

## Proteinstrukturaufklärung mit drei- und vierdimensionaler NMR-Spektroskopie

Hartmut Oschkinat\*, Thomas Müller und Thorsten Dieckmann

Die Erforschung der dreidimensionalen Strukturen von Proteinen, DNA und deren Komplexe hat in den vergangenen Jahren wichtige Beiträge zum Verständnis biochemischer Vorgänge geliefert. In zunehmendem Maße stammen diese Beiträge auch aus NMR-spektroskopischen Untersuchungen, oft unter besonderer Betonung von dynamischen Aspekten. Die Einführung von drei- und

vierdimensionalen Techniken hatte einen großen Anteil daran, daß sich die Aufklärung von Proteinstrukturen mit Hilfe der NMR-Spektroskopie zu einer routinemäßig anwendbaren Methode entwickelt hat. Während es früher eine Kunst war, die komplizierten NOESY-Spektren der Proteine zu interpretieren, gelingt dies heute dank der dreidimensionalen Techniken in höchst trans-

parenter Form. In diesem Beitrag werden die wichtigsten mehrdimensionalen NMR-Techniken an einigen ausgewählten Anwendungen diskutiert. Das Hauptgewicht liegt dabei weniger auf einer Diskussion der einzelnen Pulssequenzen, als auf einer Darstellung ihrer Verwendung zur Aufklärung von Proteinstrukturen.

### 1. Einleitung

Die NMR-Spektroskopie hat sich inzwischen als Methode für die Aufklärung der Strukturen von kleinen Proteinen und DNA-Fragmenten etabliert<sup>[1]</sup>. Mit ihr können biologische Makromoleküle in Lösung – unter besonderer Berücksichtigung dynamischer Phänomene – untersucht werden. Sie ist damit eine zur Röntgenkristallographie komplementäre Methode. Die wichtigste Voraussetzung für diese Entwicklung war die Einführung der zweidimensionalen (2D) NMR-Spektroskopie<sup>[2–6]</sup>. Diese ermöglicht die Interpretation der komplexen Protein- oder DNA-NMR-Spektren und die Ermittlung der für die Strukturberechnung benötigten Parameter, Kern-Overhauser-Effekte (NOEs)<sup>[7]</sup> und Kopplungskonstanten<sup>[8, 9]</sup>. Deren Werte repräsentieren Abstände zwischen Kernen sowie Diederwinkel, die als Grundlage für die Rekonstruktion der Raumstruktur des Proteins mit Hilfe von Distanzgeometrie<sup>[10, 11]</sup> oder Moleküldynamikprogrammen<sup>[12, 13]</sup> dienen.

Die NMR-spektroskopische Untersuchung von Proteinen blieb zunächst – von wenigen Ausnahmen abgesehen – auf relativ kleine Moleküle mit einer Größe bis zu 80 Aminosäuren beschränkt<sup>[14–20]</sup>, da sich für die Untersuchung größerer Proteine Signalüberlagerungen in den 2D-Spektren als limitierend erwiesen. Erst die drei- (3D)<sup>[21–26]</sup> und vierdimensionalen (4D) NMR-Techniken<sup>[27]</sup> ermöglichten die Überwindung dieser Barriere. Bei einer vollständigen Markierung der Proteine mit <sup>13</sup>C

und <sup>15</sup>N lassen sich heute Systeme mit einem Molekulargewicht bis zu 35 kD untersuchen. Dieser Grenzwert wird im wesentlichen durch die mit zunehmender Masse kürzer werdende transversale Relaxationszeit bestimmt. Eine weitere Einschränkung ist unter Umständen durch die Komplexität der Spektren gegeben: Bei mehr als 250 Aminosäuren liegen auch in 3D-Spektren starke Signalüberlagerungen vor. Beispiele für größere Proteine, deren Strukturen durch mehrdimensionale NMR-Spektroskopie aufgeklärt wurden, sind Interleukin 1 $\beta$ <sup>[28]</sup>, der Cyclophilin/Cyclosporin-Komplex<sup>[29]</sup> und der Calmodulin-Targetpeptid-Komplex<sup>[30]</sup>.

Die in der 3D- und 4D-NMR-Spektroskopie angewendeten Prinzipien unterscheiden sich eigentlich nicht von denen, die aus der 2D-Spektroskopie bekannt sind<sup>[6]</sup>. Es sollen daher hier nicht die Pulssequenzen selbst diskutiert werden, sondern ihre Anwendung im Kontext der Proteinstrukturaufklärung. Dazu wird nach einer kurzen Einführung in die 3D- und 4D-NMR-Spektroskopie ein „Basissatz“ von Experimenten am Beispiel von zwei Proteinen, Interleukin-4 (IL-4)<sup>[31, 32]</sup> und Hühnerweiß-Cystatin (Cystatin)<sup>[33, 34]</sup>, vorgestellt.

### 2. Mehrdimensionale NMR-Spektroskopie

Die grundlegenden Elemente der 3D- und 4D-NMR-Spektroskopie sind bereits in der 2D-NMR-Spektroskopie enthalten. Es wird daher auch allgemein von mehrdimensionaler NMR-Spektroskopie gesprochen. Der entscheidende Schritt in einer 2D-Pulssequenz der Form

Präparation – Evolution ( $t_1$ ) – Mischung – Detektion ( $t_2$ )

[\*] Dr. H. Oschkinat, Dipl.-Chem. T. Dieckmann  
Europäisches Laboratorium für Molekularbiologie  
Meyerhofstraße 1, D-69012 Heidelberg  
Telefax: Int. + 6221/387-306

Dipl.-Chem. T. Müller  
Institut für Physiologische Chemie der Universität Würzburg

ist der „Kohärenztransfer“<sup>[45]</sup>: Ein Kern A präzediert während der Evolutionszeit mit seiner charakteristischen Frequenz; durch den Kohärenztransfer in der Mischperiode wird ein mit diesem Kern A wechselwirkender zweiter Kern B angeregt und dessen Frequenz anschließend detektiert.

Führt man einen Satz von Experimenten durch, in dem die Evolutionszeit in geeigneten Schritten von Experiment zu Experiment verlängert wird, erhält man nach Detektion und Fourier-Transformation ein mit der Frequenz des Kernes A moduliertes Signal von Kern B. Sind die Signale als zweidimensionale Matrix angeordnet, liefert eine zweite, unabhängige Fourier-Transformation der orthogonalen Datenvektoren ein Signal mit zwei verschiedenen Frequenzvariablen, ein zweidimensionales Kreuzsignal. Es liegt nun auf der Hand, daß man am Ende einer solchen Pulssequenz eine weitere Mischperiode einführen kann, bevor detektiert wird. Damit erhält man die allgemeine Form eines mehrdimensionalen NMR-Experiments:

Präparation – (Evolution – Mischung)<sub>n</sub> – Detektion.

Die einzelnen mehrdimensionalen NMR-Experimente unterscheiden sich in der Art der Anregung und Mischung. Sie sind nach dem „Baukastenprinzip“ aus den aus der 2D-NMR-Spektroskopie bekannten Anregungs- und Mischsequenzen<sup>[6]</sup> aufgebaut (Abb. 1). COSY-<sup>[3, 35–38]</sup> und TOCSY-Sequenzen<sup>[39–41]</sup> (COSY = Correlated Spectroscopy, TOCSY = Total Correlated Spectroscopy) dienen der Korrelation über chemische Bindungen, während die NOESY-<sup>[42]</sup> und die ROESY-Technik<sup>[43]</sup> (NOESY = Nuclear Overhauser and Exchange Spectroscopy, ROESY = Rotating Frame Overhauser Effect Spectroscopy) die Identifizierung von räumlich benachbarten Kernen über die Kreuzrelaxation ermöglichen. Die HMQC-<sup>[44, 45]</sup> und HSQC-Sequenzen<sup>[46, 47]</sup> (HMQC = Heteronuclear Multiple Quantum Coherence, HSQC = Heteronuclear Single Quantum Coherence) sind Analoga der COSY-Sequenz, dienen jedoch der Korrelation von Kernen unterschiedlicher Art (z.B. von Protonen und Kohlenstoffkernen). Im Prinzip kann man sich die mehrdimensionalen Experimente einfach als Kombinationen von 2D-Techniken vorstellen. Für die Bezeichnung der 3D-Techniken werden daher entweder die Namen der zugrunde liegenden 2D-Techniken kombiniert (z.B. TOCSY-NOESY, NOESY-HMQC) oder, wie im Falle der meisten Tripelresonanzexperimente, die beteiligten Kerne aufgelistet. Ein 3D-HCACO-Experiment stellt so-

Präparation	angeregter Kern
90°	<sup>1</sup> H
90° Δ 90°	DQ mit <sup>1</sup> H und <sup>13</sup> C oder <sup>15</sup> N
90° 180° 90° 180° Δ Δ Δ Δ 90° 180° 90°	<sup>13</sup> C oder <sup>15</sup> N

Mischsequenz	Name der 2D-Technik
90° Δ 90°	DQF-COSY
MLEV	TOCSY
90° τ <sub>m</sub> 90°	NOESY
CW	ROESY
180° 90° 180° Δ <sub>1</sub> /2 Δ <sub>1</sub> /2 Δ <sub>2</sub> /2 Δ <sub>2</sub> /2 180° 90° 180° Δ <sub>1</sub> /2 Δ <sub>1</sub> /2 Δ <sub>2</sub> /2 Δ <sub>2</sub> /2	HSQC
: Δ : : : 90°	HMQC

Abb. 1. Einige gebräuchliche Pulssequenzen für die Anregung und Mischung bei mehrdimensionalen NMR-Experimenten. DQ = Double Quantum, DQF = Double Quantum Filtered. Die übrigen Abkürzungen werden im Text erläutert.



Hartmut Oschkinat, geboren am 28. Februar 1957 in Frankfurt am Main, studierte – unterbrochen von Zivildienst und einem Studienaufenthalt in Oxford bei Ray Freeman – ab 1975 Chemie in Frankfurt und promovierte dort 1985 bei Horst Kessler. Nach einem Postdoc-Aufenthalt bei Geoffrey Bodenhausen in Lausanne arbeitete er von 1987 bis 1991 als NMR-Spektroskopiker am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried. Seit 1992 ist er Gruppenleiter am EMBL in Heidelberg. Seine Forschungsinteressen konzentrieren sich auf die Aufklärung von Proteinstrukturen in Lösung und auf das Studium der Strukturen und Funktionen membrangebundener Proteine.

mit Korrelationen zwischen den  $\alpha$ -Protonen, den  $\alpha$ -Kohlenstoffatomen und den Carbonylkohlenstoffatomen der Aminosäuren eines Proteins her. In Klammern angegebene Kerne (z.B. 3D-HCA(CO)N) werden nicht detektiert, sind aber an einem Kohärenztransfer beteiligt. Eine Auswahl von Pulssequenzen, die zur Proteinstrukturanalyse verwendet werden, findet sich in Tabelle 1. Als Beispiel ist in Abbildung 2 ein Ausschnitt des 3D-TOCSY-NOESY-Spektrums von Interleukin-4 gezeigt.

Drei- und vierdimensionale NMR-Experimente bieten eine Reihe von qualitativen Vorteilen gegenüber zweidimensionalen Techniken. So sind Korrelationen zwischen Heterokernen für Makromoleküle nur bei Verwendung von mindestens drei Di-

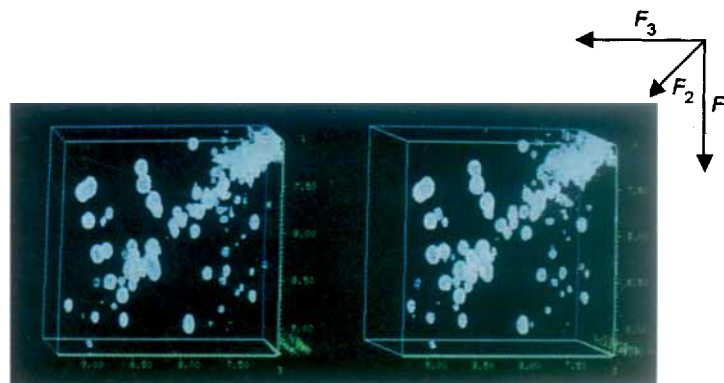


Abb. 2. Ausschnitt aus einem 3D-TOCSY-NOESY-Spektrum von IL-4 (Stereo-bild). In  $F_1$  und  $F_3$  ist der Bereich mit den chemischen Verschiebungen der Amidprotonen ausgewählt worden, in  $F_2$  der Bereich mit den Signalen der  $\alpha$ -Protonen.

Tabelle 1. Eine Auswahl der am häufigsten zur Proteinstrukturaufklärung verwendeten 3D- und 4D-NMR-Techniken.

Experiment	gewonnene Information/Verknüpfung	Lit.
<b>a) unmarkierte Proteine – homonucleare Experimente</b>		
3D-TOCSY-TOCSY	$^1\text{H}$ -Spinsysteme/Aminosäuren	[66]
3D-TOCSY-NOESY	sequenzspezifische Zuordnung der Spinsysteme, Identifizierung von NOEs	[122]
3D-NOESY-NOESY	Identifizierung von NOEs	[82–86]
<b>b) <math>^{15}\text{N}</math>-markierte Proteine</b>		
3D-TOCSY- $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HMQC/HSQC	$^1\text{H}$ -Spinsysteme, $^{15}\text{N}$ -Verschiebungen	[96–100]
3D-NOESY- $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HMQC/HSQC	sequenzspezifische Zuordnung der Spinsysteme, Identifizierung von NOEs mit Amidprotonen	[96–100]
3D-HNHB	$\text{H}_\alpha(i)\text{-N}(i)\text{-H}_\beta(i)$ , stereospezifische Zuordnung der Methylenprotonen	[111]
<b>c) <math>^{13}\text{C}</math>-<math>^{15}\text{N}</math>-markierte Proteine</b>		
3D-TOCSY- $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HMQC/HSQC	$^1\text{H}$ -Spinsysteme, $^{13}\text{C}$ -Verschiebungen	[96–100]
3D-NOESY- $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HMQC/HSQC	sequenzspezifische Zuordnung der Spinsysteme, insbesondere Identifizierung von NOEs zwischen Seitenketten	[96–100]
3D-HCCH-COSY	$^1\text{H}$ -Spinsysteme, $^{13}\text{C}$ -Verschiebungen	[117, 118]
3D-HCCH-TOCSY	$^1\text{H}$ -Spinsysteme, $^{13}\text{C}$ -Verschiebungen	[119]
3D-HC(C)NH-TOCSY	Verbindung von $\text{H}_\text{N}$ und Seitenketten- $^1\text{H}$ und $^{13}\text{C}$	[114]
3D-H(CCO)NH	Korrelation aller Seitenketten- $^1\text{H}$ und $^{13}\text{C}$ von Aminosäure $i$ mit $\text{H}_\text{N}(i+1)$	[112, 113]
H(CA)NH	$\text{H}_\alpha(i)\text{-N}(i)\text{-H}_\text{N}(i)$	[27]
3D-HCACO	$\text{H}_\alpha(i)\text{-C}_\alpha(i)\text{-CO}(i)$	[101]
3D-HNCA	$\text{H}_\text{N}(i)\text{-N}(i)\text{-C}_\alpha(i)\text{-C}_\beta(i-1)$	[101, 102]
3D-HNCACB	$\text{H}_\text{N}(i)\text{-N}(i)\text{-C}_\alpha(i)\text{-C}_\beta(i-1)/\text{C}_\beta(i)/\text{C}_\beta(i-1)$	[103]
3D-HN(CA)NNH	$\text{H}_\text{N}(i)\text{-N}(i+1)\text{-H}_\text{N}(i+1)$	[105]
3D-HA(CA)NNH	$\text{H}_\alpha(i)/\text{H}_\alpha(i-1)\text{-N}(i)\text{-H}_\text{N}(i)$	[105]
3D-HN(NCA)NNH	$\text{H}_\text{N}(i)\text{-N}(i+1)\text{-H}_\text{N}(i+1)$	[104]
3D-HCA(CO)N	$\text{H}_\alpha(i)\text{-C}_\alpha(i)\text{-N}(i+1)$	[101, 106]
3D-HNCO	$\text{H}_\text{N}(i)\text{-N}(i)\text{-CO}(i-1)$	[101]
3D-HN(CA)HA	$\text{H}_\text{N}(i)\text{-N}(i)\text{-H}_\alpha(i)/\text{H}_\alpha(i-1)$	[107]
3D-HN(CO)CA	$\text{H}_\text{N}(i)\text{-N}(i)\text{-C}_\alpha(i-1)$	[108]
3D-HN(COCA)HA	$\text{H}_\text{N}(i)\text{-N}(i)\text{-H}_\alpha(i-1)$	[109]
3D-H(N)CACO	$\text{H}_\text{N}\text{-C}_\alpha(i)/\text{C}_\alpha(i-1)\text{-CO}(i)/\text{CO}(i-1)$	[110]
3D-H(C)(CO)NH-TOCSY	Korrelation der Seitenketten- $^1\text{H}$ und $^{13}\text{C}$ mit $\text{H}_\text{N}(i, i-1)$ und $\text{N}(i, i-1)$	[144]
4D-HCANNH	$\text{H}_\alpha(i)\text{-C}_\alpha(i)\text{-N}(i)\text{-H}_\text{N}(i)$	[115, 116]
4D-HCA(CO)NNH	$\text{H}_\alpha(i)\text{-C}_\alpha(i)\text{-N}(i+1)\text{-H}_\text{N}(i+1)$	[115, 116]
4D-HNCAHA	$\text{H}_\text{N}(i)\text{-N}(i)\text{-C}_\alpha(i)\text{-H}_\alpha(i)$	[115, 116]
4D-HCCH-TOCSY	$^1\text{H}$ -Spinsysteme, $^{13}\text{C}$ -Verschiebungen	[120]
4D- $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HMQC-NOESY- $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HMQC	Identifizierung von NOEs zwischen Seitenkettenprotonen	[121]
4D- $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HMQC-NOESY- $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HMQC	Identifizierung von NOEs mit Amidprotonen	[27]
$^2\text{J}_{\text{COH}_\alpha}$ -E.COSY	$^2\text{J}(\text{CO}, \text{H}_\alpha)$	[89]
3D-HNCA	$^3\text{J}(\text{HN}, \text{H}_\alpha)$ , Winkel $\phi$	[90]
3D-HMQC- $\text{J}_{\text{NH}}$ -TOCSY	$^3\text{J}(\text{HN}, \text{H}_\alpha)$ , Winkel $\phi$	[88]
3D-H,C-COSY-ct-C,C-COSY- $\beta$ -INEPT	vicinale $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -Kopplungen	[91]
Soft-HCCH-COSY	$^3\text{J}(\text{H}_\beta, \text{CO})$	[92]
Soft-HCCH-E.COSY	$^3\text{J}(\text{H}_\alpha, \text{H}_\beta)$	[92]

