PCP, ein Prototyp für die Thioesterdomänen nichtribosomaler Peptidsynthetasen: Aufklärung der dreidimensionalen Struktur durch NMR-spektroskopische Methoden

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem
Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Thomas Weber

aus Elmshorn

Marburg/Lahn 2000

Vom Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg
als Dissertation am 13. 04. 2000 angenommen.

Erstgutachter Prof. Dr. M. A. Marahiel
Zweitgutachter Prof. Dr. T. Carell
Tag der mündlichen Prüfung am 03. 05. 2000

Zusammenfassung

Nichtribosomale Peptidsynthetasen (NRPS) sind große, modulare Enzyme, die für die Synthese einer Reihe bioaktiver Peptide mikrobiellen Ursprungs verantwortlich sind, darunter viele pharmakologisch bedeutsame Stoffe wie etwa das Immunsuppressivum Cyclosporin A. NRPS bestehen aus Modulen, die sich ihrerseits aus eigenständigen Domänen zusammensetzen. Für jede in das Peptid einzubauende Aminosäure ist ein eigenes Modul vorhanden. Die Substrat-Aminosäuren werden zunächst durch eine Adenylierungsdomäne als Aminoacyladenylate aktiviert und dann von einer *peptidyl carrier protein*-Domäne (PCP) kovalent fixiert, in dieser Form eventuell an modifizierende Domänen gereicht und schließlich durch eine Kondensationsdomäne verknüpft. PCP wird an einem hochkonservierten Serinrest posttranslational mit einem 4'-Phosphopantetheinyl-Kofaktor versehen, dessen Thiolgruppe die Aminosäure als Thioester von der A-Domäne übernehmen kann.

PCP kann seine Funktion auch als eigenständiges Protein wahrnehmen, wenn auch mit geringerer Effizienz. Da es als universeller Carrier innerhalb der NRPS mit mehreren Domänen kooperieren muß, ist seine Struktur von besonderer Bedeutung für das Verständnis der nichtribosomalen Peptidsynthese.

Als Prototyp für ein PCP wurde die entsprechende Domäne des dritten Moduls der Tyrocidin-Synthetase 3 als distinktes Protein überproduziert und NMR-spektroskopisch untersucht. Aus den experimentell ermittelten Abstands- und Winkelinformationen wurde durch kombinierte Anwendung *simulated annealing*-Rechnungen die dreidimensionale Struktur von PCP in Lösung aufgeklärt. PCP ist ein verzerrtes 4-Helix-Bündel, das zwischen der ersten und zweiten Helix einen langen Loop aufweist; es spiegelt die Faltung der Acyl-Carrier-Proteine der *E. coli* Fettsäuresynthase und der *S. coelicolor* Actinorhodin Polyketidsynthase wider, allerdings finden sich deutliche Unterschiede in der relativen Anordnung der Helices sowie in deren Länge. Der invariante Serinrest liegt am Ende des langen Loops, der in diesem Bereich flexibel ist. Durch Relaxationsmessungen konnte die Zeitskala für diese Bewegungen abgeschätzt werden. Anhand der vorliegenden Struktur können die N- und C-terminalen Grenzen der PCP-Domäne festgelegt werden, wodurch künftige Arbeiten mit rekombinanten NRPS erleichtert werden können, da die korrekte Wahl der Domänenübergänge kritisch ist. Die Struktur von PCP und seine Oberflächenbeschaffenheit geben Aufschluß über Prinzipien der Kooperation von Domänen innerhalb von NRPS.

1. Inhalt

1. Inhalt iv

2. Einleitung 8

2.1. Sekundärmetabolite und Antibiotika ... 8
2.2. Nichtribosomal synthetisierte Peptidantibiotika ... 9
2.3. Nichtribosomale Peptidsynthese ... 9
2.4. Das Peptidyl-Carrier-Protein PCP ... 11
2.5. Strukturelles Umfeld von PCP ... 13
2.6. Kernresonanzspektroskopie von Proteinen ... 16
2.6.1. NMR als alternative Methode zur Proteinstrukturbestimmung ... 16
2.6.2. NMR ist zur gleichwertigen Methode gereift ... 17
2.6.3. NMR komplementiert die Information von Kristallstrukturen ... 17
2.6.4. Vorteile durch die Messung in Lösung ... 18
2.6.5. Isotopenmarkierung von Proteinen ... 18
2.6.6. Die wichtigsten Spektren ... 18
2.6.6.1. Das ^{1}H-^{15}N HSQC ... 19
2.6.6.2. Das TOCSY ... 19
2.6.6.3. Das ^{1}H-^{1}H NOESY ... 20
2.6.6.4. Dreidimensionale Varianten von TOCSY und NOESY ... 21
2.6.6.5. Das HNHA ... 22
2.6.6.6. Das CBCA(CO)NH ... 23
2.6.6.7. Das HNCA ... 23
2.6.7. Sekundärstruktur-Ermittlung ... 23
2.6.8. Berechnung der dreidimensionalen Struktur ... 24
2.7. Aufgabenstellung ... 26

3. Material 28

3.1. Chemikalien und Laborprodukte ... 28
3.1.1. Chemikalien ... 28
3.1.2. Laborprodukte ... 28

3.2. Plasmide ... 29
3.2.1.1. pREP4 ... 29
3.2.1.2. pREP4-Gsp ... 29
3.2.1.3. pQE60-TycA-PCP ... 29
3.2.1.4. pQE70-TycC3-PCP ... 30
3.3. Bakterienstämme ... 30
3.4. Medien und Puffer ... 30
3.4.1. Medien ... 30
3.4.2. Puffer ... 31
3.4.2.1. Bindepuffer ... 31
3.4.2.2. Harnstoff-Bindepuffer ... 31
3.4.2.3. Elutionspuffer ... 31
3.4.2.4. NMR-Puffer ... 31

4. Methoden 32

4.1. Molekularbiologische Methoden ... 32
4.2. Biochemische Methoden ... 32
4.2.1. Expression von PCPs in *E. coli* ... 32
4.2.1.1. Expression unmarkierter PCPs ... 32
4.2.1.2. Expression ^{15}N und ^{13}C-markierter PCPs ... 32
4.2.1.3. Zellaufschluß ... 33
4.2.1.4. Proteinreinigung mittels IMAC (Nickelchelat-Chromatographie) ... 33
4.2.1.5. Rückfaltung denaturierend aufgereinigter PCPs ... 34
4.2.2. Beladungsassays ... 34
4.2.2.1. Phosphopantetheinylierungsassay (HPLC) ... 34
4.2.2.2. Phosphopantetheinylierungsassay (Autoradiogramm) ... 35
4.2.2.3. Aminosäure-Beladungsassay ... 35
4.2.3. NMR-Probenbereitung ... 36
4.3. NMR-Spektroskopie ... 37
4.3.1. Spektrometer ... 37
4.3.2. Experimente für das Assignment ... 37
4.3.3. Experimente zur Bestimmung von Diederwinkeln ... 37
4.3.4. Relaxationsmessungen ... 38
4.3.5. Spektrenprozessierung ... 38
4.3.6. Spektrenauswertung und Festsetzung der Randbedingungen ... 39
4.4. Grafikanwendungen ... 39

5. Ergebnisse **40**

5.1. Expressionssysteme für PCPs ... 40

5.1.1. Expressionssystem für *apo*-TycA-PCP ... 40

5.1.2. Expressionssysteme für *apo*-TycC3-PCP ... 41

5.1.3. Expressionssystem für *holo*-TycC3-PCP ... 41

5.2. Expression und Aufreinigung der PCPs ... 42

5.2.1. Präparation von *apo*-TycA-PCP und NMR-spektroskopische Untersuchungen ... 42

5.2.2. Präparation von *apo*- und *holo*-TycC3-PCP ... 43

5.3. Biochemische Untersuchungen an TycC3-PCP ... 44

5.3.1. *In vitro*-Phosphopantetheinylierung von TycC3-PCP durch Sfp ... 44

5.3.2. Quantifizierung der Phosphopantetheinylierung mittels HPLC ... 45

5.3.3. *In trans*-Beladung durch eine A-Domäne ... 45

5.4. NMR-Spektroskopie und Strukturaufklärung ... 46

5.4.1. HSQC-Spektrum ... 48

5.4.2. Sequentielle Zuordnung der Amidprotonresonanzen ... 49

5.4.3. Sekundärstruktur-Bestimmung ... 50

Berechnung der 3D-Struktur ... 52

5.5. 3D-Struktur von TycC3-PCP in Lösung ... 56

5.5.1. Qualität der Strukturbestimmung ... 59

5.5.2. Topologie und Hydrophobizität ... 61

5.6. Relaxationsmessungen an PCP ... 62

5.7. Die Ergebnisse zusammengefaßt ... 64

6. Diskussion **65**

6.1. Definition der strukturellen Einheit von PCP-Domänen nichtribosomaler Peptidsynthetasen ... 65

6.2. Vergleich von PCP mit den Acyl-Carrier-Proteinen ... 66

6.3. Interaktionen von PCP mit den anderen Domänen ... 68

6.3.1. Welche Bedeutung hat die Flexibilität des Loops ? ... 68

6.3.2. ACPs und PCP unterscheiden sich im Loop ... 69

6.3.3. Andere Carrier-Domänen ... 71

6.4. PCP bietet keine Bindetasche für das Peptid-Substrat, es ist unselektiv ... 71

6.5. Ausblick ... 72

7. Anhang **73**

7.1. Verwendete Spektren 73

7.2. Signalzuordnungen 74

7.3. Randbedingungen für die Strukturrechnung 76

7.4. Abkürzungen 86

7.5. Abbildungsverzeichnis 87

8. Literatur **88**

2. Einleitung

2.1. Sekundärmetabolite und Antibiotika

Neben den zur Aufrechterhaltung der Stoffwechselfunktion zwingend erforderlichen Metaboliten produzieren viele Organismen eine Reihe sogenannter Sekundärmetaboliten von unüberschaubarer struktureller Vielfalt. Diesen läßt sich keine lebensnotwendige Funktion zuordnen, oft ist sie gänzlich im Unklaren, und die Produktion dieser Stoffe findet oftmals in geringen oder schwankenden Mengen und in bestimmten Wachstumsphasen statt. Viele Sekundärmetabolite bzw. deren Derivate werden heute für humane Belange genutzt und in technischem Maßstab produziert, darunter findet sich eine große Zahl an Arzneimitteln von großer Bedeutung wie Cytostatika, Immunsuppressiva und Antibiotika [Strohl, 1997; von Döhren & Kleinkauf, 1997].

Im Wettlauf der Infektionsbekämpfung durch Antibiotika mit der außerordentlichen Anpassungsfähigkeit pathogener Mikroorganismen durch deren vielseitige Möglichkeiten, Genaustausch und –rekombination zu betreiben, nehmen die durch den Selektionsdruck geförderten Resistenzen zu. Der Bedarf an neuen Wirkstoffen steigt ständig. Neben der dringend nötigen Hinwendung zu kritischem und sorgfältig dosiertem Einsatz von Antibiotika wird auch in naher Zukunft die Erforschung dieser Wirkstoffe an Bedeutung nicht verlieren.

Die Antibiotika werden meist nach strukturellen Kriterien in Gruppen eingeteilt, wie beispielsweise in makrozyklische Lactone (z.B. Polyene und Makrolide), Chinone (z.B. Tetracycline), aromatische (z.B. Chloramphenicol) und Aminosäuren- und Peptidantibiotika (z.B. β-Lactame) [Dax, 1997]. Bei den Bodenbakterien der Gattung *Bacillus* treten die Peptidantibiotika als größte Gruppe der produzierten Sekundärmetabolite in den Vordergrund, wenngleich trotz umfangreicher Forschungsergebnisse nur wenig über deren Bedeutung für den jeweiligen Produzenten bekannt ist. Zu den wohl plausibelsten der ihnen zugeschriebenen Aufgaben gehören die Bekämpfung von Konkurrenten durch toxische Effekte und die Aufnahme von Spurenelementen wie z.B. Eisen(III) durch Siderophore [von Döhren & Kleinkauf, 1997].

2.2. Nichtribosomal synthetisierte Peptidantibiotika

Die von Mikroorganismen produzierten Peptidantibiotika lassen sich der Art ihrer Synthese nach in zwei Kategorien einteilen: ribosomal synthetisierte Peptide und nichtribosomal synthetisierte.

In der erstgenannten Klasse werden die Peptide, die genetisch kodiert sind, nach dem Prinzip der Proteinbiosynthese am Ribosom translatiert und in der Regel posttranslational stark modifiziert. Eine recht bekannte Gruppe der ribosomal hergestellten Peptidantibiotika bilden die Lantibiotika, benannt nach den enthaltenen Derivaten der Thioether-Aminosäure Lanthionin, die aus Modifikation von Threonin- oder Serinresten mit Cystein entstehen. Das Subtilin ist ein bekannter Vertreter dieser Gruppe [Nishio *et al.*, 1983].

Die nichtribosomal synthetisierten Peptidantibiotika dagegen werden an eigens hierzu bereitgehaltenen multifunktionellen, modularen Enzymen von beachtlicher Größe synthetisiert, den sogenannten nichtribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS) [Marahiel, 1997; Marahiel *et al.*, 1997]. Durch die Existenz von eigenständigen Modulen für den Einbau jedes einzelnen Bausteins in das Produkt erschließt sich diesen Enzymen eine Substratvielfalt, die mit der des Ribosoms kaum zu vergleichen ist. Mehrere hundert verschiedene Reste konnten schon als Bestandteile von nichtribosomal synthetisierten Peptiden nachgewiesen werden [Kleinkauf & von Döhren, 1990]. Neben D-Aminosäuren, N-methylierten Aminosäuren, Carbonsäuren, β-Hydroxycarbonsäuren u.a. tragen auch unterschiedliche Verknüpfungen wie Ester- und Lactonbindung sowie Ausbildung von Heterozyklen wie dem Thiazolinring in Bacitracin A [Konz *et al.*, 1997] zur Produktvielfalt bei [Marahiel *et al.*, 1997; von Döhren *et al.*, 1997].

2.3. Nichtribosomale Peptidsynthese

Nichtribosomale Peptidsynthetasen sind modular aufgebaute Enzyme. Ein Modul wird als funktionell und strukturell unabhängige Einheit definiert, die die Aktivierung, kovalente Fixierung und den Einbau jeweils einer bestimmten Substrat-Aminosäure in das Peptidprodukt bewerkstelligt [Lipmann, 1980]. Dabei stellen die Module in ihrer genetischen Reihenfolge (und in der Reihenfolge innerhalb des Multienzyms) die Matrize für das Peptidprodukt dar, indem jedes Modul seine aktivierte Substrat-Aminosäure kovalent an einen 4'-Phosphopantetheinyl- (4'PP-) Kofaktor knüpft [Schlumbohm *et al.*, 1985; Vater *et al.*, 1985], mit dem alle Module ausgestattet sind (*multiple carrier thiotemplate*-Mechanismus [Stein *et al.*, 1996]).

Die Aufgabe, mehrere Reaktionsschritte durchführen zu müssen, die sich bei dieser Organisation einem Modul stellt, wird innerhalb des Moduls auf spezifische Domänen aufgeteilt, die weitestgehend strukturell eigenständig und durch flexible

Linker verbunden sind [Stachelhaus & Marahiel, 1995; Dieckmann *et al.*, 1999]. Die Substratselektivität des Moduls liegt in einer Adenylierungs- (A-)Domäne von ca. 550 AS, die das Substrat in einer Bindetasche selektiv bindet und unter ATP-Hydrolyse als Aminoacyladenylat aktiviert [Turgay *et al.*, 1992]. Diese chemisch wertvolle, da energiereiche Zwischenstufe wird von einer meist unmittelbar auf die A-Domäne folgenden Peptidyl-Carrier-Protein- (PCP-) Domäne (auch als Thioester-/T-Domäne bezeichnet) stabilisiert, indem die Thiolfunktion des an diese Domäne posttranslational angebrachten 4'PP-Kofaktors das Substrat als Thioester kovalent übernimmt und AMP als Abgangsgruppe freisetzt (siehe Abb. 2.1) [Stachelhaus *et al.*, 1996; Stein *et al.*, 1994; Schlumbohm *et al.*, 1985].

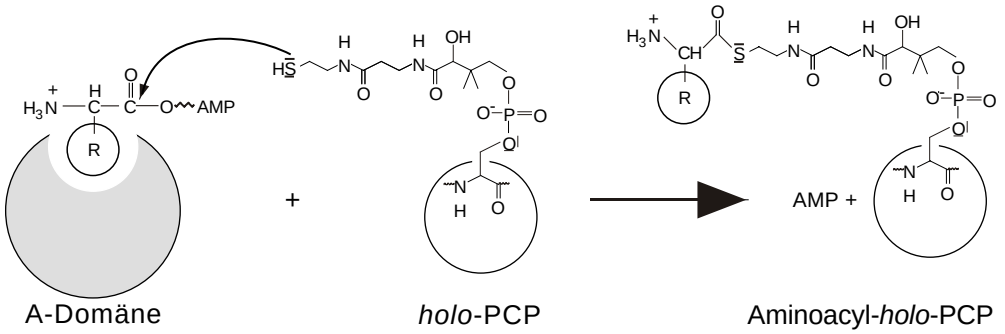

Abb. 2.1: Fixierung der aktivierten Aminosäure als Thioester am 4'PP-Kofaktor des PCPs

Die aktivierte Aminosäure liegt zunächst als Aminoacyladenylat enzymassoziiert auf der A-Domäne (grau) vor. Die kovalente Fixierung erfolgt durch Angriff der Thiolgruppe des 4'PP-Arms der nachfolgenden PCP-Domäne (weiß) an der Carbonylgruppe des Substrats. Unter Freigabe von AMP entsteht ein Thioester von Substrat und Kofaktor, der erst in der Kondensationsreaktion (nicht dargestellt) unter Rekonstitiution des 4'PP-Thiols wieder aufgegeben wird.

Ein Modul, das ausschließlich aus einer A- und einer PCP-Domäne besteht, wird als Minimalmodul bezeichnet. Die Knüpfung einer Peptidbindung zwischen zwei Thioester-Substraten, die an die PCP-Domänen zweier aufeinanderfolgender Module gebunden sind, wird durch eine Kondensations- (C-) Domäne katalysiert, die zwischen diesen Modulen angebracht ist und das Substrat des ersten 4'PP-Arms in einer Peptidbindung an die Aminofunktion der zweiten Aminosäure bindet, so daß der erste 4'PP-Kofaktor wieder eine freie Thiolgruppe bekommt und am zweiten ein um eine Einheit gewachsenes Peptid C-terminal als Thioester hängt [Stachelhaus *et al.*, 1998]. Durch Wiederholung dieser Schritte in geordneter Reihenfolge von Modul zu Modul einer NRPS entsteht das fertige Produkt, das durch Hydrolyse oder Zyklisierung von der Thioesterbindung des letzten 4'PP-Arms befreit wird [Kleinkauf & von Döhren, 1990; Kleinkauf & von Döhren, 1996].

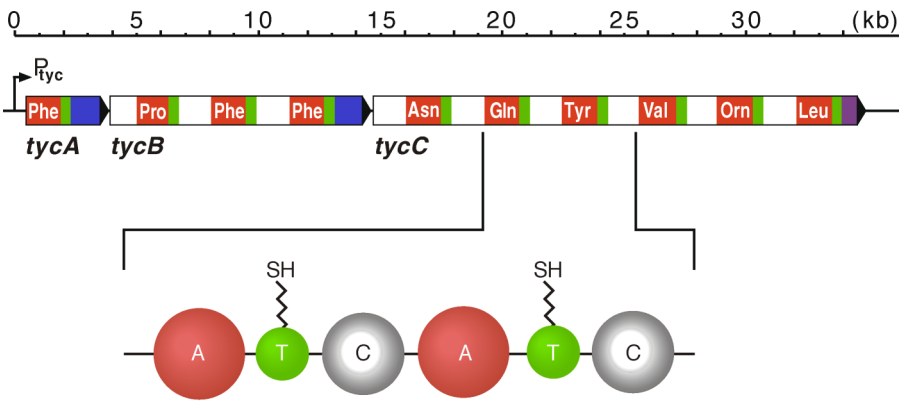

Abb. 2.2: Modulare Struktur nichtribosomaler Peptidsynthetasen

Am Beispiel des tyc-Operons (oben) und einem Ausschnitt aus einem der kodierten Proteine (unten) wird der modulare Aufbau deutlich. Rot: A-Domäne, grün: PCP, weiß/grau: C-Domäne, blau: E-Domäne, violett: Thioesterase-Domäne. Die 4'PP-Kofaktoren an jedem PCP sind schematisch dargestellt. Der unten dargestellte Proteinausschnitt umfaßt die Module TycC2 und TycC3.

Die als Thioester gebundenen Zwischenstufen dieser Synthese können Modifikationen durch optionale Domänen erfahren, die zusätzlich in die jeweiligen Module integriert sein können. Hierzu zählen Epimerisierungs- (E-) Domänen, die, hinter der PCP-Domäne in das Modul integriert, das Stereozentrum der von dem Modul aktivierten Aminosäure auf dem 4'PP-Kofaktor konvertieren können (Einbau von D-Aminosäuren) und auch N-Methylierungs- (M-) Domänen, die zwischen A- und PCP-Domäne insertiert sein können und den Methylgruppentransfer auf das Stickstoffatom der jeweiligen als Thioester gebundenen Aminosäure ermöglichen [Konz & Marahiel, 1999].

2.4. Das Peptidyl-Carrier-Protein PCP

Die PCP-Domäne, auch T-Domäne genannt wegen ihrer Aufgabe, das Substrat kovalent in Form eines Thioesters zu fixieren, ist ein eigenständiger Bereich von etwa 75 AS Länge auf dem Polypeptidstrang eines Moduls. Von der vorausgehenden (meist A-) und nachfolgenden Domäne ist sie durch flexible Linker-Regionen getrennt. Nach der ersten Präsentation eines von einer solchen Domäne abgeleiteten separaten Proteins, das *in vitro* durch eine zugegebene A-Domäne in Gegenwart von ATP mit einer Aminosäure beladen werden konnte [Stachelhaus *et al.*, 1996], folgten weitere Konstrukte (Dökel, unpublizierte Ergebnisse), so daß sich die verallgemeinernde Bezeichnung Peptidyl-Carrier-Protein (PCP) sowohl für diese abgeleiteten Proteine als auch für die ursprünglichen Domänen etablierte.

```
                                                   core T
TycC3-PCP (3036)   AQYVAPTNAVESKLAEIWERVLGVSGIGILDNFFQIGGHSLKAMAVAAQVHREYQVELPLKVLFAQPTIKALAQYVATSGKET (3118)
SrfAB1-PCP (961)   PEYAAPKTESEKKLAEIWEGILGV-KAGVTDNFFMIGGHSLKAMMMTAKIQEHFHKEVPIKVLFEKPTIQELALYLEENESKE (1042)
BacA1-PCP  (535)   NEYEAPRNETEEKLAAVWQDVLHVEKAGIHDHFAQMGGHSLHAMELIAKIKEKMNVEIPLHQLFKLATIKELSAFIEANHQED  (617)
GrsA-PCP   (534)   VDYEAPRNEIEETLVTIWQDVLGIEKIGIKDNFYALGGDSIKAIQVAARLHS-YQLKLETKDLLKYPTIDQLVHYIKDSKRRS  (615)
act ACP      (1) MATLLTTDDLRRALVECAGETDGTDLSGDFLDLRFEDIGYDSLALMETAARLESRYGVSIPDDVAGRVDTPRELLDLINGALAEAA  (86)
dps ACP      (1)   MAELSLAELREIMRQSLGEDEVPDLADADTVTFEDLGLDSLAVLETVNHIERTYGVKLPEEELAEVRTPHSMLIFVNERLRAAA  (84)
FAS-ACP (Eco)(1)      MSTIEERVKKIIGEQLGVKQEEVTNNASFVEDLGADSLDTVELVMALEEEFDTEIPDEEAEKITTVQAAIDYINGHQA     (78)
FAS-ACP (Bsu)(1)      MADTLERVTKIIVDRLGVDEADVKLEASFKEDLGADSLDVVELVMELEDEFDMEISDEDAEKIATVGDAVNYIQNQQ     (77)
```

Abb. 2.3: Sequenzvergeich einiger beispielhaft ausgewählter PCPs und ACPs

Gelb hinterlegt sind Aminosäuren, die an dieser Position mehrheitlich im Alignment vorkommen, grün markiert sind Aminosäuren, die mit dem core T-Motiv (I/L)GG(D/H)S(I/L) übereinstimmen. Obere Kategorie: PCPs aus der B. brevis Tyrocidin-Synthetase (TycC3-PCP), Surfactin-Synthetase (SrfAB1-PCP), Gramicidin S-Synthetase (GrsA-PCP) und B. licheniformis Bacitracin-Synthetase (BacA1-PCP); mittlere Kategorie: PKS-ACPs aus der S. coelicolor Actinorhodin-Synthase (act ACP) und S. peucetius Daunorubicin-Synthase; untere Kategorie: Fettsäuresynthase-ACPs von E. coli (Eco) und B. subtilis (B. subtilis). In Klammern die Nummern der ersten und letzten AS innerhalb des jeweiligen vollständigen Proteins.

Der 4'-Phosphopantetheinyl-Kofaktor wird an einen hochkonservierten Serinrest in der Mitte des Proteins angebracht [Schlumbohm *et al.*, 1991], der Bestandteil einer stark konservierten, sogenannten *core T*-Sequenz (I/L)GG(D/H)SL ist, die wiederum das Erkennungsmerkmal dieser Domäne auf der Sequenzebene darstellt. Die *core T*-Sequenz haben PCPs mit den *acyl carrier* Proteinen (ACPs) der Fettsäuresynthasen (FAS) und der Polyketidsynthasen (PKS) gemeinsam, zu denen ansonsten keine starke Sequenzhomologie auffällt, die aber in ihrem jeweiligen Biosynthesesystem eine vergleichbare Funktion wahrnehmen, eine ähnliche Größe besitzen und das hochkonservierte Serin etwa gleich positioniert aufweisen (Abb. 2.3). Der Mechanismus der nichtribosomalen Peptidsynthese spiegelt den der Synthese von höheren Fettsäuren und Polyketiden wider, denn sowohl Typ I Polyketidsynthasen (PKS) als auch die Fettsäuresynthasen (FAS, *fatty acid synthases*) sind modular organisiert und katalysieren einen wiederholten Zyklus von decarboxylierender Kondensation kleinerer Acyleinheiten. Dabei kondensieren die Fettsäuresynthasen komplett reduzierte Substrate nach Ketoreduktion, Dehydratisierung und Enoylreduktion, während Polyketidsynthasen einige dieser Schritte auslassen oder modifizieren können, woraus sich eine große Produktvielfalt ableitet. Im Gegensatz zu diesen modularen Typ I-Systemen bestehen Typ II-Systeme der FAS und PKS aus distinkten Proteinen statt aus Domänen, aber die Organisation der Einheiten im Enzym bleibt im Prinzip gleichartig. So finden sich distinkte ACPs in Typ II-FAS und Typ II-PKS, die in ihrem jeweiligen System die Funktion haben, an einem 4'PP-Kofaktor die wachsende Fettsäure- bzw. Polyketidkette kovalent zu fixieren und zu den einzelnen Reaktionsloci zu reichen [Wakil, 1989; Hopwood & Sherman, 1990].

Die posttranslationale Modifikation dieser Carrierproteine verschiedener Systeme erfolgt durch unterschiedlich spezifische Mitglieder einer Enzymfamilie von 4'-Phosphopantetheinyltransferasen (PPTasen) [Lambalot *et al.*, 1996]. Sie katalysieren die Reaktion zwischen dem hochkonservierten Serinrest und Koenzym A, wobei

3‘,5‘-ADP freigesetzt und die 4‘PP-Gruppe als Phosphodiester am Serinsauerstoff fixiert wird (Abb. 2.4). Es hat den Anschein, daß für jedes einzelne System eine eigene PPTase vorhanden ist, z.B. ACPS für das *E. coli* FAS-ACP, Gsp für die Gramicidin S Synthetase oder Sfp für die Surfactin-Synthetase. Eine Besonderheit von Sfp besteht darin, daß es nicht nur die PCP-Subfamilie der Carrier-Proteine modifiziert sondern alle bislang getesteten, also auch ACPs, wodurch es sich zu einem nützlichen Werkzeug macht [Lambalot *et al.*, 1996].

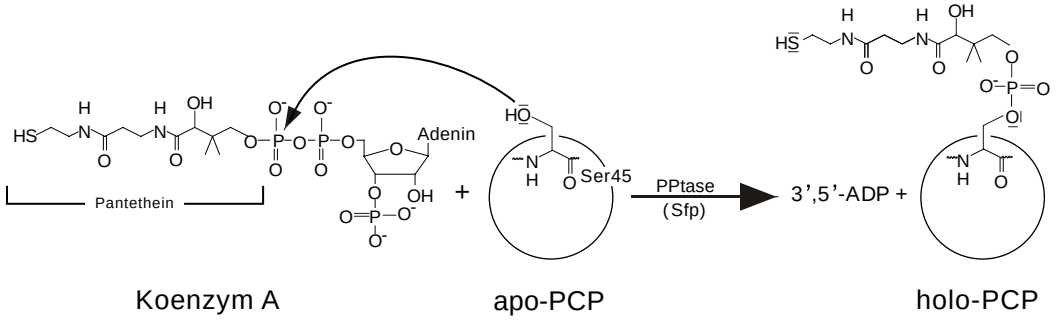

Abb. 2.4: Schema der posttranslationalen Modifikation von PCP durch eine PPTase

Vermutlich greift in der durch die PPTase (z.B. Sfp) katalysierten Reaktion das Sauerstoffatom der Serinseitenkette die β-Phosphatgruppe von CoA an und verdrängt die Abgangsgruppe 3‘,5‘-ADP. Hierzu wird sicherlich das Proton von der Serin-Hydroxylgruppe durch eine Base zumindest teilweise abstrahiert.

2.5. Strukturelles Umfeld von PCP

In den letzten Jahren haben Bemühungen um Strukturinformationen über Details der nichtribosomalen Peptidsynthese zu ersten Erfolgen geführt, die beachtliche Fortschritte auf dem Weg zur Aufklärung der Funktionsweise von NRPS darstellen. Mit der Aufklärung der Kristallstruktur der Phenylalanin-aktivierenden Gramicidin S-Synthetase I A-Domäne (auch PheA genannt) im Komplex mit Phenylalanin und AMP [Conti *et al.*, 1997] wurden die molekularen Grundlagen für die Substratselektivität dieser Domänen offengelegt.

PheA zeigt nahezu eine identische Struktur wie die zuvor publizierte Kristallstruktur der *Photinus pyralis*-Luciferase, mit der erstaunlicherweise nur 16% Sequenzhomologie bestehen. Auch die Luciferase ist ein Adenylat-bildendes Enzym. Es besteht, wie auch die A-Domäne, aus einer großen Untereinheit, die bei der A-Domäne das Aminosäure-Substrat in einer Tasche bindet, und einer kleineren, die offenbar nach Substratbindung wie ein Schwingdeckel über die Bindetasche geschwenkt werden kann. In der Luciferase, die ohne Substrate kristallisiert wurde, ist die kleine Untereinheit um 94° weggedreht von der putativen Bindestelle,

während in dem PheA-Substrat-Kokristall die kleine Domäne über der Substrat-Tasche steht und mit einem unter A-Domänen hochkonservierten Lysinrest (K517) die Carboxylfunktion des Phenylalanins stabilisiert. Die Mehrzahl der unter A-Domänen hochkonservierten Reste (sogenannte *core A*-Motive) sind an der Formierung der Substratbindetasche beteiligt, sie sind auf einen Teil von etwa 100 Resten des ungefähr 550 AS langen Proteins verteilt. Die Reste, die unmittelbaren Kontakt zur Substratseitenkette haben und die Taschenwand bilden (vergl. Abb. 2.5), liegen ebenfalls in diesem Bereich und sind weniger konserviert unter A-Domänen. Eine genauere Analyse dieser Reste hat gezeigt, daß bestimmte Kombinationen immer mit bestimmten Substraten zusammenfallen, woraus ein System von 9 Resten abgeleitet werden konnte, das quasi analog zu den 3-Basen-Kodons des genetischen Codes für die Substratselektivität der ganzen A-Domäne kodiert. Diese Entdeckung macht es nicht nur möglich, sofort anhand der Aminosäuresequenz einer A-Domäne deren Substrat relativ sicher voraussagen zu können, sondern sie bereitet den Weg für zielgerichtete Mutagenesen, die ohne umständliches Austauschen ganzer A-Domänen deren Selektivität ändern können. Einige Erfolge in dieser Richtung wurden bereits erzielt [Stachelhaus *et al.*, 1999].

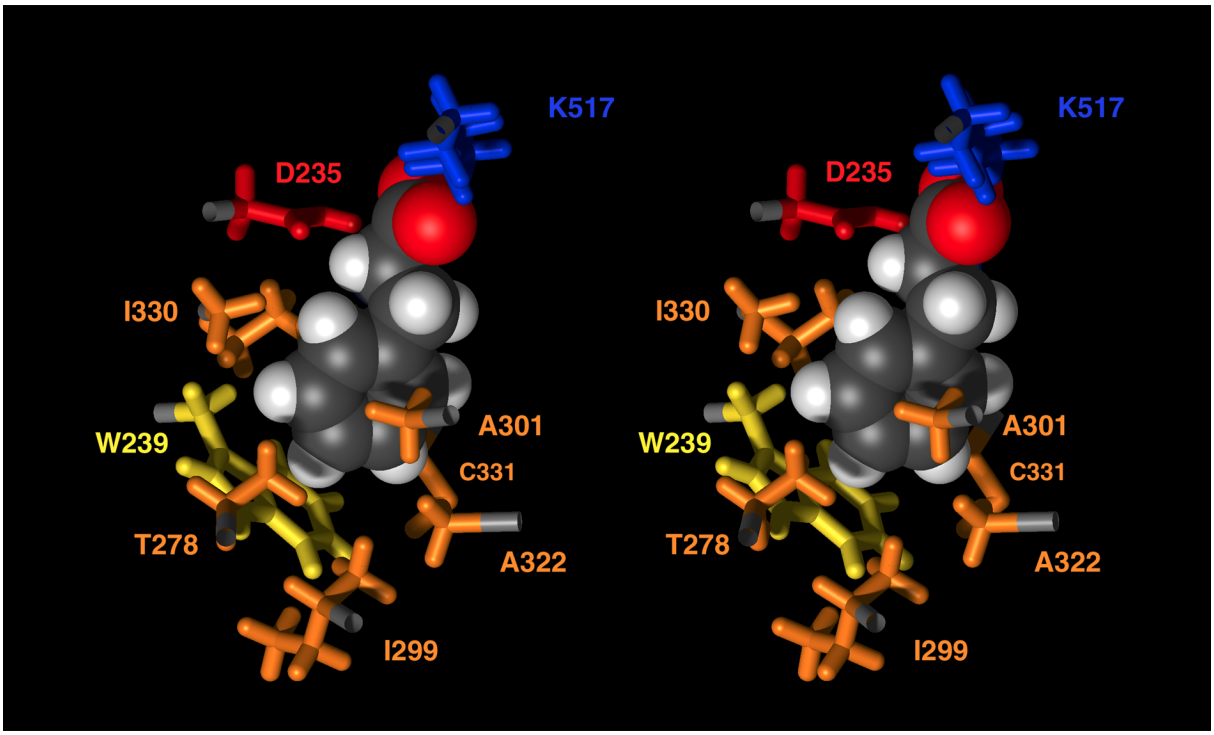

Abb. 2.5: Phenylalanin in der Substrat-Bindetasche von PheA

Stereobild des Phenylalanin-Moleküls (als Kalottenmodell) in Umgebung der Seitenketten von PheA, die die Bindetasche formen. Ungeladene Seitenketten sind orange, das aromatische Tryptophan gelb, das saure Aspartat rot und das basische Lysin blau dargestellt. Die Koordination der Lysin-Seitenkette an die Phenylalanin-Carboxylgruppe ist gut zu erkennen; das Aspartat koordiniert im Hintergrund an die (nicht sichtbare) Amino-funktion des Substrats. Die hydrophoben Reste im unteren Teil der Tasche zeigen eindrucksvoll, wie diese für die Phenylalanin-Seitenkette vorgeformt ist und zeigen auf, welche Reste verändert werden können, um andere Substrate in der Tasche zu binden.

Mit der vor kurzem veröffentlichten Kristallstruktur der PPTase Sfp [Reuter *et al.*, 1999] wurde Licht auf ein Enzym geworfen, das zwar nicht direkt an der Peptidsynthese an einer NRPS beteiligt ist, wohl aber eine Schlüsselrolle in der posttranslationalen Ausstattung dieser Multienzymkomplexe mit dem 4'PP-Kofaktor spielt. Sfp als der Vertreter der PPTasen mit der wohl am breitesten aufgefächerten Selektivität für bisher alle getesteten PCPs und ACPs [Lambalot *et al.*, 1996] ist ein wichtiges Werkzeug im Umgang mit NRPS.

Die Sfp-Struktur (Abb. 2.6) zeigt einen neuen Faltungstyp für CoA-bindende Enzyme mit einer intramolekularen 2-fachen Pseudosymmetrie, die das Molekül in zwei Hälften von je etwa 100 AS unterteilt (die C-terminalen 15 Reste haben kein Pendant im N-Terminus). Es werden zwei Klassen von PPTasen unterschieden, der Sfp-Typ und der ACPS- (*E. coli holo*-Acyl Carrier Protein Synthase-) Typ, wobei der Sfp-Typ etwa doppelte Größe aufweist und offenbar meist monomer auftritt, während der ACPS-Typ Dimere bildet. Die bei Sfp beobachtete Pseudosymmetrie, unterstützt von Sequenzhomologien, schlägt nun vor, daß der ACPS-Typ eine ähnliche Topologie haben wird, wobei die zwei pseudosymmetrischen Sfp-Hälften durch die zwei Proteinmoleküle des ACPS-Typ-Dimers ersetzt sind.

Die Art der CoA-Bindung durch Sfp ist neuartig, was nicht verwunderlich ist in Anbetracht der Tatsache, daß die bisher bekannten Strukturen von Enzymen stammen, die Modifikationen an der Thiolfunktion, also dem anderen Ende des Moleküls, vornehmen. Folglich ist bei Sfp nicht dieser Teil von CoA im reaktiven Zentrum fixiert, sondern die Pyrophosphatgruppe. Diese wird durch das für die Reaktion essentielle Magnesiumion und durch bestimmte Seitenketten im reaktiven Zentrum gehalten. Der β-Mercaptoethylamin-Teil von CoA ist derart wenig mit dem Protein in Kontakt, daß verkürzte, modifizierte oder sogar bereits als Thioester beladene 4'PP-Kofaktoren (z.B. durch Verwendung von Acetyl-CoA) auf ein Substratprotein übertragen werden können [Quadri *et al.*, 1998; Belshaw *et al.*, 1999].

Der Reaktionsmechanismus zur Übertragung des Kofaktors auf PCP bleibt vorerst um Unklaren. Die Mulde, die nach hinten durch die Faltblätter und zur Seite durch die anliegenden Helices begrenzt wird und in der das CoA gebunden vorliegt, weist einige polare Gruppen in der Umgebung des Reaktionszentrums auf, aber es bleibt offen, wie sich ein PCP dem Zentrum nähern muß, damit es modifiziert werden kann. Die Koordination eines Wassermoleküls an das Magnesiumion bietet Grund zur Annahme, daß diese Position durch den Sauerstoff der konservierten Serinseitenkette des PCPs belegt und so eine günstige Koordination der Reaktionspartner herbeigeführt wird.

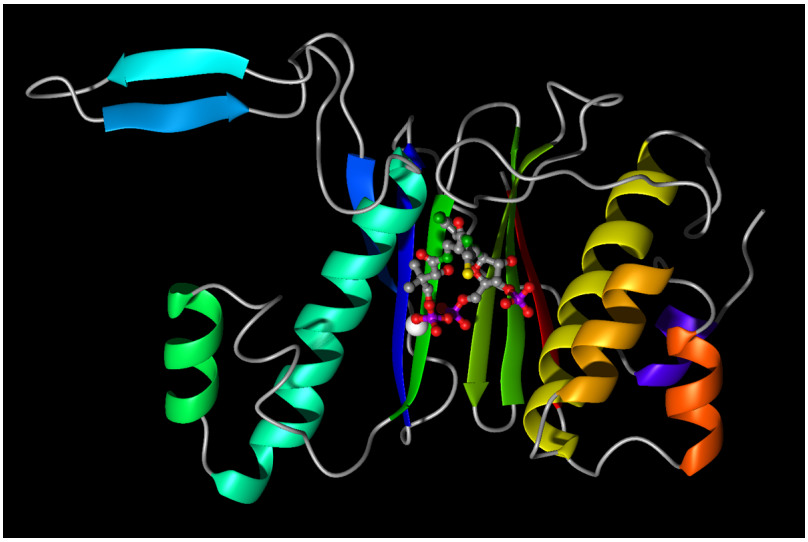

Abb. 2.6: Struktur der PPTase Sfp

Das Protein ist als Ribbon-Modell dargestellt; der N-Terminus beginnt in rot, dann ändert sich die Farbe entlang des Peptidstranges über gelb und grün nach blau, bis die C-terminale Helix violett gefärbt ist. Das Substrat CoA ist als Stäbchenmodell zu sehen, dessen Pyrophosphatgruppe durch das benötigte Mg^{2+}-Ion (weiß) fixiert wird. Die von PCP angegriffene β-Phosphatgruppe ist die linke im Bild; der 4'PP-Teil von CoA erstreckt sich dann zunächst nach oben im Bild, dann geht er auf den Betrachter zu und endet mit der gelben Thiolgruppe.

2.6. Kernresonanzspektroskopie von Proteinen

In vielen biochemisch orientierten Arbeitsgruppen ist die Kernresonanzspektroskopie (NMR) als Methode zur Aufklärung dreidimensionaler Strukturen von Proteinen noch nicht als etablierte Standardmethode neben der Röntgenstrukturanalyse von Kristallen bekannt. Daher sollen die Besonderheiten dieser Technik im Vergleich mit der Kristallographie im folgenden kurz angesprochen werden.

2.6.1. NMR als alternative Methode zur Proteinstrukturbestimmung

Neben der Kristallographie steht die NMR-Spektroskopie als gängige Methode zur Verfügung, um an dreidimensionale Strukturen von Proteinen oder Nucleinsäuren mit atomarer Auflösung zu gelangen. Die Stärken dieser Technik zur Strukturaufklärung liegen darin, daß durch sie neben der strukturellen Information solche über Dynamik und auch über schwache Interaktionen z.B. mit Liganden gewonnen werden können [Wüthrich, 1986]. Das Hinzukommen der NMR-Spektroskopie zur Kristallographie führte zu einer gegenseitigen Validierung beider Techniken; in der Tat hat die Verfügbarkeit ergänzender Information zum präzisen, aber starren Bild der Kristallstruktur zu einer kritischeren Betrachtung geführt.

