

NMR-spektroskopische Untersuchungen des an Cph1-, Agp1-gebundenen und des freien Chromophors zur Aufklärung des Phytochrom Photozyklus

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Diplom-Chemiker

Marco Röben

aus Bremen

Berlin, November 2011

Diese Arbeit wurde im Zeitraum zwischen November 2006 und September 2011 am Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP) in der Arbeitsgruppe von Dr. Peter Schmieder unter der Betreuung von Prof. Dr. Hartmut Oschkinat angefertigt.

1. Gutachter Prof. Dr. Hartmut Oschkinat
AG NMR-unterstützte Strukturforschung
Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP)
Robert-Rössle-Str. 10
13125 Berlin
2. Gutachter Prof. Dr. Robert Bittl
Freie Universität Berlin
Arnimallee 14
14195 Berlin-Dahlem

Tag der Disputation: 09.03.2012

»Die Wissenschaft fängt eigentlich erst da an interessant zu werden, wo sie aufhört.«

Justus von Liebig, aus »Chemische Briefe«

Diese Arbeit wurde mit Hilfe von KOMA-Script und L^AT_EX gesetzt.

Danksagung

Der Erfolg einer Arbeit wie diese ist ohne die Hilfe und Unterstützung vieler Personen nicht denkbar. Deshalb möchte ich an dieser Stelle allen meinen Dank aussprechen, die mich während meiner Zeit am FMP dabei begleitet haben.

Dr. Peter Schmieder gilt mein besonderer Dank für seine Betreuung während der Promotion und für die Beantwortung zahlreicher Fragen zur NMR-Spektroskopie. Ohne seine stetige Unterstützung wäre diese Arbeit kaum möglich gewesen.

Prof. Dr. Hartmut Oschkinat danke ich für die Unterstützung während der Promotion und der Aufnahme in seinem Arbeitskreis.

Prof. Dr. Robert Bittl möchte ich für die Übernahme des Koreferates danken.

Prof. Dr. Jon Hughes danke ich für die Einführung in die Welt der Phytochrome, für viele interessante Diskussion und für die Bereitstellung von isotope-markiertem PCB, wenn meine Cyano-Kulturen mal wieder nicht so wollten, wie ich. An dieser Stelle muss ich ebenso Tina Lang, aus seinem Arbeitskreis, meinen Dank aussprechen für die Hilfe und Unterstützung bei der Etablierung der Aufarbeitungsmethode von PCB.

Dr. Ronald Kühne danke ich für die Erstellung des Homologiemodells und für die Bereitstellung seines Know-Hows zu Proteinstrukturen.

Prof. Dr. Tilman Lamparter danke ich für die Bereitstellung der Phytochrom Mutanten.

Dr. Janina Hahn danke ich für die Starthilfe in den biologischen und biochemischen Teil dieser Arbeit. Ohne Dich hätte ich es als Chemiker wesentlich schwerer gehabt, mich mit den Cyanobakterien anzufreunden. Vor allem hat mir die zügige und detaillierte Korrektur meiner Arbeit sehr geholfen. Nochmals Danke dafür.

Monika Beerbaum danke ich für ihre stetige Hilfe an den Spektrometern.

Matthias Dorn danke ich für die diskussionsreichen Pausen und für das ein oder andere spannende Tischtennismatch, um den Kopf wieder frei zu bekommen, wenn man die NMR-Signale vor lauter farbigen Flecken auf dem Monitor nicht mehr gesehen hat.

Ebenso danke ich allen meinen Kollegen in meinem Büro, vor allem Barth, Stefan M., Shakeel und Stefan J. die für eine fantastische Arbeitsatmosphäre gesorgt haben. Man konnte mit Euch nicht nur über fachliche Themen reden, sondern auch so manches nettes BBQ am Institut verbringen.

Britta, vielen Dank, dass Du das kleine Missgeschick im Labor so gut weg gesteckt hast und sogar beim Aufräumen geholfen hast.

Meinen Eltern gilt mein Dank für ihre ständige Unterstützung während meiner Promotion. Es ist gut zu wissen, dass man sich immer auf Euch verlassen kann.

Katharina Koschek danke ich für die ständige moralische, aber auch fachliche Unterstützung. Danke, dass Du immer für mich da warst und nie an dem Erfolg dieser Arbeit gezweifelt hast.

Zu guter Letzt danke ich allen Mitarbeitern am FMP, speziell in der AG Schmieder und AG Oschkinat, für die schöne Zeit. Ich habe viele neue Freunde gewonnen und es ist an dieser Stelle einfach nicht möglich, jeden in einem angemessenen Umfang zu verewigen.

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	1
1. Zielsetzung der Arbeit	3
2. Kernresonanzspektroskopie	7
2.1. Theoretische Grundlagen	7
2.2. Aufnahme von NMR-Spektren	10
2.2.1. Selektive Pulse	10
2.2.2. Adiabatische Pulse	12
2.2.3. Kreuzkorrelierte Relaxation	13
3. Phytochrome	17
3.1. Struktur und Funktion	17
3.1.1. Chromophor	18
3.1.2. Photozyklus	19
3.1.3. Proteinstruktur	21
3.2. Cyanobakteriochrome	25
II. Material und Methoden	27
4. Isolierung des freien Chromophors	29
4.1. <i>Synechocystis sp.</i> PCC6803 Zellkultur	29
4.2. Zellernte	30
4.3. Aufreinigung des Chromophors	30
4.3.1. Methanolyse	30
4.3.2. Festphasenextraktion	31
4.3.3. HPLC-Reinigung	31
4.4. Präparation von unmarkiertem PCB	31
5. NMR-Spektroskopie	33
5.1. NMR-Spektrometer	33
5.2. Probenpräparation	33
5.2.1. freier Chromophor	33

5.2.2. Proteinproben	33
5.3. NMR-Experimente	34
5.3.1. Experimente ohne Lösungsmittelunterdrückung	34
5.3.2. Experimente mit Lösungsmittelunterdrückung	38
5.3.3. Protein-NMR-Experimente	40
III. Ergebnisse und Diskussion	43
6. Zuordnung von PCB in Lösung mittels Tripelresonanzspektren	45
6.1. Lösungsmittelsystem	45
6.1.1. Hexamethylphosphorsäuretriamid (HMPT)	45
6.1.2. DMSO und Methanol	46
6.1.3. Protonierungszustand des Phycocyanobilins	47
6.2. Zuordnungsstrategie mittels Tripelresonanzspektren	47
6.2.1. Isolierung von hochreinem Phycocyanobilin	47
6.2.2. Unmarkierter Chromophor	47
6.2.3. Isotopenmarkierter Chromophor	48
6.2.4. Experimente mit Lösungsmittelunterdrückung	53
7. Konformationelle Analyse von PCB in Lösung	55
7.1. Nomenklatur	55
7.2. Spektroskopische Untersuchungen	57
7.2.1. UV/VIS Spektroskopie	57
7.2.2. Skalare Kopplungen	58
7.2.3. RDC-Messungen	58
7.2.4. NOE-Wechselwirkungen	59
7.2.5. Kreuzkorrelierte Relaxationsmessungen	62
7.2.6. PCB in anderen Lösungsmitteln	71
7.3. Diskussion	72
8. Chromophordynamik in der Bindungstasche	75
8.1. NMR-Spektroskopie	75
8.2. Ergebnisse und Diskussion	76
9. Chromophor-Protein Interaktion	81
9.1. Interaktionen in Cph1	82
9.1.1. Probenvorbereitung	82
9.1.2. NMR-Spektroskopie	82
9.1.3. Cph1-P _{fr} -Homologiemodell	85
9.1.4. Diskussion	86

9.2. Interaktionen in Agp1	89
9.2.1. Probenvorbereitung	89
9.2.2. NMR-Spektroskopie	89
9.2.3. Diskussion	91
9.3. Vergleich der Interaktionen im Cph1 und Agp1	93
9.4. Vergleich der Ergebnisse mit Festkörper NMR-Spektren	94
10. Zusammenfassung	97
11. Abstract	101
Literatur	103
IV. Anhang	117
A. Zuordnung von Phycocyanobilin	119
A.1. PCB in HMPT	119
A.2. PCB in Methanol	120
A.3. PCB in DMSO	121
B. Pulsprogramme	123
B.1. HNC	123
B.2. HNCRELAY	124
B.3. HNCRELAY.MQ	125
B.4. HNC-11ECHO	126
B.5. HNCRELAY-11ECHO	128
B.6. HNCRELAY-11ECHO.MQ	129
B.7. HCC	130
B.8. CH3AROM	131
B.9. HNCA_PCB	132
B.10. HNCA_PCB.CT	133
B.11. HNCOCA_PCB	134
B.12. HNCOCA_PCB.CT	135
B.13. HNCOCA_PCB.CTDQ	136
B.14. HNCOCA_PCB.CTZQ	137
B.15. HNCOCA_PCB11ECHO	139
B.16. HNCOCA_PCB11ECHO.CT	140
B.17. HNCOCA_PCB11ECHO.CTZQ	141
C. Sequenzalignment	143

D. CNSsolve Topologie- und Parametersätze	145
D.1. Topologiesatz für PCB	145
D.2. Parametersatz für PCB	150

Abbildungsverzeichnis

2.1.	Amplitudenprofile einiger selektiven Pulse. a) Gauß Puls Kaskade Q5, b) Gauß Puls Kaskade Q3	11
2.2.	Darstellung der Wirkung eines adiabatischen Pulses im frequenzmodulierten Koordinatensystem.	13
2.3.	Winkel θ zwischen den C–H-Bindungsvektoren. b) Energiediagramm für die vier Spinzuständen $\alpha\alpha$, $\alpha\beta$, $\beta\alpha$ sowie $\beta\beta$	16
3.1.	Vereinfachte Phytochrom Domänen Struktur, der Phy, Cph1, BphP, und FphP.	18
3.2.	Strukturen der Chromophore der verschiedenen Phytochrome. (a) Phycocyanobilin (PCB) und Phytochromobilin (PΦB) (b) Biliverdin (BV) . .	19
3.3.	a) Schematische Darstellung des Phytochrom Photozyklus. b) Strukturformeln von PCB in den beiden photostationären Zuständen.	20
3.4.	Kristallstruktur des photosensorischen Moduls Cph1 aus <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803 (PDB Code: 2VEA).	22
3.5.	a) Kristallstruktur des bakteriellen Phytochrom PaBphP b) Der Chromophor PCB in der Bindungstasche vom Cph1.	23
6.1.	Strukturformel von Hexamethylphosphorsäuretriamid (HMPT).	46
6.2.	^{13}C -HMQC- und ^{15}N -HMQC-Spektrum von PCB.	48
6.3.	Pulssequenzen für die Zuordnung von PCB. a) HNC- und HNCRELAY b) HCC	49
6.4.	Spektren der Tripelresonanzspektren zur Zuordnung von PCB. a) HNC b) HNCRELAY c) HCC	50
6.5.	2D-INADEQUATE des ^{13}C uniform-markierten PCB.	52
6.6.	Pulssequenzen für das HNC- als auch HNCRELAY-Experiment inklusive einer 1-1-ECHO-Wasserunterdrückung.	54
7.1.	a) Syn-anti Terminologie zur Beschreibung verschiedener konformationeller Regionen. b) Strukturformel von PCB frei in Lösung. c) Zwei mögliche Konformationen an der Einfachbindung der Methinbrücke zwischen Ring C und D.	56
7.2.	UV/VIS-Spektren von PCB in HMPT mit und ohne <i>p</i> -TsOH	58
7.3.	HSQC-NOESY von $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -markiertem PCB in d_{18} -HMPT.	60
7.4.	$^1\text{H}, ^1\text{H}$ -NOESY von unmarkiertem PCB in d_{18} -HMPT.	62

7.5. Pulssequenz zu Messung der kreuzkorrelierten Relaxationen im PCB.	63
7.6. Spektren zur Messung der kreuzkorrelierten Kopplungen an $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ - PCB in d_{18} -HMPT.	66
7.7. Strukturen von PCB in HMPT, welche sich aus den vier aus den kreuzkorrelierten Kopplungen berechneten Winkeln ergeben.	70
7.8. Modell der Konformation vom PCB in einer Lösung von HMPT auf Basis der NOE-Wechselwirkungen zwischen den Pyrrolprotonen.	73
8.1. Projektionen von $^1\text{H},^{15}\text{N}$ Korrelationen von PCB. a) PCB in HMPT, b) PCB in Phycocyanin, c) PCB in der P_r -Form von Cph1.	77
8.2. Projektionen der Signale der Methinbrückenprotonen H5, H10 und H15 von den Chromophoren PCB und BV in verschiedenen chemischen Umgebungen.	79
9.1. Ausschnitt aus dem Protonenspektrum vom $^2\text{D}^{15}\text{N}$ -Cph1 Δ 2 in H_2O mit unmarkiertem PCB.	83
9.2. Zweidimensionale Spektren von Cph1 in der P_r - (links) und der P_{fr} - Form (rechts).	84
9.3. NOE-Interaktionen zwischen PCB und der Chromophorbindungstasche des Cph1 a) P_r -Form b) P_{fr} -Form	87
9.4. 2D-NOESY Spektrum von Agp1-M15-C20A in der P_r -Form, aufgenom- men in D_2O	90
9.5. ^{15}N -HMQC vom ^{15}N uniform markiertem Agp1-M15-C20A und 2D- NOESY vom unmarkiertem Agp1-M15-C20A.	92
9.6. NOE-Wechselwirkungen im bakteriellen Phytochrom Agp1.	93

Tabellenverzeichnis

4.1. Zusammensetzung des für die Anzucht von isotopenmarkiertem PCB modifiziertem BG11-Mediums. ^[63] Alle Angaben sind Millimolar oder entsprechend gekennzeichnet.	30
7.1. Doppel- (DQ) und Nullquantenfrequenzen (ZQ) der Pyrrolstickstoffe und der Methinbrückenkohlenstoffe mit den entsprechenden relativen Intensitäten der 4 Signale.	65
7.2. Relaxationsraten $\Gamma_{N,C}^c$ (s^{-1}) mit den daraus berechneten Winkeln in Grad aus den gemessenen Intensitäten der DQ- und ZQ-Spektren. Aufgrund der großen negativen Relaxationsrate der ZQ-Korrelation von N23C15 konnten keine Werte für den Winkel Θ bestimmt werden.	69
7.3. Relaxationsraten $\Gamma_{N,C}^c$ (s^{-1}) mit den daraus berechneten Winkeln in Grad aus den gemessenen Intensitäten der DQ- und ZQ-Spektren von PCB in DMSO. Für die Korrelationen N22C5 konnten keine Signale im Spektrum detektiert werden.	71
A.1. Chemische Verschiebungen des Chromophors Phycocyanobilin gelöst in HMPT. Die Protonierung aller vier Pyrrolstickstoffe wurde durch die Zugabe einer geringen Menge <i>p</i> -TsOH sichergestellt.	119
A.2. Chemische Verschiebungen des Chromophors Phycocyanobilin gelöst in Methanol. Die Protonierung aller vier Pyrrolstickstoffe wurde durch die Zugabe einer geringen Menge <i>p</i> -TsOH sichergestellt.	120
A.3. Chemische Verschiebungen des Chromophors Phycocyanobilin gelöst in DMSO. Die Protonierung aller vier Pyrrolstickstoffe wurde durch die Zugabe einer geringen Menge <i>p</i> -TsOH sichergestellt.	121

Abkürzungsverzeichnis

Da in der wissenschaftlichen Literatur häufig nur der englische Ausdruck für bestimmte Akronyme geläufig ist, wird dieser zuerst genannt. Wenn möglich ist dahinter die deutsche Übersetzung angegeben.

