕ und χ_1)	164	0.392 °	0.405 °
$^3J_{\text{HNH}\alpha}$ -Kopplungskonstanten	44	1.04 Hz	1.04 Hz
<i>3) Verschiebungsdifferenzen</i>			
C $^{\alpha}$	169	1.27 ppm	1.24 ppm
C $^{\beta}$	160	1.32 ppm	1.35 ppm
Protonen	226	0.28 ppm	0.28 ppm

Die Konvergenz der Lösungsstruktur von HNL geht aus der Streuung der Atomkoordinaten des endgültigen Struktursatzes gegenüber der (minimierten) gemittelten Struktur hervor und ist in Tab.2.2 zusammengefaßt. Zieht man die ausgedehnten, weitgehend ungeordneten und hochflexiblen (vgl. Dynamik von HNL) Bereiche des N-Terminus und der ω -Schleife ab, erreicht die Konvergenz der HNL-Struktur eine sehr geringe Summen-Quadratwurzelabweichung aller Atomkoordinaten nahe 1Å.

Tab.2.2 Mittlere Summen-Quadratwurzelabweichung der Atomkoordinaten (in Å)

	SA bezüglich $\langle SA \rangle$ ¹⁾		SA bezüglich $\langle SA \rangle_{\min}$ ¹⁾	
	Proteinrückgr at	alle Atome	Proteinrückgr at	alle Atome
alle Reste	2.18 ± 0.52	2.53 ± 0.48	2.18 ± 0.55	2.53 ± 0.49
Sekundärstrukturen ²⁾	0.79 ± 0.13	1.24 ± 0.10	0.78 ± 0.14	1.24 ± 0.12
β -Faß ³⁾	0.62 ± 0.14	1.11 ± 0.08	0.62 ± 0.11	1.12 ± 0.09
Bindungsstelle ⁴⁾	0.40 ± 0.07	0.99 ± 0.15	0.40 ± 0.07	0.99 ± 0.16
$\langle SA \rangle$ bezüglich $\langle SA \rangle_{\min}$ (alle Atome)			1.70	2.00

Verwendete Abkürzungen: ¹⁾ SA = Satz der 20 finalen Strukturen aus *simulated annealing*; $\langle SA \rangle$ = gemittelte Struktur aus finalem Struktursatz; $\langle SA \rangle_{\min}$ = gemittelte Struktur nach Minimierung bezüglich aller experimentellen Randbedingungen. ²⁾ Reste 24-39 und 52-168. ³⁾ Reste 29-39 und 52-139. ⁴⁾ Reste F27, W31, V33, Y52, T54, Y56, V66, R81, F83, F92, L94, Y106, V108, V110, V121, F123, K125, K134, T136, Y139.

Die stereochemische Qualität bewertet, wie stark die experimentell bestimmte Struktur hinsichtlich struktureller Parameter von statistischen Erwartungswerten abweicht. Die stereochemische Qualität der Lösungsstruktur von HNL wurde mit dem Programm PROCHECK [162, 163] ermittelt. Zu den bewerteten Parametern gehört insbesondere auch die ϕ, ψ -Winkelverteilung im *Ramachandran*-Diagramm, das in Abb.2.6 für die minimierte gemittelte HNL-Struktur abgebildet ist. Es zeigt, daß 80% der bewerteten Reste (Glycine, Proline und die N-terminale Aminosäure sind von der Bewertung ausgeschlossen) in die wahrscheinlichsten Aufenthaltsbereiche fallen und kein einziger Rest die allgemein akzeptierten ϕ, ψ -Winkelkombinationen verletzt. Nach der PROCHECK-Bewertung ist die minimierte gemittelte HNL-Struktur in allen stereochemischen Kriterien gleich gut oder besser als eine durchschnittliche Kristallstruktur mit 2 Å Auflösung.

Tab.2.3 ϕ, ψ -Winkelverteilung im *Ramachandran*-Diagramm, ermittelt mit dem Programm PROCHECK [162, 163].

ϕ, ψ -Winkelverteilung im <i>Ramachandran</i> -Diagramm (keine Bewertung für Gly, Pro und N-Terminus)	minimierte gemittelte Struktur
in bevorzugten Bereichen	79.6 %
in erweitert erlaubten Bereichen	17.8 %
in großzügig erlaubten Bereichen	2.5 %
in verbotenen Bereichen	0.0 %

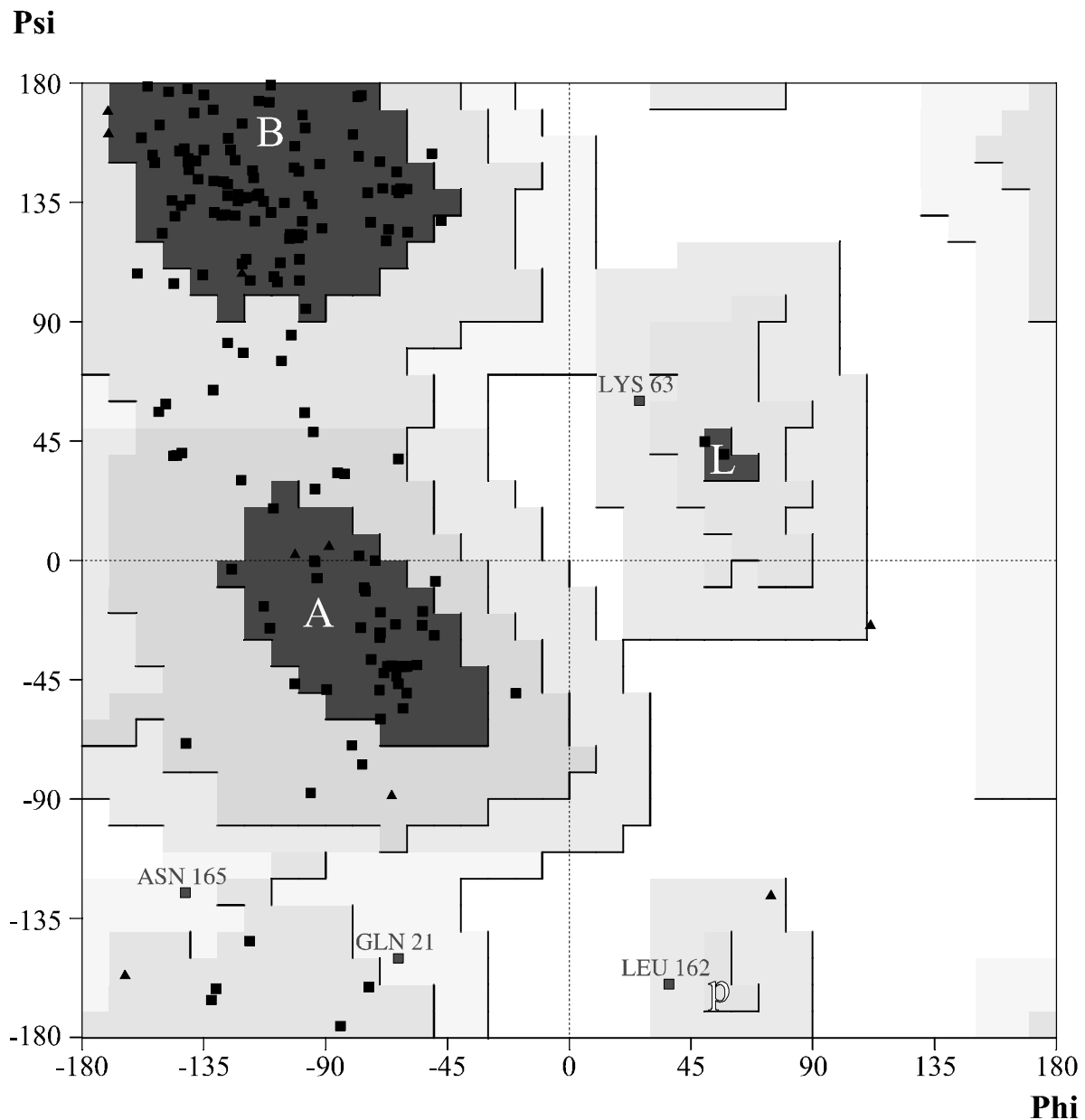


Abb.2.6 Ramachandran-Plot für die minimierte gemittelte NMR-Struktur von HNL, erstellt mit dem Program PROCHECK [162, 163]. Die Schattierung entspricht zunehmender Wahrscheinlichkeit der Lage einzelner Aminosäuren (■) im ϕ, ψ -Raum. Helikale Strukturen fallen bevorzugt in Region A, β -Stränge in Region B und linksgängige Helices in Regions L. β -Schleifenmotive können in allen ausgezeichneten Bereichen (A, B, L und p) angetroffen werden. Lediglich 4 Aminosäuren (Q21, K63, L162, N165) fallen in Bereiche mit geringer Aufenthaltswahrscheinlichkeit, keine Aminosäure fällt in verbotene Bereiche. Für Glycine (▲) gelten die angegebenen Vorzugsbereiche nicht.

2.4.3 Die NMR-Struktur von HNL

Die Lösungsstruktur von HNL (Abb.2.7) zeigt das erwartete, typische Faltungsmuster der Lipocaline: Das β -Faß von HNL baut sich aus 8 antiparallelen β -Strängen auf, die zwei fast orthogonale β -Faltblätter bilden. Das erste Faltblatt besteht aus den Strängen β 2 bis β 4, das zweite Faltblatt aus den Strängen β 6 bis β 8. Der kurze β 5-Strang verbindet beide Faltblätter zwischen dem stark gekrümmten β 4-Strang und dem zentralen Bereich des β 6-Stranges. An den gegenüberliegenden Seiten werden die Faltblätter über den gemeinsamen β 1-Strang verbunden. Durch den scharfen Knick in diesem Strang (der β -*bulge* bei V33) liegen die angrenzenden Stränge β 2 und β 8 fast rechtwinklig zueinander. Die Konformation und das Netz der Wasserstoffbrücken in dieser Region, dargestellt in Abb.2.8.a, sind typisch für die Lipocaline. Der β -*bulge* wird durch eine doppelte Wasserstoffbrücke zwischen L137-CO und sowohl V34-H^N als auch G35-H^N stabilisiert. Zwei weitere β -*bulges* treten am Anfang (bei T104) und Ende (bei V110) des β 6-Stranges auf.

Aus der Detailansicht (Abb.2.8.a) wird ein weiteres Lipocalin-typisches Motiv ersichtlich, das von den Seitenketten der Aminosäuren W31, T113 und R140 gebildet wird. Diese hochkonservierten Reste belegen in allen Kern-Lipocalinen und den meisten Außenseiter-Lipocalinen strukturell dieselben Positionen (W31 ist die dritte Aminosäure des β 1-Stranges, T113 liegt am Ende des β 6 und R140 am Ende des β 8-Stranges). Die dicht gepackten Seitenketten dieser drei Reste verschließen zusammen mit der kurzen N-terminalen 3_{10} -Helix das trichterförmige β -Faß der Lipocaline am schmalen Ende. Die räumliche Nähe der Seitenketten wird durch eine Vielzahl von NOE-Kontakten untereinander belegt, darunter einigen NOE-Kontakten zu den Guanidinprotonen von R140. R140 weist dabei viele NMR-spektroskopische Besonderheiten gegenüber allen anderen Argininen von HNL auf, die durch seine strukturelle Umgebung erklärt werden können. So sind allein die Guanidinprotonen von R140 sichtbar, da die sterische Abschirmung im Inneren des β -Fasses den sonst sehr raschen Austausch mit Wasser verhindert. Die auffallende Hochfeldverschiebung des H ^{ϵ} -Protons auf 5.31 ppm (gegenüber 6.5 - 7.6 ppm für die übrigen Arginine - vgl. ¹⁵N-HSQC, Abb.2.3) wird durch Ringstromeffekte des nahen W31 verursacht. Die dichte Packung unterbindet praktisch jegliche Eigenbewegung der Seitenketten sowohl von R140 als auch von W31, wie die außerordentlich hohen gemessenen Ordnungsparameter für die N ^{ϵ} -H ^{ϵ} -Vektoren zeigen (vgl. Kapitel 2.5).

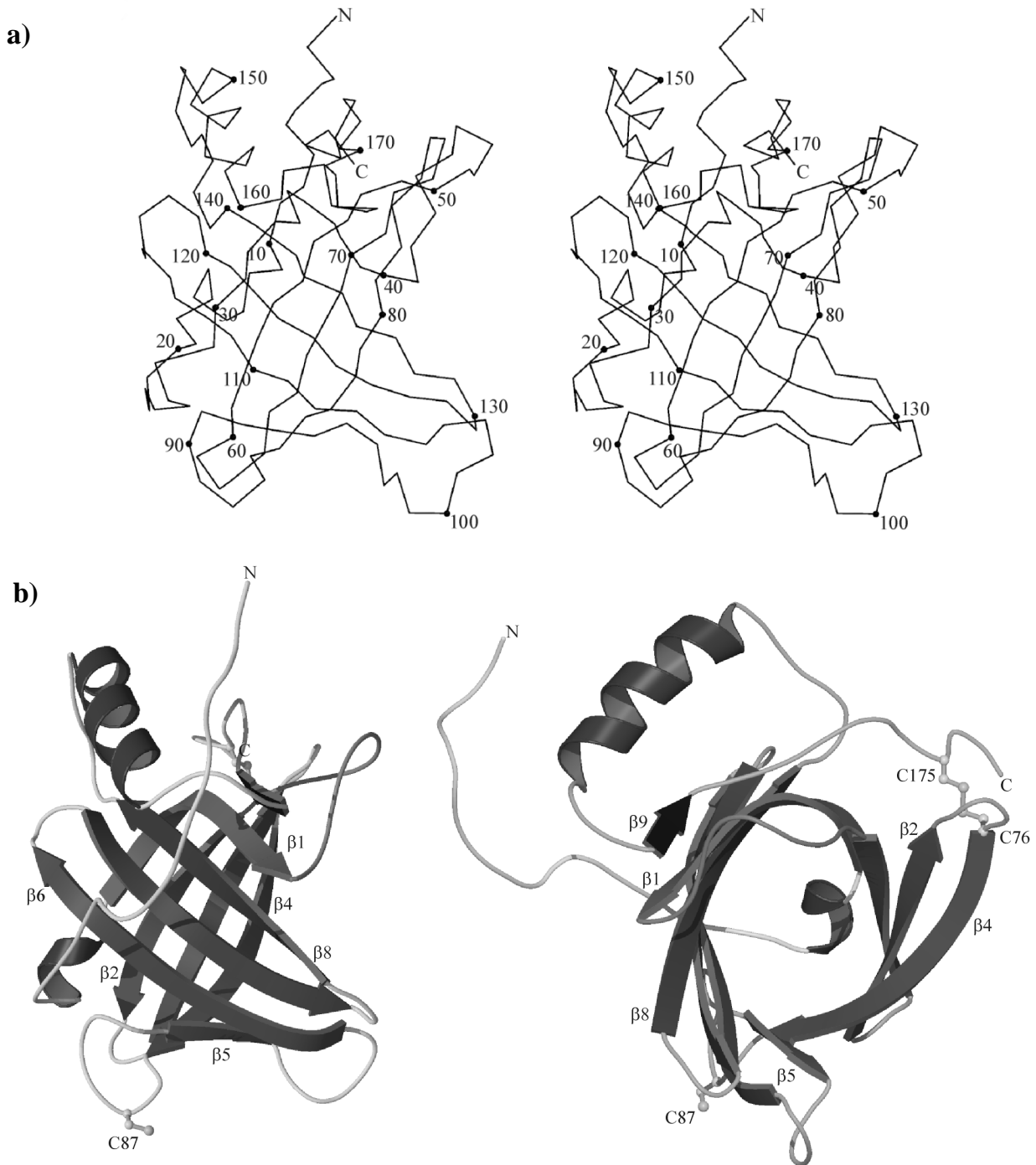


Abb.2.7 Die Lösungsstruktur von HNL. **a)** Stereodarstellung des Proteinrückgrates (C^α -Spur) mit der Öffnung des β -Fasses rechts. **b)** Orthogonale Bänderdarstellung; links Ansicht wie in a) mit der Öffnung des β -Fasses rechts; rechts Draufsicht in die Öffnung des β -Fasses.

Die Verbindungssequenzen zwischen den β -Strängen des β -Fasses sind in der Mehrzahl kurz und bilden wohldefinierte β -Schleifenmotive (β -turn) aus. Die längere β 5- β 6-Schleife weist dabei zwei abfolgende β -turns ähnlich einer kurzen 3_{10} -Helix auf. Die ebenfalls relativ lange β 4- β 5-Schleife liegt am geschlossenen Ende des β -Fasses und beinhaltet das freie Cystein (C87). Diese Schleife bildet einen β -turn über die Reste Q88

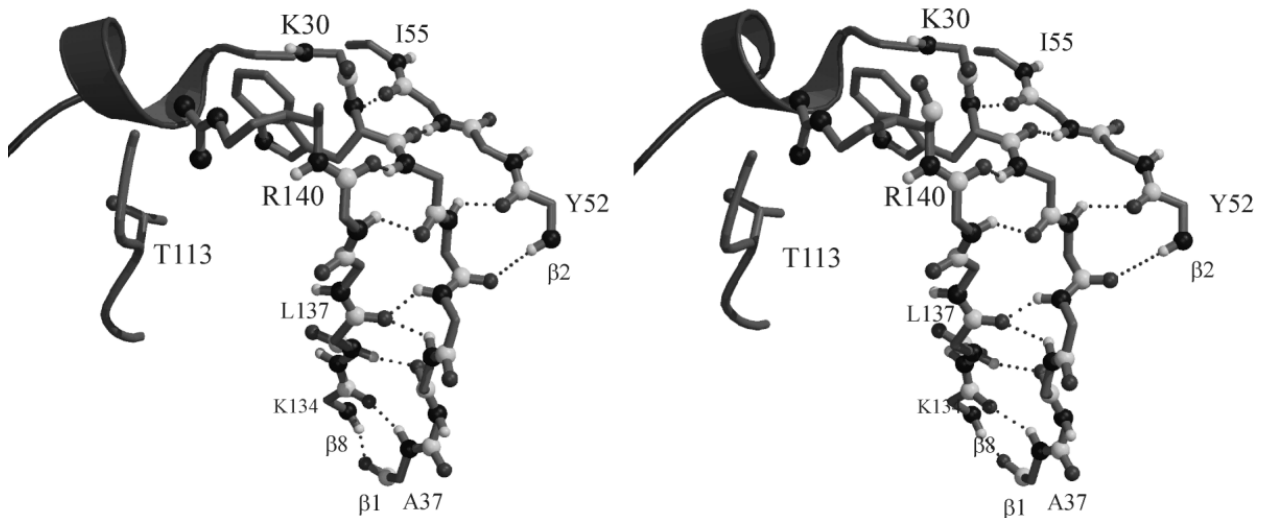
und E91, die sowohl über ihre Rückgrat- als auch Seitenkettenamidgruppen Wasserstoffbrücken zueinander ausbilden. Die ausgedehnte Ω -Schleife zwischen $\beta 1$ und $\beta 2$ zeigt hingegen keine Strukturelemente. Durch die sehr geringen Signalintensitäten konnten für diesen Bereich nur sehr wenige experimentelle Strukturdaten bestimmt werden. Die strukturelle Unbestimmtheit ist Folge der hohen konformativen Flexibilität der Ω -Schleife (vgl. Kapitel 2.5).

Zu Beginn der Ω -Schleife bzw. am Ende des $\beta 1$ -Stranges liegt N39, das über seine Seitenketten-Amidgruppe Wasserstoffbrücken zu F133-H^N und zu E131-CO ausbildet (Abb.2.8.b). Durch die Wasserstoffbrücken werden dieser freie Donor und Akzeptor zu Beginn des $\beta 8$ -Stranges abgesättigt. Die Einbindung der Seitenkette von N39 in Wasserstoffbrücken läßt sich auch NMR-spektroskopisch beweisen: Einerseits fehlt im NOESY-Spektrum das für frei zugängliche Amidprotonen beobachtbare starke Austauschsignal mit Wasser. Zum anderen weisen die ¹⁵N-Relaxationsdaten auf deutlich gehinderte Seitenkettenmobilität hin (vgl. Kapitel 7.5).

Helix $\alpha 1$ zeigt einige NOE-Kontakte zu den Strängen $\beta 1$ und $\beta 8$ und liegt dadurch wie ein Henkel über dem β -Faß. Der nachfolgende $\beta 9$ -Strang hat Faltblatt-Kontakte zu $\beta 1$ und stabilisiert die Lage der Helix. Der weitere Verlauf des C-Terminus ist ungeordnet, bleibt aber über Cystin C76-C175 mit dem β -Faß verbunden.

Die kurze 3_{10} -Helix zeigt NOE-Kontakte zu $\beta 2$ und $\beta 6$ und liegt demnach zentral über dem schmalen Ende des β -Fasses, das dadurch und durch den o.a. Seitenketten-Cluster auf der Innenseite verschlossen wird. Der weitgehend hydrophobe N-Terminus ist bis hinab zu L7 durch NOE-Kontakte zu den Strängen $\beta 6$, $\beta 7$ und $\beta 8$ seitlich am β -Faß positioniert. Er ist ungeordnet bis auf eine Helixwindung über die Aminosäuren L13 bis V16.

a)



b)

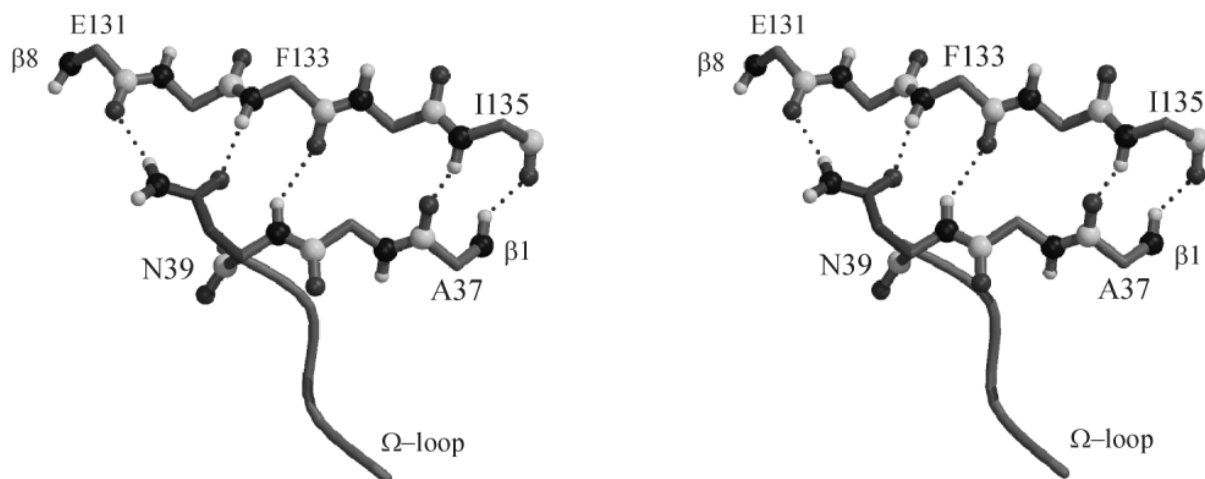


Abb.2.8 Verschluss des β -Fasses von HNL (Stereoansichten). **a)** Seitlicher Ringschluß über den gewinkelten Strang $\beta 1$ und Stränge $\beta 2$ und $\beta 8$. Das Wasserstoffbrückennetz (gestrichelt) weist eine gegabelte Wasserstoffbrücke zwischen L137, V34 und G35 infolge des β -*bulge* an V33 auf. Oben die strukturell konservierte Region am geschlossenen Ende des β -Fasses, das durch die dicht gepackten Seitenketten der hochkonservierten Reste W31, T113 und R140 verschlossen wird. **b)** Ausschnitt des Wasserstoffbrückennetzes zwischen den Strängen $\beta 1$ und $\beta 8$. Zwei Wasserstoffbrücken mit der Seitenketten-Amidgruppe von N39 sättigen den überzähligen Akzeptor E131 und Donor F133 ab.

2.5 Dynamik von HNL

2.5.1 Relaxationsmessungen und Extraktion der Relaxationsdaten

Die Moleküldynamik von HNL wurde über die ^{15}N - ^1H -Vektordynamik aus bei drei magnetischen Feldstärken (500, 600 und 750 MHz) gemessenen Relaxationsdaten (^{15}N - T_1 , ^{15}N - T_2 , $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ NOE,) erfaßt. Die Proben temperatur betrug kalibrierte 297.5 ± 0.5 K. Das zugrundeliegende ^{15}N -HSQC Spektrum (Abb.2.3) wurde zur Erhöhung der Auflösung gefaltet, indem insbesondere auch auf eine gute Separation der gefalteten Signale der Arginin- N^ϵ geachtet wurde. Alle Relaxationsexperimente liefen verschachtelt und mit Rückführung der Wassermagnetisierung zur Vermeidung von Sättigungstransfereffekten.

Für die ^{15}N - T_2 -Messungen wurden acht linear ansteigende Mischzeiten (16 - 130 ms) in gemischter Abfolge bei einer CPMG-Echodauer von 2×0.45 ms und einer Äquilibrierdauer von 2.5 s zwischen den einzelnen Programmdurchläufen gewählt. Für die ^{15}N - T_1 -Messungen wurden 12 bis 14 exponentiell ansteigende Mischzeiten (bis ca. 1 s) in gemischter Abfolge bei einer Äquilibrierdauer von 2 s zwischen den einzelnen Programmdurchläufen gewählt. Zum Gleichgewichtsaufbau des $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ -NOE wurden die Protonen 3 s lang gesättigt, die Äquilibrierdauer betrug 2 s. Erst nachträglich stellte sich heraus, daß für das Experiment bei 600 MHz die Äquilibrierdauer irrtümlich nur 1 s betrug. Darauf dürfte auch zurückzuführen sein, daß die Werte für den $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ -NOE im Vergleich zu den Messungen bei 500 und 750 MHz oft zu niedrig lagen. Auf eine Wiederholung des Experimentes mußte mangels intakter Proteinprobe verzichtet werden.

Alle Spektren wurden als 1024 x 128 Datenmatrix aufgenommen. Weitere Aufnahmeparameter sind in den entsprechenden Pulsprogrammen angegeben (Anhang E).

Die gemessenen 1024 x 128 Datenmatrizen wurden als Spektren mit 1024 x 512 Datenpunkten prozessiert, wobei zuvor die Meßdaten in der ^{15}N -Dimension durch *linear prediction* (mit 32 Koeffizienten) auf 192 Punkte weitergerechnet wurden. Die Beschränkung des Umfanges der Datenprognose auf 50% der aufgenommenen Punkte war nötig, da sich bei 100% Vorhersage bereits artifizielle Intensitätsschwankungen in den $I(t)$ -Abklingkurven zeigten. Diese gegenüber den Spektren von PLA_2 (Kapitel 3) erhöhte Ungenauigkeit in der Datenprognose beruht auf dem deutlich schlechteren Signal-zu-Rausch-Verhältnis der Spektren von HNL, was angesichts der nahezu dreimal längeren molekularen Korrelationszeit von HNL (s.u.) nicht verwundert.

Eine Basislinienkorrektur der Spektren war aufgrund der guten Wasserunterdrückung nicht erforderlich. Die Signalintensitäten wurden mit dem AURELIA-Programm durch

Überblenden einer Zuordnungsmaske für das ^{15}N -HSQC erhalten. Einzelne Signale zeigten dabei geringe feldabhängige Verschiebungen (> 0.01 ppm in ^1H , > 0.1 ppm in ^{15}N) und mußten manuell zugeordnet werden. Dabei handelte es sich fast ausschließlich um Signale in den hochflexiblen Bereichen des N-Terminus und der Ω -Schleife. Es ist nicht auszuschließen, daß die beobachteten feldabhängigen Verschiebungen statistisch signifikant sind und z.B. durch eine feldabhängige Veränderung der Populationen, die hier zu konformativ gemittelten Signallagen beitragen, erklärt werden können (vgl.1.8).

Die Berechnung des $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ -NOE erfolgte direkt durch Quotientenbildung der Intensitäten $I\{^1\text{H gesättigt}\}/I_0$. Die Anpassung der $I(t)$ -Abklingkurven unter DFIT ^[107] zur Bestimmung der Relaxationszeiten erforderte keine Offset-Berücksichtigung. Bei den T_1 -Abklingkurven zeigten sich jedoch jeweils wenige, einheitlich abweichende Meßpunkte (192 ms bei 600 MHz, 8 sowie 256 ms bei 500 MHz und 243 sowie 365 ms bei 750 MHz), die aus der Anpassung ausgeschlossen werden mußten. Dadurch konnten bei 750 MHz einige T_1 -Werte zum Teil nur mit hoher Ungenauigkeit ($> 5\%$) bestimmt werden. Fehlerhafte Meßpunkte lagen weder innerhalb der gewählten Mischzeitbereiche noch innerhalb der Meßreihe in einer erkennbaren Vorzugsposition, traten aber offensichtlich bei allen drei Geräten auf. Ihre Ursache ist unbekannt.

^{15}N -Relaxationsdaten wurden für maximal 148 aufgelöste von 157 detektierbaren Stickstoffatomen des Proteinrückgrates, für 5 von 7 Arginin- N^ϵ und für beide Tryptophan- N^ϵ bestimmt. Zusätzlich wurden die ^{15}N -Relaxationsdaten für die monodeuterierten NHD-Spezies der Seitenkettenamidgruppen aller 10 Asparagine und für 10 von 11 Glutaminen bestimmt.

Tab.2.4 Mittelwerte und Streuungen der gemessenen Relaxationsdaten für HNL bei drei magnetischen Feldstärken, 297.5 ± 0.5 K.

B_0	$^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ -NOE	^{15}N - T_1 [ms]	^{15}N - T_2 [ms]
500 MHz	0.74 (0.79)	830 (832)	69.7 (63.0)
	[-0.65 - 0.9]	[750 - 1120]	[43 - 317]
600 MHz	0.75 (0.80)	1025 (1050)	65.8 (58.6)
	[-0.95 - 0.95]	[670 - 1230]	[33 - 327]
750 MHz	0.79 (0.83)	1480 (1540)	58.9 (52.7)
	[-0.25 - 0.9]	[910 - 1880]	[31 - 283]

Die Mittelung erfolgte über alle erfaßten Signale des Proteinrückgrates bzw. (in Klammern) nur über die Aminosäuren 10 bis 178 unter Vernachlässigung der besonders flexiblen Termini. In eckigen Klammern ist die Streuung der Relaxationsdaten über das gesamte Proteinrückgrat angegeben.

Die ermittelten Relaxationsdaten sind in Anhang B.3 aufgelistet und in Abb.2.9 über der Sequenz aufgetragen. Tabelle 2.4 faßt Mittelwerte und Streuungen der Relaxationsdaten des Proteinrückgrates zusammen.

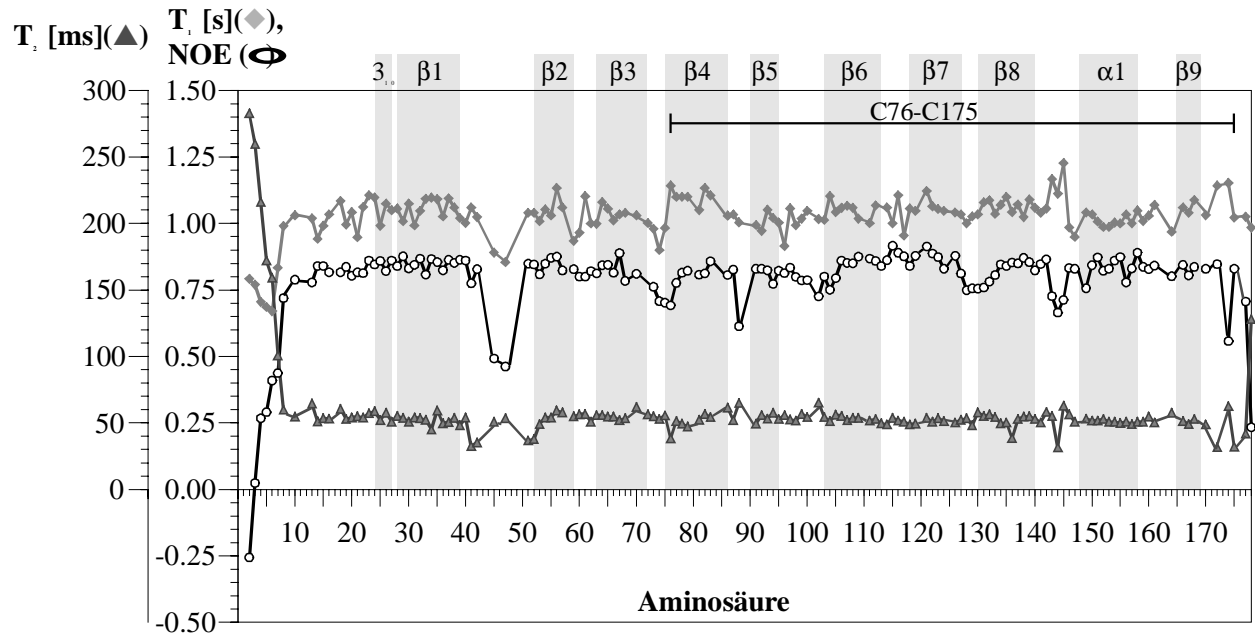


Abb.2.9 Experimentelle Relaxationsdaten von HNL (bei 750 MHz). Die Sekundärstrukturelemente sind grau unterlegt, das Cystin C76-C175 ist eingetragen.

2.5.2 Untersuchung von Aggregation und Anisotropie

Vor Beginn der modellfreien Auswertung der Relaxationsdaten muß überprüft werden, ob die wichtigsten Voraussetzungen für ihre Gültigkeit - weitgehende isotrope Molekülrotation und Oligomerenreinheit ^[81] - überhaupt erfüllt sind. Anisotrope Molekülrotation macht die Annahme einer einheitlichen molekularen Rotationskorrelationszeit ungültig; stattdessen erzeugt die unterschiedlich rasche Rotation um die 3 Hauptträgheitsachsen ein Spektrum von orientierungsabhängigen Rotationskorrelationszeiten für die einzelnen HN-Vektoren (vgl.1.6.7). Durch Aggregation entstehen Oligomere mit unterschiedlicher Rotationsanisotropie und Rotationskorrelationszeiten. Dies gilt auch bei Gleichgewichts-Aggregationsreaktionen, bei denen als zusätzliche Komplikation Linienverbreiterungen ($\Delta_{\text{Austausch}}$ -Beiträge zu R_2) auftreten können, die dann nicht mehr eindeutig konformativer Flexibilität oder chemischem Austausch zugeordnet werden können.

Zur Abschätzung der Anisotropie der Molekülrotation wurden hydrodynamische Rechnungen für die minimierte mittlere Struktur von HNL mit dem Programmmodul DIFFC ^[107] durchgeführt. Der allgemeine Ablauf dieser Rechnungen wurde in Kapitel 1.12 beschrieben. Es wurde mit dem Kugelmodell ^[83, 110] und dem modifizierten Oseen-Tensor

gerechnet. Die Kugelradien wurden reskaliert gemäß ihrer lösungsmittelzugänglichen Oberflächen, die mit einem Wasser-Proberadius von 1.6 \AA berechnet wurden [112]. Effektiv abgeschirmte Kugeln (mit einem reskalierten Radius $< 0.1 \text{ \AA}$) wurden eliminiert. Kugeln mit einer Volumenüberlappung $> 10\%$ wurden um maximal 0.01 \AA in ihrer Position variiert, wodurch das Ausmaß an Überlappung ohne nennenswerte Verzerrung der Struktur reduziert wurde. Zur Berechnung der Reibungskoeffizienten wurde die *slip*-Bedingung ($\xi_i = 4\pi\eta r_{\text{eff},i}$) benutzt [108, 114], die für Reibungskugeln in atomarer Größenordnung Gültigkeit hat.

Die Unbestimmtheit der Position der flexiblen Ω -Schleife und der Termini von HNL muß bei der Berechnung des Anisotropietensors berücksichtigt werden. Das Ausmaß der resultierenden Streuung des Anisotropietensors läßt sich durch wiederholte Berechnungen für unterschiedliche Orientierungen der flexiblen Bereiche bestimmen. Die möglichen Orientierungen können durch eine moleküldynamische Simulation ermittelt werden. Mit diesem Verfahren [86] kann der *mittlere* Anisotropietensor beliebig genau berechnet werden, jedoch mit sehr hohem Rechenaufwand. Wenn ein flexibler Proteinbereich einen sehr großen Konformationsraum überstreicht, wird sich sein Einfluß auf Größe und Orientierung des Anisotropietensors reduzieren und näherungsweise herausmitteln. Dann läßt sich der mittlere Anisotropietensor auch viel einfacher abschätzen, indem die Proteinstruktur um derart flexible Bereiche gekürzt wird [86]. Für HNL wurde dazu die mittlere minimierte Struktur um die Reste M0 bis L18 (N-Terminus), R43 bis Q49 (Ω -Schleife) und G178 (C-Terminus) gekürzt.

Tab.2.5 Ergebnisse der hydrodynamischen Rechnungen für HNL.

Kugelzentren	Radien	vollständige Struktur	gekürzte Struktur
alle Atome	Van-der-Waals	1.44:1.157:1.0	-
alle Atome	1 \AA	1.47:1.183:1.0	1.154:1.027:1.0
nur C^α	1 \AA	1.44:1.08:1.0	-
mittlere Anisotropie = $1 - 2D_z/(D_x+D_y)$		0.355	0.14

Die Rechnungen wurden mit unterschiedlichen Kugelzentren und Kugelradien für die mittlere minimierte und die um die flexiblen Bereiche der Termini und Ω -Schleife (M0 - L18, R43 - Q49 und G178) gekürzte Struktur durchgeführt. Angegeben sind die Verhältnisse der berechneten Rotationstensor-Hauptachsen sowie die (gemittelten) Anisotropien.

Die hydrodynamischen Rechnungen wurden mit unterschiedlichen Parametern sowohl für die vollständige (mittlere minimierte) als auch für die beschriebene gekürzte Struktur

wiederholt; die Ergebnisse sind in Tabelle 2.5 zusammengefaßt. Sie weisen für die gekürzte Struktur nahezu perfekte Isotropie auf. Die vollständige Struktur zeigt geringe, nahezu zylindrische Anisotropie, deren Hauptachse senkrecht zur β -Faßachse durch die α -Helix verläuft. Berücksichtigt man, daß beide Strukturen den Rotationstensor nur in guter Näherung beschreiben, so kann man dennoch weitgehende Isotropie erkennen.

Zur Untersuchung der Aggregation von HNL wurde die ^{15}N -markierte Probe (~ 1.4 mM) nach Abschluß aller NMR-spektroskopischen Untersuchungen benutzt. Die Ultrazentrifugation (bei 20°C , 60.000 U/min) lieferte monodisperse Sedimentationskurven, die das Vorliegen verschiedener Oligomere und ihren raschen Austausch ausschließen. Der Sedimentationskoeffizient lag bei 2.4 S, aus dem sich unter Annahme eines kompakten isotropen Proteins ein ungefähres Molgewicht von ca. 20 kDa abschätzen läßt. Dies stimmt exzellent mit der berechneten Molmasse von monomerem HNL (ca. 21 kDa) überein. Auch die Gelfiltration unter nativen Bedingungen zeigte nur das Monomer an. Zusätzlich wurden NMR-Diffusionsexperimente (Anhang E) durchgeführt, die einen Diffusionskoeffizienten von $1.05 \pm 0.05 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ lieferten (bei 297.5 K mit $\eta(\text{H}_2\text{O}) = 0.9$ cP). Daraus berechnet sich nach Gl.1.113, wiederum unter der Annahme eines kompakten isotropen Moleküles, ein Proteindurchmesser von $46 - 48 \text{ \AA}$, der sehr gut mit der berechneten Struktur von HNL übereinstimmt. Zusammenfassend läßt sich also Aggregation und Austausch zwischen verschiedenen Oligomeren für HNL experimentell eindeutig ausschließen; es liegt auch nach ca. 15 Monaten nachweislich nur monomeres HNL vor. In gewisser Hinsicht ist dieser Befund angesichts des exponierten freien Cysteins (C87) von HNL und der bekannten dimeren Isoformen überraschend, da der Probe kein Reduktor (z.B. Dithiothreitol oder $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) zur Verhinderung einer kovalenten Dimerisierung über das Cystein zugesetzt wurde. Bei Betrachtung der Umgebung von C87, der vorgeschlagenen Kontaktseite für Protein-Protein-Wechselwirkungen, fällt jedoch ein ausgedehnter Bereich negativer Ladung (3_{10} -Helix) auf. Vermutlich verhindern die elektrostatischen Abstoßungskräfte die Dimerisierung von HNL.

2.5.3 Modellfreie Auswertung der Relaxationsdaten (nach Lipari-Szabo)

Die modellfreie Auswertung der Relaxationsdaten von HNL folgt dem in Kapitel 1.11 und später für PLA2 (Kapitel 3.3) beschriebenen Schema.

Die Auswertung beginnt mit einer Abschätzung für die molekulare Rotationskorrelationszeit τ_R aus den T_1/T_2 -Verhältnissen der Stickstoffatome des Proteinrückgrates. Die dafür nötige Voraussetzung einer weitgehend einheitlichen (isotropen) Molekülbewegung ohne

Lokalbewegungen wird für die kompakte β -Faßstruktur von HNL sicher sehr viel besser erfüllt als für PLA₂ (Kapitel 3) mit seinem hohen Anteil flexibler, strukturloser Bereiche.

Tabelle 2.6 faßt die aus der Analyse der T₁/T₂-Verhältnisse gewonnenen Aussagen zusammen. Es wurden 13 Aminosäuren mit ausgeprägter langsamer Lokalbewegung ($\Delta_{\text{Austausch}}$ -Beiträge) identifiziert, unter anderem in der Ω -Schleife (N39 bis Y52), im β -bulge von β 1 (V34) und beiderseits der intramolekularen Disulfidbrücke zwischen C76 und C175 (von C76 bis W79 in β 4 und von I172 bis D177 am C-Terminus). Die feldabhängigen Mittelwerte für T₁/T₂ lieferten molekulare Korrelationszeiten $\tau_{\text{R}}(\text{B}_0)$, die untereinander um 0.9 ns variierten, entsprechend einer Streuung von 7% um den Mittelwert von $\tau_{\text{R}} = 13.1$ ns. Obgleich die Korrelationszeiten $\tau_{\text{R}}(\text{B}_0)$ erst vorläufig sind und noch innerhalb ihrer Fehlergrenzen übereinstimmen, kann man bereits einen systematischen Fehler in den Messungen bei 500 MHz vermuten, der zu einer Erhöhung der Korrelationszeit führte.

Tab.2.6 Zusammenfassung wichtiger Abschätzungen zur Dynamikbewertung von HNL.

B₀	Mittelwert T₁/T₂ für ¹⁵N	τ_{R} [ns]	$\Delta_{\text{Austausch}}$-Beiträge identifiziert für die Reste
500 MHz	13.1 ± 2.2	13.6 ± 1.2	34, 39, 42, 51, 52, 76, 78, 136, 172, 175, 177
600 MHz	16.5 ± 3.7	12.7 ± 1.5	34, 41, 51, 52, 76, 136, 144, 172, 175
750 MHz	27.3 ± 6.4	13.0 ± 1.6	41, 42, 51, 52, 76, 79, 136, 144, 172, 175, 177

Die angegebenen ¹⁵N-T₁/T₂ Verhältnisse des Proteinrückgrates (Mittelung ohne die jeweils identifizierten Reste mit hohen $\Delta_{\text{Austausch}}$ -Beiträgen) ergeben Schätzwerte für die molekulare Korrelationszeit $\tau_{\text{R}}^{[50]}$ - vgl. Kapitel 1.11.1.

Nachdem die Voraussetzungen der modellfreien Analyse - weitgehend isotrope Molekülrotation und Oligomerenreinheit - in Kapitel 2.5.2 bestätigt wurden, kann mit dem Anfangswert von $\tau_{\text{R}} = 13.1$ ns für jeden ¹⁵N-¹H-Vektor des Proteinrückgrates eine Anpassung an die drei isotropen Modellfunktionen überprüft werden, jeweils auch unter Berücksichtigung konformativer Bewegungsbeiträge ($\Delta_{\text{Austausch}}$ -Beiträge). Jede der (2 × 3) Modellfunktionen wurde jeweils sowohl durch χ^2 -Test der Fehlerquadrate X^2_{min} als auch durch paarweisen F-Test der X^2_{min} -Werte untereinander bewertet. Die durchweg zu hohen X^2_{min} zeigten, daß die experimentellen Fehlerangaben der Relaxationsdaten (Standardabweichung der I(t)-Abklingkurven bzw. Signal-zu-Rausch-Verhältnis des ¹⁵N{¹H}NOE) zu gering waren. Daraufhin wurden die Minimalfehler für den NOE auf 0.05 und für die

Relaxationszeiten auf 2% gesetzt. Dennoch verblieben auch mit diesen realistischeren Fehlerannahmen hohe X_{\min}^2 , was auf systematische Fehler einzelner Relaxationsmessungen (vgl. 1.10.3) hindeutete. Deshalb wurden für jeden ^{15}N - ^1H -Vektor erneut alle 2×3 Modellfunktionen überprüft, wobei alternierend immer einer der bis zu 9 Relaxationswerte eliminiert wurde. Durch Vergleich der gemessenen mit den jeweils rückgerechneten Relaxationswerten stellte sich heraus, daß durchweg die ^{15}N - T_1 -Zeiten der Messung bei 500 MHz zu hoch lagen. Dieser systematische Fehler bestätigt die o.a. Beobachtung, daß der Schätzwert für $\tau_R(500 \text{ MHz})$ tendenziell zu hoch lag und folgte auch aus dem T_1 -Trend über die drei gemessenen Feldstärken. Deshalb wurden die ^{15}N - T_1 -Zeiten bei 500 MHz schrittweise um 1% reduziert und mit diesen reskalierten Werten jeweils erneut die Summe der Fehlerquadrate ΣX_{\min}^2 über die Aminosäuren 30 bis 140, die das kompakte β -barrel bilden, mit variabler molekularer Korrelationszeit τ_R minimiert. Dabei fiel ΣX_{\min}^2 von 1560 auf 1230 bei auf 93% reduzierten ^{15}N - T_1 -Zeiten und stieg dann wieder auf 1300 bei auf 90% reduzierten ^{15}N - T_1 -Zeiten. Gleichzeitig verringerte sich $\tau_R(500 \text{ MHz})$ stetig von 13.5 ns auf 13.2 ns. Die ^{15}N - T_1 -Zeiten bei 500 MHz waren offensichtlich systematisch um ca. 5-7% erhöht; es wurde daher nachfolgend mit auf 94% reskalierten Werten weitergerechnet. Der Ursprung dieses systematischen Fehlers bleibt unbekannt.

Bei der Untersuchung der einzelnen Relaxationsdaten fiel ebenfalls auf, daß auch der $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}\text{NOE}$ bei 600 MHz oft, jedoch nicht generell zu niedrig lag. Dieser uneinheitliche Fehler konnte folglich *nicht* durch globale Reskalierung kompensiert werden; der $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}\text{NOE}$ bei 600 MHz mußte stattdessen in entsprechenden Fällen aus der Auswertung ausgeschlossen werden. Die wahrscheinlichste Ursache dieses Fehlers wurde bereits in Kapitel 2.5.1 angesprochen: eine irrtümlich zu kurz gewählte Relaxationsdauer zwischen einzelnen Aufnahmen führte zu unterschiedlicher kumulativer Sättigung einzelner ^{15}N -Spins vor Aufbau des heteronuklearen NOE.

Nachdem der systematische Fehler der T_1 -Messung bei 500 MHz kompensiert und der $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}\text{NOE}$ bei 600 MHz fallweise eliminiert waren, wurde die Zuordnung der Modellfunktionen erneut überprüft. Die erzielbaren besten X_{\min}^2 lagen nun weitgehend innerhalb des Erwartungsbereiches der χ^2 -Verteilung ($X_{\min}^2 < \chi^2(0.95)$). Erneut wurden jeweils einzelne Relaxationswerte aus der Auswertung ausgeklammert, um nochmals nach verbliebenen abweichenden Meßwerten zu suchen. Diese wurden erst dann eliminiert, wenn die Abweichung auch direkt aus einem Trendvergleich für die betroffene Relaxationsrate folgte und die Eliminierung nicht ausschlaggebend für die Wahl der Modellfunktion war.

Nach dem zweiten Durchlauf der Zuordnung der Modellfunktionen und Ausschluß von

Fehlerten wurde wiederum mit τ_R als globaler Variabler über alle Aminosäuren minimiert. Die globale ΣX_{\min}^2 halbierte sich jetzt beinahe auf ca. 1250, τ_R blieb bei 13.2 ns stabil. Danach wurde letztmalig die Zuordnung der Modellfunktionen für die ^{15}N - ^1H -Vektoren mit überdurchschnittlich hohem $X_{\min}^2 > 10$ überprüft und gegebenenfalls korrigiert.

Nach der dritten Iteration der Zuordnung von Modellfunktionen und Minimierung der molekularen Korrelationszeit ergab sich bei insgesamt 154 erfaßten Aminosäuren die in Tabelle 2.7 aufgelistete Häufigkeit der Modellfunktionen.

Tab.2.7 Häufigkeit der zugeordneten $J(\omega)$ -Modellfunktionen für HNL zur Beschreibung der ^{15}N -H-Vektordynamik aus ^{15}N -Relaxationsdaten.

Modellfunktion	Häufigkeit	
	absolut	prozentual
1	78	50.7
1 + $\Delta_{\text{Austausch}}$	26	16.9
2	1	0.6
2 + $\Delta_{\text{Austausch}}$	1	0.6
3	42	27.3
3 + $\Delta_{\text{Austausch}}$	6	3.9

Die endgültige molekulare Korrelationszeit von $\tau_R = 13.28 \pm 0.05$ ns wurde nach Minimierung über die 118 erfaßten Aminosäuren des β -Fasses von HNL (G29 - R140) erhalten. Die Übereinstimmung der minimierten molekularen Korrelationszeit mit dem Schätzwert aus den T_1/T_2 -Verhältnissen sowie das Überwiegen der einfachsten Modellfunktion 1 sichern das Ergebnis der Dynamikauswertung von HNL ab. ΣX_{\min}^2 betrug dabei 629 und stieg bei Minimierung über alle 154 erfaßten Aminosäuren auf 1136. In beiden Fällen wurde der kritische χ^2 -Wert des 5%-Quantils knapp überschritten, was verdeutlicht, daß auch die angenommenen Minimalfehler von 2% für die Relaxationszeiten und 0.05 für den $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ NOE bei den Messungen an HNL noch etwas zu gering waren. Besonders für einige Aminosäuren im N-Terminus (bis N21) war die Auswertung der Relaxationsdaten problematisch und auch bei Annahme des kompliziertesten Bewegungsmodelles verblieben vereinzelt X_{\min}^2 größer 15. Derartig hohe Fehlerquadrate sind nach der χ^2 -Verteilung verboten, so daß die Modellfunktionen hier nur noch über den paarweisen F-Test bewertet werden konnten. Mögliche Ursachen dieser hohen X_{\min}^2 könnten übersehene Meßfehler sein. Andererseits spricht die sequentielle Häufung der Abweichungen eher für unbekannt strukturelle und dynamische Hintergründe.

2.5.4 Verteilung der Parameter lokaler Dynamik in HNL

Die modellfreien Parameter lokaler ^{15}N - ^1H -Vektordynamik von HNL sind in Anhang B.4 aufgelistet und in den Abbildungen 2.10 und 2.11 über der Aminosäuresequenz aufgetragen. Tabelle 2.8 listet die Mittel- und Extremwerte der Dynamikparameter auf.

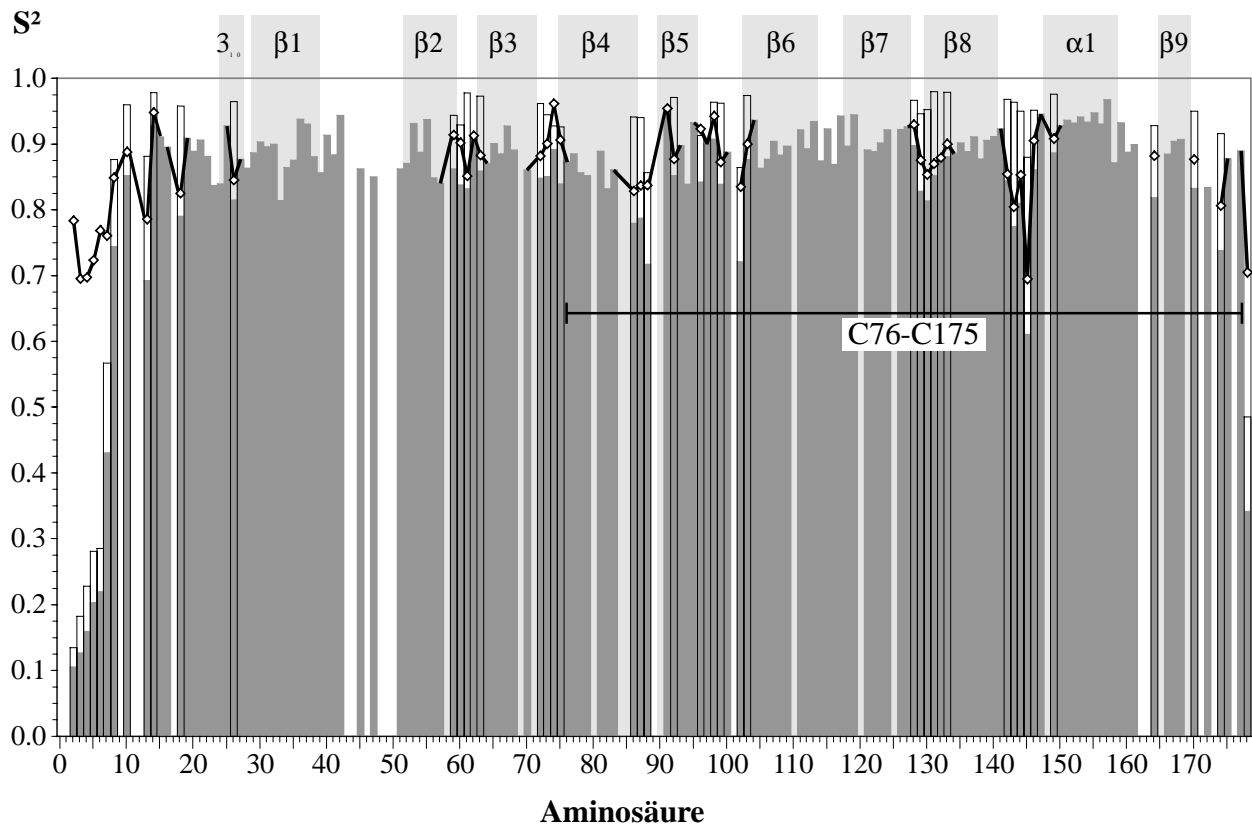


Abb.2.10 Verlauf des generalisierten Ordnungsparameters S^2 (■) für HNL. In flexiblen Bereichen (Modell 3) ist S^2 das Produkt aus S_s^2 (●) und S_f^2 (-◇-) zweier überlagerter lokaler Bewegungen. Der S_f^2 -Verlauf ist durch Linien mit den angrenzenden S^2 verbunden. Sekundärstrukturelemente sind grau unterlegt, das Cystin C76-C175 ist eingezeichnet.

Der generalisierte Ordnungsparameter (S^2 bzw. das Produkt aus S_f^2 und S_s^2 bei Vorliegen zweier Bewegungsmoden mit Korrelationszeiten kürzer als τ_R) variiert nur wenig über den größten Teil der Proteinsequenz (Abb.2.10). Der Mittelwert über alle Reste liegt bei $\langle S^2 \rangle = 0.85$ und erhöht sich bei Mittelung über die β -Stränge des β -Fasses (β_1 bis β_8) geringfügig auf 0.89. Eine deutliche Abnahme von S^2 beobachtet man nur am N-Terminus bis L7, unmittelbar am C-Terminus sowie in geringerem Umfang auch in den meisten Schleifenbereichen. Als Ursache wurde jeweils Beweglichkeit im Nanosekunden-Bereich aufgefunden. Die lokalen Korrelationszeiten reichen dabei von 260 ps bis 3.9 ns (Abb.2.11). Diese Nanosekunden-Bewegungen haben in der Regel sehr kleine Amplituden (S_s^2 meist > 0.9). Hohe Amplituden mit S_s^2 bis herab zu 0.13 treten hingegen am N-Terminus bis L7 und am C-terminalen G178 auf. Nur hier übersteigen die Amplituden

der Nanosekunden-Bewegungen auch die der überlagerten sehr schnellen Bewegungen im Pikosekundenbereich ($S_s^2 < S_f^2$), wobei S_f^2 nur bis auf 0.7 fällt. Bemerkenswert ist die kontinuierliche Zunahme von S_s^2 und τ_s am N-Terminus von D2 nach I8, wo die Amplitude quasi abgeklungen ist ($S_s^2 = 0.88$).

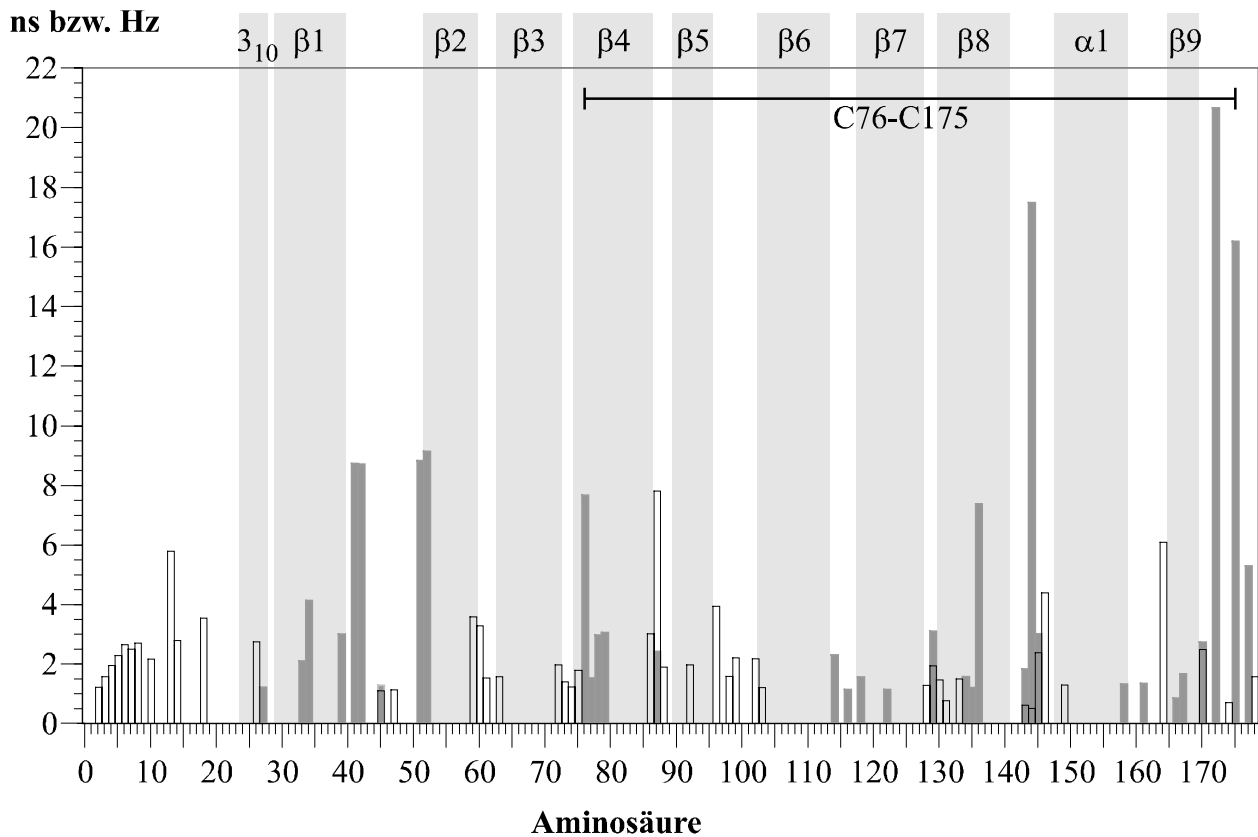


Abb.2.11 Verteilung der Nanosekunden-Korrelationszeiten τ_s (■) und der $\Delta_{\text{Austausch}}$ -Beiträge (●) in Hz, bezogen auf eine Feldstärke von 750 MHz). Sekundärstrukturelemente sind grau unterlegt, das Cystin C76-C175 ist eingezeichnet.

Sowohl der C-Terminus als auch die ausgedehnte Ω -Schleife erscheinen auf der Nanosekunden-Zeitskala sehr viel starrer, zeigen jedoch im Mikro- bis Millisekundenbereich ausgesprochene Flexibilität. In diesem Zeitbereich führen konformative Bewegungen zu hohen $\Delta_{\text{Austausch}}$ -Beiträgen (Abb.2.11) zur transversalen Relaxation und damit zu großen Linienbreiten bei niedrigen Signalintensitäten, die für viele Reste des C-Terminus und der Ω -Schleife auch beobachtet werden. Ähnliche langsame konformative Beweglichkeit findet man am β -bulge bei V33, in der ersten Hälfte von β_4 beginnend mit C76, in der Mitte von β_8 sowie für die Schleifen β_4 - β_5 , β_6 - β_7 , β_7 - β_8 , β_8 - α_1 und α_1 - β_9 . Die $\Delta_{\text{Austausch}}$ -Beiträge erreichen Maximalwerte (bis 20 Hz) in der β_8 - α_1 -Schleife und am C-Terminus um C175. In den Schleifen β_4 - β_5 , β_7 - β_8 und β_8 - α_1 sind diesen langsamen konformativen Bewegungen auch Bewegungen im Nanosekundenbereich überlagert.

Tab.2.8 Dispersion und Mittelwerte lokaler Dynamikparameter für die ^{15}N - ^1H -Vektoren des Proteinrückgrats von HNL.