mensionen möglich, da wegen der höheren Empfindlichkeit die Magnetisierung von Protonen detektiert werden muß<sup>[48]</sup>. Auf diese Techniken kann nicht verzichtet werden, weil sie, auf Proteine angewendet, eine Zuordnung der Signale unabhängig von der Sekundärstruktur ermöglichen. Werden die chemischen Verschiebungen der Heterokerne zur Auflösung von Signalüberlagerungen in NOESY-Spektren genutzt, benötigt man ebenfalls drei Dimensionen. Diese Auflösungssteigerung ist einer der wichtigsten Vorteile der mehrdimensionalen NMR-Spektroskopie. Dies ist in Abbildung 3 schematisch dargestellt: Zwei Paare wechselwirkender Protonen haben die gleichen chemischen Verschiebungen (A), es wird also nur ein Signal im NOESY-Spektrum beobachtet (B). Verwendet man zur Dispersion in eine dritte Dimension die in der Regel unterschiedlichen chemischen Verschiebungen der  $^{13}\text{C}$ -Kerne, werden die 2D-Kreuzsignale auf verschiedene Ebenen verteilt und damit die Zuordnung der blauen Signale möglich (C). Obwohl die Auflösung somit gesteigert wurde, kann man die Protonen mit „grüner“ Frequenz immer noch nicht eindeutig zuordnen. Es ist leicht zu sehen, daß durch die Verwendung einer weiteren Frequenzdimension, also der Detektion der an diese Protonen gebundenen Kohlenstoffatome, Abhilfe geschaffen würde.

## 2.1. Grundlagen

Der modulare Aufbau der mehrdimensionalen Pulssequenzen aus bekannten Einheiten (Abb. 1) bedingt, daß die Vorgänge während einer Pulssequenz völlig analog zu denen während der 2D-Sequenzen sind. Es soll daher hier auf die Beschreibung einzelner Sequenzen und der genutzten Kohärenztransferwege mit dem Produktoperatorformalismus<sup>[49]</sup> verzichtet werden; dem Leser seien dazu die Übersichten von Ernst<sup>[5]</sup> und Kessler et al.<sup>[6]</sup> empfohlen. Im folgenden werden lediglich einige spezielle Probleme aufgegriffen, die beim Übergang von der zweiten zur dritten Dimension entstehen. Sie verschärfen sich bei der Hinzunahme weiterer Frequenzdimensionen.

### 2.1.1. Empfindlichkeit

Der gemessene 3D-Datensatz ist eine Funktion der unabhängigen Zeitvariablen. Vernachlässigt man die Terme für die

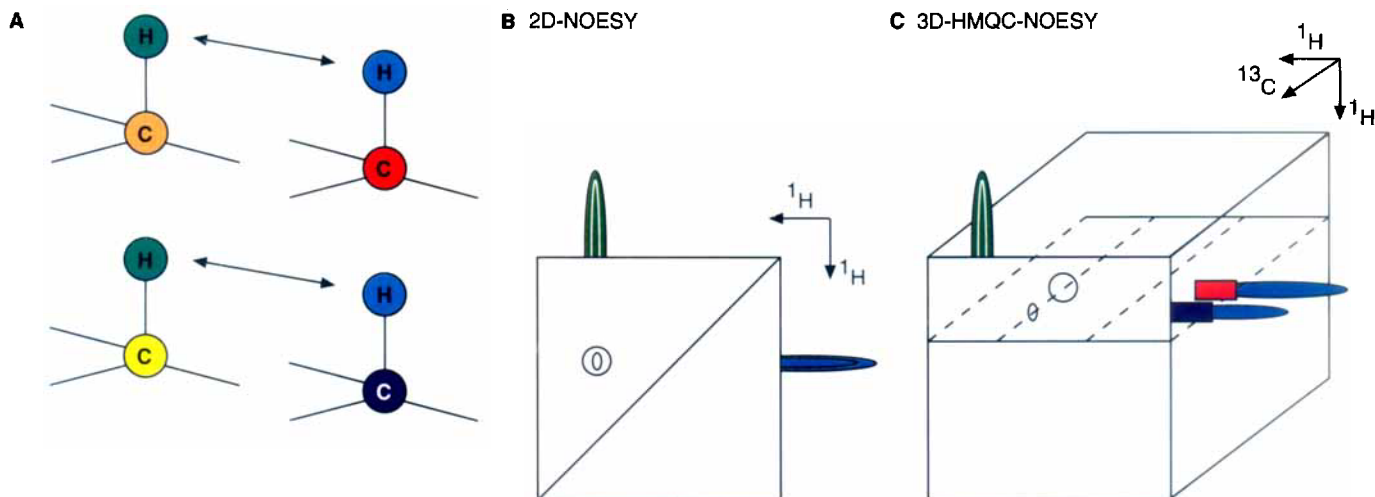


Abb. 3. Schematische Darstellung des Auflösungs Vorteils der 3D-NMR-Spektroskopie: Zwei Paare von Protonen haben die gleiche Resonanzfrequenz (gleiche Farbe) (A), dies führt zu einer Überlagerung der Kreuzsignale im 2D-NOESY-Spektrum (B). Die Hinzunahme der Frequenzen der Kohlenstoffatome in einer dritten Dimension kann das Problem lösen, da ihre Resonanzfrequenzen unterschiedlich sind. Die NOESY-Kreuzsignale werden damit auf verschiedene Ebenen verteilt (C).

Relaxation während der Evolution, wird ein einzelnes 3D-Signal durch die Beziehung (1)<sup>[51]</sup> beschrieben.  $Z_{(pq,rs,tu)}$  ist dabei die Kohärenztransferamplitude [Gl. (2)]. Der Superoperator

$$S_{(pq,rs,tu)}(t_1, t_2, t_3) \quad (1)$$

$$= Z_{(pq,rs,tu)} \exp(-\omega_{pq} t_3) \exp(-\omega_{rs} t_2) \exp(-\omega_{tu} t_1)$$

$$Z_{(pq,rs,tu)} = D_{pq} R_{(pq,rs)}^{(2)} R_{(rs,tu)}^{(1)} \sigma(0)_{(tu)} \quad (2)$$

$R_{(pq,rs)}^{(n)}$  beschreibt den  $n$ -ten Kohärenztransfer zwischen den Kohärenzen  $pq$  und  $rs$ , der Operator  $D_{pq}$  die Effektivität der Detektion des Übergangs  $pq$  und  $\sigma(0)_{(tu)}$  den Grundzustand des Dichteoperators für den Übergang  $tu$ . Gleichung (2) liefert damit die integrale Intensität des Signals.

Die Erhöhung der Zahl der Dimensionen von zwei auf drei kann, muß aber nicht mit einer wesentlichen Verschlechterung des Signal/Rausch(S/N)-Verhältnisses einhergehen. Die Hauptfaktoren, die dies bewirken können, sind die Verteilung der Intensität auf mehrere Multiplettlinien in der dritten Dimension oder ein ineffizienter Kohärenztransfer, so daß die 3D-Kreuzsignale abgeschwächt werden. Man kann zeigen, daß die Änderung des Signal/Rausch-Verhältnisses eines 2D-Kreuzsignals der Protonen  $j$  und  $k$  beim Übergang zu einem 3D-Kreuzsignal  $ijk$  von der Effizienz des zusätzlichen Transfers  $T_{ij}$  und der Zahl der Multiplettlinien des Kerns  $i$ ,  $N_i$ , abhängt [Gl. (3)]. Im günstigsten Fall, d. h. wenn das Signal von Kern  $i$  nur aus einer Linie besteht und der Transfer nahezu quantitativ verläuft, gibt es keine substantielle Intensitätsverschlechterung gegenüber dem 2D-Spektrum. Dies trifft zu bei Techniken, die als zusätzliche Frequenzparameter die chemischen Verschiebungen von Heterokernen nutzen. So sollten – ohne Relaxation – die Signalintensitäten in einem  $^{15}\text{N}$ -aufgelösten NOESY-Spektrum weitgehend denen des 2D-NOESY-Spektrums entsprechen. Kombiniert man jedoch homonucleare 2D-Techniken, so erhält man bei 10proz. Effizienz jedes Kohärenztransfers ein Verhältnis zwischen 1D-, 2D- und 3D-Signalintensitäten von 100:10:1.

$$\frac{(S/N)_{3D}^{ijk}}{(S/N)_{2D}^{jk}} = T_{ij}/N_i \quad (3)$$

### 2.1.2. Auflösung und Meßzeit

Die Vorteile der mehrdimensionalen NMR-Spektroskopie lassen sich nur nutzen, wenn in allen Dimensionen genügend Datenpunkte akkumuliert werden können. Eine zu geringe Auflösung führt zu schlecht interpretierbaren Spektren mit breiten, überlagerten Signalen und kompensiert den 3D- oder 4D-Vorteil. Die Meßzeit steigt jedoch exponentiell mit der Zahl der Experimente in den indirekt detektierten Dimensionen an, entsprechend muß man einen Kompromiß zwischen guter Auflösung und Meßdauer finden. Beispielsweise werden für die Aufnahme eines 3D-NOESY- $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HMQC-Spektrums mit  $196 \times 96 \times 1024$  Datenpunkten in  $F_1(^1\text{H})/F_2(^{15}\text{N})/F_3(^1\text{H}_\text{N})$  bei der Akkumulation von 16 Transienten pro Zeitinkrement etwa 70–80 Stunden benötigt. Man wendet daher eine Reihe von Verfahren zur Verbesserung der Auflösung oder zur Verkürzung der Meßzeit an; hierzu zählen die Rückfaltung von Signalen, die selektive Anregung kleinerer spektraler Bereiche, der Einsatz von gepulsten Feld-Gradienten und die Anwendung mathematischer Algorithmen zur optimalen Nutzung der in den Daten vorhandenen Auflösung.

**Rückfaltung von Signalen:** Signale, die außerhalb des durch das Zeitinkrement der Datenaufnahme definierten spektralen Bereichs eines NMR-Spektrums liegen, werden normalerweise bei der Fourier-Transformation des digitalisierten Signals „zurückgefaltet“<sup>[4, 52]</sup>. Durch sorgfältig geplantes Falten des Spektrums in einer Frequenzrichtung kann man den zu digitalisierenden Bereich ohne Informationsverlust verkleinern. Insbesondere mehrdimensionale  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren können auf diese Weise erheblich verbessert werden<sup>[4, 7]</sup>.

**Selektive Anregung:** Durch eine selektive Anregung von Kernen, deren Signale in bestimmten Bereichen des Spektrums liegen, kann ebenfalls eine Verkleinerung der spektralen Breite und damit eine genügende Auflösung in einer vernünftigen Zeit erreicht werden. Für die selektive Anregung werden in der Regel geformte Pulse mit geringer Leistung verwendet<sup>[51, 53, 54]</sup> oder, im Falle heteronuclearer Spektren, eine Multiplizitätsselektion durchgeführt<sup>[55–67]</sup>.

**Gradienten:** Ein Faktor, der die Dauer von mehrdimensionalen Experimenten bestimmt, ist der Phasencyclus, der zur Selektion der gewünschten Kohärenzen benötigt wird<sup>[50]</sup>. In vielen Fällen sind mindestens 4, 8 oder 16 Transienten erforderlich, um artefaktarme Spektren zu erhalten, woraus sich die langen Meßzeiten ergeben. Durch die Verwendung von gepulsten Feld-Gradienten können die gewünschten Kohärenztransferschritte unter Umständen in einem einzigen Durchgang der Pulssequenz selektiert werden<sup>[58–61]</sup>. Die Addition mehrerer Freier Induktionsabfälle (FIDs), wie sie bei der Selektion mit Phasencyclen notwendig ist, kann daher entfallen; entsprechend können mehr Datenpunkte aufgenommen werden<sup>[62–64]</sup>.

**Lineare Vorhersage:** In Fällen, in denen nur wenige Datenpunkte in einer der indirekt detektierten Dimensionen aufgenommen werden können, ist es möglich, die FIDs vor der Fourier-Transformation durch die Berechnung von zusätzlichen Datenpunkten zu verlängern und so die Auflösung nachträglich zu verbessern. Diese Datenpunkte werden in der Regel mit dem Burg-Algorithmus der linearen Vorhersage (linear prediction)<sup>[65–67]</sup> aus den gemessenen Daten berechnet.

### 2.2. Das Erscheinungsbild dreidimensionaler Spektren

Dreidimensionale NMR-Spektren enthalten, sofern möglich, die konstituierenden 2D-Spektren als Diagonalfächen. Treten alle drei möglichen Diagonalfächen auf – dies ist bei homonuclearen Spektren der Fall –, bildet ihre Schnittlinie die Hauptdiagonale. Die Signale werden nach den eingetretenen Kohärenztransfers und damit nach der Zahl der enthaltenen Frequenzen klassifiziert (Schema 1).

Diagonalsignale	A → A → A
Kreuzdiagonalsignale	A → A → B
	A → B → B
Rücktransfersignale	A → B → A
Kreuzsignale	A → B → C

Schema 1. Klassifizierung der Signale in mehrdimensionalen NMR-Spektren.

Die Diagonalsignale mit drei gleichen Frequenzen entsprechen den Signalen des 1D-Spektrums, die Signale mit zwei gleichen Frequenzen (Kreuzdiagonal- und Rücktransfersignale) denen der 2D-Spektren. Nur die 3D-Kreuzsignale enthalten Informationen, die über den Gehalt der 2D-Spektren hinausgehen. Welche Signaltypen im einzelnen auftreten, hängt von der Art des betrachteten 3D-Spektrums ab: Während in einem homonuclearen 3D-TOCSY-NOESY-Experiment in der Regel alle Signaltypen zu beobachten sind, können in 3D-TOCSY- oder -NOESY-HMQC-Spektren lediglich die Signaltypen mit zwei oder mehr verschiedenen Frequenzen auftreten. In Tripelresonanzexperimenten wie 3D-HCACO treten ausschließlich 3D-Kreuzsignale auf.

### 2.3. Auswertung von mehrdimensionalen NMR-Spektren

Die Auswertung eines mehrdimensionalen NMR-Spektrums besteht in der Suche nach Beziehungen zwischen den Kreuzsi-

gnalen (Korrelationen), die durch das Auftreten einer oder mehrerer gleicher Frequenzen definiert sind. Ein Vorteil der höherdimensionalen NMR-Spektroskopie (3D, 4D, ...) ist die Möglichkeit, Kreuzsignale mit mehreren gleichen Koordinaten korrelieren zu können. Dies führt leichter zu einem eindeutigen Ergebnis als die Korrelation von 2D-Kreuzsignalen mit Hilfe einer gemeinsamen Frequenz. Dies wird in Abbildung 4 anhand von sechs chemischen Verschiebungen, die beispielsweise zu einem Spinsystem gehören, dargestellt: Die Frequenzen des Spinsystems in A können unter Verwendung von 3D-Kreuzsignalen nur auf eine Weise verknüpft werden (B), während 2D-Kreuzsignale auch eine falsche Zuordnung zulassen (C).