Vergleich von NMR- und Röntgenstrukturanalyse-Modellen desselben Proteins weisen jedoch im allgemeinen keine gravierenden Unterschiede auf, und Diskrepanzen sind meist auf fehlerhafte Ausführung einer Methode oder Kristallisationsartefakte zurückzuführen, oder sie sind in dem unvollständigen Eindruck begründet, der durch die Anwendung nur einer Methode entsteht [Wagner *et al.*, 1992].

2.6.2. NMR ist zur gleichwertigen Methode gereift

Der beträchtliche Anteil, den die NMR-Spektroskopie an den zur Zeit abrufbaren Einträgen in der Brookhaven Protein-Datenbank (PDB) hat, belegt, daß die Kernresonanzspektroskopie zu einer der Kristallstrukturbestimmung gleichzustellenden Standard-Technik herangereift ist, wobei letztere schon etwa 25 Jahre länger praktiziert wird [Wagner, 1997]. Am 1. 1. 2000 entfielen von den 11.867 PDB-Einträgen 9725 Beiträge auf Kristallographie und andere Techniken, 1881 auf NMR und 261 auf theoretische Modelle. Zu dieser Entwicklung haben eine Reihe von Verbesserungen in den letzten Jahrzehnten beigetragen, angefangen bei technischen Neuerungen bis hin zur Einführung des Produkt-Operator-Formalismus zur einfachen Behandlung der zeitlichen Evolution von Spins bei Einwirkung von Radiofrequenzpulsen [Sørensen *et al.*, 1983]. Die Entwicklung von Expressionsmethoden zur Herstellung ^{15}N- und ^{13}C-markierter Proteinproben und die dreidimensionale Spektroskopie [Macintosh & Dahlquist, 1990; Lemaster, 1994; Fesik & Zuiderweg, 1988; Marion *et al.*, 1989c] reduzierten das Überlappungsproblem bei großer Signaldichte erheblich, und die Benutzung von ^{1}H, ^{13}C, ^{15}N-Tripleresonanzexperimenten [Montelione & Wagner, 1990; Kay *et al.*, 1990] zum sekundärstrukturunabhängigen sequenziellen Assignment ermöglichte den Zugang auch zu Proteinen mit größeren ungefalteten Bereichen. Die Verwendung von gepulsten Feldgradienten machte einige zeitintensive und unsaubere Phasenzyklen unnötig und die Wasserunterdrückung verbesserte sich [Hurd, 1990], und schließlich wurde die vollständige oder partielle Deuterierung von Proteinen zur Vereinfachung von Multipletts und Verringerung der Linienbreite benutzt [Lemaster, 1994].

Als Ergebnis dieser ständigen Neuerungen in der Methodik stehen heute dreidimensionale Strukturen von Proteinen mit bis zu 40 kDa [Garrett *et al.*, 1997; Matsuo *et al.*, 1997] und sequentielle Assignments von Komplexen mit bis zu 60 kDa Gesamtgröße [Shan *et al.*, 1996]. Weitere, ständige Verbesserungen sind abzusehen [Wüthrich, 1998].

2.6.3. NMR komplementiert die Information von Kristallstrukturen

Das Bild eines starren Moleküls mit fest definierten Atompositionen, das man von Proteinen hatte, als die Kristallstrukturbestimmung die einzig verfügbare Methode war, mußte 1975 erheblich umgestaltet werden, als durch NMR-spektroskopische Untersuchungen gezeigt wurde, daß sich die Phenylringe von Tyrosin und Phenylalanin bei Raumtemperatur ständig drehen [Snyder *et al.*, 1975; Wüthrich & Wagner, 1975]. Dies ließ sich nicht mit einem starren Modell vereinbaren, denn in einer rigiden Umgebung hätten die Phenylringe aufgrund der van-der-Waals-Interaktionen Rotationsbarrieren von bis zu 100.000 kcal/mol zu überwinden. Daraus muß auf

Fluktuationen in der Umgebung der Aromaten in einer Größenordnung von 1.7 Å geschlossen werden [Wagner, 1980]. Interessanterweise liegt die Auflösung vieler Kristallstrukturen bei niedrigeren Werten, hier stellt sich die Frage nach der Aussagekraft der Präzision solcher Strukturen. Der Einfluß, den das Fehlen dynamischer Information auf das gewonnene Strukturbild haben kann, wird anhand des Beispiels Calmodulin besonders deutlich. In der Calmodulin-Kristallstruktur werden zwei globuläre EF-Hand-Domänen durch eine lange Helix miteinander verbunden [Babu *et al.*, 1985]. NMR-Untersuchungen haben hingegen gezeigt, daß diese Helix in Lösung nicht stabil ist und sich nach Zugabe eines Liganden das Calmodulin sich gar um diesen herumlegt [Ikura *et al.*, 1992].

2.6.4. Vorteile durch die Messung in Lösung

Die Möglichkeit, durch Tripelresonanzmethoden sequentielles Assignment auch von nicht komplett gefalteten Proteinen zu erhalten, ermöglicht es, durch nachfolgende Relaxationsmessungen unbewegliche Bereiche zu identifizieren und neue Proteinkonstrukte herzustellen, die ausschließlich den gefalteten Bereich umfassen. Auf diese Weise kann gezielt Strukturinformation von Protein-Domänen erhalten werden, die durch flexible Bereiche innerhalb des natürlichen Proteins an einer Kristallisation gehindert werden.

2.6.5. Isotopenmarkierung von Proteinen

Neben dem in Proteinen reichlich vorhandenen Wasserstoff (^{1}H), der glücklicherweise sehr sensitiv ist, sind für die NMR-Spektroskopie NMR-aktive Isotope von Kohlenstoff (^{13}C) und Stickstoff (^{15}N) von Bedeutung, da sich aus ihnen fast das gesamte Proteingerüst zusammensetzt. Leider sind die natürlichen Häufigkeiten dieser Kerne ausgesprochen gering, und zusätzlich haben sie ein kleineres gyromagnetisches Verhältnis; diese Umstände machen die Messung dieser Kerne in Proteinen nahezu unmöglich. Glücklicherweise gibt es inzwischen eine Vielzahl an Möglichkeiten, Proteine durch gezielten Einbau angereicherter Isotope während der Überproduktion in heterologen Systemen mit diesen NMR-aktiven Kernen auszustatten (siehe 2.6.2).

2.6.6. Die wichtigsten Spektren

Ein kurzer Überblick über die wesentlichen Spektren, die für die Strukturaufklärung von PCP verwendet wurden, soll im folgenden knapp beschreiben, was die jeweiligen Spektren zeigen und welche Information daraus gewonnen werden kann.

2.6.6.1. Das ^{1}H-^{15}N HSQC

Das ^{1}H-^{15}N HSQC (*heteroatom single quantum correlation*) -Spektrum verknüpft die chemischen Verschiebungen von Stickstoffatomen mit denen der daran gebundenen Wasserstoffatome. In der zweidimensionalen Darstellung wird die Verschiebung der Stickstoffkerne auf der y-Achse und die Protonenverschiebung auf der x-Achse aufgetragen. Das Resultat ist ein Spektrum, das für jedes H^{N}-Proton, also jedes direkt an Stickstoff gebundene, ein Signal bei der jeweiligen ^{15}N- und ^{1}H-Verschiebung anzeigt. Daher kann man für jede Aminosäure außer Prolin einen Peak für das Amidproton der Peptidgruppe erwarten. Weiterhin sieht man die Seitenketten-H^{N}-Signale. Hierfür muß das untersuchte Protein natürlich als ^{15}N-markierte Probe vorliegen, und ein saures Milieu (am besten so sauer wie für das Protein noch gut verträglich) verhindert den Austausch saurer Protonen mit Wasser, der ansonsten zu reduzierten Signalintensitäten führt. Ein HSQC ist relativ schnell aufzunehmen und zeigt einen guten Überblick über die einzelnen Reste, so daß man die Vollständigkeit der erwarteten Signale und Überlappungsprobleme einschätzen kann. Das ^{1}H-^{15}N HSQC von TycC3-PCP ist in Abb. 5.5 zu sehen.

2.6.6.2. Das TOCSY

Im TOCSY-Experiment (*total correlation spectroscopy*) wird die Magnetisierung über skalare Kopplungen (über die Bindungen) des kompletten Spinsystems jeder Aminosäure verteilt. Dadurch erscheinen im Spektrum im Idealfall sämtliche Protonen, die ausreichend stark miteinander koppeln, als Spinsystem zusammen mit dem jeweils betrachteten Proton. Bei der zweidimensionalen Auftragung mit ^{1}H-Verschiebungen an beiden Achsen ergibt sich ein zur Diagonale durch den Nullpunkt symmetrisches Spektrum. Für ein Valin würde man beispielsweise über dem Amid-Diagonalpeak (H^{N}) auf einer Linie Kreuzsignale für H^{α}, für H^{β} und für die zwei H^{γ}-Methylgruppen erwarten; über dem H^{α}-Diagonalpeak Kreuzsignale für H^{β} und die zwei H^{γ}-Methylgruppen, unter der Diagonale das H^{N}-Kreuzsignal usw.. Das TOCSY ermöglicht es also, zu einem Diagonalpeak eines Restes (z.B. von H^{N}) die zugehörigen anderen (z.B. H^{α}) Diagonalpeaks (und damit deren Verschiebungen) aufzufinden. *In praxi* ist allerdings der TOCSY-Transfer oft nicht effektiv genug, um alle Protonen der Seitenkette zu erfassen. Da das TOCSY Protonen nur intraresidual korreliert, stellt es keine Konnektivität zu Nachbarresten her. Deshalb ist man für die sequentielle Zuordnung der Signale zu den Resten auf komplementäre Information angewiesen, die das NOESY liefern kann.

2.6.6.3. Das ^{1}H-^{1}H NOESY

Die erforderliche zum TOCSY komplementäre Information kann man durch gezielte Nutzung des Kern-Overhauser-Effektes (NOE, *nuclear Overhauser enhancement*) gewinnen. Dieser basiert auf der dipolaren Wechselwirkung von zwei Kernspins durch den Raum und ist in erster Näherung umgekehrt proportional zur sechsten Potenz des Kernabstands; in der Praxis ist ein NOE nur bei einem Abstand bis zu etwa 5 Å zu beobachten. Das NOESY schließt folglich, bei gleicher Art der Darstellung, das Signalmuster des TOCSYs mit ein, denn abgesehen von den weiter entfernten Protonen längerer Seitenketten sind die Protonen innerhalb einer Aminosäure einander nahe, so daß für sie ebenfalls NOESY-Kreuzsignale auftreten. Dadurch erhält man zusätzlich interresiduale Konnektivitäten, wenn sich Protonen räumlich benachbarter Reste näher als 5 Å sind. Zum einen stellt dies den Zugang von einem Spinsystem eines Restes zu den sequentiell benachbarten Resten dar, denn diese sind gezwungenermaßen in der unmittelbaren Umgebung und haben folglich starke NOEs, zum anderen liefert es die für die Strukturbestimmung unentbehrlichen Abstandsinformationen auch zwischen Kernen, die in der Primärstruktur weit voneinander entfernt sind, sofern diese sich durch die Tertiärstruktur nahe kommen. Ein Ausschnitt eines ^{1}H-^{1}H NOESYs von TycC3-PCP ist in Abb. 2.7 dargestellt. Bei der sequentiellen Zuordnung der Signale zu den Resten des Proteins nutzt man die Tatsache, daß die Seitenkettenprotonen (hauptsächlich H^α und H^β) des jeweils vorhergehenden Restes in der Regel dem Amidproton eines betrachteten Restes näher sind als die Seitenkettenprotonen des folgenden Restes [Wüthrich, 1986]. Da diese Methode nicht immer eindeutig ist und in Regionen mit wenig ausgeprägter Struktur auf Grenzen stößt, verwendet man inzwischen üblicherweise für dieses sequenzsspezifische *assignment* zusätzlich Tripelresonanzexperimente, die eine sichere und zügige Zuordnung ermöglichen.

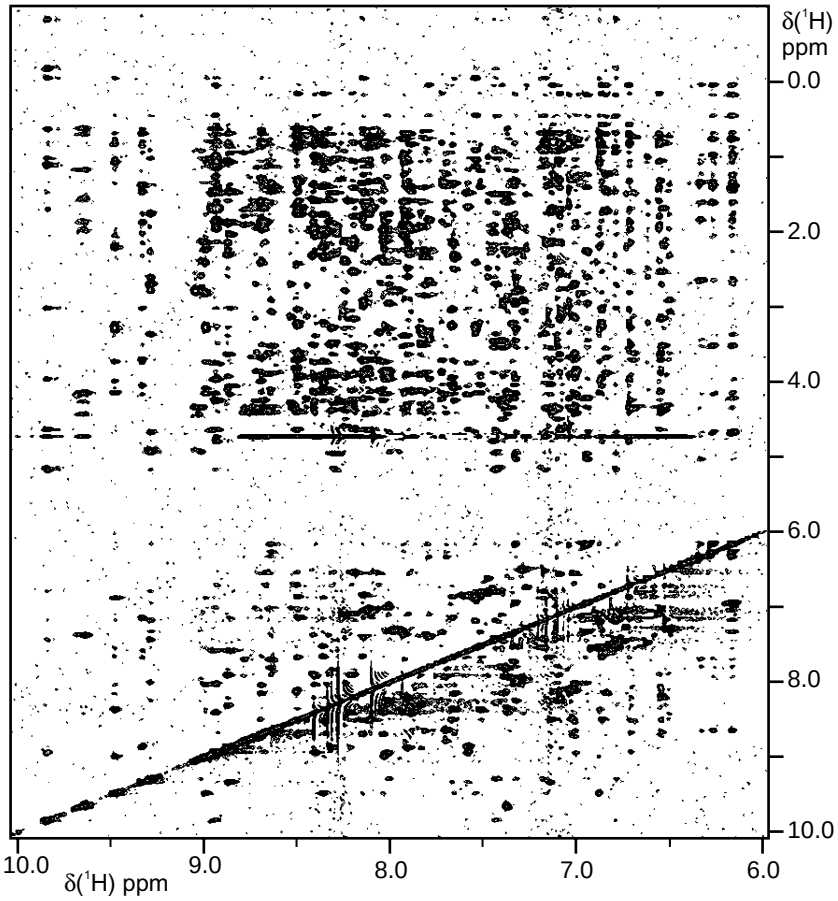

Abb. 2.7: Ausschnitt aus dem ^{1}H-^{1}H NOESY von TycC3-PCP

Zu sehen ist die Amid- und Aromatenregion des Spektrums. (pH 5,05; 300 K; H_2O). Im unteren Teil befindet sich die Diagonale des Spektrums, auf der die Amidprotonen- und im rechten Teil Aromatensignale liegen. Darüber im Spektrum finden sich zunächst NOEs zu anderen Amidprotonen, in der Mitte, um ein nicht vollständig unterdrücktes Wassersignal bei 4,730 ppm, die NOEs zu den H^{α}-Protonen, und darüber die NOEs zu Seitenketten-Protonen. Im unteren Teil ist zu erkennen, daß das Spektrum symmetrisch zur Diagonale ist. Die große Zahl an vorhandenen Signalen, die leicht zu Problemen durch deren Überlappung führt, wird auf den ersten Blick deutlich.

2.6.6.4. Dreidimensionale Varianten von TOCSY und NOESY

Das in Abb. 2.7 dargestellte Spektrum veranschaulicht die Komplexität und Signaldichte der oben beschriebenen Spektren. Da es mit zunehmender Proteingröße verstärkt zu Überschneidungen von Signalen kommt, die eine zuverlässige Auswertung der NOE-Intensitäten behindern, kann man das NOESY und auch das TOCSY entzerren, indem durch Kombination mit dem HSQC oder einem ähnlichen Experiment eine dritte Dimension eingeführt wird. Dadurch werden die Spinsysteme in verschiedene Ebenen verteilt, jedes Spinsystem ist dann in der Ebene der Verschiebung seines Heterokernes zu finden. Dient ^{15}N als Heterokern, so können die Spinsysteme der Amidprotonen von Rückgrat und Seitenketten in verschiedene ^{15}N-Ebenen verteilt werden, benutzt man die ^{13}C-Verschiebung, so kann der Seitenketten-Bereich entzerrt werden. Bei den Seitenketten hat dies den zusätzlichen Vorteil, daß Protonen am selben Kohlenstoffatom dann als Paar in derselben ^{13}C-Ebene aufzufinden sind, was die Zuordnung erheblich erleichtert.

Für die Aufnahme von Spektren, die sich auf den Aliphaten-Bereich beschränken (hochfeldverschoben zum Wassersignal), wird das Protein in D_2O gelöst, um das

störende Wassersignal auf ein Minimum zu beschränken. Für Spektren im Amidbereich ist dies wegen des Austausches der Amidprotonen mit dem Lösemittel nicht möglich.

Für die Bestimmung der PCP-Struktur wurden überwiegend dreidimensionale Spektren benutzt; die zweidimensionalen wurden bei Mehrdeutigkeiten oder schlechter Auflösung der 3D-Varianten hinzugezogen.

2.6.6.5. Das HNHA

Das HNHA mißt die Kopplung zwischen Amidproton (HN) und Alphaproton (HA) der einzelnen Reste; da hierzu die Magnetisierung gezielt über den Amidstickstoff übertragen wird, ist eine ^{15}N-markierte Probe nötig. Im Spektrum sieht man in der ^{1}H-^{1}H-Ebene über dem Diagonalpeak eines Amidprotons das Kreuzsignal des zugehörigen H^{α}, und aus ihrem Verhältnis kann ihre Kopplungskonstante ^{3}J ermittelt werden. Zweckmäßigerweise trennt man das Spektrum durch die gemessene Verschiebung in eine dritte Dimension auf, so daß Signalüberlappungen selten werden und die Signale über H^{α}-, ^{15}N- und H^{N}-Verschiebungen eindeutig den Resten zugeordnet werden können. Aus den Kopplungskonstanten kann über die semiempirische Karplus-Beziehung [Karplus, 1959] auf die ϕ-Diederwinkel der Aminosäuren geschlossen werden; da die Funktion nicht eindeutig ist, muß eine Toleranz in die Werte einfließen, die die möglichen Lösungen umschließt. Die Winkel fließen in die Berechnung der Struktur mit ein.

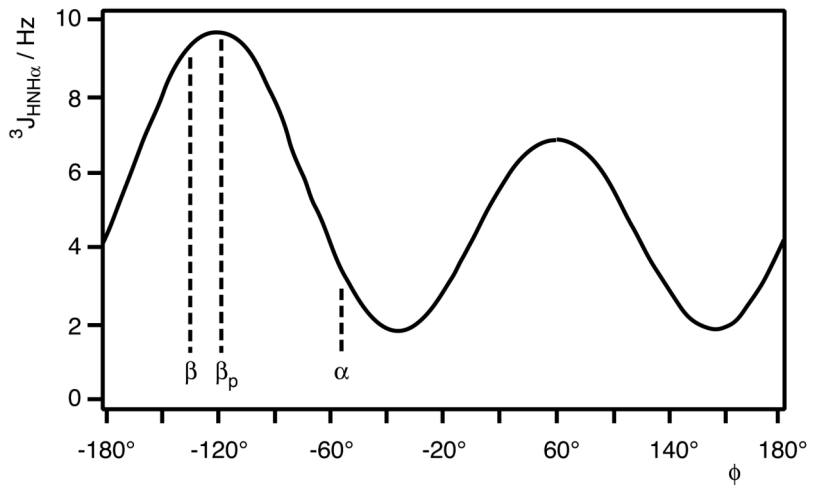

Abb. 2.8: Die Karplus-Beziehung für H^{N} und H^{α}

Die ^{3}J-Kopplung von H^{N} und H^{α} eines Restes hängen vom Diederwinkel ϕ ab. Kopplungen über 8 Hz sprechen für Winkel von 120°±30°, unter 5 Hz sind sie Helix-Indikatoren. Die Winkel im rechten Teil der Kurve sind aufgrund sterischer Gegebenheiten in Proteinen selten besetzt. Die Standardwinkel für α-Helices und antiparallele (β) sowie parallele (β_p) Faltblätter sind markiert.

2.6.6.6. Das CBCA(CO)NH

Bei diesem Experiment wird die Magnetisierung gezielt über die C^{β}, C^{α}, C^{O} und N-Kerne auf H^{N} übertragen. Die Verschiebung des C^{O} wird nicht gemessen; aus den ^{1}H-, ^{13}C- und ^{15}N- Verschiebungen wird ein dreidimensionales Spektrum dargestellt, es handelt sich also um ein Tripelresonanzexperiment, das eine ^{13}C- und ^{15}N-markierte Probe erfordert. Das Spektrum zeigt in der Ebene einer N-Verschiebung eines Restes i den H^{N}-Peak und darüber die Kreuzsignale von C^{α} und C^{β} des Restes i-1 (es wird ja über das C^{O} der Amidbindung übertragen). Hat man zusätzlich ein ähnliches Experiment durchgeführt, das zumindest eine der zwei ^{13}C-Verschiebungen mit dem dazugehörigen Amidproton desselben Restes verknüpft, kann man sich aus der Kombination dieser zwei Spektren entlang des Proteinrückgrates vorarbeiten und für die Reste nacheinander die sequentielle Zuordnung der Amidproton-Resonanzen bewerkstelligen. Durch Abgleich mit dem TOCSY/NOESY-Spektrenpaar kann man anhand der Spinsysteme der Seitenketten kontrollieren, ob die Zuordnung konsistent ist. Das erforderliche komplementäre Experiment zum CBCA(CO)NH kann z.B. ein HNCA sein.

2.6.6.7. Das HNCA

Die Namensgebung dieses Tripelresonanzexperiments ist analog zum CBCA(CO)-NH, das heißt, die Magnetisierung geht über die genannten Kerne, und bei gleicher Darstellung des Spektrums wie beim CBCA(CO)NH erhält man über dem H^{N}-Signal in der ^{15}N-Ebene des Restes i Kreuzsignale zum C^{α} desselben Restes und zum C^{α} des Restes i-1, da die interresiduale Kopplung $^{2}J(N,C^{\alpha})$ mit 7 Hz nicht wesentlich kleiner ist als die intraresiduale $^{1}J(N,C^{\alpha})$ mit 11 Hz. Die so erhaltene intraresiduale Verknüpfung von C^{α}-Verschiebung mit der von N und H^{N} reicht in Kombination mit dem CBCA(CO)NH (s.o.) theoretisch aus, um die sequentielle Zuordnung der Amidsignale zu den Resten des Proteins zu bewerkstelligen.

2.6.7. Sekundärstruktur-Ermittlung

Sind die Amidsignale und die von H^{α} und H^{β} zugeordnet und aus dem HNHA-Experiment $^{3}J(HNH^{\alpha})$-Kopplungskonstanten bestimmt worden, kann neben der Vervollständigung der Zuordnungen schon eine Sekundärstrukturbestimmung erfolgen. Wichtige Indizien sind hierfür die Stärken der sequentiellen (Reste i und i+1) NOEs und derer mittlerer Reichweite (medium range NOEs, Reste i, i+2..4). Während in β-Faltblättern aufgrund der Konformation des Proteinrückgrats nur schwache $H^{N}H^{N}(i,i+1)$, aber starke $H^{\alpha}H^{N}(i,i+1)$-Kontakte auftreten, finden sich dafür aber charakteristische long range-Kontakte zu dem benachbarten Strang in der Faltblatt-

Struktur, und zwar für jeden zweiten Rest in Richtung des gleichen Nachbarstranges. α-Helices dagegen zeichnen sich durch starke H^NH^N(i,i+1)-Kontakte, schwache $H^\alpha H^N$(i,i+1)-Kontakte und starke $H^\alpha H^N$(i,i+3)- und schwache $H^\alpha H^N$(i,i+4)-Kontakte aus, die in der helicalen Struktur begründet sind, in der sich ein Amidproton eines Restes i in räumlicher Nähe zu den Seitenkettenprotonen der vorangehenden Helixwindung (Reste i-3, i-4) befindet, wobei die α-Protonen dieser Reste so wegstehen, daß sie nur schwache NOEs zu H^N(i) geben. Stellt man die relevanten NOEs und $^3J(H^NH^\alpha)$-Werte untereinander in einer Übersicht zusammen, so kann aus der Kombination dieser Indikatoren die Sekundärstruktur des Proteins abgeleitet werden. Zusätzliche Hinweise können die Aussage stützen, so weichen die $^{13}C^\alpha$-Verschiebungen typischerweise in Helices nach oben, in Faltblättern nach unten von denen eines ungefalteten Peptides ab, und bedingt durch die regelmäßigen Wasserstoffbrückenbindungen in den Sekundärstrukturelementen werden die betroffenen Protonen vor Austausch mit dem Lösemittel geschützt, d.h. sie bleiben in einem in D_2O aufgenommenen Spektrum sichtbar.

2.6.8. Berechnung der dreidimensionalen Struktur

Für die Bestimmung der dreidimensionalen Struktur von Proteinen ist aufgrund der immensen Zahl an Freiheitsgraden solcher Moleküle die NMR-spektroskopisch ermittelte Datenmenge nicht ausreichend. Konsequenterweise muß die Zahl der aus den Experimenten abgeleiteten Information so groß wie möglich sein, damit die Struktur gut definiert werden kann, und *de facto* ist die Anzahl der Abstands- und Winkelrandbedingungen wichtiger als die Präzision, wodurch die relativ grobe Einteilung der Abstandsbedingungen in wenige Kategorien gerechtfertigt wird. Die experimentell ermittelten Daten werden bei der Strukturberechnung durch allgemeine empirische Werte für Protein-Standard-Atomabstände, Bindungswinkel, van-der-Waals-Radien etc. ergänzt, die z.B. aus Kristallstrukturen ermittelt wurden.

Für die Berechnungen stehen prinzipiell zwei Verfahren zur Verfügung. Bei der Distanzgeometrie- (DG-) Methode werden aus den verfügbaren Informationen Matrices von Abständen für vorkommende Atompaare aufgestellt und dann in den dreidimensionalen Raum projiziert, der dann die Atomkoordinaten enthält. Die Alternative ist die Methode des simulierten Temperns (*simulated annealing*, SA); sie ist für diese Arbeit zum Einsatz gekommen und soll daher kurz skizziert werden.

Im SA-Verfahren wird eine Moleküldynamiksimulation durchgeführt, bei der eine zuvor generierte Startstruktur simuliert auf hohe Temperatur gebracht wird, so daß die Teilchen hohe kinetische Energie besitzen und sich stark bewegen. Dann wird das virtuelle System langsam abgekühlt, und unter Einfluß eines durch die experimentellen Randbedingungen und empirischen Daten definierten Kraftfeldes

faltet sich das Molekül so, daß es die niedrigste Gesamtenergie annimmt. Das Kraftfeld setzt sich dabei aus verschiedenen Komponenten zusammen. Die Beiträge aus den empirischen Daten (Bindungslängen, -winkel, Diederwinkel, van-der-Waals- und elektrostatische Kräfte) lassen sich als harmonische Potentiale (für die drei erstgenannten) oder anharmonisches Lennard-Jones Potential bzw. Coulomb-Potential (für die zwei letztgenannten Beiträge) annähern. Die experimentell bestimmten Informationen (Abstände und Diederwinkel) gehen als harmonische Potentiale ein, deren Nullpunkt auf dem definierten Wert der Bedingung liegt, die aber auf Null gesetzt werden, solange sich die Bedingung innerhalb der festgelegten Grenzen bewegt (vergleichbar mit einer am unteren Ende gerade abgeschnittenen Hyperbel).

Durch die Gegenwart von Potentialen für jede festgelegte Randbedingung bewegt sich das System auf einer vieldimensionalen Energiehyperfläche, und die Summe aller Energiebeiträge ergibt eine Gesamtenergie, deren Minimierung die Bewegung der Moleküldynamik in der Simulation entgegenstrebt. Damit die Struktur nicht in einem lokalen Minimum der Hyperfläche gefangen wird, heizt man das System zunächst auf einige Tausend K auf, so daß die kinetische Energie zur Überwindung lokaler Energiebarrieren reicht, und läßt das System sich bei der Temperatur einige Tausend Simulationsschritte lang auf der Energiehyperfläche entwickeln. Nach dieser Hochtemperaturphase wird die Temperatur um einen Teilschritt abgesenkt, die Kraftkonstanten für die experimentell ermittelten Bedingungen werden stärker gewichtet, und es folgt eine erneute Entwicklung auf der Hyperfläche. Der Zyklus aus Abkühlen, Erhöhung der Kraftkonstanten und Moleküldynamik wird wiederholt, bis sich keine weitere Energieabsenkung ergibt oder eine simulierte Temperatur unter einem Grenzwert erreicht ist. Nach einer abschließenden Minimierung, bei der die Atome leicht bewegt werden, solange sich die Energie dadurch verringert (dadurch fällt das Molekül tiefer in das nächstgelegene Minimum hinein) ist eine Struktur generiert, die die gesetzten Randbedingungen möglichst gut erfüllt.

Da die vieldimensionale Energiehyperfläche unmöglich in einer einzelnen Simulation vollständig abgeschritten werden kann, muß die gesamte Strukturberechnung ausgehend von unterschiedlichen Startstrukturen mehrfach wiederholt werden. Erst wenn eine signifikante Mehrheit der Strukturen nach der Rechnung die gleiche Konformation hat, kann davon ausgegangen werden, daß das absolute Energieminimum und damit die tatsächliche Struktur getroffen wurde. Zweckmäßigerweise läßt man zu Testzwecken einige Startstrukturen mit zufälligen Atomkoordinaten generieren, die nach einer erfolgreichen Rechnung dieselbe Faltung haben sollten wie z.B. Startstrukturen in einer ausgestreckten Strang- (*extended strand*) Konformation.

Je mehr experimentelle Randbedingungen zur Verfügung stehen, desto eindeutiger kann das absolute Minimum der Energiehyperfläche definiert werden, desto weniger Moleküle bleiben also in lokalen Minima hängen und haben abweichende Strukturen. Nach Auswahl der Strukturen, die die niedrigsten Energien aufweisen und die die wenigsten der gesetzten Randbedingungen verletzen, werden diese bestmöglich aufeinandergelegt und zu einer Strukturfamilie zusammengefaßt. Diese gilt als Endergebnis einer NMR-Strukturaufklärung.

Als wichtiges Maß für die Güte einer Strukturfamilie gilt die Abweichung der Atomkoordinaten der einzelnen Mitglieder von den Atomkoordinaten einer mittleren Struktur. Diese wird durch geometrische Mittelung der Atomkoordinaten und eine anschließende Minimierung erzeugt; die Minimierung beseitigt dabei durch die Mittelung erzeugte Molekülgeometrieverletzungen. Wegen der in Seitenketten oft auftretenden strukturellen Fluktuationen beschränkt man die Betrachtung der Abweichungen oft auf das Proteinrückgrat, um eine klare Aussage zu bekommen.

2.7. Aufgabenstellung

Zu Beginn dieser Arbeit war die PCP-Domäne bereits als funktionell eigenständig charakterisiert worden, und es war ein davon abgeleitetes Protein, PCP, vorgestellt worden, das in Homologie zu den Typ II-Acyl-Carrier-Proteinen der Polyketidsynthasen und Fettsäuresynthasen die Funktion des Substratcarriers bei der nichtribosomalen Peptidsynthese übernimmt [Stachelhaus *et al.*, 1996].

Die NMR-Struktur des mit PCP funktionell vergleichbaren ACPs der *E. coli* Fettsäure-Synthase [Holak *et al.*, 1988b; Holak *et al.*, 1988a] sowie die Sekundärstruktur des *S. coelicolor* Actinorhodin-Synthase ACPs [Crump *et al.*, 1996] war publiziert, ebenso wußte man seit kurzem um die Kristallstruktur der ersten A-Domäne der *B. brevis* Gramicidin S Synthetase [Conti *et al.*, 1997].

Da frühere Kristallisationsversuche von PCP erfolglos geblieben sind (A. Hüser, unveröffentlicht) und vom *E. coli* FAS-ACP trotz angekündigter Experimente bis jetzt keine Kristallstruktur veröffentlicht wurde [Holak *et al.*, 1988b], sollte die PCP-Struktur in Lösung mit NMR-spektroskopischen Methoden bestimmt werden. Hierzu stand das von Stachelhaus *et al*. vorgestellte Expressionssystem für TycA-PCP zur Verfügung, wurde aber in einem frühen Stadium der Untersuchungen durch ein von S. Dökel bereitgestelltes Expressionssystem für TycC3-PCP ersetzt, da das ursprüngliche System sich als ungeeignet herausstellte. Durch die Strukturaufklärung sollte Licht auf die genauen Domänengrenzen geworfen werden, und aus der Struktur sollten

Rückschlüsse auf die Funktionalität von PCP in der Zusammenarbeit mit den anderen Domänen der nichtribosomalen Peptidsynthetasen gezogen werden.

Die Arbeiten wurden in Kooperation mit der NMR-Gruppe von T. A. Holak, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, durchgeführt.

3. Material

3.1. Chemikalien und Laborprodukte

3.1.1. Chemikalien

Die Chemikalien wurden, sofern sie zur Präparation von Proteinproben oder Medium verwendet wurden, in den Reinheitsgraden „für biochemische Zwecke“, *pro analysi* oder vergleichbar von verschiedenen Herstellern bezogen.

^{15}N-Ammoniumchlorid, ^{13}C-Glucose und Deuteriumoxid wurden in >99% Isotopenreinheit bezüglich des angereicherten Isotopes von den Cambridge Isotope Laboratories, Inc., Andover, Massachusetts, USA, gewählt.

[^{3}H]-CoA (40 Ci/mmol) sowie [^{14}C]-L-Tyrosin (497 mCi/mmol) stammen von der Firma Hartmann Analytics, Braunschweig.

Amplify-Lösung zur Verstärkung der Filmschwärzung bei [^{14}C]-Autoradiographien wurde von Amersham-Buchler GmbH&Co. KG, Braunschweig bezogen.

3.1.2. Laborprodukte

Centricon-Konzentratoren (Ausschlußgröße 3 kDa) und Centriprep-Konzentratoren (Ausschlußgröße 3 kDa) zur Ankonzentrierung von Proteinlösungen stammen von der Firma Millipore GmbH, Eschborn.

PCR-Reaktionen wurden mit dem Expand long-range PCR system von Boehringer, Mannheim, durchgeführt.

Restriktionsendonukleasen und T4 DNA Ligase stammen von Amersham Buchler GmbH & Co. KG, Braunschweig.

Für die Dialyse wurde SpectraPor Dialyseschlauch (Spectrum Laboratories, Inc., Rancho Dominguez, Kalifornien, USA) mit einer Ausschlußgrenze von 3,5 kDa eingesetzt.

Ni-NTA Agarose zur Nickelchelatchromatographie wurde von Qiagen, Hilden, bezogen.

SDS-PAGE wurde in *mighty small*-Vertikalkammern der Firma Hoefer Scientific Instruments durchgeführt.

3.2. Plasmide

3.2.1.1. pREP4

Dieses Plasmid wurde zusammen mit den pQE60- und pQE70-Derivaten für die Überexpression der jeweiligen Proteine eingesetzt. Eine optimierte Promotor/Operator-Kombination in letzteren Plasmiden macht eine zusätzliche Quelle für den *lac*-Repressor nötig, um die Genexpression vor Induktion wirksam zu unterdrücken. pREP4 enthält das *lacI*-Gen, das für den Repressor kodiert, sowie das Kanamycin-Resistenz vermittelnde *neo*-Gen, welches bei pREP4 durch eine Mutation in der Ribosomen-Bindestestelle weniger stark exprimiert wird. Eine Kanamycin-Konzentration von 25 mg/L im Medium reicht zur Selektion auf plasmidtragende *E. coli*-Zellen aus [Konz, 1998].

3.2.1.2. pREP4-Gsp

Dieses Plasmid leitet sich von pREP4 ab, zusätzlich enthält es unter T7-Promotor-Kontrolle das Gen der PPTase Gsp aus *B. brevis*. pREP4-Gsp wurde statt pREP4 zur Koexpression in *E. coli* BL21 λDE3 verwendet, wenn das überzuexprimierende PCP posttranslational während der Expression zu *holo*-PCP modifiziert werden sollte [Stachelhaus *et al.*, 1998].

3.2.1.3. pQE60-TycA-PCP

pQE60-TycA-PCP (publiziert als pPCP-His in [Stachelhaus *et al.*, 1996]) ist ein pQE60-Derivat, das durch Klonierung des für die PCP-Domäne der Tyrocidin Synthetase I (Reste 415 bis 521) kodierenden DNA-Abschnitts in die *Nco*I / *Bgl*II-Schnittstellen entstanden ist. Es ermöglicht die effiziente Überexpression von TycA-PCP als C-terminal Hexahistidin-markiertes Protein. Die Effektivität der Genexpression unter Kontrolle einer optimierten T5-Promotor/*lac*-Operator-Kombination erfordert zur erfolgreichen Unterdrückung während des Heranziehens der Kulturen die Gegenwart des Repressorplasmids pREP4 oder eines Derivats wie pREP4-Gsp. Ampicillin-Resistenz (100 mg/L Medium) wird durch das *bla*-Gen aus pBR322 [Sutcliffe, 1979] vermittelt, dessen Promotorsequenz optimiert wurde (Firmenschrift „The Expressionist“, Qiagen, Hilden).

3.2.1.4. pQE70-TycC3-PCP

Dieses Plasmid leitet sich von pQE70 ab, wobei letzteres identisch zu pQE60 (s. 3.2.1.3) ist bis auf eine *Sph*I-Schnittstelle, die an Stelle der in pQE60 vorkommenden *Nco*I-Schnittstelle tritt, welche eingebettet das ATG-Startkodon für das zu exprimierende rekombinante Gen enthält [Konz, 1998]. pQE70-TycC3-PCP wurde von S. Dökel hergestellt (unpublizierte Ergebnisse) und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Chromosomale DNA von *B. brevis* ATCC 8185 wurde als PCR-Templat verwendet, um das *tycC*-Genfragment zu amplifizieren, das für die dritte PCP-Domäne von TycC kodiert. Durch die Primer 5'-TycC3-PCP (5'-TTA**GCATGC**-CCGTAACCGAAGCGC-3') und 3'-TycC3-PCP (5'-AAA**AGATCT**CGTGGCGAC-ATACTG-3') wurden *Sph*I- und *Bgl*II-Restriktionsschnittstellen in das Fragment eingeführt, die zur Klonierung in die gleichen Restriktionsstellen von pQE70 (Qiagen, Hilden) dienten (fett: Restriktionsstellen; unterstrichen: Basen abweichend vom chromosomalen Templat).

3.3. Bakterienstämme

Stamm	Genotyp
B. brevis ATCC 8185	Wildtyp, Tyrocidin-Produzent
E. coli SG13009	*nal*^{S} *str*^{S} *rif*^{S} *lac ara gal mtl* F$^-$ [Gottesman *et al.*, 1981]
E. coli BL21 λDE3	*hsd*S *gal* λcI*ts* 857 *ind* 1 Sam7*nin* 5 *lac* UV5-T7 gene1 [Studier and Moffatt, 1986]
E. coli XL1 Blue	*sup*E44 *hsd*R17 *rec*A1 *end*A1 *gy*rA96 *thi*-1 *rel*A1 *lac*[F' *pro*AB$^+$ *lac*I^q *lac*ZΔM15 Tn*10* (Tet^r)] [Bullock *et al.*, 1987]

3.4. Medien und Puffer

3.4.1. Medien

Zur Kultivierung von Bakterien wurde 2YT-Vollmedium (in Form von Agar-Platten oder Flüssigmedium für sämtliche Klonierungsschritte und für Überexpression unmarkierter Proteine) oder M9-Minimalmedium (als Flüssigmedium für die Überexpression ^{15}N- und ^{15}N, ^{13}C-markierter Proteine) eingesetzt [Sambrook *et al.*, 1989]. Die jeweils benötigten Antibiotikazusätze, die sich aus den Beschreibungen der

verwendeten Plasmide ergeben (es wurde nur auf plasmidvermittelte Resistenz selektiert), wurden gemäß [Sambrook *et al.*, 1989] angesetzt und zugegeben.

3.4.2. Puffer

3.4.2.1. Bindepuffer

Bindepuffer wurde bei der nativen Aufreinigung von TycA-PCP für alle Schritte bis zum Auftrag auf die Ni-NTA-Säule verwendet; bei denaturierender Aufreinigung wurde nach dem Auftrag des Rohextraktes in Harnstoff-Bindepuffer auf die Säule auf Bindepuffer umgepuffert. Bindepuffer ist 50 mM Natriumphosphatpuffer, 10 mM Imidazol, pH 7,5.

3.4.2.2. Harnstoff-Bindepuffer

Dieser Puffer diente zum Zellaufschluß bei denaturierender Aufreinigung und wurde hierbei für alle Schritte bis einschließlich zum Auftragen auf die Ni-NTA-Säule verwendet. Harnstoff-Bindepuffer basiert auf Bindepuffer mit einem zusätzlichen Harnstoffgehalt von 8 M.

3.4.2.3. Elutionspuffer

Elutionspuffer wurde bei der Ni-NTA-Chromatographie verwendet, um das gebundene Hexahistidin-markierte Protein kompetetiv durch im Puffer enthaltenes Imidazol von der Säule zu verdrängen. Elutionspuffer entspricht Bindepuffer mit einem Imidazolzusatz von 250 mM.

3.4.2.4. NMR-Puffer

Für die NMR-spektroskopischen Untersuchungen wurden die Proteine gegen diesen Puffer dialysiert, bevor sie ankonzentriert wurden und zur Messung kamen. NMR-Puffer besteht aus 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 5,05.

4. Methoden

4.1. Molekularbiologische Methoden

Soweit nicht anders angegeben, wurden molekularbiologische Arbeiten weitestgehend nach den einschlägig bekannten Vorschriften durchgeführt, wie sie in den Lehr- und Handbüchern für molekularbiologische Labormethoden umfassend dargestellt sind, z.B. [Sambrook *et al.*, 1989]; die wichtigsten Vorschriften sind auch z.B. in [Konz, 1998] zu finden.