ACN	Acetonitril
Agp1	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> Phytochrom 1
ARNT	<i>aromatic hydrocarbon receptor nuclear translocator</i>
BLUF	<i>blue-light sensors using flavin adenine dinucleotide</i>
BphP	bakterielles Phytochrom
BV	Biliverdin
B_0	Stärke des externen Magnetfeldes
B_1	Magnetfeldstärke der eingestrahlten Radiofrequenz
B_{lokal}	lokales Magnetfeld, z. B. eines Kernes
B_{eff}	effektives magnetisches Feld
CBCR	Cyanobakteriochrome
CBD	Chromophorbindungs Domäne
CCR	Kreuzkorrelierte Relaxation (<i>Cross Correlated Relaxation</i>)
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
Cph1	cyanobakterielles Phytochrom 1
Cph2	cyanobakterielles Phytochrom 2
CSA	<i>chemical shift anisotropie</i>
DAD	Diodenarraydetektor
DMSO	Dimethylsulfoxid
DQ	Doppelquanten
DrBphP	<i>Deinococcus radiodurans</i> Phytochrom
DSS	2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonsäure
δ	chemische Verschiebung
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Fh1A	<i>formate hydrogen lyase transcription activator</i>
FID	<i>free induction decay</i>

FMN	Flavinmononucleotid
Fph	Phytochrom aus Pilzen
GAF	cGMP <i>phosphodiesterase, adenylate cyclase, Fh1A</i>
GPC	Gelpermeationschromatographie
Γ^C	Relaxationsrate der kreuzkorrelierten Relaxation
HCC	2D-NMR Spektrum zur Korrelation der Methylgruppenprotonen und Pyrrolkohlenstoffe
HKRD	<i>histidine-kinase-related domain</i>
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence
HMPT	Hexamethylphosphorsäuretriamid
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HNC	2D-NMR-Spektrum zur Korrelation der Pyrrol-NH-Gruppen mit den benachbarten Kohlenstoffkernen
HNCA	3D-Experiment zur sequentiellen Zuordnung einer Aminosäuresequenz
HNCOCA	3D-Experiment zur sequentiellen Zuordnung einer Aminosäuresequenz
HNCOCA_PCB	2D-Experiment zur Aufnahme der kreuzkorrelierten Kopplungen am PCB
HNCRELAY	2D-NMR-Spektrum zur Weitbereichskorrelation der Pyrrol-NH-Gruppen mit den benachbarten Kohlenstoffkernen
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
γ	gyromagnetisches Verhältnis
I	Kernspinquantenzahl
IFP	infrarotfluoreszierendes Protein
INADEQUATE	<i>Incredible Natural Abundance Double Quantum Transfer Experiment</i>
INEPT	<i>Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
k	Plancksches Wirkungsquantum ($6,626 \cdot 10^{43}$ J s)
LOV	<i>Light-Oxygen-Voltage</i>
μ	magnetisches Moment
m_I	magnetische Quantenzahl des Drehimpulses

NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i> , Kernspinresonanzspektroskopie
NOE	<i>Nuclear Overhauser Effect</i> , Kern Overhauser Effekt
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
ν_L	Larmor-Frequenz
ω_0	eingestrahlte Frequenz
ω	Resonanzfrequenz eines isolierten Spins
ω_{RF}	Frequenzmodulation
PaBphP	<i>PPseudomonas aeruginosa</i> Phytochrom
PAS	PER, ARNT <i>and</i> SIM
PCB	Phycocyanobilin
PDB	<i>Protein Database</i>
PER	<i>period circadian protein</i>
PES	Polyethersulfon
P_{fr}	Dunkelrotlicht absorbierende Form des Phytochroms
Phy	pflanzliches Phytochrom
PHY	<i>phytochromespecific GAF-related</i>
PTFE	Polytetrafluorethylen
P_r	Rotlicht absorbierende Form des Phytochroms
<i>p</i> -TsOH	<i>para</i> -Toluolsulfonsäure
P Φ B	Phytochromobilin
<i>P</i>	Kern- oder Eigendrehimpuls
RDC	Restliche Dipolare Kopplung (<i>residual dipolar coupling</i>)
RP	<i>reversed phase</i> , Umkehrphase
RpBphP2	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> Phytochrom 2
RpBphP3	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> Phytochrom 3
SIM	<i>single minded protein</i>
S/N	Signal zu Rausch-Verhältnis
SPE	<i>solid phase extraction</i> , Festphasenextraktion
TMS	Tetramethylsilan
τ_p	Pulslänge
UV/VIS	Ultravioletter und sichtbarer (<i>visible</i>) Bereich der elektromagnetischen Wellen
ZQ	Nullquanten

Teil I.

Einleitung

1. Zielsetzung der Arbeit

Phytochrome kommen als Rotlichtrezeptoren sowohl in Pflanzen, Bakterien und Pilzen vor und können z. B. Einfluss auf die Photomorphogenese nehmen. Verschiedene Lichtverhältnisse detektieren sie durch einen noch nicht vollständig verstandenen Photozyklus.

Der Phytochrom-Photozyklus besitzt zwei stabile Zustände P_r und P_{fr} . Beide Zustände zeichnen sich durch spezifische Absorptionsmaxima im roten bzw. in dunkelroten Bereich des sichtbaren Spektrums aus. Konstitution und Konformation des verwendeten Chromophors bestimmen dabei die genauen spektroskopischen Eigenschaften des Proteins. Als Chromophor wird in cyanobakteriellen Phytochromen Phycocyanobilin (PCB) und in bakteriellen Phytochromen Biliverdin (BV) eingesetzt.

Während des Photozyklus, also beim Übergang von P_r zu P_{fr} und zurück, kommt es zu einer Z/E-Isomerisierung der Doppelbindung an Position C15 im Chromophor. Diese konformationelle Veränderung ermöglicht es Phytochromen, verschiedene Lichtverhältnisse zu detektieren.

Grundlegende strukturelle Informationen über die Phytochrome und den Protein gebundenen Chromophor wurden erst in den letzten Jahren durch die Röntgenkristallographie geliefert. Die Röntgenkristallstruktur des bakteriellen Phytochroms *Deinococcus radiodurans* (DrBphP) lieferte erstmals Informationen über die Struktur und Konformation des Chromophors innerhalb der Bindungstasche, als auch der Bindungstasche selbst.^[1] Während das von Wagner *et al.* verwendete Konstrukt durch das Fehlen der PHY-Domäne photoinaktiv war, so konnte erst drei Jahre später eine Kristallstruktur einer vollständigen lichtsensitiven Einheit eines Phytochroms (Cph1 aus *Synechocystis sp.*) vorgestellt werden.^[2] Noch im selben Jahr erschien die Kristallstruktur des bakteriellen Phytochroms PaBphP aus *Pseudomonas aeruginosa*.^[3] Alle Kristallstrukturen wurden in den jeweiligen Grundzuständen der Phytochrome bestimmt. Im DrBphP und im Cph1 ist dies die P_r - im PaBphP die P_{fr} -Form.

Allerdings sind die genauen Veränderungen der Interaktionen zwischen dem Chromophor und dem Protein während der Z/E-Isomerisierung trotz der vorliegenden Kristallstrukturen nicht vollständig verstanden. Ziel der aktuellen Forschung ist es, die durch den Photozyklus hervorgerufenen strukturellen Veränderungen zu erfassen und die daraus resultierenden Konsequenzen bis hin zur Auslösung der Signaltransduktionskaskade zu beschreiben. Für die Beantwortung dieser Fragen sind detaillierte Kenntnisse über die Konformation des Chromophors in den verschiedenen Zuständen des Proteins, dessen Mobilität in der Bindungstasche und dem Protonierungszustand des Chromophors als auch der Aminosäuren in der direkten Nachbarschaft nötig.

Das Ziel der Arbeit ist daher zum einen die Bestimmung der Konformation des ungebundenen Chromophor PCB in einem organischen Lösungsmittel und zum anderen sollen PCB als auch BV im proteinogenen Umfeld betrachtet werden. Hierbei liegt der Fokus auf der Mobilität der Chromophore in der Bindungstasche und auf der Detektion der dabei auftretenden Wasserstoffbrückenbindungen.

Der Chromophor PCB in Lösung

Zunächst soll der Chromophor PCB gelöst in einem organischen Lösungsmittel betrachtet werden. Das Ziel ist es, mit Hilfe der NMR-Spektroskopie, die Konformation von PCB in Lösung zu bestimmen. Gelingt es Rückschlüsse über die Veränderung der chemischen Verschiebungen vom PCB mit der Konformation zu erhalten, so könnten diese später auf das proteingebundene PCB übertragen werden.

Als Lösungsmittel sollen Hexamethylphosphorsäuretriamid (HMPT), Dimethylsulfoxid (DMSO), sowie Methanol eingesetzt werden. Während DMSO und Methanol gängige Lösungsmittel für die Aufnahme von NMR-Spektren sind, nimmt HMPT hier eine spezielle Rolle ein. HMPT soll durch seine speziellen chemischen Eigenschaften, wie zum Beispiel seinem außergewöhnlich hohen elektrischen Dipolmoment, die Konformation von PCB dahingehend beeinflussen, dass das PCB nicht mehr helikal, sondern in einer eher gestreckten Form in Lösung vorliegt.^[4] Dies würde die Konformation in Lösung an die Konformation von PCB innerhalb der Bindungstasche des Proteins annähern. Vor allem für die Übertragung der spektroskopischen Daten vom PCB in Lösung auf das proteingebundene PCB wäre dieser Punkt von äußerstem Interesse.

Für die Interpretation der NMR-Daten ist eine vollständige Zuordnung der in den Spektren vorkommenden Signalen nötig. Hierfür bestehen gängige Strategien, die bei kleinen organischen Molekülen auf Standardexperimenten wie COSY, HMQC und HMBC beruhen. Liegt das zu untersuchende Molekül, wie hier der Chromophor PCB, nur in sehr geringer Konzentration vor oder besitzt eine hohe Symmetrie, führen die klassischen Experimente nicht zur einer vollständigen Zuordnung, so dass eine alternative Strategie benötigt wird. Deshalb soll im Rahmen dieser Arbeit eine Zuordnungsstrategie, basierend auf Tripelresonanzspektren entworfen werden. Die dazu nötige Isotopenmarkierung wird durch die Anzucht einer Cyanobakterienkultur des Typs *Synechocystis sp. PCC6803* in einem entsprechendem Medium erreicht.

Die für die Zuordnung der Signale verwendeten Tripelresonanzexperimente sollen anschließend dahingehend erweitert werden, dass mit Ihnen die Aufnahme kreuzkorrelierter Relaxationsmessungen (*cross correlated relaxation*, CCR) möglich wird. Hierfür müssen Doppel- (DQ) oder Nullquantenspektren (ZQ) erzeugt werden, bei denen während der Evolutionszeit keine Protonenkopplung zugelassen wird. Die so im Spektrum auswertbare Kreuzkorrelation der *chemical shift anisotropy* (CSA) und der Dipol-Dipol-Wechselwirkung kann in einen Winkel zwischen zwei Bindungsvektoren

umgerechnet werden.^[5,6] Im PCB würden hierfür die N–H-Gruppe eines Pyrrolringes und die benachbarte C–H-Gruppe einer Methinbrücke in Frage kommen. Somit würde eine Bestimmung der Konformation des PCBs in Lösung mit hoher Präzision möglich sein.

Betrachtung von PCB und BV innerhalb der Bindungstasche

Mit Hilfe der NMR-Spektroskopie sollen strukturelle und dynamische Daten über den kovalent an das Phytochrom gebundenen Chromophor gewonnen werden. Als Modellsysteme sollen dafür das cyanobakterielle Phytochrom Cph1 aus *Synechocystis sp.* mit PCB und das bakterielle Phytochrom Agp1 aus dem *Agrobacterium tumefaciens* mit BV als Chromophor eingesetzt werden. Das Cph1 soll neben dem P_r-Grundzustand ebenfalls in seinem angeregten P_{fr}-Zustand untersucht werden. Im Agp1 ist der angeregte Zustand aufgrund der sehr kurzen Dunkelreversion NMR-spektroskopisch nicht zugänglich.

Durch die Verwendung bakterieller und cyanobakterieller Phytochrome können zwei kanonische Phytochromklassen miteinander verglichen werden für die der selbe Photozyklus postuliert wird, die sich aber dennoch im Detail, wie zum Beispiel in der unterschiedlichen Rate der Dunkelreversion, unterscheiden.

Informationen über die Mobilität der Chromophore innerhalb der Bindungstaschen sollen durch eine Auswertung der Linienbreiten der Methinbrückenprotonen an Position 5, 10 und 15, sowie der vier Pyrrolprotonen erfolgen. Für die Experimente zur Mobilität sollen zusätzlich zwei Punktmutanten der oben genannten Phytochrome, bei denen der Chromophor nicht mehr kovalent gebunden ist, eingesetzt werden. Zum einen die C259A-Mutante des Cph1 und zum anderen die C20A-Mutante des Agp1.