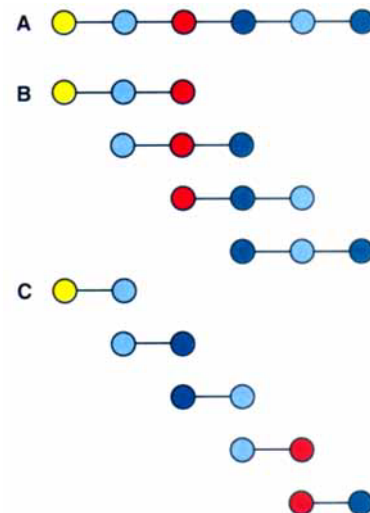


Abb. 4. Zuordnung eines Spinsystems mit sechs chemischen Verschiebungen. Das in A schematisch wiedergegebene System aus sechs Kernen kann bei Verwendung der in B gezeigten 3D-Kreuzsignale nur auf die in A dargestellte Weise aufgebaut werden. Dagegen kann auf der Basis von 2D-Kreuzsignalen auch eine falsche Verknüpfung entstehen, wie in C gezeigt ist.

Die manuelle Auswertung von 3D- und 4D-Spektren erfolgt in der Regel anhand eines Satzes von 2D-Ebenen, wobei meist solche mit gleicher oder symmetrischer Frequenz in der dritten Dimension aus verschiedenen 3D-Experimenten kombiniert werden. Das Auffinden einer zweiten gleichen Koordinate liefert die gewünschte Korrelation.

Diese Vorgehensweise ist bei gleichzeitiger Verwendung mehrerer 3D- oder gar 4D-Datensätze arbeitsintensiv, und die Menge an Informationen kaum noch zu handhaben. Aus diesem Grund werden mehrdimensionale Spektren bereits vielfach unter Rechereinsatz direkt am Bildschirm analysiert<sup>[68–71]</sup>.

Ein Fernziel der NMR-spektroskopischen Strukturaufklärung ist die vollständige Automatisierung des Zuordnungsprozesses, zu der bereits einige Versuche gemacht wurden<sup>[72–74]</sup>. Dabei hat es sich als schwierig erwiesen, die Arbeitsweise eines erfahrenen Spektroskopikers auf den Computer zu übertragen. Probleme bereiten vor allem die Unterscheidung von realen Signalen und Artefakten sowie eine mögliche Unvollständigkeit der Informationen. Trotz dieser Schwierigkeiten ist offensichtlich, daß mit 3D- und 4D-Techniken Datensätze erhalten werden, deren spezifischere Informationen eine Automatisierung der Auswertung wesentlich vereinfachen.



## 2.4. Quantitative Auswertung von mehrdimensionalen NMR-Spektren

### 2.4.1. Bestimmung von Abständen

Die für eine Berechnung von Proteinstrukturen notwendigen Abstände zwischen Wasserstoffatomen erhält man aus einer quantitativen Auswertung von NOE- oder ROE-abhängigen Kreuzsignalen. Es gibt dafür mehrere Strategien, die von einer groben Klassifizierung der NOEs<sup>[1]</sup> bis zu einer Behandlung des Problems mit einem Relaxationsmatrix-Formalismus reichen<sup>[75–78]</sup>.

In den meisten Fällen führte man bislang eine Klassifizierung der beobachteten NOEs durch, oder man berechnete die Abstände nach Integration der Kreuzsignale in NOESY-Spektren mit kurzer Mischzeit unter Verwendung bekannter Referenzabstände<sup>[79, 80]</sup>. Bei der ersten Methode werden die NOESY-Kreuzsignale nach ihrer Intensität oder ihrem Auftreten in NOESY-Spektren mit unterschiedlichen Mischzeiten in Klassen eingeteilt und diesen dann ein oberer Grenzwert für den Abstand zugeordnet (z.B. Intensität groß: Abstand < 2.8 Å, mittel: Abstand < 3.5 Å, klein: Abstand < 5.0 Å). Bei der zweiten Methode werden die Abstände  $r_{ij}$  gemäß Gleichung (4) aus den Intensitäten  $I_{ij}$  der Signale und einem Referenzabstand  $r_{ref}$  berechnet. Die Proportionalität gilt allerdings nur, wenn die NOESY-Spektren mit einer genügend kurzen Mischzeit aufgenommen werden.

$$r_{ij} = r_{ref} \left( \frac{I_{ref}}{I_{ij}} \right)^{\frac{1}{6}} \quad (4)$$

Dieser direkte Zusammenhang zwischen der Intensität eines Kreuzsignals und dem zugrundeliegenden Protonenabstand ist bei drei- und vierdimensionalen NMR-Spektren nicht mehr gegeben, da hier mehr als ein Transferprozess [siehe Gl. (2)] zur Intensität beiträgt. Die Amplitude eines dreidimensionalen Kreuzsignals wird vom Produkt der Effizienz der beiden Einzelschritte bestimmt. Man kann dies mit einem Vektordiagramm beschreiben, in dem die Effizienz der Einzelschritte durch die Vektoren und die Amplitude des 3D-Kreuzsignals durch die aufgespannte Fläche dargestellt wird<sup>[81]</sup>.

Eine exakte quantitative Auswertung von NOESY-verwandten 3D-Spektren setzt damit voraus, daß alle Beiträge zu Kreuzsignalen außer dem zu bestimmenden Abstand bekannt oder zumindest als konstant anzusehen sind. Letzteres kann näherungsweise angenommen werden, wenn einer der Beiträge durch eine heteronucleare Kopplung über eine Bindung zustande kommt wie im Fall von NOESY-HMQC- oder NOESY-HSQC-Spektren. Diese Kopplungen variieren in relativ engen Grenzen (90–96 Hz für NH, 125–160 Hz für CH). Ein Problem kann allerdings durch unterschiedliche transversale Relaxationszeiten von Protonen entstehen: Die in den Pulssequenzen verwendeten Zeiten für die freie Präzession zur Entwicklung der heteronuclearen Kopplungen ist bei biologischen Makromolekülen nicht mehr vernachlässigbar, da unter Umständen chemisch verwandte Gruppen unterschiedlich schnell relaxieren, so daß die Signalamplituden durch Relaxationseffekte verfälscht werden können.

Die Situation wird zusätzlich kompliziert, wenn die Effizienz der beiden Kohärenztransferschritte konformationsabhängig

ist, z.B. bei homonuclearen 3D-Experimenten<sup>[81, 82]</sup>. In bestimmten Fällen lassen sich Regeln für die Signalamplituden aus der Sekundärstruktur des Proteins ableiten. Ein Beispiel dafür sind die 3D-Kreuzsignale in TOCSY-NOESY-Spektren, die in erster Näherung vom Produkt aus dem Quadrat der beteiligten Kopplung und dem Inversen der sechsten Potenz des beteiligten Abstands abhängig sind (Abb. 5). Es gibt daher eine Reihe spe-

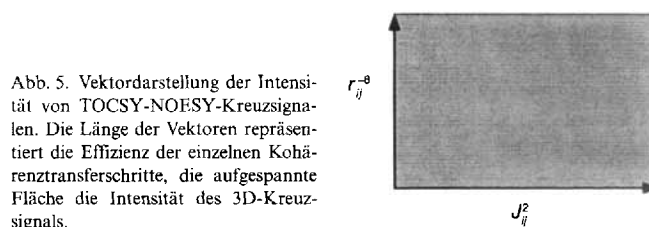


Abb. 5. Vektordarstellung der Intensität von TOCSY-NOESY-Kreuzsignalen. Die Länge der Vektoren repräsentiert die Effizienz der einzelnen Kohärenztransferschritte, die aufgespannte Fläche die Intensität des 3D-Kreuzsignals.

zifischer Kreuzsignale in diesen Spektren, deren Amplituden durch die Art der Sekundärstruktur beeinflusst werden (Abb. 6). Man erkennt, daß für  $\alpha$ -Helices nur schwache Kreuzsignale mit den  $H_x$ - und  $H_N$ -Verschiebungen als Koordinaten zu erwarten sind, während  $\beta$ -Strukturen zu sehr intensiven Signalen führen.

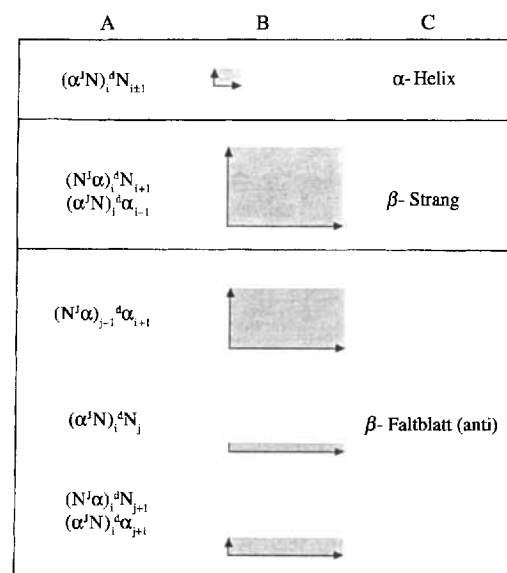


Abb. 6. Intensitäten der Kreuzsignale in TOCSY-NOESY-Spektren in Abhängigkeit von der Sekundärstruktur des Proteins (C). A enthält den zugrundeliegenden Transfer; dabei bedeutet beispielsweise  $(N^j \alpha)_i^4 N_{i+1}$  einen TOCSY-Transfer von  $H_N$  zu  $H_x$  innerhalb der Aminosäure  $i$  mit nachfolgendem NOESY-Transfer (abstandsabhängig) zum  $H_N$  der folgenden Aminosäure. B zeigt eine Vektordarstellung der Intensitäten gemäß Abbildung 4 für die verschiedenen Kreuzsignaltypen.

Die quantitative Auswertung von NOESY-NOESY-Spektren hat einige interessante Aspekte. So wird in erster Näherung die Amplitude der Kreuzsignale  $I_{ijk}$  durch zwei Kreuzrelaxationsraten  $\sigma$  beeinflusst [Gl. (5)].  $\tau_m^{(1)}$  und  $\tau_m^{(2)}$  sind die verwendeten Mischzeiten. Für  $\tau_m^{(1)} = \tau_m^{(2)}$  entspricht dieser Term denen

$$I_{ijk} \approx \sigma_{ij} \sigma_{jk} \tau_m^{(1)} \tau_m^{(2)} \quad (5)$$

zweiten Ordnung, die man bei einer Reihenentwicklung der Ex-

ponentialfunktion erhält, die den Magnetisierungstransfer im NOESY-Experiment beschreibt<sup>[83]</sup> [Gl. (6)]. Man kann diesen Umstand – im Prinzip – zur Berechnung von Beiträgen höherer Ordnung zu 2D- und 3D-Kreuzsignalen nutzen<sup>[51, 84–86]</sup>.

$$[e^{-R\tau_m}]_{ij} \approx 1 + \sigma_{ij}\tau_m + \sum_k \sigma_{ij}\sigma_{jk}\tau_m^{(2)} \quad (6)$$

### 2.4.2. Bestimmung von Diederwinkeln

Die Bestimmung von Diederwinkeln erfordert die Messung von Kopplungskonstanten. Zu diesem Zweck wurden einige 3D-Techniken entwickelt, die Multipletts mit e.COSY-artiger Feinstruktur (e.COSY = exclusive Correlation Spectroscopy) erzeugen<sup>[87–92]</sup>. Das Hauptproblem ist dabei das Erreichen einer genügend hohen Auflösung. Um auch kleine Kopplungskonstanten mit ausreichender Präzision messen zu können, müssen in der Regel einzelne Ebenen der mehrdimensionalen Spektren mit hoher Auflösung berechnet werden. Die Kopplungskonstanten können dann direkt aus der Aufspaltung der e.COSY-artigen Multipletts in den 2D-Ebenen der mehrdimensionalen Spektren abgelesen werden.

## 3. Strategien und Experimente zur Bestimmung von Proteinstrukturen

Die Wahl und die Kombination der mehrdimensionalen Experimente und damit zugleich auch die Entscheidung darüber, welche Isotope eingesetzt werden sollen, richtet sich nach der Größe des Proteins, seiner Sekundärstruktur, der Verteilung der Signale im Protonenspektrum und der Zugänglichkeit von markiertem, in der Regel rekombinant hergestelltem Protein. In Abhängigkeit von diesen Faktoren muß eine Kombination von Markierung und NMR-Experimenten gefunden werden, welche die für eine NMR-spektroskopische Strukturaufklärung erforderlichen Informationen zugänglich macht. Dies sind insbesondere

- eine lückenlose sequentielle Zuordnung
- eine möglichst vollständige Zuordnung der Seitenkettensignale
- eine genügende Zahl ausreichend genau gemessener NOEs. Damit kann man für jede Art von Markierung einen „Basisatz“ an Experimenten festlegen (Tabelle 2).

Tabelle 2. Je nach Markierung zur Proteinstrukturaufklärung geeignete NMR-Experimente.

	ohne Isotopenmarkierung	Markierung mit <sup>15</sup> N	Markierung mit <sup>15</sup> N und <sup>13</sup> C
Zuordnung von Spinsystemen	TOCSY-TOCSY	TOCSY-HMQC TOCSY-TOCSY	3D/4D-HCCH-TOCSY HCCH-COSY HC(C)NH-TOCSY
sequenzspezifische Zuordnung	TOCSY-NOESY	NOESY-HMQC TOCSY-NOESY	HCACO HNCA HNCO HCA(CO)N
Identifizierung von NOEs	NOESY-NOESY TOCSY-NOESY	NOESY-HMQC NOESY-NOESY TOCSY-NOESY	3D-NOESY-HMQC 4D-HMQC-NOESY HMQC

Ist das Protein nicht markiert, wird man das konventionelle, auf einer Sekundärstrukturanalyse beruhende Konzept der Zuordnung verwenden, das mit <sup>1</sup>H-Techniken auskommt (Abb. 7A). Die Seitenkettensignale werden dabei anhand der skalaren Kopplungen zwischen den Protonen mit TOCSY- und COSY-Techniken zu Signalsätzen zusammengefaßt, die mit Hilfe von NOEs zwischen benachbarten Aminosäuren aus NOESY-Spektren sequentiell geordnet werden. Die Strukturberechnung basiert dann auf NOEs, die entweder direkt aus 2D-NOESY-Spektren oder aus homonuclearen 3D-Spektren<sup>[32, 84, 85, 93–95]</sup> entnommen werden.

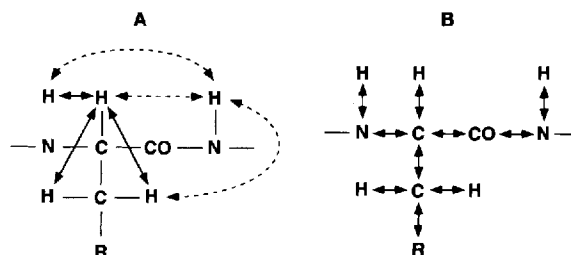


Abb. 7. Identifizierung von Spinsystemen und sequenzspezifische Zuordnung in Proteinen. A) Bei nichtmarkierten Proteinen erfolgt die Zuordnung auf der Basis von homonuclearen Spektren über <sup>3</sup>J-Kopplungen (durchgezogene Linien) und NOEs zwischen Protonen der einzelnen Aminosäuren (gestrichelte Linien). B) Im Falle einer Markierung mit <sup>15</sup>N, <sup>13</sup>C erfolgt die Zuordnung mit heteronuclearen Techniken anhand der relativ großen Kopplungen über eine Bindung (<sup>1</sup>J<sub>HC</sub> ≈ 125, <sup>1</sup>J<sub>NH</sub> ≈ 90, <sup>1</sup>J<sub>NC</sub> ≈ 10–17, <sup>1</sup>J<sub>CC</sub> ≈ 40–60 Hz).

Markiert man das Protein mit <sup>15</sup>N, kann man die chemischen Verschiebungen der Heterokerne zwar zusätzlich für die dreidimensionale Auflösung des NH-Bereichs der TOCSY- und NOESY-Spektren verwenden<sup>[96–100]</sup>, man nutzt aber im Prinzip die gleichen Zusammenhänge wie bei den reinen <sup>1</sup>H-Techniken (Abb. 7A). Damit wird die Zuordnung erleichtert, und es kann meist eine größere Zahl von NOEs interpretiert werden. Da sich die auflösungssteigernde Wirkung der <sup>15</sup>N-Markierung nur auf die Amidprotonen auswirkt, muß man Überlagerungen im aliphatischen Bereich bei Bedarf mit homonuclearen 3D-Techniken auflösen<sup>[32]</sup>. Dies gilt insbesondere für die Zuordnung von NOEs zwischen Seitenkettenprotonen.