Parameter lokaler Dynamik:	X^2_{\min}	S^2	S^2_f	S^2_s	τ_s [ns]	$\Delta_{\text{Austausch}}$ [Hz]
Mittelwert über Proteinsequenz	7.5	0.85	0.85	0.84	1.15	4.7
Mittelwert nur über β -Faß (ohne Schleifenbereiche)	6.8	0.89	0.88	0.96	0.9	3.6
Mittelwert über alle Sekundärstrukturelemente	6.5	0.89	0.88	0.96	1.0	3.0
Maximalwert über Proteinsequenz	45.4	0.97	0.96	0.98	3.9	20.7
Minimalwert über Proteinsequenz	0.3	0.11	0.69	0.13	0.26	0.9

Zusätzlich zur ^{15}N - ^1H -Vektordynamik des Proteinrückgrates wurden die Dynamikparameter für die $^{15}\text{N}^{\epsilon}$ -Spins der Seitenketten von 5 der 7 Arginine und beider Tryptophane bestimmt. Auch hier ist die modellfreie Analyse möglich, da die $^{15}\text{N}^{\epsilon}$ -Relaxation maßgeblich von dem einzigen gebundenen Proton bestimmt wird [24]. Es wird die molekulare Rotationskorrelationszeit zugrundegelegt, um die lokale Seitenkettendynamik zu bewerten. Die erhaltenen Parameter der modellfreien Analyse sind in Tabelle 2.9 aufgeführt. Von den 5 erfaßten Arginin-Seitenketten konnten 2 nicht zugeordnet werden; bei ihnen handelt es sich um R43, R72, R81, oder R130.

Tab.2.9 Modellfreie Dynamikparameter der ^{15}N - ^1H -Vektordynamik der Arginin- und Tryptophanseitenketten von HNL (es wurden keine $\Delta_{\text{Austausch}}$ -Beiträge gefunden).

Seitenkette	Struktur- element	Modell- funktion	X^2_{\min}	S^2	S^2_{fast}	S^2_{slow}	τ_{lokal} [ns]
R109-N$^{\epsilon}$	β_6	3	2.7	0.46	0.55	0.83	1.54
R140-N$^{\epsilon}$	β_8	1	9.7	0.94			
R154-N$^{\epsilon}$	α_1	3	6.6	0.13	0.46	0.29	0.44
R?-N$^{\epsilon}$		3	13.7	0.13	0.54	0.24	0.54
R?-N$^{\epsilon}$		3	6.4	0.21	0.62	0.34	0.81
W31-N$^{\epsilon}$	β_1	1	8.5	0.79			
W79-N$^{\epsilon}$	β_4	3	54.8	0.53	0.71	0.76	1.88

2.5.5 Vergleichende Bewertung der Relaxationsdaten von Seitenketten-Amidgruppen

In den Amidgruppen der Seitenketten von Asparagin und Glutamin wird die ^{15}N -Relaxation maßgeblich durch die Reorientierung beider nicht-paralleler ^{15}N - ^1H -Vektoren induziert, wodurch weitere Relaxationswege über dipolare Kreuzkorrelation auftreten (vgl. Mehrspineffekte, 1.5.4). In den entsprechenden monodeutierten NHD-Gruppen wird die ^{15}N -Relaxation maßgeblich wieder nur durch die dipolare Wechselwirkung mit dem einzigen Proton bestimmt. Der Beitrag der dipolaren Kopplung und dipolaren Kreuzkorrelation mit Deuterium ist aufgrund dessen im Vergleich zum Proton siebenfach niedrigeren gyromagnetischen Verhältnisses vernachlässigbar. Allerdings wird die ^{15}N -Relaxation in diesem Fall durch den skalaren Relaxationsmechanismus beschleunigt, da Deuterium aufgrund seines Quadrupolmomentes rasch relaxiert (vgl. 1.5.3). Dieses Problem kann durch kontinuierliche Deuteriumkopplung vermieden werden, worauf in den Messungen bei HNL aus Gründen besserer *LOCK*-Stabilität verzichtet wurde. Deswegen erfolgt hier für die Relaxationsdaten der Seitenketten-Amidgruppen von Asparagin und Glutamin keine quantitative Auswertung; die Bewertung lokaler Dynamik beschränkt sich auf einen qualitativen Vergleich der Relaxationsdaten untereinander.

Als Bezugsgrößen wurden die Mittelwerte der einzelnen Relaxationsraten für Asparagine und Glutamine getrennt gebildet (Anhang B.3). Wie zu erwarten, stimmten diese Mittelwerte überein, sodaß für Asparagine und Glutamine von gleichen Relaxationsprozessen ausgegangen werden kann. Positive $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}\text{NOE}$ und daneben auch kürzere T_2 -Zeiten wurden als Indikatoren für relative Starrheit im ps- bis ns-Bereich und damit für starke Einschränkung der freien Beweglichkeit bewertet. Negative $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}\text{NOE}$ und relativ längere T_2 -Zeiten wurden als freie Beweglichkeit interpretiert. Bei negativem $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}\text{NOE}$ und verkürzter T_2 -Zeit liegen vermutlich langsame konformative und schnelle Beweglichkeit nebeneinander vor. Die Dispersion der T_1 -Zeiten ist gering. Abb. 2.12 zeigt die Relaxationsraten (bei 750 MHz) für die Seitenketten-Amidgruppen der erfaßten Asparagine und Glutamine von HNL samt dynamischer Bewertung. Zum Vergleich sind auch die Relaxationsraten der Arginin- und Tryptophan-Seitenketten angegeben.

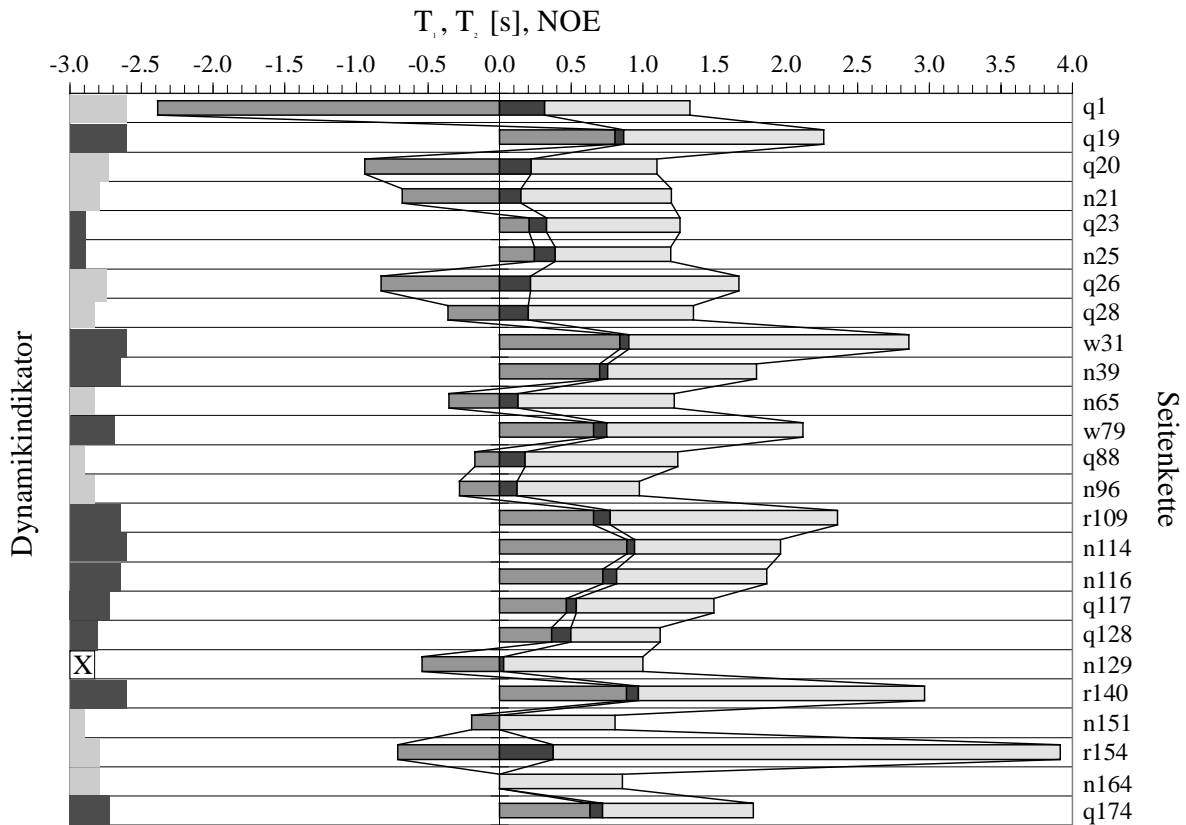


Abb.2.12 Relaxationsraten (bei 750 MHz) der ^{15}N -Spins in den Seitenketten von HNL: (■) $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ -NOE, (■) ^{15}N - T_2 und (■) ^{15}N - T_1 . Links sind die Relaxationsdaten in einem Dynamikindikator semi-quantitativ zusammengefaßt: ■ = freie Beweglichkeit, ■ = gehinderte Beweglichkeit, (X) = freie Beweglichkeit mit überlagerter langsamer Beweglichkeit ($\Delta_{\text{Austausch}}$ -Beiträge). Die Länge der Balken quantifiziert das Ausmaß der Beweglichkeit bzw. Dämpfung.

2.5.6 Die Dynamik des Proteinrückgrates von HNL

Die Dynamik des Proteinrückgrates von HNL wurde über ^{15}N -Relaxationsmessungen bei 297.5 ± 0.5 K und ca. 1 mM Proteinkonzentration erfaßt und nach dem *modellfreien Ansatz* ausgewertet. Damit ergibt sich ein quantitatives Bild der Proteindynamik, die durch Ordnungsparameter S^2 und lokale Korrelationszeiten τ_i ausgedrückt wird. Niedrige S^2 weisen auf erhöhte Amplituden für rasche lokale Bewegungen hin, die wesentlich schneller als die Molekülrotation sind (τ_{fast} im Pikosekundenbereich) oder im gleichen Zeitbereich (τ_{slow} im Nanosekundenbereich) verlaufen können. Langsamere konformative Bewegungen ($\tau_{\text{Austausch}}$ im Mikro- bis Millisekundenbereich) werden als $\Delta_{\text{Austausch}}$ -Beiträge zur transversalen Relaxation erfaßt; jedoch ist eine Quantifizierung ihrer Amplituden und Korrelationszeiten nicht direkt möglich.

Die für HNL berechnete molekulare Korrelationszeit von $\tau_{\text{R}} = 13.3$ ns entspricht nach Gl. 1.114. einem Moleküldurchmesser von 48 Å. Dieser Wert stimmt sehr gut mit der Struktur überein und beweist, daß HNL trotz eines freien Cysteins unter den Proben-

bedingungen monomer vorliegt und sich in seiner Molekülbewegung gut als kompakter, starrer isotroper Rotator beschreiben läßt. Die weitgehend einheitlich hohen Ordnungsparameter (vgl. Tab. 2.8, Anhang B.4) beweisen ebenfalls die Starrheit der HNL-Struktur.

Die sequentielle Auftragung der Parameter lokaler Dynamik (Ordnungsparameter S^2 in Abb.2.10. und lokale Korrelationszeiten sowie $\Delta_{\text{Austausch}}$ -Beiträge in Abb.2.11) zeigt für HNL lokale Trends und gute Korrelation mit der Struktur. Deutliche Abnahmen der Ordnungsparameter und konformative Bewegungen treten fast ausschließlich an den Termini, in den Schleifenbereichen, um die Disulfidbrücke des Cystins C76-C175 sowie an β -*bulges* auf. Die beobachteten Abnahmen der Ordnungsparameter sind fast immer auf Beweglichkeit im Nanosekunden-Bereich mit Korrelationszeiten von 0.3 bis 4 ns und in der Regel kleinen Amplituden zurückzuführen. Der Beitrag noch schnellerer Bewegungen ($\tau < 20$ ps) ist allgemein niedrig.

Der *N-Terminus* zeigt die für ungeordnete freie Enden charakteristische ps- und ns-Flexibilität. Die ns-Beweglichkeit nimmt dabei in Amplitude und Frequenz von D2 bis L7 kontinuierlich ab, während die kleinere ps-Amplitude annähernd konstant bleibt. Ab I8 sind ps- und ns-Amplitude quasi abgeklungen, in Übereinstimmung mit der durch NOE-Kontakte angedeuteten hydrophoben Anlagerung des N-Terminus seitlich ans β -Faß. Im weiteren Verlauf nehmen beide Amplituden um L13 und L18 wieder etwas zu. Für K15 und V16 sowie ab Q19 ist aber keine schnelle Beweglichkeit mehr feststellbar. Dies läßt sich auch strukturell begründen: Von S14 bis V16 liegt eine Vorzugskonformation in Form einer helikalen Windung vor; zwischen Q19 und F22 werden NOE-Kontakte zu β_6 beobachtet. Im Bereich der sich anschließenden 3_{10} -Helix ist die ps-Amplitude erhöht und vereinzelt tritt ns- und konformative Flexibilität auf.

In den Strängen des β -Faß sind die Ordnungsparameter durchgehend hoch und Anzeichen von lokaler Flexibilität fehlen bis auf drei Bereiche: Innerhalb des β_1 -Stranges beobachtet man konformative Flexibilität und erhöhte ps-Amplituden für V33 und V34, also genau an der Stelle des β -*bulge*. Auch in der Mitte des β_8 -Stranges, der mit β_1 gepaart ist, tritt konformative Flexibilität auf. Möglicherweise übertragen sich hier die Bewegungen des β -*bulge*. Zusätzlich treten zu Beginn des β_8 -Stranges Nanosekunden-Bewegungen mit sehr kleiner Amplitude auf, die die Beweglichkeit der β_7 - β_8 -Schleife fortsetzen. Die erste Hälfte des β_4 -Stranges zeigt ebenfalls zusammenhängend konformative Bewegungen. Diese gehen offensichtlich vom vorangehenden C76 aus, das eine Disulfidbrücke zu C175 bildet. Die Dynamik des Cystins wird weiter unten im Zusammenhang mit dem C-Terminus diskutiert.

Alle *Schleifenbereiche* von HNL zeigen deutliche Anzeichen zusammenhängender lokaler Flexibilität. Meist liegt schnelle ps- und ns-Beweglichkeit mit kleinen Amplituden vor und die ns-Korrelationszeiten folgen erkennbaren Trends. Nur in der kurzen $\beta 6$ - $\beta 7$ -Schleife wird ausschließlich konformative Beweglichkeit beobachtet. Konformative Flexibilität tritt auch in den Schleifen $\beta 4$ - $\beta 5$, $\beta 7$ - $\beta 8$, $\beta 8$ - $\alpha 1$ und $\alpha 1$ - $\beta 9$ zusätzlich zu schnellen Bewegungen auf.

Die ausgedehnte Ω -Schleife ($\beta 1$ - $\beta 2$) zeigt besonders hohe konformative Beweglichkeit. Dies könnte die starke Abnahme der NMR-Signalintensitäten in der Mitte der Ω -Schleife erklären, wo bei den Relaxationsmessungen nur noch zwei Reste (D45, D47) erfaßt werden konnten. Allerdings deuten diese Meßpunkte gerade darauf hin, daß zur Mitte der Ω -Schleife die konformativen $\Delta_{\text{Austausch}}$ -Beiträge wieder abgeklungen sind. Wie in 1.8 aber erwähnt, ist $\Delta_{\text{Austausch}}$ ein Resonanzphänomen und hängt nicht nur von der Austauschrate k_{ex} ab, sondern u.a. auch von der Dispersion der durchlaufenen chemischen Verschiebung. Es ist sehr wahrscheinlich, daß in der Mitte der Ω -Schleife die chemische Verschiebungsdifferenz zwischen den eingenommenen Konformationen verschwindet, und nicht die Austauschrate k_{ex} .

Die Dynamik von *Helix $\alpha 1$* ist der des β -Fasses vergleichbar - die Ordnungsparameter sind durchweg sehr hoch und Anzeichen lokaler Flexibilität fehlen weitgehend. Die lange Verbindungsschleife $\beta 8$ - $\alpha 1$ zum β -Faß zeigt hingegen sehr hohe ns- und konformative Flexibilität. Auch die Verbindung $\alpha 1$ - $\beta 9$ zeigt konformative und ns-Beweglichkeit. Die an sich starre Helix $\alpha 1$ ist also beiderseits sehr beweglich über dem β -Faß aufgehängt. Auf Helix $\alpha 1$ folgt der kurze $\beta 9$ -Strang mit Kontakt zum β -Faß. Die Anlagerung von $\beta 9$ an $\beta 1$ ist konformativ flexibel; möglicherweise variiert der Öffnungswinkel zwischen $\beta 1$ und $\beta 9$.

Der *C-Terminus* ist über das *Cystin C76-C175* mit dem β -Faß verbunden. Hierdurch wird die zu erwartende schnelle Beweglichkeit des Terminus (vgl. N-Terminus) stark gedämpft und man beobachtet stattdessen ausgeprägte langsame konformative Flexibilität beiderseits der Disulfidbrücke, die sich über C76 weiter auf den $\beta 4$ -Strang überträgt. Nur das C-terminale G178 zeigt schnelle Flexibilität mit hohen ps- und ns-Amplituden. Es ist unklar, ob die inhärente schnelle Flexibilität des Terminus durch das Cystin verlangsamt wird oder ob diese ganz unterbunden und stattdessen die langsame Beweglichkeit durch Rotation um die Disulfidbrücke verursacht wird [94].

Abbildung 2.13 zeigt die Stereoansicht des endgültigen Struktursatzes von HNL, eingefärbt nach der experimentell bestimmten lokalen Beweglichkeit. Diese Darstellung

verdeutlicht nochmals die beschriebenen Zusammenhänge von Struktur und Dynamik: Bereiche mit definierter Sekundärstruktur sind weitgehend starr, Schleifenbereiche hingegen flexibel. Gleichzeitig wird ersichtlich, daß sich strukturelle Unschärfe meist gut mit erhöhter lokaler Beweglichkeit erklären läßt und damit physikalisch begründet ist: Die zur besseren Übersichtlichkeit nicht dargestellten Bereiche mit höchster struktureller Abweichung - der N-Terminus (M0 bis V16), die Ω -Schleife (A40 bis M51) und der C-Terminus (I176 bis G178) - sind gleichzeitig auch die Bereiche mit der ausgeprägtesten lokalen Beweglichkeit; die Position der Helix $\alpha 1$ ist nur deshalb schlecht definiert, da sie beiderseits sehr flexibel aufgehängt ist; die $\beta 3$ - $\beta 4$ -Schleife zeigt eine hohe strukturelle Streuung, möglicherweise da hier unmittelbar die intramolekulare Disulfidbrücke (C76-C175) zum flexiblen C-Terminus folgt.

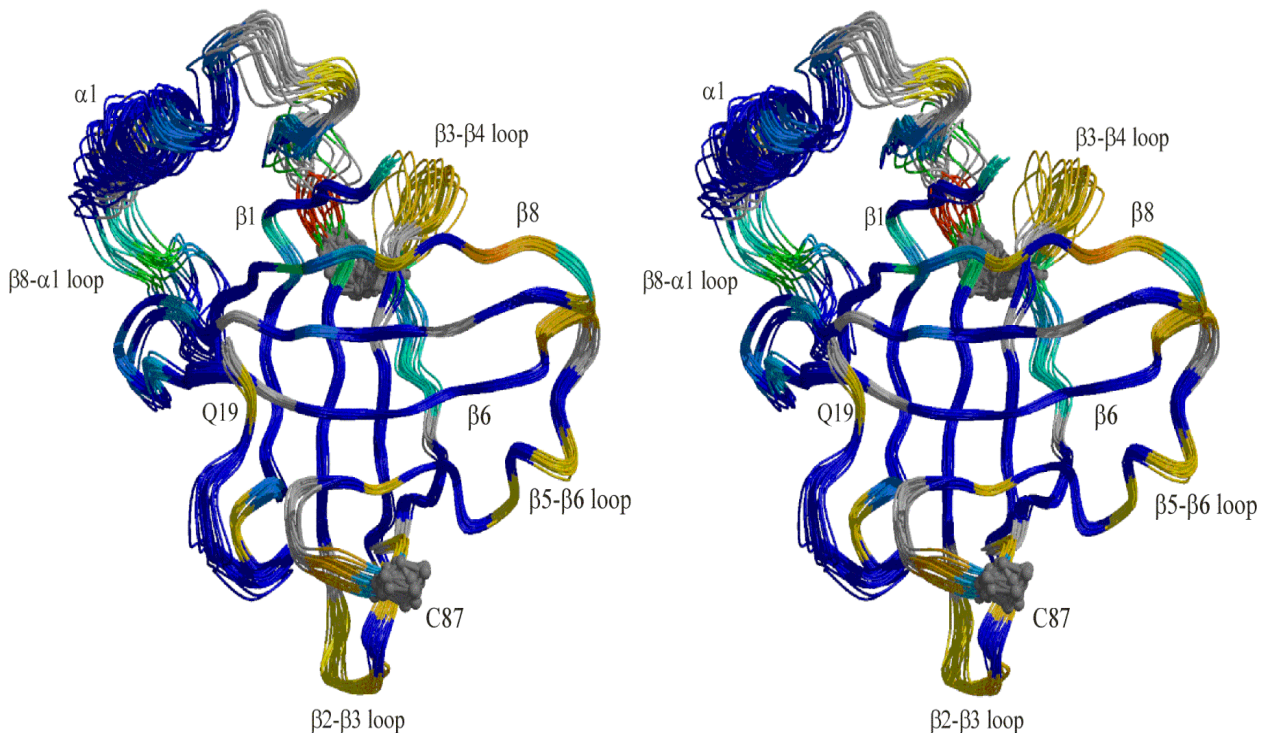


Abb.2.13 Konvergenz und Dynamik der HNL-Struktur. Die Stereoansicht des endgültigen Struktursatzes (20 Strukturen, superpositioniert über das Proteinrückgrat des β -Fasses) ist nach lokaler Dynamik eingefärbt. Hellblau bis grün entspricht langsamer konformativer Beweglichkeit mit zunehmenden $\Delta_{\text{Austausch}}$ -Beiträgen. Die Einfärbung für schnelle Beweglichkeit im Nanosekundenbereich erfolgte gemäß dem Quotient $(1-S^2)/\tau_s$, um gleichzeitig Amplitude und Frequenz dieser Bewegungen zu erfassen (von gelb nach rot entsprechend zunehmender Amplitude und Frequenz). Reste ohne dynamische Auffälligkeit sind dunkelblau, nicht erfaßte Reste weiß und die Seitenketten der Cysteine grau dargestellt. Die strukturell stark streuenden, hochflexiblen Bereiche des N-Terminus (M0 bis V16), der Ω -Schleife (A40 bis M51) und des C-Terminus (I176 bis G178) fehlen der Übersichtlichkeit halber.

2.5.7 Die Seitenkettendynamik von HNL

Auch für die Dynamik der ^{15}N - ^1H -Vektoren der Seitenketten von Arginin, Tryptophan, Asparagin und Glutamin zeigt sich ein deutlicher Zusammenhang zur lokalen Struktur. Für die Arginine und Tryptophane konnte dabei eine quantitative Analyse mit dem modellfreien Ansatz durchgeführt werden (Dynamikparameter in Tabelle 2.9).

Von den 5 erfaßten Argininen zeigt nur die Seitenkette von *R140* keine ns-Beweglichkeit. Sie erscheint auf allen Zeitskalen vollkommen starr ($S^2 = 0.94$). Auch die Seitenkette von *W31* zeigt nur geringe ps-Beweglichkeit ($S^2 = 0.8$). *R140* bildet mit *W31* und *T113* einen kompakt gestapelten Seitenkettenhaufen, der das β -Faß einseitig verschließt (vgl. Kapitel 2.4.3. und Abb.2.8.a). Die dichte Packung verhindert effektiv die freie Beweglichkeit der Seitenketten von *R140* und *W31* und unterbindet deren Protonenaustausch mit Wasser.

Nach *R140* zeigt *R109* im β_6 -Strang die geringste Seitenkettenflexibilität, obgleich bereits ns-Bewegungen mit kleinen Amplituden erkennbar sind. Die Amplitude von ps-Bewegungen ist deutlich größer, Protonenaustausch mit Wasser wird aber nicht beobachtet. *R109* scheint in einer Tasche zwischen den Strängen β_5 und β_6 und dem N-Terminus seine freie Beweglichkeit und Solvenz Zugänglichkeit weitgehend zu verlieren.

Für die Seitenketten von *R154* und zwei weiteren, nicht zugeordneten Argininen (*R43*, *R72*, *R81*, oder *R130*) werden ps- und ns-Bewegungen mit hohen Amplituden ($S_f^2 \approx 0.5$, $S_s^2 \approx 0.3$) gefunden. Die ns-Bewegungen entsprechen in Amplitude und Frequenz weitgehend dem N-Terminus. Diese Seitenketten sind offensichtlich frei beweglich. Ihre hohen Protonenaustauschraten mit Wasser deuten zudem freie Solvenz Zugänglichkeit an.

Die Seitenkette von *W79* scheint ebenfalls frei beweglich; dies legt auch die lokale Struktur nahe. Die Amplituden der aufgefundenen ps- und ns-Bewegungen ($S_f^2 = 0.7$, $S_s^2 = 0.75$) sind jedoch viel geringer als für die frei beweglichen Argininseitenketten. Dies scheint plausibel, da die Seitenkette von Arginin länger und weniger sperrig als die von Tryptophan ist.

Die Relaxationsdaten der *Seitenketten-Amidgruppen* der erfaßten *Asparagine* und *Glutamine* sind in Abb.2.12 zusammengefaßt (Daten in Anhang B.3) und, wie in Kapitel 2.5.5. beschrieben, durch Vergleich qualitativ bewertet. Die meisten Seitenketten zeigen mehr oder minder freie schnelle Beweglichkeit. Die Seitenketten-Amidgruppe von *N129* in der β_7 - β_8 -Schleife unterliegt neben hoher schneller auch konformativer Beweglichkeit, die man hier ebenso für die Rückgrat-Amidgruppe findet. Deutlich eingeschränkt in ihrer Beweglichkeit in allen beobachtbaren Zeitbereichen sind hingegen die Seitenketten

von *Q19*, *N39*, *N114*, *N116*, *Q117* und *Q174*; dies läßt sich in jedem Fall auch strukturell begründen.

Die Seitenketten-Amidgruppe von *Q19* im N-Terminus bildet eine Wasserstoffbrücke zu T113 am Ende des $\beta 6$ -Stranges aus (Abb.2.14.a). Dies wird auch durch NOE-Kontakte zwischen den beiden Resten bestätigt.

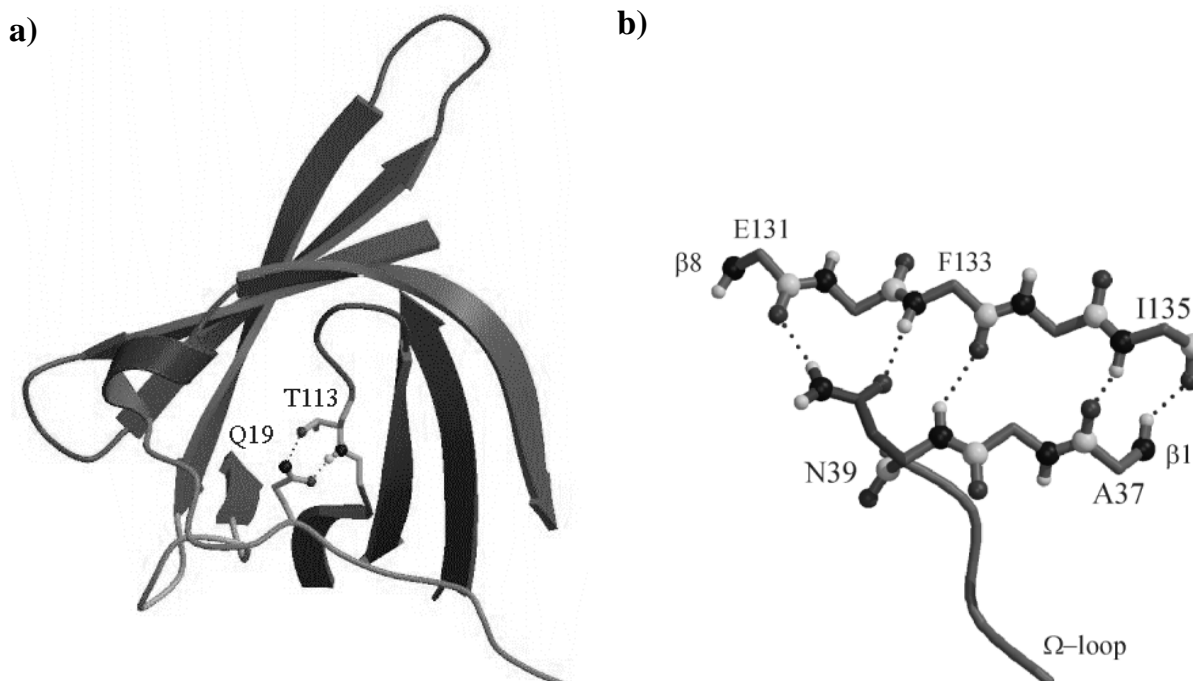


Abb.2.14 Details der HNL-Struktur, die gehinderte Seitenketten-Mobilität erklären. **a)** Der weitgehend strukturlose N-Terminus hat wiederholt Kontakt zum β -Faß um A10 (mit dem $\beta 8$ -Strang) und Q19 (mit dem $\beta 1$ -Strang) Die Seitenketten-Amidgruppe von Q19 bildet eine doppelte Wasserstoffbrücke zu T113 aus, was ihre reduzierte Beweglichkeit erklärt. **b)** Die Seitenketten-Amidgruppe von N39 sättigt den ungepaarten Akzeptor E131 und Donor F133, beide im $\beta 8$ -Strang, durch Wasserstoffbrücken ab (*N-capping*).

Die Seitenketten-Amidgruppe von *N39* am Ende des $\beta 1$ -Stranges ist in Wasserstoffbrücken zu E131 und F133 im $\beta 8$ -Strang eingebunden. Das Strukturmotiv wurde in Kapitel 2.4.3. diskutiert und ist in Abb.2.14.b nochmals abgebildet.

Die Reste *N114*, *N116* und *Q117* liegen alle in der kurzen $\beta 6$ - $\beta 7$ -Schleife, die von allen Schlaufen des β -Fasses als einzige keine schnelle, sondern nur konformative Beweglichkeit aufweist. Die Seitenketten-Amidgruppen von N114, N116 und Q117 bilden möglicherweise untereinander ein Netz von Wasserstoffbrücken aus, das die Schleifenregion strukturell stabilisiert.

Von Q174 bis D177 liegt am C-Terminus eine Vorzugskonformation in Form einer helikalen Windung vor. Die Struktur und auch Dynamik legt eine Wasserstoffbrücke zwischen den Seitenketten von Q174 und D177 in (i+3)-Stellung nahe.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß sowohl bei quantitativer als auch bei qualitativer Auswertung der Relaxationsdaten für die ^{15}N - ^1H -Vektorbeweglichkeit in den Seitenketten von HNL eine klare Korrelation mit der lokalen Struktur erkennbar wird. Eingeschränkte Seitenkettenbeweglichkeit deutet oft auf Wasserstoffbrücken (Asparagine, Glutamine) bzw. Salzbrücken (Arginine) hin und liefert damit wertvolle strukturelle Hinweise.

3. Dynamik von hnps-PLA2

3.1 Biochemischer Hintergrund ^[164]

3.1.1 Die Familie der Phospholipasen

Phospholipasen hydrolysieren Membranphospholipide und nehmen damit eine Schlüsselposition im Metabolismus von Zellmembranen ein. Der Abbau der Phospholipide geschieht dabei schrittweise und erfordert die Beteiligung unterschiedlicher Phospholipasen, die das Substrat jeweils nur an spezifischen Spaltstellen hydrolysieren (Abb.3.1, Tab.3.1). Nach diesen Spaltstellen am Phospholipid erfolgt die primäre Klasseneinteilung der Phospholipasen in PLA1, PLA2, PLB, PLC, PLD und Lysophospholipasen (LPL).

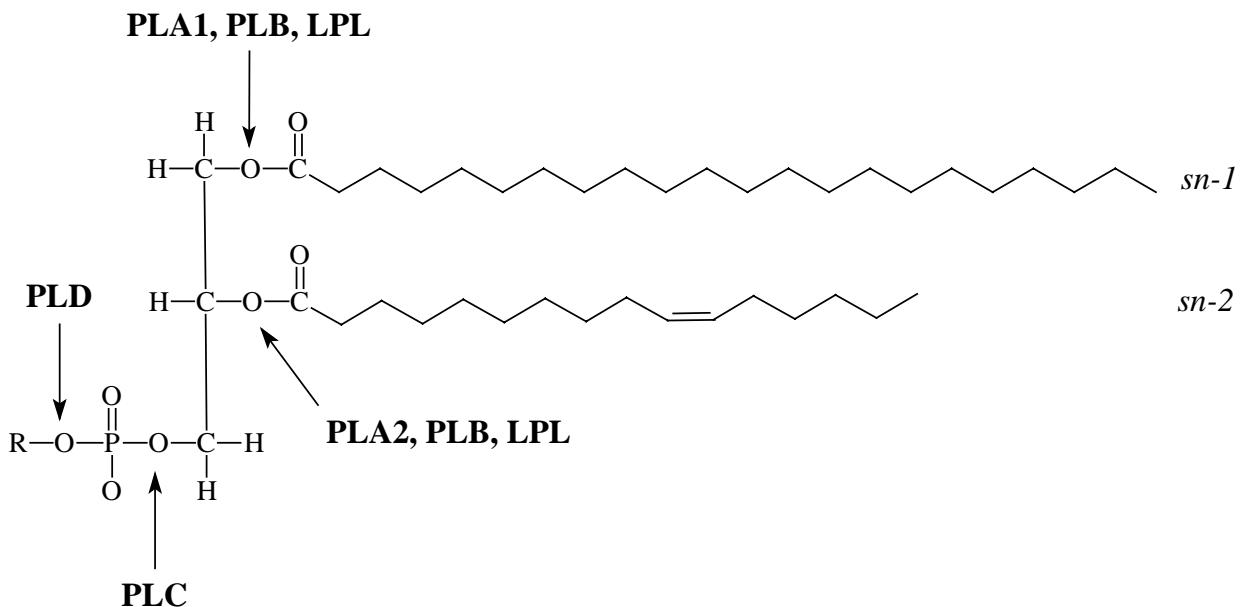


Abb.3.1 Spaltstellen der verschiedenen Phospholipasen am Phospholipid

Phospholipasen nehmen biochemisch neben der zentralen Rolle im Membranstoffwechsel auch weitere Funktionen wahr (Tab.3.1). Zu ihnen gehören die Beteiligung an Signalübertragungskaskaden (PLC), an der Regulation von K^+ -Ionenkanälen ^[165] (PLA2) und an der Vermittlung entzündlicher Prozesse (PLA2). Besonders aufgrund letzterer Funktion sind die PLA2 von hohem pharmakologischen Interesse, da man sich durch eine Hemmung dieser Enzyme Fortschritte bei der Behandlung und Diagnose schwerer chronischer Entzündungserkrankungen innerer Organe, rheumatischer Arthritis und allergischer Überreaktionen erhofft ^[166].

Tab.3.1 Zusammenfassung der von Phospholipasen katalysierten Reaktionen und ihre biochemischen Funktionen (außer Membranmetabolismus).

Klasse	katalysierte Reaktion	biochemische Funktion
PLA1	Phospholipid zu 2-Lysophospholipid + (sn-1)Fettsäure	
PLA2	Phospholipid zu 1-Lysophospholipid + (sn-2)Fettsäure [=> Arachidonsäure]	<ul style="list-style-type: none"> • Freisetzung von Botenstoffen (Arachidonsäure und PAF-Vorläufer) zur Vermittlung entzündlicher Prozesse • cytosolische PLA2 auch als LPL
PLB	Phospholipid / Lysophospholipid zu Glycerolphosphatid + Fettsäuren	
PLC	Phospholipid zu Diacylglycerol + Phosphomonoester [=> IP ₃]	<ul style="list-style-type: none"> • Kopplung an Signaltransduktionskaskade direkt und indirekt (über Freisetzung von Botenstoffen wie IP₃)
PLD	Phospholipid zu Phosphatidsäure + Alkohol	<ul style="list-style-type: none"> • auch als Transphosphatidylase (Austausch des Kopfgruppen-Alkohols)
LPL	Lysophospholipid zu Glycerolphosphatid + Fettsäuren	

3.1.2 Funktion und Eigenschaften der Phospholipasen A₂ (PLA2)

Am besten untersucht ist die Klasse der PLA2, die die hydrolytische Abspaltung der *sn-2* Fettsäure katalysieren. Das verbleibende Lysophospholipid wirkt membranlösend und damit cytotoxisch. Zum Schutz der betroffenen Zelle kann das Lysophospholipid durch Lysophospholipasen durch hydrolytische Abspaltung auch der *sn-1* Fettsäure weiter zersetzt oder aber durch Acyltransferasen durch neuerliche Fettsäureveresterung in *sn-2* wieder zu Phospholipid regeneriert werden.

Bei der an *sn-2* Position abgespaltenen Fettsäure handelt es sich bei Säugetieren meist um *Arachidonsäure* (C₂₀). Diese kann durch Cyclooxygenase zu Prostaglandinen und durch Lipxygenase zu Leukotrienen metabolisiert werden. Sowohl Prostaglandine als auch Leukotriene sind u.a. Vermittler von Entzündungsreaktionen. Leukotriene, aber auch Arachidonsäure selbst [167], können darüberhinaus K⁺-Ionenkanäle regulieren.

Phospholipid kann an Position *sn-1* statt mit Fettsäure verestert auch mit Fettalkohol verethert vorkommen. Nach Hydrolyse durch PLA2 verbleibt in diesem Fall ein fettalkoholhaltiges Lysophospholipid, das Vorläufer des *Platelet-activating Factor* (PAF) ist. Dieser Botenstoff ist u.a. an vielfältigen Krankheitsprozessen beteiligt.

PLA2 kommen in verschiedenen Organismen und Isoformen vor und werden primär in die Unterklasse der *sekretorischen* (sPLA2) und *cytosolischen* PLA2 (cPLA2) unterteilt.

Die **sPLA2** sind kleine (ca. 125 Aminosäuren, 14-18 kDa), wasserlösliche Proteine, die in einzelnen Organen und der Synovialflüssigkeit von Säugetieren sowie als Hauptallergene im Schlangen- und Bienengift vorkommen. Sie benötigen als Kofaktor Kalzium in relativ hohen Konzentrationen (~1 mM). Eine außergewöhnlich große Anzahl Cystine (5 bis 7) verleiht ihnen hohe Stabilität gegenüber denaturierenden Bedingungen. Bemerkenswert ist ihre Selektivität gegenüber dem Aggregatzustand des Substrates: während monomer gelöste Phospholipide nur langsam hydrolysiert werden, ist die katalytische Aktivität gegenüber aggregiertem Substrat (Micellen, Vesikel) um $>10^3$ erhöht [168]. Diese Aktivitätssteigerung der Enzyme an Grenzflächen wird als *interfacial activation* bezeichnet und beruht vermutlich auf allosterischer Aktivierung an der interfacialen Erkennungsseite der sPLA2. Sie erleichtert den Übertritt der hydrophoben Phospholipide aus der Membran in den lipophilen Kanal des Enzymes, der Kern der sPLA2-Struktur ist und das katalytische Zentrum enthält. Die sPLA2 lassen sich nach strukturellen und sequentiellen Unterschieden in die **Gruppen I - III der PLA2** unterteilen [169-171]. Zwischen den sPLA2 der Gruppen I (u.a. aus Säugerpankreas, Kobragift) und II (weitere Schlangengifte, menschliche Synovialflüssigkeit) besteht sehr hohe Sequenz- und Strukturhomologie. Die Homologie zu den sPLA2 der Gruppe III (z.B. Bienengift-PLA2) ist hingegen deutlich geringer und weist auf ihre eigenständige Evolution hin. Die Gruppen lassen sich auch durch Substratspezifität (insbesondere bezüglich der polaren *sn-3* Kopfgruppe) und Selektivität gegenüber dem Aggregatzustand des Substrates unterscheiden.

Die **cPLA2** sind mit ca. 700 Aminosäuren (70-100 kDa) deutlich größer als die sPLA2, zu denen sie keine erkennbare Sequenzhomologie aufweisen. Sie kommen in Organen von Säugern vor (z.B. Herz, Niere). Die cPLA2 besitzen keine Cystine und benötigen auch kein Kalzium als Kofaktor für ihre hydrolytische Aktivität. Allerdings wirkt ein Kalziumgradient chemotaktisch; die Kalziumbindungsstelle hierfür liegt im C-terminalen Bereich der cPLA2, der Sequenzhomologie zu den PLC aufweist. Im Gegensatz zu den sPLA2 zeigen die cPLA2 Selektivität bezüglich der *sn-2* Fettsäure (bevorzugt Arachidonsäure) und besitzen auch Lysophospholipaseaktivität. Die cPLA2 bilden die **Gruppe IV der PLA2-Enzymklasse**.

Die biochemische Funktion von PLA2 liegt im Membranmetabolismus und in der Produktion von Botenstoffen, die an der Signaltransduktionskaskade, der Regulation von Ionenkanälen, aber vor allem an Entzündungsprozessen beteiligt sind (insbesondere Arachidonsäure und pro-PAF). Unkontrollierte PLA2-Sekretion kann daher zu chronisch entzündlichen Prozessen führen. Hierin liegt die pharmakologische Bedeutung der sPLA2.

3.2 Struktur und funktionale Struktur motive von hnpS-PLA2

3.2.1 Struktur von hnpS-PLA2

Innerhalb der sekretorischen PLA2 der Gruppen I und II, zu der die humane nicht-pankreatische sekretierte PLA2 (hnpS-PLA2) gehört, besteht sehr hohe sequentielle und strukturelle Homologie. Diese Enzyme weisen nur über etwa die Hälfte ihrer Aminosäuresequenz wohldefinierte sekundäre Strukturelemente in Form von 4 Helizes und 2 kurzen β -Strängen auf. Das Faltungsmuster für hnpS-PLA2 ist in Abb.3.2 dargestellt.

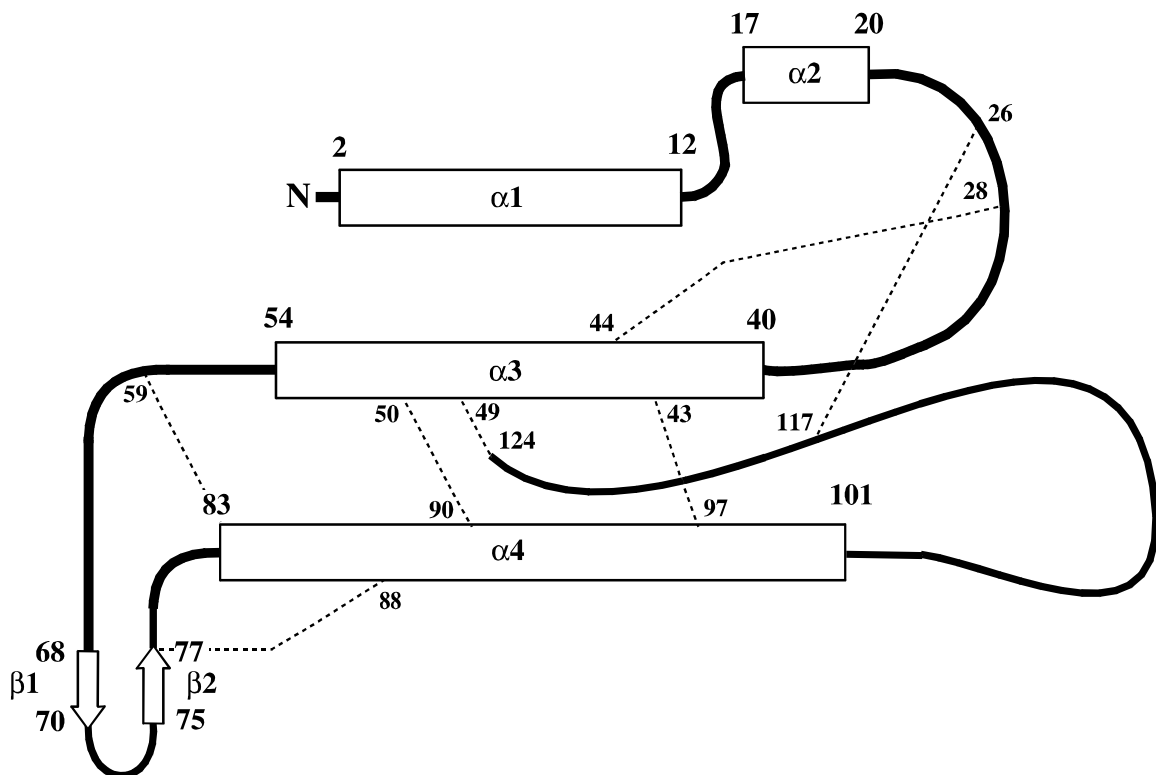


Abb.3.2 Schematische Darstellung der Sekundärstrukturelemente und Lage der Cystinbrücken von hnpS-PLA2. Die Sequenznummern der Cysteine sowie der ersten und letzten Aminosäuren in Sekundärstrukturelementen sind angegeben.

Kristallstrukturen und NMR-Strukturen in Lösung sind von einer Vielzahl sPLA2 der Gruppen I und II bekannt, sowohl in freier Form als auch im Komplex mit Inhibitoren und an Micellen. Durch Arbeiten in unserem Arbeitskreis [172] konnte mit hnpS-PLA2 erstmals eine hochaufgelöste NMR-Struktur einer sPLA2 der Gruppe II erhalten werden (Abb.3.3). Zuvor war bereits die Kristallstruktur der hnpS-PLA2 in freier Form wie auch im Komplex mit einem Inhibitor aufgeklärt worden [173, 174]. Die Unterschiede in den Kristallstrukturen der freien und inhibierten hnpS-PLA2 und der NMR-Struktur der freien hnpS-PLA2 sind nur minimal.

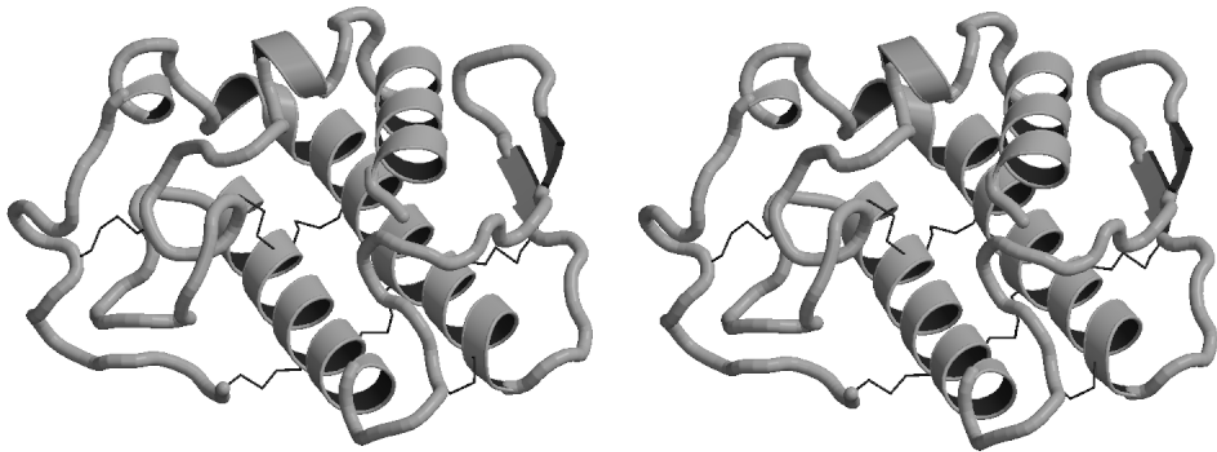


Abb.3.3 Stereodarstellung der minimierten gemittelten Struktur von hnps-PLA2 in wässriger Lösung, mit Blick in den lipophilen Kanal. C-Terminus und kalziumbindende Schleife liegen links, der surface loop rechts von der Öffnung des Kanals.

Die 4 Helizes der sPLA2 bilden den *lipophilen Kanal*, das kompakte und katalytisch aktive Zentrum der Enzyme. Die zwei längeren zentralen Helices α_3 und α_4 verlaufen antiparallel und werden durch zwei Cystine in ihrer Lage fixiert; sie bilden den Boden des lipophilen Kanals. Die kürzere N-terminale Helix α_1 verläuft schräg über Helix α_4 und überdeckt den so gebildeten Kanal. Dieser wird einseitig durch die kurze Helix α_2 verschlossen. Zwischen Helices α_2 und α_3 verläuft ein langer, unstrukturierter Schleifenbereich, der über ein Cystin mit der Helix α_3 verbunden ist. Hier befindet sich die primäre Kalzium-Bindungsstelle der PLA2. Der zentrale Teil dieser Schleife ragt wie eine Pforte in die Öffnung des lipophilen Kanals. Die zweite Pforte bildet der α_3 -nahe Teil der ausgedehnten Schleifenregion zwischen den Helices α_3 und α_4 . Innerhalb dieser als *surface loop* bezeichneten Region wird die eigentliche Schleife durch ein kurzes antiparalleles β -Faltblatt stabilisiert. Der *surface loop* ist über zwei Cystine mit Helix α_4 lose verbunden. Der auf Helix α_4 folgende C-Terminus ist ebenfalls weitgehend unstrukturiert und über ein Cystin mit der kalziumbindenden Schleife verbunden.

Im Unterschied zu den PLA2 der Gruppe I ist in Gruppe II der *surface loop* um 3 Aminosäuren kürzer, der C-Terminus aber um 7 Aminosäuren länger. Weiterhin fehlt in Gruppe II ein Cystin, welches in Gruppe I die N-terminale Helix α_1 mit dem β -Faltblatt des *surface loop* verknüpft. Stattdessen verbindet ein C-terminales Cystin den C-Terminus mit Helix α_3 . Der Sequenzvergleich zwischen hnps-PLA2 und verwandten PLA2 der Gruppen I und II ist in Abb.3.4 aufgetragen.

PA2M_HUMAN	NLVNFHRMI KLTT-GKEAAL SYGFYGC■CG VGGRGSPKDA TDRCCVTHDC CYKRLEK-RGC
PA21_AGKPI	NLFQFEKLI KKMT-GKSGML WYSAYGCYCG WGGQGRPKDA TDRCCFVHDC CYGKVT---GC
PA21_BOVIN	ALWQFN■GMI KCKIPSSPELL DFNNYGCYCG LGGSGTPVDD LDRCCQTHDN CYQAKKLDSC
PA22_PIG	ALWQFRSMI KCTIPGSDPLL DFNNYGCYCG LGGSGTPVDE LDRCCETHDN CYRDAKNLSDC
PA2_NAJNA	NLYQFKNMI KCTVPSRSWWD FAD-YGCYCG RGGSGTPVDD LDRCCQVHDN CYNEAEKISGC
	1 10 20 30 40 50
GTKFL-----SYKFS NSGSRITC-AK QDSCRSQICE CDKAAATCFA RNKTTYNKKY QYYS■SNKH-CRG STPRC	
NPKMD-----IYTYS VDNGNIVC-GG TNPCKKQICE CDRAAAICFR DNLKTYDSKT YWKYPKKNCKE ESEPC	
--KVLVDNPTYTNNYSYS CSNNEITCSSE NNACEAFICN CDRNAAICFS KVP-YNKEH-■KNLD■K■K■-C	
--KFLVDNPTYTNSYSYS CSNTEITCNSK NNACEAFICN CDRNAAICFS KAP-YNKEH- KNLDTKKYC	
WPYFK-----TYSYE CSQGTTLTCKGD NNACAASVCD CDRLAAICFA GAP-YNDNN- YNIDLKARCQ	
60 70 80 90 100 110 120	

Abb.3.4 Sequenzvergleich ausgewählter sPLA2: hnpS-PLA2 (humane Synovialflüssigkeit, PA2M_HUMAN, Acc.Nr. P14555) und app-PLA2 (Gift von Agkistrodon piscivorus, PA21_AGKPI, Acc.Nr. P51972) gehören zur Gruppe II der PLA2; bp-PLA2 (Rinderpankreas, PA21_BOVIN, Acc.Nr. P00593), pp-PLA2 (Schweinepankreas, PA22_PIG, Acc.Nr. P04416) und mn-PLA₂ (Kobragift, PA2_NAJNA, Acc.Nr. P15445) gehören zur Gruppe I der PLA2. Angegebene Zugriffsnamen und -nummern beziehen sich auf die Swiss Protein Data Bank. (■) Bindungsstelle des katalytischen Ca²⁺; (■) Bindungsstelle des sekundären Ca²⁺; (fett) aktive Diade; (■) interfaciale Erkennungsseite (für PLA2 aus Rinderpankreas) [175].

3.2.2 Korrelation von Struktur und Funktion der sPLA2 (Gruppen I und II)

In den sPLA2 übernehmen funktionell und strukturell korrelierende Bereiche Aufgaben bei der Substratbindung, der Esterhydrolyse, der Stabilisierung des Übergangszustandes, der interfacialen Aktivierung sowie der Strukturstabilisierung.

Kern der PLA2-Struktur ist der **lipophile Kanal**, der der Aufnahme und Umsetzung des hydrophoben Liganden dient. Er erlaubt dem Substrat die Diffusion aus der Phospholipid-Membran ins aktive Zentrum des Enzymes [176] und stabilisiert den Übergangszustand der Hydrolyse [177]. Am Aufbau des Kanales sind lipophile Seitenketten insbesondere auch von aromatischen Aminosäuren beteiligt. Diese bilden ein intramolekulares Aromatengerüst, das aber weitgehend nur geringen Einfluß auf Struktur und Stabilität hat [178, 179].

Der lipophile Kanal wird von einem ausgedehnten **Wasserstoff-Brückennetz** [177, 180] unter Einbeziehung einiger Strukturwassermoleküle, des N-Terminus [181], der primären Kalzium-Bindungsstelle [175, 176], der interfacialen Erkennungsseite [175, 176, 182] sowie der katalytischen Diade [175, 176, 183] durchzogen. Dieses Netzwerk assistiert bei vielfältigen Aufgaben wie der konformativen Stabilisierung [183, 184], der Kommunikation zwischen interfacialer Erkennungsseite und aktivem Zentrum, sowie dem Elektronen- und Protonenausgleich während der Hydrolyse (Abb.3.5). Das Netzwerke hat strukturell [185] und katalytisch [178, 184] aber nur geringe Bedeutung.

Das **aktive Zentrum** der PLA2 liegt innerhalb des lipophilen Kanals. Die katalytisch aktive Diade, die auch strukturell bedeutsam ist ^[183], besteht aus einem essentiellen Histidin in Helix α_3 und einem benachbarten Aspartat in Helix α_4 . Das Histidin-N δ_1 wirkt als Protonenakzeptor für ein katalytisches Wassermolekül, welches in der Esterhydrolyse eingebaut wird. Das katalytisch nicht essentielle Aspartat assistiert der Hydrolyse, indem es über eine Wasserstoffbrücke zum Histidin-NH ϵ_2 das richtige Tautomer und die korrekte Orientierung des Histidins stabilisiert. Es ist über ein Strukturwasser ^[186] sowie zwei räumlich benachbarte Tyrosine ^[180] mit dem Wasserstoff-Brückennetz im lipophilen Kanal verbunden (Abb.3.5). Die katalytische Diade der PLA2 ist funktionell und strukturell sehr ähnlich der aktiven Triade von Serinproteasen und Lipasen, in denen das hydrolytisch aktive Wassermolekül durch Serin ersetzt ist.

In unmittelbarer räumlicher Nähe zum aktiven Zentrum wird auch das **katalytisch essentielle Kalziumion** gebunden. Die Komplexierung erfolgt über 3 Aminosäuren der kalziumbindenden Schleife und ein hochkonserviertes, essentielles Aspartat ^[187] in direkter Nachbarschaft zum katalytischen Histidin. Über koordinative Bindung der sn-3 Phosphatgruppe und der sn-2 Carboxylgruppe ans Kalzium-Kation ^[188] wird das intermediäre tetraedrische Esteroxyanion stabilisiert und vermutlich auch die Stereochemie der Hydrolyse gesteuert ^[176, 187] (Abb.3.5). Interessanterweise zeigte von allen möglichen (CxyA)₂-Cystin-Deletionsmutanten der bp-PLA2 nur die C29A-C45A-Mutante deutlich reduzierte Aktivität ^[189]. Dieses Cystin verbindet auch in der hnpS-PLA2 das kalziumbindende Aspartat nahe des aktiven Zentrums mit der Kalziumbindungsschleife und kann so die günstigste Konformation für die Kalziumkomplexierung stabilisieren. Tatsächlich zeigt die C29A-C45A Mutante primär eine deutlich reduzierte Kalzium-Affinität, die wohl die beobachtete Aktivitätsabnahme begründet ^[189].

Der weitgehend unstrukturierte **C-Terminus** ist außer am Aufbau der interfacialen Erkennungsseite ^[175] (s.u.) auch an der *Komplexierung eines sekundären Kalziumions* beteiligt. Weitere Liganden dieser sekundären Kalziumbindungsstelle liegen in der kalziumbindenden Schleife. Durch diese unmittelbare Nähe zum katalytischen primären Kalziumion, die über eine Strukturwasser-Brücke noch verstärkt wird, kann das sekundäre Kalzium als zusätzliches Elektrophil an der Stabilisierung des intermediären Esteroxyanions mitwirken. Dies erklärt den beobachteten Verlust an Substratspezifität nach Deletion des C-Terminus ^[190].

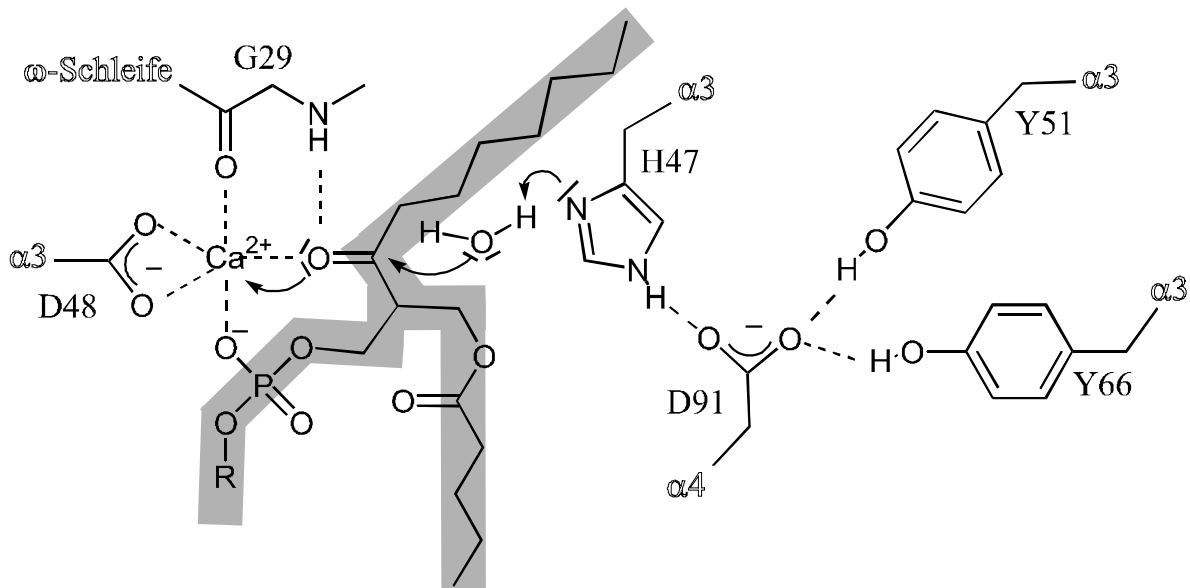


Abb.3.5 Vorgeschlagener Katalysemechanismus von hnps-PLA2 [176, 187]. Das Substrat (Phospholipid) ist grau unterlegt, die Sekundärstrukturelemente sind eingetragen. D91 stabilisiert die Orientierung und das benötigte Tautomer des essentiellen H47 (beide bilden die aktive Diade), das als Protonenakzeptor für das hydrolytisch wirksame Wasser fungiert. Über Y51 und Y66 ist D91 in einem intramolekularen Wasserstoff-Brückennetz fixiert. Das katalytisch essentielle Ca^{2+} , das das intermediäre Esteroxyanion stabilisiert, wird durch G29 und D48 komplexiert.

Die **interfaciale Erkennungsseite** der PLA2 umfaßt einen N-terminalen und einen C-terminalen Cluster sowie weitere Aminosäuren im Bereich des lipophilen Kanals [175, 181, 190]. Mit dieser Oberfläche lagert sich das Enzym an die Lipidmembran, wodurch konformative Änderungen denkbar wären, die die beobachtete Aktivitätssteigerung der membrangebundenen PLA2 erklären könnten [168, 191]. Dafür spricht auch, daß viele Aminosäuren der interfacialen Kontaktseite an der Öffnung des lipophilen Kanals liegen. Beim Kontakt mit der Lipidmembran könnte es so zu einer Aufweitung der Kanalöffnung und damit erleichterter Diffusion des Substrates ins aktive Zentrum kommen [176].

Besondere funktionale Vielfalt zeigt der weitgehend helikale **N-Terminus**. Er ist einerseits beteiligt am Aufbau des lipophilen Kanals, dessen eine Innenwand durch die Seitenketten der hochkonservierten Aminosäuren L2, F5 und I9 gebildet wird [176]. So zeigten nicht-konservative Mutationen von F5 und I9 an PLA2 aus Rinderpankreas (bp-PLA2) deutlich reduzierte Aktivität, während eine Mutation von L2 zu veränderter Phospholipidselektivität bezüglich der Länge der Acylkette führte [177]. Andererseits sind Seitenketten weiterer Reste, darunter W3 und N6 der bp-PLA2 [175, 180], am Aufbau der interfacialen Erkennungsseite beteiligt. Dazu beobachtete man an Mutationen von W3 primär eine veränderte Selektivität der bp-PLA2 in der interfacialen Erkennung der

Aggregatform des Substrates [177]. Schließlich wird eine Beteiligung der N-terminalen Amidgruppe und der Seitenketten-Amidgruppe von Q4 bzw. N4 am intramolekularen Wasserstoff-Brückengerüst vermutet [175, 180, 192]. Die N-terminale Amidgruppe, die auch an der interfacialen Erkennungsseite liegt [175, 180], ist dabei essentiell für die Bindung eines Strukturwassermoleküls [193]. Sie hat besonderes Interesse im Zusammenhang mit der beobachteten interfacialen Aktivierung der PLA2 gefunden, da in NMR- und Kristallstrukturen freier PLA2 im Gegensatz zu substrat- und membrangebundenen PLA2 ein Aufbruch der N-terminalen $\alpha 1$ Helix für die ersten 3 Aminosäuren gefunden wurde [192, 194]. Diese geringfügige N-terminale Umordnung wurde auch an *hnps-PLA2* beobachtet. Demnach könnte die N-terminale Amidgruppe nicht mehr am Wasserstoff-Brückengerüst teilnehmen. Allerdings wurde mittlerweile die Sekundärstruktur der freien PLA2 aus Schlangengift von *Agkistrodon p. p.* (ebenfalls eine sPLA2 der Gruppe II) veröffentlicht, in der die Helix $\alpha 1$ bis einschließlich der N-terminalen Aminosäure intakt bleibt [171]. Obgleich für die Aktivierung höchstwahrscheinlich ein unmodifizierter N-Terminus nötig ist [195], bleibt fraglich, ob die Struktur des N-Terminus maßgeblich für die interfaciale Aktivierung der PLA2 ist.