Die strukturellen Untersuchungen hinsichtlich der Detektion von Wasserstoffbrückenbindungen sollen aus einer Kombination von ¹⁵N-HMQC- und NOESY-Spektren erfolgen. Der Fokus liegt hierbei hauptsächlich auf den austauschbaren Protonen der Aminosäureseitenketten innerhalb der Bindungstasche. Vor allem die Tyrosine und die Histidine in direkter Nachbarschaft zum Chromophor sind hier von besonderem Interesse. Diese sind innerhalb der Phytochromklassen in der Proteinsequenz hoch konserviert und für einen funktionierenden Photozyklus von elementarer Bedeutung.

2. Kernresonanzspektroskopie

Die Grundlage der Kernresonanzspektroskopie wurde 1922 von Otto Stern¹ und Walther Gerlach² gelegt, als sie einen Strahl von Silberatomen durch ein Magnetfeld schickten und eine Teilung des Strahls in zwei diskrete Punkte beobachteten. Sie hatten die nach der Quantenmechanik vorhergesagte Quantelung des Elektronenspins bewiesen,^[7] wofür Stern 1943 den Physik-Nobelpreis erhielt. Isidor Isaac Rabi³ konnte 1930 die Ergebnisse des Stern-Gerlach Experimentes auf den Kernspin übertragen, indem er experimentell bewies, dass einer der Halbstrahlen verschwand, wenn man ihn mit einem elektromagnetischen Wechselfeld mit geeigneter Frequenz bestrahlte. Dafür wurde er 1944 ebenfalls mit dem Nobelpreis in Physik ausgezeichnet.

Felix Bloch⁴ und Edward Mills Purcell⁵ führten 1946 unabhängig voneinander die ersten NMR-Experimente durch. 1952 erhielten sie für ihre Arbeiten den Physik-Nobelpreis.

Nachdem man erkannte, dass chemische Verbindungen ein für sie charakteristisches NMR-Spektrum erzeugen, wurde NMR-Spektroskopie zu einer Standard-Methode der chemischen Strukturaufklärung. Vor allem die Arbeiten von Richard R. Ernst⁶ zur ein- und zweidimensionalen Fourier-Transformations-NMR-Spektroskopie, für die er 1991 den Nobelpreis für Chemie erhielt, trugen zum Erfolg dieser spektroskopischen Methode bei.

Kurt Wüthrich⁷ verwendete die zwei- und multidimensionale NMR Spektroskopie zur Aufklärung der Struktur von Proteinen und wurde 2002 ebenfalls mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet.

2.1. Theoretische Grundlagen

In der klassischen Vorstellung sind Atomkerne kugelsymmetrisch und führen eine Rotationsbewegung um ihre Kernachse aus. Diese Rotation wird als Drehimpuls- oder

¹Otto Stern, Physiker (* 17. Februar 1888 in Sohrau (Oberschlesien); † 17. August 1969 in Berkeley)

²Walther Gerlach, Physiker (* 1. August 1889 in Biebrich am Rhein; † 10. August 1979 in München)

³Isidor Isaac Rabi, Physiker (* 29. Juli 1898 in Rymanów, Polen, Galizien; † 11. Januar 1988 in New York)

⁴Felix Bloch, Physiker (* 23. Oktober 1905 in Zürich; † 10. September 1983 in Zürich)

⁵Edward Mills Purcell, Physiker (* 30. August 1912 in Taylorville, Illinois; † 7. März 1997 in Cambridge, Massachusetts)

⁶Richard Robert Ernst, Chemiker (* 14. August 1933 in Winterthur)

⁷Kurt Wüthrich, Chemiker (* 4. Oktober 1938 in Aarberg)

Kernspinquantenzahl I bezeichnet. Jeder Kern besitzt eine definierte Kernspinquantenzahl, aus der man mit Hilfe des Planckschen Wirkungsquantums h ($h = 6,6256 \cdot 10^{-34}$) den so genannten Kern- oder Eigendrehimpuls P berechnen kann.

$$P = h\sqrt{I(I+1)} \quad \text{mit } h = \frac{h}{2\pi} \quad (2.1)$$

Jeder Kern besitzt eine charakteristische Konstante, die die Nachweisempfindlichkeit eines Kernes bestimmt, das gyromagnetische Verhältnis γ . Aus dem gyromagnetischen Verhältnis und dem Eigendrehimpuls kann man das magnetische Moment μ eines Kernes berechnen.

$$\mu = \gamma \cdot P \quad (2.2)$$

Das magnetische Moment wie auch der Eigendrehimpuls sind vektorielle Größen. Setzt man in Gleichung 2.2 für den Eigendrehimpuls P aus Gleichung 2.1 ein, so erhält man:

$$\mu = \gamma\sqrt{I(I+1)}h \quad (2.3)$$

Aus dieser Formel wird ersichtlich, dass Kerne einen Eigendrehimpuls bzw. einen Kernspin $\neq 0$ besitzen müssen, damit sie in der NMR-Spektroskopie verwendet werden können. Die in der biologischen NMR-Spektroskopie verwendeten Kerne ^1H , ^{13}C und ^{15}N besitzen einen Kernspin von $1/2$ und sind dementsprechend NMR aktiv. Eine tabellarische Auflistung weiterer physikalischer Kenngrößen ist zum Beispiel dem Lehrbuch von H. Friebolin zu entnehmen.^[8]

Nach der Quantenmechanik ist der Eigendrehimpuls P der Kerne gequantelt. Die erlaubten Eigenwerte in z -Richtung eines kartesischen Koordinatensystems sind durch Gleichung 2.4 gegeben.

$$P_z = \hbar m_I \quad (2.4)$$

Hierbei ist m_I die magnetische Quantenzahl. Insgesamt kann es $2I+1$ Eigenwerte bzw. Energieniveaus geben. Es existiert somit ein direkter Zusammenhang mit dem Kernspin I .

$$m_I = I, I-1, I-2, \dots, -I \quad (2.5)$$

Bringt man nun einen Kern mit einem Kernspin $I \neq 0$ in ein statisches Magnetfeld, das entlang der z -Achse verläuft, wird der Kernspin in Feldrichtung nach Gleichung 2.4 aufgespalten. Es kommt zur so genannten Richtungsquantelung, bei der Kerne mit paralleler Ausrichtung von μ zum äußeren Magnetfeld energieärmer sind als Kerne mit entgegengesetzter Ausrichtung von μ . Kerne mit $I = 1/2$ populieren dementsprechend die zwei möglichen Energieniveaus, auch Kern-Zeeman-Niveaus genannt, $m_I = +1/2$

und $m_I = -1/2$. In der Quantenmechanik werden die beiden Eigenfunktionen des Systems für die Zustände $m_I = +1/2$ und $m_I = -1/2$ in der Regel mit α und β bezeichnet.

Nach der klassischen Betrachtungsweise führen die Kerne eine Rotationsbewegung aus. Die Kerndipole präzedieren somit um die z-Achse, sie beschreiben eine Kreisbewegung in Magnetfeldrichtung. Die Frequenz, mit der die Kreisbewegung ausgeführt wird, bezeichnet man als Larmor-Frequenz ν_L .

$$\nu_L = \left| \frac{\gamma}{2\pi} \right| B_0 \quad (\text{oder mit } \omega = 2\pi\nu) \quad \omega_L = \gamma B_0 \quad (2.6)$$

$$\Delta E = h\nu_L = \hbar\gamma B_0 = \hbar\omega_L \quad (2.7)$$

Wird eine Radiofrequenz eingestrahlt, die genau der Larmor-Frequenz entspricht, kann die magnetische Komponente der Welle mit den Kerndipolen in Wechselwirkung treten und ein Übergang ins höhere Energieniveau stattfinden. Gleichung 2.6 beschreibt diese Resonanzbedingung, welche die Grundlage eines NMR-Experimentes bildet.

Die Larmor-Frequenz sowie der Energieunterschied ΔE zwischen den beiden Energieniveaus α und β sind von der Magnetfeldstärke B_0 abhängig. Die benötigte Radiofrequenz zur Erfüllung der Resonanzbedingung eines Kerns ist demzufolge geräteabhängig. Aus diesem Grund wird für NMR-Spektren die ppm-Skala (Gleichung 2.8) verwendet. Die ppm-Skala ist dimensionslos und bezieht sich auf eine Referenzsubstanz. Definitionsgemäß ist dies zum Beispiel für die chemische Verschiebung von Protonen Tetramethylsilan (TMS) oder 2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonsäure⁸ (DSS). Für die Referenzierung anderer Kerne sind ebenso spezielle Verbindungen und Protokolle verfügbar.^[9] Die ppm-Skala gibt die chemische Verschiebung δ verschiedener Resonanzsignale an. Häufig wird hierbei ν_{Referenz} gleich der Messfrequenz gesetzt.

$$\delta = \frac{\nu_{\text{Substanz}} - \nu_{\text{Referenz}}}{\nu_{\text{Referenz}}} \cdot 10^6 \quad (2.8)$$

Ist die Resonanzbedingung erfüllt, hängt die Empfindlichkeit eines Experimentes von dem Besetzungsverhältnis der beiden Energieniveaus α und β ab. Während das Besetzungsverhältnis N_β/N_α im Magnetfeld der Erde ca. eins ist, verschiebt es sich innerhalb eines starken Magnetfeldes zu Gunsten des energieärmeren Energieniveaus β . Der Grund hierfür ist, dass mit einer größeren Magnetfeldstärke B_0 der Energieunterschied ΔE ebenfalls ansteigt. Dieses Phänomen wird durch die Boltzmannverteilung beschrieben (Gleichung 2.9).

$$\frac{N_\beta}{N_\alpha} = e^{\frac{-\Delta E}{k_B T}} = e^{\frac{-\gamma \hbar B_0}{\hbar B_0 T}} \approx 1 - \frac{\gamma \hbar B_0}{k_B T} \quad (2.9)$$

Vor allem bei gering konzentrierten Proben, bei denen wenige Kernspins zur Anregung zur Verfügung stehen, ist ein günstiges Besetzungsverhältnis für eine hohe

⁸systematischer Name: 3-(Trimethylsilyl)propan-1-sulfonsäure

Empfindlichkeit der Messung wichtig. Dies ist ein Grund, warum Hochfeldgeräte mit hohen Magnetfeldstärken eingesetzt werden.

2.2. Aufnahme von NMR-Spektren

Heutzutage wird für die Aufnahme von NMR-Spektren ausschließlich ein von R. R. Ernst entwickeltes Impulsverfahren eingesetzt.^[10] Dabei werden gleichzeitig alle Kerne einer Sorte durch Einstrahlen eines Frequenzpulses angeregt. Bei einer magnetischen Feldstärke von 14,1 T beträgt die Generatorfrequenz für Protonen 600 MHz.

2.2.1. Selektive Pulse

Der zur Anregung verwendete Puls besitzt üblicherweise eine Dauer von einigen Mikrosekunden. Um einen breiten Frequenzbereich abzudecken, werden möglichst kurze Pulse (μs) mit einer hohen Leistung (mehrere Watt) verwendet. Man spricht in diesem Fall von harten Pulsen (*hard pulses*). Per Definition erfüllen sie folgende Bedingung:^[11]

$$|B_1| \gg \left| \frac{\Delta\omega}{\gamma} \right| \quad (2.10)$$

Das zu der eingestrahlten Radiofrequenz korrespondierende Magnetfeld⁹ B_1 ist deutlich größer als der Quotient aus der Differenz $\Delta\omega$ der Resonanzfrequenz eines isolierten Spins ω und der eingestrahlten Frequenz ω_0 sowie dem gyromagnetischen Verhältnis γ . Aufgrund der obigen Beziehung (Gleichung 2.10) spielt für den Pulswinkel α die Differenz $\Delta\omega$ keine Rolle, da jeder Spin über den gesamten Frequenzbereich das gleiche Magnetfeld B_1 erfährt (τ_p Pulslänge).

$$\alpha = -\gamma |B_1| \tau_p \quad (2.11)$$

Um den Anregungsbereich einzugrenzen, muss die Pulslänge τ_p vergrößert werden. Einhergehend mit der Vergrößerung von τ_p muss B_1 , also die Leistung des Pulses, verringert werden, um den gleichen Pulswinkel α zu erhalten. Gleichung 2.11 gilt in diesem Fall nur noch für kleine Werte von $\Delta\omega$, also für Spins, deren Resonanzfrequenz nahe der angeregten Frequenz liegt (kleiner Offset). Spins mit einem großen Offset sind

⁹Wichtig für die folgende Betrachtung ist im Endeffekt das effektive Feld B^{eff} , welches die einzelnen Spins erfahren. Dieses setzt sich aus dem transversalen B_1 -Feld und der longitudinalen Komponente B_0^{eff} zusammen.

$$B^{eff} = \sqrt{\left(B_0^{eff} - \frac{\omega}{\gamma} \right)^2 + (B_1)^2}$$

Aufgrund Gleichung 2.10 kann als Näherung $B^{eff} = B_1$ gesetzt werden.

von einem solchen Radiofrequenzpuls nicht betroffen, da $|B_1| \ll |\Delta\omega/\gamma|$. Die Pulslänge τ_p für solch einen selektiven Puls ergibt sich aus

$$\alpha = [(\Delta\omega)^2 + (\gamma B_1)^2]^{\frac{1}{2}} \tau_p \quad (2.12)$$

Ein selektiver Rechteckpuls mit vergrößerter Pulslänge und verringerter Leistung besitzt jedoch eine schlechte Frequenzselektivität. Abhilfe schafft hier die DANTE-Sequenz, welche aus mehreren harten Pulsen besteht, oder die Verwendung komplizierterer Amplitudenprofile, bei denen die Leistung des Pulses, die Amplitude, über die Zeit des Pulses variiert wird. Da B_1 nun nicht mehr konstant ist, muss Gleichung 2.12 als Integral geschrieben werden.

$$\alpha = \int \{(\Delta\omega)^2 + [\gamma B_1(t)]^2\}^{\frac{1}{2}} dt \quad (2.13)$$

Ein Beispiel für das Amplitudenprofil eines selektiven Pulses ist die Gauß-Funktion, die nach einer Fourier-Transformation ebenfalls eine Gauß-Funktion ergibt. Man erhält somit einen definierten Frequenzbereich für die Anregung. In der Praxis werden häufig die Gauß-Puls-Kaskaden Q5 für die Anregung und Q3 für die Inversion verwendet.^[12] Die Amplitudenprofile beider Pulse sind in Abbildung 2.1 zu sehen. Hierbei muss neben eine Amplitudenmodulation auch eine Phasenmodulation erfolgen. Der Einfachheit halber werden die Phaseninformationen an dieser Stelle vernachlässigt.