4.2. Biochemische Methoden

4.2.1. Expression von PCPs in *E. coli*

4.2.1.1. Expression unmarkierter PCPs

Zur Expression unmarkierter PCPs in *E. coli* wurde 2YT-Medium [Sambrook *et al.*, 1989] verwendet. Für einen präparativen Ansatz (ausreichend zur Herstellung einer NMR-Probe) wurden 5 L Medium aus einer Vorkultur (37°C, 250 upm) des jeweiligen Bakterienstammes im exponentiellen Wachstumsstadium einprozentig angeimpft und bei 37°C und 250 upm inkubiert. Bei einer OD_{600} von 0,8 erfolgte die Induktion durch Zugabe von IPTG zu einer Endkonzentration von 1 mM. Die Inkubation wurde für 2 Stunden unter denselben Bedingungen fortgesetzt, bevor die Zellen durch Zentrifugation bei 6.000 g geerntet wurden. Die Zellpellets wurden anschließend bei –20°C bis zur Verwendung eingefroren oder für den folgenden Zellaufschluß in etwa dem doppelten Pellet-Volumen des jeweiligen Puffers resuspendiert.

4.2.1.2. Expression ^{15}N und ^{13}C-markierter PCPs

Die Expression von vollständig ^{15}N- und vollständig ^{15}N, ^{13}C-markierten Proteinen geschah durch Beschränkung auf $^{15}NH_4Cl$ als einzige Stickstoffquelle und [100% ^{13}C]-Glucose als einzige Kohlenstoffquelle im Medium. Hierzu wurde beim Ansatz von M9-Minimalmedium (das NH_4Cl und Glucose als einzige Stickstoff-/Kohlenstoffquelle enthält) [Sambrook *et al.*, 1989] die jeweils entsprechende Komponente durch

die gleiche, aber isotopenangereicherte Chemikalie ersetzt. Unter Verwendung dieses Mediums wurde nach demselben Verfahren exprimiert wie sonst mit Vollmedium für unmarkierte Proteinproben. Für ^{15}N-markierte NMR-Proben wurden 5 L Medium verwendet; ^{15}N, ^{13}C-markierte Proben wurden in 2 L exprimiert.

4.2.1.3. Zellaufschluß

Der Zellaufschluß für die nicht-denaturierende Aufreinigung wurde mit einer Frenchpress durchgeführt. Hierbei wird die Zellsuspension (Aufnahme des Zellpellets in Bindepuffer) in einer Druckzelle auf mehrere kbar gebracht und durch ein kleines Ventil langsam abgelassen. Durch die plötzliche Expansion reißen die Zellen auf. Zweimaliges Durchlaufen der Frenchpress führte zu vollständigem Aufschluß (Kontrolle auf ganze Zellen im Mikroskop). Alle Arbeiten erfolgten bei 4°C.

Der denaturierende Aufschluß erfolgte durch Resuspendieren und zweistündiges Rühren der Zellen in Harnstoff-Bindepuffer. Der hohe Harnstoffgehalt von 8 M denaturiert die Bestandteile der Zellwand derart, daß die Bakterienzellen sich teilweise auflösen, wodurch der Zellinhalt in den Puffer gelangt und die Proteine entfaltet werden. Arbeiten mit 8 M Harnstoff wurden bei RT durchgeführt.

Nach dem denaturierenden oder nicht-denaturierenden Aufschluß wurde der Rohextrakt durch 45-minütige Zentrifugation bei 100.000 g von Zelltrümmern befreit.

4.2.1.4. Proteinreinigung mittels IMAC (Nickelchelat-Chromatographie)

Die exprimierten, rekombinanten PCPs besitzen aufgrund der verwendeten Klonierungsstrategie (s. Kap. 3.2) eine C-terminale Hexahistidin-Sequenz. Diese erlaubt eine effiziente Reinigung durch IMAC (*immobilized-metal affinity chromatography*). Hierzu wird bei der Chromatographie als stationäre Phase an eine kreuzvernetzte Agarosematrix gekoppelte *nitrilotriacetic acid*, $(CO_2^-\text{-}CH_2)_2N\text{-}CHR\text{-}CH_2CO_2^-$, verwendet (R ist der Linker zur Agarosematrix). Die drei Carboxylgruppen sowie der Stickstoff belegen 4 der 6 Koordinationsstellen eines Ni^{2+}-Ions, mit dem die Säule beladen ist, während die 2 freien Koordinationsstellen des Ions, die ansonsten mit Wasser besetzt sind, durch zwei Imidazolringe des Proteins belegt werden können, wodurch selektiv das Hexahistidinmarkierte, überexprimierte Protein an die Säule binden kann (daher auch die Bezeichnung Nickelchelat-Chromatographie). Nach dem Waschen der Säule kann das Protein durch pH-Gradient (Protonierung der Histidinseitenketten) oder Imidazol (kompetetive Verdrängung) eluiert werden.

Nach Äquilibrierung der Säule (Säulenvolumen 2 mL) in Bindepuffer bzw. Harnstoff-Bindepuffer wurde der Rohextrakt aufgetragen. Nach Waschen der Säule

bis zum proteinfreien Durchlauf wurde bei denaturierender Aufreinigung von Harnstoff-Bindepuffer auf Bindepuffer umgestellt, da sich die Elution ohne hohe Harnstoffkonzentration als einfacher handhabbar und besser reproduzierbar herausgestellt hatte. Danach wurde ein linearer Gradient von etwa 20 Säulenvolumen von Bindepuffer auf Elutionspuffer angelegt und hierbei Fraktionen von jeweils 2 mL aufgefangen.

Die Fraktionen wurden mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) in 10% Acrylamid-Gelen nach Schägger und von Jagow [Schägger & von Jagow, 1987] auf PCP-Gehalt und Reinheit geprüft, und geeignete Fraktionen wurden vereinigt und durch Dialyse gegen NMR-Puffer von Imidazol befreit. Alle Schritte erfolgten bei RT, anschließend wurde nativ aufgereinigtes Protein bei 4°C gehalten, denaturierend aufgereinigtes wurde vorher noch einmal zurückgefaltet, s.u..

4.2.1.5. Rückfaltung denaturierend aufgereinigter PCPs

Denaturierend aufgereinigte PCPs wurden nach der chromatographischen Reinigung nicht direkt gegen NMR-Puffer dialysiert, da durch die schnelle Umpufferung von Harnstoff-Bindepuffer auf Bindepuffer auf der Säule nicht sicher davon ausgegangen werden konnte, daß das Protein auf der Säule korrekt gefaltet wurde. Deshalb wurden die vereinigten PCP-haltigen Fraktionen zunächst noch einmal mit festem Harnstoff auf eine Konzentration von 8 M gebracht, um evtl. fehlgefaltetes Protein zu entfalten, und danach erfolgte die Dialyse gegen NMR-Puffer, wobei sich PCP zurückfaltete. Die vorbereitenden Arbeiten wurden bei Raumtemperatur durchgeführt, um das Ausfallen von Harnstoff zu vermeiden. Dann wurde im Kühlraum von RT auf 4°C abgekühlt. Alle folgenden Schritte der Reinigung erfolgten bei 4°C.

4.2.2. Beladungsassays

4.2.2.1. Phosphopantetheinylierungsassay (HPLC)

Zur Analyse des Phosphopantetheinylierungsgrades von PCP wurde das von M. R. Mofid (unveröffentl. Ergebnisse) entwickelte HPLC-Verfahren eingesetzt. *Holo*- und *apo*-TycC3-PCP werden auf einer ET 250/3 Nucleosil 120-3 C_{18}-Säule (Macherey-Nagel GmbH&Co. KG, Düren) getrennt und das Verhältnis der Peakintegrale als Verhältnis der beiden PCP-Formen angenähert.

Hierzu wurden 40 μL Proteinlösung (mit etwa 100 pmol PCP) mit 80 μL Lösung B (s. u.) versetzt und von diesem Ansatz 100 μL auf die Säule gegeben. Folgendes Profil wurde bei 40°C und 0,5 mL/min angelegt, während bei 220 nm detektiert wurde:

Zeit/min	0	30	35	36	40
% vol Lsg. B	40	95	95	40	40

Lösung A: 0,1% vol. Trifluoressigsäure in Wasser

Lösung B: 0,1% vol. Trifluoressigsäure in Acetonitril

Die Retentionszeiten von *holo*-TycC3-PCP (11,7 min) und *apo*-TycC3-PCP (12,9 min) gewährleisten eine Basislinien-Trennung der beiden Komponenten. Die Kalibrierung erfolgte durch beladene/unbeladene, MALDI-TOF geprüfte TycC3-PCP-Standards [Mofid, 1999].

4.2.2.2. Phosphopantetheinylierungsassay (Autoradiogramm)

Ein qualitativer Beleg der Erkennung von PCP durch die PPTase Sfp konnte durch Verwendung [^{3}H]-markierten 4'-Phosphopantetheins und Autoradiographie eines SDS-Polacrylamidgels des so beladenen Proteins erhalten werden. Der Vergleich des Autoradiogramms mit der Ablichtung des Coomassie-gefärbten Gels zeigt Proteinbanden auf, die Radioaktivität kovalent eingebaut haben.

Hierzu wurden 50 μL *apo*-PCP-Lösung (1 pmol/μL) mit dem gleichen Volumen 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 8, 10 mM $MgCl_2$, 0,2 μM Sfp und 3 μCi [^{3}H]-CoA für 60 min bei 37°C inkubiert. Dann wurde nach Hinzufügen von 15 μL BSA-Lösung (25 mg/mL) durch Zugabe von 800 μL eiskalter, 10%iger Trichloressigsäure (TCA) kopräzipitiert. Der Niederschlag wurde 15 min bei 13.000 upm in einer Tischzentrifuge bei 4°C abzentrifugiert und zweimal mit je 500 μL der eiskalten TCA gewaschen.

Für die Analyse durch SDS-PAGE und Autoradiogramm wurden 20 μL SDS-Probenpuffer zum Lösen des Pellets verwendet, kurz auf 60°C erhitzt und dann auf einem 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Das fertige Gel wurde Coomassie-gefärbt, zur Festhaltung des Bandenmusters eingescannt, mit *Amplify*-Lösung gemäß Anleitung des Herstellers behandelt und zur Belichtung eines Röntgenfilms verwendet. Die Gelelektrophorese inklusive SDS-Probenpuffer-Ansatz und Coomassie-Färbung wurden nach Schägger und von Jagow durchgeführt [Schägger & von Jagow, 1987].

4.2.2.3. Aminosäure-Beladungsassay

Der Transfer einer Aminosäure auf den 4'PP-Kofaktor durch eine A-Domäne, der zu einer kovalenten Fixierung des Substrates als Thioester am *holo*-PCP führt und ein

Beleg für eine funktionierende Protein-Protein-Interaktion zwischen A-Domäne und PCP ist, kann durch Verwendung radioaktiver Aminosäuren verfolgt werden. Nach Präzipitation des Ansatzes mit Trichloressigsäure (TCA) und Auswaschen ungebundener Aminosäure kann die Radioaktivität im Niederschlag quantifiziert werden. Da die nötige Aktivierung der Aminosäure als Aminoacyladenylat ATP-abhängig ist, wird ein Reaktionsansatz ohne ATP als Nullwert abgezogen.

50 pmol *holo*-TycC3-PCP wurden mit 50 oder 100 pmol A-Domäne in 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 8, 10 mM $MgCl_2$, 200 pmol [^{14}C]-L-Tyrosin (auf 2 μCi Radioaktivität mit unmarkiertem Tyrosin gebracht) bei 37°C inkubiert und nach der gewünschten Reaktionszeit mit 15 μL BSA-Lösung (25 mg/mL) durch Zugabe von 800 μL eiskalter, 10%iger TCA kopräzipitiert. Der Niederschlag wurde 15 min bei 13.000 upm in einer Tischzentrifuge bei 4°C abzentrifugiert und zweimal mit je 500 μL der eiskalten TCA gewaschen, bevor es in 300 μL Ameisensäure gelöst und im Szintillationszähler ausgewertet wurde.

4.2.3. NMR-Probenbereitung

Nach Dialyse der Proteinproben gegen NMR-Puffer wurden diese in Centriprep- und Centricon-Konzentratoren bei 4500 g in der Zentrifuge einkonzentriert. Es handelt sich hierbei um Ultrafiltrationsmembranen, durch die die Lösung aufgrund der Zentrifugalkraft gedrückt wird, während das Protein sich vor der Membran in der Lösung anreichert. Je nach Proteingehalt wurde auf 450 oder 270 µL Volumen eingeengt und anschließend mit $^1/_9$Vol. D_2O versetzt.

Für Messungen von PCP in reinem D_2O wurde die entsprechende Probe im geschlossenen Röhrchen zunächst eingefroren, indem dieses in pulverisiertem Trockeneis gedreht wurde, so daß die Lösung sich verteilte und großflächig und blasenfrei an der Röhrchenwand einfror. Dann wurde das Röhrchen geöffnet und mit Laborfilm verschlossen, der dann mit einer Kanüle mit kleinen Löchern versehen wurde (Verhinderung des Herausblasens von Lyophilisat beim Belüften). Das Röhrchen wurde noch gefroren im Vakuum lyophilisiert und hinterher im ursprünglichen Volumen D_2O aufgenommen. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Die Proben wurden grundsätzlich bei 4°C gelagert.

4.3. NMR-Spektroskopie

4.3.1. Spektrometer

Die für diese Arbeit verwendeten NMR-Experimente wurden bei 300 K auf Bruker AMX 500, DRX 500, DRX 600 und DMX 750 Spektrometern von C. Renner und R. Baumgartner durchgeführt. Alle Spektrometer waren mit ^{1}H, ^{13}C, ^{15}N -Tripelresonanz-Probenköpfen und Pulsfeldgradientenzubehör ausgestattet.

4.3.2. Experimente für das Assignment

Für die Zuordnung der Proteinrückgrat-Signale wurden CBCA(CO)NH-, CT-HNCA- und CT-HNCO-Tripelresonanzexperimente aufgenommen [Grzesiek & Bax, 1992a; Grzesiek & Bax, 1992b].

Isotropes Mischen [Braunschweiler & Ernst, 1983] erfolgte durch DIPSI-2- [Shaka *et al.*, 1988] oder MLEV-17- [Bax & Davis, 1985] Spinlocksequenzen. Wasserunterdrückung in Messungen an 90% H_2O/10% D_2O-Proben wurde durch Integrierung einer WATERGATE-Sequenz [Sklenár *et al.*, 1993] in die jeweiligen Pulssequenzen durchgeführt, während die Restwasserunterdrückung bei 100% D_2O-Proben durch leichte Vorsättigung erreicht wurde. STATES-TPPI-Phasenzyklen [Marion *et al.*, 1989b] wurden zur Quadratur-Detektion in den indirekt detektierten Dimensionen herangezogen.

Die Tripelresonanzexperimente, 2D TOCSY [Dhalluin *et al.*, 1996] (t_m=57 ms), 3D ^{1}H-^{15}N TOCSY-HSQC [Marion *et al.*, 1989a] (t_m=58 ms), 2D NOESY [Lippens *et al.*, 1995] (t_m=120 und 70 ms) und 3D ^{1}H-^{15}N NOESY-HSQC [Jahnke *et al.*, 1995; Talluri & Wagner, 1996] (t_m=120 und 90 ms) in H_2O wurden als *water flip-back*-Version aufgenommen. Das ^{13}C-separierte NOESY-HSQC [Muhandiram *et al.*, 1993] wurde in D_2O mit einer Mischzeit von 110 ms durchgeführt.

Für die Zuordnung der Seitenketten-Resonanzen dienten 2D NOESYs (t_m=70 ms und 120 ms) in D_2O, das 3D TOCSY-HSQC und ein 3D HCCH-TOCSY [Kay *et al.*, 1993] (t_m=8 ms bzw. 19 ms).

2D ^{1}H-^{15}N HSQCs wurden nach [Mori *et al.*, 1995; Mori *et al.*, 1996] aufgenommen, um Signalverlust durch schnellen chemischen Austausch zu verringern.

4.3.3. Experimente zur Bestimmung von Diederwinkeln

Aus einer Kombination von 2D $^{13}C'$-[$^{13}C^{\gamma}$[Aromat]] Spin-Echo-Differenz- und 2D ^{15}N-[$^{13}C^{\gamma}$ [Aromat]] Spin-Echo-Differenz ^{1}HN-^{15}N HSQC [Hu *et al.*, 1997] konnten einige χ_1-Winkel von aromatischen Seitenketten extrahiert werden (die Auswertung

übernahm freundlicherweise R. Baumgartner). Aus einem 3D HNHA [Vuister & Bax, 1993] wurden ϕ-Diederwinkel für das Proteinrückgrat ermittelt.

4.3.4. Relaxationsmessungen

Zur Ermittlung von ^{15}N T_2, $^{15}N\{^1H\}$ NOE und ^{15}N(Dipol-CSA) Crosskorrelationsraten bei 500 MHz Protonenfrequenz wurden modifizierte Versionen der von Farrow *et al.* [Farrow *et al.*, 1994] und Tessari *et al.* [Tessari *et al.*, 1997] vorgestellten Experimente durchgeführt, bei denen statt der gradienten-selektierten Wasserunterdrückung die WATERGATE-Sequenz verwendet wurde. In den $T_{1\rho}$-Experimenten wurde eine Sättigung des Wassers durch schwache *water flip-back*-Pulse vermieden. Die Relaxationsintervalle für $T_{1\rho}$ wurden nach dem Schema 16 ms+n*32 ms (n=0, 1, 2, 3, 4) gewählt [Jones *et al.*, 1996]. Sättigung der Amidprotonen im heteronuklearen NOE-Experiment wurde durch eine Reihe von 120°-Pulsen vor dem Experiment erreicht [Markley *et al.*, 1971]. In [Tessari *et al.*, 1997] ist der Phasenzyklus für den Empfänger nicht korrekt; verwendet wurde daher für die Messungen (P, -P, -P, P) mit P=(x, -x, -x, x) statt wie beschrieben (2P, 4(-P), 2P). Für die Crosskorrelation wurden Relaxationsraten von 40 ms und 80 ms gewählt. Für alle Relaxationsexperimente wurden mindestens 120 (^{15}N) mal 2048 (^1H) Punkte bei einer spektralen Breite von 32 ppm (^{15}N) und 12 ppm (^1H) augenommen. Die Relaxationsmessungen wurden zeitlich versetzt (*interleaved*) aufgenommen, um den Einfluß von eventuellen äußeren Instabilitäten zu reduzieren.

NOE-Intensitäten wurden einfacherweise mit dem Verhältnis der Peakhöhen in den Experimenten mit bzw. ohne Protonensättigung gleichgesetzt. Um $T_{1\rho}$-Werte zu erhalten, wurden die experimentellen Daten (in Form der Peakhöhen) durch einen einfachen Rastersuche-Algorithmus an eine Kurve $A*\exp(-t/T_{1\rho})$ angefittet. Unsicherheiten wurden durch wiederholte Aufnahme einzelner Datenpunkte oder des gesamten Relaxationsexperimentes ermittelt. Die Ermittlung der Crosskorrelationsraten basierte darauf, daß die Verhältnisse der Signalintensitäten (in Form der Peakhöhen) aus dem Crosskorrelations-Experiment und dem zugehörigen Referenzexperiment einer Relation $T*\eta$ folgen [Tessari *et al.*, 1997]. Eine Fehlerabschätzung der η-Raten erfolgte anhand des Vergleichs der Werte zweier Experimente mit unterschiedlichen Relaxations-Intervallen. In Abb. 5.13 (oben) ist der Mittelwert beider Messungen gezeigt.

4.3.5. Spektrenprozessierung

Die Prozessierung der Spektren erfolgte mit der Software CC-NMR [Cieslar *et al.*, 1993]. Die Auflösung in den indirekten Dimensionen wurde durch *linear prediction* und *zero fillig* verbessert [Edison *et al.*, 1994].

4.3.6. Spektrenauswertung und Festsetzung der Randbedingungen

Die Auswertung der Spektren, insbesondere die Signalzuordnung, NOE-Intensitätsauswertung und Datenverwaltung geschah mit Hilfe der in der Arbeitsgruppe von T. A. Holak entwickelten Software NMRscout, die auf CC-NMR [Cieslar *et al.*, 1993] basiert.

Interproton-Abstände wurden aus den 2D NOESYs in H_2O und D_2O sowie dem ^{15}N-editierten und dem ^{13}C-editierten NOESY extrahiert. Dabei wurden die Peakhöhen als Maß für die NOE-Intensität herangezogen. Es wurden 3 Klassen von NOEs unterschieden, die jeweils entsprechenden Abständen der beteiligten Atome zugeordnet wurden: schwache NOEs (1,8 Å bis 5,0 Å), mittlere NOEs (1,8 Å bis 3,5 Å) und starke NOEs (1,8 Å bis 2,8 Å). Eine interne Kalibrierung der Zuordnung von Abständen zu NOE-Intensitäten wurde durchgeführt, indem aufgelöste intraresiduale Aromatensignale von Seitenketten den entsprechenden Standardabständen zugeschrieben und die anderen Signalintensitäten hierzu in Relation gesetzt wurden.

Für entartete oder nicht unterscheidbare Signale wurden entsprechende Pseudoatomkorrekturen nach Wüthrich [Wüthrich, 1986] auf die Abstandsbedingungen aufgeschlagen. Der erlaubte Fehler bei Diedern wurde auf ±30° für ϕ und ±40° für χ_1 festgelegt. Für die drei identifizierten *trans*-Xxx-Pro-Amidbindungen wurden für die jeweilige dem Prolin vorangehende Aminosäure ψ-Diederwinkel von 120° ±60° gesetzt.

Amidprotonen von Resten, die aufgrund der ermittelten Sekundärstruktur in Helices liegen und die keinen Austausch mit 100% D_2O zeigten, wurden den regulären, helicalen Wasserstoffbrückenbindungen zugeordnet. Für solche wurden jeweils zwei Abstandsbedingungen gesetzt: 1,9 Å (O-HN) und 2,9 Å (O-N).

Die Strukturrechnung erfolgte mit dem Programm X-PLOR 3.1 [Brünger, 1992; Brünger & Nilges, 1993]. Einzelheiten zu den Rechnungen sind unter 5.4.4 aufgeführt.

4.4. Grafikanwendungen

Oberflächenpotential-Darstellungen von Proteinen wurden mit dem Programm GRASP [Nicholls *et al.*, 1991] unter Verwendung eines auf ganzzahlingen Ladungen der polaren Aminosäuren beruhenden Potentials (mitgelieferte Datei *full.crg*) berechnet und dargestellt.

Andere Darstellungen von Proteinstrukturen wurden mit MOLMOL [Konradi *et al.*, 1996] vorbereitet, in 3D-Szenen umgesetzt und mit der *freeware* PovRay (http://www.povray.org) gerendert.

5. Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Peptidyl-Carrier-Proteine (PCPs) in *E. coli* überproduziert, aufgereinigt und NMR-spektroskopisch untersucht. Das überwiegend verwendete TycC3-PCP wurde mit verschiedenen Methoden auf seine biochemische Funktionalität überprüft. Nach Herstellung unmarkierter, ^{15}N- und ^{13}C-markierter Proteinproben von TycC3-PCP wurde schließlich mittels NMR-Spektroskopie und *simulated annealing*-Rechenverfahren die dreidimensionale Struktur dieses Proteins als Prototyp für PCP-Domänen nichtribosomaler Peptidsynthetasen bestimmt.

5.1. Expressionssysteme für PCPs

Die zwei untersuchten PCPs sind aus den PCP-Domänen der Tyrocidin-Synthetase I (TycA) sowie aus dem dritten Modul der Tyrocidin-Synthetase III (TycC3) abgeleitet. Die Expressionssysteme sollen hier kurz beschrieben werden.

5.1.1. Expressionssystem für *apo*-TycA-PCP

Von Stachelhaus *et al.* [Stachelhaus *et al.*, 1996] ist ein Expressionssystem vorgestellt worden, das eine Überproduktion von TycA-PCP ermöglicht. Es handelt sich um einen *E. coli*-Stamm SG13009 [pREP4, pQE60-TycA-PCP], wobei das pQE60-Derivat das Strukturgen des PCPs und als C-terminale Fusion eine Hexahistidin-Markierung enthält. Die Reste 2 bis 108 des rekombinanten Proteins sind identisch zu den Resten 415 bis 521 von TycA, während das N-terminale Methionin und eine C-terminale Sequenz SHHHHHH durch das verwendete Plasmid angefügt wurden. Der konservierte *core T*-Bereich liegt in diesem Protein so, daß das invariante Serin die 68. Aminosäure darstellt (die in der o.g. Publikation genannten Aminosäurenummern sind inkorrekt). Die Proteinhälfte N-terminal zu S68 ist ausgesprochen lang gewählt worden, und die Folgen, die sich hieraus ergeben, werden in Kapitel 6.1 erörtert.

Das Expressionssystem ermöglicht die Herstellung von unmarkierten sowie vollständig markierten (^{15}N) Proteinproben, die nicht phosphopantetheinyliert sind, da die endogene *E. coli* PPTase ACPS neben ihrem natürlichen Substrat ACP keine NRPS-PCPs erkennen und modifizieren kann [Lambalot *et al.*, 1996] und keine NRPS-selektive PPTase koexprimiert wird. Bei der Expression bestanden Löslichkeitsprobleme, die sich teilweise durch Kultivierung in Gegenwart von

20 mM Magnesiumchlorid im Medium umgehen ließen [Hüser, 1996]. Aus 5 L Kulturmedium konnten Proben von etwa 20 bis 25 mg TycA-PCP hergestellt werden. Wie in den nachfolgenden Kapiteln näher erläutert wird, neigt das TycA-PCP zur Entfaltung und Präzipitation, weswegen die Aufreinigung nach ersten nativen Versuchen stets denaturierend erfolgte.

5.1.2. Expressionssysteme für *apo*-TycC3-PCP

Durch Kotransformation von *E. coli* BL21 λDE3 mit pQE70-TycC3-PCP und pREP4 sowie von *E. coli* SG13009 [pREP4] mit pQE70-TycC3-PCP wurden zwei Expressionssysteme für nicht phosphopantetheinyliertes (*apo*-) TycC3-PCP hergestellt. Um vollständig vergleichbares Wachstums- und Expressionsverhalten wie beim Expressionssystem für das *holo*-Protein (s. u.) zu gewährleisten, wurde auch hier BL21 als Wirt gewählt. Allerdings zeigte das gleichzeitig hergestellte SG13009-System weniger Verunreinigungen, die neben dem Hexahistidin-markierten Protein an die Nickelchelat-Säule binden und koeluieren, bei gleicher Effizienz der Expression. Daher wurde dieses System für präparative Expressionen bevorzugt verwendet. Das rekombinante Strukturgen in pQE70-TycC3-PCP ist unter dem Expressionssystem für *holo*-TycC3-PCP (5.1.3) beschrieben.

5.1.3. Expressionssystem für *holo*-TycC3-PCP

Zur Überproduktion von *holo*-TycC3-PCP stand zu Beginn dieser Arbeit ein Expressionssystem zur Verfügung, welches durch Koexpression des PCPs mit der PPTase Gsp aus dem Gramicidin-S-Synthetase-System eine gute posttranslationale Modifikation mit dem Kofaktor gewährleistet [Stachelhaus *et al.*, 1998]. Der Expressionsstamm wurde von S. Dökel hergestellt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um *E. coli* BL21 λDE3 [pREP4-Gsp, pQE70-TycC3-PCP], der auf dem modifizierten Repressorplasmid pREP4-Gsp unter T7-Promotor-Kontrolle das Gen der 4'-Phosphopantetheinyl-Transferase Gsp enthält, während auf dem pQE70-Derivat ein C-terminales Hexahistidin-markiertes Protein kodiert wird, dessen Aminosäuren 2 bis 83 zu den Resten 3032 bis 3113 der Tyrocidin-Synthetase III (TycC) aus *B. brevis* identisch sind, während das N-terminale Methionin und die C-terminale Sequenz RSHHHHHH durch gezielte Klonierung in pQE70 an die natürlichen Reste fusioniert wurden (vergl. Beschreibung der Plasmide, Kap. 3.2.1.4). Durch IPTG-Zugabe wird sowohl das *tycC3-PCP*-Gen auf dem pQE-Derivat als auch das Gen für die im Chromosom des Stammes integrierte T7-RNA-Polymerase induziert, die für die Transkription des *gsp*-Gens benötigt wird.

5.2. Expression und Aufreinigung der PCPs

5.2.1. Präparation von apo-TycA-PCP und NMR-spektroskopische Untersuchungen

Mit dem *apo*-TycA-Expressionssystem wurden unmarkierte und vollständig ^{15}N-markierte Proteinproben hergestellt, die aufgrund der Abwesenheit einer PCP-erkennenden PPTase nicht phosphopantetheinyliert vorlagen. Aus 5 L Medium konnten Proben von etwa 25 mg Protein (unmarkiert) oder etwa 20 mg (^{15}N-markiert) für die spektroskopischen Untersuchungen vorbereitet werden.

Die Aufreinigung des Proteins konnte über Ni-NTA IMAC nativ oder denaturierend erfolgen. Bei nativer Aufreinigung kam es allerdings zu Komplikationen durch ungefaltetes sowie durch nicht lösliches PCP. So ist bereits zum Zeitpunkt des Zellaufschlusses mit der Frenchpress etwa $^{1}/_{10}$ des überexprimierten Proteins unlöslich [Hüser, 1996]. Die NMR-spektroskopischen Messungen an den nativ aufgereinigten Proben zeigten des weiteren, daß auch stets ein merklicher Anteil der TycA-PCP-Moleküle nicht korrekt gefaltet war und unter der Messung Protein ausfiel. Aus diesem Grund wurde versucht, das Protein zu denaturieren und danach zurückzufalten. Zur Probe wurde eine ausgefallene TycA-PCP-Probe aus dem NMR-Röhrchen bei RT in Harnstoff-Bindepuffer gebracht. Nach mehrmaliger Dialyse gegen Harnstoff-freien NMR-Puffer wurde die Probe wie bei einer herkömmlichen Probenpräparation wieder eingeengt. Nachfolgende NMR-Spektren belegten, daß die frisch renaturierte TycA-PCP-Probe korrekt gefaltet war. Nachfolgende Präparationen von TycA-PCP wurden daraufhin komplett denaturierend aufgereinigt (vergl. Abb. 5.2).

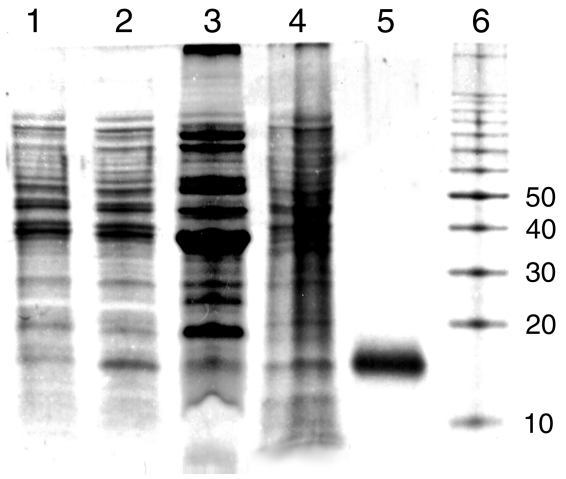

Abb. 5.1: SDS-PAGE der nativen Aufreinigung von TycA-PCP

10%iges Gel nach Coomassie-Färbung. Bahn 1: Zellrohextrakt unmittelbar vor Induktion; Bahn 2: Zellrohextrakt nach 2 Stunden Induktion; Bahn 3: Zelltrümmer-Pellet nach Aufschluß; Bahn 4: Durchbruch der Ni-NTA-Chromatoraphie; Bahn 5: vereinigte, PCP-haltige Fraktionen nach Elution; Bahn 6: 10 kDa-Protein-Leiter als Größenstandard. Bei denaturierender Aufreinigung zeigt das Produkt die gleiche Reinheit wie in Bahn 5 zu sehen. TycA-PCP hat ein Molgewicht von 13,1 kDa; für Hexahistidin-markierte Proteine wird jedoch oft ein leicht verlangsamtes Laufverhalten beobachtet.

Die Neigung von TycA-PCP, während der Aufnahme von NMR-Spektren sich wieder zu entfalten und auszufallen, konnte durch die Rückfaltung nicht beseitigt werden. Daher wurde die NMR-spektroskopische Untersuchung dieses Konstruktes zugunsten des zu diesem Zeitpunkt verfügbaren TycC3-Konstruktes aufgegeben.

Nach Kenntnis der in dieser Arbeit vorgestellten Struktur von TycC3-PCP in Lösung und mit der Annahme, daß es sich hier um einen allgemeingültigen Faltungstyp für PCPs handelt, kann die Denaturierung und Rückfaltung als universelle und einfache Methode der Proteinreinigung von PCPs empfohlen werden. Da auch bei cysteinhaltigen PCPs aufgrund der vorliegenden Struktur keine funktionellen Disulfidbrücken zu erwarten sind, ist bei deren Rückfaltung nur auf einen prinzipiellen Oxidationsschutz zu achten.

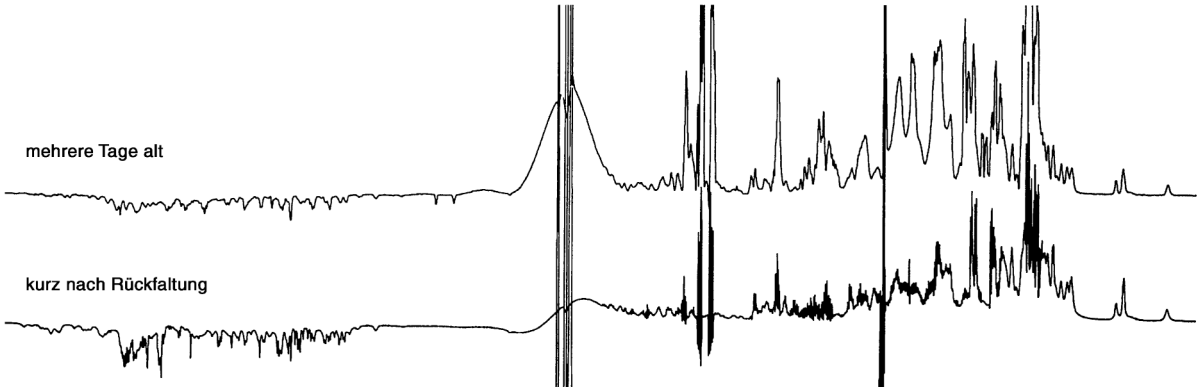

Abb. 5.2: Vergleich von TycA-PCP vor und nach Rückfaltung

Gezeigt sind die ^{1}H-NMR-Spektren derselben Probe, aufgenommen unter denselben Bedingungen mit gleichen Parametern; oben nachdem die Probe einige Tage bei 4°C gelagert und zwischendurch für einige NMR-Experimente verwendet worden war, unten unmittelbar nach Rückfaltung aus 8 M Harnstoff-Puffer und erneuter Ankonzentrierung. Im vergleich zum unteren Spektrum fällt auf, daß die Signale oben zusammengefallen sind, was darauf hindeutet, daß die Dispersion der chemischen Verschiebungen der einzelnen Reste stark abgenommen hat. Das zeigt an, daß sich diese Reste nicht mehr in gefalteter Umgebung befinden. Da die Spektren nur zu einem qualitativen Vergleich dienen, ist keine ppm-Skala angebracht.

5.2.2. Präparation von apo- und holo-TycC3-PCP

Nachdem die Denaturierung und Rückfaltung von TycA-PCP erfolgreich war, wurde das TycC3-PCP grundsätzlich denaturierend aufgereinigt. Das Arbeiten im denaturierenden Milieu hatte nicht nur den Vorteil, daß fehlgefaltete Proteinmoleküle neu gefaltet wurden, sondern der Nebeneffekt, daß sämtliche Proteasen ebenfalls denaturiert wurden, führte zu besserer Ausbeute und Qualität des Präparates. Des weiteren war der Zellaufschluß mit 8-molarem Harnstoffpuffer mit äußerst geringem Aufwand und großer Effizienz verbunden.

Von TycC3-PCP wurden unmarkierte, vollständig ^{15}N-markierte und vollständig ^{15}N, ^{13}C-markierte Proben hergestellt, wobei durch Wahl des Expressionssystems *apo*- oder *holo*-PCP produziert werden konnte. Bei TycC3-PCP-Präparationen lag die Ausbeute im gleichen Rahmen wie bei TycA-PCP. Vollständig ^{15}N, ^{13}C-markierte Expressionskulturen wurden in 2 L Medium angesetzt, ansonsten wurden 5 L Medium verwendet. Die Präparation erfolgte analog zu TycA-PCP durch Ni-NTA IMAC, Dialyse und Ankonzentrierung und brachte vergleichbare Ausbeuten mit gleicher Reinheit (vergl. Abb. 5.1).

5.3. Biochemische Untersuchungen an TycC3-PCP

Während das TycA-PCP hinsichtlich seiner biochemischen Funktionalität charakterisiert [Stachelhaus *et al.*, 1996] und von mehreren Arbeitsgruppen für unterschiedliche Belange verwendet worden ist, ist das TycC3-PCP bisher nicht näher untersucht worden. Die Homologie, die die PCPs auf Sequenzebene zeigen, sowie die bisherigen Forschungsergebnisse auf dem Gebiet der nichtribosomalen Peptidsynthese, die ein einheitliches, universelles Funktionsbild der PCPs verschiedenster NRPS-Systeme zeichnen, lassen erwarten, daß hier kein wesentlicher Unterschied besteht. Allein das Design des Proteins, d.h. die Wahl von erster und letzter Aminosäure des PCP-Konstruktes auf dem Polypeptidstrang des NRPS-Moduls, stellt einen wesentlichen Unterschied dar, denn eine ungünstige Wahl der Domänengrenzen kann durchaus die Faltung des PCPs beeinträchtigen und damit seine Funktion. Das dies nun gerade eher bei TycA-PCP der Fall ist (vergl. Löslichkeits- und Faltungsprobleme bei der Aufreinigung und Messung), welches bereits hinreichend charakterisiert ist bezüglich Modifizierbarkeit durch PPTasen und Aminosäurebeladung durch eine A-Domäne [Stachelhaus *et al.*, 1996; Lambalot *et al.*, 1996], führt zu der berechtigten Annahme, daß die Funktionalität von TycC-PCP, bei dem diese Probleme nicht bestehen, umso gesicherter sein sollte. Dennoch bestand Bedarf an biochemischen Untersuchungen, die diese Annahme belegen.

5.3.1. *In vitro*-Phosphopantetheinylierung von TycC3-PCP durch Sfp

Zur qualitativen Kontrolle der posttranslationalen Modifikation mit dem 4'PP-Kofaktor wurde der radioaktive Phosphopantetheinylierungsassay mit einer Probe aufgereinigten *apo*-PCPs durchgeführt (s. Kap. 4.2.2.2) und auf einem SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Coomassie-Färbung folgte eine Audiographie des Gels, die zusammen mit dessen Coomassie-Färbung in Abb. 5.3 dargestellt ist. Eine Schwärzung des Films über der Bande des mit [^{3}H]-CoA und Sfp inkubierten PCPs zeigt die Beladung mit dem Kofaktor an.

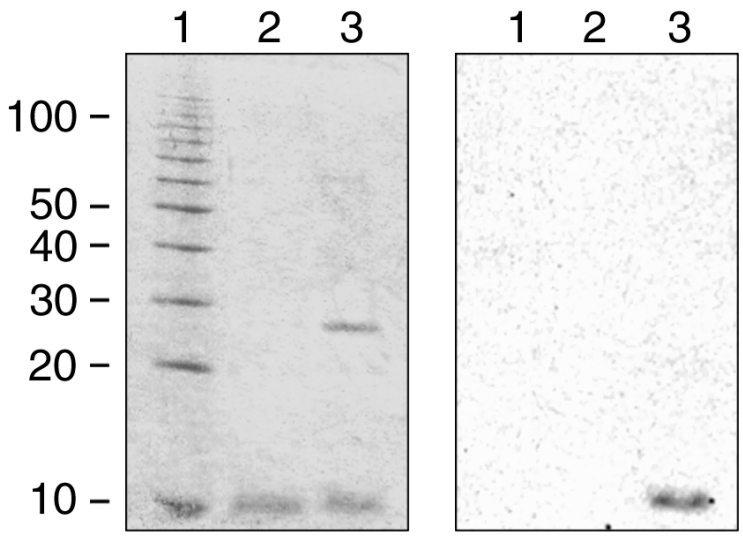

Abb. 5.3: Autoradiographie eines Phosphopantetheinylierungsassays von TycC3-PCP

Nach Durchführung des Assays zur Beladung von PCP mit [^{3}H]-CoA wurden die Proben auf einem SDS-PAGE (links) getrennt und hiervon ein Autoradiogramm (rechts, durch Amplify verstärkt, mehrere Tage aufgelegt) angefertigt. Bahn 1: Proteinmarker (kDa), Bahn 2: PCP und CoA ohne Sfp, Bahn 3: PCP und CoA in Gegenwart von Sfp. Die PCP-Banden laufen bei 10 kDa, Sfp bei 28 kDa.

5.3.2. Quantifizierung der Phosphopantetheinylierung mittels HPLC

Zur Quantifizierung des Grades der posttranlationalen Modifikation von PCP wurde von M. R. Mofid (unpublizierte Ergebnisse) ein HPLC-Verfahren entwickelt, das eine vollständige Trennung und Quantifizierung von *apo*- und *holo*-PCP auf einer *reversed phase*-Säule im analytischen Maßstab ermöglicht (s. Kap. 4.2.2.1). Mit dieser Methode wurden Fraktionen von präpariertem (nicht mit PPTase koexprimierten) *apo*-PCP, (koexprimiertem) *holo*-PCP und nicht-koexprimierten, aber *in vitro* phosphopantetheinyliertem PCP analysiert. Die *in vitro*-Phosphopantetheinylierung erfolgte analog zum radioaktiven Phosphopantetheinylierungsassay, wobei jedoch unmarkiertes CoA verwendet wurde (s. Kap. 4.2.2.2). Dieser Ansatz wurde nach Ablauf der Reaktion wie die anderen Proben behandelt und auf der HPLC getrennt. Die HPLC-Messungen wurden in Zusammenarbeit mit M. R. Mofid durchgeführt.

Folgende 4'PP-Beladungswerte wurden typischerweise erhalten:

apo-PCP, nicht koexprimiert:	< 3%
holo-PCP, mit Gsp koexprimiert:	schwankend um 80%
apo-PCP, *in vitro* mit Sfp beladen:	100%

5.3.3. *In trans*-Beladung durch eine A-Domäne

Da bei TycA-PCP eine Beladung des *holo*-PCPs mit einer Aminosäure durch die zugehörige A-Domäne beobachtet werden konnte [Stachelhaus *et al.*, 1996], sollte diese Reaktion auch für *holo*-TycC3-PCP durchgeführt werden. Dies erfolgte in einem

Aminosäure-Beladungsassay (s. Kap. 4.2.2.3) unter Verwendung der als distinktes Protein exprimierten A-Domäne aus demselben Modul, d.h. TycC3-A [Mootz & Marahiel, 1997], die Probe wurde freundlicherweise von M. R. Mofid bereitgestellt. Diese A-Domäne aktiviert selektiv L-Trp oder L-Tyr; der Assay wurde mit L-Tyrosin durchgeführt.