3.3 Dynamik von hnps-PLA2

3.3.1 Relaxationsmessungen und Extraktion der Relaxationsdaten

Zur Erfassung der Dynamik des Proteinrückgrates von hnps-PLA2 wurden ^{15}N -Relaxationsmessungen (T_1 , T_2 , $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ -NOE) bei 3 magnetischen Feldstärken (500, 600 und 750 MHz) wie in Kapitel 1.9 beschrieben durchgeführt. Die vollständig ^{15}N -markierte Probe hatte eine Konzentration von ca. 1.4 mM bei pH 4.5 (10 mM KH_2PO_4 -Puffer). Die Meßtemperatur betrug kalibrierte 309.8 ± 0.5 K. Zur Minimierung der Probenerwärmung während der Messungen wurden kurze Entkopplerzeiten, entsprechend kurzen Aufnahmezeiten von ca. 70 ms, und lange Wartezeiten von 2.5 s zwischen einzelnen Programmdurchläufen (*scans*) gewählt. Die Intensität des LOCK-Signales als Maß für die tatsächliche Probentemperatur schwankte danach nicht mehr erkennbar. Zum Gleichgewichtsaufbau des $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ -NOE wurden die Protonen während 3 s gesättigt, die Äquilibrierdauer lag bei 2 s.

Alle Spektren wurden als 1024×128 Datenpunktmatrizen bei kalibrierten $309.8 \text{ K} \pm 0.5$ K aufgenommen. Für die ^{15}N - T_2 -Messungen wurden 12 linear ansteigende Mischzeiten (16 - 192 ms) mit einer CPMG-Echodauer von 2×0.45 ms, für die ^{15}N - T_1 -Messungen 12 bis 14 exponentiell ansteigende Mischzeiten bis ca. $1.5 \times T_1$ (8 ms bis ca. 1 s) in jeweils gemischter Abfolge gewählt. Zur Vorabschätzung der T_1 -Zeiten nach Gl. 1.116 wurde das zugrundeliegende ^{15}N -HSQC mit 16 ms und 1024 ms Mischzeit kurz anlaufen gelassen und der jeweils erste serielle FID identisch prozessiert.

Die gemessenen 1024×128 Aufnahmematrizen wurden zu 2048×512 spektralen Datenpunktmatrizen fouriertransformiert. Durch 100% *Linear Prediction* mit 32 Koeffizienten wurde der FID in F1 zuvor auf 256 Datenpunkte weitergerechnet; danach erfolgte einfaches Zero-Filling in beiden Dimensionen. Bei mehr als 100% *Linear Prediction* wurden hingegen zunehmend Schwankungen in den Signalintensitäten der $I(t)$ -Abklingkurven beobachtet.

Die T_1 - und T_2 -Zeiten wurden aus Signalintensitäten durch Kurvenanpassung an Gl.1.119 mit dem DFIT Modul des DASHA Programmpaketes ^[107] ermittelt. Die Berücksichtigung eines Offsets war statistisch nicht signifikant, wie auch von der ausgezeichneten Unterdrückung des Wassersignales (Aufnahme mit 8K *receiver gain*) zu erwarten war. Basislinienkorrektur war ebenfalls nicht nötig und führte zu einer höheren Schwankung der gemessenen Intensitäten um die Zielfunktion.

Eine erste Fehlerabschätzung für die Relaxationszeiten wurde durch die jeweiligen Standardabweichungen der Kurvenanpassung gefunden. Diese lagen bei den meisten Signalen um nur 1%. Doppelmessungen der T_1 -Zeiten bei 750 und 600 MHz und der T_2 -Zeit bei 600 MHz ergaben jedoch mittlere Abweichungen von ca. 2%, in Übereinstimmung mit den Fehlerbetrachtungen in Kapitel 1.10.3. Wo nötig, wurden deshalb die Fehlergrenzen für die Relaxationszeiten auf 2% angehoben.

Der $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ -NOE wurde als Verhältnis der Signalintensitäten $I_{\text{gesättigt}}/I_0$ berechnet. Auch hier konnte auf eine Basislinienkorrektur verzichtet werden. Der mittlere Fehler ΔNOE nach Gl.1.120 lag bei ca. 4% bzw. 0.03. Doppelmessungen bei 600 und 750 MHz lieferten jedoch Divergenzen um 0.05 (vgl. 1.10.3), weshalb die Fehlergrenzen für den $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ -NOE nach Bedarf auf 0.05 angehoben wurde.

Experimentelle Werte für $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ NOE, $^{15}\text{N}-T_1$ and $^{15}\text{N}-T_2$ konnten für 110 der 124 Aminosäuren von PLA₂ bestimmt werden. Für die restlichen 14 Aminosäuren (darunter 2 Proline und die N-terminale Aminosäure) konnten entweder keine Signale aufgefunden werden oder diese waren zu stark überlagert. Die ermittelten Relaxationsdaten sind in Anhang C.1 aufgelistet und in Abb.3.6 gegen die Proteinsequenz aufgetragen. Nachfolgende Tabelle 6.2 faßt Mittelwerte und Streuungen der Relaxationsdaten des Proteinrückgrates zusammen.

Tab.3.2 Mittelwerte und Streuungen der gemessenen Relaxationsdaten für PLA2 bei 3 magnetischen Feldstärken, 309.8 K \pm 0.2K.

B_0	$^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ -NOE	$^{15}\text{N}-T_1$ [ms]	$^{15}\text{N}-T_2$ [ms]
500 MHz	0.75 (0.78)	442 (423)	144 (138)
	[0.36 - 0.85]	[387 - 574]	[65 - 231]
600 MHz	0.78 (0.82)	538 (519)	138 (132)
	[0.48 - 0.87]	[477 - 658]	[53 - 225]
750 MHz	0.84 (0.87)	660 (651)	120 (117)
	[0.58 - 0.95]	[567 - 785]	[37 - 195]

Die Mittelung erfolgte über alle erfaßten Signale (110) des Proteinrückgrates (*kursiv*) bzw. (in Klammern) nur über die Bereiche ausgedehnter Sekundärstruktur, Helices α_1 (Reste 3 - 12), α_3 (Reste 39 - 55) und α_4 (Reste 82 - 101). Darunter sind die Streuungen der Relaxationsdaten über das gesamte Proteinrückgrat angegeben.

3.3.2 Qualitative Bewertung der Relaxationsdaten

Die Relaxationsdaten von PLA2 sind in Abb.3.6 aufgetragen und in Anhang C.1 vollständig aufgelistet. Zur Interpretation der erkennbaren Abweichungen in den Relaxationsraten sind die Indikatoren (vgl. 1.11.2) nochmals kurz zusammengefaßt:

- Lokale Reduktion des $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ -NOE zeigt lokale Beweglichkeit mit typischen Korrelationszeiten τ_{eff} von ca. 0.5 bis 2 ns an (*ns-Beweglichkeit*) (vgl. Abb.1.7.a).
- Die Dispersion der ^{15}N - T_1 -Zeiten ist typischerweise gering; erhöhte ^{15}N - T_1 -Zeiten weisen aber auf schnelle lokale Beweglichkeit mit $\tau_{\text{eff}} < 0.5$ ns hin (vgl. Abb.1.7.a).
- Die ^{15}N - T_2 -Zeiten werden durch konformative Austauschprozesse mit Korrelationszeiten im Mikro- bis Millisekundenbereich stark reduziert, durch rasche lokale Bewegungen im ps- bis ns-Bereich hingegen deutlich verlängert (vgl. Abb.1.7.a).

Der $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ -NOE ist in drei Bereichen von PLA2 deutlich und zusammenhängend erniedrigt - von V30 bis G34 im Zentrum der primären Ca^{2+} -bindenden Schleife, um T61/K62 zu Beginn des *surface loop* sowie am C-Terminus ab C117. Generell sind in diesen Bereichen auch die ^{15}N - T_2 -Zeiten sowie in geringerem Maße auch die ^{15}N - T_1 -Zeiten erhöht. In guter Übereinstimmung weisen diese Indikatoren also in den angegebenen drei Bereichen auf schnelle ns-Beweglichkeit hin. Erkennbare Erhöhung der ^{15}N - T_2 -Zeit durch schnelle Bewegungen findet man auch um Q80/D81 am Ende des *surface loop* und im Bereich der α_1 - α_2 -Schleife. Eine sehr deutliche zusammenhängende Erniedrigung der ^{15}N - T_2 -Zeiten zeigt langsame konformative Beweglichkeit von Q110 bis N115 im C-Terminus an. Verkürzte ^{15}N - T_2 -Zeiten treten ebenso in unregelmäßiger Abfolge im Bereich der α_2 -Helix und der anschließenden Ca^{2+} -bindenden Schleife auf. Auch der $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ -NOE und die ^{15}N - T_1 -Zeiten zeigen im Bereich der α_2 -Helix uneinheitliche Schwankungen.

G31 hat statt der eigentlich erwarteten verlängerten (s.o.) eine deutlich verkürzte ^{15}N - T_2 -Zeit. Nur in Kombination mit dem $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ -NOE kann man erkennen, daß hier schnelle und langsame Bewegungen nebeneinander auftreten. Ähnlich mehrdeutige Aussagen erhält man insbesondere für die dynamisch heterogene α_2 -Helix. Bei der Bewertung der ^{15}N - T_2 -Zeiten muß also mit der Möglichkeit gerechnet werden, daß sich die Effekte schneller und langsamer Bewegungen kompensieren und unauffällige ^{15}N - T_2 -Zeiten vortäuschen. Es muß daher parallel immer auch besonders auf den $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ -NOE geachtet werden, der ein sehr verlässlicher Indikator schneller ns-Beweglichkeit ist (vgl. 1.11.2). Dies verdeutlicht den Vorteil eines Interpretationsansatzes (wie z.B. die modellfreie Ana-

lyse), der mehrere verfügbare Relaxationsraten parallel berücksichtigt und damit überlagerte Effekte auflösen kann, wodurch dynamische Trends z.T. erst deutlich werden.

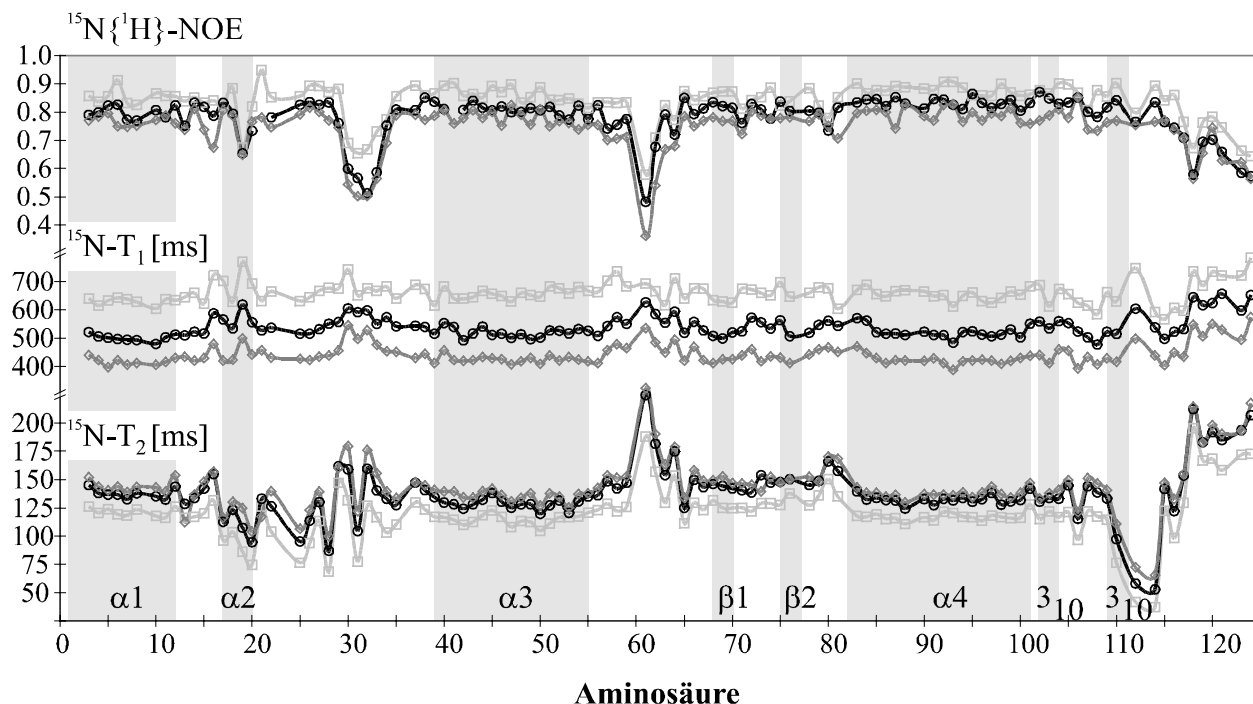


Abb.3.6 Experimentelle Relaxationsdaten von PLA2. Die Messungen wurden bei den drei Feldstärken 500 MHz (◆), 600 MHz (●) und 750 MHz (■) durchgeführt. Die Sekundärstrukturelemente von PLA2 sind grau unterlegt und bezeichnet.

Aus der Betrachtung der Relaxationsdaten von PLA2 folgt, daß nur die Helices α_1 , α_3 und α_4 weitgehend frei von lokalen Beweglichkeiten sind und sich für die Berechnung der Korrelationszeit anbieten, während alle Schlaufenbereiche und insbesondere die kurze α_2 -Helix und die C-terminale 3_{10} -Helix (Y109 bis Y111) hohe Beweglichkeit aufweisen.

3.3.3 Bestimmung der molekularen Korrelationszeit

Für hnp-PLA2 weisen viele Faktoren darauf hin, daß bei der Berechnung von τ_R aus dem T_1/T_2 -Verhältnis (vgl. Kapitel 1.11.2) große Vorsicht geboten ist. Nur ca. 50% der Aminosäuren sind in Sekundärstrukturen eingebunden. Davon haben nur die drei Helices α_1 , α_3 und α_4 eine größere Ausdehnung. Im Gegensatz zu HNL (Kapitel 2) erscheint die Struktur von hnp-PLA2 wenig kompakt und ist mit einem Trägheitstensor-Hauptachsenverhältnis von 1.00:1.75:2.14 deutlich anisotrop. Die Rolle der zahlreichen Cystine in PLA2 ist ambivalent. Sicher führen sie zu erhöhter struktureller Stabilität, da sie die Anzahl der Bewegungsfreiheitsgrade des Moleküls einschränken und Beweglichkeit dämpfen. Andererseits lassen sie immer noch Bewegungsprozesse im relaxationswirksamen Mikro- bis Millisekundenbereich zu [93-96] und können Bewegungen aus flexiblen Mole-

külregionen über die Disulfidbrücke übertragen (vgl. HNL, 2.5.6). So sind gerade die Helices α_3 und α_4 über Cystine mit erwartungsgemäß hochflexiblen Bereichen (C-Terminus, Schlaufenbereiche) verknüpft. Es muß daher damit gerechnet werden, daß Cystinvermittelte konformative Beweglichkeit die T_2 -Zeiten in Helices α_3 und α_4 lokal verkürzt und so die scheinbare Korrelationszeit aus dem T_1/T_2 -Verhältnis verlängert. Damit bleibt als sicherster Kandidat für die Beobachtung der wahren molekularen Korrelationszeit die N-terminale Helix α_1 . Eine Berechnung von τ_R aus dem T_1/T_2 -Verhältnis ist aber auch hier problematisch, da nur über wenige Reste gemittelt wird (statistische Ungenauigkeit) und zudem möglicherweise die für freie Termini typische Nanosekunden-Beweglichkeit, die zur scheinbaren Verkürzung von τ_R führt, nicht völlig abgeklungen ist.

Aufgrund der beschriebenen Unsicherheit in der Auswahl der geeigneten Reste zur Bestimmung der molekularen Korrelationszeit wurde für jeden Rest eine *per-residue* Korrelationszeit $\tau_{R,i}$ aus den T_1/T_2 -Verhältnissen bei den drei vermessenen Feldstärken bestimmt. Das Ergebnis ist in Abb.3.7 sequentiell aufgetragen und beweist die große Dispersion lokaler dynamischer Prozesse in PLA2.

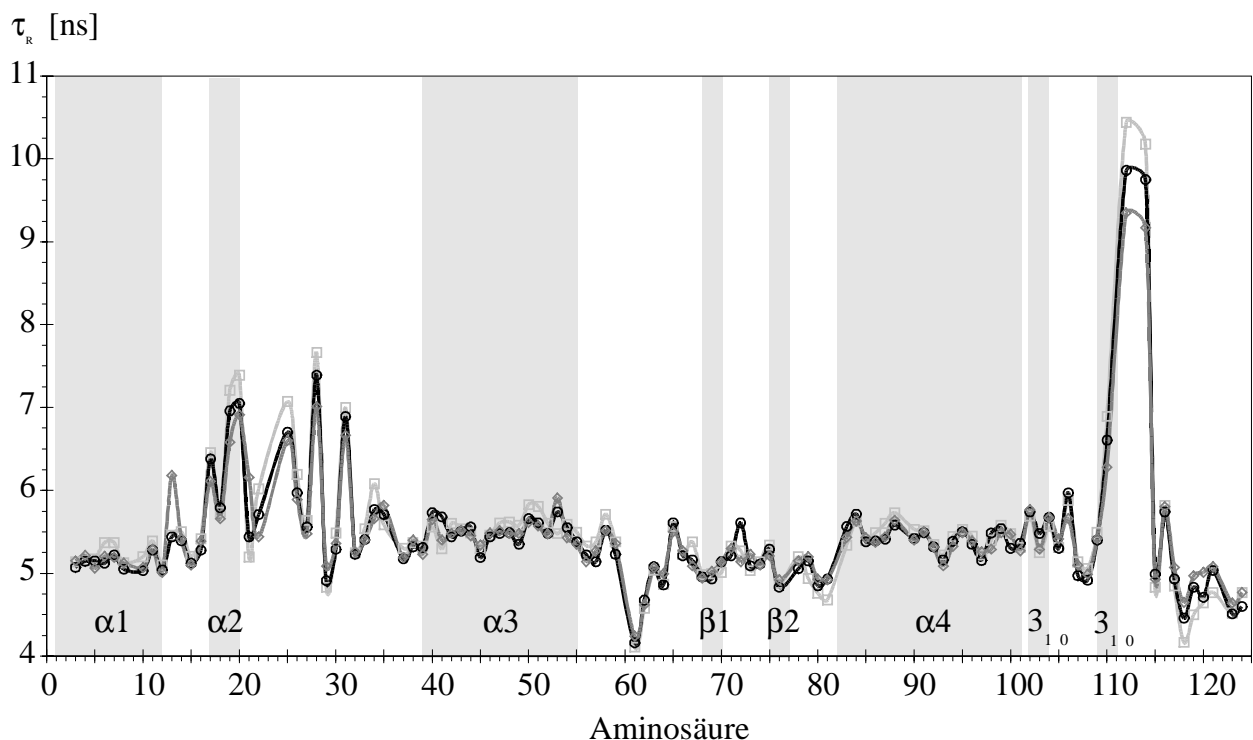


Abb.3.7 *Per-residue* Korrelationszeiten $\tau_{R,i}$ aus dem T_1/T_2 -Verhältnis. Die Messungen wurden bei drei Feldstärken (500 MHz (◆), 600 MHz (●) und 750 MHz (■)) durchgeführt. Die Sekundärstrukturelemente von PLA2 sind grau unterlegt und bezeichnet. Die Mittelwerte der Korrelationszeiten betragen ca. 5.15 ns für Helix α_1 , 5.5 ns für Helix α_3 und 5.45 ns für Helix α_4 .

Überdurchschnittlich hohe, mit der Feldstärke steigende τ_i sind eindeutige Indikatoren für konformative Austauschprozesse und treten besonders stark in Helix α_2 , der sich anschließenden Ca^{2+} -bindenden Schleife sowie im C-Terminus auf. Unterdurchschnittliche lokale Korrelationszeiten, insbesondere mit inverser Feldabhängigkeit [22] (vgl. Abb.1.9.c), weisen auf schnelle Nanosekunden-Bewegungen hin und finden sich vor allem im Bereich des *surface loop* (α_3 - α_4 -Schleife) und im C-Terminus. Aus der Darstellung werden auch einzelne herausfallende Werte erkennbar (z.B. T13 bei 500 MHz, G72 bei 600 MHz), denen fehlerhafte T_1 - bzw. T_2 -Werte zugrundeliegen.

Bei der Analyse lokaler Korrelationszeiten von hnp-PLA2 fällt der signifikante Unterschied in den gemittelten Korrelationszeiten über die vermutet starren Helices α_1 , α_3 und α_4 auf. Ihr jeweiliger Mittelwert ist, wie für starre Regionen gefordert, weitgehend feldunabhängig. Für Helices α_3 und α_4 stimmen die mittleren Korrelationszeiten mit 5.5 ns bzw. 5.45 ns sehr gut überein; die Standardabweichung innerhalb der Helices beträgt ca. 0.15 ns. Die mittlere Korrelationszeit für Helix α_1 liegt hingegen mit 5.15 ± 0.1 ns deutlich niedriger und kann auch unter Berücksichtigung der jeweiligen Standardabweichungen nicht mit den Mittelwerten über Helices α_3 und α_4 zur Übereinstimmung gebracht werden. Diese regional unterschiedlichen Korrelationszeiten folgen den o.a. Überlegungen. So weisen tatsächlich die Cystein-reichen Helices α_3 und α_4 die längeren regionalen Korrelationszeiten bei gleichzeitig höherer Dispersion auf. Andererseits erscheint die Bestimmung der molekularen Korrelationszeit aus Helix α_1 weniger problematisch als zunächst angenommen, da die lokalen Korrelationszeiten hier nur sehr geringe Dispersion zeigen und daher eine statistisch verlässliche Mittelwertbildung erlauben. Es läßt sich hier auch keine inverse Feldabhängigkeit der lokalen Korrelationszeiten beobachten, die ein möglicher Hinweis auf Terminus-typische Nanosekunden-Bewegungen wäre.

Aus der Analyse der lokalen Korrelationszeiten aus den T_1/T_2 -Verhältnissen läßt sich für hnp-PLA2 schlußfolgernd und in voller Übereinstimmung mit den o.a. Überlegungen keine eindeutige globale Korrelationszeit angeben. Der Bereich für die molekulare Rotationskorrelationszeit ist aber verlässlich auf 5.15 ns (aus Helix α_1) bis 5.5 ns (aus Helices α_3 und α_4) einzugrenzen.

Die Tatsache, daß die parallel orientierten Helices α_3 und α_4 quasi identische, aber deutlich verschiedene regionale Korrelationszeiten zur quer orientierten Helix α_1 aufweisen, kann als Hinweis auf die Anisotropie der Molekülrotation gewertet werden. Nach der isotropen Analyse muß daher auch die anisotrope Analyse der hnp-PLA2-Dynamik bewertet werden.

Ein prinzipielles Problem bei der Berechnung von τ_R aus dem T_1/T_2 -Verhältnis helikaler Strukturen gegenüber Faldblättern könnte aus der Tatsache resultieren, daß Helices im entscheidenden Nanosekundenbereich eben nicht inhärent starr sind, sondern rasche kooperative Übergänge zwischen helikaler, teilgeordneter und ungeordneter Konformation durchführen [37, 43, 88-93, 196, 197]. Derartige Beobachtungen wurden an globulären helikalen Proteinen und helikalen Peptiden in wäßriger Lösung gemacht. Die von interner Dynamik unabhängige Bestimmung der molekularen Korrelationszeit mit anderen Methoden ist hier also von besonderer Bedeutung (vgl. 1.12.4).

3.3.4 *Isotrope und anisotrope modellfreie Auswertung der Relaxationsdaten*

Aufgrund der beschriebenen Problematik bei der Bestimmung der molekularen Rotationskorrelationszeit τ_R wurde die *isotrope* modellfreie Auswertung der PLA2-Dynamik jeweils mit den angenommenen Grenzwerten von 5.15 ns (aus Helix α_1) und 5.5 ns (aus Helices α_3 und α_4) sowie einer über alle Reste gemittelten τ_R von 5.3 ns durchgeführt. Zusätzlich wurde die *anisotrope* modellfreie Auswertung mit einer isotrop gemittelten Rotationskorrelationszeit $\tau_{R,iso}$ von 5.25 ns durchgeführt.

Die Berechnung des Rotationsdiffusionstensors aus der minimierten gemittelten Struktur erfolgte wie in Kapitel 1.12 und für HNL (vgl. 2.5.2) beschrieben. Bei diesem relativ kleinen Protein wurden alle Atome als Kugelzentren mit dem jeweiligen Van-der-Waals-Radius ausgewählt. Die Kugelradien wurden gemäß der solvenszugänglichen Oberflächen reskaliert, die mit einem Wassermolekülradius von 1.6 Å ermittelt wurden. Effektiv abgeschirmte Kugeln mit einem reskalierten Radius kleiner 0.1 Å wurden eliminiert und verbleibende Kugeln mit einer Volumenüberlappung größer 10% um maximal 0.1 Å in ihrer Position variiert, um das Ausmaß der Überlappungen zu reduzieren. Die Berechnung der Punktreibungsquellen erfolgte nach der *slip*-Bedingung [114] (Gl. 1.133), die Berechnung des Rotationsdiffusionstensors mit dem modifizierten Oseen-Tensor [115, 198, 199].

Die Zuordnung der wahrscheinlichsten Modellfunktion erfolgte nach den Kriterien der χ^2 -Verteilung sowie des paarweisen F-Tests (vgl. 1.11.5). Die in Kapitel 3.3.1 ermittelten Fehler in den Meßwerten lieferten hierbei für die meisten Reste Fehlerquadrate X^2_{min} im χ^2 -erlaubten Bereich. Fiel X^2_{min} bei keinem Modell unter den erlaubten Wert oder gelang keine eindeutige Zuordnung der Modellfunktion, wurde permutativ einer der maximal 9 Relaxationswerte bei der Minimierung ausgelassen. Wenn dabei X^2_{min} signifikant fiel, wurde der betreffende Relaxationswert als Ausreißer eliminiert. Voraussetzung war allerdings, daß sich durch Vernachlässigung dieses Datenpunktes keine fundamentale Ände-

rung der zugeordneten Modellfunktion ergab. Nach einem ersten Durchlauf wurde die Rotationskorrelationszeit τ_R über alle Reste mit eindeutig zugeordneter Modellfunktion global minimiert und die Zuordnung anschließend überprüft bzw. ergänzt. Dieser Vorgang wurde zwei- bis dreimal iteriert. Die zuletzt global optimierten τ_R -Werte lagen durchweg unter den angesetzten Anfangswerten: 5.10 ns (von 5.15 ns), 5.17 ns (von 5.3 ns), 5.35 ns (von 5.5 ns) bzw. für die anisotrope Anpassung 5.20 ns (von 5.25 ns).

Tabelle 3.3 faßt die optimierten Rotationskorrelationszeiten τ_R , die Modell-Zuordnungen und die erhaltenen minimierten Fehlerquadrat-Summen X^2_{\min} für die 110 bewerteten Aminosäuren (von 124) zusammen. Sie zeigt, daß für keinen ^{15}N - ^1H -Vektor und bei keiner der 4 Auswertungen eine gute Anpassung an das vollständige Lipari-Szabo-Modell 2 erhalten wurden. Stattdessen wurde für ca. 25 bis 40% aller Reste Modellfunktion 3 als wahrscheinlichstes Modell aufgefunden. Tabelle 3.4 zeigt die Dispersion und die Mittelwerte der berechneten Dynamikparameter für jede der 4 Auswertungen.

Tab.3.3 Übersicht über die für *hnps*-PLA2 optimierten Rotationskorrelationszeiten τ_R , die Modell-Zuordnungen und die minimierten Fehlerquadrat-Summen X^2_{\min} (110 Aminosäuren wurden erfaßt).

Modellfunktion	1	1 + $\Delta_{\text{Austausch}}$	3	3 + $\Delta_{\text{Austausch}}$	X^2_{\min}
$\tau_R = 5.1$ ns	16	68	7	19	523
(isotrop)	(14.5%)	(61.8%)	(6.4%)	(17.3%)	
$\tau_R = 5.17$ ns	28	56	6	20	541
(isotrop)	(25.5%)	(51%)	(5.5%)	(18%)	
$\tau_R = 5.35$ ns	34	33	24	19	698
(isotrop)	(31%)	(30%)	(21.7%)	(17.3%)	
$\tau_{R,\text{iso}} = 5.2$ ns	38	45	7	20	521
(anisotrop)	(34.5%)	(41%)	(6.3%)	(18.2%)	

Im direkten Vergleich fällt die isotrope Auswertung mit der längsten Rotationskorrelationszeit ($\tau_R = 5.35$ ns) deutlich aus der Norm. Sie liefert die mit Abstand höchste ΣX^2_{\min} , d.h. die allgemein schlechteste Modellanpassung. Sie erfordert gegenüber den anderen Rechnungen auch fast doppelt so häufig die Annahme des kompliziertesten Bewegungsmodells 3 (für interne Bewegungen im ns-Bereich), reduziert andererseits aber die Notwendigkeit zur Berücksichtigung von $\Delta_{\text{Austausch}}$ -Korrekturen (für chemische bzw. konformative Austauschprozesse im μs - bis ms -Bereich) auf ein Minimum. Dieses Ergebnis überrascht nicht, da Modellfunktion 3 eine *Überschätzung*, $\Delta_{\text{Austausch}}$ -Beiträge hingegen eine *Unterschätzung* der molekularen Rotationskorrelationszeit τ_R kompensiert.

Die isotropen Auswertungen mit $\tau_R = 5.1$ und $\tau_R = 5.17$ sind hinsichtlich der Summenfehlerquadrate und der relativen Häufigkeit der Modelle 1 und 3 weitgehend äquivalent. Erwartungsgemäß müssen bei der kürzeren Korrelationszeit jedoch häufiger $\Delta_{\text{Austausch}}$ -Korrekturen berücksichtigt werden.

Tab.3.4 Dispersion und Mittelwerte lokaler Dynamikparameter für die ^{15}N - ^1H -Vektoren des Proteinrückgrates von hnp-PLA2 bei verschiedenen Rotationskorrelationszeiten τ_R .

Parameter lokaler Dynamik	X^2_{\min}	S^2	S_f^2	S_s^2	$\Delta_{\text{Austausch}}$ [Hz]	τ_s [ns]
Mittelwert über Proteinsequenz	4.8	0.80	0.78	0.78	2.1	2.4
	4.9	0.79	0.78	0.73	2.1	2.9
	6.5	0.78	0.81	0.78	2.5	3.4
	4.7	0.80	0.80	0.83	2.0	2.9
Mittelwert über Helizes $\alpha 1$, $\alpha 3$ und $\alpha 4$	4.6	0.87	0.84	0.84	1.0	0.0
	4.5	0.86	0.84	0.81	1.0	4.6
	6.5	0.87	0.88	0.88	0.8	4.2
	5.1	0.88	0.84	0.92	0.8	4.7
Maximalwert über Proteinsequenz	16.5	0.93	0.89	0.94	19.5	8.2
	22.5	0.93	0.89	0.92	19.3	8.3
	39.0	0.94	0.93	0.96	18.8	10.5
	14.9	0.93	0.91	0.95	17.7	8.2
Minimalwert über Proteinsequenz	0.3	0.41	0.66	0.56	0.4	0.2
	0.3	0.38	0.66	0.52	0.45	1.1
	0.5	0.39	0.66	0.48	0.45	0.2
	0.3	0.38	0.66	0.49	0.4	0.9

Die eingetragenen Werte gelten für: 1.Eintrag = isotroper Fit mit $\tau_R = 5.1$ ns; 2.Eintrag = isotroper Fit mit $\tau_R = 5.17$ ns; 3.Eintrag = isotroper Fit mit $\tau_R = 5.35$ ns; 4.Eintrag (*kursiv*) = anisotroper Fit mit $\tau_{R,\text{iso}} = 5.2$ ns. Die angegebenen Linienverbreiterungen $\Delta_{\text{Austausch}}$ beziehen sich auf eine Feldstärke von 750 MHz.

Die Berücksichtigung anisotroper Molekülrotation liefert gegenüber der isotropen Auswertung bei vergleichbarer Rotationskorrelationszeit keine erkennbare Verbesserung von ΣX^2_{\min} . Das Auftreten von Modellfunktion 3 für ca. 25% aller Reste wird durch die anisotrope Auswertung voll bestätigt. Die lokalen Nanosekunden-Bewegungen sind für hnp-PLA2 also eindeutig *real* und kein Artefakt der anisotropen Molekülrotation [81]. Im Gegensatz dazu sind jedoch viele geringfügige $\Delta_{\text{Austausch}}$ -Beiträge, die bei der isotropen Auswertung notwendig werden, offensichtlich ein Artefakt der anisotropen Molekül-

rotation. Durch ihre Berücksichtigung reduziert sich der Anteil Reste, die $\Delta_{\text{Austausch}}$ -Korrekturen erfordern, auch bei der kurzen isotrop gemittelten Korrelationszeit von $\tau_{\text{R,iso}} = 5.2$ ns um ca. 15 – 25% auf 60% (vgl. Tabelle 3.3). Gleichzeitig reduziert sich der Mittelwert der $\Delta_{\text{Austausch}}$ -Beiträge in den Helices $\alpha 1$, $\alpha 3$ und $\alpha 4$ um 20% auf 0.8 Hz (vgl. Tab. 3.4). Die Kompensation anisotroper Molekülrotation durch $\Delta_{\text{Austausch}}$ -Beiträge ist komplementär zur literaturbeschriebenen Kompensation durch Nanosekunden-Bewegungen [81]: Anisotrope Molekülrotation erzeugt eine orientierungsabhängige Streuung lokaler Korrelationszeiten um die isotrop gemittelte Rotationskorrelationszeit $\tau_{\text{R,iso}}$. Eine Erniedrigung der *per residue* $\tau_{\text{R,i}}$ wird durch die Beimischung einer schnelleren Bewegung (Modell 3), ihre Erhöhung durch die Beimischung einer langsameren Bewegung ($\Delta_{\text{Austausch}}$ -Beiträge) zur isotrop gemittelten Molekülrotation kompensiert.

Die besprochene Bewertung der vier Rechnungen führt zusammengefaßt zur Ablehnung des isotropen Modells für Korrelationszeiten $\tau_{\text{R}} > 5.2$ ns aus statistischen Erwägungen. Diese Rechnung führt außerdem zur Überschätzung der Beweglichkeit im ns-Bereich. Bei Korrelationszeiten von 5.1 bis 5.2 ns ist die Annahme isotroper Molekülrotation trotz des erheblichen Anisotropietensors (Hauptachsenverhältnis 1.00:1.75:2.14) statistisch akzeptabel und gibt Beweglichkeit im ns-Bereich korrekt wieder. Sie führt aber wahrscheinlich zu artifiziellen $\Delta_{\text{Austausch}}$ -Beiträgen und überschätzter Dynamik im μs - bis ms -Bereich. Die statistische Äquivalenz beider Rechnungen gibt die tatsächliche Unbestimmtheit der isotropen Rotationskorrelationszeit wieder. Die anisotrope Auswertung mit einer isotrop gemittelten Rotationskorrelationszeit von $\tau_{\text{R,iso}} = 5.2$ ns reduziert Häufigkeit und Ausmaß der $\Delta_{\text{Austausch}}$ -Korrekturen signifikant. Dadurch nimmt die Anzahl anzupassender Parameter ab bzw. die Anzahl Freiheitsgrade (= Anzahl Datenpunkte minus Anzahl zu bestimmender Parameter) zu. Dies führt zu einer schwachen statistischen Verbesserung gegenüber der isotropen Auswertung mit optimierter Korrelationszeit, obgleich sich die Fehlerquadrat-Summe ΣX_{mi}^2 nicht verringert. Aus statistischen Erwägungen, aufgrund des erheblichen Anisotropietensors und wegen der Reduktion vermutlich artifizieller $\Delta_{\text{Austausch}}$ -Beiträge ist die anisotrope Auswertung mit $\tau_{\text{R,iso}} = 5.2$ ns daher bevorzugt.

Abb.3.8 vergleicht die Streuung der beiden wesentlichen Dynamikparameter, S^2 und $\Delta_{\text{Austausch}}$, für die drei isotropen Auswertungen mit der anisotropen Rechnung. Der generalisierte Ordnungsparameter S^2 zeigt unabhängig von den globalen Auswertungsbedingungen weitgehend die gleichen Trends. Nur bei isotroper Auswertung mit $\tau_{\text{R}} = 5.35$ ns treten außerordentliche Reduktionen für S^2 bei Resten auf, die abweichend mit Modellfunktion 3 angepaßt wurden; in den übrigen Bereichen ist S^2 hingegen tendenziell leicht

erhöht. Für $\Delta_{\text{Austausch}}$ ergibt sich ebenso insgesamt ein weitgehend einheitliches Bild. Bei isotroper Auswertung mit $\tau_R < 5.2$ ns treten zusätzlich die erwähnten geringfügigen $\Delta_{\text{Austausch}}$ -Beiträge insbesondere im Bereich der Helices α_3 und α_4 auf.

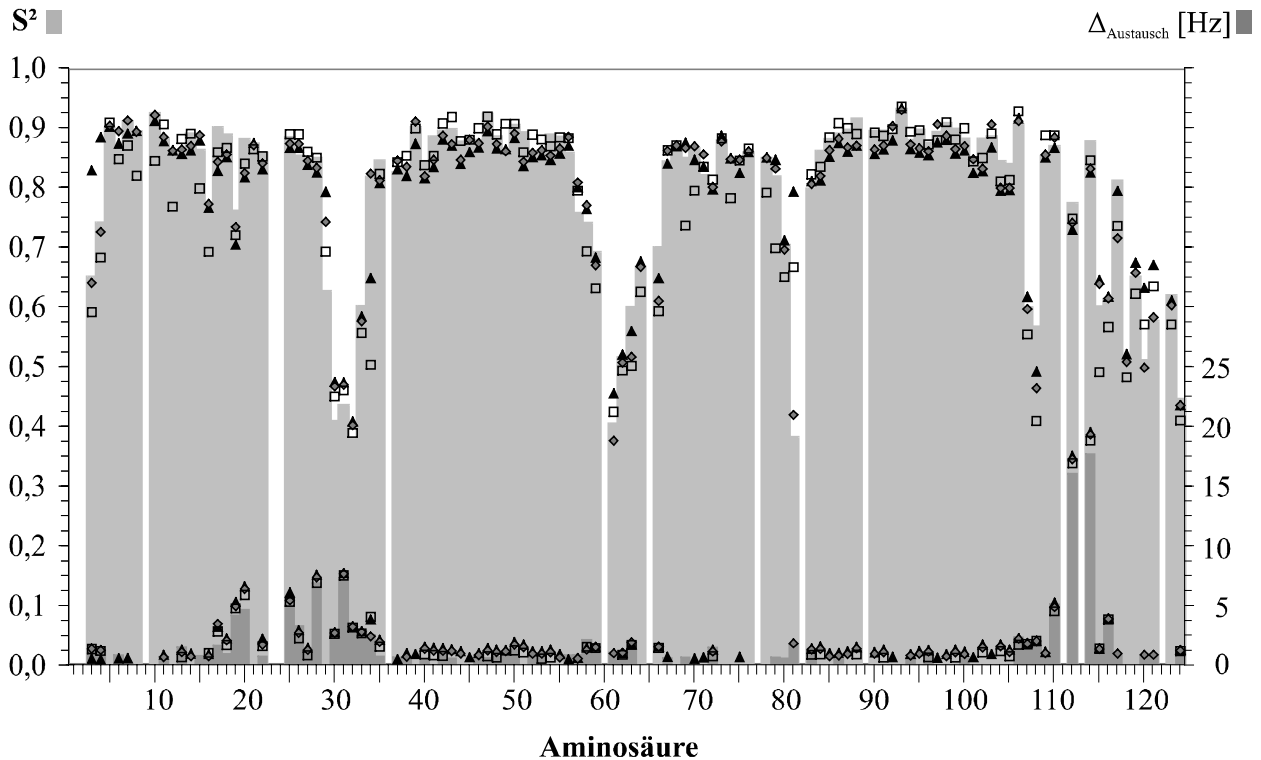


Abb.3.8 Vergleich der generalisierten Ordnungsparameter S^2 und Linienverbreiterungen $\Delta_{\text{Austausch}}$ (in Hz, bei 750 MHz) für hnp-PLA2 bei Annahme isotroper Molekülrotation mit verschiedenen Rotationskorrelationszeiten τ_R ((▲) 5.1 ns, (◊) 5.17 ns und (□) 5.35 ns) mit der gewählten anisotropen Auswertung bei isotrop gemittelter $\tau_{R,\text{iso}} = 5.2$ ns.

Abb. 3.8 verdeutlicht, daß die wesentlichen Parameter der lokalen Dynamik von hnp-PLA2 innerhalb der untersuchten Grenzen weitgehend invariabel gegenüber den Annahmen bezüglich der globalen Molekülrotation sind. Die anisotrope Auswertung mit $\tau_{R,\text{iso}} = 5.2$ ns erlaubt daher eine verlässliche Bewertung der Proteindynamik, selbst wenn die globale Molekülbewegung hierbei fehlergeschätzt worden sein sollte. Alle nachfolgenden Diskussionen beziehen sich auf diese Rechnung.

3.3.5 Verteilung der Parameter lokaler Dynamik in hnp-PLA2

Die Parameter lokaler ^{15}N - ^1H -Vektordynamik des Proteinerückgrates von hnp-PLA2 bei anisotroper Auswertung mit $\tau_{R,\text{iso}} = 5.2$ ns sind in Anhang C.2 aufgelistet. Ihre Mittel- und Extremwerte stehen in Tabelle 3.4.

Abb.3.9 zeigt den Verlauf des generalisierten Ordnungsparameters S^2 (bzw. des Produktes aus S_f^2 und S_s^2) über die Aminosäuresequenz. Er variiert stark (± 0.15) um den globa-

len Mittelwert von 0.8. Die Maximalwerte von S^2 erreichen 0.93 (Ala93, His47, Lys10), die Minimalwerte 0.38 (Gly32, Asp81, Thr61). Der S^2 -Mittelwert über Helices α_1 , α_3 und α_4 beträgt 0.88 ± 0.05 . Dieser Mittelwert wird weitgehend nur in den Bereichen mit definierter Sekundärstruktur erreicht. Ein Drittel aller bewerteten Reste weisen S^2 unterhalb dieses Plateauwertes auf (d.h. $S^2 < 0.83$). Auffallend niedrige $S^2 < 0.8$ finden sich

- am N-Terminus zu Beginn von Helix α_1 (Val3 - Asn4)
- vor (Glu16) und am Ende (Leu19) der kurzen Helix α_2
- in der Ca^{2+} -bindenden Schleife (Gly29 – Arg33)
- zu Beginn (Arg57 – Tyr66) und am Ende (Gln80 – Asp81) des *surface loop* sowie zwischen den zentralen β -Strängen (Ser71 – Gly72)
- im C-terminalen Bereich zwischen (Lys107 – Lys108) und nach (Tyr112 – Cys124) den kurzen 3_{10} -Motiven; der weitgehend homogene Abfall von S^2 zum C-Terminus hin wird bei Asn114 und C117 lokal unterbrochen.

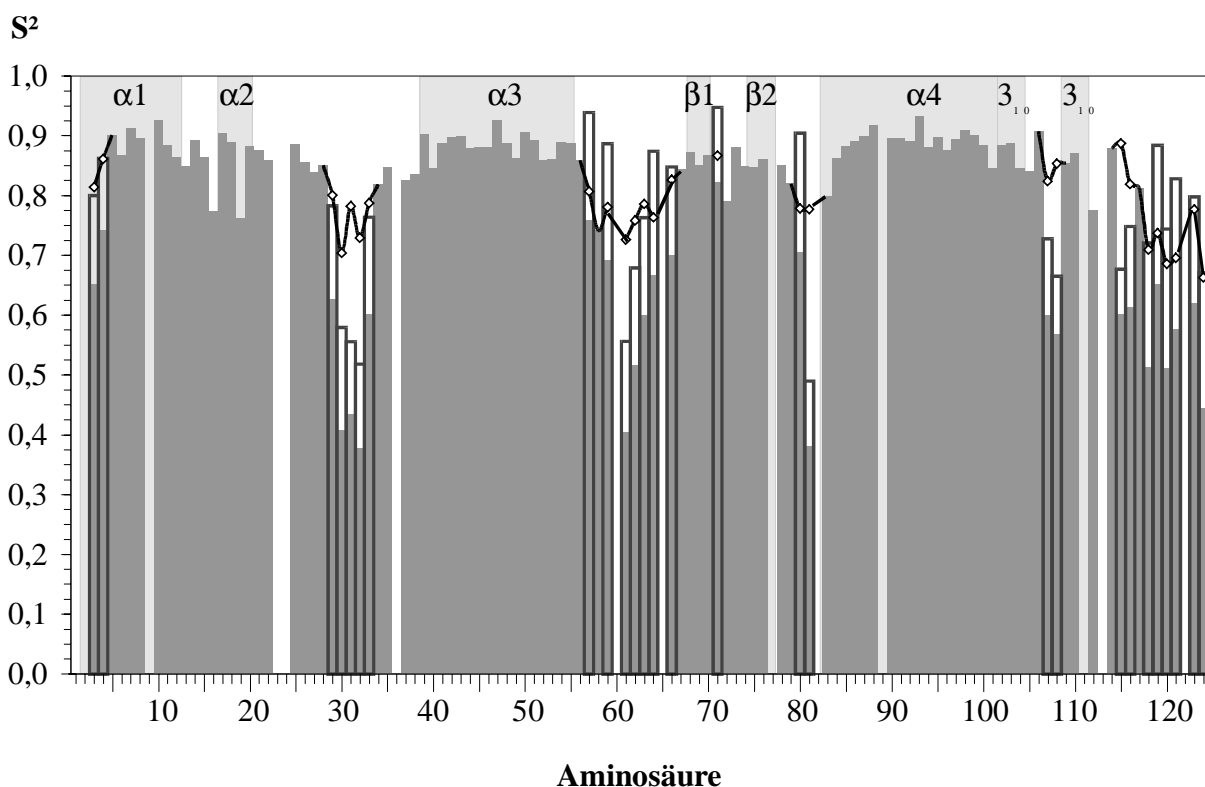


Abb.3.9 Verlauf des generalisierten Ordnungsparameters S^2 (■) für hnpS-PLA2. In flexiblen Bereichen (Modell 3) ist S^2 das Produkt aus S_s^2 (□) und S_f^2 (—◇—) zweier überlagerter lokaler Bewegungen. Der S_f^2 -Verlauf ist durch Linien mit den angrenzenden S^2 verbunden.

Die Reduktion von S^2 erfolgt dabei auffallend zusammenhängend: während S^2 an den Termini nahezu kontinuierlich fällt, durchläuft er in den flexiblen Schleifenbereichen

deutlich erkennbare Minima. Fast immer liegen Bewegungen im ns-Bereich mit Korrelationszeiten τ_s von ca. 1.0 bis 8.0 ns vor, wobei der Fehler naturgemäß mit der Größe von τ_s zunimmt (Abb.3.10). Ihr Ordnungsparameter S_s^2 ist maßgeblich für die starke S^2 -Reduktion verantwortlich und sinkt bis auf 0.5 ab (Gly32, Thr61, Asp81). An den Grenzen der flexiblen Bereiche verschwindet die Amplitude der Nanosekunden-Bewegungen (d.h. $S_s^2 \mapsto 1$), während sich die Ordnungsparameter S_f^2 der lokal überlagerten schnelleren Pikosekunden-Bewegungen hier wieder an den globalen Ordnungsparameter S^2 (aus Modell 1) annähern. Sowohl S_s^2 als auch S_f^2 zeigen über die flexiblen Bereiche die für S^2 besprochenen Trends. Die *maximale* Amplitude ist dabei fast immer größer für die langsameren ns-Bewegungen, d.h. $S_{s,\min}^2 < S_{f,\min}^2$. Nur am C-Terminus ist die ns-Beweglichkeit deutlich eingeschränkter als die schnellere ps-Beweglichkeit.

(■) τ_s [ns], (□) $\Delta_{\text{Austausch}}$ [Hz]

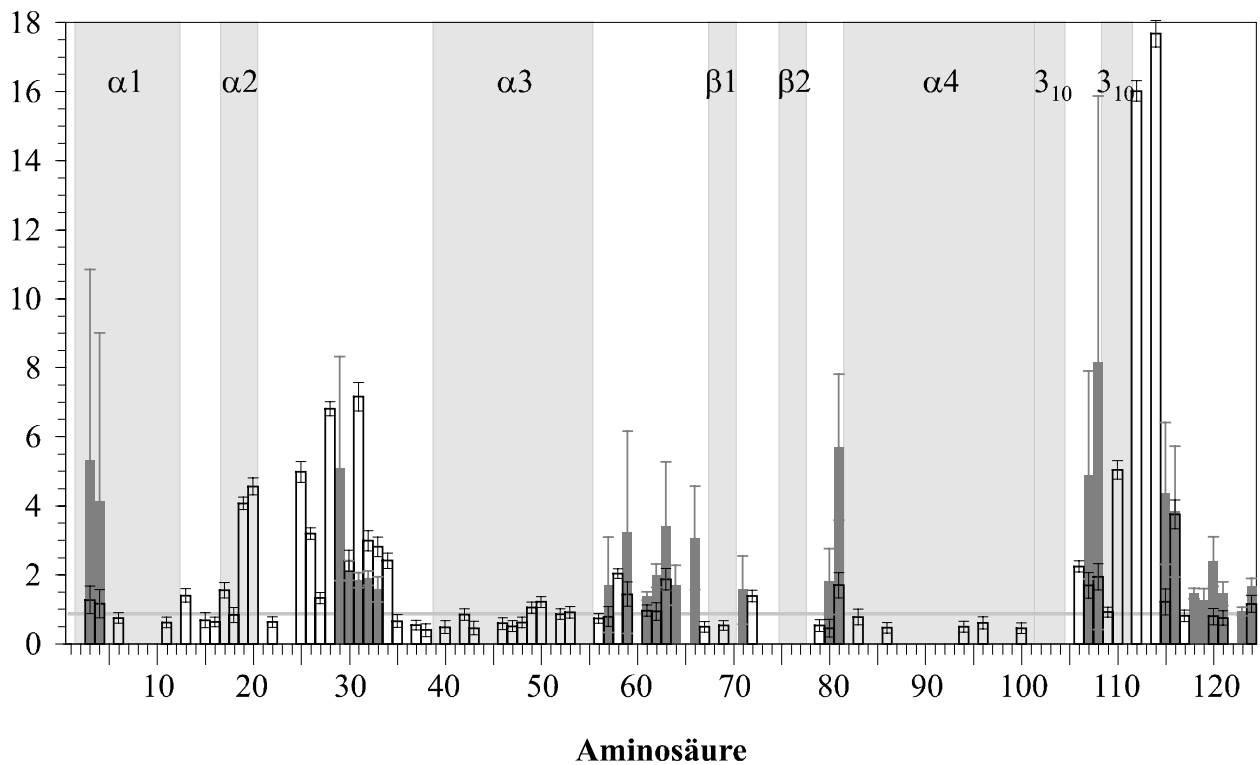


Abb.3.10 Sequentieller Verlauf der Nanosekunden-Korrelationszeiten τ_s (■) und der $\Delta_{\text{Austausch}}$ -Beiträge (□), in Hz, bezogen auf eine Feldstärke von 750 MHz). Die horizontale Linie bei 0.8 Hz entspricht dem $\Delta_{\text{Austausch}}$ -Mittelwert über Helices α_1 , α_3 und α_4 .

Auch bei Berücksichtigung anisotroper Molekülrotation benötigt die Mehrheit (65 von 110) der bewerteten Reste $\Delta_{\text{Austausch}}$ -Korrekturen zu R_2 (Abb.3.10) mit einem Maximalwert von 17.7 Hz (Asn114, alle Angaben gelten bezüglich einer Feldstärke von 750 MHz). 39 Reste weisen $\Delta_{\text{Austausch}}$ -Beiträge größer als der Mittelwert von 0.8 Hz über Helices α_1 , α_3 und α_4 auf; für 17 Reste ist $\Delta_{\text{Austausch}} > 2$ Hz. Diese signifikanten $\Delta_{\text{Austausch}}$ -

Beiträge (> 0.8 Hz) treten fast überall dort auf, wo auch ns-Beweglichkeit beobachtet wurde:

- am N-Terminus zu Beginn von Helix $\alpha 1$ (Val3 - Asn4)
- verbreitet im gesamten Bereich zwischen Helizes $\alpha 1$ und $\alpha 3$; sowohl Helix $\alpha 2$ als auch der überwiegende Teil der Ca^{2+} -bindenden Schleife (Gly25 – Gly34) weisen dabei hohe $\Delta_{\text{Austausch}}$ -Beiträge bis 4.5 bzw. 7 Hz auf
- innerhalb Helix $\alpha 3$ vor allem an Cystinen (Arg42, Cys49, Cys50) sowie am C-terminalen Ende der Helix (Lys52, Arg53)
- zu Beginn (Arg57 – Phe63) und am Ende (Asp81) des *surface loop* sowie zwischen den zentralen β -Strängen (Gly72)
- im C-terminalen Bereich nach dem ersten 3_{10} -Motiv bis Cys117 (Asn106 – CYS117) und am C-terminalen Cys124; unmittelbar nach dem zweiten 3_{10} -Motiv erreichen dabei die $\Delta_{\text{Austausch}}$ -Beiträge ihr absolutes Maximum um 17.5 Hz (Asn114)

Die verbleibenden 25% aller Reste mit geringen $\Delta_{\text{Austausch}}$ -Beiträgen (< 0.8 Hz) erweitern z.T. diese Bereiche. Daneben treten sie gehäuft in Helix $\alpha 3$ und vereinzelt in den Helizes $\alpha 1$ und $\alpha 4$ auf.

3.3.6 Bewertung der $\Delta_{\text{Austausch}}$ -Linienverbreiterungen

Das verbreitete Auftreten von $\Delta_{\text{Austausch}}$ -Beiträgen in hnps-PLA2 (ca. 60% aller Reste sind hiervon betroffen) ist bemerkenswert. Während die Beiträge in vielen Fällen signifikant sind, stellt sich für geringfügige $\Delta_{\text{Austausch}}$ -Beiträge (beispielsweise weist jede vierte erfaßte Aminosäure Linienverbreiterungen unter 0.8 Hz auf) die Frage, ob diese Korrekturterme real sind.

$\Delta_{\text{Austausch}}$ -Beiträge kompensieren für kürzere T_2 -Zeiten als aus den Modellrechnungen erwartet. Die bei T_2 -Messungen primär zu befürchtende unbemerkte Probenerwärmung würde jedoch zu verlängerten T_2 -Zeiten führen. Ein Beitrag formell unberücksichtigter Relaxationsmechanismen (Beimischung von Kreuzkorrelation und Antiphase-Relaxation, vgl. 1.9.6) ist denkbar, erscheint aber vernachlässigbar angesichts der identischen Aufnahmeparameter wie für HNL, wo kein verbreitetes Auftreten von $\Delta_{\text{Austausch}}$ -Beiträgen beobachtet wurde. Dies spricht auch gegen mögliche Geräteinstabilitäten als Quelle von T_2 -Artefakten. Jeder apparative und experimentelle Fehler hätte außerdem auf den drei verwendeten Spektrometern gleichermaßen auftreten müssen, um unbemerkt zu bleiben bzw. sich nicht weitgehend herauszumitteln. Zur Vermeidung unterschiedlich starken

Sättigungstransfers von H₂O auf die Amidprotonen wurde die Inversionsbandbreite der H^N-selektiven Inversionspulse auf die verschiedenen Feldstärken umgerechnet. Zusammenfassend sind größere experimentelle Fehler also wenig wahrscheinlich.

Die explizite Berücksichtigung anisotroper Molekülrotation konnte die Häufigkeit und mittlere Größe der $\Delta_{\text{Austausch}}$ -Korrekturen deutlich reduzieren (vgl. 3.3.4). Insofern könnten geringfügige $\Delta_{\text{Austausch}}$ -Beiträge Rechenartefakte darstellen, die auf der Ungenauigkeit des aus der stellenweise schlecht definierten und offensichtlich hochdynamischen Struktur berechneten Rotationsdiffusionstensors beruhen. Für eine präzisere Berechnung des Rotationsdiffusionstensors müßte dieser für *jede denkbare* Orientierung flexibler Bereiche einzeln berechnet und anschließend über alle Konformationen gemittelt werden. Der Rechenaufwand für dieses Mittelungsverfahren ist angesichts der hohen Zahl konformativer Freiheitsgrade für hnp-PLA2 unrealistisch. Die Alternative, die Struktur um die ungeordneten Bereiche zu kürzen und den Rotationsdiffusionstensor nur für den verbleibenden starren Kern des Proteins zu berechnen, ist wegen der Verbreitung von Flexibilität hier ebenfalls nicht durchführbar. Obgleich also eine höhere Präzision der hydrodynamischen Rechnungen für hnp-PLA2 kaum erreichbar erscheint, kann aus einem anderen Grund wohl ausgeschlossen werden, daß Anisotropie-Artefakte wesentlich sind: von den beiden parallelen Helizes $\alpha 3$ und $\alpha 4$ weist nur Helix $\alpha 3$ verbreitet geringe $\Delta_{\text{Austausch}}$ -Beiträge auf; Anisotropie-Artefakte müßten wegen der Parallelität aber für beide Helizes gleichermaßen auftreten.

Eine Aggregation von hnp-PLA2 (mit entsprechend verlängerter molekularer Korrelationszeit) würde zwar die T₂-Relaxation beschleunigen, beeinflusst aber gleichermaßen die anderen gemessenen Relaxationsraten (T₁, NOE). Falls die Aggregation jedoch innerhalb des kritischen μs - bis ms -Zeitfensters reversibel abläuft, könnten diese intermolekularen Austauschprozesse das Auftreten der beobachteten $\Delta_{\text{Austausch}}$ -Beiträge erklären.

Geringfügige $\Delta_{\text{Austausch}}$ -Beiträge können auch durch eine Unterschätzung des Betrages der CSA-Kopplungskonstanten verursacht werden. Die vorliegenden Auswertungen wurden mit einer ¹⁵N-CSA von einheitlich -170 ppm durchgeführt, die gegenüber einer Vergleichsrechnung mit -160 ppm eine deutliche Reduktion des mittleren $\Delta_{\text{Austausch}}$ -Beitrags über alle Sekundärstrukturbereiche um ca. 30% und eine geringe Reduktion der Fehlerquadrat-Summe ergab. Die gewählte einheitliche ¹⁵N-CSA-Konstante von -170 ppm liegt bereits am oberen Ende der literaturverwendeten Werte [69]. Die *individuelle* Anpassung der ¹⁵N-CSA-Konstanten einzelner Reste konnte in der vorliegenden Arbeit nicht mehr durchgeführt werden (vgl. 1.11.6).

Aus Gründen der Unsicherheit in der angenommenen ^{15}N -CSA-Konstanten sowie nicht auszuschließender höherer Meßfehler als angenommen erscheint es unsicher, geringfügige $\Delta_{\text{Austausch}}$ -Beiträge ohne weitere dynamische Hinweise (z.B. eindeutige Trends) einzeln zu interpretieren. In Verlängerung von Bereichen mit hohen $\Delta_{\text{Austausch}}$ -Beiträgen können so auch die geringfügigen Beiträge akzeptiert werden, wohingegen isolierte kleine $\Delta_{\text{Austausch}}$ -Beiträge (vor allem in den Helizes) nicht überbewertet werden sollten. Als Signifikanzgrenze, unterhalb derer $\Delta_{\text{Austausch}}$ -Beiträge als unsicher angesehen werden, wird nachfolgend der Mittelwert über Helizes $\alpha 1$, $\alpha 3$ und $\alpha 4$ von 0.8 Hz angenommen. Vor einer weitergehenden Analyse sollten die $\Delta_{\text{Austausch}}$ -Beiträge genauer nachgemessen werden (beispielsweise über $T_{1\rho}$ -Meßreihen) und die ^{15}N -CSA-Konstanten einzeln optimiert werden.

Anders als für die Indikatoren schneller *intramolekularer* Bewegungen – Ordnungsparameter S^2 und lokale Korrelationszeiten τ_s – ist die Interpretation von $\Delta_{\text{Austausch}}$ -Beiträgen mehrdeutig. Sie können ebenfalls auf *intramolekularen* konformativen, aber auch auf *intermolekularen* chemischen Austauschprozessen (wie z.B. reversible Aggregation) beruhen. Letztere Möglichkeit muß also ausgeschlossen sein, um $\Delta_{\text{Austausch}}$ -Beiträge eindeutig als Indikatoren für Proteinflexibilität interpretieren zu können.

Das Auftreten von Dimeren in den Kristallstrukturen verwandter PLA2 legt auch für hnp-PLA2 die Möglichkeit zur Dimerisierung nahe. Die Bereiche mit $\Delta_{\text{Austausch}}$ -Auftreten fallen z.T. mit der für hnp-PLA2 abgeleiteten Dimerisierungsseite zusammen. Diese Bereiche sind gleichzeitig aber auch weitgehend unstrukturiert und vermutlich hochflexibel, was die aufgefundenen $\Delta_{\text{Austausch}}$ -Beiträge ebenfalls erklären würde. Es konnten auch keine intermolekularen NOE-Kontakte aufgefunden werden, die auf Aggregation hinwiesen. Die aus den Relaxationsdaten berechnete kurze Rotationskorrelationszeit von 5.2 ns entspricht nach Gl.1.114 einer kompakten Kugel mit ca. 20 Å Radius, in Übereinstimmung mit *monomerer* hnp-PLA2. Die Bereiche mit hohen $\Delta_{\text{Austausch}}$ -Beiträgen korrelieren ebenfalls auffallend gut mit den lokalen RMSD-Werten der Lösungsstruktur.