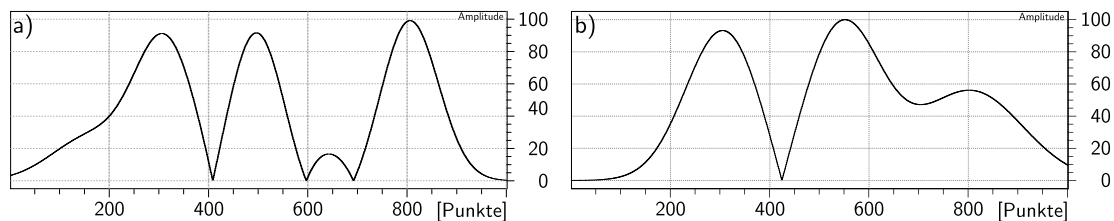


Abbildung 2.1.: Verschiedene Amplitudenprofile einiger selektiven Pulse. Die Grafiken wurden mit Hilfe des *Shape Tools* von Topspin 3.0 erzeugt. Für die Darstellung wurden Polarkoordinaten gewählt und die Phaseninformation vernachlässigt. a) Gauß-Puls-Kaskade Q5 (Anregung), b) Gauß-Puls-Kaskade Q3 (Inversion)

Sowohl der Q5- als auch der Q3-Puls wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet, um eine selektive Anregung zu erreichen. In Abbildung 2.1a ist zu erkennen, dass das Amplitudenprofil für den Q5-Puls unsymmetrisch ist. Dementsprechend wurde an der entsprechende Stelle im Pulsprogramm die gespiegelte Variante Q5tr (*time reversed*) eingesetzt.

Neben den gaußartigen Amplitudenprofilen sind weitere in der Literatur beschrieben. Die Entwicklung leistungsfähigerer Amplitudenprofile für eine verbesserte Selektivität ist Bestandteil aktueller Forschung. Für eine detailliertere Diskussion der Materie sei an dieser Stelle auf die Literatur verwiesen.^[13–17]

2.2.2. Adiabatische Pulse

Während sich selektive Pulse vor allem durch eine Amplitudenmodulation auszeichnen, sind adiabatische Pulse durch eine Frequenzmodulation gekennzeichnet.^[18–20]

In den Anfängen der NMR-Spektroskopie wurde ein Spektrum dadurch erhalten, dass das effektive magnetische Feld B_{eff} so langsam verändert wurde, dass der Magnetisierungsvektor der Spins über die Zeit immer kollinear zum sich verändernden Feld blieb. Die Veränderung erfolgte somit adiabatisch. Es konnte ein entsprechend großer Bereich mit einer hohen Toleranz bezüglich Inhomogenitäten zu der eingestrahlten Radiofrequenz angeregt werden. Während in der modernen FT-NMR-Spektroskopie das magnetische Feld B_0 konstant gehalten wird, erfolgt eine adiabatische Veränderung des Magnetisierungsvektors durch eine Frequenzmodulation. Diese Frequenzmodulation ω_{RF} hat eine Änderung der Trägerfrequenz ω_0 mit der Zeit (auch als Frequenzhub bezeichnet) zur Folge. Somit kann ebenfalls ein breiter Frequenzbereich abgedeckt werden.

Mathematisch wird die adiabatische Bedingung als

$$|\omega_{eff}(t)| \gg \left| \frac{d\alpha}{dt} \right| \quad (2.14)$$

ausgedrückt. Der effektive Feldvektor ω_{eff} zur Zeit t muss zu jeder Zeit größer sein als die Veränderung des Pulswinkels α mit der Zeit t . Die Veränderung von ω_{eff} ist in Abbildung 2.2 gezeigt. Zur Darstellung wird ein rotierendes Koordinatensystem verwendet, wobei die Geschwindigkeit der Rotation durch die Frequenzmodulation ω_{RF} definiert ist. ω_{eff} setzt sich aus $\Delta\omega$ und der Trägerfrequenz ω_1 zusammen. Ist nun, wie in Abbildung 2.2a gezeigt, $\omega_{RF} \gg \omega_0$, befindet man sich weit unterhalb der Resonanzbedingung, so dass ω_{eff} parallel zu z' ist. Vergrößert man ω_{RF} wird $\Delta\omega$ stetig kleiner, bis bei $\omega_{RF} = \omega_0$ der effektive Feldvektor ω_{eff} in der transversalen Ebene liegt (Abbildung 2.2b). Dieser Zustand beschreibt einen adiabatischen 90°-Puls. Für einen 180°-Puls muss ω_{RF} weiter vergrößert werden, bis ω_{eff} schließlich parallel zu $-z'$ steht (Abbildung 2.2c). Erfolgt die Veränderung von ω_{RF} gemäß der adiabatischen Bedingung (Gleichung 2.14), so kann der Magnetisierungsvektor dem effektiven Feldvektor ω_{eff} folgen.^[21]

Mit Hilfe der adiabatischen Pulse ist es somit möglich, sehr große Anregungsbereiche von teilweise mehreren kHz abzudecken. Dies ist für Entkopplungssequenzen und ebenso für 180°-Pulse von Bedeutung.^[22] Hier ist es wichtig, dass alle Kerne das gleiche effektive transversale Magnetfeld B_1 erfahren. Vor allem bei größeren spektralen Weiten, wie sie unter anderem beim Kohlenstoffisotop ^{13}C vorkommen, entsprechen 180°-Hartpulse bei hohen Werten für $\Delta\omega$ häufig nicht mehr einem optimalen 180°-Puls. Durch die resultierende schlechte Refokussierung der Magnetisierung tauchen Phasenstörungen im Spektrum auf, die es zu vermeiden gilt. In solchen Fällen werden adiabatische Pulse eingesetzt. Wie bei den selektiven Pulsen gibt es mehrere Varian-

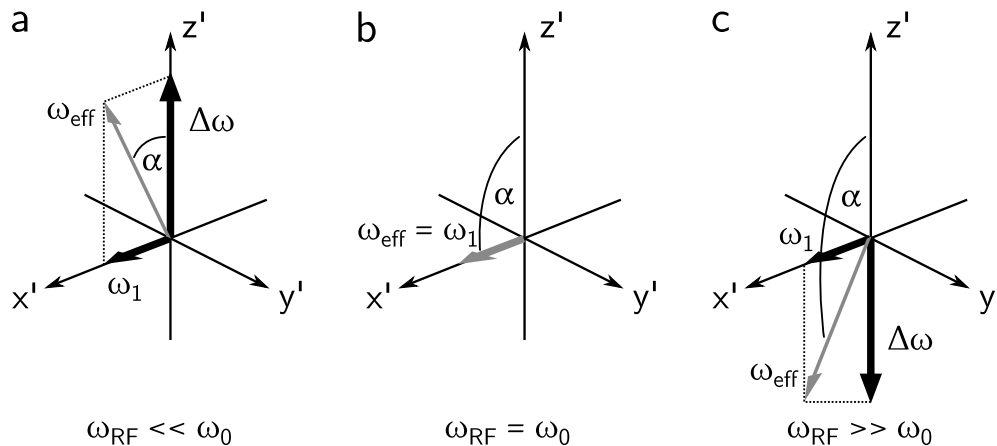


Abbildung 2.2.: Darstellung der Wirkung eines adiabatischen Pulses im frequenzmodulierten Koordinatensystem. Die Rotationsfrequenz wird durch die Frequenzmodulation ω_{RF} bestimmt. In der Abbildung ist ω_{eff} der effektive Feldvektor mit seinen beiden Komponenten $\Delta\omega$ und ω_1 . Abbildung a) zeigt den Zustand weit unterhalb der Resonanzbedingung. ω_{eff} ist parallel zur z' -Achse. In b) ist der *on resonance* Zustand gezeigt. ω_{eff} ist gleich ω_1 und somit senkrecht zur z' -Achse (90° Puls). c) zeigt das System weit oberhalb der Resonanzbedingung. ω_{eff} befindet sich nun in $-z'$ -Richtung (180° Puls).^[21]

ten der adiabatischen Pulse. Die in dieser Arbeit erstellten Tripelresonanzspektren verwenden adiabatische Chirp-Pulse.^[23–26]

2.2.3. Kreuzkorrelierte Relaxation

Das Phänomen der kreuzkorrelierten Relaxation ermöglicht es, strukturelle Informationen über ein Molekül zu erhalten. Der kreuzkorrelierten Relaxation zu Grunde liegen Relaxationsprozesse wie die *chemical shift anisotropy* (CSA) und Dipol-Dipol-Wechselwirkungen.

Relaxation

Mit Relaxation wird in der NMR-Spektroskopie die Rückkehr des Magnetisierungsvektors in den Gleichgewichtszustand beschrieben. Grundlage eines jeden NMR-Experimentes ist die Auslenkung des Magnetisierungsvektors aus dem Gleichgewichtszustand entlang der z -Achse eines Koordinatensystems mit Hilfe von Radiofrequenzpulsen in die transversale xy -Ebene. Die so in das System eingebrachte Energie wird durch verschiedene Prozesse wieder abgegeben. In Abhängigkeit von der Effizienz dieser Prozesse kehrt das System in den Gleichgewichtszustand zurück.

Die wohl bekanntesten Parameter zur Beschreibung der Relaxation eines Systems sind die T_1 - und T_2 -Zeiten. Während die T_1 -Zeit die longitudinale oder auch Spin-

Gitter-Relaxation beschreibt, liegt der T_2 -Zeit die transversale oder auch Spin-Spin-Relaxation zu Grunde. Phänomenologisch bedeutet dies, dass die T_2 -Zeit vor allem für die Effektivität des Magnetisierungstransfers während eines Pulsprogramms von Bedeutung ist. Die T_1 -Zeit ist die Zeit, welche das System braucht, um wieder in den Gleichgewichtszustand zurückzukehren. Es ist also die Zeit, nach der der Magnetisierungsvektor wieder entlang der z-Achse orientiert ist und ein neues Experiment gestartet werden kann.

In den folgenden beiden Abschnitten werden zwei wichtige Relaxationsprozesse vorgestellt. Für eine mathematische Abhandlung und eine ausführlichere Diskussion der verschiedenen Relaxationsprozesse sei auf die einschlägige NMR-Literatur verwiesen.^[8,27,28]

chemical shift anisotropy (CSA) Chemische Verschiebungen sind ein Resultat der elektronischen Umgebung, die das lokale Magnetfeld B_{lokal} eines einzelnen Kernes beeinflusst. Die Ladungsverteilung in einem Molekül besitzt einen anisotropen Charakter. Somit kann B_{lokal} je nach Ausrichtung zur elektronischen Umgebung verstärkt oder geschwächt werden. Zum Beispiel besitzen Doppelbindungen einen charakteristischen Anisotropiekegel, weshalb der Effekt einer Doppelbindung auf die chemische Umgebung gut vorhergesagt werden kann.

In einem Molekül ist durch die chemische Umgebung die elektronische Umgebung an jedem Kern einzigartig. Das führt dazu, dass jeder Kern eine spezifische Resonanzfrequenz und ebenso ein spezifisches lokales Magnetfeld B_{lokal} besitzt.

Durch den anisotropen Charakter sind die lokalen Felder räumlich gerichtet. Aufgrund der Molekülrotation bewegen sie sich was zu einer leichten Fluktuation von B_{lokal} führt. Eben diese Fluktuation ist eine Ursache der Relaxation. Man spricht von *chemical shift anisotropy* (CSA). Während bei Kernen mit Spin $1/2$ die CSA als Relaxationsquelle den Dipol-Dipol-Wechselwirkungen untergeordnet ist, zeigt sich der Effekt der CSA bei hohen Magnetfeldstärken jedoch immer stärker.

Dipol-Dipol Wechselwirkungen Wie oben beschrieben besitzen Kerne ein lokales Magnetfeld B_{lokal} bzw. Dipolmoment und beeinflussen Kerne in direkter räumlicher Nähe. Dies wird als Dipol-Dipol-Wechselwirkung bezeichnet.

Damit es zu solch einer Wechselwirkung kommt, dürfen die Kerne nicht zu weit voneinander entfernt sein. Im Allgemeinen geht man von einem maximalen Abstand von 5 \AA aus. Neben dem Abstand der Kerne zueinander ist das gyromagnetische Verhältnis γ für die Stärke der Wechselwirkung maßgebend. Je größer γ , umso größer die Dipol-Dipol-Wechselwirkung. Somit erfahren zwei Protonen eine größere Dipol-Dipol-Wechselwirkung als ein Proton und ein Kohlenstoffatom. Neben den beiden genannten Randbedingungen ist die Ausrichtung des lokalen Magnetfeldes zum äußeren Magnetfeld maßgebend. Weil in einer Lösung die Moleküle und damit die

Kerne ständig in Bewegung sind, ist nur der Mittelwert aller möglichen Ausrichtungen maßgebend für die Dipol-Dipol-Wechselwirkung. Die Anisotropie der Lösung ist der Grund, warum die dipolare Kopplung zweier Kerne in einem Lösungs-NMR-Spektrum nicht sichtbar ist oder anders ausgedrückt: In einer anisotropen Lösung ist die dipolare Kopplung gleich Null.

Nichtsdestotrotz ist der beschriebene Effekt für die Relaxation des Systems verantwortlich. Außerdem ist die dipolare Kopplung Grundlage des Nuclear Overhauser Effektes (NOE), und die Winkelabhängigkeit ist maßgeblich für den Einsatz der kreuzkorrelierten Korrelation in der Strukturbiologie verantwortlich.