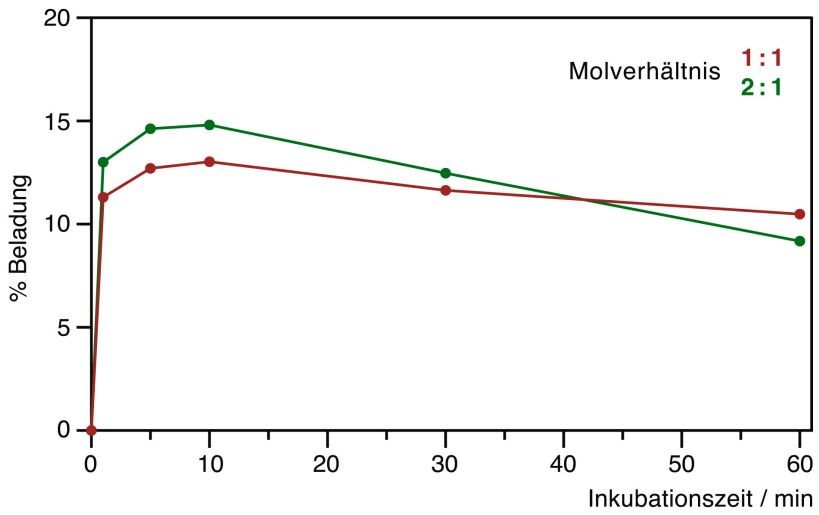

Abb. 5.4: Zeitlicher Verlauf der Beladungsreaktion von holo-TycC3-PCP mit L-Tyrosin

Der Versuch wurde mit äquimolaren Verhältnissen von A- und PCP-Domäne (rot) sowie mit doppelter Menge A-Domäne (grün) durchgeführt. Angegeben ist die Beladung des PCPs relativ zur Gesamtmenge im Ansatz.

Da die Effizienz der Beladung einer T-Domäne, die nicht *in cis* sondern *in trans* zur A-Domäne vorliegt (also nicht auf demselben Polypeptidstrang), durch den viel ungünstigeren Entropieterm der Reaktion weit weniger effizient ist als eine herkömmliche Beladung innerhalb eines Moduls, wurde der Assay mit molaren Verhältnissen A:PCP von 1:1 und 2:1 durchgeführt. Der zeitliche Verlauf der Messungen ist in Abb. 5.3.3 dargestellt. Die Maxima der Kurven liegen bei 14,8 % Beladung beim Molverhältnis 2:1 und bei 13,0 % für äquimolare Verhältnisse. Diese Beladungsraten sind in einem für die wenig effizienten *in trans*-Beladungen üblichen Rahmen [Weinreb *et al.*, 1998].

5.4. NMR-Spektroskopie und Strukturaufklärung

Der biochemischen Charakterisierung, die eine produktive Interaktion mit der zu TycC3-PCP gehörigen Adenylierungsdomäne sowie eine Erkennung und Modifikation durch die 4'-Phosphopantetheintransferase Sfp belegt hatte, konnten sich NMR-spektroskopische Untersuchungen mit dem Ziel der Strukturaufklärung anschließen. Da sowohl bei den mit PCP vergleichbaren ACPs der *E. coli* Fettsäure-synthase und der *S. coelicolor* Actinorhodinsynthase der 4'PP-Kofaktor nicht mit dem

Protein interagierte und offenbar vom Proteinkörper weg in das Solvens ragte, wurde auch bei PCP davon ausgegangen. 2D NOESY-Spektren von *apo*- und *holo*-TycC3-PCP waren identisch (hier nicht gezeigt). Bei der *holo*-Form ließen sich die Resonanzen des Kofaktors nicht finden, offenbar wurden sie von anderen Signalen überdeckt. Die folgenden NMR-Untersuchungen wurden mit *holo*-TycC3-PCP durchgeführt, aus o.g. Gründen wird aber nicht mehr explizit darauf hingewiesen.

5.4.1. HSQC-Spektrum

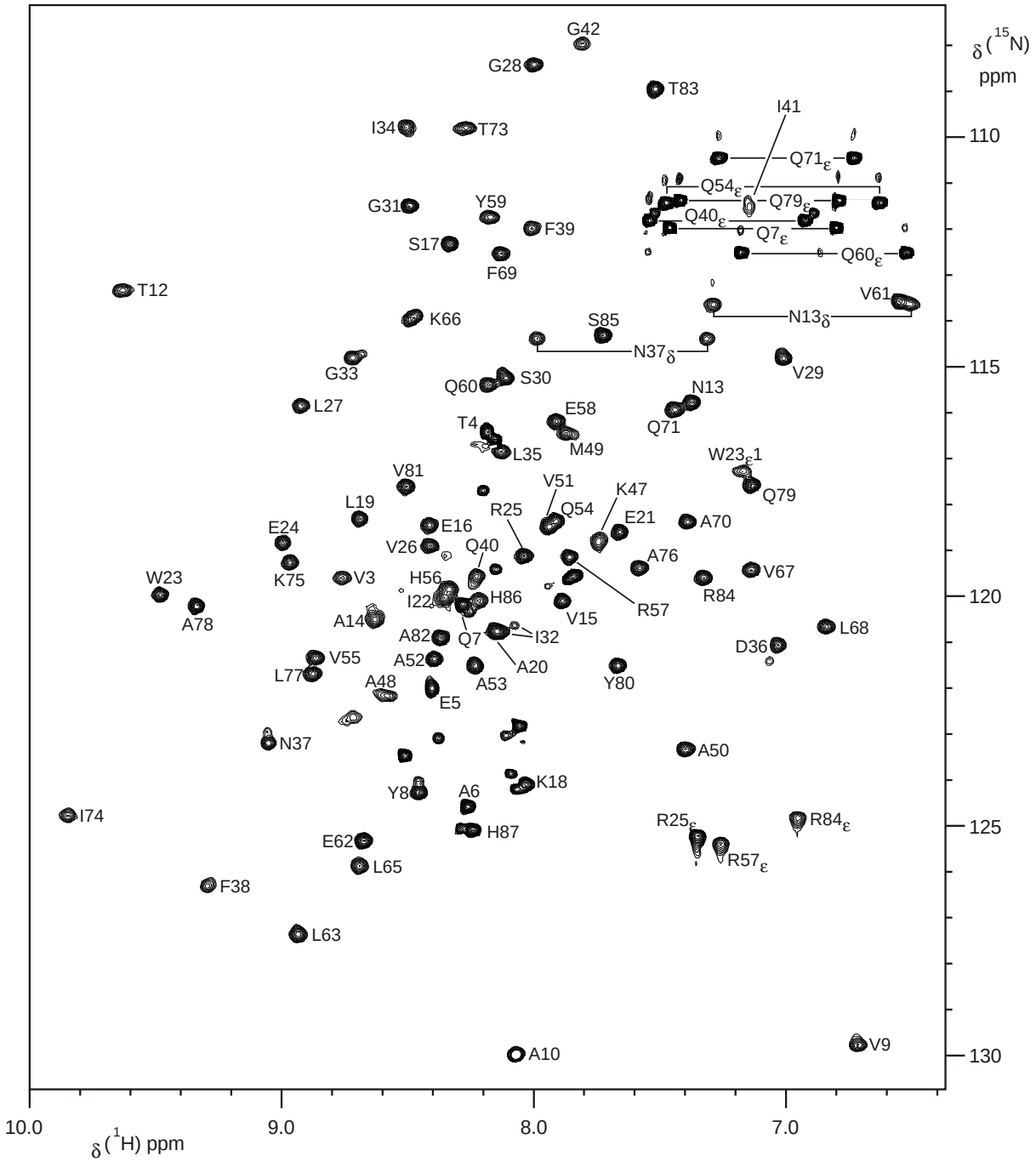

Abb. 5.5: ^{1}H-^{15}N HSQC-Spektrum von TycC3-PCP bei pH 5,05

Die Zuordnungen der Amidprotonsignale sind angegeben, Seitenketten –NH_2-Signale sind durch Balken gekennzeichnet. Die ε-Protonen von R25, R57 und R84 sind in das Spektrum hineingefaltet.

Das ^{1}H-^{15}N HSQC von TycC3-PCP ist in Abb. 5.5 dargestellt. Es zeigt eine gute Dispersion der Signale, die bei helicalen Proteinen prinzipiell geringer ausfällt als bei β-Faltblatt-dominierten. Nahezu alle Signale treten mit gleicher Intensität auf, mit Ausnahme derer aus dem Kofaktor-bindenden Bereich I41 bis S45. Für diese Reste

nimmt auch im NOESY die Anzahl von ^{1}H-^{1}H-NOEs von I41 zu nachfolgenden Resten hin ab, bis schließlich G43 bis S45 in keinem der Spektren beobachtbar sind. Die Homogenität der Signalintensitäten der meisten Resonanzen deutet schon darauf hin, daß PCP eine gut definierte Gesamtstruktur hat, abgesehen vom Bereich I41-S45, der offenbar flexibler ist. Dieser Bereich entspricht interessanterweise dem *coreT*-Motiv IGGHSL, dessen Serinrest posttranslational mit 4'PP modifiziert wird.

5.4.2. Sequentielle Zuordnung der Amidprotonresonanzen

Die sequentielle Zuordnung der Signale von Amidprotonen erfolgte nach der Standardprozedur, basierend auf der generellen Methodik nach Wüthrich [Wüthrich, 1986], erweitert durch das Hinzukommen von Tripelresonanzspektren [Bax & Grzesiek, 1993] während des Assignments. Folgende Spektren wurden verwendet:

3D ^{1}H-^{15}N-NOESY-HSQC (lange Mischzeit)

3D ^{1}H-^{15}N-TOCSY-HSQC

CBCA(CO)NH

HNCA

Die anfangs ausschließlich zur Verfügung stehenden 3D-NOESY- und 3D-TOCSY-HSQC-Spektren ermöglichten schon eine recht zügige Zuordnung, gestützt von der durch die relativ lange Mischzeit des NOESYs deutlich bemerkbaren Spindiffusion (Verteilung der Magnetisierung entlang des Moleküls). Nachdem auch die Tripelresonanz-Spektren verfügbar waren, konnte die bisherige Zuordnung von etwa der Hälfte der Reste umgehend verifiziert werden, und durch die kombinierte Nutzung der zwei Spektrensätze wurde das sequentielle Assignment der Amidprotonen in relativ kurzer Zeit abgeschlossen.

Alle Amidprotonen des Proteins, mit Ausnahme von M1, G43-S45 und den C-terminalen 4 Histidinen, konnten zugeordnet werden. Die Zuordnungen sind in dem in Abb. 5.5 dargestellten HSQC zu sehen.

Die anschließende Zuweisung der Seitenketten-Signale stützte sich auf die folgenden Spektren:

3D ^{1}H-^{15}N NOESY-HSQC, (kurze Mischzeit)

3D ^{1}H-^{15}N TOCSY-HSQC

3D HCCH-TOCSY

^{13}C-separiertes NOESY-HSQC

2D ^{1}H-^{1}H-NOESY (H_2O)

2D ^{1}H-^{1}H-NOESY (D_2O)

2D TOCSY

Der Großteil der Zuordnungsarbeit an den Seitenkettensignalen wurde anhand der 3D TOCSYs durchgeführt. Bei Mehrdeutigkeiten durch mangelnde Auflösung oder Signalüberlappung wurde das 2D TOCSY hinzugezogen. Die NOESYs wurden zur Hilfe genommen, wenn der TOCSY-Transfer nicht das gesamte Spinsystem abdeckte. In diesen Fällen konnte anhand der auffällig starken NOEs sehr oft das entsprechende Diagonalsignal des zugehörigen TOCSY-Peaks gefunden werden, obwohl kein TOCSY-Kreuzsignal selbst auftrat. Der Amidprotonenbereich des 2D NOESYs von TycC3-PCP ist in Abb. Abb. 2.7 dargestellt.

Überhaupt keine Seitenkettenresonanzen konnten den Resten M1-V3 und G43-S45 zugeordnet werden, wobei dies (V3 ausgenommen) aufgrund der fehlenden Amidproton-Zuordnung (s.o.) auch nicht zu erwarten war. Die Prolinreste 11, 64 und 72 zeigten alle die typischen, starken HN_{i-1}-$H\delta_i$ und $H\alpha_{i-1}$-$H\delta_i$ (X_{i-1}-P_i)-NOEs, also Kontakte der α- und Amidprotonen des jeweils vorhergehenden Restes zu den δ-Protonen des entsprechenden Prolins. Diese Kontakte sind nur in der *trans*-Konfiguration der Amidbindung möglich, und entsprechend wurden die Parameterdateien für die Strukturrechnung angelegt.

5.4.3. Sekundärstruktur-Bestimmung

Zur Bestimmung der Sekundärstruktur von PCP wurden die nach [Wüthrich, 1986] wesentlichen NMR-spektroskopisch zugänglichen Informationen hierzu aus den verfügbaren Spektren extrahiert und zusammengestellt.

Die ^{3}J (H^{α}-H^{N}) Kopplungskonstanten wurden aus dem 3D HNHA-Spektrum ermittelt. Sie stehen über die Karplus-Kurve mit den Diederwinkeln ϕ im Protein in Beziehung (siehe 2.6.6.5) und erlauben neben der Sekundärstruktur-Ermittlung eine effektive Einschränkung des Konformationsraumes für die Berechnung der dreidimensionalen Struktur. Die schon zum Zuordnen der Amidprotonen genutzten sequentiellen NOEs wurden vervollständigt und in starke, mittlere und schwache Kontakte eingeteilt. Aus dem CBCA(CO)NH wurden die ^{13}C-Verschiebungen der C^{α}-Atome extrahiert und deren Differenz zu den entsprechenden Werten ungefalteter Peptide gebildet.

In einem 2D TOCSY einer PCP-Probe in 100% D_2O konnte auch noch mehrere Monate nach der Lyophilisierung und Resolvatisierung des Proteins in D_2O eine große Zahl von Amidprotonen im Spektrum beobachtet werden, wodurch belegt wird, daß diese durch Wasserstoffbrücken oder mangelnde Zugänglichkeit für das Lösungsmittel sehr gut vor Austausch mit Deuterium geschützt sind. Da reguläre Sekundärstrukturen unter anderem auf regelmäßigen Wasserstoffbrücken basieren, werden die nicht-austauschenden Amidprotonen als Bestätigung für identifizierte Sekundärstrukturelemente gewertet.

Abb. 5.6 zeigt eine graphische Zusammenstellung der gesammelten Hinweise und stellt die aus der Gesamtheit dieser Daten kombinierte Sekundärstruktur von PCP schematisch über der Sequenz des Proteins dar. Die Abbildung zeigt 4 Helices und einen längeren Loop für PCP an:

Helix 1	A14-L27
Loop	G28-S45
Helix 2	L46-R58
Helix 3	L65-A70
Helix 4	I74-A83

Das Prolin 64 liegt also unmittelbar vor der dritten Helix und Prolin 72 genau zwischen Helices 3 und 4, während die Proline 2 und 11 im N-terminalen Bereich zu finden sind.

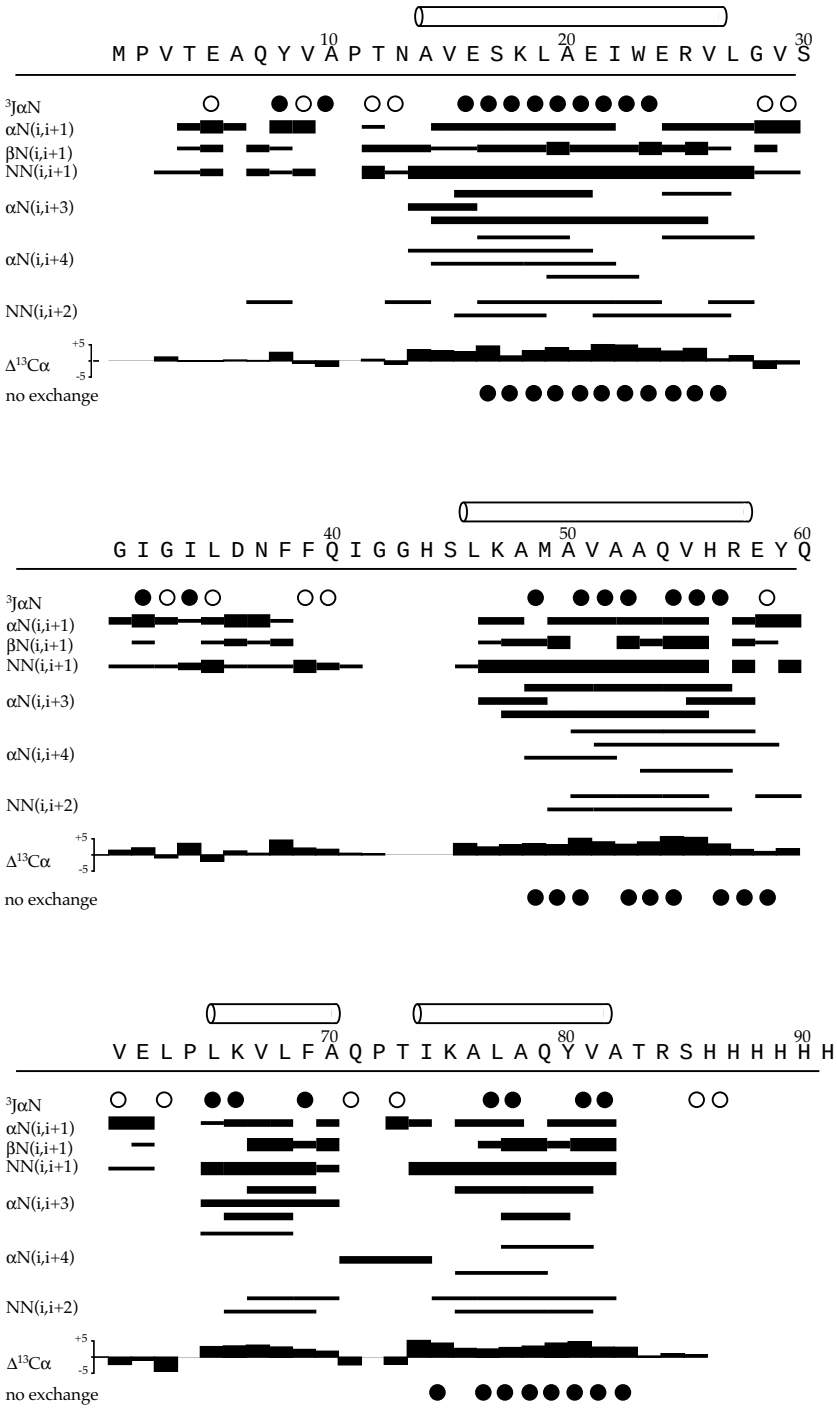

Abb. 5.6: NMR-spektroskopische Sekundärstruktur-Indikatoren

Gefüllte Kreise in der ersten Zeile unter der Primärstruktur zeigen kleine $^3J(H^N\text{-}H^\alpha)$ Kopplungskonstanten (<5 Hz) an, offene Kreise dagegen große Kopplungskonstanten (>8 Hz). Darunter sind die Intensitiäten der charakteristischen NOEs (schwach, mittel oder stark) durch verschieden dicke Balken dargestellt. Kategorien typischer Kontakte, für die keine Vertreter gefunden werden konnten, wie etwa ß-Faltblatt-typische αN(i,i+2)-Kontakte, sind nicht aufgeführt. Die Abweichungen der chemischen $^{13}C^\alpha$-Shifts von Standardwerten für ungefaltete Peptide sind ebenfalls als Balken aufgeführt. In der untersten Reihe befinden sich schließlich Markierungen der Reste, deren Rückgrat-Amidprotonen nicht mit H_2O austauschten. Die abgeleitete Sekundärstruktur ist über der Proteinsequenz schematisiert.

5.4.4. Berechnung der 3D-Struktur

Zur Berechnung der 3D-Struktur von TycC3-PCP wurden zusätzlich zu den bereits ermittelten sequentiellen und *medium range*-Kontakten weitere Kontakte gesucht, wobei *long range*-Kontakte die wertvollste Information für die Proteinfaltung darstellen, da erst sie bei den Rechnungen bewirken, daß sich sequentiell weit voneinander entfernte Reste gezielt einander nähern. Die NOE-Informationen wurden hauptsächlich aus dem 3D NOESY-HSQC und dem ^{13}C-separierten NOESY gesammelt, mit zusätzlichen NOEs aus den entsprechenden 2D-Experimenten.

Die insgesamt 802 gesammelten NOEs wurden unter Berücksichtigung der von Wüthrich [Wüthrich, 1986] angegebenen Pseudoatomkorrekturen in starke (1,8 bis 2,8 Å), mittlere (1,8 bis 3,5 Å) und schwache (1,8 bis 5,0 Å) Abstandsbedingungen konvertiert. Die untere Grenze wurde grundsätzlich auf den van-der-Waals-Abstand zweier Wasserstoffatome gesetzt, da dies im Vergleich zu einer Einteilung in nicht überlappende Abstandskategorien zu einer deutlichen Entspannung der berechneten Strukturfamilie mit weniger verletzten Randbedingungen, geringeren Energien und besserer Übereinstimmung führte.

Zusätzlich zu den Abständen wurden die 63 festgelegten ϕ-Diederwinkel, 3 ψ-Diederwinkel für die *trans*-Proline, 6 χ_1- Diederwinkel und 27 Wasserstoffbrücken als Randbedingungen für die Strukturrechnung festgelegt. Die Wasserstoffbrücken erschienen nicht als Bindungen in den Parameterdateien, sondern es wurden pro Wasserstoffbrücke 2 Abstände gesetzt, nämlich zwischen Carbonylsauerstoff und Amidstickstoff (2,9 Å) und zwischen ersterem und Amidproton (1,9 Å).

In einem frühen Stadium der Strukturbestimmung, als die Anzahl gesammelter Randbedingungen etwa die Hälfte des endgültigen Satzes umfaßte, wurden zur Überprüfung der Unabhängigkeit des Endergebnisses von den Startstrukturen Testrechnungen durchgeführt. Es wurden jeweils 10 Startstrukturen mit der Konformation eines geraden Stranges (*extended strand*) und mit randomisierten Atomkoordinaten generiert; hierzu wurden die entsprechenden mit dem Programm X-PLOR 3.1 [Brünger, 1992] zur Verfügung gestellten Skripte verwendet. Die 20 Startstrukturen lagen also vor Beginn der SA-Rechnung an völlig unterschiedlichen Orten der Energiehyperfläche. Die Strukturfamilie wurde einer Sequenz aus *simulated annealing* mit 10.000 Hochtemperatur- und 8.000 Kühlschritten und einem anschließenden, kurzen *refinement* von 500 Schritten (alles unter Verwendung der Standard- X-PLOR Skripte) unterzogen, wobei die verfügbaren Abstands- und Winkelrandbedingungen galten. Die erhaltenen Strukturen wurden aufeinander-gelegt und die Abweichungen voneinander bestimmt. Die Auswertung der Strukturfamilie bestätigte, daß die Endstrukturen dieselbe Faltung aufwiesen und demzufolge in dasselbe Minimum der Energiehyperfläche gelangt waren. Dies ist ein wichtiger Hinweis darauf, daß das getroffene Minimum von verschiedensten Regionen der Energiehyperfläche erreicht wird und tatsächlich das absolute Minimum darstellt, in das ein Protein sich faltet. Somit ist sichergestellt, daß bei Generierung der Startstrukturen für die endgültige Rechnung deren Konformation keine wesentliche Rolle für das Erreichen des absoluten Minimums der Energiehyperfläche spielt, da der Konformationsraum in der Hochtemperaturphase offenbar ausreichend abgeschritten wird.

Vor der abschließenden Strukturberechnung konnte nach vorläufigen Rechnungen mit der Gesamtheit der verfügbaren Randbedingungen stereospezifisches Assignment für einige Atomgruppen erreicht werden, da sie in mindestens 80% der berechneten Strukturen dieselbe Konformation hatten und unterschiedliche NOE-Muster aufwiesen. Durch kritische Analyse der Geometrie der betreffenden Gruppe und der jeweiligen NOE-Partner ergab sich in manchen Fällen eine eindeutige Zuordnung von sonst meist nicht voneinander unterscheidbaren Gruppen wie etwa den zwei Protonen von Methylengruppen oder den zwei Valin-Methylgruppen. Die Berücksichtigung dieser Zuordnungen brachten zusätzliche Verbesserungen der Konvergenz vor allem der betreffenden Strukturbereiche.

Mit dem vollständigen Satz an Abständen und Winkeln wurde die endgültige Strukturrechnung von 100 unterschiedlichen Startstrukturen in *extended strand*-Konformation angegangen. Unter Verwendung der Standardprozeduren der mitgelieferten X-PLOR 3.1-Skripte wurden die Strukturen in einem *simulated annealing* bestehend aus 20.000 Hochtemperatur- und dann 16.000 Kühlschritten von 1.000 K auf 50 K Temperatur des angelegten externen Temperaturbades gebracht. Ein folgendes *refinement* fand in 2.000 Schritten statt. *Simulated annealing* und *refinement* erfolgten stets mit Anlegung der experimentell ermittelten Randbedingungen.

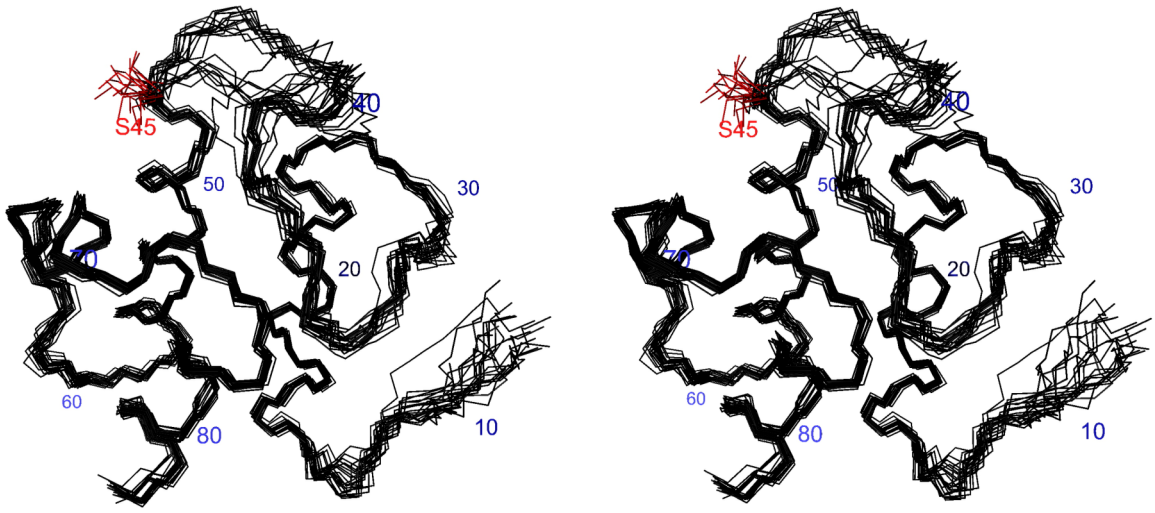

Abb. 5.7 Stereobild der endgültigen Familie von 20 Strukturen

Dargestellt sind die Bindungen der Backbone-Atome von Y8 bis T73. Als Orientierungshilfe sind Markierungen für jeden zehnten Rest angebracht. Als einzige Seitenkette ist die von S45 (rot) eingezeichnet. Aus der Abbildung läßt sich gut die Übereinstimmung der Strukturen der Familie untereinander in den verschiedenen Regionen des Proteins entnehmen. Man beachte die Aufspaltung in zwei Subfamilien im Bereich des Loops (s. Text).

38 der erhaltenen 100 Strukturen wiesen keine Abstandsverletzungen größer 0,5 Å auf. Die 20 Strukturen mit der geringsten Gesamtenergie waren gleichzeitig auch die mit den geringsten Abstands- und Winkelverletzungen und wurden durch einen *least RMSD fit* der Rückgratatome aufeinander ausgerichtet, um eine Strukturfamilie zu bilden, die das bei der Rechnung gefundene Minimum der Energiehyperfläche darstellt (Abb. 5.7). Die Abweichungen der Einzelstrukturen voneinander veranschaulichen, inwieweit der Konformationsraum eingeschränkt werden konnte, um die Proteinstruktur präzise darzustellen.

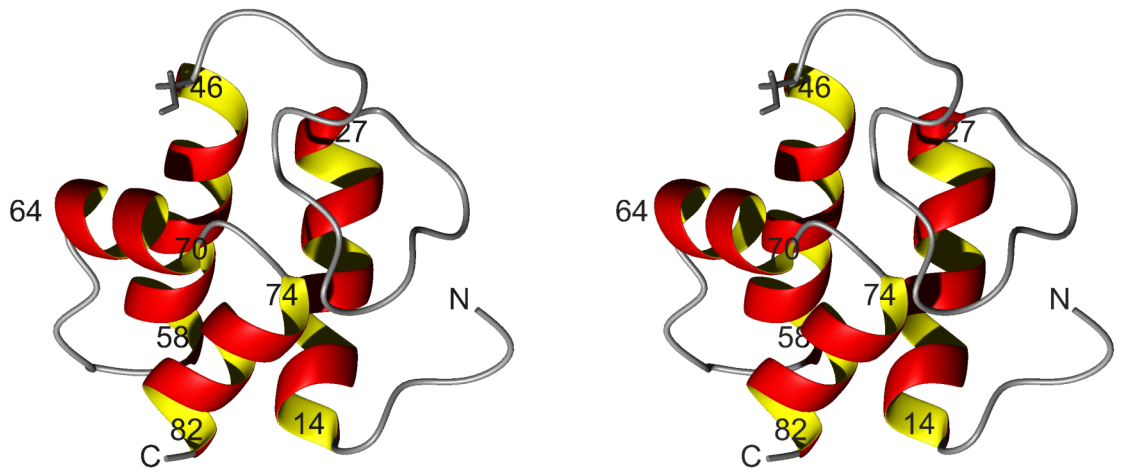

Abb. 5.8: Ribbon-Modell der minimierten Mittelwertstruktur als Stereobild

Das repräsentative Modell ist übersichtlicher als die Familiendarstellung und läßt die zugeordneten Sekundärstrukturelemente in Form der vier rot-gelb dargestellten Helices erkennen. C- und N-Termini sind markiert, ebenso die jeweils erste und letzte Aminosäure einer jeden Helix. Die Seitenkette des phosphopantetheinylierten Serinrestes ist hier als Stabmodell dargestellt.

Da eine Familie aus 20 Strukturen zwar wesentlich besser das Ergebnis der Berechnung darstellen kann, gleichzeitig aber auch sehr unhandlich in der Darstellung ist, wurde aus den gemittelten Koordinaten der Strukturfamilie eine Mittelwertstruktur (Abb. 5.8) berechnet, die dann durch eine 1.000-Schritt Powell-Minimierung (ebenfalls mit Anwendung aller Randbedingungen) von Fehlern in Bindungslängen, -winkeln etc. bereinigt wurde, die aus der geometrischen Mittelung resultieren. Diese repräsentative Mittelwertstruktur zeigt keine Abstandsverletzung größer 0,37 Å und keine Winkelverletzung größer 4°.

5.5. 3D-Struktur von TycC3-PCP in Lösung

Die übereinandergelegten Strukturen der 20er-Familie sind in Abb. 5.7 dargestellt. Abgesehen vom N-Terminus und einem Teil des ersten Loops (Q40-H44) zeigen die Strukturen gute Konvergenz, insbesondere in Helices 1 und 2 (s. auch Abb. 5.9).

Die ersten 7 Aminosäuren sind völlig ungeordnet und werden in den Darstellungen der Klarheit wegen weggelassen, sie stellen offensichtlich einen Teil des Linkers zur vorhergehenden A-Domäne dar. Der erste Rest, für den sich experimentelle Belege (in Form von NOEs) für Kontakte zum Proteinkern finden, ist Y8. Dieser Tyrosinrest wird durch diese Randbedingungen am Proteinkorpus fixiert und ist somit der erste Rest von PCP, den man zum strukturellen Kern des Proteins zählen kann.

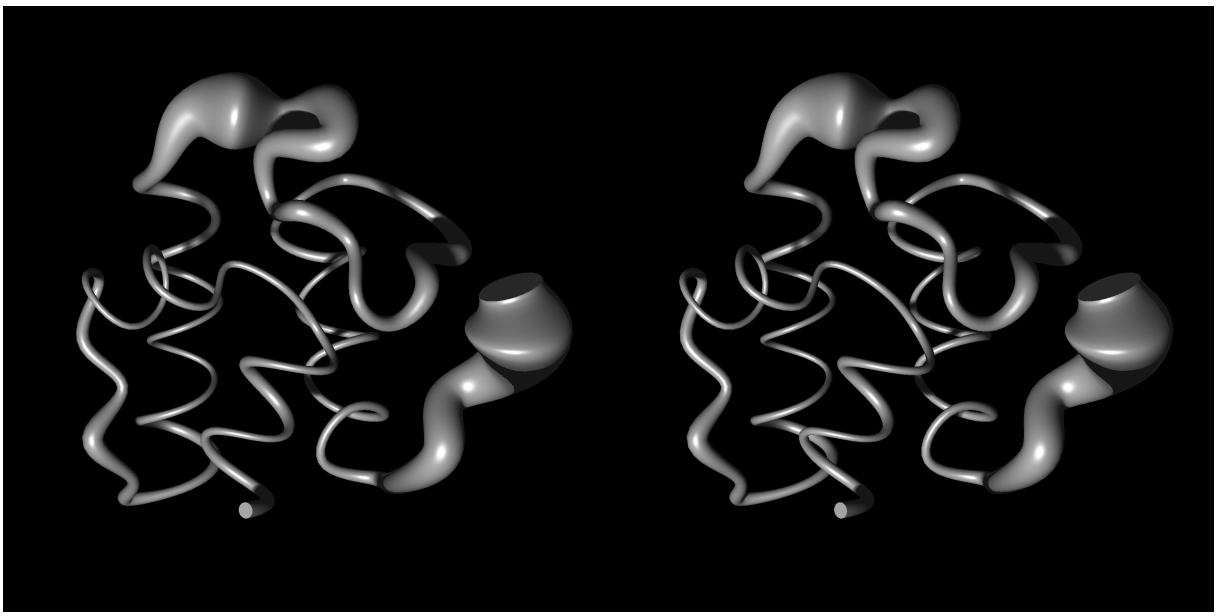

Abb. 5.9: *Sausage*-Darstellung der Familie der endgültigen 20 Strukturen

Das gemittelte Proteinrückgrat der 20 Strukturen ist als Schlauch dargestellt, dessen Durchmesser proportional zum RMSD der Rückgratatome an der betreffenden Stelle ist. Diese vereinfachende Grafik läßt sofort die unterschiedlich starken Abweichungen innerhalb der Familie erkennen und gleichzeitig strukturell beurteilen. Es handelt sich somit um eine Kombination des übersichtlichen *Ribbon*-Diagramms aus Abb. 5.8 mit dem RMSD-Plot in Abb. 5.13.

In dem weniger gut definierten Teil des langen Loops können 2 Subfamilien im Populationsverhältnis 2:3 unterschieden werden. Für N37 konnten 2 Signale im HSQC (Abb. 5.5) und zwei Spinsysteme im 3D NOESY-HSQC entdeckt werden. Es ließen sich allerdings keine Unterschiede im NOE-Muster der Spinsysteme ausmachen, da deren Intensitäten zu gering waren und beim schwächeren daher gar keine interresidualen NOEs auftraten. Auch die Seitenketten-Amidprotonen von Q40 weisen eindeutige Signalschultern auf, die aber nicht ausreichend von dem größeren Peak abgetrennt sind und in den 3D-Spektren nicht auffindbar waren. Ebenfalls

konnten 2 Signale für I32 im HSQC und im 3D NOESY-HSQC entdeckt werden, wovon allerdings eines mit dem von A20 zusammenfiel, so daß auch hier keine unterschiedlichen NOE-Muster auszumachen waren. Eine Signalaufspaltung ist grundsätzlich auf eine Aufspaltung der Struktur zurückzuführen, und sicherlich wird die Aufteilung des Loop-Endes um S45 herum in 2 Subfamilien hier den Grund für die Signalaufspaltung liefern.

Eine quantitative Auswertung der Übereinstimmung innerhalb der Strukturfamilie findet sich in Form eines RMSD-Plots in Abb. 5.13. Dieser zeigt nur zwei Regionen mit größerer Unordnung. Der N-Terminus des Proteins ist bis kurz vor die erste Helix relativ ungeordnet. Mit nahezu kontinuierlich sinkendem RMSD geht der N-terminale Bereich in die erste Helix über, und etwa ab Rest 13 kann von guter Konvergenz gesprochen werden. Im ersten Teil des sich an die erste Helix anschließenden Loops bleibt die Ordnung für einen Loop ohne reguläre Sekundärstrukturelemente erstaunlich gut bestehen, was wohl auf eine Reihe von Kontakten zurückzuführen ist, die den Loop in diesem Bereich auf den Proteinkern fixieren. Solche Ankerpunkte stellen z.B. L27, I32 und F38 dar, die an der Bildung des hydrophoben Kerns von PCP beteiligt sind (Abb. 5.12). Eine Abschätzung über die Beteiligung am hydrophoben Kern bzw. gegenteilig über die Lokalisation der einzelnen Reste auf der Proteinoberfläche läßt sich auch mit Hilfe der Abb. 5.10 vornehmen. Sie zeigt für die Oberfläche jeder Aminosäure von PCP deren Anteil an, der für das Solvens zugänglich ist. Große Werte liegen also auf der Proteinoberfläche, kleine im Inneren. Eine zusätzliche Kennzeichnung der in PCPs konservierten Reste erlaubt die Kombination beider Aussagen. Beispielsweise ist bei I22 und W23 offensichtlich, daß ihre Beteiligung am hydrophoben Kern des Proteins wichtig sein muß, denn sie sind konserviert und im Proteininneren gelegen. Wahrscheinlich helfen sie, die erste Helix am Proteinkorpus zu halten. Für die konservierten E16 und T73 ist auffällig, daß diese polaren Seitenketten wenig Zugang zum Solvens haben. Es wäre hier zu erwarten, daß die polaren Gruppen dieser Reste durch Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb des Proteins stabilisiert werden, allerdings reicht die Konvergenz der Strukturfamilie für diese Seitenketten nicht aus, um hier Wasserstoffbrücken eindeutig festzulegen, wenn auch potentielle Partner zur Verfügung stehen (T12 –OH oder –NH für E16; D36 $–CO_2^-$ oder –CO- für T73).

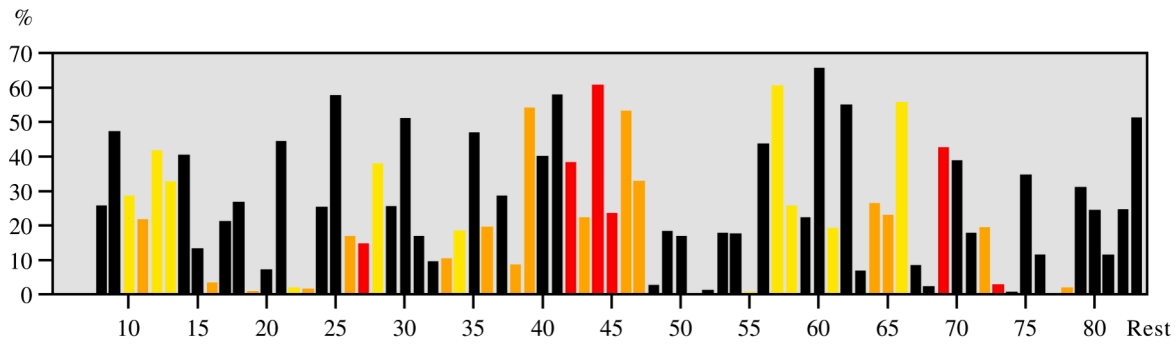

Abb. 5.10: Solvens-zugängliche Oberflächenanteile der Reste

Hochkonservierte Reste sind rot, stark konservierte orange, konservierte gelb hervorgehoben. Hohe Balken zeigen Reste an der Oberfläche an, kleine Balken weisen auf Reste im Proteininneren hin.

Der zweite Teil des Loops beginnt mit F39 stetig größere Unordnung anzunehmen, bis die RMSD-Kurve (Abb. 5.13) bei G43 ein Maximum aufweist. Dies ist genau der Bereich der *core T*-Sequenz, die für die Phosphopantetheinylierung konserviert ist, und die sich in zwei strukturelle Subfamilien auftrennt. Die in diesem Bereich beobachtete Flexibilität wurde durch Relaxationsmessungen näher untersucht (s. Kap. 5.6). Die zweite Hälfte des Proteins ab Helix 2 ist wohlgeordnet, selbst im kurzen zweiten Loop (Y59-P64) steigt der RMSD kaum. Der mittlere Gesamt-RMSD der 20er-Familie gegenüber der Mittelwertstruktur in den gut strukturierten Bereichen (A14-L27, L46-A82) beträgt 0,56 Å.

5.5.1. Qualität der Strukturbestimmung

RMSD	Mittelwert	Standardabweichung
von experimentellen Abstandsbedingungen (Å)		
insgesamt (856)	0,041	0,038
intraresidual (47)	0,082	0,049
sequenziell (|i-j|=1) (287)	0,028	0,015
mittlere Reichweite (2≤|i-j|≤4) (215)	0,045	0,029
lange Reichweite (|i-j|≥5) (253)	0,038	0,024
Wasserstoffbrückenbindungen (54)[1]	0,082	0,049
von experimentellen Diederwinkeln (°) (72)	0,450	0,428
von idealisierter kovalenter Geometrie		
Bindungen (Å) (1306)	0,004	0,000
Winkel (°) (2375)	0,677	0,005
impropers (°) (671)	0,491	0,004
von der minimierten Mittelwertstruktur (Å)		
Rückgratatome im wohlgeordneten Bereich[2]	0,56	0,09
schwere Atome im wohlgeordneten Bereich[2]	1,24	0,13
Rückgratatome in Helix 1[3]	0,43	0,11
Rückgratatome in Helix 2[4]	0,45	0,10
Rückgratatome in Helix 3[5]	0,38	0,12
Rückgratatome in Helix 4[6]	0,48	0,15

Tab. 5.1: Statistik der endgültigen Familie von 20 Strukturen

Die Anzahl der jeweiligen Randbedingungen ist in Klammern angegeben. RMSD: Wurzel des gemittelten Abweichungsquadrates. [1]Pro Wasserstoffbrückenbindung wurden 2 Abstandsbedingungen gesetzt. [2]Die Strukturen wurden so aufeinandergelegt, daß sich geringstmögliche Abweichungen für die Rückgratatome der Reste 14-38 und 46-82 ergaben. [3]Reste 14-27. [4]Reste 46-58. [5]Reste 65-70. [6]Reste 74-82. *Impropers* bezeichnen ebene Gruppen wie etwa aromatische Ringe; diese Kategorie ist in der Organisation des Programms X-PLOR begründet.