Die experimentellen Daten sprechen also gegen die Annahme von reversibler Aggregation als Ursache der beobachteten $\Delta_{\text{Austausch}}$ -Beiträge. Diese können daher mit hoher Wahrscheinlichkeit als Indikatoren *intramolekularer* Proteinflexibilität im μs - bis ms -Zeitbereich interpretiert werden. Engültig auszuschließen ist Aggregation als Ursache der Linienverbreiterung, wenn die Messung der T_2 -Zeiten bei verschiedenen Protein-Konzentrationen keine Konzentrationsabhängigkeit aufweist. Diese Beweisführung war jedoch mangels verfügbarer Proteinmengen nicht mehr möglich.

3.3.7 Beschreibung der Dynamik des Proteinrückgrats

Die Dynamik des Proteinrückgrates von hnpS-PLA2 wurde bei 309.8 ± 0.5 K über ^{15}N -Relaxationsmessungen experimentell erfaßt. In Übereinstimmung mit der hohen Asymmetrie der Proteinstruktur (Trägheitstensor-Achsenverhältnis 1.00:1.75:2.14) lieferte die Berücksichtigung anisotroper Molekülrotation eine deutlich bessere Anpassung der Relaxationsdaten als die isotrope modellfreie Auswertung. Die isotrop gemittelte Korrelationszeit der anisotropen Molekülrotation von $\tau_{\text{R,iso}} = 5.2 \pm 0.05$ ns stimmt dabei weitgehend mit der optimierten Rotationskorrelationszeit bei angenommen isotroper Molekülbewegung überein. Der Rotationsdiffusionstensor weist eine niedrigere Anisotropie als der Trägheitstensor auf (Achsenverhältnis ca. 1.00:1.15:1.50), wobei möglicherweise hohe Unsicherheiten aufgrund der unbestimmten Orientierung der ausgedehnten ungeordneten Bereiche in hnpS-PLA2 berücksichtigt werden müssen.

Nach den vorliegenden Relaxationsdaten zeigt hnpS-PLA2 große Beweglichkeit in den beiden NMR-erfaßbaren Zeitfenstern im Piko- bis Nanosekundenbereich (nachfolgend ps- bzw. ns-Bereich) und im Mikro- bis Millisekundenbereich (nachfolgend ms-Bereich). Diese Flexibilität wird erwartungsgemäß vor allem in den ausgedehnten ungeordneten Bereichen des Proteins beobachtet und korreliert sehr gut mit den lokalen RMSD-Abweichungen der berechneten Struktur. Abb.3.11 stellt die RMSD-Abweichungen den Ordnungsparametern ($1-S^2$) als Maß für die Amplitude der *schnellen* ps- und ns-Bewegungen und den $\Delta_{\text{Austausch}}$ -Linienverbreiterungen aufgrund von *langsamen* Bewegungen (nachfolgend als ms-Bewegungen bezeichnet) mit Korrelationszeiten um 10^{-6} bis 10^{-1} s gegenüber. Die Abbildungen 3.9, 3.10 und 3.11 illustrieren die nachfolgende Besprechung der Parameter lokaler Dynamik des Proteinrückgrates von hnpS-PLA2.

Helix $\alpha 1$ (L2 – T12) ist in allen erfaßten Zeitbereichen weitgehend starr. Zum N-Terminus hin (V3, N4) steigen die Amplituden von ps- und ns-Bewegungen jedoch an und auch im ms-Zeitbereich tritt Beweglichkeit auf.

Der Bereich zwischen Helizes $\alpha 1$ und $\alpha 3$ (T13 – D38) ist weitgehend ungeordnet bis auf die kurze *Helix $\alpha 2$* (A17 – S20), an die sich die *kalziumbindende Schleife* anschließt. Die Unordnung spiegelt sich in verbreiteter konformativer ms-Beweglichkeit bis einschließlich G34 wieder, die zu großen Linienverbreiterungen bis 7 Hz führt. Hiervon ist in besonderem Maße auch Helix $\alpha 2$ betroffen. Bis einschließlich C28, das mit C44 in Helix $\alpha 3$ verbunden ist, bleiben die Amplituden der ps-Bewegungen hingegen weitgehend so klein wie in den Bereichen mit definierter Sekundärstruktur. Nur E16 vor und L19 in Helix $\alpha 2$ zeigen erhöhte ps-Amplituden. Unmittelbar nach C28 treten ns-Bewegungen

mit hohen Amplituden auf (S_s^2 fällt bis auf 0.5), die bei G34 wieder abgeklungen sind; die ps-Amplituden sind hier ebenfalls uneinheitlich erhöht (S_f^2 fällt bis auf 0.7).

(■) RMSD [\AA], (■) $1-S^2 [\times 10]$, (□) $\Delta_{\text{Austausch}}$ [Hz]

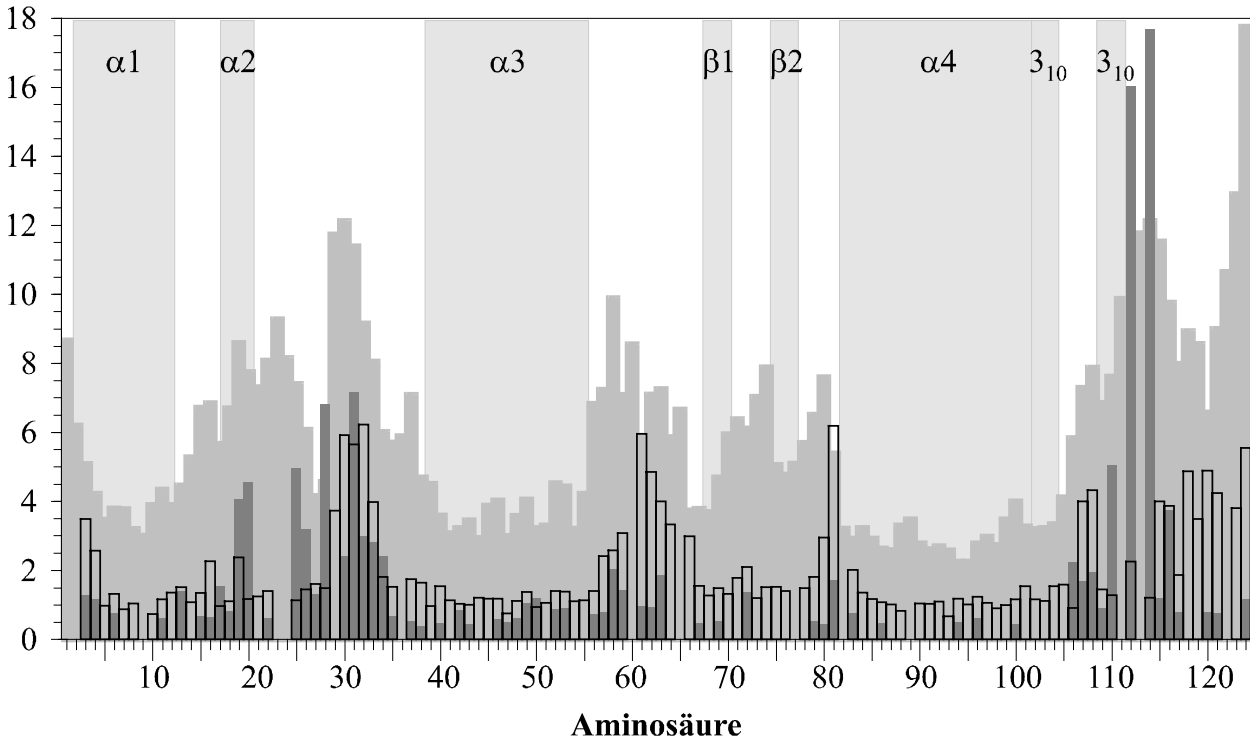


Abb.3.11 Vergleich der strukturellen Definition und lokalen Dynamik für hnpS-PLA2. Die RMS-Abweichungen der ^{15}N -Koordinaten (■, in \AA) sind den Ordnungsparametern, ($1-S^2$), als Maß für die Amplitude der ns-Bewegungen (●, Werte zehnfach vergrößert) und Linienverbreiterungen $\Delta_{\text{Austausch}}$ aufgrund von ms-Bewegungen (■, in Hz) gegenübergestellt. Die Sekundärstrukturelemente sind hellgrau hinterlegt.

Helix $\alpha 3$ zeigt die erwartete Starrheit im ps- und ns-Bereich mit durchweg sehr hohen Ordnungsparametern S^2 um 0.9. Helix $\alpha 3$ zeigt aber verbreitet geringe $\Delta_{\text{Austausch}}$ -Beiträge, die auf ms-Beweglichkeit hinweisen könnten, jedoch außer für C49, C50, K52 und R53 (mit $\Delta_{\text{Austausch}}$ -Beiträgen ≥ 1 Hz) möglicherweise nicht signifikant sind (vgl. 3.6.6).

Der gesamte *surface loop* (K56 – K67) zwischen Helix $\alpha 3$ und dem $\beta 1/\beta 2$ -Faltblatt zeigt erhebliche Beweglichkeit im ps- und ns-Bereich. Sowohl ps- als auch ns-Amplituden durchlaufen in der Mitte dieses Schleifenbereiches bei T61 ausgeprägte Maxima, wobei das Maximum der ns- größer als das der ps-Amplitude ist ($S_s^2 = 0.56$ und $S_f^2 = 0.73$). Bis F63 sind auch ms-Bewegungen mit Linienverbreiterungen bis 2 Hz überlagert.

Das antiparallele $\beta 1/\beta 2$ -Faltblatt (F68 – N70 und I75 – C77) zeigt wiederum Starrheit in allen erfaßten Zeitbereichen. Der *turn*-Bereich (S71 – R74) weist zu Beginn geringfügige ns- und ms-Beweglichkeit auf.

Im Anschluß an das Faltblatt nimmt die Beweglichkeit in allen Zeitbereichen bis D81 unmittelbar vor Beginn der α 4-Helix deutlich zu; die ns-Amplitude erreicht hier ihr globales Maximum ($S_s^2 = 0.5$). Im ps-Bereich reicht die erhöhte Beweglichkeit bis in *Helix α 4* (S82 – N101) hinein; erst ab S85 sind die ps-Amplituden auf die typischen Minimalwerte abgeklungen ($S^2 \geq 0.9$). Vereinzelt Linienverbreiterungen durch ms-Beweglichkeit sind höchstens für C83 signifikant. Im Übergang (N101) zum direkt anschließenden 3_{10} -Motiv (K102 – T104) und an dessen Ende können minimal erhöhte ps-Amplituden beobachtet werden.

Der weitgehend unstrukturierte C-terminale Bereich von hnps-PLA2 (Y105 – C124) weist wiederum erhebliche Beweglichkeit in unterschiedlichen Zeitbereichen auf. Zunächst treten bei K107 und K108 ns-Bewegungen mit hoher Amplitude auf. Das anschließende zweite 3_{10} -Motiv (Y109 – Y111) ist im schnellen Zeitbereich hingegen starr. Die ps-Amplitude steigt bei Y112 erneut an, ist aber bei N114 wieder fast abgeklungen. Erst danach nimmt die ps-Amplitude bis zum C-Terminus kontinuierlich zu (S_f^2 fällt bis 0.65) mit Ausnahme von R123, wo eine deutliche Dämpfung zu erkennen ist. Nach N114 tritt auch vorübergehend starke ns-Beweglichkeit auf, die bei C117 wieder abgeklungen ist. Ab R118 beobachtet man bis zum C-Terminus erneut ns-Beweglichkeit mit oszillierender Amplitude, die nie mehr die ps-Amplitude übersteigt. Verbreitet ist im C-terminalen Bereich ms-Beweglichkeit überlagert: Die $\Delta_{\text{Austausch}}$ -Verbreiterungen steigen ab N106 nahezu kontinuierlich, erreichen bei N114 ein absolutes Maximum von 17.7 Hz und fallen dann bis C117 wieder auf den Signifikanzwert von 0.8 Hz. Bis zum C-Terminus treten danach nur noch vereinzelt geringe $\Delta_{\text{Austausch}}$ -Beiträge auf, die für C124 wieder 1.2 Hz erreichen.

3.3.8 Interpretation der Dynamik von hnps-PLA2

Bislang wurde mangels experimenteller dynamischer Daten davon ausgegangen, daß die Proteine der PLA2-Familie eher starr sind [171, 173, 176]. Als Beweis dafür galt die hohe Anzahl Cystine, die tatsächlich auch zu einer hohen Stabilität der Enzyme gegenüber denaturierenden Bedingungen führt. Durch die in dieser Arbeit durchgeführten ^{15}N -Relaxationsmessungen wird das Bild eines starren Proteines für hnps-PLA2 erstmals experimentell widerlegt.

Die beschriebene Dynamik des Proteinrückgrats von hnps-PLA2 (Kapitel 3.6.8) steht in auffallendem Zusammenhang mit struktureller Unschärfe (Abb.3.10) und läßt sich durch strukturelle Gegebenheiten erklären bzw. untermauert sie. In Abb.3.12.a sind die Ampli-

tuden schneller Bewegungen ($1-S^2$), in Abb.3.12.b die Linienverbreiterungen aufgrund lokaler ms-Beweglichkeit auf die minimierte gemittelte Lösungsstruktur von hnpS-PLA2 projiziert. Die dynamischen Bereiche können in räumlichen Zusammenhang gebracht werden und liefern Hinweise auf den Funktionsmechanismus des Enzyms und eine mögliche Erklärung für die beobachtete interfaziale Aktivierung. Die Dynamik kann außerdem die geringen Unterschiede zwischen Lösungsstruktur, Kristallstruktur und Komplexstruktur erklären (s.u.).

Im Gegensatz zur Kristallstruktur [173] ist der N-Terminus in Lösung ungeordnet und N1 partizipiert nicht am Wasserstoff-Brückennetz, das den lipophilen Kanal durchzieht. Dies wird durch die starke Zunahme von ps- und ns-Bewegungsamplituden und das Auftreten von ms-Beweglichkeit am N-terminalen Ende von Helix $\alpha 1$ bis hin zu F5 bestätigt.

Die kurze Helix $\alpha 2$ ist strukturell viel schlechter definiert als für die übrigen Helizes. Entsprechend findet man, daß Helix $\alpha 2$ erhebliche ms-Beweglichkeit aufweist, die sich fast in der gesamten nachfolgenden Ca^{2+} -bindenden Schleife fortsetzt. Möglicherweise stellen beide Bereiche in diesem Zeitfenster eine schwingende Einheit dar. Die Komplexstruktur zeigt, daß Helix $\alpha 2$ bei der Bindung von Substrat ausweichen muß, um die Seitenkette von E16 in eine neue Position rotieren zu lassen [173]. Die beobachtete Beweglichkeit ist hierfür sicher mit entscheidend.

Die schnelle Beweglichkeit der Ca^{2+} -bindenden Schleife erreicht erst hinter Cystein C28 hohe Amplituden. Das Cystin C28–C44 stellt offensichtlich eine wirksam dämpfende Verankerung des nachfolgenden, rasch beweglichen Schleifenteils an der starren Helix $\alpha 3$ dar. In diesem Zusammenhang ist interessant, daß von allen Cys-Ala-Mutanten nur die C28A-C44A-Mutante in bp-PLA2 reduzierte Aktivität aufweist [189]. Wie auch die lokale Dynamik andeutet, kann die Nähe der Ca^{2+} -bindenden Reste (H27, G29, G31) an die katalytische Diade (H47, D91) ohne dieses klammernde Cystin nicht gewährleistet werden. Die verbreitete langsame ms-Beweglichkeit wird andererseits durch C28 nicht erkennbar gedämpft, wobei eine quantifizierende Aussage über ihre Amplitude unmöglich ist.

Die verbreiteten geringfügigen Linienverbreiterungen in Helix $\alpha 3$ könnten auf Helix-Schwingungen im ms-Zeitbereich beruhen [37, 89], wenn man unterstellt, daß ihr Betrag (0.5 – 0.8 Hz) signifikant ist. Das Auftreten von ms-Beweglichkeit bei C49–C124 und C50–C90 könnte auf die gehinderte Rotation der Disulfidbrücke zurückzuführen sein [93–96], die für die beiden anderen Cysteine in Helix $\alpha 3$ (C43–C97 und C44–C28) aber nicht zu signifikanten Linienverbreiterungen führt. Es ist ebenso denkbar, daß sich über das Cystin C49–C124 die erhöhte Beweglichkeit des C-Terminus überträgt (vgl. HNL, 2.5.6).

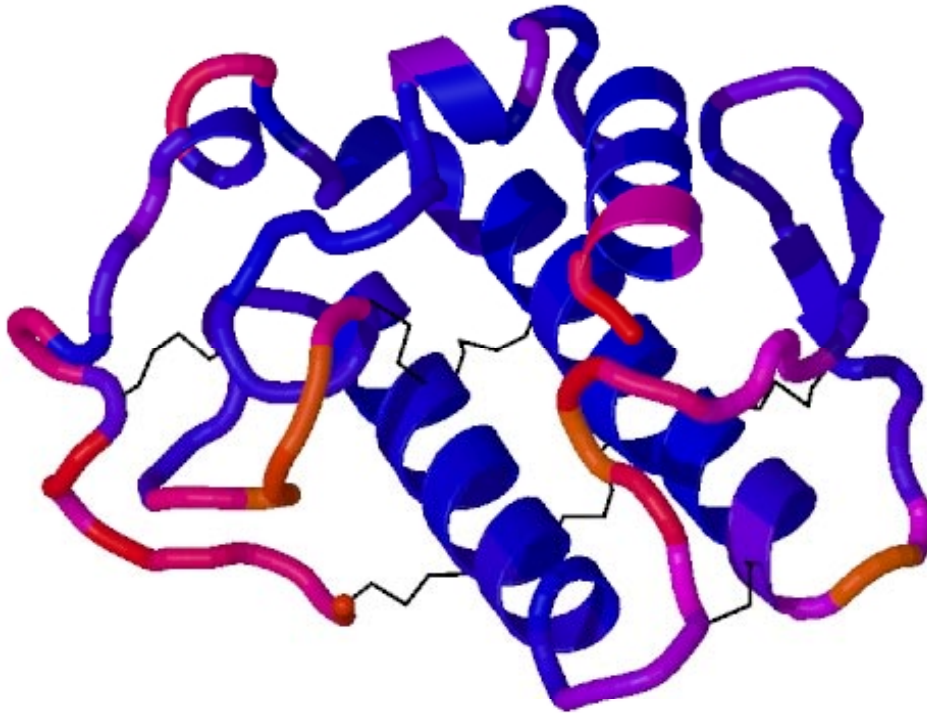


Abb.3.12.a Projektion des generalisierten Ordnungsparameters S^2 auf die Struktur von hnpS-PLA2 (mit eingezeichneten Cystinen). Mit der Farbtiefe nimmt die schnelle Bewegungsamplitude ($1-S^2$) zu. Zur besseren Erkennung von Trends wurden die Werte für fehlende Reste linear interpoliert.

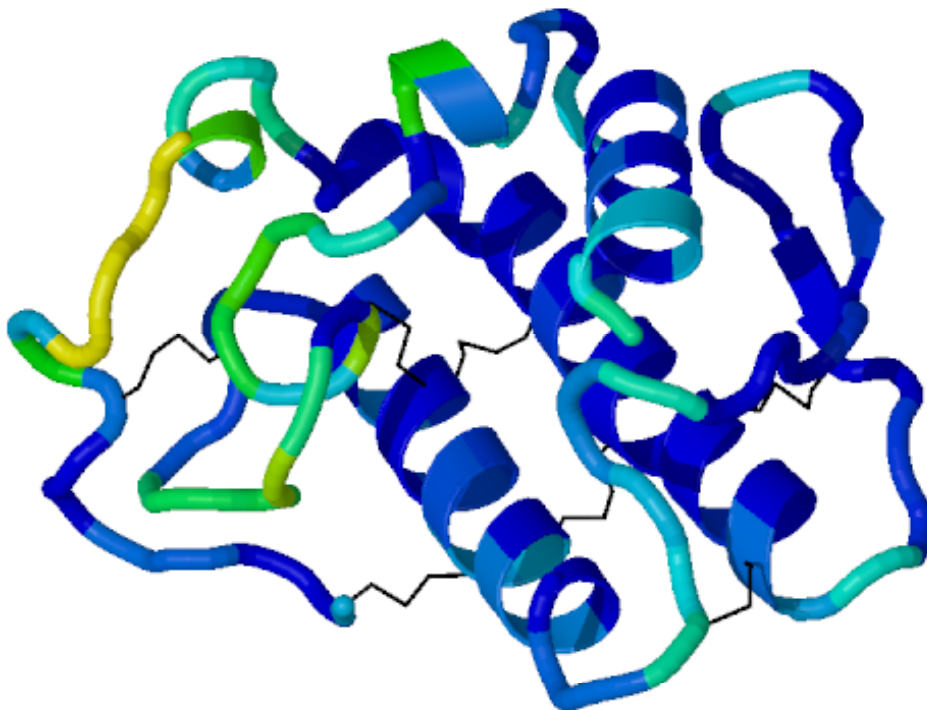


Abb.3.12.b Projektion der Linienverbreiterung $\Delta_{\text{Austausch}}$ durch langsame konformative Bewegungen auf die Struktur von hnpS-PLA2 (mit eingezeichneten Cystinen). Mit der Farbtiefe nimmt $\Delta_{\text{Austausch}}$ exponentiell zu. Zur besseren Erkennung von Trends wurden die Werte für fehlende Reste linear interpoliert.

Das antiparallele $\beta 1/\beta 2$ -Faltblatt zeigt in allen untersuchten Zeitfenstern die für Sekundärstrukturen erwartete geringe Flexibilität. Strukturell ist es ebenfalls gut definiert (niedrige RMSD-Werte, vgl. Abb. 3.11) und NOE-Kontakte zu Helizes $\alpha 1$ und $\alpha 4$ fixieren seine Lage parallel zum lipophilen Kanal. Diese Starrheit und definierte Lage des Faltblattes stehen im Kontrast zum umgebenden strukturlosen ausgedehnten Schleifenbereich zwischen Helizes $\alpha 3$ und $\alpha 4$. So tritt beiderseits des Faltblattes ns-Beweglichkeit auf, deren Amplituden auf die für hmps-PLA2 beobachteten Maximalwerte steigen. Zusätzlich ist hier ms-Beweglichkeit überlagert. Auch der kurze Schleifenbereich zwischen den beiden Strängen $\beta 1$ und $\beta 2$ zeigt in geringerem Ausmaß diese überlagerten Beweglichkeiten. Diese Beweglichkeit kann die im endgültigen Struktursatz beobachtete Streuung der Schleife zwischen paralleler und senkrechter Orientierung bezüglich des Faltblattes gut erklären.

Im C-terminalen Bereich nach Helix $\alpha 4$ sind die beiden 3_{10} -helikalen Motive auch im lokalen Verschwinden schneller Beweglichkeit erkennbar. In diesem Bereich wird das auxiliäre zweite Ca^{2+} -Ion durch Y112 und N114 gebunden. Weitere Liganden sind F23 und G25, die durch das Cystin C117–C26 in räumlicher Nähe gehalten werden. Alle 4 Liganden und das Cystin sind im schnellen Zeitbereich weitgehend starr, obgleich zwischen N114 und C117 ns-Bewegungen auftreten. Im ms-Zeitbereich sind diese Bindungsstellen aber weitgehend hochbeweglich mit vermutlich großen Amplituden. Auch diese Bewegungen werden durch das Cystin C117–C26 begrenzt, das damit dynamisch und strukturell eine ähnliche Rolle spielen dürfte wie Cystin C28–C44 in der Ca^{2+} -bindenden Schleife (s.o.). Nach C117 wird die zu erwartende freie Beweglichkeit des C-Terminus durch das C-terminale Cystin C124–C49 begrenzt. Die Beweglichkeit im ms-Zeitbereich ist stark eingeschränkt und auch die ns-Bewegungen haben nur vergleichsweise kleine Amplituden. Das C-terminale Cystin überträgt möglicherweise einen Teil dieser gedämpften Bewegungen auf Helix $\alpha 3$, wo um C49 erhöhte ms-Beweglichkeit beobachtet wird.

3.3.9 Dynamischer Erklärungsversuch der interfazialen Aktivierung

Das bemerkenswerteste Detail bei der Betrachtung der räumlichen Verteilung der Dynamik ist die hohe ns-Beweglichkeit der Ca^{2+} -bindenden Schleife und des räumlich benachbarten *surface loop* (Abb.3.12.a). Beide Bereiche liegen wie Pforten am Eingang des lipophilen Kanals, der der Aufnahme des Substrates dient. In der NMR-Struktur sowie in der sehr ähnlichen Kristallstruktur der freien hmps-PLA2 [173, 174] erscheinen diese Pforten geschlossen und verengen die Öffnung des lipophilen Kanals, so daß der

Substratzutritt behindert wird. Im Komplex mit einem Inhibitor erscheint die Öffnung jedoch aufgeweitet ^[173] und insbesondere für K62, das exponiert in der Mitte der Pforte des *surface loop* liegt, wird eine hohe Änderung der Position zwischen freier und inhibierter hns-PLA2 beobachtet.

Diese Beobachtungen korrelieren auffallend mit der ermittelten Dynamik von hns-PLA2, die für die Pforten des lipophilen Kanals ns-Bewegung (und möglicherweise auch überlagerte langsame konformative Bewegungen) mit hohen Amplituden offenbart. Dadurch können die Pforten in der Tat weit aufschwingen, wodurch der Substratzutritt erleichtert würde. Das hier NMR-spektroskopisch nachgewiesene Auf- und Zuklappen der Pforten geschieht in Lösung jedoch zufällig und asynchron, weshalb der Substratzutritt weiterhin behindert ist. Erst bei der Bindung an die Membranoberfläche kann man erwarten, daß die zufällige Pfortenbewegung unterbunden wird und beide Pforten offensichtlich in geöffneter Position arretiert werden. Dieses Modell würde die beobachtete interfaziale Aktivierung erklären.

Es existieren noch keine Strukturen der membrangebundenen hns-PLA2, und auch die Komplexstruktur mit einem Inhibitor ^[173] ist nicht maßgeblich zur Überprüfung der These, daß die Pforten beim Membrankontakt aufgespreizt werden. Für die funktional verwandten Lipasen, die ebenfalls interfaziale Aktivierung zeigen, existiert jedoch eine Struktur des Co-Kristallisats aus Lipase, Procolipase (einem essentiellen Aktivator) und gemischten Phosphatidyl-Gallensäure-Mizellen ^[200]. In den freien Lipasen wird die katalytische Triade (Asp-His-Ser) von einer Helix auf der Proteinoberfläche effektiv abgeschirmt. Diese Helix verändert an der Mizelle ihre Lage derart, daß nun die katalytische Triade gegenüber dem aggregierten Substrat frei zugänglich wird (die "geöffnete" Konformation kann alternativ durch Procolipase stabilisiert werden). In einer erst kürzlich publizierten NMR-spektroskopischen Untersuchung der Dynamik der Lipase *Cutinase* ^[201] konnte die langsame konformative Beweglichkeit der Verschluß-Helix, aber auch der Oxyanion-Bindungsstelle und aktiven Triade nachgewiesen werden. Das Zeitfenster der Helix-Bewegungen (μs bis ms) korrespondiert dabei mit der Kinetik der Hydrolyse-Reaktion, so daß die Helix-Schließbewegung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der *Cutinase*-Aktivität sein könnte. Allerdings kann für *Cutinase* aus der ermittelten Dynamik im Gegensatz zur vorgestellten Arbeit an hns-PLA2 keine direkte Erkenntnis über den Mechanismus der interfazialen Aktivierung gewonnen werden, da dieses Phänomen bei *Cutinase* gerade *nicht* beobachtet wird.

4. Struktur der N-terminalen Domäne von VAT (VAT-N)

4.1 Biochemischer Hintergrund

4.1.1 Die Familie der AAA-Proteine

VAT (*VCP-like ATPase of thermoplasma*; VCP, das *valosine-containing protein*, ist auch als p97 bekannt) [202] gehört zur erst kürzlich entdeckten AAA-Unterfamilie (*ATPases associated with a variety of cellular activities*) der ATPasen. ATPasen sind Enzyme, die durch Hydrolyse von ATP (*Adenosintriphosphat*) chemisch gespeicherte Energie in biologische Aktivität umsetzen können. Die Proteine der AAA-Familie spielen in vielfältigen zellbiologischen Prozessen Schlüsselrollen [203], so z.B. bei der Membranfusion und Organellenbiosynthese, beim Aufbau des Spindelapparates während der Meiose und dem Abbau der Mikrotubuli, bei der Substraterkennung und -entfaltung am Proteasom und beim Proteinabbau durch andere Metalloproteasen. Tab.4.1 listet die wichtigsten AAA-Vertreter und ihre bislang bekannte biochemische Funktion auf.

Das Erkennungsmerkmal der AAA-Proteine ist eine hochkonservierte Region von ca. 230 Aminosäuren, die sog. AAA- oder CAD-Domäne [204]. Sie enthält je ein Walker-Motiv A und B [205], die für diese Vertreter der ATPasen mit P-Schleife charakteristisch und für die ATP-Bindung verantwortlich sind. Die AAA-Proteine enthalten entweder eine (Typ I) oder zwei (Typ II) AAA-Domänen. Die Protein-Protein-Wechselwirkung scheint jedoch maßgeblich über eine weitere N-terminale Domäne zu verlaufen, die keine ATPase-Aktivität zeigt und zumindest innerhalb der Typ II AAA-Proteine eine entfernte Verwandtschaft und strukturelle Ähnlichkeit aufweist [206].

AAA-Protein zeigen eine ausgeprägte Neigung zur Oligomerisierung und bilden dabei typischerweise hexamere Ringe, wie z.B. NSF (*N-ethylmaleimide sensitive fusion protein*) [207-209], p97 [210], Cdc48 [211] und auch VAT [202, 212]. Die hexamere Ringstruktur erinnert an das bakterielle GroEL-Chaperonin, und einige AAA-Proteine sind tatsächlich am Zusammenbau von Proteinen bzw. der Zerlegung von Proteinkomplexen beteiligt. Demnach kann die nach wie vor ungeklärte gemeinsame Funktion des AAA-Motivs (neben der ATP-Bindung) möglicherweise in der Entfaltung von Proteinen bestehen.

Tab.4.1 Wichtige Vertreter der AAA-Proteinfamilie und ihre biochemische Funktion [203].

AAA-Protein *)	Funktion
NSF (II)	beteiligt an Docking und Fusion aller zellulären Vesikelfusionen
SEC18 (II)	intrazellulärer Vesikeltransport, NSF-assoziiert
CDC48 (II)	ER-Membranfusion
p97, VCP (II)	Fusion von Golgi-Membranen
PEX1 / PAS1 (II)	Biogenese von Peroxisomen
PEX6 / PAS8 (I)	Biogenese von Peroxisomen
VPS4 / END13 (I)	Adressierung/ Transport von Vacuoli/ Endosomen
Sug1p, Sug2p, Yta1p, Yta2p, Yta3p, Yta5p (I)	Untereinheiten der regulatorischen PA700-Strukturen des 26S Proteasoms; Erkennung, Bindung und Denaturierung ubiquitiniertes Substrate
FtsH (I)	bakterielle Zn ²⁺ -abhängige Metalloproteinase; Proteineinbau in Membrane, Proteinexport, Abbau von Transkriptionsfaktoren σ , λ IIC
Yta10p/Afg3p, Yta12/RCA1 (I)	Untereinheiten der Zn ²⁺ -abhängigen Metalloprotease der inneren Membran von Mitochondrien; Zellatmung und Proteinfaltung
Yta11/Yme1/OSD1 (I)	Untereinheiten der Zn ²⁺ -abhängigen Intermembran-Metalloprotease von Mitochondrien; Abbau ungefalteter Cytochromoxidase-Untereinheit II
Yta4/MSP1 (I)	Adressierung von Proteinen in Mitochondrien
VAT (II)	Entfaltung und/oder Abbau von Proteinkomplexen (?)

*) Die nachgestellten Ziffern geben die Zugehörigkeit zum Typ I bzw. II an.

4.1.2 VAT und die N-terminale Domäne VAT-N

VAT [202, 206] ist das 745 Aminosäuren lange archaebakterielle Homologe der Cdc48/p97-Proteine aus *Thermoplasma acidophilum* und hat ein Mg²⁺-abhängiges Aktivitätsoptimum bei ca. 70°C. Wie alle Cdc48/p97-Proteine gehört es zum Typ II der AAA-Proteine, bildet hexamere Ringstrukturen und hat eine 183 Aminosäuren lange N-terminale Erkennungsdomäne (VAT-N), die in dieser Arbeit untersucht wurde. Die Sequenz von VAT-N ist in Abb. 4.1 dargestellt. VAT scheint ebenfalls die gemeinsame Funktion der Cdc48/p97-Proteine bei der Entfaltung und/oder dem Abbau von Proteinkomplexen zu zeigen [206]. Diese Funktion ist mit großer Wahrscheinlichkeit ausschließlich in der hier untersuchten N-terminalen Domäne lokalisiert: VAT-N kann Polypeptide binden, die Proteinaggregation verhindern und die Rückfaltung geeigneter Substrate (z.B. Cyclophillin, β -Lactamase) katalysieren [206].

4.2 Materialien, Methoden und Datenhinterlegung

4.2.1 Materialien

VAT-N von *Thermoplasma acidophilum* wurde am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried im Arbeitskreis von Prof. W. Baumeister durch Dr. Jürgen Peters in *E. coli* exprimiert und gereinigt [202]. Das exprimierte Protein hatte eine um 6 Histidine (histidine tag für die Nickel-affine Aufreinigung) und 2 Glycine C-terminal auf insgesamt 191 Aminosäuren verlängerte Sequenz. NMR-spektroskopisch konnte der histidine tag allerdings nicht mehr aufgefunden werden, so daß das untersuchte Protein nur 185 Aminosäuren - davon 183 Aminosäuren native Sequenz - lang war (vgl. Abb. 4.1).

VAT-Nn	1-5	MESNN
$\beta\alpha\beta\beta_1$	6-48	GIIL R VAE A NST D PGMSR V RL D ESS R RL L D A E I G D V V E I E K V R
$\beta\alpha\beta\beta_2$	49-92	KTV G R V Y R A R P E D E N K G I V R I D S V M R N N C G A S I G D K V K V R K V R T
VAT-Nc	93-183	EIAKKVTLAPIIRKDQRLKFGEGIEEYVQRALIRRPML E QDNISVP GLTLAGQTGLL F K V V K TL P S K V P VE I G E E T K I E I R E E P A S E V L E E (<i>gg</i>)

Abb. 4.1 Aminosäuresequenz der untersuchten VAT-N-Domäne. VAT-N baut sich aus zwei N- bzw. C-terminalen Subdomänen VAT-Nn und VAT-Nc auf (vgl. 4.4.1 und 4.5). VAT-Nn zeigt bei 38% interner Homologie (fett gedruckte Reste) strukturelle Symmetrie in Form zweier $\beta\alpha\beta\beta$ -Motive. Die zwei C-terminalen Glycine (eingeklammert) sind ein *linker*-Konstrukt und entsprechen nicht der natürlichen Sequenz von VAT.

Für die NMR-spektroskopischen Strukturuntersuchungen in unserem Arbeitskreis wurden eine 1.4 mM [U-¹⁵N]-markierte und eine 1.2 mM [U-¹³C, ¹⁵N]-markierte wäßrige VAT-N-Probe benutzt. Der pH-Wert war durch Phosphatpuffer auf 5.9 - 6.0 eingestellt. Die [U-¹⁵N]-markierte Probe wies 40 mM Pufferkonzentration und 80 mM NaCl auf, die [U-¹³C, ¹⁵N]-markierte Probe 100 mM Pufferkonzentration bei 200 mM NaCl (die unterschiedlichen Puffer- und Salzkonzentrationen zeigten keine Auswirkungen auf die chemischen Verschiebungen). Jeweils waren Spuren von NaN₃ zur Probenkonservierung zugesetzt. Die wäßrige Lösung enthielt ca. 10% D₂O.

4.2.2 NMR-spektroskopische Untersuchungen

Alle NMR-spektroskopischen Untersuchungen wurden an DMX-Spektrometern der Firma BRUKER bei Protonenfrequenzen von 600 und 750 MHz durchgeführt. Geräteausstattungen und Spezifizierungen sind im Anhang A zusammengefaßt. Die spektralen Bereiche und gewählten Meßfenster für VAT-N sind in Anhang D.1 zusammengefaßt.

Messungen der Schmelzkurven bestätigten die für thermophile Proteine zu erwartende hohe Temperaturstabilität bis ca. 350 K. Mit steigender Temperatur werden die Relaxationseigenschaften generell immer günstiger, da die molekulare Rotationskorrelationszeit stark sinkt (vgl. Abb.1.8). In einer ^{15}N -HSQC Temperaturreihe zeigte sich jedoch, daß für Temperaturen oberhalb von ca. 325 K rascher $\text{H}^{\text{N}}\text{-H}_2\text{O}$ -Austausch diesen Intensitätsgewinn weitgehend ausgleicht. Zudem wurde bei 321 K die subjektiv günstigste Dispersion des ^{15}N -HSQC beobachtet, so daß 321 K als einheitliche, optimale Meßtemperatur festgelegt wurde.

Ogleich die Linienbreiten und Intensitäten der ^{15}N -HSQC-Ebene bei 321 K eine für Proteine der Größe von VAT-N gewöhnlich nicht zu erwartende Güte hatten, zeigten sich dennoch erhebliche Überlagerungen. Diese konnten nur durch ein gegenüber HNL erweitertes Meßprogramm mit unterschiedlichen Kombinationen der chemischen Verschiebungsdimensionen aufgelöst werden. Ebenfalls wurde die an den HNL-Messungen gemachte Beobachtung berücksichtigt, daß *sensitivity enhancement* im ^{13}C -HSQC die Phasenhomogenität der ^{13}C -Dimension beeinträchtigen kann. Aus diesem Grund sowie wegen der multiplizitätsabhängigen Intensitätsskalierung und der schlechteren Relaxationseigenschaften wurde bei allen ^{13}C -HSQC-detektierenden Experimenten nun auf dieses Modul verzichtet. In Anhang D.2 sind alle an VAT-N durchgeführten NMR-Experimente mit ihren wesentlichen Parametern aufgeführt. Zu den grundsätzlichen Prinzipien und Methoden gelten die für HNL (Kapitel 2.2) gemachten Bemerkungen.

Alle NMR-Experimente und vorläufige Dynamikuntersuchungen wurden in eigener Arbeit durchgeführt. Die spektrale Zuordnung, Auswertung und Berechnung der Struktur erfolgte durch Dr. Murray Coles und Jens Liermann unter Mithilfe von Adriane Gröger.

4.2.3 Datenhinterlegung

Die Daten und Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind vollständig in allgemein zugänglichen Internet-Datenbanken hinterlegt worden. Alle NMR-Daten (zugeordnete chemische Verschiebungen und Relaxationsdaten) sind in der BMRB-Datenbank (*BioMagnetic Research Bank*) der University of Wisconsin (Internet-Adresse: www.bmrb.wisc.edu) unter Zugriffsnummer 4376 archiviert. Die *best-fit* Struktur ist in der PDB-Datenbank (Protein Data Bank) unter Zugriffscode 1CZ4, der endgültige Struktursatz (24 Strukturen) unter Zugriffscode 1CZ5 hinterlegt (Internet-Adresse: www.rcsb.org/pdb/index.html).

Die Ergebnisse der strukturellen Untersuchung von VAT-N wurden publiziert [213].

4.3 Zuordnung der NMR-Resonanzen für VAT-N

4.3.1 Sequentielle Zuordnung (Signalzuordnung für das Proteinrückgrat)

Die sequentielle Zuordnung der NMR-Resonanzen für VAT-N erfolgte nach dem für HNL beschriebenen Prinzip (vgl. 2.3.1) mit Hilfe des Zuordnungsprogrammes PASTA [149]. Zur Erstellung der Pseudorest-Liste wurde ebenfalls ein hochaufgelöstes, gefaltetes ^{15}N -HSQC- und ein HNCO-Spektrum herangezogen. Die maximal zu erwartende Anzahl an Signalen im ^{15}N -HSQC-Spektrum errechnet sich für VAT-N zu:

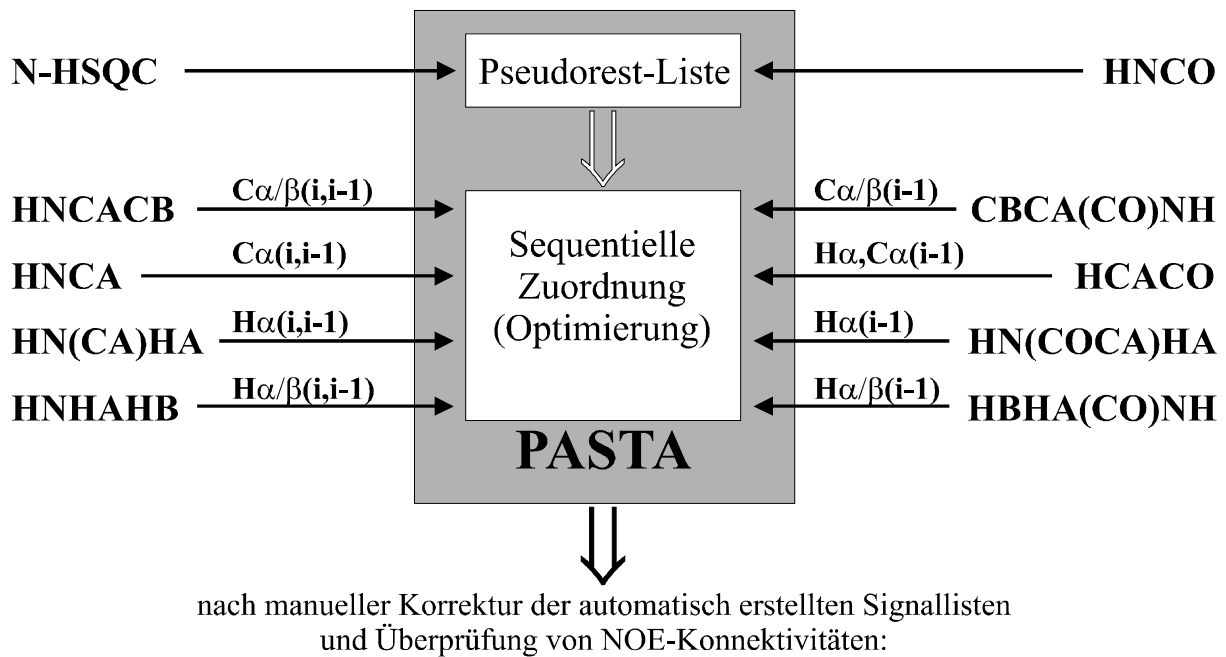
$$185 - 8 (\text{P}) + 16 (4 \text{ Q: NH}_2 + \text{NHD}) + 28 (7 \text{ N: NH}_2 + \text{NHD}) + 19 (\text{R: NH}^\epsilon) = \mathbf{240}$$

wobei vorausgesetzt wurde, daß aufgrund des raschen $\text{H}^{\text{N}}\text{-H}_2\text{O}$ -Austausches weder der N-Terminus noch die 14 Lysin-Seitenketten- H^{N} erfaßbar sind. Aus der automatisch erstellten Pseudorest-Liste wurden die gesondert ermittelten Seitenketten-Resonanzen der Arginine (aus einem für Arg-N^ϵ selektiven ^{15}N -HSQC) und der Asparagine und Glutamine (aus einem multiplizitätsselektiven ^{15}N -HSQC) entfernt.

Trotz der dank hoher Meßtemperatur (321 K) geringen Linienbreite kommt es bei VAT-N aufgrund des häufigen Auftretens von Paaren identischer Aminosäuren (insgesamt 18 Dubletts) und ausgedehnter interner Homologie (vgl. Abb.4.1) zu erheblichen Überlagerungen. Es war deshalb notwendig, das für HNL (vgl. 2.3.1) angewandte Meßprogramm deutlich zu erweitern. Hierzu wurden zusätzlich ein HN(CA)HA, ein HN(CACB)HAHB und ein HBHA(CBCACO)NH-Spektrum aufgenommen, um die sequentielle Information durch Hinzufügen von H_α und H_β zu optimieren. Weiterhin wurde ein HCACO-Experiment aufgenommen, das über die zugeordneten ^{13}CO -Resonanzen die $\text{H}\alpha(i-1)$ und $\text{C}\alpha(i-1)$ -Verschiebungen erfaßt und die direkte Beobachtung von Prolinen (über ihre H^α) ermöglicht.

Die eingesetzte Kombination der Experimente zur sequentiellen Zuordnung ist in Abb.4.2 dargestellt. Aufgrund der häufigen Signalentartungen (s.o.) waren die automatisch gewonnenen Signallisten aus den Spektren nicht eindeutig, so daß wiederholte Durchläufe des PASTA-Programmes in vielen Bereichen keine konvergente Zuordnung erzielten. Es war daher notwendig, für diese Sequenzabschnitte die korrekte Zuordnung manuell anhand der Spektren zu überprüfen bzw. in den eingesetzten, automatisch erstellten Signallisten Artefakte zu entfernen. Mit den wenigen, nachträglich durch NOE-Konnektivitäten erzielten Zuordnungen gelang die sequentielle Zuordnung des Proteinrückgrates von VAT-N bis auf 4 Aminosäuren (M1, E2, S16 und T17) vollständig.

Abb.4.3 zeigt das zugeordnete ^{15}N -HSQC-Spektrum von VAT-N.



181 (von 185) Reste zugeordnet

Abb.4.2 Schematischer Ablauf der sequentiellen Zuordnung von VAT-N mit dem Zuordnungsprogramm PASTA [149].

4.3.2 (Diastereotope) Zuordnung der Seitenketten-Signale

Die Zuordnung der Seitenkettenresonanzen über eine Kombination von 3D-(H)CCH-COSY und 3D-H(C)CH-TOCSY-Experimenten ging weitgehend von den H^β und C^β -Resonanzen aus, die bereits im Verlauf der sequentiellen Zuordnung erhalten wurden. Diese Spektrenkombination erlaubte die eindeutige Unterscheidung zwischen skalaren Nah- (im COSY-Spektrum) und Weitbereichskorrelationen (im TOCSY-Spektrum). Sie lieferte aber gleichzeitig die Seitenkettenresonanzen in *pseudo-4D* Auflösung, da die Korrelationssignale im COSY-Experiment über die ^{13}C -, im TOCSY-Experiment aber komplementär über die ^1H -Dimension erfaßt wurden. Für die Zuordnung der Seitenketten-Amidprotonen von Asparagin und Glutamin wurde ein multiplizitätsgefiltertes CBCA(CO)NH₂-Experiment benutzt.

Die Zuordnung der Seitenkettenresonanzen gelang zu 95%. Bei den fehlenden Zuordnungen handelt es sich in der Regel um die H^γ , H^δ und H^ϵ -Protonen von Lysin und Arginin. Es war für diese Aminosäuren ebenfalls nicht möglich, die Resonanzen der Seitenketten-Aminogruppen zuzuordnen aufgrund des offensichtlich sehr raschen H^N -Austausches mit dem Wasser. So waren im selektiv auf (F1)Arginin- N^ϵ gefilterten 2D H,H-NOESY bereits nach 40 ms Mischzeit selbst die Diagonalsignale verschwunden.

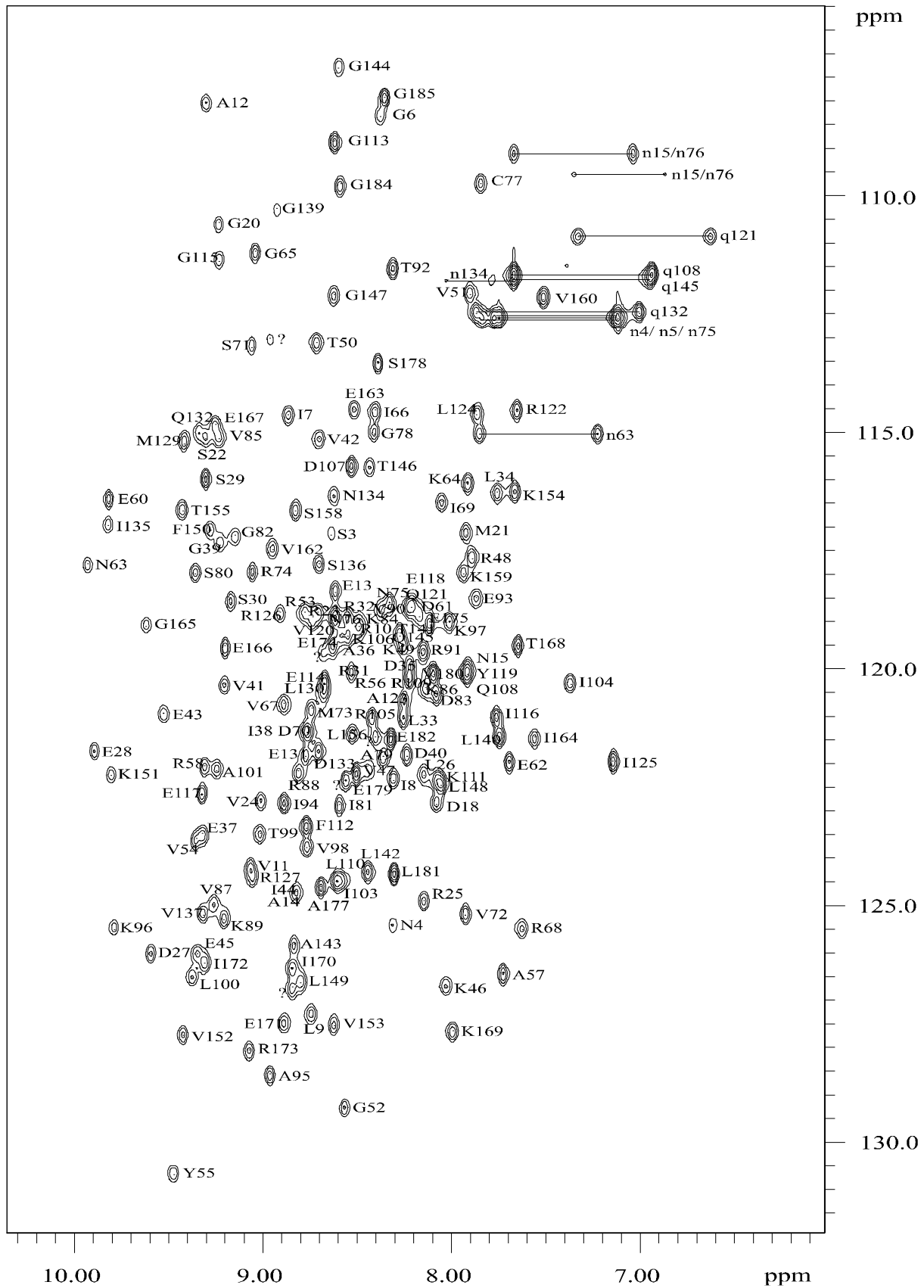


Abb.4.3 ^{15}N -HSQC von VAT-N mit Zuordnungen. Kleingeschriebene Zuordnungen beziehen sich auf Seitenketten- H^{N} .

Bei nur 20 ms Mischzeit waren sie zwar noch deutlich sichtbar; diese Mischzeit war aber zum Aufbau von NOE-Korrelationen zu kurz. Bei Betrachtung der Struktur (vgl. 4.5.4) zeigt sich auch, daß praktisch alle basischen Seitenketten in einer weiten, positiv geladenen Furche auf der Proteinoberfläche liegen und dem Lösungsmittel zugewandt sind. Strukturell bedeutsame NOE-Kontakte sind hier also ohnehin nicht zu erwarten.

Die diastereotope Zuordnung gelang für die H^β -Resonanzen von 50 Aminosäuren und für die H^γ -Resonanzen der prochiralen Methylgruppen von 18 der 20 Valine (außer V87 und V180). Das Verfahren hierzu, unter Verwendung des HNHB, H_2NCO -E.COSY und entsprechender NOESY-Spektren, wurde bereits für HNL erläutert (vgl. 2.3.3).

4.4 Ermittlung der Struktur von VAT-N

4.4.1 Sekundärstruktur und Faltungsmuster

Die Ermittlung des chemischen Verschiebungsindex [152, 153] (CSI) für C^α , C^β , C' und H^α führte zur Identifizierung der Sekundärstrukturelemente in VAT-N, die durch Betrachtung der skalaren $^3J_{HNH\alpha}$ -Kopplungen (aus dem HNHA-Experiment) und durch die Analyse charakteristischer NOE-Konnektivitäten abgesichert wurde (vgl. 4.4.2).

Das Faltungsmuster (Abb.4.4) zeigt, daß VAT-N aus zwei Subdomänen identischer Länge aufgebaut ist. Die N-terminale Subdomäne VAT-Nn (M1 bis T92) besteht aus 2 kurzen α -Helices und 6 β -Faltblättern, die ein β -barrel bilden. Die C-terminale Subdomäne VAT-Nc (E93 bis G185) besteht aus nur einer längeren α -Helix und ebenfalls 6 β -Faltblättern, die jedoch nicht in Form eines β -barrel geschlossen sind.

4.4.2 NOE-Zuordnung, Strukturrechnung und Strukturgröße

Das hohe Maß an Überlagerungen aufgrund interner Sequenzhomologie und Aminosäure-Wiederholungen in VAT-N (vgl. 4.3.1) erforderte eine gegenüber HNL deutlich veränderte Strategie zur auflösungsoptimierten Aufnahme von 3D NOESY-Spektren. Sie wird in Kapitel 5.2 ausführlich diskutiert. Für VAT-N wurden nach dieser Strategie alle vier möglichen doppelt heteronuklear editierten 3D XYH-NOESY Spektren (3D CCH-, NCH-, NNH- und CNH-NOESY) aufgenommen. Auf die entsprechenden doppelt gefilterten, aber nur einfach heteronuklear editierten 3D H(X)YH-NOESY Experimente (3D H(C)CH-, H(N)CH-, H(N)NH- und H(C)NH-NOESY), deren Information auch in den beiden zusätzlich aufgenommenen einfach gefilterten 3D HNH- und HCH-NOESY Spektren enthalten ist, wurde verzichtet.

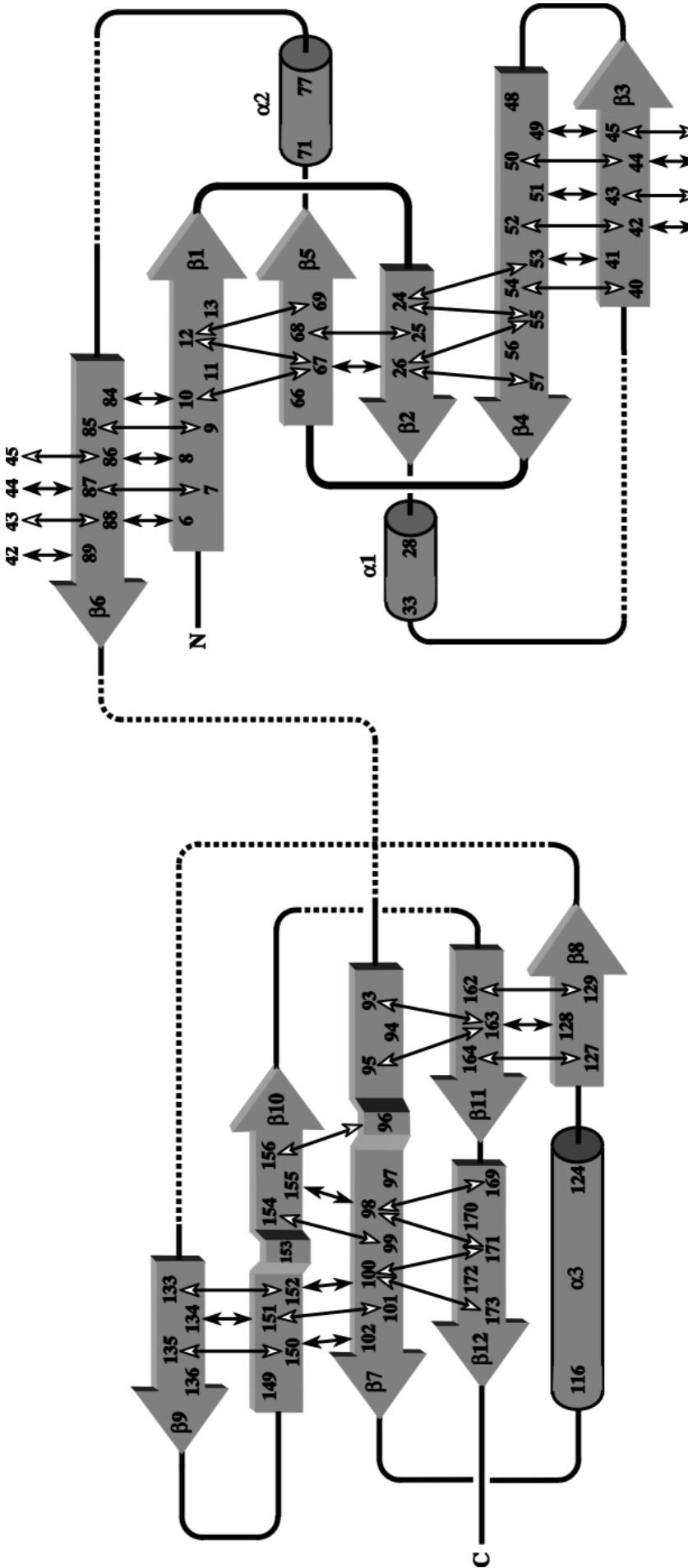


Abb.4.4 Faltungsschema von VAT-N. Wesentliche NOE-Kontakte zur Festlegung der relativen Orientierung sind eingetragen (schwarze Pfeile für H^c-H^c -Kontakte, weiße Pfeile für H^N-H^N -Kontakte). In den β -Strängen β_7 und β_{10} der C-terminalen Subdomäne tritt je ein β -*bulge* auf. Die gestrichelt eingetragenen Schleifen sind nicht maßstabsgerecht gezeichnet. Die beiden ψ -Schleifen der N-terminalen Subdomäne sind fett eingezeichnet.

Die beiden diagonalfreien 3D CNH- und NCH-NOESY Spektren ^[214] (vgl. 5.2) waren dabei besonders hilfreich für die eindeutige Zuordnung von NOE-Konnektivitäten in VAT-N (vgl. 4.4.2). Sie erlaubten die Zuordnung einer großen Anzahl anderweitig nicht auflösbarer bzw. beobachtbarer NOE-Kontakte. Dies wird in Abb. 4.5 in der Gegenüberstellung ausgewählter Streifen aus dem 3D HNH- und CNH-NOESY sowie dem 3D HCH- und NCH-NOESY illustriert.

Die experimentellen Strukturparameter für VAT-N wurden aus den beschriebenen sechs Heterokern-editierten 3D NOESY und dem 2D H,H-NOESY sowie den HNHA und HNHB Spektren erhalten. Die NOE-Korrelationssignale der 3D NOESY Spektren wurden gemäß der Intensitätsverteilung der zugrundeliegenden HSQC-Experimente skaliert und ebenso wie für das 2D H,H-NOESY in vier Klassen eingeteilt (entsprechend Distanzobergrenzen von 2.8, 3.3, 4.2 und 5.0 Å). Die Strukturrechnung erfolgte mit dem Programmpaket XPLOR ^[156].

Wie für HNL beschrieben (vgl. 2.4.2), wurde zunächst eine grobe Ausgangsstruktur aus 562 eindeutig zugeordneten NOE-Kontakten und 151 ϕ -Winkelvorgaben berechnet. Sie erlaubte die iterative Zuordnung weiterer NOE-Kontakte und anschließende Verfeinerung der Struktur. Dabei wurden insbesondere 31 NOE-Kontakte zwischen den beiden Subdomänen VAT-Nn und VAT-Nc aufgefunden (vgl. 4.5.3), die deren relative Orientierung sehr genau festlegten.

Der endgültige Struktursatz (26 Strukturen) wurde mit 1923 nicht-redundanten NOE-Kontakten, davon 459 Weitbereichskontakte und 31 Interdomänen-Kontakte, 196 Torsionswinkeln und 56 direkten $^3J_{\text{HNH}\alpha}$ -Vorgaben berechnet. Für 101 Aminosäuren wurden durch χ_1 -Winkelvorgaben die Vorzugsrotamere festgelegt; darunter fielen auch alle 8 Threonine, 19 (von 20) Valine, 15 (von 16) Isoleucine und 7 (von 8) Proline. Zusätzlich wurden 52 Wasserstoffbrücken zwischen Amidgruppen innerhalb von Sekundärstrukturen, für die aus NewMEXICO-Experimenten ^[154] unterdurchschnittliche $\text{H}^{\text{N}}\text{-H}_2\text{O}$ -Austauschraten bestimmt wurden, vorgegeben. Die Strukturen wurden durch Anwendung von CSI-Potentialen für C^α - und C^β -Verschiebungen innerhalb definierter Sekundärstrukturbereiche verfeinert ^[157-159]. Im letzten Schritt der Strukturrechnung wurde ein empirisches Datenbank-Potential für Proteinstrukturen berücksichtigt ^[160, 161].