Kreuzkorrelierte Relaxation Betrachtet man die beiden beschriebenen Relaxationsquellen, die CSA und die Dipol-Dipol-Wechselwirkung, könnte der Eindruck entstehen, dass beide unabhängig voneinander sind. Beide Effekte sind jedoch in ihrer Größe durch die Rotation des Moleküls in Lösung bestimmt.

Ein starres Molekül in Lösung unterliegt einer permanenten Rotation um alle Freiheitsgrade. Die Kernspins und die Elektronen an den Kernen unterliegen somit derselben Rotation. Die ständige Fluktuation führt zu einer Relaxation auf Basis der CSA und der Dipol-Dipol-Wechselwirkungen. Wenn eine feste Geometrie zwischen den Kernen vorliegt, wie es in einem starren Molekül der Fall ist, kommt es zu einer Kreuzkorrelation beider Effekte,

Betrachtet man zwei C–H-Gruppen in einem Molekül, so kann man zwischen den beiden C,H-Bindungsvektoren einen Winkel θ definieren (Abbildung 2.3a). Die Winkelabhängigkeit der Kreuzkorrelationsfunktion zwischen diesen beiden Gruppen kann man folgendermaßen ausdrücken.

$$\mathbb{K}_{\text{CH,CH}} \sim \frac{1}{2} (3 \cos^2 \theta_{\text{CH,CH}} - 1) \quad (2.15)$$

Sichtbar wird die Kreuzkorrelation, wenn man ein Doppelquantenspektrum ohne Entkopplung aufnimmt. Die einzelnen Spinzustände der Kerne $\alpha\alpha$, $\alpha\beta$, $\beta\alpha$ sowie $\beta\beta$ führen zu einem Spektrum mit vier Linien. Der Abstand der Linien zueinander ist durch die skalare Kopplung zwischen dem Proton und dem Kohlenstoff bestimmt (Abbildung 2.3b). In Abhängigkeit vom Winkel θ zwischen den beiden Bindungsvektoren kann Funktion 2.15 verschiedene Werte annehmen, die sich in verschiedenen Intensitäten der einzelnen Linien im Spektrum ausdrücken.

Reif *et al.* haben die Kreuzkorrelation zwischen der C_α -H- und der N-H-Bindung zweier Aminosäuren i und $i + 1$ genutzt, um Strukturinformationen über den Winkel Ψ in einem Proteinerückgrat zu ermitteln.^[5,6,29–32] Die Relaxationsraten $\Gamma_{i,i+1}^C$ aller vier möglichen Übergänge kann aus den Intensitäten der Peaks abgeleitet werden.

$$\Gamma_{i,i+1}^C = \frac{1}{4T} \cdot \ln \left(\frac{I(\alpha\beta) \cdot I(\beta\alpha)}{I(\alpha\alpha) \cdot I(\beta\beta)} \right) \quad (2.16)$$

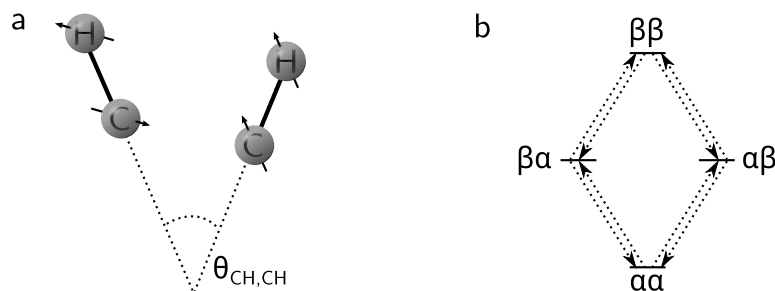


Abbildung 2.3.: a) Die beiden C–H-Bindungen mit dem Winkel θ zwischen den Bindungsvektoren. b) Energiediagramm für die vier Spinzustände $\alpha\alpha$, $\alpha\beta$, $\beta\alpha$ sowie $\beta\beta$.

Dabei beschreibt T die Zeit, in der sich die Doppelquantenkohärenz, typischerweise die Mischzeit für die C,N-Korrelation, entwickelt, und I die Intensitäten der entsprechenden Linien im Spektrum.

Die Winkelabhängigkeit der beiden Bindungsvektoren zueinander kann über folgende Gleichung bestimmt werden:

$$\Gamma_{i,i+1}^C = \frac{\gamma_H \gamma_N}{(r_{N,H_i})^3} \cdot \frac{\gamma_H \gamma_C}{(r_{C,H_{i+1}})^3} \cdot \left(\frac{\hbar \mu_0}{4\pi} \right)^2 \cdot \frac{2}{5} (3 \cos^2 \theta - 1) \cdot \tau_c \quad (2.17)$$

Hier sind \hbar , μ_0 Naturkonstanten und γ_H , γ_C und γ_N die gyromagnetischen Verhältnisse der entsprechenden Kerne. r_{N,H_i} sowie $r_{C,H_{i+1}}$ sind die Bindungslängen, welche typischerweise aus Kristallstrukturen bestimmt werden können. τ_c entspricht der Korrelationszeit des Moleküls, welche ebenfalls experimentell bestimmt werden muss.

Durch umformen von Gleichung 2.17 kann nun der Winkel θ bestimmt werden.

$$\cos(\theta) = \sqrt{\frac{80 \Gamma_{ij}^c r_{N,H}^3 r_{C,H}^3 \pi^2}{3 \gamma_H^2 \gamma_N \gamma_C \hbar^2 \mu^2 \tau_c} + \frac{1}{3}} \quad (2.18)$$

3. Phytochrome

Die in dieser Arbeit untersuchten Phytochrome sind Rotlichtrezeptoren und wurden 1959 von *Butler et al.* als erster photomorphogenetischer Photorezeptor in Pflanzen beschrieben.^[33] Sie bilden neben den Phototropinen, den BLUF (*blue-light sensors using flavin adenine dinucleotide*) Sensoren und den Cryptochromen^[34-36] eine eigene Gruppe innerhalb der pflanzlichen Photorezeptoren.^[37,38] Alle diese lichtsensitiven Proteine spielen eine wichtige Rolle bei der Detektion verschiedener Lichtverhältnisse und nehmen Einfluss auf Entwicklung, Morphologie wie auch den Metabolismus der Pflanzen.^[39]

Alle Photorezeptoren besitzen einen Chromophor, der für die spezifische Lichtabsorption und damit für die Funktion verantwortlich ist. Struktur und Funktionsweise des Chromophors ist je nach Photorezeptor unterschiedlich. Fungieren die Phototropine durch die Verwendung eines Flavinmononucleotides (FMN) als Blaulichtrezeptoren, so ist ein Bilin für die Funktion der Phytochrome als Rotlichtrezeptoren verantwortlich.^[40,41]

Die Funktionsweise der Photorezeptoren ist Thema aktueller Forschung.^[42,43] Für ein grundlegendes Verständnis ist jedoch eine genaue Kenntnis der Struktur und der strukturellen Veränderungen auf atomarer Ebene nötig.^[44]

3.1. Struktur und Funktion

Pflanzliche Phytochrome nehmen Einfluss auf die Entwicklung von Pflanzen. Die Blütenbildung, Keimung und die Schattenvermeidung sind lichtabhängige Prozesse und werden maßgeblich von den Phytochromen gesteuert. Die durch Licht gesteuerte Entwicklung einer Pflanze nennt man Photomorphogenese.^[45-47]

Phytochrome als Lichtrezeptoren kommen sowohl in Pflanzen (Phy) als auch in Pilzen (FphP), Bakterien (BphP) und Cyanobakterien (Cph1, Cph2) vor. Sie bestehen aus einer lichtempfindlichen und einer regulatorischen Einheit.

Die regulatorische Einheit besteht aus einer Histidin-Kinase Domäne (HKRD), die bei pflanzlichen Phytochromen auf zwei PAS-Domänen (PER, ARNT *and* SIM) folgt.^[48] Alle anderen Phytochrome (BphP, FphP, Cph1, Cph2) besitzen diesen beiden PAS-Domänen nicht (Abbildung 3.1).

Die lichtempfindliche Einheit ist aus einer PAS,^[49] GAF (cGMP *phosphodiesterase, adenylate cyclase, Fh1A*)^[50,51] und PHY (*phytochromespecific GAF-related*) Domäne aufgebaut. Das Vorhandensein aller drei Domänen ist essentiell für die Funktion der

Phytochrome. Eine Ausnahme bilden die cyanobakteriellen Phytochrome 2 (Cph2) und die Cyanobakteriochrome (CBCRs) (siehe Kapitel 3.2).

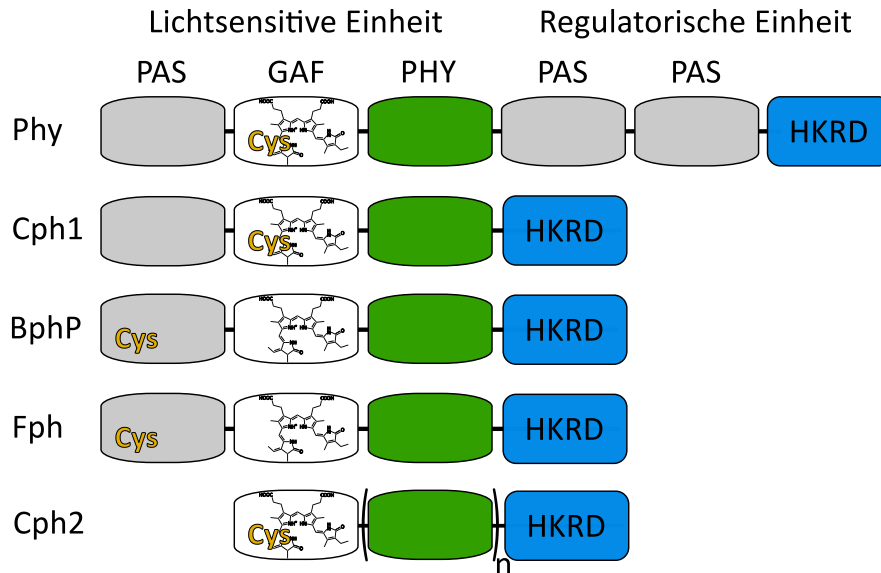


Abbildung 3.1.: Vereinfachte Phytochrom Domänen Struktur, der Phy, Cph1, BphP, und FphP. Der Chromophor ist in der GAF-Domäne innerhalb eine Bindungstasche koordiniert, während sich die kovalente Bindungsstelle, ein Cystein (Cys), unterscheidet. Abbildung in Anlehnung an Rockwell *et al.*^[41]

3.1.1. Chromophor

Als Chromophor findet man in den Phytochromen ein Bilin welches aus vier Pyrrolen, die durch eine CH₂-Gruppe miteinander verknüpft sind, besteht. Man spricht auch von einem linearen Tetrapyrrol.^[52] Der Chromophor unterscheidet sich je nach Untergruppe der Phytochrome. In pflanzlichen Phytochromen findet man Phytochromobilin (PΦB), wobei in Cph1 und Cph2 Phycocyanobilin (PCB) und in bakteriellen Phytochromen Biliverdin (BV) vorkommt.^[53]

PΦB, PCB und BV unterscheiden sich durch die Oxidationsstufen ihrer Substituenten an den beiden Ringen A und D. Während am Ring D des BV und PΦB eine Vinylgruppe gebunden ist, befindet sich an dieser Stelle im PCB eine Ethylgruppe. Des Weiteren weist BV in Position C3 im Gegensatz zu PΦB und PCB kein Chiralitätszentrum auf (Abbildung 3.2).

Alle Chromophore sind in der GAF Domäne eingebettet und mittels eines Thioethers über die Seitenkette an C3 an ein Cystein gebunden. Während bei den pflanzlichen und cyanobakteriellen Chromophoren das Cystein ebenfalls in der GAF Domäne lokalisiert ist, ist die Bindungsstelle bei den BphPs und den Fphs näher am N-Terminus.

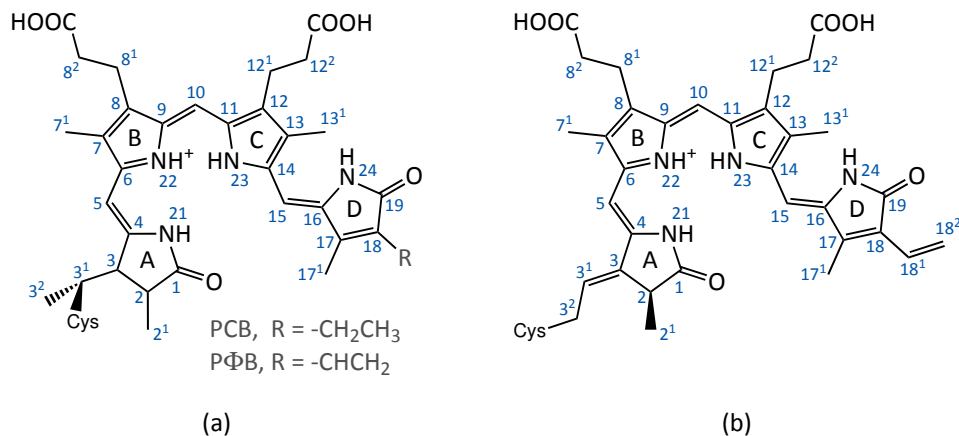


Abbildung 3.2.: Strukturen der Chromophore der verschiedenen Phytochrome. (a) Phycocyanobilin (PCB) und Phytocromobilin (PΦB) (b) Biliverdin (BV)

Ein weiterer Unterschied ist die Anknüpfung über Ring A, der bei PCB an Position C3¹ erfolgt während BV über C3² gebunden ist.