Liegt ein doppelt markiertes Protein vor (<sup>13</sup>C und <sup>15</sup>N), ist es möglich, die gesamte Zuordnung konformationsunabhängig durchzuführen (Abb. 7B)<sup>[101–116]</sup>. Die Seitenkettenzuordnung erfolgt in diesem Fall mit Experimenten, die <sup>1</sup>J-Kopplungen zwischen <sup>1</sup>H und <sup>13</sup>C und zwischen benachbarten Kohlenstoffatomen nutzen<sup>[117–120]</sup>. Diese Vorgehensweise hat zwei Vorteile: Die beteiligten Kopplungen sind relativ groß und können damit auch für größere Proteine aufgelöst werden. Außerdem lassen sich bei Proteinen mit vielen gleichen Aminosäuren die in 2D-<sup>1</sup>H-NMR-Spektren unvermeidlichen Signalüberlagerungen weitgehend vermeiden. Die sequentielle Zuordnung läßt sich jetzt ebenfalls anhand der <sup>1</sup>J-Kopplungen bewerkstelligen: Es existiert eine Reihe von 3D- und 4D-Techniken für die Korrelation der chemischen Verschiebungen der Heterokerne in der Proteinhauptkette (Abb. 7B). Die für die Strukturberechnung notwendigen NOEs können aus <sup>15</sup>N- oder <sup>13</sup>C-aufgelösten NOESY-Spektren extrahiert oder mit deren Hilfe im 2D-NOESY-Spektrum interpretiert werden. Zusätzlich werden

vierdimensionale Experimente sinnvoll<sup>[27,121]</sup>, um Zuordnungen von NOEs völlig zweifelsfrei zu erhalten, analog zu der in Abbildung 3 illustrierten Situation.

Die doppelte Markierung eines Proteins mit  $^{15}\text{N}$  und  $^{13}\text{C}$  gilt als der „Königsweg“ für eine NMR-spektroskopische Strukturuntersuchung, doch auch ohne vollständige Markierung lassen sich oft gute Resultate erzielen. Die Größe der untersuchbaren Moleküle nimmt hierbei jedoch ab: Mit homonuclearen 3D-Methoden wird man eine Größe von 10 kD nur selten überschreiten können, und die Untersuchung von  $^{15}\text{N}$ -markierten Proteinen mit einer Kombination aus  $^{15}\text{N}$ -aufgelöster und homonuclearer 3D-Spektroskopie sollte jenseits von 13–15 kD nicht mehr sehr effektiv sein.

### 3.1. Untersuchung von unmarkierten Proteinen und Peptiden

Die Anwendung von homonuclearen 3D-Techniken zur Aufklärung der Struktur von kleineren Proteinen ist dann interessant, wenn diese aus natürlichen Quellen gewonnen wurden und einer Markierung nicht einfach zugänglich sind. Zuordnungs-

### 3.2. Untersuchung eines $^{15}\text{N}$ -markierten Proteins: die Struktur von Interleukin-4

Die vollständige Markierung eines Proteins ist nicht immer praktikabel. Dies gilt insbesondere dann, wenn neben dem Wildtyp Varianten untersucht werden sollen, die nicht jeweils einzeln mit  $^{13}\text{C}$  markiert werden können. In solchen Fällen kann man mit einer  $^{15}\text{N}$ -Markierung und der kombinierten Anwendung von  $^{15}\text{N}$ -aufgelöster und homonuclearer 3D-NMR-Spektroskopie die benötigten Parameter bestimmen. Am Beispiel von IL-4 wird die Strategie zur Untersuchung eines  $^{15}\text{N}$ -markierten Proteins diskutiert.

Die Struktur von IL-4<sup>[124–128]</sup> besteht aus vier Helices, die dreidimensionale Faltung des Proteins bezeichnet man als Vier-Helix-Bündel (Abb. 8). Die relative Lage der Helices zueinander läßt sich vor allem aus NOEs zwischen den Seitenkettenprotonen der gelb gezeichneten hydrophoben Aminosäuren, die sequentielle Zuordnung aus den charakteristischen NOEs zwischen Amidprotonen ableiten. Beide Arten von Wechselwirkungen sind mit 2D-Techniken schwer zugänglich, da im Bereich der NH- und der Methylgruppensignale starke Überla-

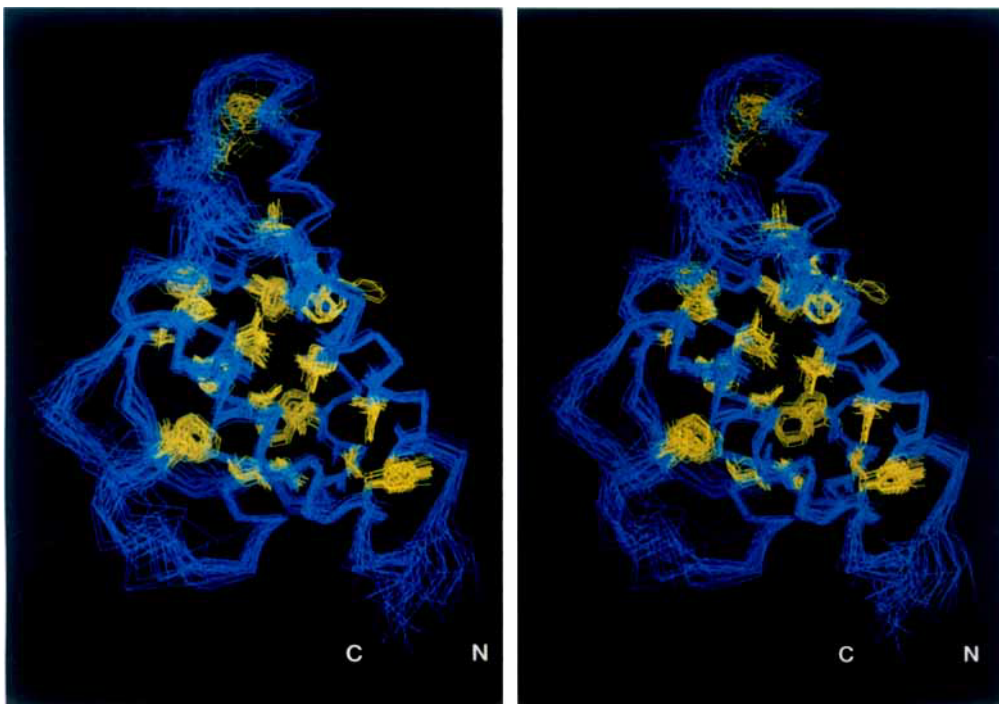


Abb. 8. Überlagerung von 21 auf der Grundlage der NMR-Daten berechneten Strukturen von Interleukin 4 (Stereobild). Die Proteinhauptkette ist blau, die Seitenketten der hydrophoben Aminosäuren sind gelb dargestellt.

probleme lassen sich mit der TOCSY-NOESY-Technik lösen<sup>[122]</sup>, und die NOESY-NOESY-Technik kann verwendet werden, um eine größere Zahl von Abständen zu messen und diese zugleich präziser zu bestimmen<sup>[84,85]</sup>. Darüber hinaus wurde gezeigt, daß dreidimensionale Spektren besser für die automatische Zuordnung von NMR-Signalen geeignet sind als zweidimensionale<sup>[72]</sup>.

Heteronucleare Methoden sind bei nichtmarkierten Proteinen in der Vergangenheit nur gelegentlich zur Untersuchung kleinerer Proteine oder Peptide verwendet worden<sup>[15,56,123]</sup>.

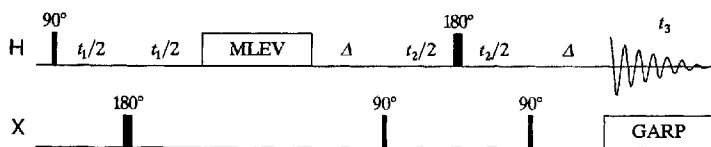
gerungen zu erwarten sind. Um diese aufzulösen, verwendet man für die sequentielle Zuordnung die  $^{15}\text{N}$ -NOESY-HMQC-Technik<sup>[96]</sup>, die zusätzliche Auflösung für den Amidbereich zur Verfügung stellt, und für die Detektion der NOES zwischen den Seitenketten die TOCSY-NOESY-Technik<sup>[32,122]</sup>. Zusätzlich bietet die  $^{15}\text{N}$ -TOCSY-HMQC-Technik<sup>[96]</sup> die Möglichkeit, die  $\text{H}_\text{N}$ -,  $\text{H}_\alpha$ - und  $\text{H}_\beta$ -Resonanzen einer Aminosäure mit deren Amidstickstoff-Resonanz zu korrelieren und damit die Grundlage für die Zuordnung der Seitenketten zu schaffen.



3.2.1. Zuordnung der Protonensignale mit <sup>15</sup>N-TOCSY-HMQC- und <sup>15</sup>N-NOESY-HMQC-Experimenten

Die <sup>15</sup>N-TOCSY-HMQC- und <sup>15</sup>N-NOESY-HMQC-Techniken (Abb. 9) gehören zu den gebräuchlichsten der 3D-Spektroskopie. Es sei vermerkt, daß HSQC-Experimente anstelle der HMQC-Experimente die gleichen Spektren ergeben. Entartete NH-Signale werden mit Hilfe der chemischen Verschiebungen der direkt gebundenen <sup>15</sup>N-Kerne auf verschiedene Ebenen verteilt, analog zu der in Abbildung 3 gezeigten Situation. Man erhält 3D-Spektren, in denen für jede Aminosäure an den Verschiebungen ihres Amidprotons und ihres Amidstickstoffkerns als Koordinaten ein Vektor erscheint, auf dem alle TOCSY- oder NOESY-Kreuzsignale des Amidprotons aufgereiht sind. Die <sup>15</sup>N-TOCSY-HMQC-Technik erleichtert damit die Zuordnung der Seitenkettensignale, im Idealfall sind alle Seitenkettenprotonen einer Aminosäure im entsprechenden Vektor zu finden.

3D-TOCSY-HMQC



3D-NOESY-HMQC

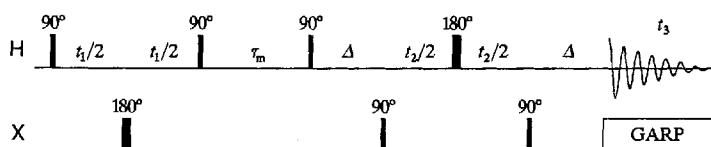


Abb. 9. Pulssequenzen für die 3D-<sup>15</sup>N-TOCSY- und 3D-<sup>15</sup>N-NOESY-HMQC-Experimente.

Die sequentielle Zuordnung von  $\alpha$ -helicalen Bereichen in Proteinen kann in sehr eleganter Weise allein unter Verwendung der <sup>15</sup>N-NOESY-HMQC-Technik bewerkstelligt werden, und zwar über das Auffinden von Kreuzsignalen zwischen den NH-Signalen benachbarter Aminosäuren. Dies wird bei 2D-NOESY-Spektren problematisch, wenn zum Beispiel zwei aus einer  $\alpha$ -Helix stammende NH-Signale entartet sind; in diesem Fall erwartet man auf der Frequenz dieser Signale vier Kreuzsignale zu anderen NH-Protonen. Eine eindeutige Zuordnung ist dann nicht mehr möglich. Dagegen befinden sich in einem <sup>15</sup>N-NOESY-HMQC-Spektrum die jeweils zusammengehörenden Signale auf verschiedenen <sup>15</sup>N-Ebenen, sofern die <sup>15</sup>N-Kerne unterschiedliche chemische Verschiebungen aufweisen. Die sequentiell zusammengehörenden Reste findet man, indem man die zur Diagonale symmetrischen NH-NH-Kreuzsignale im NOESY-Spektrum sucht. Eine gelungene sequentielle Zuordnung läßt sich in Form von aneinandergereihten Streifen darstellen, wie es für einige Reste aus IL-4 in Abbildung 10 gezeigt ist. Diese Streifen entsprechen den oben erwähnten <sup>15</sup>N/<sup>15</sup>N-Vektoren.

Für die Zuordnung von  $\beta$ -Strukturen mit dieser Technik muß man eine leicht geänderte Auswertestrategie anwenden. Überla-

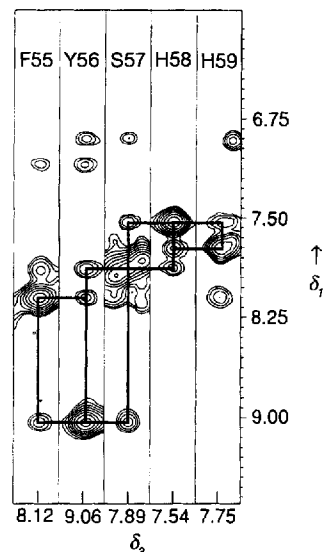


Abb. 10. Sequentielle Zuordnung für  $\alpha$ -helicale Bereiche unter Verwendung eines 3D-NOESY-HMQC-Spektrums, dargestellt am Beispiel der Verknüpfung der Aminosäuren F55 bis H59 in IL-4 über NOEs des Typs NH<sub>i</sub>-NH<sub>i+1</sub>. Die Streifen sind jeweils an den Frequenzen der Amidstickstoffkerne ( $F_2$ ) und Amidprotonen ( $F_3$ ) entnommen.

gert man Ebenen mit der gleichen <sup>15</sup>N-Frequenz aus dem <sup>15</sup>N-NOESY-HMQC- und <sup>15</sup>N-TOCSY-HMQC-Spektrum, so erhält man im H<sub>x</sub>-Bereich die zusammengehörenden NOESY- und TOCSY-Signale (Abb. 11). Die beiden 3D-Kreuzsignale

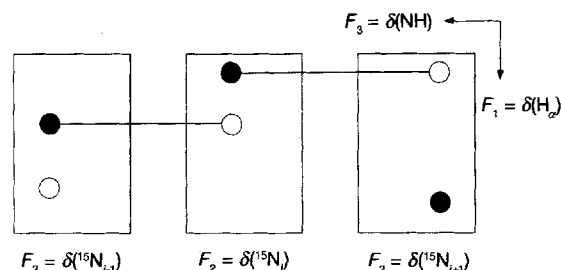


Abb. 11. Beispiel für die sequentielle Zuordnung auf der Basis von H<sub>N</sub>-H<sub>α</sub>-Korrelationen in <sup>15</sup>N-aufgelösten TOCSY- und NOESY-Spektren. Die zum gleichen NH-gehörenden TOCSY-Signale (schwarz) und NOESY-Signale (weiß) mit den Verschiebungen von H<sub>α</sub>(i)/H<sub>N</sub>(i) und H<sub>α</sub>(i-1)/H<sub>N</sub>(i) als Koordinaten befinden sich auf Ebenen mit gleichen <sup>15</sup>N-Frequenzen. Die benachbarten Aminosäuren findet man, indem man die Scheiben mit den passenden TOCSY-Signalen (links) oder NOESY-Signalen (rechts) sucht.

haben jeweils die gleichen <sup>15</sup>N- und H<sub>N</sub>-chemischen Verschiebungen und ergeben die Verknüpfung H<sub>α</sub>(i-1) → H<sub>α</sub>(i). Zur weiteren sequentiellen Zuordnung sucht man die Ebene, in der sich das mit der entsprechenden H<sub>α</sub>(i)-Frequenz korrespondierende TOCSY-Signal befindet. Im Idealfall gibt es nur eine passende Ebene, in der Regel sind jedoch immer eine Reihe von H<sub>α</sub>-Signalen entartet. Der Wert der <sup>15</sup>N-NOESY-HMQC-Technik für die Zuordnung ist daher weitgehend auf Proteine mit einem großen Anteil an  $\alpha$ -Helices beschränkt (siehe Abschnitt 3.2.2).