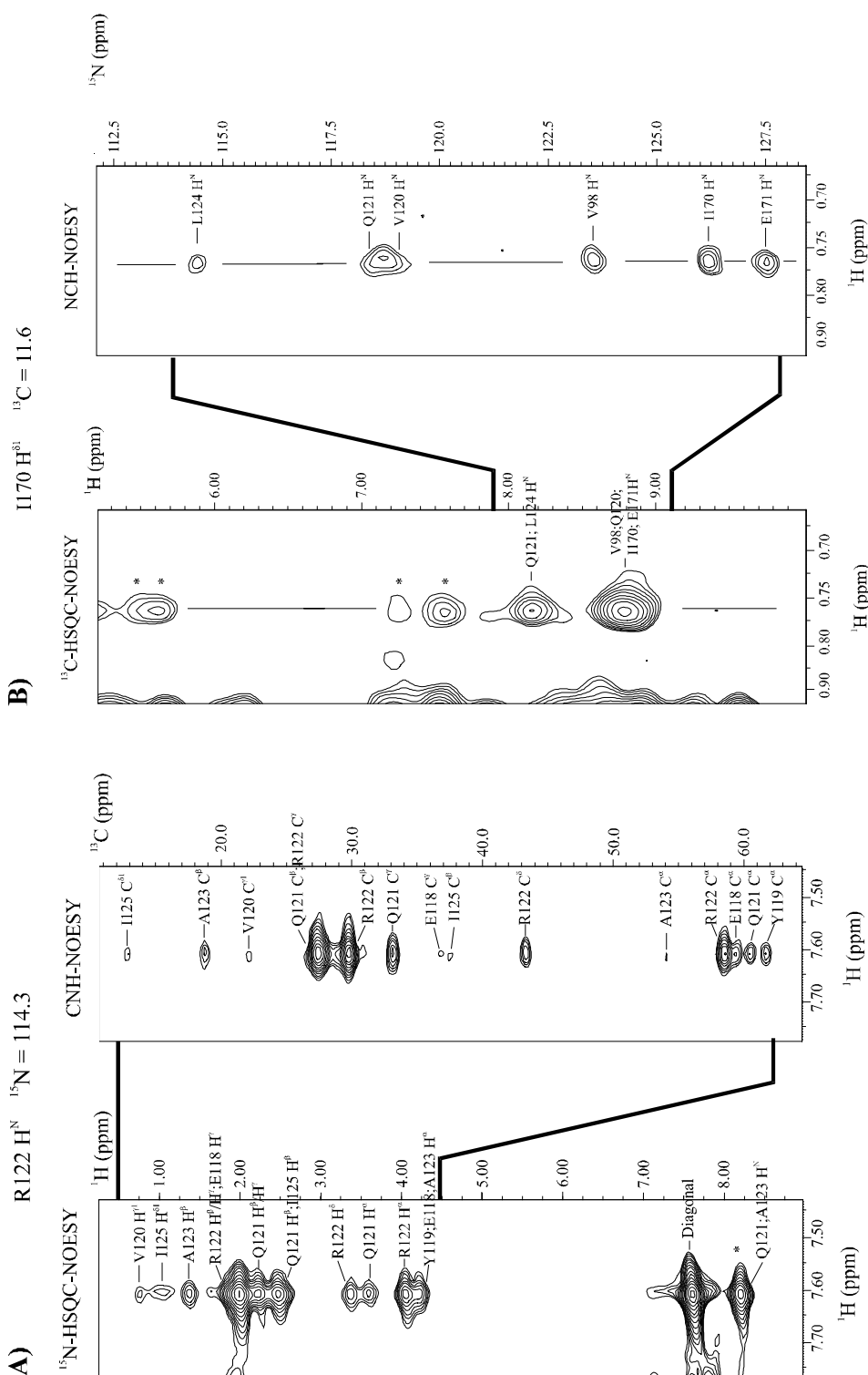


Abb.4.5 Ausgewählte Streifen aus den 3D HXH- und YXH-NOESY von VAT-N. A) Gegenüberstellung der H(N)H- und C(N)H-Streifen für R122 ($^{15}\text{N} = 114.3$ ppm). Besonders die überlagerten H^{α} -Resonanzen werden in der entsprechenden ^{13}C -Dimension vollständig aufgelöst. Die mit * markierten Signale ^{15}N -gebundener Protonen im 3D HNH-NOESY werden durch den orthogonalen ^{13}C -Filter im 3D CNH-NOESY ebenso wie das Diagonalsignal eliminiert. B) Gegenüberstellung der H(C)H- und N(C)H-Streifen für I170 ($^{13}\text{C} = 11.6$ ppm). Die überlagerten H^{N} -Resonanzen werden in der entsprechenden ^{15}N -Dimension vollständig aufgelöst. Die mit * markierten Signale ^{13}C -gebundener Protonen im 3D HCH-NOESY werden durch den orthogonalen ^{15}N -Filter im 3D NCH-NOESY ebenso wie das Diagonalsignal (nicht dargestellt) eliminiert.

Tab.4.2 Übersicht der mittleren Quadratwurzelabweichungen (RMSD) experimenteller Strukturparameter für den endgültigen Struktursatz bzw. die minimierte gemittelte Struktur (Lösungsstruktur) von VAT-N.

Experimenteller Strukturparameter	Anzahl	Endgültiger Struktursatz (26 Strukturen)	minimierte gemittelte Struktur
<i>Distanzen</i>			
a) NOE insgesamt	1923	0.027 Å	0.025 Å
intraresidual	460	0.029 Å	0.023 Å
sequentiell	643	0.025 Å	0.024 Å
mittlere Reichweite	224	0.025 Å	0.024 Å
Weitbereich	459	0.027 Å	0.027 Å
inter-Domänen	31	0.025 Å	0.043 Å
b) Wasserstoffbrücken	51	0.029 Å	0.024 Å
<i>2) Winkel</i>			
Dihedralwinkel (ϕ und χ_1)	196	0.438 °	0.468 °
$^3J_{\text{HNH}\alpha}$ -Kopplungskonstanten	56	0.72 Hz	0.70 Hz
<i>3) Verschiebungsdifferenzen</i>			
C^α	158	1.66 ppm	1.61 ppm
C^β	148	1.45 ppm	1.45 ppm

Tab.4.2 faßt die experimentell ermittelten Strukturparameter sowie ihre mittleren Verletzungen im endgültigen Struktursatz und in der gemittelten minimierten Struktur zusammen. Dabei wird deutlich, daß die Verletzungen in der gemittelten minimierten Struktur zunehmen. Dies spiegelt eine mögliche konformative Heterogenität im endgültigen Struktursatz wieder, vermutlich aufgrund geringfügiger Unterschiede in der Relativorientierung beider Subdomänen. Obgleich die Kontaktfläche zwischen beiden Subdomänen durch 30 NOE-Kontakte sehr gut definiert ist (vgl. 4.5.3), können sich Ungenauigkeiten der *relativen* NOE-Kontakte über die Gesamtlänge des Moleküls kumulieren und die Weitbereichs-Definition entsprechend verzerren. Das Beispiel VAT-N verdeutlicht also die Notwendigkeit der Strukturverfeinerung durch *absolute* Strukturparameter, die experimentell z.B. über dipolare Beiträge zu gemessenen Kopplungskonstanten [87, 215-222] oder die Orientierungsabhängigkeit von Relaxationsraten [118-121] (vgl. 1.12.5) zugänglich sind. *Falls nicht anders erwähnt, entsprechen nachfolgend dargestellte Strukturen deshalb der best-fit Struktur des endgültigen Struktursatzes und (im Gegensatz zum globulären HNL, vgl. Kapitel 2) nicht der gemittelten minimierten Struktur.*

In Tab.4.3 sind die Konvergenzkriterien (Streuung der Atomkoordinaten im endgültigen Struktursatz) aufgelistet. Zu näheren Angaben über die Strukturrechnung wird auf die Publikation verwiesen [213].

Tab.4.3 RMSD der Atomkoordinaten (in Å)

	Endgültiger Struktursatz (26 Strukturen)		Gemittelte minimierte Struktur bezüglich endgültigem Struktursatz	
	Proteinrückgrat	alle Atome	Proteinrückgrat	alle Atome
alle Reste	1.48 ± 0.26	1.88 ± 0.19	2.24 ± 0.26	2.68 ± 0.22
N-terminale Subdomäne	1.09 ± 0.29	1.61 ± 0.23	1.45 ± 0.31	2.19 ± 0.31
C-terminale Subdomäne	1.58 ± 0.35	1.92 ± 0.24	2.55 ± 0.35	2.85 ± 0.29
Sekundärstrukturen ¹⁾	0.50 ± 0.08	1.03 ± 0.07	0.83 ± 0.09	1.45 ± 0.07
N-terminale Subdomäne ¹⁾	0.36 ± 0.06	1.01 ± 0.09	0.52 ± 0.06	1.35 ± 0.11
C-terminale Subdomäne ¹⁾	0.41 ± 0.07	0.93 ± 0.08	0.75 ± 0.12	1.34 ± 0.12

¹⁾ Reste 6-14, 23-57 und 66-92 (N-terminale Subdomäne) sowie 93-104, 114-136 und 149-176 (C-terminale Subdomäne).

Die stereochemische Qualität der Lösungsstruktur von VAT-N wurde mit dem Programm PROCHECK [162, 163] ermittelt. Die ϕ, ψ -Winkelverteilung im *Ramachandran*-Diagramm ist in Tab.4.4 zusammengefaßt. Aus ihr geht hervor, daß ca. 75% der bewerteten Reste (Glycine, Proline und die N-terminale Aminosäure sind von der Bewertung ausgeschlossen) in die wahrscheinlichsten Aufenthaltsbereiche fallen und kein einziger Rest die allgemein akzeptierten ϕ, ψ -Winkelkombinationen verletzt.

Tab.4.4 ϕ, ψ -Winkelverteilung im *Ramachandran*-Diagramm, ermittelt mit dem Programm PROCHECK [162, 163].

ϕ, ψ -Winkelverteilung im <i>Ramachandran</i> -Diagramm (keine Bewertung für Gly, Pro und N-Terminus)	endgültiger Struktursatz (26 Strukturen)	minimierte gemittelte Struktur
in bevorzugten Bereichen	74.5 %	76.4 %
in erweitert erlaubten Bereichen	22.4 %	20.5 %
in großzügig erlaubten Bereichen	3.1 %	3.1 %
in verbotenen Bereichen	0.0 %	0.0 %

4.5 Die Struktur von VAT-N

Die Struktur von VAT-N wird zunächst für die beiden N- und C-terminalen Subdomänen VAT-Nn und VAT-Nc separat diskutiert, die trotz identischer Anzahl Aminosäuren und nahezu gleichen Anteilen der verschiedenen Sekundärstrukturelemente deutliche strukturelle Unterschiede aufweisen. Anschließend wird die relative Orientierung beider Subdomänen und die Gesamtstruktur besprochen.

4.5.1 Struktur der N-terminalen Subdomäne VAT-Nn

VAT-Nn (Aminosäuren 1 bis 92) zeigt auf der Ebene der Sekundär- und Tertiärstruktur bemerkenswerte Symmetrie vermutlich aufgrund der Duplikation in der Sequenz, die über 42 Reste (38 %) interne Identität aufweist (vgl. Abb.4.1). Dadurch läßt sich VAT-Nn weiter in zwei strukturell fast identische Hälften zerlegen, die je ein $\beta\alpha\beta\beta$ -Motiv ausbilden. Die Faltung beider Hälften ist vollständig verzahnt, so daß jeder β -Strang ausschließlich mit Strängen der anderen Hälfte Wasserstoff-verbrückt ist (Abb.4.4). Die 6 β -Stränge von VAT-Nn bilden zusammen ein β -barrel mit 4 antiparallelen und 2 parallelen Faltblättern. Die zwei kurzen Helices $\alpha 1$ (E28 bis L33) und $\alpha 2$ (S71 bis C77) liegen innerhalb der $\beta 2$ - $\beta 3$ - bzw. $\beta 5$ - $\beta 6$ -Schleifen. Die langen $\beta 1$ - $\beta 2$ - und $\beta 4$ - $\beta 5$ -Schleifen heißen ψ -loops, wovon sich die Bezeichnung des Strukturmotivs als doppeltes ψ -barrel ableitet [223]. Dieses Strukturmotiv findet sich in einer Reihe weiterer Proteine wieder, z.B. in der Asparat- α -Decarboxylase, der DMSO-Reduktase, der Formiat-Dehydrogenase H, dem pflanzlichen Abwehrprotein Barwin, der Endoglucanase V und, mit einer zikulären Permutation, in Asparat-Proteinasen. Aufgrund von Homologieuntersuchungen wird das doppelte ψ -barrel auch allgemein für die N-terminalen Domänen der Cdc48/p97 Proteine vorhergesagt [206, 223].

Die Struktur der VAT-Nn Subdomäne ist in Abb. 4.6 abgebildet. Aufgrund der starken Krümmung der Stränge $\beta 1$ und $\beta 4$ zu Beginn jedes $\beta\alpha\beta\beta$ -Motivs liegen $\beta 2$ und $\beta 5$, die das doppelte ψ -barrel verschließen, beinahe senkrecht zu den übrigen β -Strängen. Die Helices $\alpha 1$ und $\alpha 2$ liegen symmetrisch über den beiden Öffnungen des ψ -barrels. Da beide ψ -loops ($\beta 1$ - $\beta 2$ und $\beta 4$ - $\beta 5$) über die angrenzenden β -Stränge ragen, entsteht der Eindruck einer "verknoteten" Struktur. Diese *Pseudo-Knoten* sind ein charakteristisches Strukturmerkmal aller bislang strukturell untersuchten doppelten ψ -barrels.

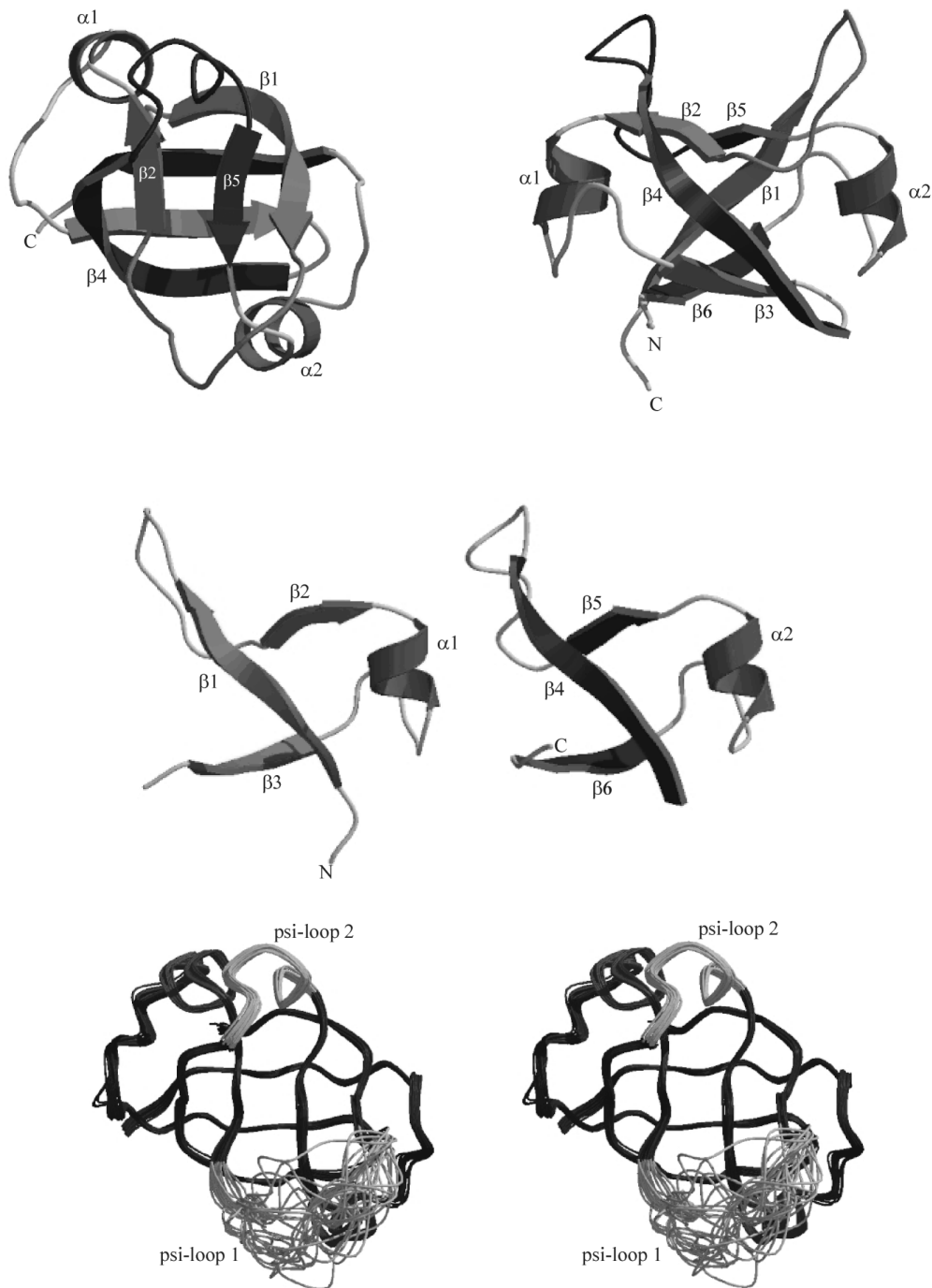


Abb.4.6 Struktur der N-terminalen Subdomäne VAT-Nn. In der obersten Zeile sind zwei orthogonale Ansichten des doppelten ψ -barrels dargestellt. Die beiden zugrundeliegenden $\beta\alpha\beta$ -Motive sind hell- und dunkelgrau unterschieden. In der rechten Ansicht werden die beiden durch die ψ -loops gebildeten *pseudo-Knoten* über $\beta 2$ und $\beta 5$ erkennbar. In der mittleren Zeile sind beide $\beta\alpha\beta$ -Motive nebeneinander dargestellt, um ihre strukturelle Identität zu verdeutlichen. Die untere Zeile zeigt die Stereoansicht des endgültigen Struktursatzes (26 Strukturen), aus der die relative Unordnung beider ψ -loops deutlich wird. Diese Superposition der Strukturen über die dunkel markierten Sekundärstruktur-Bereiche weist bezüglich der gemittelten minimierten Struktur eine RMSD von 0.36 Å für das Proteinrückgrat bzw. 1.01 Å über alle Schweratome auf.

4.5.2 Struktur der C-terminalen Subdomäne VAT-Nc

Die in Abb.4.7 dargestellte VAT-Nc Subdomäne (Aminosäuren 93 bis 185), die wie VAT-Nn aus 6 β -Strängen, aber nur einer längeren α -Helix besteht, weist eine halboffene β -Faltblattstruktur auf. Ihr zentrales Element ist der lange, beim β -*kink* an K96 beinahe rechtwinklig abgebogene β 7-Strang. Im ersten Drittel verläuft der β 7-Strang parallel entlang β 11 und bildet zusammen mit diesem und dem β 8-Strang ein β -Faltblatt. In seinem weiteren Verlauf hat β 7 Kontakt mit den Strängen β 12 und β 10 und bildet zusammen mit diesen und dem β 9-Strang ein weiteres β -Faltblatt. VAT-Nc bildet also im Gegensatz zur N-terminalen Domäne kein geschlossenes β -*barrel*, sondern eine Art halboffener β -*clam* Struktur (für den Schluß zum β -*barrel* müßten die Stränge β 8 und β 9 Kontakt haben). Die lange α 3-Helix (I116 bis L124) zwischen den Strängen β 7 und β 8 liegt quer über der von beiden Faltblättern geformten Mulde und zeigt über ihre Seitenketten NOE-Kontakte zu diesem hydrophoben Zentrum der Subdomäne. Im Gegensatz dazu ist die Position der β 7- α 3-Schleife wie auch die der β 9- β 10-Schleife schlecht definiert. Für beide Schleifen weist der $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ -NOE, der hier bis auf 0.4 fällt, auf Beweglichkeit im Nanosekunden-Zeitbereich mit hohen Amplituden hin. Dies kann ihre schlechte strukturelle Definition gut erklären.

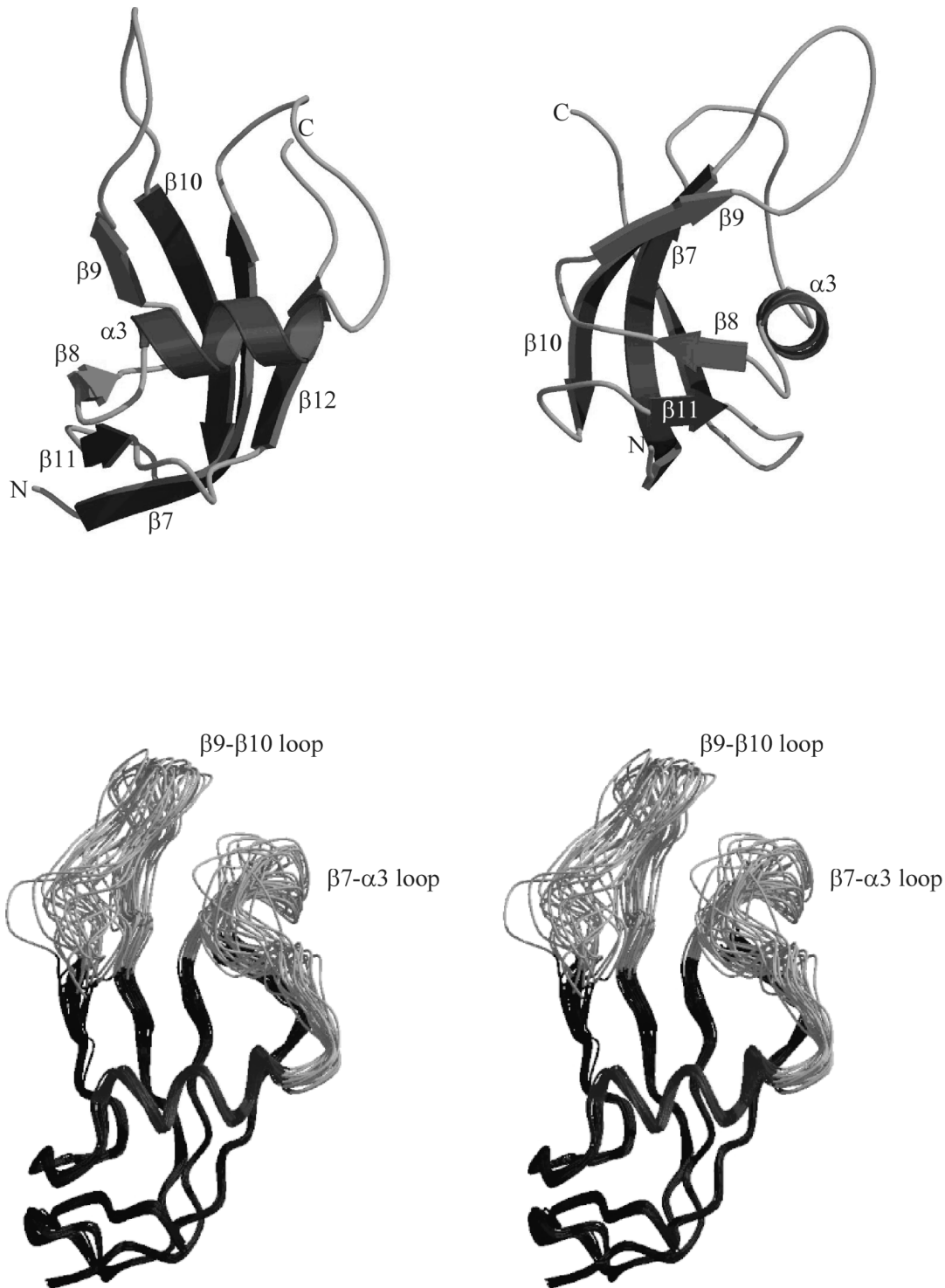


Abb.4.7 Struktur der C-terminalen Subdomäne VAT-Nc. Oben sind zwei orthogonale Ansichten der *pseudo* β -clam Struktur dargestellt. Für den Schluß zum β -barrel müßten die hellgrau gezeichneten β 8- und β 9-Stränge Wasserstoff-verbrückt sein. Darunter ist die Stereoansicht des endgültigen Struktursatzes (26 Strukturen) dargestellt, aus der die relative Unordnung der flexiblen β 7- α 3- und β 9- β 10-Schleifen deutlich wird. Diese Superposition der Strukturen über die dunkel markierten Sekundärstruktur-Bereiche weist bezüglich der gemittelten minimierten Struktur eine RMSD von 0.41 Å für das Proteinrückgrat bzw. 0.93 Å über alle Schweratome auf.

4.5.3 Relative Orientierung der Subdomänen und Gesamtstruktur von VAT-N

Für die Definition der Gesamtstruktur von VAT-N ist die relative Orientierung beider Subdomänen VAT-Nn und VAT-Nc entscheidend. Zu Beginn der Strukturberechnung (vgl. 4.4.2) konnten nur zwei eindeutige Inter-Domänen-Kontakte zwischen den Seitenketten-Amidprotonen von N76 und dem Rückgrat-Amidproton von N134 im 3D NNH-NOESY zugeordnet werden. Die gemessenen niedrigen Austauschraten der Seitenketten-Amidprotonen von N76 weisen darauf hin, daß diese Inter-Domänen-Kontakte über Wasserstoffbrücken stabilisiert werden. Interessanterweise ist N76 innerhalb der Cdc48-verwandten Proteine hochkonserviert [206]. Die erwähnten NOE-Kontakte hatten entscheidenden Einfluß auf die Konvergenz der Startstruktur, deren RMSD hierdurch von 2.03 Å auf 1.06 Å fiel. Dies wird verständlich, wenn man den großen "Hebel" beider NOE-Kontakte, die die Subdomänen in maximaler Entfernung zur verbindenden β 6- β 7-Schleife zusammenhalten, in Abb.4.8 betrachtet. Der Verbindungsstrang zeigt seinerseits in Übereinstimmung mit den Inter-Domänen-Kontakten keine erhöhte Beweglichkeit, wie 6 Weitbereichs-NOE-Kontakte zu den Subdomänen, die hohen $^3J_{\text{HNH}\alpha}$ -Kopplungskonstanten (> 8.5 Hz) und die fast maximalen $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ -NOE beweisen. Mit der so definierten relativen Ausgangs-Orientierung konnten anschließend weitere 29 NOE-Kontakte zwischen beiden Subdomänen zugeordnet werden (vgl. Abb.4.8).

Abb.4.8 verdeutlicht die über weite Bereiche hohe Konvergenz der Struktur nicht nur der einzelnen Subdomänen, sondern auch der gesamten VAT-N Domäne. Hohe Streuung weisen nur die bereits erwähnten zwei ausgedehnten Schleifen jeder Subdomäne auf, d.h. beide ψ -loops in VAT-Nn sowie die β 7- α 3- und β 9- β 10-Schleifen in VAT-Nc. Die relative Orientierung beider Subdomänen ist hingegen sehr genau festgelegt. Sie sind zueinander geneigt mit einer ausgedehnten Kontaktfläche, die größtenteils aus hydrophoben Aminosäuren der Stränge β 3, β 4, β 8 und β 10 besteht. VAT-N hat daher keine lose Hantelstruktur wie viele andere modular aufgebaute Proteine (vgl. z.B. Calmodulin [83]), sondern eine wohldefinierte kompakte nierenförmige Gesamtstruktur.

Bei genauer Betrachtung des endgültigen Struktursatzes fällt allerdings auf, daß die relative Definition der Gesamtstruktur zur Peripherie hin schlechter wird. Dies ist die Folge der deutlichen Abweichung von VAT-N von einer globulären Gesamtstruktur und der ungenügenden Weitbereichsdefinition durch die *relativen* NOE-Kontakte (vgl. 4.4.2). Strukturverfeinernde Messungen *absoluter* Strukturparameter (dipolare Kopplungsbeiträge, orientierungsabhängige Relaxationsraten, vgl. 4.4.2) konnten im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht mehr durchgeführt werden.

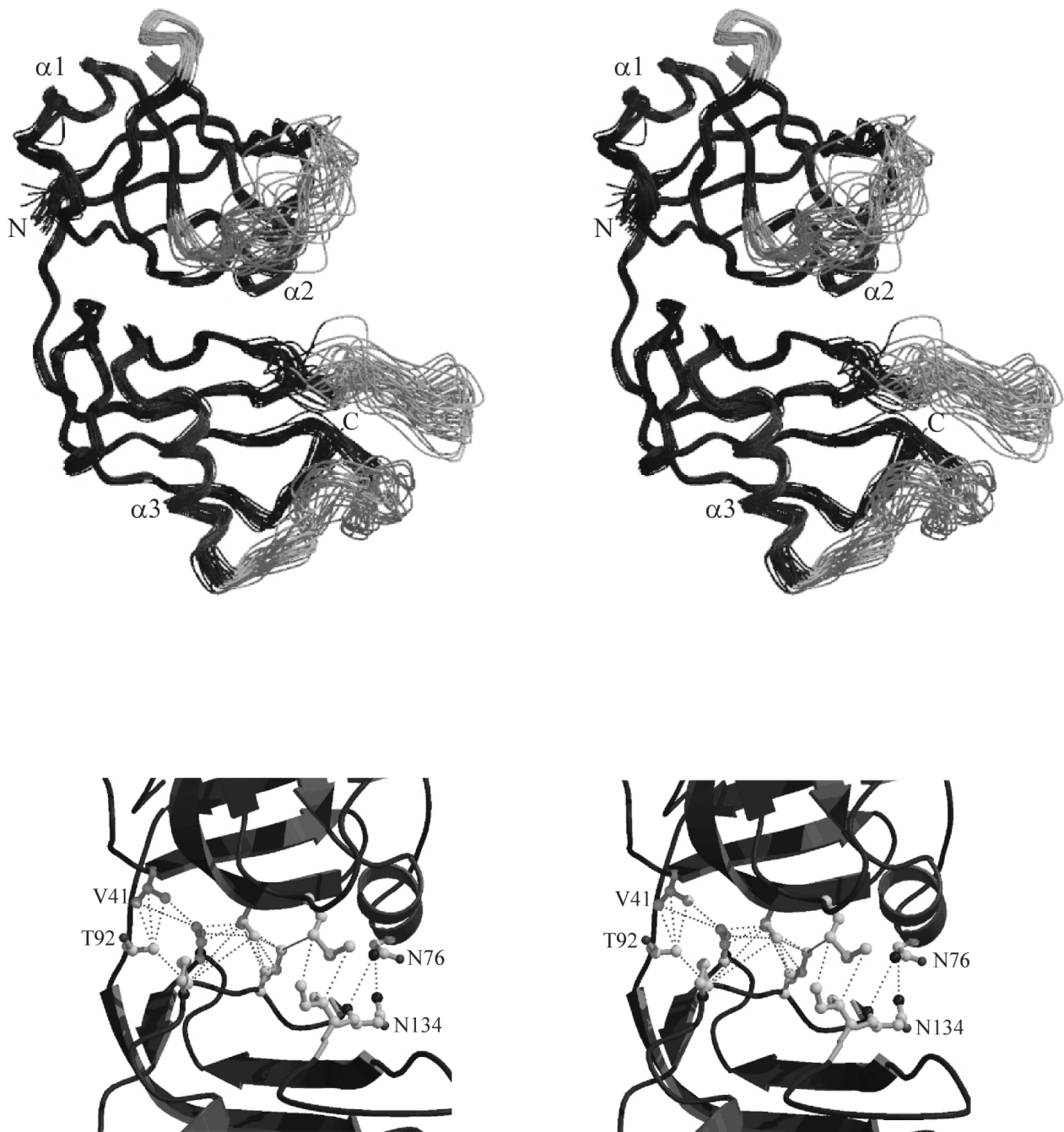


Abb.4.8 Gesamtstruktur von VAT-N und Inter-Domänen-Kontaktfläche. Oben ist die Stereoansicht des endgültigen Struktursatzes (26 Strukturen) ohne den ungeordneten C-Terminus (V180 bis G185) dargestellt. Die sehr gute Definition der relativen Orientierung beider Subdomänen wird deutlich. Diese Superposition der Strukturen über die dunkel markierten Sekundärstruktur-Bereiche weist bezüglich der gemittelten minimierten Struktur eine RMSD von 0.50 Å für das Proteinrückgrat bzw. 1.03 Å über alle Schweratome auf. Darunter ist die Definition der Kontaktfläche zwischen beiden Subdomänen (oben VAT-Nn, unten VAT-Nc) durch die eingezeichneten NOE-Kontakte zwischen Aminosäuren der Stränge $\beta 3$, $\beta 4$, $\beta 8$ und $\beta 10$ dargestellt. Mit Ausnahme der beiden Asparagine N76 und N134 liegen in der Kontaktfläche nur hydrophobe Aminosäuren.

4.5.4 Oberfläche und Lage von VAT-N im hexameren VAT-Komplex

Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen, daß VAT hexamere Ringe von ca. 15.5 nm Durchmesser bildet [202]. Durch analoge Untersuchungen an einer VAT(Δ N)-Deletionsmutante ohne die N-terminale VAT-N Domäne konnte ein elektronenmikroskopisches Differenzbild konstruiert werden, aus dem die Lage von VAT-N im ringförmigen Hexamer ersichtlich wird [212] (Abb.4.9). Dieses Differenzbild zeigt auch die nierenförmige Gesamtstruktur von VAT-N, allerdings mit einer Auflösung von lediglich 2 nm. Die Details der Struktur, und insbesondere ihr modularer Aufbau, wurden erst durch unsere NMR-spektroskopischen Untersuchungen mit einer Auflösung von ca. 0.1 bis 0.2 nm (vgl. Tab. 4.3) deutlich. Ein Vergleich der elektronenmikroskopischen Struktur mit der NMR-Struktur, die hierfür auf die gleiche niedrige Auflösung von 2 nm umgerechnet wurde, zeigt sehr gute Übereinstimmung in Form und Größe (Abb.4.9). Dank der selbst bei dieser niedrigen Auflösung erkennbar asymmetrischen, nierenförmigen Struktur von VAT-N konnte durch diesen Vergleich die Orientierung der N-terminalen Domäne im VAT-Hexamer abgeleitet werden. Demnach weist die hydrophobe Kontaktfläche zwischen den Subdomänen VAT-Nn und VAT-Nc mit ihrer Öffnung zur Mitte des hexameren Ringes, während die offensichtlich flexiblen ψ -loops in VAT-Nn und die β 7- α 3- und β 9- β 10-Schleifen in VAT-Nc auf der Oberseite des Ringes dem Lösungsmittel zugewandt sind. Die Oberfläche von VAT-N bildet also gleichzeitig die Oberfläche des VAT-Komplexes.

Abb.4.10 zeigt die Verteilung von elektrostatischem Potential und Hydrophobizität auf VAT-N einmal für die die Ringoberfläche bildende Seite (*Oberseite*) und einmal für die der Ringmitte zugewandten Seite (*Innenseite*). Das auffälligste Merkmal ist ein hauptsächlich aus Argininen gebildetes Band positiver Ladungen, das sich über die gesamte *Oberseite* erstreckt. Es beginnt in der Furche zwischen den beiden ψ -loops in VAT-Nn, verläuft über N76 und N134 an der Öffnung der Inter-Domänen-Kontaktseite und endet in der Furche zwischen β -Faltblatt und α 3-Helix in VAT-Nc. Komplementär dazu verläuft ein Band negativer Ladungen auf der konvexen Seite von VAT-N, die auf der Außenseite der hexameren VAT-Ringstruktur liegt. Das Band positiver Ladungen setzt sich in VAT-Nn auf der *Innenseite* fort. Daneben bilden D18 und D70 zwischen beiden Subdomänen einen Bereich negativer Ladungen. Ansonsten überwiegen auf der Innenseite die hydrophoben Reste im Bereich der Inter-Domänen-Kontaktseite.

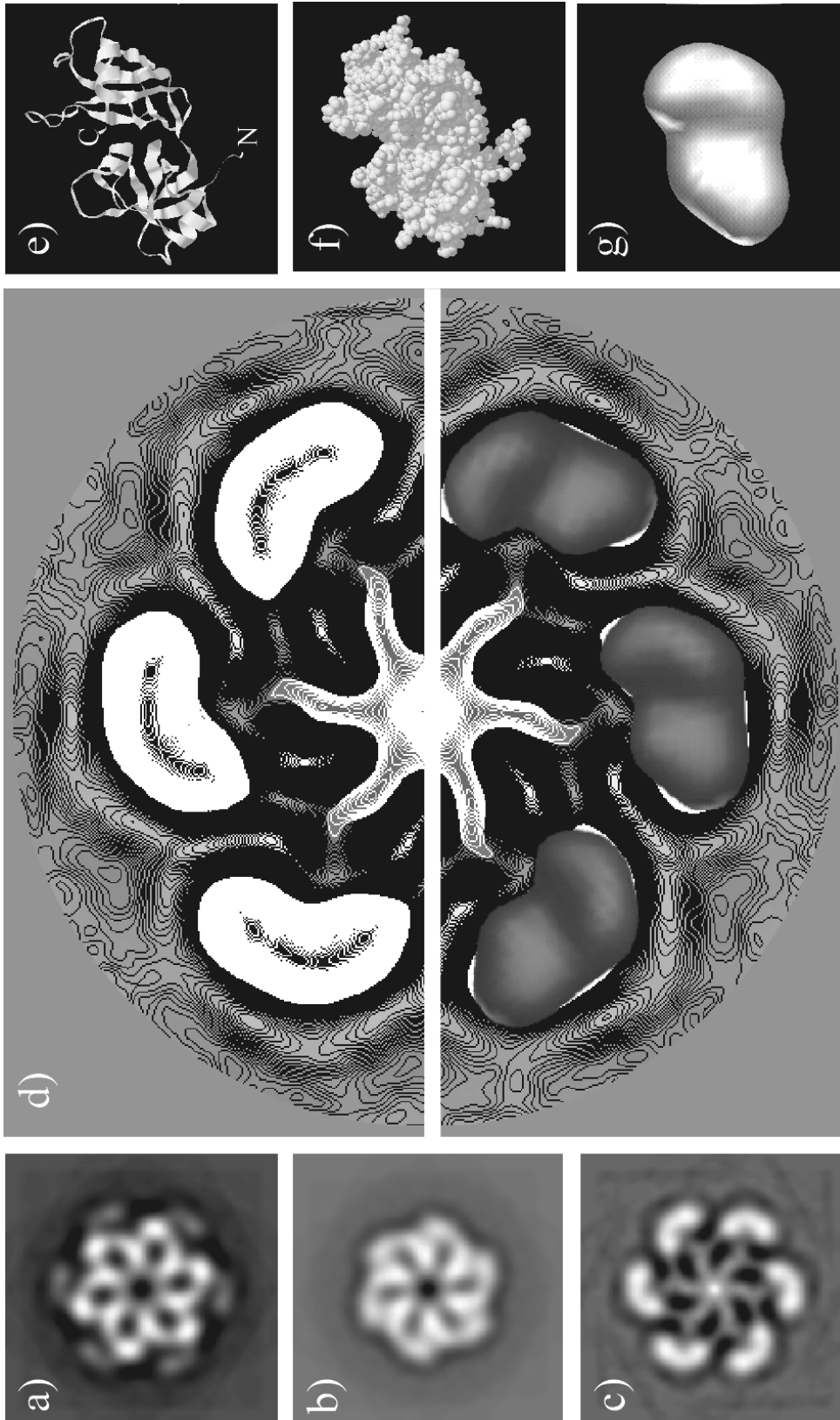


Abb.4.9 Elektronenmikroskopische Struktur von VAT und Lage der N-terminalen Domäne VAT-N. a) und b) zeigen durchschnittliche Draufsichten (nach negativer Einfärbung mit Uranylacetat) der hexameren Ringstruktur von VAT und einer VAT(Δ N)-Deletionsmutante ohne die N-terminale VAT-N Domäne. c) ist das normalisierte Differenzbild von a) und b) und zeigt die Lage der VAT-N Domänen. Bilder e) bis f) zeigen die NMR-spektroskopisch ermittelte Struktur als hochaufgelöstes Bändermodell (e) und Kalottenmodell (f) und mit der elektronenmikroskopischen Auflösung (20 nm) (g). In der Bildmitte (d) ist die Konturlinien-Darstellung von c) (oben) mit der eingepaßten VAT-N Struktur g) (unten) gezeigt.

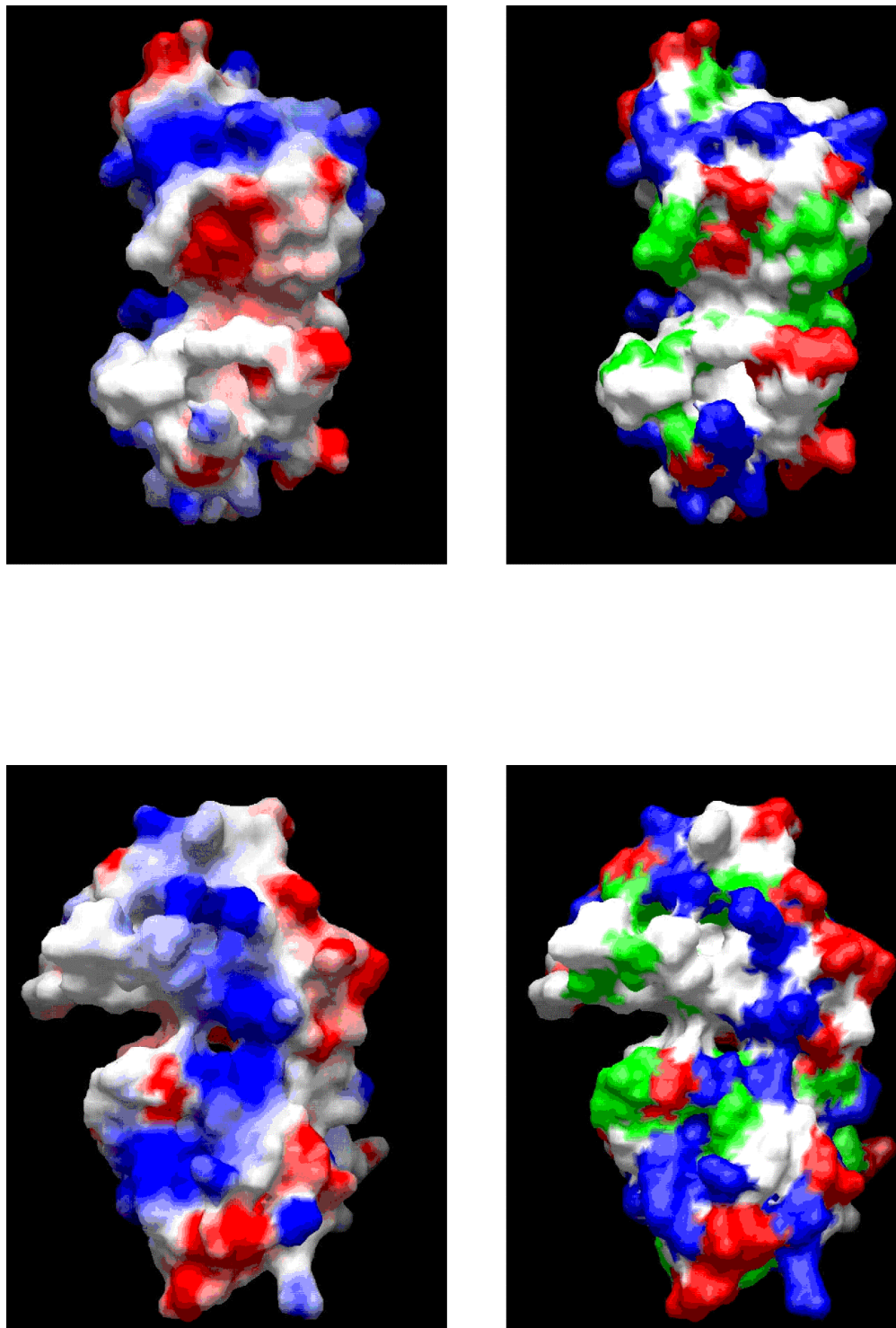


Abb.4.10 GRASP-Oberflächen von VAT-N. Die Abbildungen links entsprechen der Draufsicht auf die solvensexponierte Furche wie in Abb.4.9 (*Oberseite*). Die Abbildungen rechts entsprechen der Ansicht der Ringmitte zugewandten *Immensseite* mit Blick in die Öffnung der Kontaktfläche zwischen beiden Subdomänen. Die oberen Abbildungen zeigen das elektrostatische Potential von -7.0 (rot) bis +7.0 (blau) k_BT. Die unteren Abbildungen zeigen die Hydrophobizität (weiss = hydrophob, grün = polar, blau = positiv geladen, rot = negativ geladen).

4.6 Diskussion von Struktur und Funktion von VAT-N

Die parallel zu den NMR-spektroskopischen Untersuchungen durch Ralf Golbik und Jürgen Peters durchgeführten biochemischen Funktionsuntersuchungen haben ergeben, daß sowohl das intakte VAT als auch die isolierte N-terminalen Domäne VAT-N denaturierte Proteine binden und ihre Rückfaltung katalysieren können [206]. So war VAT-N bei der ATP-unabhängigen Rückfaltung von Cyclophilin genau so wirksam wie das intakte VAT. Dies beweist, daß VAT-N als die eigentliche Protein-bindende Domäne im VAT-Komplex fungiert.

Die in dieser Arbeit NMR-spektroskopisch ermittelte Hochauflösungsstruktur von VAT-N zeigt eine kompakte nierenförmige Gesamtstruktur, die sich aus zwei gleich großen Subdomänen zusammensetzt. Die N-terminale Subdomäne VAT-Nn bildet ein doppeltes ψ -barrel aus zwei strukturell identischen und sequentiell ca. 40% homologen $\beta\alpha\beta\beta$ -Motiven. Die C-terminale Subdomäne VAT-Nc besitzt eine aus zwei fast vertikalen β -Faltblättern aufgebaute halboffene Struktur ähnlich einer β -clam. Beide Subdomänen weisen Furchen auf, die beiderseits von je zwei flexiblen Schleifen (den ψ -loops in VAT-Nn und den $\beta 7$ - $\alpha 3$ - und $\beta 9$ - $\beta 10$ -Schleifen in VAT-Nc) eingerahmt werden und ineinander übergehen.

Durch Anpassung der VAT-N Struktur an ein elektronenmikroskopisches Differenzbild zwischen VAT und einer VAT(Δ N)-Deletionsmutante, in der die VAT-N Domäne fehlt, konnte die N-terminale Domäne in der hexameren Ringstruktur von VAT positioniert werden. VAT-N bildet demnach die Oberseite des Ringes, wobei die erwähnte Furche nach oben weist. In der Furche verläuft ein Band positiver Ladungen und parallel dazu, auf dem Ringumfang, ein Band negativer Ladungen. Die zur Ringmitte weisende Kontaktfläche zwischen beiden Subdomänen ist weitgehend hydrophob.

Die Hochauflösungsstruktur und erweiterte Homologieuntersuchungen durch Andrei Lupas (Smith-Kline-Beecham) mit dem Programm SENSER [206] führten zum Vorschlag eines Stammbaumes von Proteinen, die sich alle von einem $\beta\alpha\beta\beta$ -Urmotiv ableiten lassen. Der vorgeschlagene Stammbaum verbindet u.a. einfache prokaryotische Transkriptionsfaktoren, VAT, virale Pepsine und prokaryotische und eukaryotische Aspartat-Proteasen. Für eine ausführliche Beschreibung der Verwandtschaften und notwendigen Entwicklungsschritte wird auf die Veröffentlichung verwiesen [213]. Aus diesen phylogenetischen Betrachtungen leiten wir jedoch die Vermutung ab, daß die positiv geladene Furche auf der VAT-N Oberfläche die eigentliche Peptid-Bindungsstelle von VAT ist.

Die Furche hat eine Länge von ca. 35Å, was zur Aufnahme einer Peptidsequenz von ca. 10 Aminosäuren Länge ausreichen würde.

Aus der Beobachtung, daß VAT energieabhängig Proteine entfalten kann, läßt sich schließen, daß die ATP-Hydrolyse zur Herbeiführung konformativer Änderungen in der Peptidbindungsstelle benötigt wird. Durch diese konformativen Änderungen könnte die Proteinentfaltung mechanisch unterstützt werden. Entsprechende konformative Änderungen der N-terminalen Domänen wurden bereits für das verwandte eukaryotische AAA-Protein NSF beobachtet [209]. Die Art der möglichen Bewegung bleibt spekulativ. Es ist einerseits denkbar, daß die gesamte VAT-N Domäne sich hierbei relativ zum Ringkomplex bewegt. Andererseits ist auch eine Relativbewegung der beiden Subdomänen von VAT-N um das durch den $\beta 6$ - $\beta 7$ -Verbindungsstrang festgelegte Scharnier denkbar. Die vorläufigen dynamischen Untersuchungen über den $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ -NOE sowie die beobachteten Inter-Domänen-Kontakte müssen diesem Modell nicht widersprechen, da die scheinbare Starrheit von VAT-N auch aus dem Bestreben zur Minimierung der solvens-exponierten hydrophoben Oberfläche, die größtenteils die Kontaktfläche zwischen beiden Subdomänen bildet, resultieren kann.

5. Methodische Entwicklungen

Die in diesem Kapitel beschriebenen Methoden befassen sich mit dem Problem der Auflösungserhöhung bei der NMR-Spektroskopie von [U - ^{13}C , ^{15}N]-markierten Proteinen.

Das in 5.1 beschriebene QOF-HSQC Modul [224] erlaubt die Verkleinerung des effektiven spektralen Fensters, indem es über einen Quadrupel-Quanten-Filter (QOF) ausschließlich Methylgruppen selektiert. Im Vergleich zu den herkömmlichen Verfahren der Multiplizitätsselektion wird im QOF-HSQC die Auflösung durch Vermeidung der Entwicklung homonuklearer Protonenkopplungen maximiert.

In 5.2 wird eine meßzeit- und auflösungsoptimierte Aufnahme-strategie für NOESY-Spektren vorgestellt, nach der nur minimal drei komplementäre, doppelt heteronuklear editierte 3D XYH-NOESY aufgenommen werden müssen. Zu diesen Experimenten gehören die hier neu entwickelten *orthogonal gefilterten* 3D CNH- und NCH-NOESY [214], die *diagonalfrei* sind und damit erhebliche praktische Vorteile besitzen.

5.1 Methylgruppenselektion im HSQC durch Quadrupel-Quanten-Filter (QOF-HSQC)

Die Selektion von Methylgruppen in ^1H , ^{13}C -Korrelationsexperimenten ist eine häufig angewandte Strategie zur Auflösungserhöhung durch Einschränkung des effektiven spektralen Fensters [225, 226]. Gewöhnlich wird hierzu ein DEPT-Modul [227] eingesetzt, das heteronukleare Quadrupel-Quanten-Kohärenz (HQQC) erzeugt. Diese für Methylgruppen spezifische Kohärenzordnung wird dann entweder durch geeignete Phasenzyklen oder über Gradienten selektiert. In allen herkömmlichen Methoden bleibt jedoch die HQQC während der gesamten inkrementierten Evolutionszeit der chemischen Verschiebung erhalten. Daher entwickeln sich gleichzeitig auch alle homonuklearen ^1H , ^1H - und ^{13}C , ^{13}C -Kopplungen. Diese Kopplungsentwicklung führt zu Phasenfehlern, zur Signalaufspaltung und Linienverbreiterung und damit immer zu Intensitätsverlusten. Hochaufgelöste HQQC-Spektren sind mit dieser Methode also nicht möglich. Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb das QOF-HSQC-Modul (HSQC mit Quadrupel-Quanten-Filter) entwickelt, bei dem die Dauer der HQQC und damit die effektive Evolutionszeit der homonuklearen ^1H , ^1H -Kopplungen minimiert ist [224]. Das Modul ist aus diesem Grund auch besonders für die *constant time* (ct) Evolution [228] geeignet, wodurch die homo-

nuklearen ^{13}C , ^{13}C -Kopplungen ausgeblendet werden. Aufgrund des Einsatzes von kohärenzselektiven Gradienten kann das Modul ohne Phasenzyklus durchlaufen werden, obgleich für eine optimale Unterdrückung von Artefakten durch Pulsfehler ein minimaler Phasenzyklus von 4 Schritten empfohlen wird (vgl. Abb.5.1).

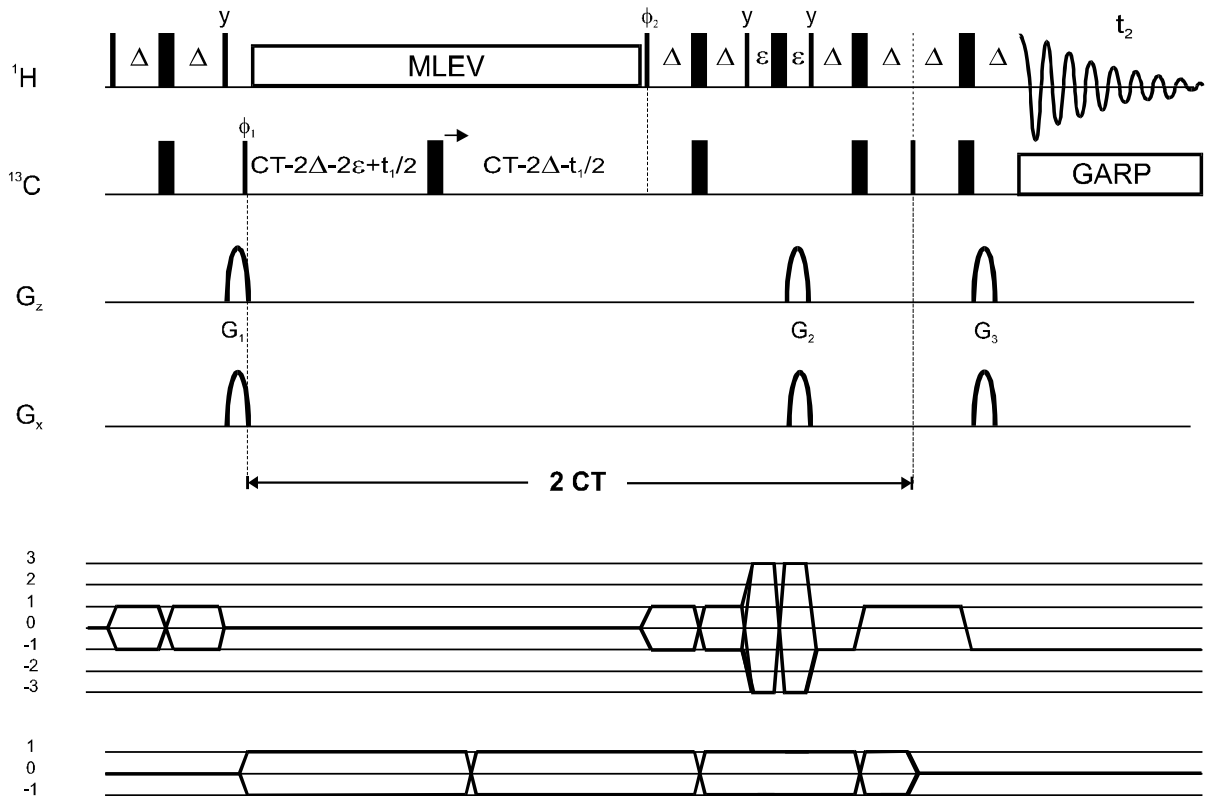


Abb.5.1 Pulssequenz und Kohärenz-Transferwege für das *constant time* (ct) QOF-HSQC-Experiment. Schmal und breit eingezeichnete Pulse haben 90° bzw. 180° Kippwinkel und erfolgen, falls nicht anders vermerkt, mit Phase x . Die Phasenzyklen lauten $\phi_1 = x, -x$; $\phi_2 = 2x, 2(-x)$ und $\phi_{\text{rec}} = x, 2(-x), x$ für den Empfänger. Während der *constant time* Periode der Dauer $2 \cdot \text{CT}$ wird der ^{13}C -Rephasierungspuls in der angegebenen Richtung verschoben. Die Zeitkonstanten sind $\Delta = 2$ ms und $\text{CT} = 12.3$ ms. Die Protonenentkopplung erfolgt durch MLEV16-Entwicklung von 180° Inversionspulsen. Die phasensensitive ^{13}C , ^1H -Kohärenzselektion nach der Echo/Antiecho-Methode in F1 wird durch die drei Gradienten mit relativen Stärken $G_1 = 20$, $G_2 = -20$, $G_3 = 65$ (Echo-Pfad) bzw. $G_3 = 55$ (Antiecho-Pfad) erzielt. Die einheitliche Gradientendauer beträgt 1 ms, gefolgt von einer Abklingzeit von $200 \mu\text{s}$. Für optimale Wasserunterdrückung werden Gradienten aus dem magischen Winkel (d.h. mit $G_x = G_y = G_z$) empfohlen [76].

Die nachfolgende Beschreibung des QOF-HSQC-Experimentes bezieht sich auf seine *constant time* Version, deren Pulssequenz in Abb.5.1 dargestellt ist. Nach einem einleitenden INEPT-Transfer entwickelt sich die chemische Verschiebung von ^{13}C als heteronukleare Ein-Quanten-Kohärenz (HSQC) während t_1 . Die Antiphase-Magnetisierung

$2C_xH_z$ wird durch 1H -Entkopplung aufrechterhalten. Das *constant time* Zeitintervall $2 \cdot CT$ wird durch die ^{13}C - T_2 -Relaxation und die Entwicklung homonuklearer ^{13}C , ^{13}C -Kopplungen bestimmt; entsprechend muß die Bedingung

$$\cos(\pi \cdot {}^1J_{CC} \cdot 2CT) \cdot \exp\left(-\frac{2CT}{T_2}\right) \quad [5.1]$$

(mit ${}^1J_{CC} \approx 35$ Hz) optimiert werden. Da die selektierten Methylgruppen selbst in großen Proteinen aufgrund ihrer raschen Rotation ausreichend lange ^{13}C - T_2 -Relaxationszeiten aufweisen, können in der Praxis CT-Zeiten bis zur theoretisch optimalen Dauer von 14 ms gewählt werden. Am Ende der ^{13}C -Evolutionszeit liegt der komplexe Term $2H_{Iz}C_y \cdot \exp(i\Omega_{CT1})$ vor. Durch den anschließenden 90° -Puls auf 1H wird dieser Term in Multiquantenkohärenz $2H_{Iy}C_y \cdot \exp(i\Omega_{CT1})$ überführt. Danach entwickeln sich während $2 \cdot \Delta$ alle weiteren $(n-1)$ ${}^1J_{CH}$ -Kopplungen des betreffenden ^{13}C -Spins in Antiphase, die durch einen 90°_y -Puls auf 1H schließlich in die benötigte *maximum quantum* Kohärenz $2H_yC_{xy}H_x^{n-1} \cdot \exp(i\Omega_{CT1})$ überführt wird (n ist die Protonenmultiplizität). Nur für Methylgruppen wird hierbei heteronukleare Quadrupel-Quanten-Kohärenz (HQQC) erreicht, die durch Gradient G_2 phasenmarkiert wird. Die HQQC besteht dazu lediglich während der durch den Gradienten vorgegebenen minimalen Dauer $2 \cdot \varepsilon$, wodurch die Entwicklung homonuklearer 1H , 1H -Kopplungen fast völlig unterbunden wird. Gleichzeitig kann diese Dauer $2 \cdot \varepsilon$ (ca. 2 ms) durch entsprechende Dezentrierung des ^{13}C -Rephasierungspulses in die t_1 -Evolutionszeit integriert werden (vgl. Abb.5.1). Anschließend wird das beschriebene Transfer-Schema in umgekehrter Richtung durchlaufen, bis durch Gradient G_3 die phasenmarkierte Kohärenz auf 1H refokussiert wird. Die Selektionsbedingung lautet

$$G_3 = -G_2 \cdot \frac{n\gamma_H \pm \gamma_C}{\gamma_H} \quad [5.2]$$

mit den gyromagnetischen Verhältnissen γ_H und γ_C für 1H und ^{13}C und der selektierten Protonenmultiplizität n . Das vorgestellte Experiment kann also durch einfache Einstellung der Gradientenverhältnisse wahlweise zur Selektion von CH_3 -, CH_2 - oder CH -Gruppen eingesetzt werden, wobei erwähnt werden muß, daß aufgrund der uneinheitlichen ${}^1J_{CH}$ -Kopplungen in der Regel neben der *maximum quantum* Kohärenz auch immer niedrigere Kohärenzordnungen auftreten. Deshalb passiert z.B ein Bruchteil der CH_3 -Intensität auch ein auf CH_2 -Gruppen eingestelltes Gradientenecho. Der Einsatz eines doppelten ReINEPT-Schrittes für *sensitivity enhancement* [77] empfiehlt sich für CH_3 -Gruppen nicht, da hier nur maximal 10% Intensitätsgewinn zu erwarten ist [229].

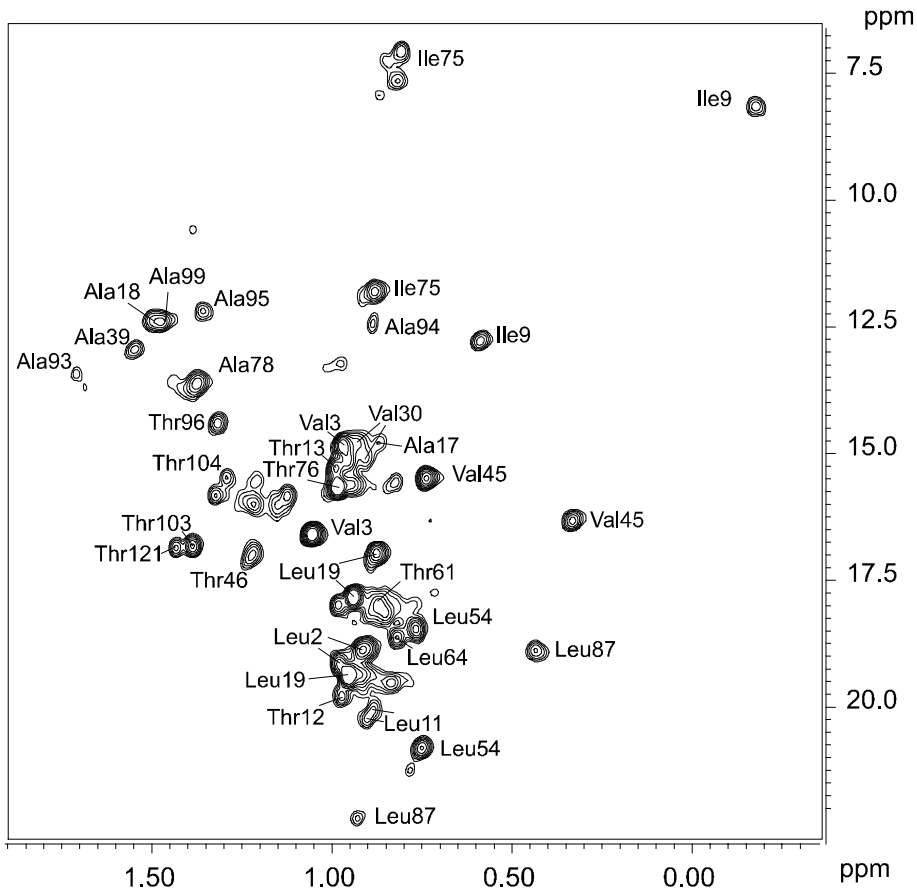


Abb.5.2 Constant time ct-QQF-HSQC Spektrum von $[U-^{13}C, ^{15}N]$ hnpS-PLA2 (0.6 mM, 310 K, 600 MHz). Die Aufnahmeparameter wurden wie für die Pulssequenz in Abb.5.1 angegeben eingestellt. Es wurden 512×88 komplexe Datenpunkte mit 16 *scans* aufgenommen. Das prozessierte Spektrum hat eine Größe von 1024×256 Datenpunkten nach *linear prediction* in F1 um 40 komplexe Datenpunkte. Die gesamte Meßzeit betrug 35 min.