3.1.2. Photozyklus

Phytochrome detektieren ihr Umgebungslicht in einem mehrstufigem Photozyklus. Die im P_r-Grundzustand vorliegende (5Z)-*syn*, (10Z)-*syn* und (15Z)-*anti* Konfiguration des Chromophors (ZZZssa) wird über zwei Übergangszustände, Lumi-R und Meta-R in eine (5Z)-*syn*, (10Z)-*syn* und (15E)-*anti* Konfiguration (ZZEssa) überführt.^[54-57] Der erste Schritt, die Z/E-Isomerisierung, erfolgt mittels Lichtabsorption einer Wellenlänge von 668 nm innerhalb von Picosekunden.^[58-60] Der entstandene Übergangszustand Lumi-R relaxiert danach innerhalb von Millisekunden über Meta-R in den P_{fr}-Zustand.^[61] Neueste Untersuchungen legen nahe, dass ausgehend von Lumi-R zunächst eine De- und anschließend an Meta-R ein Reprotonierung des Chromophors stattfindet.^[54,62]

Im angeregten Zustand besitzt das Phytochrom zwei Wege, um wieder zurück in den Grundzustand zu gelangen. Eine erneute Lichtabsorption bei 702 nm induziert eine E/Z-Isomerisierung an C15 und führt das System über die Übergangszustände Lumi-F und Meta-F zurück in den P_r-Grundzustand. Dabei geht man davon aus, dass die Isomerisierung wiederum zuerst abläuft und das angeregte System über eine Umlagerung des umgebenden Wasserstoffbrückennetzwerkes in den stabilen P_r-Zustand relaxiert (Abbildung 3.3).^[54]

Der P_r/P_{fr}-Übergang ist im Vergleich zum P_{fr}/P_r-Übergang besser charakterisiert. Jedoch steht die Forschung immer noch am Anfang zu einem kompletten Verständnis des Phytochrom Photozyklus.

Die ZZZssa Konfiguration des Chromophors im P_r-Zustand wurde mit Hilfe von

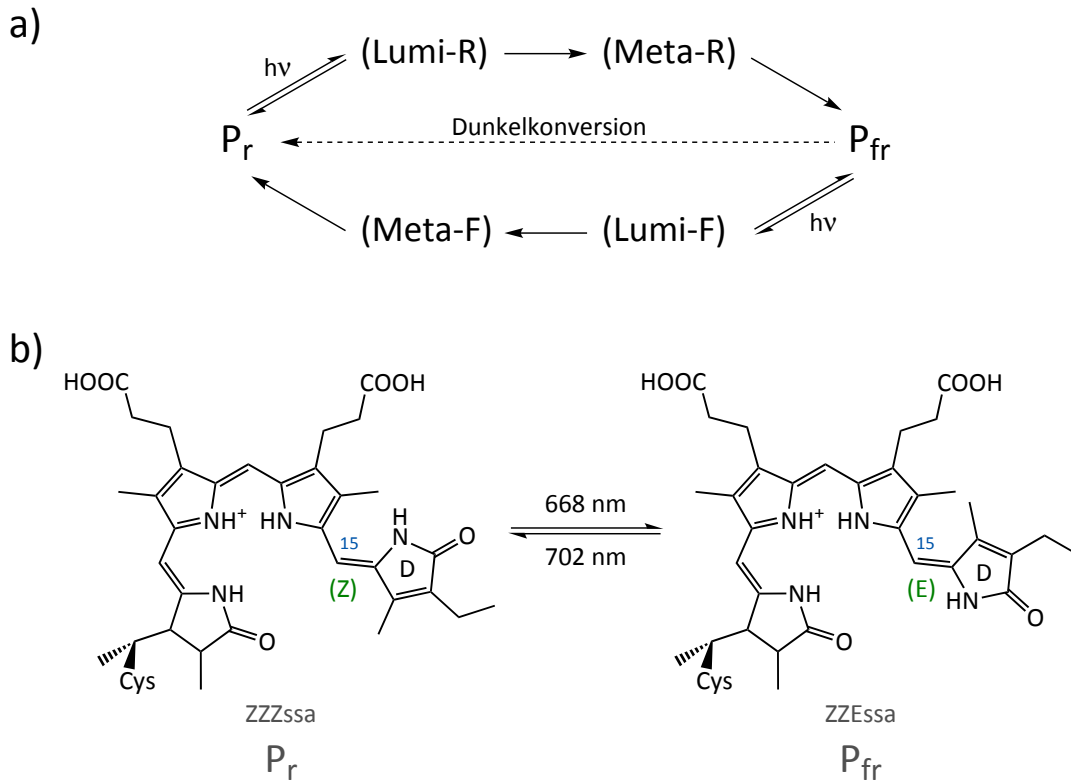


Abbildung 3.3.: a) Schematische Darstellung des Phytochrom Photozyklus. Die Z/E-Isomerisierung erfolgt durch Lichtabsorption. Der so entstandene angeregte Zustand Lumi-R wird über Meta-R in den P_{fr} -Zustand überführt. P_{fr} wird analog über Lumi-F und Meta-F in P_r umgewandelt. Ebenso ist eine Dunkelreversion möglich. b) Strukturformeln von PCB in den beiden photostationären Zuständen. Im P_r -Grundzustand liegt eine (5Z)-*syn*, (10Z)-*syn* und (15Z)-*anti* (ZZZssa) Konfiguration des Chromophors und im angeregten P_{fr} -Zustand eine (5Z)-*syn*, (10Z)-*syn* und (15E)-*anti* (ZZEssa) Konfiguration vor.

Kristallstrukturen bestätigt.^[1,2] Außerdem konnte mit Hilfe der NMR-Spektroskopie gezeigt werden, dass alle vier Stickstoffe der Pyrrole in beiden Zuständen (P_r und P_{fr}) protoniert sind.^[63,64]

Ein Problem bei der Charakterisierung der photostationären Zustände ist, dass aufgrund der überlappenden Anregungsbereiche der P_{fr} -Zustand nur schwer isoliert werden kann. Konvertiert das System von P_r - zu P_{fr} , wird gleichzeitig die P_{fr}/P_r -Rückreaktion angeregt. Man erhält bei ständiger Bestrahlung mit Rotlicht (668 nm) ein Gleichgewicht von P_r zu P_{fr} von 13/87, welches unter anderem an PhyA aus Hafer und Roggen bestimmt wurde.^[65,66] Im Gegensatz dazu ist es jedoch möglich, den P_{fr} -Zustand selektiv mit tiefrotem Licht anzuregen.^[67] Eine spektroskopische Charakterisierung des reinen P_{fr} -Zustandes ist somit, im Gegensatz zu P_r , nur schwer

möglich.

Will man den reinen P_{fr} -Zustand erhalten, so muss das Gemisch aus P_r/P_{fr} mit Hilfe der Gelpermeationschromatographie (GPC) getrennt werden. Dies ist jedoch sehr aufwendig.

Neben der lichtinduzierten Photokonversion vom P_{fr} - zum P_r -Zustand kann die sogenannte Dunkelreversion beobachtet werden. Dabei relaxiert das System, auf einem bis jetzt nicht im Detail charakterisiertem Weg zurück in den Grundzustand. Dieser Vorgang ist in der Familie der Phytochrome nicht einheitlich. Während zum Beispiel das cyanobakterielle Phytochrom Cph1 keine signifikante Dunkelreversion zeigt, verläuft diese bei dem bakteriellen Phytochrom Agp1 innerhalb weniger Stunden.

3.1.3. Proteinstruktur

Die Bestimmung der Kristallstruktur der Chromophor-Bindungsdomäne (CBD) des bakteriellen Phytochroms von *Deinococcus radiodurans* (DrBphP) mit einer Auflösung von 2,5 Å von Wagner *et al.* (PDB code 1ZTU) stellte einen Durchbruch auf dem Gebiet der Phytochromforschung dar, da die Struktur des Chromophors in der Bindungstasche des Proteins bis dahin nicht eindeutig geklärt war.^[1] Die Struktur bestätigte die schon vorher postulierte lineare und eher planare Konformation des Chromophors im P_r -Grundzustand.

Allerdings war die Struktur nur bedingt auf funktionelle Phytochrome übertragbar, da die für den Photozyklus essentielle PHY-Domäne fehlte. Auch die im Anschluss veröffentlichten höher aufgelösten Strukturen der DrBphP-CBD mit 1,45 bzw. 2,15 Å (PDB code 209C und 209B) und die Kristallstrukturen der Phytochrome RpBphP2 und RpBphP3 aus *Rhodospseudomonas palustris* konnten keine weitere Strukturinformationen liefern.^[68,69] Erst mit der Veröffentlichung der Kristallstruktur der P_r -Form des Cph1 aus *Synechocystis sp.* PCC6803 (PDB Code 2VEA) war die Struktur eines photoaktiven Phytochroms verfügbar (Abbildung 3.4).^[2]

Die lichtempfindliche Einheit des cyanobakteriellen Phytochroms Cph1 aus *Synechocystis sp.* PCC6803 besteht aus zwei strukturellen Untereinheiten. Die PAS und die GAF-Domäne bilden zusammen mit dem N-Terminus eine Untereinheit, auf die, durch eine α -Helix (α_9) verbunden, die PHY-Domäne als zweite Untereinheit folgt. Die vollständige photosensorische Domäne kristallisiert als ein antiparalleles Dimer, wobei als Dimerisierungsstelle der C-Terminus dient. Der N-Terminus ist somit für die Signalübertragung verantwortlich.

Der Chromophor ist in die GAF-Domäne eingebettet und gegen äußeren Lösungsmiteleinfluss vollständig durch ein Zungenmotiv isoliert. Die Kristallstruktur bestätigt ebenfalls Cys-259 als Bindungsstelle und die ZZZssa Konformation des Chromophors. Weiterhin legt die Struktur eine relativ dichte Packung der Bindungstasche an den Ringen A, B und C nahe. Nur um Ring D bietet die Bindungstasche genügend Raum für die lichtinduzierte Isomerisierung der C15 Doppelbindung. Die von der Kristall-

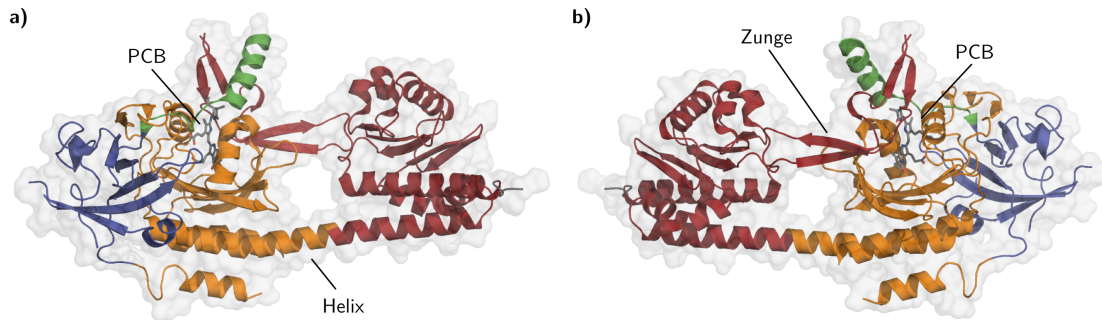


Abbildung 3.4.: Kristallstruktur des photosensorischen Moduls Cph1 aus *Synechocystis sp.* PCC6803 (PDB Code: 2VEA). Die PAS-, GAF- und PHY-Domänen sind in blau, orange und rot dargestellt. In Abbildung a) ist deutlich die α -Helix zu erkennen, die die PHY-Domäne mit dem Rest verbindet. In Abbildung b) ist die Rückseite des Proteins mit dem Zungenmotiv, der die Chromophorbindungsstasche abdeckt, abgebildet.

struktur definierte Struktur des Chromophors in der Bindungsstasche steht jedoch im Widerspruch zu vorherigen und zu den im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen aus NMR-Untersuchungen an dem System.^[63,70,71]

Auf der Basis der Struktur können mehrere, für die Signalübertragung wichtige Aminosäuren identifiziert werden, darunter Tyr-176, welches zusammen mit Val-186, Tyr-203, Pro-204 und Tyr-263 eine hydrophobe Tasche um Ring D bildet. Außerdem ist eine Wasserstoffbrückenbindung von His-290 zum Carbonylrest an Ring D möglich. Damit wird die Signalübertragung durch eine Veränderung des Wasserstoffbrückennetzwerkes in der Bindungsstasche während des Photozyklus wahrscheinlich. Auch die Propionsäureseitenkette an Ring C kommt für eine Signalübertragung durch eine mögliche Wechselwirkung zu Ser-272 und Thr-274 in Frage (Abbildung 3.5b). Eindeutige Aussagen können in dieser Hinsicht erst gemacht werden, wenn eine P_{fr} -Kristallstruktur vorliegt.

Aufgrund der oben beschriebenen Schwierigkeiten, einen reinen P_{fr} -Zustand darzustellen, gibt es bis jetzt keine Struktur eines Phytochroms in seinem angeregten Zustand. Jedoch besitzt das bakterielle Phytochrom von *Pseudomonas aeruginosa* (PaB-phP) im Gegensatz zu den vorher besprochenen Phytochromen im Grundzustand eine P_{fr} -Struktur. Es liegt in diesem Fall somit ein P_{fr}/P_r -Photozyklus vor. Das ermöglichte es Yang *et al.* 2008, eine Kristallstruktur eines P_{fr} -Zustandes zu lösen (PDB Code: 3C2W).^[3]

Die Domänenstruktur des PaBphP entspricht mit den PAS-, GAF- und PHY-Domänen der im von Essen *et al.* veröffentlichten Cph1 (Abbildung 3.5).^[2] Ebenso wie Cph1 liegt PaBphP als Dimer vor. Dennoch sind strukturelle Unterschiede zwischen der P_r - und der P_{fr} -Struktur beim direkten Vergleich der beiden Kristallstrukturen erkennbar. Im Rahmen dieser Einführung sollen jedoch nur einige wichtige Merkmale der Chro-

mophorbindungsstasche der PaBphP-P_{fr}-Struktur im Vergleich zur P_r-Kristallstruktur des Cph1 diskutiert werden.