In Tab. 5.1 sind die wesentlichen Werte der Statistik über die Strukturfamilie aufgelistet. Sie geben Aussagen über die Einhaltung der NMR-spektroskopisch ermittelten Abstands- und Dieder-Randbedingungen, über die Einhaltung der empirischen Vorgaben der Parameterdateien von X-PLOR sowie über die Konvergenz der Strukturfamilie.

Der Ramachandran-Plot [Ramachandran & Sasisekharan, 1968] liefert zusätzliche Validierungsmöglichkeiten für eine berechnete Struktur, wobei man berücksichtigen muß, daß bei NMR-Strukturen die Daten des Ramachandran-Plots nicht in die Ausgangsdaten der Berechnungen einfließen, während bei Kristallstrukturen bei den ersten Schritten des Zusammenfügens der Reste diese in der Regel ideale Konformationen haben. Erfüllung der Ramachandran-Vorgaben durch die berechneten NMR-Strukturen bestätigt zusätzlich die Validität der Strukturen. Der Ramachandran-Plot in Abb. 5.11 zeigt die Reste innerhalb des strukturellen Teils von PCP. Die Mittelwertstruktur hat für die Reste 8 bis 82 folgende Ramachandran-Statistik: 6 Reste fallen in nicht erlaubte Bereiche (Y8, A10, I32, I34, D36, I41), 7 Reste sind in nicht favorisierten Regionen, 8 in erlaubten, und die übrigen in den bevorzugten Bereichen des Plots. Die sechs ungünstig gelegenen Reste fallen sämtlich in wenig strukturierte Bereiche: Y8 und A10 sind Teil des weniger definierten N-Terminus, während die anderen vier im langen Loop lokalisiert sind. Diese Reste zeigen jeweils eine breite Streuung im Ramachandran-Plot, die sich für jeden der Reste über verbotene und erlaubte Regionen erstreckt, so daß zu vermuten ist, daß durch Mittelung über diese Verteilung Artefakte entstanden, die der Gesamtfamilie nicht gerecht werden.

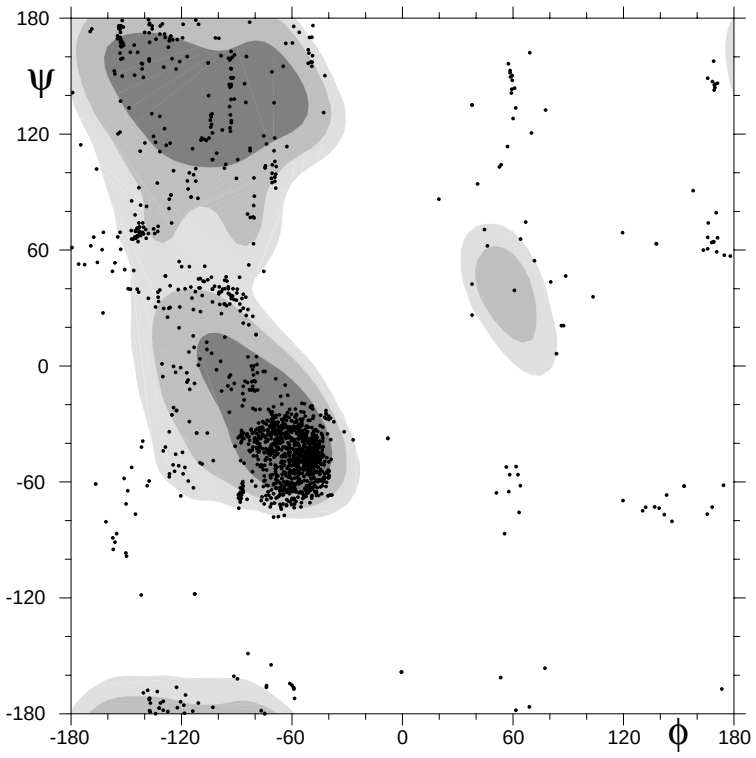

Abb. 5.11: Ramachandran-Plot der Strukturfamilie

Eingezeichnet sind die ψ- und ϕ-Winkel (in Grad) der nicht-Glycin-Reste im strukturierten Bereich von PCP (Y8 bis T83). Die unterschiedlich bevorzugten Regionen sind in 3 Graustufen unterlegt. Die Reste, deren Winkel-Kombinationen im verbotenten Bereich des Diagramms liegen, sind im Text behandelt.

5.5.2. Topologie und Hydrophobizität

PCP formt ein verzerrtes antiparalleles 4-Helix-Bündel. Helices 1 und 2 dominieren die Struktur und bilden die Rückseite des Moleküls (bei Orientierung wie in Abb. 5.7). Sie sind länger als die anderen beiden Helices und stehen in einem Winkel von 140° zueinander. Helices 3 und 4 sind auf die ersten beiden gepackt und bilden die Vorderseite des Proteins. Helix 3 liegt in Winkeln von 100° und 110° ungefähr orthogonal zu Helices 1 und 2 und bildet mit Helix 4 einen Winkel von 125°. Diese formt mit Helix 1 dann einen Winkel von 135°. Zwischen zweiter und dritter Helix befindet sich der kurze Loop 2, der etwa antiparallel zur Helix 2 aufwärts führt und mit P64 in einem Knick endet, der sicherlich mitverantwortlich für die Querlage der folgenden Helix innerhalb des Bündels ist. Der lange Loop 1 zeigt Kontakte zu Helix 1 (W23, E24), Helix 3 (L68) und Helix 4 (I74, K75, K77), die die Fixierung seines ersten Teils auf dem Proteinkorpus belegen.

Die Struktur zeigt einige hydrophobe Seitenketten, die auffällig gut für das Solvens zugänglich sind. Ein Beispiel hierfür ist F39, das sogar eher vom Protein wegzeigt als sich an die Oberfläche zu legen; weitere sind V9, L35, I41, G42, L46 und F69. Um das hochkonservierte S45 herum häufen sich einige solcher an der Proteinoberfläche gelegener Reste (Abb. 6.2). Ein einfacher Überblick über den Oberflächenanteil und die Hydrophobizität der einzelnen Reste ist in Abb. 5.10 dargestellt.

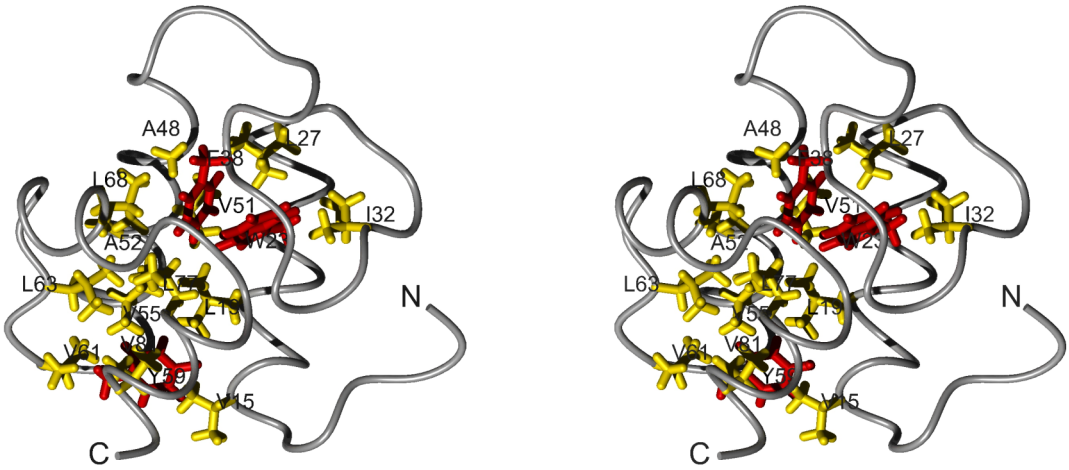

Abb. 5.12: Seitenketten, die an der Bildung des hydrophoben Kerns beteiligt sind

Grundlage für dieses Modell ist die minimierte Mittelwertstruktur wie in Abb. 5.8, wobei die Helices hier nicht dargestellt sind, dafür aber die relevanten Seitenketten als gelbe (Aliphaten) und rote (Aromaten) Stabmodelle.

5.6. Relaxationsmessungen an PCP

Die Abwesenheit von Signalen für die Reste von G43 bis S45 und die strukturelle Variabilität in eben dieser Region bedurften genauerer Untersuchung. Vorhandene, aber nicht auffindbare Signale (z.B. durch ungünstige und starke Überlappung mit anderen Signalen oder gar durch fehler- oder lückenhafte Zuordnung) würden denselben Effekt haben wie Signale, die durch Relaxationseffekte aus den Spektren verschwinden. Die strukturelle Vielfalt an dieser Stelle könnte daher auch auf einen Mangel an Daten zurückzuführen sein. Um die Annahme zu belegen, daß hier jedoch konformationelle Beweglichkeit eine wesentliche Rolle spielt, wurden transversale Autorelaxations- und transversale Crosskorrelationsraten zwischen ^{15}N-CSA und ^{15}N-^{1}H-Dipol-Dipol-Wechselwirkungen für die Amidsticktoffkerne bestimmt (Abb. 5.13 oben). In den entsprechenden Kurven sind zwei Regionen auffällig: Zum einen zeigen die Reste S30 bis I32 leicht reduzierte Raten, was auf Flexibilität hindeutet. Dies ist nicht verwunderlich, da dieser Teil des Loops solventexponiert ist. In dieser Flexibilität könnte auch eine Ursache für das Ausreißen von I32 im Ramachandran-Plot liegen, das dieser Rest trotz vieler gefundener Kontakte aufweist. Zum anderen, und hier handelt es sich um die fragliche Region mit der *core T*-Sequenz, zeigen I41 bis K47 größere transversale Relaxationsraten und dabei gleichbleibende Crosskorrelation. Der Unterschied zwischen diesen beiden Kurven wurde nur schwach durch die Stärke des angelegten Spinlock-Feldes der $T_{1\rho}$-Experimente beeinflußt. Daraus kann geschlossen werden, daß die Zeitkonstante für die Bewegungen dieses Proteinteils in einer Zeitskala liegen muß, die deutlich kleiner ist als das Zeitfenster der $T_{1\rho}$-Experimente, also der inversen Spinlock-Frequenz. Auf der anderen Seite sind die Crosskorrelationsraten durch die Beweglichkeit in diesem Bereich nicht beeinflußt worden, das heißt, die Bewegungen sind immer noch langsamer als die Gesamttaumelbewegung des Moleküls.

Eine Abwägung dieser Grenzbereiche führt schließlich zu einer Abschätzung der Zeitkonstanten für die Beweglichkeit des diskutierten Loop-Bereichs in der Größenordnung von 0,01 bis 100 µs.

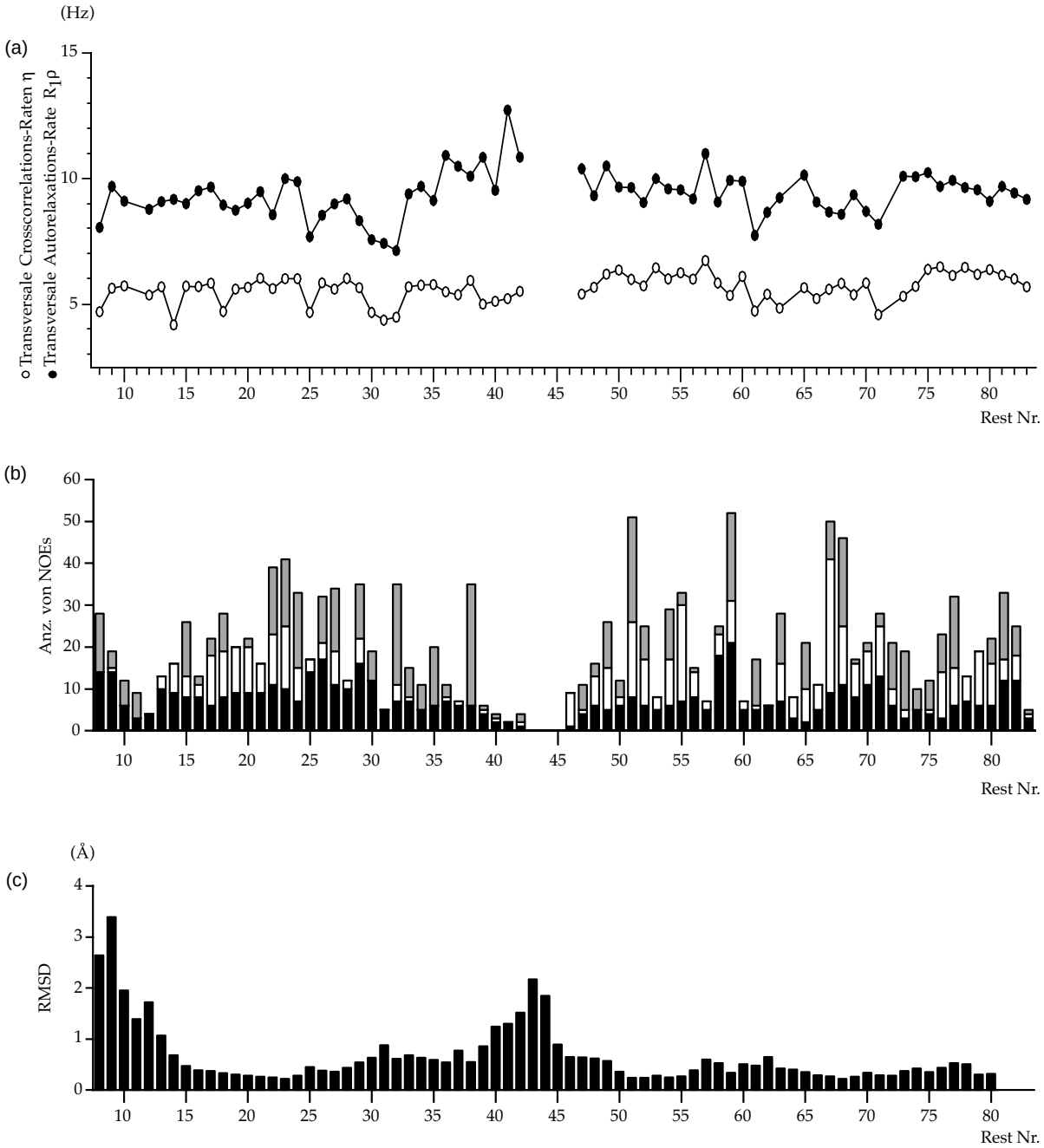

Abb. 5.13: Relaxationsdaten in Verbindung mit der NOE- und RMSD-Verteilung

Dargestellt in (a) sind die transversalen Autorelaxationsraten $R_{1\rho}$ (gefüllte Kreise, Spinlock-Frequenz 2,0 kHz) und die transversale Crosskorrelationsrate η (offene Kreise, gemittelt aus Werten für Relaxationsdelays von 40 und 80 ms). Die Anzahl der zugeordneten NOEs für jeden Rest sind in (b) aufgeschlüsselt in sequenzielle Kontakte (schwarz), mittelweite Kontakte (weiß) und Fernkontakte (grau). Die Wurzel der gemittelten Abweichungsquadrate (RMSD) der Rückgratatomkoordinaten innerhalb der Strukturfamilie relativ zur minimierten Mittelwertstruktur ist in (c) gezeigt.

5.7. Die Ergebnisse zusammengefaßt

TycC3-PCP als Prototyp für PCPs aus nichtribosomalen Peptidsynthetasen wurde in *E. coli* überproduziert und aufgereinigt. Es wurde nachgewiesen, daß die 4'PP-Transferase Sfp TycC3-PCP als Substrat für die Phosphopantetheinylierung erkennt. Die Fähigkeit von TycC3-PCP, eine als Aminoacyladenylat aktivierte Aminosäure von einer A-Domäne zu übernehmen und als Thioester am 4'PP-Kofaktor zu binden, wurde belegt. Aufgrund der bislang publizierten biochemischen Daten und der relativ großen Sequenzhomologie von PCPs untereinander kann TycC3-PCP als Prototyp, PCP, angesehen werden, der alle wesentlichen Eigenschaften mit den anderen PCP-Domänen nichtirbosomaler Peptidsynthetasen gemeinsam hat.

Von PCP wurden neben unmarkierten auch einheitlich ^{15}N- sowie einheitlich ^{15}N, ^{13}C-markierte Proben hergestellt und NMR-spektroskopisch untersucht. Aus den NMR-Spektren wurden nach Zuordnung der Signale Abstandsbedingungen und Diederwinkel extrahiert, die als Randbedingungen in eine Strukturrechnung eingingen. Die Struktur von PCP in Lösung wurde berechnet.

PCP formt ein verzerrtes antiparalleles 4-Helix-Bündel mit einem langen Loop zwischen den ersten zwei Helices. PCP hat eine dem neutralen pI entsprechend weitgehend ungeladene Oberfläche. Die ersten 7 Reste des Proteins sind ungefaltet, und der zweite Teil des Loops ist flexibel auf einer langsamen Zeitskala. Die strukturellen Fluktuationen dieses Proteinteils gehen mit einer Aufsplittung der Strukturfamilie in zwei Unterfamilien einher, die in dem betreffenden Teil des Loops unterschiedliche Faltungen haben.

6. Diskussion

6.1. Definition der strukturellen Einheit von PCP-Domänen nichtribosomaler Peptidsynthetasen

TycC3-PCP ist eine Domäne innerhalb eines Moduls einer nichtribosomalen Peptidsynthetase, in dessen Polypeptidkette es kovalent eingereiht ist. Dies ist der Hauptunterschied zu den Acyl-Carrier-Proteinen (ACPs) der *E. coli* Fettsäure-synthase und der *S. coelicolor* Actinorhodin Polyketidsynthase, die einzelne, separate Proteine darstellen. Die minimale Umgebung, in der ein PCP seine Funktion als Carrier-Protein wahrnehmen kann, das sogenannte Minimalmodul [Marahiel, 1997], umfaßt eine A-Domäne von etwa 550 AS Länge für die Substraterkennung und dessen Adenylierung sowie ein PCP (etwa 75 AS) für die kovalente Fixierung des Substrates als Thioester. Aus diesem Hauptunterschied zwischen den Typ II ACPs und diesem Typ I PCP ergeben sich verschiedene Konsequenzen, die die Erkennung und Interaktion mit den kooperierenden Untereinheiten des jeweiligen Multienzymkomplexes betreffen sowie die Frage der Definition der genauen Grenzen zwischen den Domänen innerhalb einer nichtribosomalen Peptidsynthetase.

Vor der Strukturaufklärung von PCP konnten die genauen Grenzen dieser Domäne nicht festgelegt werden, da lediglich Informationen über Sequenzhomologien verfügbar waren. Durch die stetig steigende Zahl an publizierten Sequenzen nichtribosomaler Peptidsynthetasen wächst zwar die Aussagekraft von Sequenz-alignments, die von den Interdomänenregionen angefertigt werden können, ohne Strukturinformation werden hieraus abgeleitete Aussagen jedoch grundsätzlich nicht ihren spekulativen Charakter verlieren. Fehlabschätzungen bei Domänengrenzen können zu Komplikationen wie Fehlfaltungen oder Unlöslichkeit führen, wenn rekombinante Peptidsynthetasen aus Bausteinen mit ungünstigem Design hergestellt werden.

Die NMR-Struktur von PCP belegt eindeutig, daß die ersten 7 Reste des TycC3-Konstruktes nicht Teil des strukturierten Kerns der PCP-Domäne sind, denn diese Reste weisen keine Faltung auf und interagieren nicht mit dem gefalteten Proteinkorpus. Das sich anschließende Segment von Y8 bis zur ersten Helix von PCP hingegen zeigt Wechselwirkungen (in Form von NOEs) mit dem Proteinkern, und auch die Linienbreiten der entsprechenden Signale sind gleich denen des restlichen Proteins. Die Position des Y8 ist zudem als lipophiler Rest innerhalb

nichtribosomaler Peptidsynthetasen stark konserviert. C-terminal endet Helix 4 eine Aminosäure vor dem letzten nativen Rest T83 des TycC3-Konstruktes. Da die folgenden 8 Reste RSHHHHHH artifiziell sind und keine Funktion haben können, wurden sie bei der Strukturermittlung nicht berücksichtigt. T83 zeigt bereits größere Flexibilität und deutlich weniger NOEs als die vorangehenden Reste. Des weiteren brechen die Homologien von PCPs untereinander an dieser Stelle ab, und so kann auch am C-Terminus davon ausgegangen werden, daß der strukturierte Bereich an der Stelle des T83 endet.

Es können aufgrund der Summe dieser Beobachtungen die strukturellen Grenzen der PCP-Domäne so definiert werden, daß 37 AS vor dem konservierten Serinrest die Domäne beginnt und 37 AS C-terminal dazu endet. Diese Feststellung beantwortet eine der wesentlichen Fragen, die zur Strukturaufklärung von PCP motivierten.

Wendet man diese aus der NMR-Struktur abgeleiteten Empfehlungen auf das anfangs behandelte TycA-PCP an, dann fällt unmittelbar auf, daß dieses Konstrukt N-terminal etwa 30 AS länger war als angeraten; man kann zumindest den vollständigen N-terminalen Linker in diesem Konstrukt finden, wenn nicht sogar letzte Aminosäuren der A-Domäne, deren Struktur im C-terminalen Bereich nicht mehr aufgelöst war. Es liegt nahe, daß dieses N-terminale, flexible Fragment für die Unzulänglichkeiten des TycA-PCPs bei der Präparation und Spektrenaufnahme (partielle Entfaltung und Präzipitation) verantwortlich war.

6.2. Vergleich von PCP mit den Acyl-Carrier-Proteinen

Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen von PCPs mit ACPs der Fettsäure- oder Polyketidsynthasen (Abb. 2.3) macht offensichtlich, daß diese Proteinklassen keine eindeutigen Sequenzhomologien mit Ausnahme des *core T*-Motivs teilen, und selbst dieses fällt in der Gruppe der ACPs etwas anders aus als bei PCPs.

Eine Auswertung der Aminosäurezusammensetzung bringt als weiteren großen Unterschied zwischen ACPs und PCPs sehr unterschiedliche isoelektrische Punkte für die beiden Proteinkategorien hervor: Die ACPs sind ausgesprochen saure Proteine, während PCPs als neutral einzustufen sind. So haben beispielsweise die beiden ACPs, deren Strukturen bekannt sind, jeweils einen pI von 3,8, während der pI für den Aminosäurebereich in TycC3, den das TycC3-PCP umfaßt, 6,3 beträgt. Andere PCP-Domänen zeigen ähnliche Werte. Dieser Unterschied schlägt sich erwartungsgemäß in der Oberflächenladung der Proteine nieder, die in Abb. 6.1 zu sehen ist. PCP stellt sich neben den negativ geladenen ACPs als unpolares Molekül mit wenigen, verstreuten Ladungen dar. Die Tatsache, daß PCP in seiner natürlichen Umgebung kovalent an die benachbarten Kooperationspartner gebunden ist, läßt die

auffällig ungeladene Oberfläche des Proteins plausibel erscheinen, denn es ist zu erwarten, daß innerhalb des großen funktionellen Komplexes der arbeitenden Peptidsynthetase große Teile der PCP-Oberfläche von anderen Domänen abgedeckt werden. Die Fixierung der PCP-Domäne auf der Polypeptidkette der zugehörigen A-Domäne macht ein Erkennungsmuster, wie man es sich z.B. durch bestimmte, speziell lokalisierte Ladungsmuster vorstellen könnte, unter Umständen unnötig, allerdings ist diese Möglichkeit bei dem gegenwärtigen Stand des Wissens um die Domäneninteraktionen nicht ganz auszuschließen. Immerhin sind auch einige geladene Reste auf der PCP-Oberfläche auszumachen, davon sind D38, R57, E58 und K66 unter PCPs (verschieden stark) konserviert, vergl. Abb. 5.10. Womöglich ist es hauptsächlich die Form des Proteins, die eine korrekte Ausrichtung zu den kooperierenden Domänen bewirkt. Die Verringerung der durch das Solvent zugänglichen hydrophoben Oberfläche bei der Bildung des funktionellen Komplexes der Peptidsynthetase führt dann zu einer Stabilisierung in der benötigten Ausrichtung der Domänen untereinander.

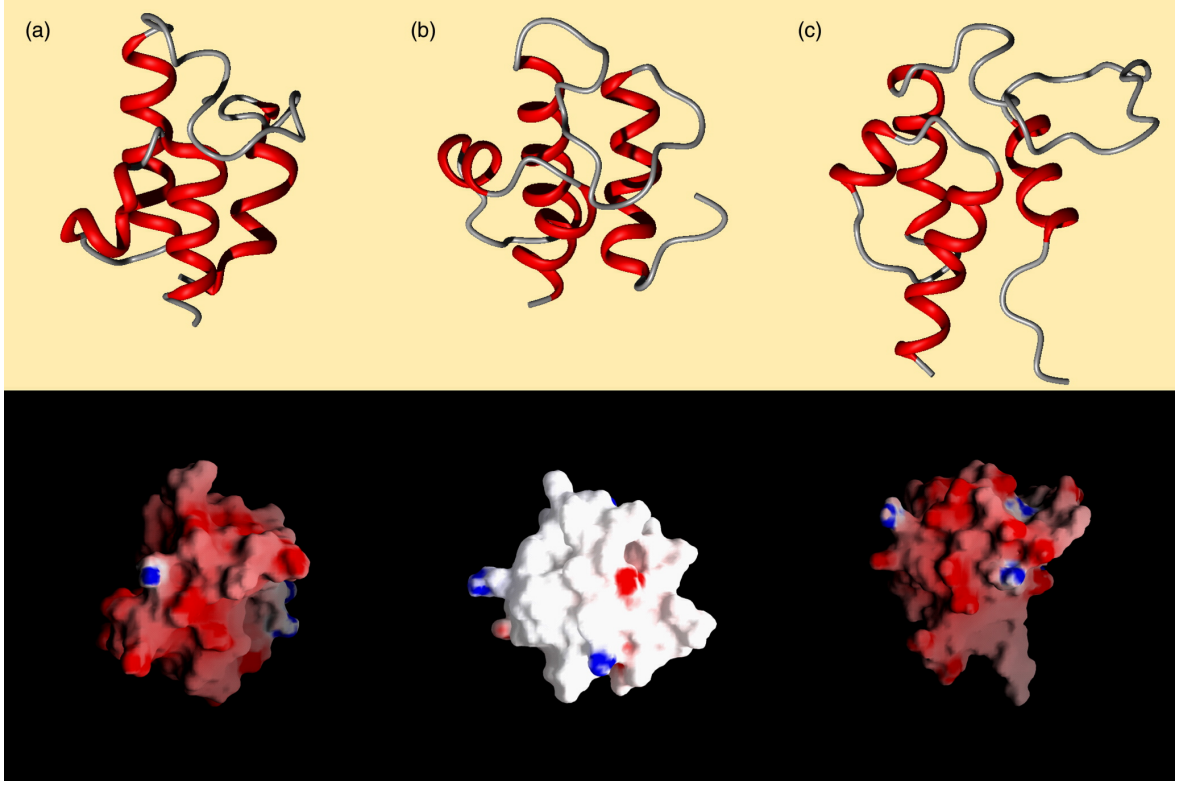

Abb. 6.1: Vergleich der PCP- und ACP-Strukturen

In der oberen Bildhälfte sind die Bänderdarstellungen der drei Proteine zur Übersicht gegeben. Die Helices sind entsprechend den Angaben zur Sekundärstruktur der entsprechenden Publikationen hervorgehoben [Holak et al., 1988b; Holak et al., 1988a; Crump et al., 1997]. Darunter in der gleichen Orientierung wie das jeweilige Bändermodell finden sich die Oberflächendarstellungen, dem Potential entsprechend gefärbt (rot: negativ, weiß: neutral, blau: positiv). (a) Fettsäure-Synthase-ACP aus E. coli . (b) TycC3-PCP. (c) Actinorhodin-Synthase ACP aus S. coelicolor.

6.3. Interaktionen von PCP mit den anderen Domänen

Weder die Kristallstruktur der Phenylalanin-aktivierenden Domäne von TycA [Conti *et al.*, 1997], noch die kürzlich veröffentlichte Kristallstruktur der PPTase Sfp [Reuter *et al.*, 1999] geben Aufschluß darüber, welcher Mechanismus zur erfolgreichen Interaktion mit PCP führen könnte. Deshalb bleibt auch nach der Aufklärung der Struktur von TycC3-PCP zunächst offen, auf welche Art eine PPTase eine PCP-Domäne erkennt, um sie mit dem 4'-Phosphopantethein-Kofaktor zu versehen (und es muß hier eine selektive Erkennung erfolgen, denn für ACPS beispielsweise wurde gezeigt, daß es Typ II ACPs, nicht aber PCPs modifiziert), oder in welcher Orientierung das PCP zur vorangehenden A-Domäne ausgerichtet sein muß, um das bereitgehaltene Aminoacyladenylat von ihr mit dem 4'PP-Arm als Thioester übernehmen zu können. Auf jeden Fall erfordern beide Reaktionen vom PCP das Eingehen enger Kontakte mit dem jeweiligen Partnerprotein. Die beobachtete Flexibilität und konformationelle Inhomogenität in der Nachbarschaft der Phosphopantetheinylierungsstelle könnte für diese Interaktion eine wichtige Rolle spielen.

6.3.1. Welche Bedeutung hat die Flexibilität des Loops ?

Durch die Variabilität des flexiblen Bereiches im Loop kann das PCP dynamische Oberflächeneigenschaften um das reaktive Serin bieten, die für das Einpassen in die Bindetasche von Sfp erforderlich sein könnten. Versuche, Licht auf den PCP-Sfp-Komplex durch Docking-Experimente *in silico* zu werfen, scheiterten offenbar daran, daß bei Anwendung starrer Proteine der Zugang zur Bindetasche von Sfp nicht frei ist. Vielleicht muß entweder Sfp sich etwas öffnen oder PCP muß bei der Komplexbildung schlanker werden, möglicherweise auch beides. Da diese Rechnungen (durchgeführt mit dem Programm Autodock [Morris *et al.*, 1998]) allerdings nicht *in extensio* betrieben wurden sondern eher einen spekulativen Charakter hatten, dürfen diese Rückschlüsse nur als vage Indizien angesehen werden, die aber die Vermutung stützen könnten, daß eine bestimmte Oberflächendynamik von PCP für die Interaktion mit Sfp benötigt wird.

Auch für die Zusammenarbeit des phosphopantetheinylierten *holo*-PCPs mit den anderen Domänen innerhalb der Peptidsynthetase erscheint die Flexibilität der zweiten Loophälfte von PCP sinnvoll, denn dadurch kann PCP je nach Interaktionspartner Oberflächen bieten, die verschiedene Eigenschaften aufweisen und PCP dadurch universeller machen. So könnte z.B. die A-Domäne eine etwas andere Oberfläche von PCP benötigen als die C-Domäne, deren Struktur leider noch nicht verfügbar ist.

6.3.2. ACPs und PCP unterscheiden sich im Loop

Während das Phosphopantetheinylierungsmotiv bei den meisten FAS-ACPs und PKS-ACPs nur kleine Unterschiede zu dem von PCPs aufweist (das zweite Glycin ist durch sterisch anspruchsvollere Reste ersetzt), zeigte diese Region bei den ACPs nicht die Flexibilität wie sie bei PCP beobachtet wurde. Es liegt also die Vermutung nahe, daß diese Eigenschaft wichtig für die Unterscheidung zwischen den zwei Klassen durch einige Enzyme ist (z.B. PPTasen mit Ausnahme von Sfp). Allerdings haben alle drei Strukturen gemein, daß der Loop insgesamt weniger definiert ist als der Rest des Proteins. Die auffällige Ansammlung hydrophober Reste an der Proteinoberfläche in der Umgebung des konservierten Serins (Abb. 6.2) findet sich in dieser Art nicht bei den ACPs. Das in PCPs konservierte F69 von Helix 3 hat in beiden ACP-Strukturen keine Äquivalente; beim FAS-ACP ist Helix 3 zu weit vom Serin entfernt, und beim PKS-ACP ist kein Phenylalanin oder Tyrosin in dieser Helix enthalten. Auch diese Besonderheit von PCP könnte demnach eine Rolle in der Interaktion mit PPTasen spielen.

Die erste Helix von PCP ist etwa eine ganze Umdrehung länger als in beiden ACP-Strukturen (Abb. 6.1 oben), während der folgende Loop bei PCP wesentlich kürzer ausfällt. Die Länge beträgt bei PCP 18, beim FAS-ACP 21 und beim PKS-ACP 24 Reste. Der erste Teil des PKS-ACP-Loops ist weniger geordnet als der entsprechende Bereich bei PCP, bei dem diese Reste in der letzten Windung der Helix 1 fixiert sind. Die Unterschiede in der Konformation des gesamten Loops könnten, unabhängig von der Flexibilität in dessen C-terminalem Bereich, eine Rolle in der Substratdifferenzierung durch PPTasen spielen. So modifiziert ACPS, die *E. coli* PPTase für das FAS-ACP, PCPs nicht *in vitro* [Lambalot *et al.*, 1996] und offensichtlich auch nicht *in vivo*, denn die posttranslationale Phosphopantetheinylierung von PCP bei der Überexpression in *E. coli* ist kleiner als 2% [Gocht & Marahiel, 1994].

Nicht zu vernachlässigen sind auch deutliche Unterschiede in der Topologie von PCP und den zwei ACPs (siehe Abb. 6.1). So ist im Fettsäuresynthase-ACP die dritte Helix weniger quergestellt als in PCP, wodurch das ACP einen schmaleren Korpus erhält (sichtbar in der Oberflächendarstellung). Beim PKS-ACP ist der Abstand zwischen zweiter und dritter Helix größer als bei PCP, so daß die Seitenketten zwischen Helices 3 und 4 des PKS-ACPs nicht mehr in unmittelbarer Nähe des invarianten Serinrestes liegen. Auch ist die letzte Helix dieses ACPs deutlich länger als bei PCP und ragt aus dem Molekül heraus.

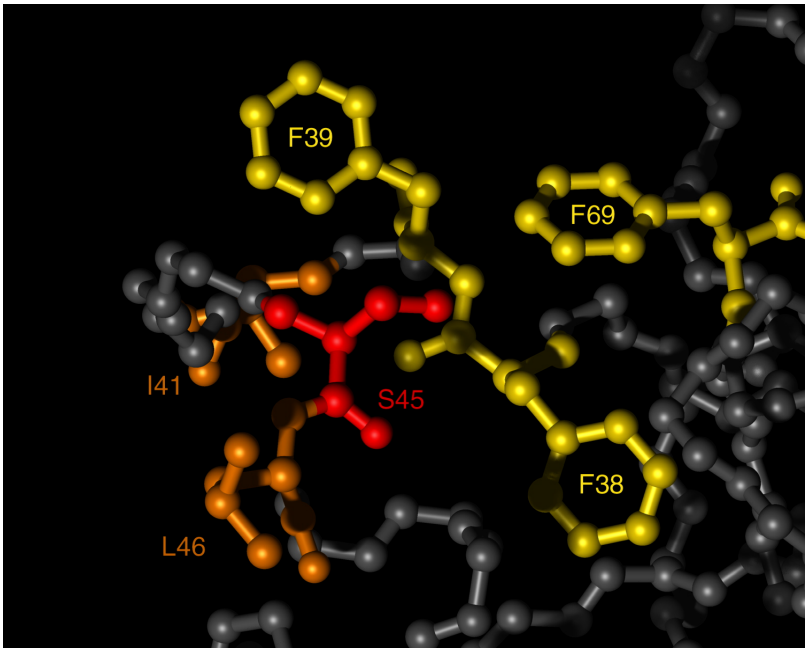

Abb. 6.2: Hydrophobe Reste an der Proteinoberfläche im Bereich um das konservierte Serin 45

Die zwei Phenylalaninreste des flexiblen Loops (F38, F39) sowie das von Helix 3 gestellte F69 sind in PCPs hochkonserviert, ebenso die aliphatischen I41 und L46, wobei diese beiden Aminosäuren im core T-Motiv auch mit vertauschten Positionen auftreten.

Die strukturellen Eigenschaften der flexiblen Region um das konservierte S45 spielen eine entscheidende Rolle für die Substraterkennung durch Sfp. Quadri *et al.* [Quadri *et al.*, 1998] haben ein 19 AS langes Peptid synthetisiert, das genau diesen flexiblen Bereich des ersten PCPs der Surfactin Synthetase B enthält (SrfAB1-PCP; AS 987 bis 1005, entsprechend AS 33 bis 51 von TycC3-PCP). Dieses Peptid konnte nicht mit dem Kofaktor beladen werden und ebenfalls nicht als kompetetiver Inhibitor bei der Phosphopantetheinylierung des kompletten SrfAB1-PCPs fungieren. Diese Ergebnisse in Verbindung mit den nun verfügbaren Strukturdaten zeigen, daß nicht allein die Sequenz der Phosphopantetheinylierungsstelle hinreichend ist, sondern vielmehr ist es die strukturelle Art der Präsentation dieses Bereichs, die die erfolgreiche Modifikation mit CoA gewährleistet, das als Kosubstrat für die Reaktion im aktiven Zentrum von Sfp liegt. In der Struktur von TycC3-PCP ist F38 in das Innere des Moleküls gerichtet und trägt zur Bildung des hydrophoben Kerns bei. Dieser Rest ist unter PCPs hochkonserviert und liegt in dem Bereich des Loops, der durch das 19 AS-Peptid imitiert wurde. Durch F38 wird die Mitte des Loops am Proteinkern verankert, so daß die Flexibilität der zweiten Hälfte sich nicht im ersten Teil des Loops fortsetzt. So ist eine gewisse Struktur dieses wichtigen Bereiches vorgegeben, aber trotzdem wird ausreichend Flexibilität gewährleistet.

6.3.3. Andere Carrier-Domänen

Die Funktion von PCP als Trägerdomäne innerhalb eines Multienzymkomplexes erinnert an die der Lipoyl-Domänen von 2-Oxosäure-Dehydrogenasen (z.B. Pyruvat-Dehydrogenase, PDH) und der Biotinyl-Domäne der Acetyl-CoA Carboxylase (ACC), die ebenfalls strukturell eigenständige, von flexiblen Linkern begrenzte Domänen darstellen und mit einem posttranslational angebrachten Kofaktor verschiedene aktive Zentren des jeweiligen Multienzymkomplexes bedienen müssen [Perham, 1991; Yao *et al.*, 1997]. Der Kofaktor der PDH ist Liponamid, eine mittels Amidbindung an eine konservierte Lysinseitenkette gebundene Liponsäure, deren reaktive Disulfidfunktion in den Redoxreaktionen der PDH eine Schlüsselrolle spielen. Die prosthetische Gruppe der ACC hingegen ist ein zur Aufnahme und Übertragung einer Carboxylgruppe benötigtes Biotin, das auf dieselbe Art an ein konserviertes Lysin des Proteins gekoppelt ist. Beide Kofaktoren sind wie das 4'PP bei PCP lang und flexibel und sind ebenfalls in einem exponierten Teil eines Loops gebunden. Allerdings handelt es sich bei diesen (strukturell und sequentiell den ACPs und PCPs nicht ähnlichen) Carrier-Domänen um reine β-Faltblatt-Strukturen, und für die Biotinyl-Domäne der ACC ist gar eine feste Anlagerung des Kofaktors an die Proteinoberfläche nachgewiesen worden, wie sie keinesfalls bei PCP oder den ACPs zu beobachten war [Roberts *et al.*, 1999].

6.4. PCP bietet keine Bindetasche für das Peptid-Substrat, es ist unselektiv

Für beide ACPs wurde die Möglichkeit einer Stabilisierung der wachsenden Fettsäure- oder Polyketidkette durch den ausgedehnten hydrophoben Proteinkern (beim ACP) oder eine hydrophobe Tasche (beim PKS-ACP) diskutiert [Holak *et al.*, 1988b; Holak *et al.*, 1988a; Crump *et al.*, 1997]. PCP hingegen bietet keine Tasche oder eine ähnliche Region, die als Ablage- oder Stabilisierungsstelle zu identifizieren wäre. Das erscheint auch sinnvoll, denn die Fixierung des Substrates auf der Proteinoberfläche oder gar in einer Tasche würde den Gewinn an Flexibilität und großer Reichweite, der durch die flexible Loop-Region und den 4'-Phosphopantetheinyl-Kofaktor entsteht, wieder schmälern. Wenn also das als Thioester gebundene Substrat nicht spezifisch mit der Proteinoberfläche interagiert, dann kann eine Selektivität von PCP für bestimmte Aminosäuren oder Peptide auf dem Kofaktor eindeutig ausgeschlossen werden.

6.5. Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit stellen einen weiteren Schritt zu dem Ziel dar, die Funktionsweise nichtribosomaler Peptidsynthetasen auf struktureller Ebene zu verstehen. Zusammen mit den Kristallstrukturen der A-Domäne von GrsA und der PPTase Sfp beginnt sich nun langsam eine Struktursammlung zu formen, in die sich künftig noch weitere Mitglieder einreihen sollten, um aus dem Informationsgehalt möglichst effektiv schöpfen zu können. Sehr wertvoll in Kombination mit der hier präsentierten PCP-Struktur wäre sicherlich ein Strukturmodell der Kondensationsdomäne, denn mit ihr müssen ja zwei PCPs interagieren, deren Aminosäure-Fracht dort verknüpft werden soll.

Aber nicht nur Studien über die Interaktionsweise der Domänen stellen Ansatzpunkte für weitere Untersuchungen dar, sondern es öffnet sich ebenfalls der Weg zu gezielter Analyse einzelner Aminosäuren und deren Funktion, was bisher auf dem Weg der Sequenzanalyse und Mutagenese meist auf viel Arbeit und Spekulation beruhen mußte. Durch die Untersuchung der Funktion einzelner hochkonservierter Reste der A-Domäne, woraus ein eigener Selektivitäts-Code für die ganze Domäne abgeleitet werden konnte [Stachelhaus *et al.*, 1999], sind erste Schritte in diese Richtung unternommen worden. In diesem Fall wurde der dreidimensionale Informationsgehalt wieder auf die Sequenzebene projiziert, was einerseits mit dem gewünschten Effekt der Abstraktion und Überschaubarkeit einhergeht, andererseits allerdings eine starke Vereinfachung mit sich bringt. Weitere Aussagen über die Bedeutungen von Unterschieden oder Homologien innerhalb von PCPs könnten durch *molecular modeling*-Studien gewonnen werden, indem *in silico* analysiert wird, welche Auswirkungen die Substitution einzelner oder mehrerer Reste auf das Protein haben. Nach Verifizierung der Ergebnisse im Labor z.B. durch gezielte Mutagenese können sich hiermit neue Wege zu gezielt hergestellten Peptidsynthetasen mit veränderter Effizienz oder Produktpalette öffnen.