Abb.5.2 zeigt das ct-QQF-HSQC Spektrum von hnpS-PLA2 (vgl. Kapitel 3). Ein entsprechend hochaufgelöstes ct-HQCC-Experiment wäre aufgrund der homonuklearen $^1H, ^1H$ -Kopplungsentwicklung während 2-CT (hier 25 ms) nicht durchführbar. Ein Vergleich von Empfindlichkeit und Auflösung kann aber für HQCC und QQF-HSQC *ohne constant time* Entwicklung vorgenommen werden. Das Ergebnis ist in Abb.5.3 dargestellt. Es verdeutlicht die aufgrund der Unterdrückung der homonuklearen $^1H, ^1H$ -Kopplungen zu erwartenden Intensitätsgewinne und Linienverschärfungen. Für eine tiefergehende Analyse des (ct) QQF-HSQC Experimentes und seiner Vorteile gegenüber dem HQCC-Experiment wird auf die Veröffentlichung [224] verwiesen. Dort wird auch die erfolgreiche Anwendung des 3D ct-NOESY-QQF-HSQC Experimentes auf die 31 kDa große homodimere IIA^{Man}-Domäne des Mannosetransporters von *E.coli* beschrieben.

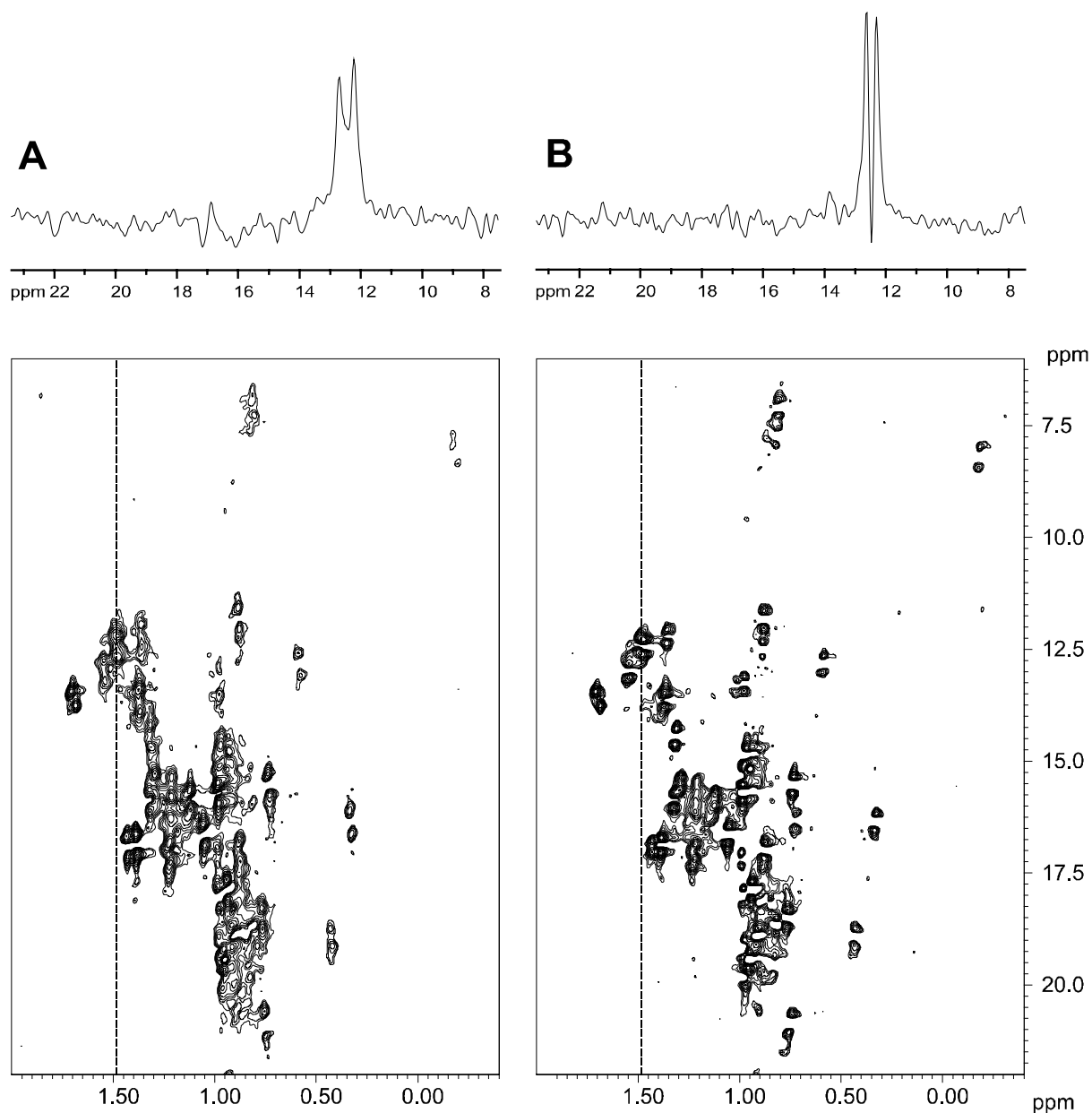


Abb.5.3 Vergleich zwischen einem herkömmlichen HMQC Spektrum (A) und dem QOF-HSQC Spektrum (B) von $[U-^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}]$ hns-PLA2. Es gelten die in Abb.5.2 aufgeführten experimentellen Bedingungen, wobei jetzt 512×128 komplexe Datenpunkte aufgenommen wurden. Die für Ala18 herausgelesenen F1-Spalten verdeutlichen den Intensitätsgewinn und die Linienverschärfung im QOF-HSQC Spektrum.

5.2 Auflösungsoptimierte Aufnahme-strategie für NOESY-Spektren und diagonalfreie 3D NOESY-Spektren durch orthogonale Isotopenfilter

Die Grundlage aller NOESY-Spektren, bei denen die NOE-Kontakte zwischen Protonen aufgezeichnet werden, ist das in Abb.5.4 schematisch dargestellte 2D $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -NOESY.

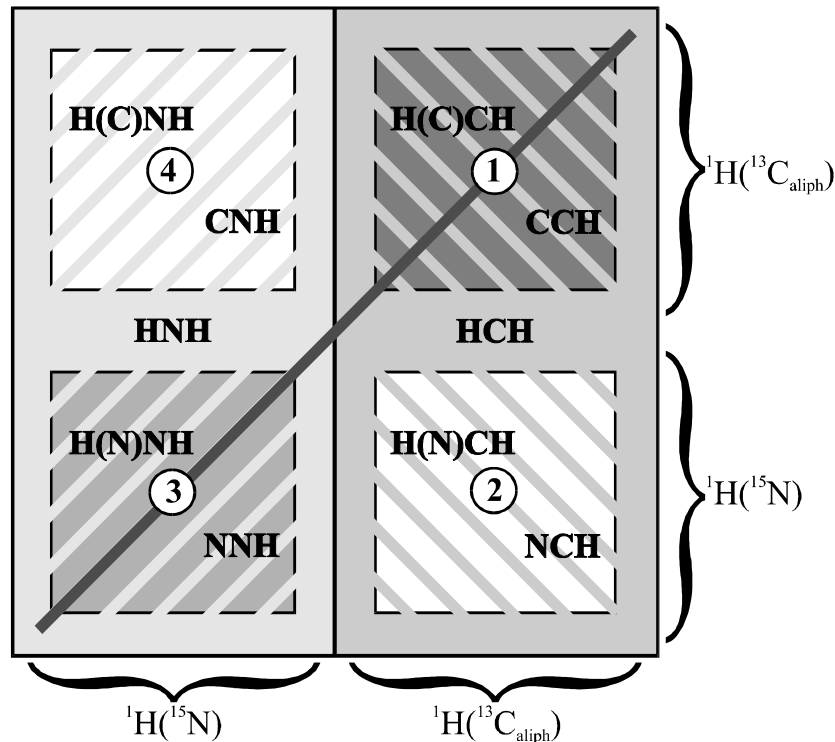


Abb.5.4 Schematische Darstellung der Kreuzsignal-Bereiche (Sub-Spektren) für alle möglichen Editierungen von 3D NOESY-Experimenten an $[\text{U-}^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}]$ markierten Proteinen als Projektion auf das 2D $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -NOESY (mit eingezeichneter Diagonale). Während nur die *einfach* isotopengefilterten HNH- und HCH-Editierungen jeweils eine Hälfte des Gesamt-Spektrums erfassen, selektieren die übrigen *doppelt* isotopengefilterten Editierungen jeweils nur einen *Quadranten* (1 bis 4), der im Fall der *orthogonalen* Filterung (CNH, NCH) diagonalfrei ist.

Für Proteine läßt sich das 2D $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -NOESY-Spektrum näherungsweise in die vier eingezeichneten Quadranten (Subspektren) unterteilen. Quadrant **1** enthält alle Signale der an aliphatische $^{13}\text{C}_{\text{aliph}}$ gebundenen Protonen, Quadrant **3** alle Signale der an ^{15}N gebundenen Protonen, wobei in dieser Betrachtung die an aromatische ^{13}C gebundenen Protonen vernachlässigt werden. Die Quadranten **2** und **4** enthalten *ausschließlich die NOE-Kreuzsignale* zwischen $^{13}\text{C}_{\text{aliph}}$ -gebundenen und ^{15}N -gebundenen Protonen, sind also *diagonalfrei*. Für $[\text{U-}^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}]$ -markierte Proteine ist es möglich, die vier Quadranten durch entsprechende Isotopenfilter gezielt auszuwählen. Diese Isotopenfilter können wahlweise auch zur Entwicklung der chemischen Verschiebung des gefilterten Heterokerns benutzt werden (*Editierung*), so daß man vom 2D zum editierten 3D bzw. 4D NOESY-Experiment gelangt. Durch einen *einfachen* Isotopenfilter werden *zwei* vertikal

benachbarte Quadranten, d.h. die Hälfte des Gesamt-Spektrums, erfaßt – beispielsweise Quadranten **1** und **2** im 3D HCH-NOESY. Erst bei Einsatz *zweier* Isotopenfilter wird selektiv nur *ein* Quadrant ausgewählt. Sind beide Isotopenfilter *identisch*, wie im 3D CCH- und 3D NNH-editierten NOESY, so können auch Ausgangs- und Zielproton identisch sein und der selektierte Quadrant (**1** oder **3**) enthält demnach auch die Diagonalsignale. Nur bei zwei *orthogonalen* Isotopenfiltern muß das Ausgangsproton seine Identität wechseln, um auch den zweiten Isotopenfilter passieren zu können; die so selektierten Quadranten (**2** oder **4**) sind folglich *diagonalfrei*. Orthogonale Filter werden in den hier vorgestellten und vom 4D HCNH-NOESY [230] abgeleiteten 3D CNH- und 3D NCH-NOESY-Experimenten realisiert [214].

Aus Abb.5.4 folgt, daß zur vollständigen Erfassung aller NOE-Kontakte mindestens *ein* 2D H,H-NOESY-, *zwei* 3D NOESY- (HCH- und HNH-editiert) oder *drei* 4D NOESY-Spektren (HCCH- [231], HNNH- [232] und HCNH- [230] bzw. HNCH-NOESY) aufgenommen werden müssen. 4D-Experimente besitzen jedoch gegenüber analogen 3D-Experimenten außer der komplizierteren Auswertbarkeit eine Reihe prinzipieller Nachteile [233]:

- Die Auflösung pro Dimension ist bei gleicher Experimentdauer geringer.
- Die Relaxationsverluste sind aufgrund der nötigen Inkrementierung einer zusätzlichen Verschiebungs-Evolutionszeit größer.
- Bei der amplitudenmodulierten komplexen Aufzeichnung einer weiteren Dimension tritt ein Intensitätsverlust um den Faktor $1/\sqrt{2}$ ein, der auch bei phasenmodulierter Aufnahme (vgl. *sensitivity enhancement* [77]) aufgrund von Relaxationsverlusten nie vollständig kompensiert wird.

Die letztgenannten beiden Verlustfaktoren gelten auch für 3D-Spektren mit simultaner Entwicklung der chemischen Verschiebung beider Heterokerne (*reduced dimensionality* Experimente), die pseudo-4D Information enthalten [234, 235].

Da die größere Dispersion in den höherdimensionalen NOESY-Spektren maßgeblich durch die Heterokern-Editierung eintritt, kann mit nur geringem Informationsverlust auf die zusätzliche Erfassung der schlechter aufgelösten Protonenverschiebung auch in der indirekten Dimension verzichtet werden. Die maximal erzielbare *Quadranten-selektive* Auflösung der NOESY-Spektren kann daher statt durch die angegebenen drei 4D Spektren auch weitgehend durch die gleiche Anzahl der entsprechenden *doppelt editierten* 3D NOESY (NNH- [236], CCH- und CNH- bzw. NCH-NOESY) erhalten werden – jedoch mit den für 3D-Experimenten geltenden Vorteilen kürzerer Meßzeit und höherer gemessener

Auflösung (s.o.). Dieser Satz von drei komplementären, doppelt hetero-editierten 3D NOESY-Spektren stellt offensichtlich das Optimum für eine meßzeit- und auflösungs-optimierte Aufnahme-strategie von NOESY-Spektren dar und wurde für VAT-N (Kapitel 4) angewendet. In Kombination mit einem einfachen 2D H,H-NOESY bzw. mit den beiden 3D HCH- und HNH-editierten NOESY-Spektren wird die volle Quadranten-selektive pseudo-4D Information über alle vier beteiligten Verschiebungen H(X), X, Y und H(Y) erhalten.

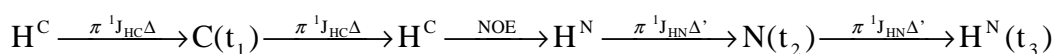
Es muß erwähnt werden, daß bei der Detektion auf den ^{15}N -gebundenen Protonen im 3D CNH-NOESY die diastereotope Information über CH_2 -Gruppen verloren geht. Sie bleibt nur im 3D NCH-NOESY erhalten, das deshalb vorzuziehen ist. Allerdings kann diese spektrale Vereinfachung im 3D CNH-NOESY wiederum mögliche Überlappungen auflösen, so daß das Experiment nicht völlig redundant ist.

Die vollständige Unterdrückung der Diagonalsignale in den 3D CNH- und NCH-NOESY-Experimenten [214], in denen die Ausgangsprotonen notwendigerweise während der NOE-Mischzeit zur Passage beider orthogonaler Isotopenfilter ihre Identität wechseln müssen, hat weitere wesentliche Vorteile:

- Die Auswirkungen statistischer Intensitätsmodulationen und kleiner Phasenfehler sind für die im Vergleich zu den NOE-Kreuzsignalen ca. 10^2 -fach intensiveren Diagonalsignale viel gravierender. In diagonal-freien NOESY-Spektren fehlen daher das sog. t_1 -Rauschen und Basislinienstörungen aufgrund von Phasenfehlern fast völlig.
- NOE-Kreuzsignale, die nahe an der Diagonalen liegen, können so z.T. erst entdeckt bzw. quantifiziert werden.
- Durch den doppelten Isotopenfilter werden auch die $\text{H}^{\text{N}}\text{-H}_2\text{O}$ -Austauschsignale unterdrückt, so daß die Beobachtung von NOE-Kontakten für H^{α} -Protonen direkt auf der Wasser-Resonanz möglich wird.

Nachfolgend wird nur kurz auf die Pulssequenzen der beiden neu entwickelten diagonal-freien 3D CNH- und NCH-NOESY eingegangen, da sie sich aus einfachen Modulen aufbauen bzw. vom bekannten 4D HCNH-NOESY [230] ableiten.

Der Kohärenzverlauf im 3D CNH-NOESY lautet



und im komplementären 3D NCH-NOESY

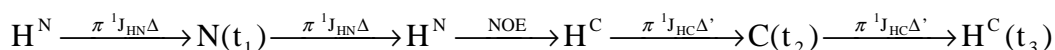


Abb.5.5 zeigt die Pulssequenz des 3D CNH-NOESY, das sich aus den herkömmlichen HSQC-Modulen aufbaut. Der letzte N→H-Transferschritt besteht aus zwei orthogonalen ReINEPT-Modulen zur Erzielung eines empfindlichkeitsgesteigerten phasenmodulierten Transfers [77]. Die Rückführung der Wassermagnetisierung ins Gleichgewicht (*water flip back*) wird durch die gewählten ^1H -Pulsphasen [49], die Unterdrückung von *radiation damping* durch das Gradientenecho-Paar G_1 im ersten HSQC-Modul und den Wasserselektiven 90° *flip back* Puls unmittelbar vor dem zweiten HSQC-Modul erzielt. Verbliebene Wasser-Kohärenz wird durch die ^{15}N , ^1H -kohärenzselektiven Gradienten G_4 , G_5 und G_6 dephasiert.

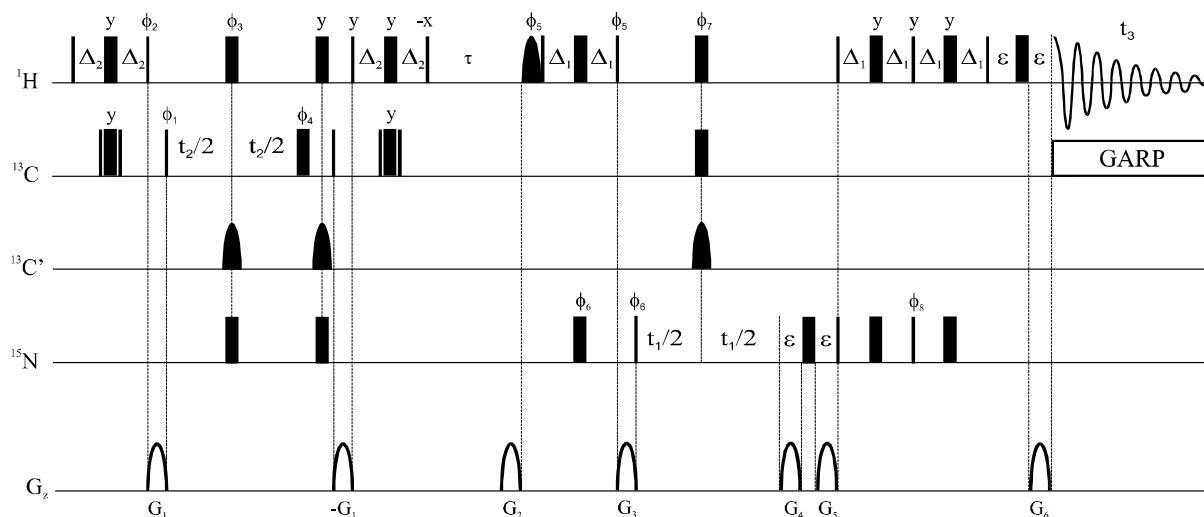


Abb.5.5 Pulssequenz des 3D CNH-NOESY. Schmal und breit eingezeichnete Pulse haben 90° bzw. 180° Kippwinkel und erfolgen, falls nicht anders vermerkt, mit Phase x. Die Transferzeiten Δ_1 und Δ_2 sind ca. 2.2 ms bzw. 1.3 ms lang; τ (ca. 50 - 100 ms) ist die NOE-Mischzeit. Der Wasser-selektive 90° ^1H -Puls ist Q5-amplitudenmoduliert [237] und ca. 3 ms lang. Die ^{13}C -selektiven 180° Inversionspulse sind SEDUCE-1-amplitudenmoduliert [238] und ca. 300 μs lang. Während der Aufnahme wird GARP-entkoppelt. Die ^{15}N , ^1H -Kohärenzselektion in F1 wird durch die Gradienten G_4 , G_5 und G_6 phasensensitiv durch getrennte Aufzeichnung der Echo- und Antiecho-Komponenten erzielt. Die Quadraturdetektion in F2 erfolgt nach States durch Inkrementierung der Pulsphase ϕ_1 . Die Phasenzyklen lauten $\phi_1 = x, -x$, $\phi_2 = 8y, 8(-y)$, $\phi_3 = 4y, 4(-y)$, $\phi_4 = 2x, 2y, 2(-x), 2(-y)$, $\phi_5 = 16y, 16(-y)$, $\phi_6 = 4x, 4(-x)$, $\phi_7 = 2x, 2(-x)$; $\phi_8 = y$ wird zusammen mit Gradient G_6 invertiert (*sensitivity enhancement* [77]). Die Empfängerphase ist $\phi_{\text{rec}} = x, 2(-x), x, -x, 2x, 2(-x), 2x, -x, x, 2(-x), x, -x, 2x, -x, x, 2(-x), 2x, 2(-x), x, -x, 2x, -x$. Die *relative* Stärke der 800 μs langen Gradienten (mit Sinus-Profil) ist $G_1 = -20$; $G_2 = 80$; $G_3 = 40$; $G_4 = -60$; $G_5 = 40$; $G_6 = 10.1$ bzw. -10.1 (zur getrennten Aufnahme von Echo- und Antiecho-Komponenten). Für optimale Wasserunterdrückung werden Gradienten aus dem magischen Winkel (mit $G_x = G_y = G_z$) empfohlen [76]. Nach jedem Gradientenpuls wird eine Abklingzeit von 200 μs eingeschoben, wodurch sich die Gradientendauer $\epsilon = 1.0$ ms ergibt.

Beide diagonalfreien Experimente (3D CNH- und NCH-NOESY) wurden erfolgreich auf VAT-N angewendet. Dort sind auch Ausschnitte der entsprechenden Spektren abgebildet (vgl. Abb.4.5).

Das hier vorgestellte Prinzip orthogonaler Filter mit seinen beschriebenen praktischen Vorteilen kann auch auf andere Weise realisiert werden. Denkbar sind u.a. orthogonale Multiplizitäts-Filter, wie z.B. in einem 3D C(H₃)-CH-NOESY, und frequenzselektive Filter, wie z.B. in einem 3D ¹³C_{aromatisch}¹³C_{aliphatisch}H-NOESY. Weiterhin bieten sich die erwähnten 3D CNH- und NCH-NOESY ideal zur selektiven Beobachtung von *inter*-molekularen NOE-Kontakten in Homodimeren an, bei denen jeweils die Hälfte der zugesetzten Monomerenkonzentration ausschließlich ¹⁵N- und ¹³C-markiert ist.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Struktur und Dynamik von drei Proteinen NMR-spektroskopisch untersucht.

In *Kapitel 1* wird die zum Verständnis der Anwendungen notwendige Theorie der Relaxationsphänomene, die die Grundlage der Beobachtbarkeit von Moleküldynamik durch NMR-Spektroskopie darstellen, beschrieben sowie eine Anleitung zur Durchführung der modellfreien Analyse und hydrodynamischer Rechnungen gegeben.

In *Kapitel 2* werden Struktur und Dynamik der *apo*-Form des humanen neutrophilen Lipocalins HNL beschrieben [148]. HNL bindet als extrazelluläres Transportprotein u.a. bakterielle, chemotaktisch wirksame Peptide, hat aber auch enzymatische Funktionen bei der Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen. Die Struktur von HNL zeigt das für Lipocaline typische trichterförmige β -barrel, das zur Aufnahme des Substrates dient. Die Dynamik des Proteinrückgrates wurde über ^{15}N -Relaxationsmessungen quantifiziert und zeigt deutliche Korrelation mit der Struktur. Während das kompakte β -barrel die erwartete Starrheit aufweist, ist die seitliche $\alpha 1$ -Helix von HNL beweglich aufgehängt. Die ungeordnete ω -Schleife, die entlang der Öffnung des β -barrels verläuft, zeigt insgesamt sehr hohe Beweglichkeit. Sie würde es erlauben, daß sich die ω -Schleife nach Beladung des Proteins über die Öffnung des β -barrels legt und nicht nur das Substrat einschließt, sondern einem noch unbekanntem HNL-Rezeptor den beladenen Zustand anzeigt. Die flexible Aufhängung der $\alpha 1$ -Helix könnte ebenfalls eine Rolle bei der Rezeptorbindung bzw. -erkennung spielen. Die zusätzlich erfaßten Relaxationsraten ^{15}N -tragender Seitenketten zeigen ebenfalls hohe Korrelation mit strukturellen Gegebenheiten wie Wasserstoffbrücken und dichte Packung.

Für die humane nicht-pankreatische sekretierte Phospholipase A_2 (hnp-PLA2), deren NMR-Struktur bereits in Vorarbeiten unseres Arbeitskreises aufgeklärt wurde [172], wurde ebenfalls die Dynamik des Proteinrückgrates über ^{15}N -Relaxationsmessungen quantitativ erfaßt (*Kapitel 3*). hnp-PLA2 hat wegen seiner Beteiligung an schweren chronischen Entzündungsprozessen (Arthritis, Allergien u.a.) pharmakologische Bedeutung und hydrolysiert die Phospholipid-Bausteine von Zellmembranen. Das Protein zeigt allerdings nur gegenüber aggregiertem Substrat (intakte Zellmembranen) eine hohe Aktivität; der Mechanismus dieser *interfazialen Aktivierung* ist noch unverstanden. Die ^{15}N -Relaxationsdaten ergaben für hnp-PLA2 eine signifikante Anisotropie der Molekülrotation, die durch hydrodynamische Rechnungen berücksichtigt wurde. Die modellfreie Analyse der

Proteindynamik weist verbreitet Dynamik im Nanosekunden- und Millisekundenbereich mit z.T. sehr hohen Amplituden auf. Die bisherige Annahme, PLA2-Proteine seien aufgrund der hohen Anzahl stabilisierender Cystine eher starr, wird hierdurch erstmals experimentell widerlegt. Das auffälligste Merkmal der meist zusammenhängenden Dynamik ist die hohe Beweglichkeit zweier Schleifen, die wie Pforten vor dem Eingang des lipophilen Kanals von hnp-PLA2 liegen. Dieses Ergebnis eröffnet erstmals einen dynamischen Zugang zum Verständnis der interfazialen Aktivierung: durch die Bindung an Membranen wird diese Schließbewegung sehr wahrscheinlich unterbunden und die Pforten eventuell in offener Stellung arretiert, so daß das Substrat ungehindert in den lipophilen Kanal und damit in das katalytisch aktive Zentrum diffundieren kann.

Die in *Kapitel 4* vorgestellte Struktur der archaebakteriellen VAT-N ^[213] ist (zeitgleich mit der Kristallstruktur von NSF-N ^[239]) die erste Hochauflösungsstruktur der N-terminalen Domäne eines AAA-Proteins. Diese weit verbreitete Proteinfamilie ist an einer Vielzahl zellbiologischer Prozesse beteiligt, u.a. bei der Substraterkennung und Proteindefaltung am Proteasom. Auch das erst kürzlich entdeckte VAT hat vermutlich Chaperon-Aktivität. Die katalytisch aktive Domäne ist dabei das untersuchte VAT-N ^[206], und auch Untersuchungen an anderen AAA-Proteinen zeigen, daß die Bindung und Prozessierung des Proteinsubstrates wohl generell an der N-terminalen Domäne stattfindet. Die Struktur von VAT-N baut sich aus zwei gleich großen Subdomänen VAT-Nn und VAT-Nc auf. VAT-Nn weist bei hoher interner Sequenzhomologie ein symmetrisch aus zwei $\beta\alpha\beta\beta$ -Motiven aufgebautes doppeltes ψ -barrel auf; VAT-Nc hat eine neue halboffene β -Faltblattstruktur. Vorläufige dynamische Untersuchungen bestätigen, daß sich beide Subdomänen starr zueinander zur nierenförmigen Gesamtstruktur zusammenlagern. Durch Vergleich mit einer elektronenmikroskopischen Aufnahme konnte VAT-N auf der Oberseite des ringförmigen VAT-Hexamers lokalisiert werden. Auf der solvenszugewandten Seite weist VAT-N eine lange, positiv geladene Furche auf, die in jeder Subdomäne von zwei flexiblen Schleifen eingefasst wird und die wahrscheinliche Peptid-Bindungsstelle darstellt. Die lipophile Kontaktfläche zwischen beiden Subdomänen weist zur Ringmitte. Begleitende evolutionsgenetische und Homologieuntersuchungen lassen vermuten, daß die Struktur von VAT-N weitgehend auf die AAA-Proteine generalisierbar ist und ein Bindeglied in der Evolution von Aspartat-Proteinasen aus einem einfachen $\beta\alpha\beta\beta$ -Urmotiv darstellt ^[213].

Im Verlauf der Arbeit ergaben sich zwei NMR-methodische Neuentwicklungen, die sich mit dem Problem der meßzeitoptimierten Auflösungserhöhung bei NMR-spektro-

skopischen Untersuchungen an [U- ^{13}C , ^{15}N]-markierten Proteinen befassen (*Kapitel 5*). Zum einen wurde ein neues, auf dem HSQC-Experiment basierendes NMR-Modul zur Selektion von Methylgruppen über einen Quadrupel-Quanten-Filter (*QQF-HSQC*) entwickelt ^[224] (*Kapitel 5.1*), das im Gegensatz zu den herkömmlichen Methoden die unerwünschte Entwicklung homonuklearer Protonenkopplungen maximal unterdrückt. Dadurch werden die Linienbreiten minimiert und die Signalintensitäten maximiert. Mit diesem QQF-HSQC ist es erstmals möglich, lange *constant time* Experimente von Methylgruppen aufzunehmen, deren Auflösung fast ausschließlich durch die natürliche T_2 -Relaxationszeit bestimmt wird. Daneben wurde systematisch nach dem meßzeit- und auflösungsoptimierten Minimalsatz von NOESY-Spektren gesucht. Nach der vorgeschlagenen Strategie sind hierzu mindestens drei komplementäre, doppelt heteronuklear editierte 3D NOESY-Experimente – das CCH-, NNH- und NCH-editierte 3D NOESY – notwendig, die zusammen die vollständige Information aller NOE-Kontakte enthalten. Durch Hinzunahme des einfachen 2D H,H-NOESY oder der beiden besser aufgelösten 3D HNH- und HCH-editierten NOESY wird im Prinzip die vollständige *pseudo-4D* Information erhalten. Das neu entwickelte 3D NCH-NOESY und sein komplementäres 3D CNH-NOESY ^[214], die *orthogonale Isotopenfilter* einsetzen, sind *diagonalfrei*. Die vollständige Unterdrückung der Diagonalsignale hat hohe praktische Bedeutung, da diese Spektren frei von t_1 -Rauschen, Phasenfehlern bzw. Basislinienstörungen und Austauschsignalen der Amidprotonen mit dem Wasser sind.

Anhang

A. Spektrometerspezifikationen

Tab.A.1 Übersicht über die im Arbeitskreis verfügbaren NMR-Spektrometer (Fa. BRUKER) mit wichtigen Spezifikationen.

Gerät	Probenkopf	Gradienten- eichung ¹⁾	Berechnung T_{real} aus $T_{\text{angezeigt}}$ [K]	0 ppm [¹ H] (MHz)	0 ppm [¹³ C] (MHz)	0 ppm [¹⁵ N] (MHz)
DMX750	TXI	(74%)	$0.996123 \cdot T_{\text{angezeigt}} - 0.624249 \text{ K}$	750.1299379	188.6198203	76.0100050
DMX600	QXI	66 ± 0.7 (74%)	$1.031109 \cdot T_{\text{angezeigt}} - 11.942032 \text{ K}$	600.3999475	150.9702846	60.8379971
DMX601	TXI	67.0 ± 0.5 (71.5%)	$0.9476 \cdot T_{\text{angezeigt}} + 13.055$	600.1299400	150.9023900	60.8106370
DMX500	BB-invers		$1.0352 \cdot T_{\text{angezeigt}} - 5.3761$	500.1299577	125.7574459	50.6777295

1) Der erste Eintrag unter Gradienteneichung gibt die absolute Stärke eines z-Gradienten in [G/cm] bei 100% Amplitude wieder. Der zweite Eintrag (in Klammern) gibt den Reskalierungsfaktor g an, um den x,y-Gradienten bei gleicher nominaler Stärke bezüglich z-Gradienten schwächer sind; der magische Winkel liegt dann bei $x = y = g \cdot z$ (die TXI- und QXI-Probenköpfe verfügen über abgeschirmte xyz-Gradientenspulen, der BB-Inversprobenkopf nur über eine abgeschirmte z-Gradientenspule).

Tab.A.1 faßt wichtige Details der Geräteausstattung und Spezifikationen der im Arbeitskreis verfügbaren NMR-Spektrometer zusammen. Maximale absolute z-Gradientenstärken wurden aus Methanol-Selbstdiffusionsmessungen bestimmt. Die Ermittlung der Umrechnung von angezeigter in tatsächliche Temperatur erfolgte über lineare Anpassung von Temperatureichkurven mittels reinem Methanol bzw. Glykol ^[45, 46] (vgl. Kap.1.9.1). Die Kalibrierung der 0ppm-Frequenzen für ¹H wurde mit externem TSP (295 K, pH 7.0) durchgeführt ^[240]. Die Referenzfrequenzen der Heterokerne wurden über ihre gyromagnetischen Verhältnisse aus den ¹H-Referenzfrequenzen errechnet. Als Konsensus-Verhältnisse wurden dabei zugrundegelegt ^[240]: $\gamma_C/\gamma_H = 0.25144953$ und $\gamma_N/\gamma_H = -0.101329118$. Es ist zu beachten, daß diese Eichung auf TSP bei höheren Temperaturen scheinbar abweichen kann, wenn die LOCK-Substanz eine deutliche Temperaturabhängigkeit ihrer chemischen Verschiebung zeigt (besonders D₂O). Davon bleibt aber das Verhältnis der Referenzfrequenzen zwischen den Spektrometern völlig unberührt.

B. Datenanhang HNL**B.1 NMR-Spektralbereiche und Meßfenste für HNL (297.5 ± 0.5K)**

<i>Spingruppe</i>	<i>Spektralbereich</i>	<i>Meßfenster</i>
<i>Protonen</i>	[(-1.2) - 10.6]	<i>Standardfenster mit Wasser in Resonanz (für FlipBack)</i>
$H_{\text{Aliphaten}}$	[(-0.5) - 6.5]	
H_{α}	[1.8 - 6,5]	
H_{Aromaten}	[6.0 - 7.8]	
$H_{\text{N,Proteinrückgrat}}$	[6.6 - 10.1]	
$H_{\text{N,Asn,Gln}}$	[5.7 - 8.1]	
$H_{\text{N,Arg,Lys}}$	[4.5 - 7.7]	
<i>Stickstoff</i>	[108.3 - 130.9]	<i>gefaltetes Standardfenster für alle auf ^{15}N-HSQC basierten Experimente</i>
$N_{\text{Proteinrückgrat}}$	[104 - 133]	
$N_{\text{Asn,Gln}}$	[108-117]	
N_{Arg}	[81.5 - 86]	
<i>Kohlenstoff</i>		
$C_{\text{Aliphaten}}$	[10 - 80]	
	[8.0-49.0]	<i>Gefaltetes $^{13}\text{C}_{\text{Aliphaten}}$-Fenster für HCCH-Korrelationsexperimente</i>
C_{α}	[40 - 69]	<i>Meßfenster für HNCA</i>
C_{β}	[16 - 73]	<i>Meßfenster für HNCACB, CBCACONH</i>
C_{Methyl}	[11 - 28]	
C_{Aromaten}	[113 - 139,5]	
CO	[169 - 182]	<i>Standardfenster für ^{13}CO</i>

B.2 Verzeichnis der an HNL durchgeführten NMR-Experimente

Zu den verwendeten Pulsprogrammen wird auf Anhang E verwiesen. Alle Aufnahmeparameter sind in den Pulsprogrammen detailliert beschrieben. Für die nachfolgend angegebenen *kritischen* Aufnahmeparameter gelten die Konventionen:

- $\Delta(\text{XY})$ = halbe Dauer der Entwicklung der skalaren Kopplung zwischen Spins X und Y, bezogen auf den INEPT-Transfer ($\Delta-180^\circ-\Delta$). Für vollständigen Transfer ohne Relaxation gelten die optimalen Transferzeiten im XY-System $\Delta(\text{XY}) = 1/4^{\text{n}}\text{J}(\text{XY})$, im XY_2 -System $\Delta(\text{XY}) = 1/8^{\text{n}}\text{J}(\text{XY})$ und im XY_3 -System $\Delta(\text{XY}) = 1/10^{\text{n}}\text{J}(\text{XY})$. Zur Minimierung von Relaxationsverlusten empfiehlt sich eine auf ca. 70% reduzierte Dauer, für die der reine Transfer immer noch $\sin(0.7 \cdot \pi/2) = 90\%$ beträgt. Damit verringert sich die gewählte Transferzeit im XY-System auf $\Delta(\text{XY}) = 1/6^{\text{n}}\text{J}(\text{XY})$, was gleichzeitig den Transfer auch für alle anderen Multiplizitäten erlaubt. Falls nicht anders angegeben, gelten nachfolgend diese Transferzeiten. Bei HMQC-Transfer ist die Transferzeit doppelt so lang; der Faktor 2 wird zur Kenntlichmachung vorgezogen (Bsp.: $\Delta(\text{NH}\alpha) = 2 \times 14 \text{ ms}$ im HNHA)
- τ = Entwicklungszeit für Populationstransfer (NOE-/ROE-Transfer) oder Kohärenztransfer (TOCSY- bzw. Hartmann-Hahn-Transfer; hier wird in Klammern die benutzte Mischsequenz und 90° -Pulslänge angegeben)
- Falls nicht anders erwähnt, wurden die angegebenen Meßfenster (B.1) gewählt. Abweichende spektrale Breiten (Meßfenster) sind in ppm angegeben.

B.2 Verzeichnis der an HNL durchgeführten NMR-Experimente

Experiment	Literatur	Bemerkungen und wichtige Parameter	Spektrometer
¹⁵ N-HSQC	[77, 241]	¹⁵ N: [80 - 134], Arg-N ^ε ungefaltet	DMX600
¹⁵ N-HSQC			DMX600
¹⁵ N-HSQC		Inversion der NH ₂ -Gruppen (11 ms Vorlaufzeit für ¹ J _{HN})	DMX600
¹⁵ N-HSQC		¹⁵ N: [65.5 - 86.5], selektiv auf Arg-N ^ε und Lys-N ⁰	DMX600
¹⁵ N-HSQC	[49]	¹⁵ N: [60 - 140], Water Flip-Back Technik	DMX600
¹³ C-HSQC	[242]	¹³ C _{Aliphaten} -Fenster	DMX600
¹³ C-HSQC		¹³ C _{Aromaten} -Fenster	DMX750
<i>Experimente zur sequentiellen Zuordnung</i>			
HNCO	[243, 244]	Δ(NCO) = 11.5 ms	DMX600
HNCA	[244-246]	Δ(NCα) = 13 ms	DMX600
HNCACB	[247]	Δ(NCα) = 10 ms, Δ(CαCβ) = 3 ms	DMX600
CBCACONH	[248]	Δ(NCO) = 11.5 ms, Δ(CαCO) = 3.8 ms, Δ(CαCβ) = 3.2 ms	DMX600
HN(CA)HA	[150, 249]	Fehlerhafte Multiquanten-Variante nach Seip [150] führte zur Modulation durch ¹ J _{CC} -Kopplungsentwicklung in der H ^α -Dimension	DMX600
HA(CACO)NH	[250]	Δ(NCO) = 11.0 ms, Δ(CαCO) = 3.8 ms,	DMX600
<i>Experimente zur Seitenkettenuordnung</i>			
HBHA(CO)NH	[251]	Δ(CαCβ) = 3.2 ms, Δ(NCO) = 12.0 ms, Δ(CαCO) = 3.5 ms	DMX600
HCCH-COSY	[252]	Δ(C ₁ C ₂) = 3.25 ms, gefaltetes ¹³ C _{Aliphaten} -Fenster	DMX600
HCCH-TOCSY	[253]	τ _{mix} = 22.8ms (DIPSI-3, 35 μs), gefaltetes ¹³ C _{Aliphaten} -Fenster	DMX600
¹⁵ N-TOCSY-HSQC	[254, 255]	τ _{mix} = 60ms (CLEAN-MLEV, 19.25 μs)	DMX600
<i>Experimente zur diastereotopen Unterscheidung</i>			
HNHB	[256]	Δ(NHβ) = 2×19ms, einschließlich Referenz-HSQC	DMX600
H ₂ NCO-E.COSY	[151]	Δ(NCO) = 12.0 ms	DMX600
<i>Experimente zur Strukturbestimmung</i>			
HNHA	[257, 258]	Δ(NHα) = 2×14 ms, mit NH ₂ -Gruppenunterdrückung	DMX600
¹³ C-NOESY-HSQC	[259]	τ _{mix} = 70ms, ¹³ C: [7.35-48.35] (gefaltet)	DMX750
¹³ C-NOESY-HSQC		τ _{mix} = 70ms, ¹³ C _{Aromaten} -Fenster	DMX750
¹⁵ N-NOESY-HSQC	[254]	τ _{mix} = 70ms	DMX600
2D-H,H-NOESY		τ _{mix} = 70ms, WATERGATE-Wasserunterdrückung	DMX750
<i>Experimente zur Dynamikmessung</i>			
cc-DPFGE-LED	[260]	Diffusionsmessung mit Δ = 55 ms (Netto-Diffusionszeit) und δ = 6 ms (Netto-Gradientendauer), variable Gradientenstärke (Sinusform) 0.85 - 40.5 G/cm	DMX600
MEXICO	[155]	τ _{mix} = 50, 100, 150ms, mit Referenz-HSQC	DMX600
¹⁵ N-T ₁ , ¹⁵ N-T ₂ ,	[50, 261]	¹⁵ N-Relaxationsmessungen bei drei Feldstärken,	DMX750
¹⁵ N{ ¹ H}-NOE		Parameter in Kapitel 2.5.1	DMX600
			DMX500

B.3 Gemessene ¹⁵N-Relaxationsdaten für HNL (297.5 ± 0.5 K, H₂O, 1 mM)

Amino-säure	Sek. Struk.	T ₁ [s] 750 MHz	T ₁ [s] 600 MHz	T ₁ [s] 500 MHz	T ₂ [ms] 750 MHz	T ₂ [ms] 600 MHz	T ₂ [ms] 500 MHz	NOE 750 MHz	NOE 600 MHz	NOE 500 MHz
M0										
Q1										
D2		1.030	0.792		282.8	327.3		-0.26	-0.95	
S3		1.064	0.770	0.940	260.0	280.8	317.3	0.02	-0.09	-0.65
T4		0.960	0.705	0.893	216.0	230.6	243.7	0.27	0.18	-0.35
S5		0.910	0.686	0.837	172.1	197.8	186.8	0.29	-0.12	-0.05
D6		0.487	0.670	0.704	159.3	174.8	170.9	0.41	0.06	0.11
L7		1.019	0.833	0.710	100.7	112.2	116.6	0.44	0.49	0.31
I8		1.225	0.990	0.790	59.9	70.5	75.7	0.72	0.71	0.63
P9										
A10		1.431	1.030	0.799	54.6	62.4	67.7	0.79	0.84	0.74
P11										
P12										
L13		1.337	1.019	0.785	64.5	63.4	81.9	0.78	0.78	0.72
S14		1.348	0.942	0.798	51.0	56.6	62.1	0.84	0.79	0.78
K15		1.395	0.991	0.792	53.6	58.2	65.8	0.84	0.70	0.76
V16		1.508	1.034	0.844	53.1	59.0	64.5	0.82	0.81	0.81
P17										
L18		1.490	1.084	0.841	60.6	65.7	71.9	0.82	0.78	0.75
Q19		1.390	0.996	0.799	53.0	59.6	63.9	0.84	0.75	0.85
Q20		1.455	1.042	0.799	54.1	61.3	66.7	0.80	0.74	0.80
N21		1.514	0.948		54.9	61.1		0.82	0.72	
F22		1.568	1.062	0.872	54.0	59.5	65.2	0.81	0.83	0.77
Q23		1.765	1.106	0.914	57.3	62.2	67.9	0.86	0.72	0.79
D24	3 ₁₀	1.577	1.097	0.904	58.6	61.6	67.1	0.85	0.84	0.83
N25	3 ₁₀	1.386	0.992	0.846	52.1	57.8	62.5	0.86	0.81	0.84
Q26	3 ₁₀	1.456	1.074	0.854	57.7	63.3	71.8	0.82	0.76	0.77
F27	3 ₁₀	1.520	1.049	0.862	50.9	57.6	63.0	0.86	0.86	0.81
Q28		1.528	1.055	0.831	55.2	60.5	69.1	0.84	0.78	0.75
G29	β1	1.504	1.008	0.786	53.7	60.6	65.8	0.88	0.78	0.86
K30	β1	1.525	1.074	0.832	50.8	60.1	61.9	0.83	0.74	0.87
W31	β1	1.598	0.992	0.750	54.1	59.7	65.3	0.84	0.82	0.81
Y32	β1	1.552	1.047	0.832	53.5	55.5	61.7	0.87	0.84	0.81
V33	β1	1.694	1.093	0.867	52.4	58.9	61.2	0.81	0.86	0.81
V34	β1	1.565	1.096	0.839	45.1	50.6	49.3	0.87	0.87	0.80
G35	β1	1.458	1.091	0.795	59.4	85.6	64.1	0.85	0.81	0.81
L36	β1	1.433	1.026	0.769	49.7	58.0	60.3	0.82	0.79	0.80
A37	β1	1.467	1.094	0.771	50.6	54.4	59.7	0.86	0.92	0.78
G38	β1	1.550	1.060	0.859	53.9	57.7	63.7	0.85	0.77	0.71
N39	β1	1.586	1.020	0.921	48.1	54.8	56.7	0.86	0.83	0.85
A40	ω	1.431	1.002	0.823	54.1	57.5	57.8	0.86	0.85	0.73
I41	ω	1.458	1.060		32.6	47.0	53.0	0.77	0.81	
L42	ω	1.423	1.024	0.732	35.3	50.2	48.0	0.83	0.65	0.71
R43	ω									
E44	ω									
D45	ω	1.160	0.890	0.771	50.9	74.0	62.7	0.49	0.54	0.45

Amino -säure	Sek. Struk.	T ₁ [s]	T ₁ [s]	T ₁ [s]	T ₂ [ms]	T ₂ [ms]	T ₂ [ms]	NOE	NOE	NOE
		750 MHz	600 MHz	500 MHz	750 MHz	600 MHz	500 MHz	750 MHz	600 MHz	500 MHz
K46	α									
D47	ω	1.248	0.854	0.803	53.4	64.3	61.1	0.46	0.41	0.77
P48	ω									
Q49	ω									
K50	ω									
M51	ω	1.650	1.040	0.818	36.6	46.3	43.7	0.85	0.88	0.72
Y52	β2	1.700	1.040	0.874	38.0	45.1	48.1	0.85	0.85	0.64
A53	β2	1.500	1.008	0.883	49.0	57.0	62.0	0.81	0.81	0.84
T54	β2	1.646	1.052	0.871	54.1	57.4	63.8	0.85	0.80	0.86
I55	β2	1.700	1.030	0.855	53.9	55.4	60.0	0.87	0.79	0.81
Y56	β2	1.640	1.133	0.829	59.4	61.3	65.3	0.88	0.90	0.75
E57	β2	1.658	1.060	0.855	57.8	61.1	68.3	0.82	0.86	0.83
L58	β2									
K59	β2	1.513	0.934	0.793	54.9	59.4	65.4	0.83	0.84	0.75
E60		1.435	0.965	0.899	56.5	61.3	68.8	0.80	0.82	0.73
D61		1.504	1.102	0.854	56.8	61.6	68.5	0.80	0.78	0.76
K62		1.495	0.999	0.805	50.9	58.7	66.9	0.82	0.78	0.77
S63	β3	1.450	0.999	0.834	55.7	62.1	73.4	0.81	0.76	0.74
Y64	β3	1.473	1.080	0.820	55.9	60.3	65.5	0.84	0.79	0.78
N65	β3	1.560	1.055	0.777	54.6	58.6	61.6	0.84	0.88	0.88
V66	β3	1.638	1.011	0.854	54.7	61.3	70.8	0.81	0.85	0.83
T67	β3	1.655	1.033	0.840	52.0	57.4	60.4	0.89	0.95	0.86
S68	β3	1.790	1.039	0.905	53.3	60.1	65.1	0.78	0.93	0.90
V69	β3									
L70	β3	1.570	1.030	0.901	62.1	61.7	62.7	0.81	0.82	0.73
F71	β3									
R72	β3	1.515	1.002	0.818	56.5	61.4	67.0		0.72	0.76
K73		1.450	0.980		55.0	62.8		0.76	0.66	
K74		1.327	0.900		53.0	60.9		0.71	0.61	
K75	β4	1.317	0.983	0.796	55.6	61.8	69.3	0.70	0.62	0.68
C76	β4	1.408	1.142	0.832	38.3	46.5	54.4	0.69	0.76	0.70
D77	β4	1.484	1.099	0.850	51.3	55.4	61.2	0.78	0.77	0.78
Y78	β4	1.534	1.100	0.923	49.3	54.5	59.3	0.81	0.77	0.73
W79	β4	1.677	1.100	0.823	47.2	56.3	61.0	0.82	0.85	0.88
I80	β4									
R81	β4	1.713	1.050	0.913	52.4	56.5	64.7	0.81	0.83	0.72
T82	β4	1.630	1.133	0.878	56.6	62.7	69.9	0.81	0.76	0.78
F83	β4	1.593	1.105	0.806	54.5	62.0	61.2	0.86	0.80	0.77
V84	β4									
P85	β4									
G86	β4	1.500	1.029	0.865	61.4	67.7	72.3	0.81	0.74	0.73
C87		1.400	1.033	0.812	52.0	59.7	67.0	0.83	0.77	0.82
Q88		1.310	1.004	0.815	65.0	71.2	80.1	0.61	0.64	0.55
P89										
G90	β5									
E91	β5	1.350	0.994	0.781	49.4	56.0	60.5	0.83	0.76	0.80
F92	β5	1.418	0.973	0.834	55.9	61.8	66.7	0.83	0.68	0.73

Amino-säure	Sek. Struk.	T ₁ [s]	T ₁ [s]	T ₁ [s]	T ₂ [ms]	T ₂ [ms]	T ₂ [ms]	NOE	NOE	NOE
		750 MHz	600 MHz	500 MHz	750 MHz	600 MHz	500 MHz	750 MHz	600 MHz	500 MHz
T93	R5	1.575	1.051	0.809	53.2	59.0	62.8	0.82	0.75	0.78
L94	β5	1.650	1.020	0.868	57.6	57.9	68.5	0.77	0.87	0.86
G95	β5	1.393	1.003	0.816	52.9	56.7	65.9	0.82	0.83	0.71
N96		1.480	0.915	0.827	55.8	61.0	68.2	0.81	0.76	0.86
I97		1.487	1.057	0.840	52.5	57.9	64.3	0.83	0.85	0.77
K98		1.300	0.993	0.786	51.6	57.7	63.6	0.80	0.72	0.73
S99		1.474	1.018	0.816	56.7	63.2	67.5	0.79	0.77	0.82
Y100		1.463	1.047	0.856	54.5	59.0	65.3	0.79	0.70	0.76
P101										
G102			1.016		65.1	71.7	112.8	0.73	0.59	0.90
L103	β6	1.490	1.013	0.841	54.2	60.0	65.6	0.80	0.66	0.72
T104	β6	1.440	1.103	0.879	51.5	54.7	59.9	0.75	0.72	0.76
S105	β6	1.515	1.043	0.851	56.1	62.1	67.5	0.79	0.87	0.78
Y106	β6	1.480	1.059	0.828	55.3	62.0	63.6	0.86	0.79	0.77
L107	β6	1.385	1.066	0.790	52.1	59.9	63.9	0.85	0.81	0.76
V108	β6	1.545	1.059	0.859	53.7	60.5	64.7	0.85	0.79	0.78
R109	β6	1.487	1.018	0.809	53.8	58.6	65.4	0.88	0.86	0.78
V110	β6									
V111	β6	1.290	1.001	0.759	51.7	59.4	62.4	0.87	0.82	0.90
S112	β6	1.535	1.068	0.808	53.0	59.0	64.1	0.86	0.84	0.82
T113	β6	1.485			49.5			0.84		
N114		1.566	1.060	0.789	48.7	54.3	56.8	0.86	0.90	0.78
Y115		1.540	1.000	0.766	53.9	58.1	60.9	0.92	0.84	0.80
N116		1.547	1.106	0.817	51.7	58.3	63.4	0.89	0.87	0.83
Q117		1.583	0.955	0.813	50.9	59.2	60.6	0.88	0.87	0.84
H118	β7	1.465	1.056	0.849	48.8	57.6	59.1	0.84	0.87	0.88
A119	β7	1.536	1.047	0.842	49.4	57.6	59.5	0.88	0.78	0.85
M120	β7									
V121	β7	1.540	1.122	0.823	53.9	58.9	63.2	0.91	0.82	0.89
F122	β7	1.535	1.064	0.816	50.8	57.0	62.3	0.89	0.90	0.82
F123	β7	1.540	1.054	0.821	53.5	57.9	62.6	0.87	0.80	0.84
K124	β7	1.605	1.047	0.804	51.4	55.2	61.6	0.83	0.76	0.82
K125	β7									
V126	β7	1.617	1.041	0.810	50.3	61.0	61.8	0.88	0.73	0.85
S127	β7	1.446	1.034	0.863	52.2	55.7	61.4	0.81	0.71	0.78
Q128		1.363	1.000	0.774	53.5	58.8	62.5	0.75	0.76	0.83
N129		1.405	1.026	0.813	48.1	57.0	62.9	0.76	0.73	0.71
R130	β8	1.495	1.034	0.868	57.9	64.8	70.6	0.75	0.63	0.69
E131	β8	1.557	1.079	0.829	55.3	62.6	67.6	0.76	0.80	0.73
Y132	β8	1.560	1.087	0.818	56.5	58.3	65.3	0.78	0.81	0.74
F133	β8	1.478	1.036	0.776	54.5	60.2	64.7	0.81	0.73	0.76
K134	β8	1.556	1.070	0.806	49.6	56.6	61.7	0.85	0.72	0.84
I135	β8	1.560	1.099	0.769	50.2	55.8	60.5	0.84	0.73	0.85
T136	β8	1.490	1.043	0.859	38.4	47.1	52.1	0.85	0.73	0.80
L137	β8	1.725	1.071	0.823	52.9	55.8	61.9	0.85	0.83	0.90
Y138	β8	1.550	1.024	0.810	54.7	56.6	65.1	0.87	0.82	0.79
G139	β8	1.570	1.090	0.761	54.8	59.0	61.0	0.85	0.84	0.76

Amino -säure	Sek. Struk.	T ₁ [s]	T ₁ [s]	T ₁ [s]	T ₂ [ms]	T ₂ [ms]	T ₂ [ms]	NOE	NOE	NOE
		750 MHz	600 MHz	500 MHz	750 MHz	600 MHz	500 MHz	750 MHz	600 MHz	500 MHz
R140	R8	1.525	1.059	0.855	53.0	57.7	60.6	0.82	0.78	0.86
T141		1.490	1.040	0.821	50.3	57.5	66.7	0.85	0.76	0.83
K142		1.660	1.056	0.900	58.1	61.7	67.1	0.86	0.86	0.75
E143		1.640	1.167	0.899	55.3	62.6	69.6	0.73	0.69	0.68
L144		1.560	1.112		31.4	36.7		0.66	0.60	
T145		1.725	1.227	0.969	62.8	70.8	83.0	0.71	0.72	0.62
S146		1.880	0.985		56.4	60.0		0.83	0.79	
E147		1.395	0.949	0.799	50.8	57.8	60.5	0.83	0.94	0.83
L148	α1									
K149	α1	1.410	1.041	0.787	53.2	60.3	64.5	0.76	0.79	0.76
E150	α1	1.478	1.034	0.799	51.8	55.8	60.9	0.84	0.88	0.78
N151	α1	1.388	1.007	0.773	51.7	56.0	62.0	0.87	0.78	0.83
F152	α1	1.350	0.986	0.765	52.8	56.7	66.3	0.82	0.88	
I153	α1	1.357	0.986	0.777	50.8	58.0	61.6	0.83	0.87	0.80
R154	α1	1.470	1.003	0.776	50.8	56.9	61.8	0.86	0.91	0.79
F155	α1	1.420	0.999	0.796	49.9	55.9	59.6	0.87	0.76	0.82
S156	α1	1.395	1.033	0.799	50.9	56.3	62.0	0.78	0.82	0.79
K157	α1	1.430	1.000	0.776	49.2	53.4	70.8	0.83	0.78	0.80
S158	α1	1.540	1.048	0.865	50.8	57.7	63.4	0.89	0.89	0.83
L159		1.423	1.009	0.820	51.0	55.7	62.6	0.84	0.82	0.81
G160		1.470	1.029	0.787	54.6	60.9	66.3	0.83	0.90	0.85
L161		1.490	1.069	0.806	50.3	55.0	61.0	0.84	0.83	0.82
P162										
E163										
N164		1.288	0.969	0.742	57.5	62.2	71.2	0.80	0.78	0.79
H165	β9									
I166	β9	1.533	1.060	0.831	51.4	59.1	61.6	0.84	0.85	0.82
V167	β9	1.496	1.040	0.821	49.1	54.5	59.6	0.81	0.75	0.79
F168	β9	1.590	1.088	0.921	52.9	57.3	62.7	0.84	0.70	0.77
P169	β9									
V170		1.366	1.031	0.808	48.6	58.4	61.6	0.83	0.74	0.72
P171										
I172		1.600	1.142	0.832	31.9	33.3	44.1	0.85	0.99	0.72
D173										
Q174		1.747	1.152	1.052	62.5	72.7	78.3	0.56	0.62	0.53
C175		1.555	1.022	0.949	32.0	37.1	42.7	0.83	0.87	0.70
I176										
D177		1.532	1.025	0.871	42.0	49.1	55.8	0.71	0.68	0.71
G178		1.127	0.984	0.910	128.1	133.7	153.1	0.23	-0.14	-0.22
Mittelwerte		1.480	1.025	0.830	58.9	65.8	69.7	0.79	0.75	0.74
nur β-barrel		1.540	1.050	0.832	52.7	58.6	63.0	0.83	0.80	0.79

Aminosäure	T ₁ [s]	T ₁ [s]	T ₁ [s]	T ₂ [ms]	T ₂ [ms]	T ₂ [ms]	NOE	NOE	NOE
	750 MHz	600 MHz	500 MHz	750 MHz	600 MHz	500 MHz	750 MHz	600 MHz	500 MHz
Seitenketten: Relaxationsdaten der N^ε von Arginin und Tryptophan									
r(1)-N ^ε	2.386	1.315		303.2	315.1	108.4	-0.56	-0.79	-0.51
r(2)-N ^ε	1.870	1.036	1.081	189.1	210.8	197.0	0.06	-0.12	
r109-N ^ε	1.700	1.470	1.078	116.0	112.8	74.2	0.66	0.57	0.65
r140-N ^ε	1.245	1.129		82.5			0.89	0.63	0.77
r154-N ^ε	1.830	1.745		372.1	290.9		-0.71	-1.12	
w31-N ^ε	1.950	1.223	0.924	62.4	65.0	70.8	0.84	0.87	0.84
w79-N ^ε	1.378	0.918	0.694	88.9	93.5	96.6	0.66	0.65	0.58

Seitenketten: Relaxationsdaten der -NHD-Spezies von Asparagin und Glutamin (ohne ²H-Entkopplung)

Falls beide H^{Nε} einer Amidgruppe getrennt erfaßbar waren, wurden die Daten gemittelt (*kursiv*)

q1 (q49?)	<i>1.016</i>	<i>1.193</i>	<i>0.620</i>	<i>312.9</i>	<i>292.4</i>	<i>203.3</i>	<i>-2.39</i>	<i>-3.14</i>	
q19	<i>1.395</i>	<i>0.883</i>	<i>0.705</i>	<i>60.8</i>	<i>68.0</i>	<i>70.8</i>	<i>0.81</i>	<i>0.74</i>	<i>0.90</i>
q20	0.876	1.011	0.476	221.1	171.2	161.6	-0.94		-1.62
n21	1.047	1.027	0.605	149.9	125.9	135.1	-0.68		-0.61
q23	0.934	0.863	0.587	121.1	136.2	121.0	0.20	0.21	
n25	0.808	0.831	0.491	146.2	162.2	136.9	0.24		
q26	<i>1.453</i>	<i>1.260</i>	<i>0.834</i>	<i>216.5</i>	<i>242.7</i>	<i>224.6</i>	<i>-0.83</i>	<i>-0.91</i>	<i>-0.93</i>
q28	1.151	1.046	0.821	201.1	170.8	196.8	-0.36	-0.72	-0.78
n39	1.040	1.026	0.667	56.5	81.5	57.1	0.70	0.87	0.52
n65	<i>1.091</i>	<i>0.980</i>	<i>0.647</i>	<i>128.9</i>	<i>131.9</i>	<i>140.1</i>	<i>-0.35</i>		<i>-0.47</i>
q88	<i>1.068</i>	<i>0.988</i>	<i>0.717</i>	<i>178.2</i>	<i>194.1</i>	<i>205.6</i>	<i>-0.17</i>	<i>-0.61</i>	<i>-0.56</i>
n96	0.856	0.916	0.519	120.4	149.4	117.6	-0.28		-0.55
n114	1.016	0.815	0.680	54.8	61.1	63.4	0.89	0.91	0.99
n116	1.049	0.821	0.602	94.7	109.9	117.5	0.72	0.57	0.76
q117	<i>0.962</i>	<i>0.931</i>	<i>0.712</i>	<i>69.0</i>		<i>68.8</i>	<i>0.47</i>		
q128	0.625	0.648	0.494	132.7		133.6	0.36		
n129	0.971	1.097		28.4	27.9	75.5	-0.54		
n151	0.807	0.800	0.582		145.2	138.0	-0.20	-0.68	-0.80
n164	0.857	1.044	0.467					-2.98	
q174	<i>1.052</i>	<i>0.847</i>	<i>0.632</i>	<i>88.7</i>	<i>74.3</i>	<i>87.8</i>	<i>0.63</i>	<i>0.50</i>	<i>0.49</i>
Mittelwerte:									
⟨n⟩	<i>0.95</i>	<i>0.94</i>	<i>0.58</i>	<i>200</i>	<i>110</i>	<i>110</i>	<i>0.05</i>	<i>-0.26</i>	<i>-0.02</i>
⟨q⟩ ¹⁾	<i>1.06</i>	<i>0.94</i>	<i>0.66</i>	<i>220</i>	<i>150</i>	<i>140</i>	<i>0.02</i>	<i>-0.13</i>	<i>-0.42</i>
⟨n + q⟩ ¹⁾	<i>1.00</i>	<i>0.94</i>	<i>0.62</i>	<i>210</i>	<i>130</i>	<i>130</i>	<i>0.04</i>	<i>-0.19</i>	<i>-0.21</i>