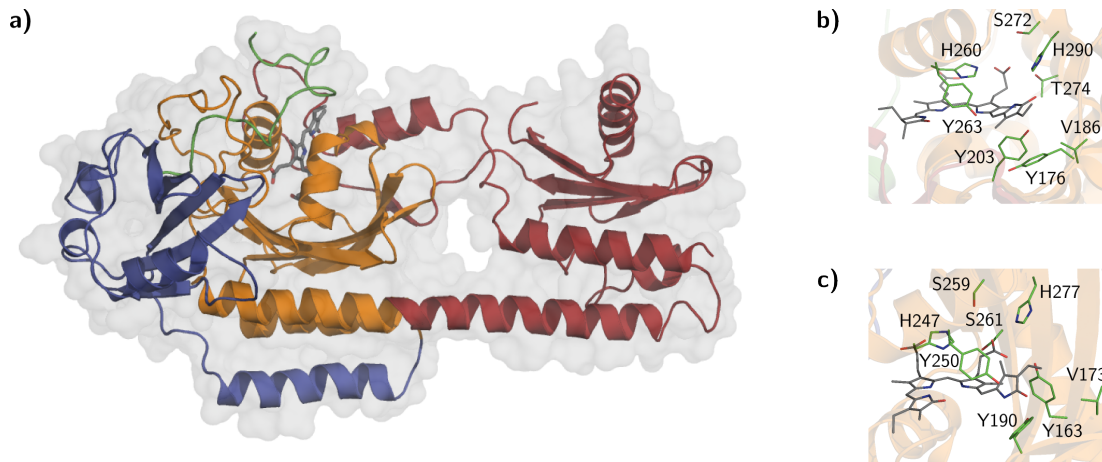


Abbildung 3.5.: a) Kristallstruktur des bakteriellen Phytochroms aus *Pseudomonas aeruginosa* (PaBphP, PDB Code: 3C2W). Die PAS-, GAF- und PHY-Domänen sind in blau, orange und rot dargestellt. b) Der Chromophor PCB in der Bindungsstasche vom Cph1. c) Der Chromophor BV in der Bindungsstasche vom PaBphP.

PaBphP¹ trägt als bakterielles Phytochrom Biliverdin (BV) als Chromophor. Die kovalente Bindung erfolgt somit über das Kohlenstoffatom C3² an Cys-12, welches nahe am N-Terminus liegt. In Bezug auf den Chromophor ist der wichtigste strukturelle Unterschied jedoch die E-konfigurierte C15-Doppelbindung. Innerhalb der Bindungsstasche ist eine Rotation von Tyr-163 und Tyr-190 im Vergleich zur P_r-Struktur des PCB in Cph1 zu erkennen. Andere, für die Signalübertragung vermutlich wichtige Aminosäuren wie His-247 und His-277 sind in beiden Strukturen ähnlich orientiert (Abbildung 3.5c). Für eine detailliertere Diskussion wird an dieser Stelle auf die Literatur verwiesen.^[72]

Mutationsstudien

Neben den strukturellen Informationen die auf den Kristallstrukturen basieren, sind mehrere Mutationsstudien verfügbar, so dass im Cph1 mehrere für die Photoconversion essentielle Aminosäuren identifiziert werden konnten. Die Notwendigkeit der kovalenten Anknüpfung des Chromophors für eine optimale Photokonversion konnte durch eine C259M und eine C259L Mutante gezeigt werden.^[73] Hier fand zwar eine Assemblierung des Chromophors statt und es entstand ein funktionales

¹Die im folgenden Absatz verwendete Nummerierung bezieht sich auf das PaBphP und unterscheidet sich vom Cph1.

Holoprotein, jedoch war dieser Vorgang deutlich verlangsamt und ebenso zeigten die UV/VIS-Spektren deutliche Unterschiede zum Wildtyp.

Auch die innerhalb der Phytochrome hoch konservierten Aminosäuren His-260 und Glu-189 sind für den Photozyklus von essentieller Bedeutung.^[73] Eine H260Q Mutante zeigt im physiologischen pH-Bereich kein verändertes Verhalten im Photozyklus, während bei erhöhtem pH-Wert (pH 9) die Photokonversion nicht mehr stattfindet. Dies ist in Übereinstimmung mit der Vermutung, dass die Imidazol Seitenkette des Histidins Einfluss auf die Protonierung des Chromophors hat.^[74] Die Mutation von Glu-189 zu Gln führt zum Verlust der Photoaktivität, was durch eine zum Wildtyp unterschiedliche Faltung des Proteins erklärt wird.^[73,75] Ähnlich schwerwiegend ist die Mutation von Tyr-176 im Cph1.^[75,76] Wird Tyr-176 gegen ein Histidin ausgetauscht, findet keine Photokonversion mehr statt und stattdessen fluoresziert das Protein nach Anregung mit Rotlicht. Da sich Tyr-176 in direkter Nachbarschaft von Ring D im PCB befindet, wird ein *gating*-Mechanismus von Tyr-176 während der Z/E-Isomerisierung vermutet.^[76]

Die fluoreszierenden Eigenschaften dieser speziellen Phytochrommutanten haben Shu *et al.* 2009 ausgenutzt, um das erste infrarotfluoreszierende Protein (IFP) zu entwickeln.^[77] Mit den IFPs ist ein weiteres System für bildgebende Verfahren, ähnlich dem der grünfluoreszierenden Proteine (GFP) verfügbar.^[78,79] Darüberhinaus führten die Erkenntnisse zu einem besseren Verständnis der Funktionsweise der Phytochrome.^[80]

Vergleicht man die am Cph1 gemachten Mutationsstudien mit denen an bakteriellen Phytochromen, werden zwei Dinge deutlich. Zum einen scheint die Annahme, dass der Mechanismus des Photozyklus innerhalb der Phytochromfamilie ähnlich verläuft richtig zu sein, zum anderen sind im Detail nicht zu vernachlässigende Unterschiede zu erkennen.

Ebenso wie in Cph1 erlaubt eine H260Q Mutante im bakteriellen Phytochrom DrBphP immer noch eine Photokonversion.^[81] In Agp1, einem bakteriellen Phytochrom aus *Agrobacterium tumefaciens*, führt eine Mutation des entsprechenden Histidins (H250A) dazu, dass der P_{fr}-Zustand nicht mehr ausgebildet werden kann.^[82]

Tyr-176 hat auch im DrBphP eine essentielle Rolle bei der Ausbildung des P_{fr}-Zustandes. Wie im Cph1 verhindert die Y176H-Mutante die Ausbildung des P_{fr}-Zustandes.^[81] Während das Tyrosin für den Photozyklus in bakteriellen und cyanobakteriellen Phytochromen gleichermaßen bedeutsam ist, scheint die Funktion während des Photozyklus in den beiden Klassen unterschiedlich zu sein. Im DrBphP wird nach Mutation des Tyrosin zu Histidin eine deutlich reduzierte und im bakteriellen Phytochrom von *Pseudomonas aruginosa* (PaBphP) gar keine Fluoreszenz beobachtet. Jedoch muss im Falle von PaBphP berücksichtigt werden, dass es sich hier um ein bakterielles Phytochrom mit einem P_{fr}/P_r-Photozyklus handelt.

3.2. Cyanobakteriochrome

Vor kurzem wurde für eine bis jetzt wenig untersuchte Untergruppe der Phytochrome, die Cyanobakteriochrome oder auch CBCRs, ein alternativer Photozyklus postuliert.^[83] CBCRs besitzen im Gegensatz zu den kanonischen Phytochromen und den Cph2-Sensoren nur eine einzelne GAF-Domäne in der photoaktiven Untereinheit.^[53] Als Chromophor wird ebenso wie bei den cyanobakteriellen Phytochromen meist PCB verwendet. Darüber hinaus nutzen die CBCRs auch andere Chromophore. So findet man zum Beispiel im cyanobakteriellen Phototaxis Regulator Protein TePixJ Phycoviolobilin (PVB) als Chromophor.^[84]

Aufgrund der geringen Größe der isolierten GAF-Domäne des cyanobakteriellen Phytochroms *SyB-Cph1* aus *Synechococcus* OSB' (PDB Code: 2K2N, 2KLI) konnte sowohl für den P_r - als auch den P_{fr} -Zustand eine Lösungs-NMR Struktur des bestimmt werden.^[83,85] Ebenso wie in Cph1 wird PCB als Chromophor verwendet und besitzt im P_r -Grundzustand eine ZZZssa Konfiguration. Im Gegensatz zu der bekannten P_{fr} -Kristallstruktur des PaBphP zeigt das PCB im P_{fr} -Zustand des *SyB-Cph1* keine Z/E-Isomerisierung um die C15-Doppelbindung. Vielmehr wird eine lichtinduzierte Rotation von Ring A um 90° beschrieben.

Eine Übertragung der Ergebnisse zum Photozyklus auf kanonische Phytochrome ist nicht möglich.^[62] Ob und inwieweit sich CBCRs in der Funktionsweise des Photozyklus von den kanonischen Phytochromen unterscheiden müssen weitere Untersuchungen zeigen.

Teil II.

Material und Methoden

4. Isolierung des freien Chromophors

Phycocyanobilin (PCB), als freier Chromophor in Lösung wurde unmarkiert, ^{15}N - als auch $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -isotopenmarkiert eingesetzt.

4.1. *Synechocystis* sp. PCC6803 Zellkultur

Die, für die Anzucht einer isotopenmarkierten *Synechocystis* sp. PCC6803 Zellkultur, verwendete Vorschrift wurde bereits im Detail von Strauss *et. al* beschrieben.^[63] Dementsprechend erfolgt die Beschreibung der Zellkultur in einer verkürzten Form.

^{15}N markierte Zellkultur

Für die Anzucht einer ^{15}N markierten Kultur wurden vier Liter BG11-Medium nach Vorschrift (Tabelle 4.1) in einer fünf Liter Schott DURAN[®] Flasche angesetzt.^[63] Das autoklavierte Medium wurde unter sterilen Bedingungen mit 10 mL einer sterilen unmarkierten *Synechocystis* sp. PCC6803 Kultur angeimpft.

Unter einem Abzug wurde die ^{15}N markierte Kultur mit normaler Umgebungsluft durch einen Sterilfilter (Pall Corporation Acro[®] 50, 0,2 μm PTFE, PN4251) mit einer handelsüblichen Pumpe (Beckmann DU[®] 520) begast und die Abluft ebenfalls durch einen Sterilfilter (Millipore, FG 0,2 μm , F2KN74458) abgeleitet.

Bei stetiger Beleuchtung (OSRAM FLUORA[®] L 18 W/77) erreichte die Kultur nach 3–4 Wochen einen stationären Zustand.

$^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ markierte Zellkultur

Der Ansatz einer vier Liter doppelt markierten Kultur erfolgte indem das $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ separat in einem Liter Reinstwasser gelöst und anschließend steril filtriert wurde (VWR PES 0,2 μm , Cat. Nr.: 87006-066). Die verbleibenden Inhaltsstoffe (Tabelle 4.1) wurden in drei Liter Reinstwasser gelöst und autoklaviert. Beide Lösungen wurden danach unter sterilen Bedingungen zusammengeführt und mit 10 mL einer unmarkierten *Synechocystis* sp. PCC6803 Kultur versetzt.

Die Kultur wurde in einer verschlossenen Flasche unter einem Abzug gerührt. Beide Kulturen erreichten nach 3–4 Wochen bei stetiger Beleuchtung (OSRAM FLUORA[®] L 18 W/77) einen stationären Zustand und konnten geerntet werden.

Tabelle 4.1.: Zusammensetzung des für die Anzucht von isotopenmarkiertem PCB modifiziertem BG11-Mediums.^[63] Alle Angaben sind Millimolar oder entsprechend gekennzeichnet.

	¹⁵ N	¹³ C und ¹⁵ N	Spurenelemente	
Na ¹⁵ NO ₃	17,700	17,700	H ₃ BO ₃	46,26
NaH ¹³ CO ₃	–	47,600	MnCl ₂	9,15
Na ₂ CO ₃	0,245	–	ZnSO ₄	0,772
CHES	–	60,000	Na ₂ MoO ₄	1,78
K ₂ HPO ₄	0,227	0,227	CuSO ₄	0,316
MgSO ₄	0,304	0,304	Co(NO ₃) ₂	0,17
CaCl ₂	0,245	0,245		
Zitronensäure	0,031	0,031		
Na ₂ -EDTA	0,0027	2,7 · 10 ⁻³		
Fe(III)ammoniumcitrat (C ₆ H ₈ O ₇ · x Fe · x H ₃ N)	6 · 10 ⁻³ g/L	6 · 10 ⁻³ g/L		
Spurenelemente	1 mL/L	1 mL/L		

4.2. Zellernte

Die Zellen der *Synechocystis* sp. Kultur wurden abzentrifugiert (4 °C, 6000 rpm, 15 min, Beckmann Avanti™ J-25) und in ca. 300 mL Kaliumphosphatpuffer (100 mM, pH 7,0, 5 mM EDTA) aufgenommen. Die Lösung wurde bei einem Druck von 21 500 psi homogenisiert (EmulsiFlex-C3 High Pressure Homogeniser (Avestin Inc., Ottawa, Canada)) und die Zellreste bei 4 °C und 10 000 rpm für 30 Minuten abzentrifugiert. Aus dem blauen Überstand wurden die Biliproteine mittels einer Ammoniumsulfatfällung (0,37 g/mL) ausgefällt. Die abzentrifugierten (4 °C, 5000 rpm, 20 min) Biliproteine wurden mit Methanol gewaschen. Dieser Vorgang wurde mehrmals wiederholt bis der Überstand nur noch wenig gefärbt war.

4.3. Aufreinigung des Chromophors

4.3.1. Methanolyse

Die Abspaltung des PCBs vom Protein erfolgte durch Methanolyse^[86] indem die ausgefallenen Biliproteine über Nacht bei 60 °C in Methanol gerührt wurden. Die methanolische PCB-Lösung wurde abfiltriert und die Methanolyse ein weiteres mal durchgeführt. Da der freie Chromophor in Lösung lichtempfindlich ist wurden ab der Methanolyse alle Schritte ausschließlich in grünem Licht durchgeführt.

4.3.2. Festphasenextraktion

Für die folgende Festphasenextraktion (SPE) wurde das Methanol am Rotationsverdampfer entfernt und das PCB in mindestens 5 mL einer Wasser/Methanol-Lösung (Verhältnis 1:1) aufgenommen. Das gelöste PCB wurde auf die mit Methanol (10 mL) equilibrierte SPE-Säule (Waters Sep-Pak[®] Plus C18 Cartridges (WAT020515)) aufgetragen und diese mit 10 mL destilliertem Wasser gewaschen. Eluiert wurde der Chromophore schlussendlich mit 2-3 mL Methanol (HPLC-Qualität). Für die folgende HPLC-Reinigung wurde die Lösung zu Aliquoten von 1 mL in Reaktionsgefäße gefüllt und das Methanol in einer Vakuumzentrifuge entfernt.