7. Anhang

7.1. Verwendete Spektren

Spektrum	Markierung	LM
CBCA(CO)NH	^{15}N, ^{13}C	H_2O
CT-HNCA	^{15}N, ^{13}C	H_2O
CT-HNCO	^{15}N, ^{13}C	H_2O
2D TOCSY (t_m = 57 ms)	-	H_2O
3D ^{1}H-^{15}N TOCSY-HSQC (t_m = 58 ms)	^{15}N	H_2O
2D NOESY (t_m = 70 u. 120 ms)	-	H_2O
3D ^{1}H-^{15}N NOESY-HSQC (t_m = 90 u. 120 ms)	^{15}N	H_2O
^{13}C-separiertes NOESY-HSQC (t_m = 110 ms)	^{15}N, ^{13}C	D_2O
2D NOESY (t_m = 70 ms, 120 ms)	-	D_2O
3D HCCH-TOCSY(t_m = 8 ms, 19 ms)	^{15}N, ^{13}C	D_2O
2D ^{1}H-^{15}N HSQC	^{15}N	H_2O
2D $^{13}C'$-[$^{13}C\gamma$[Aromat]] Spin-Echo-Differenz ^{1}HN-^{15}N HSQC	^{15}N, ^{13}C	H_2O
2D ^{15}N-[$^{13}C\gamma$ [Aromat]] Spin-Echo-Differenz ^{1}HN-^{15}N HSQC	^{15}N, ^{13}C	H_2O
3D HNHA	^{15}N	H_2O

Tab. 7.1: Für die Strukturbestimmung verwendete NMR-Spektren

Inwieweit es sich um unmarkierte oder isotopenmarkierte Proben handelte, ist in der zweiten Spalte angegeben. LM: Lösemittel.

7.2. Signalzuordnungen

Rest	HN	N	Cα	Hα	andere
V3	8,761	119,60	63,87		
T4	8,18	116,47	62,03	4,291	Hβ2,086;1,945;Hγ2,261
E5	8,405	122,01	57,27	4,257	
A6	8,258	124,59	53,06		Hβ1,314
Q7	8,278	120,19	56,20	4,212	Hβ1,981;1,927;Hγ2,289;Hδ7,462;6,803
Y8	8,456	124,27	60,89	4,330	Hβ3,118;2,711;Hδ7,010;Hε6,537
V9	6,709	129,79	62,00	3,699	Hβ3,095;Hγ1,485;0,735
A10	8,070	129,99	51,24	4,122	Hβ1,317
P11			64,44		Hγ2,162;1,553;Hδ3,728;3,631
T12	9,630	113,34	62,57	4,259	Hβ4,432;Hγ^{1}1,183
N13	7,368	115,71	52,56	4,730	Hβ3,061;2,905;Hγ7,288;6,501
A14	8,633	120,50	56,19	4,095	Hβ1,474
V15	7,885	120,11	65,77	4,137	Hβ1,979;Hγ^{1}0,697;Hγ^{2}0,844
E16	8,413	118,37	60,17	3,506	Hβ2,324;1,766;Hγ1,974;1,572
S17	8,332	112,33	63,12	3,922	Hβ3,857
K18	8,030	124,11	58,09	4,242	Hβ2,399;1,969;Hγ1,791; 1,596;Hδ1,583;1,450;Hε2,879;2,716
L19	8,690	118,31	58,90	3,981	Hβ1,945;1,854;Hδ0,823;0,631
A20	8,146	120,77	56,81	3,717	Hβ1,385
E21	7,654	118,56	60,46	4,083	Hβ2,364;2,315;2,501;2,154
I22	8,352	120,09	66,55	3,733	Hβ2,206;Hγ^{1}2,048;1,164;Hγ^{2}0,849;Hδ1,082
W23	9,480	119,90	62,50	4,148	Hβ3,303;3,263;Nε^{1}117,23;Hε^{1}7,160;Hε7,165;Hε^{3}7,548
E24	8,991	118,75	61,20	4,156	Hβ2,239;2,149;Hγ2,827; 2,430
R25	8,034	119,13	59,58	4,159	Hβ2,067;2,004;Hγ1,777;Hδ:3,230;Hε7,350
V26	8,409	118,90	66,49	3,742	Hβ1,959;Hγ1,014;0,983
L27	8,924	115,90	56,40	3,979	Hβ1,883;1,268;Hγ1,458;Hδ0,466;0,079
G28	7,996	108,43	47,44	3,890	Hα'3,857
L35	8,127	116,85	53,91	4,643	Hβ1,697;Hγ0,886;Hδ1,334;0,814
D36	7,025	121,04	55,87	4,324	Hβ2,730;2,538
N37	9,053	123,13	53,97	4,901	Hβ2,785;Hγ7,316;7,985;Nγ114,38
F38	9,289	126,37	62,69	3,365	Hβ2,714;1,778;Hδ7,401;Hε7,173
F39	8,004	111,90	60,26	3,922	Hβ3,269;2,960;Hδ7,331;Hε6,960;Hζ6,164
Q40	8,225	119,58	57,79	4,344	Hβ2,386;2,114;Hγ2,413;Nδ111,71;Hδ6,922;7,544
I41	7,147	111,52	62,08	4,374	
G42	7,807	107,95			
L46	8,715	122,64	59,24	4,398	Hβ1,715;1,918;Hγ1,788;Hδ0,935
K47	7,742	118,81	58,99	4,185	Hβ1,641;1,382;Hγ1,113;1,259;Hδ1,079;1,367;Hε2,908
A48	8,582	122,17	55,87	3,527	Hβ1,407
M49	7,872	116,46	59,37	4,128	Hβ2,289;2,255;Hγ2,868;2,730;Hε1,598
A50	7,394	123,32	55,87	4,339	Hβ1,607
V51	7,939	118,50	67,72	3,379	Hβ2,047;Hγ^{1}0,688;Hγ^{2}0,772
A52	8,395	121,38	56,76	3,915	Hβ1,593
A53	8,232	121,42	56,01	4,297	Hβ1,592
Q54	7,910	118,37	60,03	4,107	Hβ2,240;2,148;Hγ2,604;2,489;Nδ111,43;Hδ7,473;6,629
V55	8,864	121,33	68,26	3,635	Hβ2,304;Hγ^{1}0,833;Hγ^{2}1,077
H56	8,33	119,90	60,90	4,396	Hβ^{1}3,300;Hβ^{2}3,495
R57	7,855	119,17	59,91	3,895	Hδ3,184;Nε108,47;Hε7,258
E58	7,905	116,09	59,02	3,892	Hβ1,809;1,423;Hγ1,927;1,314
Y59	8,169	111,71	59,30	4,632	Hβ3,161;2,530;Hγ2,113;2,158;Hδ7,082
Q60	8,190	115,33	57,96	3,530	Hβ2,204;2,231;Nδ112,53;Hδ7,173;6,521
V61	6,540	113,62	60,48	4,334	Hβ1,708;Hγ0,843;0,808
E62	8,675	125,32	56,47	4,245	Hβ0,822;Hγ1,876
L63	8,929	127,32	51,50	4,778	Hβ1,114;1,899;Hγ1,982;Hδ0,714;0,579
P64			62,71		Hβ2,000; Hδ3,977;3,279
L65	8,690	125,87	59,01	3,669	Hβ1,593;1,281;Hγ1,655;Hδ0,885;0,776

K66	8,488	114,00	60,01	3,913	Hβ1,771;1,692;Hγ1,326;Hδ1,612;Hε2,422
V67	7,138	119,44	66,34	3,549	Hβ1,735;$H\gamma^1$0,048;$H\gamma^2$0,701
L68	6,836	120,66	58,88	3,875	Hβ1,467;1,229; Hδ0,463;0,161
F69	8,132	112,47	60,54	4,218	Hβ2,998;2,926
A70	7,385	118,37	54,60	4,236	Hβ1,509
Q71	7,439	115,94	53,77	4,774	Hβ2,003;1,908;Hγ2,248;2,183;Nδ110,46;Hδ6,727;7,264
P72			65,08	4,990	Hβ2,286;2,632;Hγ1,948;2,254;Hδ3,557;3,480
T73	8,266	109,80	59,95	5,139	Hβ4,636;$H\gamma^1$4,946;$H\gamma^2$1,030
I74	9,846	124,78	66,68	4,644	Hβ3,013;$H\gamma^1$1,123;-0,039;$H\gamma^2$-0,156;Hδ0,807
K75	8,969	119,26	60,87	3,773	Hβ1,683;1,505;Hγ1,176;1,349;Hδ1,512;1,441;Hε2,870
A76	7,574	119,32	55,46	4,163	Hβ1,487
L77	8,874	121,61	58,28	4,056	Hβ1,881;1,480;Hδ0,949;0,874
A78	9,333	120,28	55,73	3,707	Hβ1,379
Q79	7,132	117,61	59,45	4,025	Hβ2,147;2,179;Hγ2,491;2,326;Nδ111,38;Hδ7,421;6,792
Y80	7,663	121,42	62,58	3,948	Hβ3,259;3,033
V81	8,502	117,61	67,41	3,202	Hβ1,766;Hγ0,844;0,165
A82	8,362	120,85	55,84	3,892	Hβ1,409
T83	7,514	108,94	65,10	4,028	Hβ4,141;$H\gamma^2$1,188
R84	7,320	119,52	56,94	4,149	Hβ1,878;1,352;Hγ1,325;Hδ2,808;2,520;Hε6,952
S85	7,725	114,31	59,64	4,219	Hβ3,864;3,714
H86	8,218	120,10	56,34	4,727	Hβ3,152;3,053
H87	8,241	125,10		4,397	Hβ3,158;3,057

Tab. 7.2 Zordnungen der Signale

Zu jedem Rest des Proteins sind die chemischen Verschiebungen der zugeordneten Signale in ppm aufgelistet.