¹⁾ Mittelwertbildung ohne das hochflexible q1

B.4 Parameter der ^{15}N - ^1H -Vektordynamik von HNL (nach Lipari-Szabo)

Aminosäure	Struktur- element	Modell- funktion	X ² - Residue	S ²	S ² _{fast}	S ² _{slow}	R _{ex} [Hz]	τ _{lokal} [ns]
M0								
Q1								
D2		3	40.8	0.11	0.78	0.13		0.61
S3		3	45.4	0.13	0.70	0.18		0.78
T4		3	38.5	0.16	0.70	0.23		0.98
S5		3	44.5	0.20	0.72	0.28		1.14
D6		3	7.3	0.22	0.77	0.29		1.33
L7		3	18.4	0.43	0.76	0.57		1.25
I8		3	2.4	0.74	0.85	0.88		1.36
P9								
A10		3	2.5	0.85	0.89	0.96		1.08
P11								
P12								
L13		3	5.0	0.69	0.79	0.88		2.89
S14		3	3.3	0.93	0.95	0.98		1.40
K15		1	13.6	0.91				
V16		1	7.1	0.90				
P17								
L18		3	3.1	0.79	0.83	0.96		1.77
Q19		1	6.3	0.91				
Q20		1	8.2	0.89				
N21		1	36.5	0.91				
F22		1	7.8	0.88				
Q23		1	2.3	0.84				
D24	3 ₁₀	1	8.7	0.84				
N25	3 ₁₀	1	8.9	0.93				
Q26	3 ₁₀	3	5.6	0.82	0.85	0.96		1.38
F27	3 ₁₀	1	3.7	0.88			1.2	
Q28		1	12.0	0.86				
G29	β1	1	7.9	0.89				
K30	β1	1	8.1	0.90				
W31	β1	1	12.9	0.90				
Y32	β1	1	4.3	0.90				
V33	β1	1 + R _{ex}	7.7	0.81			2.1	
V34	β1 (β-bulge)	1 + R _{ex}	1.1	0.86			4.1	
G35	β1	1	9.9	0.88				
L36	β1	1	3.8	0.94				
A37	β1	1	7.7	0.93				
G38	β1	1	3.1	0.88				
N39	β1	1 + R _{ex}	9.6	0.86			3.0	
A40	ω-Schleife	1	4.9	0.91				
I41	ω-Schleife	1 + R _{ex}	13.8	0.88			8.7	
L42	ω-Schleife	1 + R _{ex}	2.5	0.94			8.7	
R43	ω-Schleife							
E44	ω-Schleife							
D45	ω-Schleife	2 + R _{ex}	0.4	0.86			1.3	0.55

Aminosäure	Struktur- element	Modell- funktion	X ² - Residue	S ²	S ² _{fast}	S ² _{slow}	R _{ex} [Hz]	τ _{lokal} [ns]
K46	ω-Schleife							
D47	ω-Schleife	2 (?)	16.0	0.85				0.56
P48	ω-Schleife							
Q49	ω-Schleife							
K50	ω-Schleife							
M51	ω-Schleife	1 + R _{ex}	5.9	0.86			8.8	
Y52	β2	1 + R _{ex}	6.6	0.87			9.1	
A53	β2	1	11.9	0.93				
T54	β2	1	3.9	0.89				
I55	β2	1	5.4	0.94				
Y56	β2	1	13.5	0.85				
E57	β2	1	5.8	0.84				
L58	β2							
K59	β2	3	4.2	0.86	0.91	0.94		1.80
E60		3	4.4	0.84	0.90	0.93		1.64
D61		3	0.3	0.83	0.85	0.98		0.76
K62		1	4.4	0.91				
S63	β3	3	4.0	0.86	0.88	0.97		0.79
Y64	β3	1	4.0	0.87				
N65	β3	1	11.4	0.90				
V66	β3	1	8.9	0.88				
T67	β3	1	3.8	0.93				
S68	β3	1	4.4	0.89				
V69	β3							
L70	β3	1	8.6	0.86				
F71	β3							
R72	β3	3	8.5	0.85	0.88	0.96		0.98
K73		3	3.5	0.85	0.90	0.94		0.70
K74		3	8.1	0.89	0.96	0.93		0.62
K75	β4	3	5.2	0.84	0.91	0.93		0.90
C76	β4 (---C175)	1 + R _{ex}	22.6	0.87			7.7	
D77	β4	1 + R _{ex}	8.2	0.89			1.5	
Y78	β4	1 + R _{ex}	14.6	0.86			3.0	
W79	β4	1 + R _{ex}	5.0	0.85			3.1	
I80	β4							
R81	β4	1	3.7	0.89				
T82	β4	1	5.2	0.83				
F83	β4	1	3.6	0.86				
V84	β4							
P85	β4							
G86	β4	3	3.5	0.78	0.83	0.94		1.50
C87	(---MMP9)	3 + R _{ex}	1.9	0.79	0.84	0.94	2.4	3.90
Q88		3	6.1	0.72	0.84	0.86		0.95
P89								
G90	β5							
E91	β5	1	1.8	0.95				
F92	β5	3	1.0	0.85	0.88	0.97		0.99

Aminosäure	Struktur- element	Modell- funktion	X ² - Residue	S ²	S ² _{fast}	S ² _{slow}	R _{ex} [Hz]	τ _{lokal} [ns]
T93	β5	1	5.2	0.90				
L94	β5	1	16.9	0.84				
G95	β5	1	2.3	0.93				
N96		3	2.5	0.84	0.92	0.91		1.97
I97		1	4.2	0.90				
K98		3	3.1	0.91	0.94	0.96		0.79
S99		3	4.8	0.84	0.87	0.96		1.10
Y100		1	8.9	0.89				
P101								
G102		3	3.1	0.72	0.83	0.86		1.09
L103	β6	3	9.3	0.88	0.90	0.97		0.60
T104	β6 (β-bulge)	1	13.7	0.94				
S105	β6	1	12.0	0.86				
Y106	β6	1	5.6	0.88				
L107	β6	1	3.8	0.90				
V108	β6	1	4.7	0.88				
R109	β6	1	8.5	0.90				
V110	β6							
V111	β6 (β-bulge)	1	6.4	0.92				
S112	β6	1	3.3	0.89				
T113	β6	1	5.6	0.93				
N114		1 + R _{ex}	5.3	0.87			2.3	
Y115		1	5.1	0.92				
N116		1 + R _{ex}	3.2	0.87			1.1	
Q117		1	8.0	0.94				
H118	β7	1 + R _{ex}	5.0	0.90			1.6	
A119	β7	1	4.9	0.94				
M120	β7							
V121	β7	1	5.9	0.89				
F122	β7	1 + R _{ex}	1.7	0.89			1.1	
F123	β7	1	5.4	0.90				
K124	β7	1	9.1	0.92				
K125	β7							
V126	β7	1	7.4	0.92				
S127	β7	1	8.5	0.93				
Q128		3	1.4	0.90	0.93	0.97		0.64
N129		3 + R _{ex}	1.6	0.83	0.88	0.95	3.1	0.97
R130	β8	3	6.7	0.81	0.85	0.95		0.74
E131	β8	3	4.3	0.85	0.87	0.98		0.39
Y132	β8	1	12.4	0.88				
F133	β8	3	4.9	0.88	0.90	0.98		0.75
K134	β8	1 + R _{ex}	3.8	0.88			1.6	
I135	β8	1 + R _{ex}	8.3	0.90			1.2	
T136	β8	1 + R _{ex}	1.9	0.89			7.4	
L137	β8	1	3.9	0.91				
Y138	β8	1	3.9	0.88				
G139	β8	1	8.1	0.91				
R140	β8	1	7.4	0.91				

Aminosäure	Struktur- element	Modell- funktion	X ² - Residue	S ²	S ² _{fast}	S ² _{slow}	R _{ex} [Hz]	τ _{lokal} [ns]
T141		1	4.3	0.92				
K142		1	9.8	0.84	0.85	0.97		
E143		3 + R _{ex}	2.0	0.77	0.80	0.96	1.8	0.31
L144		3 + R _{ex}	3.3	0.81	0.85	0.95	17.5	0.26
T145		3 + R _{ex}	4.3	0.61	0.69	0.88	3.0	1.19
S146		3	2.8	0.86	0.91	0.95		2.20
E147		1	9.9	0.95				
L148	α1							
K149	α1	3	1.3	0.89	0.91	0.98		0.65
E150	α1	1	6.3	0.93				
N151	α1	1	3.8	0.94				
F152	α1	1	12.7	0.93				
I153	α1	1	5.3	0.94				
R154	α1	1	4.9	0.93				
F155	α1	1	3.1	0.95				
S156	α1	1	3.9	0.93				
K157	α1	1	6.8	0.97				
S158	α1	1 + R _{ex}	6.4	0.87			1.3	
L159		1	6.4	0.93				
G160		1	12.1	0.89				
L161		1 + R _{ex}	3.4	0.90			1.4	
P162								
E163								
N164		3	5.4	0.82	0.88	0.93		3.04
H165	β9							
I166	β9	1 + R _{ex}	3.8	0.88			0.9	
V167	β9	1 + R _{ex}	5.3	0.90			1.7	
F168	β9	1	5.6	0.91				
P169	β9							
V170		3 + R _{ex}	2.4	0.83	0.88	0.95	2.7	1.24
P171								
I172		1 + R _{ex}	3.6	0.83			20.7	
D173								
Q174		3	8.0	0.74	0.81	0.92		0.35
C175	(---C76)	1 + R _{ex}	6.3	0.88			16.2	
I176								
D177		1 + R _{ex}	6.9	0.89			5.3	
G178		3	15.0	0.34	0.70	0.49		0.78
Mittelwerte			7.5	0.85	0.85	0.84	4.7	1.15
nur β-barrel			6.8	0.89	0.88	0.96	3.6	0.9
Seitenketten:								
r(1)-N ^e		3	2.7	0.46	0.55	0.83		1.54
r(2)-N ^e		3	6.6	0.13	0.46	0.29		0.44
r109-N ^e		3	13.7	0.13	0.54	0.24		0.54
r140-N ^e		3	6.4	0.21	0.62	0.34		0.81
r154-N ^e		1	9.7	0.94				
w31-N ^e		1	8.5	0.79				
w79-N ^e		3	54.8	0.53	0.71	0.76		1.88

C. Datenanhang PLA2

C.1 Gemessene ^{15}N -Relaxationsdaten für PLA₂ (309.8 ± 0.5 K, H_2O , 1.0 mM)

Amino -säure	Sek. - Struk.	T ₁ [ms] 750 MHz	T ₁ [ms] 600 MHz	T ₁ [ms] 500 MHz	T ₂ [ms] 750 MHz	T ₂ [ms] 600 MHz	T ₂ [ms] 500 MHz	NOE 750 MHz	NOE 600 MHz	NOE 500 MHz
N1										
L2	α1									
V3	α1	641	522	440	126.0	145.2	151.9	0.86	0.79	0.77
N4	α1	615	506	422	120.6	138.0	143.6	0.84	0.80	0.78
F5	α1	633	501	397	123.8	136.7	140.2	0.86	0.82	0.80
H6	α1	643	497	422	119.3	136.6	143.8	0.91	0.83	0.75
R7	α1	638	495	406	118.4	132.5	138.9	0.83	0.77	0.75
M8	α1	628	493	412	123.5	137.9	143.4	0.83	0.77	0.75
I9	α1									
K10	α1	605	480	405	117.9	135.0	142.9	0.87	0.81	0.77
L11	α1	638	503	416	116.3	132.3	139.0	0.86	0.78	0.79
T12	α1	634	513	430	126.0	143.8	153.6	0.86	0.82	0.76
T13		645	510	434	116.5	128.5	112.3	0.84	0.75	0.74
G14		660	523	420	117.3	133.6	136.7	0.85	0.83	0.81
K15		622	517	430	120.2	142.0	148.0	0.83	0.82	0.74
E16		723	588	479	131.6	155.0	156.7	0.84	0.79	0.67
A17	α2	702	566	420	95.9	112.6	116.5	0.82	0.83	0.81
A18	α2	628	535	423	103.7	123.2	130.0	0.88	0.79	0.79
L19	α2	771	619	499	86.4	107.5	124.8	0.67	0.65	0.65
S20	α2	693	556	441	74.5	94.6	103.8	0.82	0.73	0.77
Y21		632	527	457	126.0	133.1	117.3	0.95		0.78
G22		665	537	432	104.0	126.4	139.4	0.85	0.78	0.75
F23										
Y24										
G25		632	516	426	76.6	95.2	106.5	0.86	0.83	0.79
C26		645	516	422	93.9	113.7	123.1	0.89	0.84	0.82
H27		668	532	435	113.5	130.1	139.0	0.89	0.83	0.80
C28		678	551	438	68.5	86.9	100.0	0.87	0.83	0.77
G29		676	558	457	147.1	161.9	160.2	0.88	0.76	0.74
V30		743	605	545	131.8	159.0	179.4	0.69	0.60	0.54
G31		651	592	497	77.5	104.5	122.1	0.65	0.57	0.50
G32		677	599	527	126.7	159.5	176.0	0.67	0.51	0.50
R33		667	550	477	116.7	140.2	155.5	0.73	0.59	0.56
G34		682	574	454	103.2	133.1	139.2	0.77	0.75	0.69
S35		641	542	451	110.4	127.4	133.4	0.86	0.81	0.79
P36										
K37		688	544	430	129.8	147.2	147.3	0.89	0.81	0.79
D38		673	540	445	123.6	140.6	144.8	0.86	0.85	0.77
A39	α3	616	516	411	117.0	134.5	140.7	0.87	0.84	0.79
T40	α3	682	554	456	116.7	129.7	139.3	0.89	0.81	0.81
D41	α3	640	540	422	114.4	128.2	139.2	0.90		0.76
R42	α3	640	492	419	110.0	124.3	134.2	0.86	0.81	0.78
C43	α3	645	517	422	112.6	128.2	133.9	0.86	0.84	0.81
C44	α3	668	541	433	118.6	132.2	139.4	0.85	0.81	0.78

Amino -säure	Sek. - Struk.	T ₁ [ms] 750 MHz	T ₁ [ms] 600 MHz	T ₁ [ms] 500 MHz	T ₂ [ms] 750 MHz	T ₂ [ms] 600 MHz	T ₂ [ms] 500 MHz	NOE 750 MHz	NOE 600 MHz	NOE 500 MHz
V45	α3	656	512	429	122.9	138.0	141.8	0.89	0.81	0.80
T46	α3	650	516	426	117.0	130.3	136.0	0.87	0.82	0.75
H47	α3	629	501	407	108.0	125.2	130.6	0.90	0.80	0.82
D48	α3	660	514	418	113.2	127.9	133.6	0.83	0.80	0.79
C49	α3	653	496	430	112.6	128.2	137.8	0.85	0.81	0.76
C50	α3	646	502	409	104.7	119.6	126.8	0.89	0.81	0.81
Y51	α3	683	527	438	111.3	127.3	137.5	0.84	0.82	0.75
K52	α3	676	526	421	116.6	131.4	134.8	0.84	0.79	0.77
R53	α3	659	517	432	116.8	120.6	125.3	0.85	0.77	0.76
L54	α3	682	533	423	117.4	130.6	137.0	0.83	0.82	0.74
E55	α3	668	526	417	120.8	134.9	137.6	0.81	0.78	0.75
K56		662	509	411	123.2	136.1	142.5	0.84	0.82	0.75
R57		704	543	457	128.8	148.3	153.6	0.84	0.74	0.70
G58		737	575	478	122.2	142.1	151.5	0.83	0.75	0.71
C59		683	551	464	125.7	147.0	152.7	0.83	0.77	0.71
G60										
T61		693	627	535	188.2	224.7	230.7	0.58	0.48	0.36
K62		666	586	485	157.0	181.6	190.3	0.71	0.68	0.54
F63		616	554	449	129.4	154.0	163.2	0.82	0.79	0.67
L64		711	594	494	153.4	174.9	178.8	0.77	0.72	0.68
S65		641	519	420	111.5	125.1	133.8	0.87	0.85	0.79
Y66		676	558	468	129.4	149.7	158.1	0.84	0.79	0.75
K67		675	527	422	123.3	143.1	148.9	0.86	0.81	0.77
F68	β1	634	509	411	131.5	146.0	149.2	0.87	0.83	0.78
S69	β1	629	499	425	125.0	144.4	152.7	0.87	0.82	0.77
N70	β1	625	520	425	124.7	142.1	146.8	0.87	0.81	0.77
S71		675	524	439	125.2	140.3	146.4	0.81	0.76	0.72
G72		672	573	460	122.0	138.5	145.3	0.84	0.83	0.80
S73		660	556	417	129.0	153.9	139.3	0.85	0.81	0.79
R74		652	534	435	128.9	147.1	152.3	0.89	0.78	0.78
I75	β2	697	563	431	127.6	148.0	146.9	0.82	0.84	0.78
T76	β2	646	506	411	137.8	150.4	150.0	0.84	0.80	0.78
C77	β2									
A78		661	519	441	127.3	145.1	152.3	0.88	0.80	0.77
K79		680	547	460	135.9	148.9	148.0	0.82	0.80	0.79
Q80		676	562	467	150.4	166.1	170.1	0.78	0.73	0.75
D81		604	544	451	135.0	157.4	168.2	0.85	0.82	0.71
S82	α4									
C83	α4	670	571	470	117.9	139.5	142.8	0.90	0.83	0.80
R84	α4	689	563	446	117.3	132.3	137.9	0.87	0.84	0.80
S85	α4	656	521	429	119.5	133.7	138.0	0.88	0.84	0.81
Q86	α4	648	516	411	115.3	131.8	134.8	0.88	0.82	0.80
L87	α4	666	516	422	115.9	131.4	136.3	0.89	0.85	0.74
C88	α4	670	512	421	110.8	124.4	129.8	0.89	0.83	0.82
E89	α4									
C90	α4	665	523	420	116.7	132.7	136.8	0.88	0.81	0.78
D91	α4	648	512	428	114.1	127.5	136.4	0.88	0.85	0.77
K92	α4	652	510	411	121.5	132.8	136.6	0.91	0.84	0.82

Amino -säure	Sek. - Struk.	T ₁ [ms] 750 MHz	T ₁ [ms] 600 MHz	T ₁ [ms] 500 MHz	T ₂ [ms] 750 MHz	T ₂ [ms] 600 MHz	T ₂ [ms] 500 MHz	NOE 750 MHz	NOE 600 MHz	NOE 500 MHz
A93	α4	612	484	387	120.6	131.6	135.9	0.91	0.83	0.83
A94	α4	650	521	418	117.2	133.5	138.5	0.89	0.81	0.77
A95	α4	661	524	421	116.6	130.4	134.4	0.86	0.86	0.80
T96	α4	631	513	423	113.6	132.4	138.3	0.86	0.83	0.77
C97	α4	625	507	420	118.4	138.0	143.7	0.86	0.82	0.79
F98	α4	642	513	409	116.8	127.9	136.8	0.90	0.83	0.79
A99	α4	665	531	420	115.9	130.7	134.0	0.87	0.84	0.81
R100	α4	654	503	430	116.3	131.9	137.9	0.86	0.80	0.76
N101	α4	683	551	437	128.0	141.9	146.8	0.86	0.83	0.76
K102	3 ₁₀	688	559	440	115.2	130.4	133.1	0.88	0.87	0.77
T103	3 ₁₀	612	535	412	122.0	133.6	137.7	0.87	0.85	0.79
T104	3 ₁₀	674	561	459	116.9	133.1	140.7	0.90	0.83	0.81
Y105		655	553	456	121.2	144.8	149.5	0.90	0.83	0.78
N106		625	524	392	96.9	115.4	121.2	0.87	0.85	0.85
K107		615	503	433	122.2	144.0	151.1	0.81	0.80	0.74
K108		584	478	407	117.5	138.6	146.4	0.88	0.78	0.73
Y109	3 ₁₀	663	522	428	114.7	133.3	140.5	0.85	0.82	0.76
Q110	3 ₁₀	630	515	417	76.4	97.2	110.8	0.90	0.84	0.77
Y111	3 ₁₀									
Y112		748	605	497	41.8	58.1	72.5	0.80	0.76	0.75
S113										
N114		593	538	439	37.2	52.8	65.5	0.89	0.83	0.77
K115		567	498	404	122.6	141.7	147.0	0.84	0.76	0.77
H116		607	523	450	98.2	122.2	132.6	0.86	0.74	0.74
C117		596	532	435	129.5	153.6	154.7	0.77	0.71	0.71
R118		736	645	548	195.4	212.2	214.3	0.67	0.58	0.56
G119		685	616	506	166.7	183.0	182.5	0.76	0.69	0.66
S120		735	624	550	168.5	191.7	198.0	0.78	0.70	0.74
T121		721	658	530	158.2	184.8	190.2	0.75	0.66	0.63
P122										
R123		722	598	494	172.1	193.8	193.2	0.66	0.58	0.62
C124		785	653	574	172.6	206.8	217.4	0.64	0.57	0.56
Mittelwerte		660	538	442	120	138	144	0.84	0.78	0.75
nur α1, α3, α4		651	519	423	117	132	138	0.87	0.82	0.78

C.2 Parameter der ^{15}N - ^1H -Vektordynamik von PLA2 (nach Lipari-Szabo)

Amino-säure	Sek. - Struk.	Modell	X ² -Residue	S ²	S ² _{fast}	S ² _{slow}	R _{ex} [Hz]	τ _{lokal} [ns]
N1								
L2	α1							
V3	α1	3 + R _{ex}	2.0	0.65 ± 0.13	0.81 ± 0.02	0.80 ± 0.14	1.3 ± 0.4	5.32 ± 5.52
N4	α1	3 + R _{ex}	1.8	0.74 ± 0.11	0.86 ± 0.02	0.86 ± 0.10	1.2 ± 0.4	4.12 ± 4.89
F5	α1	1	6.1	0.90 ± 0.01				
H6	α1	1 + R _{ex}	2.6	0.87 ± 0.01			0.7 ± 0.2	
R7	α1	1	3.3	0.91 ± 0.01				
M8	α1	1	3.1	0.90 ± 0.01				
I9	α1							
K10	α1	1	13.9	0.93 ± 0.01				
L11	α1	1 + R _{ex}	2.3	0.88 ± 0.01			0.6 ± 0.2	
T12	α1	1	14.9	0.86 ± 0.01				
T13		1 + R _{ex}	6.1	0.85 ± 0.01			1.4 ± 0.2	
G14		1	5.6	0.89 ± 0.01				
K15		1 + R _{ex}	5.5	0.86 ± 0.01			0.7 ± 0.2	
E16		1 + R _{ex}	2.7	0.77 ± 0.01			0.6 ± 0.1	
A17	α2	1 + R _{ex}	4.7	0.90 ± 0.01			1.6 ± 0.2	
A18	α2	1 + R _{ex}	6.5	0.89 ± 0.01			0.8 ± 0.2	
L19	α2	1 + R _{ex}	7.6	0.76 ± 0.01			4.1 ± 0.2	
S20	α2	1 + R _{ex}	5.5	0.88 ± 0.01			4.6 ± 0.2	
Y21		1	7.4	0.87 ± 0.01				
G22		1 + R _{ex}	2.0	0.86 ± 0.01			0.6 ± 0.2	
F23								
Y24								
G25		1 + R _{ex}	3.9	0.89 ± 0.01			5.0 ± 0.3	
C26[-C117]		1 + R _{ex}	6.4	0.85 ± 0.01			3.2 ± 0.2	
H27		1 + R _{ex}	3.7	0.84 ± 0.01			1.3 ± 0.2	
C28[-C44]		1 + R _{ex}	3.6	0.85 ± 0.01			6.8 ± 0.2	
G29		3	2.2	0.63 ± 0.05	0.80 ± 0.01	0.78 ± 0.06		5.08 ± 3.24
V30		3 + R _{ex}	4.5	0.41 ± 0.04	0.70 ± 0.02	0.58 ± 0.04	2.4 ± 0.3	2.12 ± 0.28
G31		3 + R _{ex}	8.0	0.43 ± 0.05	0.78 ± 0.02	0.56 ± 0.04	7.2 ± 0.4	1.85 ± 0.22
G32		3 + R _{ex}	7.8	0.38 ± 0.04	0.73 ± 0.02	0.52 ± 0.04	3.0 ± 0.3	1.91 ± 0.21
R33		3 + R _{ex}	0.3	0.60 ± 0.04	0.79 ± 0.02	0.76 ± 0.04	2.8 ± 0.3	1.57 ± 0.37
G34		1 + R _{ex}	5.2	0.82 ± 0.01			2.4 ± 0.2	
S35		1 + R _{ex}	2.8	0.85 ± 0.01			0.7 ± 0.2	
P36								
K37		1 + R _{ex}	4.8	0.83 ± 0.01			0.5 ± 0.1	
D38		1 + R _{ex}	2.1	0.84 ± 0.01			0.4 ± 0.2	
A39	α3	1	6.1	0.90 ± 0.01				
T40	α3	1 + R _{ex}	5.1	0.85 ± 0.01			0.5 ± 0.2	
D41	α3	1	9.7	0.89 ± 0.01				
R42	α3	1 + R _{ex}	4.3	0.90 ± 0.01			0.8 ± 0.2	
C43[-C97]	α3	1 + R _{ex}	4.7	0.90 ± 0.01			0.5 ± 0.2	
C44[-C28]	α3	1	7.5	0.88 ± 0.01				
V45	α3	1	4.8	0.88 ± 0.01				
T46	α3	1 + R _{ex}	2.8	0.88 ± 0.01			0.6 ± 0.2	

Aminosäure	Sek. - Struk.	Modell	X ² -Residue	S ²	S ² _{fast}	S ² _{slow}	R _{ex} [Hz]	τ _{lokal} [ns]
H47	α3	1 + R _{av}	6.7	0.92 ± 0.01			0.5 ± 0.2	
D48	α3	1 + R _{ex}	1.2	0.89 ± 0.01			0.6 ± 0.2	
C49[-C124]	α3	1 + R _{ex}	2.9	0.86 ± 0.01			1.1 ± 0.2	
C50[-C90]	α3	1 + R _{ex}	2.3	0.91 ± 0.01			1.2 ± 0.2	
Y51	α3	1	12.0	0.89 ± 0.01				
K52	α3	1 + R _{ex}	4.4	0.86 ± 0.01			0.9 ± 0.2	
R53	α3	1 + R _{ex}	1.7	0.86 ± 0.01			0.9 ± 0.2	
L54	α3	1	3.0	0.89 ± 0.01				
E55	α3	1	1.7	0.89 ± 0.01				
K56		1 + R _{ex}	2.8	0.86 ± 0.01			0.7 ± 0.1	
R57		3 + R _{ex}	1.3	0.76 ± 0.04	0.81 ± 0.02	0.94 ± 0.04	0.8 ± 0.3	1.71 ± 1.39
G58		1 + R _{ex}	1.7	0.74 ± 0.01			2.0 ± 0.1	
C59[-C83]		3 + R _{ex}	3.8	0.69 ± 0.07	0.78 ± 0.02	0.89 ± 0.07	1.4 ± 0.3	3.23 ± 2.93
G60								
T61		3 + R _{ex}	1.7	0.40 ± 0.03	0.73 ± 0.01	0.56 ± 0.03	1.0 ± 0.2	1.39 ± 0.12
K62		3 + R _{ex}	2.9	0.51 ± 0.04	0.76 ± 0.02	0.68 ± 0.04	0.9 ± 0.3	1.98 ± 0.34
F63		3 + R _{ex}	2.4	0.60 ± 0.07	0.79 ± 0.02	0.76 ± 0.07	1.9 ± 0.3	3.41 ± 1.85
L64		3	5.0	0.67 ± 0.03	0.76 ± 0.01	0.87 ± 0.02		1.70 ± 0.58
S65								
Y66		3	12.6	0.70 ± 0.03	0.83 ± 0.01	0.85 ± 0.02		3.07 ± 1.50
K67		1 + R _{ex}	4.7	0.84 ± 0.01			0.5 ± 0.2	
F68	β1	1	5.9	0.87 ± 0.01				
S69	β1	1 + R _{ex}	6.8	0.85 ± 0.01			0.5 ± 0.1	
N70	β1	1	6.7	0.87 ± 0.01				
S71		3	3.0	0.82 ± 0.02	0.87 ± 0.01	0.95 ± 0.02		1.56 ± 0.99
G72		1 + R _{ex}	6.4	0.79 ± 0.01			1.4 ± 0.2	
S73		1	8.5	0.88 ± 0.01				
R74		1	7.7	0.85 ± 0.01				
I75	β2	1	4.5	0.85 ± 0.01				
T76	β2	1	6.2	0.86 ± 0.01				
C77[-C88]	β2							
A78		1	8.9	0.85 ± 0.01				
K79		1 + R _{ex}	7.7	0.82 ± 0.01			0.5 ± 0.2	
Q80		3 + R _{ex}	2.2	0.70 ± 0.04	0.78 ± 0.02	0.90 ± 0.04	0.5 ± 0.3	1.80 ± 0.96
D81		3 + R _{ex}	8.8	0.38 ± 0.11	0.78 ± 0.02	0.49 ± 0.13	1.7 ± 0.4	5.70 ± 2.11
S82	α4							
C83[-C59]	α4	1 + R _{ex}	2.9	0.80 ± 0.02			0.8 ± 0.2	
R84	α4	1	7.7	0.86 ± 0.01				
S85	α4	1	4.1	0.88 ± 0.01				
Q86	α4	1 + R _{ex}	3.5	0.89 ± 0.01			0.5 ± 0.1	
L87	α4	1	6.5	0.90 ± 0.01				
C88[-C77]	α4	1	4.9	0.92 ± 0.01				
E89	α4							
C90[-C50]	α4	1	5.2	0.90 ± 0.01				
D91	α4	1	6.2	0.90 ± 0.01				
K92	α4	1	8.1	0.89 ± 0.01				
A93	α4	1	6.3	0.93 ± 0.01				
A94	α4	1 + R _{ex}	2.6	0.88 ± 0.01			0.5 ± 0.2	

Amino- säure	Sek. - Struk.	Modell	χ^2 - Residue	S^2	S^2_{fast}	S^2_{slow}	R_{ex} [Hz]	τ_{lokal} [ns]
A95	$\alpha 4$	1	7.8	0.90 ± 0.01				
T96	$\alpha 4$	$1 + R_{ex}$	3.6	0.88 ± 0.01			0.6 ± 0.2	
C97[-C43]	$\alpha 4$	1	6.1	0.89 ± 0.01				
F98	$\alpha 4$	1	4.1	0.91 ± 0.01				
A99	$\alpha 4$	1	3.2	0.90 ± 0.01				
R100	$\alpha 4$	$1 + R_{ex}$	4.4	0.88 ± 0.01			0.5 ± 0.2	
N101	$\alpha 4$	1	2.5	0.85 ± 0.01				
K102	3_{10}	1	4.5	0.88 ± 0.01				
T103	3_{10}	1	2.3	0.89 ± 0.01				
T104	3_{10}	1	5.8	0.85 ± 0.01				
Y105		1	10.7	0.84 ± 0.01				
N106		$1 + R_{ex}$	7.9	0.91 ± 0.01			2.2 ± 0.2	
K107		$3 + R_{ex}$	1.3	0.60 ± 0.11	0.82 ± 0.02	0.73 ± 0.11	1.7 ± 0.4	4.89 ± 3.01
K108		$3 + R_{ex}$	2.1	0.57 ± 0.22	0.85 ± 0.02	0.66 ± 0.25	1.9 ± 0.4	8.15 ± 7.73
Y109	3_{10}	$1 + R_{ex}$	1.0	0.85 ± 0.01			0.9 ± 0.1	
Q110	3_{10}	$1 + R_{ex}$	2.9	0.87 ± 0.01			5.0 ± 0.3	
Y111	3_{10}							
Y112		$1 + R_{ex}$	2.5	0.77 ± 0.01			$16. \pm 0.3$	
S113								
N114		$1 + R_{ex}$	3.2	0.88 ± 0.01			$17. \pm 0.4$	
K115		$3 + R_{ex}$	3.6	0.60 ± 0.10	0.89 ± 0.02	0.68 ± 0.09	1.2 ± 0.4	4.36 ± 2.05
H116		$3 + R_{ex}$	4.3	0.61 ± 0.09	0.82 ± 0.02	0.75 ± 0.09	3.8 ± 0.4	3.83 ± 1.89
C117[-C26]		$1 + R_{ex}$	4.9	0.81 ± 0.01			0.8 ± 0.2	
R118		3	3.6	0.51 ± 0.02	0.71 ± 0.01	0.72 ± 0.02		1.46 ± 0.16
G119		3	0.7	0.65 ± 0.03	0.74 ± 0.01	0.88 ± 0.02		1.26 ± 0.34
S120		$3 + R_{ex}$	2.7	0.51 ± 0.04	0.69 ± 0.02	0.74 ± 0.04	0.8 ± 0.2	2.39 ± 0.72
T121		$3 + R_{ex}$	1.7	0.58 ± 0.03	0.70 ± 0.01	0.83 ± 0.03	0.8 ± 0.2	1.45 ± 0.34
P122								
R123		3	0.4	0.62 ± 0.02	0.78 ± 0.01	0.80 ± 0.01		0.94 ± 0.12
C124[-C49]		$3 + R_{ex}$	3.7	0.44 ± 0.03	0.66 ± 0.01	0.67 ± 0.04	1.2 ± 0.2	1.66 ± 0.24
Mittelwerte			4.7	0.80	0.80	0.83	2.0	2.9
$\alpha 1, \alpha 3, \alpha 4$			5.1	0.88	0.84	0.92	0.8	4.7

D. Datenanhang VAT-N**D.1 NMR-Spektralbereiche und Meßfenste für VAT-N (321 K)**

Spingruppe	Spektralbereich	Meßfenster
<i>Protonen</i>	[0 - 10]	<i>Standardfenster mit Wasser in Resonanz (für FlipBack-Techniken)</i>
H _{Aliphaten}	[0 - 10]	
H _α	[3.4 - 6.2]	
H _{Aromaten}		
H _{N,Proteinrückgrat}	[6.6 - 10.0]	
H _{N,Asn,Gln}		
H _{N,Arg}	[7.2 - 9.0]	
<i>Stickstoff</i>	[106 - 132]	<i>Standardfenster für alle ¹⁵N-HSQC basierten Experimente</i>
N _{Proteinrückgrat}	[103.3 - 134.1]	
N _{Asn,Gln}		
N _{Arg}	[81.5 - 87.0]	
<i>Kohlenstoff</i>		
C _{Aliphaten}	[10 - 73]	
	[47.85 - 86.8]	<i>Gefaltetes C_{Aliphaten}-Meßfenster für HCCH-TOCSY</i>
C _α	[43 - 68]	
C _β	[18 - 72]	<i>Meßfenster für HNCACB, CBCACONH</i>
C _{Methyl}	[5 - 45]	
C _{Aromaten}	[115 - 140]	
CO	[171 - 181]	<i>Standardfenster für ¹³CO</i>

D.2 Verzeichnis der an VAT-N durchgeführten NMR-Experimente

Zu den verwendeten Pulsprogrammen wird auf Anhang E verwiesen. Alle Aufnahmeparameter sind in den Pulsprogrammen detailliert beschrieben. Für die nachfolgend angegebenen *kritischen* Aufnahmeparameter gelten die in Anhang B.2 aufgeführten Konventionen. Die Meßtemperatur lag bei kalibrierten 321 K.

Experiment	Literatur	Bemerkungen	Spektrometer
¹⁵ N-HSQC	[49]	¹⁵ N: [80 - 134], Arg-N ^e ungefaltet (A12 gefaltet), <i>flip-back</i>	DMX600
¹⁵ N-HSQC	[77, 241]	optimiert gefaltetes ¹⁵ N-Standardfenster [106 - 132]	DMX750
¹⁵ N-HSQC		Vergleich verschiedener Techniken: <i>flip-back</i> , <i>sens. enh.</i>	DMX600
¹⁵ N-HSQC		Inversion der NH ₂ -Gruppen, <i>flip-back</i>	DMX600
¹⁵ N-HSQC		Temperaturreihe (<i>flip back</i>): 300, 310, 315, 320, 325, 327.5, 330K	DMX600
¹⁵ N _{sel} -HSQC		selektiv auf Arg-N ^e : [81 - 88] ppm, <i>flip-back</i>	DMX750
¹³ C-HSQC*	[242]		DMX750
¹³ C-HSQC*		¹³ C _{Aliphaten} gefaltet (für <u>HCCH</u> -COSY und <u>HCCH</u> -TOCSY)	DMX750
CT- ¹³ C _{arom} -HSQC*		selektiv auf ¹³ C _{Aromaten} , <i>constant time</i> Version (CT = 14 ms)	DMX600
¹³ C-ct-QQF-HSQC*	[224]	¹³ C _{Methyl} -Fenster, CT = 14 ms	DMX750
<u>Experimente zur sequentiellen Zuordnung</u>			
HNCO	[243, 244]	Δ(NCO) = 13.4 ms	DMX600
HNCA	[244-246]	Δ(NCα) = 14.0 ms	DMX600
HNCACB	[247]	Δ(NCα) = 14.0 ms, Δ(CαCβ) = 3.0 ms	DMX600
CBCA(CO)NH	[248]	Δ(NCO) = 13.4 ms, Δ(CαCO) = 3.7 ms, Δ(CαCβ) = 3.2 ms	DMX600
HN(CA)HA	[150, 249]	Δ(NCα) = 14.0 ms	DMX600
HA(CACO)NH	[250]	Δ(NCO) = 11.0 ms, Δ(CαCO) = 3.0 ms	DMX600
HBHANH	[262]	Δ(CαCβ) = Δ(NCα) = 11.0 ms	DMX600
HBHA(CO)NH	[251]	Δ(NCO) = 14.0 ms, Δ(CαCO) = 3.7 ms, Δ(CαCβ) = 3.2 ms	DMX600
HCACO	[262]	Δ(CαCO) = 3.5 ms = CT/2	DMX600
<u>Experimente zur Seitenkettenuordnung</u>			
<u>HCCH</u> -COSY*	[252]	C,C,H-editiert, Δ(C ₁ C ₂) = 3.7 ms, gefaltetes ¹³ C _{Aliphaten} -Fenster	DMX750
<u>HCCH</u> -TOCSY*	[253]	τ _{mix} = 20.2ms (DIPSI-3, 31 μs), gefaltetes ¹³ C _{Aliphaten} -Fenster	DMX750
¹⁵ N-TOCSY-HSQC	[254, 255]	τ _{mix} = 60ms (CLEAN-MLEV, 27.3 μs)	DMX600
CBCA(CO)NH ₂	[263]	Δ(NCO) = 14 ms, Δ(CαCβ) = 3.2 ms, mit NH ₂ -Filter	DMX600
<u>Experimente zur diastereotopen Unterscheidung</u>			
HNHB	[256]	Δ(NHβ) = 2×19ms	DMX600
H ₂ NCO-E.COSY	[151]	Δ(NCO) = 14 ms	
<u>Experimente zur Strukturbestimmung</u>			
HNHA	[257, 258]	Δ(NHα) = 2×14 ms, mit NH ₂ -Gruppenunterdrückung	DMX600
HCH-NOESY*	[259]	τ _{mix} = 70ms, gefaltetes ¹³ C _{Aliphaten} -Fenster	DMX750
ct-CCH-NOESY*		τ _{mix} = 70ms, <i>constant time</i> in F2 (vor τ _{mix}), CT = 6.6ms	DMX750
HNH-NOESY	[254]	τ _{mix} = 80ms	DMX600
NNH-NOESY	[236]	τ _{mix} = 60ms	DMX750
CNH-NOESY	[214]	τ _{mix} = 80ms	DMX750
NCH-NOESY	[214]	τ _{mix} = 80ms	DMX750
F1{ ¹⁵ N _{sel} }-NOESY		2D-H,H-NOESY mit Arg-N ^e -Filter in F1, τ _{mix} = 20ms, 40ms	DMX750
2D-H,H-NOESY		τ _{mix} = 70ms und 90ms, WATERGATE-Wasserunterdrückung	DMX750
<u>Experimente zur Dynamikmessung</u>			
NewMEXICO	[154]	τ _{mix} = 50, 100, 200ms (mit Referenz-HSQC, <i>flip back</i>)	DMX600
¹⁵ N{ ¹ H}-NOE	[261]		DMX750

*) ohne *sensitivity enhancement*

E. Pulsprogramme

Die verwendeten Pulsprogramme sind zum größten Teil literaturbekannte Standardprogramme, die kommentiert und nach Bedarf optimiert wurden (*water flip back*, *sensitivity enhancement*, Unterdrückung von *radiation damping*, optimierte Wasserunterdrückung, leistungsoptimierte Entkopplung, Wahl günstigster Relaxationswege etc.). Sie werden daher nicht einzeln aufgelistet, sondern stehen dem Arbeitskreis archiviert zur Verfügung (Verzeichnis /akkn4/td/pp) und können jederzeit angefordert werden. Nachfolgend werden nur die zur Messung von Relaxationsraten und Diffusionskonstanten benutzten Pulsprogramme sowie die in Kapitel 5 erwähnten methodischen Neuentwicklungen aufgeführt. Alle Pulsprogramme sind für digitale AVANCE-Spektrometer der Fa. BRUKER und die Steuerungs-Software XWINNMR 2.5 geschrieben.

Die *Kanalbelegung* lautet standardmäßig

F1 = ^1H und F2 = ^{15}N bei H/N-Korrelationsexperimenten
und

F1 = ^1H , F2 = $^{13}\text{C}_{\text{Aliphaten}}$, F3 = ^{13}CO und F4 = ^{15}N bei Tripelresonanz-Experimenten

Pulsprogramm zur Bestimmung der ^{15}N - T_1 Relaxationszeiten

```

;## tdt1f2se.3e          td 01.12.97
;interleaved pseudo-3D-15N T1-relaxation measurement
;Features:
;T1 relaxation experiment starting with  $\pm 10\text{Nz}$  alternating at beginning of t1 mixing delay.
;Relaxation to  $+1\text{Nz}$  implies enhancement factor of 10
;using INEPT-transfers and double reverse INEPT for sensitivity enhancement
;using coherence selection with gradients and echo/antiecho detection in F2
;flip-back version using selective pulses on water (H2O (at O1) is selectively returned to +z)
;all gradients leave water in phase as water is aligned along +/-z
;F2 and F3 decoupled
;Lit:
;A.G. Palmer III, J. Cavanagh, P.E. Wright & M. Rance, J. Magn.Reson. 93, 151-170 (1991)
;L.E. Kay, P. Keifer & T. Saarinen, J. Am. Chem. Soc. 114, 10663-5 (1992)
;J. Schleucher et al., Angew. Chem. 114(10), 1518 (1993)

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

#####
;## This interleaved sampling scheme creates a pseudo-3D spectrum
;## where F3(aq) and F2(td2) represent the known X,H-HSQC spectra
;## The dummy-dimension F1(td1,l2) serves as an index for the chosen
;## T1 mixing times (T1,mix)
;## The chosen vclist must contain l2 loop entries (c) to produce
;## the desired T1,mix according to:      T1,mix = d22*c
#####
;## The 'expt' command overestimates the experimental time
;## Calculate duration manually as: ca. NS * 2TD * (d1+300ms)
#####

```

```

;## BEFORE PROCESSING,THE STATUS PARAMETER FOR TD1 MUST BE SET TO TD1 MANUALLY!
;## Only xfb in the F2/F3 plane meaningful!
;## td1 is index for T1 mixing times as defined by VCLIST
;## MC2: echo-antiecho
;## No phase correction in F1
;## Add 90 degree to Phc0(F2)
;#####
;##### Setting Parameters: #####
;#####
;## VCLIST = contains td1 loop counter entries for T1 mixing times
;## *)          It is recommended to interleave long and short T1,mix pairwise
;##            in the vclist to ensure homogeneous sample heating
;## *)          SETTING THE T1-MIXING TIMES IN THE VCLIST1:
;##            Duration of one T1 loop = d22!
;##            T1,mix = d22 * c (c = vclist1 entry)
;## *) td1 = number of vclist entries (i.e. T1 mixing times)
;## SETTING NUMBER OF SCANS AND DUMMY SCANS:
;## The actual number of scans performed is NOT = NS but
;## L3 = NS/TD1 i.e. NS divided by number of experiments
;## DS = 2*n*NS as with the usual echo-antiecho experiments
;## SFO1= water on-resonant
;## in0 = 1/(2 * SW(X)) = DW(X) ;d0 is here used for F2(td2)!!!
;## nd0 = 2
;## cpdprg2: garp
;## GRDPROG: 6sineea(ma) – ATTENTION: this gradprog uses only 8 different gradients!
;## use gradient ratios:
;##   cnst21 : cnst22 : cnst23 : cnst24 : cnst25 : cnst26 : cnst27 : cnst28
;##     5      b      35     35     69     7     69     -7    for 15N

;#####
;## PULSES, DELAYS AND LOOPS:
;#####
;## p1          ;90 high power pulse on F1 (p1)
;## p3          ;90 high power pulse on F2 (p12)
;## p11= ca. 4-5 ms ;90 selective pulse on H2O (sp1, g4 pulse), tune on H2O
;## p12         ;180 shifted bandselective pulse on HN (sp2, g3, ca.>800us)
;## p16= ca. 1m   ;gradient pulse length
;## pcpd2       ;90 low power pulse on F2 (p12) for cpd2
;## d1 = 1-5*T1(HN) ;the longer, the better (minimizes sample heating)
;##            ;NOTE: the interleaved acquisition mode allows
;##            ;for shorter d1 than in comparative experiments!
;## d4 =< 2.7m   ;1/(4J(NH))
;## "d14=d4"     ;change to 1/(6J(NH)) for NH2 groups
;## d16=200u    ;recovery delay for gradients
;## d21>=1.5m   ;half the delay between HN decoupling in T1

;#### fixed parameters, do not change ####
;p2=p1*2"      "p4=p3*2"

"d0=3u"       ;incrementable t1-delay
"d11=50u"     ;delay for phase and buffer incrementation
"d13=5u"      ;delay for phase presetting
"d7=(p3-p1)/2" ;pulse center delay
"d8=(p4-p2)/2" ;pulse center delay
"d25=d13+p16+d16+4u" ;compensated refocussing delay
"d15=d14-p16-d16-d0*2-p2" ;compensated refocussing delay
"d22=d21*4+p12*2" ;calculated time for 1 loop in T1
"d23=d21-p16-d16"

"l0=(td2/2)" ;loop counter for ea detection
"l3=ns/td1"  ;true number of scans per experiment

```

```

"l9=1"                ;dummy scan flag
"nbl=td1"             ;number of buffers allocated
;#### Calculation of T1 mixing times: ####
;T1,mix = d22 * c (c = vclist entry)

ze
d22 p112:f2
3m st0
1 zd
6m iu9
2 d11*7
3 d1
d11*2
4 d11*5
5 50u UNBLKGRAD
(p3 ph0):f2
d13
GRADIENT(cnst21)      ;15N-spoil
d16
(p1 ph11)             ;INEPT
d4 p12:f2
(d8 p2 ph0) (p4 ph0):f2
d4
(p1 ph1)
d13
p11:sp1:f1 ph12      ;water flip back pulse
d13
GRADIENT(cnst22)      ;z-spoil
d16 p11:f1
(p3 ph2):f2           ;coherence on X
d14
(d8 p2 ph0) (p4 ph0):f2
d14
(p3 ph10):f2          ;flip N coherence to +/-z
d23                   ;start of T1
GRADIENT(cnst23)      ;z-spoil
d16
p12:sp2:f1 ph20      ;band selective decoupling of amide H with MLEV expansion
d21 ip20
8 d21 ip20
p12:sp2:f1 ph20
d21
d21
p12:sp2:f1 ph20
d21 ip20
lo to 8 times c
d21 ip20
p12:sp2:f1 ph20
d23
GRADIENT(cnst24)      ;z-spoil
d16                   ;end of T1
(p3 ph5):f2           ;read pulse on N
d14 p11:f1            ;refocussing of chemical shift evolution
(p4 ph4):f2           ;refocussing 15N
d0                    ;t1-evolution
(p2 ph0):f1
d15
GRADIENT(cnst25)      ;select 15N-SQC
d16
d0
(d7 p1 ph0) (p3 ph6):f2 ;reverse INEPT of HzNy

```

```
d14
(d8 p2 ph0) (p4 ph0):f2
d14
(d7 p1 ph1) (p3 ph7):f2          ;reverse INEPT of HzNx (sensitivity enh.)
d4
(d8 p2 ph0) (p4 ph0):f2
d4
d7
(p1 ph2)
d25
(p2 ph0)
d13
GRADIENT(const26)                ;coherence selection H(-1)
d16 pl12:f2
goscnp ph31 cpd:f2               ;acquire without loop and phase pointer incrementation
d11 do:f2
d11 BLKGRAD
if "l9 < ds+2" goto 1
3m st                             ;increment buffer for next experiment
3m ivc
lo to 2 times td1                ;loop for next experiment same scan
d11 ipp4                          ;increment phase program pointers
d11 ipp6
d11 ipp7
d11 ipp10
d11 ipp11
d11 ipp12
d11 ipp31
lo to 3 times l3                 ;loop for next scan (l3=ns/td1)
d1 wr #0 if #0 zd                ;write out buffers and move disk pointer by TD*nbl
d11 ip7*2                         ;shift sign for sensitivity enhancement
lo to 4 times 2                  ;loop once for anti-echo detection
d11 id0
d11 ip5*2
d11 ip31*2
lo to 5 times l0
exit

ph0=0
ph1=1
ph2=2
ph4={0}*8 {1}*8
ph5=1
ph6=0 0 2 2
ph7=1 1 3 3
ph10=1 3
ph11={0}*4 {2}*4
ph12={2}*4 {0}*4
ph20=0
ph31=0 2 2 0 2 0 0 2 2 0 0 2 0 2 2 0
```

Pulsprogramm zur Bestimmung der ^{15}N - T_2 Relaxationszeiten

```

;## tdt2f2se.3e ##          td 07.11.97
;interleaved pseudo-3D-15N T2-relaxation measurement
;Features:
;T2 mixing sequenz = CPMG
;using INEPT-transfers and double reverse INEPT for sensitivity enhancement
;using coherence selection with gradients and echo/antiecho detection in F2
;flip-back version using selective pulses on water (H2O (at O1) is selectively returned to +z)
;all gradients leave water in phase as water is aligned along +/-z
;F2 and F3 decoupled
;Lit:
;A.G. Palmer III, J. Cavanagh, P.E. Wright & M. Rance, J. Magn.Reson. 93, 151-170 (1991)
;L.E. Kay, P. Keifer & T. Saarinen, J. Am. Chem. Soc. 114, 10663-5 (1992)
;N.A.Farrow, R.Muhandiram, A.U.Singer, S.M.Pascal, C.M.Kay
;G.Gish, S.E.Shoelson, T.Pawson, J.D.Forman-Kay and L.E.Kay
;Biochemistry 33(1994), 5984-6003

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

#####
;## This interleaved sampling scheme creates a pseudo-3D spectrum
;## where F3(aq) and F2(td2) represent the known X,H-HSQC
;## The dummy-dimension F1(td1,l2) serves as an index for the chosen
;## T2 mixing times (T2,mix)
;## The chosen vclist must contain l2 loop entries (c) to
;## produce the desired T2,mix according to T2,mix = d22*c
#####
;## The `expt` command overestimates experimental times
;## Calculate duration manually as: ca. NS * 2TD * (d1+100ms)
#####
;## BEFORE PROCESSING,THE STATUS PARAMETER FOR TD1 MUST BE SET TO TD1 MANUALLY!
;## Only xfb in the F2/F3 plane meaningful!
;## td1 is index for T2 mixing times as defined by VCLIST
;## MC2: echo-antiecho
;## No phase correction in F1
#####
;##### Setting Parameters: #####
#####
;## VCLIST = contains td1 loop counter entries for T2 mixing times
;## *) It is recommended to interleave long and short T2,mix pairwise
;## in the vclist to ensure homogeneous sample heating
;## *) SETTING THE T2-MIXING TIMES IN THE VCLIST1:
;## Duration of 1 CPMG loop = d22!
;## T2,mix = d22 * c (c = vclist1 entry)
;## *) td1 = number of vclist entries (i.e. T2 mixing times)
;## *) SETTING NUMBER OF SCANS AND DUMMY SCANS:
;## The actual number of scans performed is NOT = NS but
;## L3 = NS/TD1 i.e. NS divided by number of experiments
;## DS = 2*n*NS as with the usual echo-antiecho experiments
;## SFO1= water on-resonant
;## in0 = 1/(2 * SW(X)) = DW(X) ;d0 is here used for F2(td2)!!!
;## nd0 = 2
;## cpdprg2: garp
;## GRDPROG: 4sineea(ma)
;## use gradient ratios:
;## cnst21 : cnst22 : cnst23 : cnst24 : cnst25 : cnst26 : cnst27 : cnst28
;## 20 20 69 7 20 20 69 -7 for 15N

#####

```



```

;## PULSES, DELAYS AND LOOPS:
;#####
;## p1                ;90 high power pulse on F1 (p11)
;## p3                ;90 high power pulse on F2 (p12)
;## p11= ca. 4-5 ms   ;90 selective pulse on F1 (sp1, g4 pulse), tune on H2O
;## p16= ca. 1m      ;gradient pulse length
;## pcpd2             ;90 low power pulse on F2 (p112) for cpd2
;## d1 >= 2s         ;the longer, the better (minimizes sample heating)
;##                  ;NOTE: the interleaved acquisition mode allows
;##                  ;for shorter d1 than in comparative experiments!
;## d4 =< 2.7m       ;1/(4J(NH))
"d14=d4"              ;change to 1/(6J(NH)) for NH2 groups
;## d16=200u         ;recovery delay for gradients
;## d20=0.45m        ;CPMG delay (180(N) - 2*d20- 180(N))
;##                  ;NOTE: long d20 minimize sample heating but are
;##                  ;detrimental due to longer antiphase evolution!

;#### fixed parameters, do not change ####
"p2=p1*2"             "p4=p3*2"
"d0=3u"
"d11=50u"             ;delay for phase and buffer incrementation
"d12=10u"             ;delay for power switching
"d13=5u"              ;delay for phase presetting
"d5=d14+p3*0.64"
"d6=d14+d0+p1"
"d7=(p3-p1)/2"        ;pulse center delay
"d8=(p4-p2)/2"        ;pulse center delay
"d21=d20-p1"          ;corrected CPMG delay
"d24=d14-p16-d16-d0-p1-p3*0.64"
"d25=d13+p16+d16"     ;tc = refocussing delay
"l0=(td2/2)"          ;loop counter for ea detection
"l3=ns/td1"           ;true number of scans per experiment
"l9=1"                ;dummy scan flag
"nbl=td1"             ;number of buffers allocated

;#### Calculation of T2 mixing times: ####
"d22=d20*32+p4*16"    ;duration of 1 CPMG pass
;T2,mix = d22 * c      ;(c = vclist entry)

ze
d22 p112:f2
3m st0
1 zd
6m iu9
2 d11*7
3 d1
d11*2
4 d11*5
5 50u UNBLKGRAD
d12 p12:f2
(p3 ph0):f2
d13
GRADIENT(cnst21)      ;15N-spoil
d16
(p1 ph1)              ;INEPT
d4 p12:f2
(d8 p2 ph0) (p4 ph0):f2
d4
(p1 ph1)
d13
p11:sp1:f1 ph12      ;water flip back pulse

```

```

d13
GRADIENT(cnst22)           ;z-spoil
d16 p11:f1
(p3 ph5):f2                ;coherence on X
d14
(d8 p2 ph0) (p4 ph0):f2
d5
10 d20                     ;start of CPMG sequence
(p4 ph0):f2                ;NOTE:
d20                        ;the CPMG phase must be parallel
lo to 10 times 3           ;to the incoming X-coherence!!!
d20
(p4 ph0):f2
d21
(p2 ph0):f1                ;H-decoupling
d21
(p4 ph0):f2
d20
11 d20
(p4 ph0):f2
d20
lo to 11 times 6
d20
(p4 ph0):f2
d21
(p2 ph2):f1                ;H-decoupling
d21
(p4 ph0):f2
d20
12 d20
(p4 ph0):f2
d20
lo to 12 times 2
d20
(p4 ph0):f2
d20
lo to 10 times c           ;end of CPMG sequence
d6                          ;compensated refocussing delay
(p4 ph4):f2                ;refocussing 15N
d0                          ;t1-evolution
(p2 ph0):f1
d0
d24
GRADIENT(cnst23)           ;coherence selection 15N(+/-1)
d16
(d7 p1 ph0) (p3 ph6):f2    ;reverse INEPT of HzNy
d14
(d8 p2 ph0) (p4 ph0):f2
d14
(d7 p1 ph1) (p3 ph7):f2    ;reverse INEPT of HzNx (sensitivity enh.)
d4
(d8 p2 ph0) (p4 ph0):f2
d4
d7
(p1 ph2)
d25
(p2 ph0)
d13
GRADIENT(cnst24)           ;coherence selection H(-1)
d16 p112:f2
goscnp ph31 cpd:f2        ;acquire without loop and phase pointer incrementation

```

```

d11 do:f2
d11 BLKGRAD
if "19 < ds+2" goto 1
3m st ;increment buffer for next experiment
3m ivc
lo to 2 times td1 ;loop for next experiment same scan
d11 ipp4 ;increment phase program pointers
d11 ipp5
d11 ipp6
d11 ipp7
d11 ipp11
d11 ipp12
d11 ipp31
lo to 3 times l3 ;loop for next scan (l3=ns/td1)
d1 wr #0 if #0 zd ;write out buffers and move disk pointer by TD*nbl
d11 ip7*2 ;shift sign for sensitivity enhancement
lo to 4 times 2 ;loop once for anti-echo detection
d11 id0
d11 ip5*2
d11 ip31*2
lo to 5 times l0
exit

ph0=0
ph1=1
ph2=2
ph4=0 1 2 3
ph5=0 0 2 2
ph6=0 0 0 0 2 2 2 2
ph7=1 1 1 1 3 3 3 3
ph11=0 0 0 0 0 0 0 2 2 2 2 2 2 2 2
ph12=2 2 2 2 2 2 2 0 0 0 0 0 0 0 0
ph31=0 2 2 0 2 0 0 2 2 0 0 2 0 2 2 0

```

Pulsprogramm zur Bestimmung des $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ -NOE

```

;## tdnhoese.3e ## td 06.11.97
;interleaved pseudo-3D-15N N(H) Steady-State NOE Experiment measurement
;interleaving scheme:
;1. NOE(first scan, first t2-point)-echo
; no-NOE(first scan, first t2-point)-echo
; NOE(second scan, first t2-point)-echo
; no-NOE(second scan, first t2-point)-echo
; etc. until accumulation of desired number of scans
;2. the same for anti-echo
;3. increment t2 time, recommence at 1.
;FEATURES:
;using INEPT-transfers, sensitivity enhanced, using coherence selection via gradients (echo-antiecho in F2)
;Flip-back version (H2O (at O1) is selectively returned to +z)
;F2 and F3 decoupled
;using reduced presaturation power and offset jump to HN region in order to reduce sample heating
;Lit:
;A.G. Palmer III, J. Cavanagh, P.E. Wright & M. Rance, J. Magn.
; Reson. 93, 151-170 (1991)
;L.E. Kay, P. Keifer & T. Saarinen, J. Am. Chem. Soc. 114,
; 10663-5 (1992)

#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
;#####

```

```

;## This interleaved sampling scheme creates a pseudo-3D spectrum
;## where F3(aq) and F2(td2) represent the known X,H-HSQC
;## The dummy-dimension F1(td1,l2) serves as an index for the
;## NOE or no-NOE spectra respectively.
;## Several pairs of NOE/no-NOE spectra can be acquired
;## according to the chosen value for TD1 (even numbers!!!)
;## The efficient NOE build-up delay is d9, calculated from d30
;#####
;## The actual number of scans per experiment is not = NS, but L3=NS/TD1!
;## Thus,in the status window of the acquisition window,the scan counter
;## will only count up to l3 = NS/TD1 !
;## For same intensities, NS must be increased proportionally to TD1
;## For example: NS = 16*TD1 will accumulate 16 scans per experiment!
;#####
;## BEFORE PROCESSING,THE STATUS PARAMETER FOR TD1 MUST BE SET TO TD1 MANUALLY!
;## Only xfb in the F2/F3 plane meaningful!
;## td1 is index for NOE / no-NOE
;## MC2: echo-antiecho
;## Ph0(F1) = -90 degree
;#####
;## The 'expt' command overestimates the experimental time
;## Calculate duration manually as: NS * 2TD * (d1+d30+AQ)
;#####
;##### Setting Parameters: #####
;#####
;FQ1LIST = contains 3 entries: BF(1H), O1(HN), O1 (H2O)
;SFO1= water on-resonant
;DS = 2*n*NS
;td1/2 = number of pairs of NOE/no-NOE experiments
;in0 = 1/(2 * SW(X)) = DW(X) ;d0 is here used for F2(td2)!!!
;nd0 = 2
;cpdprg2: garp
;GRDPROG: 2sineea(ma)
;use gradient ratios:
;cnst21 : cnst22 : cnst23 : cnst24:
; 69      7      69      -7      for 15N

;p1                ;90 H high power pulse on F1 (p11)
;p3                ;90 X high power pulse on F2 (p12)
;p10= ca.100u     ;180 H low power pulse on F1 (p111) for presaturation
;p16= ca. 1m      ;gradient pulse length
;pcpd2           ;90 low power pulse on F2 (p112) for cpd2

;d1 = ca. 2*T1(HN) ;relaxation delay
;d4 =< 2.7m       ;1/(4J(NH))
"d14=d4"          ;change to 1/(6J(NH)) for NH2 groups
;d16=200u         ;gradient recovery delay
;d29 = ca. 5m     ;delay between hard pulses in presaturation loop
;d30 = ca. 3s     ;presaturation time for NOE build-up
;                 ;the exact value will be d9!!!

;#### fixed parameters, do not change ####
"p2=p1*2"
"p4=p3*2"
"d0=3u"
"d11=50u"         ;delay for phase and buffer incrementation
"d12=3u"          ;delay for power level switching
"d13=3u"          ;delay for phase presetting
"d6=(p4-p2)/2"   ;180 pulse center delay
"d7=(p3-p1)/2"   ;90 pulse center delay
"d24=d14+p1+d0"  ;compensated d14