3.2.2. Vervollständigung und Überprüfung der sequentiellen Zuordnung durch TOCSY-NOESY-Daten

Zuordnungsprobleme wegen starker Überlagerungen im H<sub>α</sub>-Bereich traten auch in den NOESY- und TOCSY-Spektren von Interleukin-4 auf. So sind die H<sub>α</sub>-Signale einiger der im  $\beta$ -Falt-

blatt befindlichen Aminosäuren entartet. Die 2D-Spektren und die  $^{15}\text{N}$ -aufgelösten 3D-Spektren führten nicht zu eindeutigen Korrelationen. 3D-TOCSY-NOESY-Spektren dagegen enthalten die benötigten Informationen. In diesen Spektren beobachtet man Signale mit den Verschiebungen  $H_N(i)/H_\alpha(i)/H_N(i+1)$  und  $H_\alpha(i)/H_N(i)/H_N(i+1)$  als Koordinaten in  $F_1/F_2/F_3$ , die im Prinzip direkt den gewünschten Korrelationen entsprechen. Dies wird in Abbildung 12 verdeutlicht, in welcher der für die Zuordnung wichtige Bereich aus 2D-TOCSY- und 2D-NOESY-Spektren schematisch dargestellt ist. Die ausgefüllten Kreise

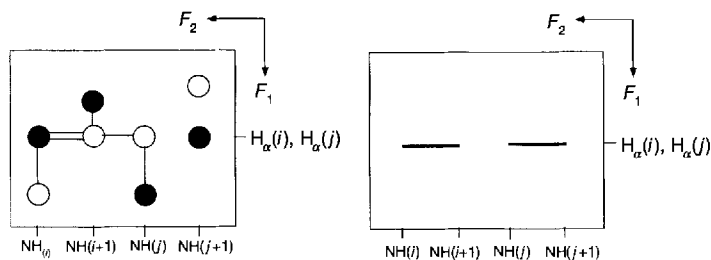


Abb. 12. Beispiel für den Gebrauch von 3D-TOCSY-NOESY-Daten bei der Zuordnung von Protein-NMR-Spektren. Links: Zur Zuordnung anhand von 2D-Spektren werden normalerweise Kreuzsignale mit Kopplungs- (schwarz) und Abstandsinfos (weiß), die z.B. in TOCSY- und NOESY-Spektren enthalten sind, verbunden. Liegen die Signale von verschiedenen  $\alpha$ -Protonen bei der gleichen Frequenz, ergeben sich mehrere Möglichkeiten der Verknüpfung. Rechts: Die in TOCSY-NOESY-Spektren enthaltenen Kreuzsignale mit den Verschiebungen von  $H_N(i)/H_\alpha(i)/H_N(i+1)$  oder  $H_N(i)/H_N(i+1)/H_\alpha(i+1)$  als Koordinaten in  $F_1/F_2/F_3$  entsprechen direkt den im oberen Spektrum eingezeichneten Korrelationen. Sie können im 2D-Spektrum als Korrelationslinien auf der Höhe der  $H_\alpha$ -Frequenz dargestellt werden. Die Linien verbinden dann die Frequenzen der Amidprotonen der Aminosäuren  $i$  und  $i+1$ .

stellen TOCSY-, die leeren NOESY-Signale dar. Die Zuordnung ist hier nicht zweifelsfrei durchzuführen, da die chemischen Verschiebungen zweier  $H_\alpha$ -Signale entartet sind. Beide Zuordnungsmöglichkeiten, ausgehend von der Aminosäure  $i$ , sind angegeben. Die oben genannten 3D-Kreuzsignale haben den Charakter von Korrelationslinien zwischen 2D-Kreuzsignalen, wenn man auf der Höhe der enthaltenen  $H_\alpha$ -Verschiebung eine Linie zwischen den beiden NH-Verschiebungen zieht (Abb. 12 rechts). Auf diese Weise ergibt sich eine eindeutige Zuordnung der 2D-Kreuzsignale.

In der Praxis geht man so vor, daß man die entsprechenden Teile des 3D-Spektrums separat berechnet, mit einem Signalsuchverfahren eine Liste der Signale erstellt und diese wie oben beschrieben graphisch in die Spektren einträgt. Dies ist für Interleukin-4 in Abbildung 13 gezeigt. Das TOCSY-Spektrum ist in Türkis, das NOESY-Spektrum in Rot dargestellt, und die vom Auswerteprogramm eingetragenen Korrelationslinien geben die sequentiell zusammengehörenden Signale an. In der Abbildung sind Korrelationen zu sehen, die vorwiegend aus nicht-helicalen Bereichen stammen. Aminosäuren in Helices geben wegen der kleinen Kopplung zwischen  $H_N$  und  $H_\alpha$  nur sehr schwache Kreuzsignale, die nicht berücksichtigt wurden.

### 3.2.3. Zuordnung der Signale in NOESY-Spektren

Eines der Hauptprobleme der Zuordnung von Signalen in NOESY-Spektren ist die Identifizierung von NOEs zwischen Methylgruppen oder anderen Seitenkettenatomen. Ein konkre-

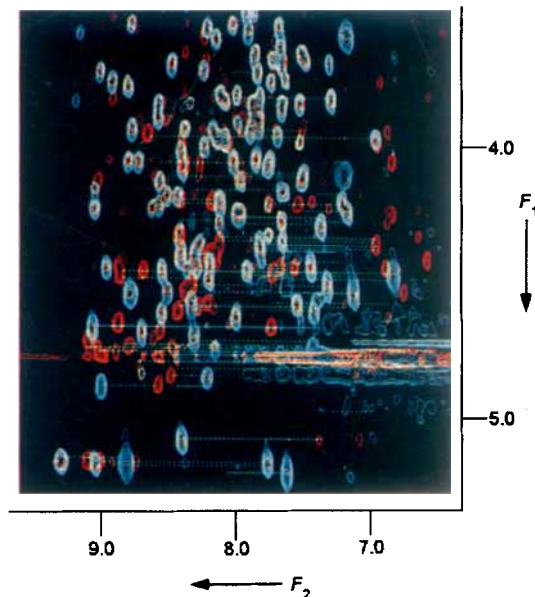


Abb. 13. Überlagerung der 2D-TOCSY- (türkis) und 2D-NOESY-Spektren (rot) von IL-4 mit eingezeichneten Korrelationslinien, die aus Kreuzsignalen im 3D-TOCSY-NOESY-Spektrum abgeleitet wurden (siehe Abb. 12).

ter Fall aus der Aufklärung der IL-4-Struktur ist in Abbildung 14A gezeigt. Es besteht die Möglichkeit, diese NOEs anhand der Kopplungen der Methylgruppen zu den direkt benachbarten Protonen mit einem TOCSY-NOESY-Spektrum aufzulösen. Dies setzt allerdings voraus, daß im 2D-TOCSY-Spektrum die Kreuzsignale zwischen den Methylgruppen der Valinreste und deren  $H_\beta$  sowie zwischen den Methylgruppen der Leucinreste und deren  $H_\gamma$  aufgelöst und bereits zugeordnet sind.

Das 3D-Spektrum wird in Form von TOCSY-Ebenen ausgewertet und direkt mit dem NOESY-Spektrum verglichen. Das

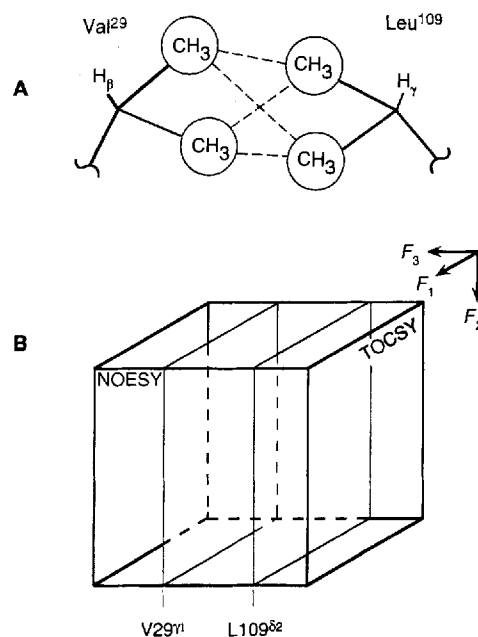


Abb. 14. Identifizierung von NOEs zwischen Seitenkettenprotonen von IL-4 mit der 3D-TOCSY-NOESY-Technik. Um die NOEs zwischen den in A dargestellten Seitenketten von Val29 und Leu109 eindeutig zuzuordnen zu können, werden TOCSY-Ebenen ( $F_1/F_2$ ) an den Frequenzen der Methylgruppenprotonen ( $F_3$ ) ausgewertet (B; siehe dazu Abb. 15).

NOESY-Spektrum wird dabei in  $F_2$ -Richtung durchgearbeitet; aus dem 3D-Spektrum werden die an den entsprechenden  $F_3$ -Koordinaten genommenen Ebenen verwendet (Abb. 14 B). Die  $F_1$ -Frequenzen der im 2D-Spektrum auftretenden Kreuzsignale kann man verwenden, um das für die Zuordnung interessierende 3D-Kreuzsignal zu finden; es liegt in der TOCSY-Ebene des 3D-Spektrums auf der  $F_2$ -Koordinate mit der gleichen chemischen Verschiebung. Die  $F_1$ -Koordinate des 3D-

Kreuzsignals gibt die chemische Verschiebung des Koppelungspartners und damit, im Vergleich mit dem TOCSY-Spektrum, die Zuordnung.

Als Beispiel ist in Abbildung 15 die Zuordnung der NOEs zwischen den Methylgruppen von L109 und V29 gezeigt. Das Signal einer Methylgruppe von L109 im Protonenspektrum ist nicht von anderen überlagert, was das Problem vereinfacht. Die an dieser Stelle genommene  $F_1/F_2$ -Ebene (Abb. 15 a) zeigt zwei Kreuzsignale mit den Verschiebungen von V29- $H_\beta$  in  $F_1$  und den V29-Methylgruppen in  $F_2$  als Koordinaten. Damit ist belegt, daß die entsprechenden Kreuzsignale im NOESY-Spektrum von NOEs zwischen L109 und V29 stammen. Wäre das Signal von L109 von anderen überlagert, müßte man diese Interpretation mit den symmetrischen Signalen belegen, die man in einer  $F_3$ -Ebene findet, die bei der Frequenz der Methylgruppen von V29 liegt und die Kopplung zwischen L109- $H_\alpha$  und - $H_\gamma$  enthält. Diese Signale finden sich in der Tat, wie in Abbildung 15 b dargestellt.

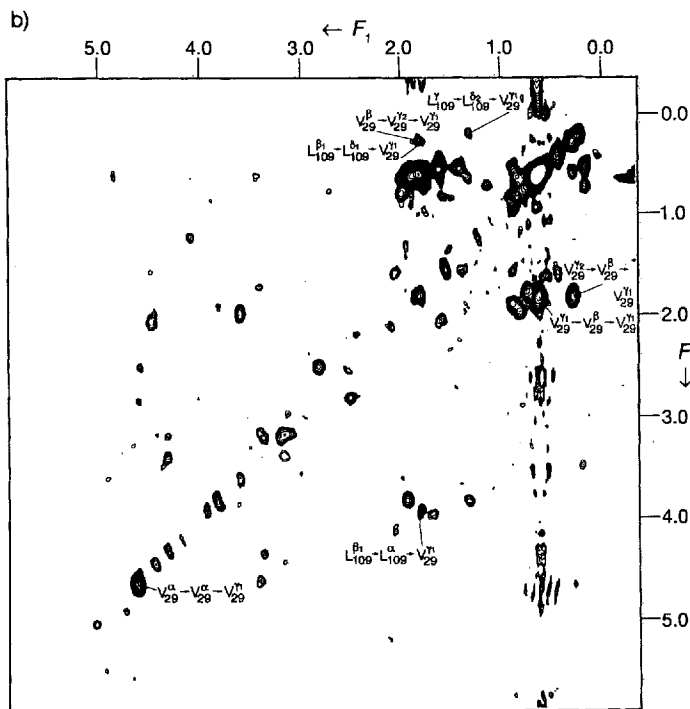
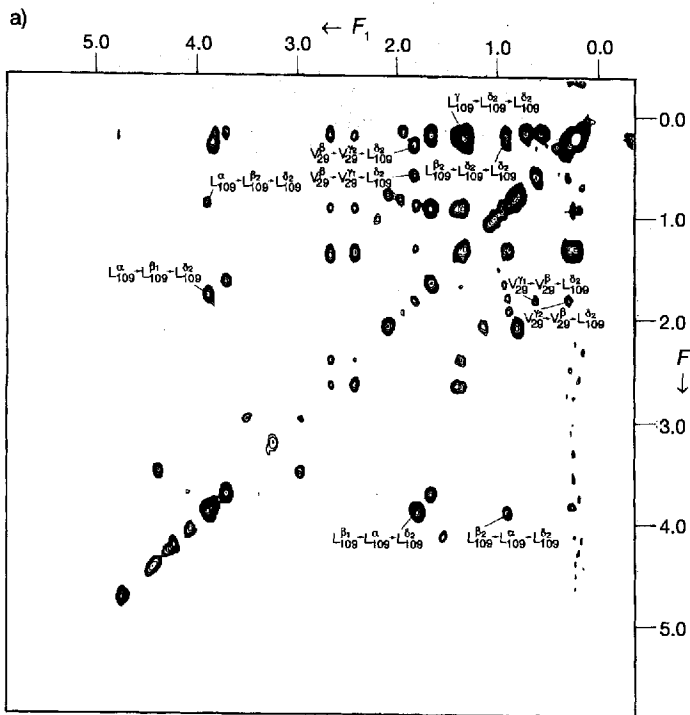


Abb. 15. TOCSY-Ebenen ( $F_1/F_2$ ), die aus dem 3D-TOCSY-NOESY-Spektrum von IL-4 an den in Abbildung 14 B dargestellten Positionen entnommen wurden. a) Bei  $\delta(F_3) = 0.22$ , b) bei  $\delta(F_3) = 0.61$ .

3.2.4. Messung von  $^3J_{H,H_N}$

Um den Verlauf der Hauptkette und die Konformationen der Seitenketten in Protonen besser festlegen zu können, werden zusätzlich Diederwinkel, die über die Karplus-Beziehung aus Kopplungskonstanten hergeleitet werden können, für die Strukturberechnung verwendet. Diese Kopplungskonstanten lassen sich bei Proteinen nur schlecht mit 2D-Experimenten bestimmen, da meist einzelne Komponenten der Kreuzsignale durch Signalüberlagerungen verdeckt werden. Es wurde daher eine ganze Reihe von mehrdimensionalen Techniken zur Messung von Kopplungskonstanten entwickelt<sup>[88-92]</sup>.

Im Fall von IL-4 wurde die 3D-HMQC- $J_{HH}$ -TOCSY-Technik<sup>[88]</sup> eingesetzt, um die  $H_N-H_\alpha$ -Kopplung und damit den Winkel  $\phi$  der Proteinhauptkette zu bestimmen. Kleine Werte ( $< 5$  Hz) weisen auf  $\alpha$ -helicale Strukturen und große Werte ( $> 9$  Hz) auf gestreckte Konformationen hin. Mittlere Kopplungskonstanten (5 bis 9 Hz) sprechen für eine Mittelung durch schnelle Rotation um die N- $C_\alpha$ -Bindung oder für ungewöhnliche

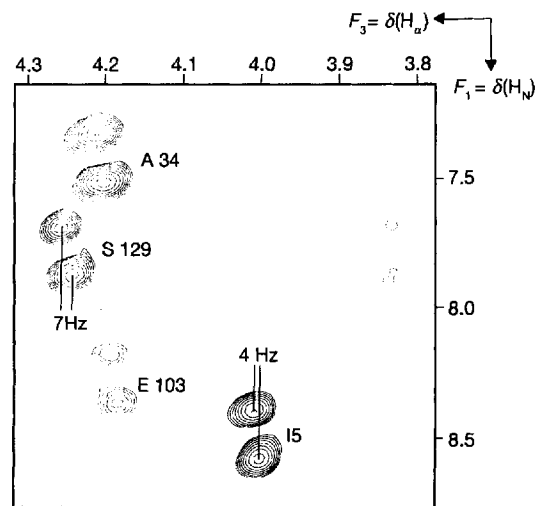


Abb. 16. Ausschnitt aus dem 3D-HMQC- $J_{HH}$ -TOCSY-Spektrum von IL-4. Dargestellt sind die  $H_x-H_N-N$ -Kreuzsignale von 15, A34, E103 und S129. Die Kopplungskonstanten entsprechen dem Abstand der Kreuzsignalkomponenten in  $F_3$ -Richtung.

Hauptkettenkonformationen (z.B. positive Winkel  $\psi$ ). Als Beispiel ist in Abbildung 16 eine Ebene aus dem HMQC- $J_{\text{HH}}$ -TOCSY-Spektrum von IL-4 gezeigt. Die  $H_x$ - $H_N$ -N-Kreuzsignale sind in  $F_2$  durch die  $^1J_{\text{NH}}$ - und in  $F_3$  durch die  $^3J_{\text{HNH}_\alpha}$ -Kopplungen aufgespalten.

### 3.3. Techniken für $^{15}\text{N}$ - und $^{13}\text{C}$ -markierte Proteine: die Struktur von Cystatin in Lösung

In vielen Fällen ist eine Untersuchung von Proteinen mit mehr als 100 Aminosäuren ohne  $^{13}\text{C}$ -Markierung nur unter Auflösungsverlust durchzuführen. Ein Beispiel sind die Strukturen von phosphoryliertem und nichtphosphoryliertem Cystatin<sup>[129–131]</sup>. Das phosphorylierte Protein ist aus Hühnerweiß isoliert worden<sup>[132]</sup> und konnte nicht markiert werden; seine Struktur ist in bestimmten Bereichen schlecht definiert (Abb. 17 links). Die nichtphosphorylierte Form (Abb. 17 rechts) konnte in *E. coli* überexprimiert werden<sup>[34]</sup> und war so einer Markierung mit  $^{13}\text{C}$  und  $^{15}\text{N}$  zugänglich. Die Struktur der großen Schleife im linken unteren Teil des Proteins konnte damit durch die Messung einer höheren Zahl von Abständen festgelegt werden.