7.3. Randbedingungen für die Strukturrechnung

Die experimentell ermittelten Randbedingungen für die endgültige Berechnung von 100 Strukturen werden nachfolgend aufgelistet. Die Schreibweise richtet sich nach den Syntaxregeln von X-PLOR 3.1. Die Parameterdateien für die Rechnung werden hier nicht explizit aufgeführt; sie wurden mit den entsprechenden Skripten von X-PLOR 3.1 unter Übernahme der Standardeinstellungen aus der Aminosäuresequenz (M1 bis T83) von PCP generiert.

```
assign (resid  5 and name HN  ) (resid  4 and name HA  ) 3.5 1.1 0.4
assign (resid  5 and name HN  ) (resid  4 and name HB  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid  6 and name HN  ) (resid  5 and name HA  ) 2.4 0.4 0.4
assign (resid  6 and name HN  ) (resid  5 and name HB# ) 3.5 1.1 1.4
assign (resid  6 and name HN  ) (resid  5 and name HG# ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid  6 and name HB# ) (resid  5 and name HA  ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid  6 and name HB# ) (resid  5 and name HB# ) 4.2 1.8 2.8
assign (resid  6 and name HB# ) (resid  5 and name HG# ) 4.2 1.8 2.8
assign (resid  7 and name HN  ) (resid  6 and name HA  ) 3.5 1.1 0.4
assign (resid  8 and name HN  ) (resid  7 and name HB# ) 3.5 1.1 1.4
assign (resid  8 and name HN  ) (resid  7 and name HG# ) 3.5 1.1 1.4
assign (resid  9 and name HN  ) (resid  8 and name HB1 ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid  9 and name HN  ) (resid  8 and name HB2 ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid  9 and name HN  ) (resid  8 and name HA  ) 2.4 0.4 0.4
assign (resid  9 and name HN  ) (resid  8 and name HE# ) 4.2 1.8 2.8
assign (resid  9 and name HN  ) (resid  8 and name HD# ) 4.2 1.8 2.8
assign (resid  9 and name HG* ) (resid  8 and name HA  ) 4.2 1.8 2.8
assign (resid  9 and name HA  ) (resid  8 and name HD# ) 4.2 1.8 2.8
assign (resid  9 and name HA  ) (resid  8 and name HE# ) 4.2 1.8 2.8
assign (resid  9 and name HG* ) (resid  8 and name HD# ) 4.2 1.8 4.8
assign (resid  9 and name HG* ) (resid  8 and name HE# ) 4.2 1.8 4.8
assign (resid 10 and name HN  ) (resid  9 and name HA  ) 2.4 0.4 0.4
assign (resid 10 and name HN  ) (resid  9 and name HG* ) 2.4 0.4 2.4
assign (resid 11 and name HD# ) (resid 10 and name HA  ) 2.4 0.4 1.4
assign (resid 10 and name HB# ) (resid 11 and name HD1 ) 2.4 0.4 1.4
assign (resid 10 and name HB# ) (resid 11 and name HD2 ) 2.4 0.4 1.4
assign (resid 13 and name HN  ) (resid 12 and name HA  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 13 and name HN  ) (resid 12 and name HB  ) 3.5 1.1 0.4
assign (resid 13 and name HN  ) (resid 12 and name HG# ) 3.5 1.1 1.4
assign (resid 14 and name HN  ) (resid 13 and name HB1 ) 3.5 1.1 0.4
assign (resid 14 and name HN  ) (resid 13 and name HB2 ) 3.5 1.1 0.4
assign (resid 14 and name HA  ) (resid 13 and name HA  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 14 and name HB# ) (resid 13 and name HA  ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 14 and name HB# ) (resid 13 and name HB# ) 4.2 1.8 2.8
assign (resid 15 and name HN  ) (resid 14 and name HB# ) 3.5 1.1 1.4
assign (resid 15 and name HA  ) (resid 14 and name HB# ) 3.5 1.1 1.4
assign (resid 16 and name HN  ) (resid 15 and name HA  ) 3.5 1.1 0.3
assign (resid 16 and name HN  ) (resid 15 and name HB  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 16 and name HN  ) (resid 15 and name HG1#) 3.5 1.1 1.4
assign (resid 16 and name HN  ) (resid 15 and name HG2#) 3.5 1.1 1.4
assign (resid 17 and name HN  ) (resid 16 and name HA  ) 3.5 1.1 0.3
assign (resid 17 and name HN  ) (resid 16 and name HB# ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 17 and name HN  ) (resid 16 and name HG# ) 3.5 1.1 1.4
assign (resid 18 and name HN  ) (resid 17 and name HA  ) 3.5 1.1 0.3
assign (resid 18 and name HN  ) (resid 17 and name HB# ) 3.5 1.1 1.4
assign (resid 19 and name HN  ) (resid 18 and name HA  ) 3.5 1.1 0.3
assign (resid 19 and name HN  ) (resid 18 and name HB# ) 3.5 1.1 1.4
assign (resid 19 and name HN  ) (resid 18 and name HD1 ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 19 and name HN  ) (resid 18 and name HD2 ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 20 and name HN  ) (resid 19 and name HA  ) 3.5 1.1 0.3
assign (resid 20 and name HN  ) (resid 19 and name HB# ) 3.5 1.1 1.4
assign (resid 20 and name HN  ) (resid 19 and name HD* ) 3.5 1.1 2.4
assign (resid 21 and name HN  ) (resid 20 and name HA  ) 3.5 1.1 0.3
assign (resid 21 and name HN  ) (resid 20 and name HB# ) 2.4 0.4 1.4
assign (resid 21 and name HA  ) (resid 20 and name HA  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 21 and name HA  ) (resid 20 and name HB# ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 22 and name HN  ) (resid 21 and name HA  ) 3.5 1.1 0.3
assign (resid 22 and name HN  ) (resid 21 and name HB1 ) 3.5 1.1 0.4
assign (resid 22 and name HN  ) (resid 21 and name HB2 ) 3.5 1.1 0.4
assign (resid 23 and name HN  ) (resid 22 and name HA  ) 3.5 1.1 0.3
assign (resid 23 and name HN  ) (resid 22 and name HB  ) 3.5 1.1 0.3
assign (resid 23 and name HN  ) (resid 22 and name HG1#) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 23 and name HN  ) (resid 22 and name HG2#) 3.5 1.1 1.4
assign (resid 23 and name HN  ) (resid 22 and name HD# ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 23 and name HA  ) (resid 22 and name HD# ) 3.5 1.1 1.4
assign (resid 24 and name HN  ) (resid 23 and name HB1 ) 3.5 1.1 0.4
assign (resid 24 and name HN  ) (resid 23 and name HB2 ) 3.5 1.1 0.4
assign (resid 25 and name HN  ) (resid 24 and name HB# ) 2.4 0.4 1.4
assign (resid 25 and name HN  ) (resid 24 and name HG1 ) 3.5 1.1 0.4
assign (resid 25 and name HN  ) (resid 24 and name HG1 ) 3.5 1.1 0.4
assign (resid 26 and name HN  ) (resid 25 and name HA  ) 3.5 1.1 0.3
assign (resid 26 and name HN  ) (resid 25 and name HB# ) 3.5 1.1 1.4
assign (resid 26 and name HN  ) (resid 25 and name HG# ) 3.5 1.1 1.4
assign (resid 26 and name HA  ) (resid 25 and name HD# ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 26 and name HA  ) (resid 25 and name HA  ) 4.2 1.8 0.8
```

```
assign (resid 26 and name HA  ) (resid 25 and name HG# ) 2.4 0.4 1.4
assign (resid 26 and name HG* ) (resid 25 and name HB# ) 3.5 1.1 2.5
assign (resid 26 and name HG* ) (resid 25 and name HG# ) 3.5 1.1 2.5
assign (resid 26 and name HG* ) (resid 25 and name HD# ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 27 and name HN  ) (resid 26 and name HA  ) 3.5 1.1 0.3
assign (resid 27 and name HN  ) (resid 26 and name HB  ) 2.4 0.4 0.4
assign (resid 27 and name HN  ) (resid 26 and name HG* ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 27 and name HA  ) (resid 26 and name HG* ) 3.5 1.1 2.3
assign (resid 27 and name HD* ) (resid 26 and name HB  ) 4.2 1.8 2.8
assign (resid 27 and name HD* ) (resid 26 and name HG* ) 2.4 0.4 4.4
assign (resid 28 and name HN  ) (resid 27 and name HA  ) 3.5 1.1 0.4
assign (resid 28 and name HN  ) (resid 27 and name HB1 ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 28 and name HN  ) (resid 27 and name HB2 ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 29 and name HN  ) (resid 28 and name HA# ) 3.5 1.1 1.4
assign (resid 29 and name HG2#) (resid 28 and name HN  ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 29 and name HA  ) (resid 28 and name HA# ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 29 and name HG* ) (resid 28 and name HA1 ) 4.2 1.8 2.8
assign (resid 29 and name HG* ) (resid 28 and name HA1 ) 4.2 1.8 2.8
assign (resid 30 and name HN  ) (resid 29 and name HA  ) 2.4 0.4 0.4
assign (resid 30 and name HN  ) (resid 29 and name HB  ) 3.5 1.1 0.4
assign (resid 30 and name HN  ) (resid 29 and name HG1#) 3.5 1.1 1.4
assign (resid 30 and name HN  ) (resid 29 and name HG2#) 3.5 1.1 1.4
assign (resid 30 and name HA  ) (resid 29 and name HA  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 30 and name HA  ) (resid 29 and name HG1#) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 30 and name HA  ) (resid 29 and name HG2#) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 30 and name HB# ) (resid 29 and name HA  ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 30 and name HB# ) (resid 29 and name HG1#) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 31 and name HN  ) (resid 30 and name HA  ) 2.4 0.4 0.4
assign (resid 32 and name HN  ) (resid 31 and name HA1 ) 3.5 1.1 0.4
assign (resid 32 and name HN  ) (resid 31 and name HA2 ) 3.5 1.1 0.4
assign (resid 33 and name HN  ) (resid 32 and name HA  ) 2.4 0.4 0.4
assign (resid 33 and name HN  ) (resid 32 and name HB  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 33 and name HN  ) (resid 32 and name HG1#) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 34 and name HN  ) (resid 33 and name HA1 ) 3.5 1.1 0.4
assign (resid 34 and name HN  ) (resid 33 and name HA2 ) 3.5 1.1 0.4
assign (resid 35 and name HN  ) (resid 34 and name HA  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 36 and name HN  ) (resid 35 and name HA  ) 3.5 1.1 0.4
assign (resid 36 and name HN  ) (resid 35 and name HB# ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 36 and name HN  ) (resid 35 and name HG  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 37 and name HN  ) (resid 36 and name HB# ) 3.5 1.1 1.4
assign (resid 37 and name HN  ) (resid 36 and name HA  ) 2.4 0.4 0.4
assign (resid 38 and name HN  ) (resid 37 and name HA  ) 2.4 0.4 0.4
assign (resid 38 and name HN  ) (resid 37 and name HB# ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 39 and name HN  ) (resid 38 and name HA  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 39 and name HN  ) (resid 38 and name HB# ) 3.5 1.1 1.4
assign (resid 48 and name HN  ) (resid 47 and name HA  ) 3.5 1.1 0.3
assign (resid 48 and name HN  ) (resid 47 and name HB# ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 49 and name HN  ) (resid 48 and name HA  ) 3.5 1.1 0.3
assign (resid 49 and name HN  ) (resid 48 and name HB# ) 3.5 1.1 1.4
assign (resid 50 and name HN  ) (resid 49 and name HB# ) 3.5 1.1 1.4
assign (resid 51 and name HN  ) (resid 50 and name HA  ) 3.5 1.1 0.3
assign (resid 51 and name HN  ) (resid 50 and name HB# ) 2.4 0.4 1.4
assign (resid 51 and name HA  ) (resid 50 and name HB# ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 52 and name HN  ) (resid 51 and name HA  ) 3.5 1.1 0.3
assign (resid 52 and name HN  ) (resid 51 and name HG1#) 3.5 1.1 1.4
assign (resid 52 and name HN  ) (resid 51 and name HG2#) 3.5 1.1 1.4
assign (resid 53 and name HN  ) (resid 52 and name HA  ) 3.5 1.1 0.3
assign (resid 54 and name HN  ) (resid 53 and name HA  ) 3.5 1.1 0.3
assign (resid 54 and name HN  ) (resid 53 and name HB# ) 2.4 0.4 1.4
assign (resid 55 and name HN  ) (resid 54 and name HA  ) 3.5 1.1 0.3
assign (resid 55 and name HN  ) (resid 54 and name HB# ) 3.5 1.1 1.4
assign (resid 56 and name HN  ) (resid 55 and name HA  ) 3.5 1.1 0.3
assign (resid 56 and name HN  ) (resid 55 and name HB  ) 2.4 0.4 0.4
assign (resid 56 and name HN  ) (resid 55 and name HG2#) 3.5 1.1 1.4
assign (resid 57 and name HN  ) (resid 56 and name HA  ) 3.5 1.1 0.3
assign (resid 57 and name HN  ) (resid 56 and name HB1 ) 2.4 0.4 0.4
assign (resid 57 and name HN  ) (resid 56 and name HB2 ) 3.5 1.1 0.4
assign (resid 58 and name HN  ) (resid 57 and name HD# ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 59 and name HN  ) (resid 58 and name HA  ) 3.5 1.1 0.3
assign (resid 59 and name HN  ) (resid 58 and name HB1 ) 3.5 1.1 0.4
assign (resid 59 and name HN  ) (resid 58 and name HB2 ) 3.5 1.1 0.4
assign (resid 59 and name HN  ) (resid 58 and name HG# ) 3.5 1.1 1.4
assign (resid 59 and name HA  ) (resid 58 and name HB# ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 59 and name HE# ) (resid 58 and name HA  ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 59 and name HE# ) (resid 58 and name HB1 ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 59 and name HE# ) (resid 58 and name HB2 ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 59 and name HE# ) (resid 58 and name HG1 ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 59 and name HE# ) (resid 58 and name HG2 ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 59 and name HD# ) (resid 58 and name HA  ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 59 and name HD# ) (resid 58 and name HB1 ) 3.5 1.1 1.4
assign (resid 59 and name HD# ) (resid 58 and name HB2 ) 3.5 1.1 1.4
assign (resid 59 and name HD# ) (resid 58 and name HG1 ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 59 and name HD# ) (resid 58 and name HG2 ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 60 and name HN  ) (resid 59 and name HA  ) 2.4 0.4 0.4
assign (resid 60 and name HN  ) (resid 59 and name HB# ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 58 and name HN  ) (resid 59 and name HD# ) 3.5 1.1 2.4
assign (resid 60 and name HN  ) (resid 59 and name HD# ) 4.2 1.8 2.8
assign (resid 61 and name HN  ) (resid 59 and name HD# ) 4.2 1.8 2.8
assign (resid 61 and name HN  ) (resid 60 and name HA  ) 2.4 0.4 0.4
assign (resid 62 and name HN  ) (resid 61 and name HA  ) 2.4 0.4 0.4
assign (resid 63 and name HN  ) (resid 62 and name HA  ) 2.4 0.4 0.4
assign (resid 63 and name HN  ) (resid 62 and name HG# ) 2.4 0.4 1.4
assign (resid 63 and name HN  ) (resid 62 and name HB# ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 63 and name HA  ) (resid 64 and name HD1 ) 2.4 0.4 0.4
assign (resid 63 and name HA  ) (resid 64 and name HD2 ) 2.4 0.4 0.4
assign (resid 63 and name HD* ) (resid 64 and name HD# ) 2.4 0.4 3.4
assign (resid 66 and name HN  ) (resid 65 and name HA  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 67 and name HN  ) (resid 66 and name HA  ) 3.5 1.1 0.4
assign (resid 67 and name HN  ) (resid 66 and name HE# ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 68 and name HN  ) (resid 67 and name HA  ) 3.5 1.1 0.4
assign (resid 68 and name HN  ) (resid 67 and name HB  ) 2.4 0.4 0.4
assign (resid 68 and name HN  ) (resid 67 and name HG1#) 3.5 1.1 1.4
```

```
assign (resid 68 and name HN  ) (resid 67 and name HG2#) 3.5 1.1 1.4
assign (resid 68 and name HA  ) (resid 67 and name HG1#) 3.5 1.1 1.4
assign (resid 69 and name HN  ) (resid 68 and name HA  ) 3.5 1.1 0.4
assign (resid 69 and name HN  ) (resid 68 and name HB1 ) 2.4 0.4 1.4
assign (resid 69 and name HN  ) (resid 68 and name HB2 ) 2.4 0.4 1.4
assign (resid 69 and name HA  ) (resid 68 and name HD*2) 4.2 1.8 2.8
assign (resid 70 and name HN  ) (resid 69 and name HB1 ) 3.5 1.1 0.4
assign (resid 70 and name HN  ) (resid 69 and name HB2 ) 3.5 1.1 0.4
assign (resid 71 and name HN  ) (resid 70 and name HA  ) 3.5 1.1 0.4
assign (resid 71 and name HN  ) (resid 70 and name HB# ) 2.4 0.4 1.4
assign (resid 71 and name HA  ) (resid 70 and name HA  ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 71 and name HG1 ) (resid 70 and name HB# ) 2.4 0.4 1.4
assign (resid 71 and name HG2 ) (resid 70 and name HB# ) 2.4 0.4 1.4
assign (resid 71 and name HE21) (resid 70 and name HB# ) 3.5 1.1 1.4
assign (resid 71 and name HE22) (resid 70 and name HB# ) 3.5 1.1 1.4
assign (resid 72 and name HA  ) (resid 71 and name HA  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 72 and name HD1 ) (resid 71 and name HA  ) 2.4 0.4 0.4
assign (resid 72 and name HD2 ) (resid 71 and name HA  ) 2.4 0.4 0.4
assign (resid 72 and name HD1 ) (resid 71 and name HB# ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 72 and name HD2 ) (resid 71 and name HB# ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 73 and name HG2#) (resid 72 and name HD# ) 4.2 1.8 2.8
assign (resid 74 and name HN  ) (resid 73 and name HA  ) 2.4 0.4 0.4
assign (resid 74 and name HN  ) (resid 73 and name HG2#) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 75 and name HN  ) (resid 74 and name HA  ) 3.5 1.1 0.3
assign (resid 75 and name HN  ) (resid 74 and name HG1#) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 77 and name HN  ) (resid 76 and name HA  ) 3.5 1.1 0.3
assign (resid 78 and name HN  ) (resid 77 and name HA  ) 3.5 1.1 0.3
assign (resid 78 and name HN  ) (resid 77 and name HB# ) 3.5 1.1 1.4
assign (resid 78 and name HN  ) (resid 77 and name HD# ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 79 and name HN  ) (resid 78 and name HA  ) 3.5 1.1 0.3
assign (resid 79 and name HN  ) (resid 78 and name HB# ) 2.4 0.4 1.4
assign (resid 80 and name HN  ) (resid 79 and name HG# ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 80 and name HN  ) (resid 79 and name HB# ) 2.4 0.4 1.4
assign (resid 81 and name HN  ) (resid 80 and name HB# ) 3.5 1.1 1.4
assign (resid 81 and name HN  ) (resid 80 and name HA  ) 3.5 1.1 0.3
assign (resid 82 and name HN  ) (resid 81 and name HA  ) 3.5 1.1 0.3
assign (resid 82 and name HN  ) (resid 81 and name HB  ) 2.4 0.4 1.4
assign (resid 82 and name HA  ) (resid 81 and name HA  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 82 and name HA  ) (resid 81 and name HB  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 82 and name HA  ) (resid 81 and name HG1#) 4.2 1.8 2.8
assign (resid 82 and name HA  ) (resid 81 and name HG1#) 4.2 1.8 2.8
assign (resid 82 and name HB# ) (resid 81 and name HG* ) 2.4 0.4 3.4
assign (resid 82 and name HB# ) (resid 81 and name HB  ) 3.5 1.1 1.5
assign (resid 83 and name HN  ) (resid 82 and name HA  ) 3.5 1.1 0.3
assign (resid 83 and name HN  ) (resid 82 and name HB# ) 2.4 0.4 1.4

assign (resid 17 and name HN  ) (resid 14 and name HB# ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 17 and name HN  ) (resid 14 and name HA  ) 3.4 1.0 0.3
assign (resid 17 and name HB# ) (resid 14 and name HA  ) 2.4 0.4 1.4
assign (resid 17 and name HB# ) (resid 14 and name HB# ) 3.5 1.1 2.4
assign (resid 17 and name HA  ) (resid 14 and name HB# ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 17 and name HA  ) (resid 14 and name HA  ) 3.5 1.1 0.4
assign (resid 18 and name HN  ) (resid 15 and name HA  ) 3.4 1.0 0.3
assign (resid 18 and name HN  ) (resid 15 and name HG* ) 3.5 1.1 2.4
assign (resid 19 and name HN  ) (resid 16 and name HA  ) 3.4 1.0 0.3
assign (resid 20 and name HB# ) (resid 17 and name HA  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 20 and name HB# ) (resid 17 and name HB# ) 3.5 1.1 2.4
assign (resid 21 and name HN  ) (resid 18 and name HA  ) 3.4 1.0 0.3
assign (resid 22 and name HN  ) (resid 19 and name HA  ) 3.4 1.0 0.3
assign (resid 22 and name HA  ) (resid 19 and name HA  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 22 and name HB  ) (resid 19 and name HA  ) 3.5 1.1 0.4
assign (resid 22 and name HG11) (resid 19 and name HA  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 22 and name HG12) (resid 19 and name HA  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 22 and name HD# ) (resid 19 and name HA  ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 23 and name HN  ) (resid 20 and name HB# ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 23 and name HA  ) (resid 20 and name HA  ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 23 and name HA  ) (resid 27 and name HD* ) 3.5 1.1 2.4
assign (resid 23 and name HA  ) (resid 27 and name HG  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 23 and name HB1 ) (resid 20 and name HA  ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 23 and name HB2 ) (resid 20 and name HA  ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 23 and name HE3 ) (resid 20 and name HA  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 24 and name HN  ) (resid 21 and name HA  ) 3.4 1.0 0.3
assign (resid 24 and name HG# ) (resid 21 and name HA  ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 26 and name HB# ) (resid 23 and name HA  ) 3.5 1.1 1.4
assign (resid 27 and name HN  ) (resid 24 and name HA  ) 3.5 1.1 0.4
assign (resid 27 and name HD* ) (resid 24 and name HA  ) 4.2 1.8 2.8
assign (resid 28 and name HN  ) (resid 25 and name HA  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 32 and name HD# ) (resid 29 and name HB  ) 3.5 1.1 1.4
assign (resid 32 and name HG1#) (resid 29 and name HB  ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 32 and name HN  ) (resid 29 and name HG1#) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 32 and name HN  ) (resid 29 and name HG2#) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 40 and name HN  ) (resid 37 and name HB# ) 3.5 1.1 1.4
assign (resid 42 and name HN  ) (resid 39 and name HZ  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 49 and name HG1 ) (resid 46 and name HA  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 49 and name HG2 ) (resid 46 and name HA  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 49 and name HG1 ) (resid 46 and name HD* ) 4.2 1.8 2.8
assign (resid 49 and name HG2 ) (resid 46 and name HD* ) 4.2 1.8 2.8
assign (resid 49 and name HB1 ) (resid 46 and name HA  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 49 and name HB2 ) (resid 46 and name HA  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 49 and name HB1 ) (resid 46 and name HD* ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 49 and name HB2 ) (resid 46 and name HD* ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 50 and name HN  ) (resid 47 and name HA  ) 3.4 1.0 0.3
assign (resid 51 and name HN  ) (resid 48 and name HA  ) 3.4 1.0 0.3
assign (resid 51 and name HN  ) (resid 48 and name HB# ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 51 and name HG1#) (resid 48 and name HA  ) 3.5 1.1 1.4
assign (resid 51 and name HG2#) (resid 48 and name HA  ) 3.5 1.1 1.4
assign (resid 51 and name HB  ) (resid 48 and name HA  ) 3.5 1.1 0.4
assign (resid 51 and name HB  ) (resid 48 and name HB# ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 51 and name HG2#) (resid 48 and name HB# ) 2.4 0.4 2.4
assign (resid 51 and name HA  ) (resid 54 and name HG# ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 51 and name HA  ) (resid 54 and name HB# ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 52 and name HN  ) (resid 49 and name HA  ) 3.4 1.0 0.3
```

```
assign (resid 54 and name HN  ) (resid 51 and name HA  ) 3.5 1.1 0.4
assign (resid 54 and name HG1 ) (resid 51 and name HA  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 54 and name HG2 ) (resid 51 and name HA  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 54 and name HB1 ) (resid 51 and name HA  ) 3.5 1.1 0.4
assign (resid 54 and name HB2 ) (resid 51 and name HA  ) 3.5 1.1 0.4
assign (resid 55 and name HN  ) (resid 52 and name HB# ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 55 and name HN  ) (resid 52 and name HA  ) 3.5 1.1 0.4
assign (resid 55 and name HB# ) (resid 52 and name HA  ) 3.5 1.1 1.4
assign (resid 55 and name HG2#) (resid 52 and name HA  ) 3.5 1.1 1.4
assign (resid 55 and name HB  ) (resid 52 and name HB# ) 3.5 1.1 1.4
assign (resid 55 and name HG2#) (resid 52 and name HB# ) 3.5 1.1 1.4
assign (resid 55 and name HG1#) (resid 52 and name HA  ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 57 and name HN  ) (resid 54 and name HA  ) 3.4 1.0 0.3
assign (resid 58 and name HN  ) (resid 55 and name HA  ) 3.4 1.0 0.3
assign (resid 58 and name HB1 ) (resid 55 and name HA  ) 3.5 1.1 0.4
assign (resid 58 and name HB2 ) (resid 55 and name HA  ) 3.5 1.1 0.4
assign (resid 59 and name HN  ) (resid 56 and name HA  ) 3.4 1.0 0.3
assign (resid 66 and name HN  ) (resid 69 and name HB# ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 66 and name HA  ) (resid 69 and name HA  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 66 and name HA  ) (resid 69 and name HB1 ) 3.5 1.1 0.4
assign (resid 66 and name HA  ) (resid 69 and name HB2 ) 3.5 1.1 0.4
assign (resid 67 and name HG1#) (resid 64 and name HD1 ) 3.5 1.1 1.4
assign (resid 67 and name HG2#) (resid 64 and name HD1 ) 3.5 1.1 1.4
assign (resid 67 and name HG1#) (resid 64 and name HD2 ) 3.5 1.1 1.4
assign (resid 67 and name HG2#) (resid 64 and name HD2 ) 3.5 1.1 1.4
assign (resid 67 and name HB  ) (resid 64 and name HD# ) 3.5 1.1 1.4
assign (resid 68 and name HN  ) (resid 65 and name HA  ) 3.5 1.1 0.4
assign (resid 68 and name HB1 ) (resid 65 and name HA  ) 3.5 1.1 0.4
assign (resid 68 and name HB2 ) (resid 65 and name HA  ) 3.5 1.1 0.4
assign (resid 68 and name HD1#) (resid 65 and name HA  ) 3.5 1.1 1.4
assign (resid 68 and name HD2#) (resid 65 and name HA  ) 3.5 1.1 1.4
assign (resid 68 and name HD1#) (resid 65 and name HD* ) 2.4 0.4 3.4
assign (resid 68 and name HD2#) (resid 65 and name HD* ) 2.4 0.4 3.4
assign (resid 69 and name HN  ) (resid 66 and name HA  ) 3.5 1.1 0.4
assign (resid 70 and name HN  ) (resid 67 and name HA  ) 3.5 1.1 0.4
assign (resid 70 and name HN  ) (resid 67 and name HG1#) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 70 and name HN  ) (resid 67 and name HG2#) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 70 and name HA  ) (resid 67 and name HA  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 70 and name HB# ) (resid 67 and name HA  ) 2.4 0.4 1.4
assign (resid 70 and name HB# ) (resid 67 and name HG1#) 3.5 1.1 2.4
assign (resid 70 and name HB# ) (resid 67 and name HG2#) 3.5 1.1 2.4
assign (resid 71 and name HN  ) (resid 68 and name HA  ) 3.5 1.1 0.4
assign (resid 76 and name HN  ) (resid 73 and name HG2#) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 76 and name HB# ) (resid 73 and name HG2#) 4.2 1.8 2.8
assign (resid 76 and name HA  ) (resid 79 and name HG1 ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 76 and name HA  ) (resid 79 and name HG2 ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 76 and name HA  ) (resid 79 and name HB1 ) 3.5 1.1 0.4
assign (resid 76 and name HA  ) (resid 79 and name HB2 ) 3.5 1.1 0.4
assign (resid 76 and name HB# ) (resid 79 and name HG1 ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 76 and name HB# ) (resid 79 and name HG2 ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 79 and name HN  ) (resid 76 and name HA  ) 3.4 1.0 0.3
assign (resid 80 and name HA  ) (resid 77 and name HA  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 80 and name HB1 ) (resid 77 and name HA  ) 3.5 1.1 0.4
assign (resid 80 and name HB2 ) (resid 77 and name HA  ) 3.5 1.1 0.4
assign (resid 80 and name HB1 ) (resid 77 and name HD1#) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 80 and name HB1 ) (resid 77 and name HD2#) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 80 and name HB2 ) (resid 77 and name HD1#) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 80 and name HB2 ) (resid 77 and name HD2#) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 81 and name HN  ) (resid 78 and name HA  ) 3.4 1.0 0.3
assign (resid 81 and name HG* ) (resid 78 and name HA  ) 4.2 1.8 2.8
assign (resid 81 and name HB  ) (resid 78 and name HA  ) 3.5 1.1 0.4
assign (resid 82 and name HN  ) (resid 79 and name HA  ) 3.4 1.0 0.3
assign (resid 82 and name HB# ) (resid 79 and name HG# ) 4.2 1.8 2.8
assign (resid 82 and name HB# ) (resid 79 and name HB1 ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 82 and name HB# ) (resid 79 and name HB2 ) 4.2 1.8 1.8

assign (resid 18 and name HN  ) (resid 14 and name HA  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 19 and name HN  ) (resid 15 and name HA  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 21 and name HN  ) (resid 17 and name HA  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 22 and name HN  ) (resid 18 and name HA  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 22 and name HG2#) (resid 18 and name HA  ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 22 and name HG2#) (resid 18 and name HG# ) 3.5 1.1 2.4
assign (resid 22 and name HG2#) (resid 18 and name HD# ) 3.5 1.1 2.4
assign (resid 23 and name HN  ) (resid 19 and name HA  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 24 and name HN  ) (resid 20 and name HA  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 24 and name HN  ) (resid 20 and name HB# ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 26 and name HB  ) (resid 22 and name HD# ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 27 and name HD# ) (resid 23 and name HB1 ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 27 and name HD# ) (resid 23 and name HB2 ) 3.5 1.1 2.4
assign (resid 27 and name HD# ) (resid 23 and name HB2 ) 3.5 1.1 2.4
assign (resid 29 and name HN  ) (resid 25 and name HA  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 53 and name HN  ) (resid 49 and name HA  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 55 and name HN  ) (resid 51 and name HA  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 55 and name HN  ) (resid 51 and name HG1#) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 55 and name HG2#) (resid 51 and name HG1#) 2.4 0.4 2.4
assign (resid 56 and name HN  ) (resid 52 and name HA  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 58 and name HN  ) (resid 54 and name HA  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 59 and name HN  ) (resid 55 and name HA  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 59 and name HN  ) (resid 55 and name HG1#) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 59 and name HE# ) (resid 55 and name HG2#) 3.5 1.1 3.4
assign (resid 59 and name HE# ) (resid 55 and name HG1#) 2.4 0.4 3.4
assign (resid 59 and name HE# ) (resid 55 and name HA  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 59 and name HD# ) (resid 55 and name HG1#) 3.5 1.1 3.4
assign (resid 59 and name HD# ) (resid 55 and name HG2#) 3.5 1.1 3.4
assign (resid 59 and name HD# ) (resid 55 and name HA  ) 2.4 0.4 2.4
assign (resid 60 and name HN  ) (resid 56 and name HA  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 60 and name HA  ) (resid 56 and name HA  ) 3.5 1.1 0.4
assign (resid 67 and name HA  ) (resid 63 and name HD* ) 4.2 1.8 2.8
assign (resid 67 and name HG1#) (resid 63 and name HA  ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 67 and name HG2#) (resid 63 and name HA  ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 67 and name HB  ) (resid 63 and name HD* ) 3.5 1.1 2.4
assign (resid 67 and name HB  ) (resid 63 and name HA  ) 4.2 1.8 0.8
```

```
assign (resid 67 and name HB  ) (resid 63 and name HG# ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 67 and name HG* ) (resid 63 and name HG  ) 4.2 1.8 2.8
assign (resid 67 and name HG* ) (resid 63 and name HD1#) 2.4 0.4 3.6
assign (resid 67 and name HG* ) (resid 63 and name HD2#) 2.4 0.4 3.6
assign (resid 69 and name HN  ) (resid 65 and name HA  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 67 and name HA  ) (resid 71 and name HN  ) 3.5 1.1 0.4
assign (resid 67 and name HA  ) (resid 71 and name HB# ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 67 and name HA  ) (resid 71 and name HG# ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 67 and name HA  ) (resid 71 and name HE2#) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 67 and name HG1#) (resid 71 and name HE2#) 3.5 1.1 2.4
assign (resid 67 and name HG2#) (resid 71 and name HE2#) 2.4 0.4 2.6
assign (resid 67 and name HG1#) (resid 71 and name HB1 ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 67 and name HG1#) (resid 71 and name HB2 ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 67 and name HG1#) (resid 71 and name HG1 ) 3.5 1.1 1.5
assign (resid 67 and name HG1#) (resid 71 and name HG2 ) 3.5 1.1 1.5
assign (resid 72 and name HA  ) (resid 68 and name HA  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 72 and name HA  ) (resid 68 and name HD1#) 3.5 1.1 1.4
assign (resid 72 and name HA  ) (resid 68 and name HD2#) 3.5 1.1 1.4
assign (resid 72 and name HB# ) (resid 68 and name HD* ) 4.2 1.8 3.8
assign (resid 80 and name HN  ) (resid 76 and name HA  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 82 and name HN  ) (resid 78 and name HA  ) 4.2 1.8 0.8

assign (resid  4 and name HN  ) (resid  3 and name HN  ) 4.2 1.8 0.5
assign (resid  5 and name HN  ) (resid  4 and name HN  ) 4.2 1.8 0.5
assign (resid  6 and name HN  ) (resid  5 and name HN  ) 3.5 1.1 0.4
assign (resid  8 and name HN  ) (resid  7 and name HN  ) 3.5 1.1 0.4
assign (resid  9 and name HN  ) (resid  8 and name HN  ) 4.2 1.8 0.5
assign (resid 10 and name HN  ) (resid  9 and name HN  ) 4.2 1.8 0.5
assign (resid 13 and name HN  ) (resid 12 and name HN  ) 2.4 0.4 0.5
assign (resid 14 and name HN  ) (resid 13 and name HN  ) 4.2 1.8 0.5
assign (resid 15 and name HN  ) (resid 14 and name HN  ) 2.8 0.4 0.3
assign (resid 16 and name HN  ) (resid 15 and name HN  ) 2.8 0.4 0.3
assign (resid 18 and name HN  ) (resid 17 and name HN  ) 2.8 0.4 0.3
assign (resid 19 and name HN  ) (resid 18 and name HN  ) 2.8 0.4 0.3
assign (resid 20 and name HN  ) (resid 19 and name HN  ) 2.8 0.4 0.3
assign (resid 21 and name HN  ) (resid 20 and name HN  ) 2.8 0.4 0.3
assign (resid 22 and name HN  ) (resid 21 and name HN  ) 2.8 0.4 0.3
assign (resid 23 and name HN  ) (resid 22 and name HN  ) 2.8 0.4 0.3
assign (resid 24 and name HN  ) (resid 23 and name HN  ) 2.8 0.4 0.3
assign (resid 25 and name HN  ) (resid 24 and name HN  ) 2.8 0.4 0.3
assign (resid 26 and name HN  ) (resid 25 and name HN  ) 2.8 0.4 0.3
assign (resid 27 and name HN  ) (resid 26 and name HN  ) 2.8 0.4 0.3
assign (resid 28 and name HN  ) (resid 27 and name HN  ) 2.8 0.4 0.3
assign (resid 29 and name HN  ) (resid 28 and name HN  ) 2.4 0.4 0.5
assign (resid 30 and name HN  ) (resid 29 and name HN  ) 4.2 1.8 0.5
assign (resid 31 and name HN  ) (resid 30 and name HN  ) 4.2 1.8 0.5
assign (resid 32 and name HN  ) (resid 31 and name HN  ) 4.2 1.8 0.5
assign (resid 33 and name HN  ) (resid 32 and name HN  ) 4.2 1.8 0.5
assign (resid 34 and name HN  ) (resid 33 and name HN  ) 4.2 1.8 0.5
assign (resid 35 and name HN  ) (resid 34 and name HN  ) 3.5 1.1 0.4
assign (resid 36 and name HN  ) (resid 35 and name HN  ) 2.4 0.4 0.5
assign (resid 37 and name HN  ) (resid 36 and name HN  ) 4.2 1.8 0.5
assign (resid 38 and name HN  ) (resid 37 and name HN  ) 4.2 1.8 0.5
assign (resid 39 and name HN  ) (resid 38 and name HN  ) 4.2 1.8 0.5
assign (resid 40 and name HN  ) (resid 39 and name HN  ) 2.4 0.4 0.5
assign (resid 41 and name HN  ) (resid 40 and name HN  ) 3.5 1.1 0.4
assign (resid 42 and name HN  ) (resid 41 and name HN  ) 4.2 1.8 0.5
assign (resid 47 and name HN  ) (resid 46 and name HN  ) 4.2 1.8 0.5
assign (resid 48 and name HN  ) (resid 47 and name HN  ) 2.8 0.4 0.3
assign (resid 49 and name HN  ) (resid 48 and name HN  ) 2.8 0.4 0.3
assign (resid 50 and name HN  ) (resid 49 and name HN  ) 2.8 0.4 0.3
assign (resid 51 and name HN  ) (resid 50 and name HN  ) 2.8 0.4 0.3
assign (resid 52 and name HN  ) (resid 51 and name HN  ) 2.8 0.4 0.3
assign (resid 53 and name HN  ) (resid 52 and name HN  ) 2.8 0.4 0.3
assign (resid 54 and name HN  ) (resid 53 and name HN  ) 2.8 0.4 0.3
assign (resid 55 and name HN  ) (resid 54 and name HN  ) 2.8 0.4 0.3
assign (resid 56 and name HN  ) (resid 55 and name HN  ) 2.8 0.4 0.3
assign (resid 57 and name HN  ) (resid 56 and name HN  ) 2.8 0.4 0.3
assign (resid 59 and name HN  ) (resid 58 and name HN  ) 2.8 0.4 0.3
assign (resid 61 and name HN  ) (resid 60 and name HN  ) 2.4 0.4 0.5
assign (resid 62 and name HN  ) (resid 61 and name HN  ) 4.2 1.8 0.5
assign (resid 63 and name HN  ) (resid 62 and name HN  ) 4.2 1.8 0.5
assign (resid 66 and name HN  ) (resid 65 and name HN  ) 2.4 0.4 0.5
assign (resid 67 and name HN  ) (resid 66 and name HN  ) 2.4 0.4 0.5
assign (resid 68 and name HN  ) (resid 67 and name HN  ) 2.4 0.4 0.5
assign (resid 69 and name HN  ) (resid 68 and name HN  ) 2.4 0.4 0.5
assign (resid 70 and name HN  ) (resid 69 and name HN  ) 2.4 0.4 0.5
assign (resid 71 and name HN  ) (resid 70 and name HN  ) 3.5 1.1 0.4
assign (resid 75 and name HN  ) (resid 74 and name HN  ) 2.8 0.4 0.3
assign (resid 76 and name HN  ) (resid 75 and name HN  ) 2.8 0.4 0.3
assign (resid 77 and name HN  ) (resid 76 and name HN  ) 2.8 0.4 0.3
assign (resid 78 and name HN  ) (resid 77 and name HN  ) 2.8 0.4 0.3
assign (resid 79 and name HN  ) (resid 78 and name HN  ) 2.8 0.4 0.3
assign (resid 80 and name HN  ) (resid 79 and name HN  ) 2.8 0.4 0.3
assign (resid 81 and name HN  ) (resid 80 and name HN  ) 2.8 0.4 0.3
assign (resid 82 and name HN  ) (resid 81 and name HN  ) 2.8 0.4 0.3
assign (resid 83 and name HN  ) (resid 82 and name HN  ) 2.8 0.4 0.3

assign (resid  9 and name HN  ) (resid  7 and name HN  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 15 and name HN  ) (resid 13 and name HN  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 17 and name HN  ) (resid 15 and name HN  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 18 and name HN  ) (resid 16 and name HN  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 19 and name HN  ) (resid 17 and name HN  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 20 and name HN  ) (resid 18 and name HN  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 21 and name HN  ) (resid 19 and name HN  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 23 and name HN  ) (resid 21 and name HN  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 24 and name HN  ) (resid 22 and name HN  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 25 and name HN  ) (resid 23 and name HN  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 26 and name HN  ) (resid 24 and name HN  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 28 and name HN  ) (resid 26 and name HN  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 29 and name HN  ) (resid 27 and name HN  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 52 and name HN  ) (resid 50 and name HN  ) 4.2 1.8 0.8
```

```
assign (resid 53 and name HN  ) (resid 51 and name HN  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 54 and name HN  ) (resid 52 and name HN  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 55 and name HN  ) (resid 53 and name HN  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 56 and name HN  ) (resid 54 and name HN  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 57 and name HN  ) (resid 55 and name HN  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 58 and name HN  ) (resid 56 and name HN  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 61 and name HN  ) (resid 59 and name HN  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 68 and name HN  ) (resid 66 and name HN  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 69 and name HN  ) (resid 67 and name HN  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 70 and name HN  ) (resid 68 and name HN  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 71 and name HN  ) (resid 69 and name HN  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 77 and name HN  ) (resid 75 and name HN  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 78 and name HN  ) (resid 76 and name HN  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 79 and name HN  ) (resid 77 and name HN  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 80 and name HN  ) (resid 78 and name HN  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 81 and name HN  ) (resid 79 and name HN  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 82 and name HN  ) (resid 80 and name HN  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 83 and name HN  ) (resid 81 and name HN  ) 4.2 1.8 0.8

assign (resid 16 and name HN  ) (resid 13 and name HN  ) 3.5 1.1 0.4
assign (resid 21 and name HN  ) (resid 18 and name HN  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 23 and name HN  ) (resid 20 and name HN  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 36 and name HN  ) (resid 33 and name HN  ) 4.2 1.8 0.8

assign (resid 17 and name HN  ) (resid 13 and name HN  ) 3.5 1.1 0.4

assign (resid  7 and name HA  ) (resid  9 and name HG* ) 4.2 1.8 2.8
assign (resid  7 and name HB1 ) (resid  9 and name HG* ) 3.5 1.1 2.4
assign (resid  7 and name HB2 ) (resid  9 and name HG* ) 3.5 1.1 2.4
assign (resid  7 and name HG# ) (resid  9 and name HG* ) 2.4 0.4 3.6
assign (resid  8 and name HE# ) (resid 10 and name HA  ) 3.5 1.1 2.4
assign (resid  8 and name HD# ) (resid 10 and name HA  ) 4.2 1.8 2.8
assign (resid  8 and name HD# ) (resid 10 and name HB# ) 3.5 1.1 3.4
assign (resid  8 and name HE# ) (resid 10 and name HB# ) 2.4 0.4 3.6
assign (resid  8 and name HE# ) (resid 10 and name HN  ) 3.5 1.1 2.4
assign (resid  8 and name HD# ) (resid 10 and name HN  ) 4.2 1.8 2.8
assign (resid  8 and name HD# ) (resid 32 and name HA  ) 4.2 1.8 2.8
assign (resid  8 and name HE# ) (resid 32 and name HA  ) 4.2 1.8 2.8
assign (resid  8 and name HD# ) (resid 33 and name HA1 ) 3.5 1.1 2.4
assign (resid  8 and name HE# ) (resid 33 and name HA1 ) 3.5 1.1 2.4
assign (resid  8 and name HD# ) (resid 33 and name HA2 ) 3.5 1.1 2.4
assign (resid  8 and name HE# ) (resid 33 and name HA2 ) 3.5 1.1 2.4
assign (resid  8 and name HD# ) (resid 33 and name HN  ) 3.5 1.1 2.4
assign (resid  8 and name HE# ) (resid 33 and name HN  ) 4.2 1.8 2.8
assign (resid 11 and name HG1 ) (resid 17 and name HB# ) 3.5 1.1 2.4
assign (resid 11 and name HG1 ) (resid 17 and name HA  ) 3.5 1.1 1.4
assign (resid 11 and name HG2 ) (resid 17 and name HB# ) 3.5 1.1 2.4
assign (resid 11 and name HG2 ) (resid 17 and name HA  ) 3.5 1.1 1.4
assign (resid 11 and name HG1 ) (resid 20 and name HB# ) 3.5 1.1 2.4
assign (resid 11 and name HG2 ) (resid 20 and name HB# ) 3.5 1.1 2.4
assign (resid 15 and name HA  ) (resid 59 and name HE# ) 4.2 1.8 2.8
assign (resid 15 and name HG1#) (resid 59 and name HE# ) 3.5 1.1 3.4
assign (resid 15 and name HG2#) (resid 59 and name HE# ) 3.5 1.1 3.4
assign (resid 15 and name HA  ) (resid 81 and name HG* ) 4.2 1.8 2.8
assign (resid 15 and name HG1#) (resid 81 and name HG* ) 2.4 0.4 3.6
assign (resid 15 and name HG2#) (resid 81 and name HG* ) 3.5 1.1 3.4
assign (resid 15 and name HA  ) (resid 82 and name HB# ) 3.5 1.1 1.4
assign (resid 15 and name HB  ) (resid 82 and name HB# ) 3.5 1.1 1.4
assign (resid 15 and name HG1#) (resid 82 and name HB# ) 2.4 0.4 4.6
assign (resid 15 and name HG2#) (resid 82 and name HB# ) 2.4 0.4 4.6
assign (resid 15 and name HG1#) (resid 82 and name HA  ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 15 and name HG2#) (resid 82 and name HA  ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 15 and name HG2#) (resid 83 and name HN  ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 16 and name HB1 ) (resid 75 and name HA  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 16 and name HB2 ) (resid 75 and name HA  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 18 and name HG# ) (resid 54 and name HA  ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 18 and name HE# ) (resid 54 and name HA  ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 18 and name HG# ) (resid 54 and name HG# ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 18 and name HB# ) (resid 54 and name HG# ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 18 and name HG# ) (resid 58 and name HG# ) 3.5 1.1 2.4
assign (resid 18 and name HD1 ) (resid 59 and name HE# ) 4.2 1.8 2.8
assign (resid 18 and name HD2 ) (resid 59 and name HE# ) 4.2 1.8 2.8
assign (resid 18 and name HG1 ) (resid 59 and name HE# ) 4.2 1.8 2.8
assign (resid 18 and name HG2 ) (resid 59 and name HE# ) 4.2 1.8 2.8
assign (resid 22 and name HA  ) (resid 51 and name HG1#) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 22 and name HA  ) (resid 51 and name HG2#) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 22 and name HB  ) (resid 51 and name HG2#) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 22 and name HG2#) (resid 51 and name HA  ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 22 and name HG2#) (resid 51 and name HG1#) 3.5 1.1 2.4
assign (resid 22 and name HD# ) (resid 51 and name HN  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 22 and name HD# ) (resid 51 and name HA  ) 2.4 0.4 1.6
assign (resid 22 and name HD# ) (resid 51 and name HG1#) 3.5 1.1 2.4
assign (resid 22 and name HD# ) (resid 51 and name HG2#) 2.4 0.4 2.4
assign (resid 22 and name HD# ) (resid 54 and name HN  ) 3.5 1.1 1.4
assign (resid 22 and name HG2#) (resid 54 and name HA  ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 22 and name HG2#) (resid 54 and name HG# ) 3.5 1.1 2.4
assign (resid 22 and name HD# ) (resid 54 and name HG1 ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 22 and name HD# ) (resid 54 and name HG2 ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 22 and name HA  ) (resid 54 and name HG# ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 22 and name HG2#) (resid 58 and name HG# ) 3.5 1.1 2.4
assign (resid 23 and name HN  ) (resid 51 and name HG2#) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 23 and name HA  ) (resid 51 and name HG1#) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 23 and name HA  ) (resid 51 and name HG2#) 3.5 1.1 1.4
assign (resid 23 and name HB1 ) (resid 32 and name HG2#) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 23 and name HB2 ) (resid 32 and name HG2#) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 23 and name HB1 ) (resid 32 and name HD# ) 3.5 1.1 1.4
assign (resid 23 and name HB2 ) (resid 32 and name HD# ) 3.5 1.1 1.4
assign (resid 23 and name HE1 ) (resid 51 and name HG1#) 3.5 1.1 1.4
assign (resid 23 and name HE1 ) (resid 77 and name HD1#) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 23 and name HE1 ) (resid 77 and name HD2#) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 23 and name HE3 ) (resid 29 and name HG2#) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 23 and name HE3 ) (resid 32 and name HD# ) 2.4 0.4 1.6
```

```
assign (resid 23 and name HE3 ) (resid 32 and name HG11) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 23 and name HE3 ) (resid 32 and name HG12) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 23 and name HE3 ) (resid 32 and name HG2#) 2.4 0.4 1.6
assign (resid 23 and name HE3 ) (resid 38 and name HA  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 24 and name HA  ) (resid 29 and name HG1#) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 24 and name HA  ) (resid 29 and name HG2#) 3.5 1.1 1.4
assign (resid 24 and name HB# ) (resid 29 and name HN  ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 24 and name HB1 ) (resid 29 and name HB  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 24 and name HB2 ) (resid 29 and name HB  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 24 and name HG# ) (resid 29 and name HG2#) 4.2 1.8 2.8
assign (resid 24 and name HA  ) (resid 30 and name HA  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 24 and name HB1 ) (resid 30 and name HA  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 24 and name HB2 ) (resid 30 and name HA  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 24 and name HG1 ) (resid 30 and name HA  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 24 and name HG2 ) (resid 30 and name HA  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 24 and name HA  ) (resid 32 and name HD# ) 2.4 0.4 1.6
assign (resid 24 and name HA  ) (resid 32 and name HG2#) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 24 and name HA  ) (resid 32 and name HG11) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 24 and name HA  ) (resid 32 and name HG12) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 24 and name HA  ) (resid 32 and name HB  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 24 and name HG1 ) (resid 32 and name HD# ) 3.5 1.1 1.4
assign (resid 24 and name HG2 ) (resid 32 and name HD# ) 3.5 1.1 1.4
assign (resid 26 and name HG* ) (resid 47 and name HE# ) 3.5 1.1 3.4
assign (resid 26 and name HA  ) (resid 50 and name HB# ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 26 and name HA  ) (resid 51 and name HG2#) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 26 and name HB  ) (resid 51 and name HG2#) 3.5 1.1 1.4
assign (resid 26 and name HN  ) (resid 50 and name HB# ) 4.2 1.8 2.8
assign (resid 26 and name HG* ) (resid 50 and name HA  ) 4.2 1.8 2.8
assign (resid 26 and name HG* ) (resid 50 and name HB# ) 4.2 1.8 3.8
assign (resid 26 and name HG* ) (resid 51 and name HA  ) 2.4 0.4 2.6
assign (resid 26 and name HN  ) (resid 51 and name HG2#) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 26 and name HG* ) (resid 54 and name HE2#) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 26 and name HG* ) (resid 54 and name HG# ) 4.2 1.8 3.8
assign (resid 27 and name HD* ) (resid 29 and name HG2#) 2.4 0.4 3.6
assign (resid 27 and name HD* ) (resid 29 and name HN  ) 4.2 1.8 2.8
assign (resid 27 and name HB# ) (resid 29 and name HN  ) 3.5 1.1 1.4
assign (resid 27 and name HD* ) (resid 32 and name HG1#) 4.2 1.8 3.8
assign (resid 27 and name HD* ) (resid 32 and name HG2#) 3.5 1.1 3.4
assign (resid 27 and name HD* ) (resid 51 and name HN  ) 3.5 1.1 2.4
assign (resid 27 and name HD* ) (resid 42 and name HA1 ) 4.2 1.8 2.8
assign (resid 27 and name HD* ) (resid 42 and name HA2 ) 4.2 1.8 2.8
assign (resid 27 and name HD* ) (resid 47 and name HA  ) 4.2 1.8 2.8
assign (resid 27 and name HD* ) (resid 47 and name HB# ) 4.2 1.8 3.8
assign (resid 27 and name HD* ) (resid 47 and name HE# ) 3.5 1.1 3.4
assign (resid 27 and name HA  ) (resid 47 and name HD# ) 4.2 1.8 2.8
assign (resid 27 and name HA  ) (resid 47 and name HE# ) 3.5 1.1 1.4
assign (resid 27 and name HD1#) (resid 51 and name HG2#) 3.5 1.1 2.4
assign (resid 27 and name HD2#) (resid 51 and name HG2#) 3.5 1.1 2.4
assign (resid 29 and name HN  ) (resid 32 and name HG1#) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 29 and name HN  ) (resid 32 and name HD# ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 29 and name HG2#) (resid 32 and name HD# ) 4.2 1.8 2.8
assign (resid 30 and name HA  ) (resid 32 and name HD# ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 30 and name HA  ) (resid 32 and name HG1#) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 33 and name HA# ) (resid 35 and name HN  ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 34 and name HA  ) (resid 36 and name HN  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 34 and name HA  ) (resid 74 and name HN  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 34 and name HA  ) (resid 74 and name HA  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 34 and name HN  ) (resid 74 and name HB  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 34 and name HN  ) (resid 74 and name HG1#) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 34 and name HA  ) (resid 75 and name HN  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 36 and name HB1 ) (resid 38 and name HE# ) 4.2 1.8 2.8
assign (resid 36 and name HB2 ) (resid 38 and name HE# ) 4.2 1.8 2.8
assign (resid 35 and name HA  ) (resid 73 and name HA  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 35 and name HD* ) (resid 73 and name HA  ) 4.2 1.8 2.8
assign (resid 35 and name HB# ) (resid 74 and name HN  ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 35 and name HG  ) (resid 75 and name HN  ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 35 and name HD1#) (resid 75 and name HN  ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 35 and name HD2#) (resid 75 and name HN  ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 35 and name HD* ) (resid 75 and name HE# ) 3.5 1.1 3.4
assign (resid 35 and name HD* ) (resid 76 and name HN  ) 4.2 1.8 2.8
assign (resid 35 and name HA  ) (resid 76 and name HB# ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 35 and name HB# ) (resid 76 and name HB# ) 4.2 1.8 2.8
assign (resid 35 and name HG  ) (resid 76 and name HB# ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 35 and name HD1#) (resid 76 and name HB# ) 4.2 1.8 2.8
assign (resid 35 and name HD2#) (resid 76 and name HB# ) 4.2 1.8 2.8
assign (resid 38 and name HN  ) (resid 73 and name HA  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 38 and name HN  ) (resid 72 and name HB# ) 3.5 1.1 1.5
assign (resid 38 and name HN  ) (resid 73 and name HG2#) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 38 and name HB1 ) (resid 72 and name HB1 ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 38 and name HB2 ) (resid 72 and name HB1 ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 38 and name HB1 ) (resid 72 and name HB2 ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 38 and name HB2 ) (resid 72 and name HB2 ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 38 and name HB# ) (resid 68 and name HD* ) 4.2 1.8 3.8
assign (resid 38 and name HD# ) (resid 68 and name HD1#) 4.2 1.8 3.8
assign (resid 38 and name HD# ) (resid 68 and name HD2#) 4.2 1.8 3.8
assign (resid 38 and name HD# ) (resid 72 and name HA  ) 4.2 1.8 2.8
assign (resid 38 and name HD# ) (resid 73 and name HN  ) 4.2 1.8 2.8
assign (resid 38 and name HD# ) (resid 73 and name HA  ) 2.4 0.4 2.4
assign (resid 38 and name HD# ) (resid 73 and name HB  ) 4.2 1.8 2.8
assign (resid 38 and name HD# ) (resid 73 and name HG2#) 4.2 1.8 3.8
assign (resid 38 and name HD# ) (resid 73 and name HG1 ) 4.2 1.8 2.8
assign (resid 38 and name HE# ) (resid 68 and name HD* ) 4.2 1.8 4.8
assign (resid 38 and name HE# ) (resid 72 and name HA  ) 4.2 1.8 2.8
assign (resid 38 and name HE# ) (resid 73 and name HA  ) 3.5 1.1 2.5
assign (resid 38 and name HE# ) (resid 73 and name HG2#) 4.2 1.8 3.8
assign (resid 38 and name HE# ) (resid 73 and name HG1 ) 4.2 1.8 2.8
assign (resid 38 and name HZ  ) (resid 68 and name HD1#) 3.5 1.1 2.5
assign (resid 38 and name HZ  ) (resid 68 and name HD2#) 3.5 1.1 2.5
assign (resid 38 and name HZ  ) (resid 73 and name HA  ) 3.5 1.1 0.5
assign (resid 38 and name HZ  ) (resid 77 and name HD1#) 2.4 0.4 1.4
assign (resid 38 and name HZ  ) (resid 77 and name HD2#) 2.4 0.4 1.4
assign (resid 39 and name HN  ) (resid 72 and name HB# ) 4.2 1.8 1.8
```

```
assign (resid 40 and name HG# ) (resid 73 and name HG1 ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 48 and name HA  ) (resid 68 and name HD* ) 2.4 0.4 2.4
assign (resid 48 and name HB# ) (resid 68 and name HD1#) 2.4 0.4 2.4
assign (resid 48 and name HB# ) (resid 68 and name HD2#) 2.4 0.4 2.4
assign (resid 49 and name HE# ) (resid 56 and name HB# ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 49 and name HA  ) (resid 65 and name HD1#) 2.4 0.4 1.6
assign (resid 49 and name HB1 ) (resid 65 and name HD1#) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 49 and name HB2 ) (resid 65 and name HD1#) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 49 and name HG1 ) (resid 65 and name HD1#) 3.5 1.1 0.5
assign (resid 49 and name HG2 ) (resid 65 and name HD1#) 3.5 1.1 0.5
assign (resid 49 and name HA  ) (resid 65 and name HD2#) 2.4 0.4 1.4
assign (resid 49 and name HB1 ) (resid 65 and name HD2#) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 49 and name HB2 ) (resid 65 and name HD2#) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 49 and name HG1 ) (resid 65 and name HD2#) 3.5 1.1 0.5
assign (resid 49 and name HG2 ) (resid 65 and name HD2#) 3.5 1.1 0.5
assign (resid 51 and name HB  ) (resid 68 and name HD1#) 3.5 1.1 2.5
assign (resid 51 and name HB  ) (resid 68 and name HD2#) 3.5 1.1 2.5
assign (resid 51 and name HG1#) (resid 68 and name HD* ) 2.4 0.4 3.4
assign (resid 51 and name HG2#) (resid 68 and name HD1#) 3.5 1.1 2.5
assign (resid 51 and name HG2#) (resid 68 and name HD2#) 3.5 1.1 2.5
assign (resid 52 and name HA  ) (resid 63 and name HB# ) 3.5 1.1 1.5
assign (resid 52 and name HA  ) (resid 63 and name HD* ) 2.4 0.4 2.6
assign (resid 52 and name HB# ) (resid 65 and name HD* ) 3.5 1.1 3.5
assign (resid 52 and name HB# ) (resid 68 and name HB1 ) 3.5 1.1 1.5
assign (resid 52 and name HB# ) (resid 68 and name HB2 ) 3.5 1.1 1.5
assign (resid 52 and name HB# ) (resid 68 and name HD1#) 3.5 1.1 1.5
assign (resid 52 and name HB# ) (resid 68 and name HD2#) 3.5 1.1 1.5
assign (resid 52 and name HB# ) (resid 68 and name HD* ) 3.5 1.1 3.5
assign (resid 55 and name HB  ) (resid 63 and name HD* ) 3.5 1.1 2.5
assign (resid 55 and name HB  ) (resid 63 and name HB# ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 55 and name HG2#) (resid 81 and name HG* ) 3.5 1.1 1.5
assign (resid 59 and name HB1 ) (resid 61 and name HB  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 59 and name HB2 ) (resid 61 and name HB  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 59 and name HB1 ) (resid 61 and name HG* ) 2.4 0.4 2.4
assign (resid 59 and name HB2 ) (resid 61 and name HG* ) 2.4 0.4 2.4
assign (resid 59 and name HA  ) (resid 81 and name HG1#) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 59 and name HB1 ) (resid 81 and name HG1#) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 59 and name HB2 ) (resid 81 and name HG1#) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 59 and name HD# ) (resid 81 and name HG1#) 2.4 0.4 3.4
assign (resid 59 and name HD# ) (resid 81 and name HG2#) 3.5 1.1 3.5
assign (resid 59 and name HE# ) (resid 81 and name HG1#) 3.5 1.1 3.5
assign (resid 59 and name HE# ) (resid 81 and name HG2#) 4.2 1.8 3.8
assign (resid 61 and name HG1#) (resid 59 and name HD# ) 3.5 1.1 3.5
assign (resid 61 and name HG2#) (resid 59 and name HD# ) 3.5 1.1 3.5
assign (resid 61 and name HG* ) (resid 59 and name HE# ) 2.4 0.4 4.4
assign (resid 61 and name HG* ) (resid 80 and name HE# ) 3.5 1.1 4.5
assign (resid 61 and name HB  ) (resid 81 and name HG1#) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 61 and name HG1#) (resid 81 and name HG1#) 2.4 0.4 2.4
assign (resid 61 and name HG2#) (resid 81 and name HG1#) 2.4 0.4 2.4
assign (resid 63 and name HD1#) (resid 77 and name HA  ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 63 and name HD2#) (resid 77 and name HA  ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 63 and name HG  ) (resid 77 and name HD* ) 4.2 1.8 2.8
assign (resid 63 and name HD1#) (resid 77 and name HD1#) 2.4 0.4 2.4
assign (resid 63 and name HD1#) (resid 77 and name HD2#) 2.4 0.4 2.4
assign (resid 63 and name HD2#) (resid 77 and name HD1#) 2.4 0.4 2.4
assign (resid 63 and name HD2#) (resid 77 and name HD2#) 2.4 0.4 2.4
assign (resid 63 and name HD* ) (resid 81 and name HG1#) 2.4 0.4 3.4
assign (resid 67 and name HA  ) (resid 69 and name HN  ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 67 and name HG1#) (resid 77 and name HA  ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 67 and name HG1#) (resid 77 and name HD1#) 3.5 1.1 2.5
assign (resid 67 and name HG1#) (resid 77 and name HD2#) 3.5 1.1 2.5
assign (resid 67 and name HG2#) (resid 80 and name HB# ) 4.2 1.8 2.8
assign (resid 67 and name HG1#) (resid 80 and name HB1 ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 67 and name HG1#) (resid 80 and name HB2 ) 4.2 1.8 1.8
assign (resid 67 and name HG1#) (resid 80 and name HE# ) 2.4 0.4 3.4
assign (resid 67 and name HG2#) (resid 80 and name HE# ) 3.5 1.1 3.5
assign (resid 68 and name HD* ) (resid 77 and name HD1#) 2.4 0.4 3.4
assign (resid 68 and name HD* ) (resid 77 and name HD2#) 2.4 0.4 3.4
assign (resid 70 and name HA  ) (resid 72 and name HD1 ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 70 and name HA  ) (resid 72 and name HD2 ) 4.2 1.8 0.8
assign (resid 71 and name HA  ) (resid 76 and name HB# ) 3.5 1.1 1.5
assign (resid 71 and name HB1 ) (resid 76 and name HB# ) 2.4 0.4 0.4
assign (resid 71 and name HB2 ) (resid 76 and name HB# ) 2.4 0.4 0.4
assign (resid 72 and name HA  ) (resid 77 and name HD* ) 4.2 1.8 2.8
assign (resid 81 and name HA  ) (resid 82 and name HA  ) 4.2 1.8 1.8

assign (resid  8 and name HA  ) (resid  8 and name HD# ) 2.4 0.4 2.4
assign (resid  8 and name HA  ) (resid  8 and name HE# ) 4.2 0.5 2.8
assign (resid  8 and name HB1 ) (resid  8 and name HD# ) 2.4 0.4 2.4
assign (resid  8 and name HB2 ) (resid  8 and name HD# ) 2.4 0.4 2.4
assign (resid  8 and name HB1 ) (resid  8 and name HE# ) 4.2 0.5 2.8
assign (resid  8 and name HB2 ) (resid  8 and name HE# ) 4.2 0.5 2.8
assign (resid 23 and name HN  ) (resid 23 and name HE1 ) 4.2 0.5 0.8
assign (resid 23 and name HA  ) (resid 23 and name HE3 ) 4.2 0.5 0.8
assign (resid 23 and name HB1 ) (resid 23 and name HE3 ) 3.5 1.4 0.4
assign (resid 23 and name HB2 ) (resid 23 and name HE3 ) 3.5 1.4 0.4
assign (resid 24 and name HA  ) (resid 24 and name HG1 ) 3.5 0.4 0.4
assign (resid 24 and name HA  ) (resid 24 and name HG2 ) 3.5 0.4 0.4
assign (resid 25 and name HA  ) (resid 25 and name HE# ) 2.4 0.4 1.4
assign (resid 26 and name HA  ) (resid 26 and name HG1#) 2.4 0.4 1.4
assign (resid 26 and name HA  ) (resid 26 and name HG2#) 2.4 0.4 1.4
assign (resid 27 and name HN  ) (resid 27 and name HG  ) 2.4 0.4 0.4
assign (resid 27 and name HN  ) (resid 27 and name HD1#) 4.2 0.5 1.8
assign (resid 27 and name HN  ) (resid 27 and name HD2#) 4.2 0.5 1.8
assign (resid 27 and name HA  ) (resid 27 and name HD* ) 2.4 0.4 2.4
assign (resid 38 and name HN  ) (resid 38 and name HE# ) 4.2 0.5 2.8
assign (resid 38 and name HN  ) (resid 38 and name HD# ) 3.5 0.4 2.4
assign (resid 38 and name HA  ) (resid 38 and name HB# ) 2.4 0.4 1.4
assign (resid 38 and name HA  ) (resid 38 and name HD# ) 3.5 0.4 2.4
assign (resid 38 and name HA  ) (resid 38 and name HE# ) 3.5 0.4 2.4
assign (resid 38 and name HA  ) (resid 38 and name HZ  ) 4.2 0.5 1.8
assign (resid 38 and name HB1 ) (resid 38 and name HE# ) 4.2 0.5 2.8
```

```
assign (resid 38 and name HB# ) (resid 38 and name HZ  ) 4.2 0.5 1.8
assign (resid 38 and name HB2 ) (resid 38 and name HE# ) 4.2 0.5 2.8
assign (resid 40 and name HE2#) (resid 40 and name HB# ) 4.2 0.5 2.8
assign (resid 40 and name HA  ) (resid 40 and name HB# ) 3.5 0.4 1.4
assign (resid 40 and name HA  ) (resid 40 and name HG# ) 2.4 0.4 1.4
assign (resid 47 and name HA  ) (resid 47 and name HE# ) 4.2 0.5 1.8
assign (resid 47 and name HB1 ) (resid 47 and name HE# ) 4.2 0.5 1.8
assign (resid 47 and name HB2 ) (resid 47 and name HE# ) 4.2 0.5 1.8
assign (resid 49 and name HA  ) (resid 49 and name HG1 ) 3.5 0.4 0.4
assign (resid 49 and name HA  ) (resid 49 and name HG2 ) 3.5 0.4 0.4
assign (resid 59 and name HA  ) (resid 59 and name HD# ) 2.4 0.4 2.4
assign (resid 59 and name HA  ) (resid 59 and name HE# ) 3.5 0.4 2.4
assign (resid 59 and name HB1 ) (resid 59 and name HD# ) 2.4 0.4 2.4
assign (resid 59 and name HB1 ) (resid 59 and name HE# ) 4.2 0.5 2.8
assign (resid 59 and name HB2 ) (resid 59 and name HD# ) 2.4 0.4 2.4
assign (resid 59 and name HB2 ) (resid 59 and name HE# ) 4.2 0.5 2.8
assign (resid 61 and name HA  ) (resid 61 and name HB  ) 2.4 0.4 0.4
assign (resid 61 and name HN  ) (resid 61 and name HB  ) 2.4 0.4 0.4
assign (resid 81 and name HA  ) (resid 81 and name HB  ) 3.5 0.4 0.4
assign (resid 81 and name HA  ) (resid 81 and name HG1#) 2.4 0.4 1.4
assign (resid 81 and name HA  ) (resid 81 and name HG2#) 2.4 0.4 1.4

assign (resid  8 and name HA  ) (resid  8 and name HD# ) 2.4 0.4 2.4
assign (resid  8 and name HA  ) (resid  8 and name HE# ) 4.2 0.5 2.8
assign (resid  8 and name HB1 ) (resid  8 and name HD# ) 2.4 0.4 2.4
assign (resid  8 and name HB2 ) (resid  8 and name HD# ) 2.4 0.4 2.4
assign (resid  8 and name HB1 ) (resid  8 and name HE# ) 4.2 0.5 2.8
assign (resid  8 and name HB2 ) (resid  8 and name HE# ) 4.2 0.5 2.8
assign (resid 23 and name HN  ) (resid 23 and name HE1 ) 4.2 0.5 0.8
assign (resid 23 and name HA  ) (resid 23 and name HE3 ) 4.2 0.5 0.8
assign (resid 23 and name HB1 ) (resid 23 and name HE3 ) 3.5 1.4 0.4
assign (resid 23 and name HB2 ) (resid 23 and name HE3 ) 3.5 1.4 0.4
assign (resid 24 and name HA  ) (resid 24 and name HG1 ) 3.5 0.4 0.4
assign (resid 24 and name HA  ) (resid 24 and name HG2 ) 3.5 0.4 0.4
assign (resid 25 and name HA  ) (resid 25 and name HE# ) 2.4 0.4 1.4
assign (resid 26 and name HA  ) (resid 26 and name HG1#) 2.4 0.4 1.4
assign (resid 26 and name HA  ) (resid 26 and name HG2#) 2.4 0.4 1.4
assign (resid 27 and name HN  ) (resid 27 and name HG  ) 2.4 0.4 0.4
assign (resid 27 and name HN  ) (resid 27 and name HD1#) 4.2 0.5 1.8
assign (resid 27 and name HN  ) (resid 27 and name HD2#) 4.2 0.5 1.8
assign (resid 27 and name HA  ) (resid 27 and name HD* ) 2.4 0.4 2.4
assign (resid 38 and name HN  ) (resid 38 and name HE# ) 4.2 0.5 2.8
assign (resid 38 and name HN  ) (resid 38 and name HD# ) 3.5 0.4 2.4
assign (resid 38 and name HA  ) (resid 38 and name HB# ) 2.4 0.4 1.4
assign (resid 38 and name HA  ) (resid 38 and name HD# ) 3.5 0.4 2.4
assign (resid 38 and name HA  ) (resid 38 and name HE# ) 3.5 0.4 2.4
assign (resid 38 and name HA  ) (resid 38 and name HZ  ) 4.2 0.5 1.8
assign (resid 38 and name HB1 ) (resid 38 and name HE# ) 4.2 0.5 2.8
assign (resid 38 and name HB# ) (resid 38 and name HZ  ) 4.2 0.5 1.8
assign (resid 38 and name HB2 ) (resid 38 and name HE# ) 4.2 0.5 2.8
assign (resid 40 and name HE2#) (resid 40 and name HB# ) 4.2 0.5 2.8
assign (resid 40 and name HA  ) (resid 40 and name HB# ) 3.5 0.4 1.4
assign (resid 40 and name HA  ) (resid 40 and name HG# ) 2.4 0.4 1.4
assign (resid 47 and name HA  ) (resid 47 and name HE# ) 4.2 0.5 1.8
assign (resid 47 and name HB1 ) (resid 47 and name HE# ) 4.2 0.5 1.8
assign (resid 47 and name HB2 ) (resid 47 and name HE# ) 4.2 0.5 1.8
assign (resid 49 and name HA  ) (resid 49 and name HG1 ) 3.5 0.4 0.4
assign (resid 49 and name HA  ) (resid 49 and name HG2 ) 3.5 0.4 0.4
assign (resid 59 and name HA  ) (resid 59 and name HD# ) 2.4 0.4 2.4
assign (resid 59 and name HA  ) (resid 59 and name HE# ) 3.5 0.4 2.4
assign (resid 59 and name HB1 ) (resid 59 and name HD# ) 2.4 0.4 2.4
assign (resid 59 and name HB1 ) (resid 59 and name HE# ) 4.2 0.5 2.8
assign (resid 59 and name HB2 ) (resid 59 and name HD# ) 2.4 0.4 2.4
assign (resid 59 and name HB2 ) (resid 59 and name HE# ) 4.2 0.5 2.8
assign (resid 61 and name HA  ) (resid 61 and name HB  ) 2.4 0.4 0.4
assign (resid 61 and name HN  ) (resid 61 and name HB  ) 2.4 0.4 0.4
assign (resid 81 and name HA  ) (resid 81 and name HB  ) 3.5 0.4 0.4
assign (resid 81 and name HA  ) (resid 81 and name HG1#) 2.4 0.4 1.4
assign (resid 81 and name HA  ) (resid 81 and name HG2#) 2.4 0.4 1.4

assign (resid 13 and name O   ) (resid 17 and name HN  ) 1.9 0.5 0.1
assign (resid 13 and name O   ) (resid 17 and name N   ) 2.9 0.3 0.5
assign (resid 14 and name O   ) (resid 18 and name HN  ) 1.9 0.5 0.1
assign (resid 14 and name O   ) (resid 18 and name N   ) 2.9 0.3 0.5
assign (resid 15 and name O   ) (resid 19 and name HN  ) 1.9 0.5 0.1
assign (resid 15 and name O   ) (resid 19 and name N   ) 2.9 0.3 0.5
assign (resid 16 and name O   ) (resid 20 and name HN  ) 1.9 0.5 0.1
assign (resid 16 and name O   ) (resid 20 and name N   ) 2.9 0.3 0.5
assign (resid 17 and name O   ) (resid 21 and name HN  ) 1.9 0.5 0.1
assign (resid 17 and name O   ) (resid 21 and name N   ) 2.9 0.3 0.5
assign (resid 18 and name O   ) (resid 22 and name HN  ) 1.9 0.5 0.1
assign (resid 18 and name O   ) (resid 22 and name N   ) 2.9 0.3 0.5
assign (resid 19 and name O   ) (resid 23 and name HN  ) 1.9 0.5 0.1
assign (resid 19 and name O   ) (resid 23 and name N   ) 2.9 0.3 0.5
assign (resid 20 and name O   ) (resid 24 and name HN  ) 1.9 0.5 0.1
assign (resid 20 and name O   ) (resid 24 and name N   ) 2.9 0.3 0.5
assign (resid 21 and name O   ) (resid 25 and name HN  ) 1.9 0.5 0.1
assign (resid 21 and name O   ) (resid 25 and name N   ) 2.9 0.3 0.5
assign (resid 22 and name O   ) (resid 26 and name HN  ) 1.9 0.5 0.1
assign (resid 22 and name O   ) (resid 26 and name N   ) 2.9 0.3 0.5
assign (resid 23 and name O   ) (resid 27 and name HN  ) 1.9 0.5 0.1
assign (resid 23 and name O   ) (resid 27 and name N   ) 2.9 0.3 0.5
assign (resid 45 and name O   ) (resid 49 and name HN  ) 1.9 0.5 0.1
assign (resid 45 and name O   ) (resid 49 and name N   ) 2.9 0.3 0.5
assign (resid 46 and name O   ) (resid 50 and name HN  ) 1.9 0.5 0.1
assign (resid 46 and name O   ) (resid 50 and name N   ) 2.9 0.3 0.5
assign (resid 47 and name O   ) (resid 51 and name HN  ) 1.9 0.5 0.1
assign (resid 47 and name O   ) (resid 51 and name N   ) 2.9 0.3 0.5
assign (resid 49 and name O   ) (resid 53 and name HN  ) 1.9 0.5 0.1
assign (resid 49 and name O   ) (resid 53 and name N   ) 2.9 0.3 0.5
assign (resid 50 and name O   ) (resid 54 and name HN  ) 1.9 0.5 0.1
assign (resid 50 and name O   ) (resid 54 and name N   ) 2.9 0.3 0.5
```

```
assign (resid 51 and name O   ) (resid 55 and name HN  ) 1.9 0.5 0.1
assign (resid 51 and name O   ) (resid 55 and name N   ) 2.9 0.3 0.5
assign (resid 53 and name O   ) (resid 57 and name HN  ) 1.9 0.5 0.1
assign (resid 53 and name O   ) (resid 57 and name N   ) 2.9 0.3 0.5
assign (resid 54 and name O   ) (resid 58 and name HN  ) 1.9 0.5 0.1
assign (resid 54 and name O   ) (resid 58 and name N   ) 2.9 0.3 0.5
assign (resid 55 and name O   ) (resid 59 and name HN  ) 1.9 0.5 0.1
assign (resid 55 and name O   ) (resid 59 and name N   ) 2.9 0.3 0.5
assign (resid 73 and name O   ) (resid 77 and name HN  ) 1.9 0.5 0.1
assign (resid 73 and name O   ) (resid 77 and name N   ) 2.9 0.3 0.5
assign (resid 74 and name O   ) (resid 78 and name HN  ) 1.9 0.5 0.1
assign (resid 74 and name O   ) (resid 78 and name N   ) 2.9 0.3 0.5
assign (resid 75 and name O   ) (resid 79 and name HN  ) 1.9 0.5 0.1
assign (resid 75 and name O   ) (resid 79 and name N   ) 2.9 0.3 0.5
assign (resid 76 and name O   ) (resid 80 and name HN  ) 1.9 0.5 0.1
assign (resid 76 and name O   ) (resid 80 and name N   ) 2.9 0.3 0.5
assign (resid 77 and name O   ) (resid 81 and name HN  ) 1.9 0.5 0.1
assign (resid 77 and name O   ) (resid 81 and name N   ) 2.9 0.3 0.5
assign (resid 78 and name O   ) (resid 82 and name HN  ) 1.9 0.5 0.1
assign (resid 78 and name O   ) (resid 82 and name N   ) 2.9 0.3 0.5
assign (resid 79 and name O   ) (resid 83 and name HN  ) 1.9 0.5 0.1
assign (resid 79 and name O   ) (resid 83 and name N   ) 2.9 0.3 0.5

assign (resid  4 and name C ) (resid  5 and name N ) (resid  5 and name CA) (resid  5 and name C ) 1 -120.0 46.5 2
assign (resid  5 and name C ) (resid  6 and name N ) (resid  6 and name CA) (resid  6 and name C ) 1 -120.0 55.0 2
assign (resid  6 and name C ) (resid  7 and name N ) (resid  7 and name CA) (resid  7 and name C ) 1 -120.0 48.5 2
assign (resid  7 and name C ) (resid  8 and name N ) (resid  8 and name CA) (resid  8 and name C ) 1 -120.0 65.5 2
assign (resid  8 and name C ) (resid  9 and name N ) (resid  9 and name CA) (resid  9 and name C ) 1 -120.0 15.5 2
assign (resid  9 and name C ) (resid 10 and name N ) (resid 10 and name CA) (resid 10 and name C ) 1 -120.0 70.0 2
assign (resid 11 and name C ) (resid 12 and name N ) (resid 12 and name CA) (resid 12 and name C ) 1 -120.0 10.0 2
assign (resid 12 and name C ) (resid 13 and name N ) (resid 13 and name CA) (resid 13 and name C ) 1 -120.0 54.0 2
assign (resid 14 and name C ) (resid 15 and name N ) (resid 15 and name CA) (resid 15 and name C ) 1  -57.0 30.0 2
assign (resid 15 and name C ) (resid 16 and name N ) (resid 16 and name CA) (resid 16 and name C ) 1  -57.0 30.0 2
assign (resid 16 and name C ) (resid 17 and name N ) (resid 17 and name CA) (resid 17 and name C ) 1  -57.0 30.0 2
assign (resid 17 and name C ) (resid 18 and name N ) (resid 18 and name CA) (resid 18 and name C ) 1  -57.0 30.0 2
assign (resid 18 and name C ) (resid 19 and name N ) (resid 19 and name CA) (resid 19 and name C ) 1  -57.0 30.0 2
assign (resid 19 and name C ) (resid 20 and name N ) (resid 20 and name CA) (resid 20 and name C ) 1  -57.0 30.0 2
assign (resid 20 and name C ) (resid 21 and name N ) (resid 21 and name CA) (resid 21 and name C ) 1  -57.0 30.0 2
assign (resid 21 and name C ) (resid 22 and name N ) (resid 22 and name CA) (resid 22 and name C ) 1  -57.0 30.0 2
assign (resid 22 and name C ) (resid 23 and name N ) (resid 23 and name CA) (resid 23 and name C ) 1  -57.0 30.0 2
assign (resid 23 and name C ) (resid 24 and name N ) (resid 24 and name CA) (resid 24 and name C ) 1  -57.0 30.0 2
assign (resid 24 and name C ) (resid 25 and name N ) (resid 25 and name CA) (resid 25 and name C ) 1  -57.0 30.0 2
assign (resid 25 and name C ) (resid 26 and name N ) (resid 26 and name CA) (resid 26 and name C ) 1  -57.0 30.0 2
assign (resid 26 and name C ) (resid 27 and name N ) (resid 27 and name CA) (resid 27 and name C ) 1 -120.0 62.8 2
assign (resid 28 and name C ) (resid 29 and name N ) (resid 29 and name CA) (resid 29 and name C ) 1 -120.0 17.0 2
assign (resid 29 and name C ) (resid 30 and name N ) (resid 30 and name CA) (resid 30 and name C ) 1 -120.0 33.0 2
assign (resid 33 and name C ) (resid 34 and name N ) (resid 34 and name CA) (resid 34 and name C ) 1 -120.0 63.5 2
assign (resid 35 and name C ) (resid 36 and name N ) (resid 36 and name CA) (resid 36 and name C ) 1 -120.0 60.5 2
assign (resid 36 and name C ) (resid 37 and name N ) (resid 37 and name CA) (resid 37 and name C ) 1 -120.0 56.0 2
assign (resid 38 and name C ) (resid 39 and name N ) (resid 39 and name CA) (resid 39 and name C ) 1 -120.0 43.5 2
assign (resid 39 and name C ) (resid 40 and name N ) (resid 40 and name CA) (resid 40 and name C ) 1 -120.0 37.5 2
assign (resid 46 and name C ) (resid 47 and name N ) (resid 47 and name CA) (resid 47 and name C ) 1  -57.0 30.0 2
assign (resid 47 and name C ) (resid 48 and name N ) (resid 48 and name CA) (resid 48 and name C ) 1  -57.0 30.0 2
assign (resid 48 and name C ) (resid 49 and name N ) (resid 49 and name CA) (resid 49 and name C ) 1  -57.0 30.0 2
assign (resid 49 and name C ) (resid 50 and name N ) (resid 50 and name CA) (resid 50 and name C ) 1  -57.0 30.0 2
assign (resid 50 and name C ) (resid 51 and name N ) (resid 51 and name CA) (resid 51 and name C ) 1  -57.0 30.0 2
assign (resid 51 and name C ) (resid 52 and name N ) (resid 52 and name CA) (resid 52 and name C ) 1  -57.0 30.0 2
assign (resid 52 and name C ) (resid 53 and name N ) (resid 53 and name CA) (resid 53 and name C ) 1  -57.0 30.0 2
assign (resid 53 and name C ) (resid 54 and name N ) (resid 54 and name CA) (resid 54 and name C ) 1  -57.0 30.0 2
assign (resid 54 and name C ) (resid 55 and name N ) (resid 55 and name CA) (resid 55 and name C ) 1  -57.0 30.0 2
assign (resid 55 and name C ) (resid 56 and name N ) (resid 56 and name CA) (resid 56 and name C ) 1  -57.0 30.0 2
assign (resid 56 and name C ) (resid 57 and name N ) (resid 57 and name CA) (resid 57 and name C ) 1  -57.0 30.0 2
assign (resid 57 and name C ) (resid 58 and name N ) (resid 58 and name CA) (resid 58 and name C ) 1  -57.0 30.0 2
assign (resid 58 and name C ) (resid 59 and name N ) (resid 59 and name CA) (resid 59 and name C ) 1 -120.0 30.0 2
assign (resid 59 and name C ) (resid 60 and name N ) (resid 60 and name CA) (resid 60 and name C ) 1 -120.0 51.5 2
assign (resid 60 and name C ) (resid 61 and name N ) (resid 61 and name CA) (resid 61 and name C ) 1 -120.0 25.0 2
assign (resid 61 and name C ) (resid 62 and name N ) (resid 62 and name CA) (resid 62 and name C ) 1 -120.0 50.5 2
assign (resid 62 and name C ) (resid 63 and name N ) (resid 63 and name CA) (resid 63 and name C ) 1 -120.0 32.5 2
assign (resid 64 and name C ) (resid 65 and name N ) (resid 65 and name CA) (resid 65 and name C ) 1 -120.0 68.0 2
assign (resid 65 and name C ) (resid 66 and name N ) (resid 66 and name CA) (resid 66 and name C ) 1  -57.0 30.0 2
assign (resid 66 and name C ) (resid 67 and name N ) (resid 67 and name CA) (resid 67 and name C ) 1  -57.0 30.0 2
assign (resid 67 and name C ) (resid 68 and name N ) (resid 68 and name CA) (resid 68 and name C ) 1  -57.0 30.0 2
assign (resid 68 and name C ) (resid 69 and name N ) (resid 69 and name CA) (resid 69 and name C ) 1  -57.0 30.0 2
assign (resid 69 and name C ) (resid 70 and name N ) (resid 70 and name CA) (resid 70 and name C ) 1 -120.0 55.0 2
assign (resid 70 and name C ) (resid 71 and name N ) (resid 71 and name CA) (resid 71 and name C ) 1 -120.0 33.0 2
assign (resid 72 and name C ) (resid 73 and name N ) (resid 73 and name CA) (resid 73 and name C ) 1 -120.0 30.0 2
assign (resid 73 and name C ) (resid 74 and name N ) (resid 74 and name CA) (resid 74 and name C ) 1  -57.0 30.0 2
assign (resid 74 and name C ) (resid 75 and name N ) (resid 75 and name CA) (resid 75 and name C ) 1  -57.0 30.0 2
assign (resid 75 and name C ) (resid 76 and name N ) (resid 76 and name CA) (resid 76 and name C ) 1  -57.0 30.0 2
assign (resid 76 and name C ) (resid 77 and name N ) (resid 77 and name CA) (resid 77 and name C ) 1  -57.0 30.0 2
assign (resid 77 and name C ) (resid 78 and name N ) (resid 78 and name CA) (resid 78 and name C ) 1  -57.0 30.0 2
assign (resid 78 and name C ) (resid 79 and name N ) (resid 79 and name CA) (resid 79 and name C ) 1  -57.0 30.0 2
assign (resid 79 and name C ) (resid 80 and name N ) (resid 80 and name CA) (resid 80 and name C ) 1  -57.0 30.0 2
assign (resid 80 and name C ) (resid 81 and name N ) (resid 81 and name CA) (resid 81 and name C ) 1  -57.0 30.0 2
assign (resid 81 and name C ) (resid 82 and name N ) (resid 82 and name CA) (resid 82 and name C ) 1  -57.0 30.0 2
assign (resid 82 and name C ) (resid 83 and name N ) (resid 83 and name CA) (resid 83 and name C ) 1 -120.0 54.5 2

assign (resid 10 and name N ) (resid 10 and name CA) (resid 10 and name C ) (resid 11 and name N ) 1  120.0 60.0 2
assign (resid 63 and name N ) (resid 63 and name CA) (resid 63 and name C ) (resid 64 and name N ) 1  120.0 60.0 2
assign (resid 71 and name N ) (resid 71 and name CA) (resid 71 and name C ) (resid 72 and name N ) 1  120.0 60.0 2

assign (resid 80 and name N ) (resid 80 and name CA) (resid 80 and name CB) (resid 80 and name CG) 1  180.0 40.0  2
assign (resid 56 and name N ) (resid 56 and name CA) (resid 56 and name CB) (resid 56 and name CG) 1  180.0 40.0  2
assign (resid  8 and name N ) (resid  8 and name CA) (resid  8 and name CB) (resid  8 and name CG) 1  180.0 40.0  2
assign (resid 23 and name N ) (resid 23 and name CA) (resid 23 and name CB) (resid 23 and name CG) 1  -60.0 40.0  2
assign (resid 69 and name N ) (resid 69 and name CA) (resid 69 and name CB) (resid 69 and name CG) 1  -60.0 40.0  2
assign (resid 59 and name N ) (resid 59 and name CA) (resid 59 and name CB) (resid 59 and name CG) 1  -60.0 40.0  2
```