```

```

"d25=d13+p16+d16"           ;compensated refocussing delay
"d15=d14-p16-d11-d0-p1"     ;compensated refocussing delay
"l0=(td2/2)"
"l1=d30/(d29+p10*0.67)+0.5" ;loop counter for presaturation
"l3=ns/td1"                 ;reduced scan counter
"l8=1"                      ;dummy scan flag
"l9=1"                      ;flag for NOE/noNOE
"nbl=td1"                   ;number of buffers allocated

##### Efficient NOE build/up time #####
"d9=l1*(d29+p10*0.67)"

ze
d11 st0
d12 pl12:f2
1 zd
d15 iu8                      ;increment dummy scan flag
2 d11*6
3 d1
d11
4 d11*3
5 d12 pl11:f1
5m fq1:f1                   ;set SFO1 to center of HN protons
if "l9 == 2" goto 7         ;if label l9=2 then no-NOE else NOE
d13
6 d29
p10*0.67 ph0                ;proton presaturation loop
lo to 6 times l1
d12 pl2:f2 iu9
goto 8
7 d9 ru9                    ;no-NOE part and reset NOE flag
d12 pl2:f2
8 d13
(p3 ph5):f2                 ;begin of pulse sequence - excitation pulse on N
d24 fq1:f1                 ;refocussing of chemical shift evolution, jump to H2O
(p4 ph4):f2
d0 pl1:f1                   ;t1 chemical shift evolution
(p2 ph8):f1
d0
d11 UNBLKGRAD
GRADIENT(cnst21)           ;select 15N-SQC
d15
(d7 p1 ph0) (p3 ph6):f2    ;INEPT transfer of x-component
d14
(d6 p2 ph0) (p4 ph0):f2
d14
(d7 p1 ph1) (p3 ph7):f2    ;INEPT transfer of y-component
d4
(d6 p2 ph0) (p4 ph0):f2
d4
d7
(p1 ph2)                   ;read pulse
d25
(p2 ph0)
d13
GRADIENT(cnst22)           ;select 1H-SQC
d16 pl12:f2
goscnp ph31 cpd:f2         ;acquire without loop and phase pointer incrementation
d11 do:f2
d11 BLKGRAD
if "l8 < ds+2" goto 1     ;conditional loop for DS dummy scans

```

```

d11 st ;increment buffer for next experiment
lo to 2 times td1 ;loop for next experiment same scan
d11 ipp31 ;increment phase program pointers
d11 ipp4
d11 ipp5
d11 ipp6
d11 ipp7
d11 ipp8
lo to 3 times l3 ;loop for next scan (l3=ns/td1)
d1 wr #0 if #0 zd ;write out buffers and move disk pointer by TD*nbl
d11 ip6*2 ;shift sign for sensitivity enhancement
lo to 4 times 2 ;loop once for anti-echo detection
d11 id0
d11 ip5*2
d11 ip31*2
lo to 5 times l0 ;loop for (td2/2) complex time points in F2
exit

ph0= 0
ph1= 1
ph2= 2
ph4= 0 1 2 3
ph5= 1 1 3 3
ph6= 0 0 0 0 2 2 2 2
ph7= 1 1 1 1 3 3 3 3
ph8= 0 0 0 0 0 0 0 2 2 2 2 2 2 2 2
ph31=0 2 2 0 2 0 0 2

```

Pulsprogramm zur Bestimmung von Diffusionskonstanten

```

;tddiff.2D td 20/08/99
;pseudo-2D diffusion experiment with first order compensation of convection flux
;optional WATERGATE suppression scheme
;Lit:
;A.Jerchow, N.Mueller in JMR 125 (1997), 372-375

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

##### Important Notes #####
;## Set cnst1:
;## cnst1 = 0: no WATERGATE
;## cnst1 = 1: WATERGATE
;## Start the experiment always only using 'dosy' command!
;## NEVER use 'multizg' when changing the gradient ramp!
;## ALWAYS run diffusion experiments on the protein AND the water
;## i.e. once with cnst1 = 0, once with cnst1 = 1
;## in order to verify your results: D(H2O) is tabulated!

;grdprog = tddiff2Dwg (square gradients)
; or = tddiff2Dswg (sine gradients)
;only z-spoil gradients matter, e.g.:
;cnst22 = 15, cnst23 = 16 cnst24 = 13 proposed
;cnst21, the diffusion editing gradient, is set by dosy!
;## Note:
; On changing from square to sine gradients,
; usings the SAME gradient ramp (written with dosy)
; multiply d8 by 2/PI to get equal I(gradient) curve

```

```

;**** parameters to be set ****
;p0          90degree proton pulse (p18) for fine tuning of WATERGATE
;p1          90degree proton pulse (p1)
;p16         800us, gradient pulse length for z-spoils
;p17         ca.2ms, gradient length for diffusion gradients
;p28         ;90degree proton pulse (p18) for WATERGATE
;d1          relaxation delay
;d8 =BD,ca.80-150ms (gradient ramp 2-80) for protein
;           ca. 20ms (gradient ramp 2-40) for water
;d17         ca.2*p17, recovery delay for diffusion gradients
;d16         100us, recovery delay for purge gradients
;d19         > dw, WATERGATE suppression delay

;**** calculated parameters ****
define delay LD          "p2=p1*2"          "d13=d3*0.5-p16-d16"
define delay BD          "d3=d8-p17*10/3-d17*3"  "l20=ds"

;## Evaluation in XWINNMR T1/T2 mode:
;## Setup with `edt1`:
"LD=p17*2"
"BD=d8"
;function type = vargrad: I(grad)=I0*exp[-1e-5*D*(BD-LD/3)*(2PI*g*LD*grad)^2]
;g = gamma(1H) = 4258*gscal*gshape (in G/cm)
;where
;gshape = 1 for square grads and 2/PI for sine grads
;gscal = calibrated gradient strength factor (0.67 for TXI on PAT)

1 ze
  LD
  BD
2 d1 BLKGRAD
3 50u UNBLKGRAD
  p1 ph1          ;start of first PFGE
  GRADIENT17(const21)
  d17
  p2 ph2
  GRADIENT17(-const21)
  d17
  p1 ph3          ;end of first PFGE
  d13             ;start of first diffusion mixing
  GRADIENT(const22)
  d16
  p1 ph4          ;start of rephasing PFGE
  GRADIENT17(const21)
  d17
  GRADIENT17(const21)
  d17
  p2 ph5
  GRADIENT17(const-21)
  d17
  GRADIENT17(const-21)
  d17
  p1 ph6          ;end of rephasing PFGE
  d13             ;start of second diffusion mixing
  GRADIENT(const23)
  d16
  p1 ph7          ;start of second PFGE
  GRADIENT17(const21)
  d17
  p2 ph8
  GRADIENT17(-const21)

```

```

d17
  4u
  GRADIENT(cnst24)          ;end of second PFGE
d16
if "cnst1 == 0" goto 20
  3u pl18:f1                ;WATERGATE
  p28*0.231 ph13
  d19*2
  p28*0.692 ph13
  d19*2
  p28*1.462 ph13
  d19*2
  p28*1.462 ph14
  d19*2
  p28*0.692 ph14
  d19*2
  p0*0.231 ph14
  3u pl1:f1
  goto 21
20 (p2 ph15):f1            ;no WATERGATE
21 GRADIENT(cnst24)
  d16
  go=2 ph31
  d1 BLKGRAD wr #0 if #0 zd
  lo to 3 times td1
  exit

ph0=0
ph1=0 0 1 1 2 2 3 3
ph2=1 2 2 3 3 0 0 1
ph3=0
ph4=2 2 3 3
ph5=3 3 0 0 3 3 0 0 0 1 1 0 0 1 1
ph6=2
ph7=0
ph8={0}*16 {2}*16
ph13= {0}*16 {1}*16 {2}*16 {3}*16
ph14= {2}*16 {3}*16 {0}*16 {1}*16
ph15= {0}*16 {1}*16
ph31=0 2 0 2 2 0 2 0 2 0 2 0 0 2 0 2
      2 0 2 0 0 2 0 2 0 2 0 2 0 2 0

```

Diagonalfreies 3D N,(CH)-NOESY

```

;tdNCHnoesy                21.04.99 td
;3D 15N-HSQC-NOESY-13C-HSQC with detection on N,C and H(C)
;gradients designed to ensure water flip-back
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>

;##### IMPORTANT NOTES #####
;nd0 = 2 for 13C
;nd10 = 2 for 15N
;NS: 4 * n
;DS: 2 * NS * m!!!
;MC2: echo-antiecho (in F1), STATES (in F2)
;grdprog = tdCCHnoesy
;gradient ratios:
; c21 : c22 : c23 : c24 : c25 : c26 : c27 : c28 : c29 : c30 : c31
; 60 : -60 : 80 : -66 : 45 : -87 : 24 : 22 : 55 : -22 : -55

```



```

;selection rules:
;a) coherence selection: (c25-c26) = +/- 4*(c28-c29)
;b) water flip-back:      c21 = - c22
;                          c27 = c25+c26-c24
;                          c23 = variable z-spoil
;#####
;## PULSES, DELAYS AND LOOPS:
;#####
;p1          ;90 high power pulse on 1H (F1, p1)
;p3          ;90 high power pulse on 13C (F2, p12)
;p6          ;selective 180hermite on CO (F3, sp3)
;p7          ;90 high power pulse on 15N (F4, p14)
;p16 = ca. 800us          ;gradient pulse length
;pcpd2 ca. 80us          ;90 low power pulse on F2 (13C, p112) for cpd2
;d1 = 1-5*T1(HN)          ;the longer, the better
;d5          ;CT delay
;d8          ;NOE mixing time ca. 50-80m
;d3          ;<= 1/4JCH (ca. 1.2 ms)
;d4          ;<= 1/4JNH (ca. 2.0 ms)
;d16>100u          ;recovery delay for gradients

;#### Fixed Parameters, do not change #####
"p2=p1*2"          "d21=d10"          "cen42=p4+3u-p1"
"p4=p3*2"          "d23=d3-p16"          "cen62=(p6-p2)/2"
"p8=p7*2"          "cen64=(p6-p4)/2"
"d0=5u"          define delay cen42          "cen68=(p6-p8)/2"
"d10=5u"          define delay cen62          "cen82=(p8-p2)/2"
"d11=10m"          define delay cen64
"d18=d8-p16-d16"  define delay cen68          "l3=(td1/2)"
"d20=d0*2"          define delay cen82          "l4=(td2/2)"

1 ze
2 d1 do:f2
3 d11*4
4 d11*3
5 d11*2
6 d11 UNBLKGRAD
  (p1 ph0):f1          ;start of H,N-HSQC
  d4 p14:f4
  (cen82 p2 ph1):f1 (p8 ph5):f4
  d4 p12:f2
  (p1 ph7):f1
  GRADIENT(cnst21)          ;z-spoil and radiation damping
  d16
  (p7 ph5):f4
  d10
  (cen62 p2 ph6):f1 (cen64 p4 ph0):f2 (p6:sp3 ph0):f3
  d10
  (p8 ph8):f4
  d21
  (cen62 p2 ph1):f1 (cen64 p4 ph0):f2 (p6:sp3 ph0):f3
  d21
  (p7 ph0):f4
  GRADIENT(cnst22)          ;z-spoil and water rephasing
  d16
  (p1 ph1):f1
  d4
  (cen82 p2 ph1):f1 (p8 ph0):f4
  d4
  (p1 ph2):f1          ;start of NOE mixing
  d18

```

```

GRADIENT(cnst23)                ;z-spoil
d16                             ; end of NOE mixing
(p1 ph0):f1                     ;start of C,H-HSQC
d3
(cen42 p2 ph1):f1 (p3 ph3 3u p4 ph13 3u p3 ph3):f2
d3
(p1 ph17):f1
GRADIENT(cnst24)                ;z-spoil and radiation damping
d16
(p3 ph3):f2
d0 p13:f3
(cen62 p2 ph16):f1 (p6:sp3 ph0):f3 (cen68 p8 ph0):f4
d0
GRADIENT(cnst25)                ;coherence selection
d16 p12:f2
(p4 ph0):f2
GRADIENT(cnst26)                ;coherence selection
d16 p13:f3
(cen62 p2 ph1):f1 (p6:sp3 ph0):f3 (cen68 p8 ph0):f4      ;Bloch-Siegert-compensation
d20 p12:f2
(p3 ph0):f2
GRADIENT(cnst27)                ;z-spoil and water rephasing
d16
(p1 ph0)
GRADIENT(cnst28)                ;coherence selection
d23
(cen42 p2 ph0) (p3 ph0 3u p4 ph1 3u p3 ph0):f2
GRADIENT(cnst29)                ;coherence selection
d23 p112:f2
4u BLKGRAD
go=2 ph31 cpd2:f2
d1 do:f2 wr #0 if #0 zd
lo to 3 times 2
d11 id0
d11 ip3*2
d11 ip13*2
d11 ip31*2
lo to 4 times l3
d11 rd0
d11 ip5
lo to 5 times 2
d11 id10
d11 ip31*2
lo to 6 times l4
exit

ph0 = 0
ph1 = 1
ph2 = 2
ph3 = 0 0 2 2                ;axial peak suppression in F1
ph13= 1 1 3 3
ph5 = 0 2                    ;incrementable STATES/phase for t2
ph6 = {1}*16 {3}*16         ;suppresses MQC in F2
ph7 = {1}*16 {3}*16         ;water suppression
ph8 = {0}*4 {1}*4 {2}*4 {3}*4 ;phase purge in F2
ph16= {1}*8 {3}*8           ;suppresses MQC in F1
ph17= {1}*8 {3}*8           ;water suppression
ph31= 0 2 2 0 2 0 0 2 2 0 0 2 2 0 2 2 0
      2 0 0 2 0 2 2 0 0 2 2 0 2 0 0 2

```

Diagonalfreies 3D C,(NH)-NOESY (wahlweise constant time in F2)

```

;tdCNHnoesy ;td 10/03/99
;3D C,N,H-NOESY-HSQC
;C,H-HSQC with 15N and 13CO decoupling
;N,H-HSQC with 13CA and 13CO decoupling
;coherence selection via gradients (echo-antiecho), sensitivity enhanced
;optionally constant time (CT) for 13C(F2)
;water flip-back using selective pulse

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

##### Important notes #####
;### This program optionally runs as constant-time
;### or as non-constant time version for 13C (F2)
;### Choose options:
;### 1) Constant Time version:
;### set cnst1 = 1 and d5 ca. 3.6ms (see below)
;### 2) Non-CT version:
;### set cnst1 = 2 and d5=p6+5u (see below)
;### invert cnst22, i.e. cnst22 = -40
;### Ignore the warning of d10 becoming negative!
;###
;DS=2*NS*x
;water must be on-resonant!
;Reverse = TRUE in F1(15N)
;grdprog = 7sineama
;use gradient ratio:
;cnst21:cnst22:cnst23:cnst24:cnst25:cnst26:cnst27:cnst28
; -20 +/-40 80 40 60 -40 -10.1 10.1

##### Parameters to set up #####
;p1 ;90 degree hard pulse on 1H (f1) at p11
;p3 ;90 degree hard pulse on C (f2) at p12
;p7 ;90 degree hard pulse on N (f4) at p14
;p6:sp3 ;180deg selective CO pulse on F3 (>220us SEDUCE-1 at sp3)
;p8 ;180deg 15N pulse on F4 (p14)
;p11:sp11 ca. 3ms ;selective 90deg flip-back pulse on water (G4)
;p16=1ms ;gradient pulse length
;pcpd2 ;90 degree soft pulse on X (f2) at p112
;d1>1s ;relaxation delay
;d4 ;ca. 0.7/4JHN, ca. 1.9 - 2.3 ms
;d14 ;ca. 0.7/4JHN to 0.7/6JHN, ca. 1.9 - 2.1 ms
;Set d5 according to CT or non-CT version (see NOTES):
; d5 = p6+5u for cnst1 = 2 i.e. non-constant time version
; d5 ca. 1/(8JCC)= ca. 3.6ms for cnst1 = 1 i.e. constant time version
;for CT version: FIDRES=1/(2*d5-2*p6)
; intensity scaling = cos(PI*JCC*2*d5)*exp(-2*d5/T2)
; i.e. for d5=1/(8JCC): FIDRES = 76Hz/pnt, scaling ca. 50%
;d3 ;ca. 0.7/4JHC, ca. 1.3 - 1.5 ms
;d8 ;NOE mixing time
;d16=200u ;gradient recovery delay

##### Calculated Parameters, do not change #####
;p2=p1*2" define delay cen68 "cen68=(p6-p8)/2"
;p4=p3*2" define delay cen71 "cen71=(p7-p1)/2"
;p8=p7*2" define delay cen82 "cen82=(p8-p2)/2"
define delay cen42 "cen42=p4+3u-p1" define delay CT
define delay cen62 "cen62=(p6-p2)/2" "CT=d5*2-p6+p4"
define delay cen64 "cen64=(p6-p4)/2" "d10=d5-p6"

```

```

"d21=CT-d10-p6"          "d17=d16+p6+d0*2"      "d26=p16+d16"
"d0=5u"                  "d18=d8-p16-d16"      "13=(td1/2)"
"d11=10m"                "d20=d10"              "14=(td2/2)"

1 ze
  d20
2 d1 do:f4 BLKGRAD
  d11
3 d11*3
4 d11*2
5 d11*2
6 50u UNBLKGRAD
  d11 pl1:f1
  (p1 ph0):f1              ;start of 1.HSQC
  d3 pl2:f2
  (cen42 p2 ph0):f1 (p3 ph0 3u p4 ph1 3u p3 ph0):f2
  d3 pl4:f4
  (p1 ph11):f1
  GRADIENT(cnst21)         ;z-spoil and phase purge in F1
  d16
  if "cnst1 == 2" goto 7   ;jump conditionally to non-CT version
  (p3 ph5):f2
  3u pl2:f2
  (p6:sp3 ph0):f3         ;Bloch-Siegert compensation
  (CT) (d10 p4 ph6):f2 (d10 d21 p6:sp3):f3 (d10 d21 cen62 p2 ph12):f1 (d10 d21 cen68 p8 ph0):f4
  3u pl2:f2
  (p3 ph0):f2
  goto 8
;####For non-CT:
7 (p3 ph5):f2
  d10 pl3:f3
  (cen62 p2 ph12):f1 (p6:sp3 ph0):f3 (cen68 p8 ph0):f4
  d10 pl2:f2
  (p4 ph6):f2
  d20 pl3:f3
  (cen62 p2 ph0):f1 (p6:sp3 ph0):f3 (cen68 p8 ph0):f4
  d20 pl2:f2
  (p3 ph0):f2
;####
8 GRADIENT(cnst22)         ;z-spoil
  d16
  (p1 ph0):f1
  d3
  (cen42 p2 ph0):f1 (p3 ph0 3u p4 ph1 3u p3 ph0):f2
  d3
  (p1 ph1):f1              ;start of NOE mixing
  d18
  GRADIENT(cnst23)
  d16
  (p1 ph0):f1              ;start of 2.HSQC
  d4
  (cen82 p2 ph0):f1 (p8 ph0):f4
  d4
  (p1 ph7):f1              ;H2O in +y
  3u
  (p11:sp11 ph0):f1       ;water flip-back
  GRADIENT(cnst24)         ;z-spoil
  d16 pl1:f1
  (p7 ph3):f4              ;start of t2
  d0
  (cen62 p2 ph0):f1 (cen64 p4 ph0):f2 (p6:sp3 ph0):f3      ;H2O in -z

```

```

d0
GRADIENT(cnst25)
d16
(p8 ph4):f4
GRADIENT(cnst26)
d17
(cen71 p1 ph0):f1 (p7 ph10):f4
d14
(cen82 p2 ph0):f1 (p8 ph0):f4
d14
(cen71 p1 ph1):f1 (p7 ph9):f4
d4
(cen82 p2 ph0):f1 (p8 ph0):f4
d4
(cen71 p1 ph2):f1
d26
(p2 ph0):f1
GRADIENT(cnst27)
d16 pl14:f4
go=2 ph31 cpds4:f4
d1 BLKGRAD do:f4 wr #0 if #0 zd
d11 ip9*2
lo to 3 times 2                ;e/a detection in F1
d11 id0
d11 ip3*2
d11 ip31*2
lo to 4 times l3
d11 rd0
d11 ip5                        ;States detection in F2
lo to 5 times 2
5u
if "cnst1 == 2" goto 10        ;jump conditionally to non-CT version
d11 dd10
goto 11
10 d11 id10
11 d11 ip31*2
   lo to 6 times l4
exit

ph0= 0
ph1= 1
ph2= 2
ph3= 0 2                      ;axial peak suppression in F1
ph4= 0
ph5= 0 0 2 2                  ;States phase in F2
ph6= {0}*4 {1}*4             ;phase and quad image purge in F2
ph7= {1}*16 {3}*16           ;water suppression
ph9= {1}*32 {3}*32           ;sens.enh.
ph10={0}*32 {2}*32           ;sens.enh.
ph11={1}*8 {3}*8             ;water suppression
ph12={0}*8 {2}*8             ;MQC suppression in F2
ph31=0 2 2 0 2 0 0 2 2 0 0 2 0 2 2 0
    2 0 0 2 0 2 2 0 0 2 2 0 2 0 0 2
    2 0 0 2 0 2 2 0 0 2 2 0 2 0 0 2
    0 2 2 0 2 0 0 2 2 0 0 2 0 2 2 0

```

QQF-HSQC (wahlweise als constant time Version)

```

;tdqqfhsqc.ct                      td 09.11.98
;avance-version
;2D C,H-HSQC with variable multiquantum filter (through gradients)
;i.e. for selective excitation of methyl groups (quadrupel quantum filter, QQF)
;optionally constant time version
;gradient selected
;with decoupling during acquisition;

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

;***** NOTES ****
;maximum td1 = loop counter 10
;p1 should be optimized on fist serial FID, it is generally ca.5% less than determined on the water signal!
;MC2: echo-antiecho
;cpd2: decoupling according to sequence defined by cpdprg2
;gradprog: 4sineeama
;use gradient relations as follows:
;1.                cnst22=-cnst21
;2.echo:           cnst23=cnst21*2*(n*gH+gX)/gH  n=desired coherence level
;3.antiecho        cnst26=cnst21*2*(n*gH-gX)/gH  n=desired coherence level
;example for n=3, X=13C
;cnst21            cnst22  cnst23  cnst24  cnst25  cnst26  cnst27  cnst28
; 20               10     -10    65     20     10     -10    55

;***** Parameters to be set ****
;p1                ;90 degree hard pulse on 1H (f1) at p11
;p3                ;90 degree hard pulse on C (f2) at p12
;p16=1ms           ;gradient pulse length
;pcpd2             ;90 degree soft pulse on X (f2) at p112

;d1 > 1s           ;recovery delay
;d3=22-27m         ;Constant Time Delay <=1/J(CC)
;d4=2m             ;1/4J(HC) optimize carefully!
;d16 ca. 200us    ;eddy current recovery delay (for gradients)

;**** Calculated Parameters, do not change ****
;p2=p1*2"          "p4=p3*2"          "d11=30m"

;*** for ct version ***          ;*** for variable t1 version ***          ;*** for both versions ***
"d5=d3-d4*4-d16*2-p16*2-p4*2-p2*2.5" ;"d0=3u"          "d24=(p4-p2)/2"
"d15=d5/2-d4*2+p1-p3"          ;"d20=d0*2+p2"   "d17=d4-p16-5u"
"d0=d4*2-p16-d16-p1*2.5"       ;"d11=td1/2"

1 ze
2 d1 do:f2
3 d11
  d11
  d11
4 d11 p12:f2
  50u UNBLKGRAD
  (p3 ph0):f2
  GRADIENT(cnst21)
  d16
  (p1 ph0):f1
  d4 p12:f2
  (d24 p2 ph1):f1 (p4 ph13):f2
  d4 UNBLKGRAD

```

```

(p1 ph6):f1
GRADIENT(cnst22)
d16
(p3 ph3):f2
;*** for ct version ***
(d5) (d0 p2 ph0):f1 (d0 d15 p4 ph8):f2
;*** for variable t1 version ***
; d0
; (p2 ph0):f1
; d0
; (p4 ph0):f2
; d20
;*** end of t1 time for both versions ***
(p1 ph4):f1
GRADIENT(cnst23)
d17
(d24 p2 ph1):f1 (p4 ph0):f2
GRADIENT(cnst24)
d17
(p1 ph7):f1 ;QQF begins
GRADIENT(cnst25)
d16
(p2 ph0):f1
GRADIENT(cnst26)
d16
(p1 ph7):f1 ;QQF ends
GRADIENT(cnst27)
d17
(d24 p2 ph1):f1 (p4 ph0):f2
GRADIENT(cnst28)
d17
(p3 ph5):f2
d4
(d24 p2 ph0):f1 (p4 ph0):f2
GRADIENT(cnst29)
d17 pl12:f2
5u BLKGRAD
go=2 ph31 cpd2:f2
d1 do:f2 wr #0 if #0 zd
lo to 3 times 2
d11 id0
d11 ip31*2
d11 ip3*2
d11 ip13*2
lo to 4 times 11
exit

ph0=0
ph1=1
ph3=0 2
ph4={0}*4 {2}*4
ph5={0}*8 {2}*8
ph6={1}*16 {3}*16
ph7={1}*4 {3}*4
ph8=0 0 1 1 2 2 3 3
ph13=0 2
ph31=0 2 2 0 2 0 2 2 0 0 2 0 2 2 0
      2 0 0 2 0 2 2 0 0 2 2 0 2 0 0 2

```

Literaturverzeichnis

- [1] M. P. Williamson, T. F. Havel, K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.* **1985**, *182*, 295.
- [2] F. Bloch, *Phys.Rev.* **1946**, *70*, 460.
- [3] R. R. Ernst, W. A. Anderson, *Rev. Sci. Instr.* **1966**, *37*, 93-102.
- [4] J. Jeener, *Ampere International Summerschool II* Basko Polje, Jugoslawien, **1971**.
- [5] C. Griesinger, O. W. Sorensen, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* **1987**, *73*, 574.
- [6] M. Ikura, L. E. Kay, A. Bax, *Biochemistry* **1990**, *29*, 4659.
- [7] L. E. Kay, G. M. Clore, A. Bax, A. M. Gronenborn, *Science* **1990**, 249.
- [8] K. Pervushin, R. Riek, G. Wider, K. Wüthrich, *Proc. Natl. Acad. Sc. USA.* **1997**, *94*, 12366-12371.
- [9] R. Riek, G. Wider, K. Pervushin, K. Wüthrich, *Proc. Natl. Acad. Sc. USA.* **1999**, *96*, 4918-4923.
- [10] S. B. Shuker, P. J. Hajduk, R. P. Meadows, S. W. Fesik, *Science* **1996**, *274*, 1531-1534.
- [11] A. G. Redfield, *IBM J. Res. Develop.* **1957**, *1*, 19.
- [12] G. Lipari, A. Szabo, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 4546-4559.
- [13] D. E. Woessner, *J. Chem. Phys.* **1962**, *37*, 647-654.
- [14] A. Abragam, *Principles of Nuclear Magnetism*, Band 32, Clarendon Press, Oxford, **1989**.
- [15] I. Solomon, *Phys.Rev.* **1955**, *99*, 559.
- [16] R. R. Ernst, G. Bodenhausen, A. Wokaun, *Principles of nuclear magnetic resonance in one and two dimensions*, Band 14, Clarendon Press, Oxford, **1994**.
- [17] P. W. Atkins, *Physikalische Chemie*, VCH, Weinheim, **1988**.
- [18] J. M. Schurr, B. S. Fujimoto, S. Nuutero, *J. Magn. Reson.* **1994**, *A 106*, 1-22.
- [19] J. Boyd, U. Hommel, I. D. Campbell, *Chem. Phys. Lett.* **1990**, *175*, 477-482.
- [20] J. Boyd, T. K. Mal, N. Soffe, I. D. Campbell, *J. Magn. Reson.* **1997**, *124*, 61-71.
- [21] D. Fushman, N. Tjandra, D. Cowburn, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 10947-10952.
- [22] D. M. Korzhnev, V. Y. Orekhov, A. S. Arseniev, *J. Magn. Reson.* **1997**, *127*, 184-191.
- [23] M. W. F. Fischer, L. Zeng, Y. Pang, W. Hu, A. Majumdar, E. R. P. Zuiderweg, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 12629-12642.
- [24] M. Buck, J. Boyd, C. Redfield, D. A. MacKenzie, D. J. Jeenes, D. B. Archer, C. M. Dobson, *Biochemistry* **1995**, *34*, 4041-4055.
- [25] L. G. Werbelow, D. M. Grant, *Adv. Magn. Reson.* **1974**, *9*, 189-300.

- [26] J. W. Peng, G. Wagner, *Biochemistry* **1992**, *31*, 8571-8586.
- [27] P. Allard, J. Jarvet, A. Ehrenberg, A. Gräslund, *J. Biomol. NMR* **1995**, *5*, 133-146.
- [28] N. A. Farrow, O. Zhang, A. Szabo, D. A. Torchia, L. E. Kay, *J. Biomol. NMR* **1995**, *6*, 153-162.
- [29] M. A. Markus, K. T. Dayie, P. Matsudaira, G. Wagner, *Biochemistry* **1996**, *35*, 1722-1732.
- [30] N. A. Farrow, O. Zhang, J. D. Forman-Kay, L. E. Kay, *Biochemistry* **1995**, *34*, 868-878.
- [31] G. Lipari, A. Szabo, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 4559-4570.
- [32] G. M. Clore, A. Szabo, A. Bax, L. E. Kay, P. C. Driscoll, A. M. Gronenborn, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 4989-4991.
- [33] G. M. Clore, P. C. Driscoll, P. T. Wingfield, A. M. Gronenborn, *Biochemistry* **1990**, *29*, 7387-7401.
- [34] T. J. Swift, R. E. Connick, *J. Chem. Phys.* **1962**, *37*, 307ff.
- [35] R. A. Dwek, *NMR in Biochemistry*, Clarendon Press, Oxford, **1973**.
- [36] S. Zinn-Justin, P. Berthault, M. Guenneuges, H. Desvaux, *J. Biomol. NMR* **1997**, *10*, 363-372.
- [37] V. Y. Orekhov, K. V. Pervushin, A. S. Arseniev, *Eur. J. Biochem.* **1994**, *219*, 887-896.
- [38] A. L. Lee, A. J. Wand, *J. Biomol. NMR* **1999**, *13*, 101-112.
- [39] D. Fushman, D. Cowburn, *J. Biomol. NMR* **1999**, *13*, 139-147.
- [40] D. G. Davis, M. E. Perlman, R. E. London, *J. Magn. Reson.* **1994**, *B 104*, 266-275.
- [41] C. Dewerell, R. E. Morgan, J. H. Strange, *Mol. Phys.* **1970**, *18*, 553-559.
- [42] F. A. A. Mulder, P. J. A. van Tiborg, R. Kaptein, R. Boelens, *J. Biomol. NMR* **1999**, *13*, 275-288.
- [43] V. Y. Orekhov, D. M. Korzhnev, T. Diercks, H. Kessler, A. S. Arseniev, *J. Biomol. NMR* **1999**, *14*, 345-356.
- [44] F. Bruker, *Bruker Almanac*, Bruker Analytische Messtechnik GmbH, Rheinstetten/Karlsruhe, **1998**.
- [45] A. L. VanGeet, *Anal. Chem.* **1970**, *42*, 679-680.
- [46] A. L. VanGeet, *Anal. Chem.* **1968**, *40*, 2227-2229.
- [47] G. M. Smith, P. L. Yu, D. J. Domingues, *Biochemistry* **1987**, *26*, 2202.
- [48] S. Grzesiek, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 12593-12594.
- [49] W. Jahnke, H. Kessler, *J. Biomol. NMR* **1994**, *4*, 735-740.
- [50] L. E. Kay, D. A. Torchia, A. Bax, *Biochemistry* **1989**, *28*, 8972-8979.

- [51] C. Bracken, P. A. Carr, J. Cavanagh, A. G. Palmer, *J. Mol. Biol.* **1999**, 285, 2133-2146.
- [52] A. C. Wang, A. Bax, *J. Biomol. NMR* **1993**, 3, 715-720.
- [53] J. A. Jones, *J. Magn. Reson.* **1997**, 126, 283-286.
- [54] G. H. Weiss, J. A. Ferretti, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1988**, 20, 317-335.
- [55] A. Allerhand, E. Thiele, *J. Chem. Phys.* **1966**, 45, 902-916.
- [56] M. Czisch, G. C. King, A. Ross, *J. Magn. Reson.* **1997**, 126, 154-157.
- [57] J. P. Loria, M. Rance, A. G. Palmer III, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 2331-2332.
- [58] A. G. Palmer, N. J. Skelton, W. J. Chazin, P. E. Wright, M. Rance, *Mol. Phys.* **1992**.
- [59] A. Ross, M. Czisch, G. C. King, *J. Magn. Reson.* **1997**, 124, 355-365.
- [60] M. Zweckstetter, T. A. Holak, *J. Magn. Reson.* **1998**, 133, 134-147.
- [61] L. E. Kay, L. K. Nicholson, F. Delaglio, A. Bax, D. A. Torchia, *J. Magn. Reson.* **1992**, 97, 359-375.
- [62] A. J. Shaka, J. Keeler, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1987**, 19, 47-129.
- [63] H. Y. Carr, E. M. Purcell, *Phys. Rev.* **1954**, 94, 630-638.
- [64] S. Meiboom, D. Gill, *Rev. Sci. Instrum.* **1958**, 29, 688-691.
- [65] M. Bloom, L. W. Reeves, E. J. Wells, *J. Chem. Phys.* **1965**, 42, 1615-1624.
- [66] R. Ishima, P. T. Wingfield, S. J. Stahl, J. D. Kaufman, D. A. Torchia, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 10534-10542.
- [67] F. A. A. Mulder, R. A. d. Graaf, R. Kaptein, R. Boelens, *J. Magn. Reson.* **1998**, 131, 351-357.
- [68] M. Akke, I. Arthur G. Palmer, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 911-912.
- [69] N. Tjandra, P. Wingfield, S. Stahl, A. Bax, *J. Biomol. NMR* **1996**, 8, 273-284.
- [70] L. Banci, I. C. Felli, D. Koulougliotis, *J. Biomol. NMR* **1998**, 12, 307-318.
- [71] R. Konrat, M. Tollinger, *J. Biomol. NMR* **1999**, 13, 213-221.
- [72] A. D. Bain, G. J. Duns, *J. Magn. Reson.* **1994**, A 109, 56-64.
- [73] J. Briand, K. D. Kopple, *J. Biomol. NMR* **1995**, 6, 347-360.
- [74] R. Brüschweiler, C. Grieseinger, R. R. Ernst, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 8034-8035.
- [75] J. W. Peng, V. Thanabal, G. Wagner, *J. Magn. Reson.* **1991**, 94, 82-100.
- [76] D. L. Mattiello, W. S. Warren, L. Mueller, B. T. Farmer II, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 3253-3261.

- [77] A. G. Palmer III, J. Cavanagh, P. E. Wright, M. Rance, *J. Magn. Reson.* **1991**, *93*, 151-170.
- [78] D. Jin, F. Figueirido, G. T. Montelione, R. M. Levy, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 6923-2924.
- [79] D. Jin, M. Andrec, G. T. Montelione, R. M. Levy, *J. Biomol. NMR* **1998**, *12*, 471-492.
- [80] R. King, O. Jardetzky, *Chem. Phys. Lett.* **1978**, *55*, 15-18.
- [81] J. M. Schurr, H. P. Babcock, B. S. Fujimoto, *J. Magn. Reson.* **1994**, *B 105*, 211-224.
- [82] S. Yao, M. G. Hinds, R. S. Norton, *J. Magn. Reson.* **1998**, *131*, 347-350.
- [83] G. Barbato, M. Ikura, L. E. Kay, R. W. Pastor, A. Bax, *Biochemistry* **1992**, *31*, 5269-5278.
- [84] I. Q. H. Phan, J. Boyd, I. D. Campbell, *J. Biomol. NMR* **1996**, *8*, 369-378.
- [85] D. M. Schneider, M. Dellwo, A. J. Wand, *Biochemistry* **1992**, *31*, 3645-3652.
- [86] N. Tjandra, S. E. Feller, R. W. Pastor, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 12562-12566.
- [87] G. M. Clore, A. M. Gronenborn, A. Bax, *J. Magn. Reson.* **1998**, *133*, 216-221.
- [88] J. J. Barchi Jr., B. Grasberger, A. M. Gronenborn, G. M. Clore, *Protein Sci.* **1994**, *3*, 15-21.
- [89] K. A. Williams, N. A. Farrow, C. M. Deber, L. E. Kay, *Biochemistry* **1996**, *35*, 5145-5157.
- [90] K. V. Pervushin, V. Y. Orekhov, D. M. Korzhnev, A. S. Arseniev, *J. Biomol. NMR* **1995**, *5*, 383-396.
- [91] V. Y. Orekhov, G. V. Abdulaeva, L. Y. Musina, A. S. Arseniev, *Eur. J. Biochem.* **1992**, *210*, 223-229.
- [92] A. T. Alexandrescu, C. Abeygunawardana, D. Shortle, *Biochemistry* **1994**, *33*, 1063-1072.
- [93] M. Buck, H. Schwalbe, C. M. Dobson, *J. Mol. Biol.* **1996**, *257*, 669-683.
- [94] T. Szyperski, P. Luginbühl, G. Otting, P. Güntert, K. Wüthrich, *J. Biomol. NMR* **1993**, *3*, 151-164.
- [95] G. Otting, E. Liepinsh, K. Wüthrich, *Biochemistry* **1993**, *32*, 3571-3582.
- [96] Y. Feng, B. K. Klein, C. A. McWherter, *J. Mol. Biol.* **1996**, *259*, 524-541.
- [97] V. Y. Orekhov, K. V. Pervushin, D. M. Korzhnev, A. S. Arseniev, *J. Biomol. NMR* **1995**, *6*, 113-122.
- [98] I. S. Beloborodov, V. Y. Orekhov, A. S. Arseniev, *J. Magn. Reson.* **1998**, *132*, 328-329.

- [99] Z. Zheng, J. Czaplicki, O. Jardetzky, *Biochemistry* **1995**, *34*, 5212-5223.
- [100] W. H. Press, S. A. Teukolsky, W. T. Vetterling, B. P. Flannery, *Numerical Recipes in C*, Cambridge University Press, Cambridge, NY, **1992**.
- [101] M. T. McMahon, O. Oldfield, *J. Biomol. NMR* **1999**, *13*, 133-137.
- [102] A. M. Mandel, M. Akke, A. G. Palmer III., *J. Mol. Biol.* **1995**, *246*, 144-163.
- [103] N. Tjandra, A. Szabo, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 6986-6991.
- [104] R. Ghose, J. H. Prestegard, *J. Magn. Reson.* **1998**, *134*, 308-314.
- [105] M. Tessari, F. A. A. Mulder, R. Boelens, G. W. Vuister, *J. Magn. Reson.* **1997**, *127*, 128-133.
- [106] M. Tessari, H. Vis, R. Boelens, R. Kaptein, G. W. Vuister, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8985-8990.
- [107] V. Y. Orekhov, D. E. Nolde, A. P. Golovanov, D. M. Korzhnev, A. S. Arseniev, *Appl. Magn. Reson.* **1995**, *9*, 581-588.
- [108] J. Happel, H. Brenner, *Low Reynolds Number Hydrodynamics*, Nordoff, Leyden, **1973**.
- [109] J. M. Garcia Bernal, J. Garcia de la Torre, *Biopolymers* **1980**, *19*, 751-766.
- [110] J. Garcia de la Torre, V. A. Bloomfield, *Q. Rev. Biophys.* **1981**, *14*, 81-139.
- [111] G. Lamm, A. Szabo, *J. Chem. Phys.* **1986**, *85*, 7334-7348.
- [112] B. Lee, F. M. Richards, *J. Mol. Biol.* **1971**, *55*, 379-400.
- [113] R. W. Pastor, M. Karplus, *J. Phys. Chem.* **1988**, *92*, 2636-2641.
- [114] R. W. Pastor, R. Zwanzig, *J. Chem. Phys.* **1989**, *90*, 5729-5733.
- [115] J. Rotne, S. Prager, *J. Chem. Phys.* **1969**, *50*, 4831-4837.
- [116] R. M. Venable, R. W. Pastor, *Biopolymers* **1988**, *27*, 1001-1014.
- [117] I. D. Kuntz, W. Kauzmann, *Adv. Protein Chem.* **1974**, *28*, 236-345.
- [118] R. Brüschweiler, X. Liao, P. E. Wright, *Science* **1995**, *268*, 886-889.
- [119] G. Cornilescu, J. L. Marquardt, M. Ottiger, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 6836-6837.
- [120] N. Tjandra, D. S. Garrett, A. M. Gronenborn, A. Bax, G. M. Clore, *Nature Struct. Biol.* **1997**, *4*, 443-449.
- [121] D. Fushman, R. Xu, D. Cowburn, *Biochemistry* **1999**, *38*, 10225-10230.
- [122] G. M. Clore, A. M. Gronenborn, A. Szabo, N. Tjandra, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 4889-4890.
- [123] J.-C. Hus, D. Marion, M. Blackledge, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 2311-2312.
- [124] D. R. Flower, *Biochemistry Journal* **1996**, *318*, 1-14.
- [125] D. R. Flower, *FEBS Letters* **1994**, *354*, 7-11.

- [126] A. Nagata, Y. Suzuki, M. Igarashi, N. Eguchi, H. Toh, Y. Urade, O. Hayaishi, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **1991**, 88, 4020-4024.
- [127] G. Beste, F. S. Schmidt, T. Stibora, A. Skerra, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 96, 1898-1903.
- [128] D. R. Flower, A. C. T. North, T. K. Attwood, *BBRC* **1991**, 180, 69-74.
- [129] S. Spinelli, R. Ramoni, S. Grolli, B. Bonicel, C. Cambillau, M. Tegoni, *Biochemistry* **1998**, 37, 7913-7918.
- [130] P. A. Nygren, M. Uhlen, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1997**, 7, 463-469.
- [131] R. A. Allen, R. W. Erickson, A. J. Jesaitis, *Biochim. Biophys. Acta* **1989**, 991, 123-133.
- [132] G. I. Goldberg, A. Strongin, I. F. Collier, T. Genrich, B. L. Marmer, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 4583-4591.
- [133] S. Triebel, J. Bläser, H. Reinke, H. Tschesche, *FEBS Letters* **1992**, 314, 386-388.
- [134] L. Kjeldsen, D. F. Bainton, H. Sengelov, N. Borregaard, *Blood* **1993**, 82, 3183-3191.
- [135] L. Kjeldsen, D. F. Bainton, H. Sengelov, N. Borregaard, *Blood* **1994**, 83, 799-807.
- [136] L. Seveus, K. Amin, C. G. Peterson, G. M. Roomans, P. Venge, *Histochem. Cell Biol.* **1997**, 107, 423-432.
- [137] A. Schettler, H. Thorn, B. M. Jockusch, H. Tschesche, *Eur. J. Biochem.* **1991**, 197, 197-202.
- [138] S. Bartsch, *Dissertation*, Universität Bielefeld, **1996**.
- [139] V. M. Keatings, P. J. Barnes, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **1997**, 155, 449-453.
- [140] A. M. Elneihoum, P. Falke, B. Hedblad, F. Lindgarde, K. Ohlsson, *Atherosclerosis* **1997**, 79-84.
- [141] A. J. P. Docherty, G. Murphy, *Ann. Rheum. Dis.* **1990**, 49, 469-479.
- [142] H. Kolkenbrock, A. Hecker-Kia, D. Orgel, A. Kinawi, N. Ulbrich, *Biol Chem.* **1996**, 377, 529-533.
- [143] V. Zölzer, H. Tschesche, *Veröffentlichung in Arbeit* **1999**.
- [144] D. R. Edwards, G. Murphy, *Nature* **1998**, 394, 527-528.
- [145] S. Arii, M. Mise, T. Harada, M. Furutani, S. Ishigami, M. Niwano, M. Mizumoto, M. Fukumoto, M. Imamura, *Hepatology* **1996**, 24, 316-322.
- [146] M. Furutani, S. Arii, M. Mizumoto, M. Kato, M. Imamura, *Cancer Letters* **1998**, 122, 209-214.
- [147] B. Mühlenweg, *Diplomarbeit*, Universität Bielefeld, **1996**.
- [148] M. Coles, T. Diercks, B. Muehlenweg, S. Bartsch, V. Zölzer, H. Tschesche, H. Kessler, *J. Mol. Biol.* **1999**, 289, 139-157.

- [149] M. Leutner, R. M. Gschwind, J. Liermann, C. Schwarz, G. Gemmecker, H. Kessler, *J. Biomol. NMR* **1998**, *11*, 31-43.
- [150] S. Seip, J. Balbach, H. Kessler, *J. Magn. Reson.* **1992**, *100*, 406-410.
- [151] F. Löhr, H. Rüterjans, *J. Magn. Reson.* **1997**, *124*, 255-258.
- [152] D. S. Wishart, B. D. Sykes, F. M. Richards, *Biochemistry* **1992**, *31*, 1647-1651.
- [153] D. S. Wishart, B. D. Sykes, *J. Biomol. NMR* **1994**, *4*, 171-180.
- [154] S. Koide, W. Jahnke, P. E. Wright, *J. Biomol. NMR* **1995**, *6*, 306-312.
- [155] G. Gemmecker, W. Jahnke, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 11620-11621.
- [156] A. T. Brunger, *X-PLOR, Version 3.1. A System for X-ray Crystallography and NMR*, Yale University Press, New Haven, Connecticut, **1992**.
- [157] J. Kuszewski, J. Qin, A. M. Gronenborn, G. M. Clore, *J. Magn. Reson. B* **1995**, *106*, 92-96.
- [158] J. Kuszewski, A. M. Gronenborn, G. M. Clore, *J. Magn. Reson. B* **1995**, *107*, 293-297.
- [159] J. Kuszewski, A. M. Gronenborn, G. M. Clore, *J. Magn. Reson. B* **1996**, *112*, 78-91.
- [160] J. Kuszewski, A. M. Gronenborn, G. M. Clore, *Prot. Sci.* **1996**, *5*, 1067-1080.
- [161] J. Kuszewski, A. M. Gronenborn, G. M. Clore, *J. Magn. Reson.* **1997**, *125*, 171-177.
- [162] R. A. Laskowski, M. W. MacArthur, D. S. Moss, J. M. Thornton, *Journal of Applied Crystallography* **1993**, *26*, 283-289.
- [163] R. A. Laskowski, J. A. C. Rullmann, M. W. MacArthur, R. Kaptein, J. M. Thornton, *J. Biomol. NMR* **1996**, *8*, 477-486.
- [164] *Molecular biology and biotechnology - a comprehensive desk reference*; R. A. Meyers, Ed.; VCH:, **1995**.
- [165] D. Kim, D. L. Lewis, L. Graziadei, E. J. Neer, D. Bar-Sagi, D. E. Clapham, *Nature* **1989**, *337*, 557-560.
- [166] W. Pruzanski, P. Vadas, *Immunology today* **1991**, *12*, 143-146.
- [167] D. Kim, D. E. Clapham, *Science* **1989**, *244*, 1174-1176.
- [168] M. K. Jain, B. Z. Yu, O. G. Berg, *Biochemistry* **1993**, *32*, 11319-11329.
- [169] R. L. Heinrikson, E. T. Krueger, P. S. Keim, *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 4913-4921.
- [170] D. L. Scott, P. B. Sigler, *Adv. Protein Chem.* **1994**, *45*, 53-88.
- [171] R. Jerala, P. F. F. Almeida, Q. Ye, R. L. Biltonen, G. S. Rule, *J. Biomol. NMR* **1996**, *7*, 107-120.
- [172] C. Schwartz, Technische Universität München, **1998**.

- [173] D. L. Scott, S. P. White, J. L. Browning, J. J. Rosa, M. H. Gelb, P. B. Sigler, *Science* **1991**, 254, 1007-1010.
- [174] J. P. Wery, R. W. Schevitz, D. K. Clawson, J. L. Bobbitt, E. R. Dow, G. Gamboa, T. Goodson, R. B. Hermann, R. M. Kramer, D. B. McClure, E. D. Mihelich, J. E. Putnam, J. D. Sharp, D. H. Stark, C. Teater, M. M. Warrick, N. D. Jones, *Nature* **1991**, 352, 79-82.
- [175] B. W. Dijkstra, J. Drenth, K. H. Kalk, *Nature* **1981**, 289, 604-606.
- [176] D. L. Scott, S. P. White, Z. Otwinowski, W. Yuan, M. H. Gelb, P. B. Sigler, *Science* **1990**, 250, 1541-1546.
- [177] X. Liu, H. Zhu, B. Huang, J. Rogers, B. Z. Yu, A. Kumar, M. K. Jain, M. Sundaralingam, M. D. Tsai, *Biochemistry* **1995**, 34, 7322-7334.
- [178] C. M. Dupureur, B. Z. Yu, M. K. Jain, J. P. Noel, T. Deng, Y. Li, I. L. Byeon, M. D. Tsai, *Biochemistry* **1992**, 31, 6402-6413.
- [179] C. M. Dupureur, B. Z. Yu, A. Mamone, M. K. Jain, M. D. Tsai, *Biochemistry* **1992**, 31, 10576-10583.
- [180] B. W. Dijkstra, R. Renetseder, K. H. Kalk, J. Drenth, *J. Mol. Biol.* **1983**, 168, 163-179.
- [181] B. W. Dijkstra, K. H. Kalk, J. Drenth, G. H. de Haas, M. R. Egmond, A. J. Slotboom, *Biochemistry* **1984**, 23, 2759-2766.
- [182] F. Ramirez, M. K. Jain, *Proteins* **1991**, 9, 229-239.
- [183] Y. Li, M. D. Tsai, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 8523-8526.
- [184] C. M. Dupureur, Y. Li, M. D. Tsai, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 2748-2749.
- [185] C. Sekharudu, B. Ramakrishnan, B. Huang, R. T. Jiang, C. M. Dupureur, M. D. Tsai, M. Sundaralingam, *Protein Sci.* **1992**, 1, 1585-1594.
- [186] A. Kumar, Y. C. Sekharudu, C. M. Dupureur, H. Zhu, M. D. Tsai, M. Sundaralingam, *Protein Sci.* **1994**, 3, 2082-2088.
- [187] Y. Li, B. Z. Yu, H. Zhu, M. K. Jain, M. D. Tsai, *Biochemistry* **1994**, 33, 14714-14722.
- [188] H. K. Lin, M. H. Gelb, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 3932-3942.
- [189] H. Zhu, C. M. Dupureur, X. Zhang, M. D. Tsai, *Biochemistry* **1995**, 34, 15307-15314.
- [190] B. Huang, B. Z. Yu, J. Rogers, I.-J. L. Byeon, K. Sekar, X. Chen, M. Sundaralingam, M. D. Tsai, M. K. Jain, *Biochemistry* **1996**, 35, 12164-12174.
- [191] M. K. Jain, B. P. Maliwal, *Biochemistry* **1993**, 32, 11838-11846.
- [192] B. van den Berg, M. Tessari, R. Boelens, R. Dijkman, G. H. de Haas, R. Kaptein, H. M. Verheij, *Nature Struct. Biol.* **1995**, 2, 402-406.

- [193] B. P. Maliwal, B. Z. Yu, H. Szmazinski, T. Squier, J. van Binsbergen, A. J. Slotboom, M. K. Jain, *Biochemistry* **1994**, *33*, 4509-5416.
- [194] B. van den Berg, M. Tessari, R. Boelens, R. Dijkman, R. Kaptein, G. H. de Haas, H. M. Verheij, *J. Biomol. NMR* **1995**, *5*, 110-121.
- [195] H. M. Verheij, M. R. Egmond, G. H. de Haas, *Biochemistry* **1981**, *20*, 94-99.
- [196] P. A. Thompson, W. A. Eaton, J. Hofrichter, *Biochemistry* **1997**, *36*, 9200-9210.
- [197] V. Daggett, M. Levitt, *J. Mol. Biol.* **1992**, *223*, 1121-1138.
- [198] J. Garcia de la Torre, V. A. Bloomfield, *Biopolymers* **1977**, *16*, 1747-1763.
- [199] J. Garcia de la Torre, V. A. Bloomfield, *Biopolymers* **1977**, *16*, 1765-1778.
- [200] H. van Tilbeurgh, M.-P. Egloff, C. Martinez, N. Rugani, R. Verger, C. Cambillau, *Nature* **1993**, *362*, 814-820.
- [201] J. J. Prompers, A. Groenewegen, C. W. Hilbers, H. A. M. Pepermans, *Biochemistry* **1999**, *38*, 5315-5327.
- [202] V. Pamnani, T. Tamura, A. Lupas, J. Peters, Z. Cejka, W. Ashraf, W. Baumeister, *FEBS Letters* **1997**, *404*, 263-268.
- [203] S. Patel, M. Latterich, *Trends Cell Biol.* **1998**, *8*, 65-71.
- [204] A. Beyer, *Protein Sci.* **1997**, *6*, 2043-2058.
- [205] J. E. Walker, M. J. Saraste, J. J. Runswick, N. J. Gay, *EMBO J.* **1982**, *1*, 945-951.
- [206] R. Golbik, A. Lupas, K. K. Koretke, J. Peters, W. Baumeister, *Biol. Chem.* **1999**, *in press*.
- [207] R. C. Yu, P. I. Hanson, R. Jahn, A. T. Brunger, *Nat. Struct. Biol.* **1998**, *5*, 803-811.
- [208] C. U. Lenzen, D. Steinmann, S. W. Whiteheart, W. I. Weis, *Cell* **1998**, *94*, 525-36.
- [209] P. I. Hanson, R. Roth, H. Morisaki, R. Jahn, J. E. Heuser, *Cell* **1997**, *90*, 523-35.
- [210] J. Peters, J. Harris, A. Lustig, S. Muller, A. Engel, S. Volker, W. Franke, *J. Mol. Biol.* **1992**, *223*, 557-571.
- [211] K. U. Frohlich, H. W. Fries, J. M. Peters, D. Mecke, *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, *1253*, 25-32.
- [212] B. Rockel, J. Walz, R. Hegerl, J. Peters, D. Typke, W. Baumeister, *in press* **1999**.
- [213] M. Coles, T. Diercks, J. Liermann, A. Gröger, A. Lupas, J. Peters, C. Koretke, B. Rockel, W. Baumeister, H. Kessler, *Curr. Biol.* **1999**, *9*, 1158-1168.
- [214] T. Diercks, M. Coles, H. Kessler, *J. Biomol. NMR* **1999**, *15*, 177-180.
- [215] G. M. Clore, A. M. Gronenborn, N. Tjandra, *J. Magn. Reson.* **1998**, *131*, 159-162.
- [216] N. Tjandra, S. Grzesiek, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 6264-6272.
- [217] N. Tjandra, A. Bax, *J. Magn. Reson.* **1997**, *124*, 512-515.
- [218] J. R. Tolman, *Proc. Natl. Acad. Sc. USA.* **1995**, *92*, 9279-9283.

- [219] A. A. Bothner-By, C. Gayathri, P. C. M. van Zijl, C. MacLean, J.-J. Lai, K. M. Smith, *Mag. Res. Chem.* **1985**, *23*, 935-938.
- [220] H. Wang, M. Eberstadt, E. T. Olejniczak, R. P. Meadows, S. W. Fesik, *J. Biomol. NMR* **1998**, *12*, 443-446.
- [221] M. Ottiger, A. Bax, *J. Biomol. NMR* **1998**, *12*, 361-372.
- [222] M. Ottiger, F. Delaglio, J. L. Marquardt, N. Tjandra, A. Bax, *J. Magn. Reson.* **1998**, *134*, 365-369.
- [223] R. M. Castillo, K. Mizuguchi, V. Dhanaraj, A. Albert, T. L. Blundell, A. G. Murzin, *Structure* **1999**, *7*, 227-236.
- [224] T. Diercks, M. Schwaiger, H. Kessler, *J. Magn. Reson.* **1998**, *130*, 335-340.
- [225] H. Kessler, P. Schmieder, M. Kurz, *J. Magn. Reson.* **1989**, *85*, 400-405.
- [226] H. Kessler, P. Schmieder, M. Köck, M. Reggelin, *J. Magn. Reson.* **1991**, *91*, 375-379.
- [227] D. M. Doddrell, D. T. Pegg, M. R. Bendall, *J. Magn. Reson.* **1982**, *48*, 323-327.
- [228] A. Bax, A. F. Mehlkopf, J. Smidt, *J. Magn. Reson.* **1979**, *35*, 167-169.
- [229] J. Schleucher, M. Schwendinger, M. Sattler, P. Schmidt, O. Schedletzky, S. J. Glaser, O. W. Sörensen, C. Griesinger, *J. Biomol. NMR* **1994**, *4*, 301-306.
- [230] D. R. Muhandiram, G. Y. Xu, L. E. Kay, *J. Biomol. NMR* **1993**, *3*, 463-470.
- [231] G. M. Clore, L. E. Kay, A. Bax, A. M. Gronenborn, *Biochemistry* **1991**, *30*, 12-18.
- [232] S. Grzesiek, P. Wingfield, S. Stahl, J. D. Kaufman, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 9594-9595.
- [233] A. Bax, S. Grzesiek, *Accounts of Chemical Research* **1993**, *26*, 131-138.
- [234] B. Brutscher, N. Morelle, F. Cordier, D. Marion, *J. Magn. Reson.* **1995**, *B 109*, 238-242.
- [235] R. Jerala, G. S. Rule, *J. Magn. Reson.* **1995**, *B 108*, 294-298.
- [236] O. Zhang, J. D. Forman-Kay, *Biochemistry* **1997**, *36*, 3959-3970.
- [237] L. Emsley, G. Bodenhausen, *J. Magn. Reson.* **1992**, *97*, 135-148.
- [238] M. A. McCoy, L. Mueller, *J. Magn. Reson.* **1993**, *A 101*, 122-130.
- [239] R. C. Yu, R. Jahn, A. T. Brunger, *Mol. Cell* **1999**, *4*, 97-107.
- [240] D. S. Wishart, C. G. Bigam, J. Yao, F. Abildgaard, H. J. Dyson, E. Oldfield, J. L. Markley, B. D. Sykes, *J. Biomol. NMR* **1995**, *6*, 135-140.
- [241] G. Bodenhausen, D. J. Ruben, *Chem. Phys. Lett.* **1980**, *69*, 185-189.
- [242] G. W. Vuister, A. Bax, *J. Magn. Reson.* **1992**, *98*, 428-435.
- [243] J. Schleucher, M. Sattler, C. Griesinger, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 1518-1521.
- [244] L. E. Kay, M. Ikura, R. Tschudin, A. Bax, *J. Magn. Reson.* **1990**, *89*, 496-514.

- [245] B. T. Farmer II, R. A. Venters, L. D. Spicer, M. G. Wittekind, L. Müller, *J. Biomol. NMR* **1992**, 2, 195-202.
- [246] J. Stonehouse, G. L. Shaw, J. Keeler, E. D. Laue, *J. Magn. Reson.* **1994**, 107, 178-184.
- [247] M. Wittekind, L. Müller, *J. Magn. Reson.* **1993**, 101, 201-205.
- [248] S. Grzesiek, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 6291-6293.
- [249] R. T. Clubb, V. Thanabal, G. Wagner, *J. Biomol. NMR* **1992**, 2, 203-210.
- [250] R. T. Clubb, G. Wagner, *J. Biomol. NMR* **1992**, 2, 389-394.
- [251] S. Grzesiek, A. Bax, *J. Biomol. NMR* **1993**, 3, 185-204.
- [252] Ikura, L. E. Kay, A. Bax, *J. Biomol. NMR* **1991**, 1, 299-304.
- [253] A. Bax, M. Clore, A. M. Gronenborn, *J. Magn. Reson.* **1990**, 88, 425-431.
- [254] D. Marion, P. C. Driscoll, L. E. Kay, P. T. Wingfield, A. Bax, A. M. Gronenborn, G. M. Clore, *Biochemistry* **1989**, 28, 6150-6156.
- [255] C. Griesinger, G. Otting, K. Wüthrich, R. R. Ernst, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 7870-7872.
- [256] S. J. Archer, M. Ikura, D. A. Torchia, A. Bax, *J. Magn. Reson.* **1991**, 95, 636-641.
- [257] H. Kuboniwa, S. Grzesiek, F. Delaglio, A. Bax, *J. Biomol. NMR* **1994**, 4, 871-878.
- [258] G. W. Vuister, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 7772-7777.
- [259] D. R. Muhandiram, N. A. Farrow, G. Y. Xu, S. H. Smallcombe, L. E. Kay, *J. Magn. Reson.* **1993**, 102, 317-321.
- [260] A. Jerschow, N. Müller, *J. Magn. Reson.* **1998**, 132, 13-18.
- [261] N. A. Farrow, R. Muhandiram, A. U. Singer, S. M. Pascal, C. M. Kay, G. Gish, S. E. Shoelson, T. Pawson, J. D. Forman-Kay, L. E. Kay, *Biochemistry* **1994**, 33, 5984-6003.
- [262] A. C. Wang, P. J. Lodi, J. Qin, G. W. Vuister, A. M. Gronenborn, G. M. Clore, *J. Magn. Reson.* **1994**, 105 B, 196-198.
- [263] B. T. Farmer, Ii, R. A. Venters, *J. Biomol. NMR* **1996**, 7, 59-71.