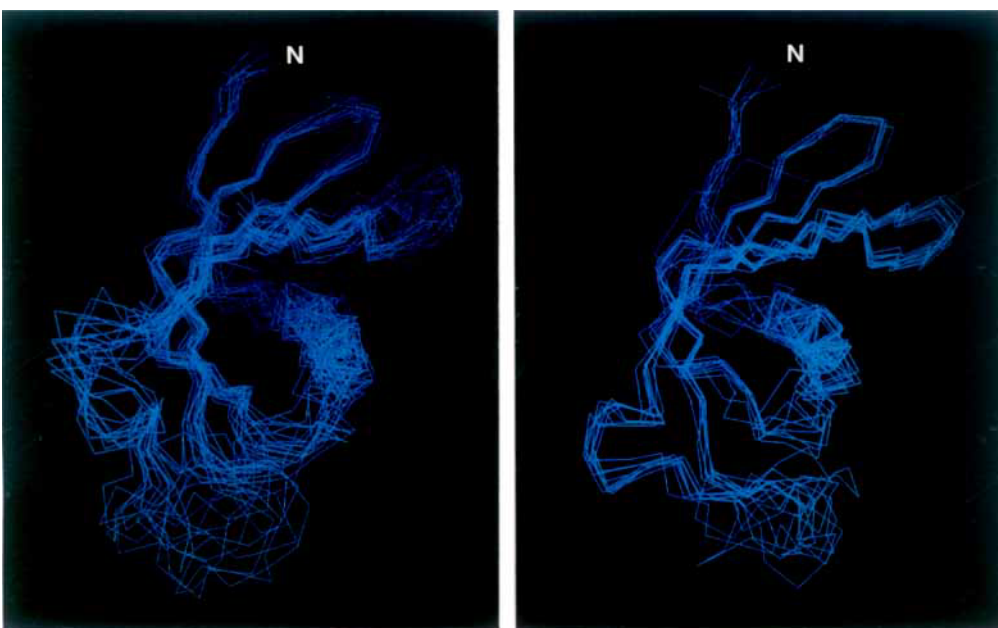


Abb. 17.  $C_\alpha$ -Darstellung der berechneten Strukturen von phosphoryliertem Hühnerweiß-Cystatin (links) und der rekombinant hergestellten Mutante (rechts). N kennzeichnet jeweils den N-Terminus.

Die Vorteile der  $^{13}\text{C}$ -Markierung zeigen sich oft schon bei der Zuordnung der Seitenkettensignale. Anhand charakteristischer chemischer Verschiebungen im  $^{13}\text{C}$ -Bereich lassen sich einige Aminosäurereste leicht erkennen. Die sequentielle Zuordnung wird zusätzlich durch Tripelresonanzexperimente stark vereinfacht.

Die Versuche zur Aufklärung der Cystatinstruktur in Lösung begannen mit unmarkierten Proben, der Großteil der Signale konnte dabei mit konventionellen Techniken zugeordnet werden. Für einige Fragestellungen war jedoch die  $^{13}\text{C}$ -Markierung unerlässlich.

Dies galt insbesondere für die Frage nach einer möglichen Flexibilität des N-Terminus (bis G9) und einer großen Schleife in der Region 69–80, da diese Regionen keine bzw. nur schwache NOEs aufwiesen. Die vollständige Beschreibung der Struktur erfordert deshalb die Messung heteronuclearer Relaxationsparameter (vor allem für  $^{15}\text{N}$ ), die Informationen über die Beweglichkeit der Peptidkette liefern. Aus diesem Grund wird die Methode zur Bestimmung dieser Parameter in Abschnitt 4 kurz vorgestellt werden.

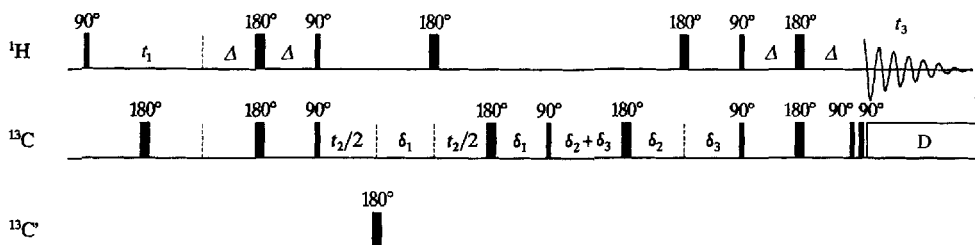
#### 3.3.1. Zuordnung der Signale von Seitenketten

Die Zuordnung der Signale von Seitenketten erfolgt bei doppelt markierten Proben im wesentlichen mit Experimenten vom HCCH-Typ, den 3D-HCCH-COSY-<sup>[117, 118]</sup> und 3D-HCCH-TOCSY-Techniken<sup>[119]</sup> (Abb. 18). Die letztere Technik ermöglicht die Korrelation aller Seitenkettenprotonen und -kohlenstoffkerne mit dem  $\alpha$ -Proton und dem  $\alpha$ -Kohlenstoffkern der jeweiligen Aminosäure, d. h. mit den Kernen, welche die Anknüpfungspunkte für die sequentielle Zuordnung darstellen (Abb. 19)<sup>[133, 134]</sup>.

Die Pulssequenzen entsprechen dem allgemeinen Schema, das eine Anregung und Detektion von Protonen vorsieht. Die Anregung der Kohlenstoffkerne erfolgt dabei über die C-H-Kopp-

lung, um dann die  $^1J_{\text{CC}}$ -Kopplungen nutzen zu können (siehe auch Abb. 7B). Zur Detektion müssen über eine C-H-Kopplung wieder die Protonen angeregt werden. Wegen der Größe der beteiligten Kopplungen (125, 40, 125 Hz) wird die maximale Kohärenztransferamplitude in kürzerer Zeit als bei Anwendung einer entsprechenden homonuclearen Sequenz (TOCSY, COSY) erreicht. Dies erleichtert die Messung von Korrelationen zwischen Seitenkettensignalen vor allem bei größeren Proteinen, deren Protonen eine zu kurze transversale Relaxationszeit für die Anwendung von  $^1\text{H}$ -Techniken aufweisen. Die mit den Pulssequenzen in Abbildung 18 erhaltenen 3D-Spektren weisen zwei

3D-HCCH-COSY



3D-HCCH-TOCSY

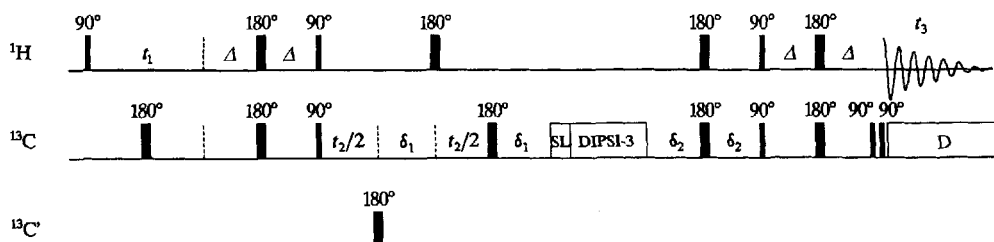


Abb. 18. Pulssequenzen für die 3D-HCCH-TOCSY- und 3D-HCCH-COSY-Technik. D = Entkoppeln.

Koordinatenachsen mit  $^1\text{H}$ - ( $F_1$  und  $F_3$ ) und eine mit  $^{13}\text{C}$ -chemischen Verschiebungen ( $F_2$ ) auf, sie entsprechen nach  $^{13}\text{C}$ -chemischen Verschiebungen aufgelösten COSY- oder TOCSY-Spektren. Im HCCH-COSY-Spektrum findet man in einer  $F_2$ -Ebene, d. h. für eine  $^{13}\text{C}$ -chemische Verschiebung, die Frequenzen der direkt gebundenen Protonen auf der  $F_1$ - und diejenigen der an den benachbarten Kohlenstoffatomen befindlichen auf der  $F_3$ -Koordinatenachse. Die vollständige Seitenkettenzuordnung erhält man durch die Kombination der  $F_2$ -Ebenen mit den symmetrischen  $^1\text{H}$ -Signalen. Im HCCH-TOCSY-Spektrum kann man im Prinzip alle Protonen einer Seitenkette in einer einzigen  $F_2$ -Ebene ( $\delta(^{13}\text{C})$ ) finden, was die Arbeit oft erleichtert (Abb. 19 rechts).

während in  $F_3$ -Richtung im Idealfall die Frequenzen aller zum Spinsystem der betreffenden Aminosäure gehörenden Protonen abgelesen werden können. Man findet zum Beispiel für T96 ausgehend vom  $\text{C}_\alpha/\text{H}_\alpha$ -Diagonalsignal die 3D-Kreuzsignale zu  $\text{H}_\beta$  sowie zu den H der  $\gamma$ -Methylgruppe.

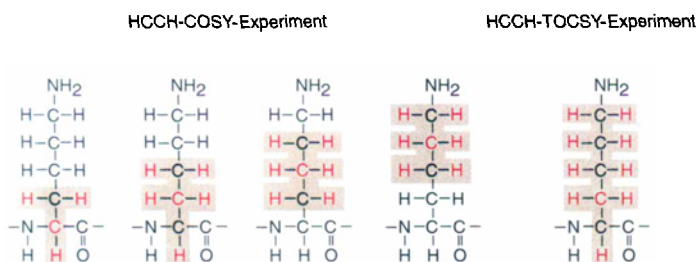


Abb. 19. Schematische Darstellung der aus HCCH-Experimenten bestimmten „Bausteine“ für die Zuordnung der Seitenketten am Beispiel eines Lysinrestes. Im HCCH-COSY-Spektrum findet man auf Ebenen, die an den Frequenzen der rot gezeichneten Kohlenstoffkerne entnommen werden, Korrelationen zu den direkt gebundenen Protonen und zu jenen an den benachbarten Kohlenstoffatomen (grau unterlegte Bereiche). Eine Zuordnung der gesamten Seitenkette gelingt durch Kombination der Informationen aus den einzelnen Ebenen. Ein HCCH-TOCSY-Spektrum enthält auf der Ebene einer Kohlenstoffresonanzfrequenz Korrelationen zu allen Protonen innerhalb der Seitenkette.

In Abbildung 20 ist dies am HCCH-TOCSY-Spektrum von Cystatin dargestellt. Die gezeigte Ebene wurde an der  $F_2$ -Koordinate mit den Verschiebungen der  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Kohlenstoffatome von T70, T96, T94, V99 und S56 genommen. In  $F_1$ -Richtung findet sich jeweils die Frequenz des direkt gebundenen Protons,

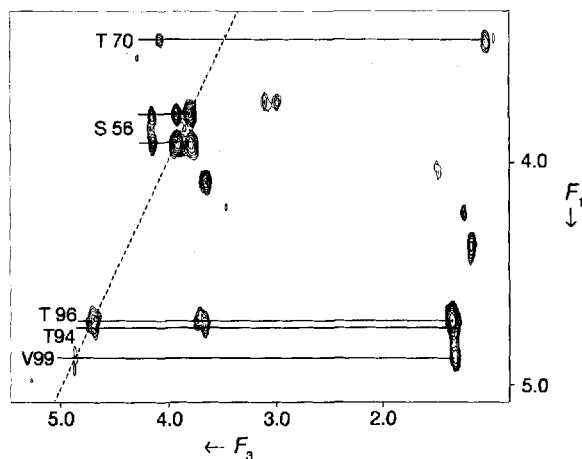


Abb. 20. Ebene aus einem 3D-HCCH-TOCSY-Spektrum von Cystatin. Eingzeichnet sind die Spinsysteme von T70, S56, T96, T94 und V99.

Beide Techniken eignen sich auch für eine vierdimensionale Durchführung des Experiments. Mit den in Abbildung 18 gezeigten Pulssequenzen wird der zuerst angeregte Kohlenstoffkern detektiert. Im Prinzip kann man durch einfaches Einfügen einer zweiten Evolutionszeit nach dem COSY- oder TOCSY-Transfer auch die Frequenz des zweiten Kohlenstoffkerns detektieren.

3.3.2. Sequentielle Zuordnung anhand von Kopplungen über eine Bindung zwischen den Atomen der Proteinhauptkette

Bei einem doppelt markierten Protein wird die sequentielle Zuordnung in der Regel mit einer Kombination von Tripelreso-



nanzexperimenten durchgeführt<sup>[135-137]</sup>, welche die chemischen Verschiebungen der Atome in der Proteinhauptkette miteinander korrelieren. Jedes Experiment liefert potentiell einen „Baustein“ für den Aufbau der Sequenz (Abb. 21). Diese Expe-

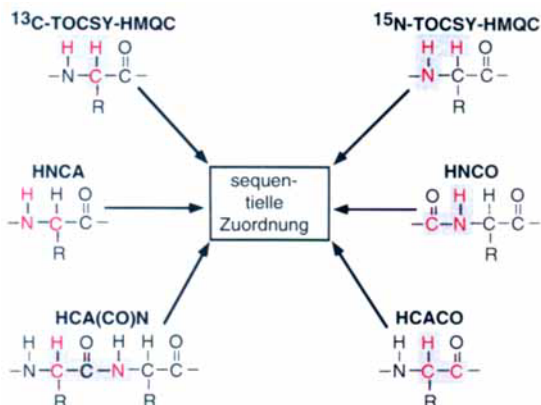


Abb. 21. Schematische Darstellung der mit Tripelresonanzexperimenten bestimm- baren „Bausteine“ (Korrelationen) einer Proteinhauptkette. In den Spektren treten jeweils Kreuzsignale mit den Frequenzen der rot gezeichneten Kerne auf. Die kombinierte Auswertung dieser Spektren liefert die sequentielle Zuordnung.

rimente zeichnen sich durch relativ umfangreiche Pulssequenzen aus, die ein gut ausgerüstetes NMR-Gerät voraussetzen. Zwei solche Sequenzen, die im Prinzip vier Frequenzkanäle benöti- gen, sind in Abbildung 22 wiedergegeben.

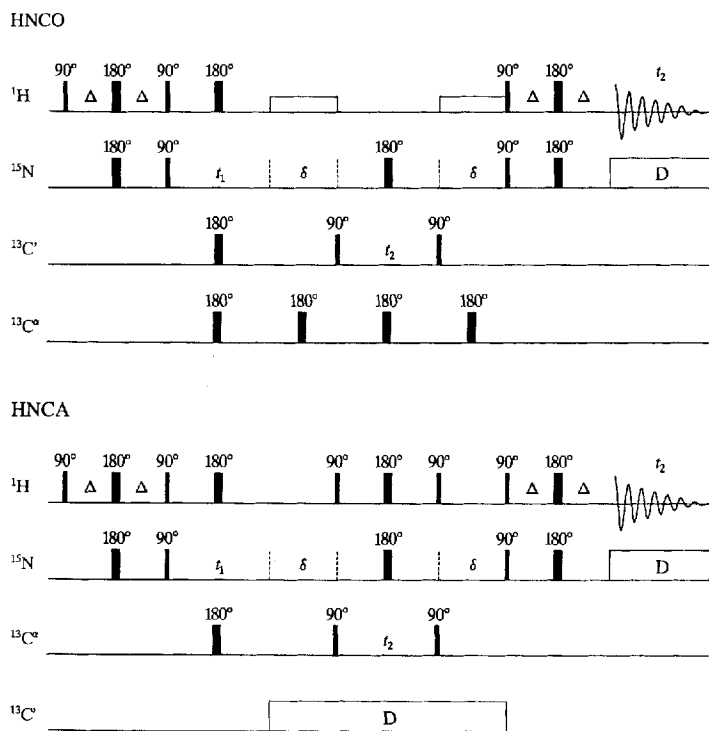


Abb. 22. Pulssequenzen der 3D-HNCO- und 3D-HNCA-Experimente.

Man kann zwar mit einem Minimum an Experimenten aus- kommen; es zeigt sich in der Praxis jedoch, daß eine mehrfache Absicherung hilfreich ist. So sollten die sequentiellen Korrela-

Aminosäure *i*      Aminosäure *i*+1

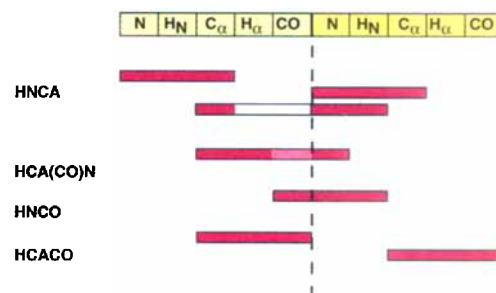


Abb. 23. Verknüpfung der Aminosäuren *i* und *i*+1 mit einem Basissatz an 3D-Tripelresonanzexperimenten. Die roten Balken geben jeweils die in einem 3D-Kreuz- signal enthaltenen Frequenzen an. Pink eingefärbte Bereiche entsprechen Kernen, die nicht detektiert, sondern nur während der Pulssequenz zum Magnetisierungs- transfer verwendet werden.

tionen durch einen Satz an Kreuzsignalen, die jeweils zwei ge- meinsame Frequenzen haben, gegeben sein. Eine solche Kombi- nation von Experimenten ist in Abbildung 23 gezeigt. Aus den HNCA-<sup>[101, 102]</sup> und HCACO-Experimenten<sup>[101]</sup> erhält man die zusammengehörigen Kerne einer Aminosäure. Die Verknüp- fung mit den in der Sequenz benachbarten Aminosäuren kann über mehrere Korrelationen erfolgen. So enthalten die Kreuz- signale im HNCO-Spektrum<sup>[101]</sup> neben den HN- und N-Fre- quenzen der Aminosäure *i* auch die Frequenz des Carbonyl- kohlenstoffatoms der Aminosäure *i*-1. In analoger Weise verbindet das HCA(CO)N-Spektrum<sup>[101]</sup> H<sub>α</sub> und C<sub>α</sub> der Ami- nosäure *i* mit dem Amidstickstoffatom der Aminosäure *i*+1. Die sequentielle Zuordnung erfolgt somit durch die Kombi- nation von „Bausteinen“, die sich in Teilen überschneiden. Neben den bereits genannten Experimenten gibt es noch eine ganze Reihe alternativer Pulssequenzen, so daß für nahezu jede Frage- stellung ein geeignetes Experiment existiert (siehe Tabelle 1).