7.4. Abkürzungen

ACPS	*holo*-Acyl-Carrier-Protein Synthase von *E. coli*
A-Domäne	Adenylierungsdomäne
AS	Aminosäuren
AMP	Adenosin-5‘-monophosphat
ATCC	*american type culture collection*, Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, USA
ATP	Adenosin-5‘-triphosphat
BSA	Rinder- (*bovine*) serum-Albumin
CBCA(CO)NH	Übertragung der Magnetisierung von C^{β} über C^{α} und C^{O} und N nach H^{N} (C^{O} wird nicht gemessen)
C-Domäne	Kondensationsdomäne
CoA	Koenzym A
CSA	*chemical shielding anisotropy* (Anisotropie der chemischen Abschirmung)
CT	*constant time* (konstante Zeitintervalle)
DIPSI	*decoupling in the presence of scalar interactions* (Entkopplung in Gegenwart skalarer Interaktionen)
E-Domäne	Epimerisierungsdomäne
g	mittlere Erdbeschleunigung: 9,80665 m/s^2
Gsp	PPTase für die *B. brevis* Gramicidin S-Synthetase
HNCO	Übertragung der Magnetisierung von H^{N} über N nach C^{O}
HNCA	Übertragung der Magnetisierung von H^{N} über N nach C^{α}
HNHA	Experiment zur Kopplungsbestimmung von HN und Hα
HPLC	*high performance liquid chromatography*, Hochleistungsflüssigchromatographie
HSQC	*heteronuclear single quantum coherence*, Heteroatomkern-Einquantenkohärenz
IMAC	immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kDa	Kilodalton
M	mol/L
MALDI-TOF	*matrix-assisted laser-desorption ionization- time of flight* MS, matrixunterstützte Desorptions-Ionisierung-Flugzeit-Massenspektrometrie
MLEV	Malcom Levitt
MS	Massenspektrometrie
NMR	*nuclear magnetic resonance*, Kernspinresonanz
NOE	*nuclear* Overhauser-*enhancement*, Kern-Overhauser-Verstärkung
NOESY	NOE *spectroscopy*, NOE-Spektroskopie
NRPS	nichtribosomale Peptidsynthetase
OD_x	optische Dichte bei x nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCP	*peptidyl carrier protein*
PCR	Polymeraseketten- (*chain*) reaktion
4‘PP	4‘-Phosphopantethein
PPTase	4‘PP-Transferase
RT	Raumtemperatur
RMSD	*root mean square deviation*, Wurzel der gemittelten quadratischen Abweichung

SDS	Natrium-(*sodium*) dodecylsulfat
Sfp	PPTase für die *B. subtilis* Surfactin-Synthetase
TCA	Trichloressigsäure (-*acetic acid*)
TOCSY	*total correlation spectroscopy*, totale Korrelationsspektroskopie (korreliert jew. das ges. Spinsystem)
TPPI	*time-proportional phase incrementation* (zeitproportionale Phaseninkrementierung)
upm	Umdrehungen pro Minute
WATERGATE	*water suppression by gradient tailored excitation*

7.5. Abbildungsverzeichnis

Fixierung der aktivierten Aminosäure als Thioester am 4‘PP-Kofaktor des PCPs 10
Modulare Struktur nichtribosomaler Peptidsynthetasen 11
Sequenzvergeich einiger beispielhaft ausgewählter PCPs und ACPs 12
Schema der posttranslationalen Modifikation von PCP durch eine PPTase 13
Phenylalanin in der Substrat-Bindetasche von PheA 14
Struktur der PPTase Sfp 16
Ausschnitt aus dem ^{1}H-^{1}H NOESY von TycC3-PCP 21
Die Karplus-Beziehung für H^{N} und H^{α} 22
SDS-PAGE der nativen Aufreinigung von TycA-PCP 42
Vergleich von TycA-PCP vor und nach Rückfaltung 43
Autoradiographie eines Phosphopantetheinylierungsassays von TycC3-PCP 45
Zeitlicher Verlauf der Beladungsreaktion von holo-TycC3-PCP mit L-Tyrosin 46
^{1}H-^{15}N HSQC-Spektrum von TycC3-PCP bei pH 5,05 48
NMR-spektroskopische Sekundärstruktur-Indikatoren 52
Stereobild der endgültigen Familie von 20 Strukturen 54
Ribbon-Modell der minimierten Mittelwertstruktur als Stereobild 55
Sausage-Darstellung der Familie der endgültigen 20 Strukturen 56
Solvens-zugängliche Oberflächenanteile der Reste 58
Ramachandran-Plot der Strukturfamilie 60
Seitenketten, die an der Bildung des hydrophoben Kerns beteiligt sind 61
Relaxationsdaten in Verbindung mit der NOE- und RMSD-Verteilung 63
Vergleich der PCP- und ACP-Strukturen 67
Hydrophobe Reste an der Proteinoberfläche im Bereich um das konservierte Serin 45 70

8. Literatur

Babu, Y.S., Sack, J.S., Greenhough, T.J., Bugg, C.E., Means, A.R. und Cook, W.J. (1985) Three-dimensional structure of calmodulin; *Nature*, **315**, 37-40.

Bax, A. und Davis, D.G. (1985) MLEV-17-based two-dimensional homonuclear magnetization transfer spectroscopy; *J. Magn. Reson.*, **65**, 355-360.

Bax, A. und Grzesiek, S. (1993) Methodological Advances in Protein NMR; *Accounts of Chemical Research*, **26**, 131-138.

Belshaw, P.J., Walsh, C.T. und Stachelhaus, T. (1999) Aminoacyl-CoAs as probes of condensation domain selectivity in nonribosomal peptide synthesis; *Science*, **284**, 486-489.

Braunschweiler, L. und Ernst, R.R. (1983) Coherence transfer by isotropic mixing - application to proton correlation spectroscopy; *J. Magn. Reson.*, **53**, 521-528.

Brünger, A.T. (1992) X-PLOR, Version 3.1: a system for X-ray crystallography and NMR; Yale University Press, New Haven.

Brünger, A.T. und Nilges, M. (1993) Computational challenges for macromolecular structure determination by X-ray crystallography and solution NMR-spectroscopy; *Quarterly Reviews of Biophysics*, **26**, 49-125.

Cieslar, C., Ross, A., Zink, T. und Holak, T.A. (1993) Efficiency in multidimensional NMR by optimized recording of time point phase pairs in evolution periods and their selective linear transformation; *J. Magn. Reson. Ser. B*, **101**, 97-101.

Conti, E., Stachelhaus, T., Marahiel, M.A. und Brick, P. (1997) Structural basis for the activation of phenylalanine in the nonribosomal biosynthesis of gramicidin S; *Embo J.*, **16**, 4174-4183.

Crump, M.P., Crosby, J., Dempsey, C.E., Murray, M., Hopwood, D.A. und Simpson, T.J. (1996) Conserved secondary structure in the actinorhodin polyketide synthase acyl carrier protein from *Streptomyces coelicolor* A3(2) and the fatty acid synthase acyl carrier protein from *Escherichia coli*; *FEBS Lett.*, **391**, 302-306.

Crump, M.P., Crosby, J., Dempsey, C.E., Parkinson, J.A., Murray, M., Hopwood, D.A. und Simpson, T.J. (1997) Solution structure of the actinorhodin polyketide synthase acyl carrier protein from *Streptomyces coelicolor* A3(2); *Biochemistry*, **36**, 6000-6008.

Dax, S.L. (1997) Antibacterial chemotherapeutic agents; Chapman & Hall, Padstow, UK.

Dhalluin, C., Wieruszeski, J.M. und Lippens, G. (1996) An improved homonuclear TOCSY experiment with minimal water saturation; *J. Magn. Reson. Ser. B*, **111**, 168-170.

Dieckmann, R., Pavela-Vrancic, M., von Döhren, H. und Kleinkauf, H. (1999) Probing the domain structure and ligand-induced conformational changes by limited proteolysis of tyrocidine synthetase 1; *J. Mol. Biol.*, **288**, 129-140.

Edison, A.S., Abildgaard, F., Westler, W.M., Mooberry, E.S. und Markley, J.L. (1994) Practical introduction to theory and implementation of multinuclear, multidimensional nuclear magnetic resonance experiments; *Methods Enzymol.*, **239**, 3-79.

Farrow, N.A., Muhandiram, R., Singer, A.U., Pascal, S.M., Kay, C.M., Gish, G., Shoelson, S.E., Pawson, T., Forman-Kay, J.D. und Kay, L.E. (1994) Backbone dynamics of a free and phosphopeptide-complexed Src homology 2 domain studied by ^{15}N NMR relaxation; *Biochemistry*, **33**, 5984-6003.

Fesik, S.W. und Zuiderweg, E.R.P. (1988) Heteronuclear three-dimensional NMR spectroscopy. A strategy for simplification of homonuclear two-dimensional NMR spectra; *J. Magn. Reson.*, **78**, 588-593.

Garrett, D.S., Seok, Y.J., Liao, D.I., Peterkofsky, A., Gronenborn, A.M. und Clore, G.M. (1997) Solution structure of the 30 kDa N-terminal domain of enzyme I of the *Escherichia coli* phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system by multidimensional NMR; *Biochemistry*, **36**, 2517-2530.

Gocht, M. und Marahiel, M.A. (1994) Analysis of core sequences in the D-Phe activating domain of the multifunctional peptide synthetase TycA by site-directed mutagenesis; *J. Bacteriol.*, **176**, 2654-2662.

Grzesiek, S. und Bax, A. (1992a) Correlating backbone amide and side-chain resonances in larger proteins by multiple relayed triple resonance NMR; *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 6291-6293.

Grzesiek, S. und Bax, A. (1992b) Improved 3D triple-resonance NMR techniques applied to a 31-kDa protein; *J. Magn. Reson.*, **96**, 432-440.

Holak, T.A., Kearsley, S.K., Kim, Y. und Prestegard, J.H. (1988a) Three-dimensional structure of acyl carrier protein determined by NMR pseudoenergy and distance geometry calculations; *Biochemistry*, **27**, 6135-6142.

Holak, T.A., Nilges, M., Prestegard, J.H., Gronenborn, A.M. und Clore, G.M. (1988b) Three-dimensional structure of acyl carrier protein in solution determined by nuclear magnetic resonance and the combined use of dynamical simulated annealing and distance geometry; *Eur. J. Biochem.*, **175**, 9-15.

Hopwood, D.A. und Sherman, D.H. (1990) Molecular genetics of polyketides and its comparison to fatty acid biosynthesis; *Annu. Rev. Genet.*, **24**, 37-66.

Hu, J.S., Grzesiek, S. und Bax, A. (1997) Two-dimensional NMR methods for determining χ^1 angles of aromatic residues in proteins from three-bond $J_{C'C\gamma}$ and $J_{NC\gamma}$ couplings; *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 1803-1804.

Hurd, R.E. (1990) Gradient-enhanced spectroscopy; *J. Magn. Reson.*, **87**, 422-428.

Hüser, A. (1996) Untersuchungen zur Funktion des Thioesterbildungsmoduls der Tyrocidin Synthetase 1; *Diplomarbeit*, Fachbereich Chemie; Philipps-Universität, Marburg.

Ikura, M., Clore, G.M., Gronenborn, A.M., Zhu, G., Klee, C.B. und Bax, A. (1992) Solution structure of a calmodulin-target peptide complex by multidimensional NMR; *Science*, **256**, 632-638.

Jahnke, W., Baur, M., Gemmecker, G. und Kessler, H. (1995) Improved accuracy of NMR structures by a modified NOESY-HSQC experiment; *J. Magn. Reson. Ser. B*, **106**, 86-88.

Jones, J.A., Hodgkinson, P., Barker, A.L. und Hore, P.J. (1996) Optimal sampling strategies for the measurement of spin-spin relaxation times; *J. Magn. Reson. Ser. B*, **113**, 25-34.

Karplus, M. (1959) Contact electron-spin coupling of nuclear magnetic mements; *J. Chem. Phys.*, **30**, 11-15.

Kay, L.E., Ikura, M., Tschudin, R. und Bax, A. (1990) Three-dimensional triple-resonance NMR spectroscopy of isotopically enriched proteins; *J. Magn. Reson.*, **89**, 495-514.

Kay, L.E., Xu, G.Y., Singer, A.U., Muhandiram, D.R. und Formankay, J.D. (1993) A gradient-enhanced HCCH TOCSY experiment for recording sidechain ^{1}H and ^{13}C correlations in H_2O samples of proteins; *J. Magn. Reson. Ser. B*, **101**, 333-337.

Kleinkauf, H. und von Döhren, H. (1990) Nonribosomal biosynthesis of peptide antibiotics; *Eur. J. Biochem.*, **192**, 1-15.

Kleinkauf, H. und von Döhren, H. (1996) A nonribosomal system of peptide biosynthesis; *Eur. J. Biochem.*, **236**, 335-351.

Konradi, R., Billeter, M. und Wüthrich, K. (1996) MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures; *J. Mol. Graphics*, **14**, 51-55.

Konz, D. (1998) Identifizierung und Charakterisierung des Bacitracin Biosynthese-Operons aus *Bacillus licheniformis* ATCC 10716; *Dissertation*, Fachbereich Chemie; Philipps-Universität, Marburg.

Konz, D., Klens, A., Schörgendorfer, K. und Marahiel, M.A. (1997) The bacitracin biosynthesis operon of Bacillus licheniformis ATCC 10716: molecular characterization of three multi-modular peptide synthetases; *Chem. Biol.*, **4**, 927-937.

Konz, D. und Marahiel, M.A. (1999) How do peptide synthetases generate structural diversity?; *Chem. Biol.*, **6**, R39-48.

Lambalot, R.H., Gehring, A.M., Flugel, R.S., Zuber, P., LaCelle, M., Marahiel, M.A., Reid, R., Khosla, C. und Walsh, C.T. (1996) A new enzyme superfamily - the phosphopantetheinyl transferases; *Chem. Biol.*, **3**, 923-936.

Lemaster, D.M. (1994) Isotope labeling in solution protein assignment and structural analysis; *Progr. NMR Spect.*, **26**.

Lipmann, F. (1980) Bacterial production of antibiotic polypeptides by thiol-linked synthesis on protein templates; *Adv. Microb. Physiol.*, **21**, 227-266.

Lippens, G., Dhalluin, C. und Wieruszeski, J.M. (1995) Use of a water flip-back pulse in the homonuclear NOESY experiment; *J. Biomol. NMR*, **5**, 327-331.

Macintosh, L.P. und Dahlquist, F.W. (1990) Biosynthetic incorporation of ^{15}N and ^{13}C for assignment and interpretation of nuclear magnetic resonance spectra of proteins; *Q. Rev. Biophys.*, **23**, 1-38.

Marahiel, M.A. (1997) Protein templates for the biosynthesis of peptide antibiotics; *Chem. Biol.*, **4**, 561-567.

Marahiel, M.A., Stachelhaus, T. und Mootz, H.D. (1997) Modular peptide synthetases involved in non-ribosomal peptide synthesis.; *Chem. Rev.*, **97**, 2651-2673.

Marion, D., Driscoll, P.C., Kay, L.E., Wingfield, P.T., Bax, A., Gronenborn, A.M. und Clore, G.M. (1989a) Overcoming the overlap problem in the assignment of ^{1}H NMR spectra of larger proteins by use of three-dimensional heteronuclear ^{1}H-^{15}N Hartmann-Hahn-multiple quantum coherence and nuclear Overhauser- multiple quantum coherence spectroscopy: application to interleukin 1β; *Biochemistry*, **28**, 6150-6156.

Marion, D., Ikura, M., Tschudin, R. und Bax, A. (1989b) Rapid recording of 2D NMR-spectra without phase cycling - application to the study of hydrogen-exchange in proteins; *J. Magn. Reson.*, **85**, 393-399.

Marion, D., Kay, L.E., Sparks, S.W., Torchia, D.A. und Bax, A. (1989c) Three-dimensional heteronuclear NMR of ^{15}N labeled proteins; *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 1515-1517.

Markley, J.L., Horsley, W.J. und Klein, M.P. (1971) Spin-lattice relaxation measurements in slowly relaxing complex spectra; *J. Chem. Phys.*, **55**, 3604-3605.

Matsuo, H., Li, H., McGuire, A.M., Fletcher, C.M., Gingras, A.C., Sonenberg, N. und Wagner, G. (1997) Structure of translation factor eIF4E bound to m7GDP and interaction with 4E-binding protein; *Nat. Struct. Biol.*, **4**, 717-724.

Mofid, M.R. (1999) Die posttranslationale Modifikation von Peptidsynthetase Domänen durch 4'-Phosphopantetheinyl-Transferasen: Kristallisation der Sfp und Untersuchungen zur Aktivität; *Diplomarbeit*, Fachbereich Chemie; Philipps-Universität, Marburg.

Montelione, G.T. und Wagner, G. (1990) Triple resonance experiments for establishing conformation-independent sequential NMR assignments in isotope-enriched polypeptides; *J. Magn. Reson.*, **87**, 183-188.

Mootz, H.D. und Marahiel, M.A. (1997) The tyrocidine biosynthesis operon of *Bacillus brevis*: complete nucleotide sequence and biochemical characterization of functional internal adenylation domains; *J. Bacteriol.*, **179**, 6843-6850.

Mori, S., Abeygunawardana, C., Johnson, M.O. und vanZijl, P. (1996) Improved sensitivity of HSQC spectra of exchanging protons at short interscan delays using a new fast HSQC (FHSQC) detection scheme that avoids water saturation (vol 108, pg 94, 1995); *J. Magn. Reson. Ser. B*, **110**, 321-321.

Mori, S., Abeygunawardana, C., Johnson, M.O. und Vanzijl, P.C.M. (1995) Improved sensitivity of HSQC spectra of exchanging protons at short interscan delays using a new fast HSQC (FHSQC) detection scheme that avoids water saturation; *J. Magn. Reson. Ser. B*, **108**, 94-98.

Morris, G.M., Goodsell, D.S., Halliday, R.S., Huey, R., Hart, W.E., Belew, R.K. und Olson, A.J. (1998) Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function; *J. Computational Chemistry*, **19**, 1639-1662.

Muhandiram, D.R., Farrow, N.A., Xu, G.Y., Smallcombe, S.H. und Kay, L.E. (1993) A gradient ^{13}C NOESY-HSQC experiment for recording NOESY spectra of ^{13}C-labeled proteins dissolved in H_2O; *J. Magn. Reson. Ser. B*, **102**, 317-321.

Nicholls, A., Sharp, K.A. und Honig, B. (1991) Protein folding and association: insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons; *Proteins*, **11**, 281-296.

Nishio, C., Komura, S. und Kurahashi, K. (1983) Peptide antibiotic subtilin is synthesized via precursor proteins; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **116**, 751-758.

Perham, R.N. (1991) Domains, motifs, and linkers in 2-oxo acid dehydrogenase multienzyme complexes: a paradigm in the design of a multifunctional protein; *Biochemistry*, **30**, 8501-8512.

Quadri, L.E., Weinreb, P.H., Lei, M., Nakano, M.M., Zuber, P. und Walsh, C.T. (1998) Characterization of Sfp, a *Bacillus subtilis* phosphopantetheinyl transferase for peptidyl carrier protein domains in peptide synthetases; *Biochemistry*, **37**, 1585-1595.

Ramachandran, G.N. und Sasisekharan, V. (1968) Conformation of polypeptides and proteins; *Adv Protein Chem*, **23**, 283-438.

Reuter, K., Mofid, M.R., Marahiel, M.A. und Ficner, R. (1999) Crystal structure of the surfactin synthetase-activating enzyme Sfp: a prototype of the 4'-phosphopantetheinyl transferase superfamily; *Embo J.*, **18**, 6823-6831.

Roberts, E.L., Shu, N., Howard, M.J., Broadhurst, R.W., Chapman-Smith, A., Wallace, J.C., Morris, T., Cronan, J.E., Jr. und Perham, R.N. (1999) Solution structures of apo and holo biotinyl domains from acetyl coenzyme A carboxylase of *Escherichia coli* determined by triple-resonance nuclear magnetic resonance spectroscopy; *Biochemistry*, **38**, 5045-5053.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.

Schägger, H. und von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa; *Anal. Biochem.*, **166**, 368-379.

Schlumbohm, W., Stein, T., Ullrich, C., Vater, J., Krause, M., Marahiel, M.A., Kruft, V. und Wittmann-Liebold, B. (1991) An active serine is involved in covalent substrate amino acid binding at each reaction center of gramicidin S synthetase; *J. Biol. Chem.*, **266**, 23135-23141.

Schlumbohm, W., Vater, J. und Kleinkauf, H. (1985) Reactive sulfhydryl groups involved in the aminoacyl adenylate activation reactions of the gramicidin S synthetase 2; *Biol. Chem. Hoppe Seyler*, **366**, 925-930.

Shaka, A.J., Lee, C.J. und Pines, A. (1988) Iterative schemes for bilinear operators - application to spin decoupling; *J. Magn. Reson.*, **77**, 274-293.

Shan, X., Gardner, K.H., Muhandiram, D.R., Rao, N.S., Arrowsmith, C.H. und Kay, L.E. (1996) Assignment of ^{15}N, ^{13}Cα, ^{13}Cβ, and HN resonances in an ^{15}N, ^{13}C, ^{2}H labeled 64 kDa trp repressor-operator complex using triple-resonance NMR spectroscopy and ^{2}H decoupling; *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 6570-6579.

Sklenár, V., Piotto, M., Leppik, R. und Saudek, V. (1993) Gradient-tailored water suppression for ^{1}H^{15}N HSQC experiments optimized to retain full sensitivity; *J. Magn. Reson. Ser. A*, **102**, 241-245.

Snyder, G.H., Rowan, R.d., Karplus, S. und Sykes, B.D. (1975) Complete tyrosine assignments in the high field 1H nuclear magnetic resonance spectrum of the bovine pancreatic trypsin inhibitor; *Biochemistry*, **14**, 3765-3777.

Sørensen, O.W., Eich, G.W., Levitt, M.H., Bodenhausen, G. und Ernst, R.R. (1983) Product operator formalism for the description of NMR pulse experiments; *Progr. NMR Spectroscopy*, **16**, 163-192.

Stachelhaus, T., Hüser, A. und Marahiel, M.A. (1996) Biochemical characterization of peptidyl carrier protein (PCP), the thiolation domain of multifunctional peptide synthetases; *Chem. Biol.*, **3**, 913-921.

Stachelhaus, T. und Marahiel, M.A. (1995) Modular structure of peptide synthetases revealed by dissection of the multifunctional enzyme GrsA; *J. Biol. Chem.*, **270**, 6163-6169.

Stachelhaus, T., Mootz, H.D., Bergendahl, V. und Marahiel, M.A. (1998) Peptide bond formation in nonribosomal peptide biosynthesis. Catalytic role of the condensation domain; *J. Biol. Chem.*, **273**, 22773-22781.

Stachelhaus, T., Mootz, H.D. und Marahiel, M.A. (1999) The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases; *Chem. Biol.*, **6**, 493-505.

Stein, T., Vater, J., Kruft, V., Otto, A., Wittmann-Liebold, B., Franke, P., Panico, M., McDowell, R. und Morris, H.R. (1996) The multiple carrier model of nonribosomal peptide biosynthesis at modular multienzymatic templates; *J. Biol. Chem.*, **271**, 15428-15435.

Stein, T., Vater, J., Kruft, V., Wittmann-Liebold, B., Franke, P., Panico, M., Mc Dowell, R. und Morris, H.R. (1994) Detection of 4'-phosphopantetheine at the thioester binding site for L- valine of gramicidinS synthetase 2; *FEBS Lett.*, **340**, 39-44.

Strohl, W.R. (1997) Biotechnology of antibiotics; Marcel Decker, Inc., New York, USA.

Sutcliffe, J.G. (1979) Complete nucleotide sequence of the Escherichia coli plasmid pBR322; *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **43**, 77-90.

Talluri, S. und Wagner, G. (1996) An optimized 3D NOESY-HSQC; *J. Magn. Reson. Ser. B*, **112**, 200-205.

Tessari, M., Mulder, F.A.A., Boelens, R. und Vuister, G.W. (1997) Determination of amide proton CSA in ^{15}N-labeled proteins using ^{1}H CSA/^{15}N-^{1}H dipolar and ^{15}N CSA/^{15}N-^{1}H dipolar cross-correlation rates; *J. Magn. Reson.*, **127**, 128-133.

Turgay, K., Krause, M. und Marahiel, M.A. (1992) Four homologous domains in the primary structure of GrsB are related to domains in a superfamily of adenylate-forming enzymes; *Mol. Microbiol.*, **6**, 2743-2744.

Vater, J., Mallow, N., Gerhardt, S., Gadow, A. und Kleinkauf, H. (1985) Gramicidin S synthetase. Temperature dependence and thermodynamic parameters of substrate amino acid activation reactions; *Biochemistry*, **24**, 2022-2027.

von Döhren, H., Keller, U., Vater, J. und Zocher, R. (1997) Multifunctional peptide synthetases; *Chem. Rev.*, **97**, 2675-2705.

von Döhren, H. und Kleinkauf, H. (1997) Products of secondary metabolism; VCH-Verlagsgesellschaft, Weinheim.

Vuister, G.W. und Bax, A. (1993) Quantitative J correlation - a new approach for measuring homonuclear 3-bond J($H^N H^\alpha$) coupling-constants in ^{15}N- enriched proteins; *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 7772-7777.

Wagner, G. (1980) Activation volumes for the rotational motion of interior aromatic rings in globular proteins determined by high resolution ^{1}H NMR at variable pressure; *FEBS Lett.*, **112**, 280-284.

Wagner, G. (1997) An account of NMR in structural biology; *Nat. Struct. Biol.*, **4 Suppl**, 841-844.

Wagner, G., Hyberts, S.G. und Havel, T.F. (1992) NMR structure determination in solution and comparison with X-ray crystallography; *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **21**, 167-198.

Wakil, S.J. (1989) Fatty acid synthase, a proficient multifunctional enzyme; *Biochemistry*, **28**, 4523-4530.

Weinreb, P.H., Quadri, L.E., Walsh, C.T. und Zuber, P. (1998) Stoichiometry and specificity of in vitro phosphopantetheinylation and aminoacylation of the valine-activating module of surfactin synthetase; *Biochemistry*, **37**, 1575-1584.

Wüthrich, K. (1986) NMR of proteins and nucleic acids; Wiley, New York.

Wüthrich, K. (1998) The second decade-into the third millenium; *Nat. Struct. Biol.*, **5 Suppl**, 492-495.

Wüthrich, K. und Wagner, G. (1975) NMR investigations of the dynamics of the aromatic amino acid residues in the basic pancreatic trypsin inhibitor; *FEBS Lett.*, **50**, 265-268.
Yao, X., Wei, D., Soden, C., Jr., Summers, M.F. und Beckett, D. (1997) Structure of the carboxy-terminal fragment of the apo-biotin carboxyl carrier subunit of Escherichia coli acetyl-CoA carboxylase; *Biochemistry*, **36**, 15089-15100.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. M. A. Marahiel danke ich für ein interessantes Arbeitsthema, die Möglichkeit, außerhalb der Arbeitsgruppe eine neue Technik kennenzulernen, die Betreuung der Arbeit und viele damit verbundene anregende Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. T. Carell und Frau Dr. Geschwind gilt mein Dank für die Begutachtung dieser Arbeit.

Dr. T. A. Holak danke ich für die Ermöglichung mehrerer Aufenthalte in seiner Arbeitsgruppe im Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried. Mein Dank geht an die gesamte Arbeitsgruppe, besonders an Roland Baumgartner und Christian Renner, deren gute Zusammenarbeit und stete Bereitschaft zu Diskussionen und Hilfe wesentlich zu dieser Arbeit beigetragen haben.

Allen Mitgliedern des Marburger Arbeitskreises möchte ich für eine angenehme Arbeitsatmosphäre, hilfreiche Diskussionen und gute Zusammenarbeit danken. Henning Mootz und Martin Hahn danke ich für die Durchsicht des Manuskripts und viele Anregungen. Sascha Dökel sei für die Bereitstellung des Expressionssystems und bereichernde Gespräche rund um PCPs gedankt. Mein Dank geht auch an Mohammad Reza Mofid, der bei den Assays mit Rat und Tat geholfen hat, und an Gabi Schimpff-Weiland und Inge Schüler für technische Hilfen, die die Arbeit erleichtert haben.

In unserem Labor 4716 haben Daniel Winkelmann, Andrea Klens, Petra Ziegler, Dirk Konz, Wolfgang Klein, Oliver Fischer und Jörg Tost durch Hilfsbereitschaft, eine gute Atmosphäre und zahlreiche Diskussionen meinen Dank verdient.

Birgit Hippler, Ulrike Giesübel und Thomas Christ danke ich für die angenehmen gemeinsamen Studienjahre.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir das Studium ermöglicht haben und auf deren Hilfe und Unterstützung ich mich stets verlassen konnte.

Besonderer Dank gilt meiner Frau Stefanie für ihre liebevolle Geduld und Hilfe, ohne die das Arbeiten in den letzten drei Jahren nicht denkbar gewesen wäre.