Der wesentliche Vorteil dieser Gruppe von Experimenten ist die verhältnismäßig geringe Zahl von Signalen in den Spektren: Sie enthalten pro Aminosäure nur ein oder maximal zwei Kreuz- signale. Dies vereinfacht zum einen die manuelle Auswertung und ermöglicht zum anderen eine weitgehende Automatisie- rung. Abbildung 24 zeigt eine dreidimensionale Ansicht des 3D- HCACO-Spektrums von Cystatin. Die einzelnen Kreuzsignale

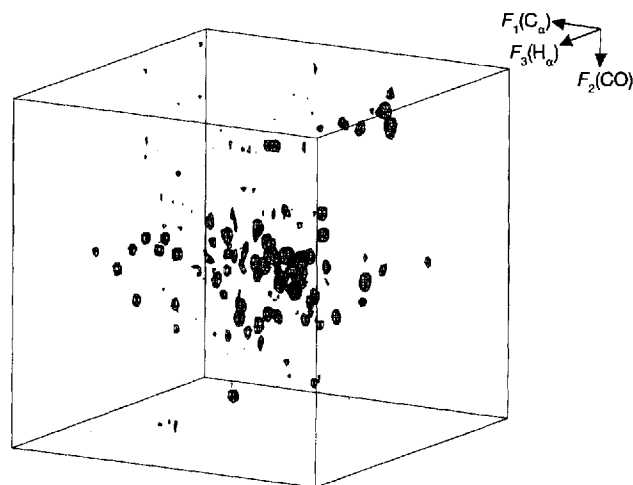


Abb. 24. Dreidimensionale Darstellung des 3D-HCACO-Spektrums von Cystatin.

sind in allen drei Frequenzrichtungen gut aufgelöst, wobei ca. 90% der zu erwartenden Korrelationen beobachtet werden.

3.3.3. Identifizierung von NOEs mit 3D- und 4D-NOESY-HMQC-Techniken

Die in Abschnitt 3.2.1 beschriebenen Experimente vom 3D-NOESY-HMQC/HSQC-Typ<sup>196-1001</sup> sind von besonderem Wert, wenn eine <sup>13</sup>C-Markierung vorliegt, da sie zur Zuordnung der NOEs zwischen Protonen aus den Seitenketten der Aminosäuren eingesetzt werden können. Die 3D-Spektren entsprechen einem nach den Frequenzen der direkt gebundenen Kohlenstoffatome aufgelösten 2D-NOESY-Spektrum. Dabei werden die im 2D-Spektrum symmetrisch zur Diagonalen angeordneten NOE-Kreuzsignale auf zwei verschiedene Ebenen des 3D-Spektrums, entsprechend den Frequenzen der direkt gebundenen Kohlenstoffatome verteilt. Die Identifizierung der NOEs erfolgt nun über die Kombination dieser Ebenen. Dies ist in Abbildung 25 am Beispiel der Zuordnung des NOE zwischen F83 H<sub>α</sub> und T69 H<sub>α</sub> von Cystatin dargestellt. Die beiden Seitenketten können anhand ihrer NOE-Muster klar identifiziert werden.

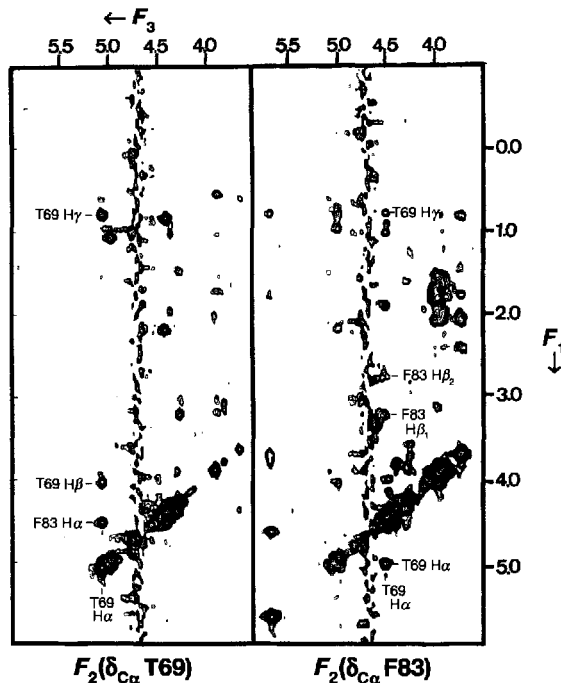


Abb. 25. Ausschnitte aus zwei F<sub>3</sub>-Ebenen des 3D-NOESY-<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C-HMQC-Spektrums von Cystatin, welche die Identifizierung des H<sub>α</sub>-H<sub>α</sub>-NOE zwischen T69 und F83 ermöglichen.

Die Zuordnung von weitreichenden NOEs zwischen Seitenketten gelingt nach demselben Prinzip und ist in Abbildung 26 am Beispiel der Methylgruppen mehrerer Alanin-, Valin- und Isoleucinreste dargestellt. Das mit einem Fragezeichen markierte Kreuzsignal konnte auch mit Hilfe des 3D-Spektrums nicht eindeutig zugeordnet werden, da die H<sub>α</sub>- und C<sub>α</sub>-Signale von anderen überlagert waren. Wenn, wie in diesem Fall, die dreidimensionale Auffächerung des NOESY-Spektrums für eine eindeutige Zuordnung nicht mehr ausreicht, können die Experimente auch als vierdimensionale Varianten durchgeführt

werden. Dabei werden jeweils alle an einem NOE beteiligten Protonen mit den direkt gebundenen Heterokernen korreliert. Diese Experimente liefern 4D-HMQC-NOESY-HMQC-Spektren<sup>127,1211</sup>. Mit einem solchen Experiment (4D-<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C-HMQC-NOESY-<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C-HMQC<sup>11211</sup>) konnte die Mehrdeutigkeit bezüglich des einen Kreuzsignals in Abbildung 26 aufgelöst werden: Das entsprechende 4D-Kreuzsignal taucht bei den Koordinaten H<sub>β</sub>(A90)-C<sub>β</sub>(A90)-H<sub>α</sub>(P87)-C<sub>α</sub>(P87) auf, womit der NOE eindeutig einer Wechselwirkung zwischen der β-Methylgruppe von Alanin 90 und dem α-Proton von P87 zugeordnet werden kann.

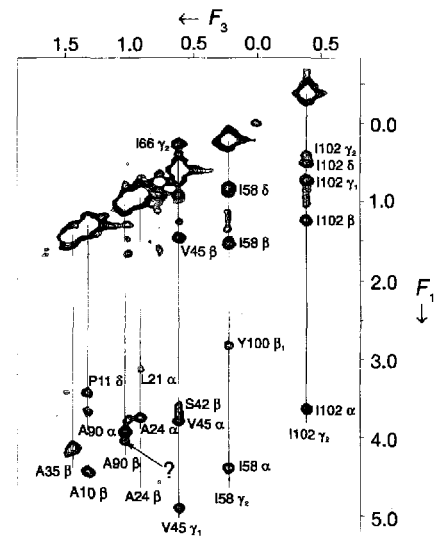


Abb. 26. Zu F<sub>2</sub> = 17.5 (<sup>13</sup>C) gehörende Ebene aus dem 3D-NOESY-<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C-HMQC-Spektrum von Cystatin. Beschriftet sind die NOE-Signale einiger Valin-, Isoleucin- und Alaninmethylgruppen. Das mit einem Fragezeichen markierte Signal konnte erst mit einem 4D-Experiment als NOE zwischen P87-H<sub>α</sub> und A90-H<sub>β</sub> identifiziert werden.

4. NMR-Experimente zur Untersuchung der inneren Dynamik von Biomolekülen

Mit der Möglichkeit, NMR-spektroskopisch die Strukturen von kleinen und mittelgroßen Proteinen in Lösung zu bestimmen, wurde auch die Grundlage für eine Untersuchung ihrer dynamischen Eigenschaften gelegt<sup>1138-1421</sup>.

Die Beweglichkeit einer Peptidkette spiegelt sich im Relaxationsverhalten von Protonen und Heterokernen wider, so daß über eine Messung der Relaxationsparameter (longitudinale Relaxationszeit T<sub>1</sub>, transversale Relaxationszeit T<sub>2</sub> und NOE) Aussagen über die innere Dynamik des Proteins gemacht werden können. Zur Bestimmung der Relaxationszeiten der Heterokerne und des Hetero-NOE werden geringfügig abgeänderte H-X-Korrelationen vom HSQC-Typ eingesetzt<sup>11431</sup>, wobei für jeden Parameter eine Meßreihe mit unterschiedlichen Wartezeiten für die Relaxation aufgenommen werden muß. Eine Auftragung der erhaltenen Intensitäten liefert für jeden Heterokern eine exponentiell abfallende Kurve, aus der dann die jeweilige Relaxationszeit ermittelt wird. Zur Bestimmung des Hetero-NOE wird je ein Experiment mit und ohne Vorsättigung der Protonen aufgenommen. Der NOE ergibt sich dann aus dem

Verhältnis der gemessenen Intensitäten der Kreuzsignale in den beiden Spektren. Abbildung 27 zeigt die für Cystatin erhaltenen  $T_1$ -,  $T_2$ - und NOE-Werte. Dabei wird die stark unterschiedliche Relaxation der  $^{15}\text{N}$ -Kerne und damit die unterschiedliche Beweglichkeit der Proteinhauptkette deutlich. Insbesondere im Bereich der Aminosäuren 72 bis 80 gleicht das Relaxationsverhalten der Amidstickstoffkerne mehr dem in einem Peptid, als dem in einem Protein mit mehr als 100 Aminosäuren. Die starke

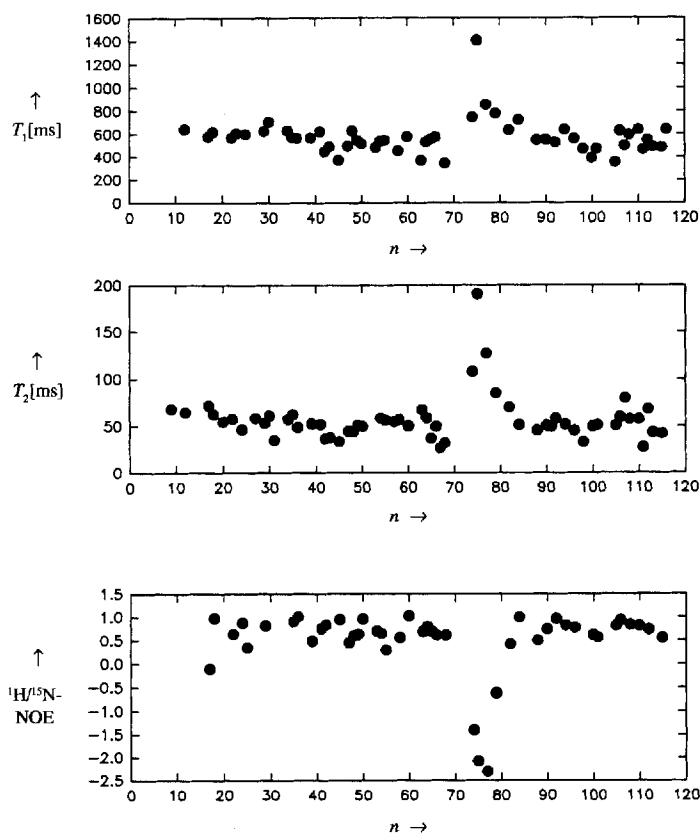


Abb. 27. Werte für  $T_1$ ,  $T_2$  und den  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -NOE der einzelnen Aminosäuren von Cystatin ( $n$  = Positionsnummer der Aminosäure). Deutlich zu erkennen sind die extremen Werte im Bereich von C71 bis C81, die auf eine wesentlich höhere Mobilität der Proteinhauptkette in dieser Region hindeuten.

Streuung bei den in Abbildung 17 dargestellten Strukturen in diesem Bereich der Peptidkette ist also kein Artefakt, verursacht durch unzureichende Daten, sondern geht auf eine tatsächliche Flexibilität der Proteinhauptkette zurück.

## 5. Zusammenfassung und Ausblick

Die Einführung multidimensionaler NMR-Techniken hat im Zusammenspiel mit der Isotopenmarkierung rekombinant hergestellter Proteine die Strukturbestimmung an biologisch wichtigen Makromolekülen ( $M > 10$  kD) in Lösung ermöglicht. Die in dieser Übersicht vorgestellten Methoden sind nur eine Auswahl an Experimenten für die Aufklärung von Proteinstrukturen mit Hilfe der NMR-Spektroskopie.

Die Obergrenze für NMR-spektroskopisch zugängliche Proteine ist mit den aus der Literatur bekannten Beispielen sicherlich noch nicht erreicht. Wegen der bei größeren Molekülen

kürzer werdenden transversalen Relaxationszeit ist man jedoch bei Proteinen mit einem Molekulargewicht von mehr als ca. 25 kD in der Wahl der Experimente stark eingeschränkt. Es ist daher anzunehmen, daß zumindest im Hinblick auf eine vollständige Strukturaufklärung durch NMR-Spektroskopie eine „natürliche Obergrenze“ existiert.

*Diese Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft und den Sonderforschungsbereich 207 unterstützt. Wir danken Dr. E. A. Auerswald, München, und Prof. W. Sebald, Würzburg, für die Präparation der markierten Proteine. Der Firma Bruker danken wir für technische Unterstützung (8 mm-Probenkopf), Dr. P. Neidig für Modifikationen des Programms AURELIA. Die Moleküle wurden mit dem Programm QUANTA (Molecular Simulations, Inc.) dargestellt.*

Eingegangen am 11. Juni 1993 [A 3]

- [1] K. Wüthrich, *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, 1. Aufl., Wiley, New York, 1986.
- [2] J. Jeener, Ampère International Summer School, Basko Polje, Jugoslawien, 1971, unveröffentlicht.
- [3] W. P. Aue, E. Bartholdi, R. R. Ernst, *J. Chem. Phys.* **1976**, *64*, 2229.
- [4] R. R. Ernst, G. Bodenhausen, A. Wokaun, *Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions*, 1. Aufl., Oxford University Press, New York, 1987.
- [5] R. R. Ernst, *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 817; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 805.
- [6] H. Kessler, M. Gehrke, C. Griesinger, *Angew. Chem.* **1988**, *100*, 507; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, *27*, 490.
- [7] D. Neuhaus, M. P. Williamson, *The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis*, 1. Aufl., VCH, Weinheim, 1989.
- [8] M. Karplus, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2870.
- [9] V. F. Bystrov, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1976**, *10*, 41; V. F. Bystrov, A. S. Arseniev, D. Yu, J. Gavrilov, *J. Magn. Reson.* **1978**, *30*, 151.
- [10] T. F. Havel, K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.* **1985**, *182*, 281–294; *Bull. Math. Biol.* **1984**, *46*, 673.
- [11] W. Braun, N. Go, *J. Mol. Biol.* **1985**, *186*, 611.
- [12] W. F. van Gunsteren, H. J. C. Berendsen, *Angew. Chem.* **1990**, *102*, 1020; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, *29*, 992.
- [13] A. T. Brünger, G. M. Clore, A. M. Gronenborn, M. Karplus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, *83*, 3801.
- [14] W. Braun, G. Wider, K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.* **1983**, *169*, 921.
- [15] R. Kaptein, E. R. P. Zuiderweg, R. M. Scheek, R. Boelens, W. F. van Gunsteren, *J. Mol. Biol.* **1985**, *182*, 179.
- [16] G. Wagner, W. Braun, T. F. Havel, T. Schaumann, T. Go, K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.* **1987**, *196*, 611.
- [17] A. D. Kline, K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.* **1986**, *192*, 869.
- [18] M. P. Williamson, T. F. Havel, K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.* **1985**, *182*, 295.
- [19] G. M. Clore, A. M. Gronenborn, *Protein Eng.* **1987**, *1*, 275.
- [20] W. A. Hendrickson, K. Wüthrich (Hrsg.), *Macromolecular Structures* **1991**, *1*.
- [21] C. Griesinger, O. W. Sørensen, R. R. Ernst, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 7227.
- [22] G. W. Vuister, R. Boelens, R. Kaptein, *J. Magn. Reson.* **1988**, *80*, 176.
- [23] H. Oschkinat, C. Griesinger, P. J. Kraulis, O. W. Sørensen, R. R. Ernst, A. M. Gronenborn, G. M. Clore, *Nature* **1988**, *332*, 374.
- [24] S. W. Fesik, E. R. P. Zuiderweg, *J. Magn. Reson.* **1988**, *78*, 588.
- [25] L. E. Kay, D. Marion, A. Bax, *J. Magn. Reson.* **1989**, *84*, 72.
- [26] E. R. P. Zuiderweg, S. W. Fesik, *Biochemistry* **1989**, *28*, 2387.
- [27] L. E. Kay, G. M. Clore, A. Bax, A. M. Gronenborn, *Science* **1990**, *249*, 411.
- [28] G. M. Clore, P. Driscoll, P. T. Wingfield, A. M. Gronenborn, *J. Mol. Biol.* **1990**, *214*, 811.
- [29] Y. Theriault, T. M. Logan, R. Meadows, L. Yu, E. T. Olejniczak, T. F. Holzman, R. L. Simmer, S. W. Fesik, *Nature* **1993**, *361*, 88.
- [30] M. Ikura, G. M. Clore, A. M. Gronenborn, G. Zhu, C. B. Klee, A. Bax, *Science* **1992**, *256*, 632.
- [31] N. Kruse, T. Lehnbecher, W. Sebald, *FEBS Lett.* **1991**, *286*, 58.
- [32] T. Müller, T. Dieckmann, W. Sebald, H. Oschkinat, unveröffentlicht.
- [33] A. Barret, N. Rawlings, M. Davies, W. Machleidt, G. Salvesen, V. Turk, *Proteinase Inhibitors*, 1. Aufl., Elsevier, The Netherlands, 1986.
- [34] E. A. Auerswald, G. Genenger, R. Mentele, S. Lenzen, I. Assfalg-Machleidt, L. Mitschang, H. Oschkinat, H. Fritz, *Eur. J. Biochem.* **1991**, *200*, 131.
- [35] U. Piantini, O. W. Sørensen, R. R. Ernst, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 6800.
- [36] M. Rance, O. W. Sørensen, G. Bodenhausen, G. Wagner, R. R. Ernst, K. Wüthrich, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1983**, *117*, 458.
- [37] A. J. Shaka, R. Freeman, *J. Magn. Reson.* **1983**, *51*, 169.

- [38] N. Müller, R. R. Ernst, K. Wüthrich, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 6482.
- [39] L. Braunschweiler, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* **1983**, *53*, 521.
- [40] D. G. Davis, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 2821.
- [41] C. Giesinger, G. Otting, K. Wüthrich, R. R. Ernst, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 7870.
- [42] J. Jeener, B. H. Meier, P. Bachmann, R. R. Ernst, *J. Chem. Phys.* **1979**, *71*, 4546.
- [43] A. A. Bothner-By, R. L. Stephens, J. Lee, C. D. Warren, R. W. Jeanloz, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 811.
- [44] A. A. Maudsley, R. R. Ernst, *Chem. Phys. Lett.* **1977**, *50*, 368.
- [45] G. Bodenhausen, R. Freeman, *J. Magn. Reson.* **1977**, *28*, 471.
- [46] G. Bodenhausen, D. J. Ruben, *Chem. Phys. Lett.* **1980**, *69*, 185.
- [47] L. E. Kay, D. Marion, A. Bax, *J. Magn. Reson.* **1989**, *84*, 72.
- [48] G. Wagner, *Methods Enzymol.* **1989**, *176*, 93.
- [49] O. W. Sørensen, G. W. Eich, M. H. Levitt, G. Bodenhausen, R. R. Ernst, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1983**, *6*, 163.
- [50] G. Bodenhausen, H. Kogler, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* **1984**, *58*, 370.
- [51] C. Griesinger, O. W. Sørensen, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* **1989**, *84*, 14.
- [52] D. Zicssow, *On Line Rechner in der Chemie. Grundlagen und Anwendungen in der Fourierspektroskopie*, de Gruyter, Berlin, **1976**.
- [53] C. Bauer, R. Freeman, T. Frenkiel, J. Keeler, A. J. Shaka, *J. Magn. Reson.* **1984**, *58*, 442.
- [54] H. Oschkinat, C. Cieslar, T. A. Holak, G. M. Clore, A. M. Gronenborn, *J. Magn. Reson.* **1989**, *83*, 450.
- [55] P. Schmieder, H. Kessler, H. Oschkinat, *Angew. Chem.* **1990**, *102*, 588; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, *29*, 546.
- [56] H. Kessler, P. Schmieder, H. Oschkinat, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 8599.
- [57] J. Schmidt, H. Rüterjans, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 1279.
- [58] A. Wokaun, R. R. Ernst, *Chem. Phys. Lett.* **1977**, *52*, 407.
- [59] A. Bax, P. G. De Jong, A. F. Mehlkopf, J. Smidt, *Chem. Phys. Lett.* **1980**, *69*, 567.
- [60] R. E. Hurd, *J. Magn. Reson.* **1990**, *87*, 422.
- [61] A. L. Davis, E. D. Laue, J. Keeler, D. Moskau, J. Lohman, *J. Magn. Reson.* **1991**, *94*, 637.
- [62] G. W. Vuister, R. Boelens, R. Kaptein, R. E. Hurd, B. John, P. C. M. van Zijl, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 9688.
- [63] A. L. Davis, R. Boelens, R. Kaptein, *J. Biomol. NMR* **1992**, *2*, 395.
- [64] A. Ross, M. Czisch, C. Cieslar, T. A. Holak, *J. Biomol. NMR* **1993**, *3*, 215.
- [65] E. T. Olejniczak, H. L. Eaton, *J. Magn. Reson.* **1990**, *87*, 628.
- [66] C. Cieslar, T. A. Holak, H. Oschkinat, *J. Magn. Reson.* **1990**, *87*, 400.
- [67] G. Zhu, A. Bax, *J. Magn. Reson.* **1990**, *90*, 405.
- [68] R. Powers, D. S. Garrett, C. J. March, E. A. Frieden, A. M. Gronenborn, G. M. Clore, *Biochemistry* **1992**, *31*, 4334.
- [69] K.-P. Neidig, R. Saffrich, M. Lorenz, H. R. Kalbitzer, *J. Magn. Reson.* **1990**, *89*, 543.
- [70] M. Kjaer, K. V. Andersen, H. Shen, S. Ludvigsen, D. Windekilde, B. Sørensen, F. M. Poulsen, *NATO ASI Ser. Ser. A* **1991**, *225*, 291.
- [71] C. Eccles, P. Güntert, M. Billeter, K. Wüthrich, *J. Biomol. NMR* **1991**, *2*, 111.
- [72] H. Oschkinat, T. A. Holak, C. Cieslar, *Biopolymers* **1991**, *31*, 699.
- [73] F. J. M. van de Ven, *J. Magn. Reson.* **1990**, *86*, 633.
- [74] R. Bernstein, C. Cieslar, A. Ross, H. Oschkinat, J. Freund, T. A. Holak, *J. Biomol. NMR* **1993**, *3*, 245.
- [75] T. L. James, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1991**, *1*, 1042.
- [76] R. Boelens, T. M. G. Koning, R. Kaptein, *J. Mol. Struct.* **1988**, *173*, 299.
- [77] P. Yip, D. A. Case, *J. Magn. Reson.* **1989**, *83*, 643.
- [78] B. A. Borgias, T. L. James, *J. Magn. Reson.* **1988**, *79*, 493.
- [79] S. G. Hyberts, M. S. Goldberg, T. F. Havel, G. Wagner, *Protein Sci.* **1992**, *1*, 736.
- [80] G. M. Clore, A. M. Gronenborn, *J. Magn. Reson.* **1985**, *61*, 158.
- [81] H. Oschkinat, C. Cieslar, C. Griesinger, *J. Magn. Reson.* **1990**, *86*, 453.
- [82] R. Boelens, G. Vuister, T. M. G. Koning, R. Kaptein, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8525.
- [83] S. Macura, R. R. Ernst, *Mol. Phys.* **1982**, *41*, 95.
- [84] A. M. J. J. Bonvin, R. Boelens, R. Kaptein, *J. Magn. Reson.* **1991**, *95*, 626.
- [85] T. A. Holak, J. Habazettl, H. Oschkinat, J. Otlewski, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 3196.
- [86] H. Kessler, S. Seip, J. Saulitis, *J. Biomol. NMR* **1991**, *1*, 83.
- [87] O. W. Sørensen, *J. Magn. Reson.* **1990**, *90*, 433.
- [88] W. Willker, D. Leibfritz, *J. Magn. Reson.* **1992**, *99*, 421.
- [89] G. W. Vuister, A. Bax, *J. Biomol. NMR* **1992**, *2*, 401.
- [90] J. C. Madsen, O. W. Sørensen, P. Sørensen, F. Poulsen, *J. Biomol. NMR* **1993**, *3*, 239.
- [91] C. Griesinger, U. Eggenberger, *J. Magn. Reson.* **1992**, *97*, 426.
- [92] U. Eggenberger, Y. Karimi-Nejad, H. Thürig, H. Rüterjans, C. Griesinger, *J. Biomol. NMR* **1992**, *2*, 583.
- [93] J. Habazettl, A. Ross, H. Oschkinat, T. A. Holak, *J. Magn. Reson.* **1992**, *97*, 511.
- [94] J. Habazettl, M. Schleicher, J. Otlewski, T. A. Holak, *J. Mol. Biol.* **1992**, *228*, 156.
- [95] R. Bernstein, A. Ross, C. Cieslar, T. A. Holak, *J. Magn. Reson. Ser. B* **1993**, *101*, 185.
- [96] D. Marion, P. C. Driscoll, L. E. Kay, P. T. Wingfield, A. Bax, A. M. Gronenborn, G. M. Clore, *Biochemistry* **1989**, *28*, 6150.
- [97] E. R. P. Zuiderweg, L. P. McIntosh, F. W. Dahlquist, S. W. Fesik, *J. Magn. Reson.* **1990**, *86*, 210.
- [98] M. Wittekind, M. Goralach, M. Friedrichs, G. Dreyfuss, L. Müller, *Biochemistry* **1992**, *31*, 6254.
- [99] K. L. Constantine, V. Goldfarb, M. Wittekind, J. Anthony, S. C. Ng, L. Müller, *Biochemistry* **1992**, *31*, 5033.
- [100] W. J. Fairbrother, A. G. Palmer III, M. Rance, J. Seizer, M. H. Saier, P. E. Wright, *Biochemistry* **1992**, *31*, 4413.
- [101] L. E. Kay, M. Ikura, R. Tschudin, A. Bax, *J. Magn. Reson.* **1990**, *89*, 496.
- [102] B. T. Farmer II, R. A. Venters, L. D. Spicer, M. G. Wittekind, L. Müller, *J. Biomol. NMR* **1992**, *2*, 195.
- [103] M. G. Wittekind, L. Müller, *J. Magn. Reson. Ser. B* **1993**, *101*, 201.
- [104] R. Weisemann, H. Rüterjans, W. Bermel, *J. Biomol. NMR* **1993**, *3*, 113.
- [105] L. E. Kay, M. Ikura, A. Bax, *J. Magn. Reson.* **1991**, *91*, 84.
- [106] A. G. Palmer III, J. C. Fairbrother, P. E. Wright, M. Rance, *J. Biomol. NMR* **1992**, *2*, 103.
- [107] R. T. Clubb, V. Thanabal, G. Wagner, *J. Biomol. NMR* **1992**, *2*, 203.
- [108] A. Bax, M. Ikura, *J. Biomol. NMR* **1991**, *1*, 99.
- [109] R. T. Clubb, G. Wagner, *J. Biomol. NMR* **1992**, *2*, 389.
- [110] S. Seip, J. Balbach, H. Kessler, *J. Biomol. NMR* **1993**, *3*, 233.
- [111] S. J. Archer, M. Ikura, D. A. Torchia, A. Bax, *J. Magn. Reson.* **1991**, *95*, 636.
- [112] S. Grzesiek, J. Anglister, A. Bax, *J. Magn. Reson. Ser. B* **1993**, *101*, 114.
- [113] S. Grzesiek, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 6291.
- [114] B. Lyons, G. T. Montelione, *J. Magn. Reson. Ser. B* **1993**, *101*, 206.
- [115] W. Boucher, E. D. Laue, S. Cambell-Burk, P. J. Domaille, *J. Biomol. NMR* **1992**, *2*, 631.
- [116] W. Boucher, E. D. Laue, S. Cambell-Burk, P. J. Domaille, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 2262.
- [117] L. E. Kay, M. Ikura, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 888.
- [118] M. Ikura, L. E. Kay, A. Bax, *J. Biomol. NMR* **1991**, *1*, 299.
- [119] A. Bax, G. M. Clore, A. M. Gronenborn, *J. Magn. Reson.* **1990**, *88*, 425.
- [120] E. T. Olejniczak, R. X. Xu, S. W. Fesik, *J. Biomol. NMR* **1992**, *2*, 655.
- [121] G. M. Clore, L. E. Kay, A. Bax, A. M. Gronenborn, *Biochemistry* **1991**, *30*, 12.
- [122] H. Oschkinat, C. Cieslar, A. M. Gronenborn, G. M. Clore, *J. Magn. Reson.* **1989**, *81*, 212.
- [123] S. W. Fesik, R. T. Gampe, E. R. P. Zuiderweg, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 770.
- [124] L. Smith, C. Redfield, J. Boyd, G. M. P. Lawrence, R. G. Edwards, R. A. G. Smith, C. M. Dobson, *J. Mol. Biol.* **1992**, *224*, 899.
- [125] A. Wlodaver, A. Pavlovsky, A. Gustchina, *FEBS Lett.* **1992**, *309*, 59.
- [126] R. Powers, D. S. Garrett, C. J. March, E. A. Frieden, A. M. Gronenborn, G. M. Clore, *Science* **1992**, *256*, 1673.
- [127] M. R. Walter, W. J. Cook, B. G. Zhao, R. P. Cameron, S. E. Ealick, R. L. Walter, P. Reichert, T. L. Nagabhushan, P. P. Trotta, C. E. Brugg, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 20371.
- [128] T. Müller, W. Sebald, H. Oschkinat, unveröffentlicht.
- [129] W. Bode, R. Engh, D. Musil, B. Laber, M. Stubbs, R. Huber, V. Turk, *EMBO J.* **1988**, *7*, 2593.
- [130] T. Dieckmann, L. Mitschang, M. Hofmann, J. Kos, V. Turk, E. A. Auerswald, R. Jaenicke, H. Oschkinat, *J. Mol. Biol.*, im Druck.
- [131] R. Engh, T. Dieckmann, W. Bode, E. Auerswald, V. Turk, R. Huber, H. Oschkinat, *J. Mol. Biol.*, im Druck.
- [132] V. Turk, J. Brzin, M. Longer, A. Ritonja, M. Eropkin, U. Borchert, W. Machleidt, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **1983**, *364*, 1487.
- [133] G. M. Clore, A. Bax, P. C. Driscoll, P. T. Wingfield, A. M. Gronenborn, *Biochemistry* **1990**, *29*, 8172.
- [134] W. J. Fairbrother, A. G. Palmer III, M. Rance, J. Reizer, M. H. Saier, P. E. Wright, *Biochemistry* **1992**, *31*, 4413.
- [135] G. T. Montelione, G. Wagner, *J. Magn. Reson.* **1990**, *87*, 183.
- [136] M. Ikura, L. E. Kay, A. Bax, *Biochemistry* **1990**, *29*, 4659.
- [137] G. M. Clore, A. M. Gronenborn, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1991**, *23*, 43.
- [138] D. M. Schneider, M. J. Dellwo, A. J. Wand, *Biochemistry* **1992**, *31*, 3645.
- [139] G. Barbato, M. Ikura, L. E. Kay, R. W. Pastor, A. Bax, *Biochemistry* **1992**, *31*, 5269.
- [140] C. Redfield, J. Boyd, L. J. Smith, R. A. G. Smith, C. M. Dobson, *Biochemistry* **1992**, *31*, 10431.
- [141] R. Powers, G. M. Clore, S. J. Stahl, P. T. Wingfield, A. M. Gronenborn, *Biochemistry* **1992**, *31*, 9150.
- [142] G. M. Clore, P. C. Driscoll, P. T. Wingfield, A. M. Gronenborn, *Biochemistry* **1990**, *29*, 7387.
- [143] L. E. Kay, D. A. Torchia, A. Bax, *Biochemistry* **1989**, *28*, 8972.
- [144] T. M. Logan, E. T. Olejniczak, R. X. Xu, S. W. Fesik, *J. Biomol. NMR* **1993**, *3*, 225.