4.3.3. HPLC-Reinigung

Das PCB wurde in einem Milliliter ACN/Wasser-Gemisch (Verhältnis 1:1) gelöst und 500 µL auf eine mit 27 % ACN und 73 % K_nPO_4 equilibrierte Umkehrphasen (RP)-Säule von Macherey & Nagel (5 µm EC250/10 NUCLEODUR[®] Sphinx) aufgetragen. PCB eluierte bei einer Flußrate von 3 mL/min bei einer Retentionszeit von 25 Minuten. Detektiert wurde über das UV/VIS-Maximum des freien Chromophores bei 689 nm.

Als HPLC-Anlage wurde die Hewlett-Packard Serie 1100, ausgerüstet mit einem manuellen Injektor (G1328A, Ser. Nr.: DE54000938), einer binären Pumpe (G1312A, Ser. Nr.: DE70301173), einem Entgaser (G1322A, Ser. Nr.: JP63205468) und einem Säulenofen (G1316A, Ser. Nr.: DE64302680) verwendet. Die Absorptionsspektren wurden mit einem Diodenarraydetektor (DAD) (G1315A, Ser. Nr.: DE6302193) über einen Bereich von 250-800 nm aufgezeichnet.

4.4. Präparation von unmarkiertem PCB

Unmarkiertes PCB wurde aus *Spirulina platensis* Tabletten (Concept Vitalprodukte, Best.-Nr.: 9hpr2500) gewonnen, in dem diese in destilliertem Wasser gelöst und die festen Zellbestandteile abzentrifugiert (6000 rpm, 4 °C, 15 min) wurden. Die Proteine im Überstand wurden durch eine Ammoniumsulfatfällung (0,37 g/mL) ausgefällt. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Niederschlag mehrmals mit kaltem Methanol gewaschen.

Die weitere Aufarbeitung erfolgte nach der in Abschnitt 4.3 beschriebenen Vorschrift.

5. NMR-Spektroskopie

Für die Lösungs-NMR Messungen am freien Chromophor wurden Proben in d_3 -Methanol, d_6 -DMSO sowie d_{18} -HMPT hergestellt. Da das freie PCB in Lösung lichtempfindlich ist wurden alle Arbeiten in grünem Licht durchgeführt.

5.1. NMR-Spektrometer

Für die NMR-Messungen standen drei 600 MHz Geräte (DRX600, AV600, AV600) zur Verfügung.

5.2. Probenpräparation

5.2.1. freier Chromophor

Für eine NMR-Probe wurden 250 (41 mmol L^{-1}) bzw. 500 nmol (82 mmol L^{-1}) PCB in 0,6 mL deuteriertem Lösungsmittel gelöst. Um eine Protonierung der vier Pyrrolstickstoffe zu gewährleisten wurde eine geringe Menge (ein bis zwei Kristalle) *p*-Toluolsulfonsäure (*p*-TsOH) hinzugegeben. Die so hergestellte Probe wurde unter Lichtausschluß in das Spektrometer überführt.

5.2.2. Proteinproben

Die Herstellung der Cph1- und Agp1-Proteinproben erfolgte nach einer von Lamparter *et al.* beschriebenen Prozedur.^[87,88] Für die Deuterierung der Proteine wurden die entsprechenden Bestandteile des Mediums in D_2O gelöst oder, falls als Hydrat vorliegend, lyophilisiert und anschließend wieder wieder in D_2O gelöst. Die Assemblierung des Chromophors in das Apo-Protein erfolgte ebenso nach einem bereits beschriebenen Verfahren.^[73,88]

Details zu der Präparation der Agp1-C20A- und Cph1-C259A-Mutanten ist der Literatur zu entnehmen.^[71]

5.3. NMR-Experimente

5.3.1. Experimente ohne Lösungsmittelunterdrückung

¹H von Phycocyanobilin

Gerät: DRX600	Pulsprogramm: Standard Bruker zg
Lösungsmittel: HMPT, DMSO	Markierungsmuster: ¹³ C ¹⁵ N
Parameter: td = 8 192	ns = 32 ds = 4 swh = 10 000 Hz
O1 = 3 600 Hz	d1 = 1,3 s

Prozessiert wurde mit 32 768 Datenpunkten und einem quadratischen Sinus als Apodisierungsfunktion (SSB = 2).

DQF-COSY von Phycocyanobilin

Gerät: AV600	Pulsprogramm: MFdqfcosy
Lösungsmittel: HMPT	Markierungsmuster: unmarkiert
Parameter: td = 4 096	td1 = 512 ns = 16 ds = 4
swh = 10 000 Hz	O1 = 2 820 Hz O2 = 2 820 Hz in0 = 120 µs
d1 = 1,3 s	

Gerät: AV600	Pulsprogramm: MFdqfcosy
Lösungsmittel: DMSO	Markierungsmuster: unmarkiert
Parameter: td = 4 096	td1 = 512 ns = 8 ds = 4
swh = 10 000 Hz	O1 = 3 600 Hz O2 = 3 600 Hz in0 = 120 µs
d1 = 1,3 s	

Prozessiert wurde mit $4\,096 \times 1\,024$ Datenpunkten und einem quadratischen Sinus als Apodisierungsfunktion (SSB = 2).

¹³C-HMQC von Phycocyanobilin

Gerät: AV600	Pulsprogramm: MFhmqceaf2
Lösungsmittel: HMPT, DMSO	Markierungsmuster: unmarkiert
Parameter: td = 1 024	td1 = 512 ns = 32 ds = 4
swh = 10 000 Hz	O1 = 3 600 Hz O2 = 12 000 Hz in0 = 41,67 µs
d1 = 1,3 s	

Prozessiert wurde mit $4\,096 \times 1\,024$ Datenpunkten und einem quadratischen Sinus als Apodisierungsfunktion (SSB = 2).

¹³C-HMBC von Phycocyanobilin

Gerät: AV600 Pulsprogramm: hsqcetgpnoSp
 Lösungsmittel: HMPT Markierungsmuster: ¹³C¹⁵N
 Parameter: td = 4 096 td1 = 1 024 ns = 128 ds = 2
 swH = 10 000 Hz O1 = 3 600 Hz O2 = 15 000 Hz in0 = 32 µs
 d1 = 1,3 s

Prozessiert wurde mit $4\,096 \times 2\,048$ Datenpunkten und einem Sinus als Apodisierungsfunktion in der direkten und einem quadratischen Sinus als Apodisierungsfunktion in der indirekten Dimension (SSB = 2).

¹⁵N-HMQC von Phycocyanobilin

Gerät: DRX600 Pulsprogramm: pFhmqceaf3
 Lösungsmittel: HMPT, DMSO Markierungsmuster: ¹³C¹⁵N
 Parameter: td = 4 096 td1 = 256 ns = 4 ds = 4
 swH = 10 000 Hz O1 = 3 600 Hz O2 = 9 000 Hz in0 = 540 µs
 d1 = 1,3 s

Für die Kohlenstoffkopplung wurde in der Mitte der Evolutionszeit ein zusätzlicher 180° Kohlenstoffpuls verwendet. Prozessiert wurde mit $8\,192 \times 1\,024$ Datenpunkten und einem quadratischen Sinus als Apodisierungsfunktion in der direkten (SSB = 2) und indirekten Dimension (SSB = 4).

NOESY von Phycocyanobilin

Gerät: AV600 Pulsprogramm: MFnoesy
 Lösungsmittel: HMPT, DMSO Markierungsmuster: unmarkiert
 Parameter: td = 4 096 td1 = 512 ns = 16 ds = 4
 swH = 10 000 Hz O1 = 3 600 Hz O2 = 10 000 Hz in0 = 100 µs
 d1 = 1,3 s

Das Spektrum wurde mit einer NOESY-Mischzeit von 100 ms und für das Spektrum in aufgenommen. Prozessiert wurde mit $4\,096 \times 2\,048$ Datenpunkten und einem quadratischen Sinus als Apodisierungsfunktion in der direkten und indirekten Dimension (SSB = 2).

¹³C-HSQC-NOESY von Phycocyanobilin

Gerät: AV600	Pulsprogramm: hsqcetgpno sp		
Lösungsmittel: HMPT	Markierungsmuster: ¹³ C ¹⁵ N		
Parameter: td = 2 048	td1 = 512	ns = 32	ds = 16
swh = 10 000 Hz	O1 = 3 600 Hz	O2 = 12 500 Hz	in0 = 40 µs
d1 = 1,3 s			

Prozessiert wurde mit $4\,096 \times 1\,024$ Datenpunkten und einem quadratischen Sinus als Apodisierungsfunktion (SSB = 4).

HNC von Phycocyanobilin

Gerät: DRX600	Pulsprogramm: mrhnc		
Lösungsmittel: HMPT, DMSO	Markierungsmuster: ¹³ C ¹⁵ N		
Parameter: td = 1 024	td1 = 512	ns = 8	ds = 4
swh = 10 000 Hz	O1 = 3 600 Hz	O2 = 15 000 Hz	O3 = 9 000 Hz
in0 = 107,53 µs	d1 = 1,3 s		

Auf dem Kohlenstoffkanal wurden nicht selektive 90° Pulse und adiabatische Chirp Pulse verwendet. Details und grafische Darstellung in Abbildung 6.3 auf Seite 49. Prozessiert wurde mit $2\,048 \times 1\,024$ Datenpunkten und einem quadratischen Sinus als Apodisierungsfunktion in der indirekten Dimension (SSB = 2).

HNCRELAY von Phycocyanobilin

Gerät: DRX600	Pulsprogramm: mrhncrelay		
Lösungsmittel: HMPT, DMSO	Markierungsmuster: ¹³ C ¹⁵ N		
Parameter: td = 1 024	td1 = 512	ns = 32	ds = 4
swh = 10 000 Hz	O1 = 3 600 Hz	O2 = 15 000 Hz	O3 = 9 000 Hz
in0 = 28,8 µs	d1 = 1,3 s		

Auf dem Kohlenstoffkanal wurden nicht selektive 90° Pulse und adiabatische Chirp Pulse verwendet. Details und grafische Darstellung in Abbildung 6.3 auf Seite 49. Prozessiert wurde mit $2\,048 \times 1\,024$ Datenpunkten und einem quadratischen Sinus als Apodisierungsfunktion in der indirekten Dimension (SSB = 2).

HCC von Phycocyanobilin

Gerät: DRX600 Pulsprogramm: `mrhcc`
 Lösungsmittel: HMPT, DMSO Markierungsmuster: $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$
 Parameter: `td = 1 024` `td1 = 512` `ns = 32` `ds = 4`
 `swh = 10 000 Hz` `O1 = 3 600 Hz` `O2 = 12 000 Hz` `O3 = 9 000 Hz`
 `in0 = 28,8 μs` `d1 = 1,3 s`

Auf dem Kohlenstoffkanal wurden nicht selektive 90° Pulse und adiabatische Chirp Pulse verwendet. Details und grafische Darstellung in Abbildung 6.3 auf Seite 49. Prozessiert wurde mit $2\,048 \times 1\,024$ Datenpunkten und einem quadratischen Sinus als Apodisierungsfunktion in der direkten (SSB = 2,5) und indirekten Dimension (SSB = 2). Anschließend wurden Projektionen (negativ und positiv) vom Rauschen erzeugt und vom Spektrum abgezogen um das t_1 -Rauschen zu verringern.

INADEQUATE von Phycocyanobilin

Gerät: AV600 Pulsprogramm: `mrinadph`
 Lösungsmittel: HMPT Markierungsmuster: $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$
 Parameter: `td = 32 768` `td1 = 452` `ns = 224` `ds = 0`
 `swh = 45 454 Hz` `O1 = 15 000 Hz` `O2 = 15 000 Hz` `in0 = 18 μs`
 `d1 = 2,0 s`

Gerät: AV600 Pulsprogramm: `mrinadph`
 Lösungsmittel: DMSO Markierungsmuster: $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$
 Parameter: `td = 32 768` `td1 = 512` `ns = 192` `ds = 0`
 `swh = 45 454 Hz` `O1 = 15 000 Hz` `O2 = 15 000 Hz` `in0 = 18 μs`
 `d1 = 2,0 s`

Gerät: AV600 Pulsprogramm: `mrinadph`
 Lösungsmittel: MeOH Markierungsmuster: $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$
 Parameter: `td = 32 768` `td1 = 455` `ns = 224` `ds = 0`
 `swh = 45 454 Hz` `O1 = 3 111 Hz` `O2 = 3 111 Hz` `in0 = 18 μs`
 `d1 = 2,0 s`

Prozessiert wurde mit $8\,192 \times 1\,024$ Datenpunkten und einer Exponentialfunktion (HMPT: LB = 3 Hz, DMSO: LN = 5 Hz) in der direkten und einem quadratischen Sinus als Apodisierungsfunktion in der indirekten Dimension (SSB = 2). Das so prozessierte Spektrum war phasensensitiv. Für die Aufnahme des INADEQUATE-Spektrums in Methanol wurden O1 und O2 ungünstig gewählt. Eine Auswertung des Spektrums war dennoch möglich.

5.3.2. Experimente mit Lösungsmittelunterdrückung

Für eine optimale Lösungsmittelunterdrückung wurde der Offset direkt auf das Signal des Methanols platziert und anschließend ein 1D- ^1H -Spektrum mit Vorsättigung aufgenommen. Es erfolgte eine anschließende weitere Optimierung indem der das Integral des stetig aufgenommenen FIDs empirisch durch weitere kleine Veränderung des Offsets möglichst weit minimiert wurde. Der so bestimmte Offset wurde dann für die Experiment mit 3-9-19-WATERGATE und 1-1-ECHO Lösungsmittelunterdrückung übernommen.

DQF-COSY-presat von Phycocyanobilin

Gerät:	AV600	Pulsprogramm:	MFdqfcosypre	
Lösungsmittel:	MeOH	Markierungsmuster:	unmarkiert	
Parameter:	td = 4 096	td1 = 1 024	ns = 16	ds = 8
	swh = 10 000 Hz	O1 = 3 062 Hz	O2 = 3 062 Hz	in0 = 120 μs
	d1 = 1,3 s			

Prozessiert wurde mit $4\,096 \times 1\,024$ Datenpunkten und einem quadratischen Sinus als Apodisierungsfunktion (SSB = 2).

^{13}C -HSQC-watergate von Phycocyanobilin

Gerät:	AV600	Pulsprogramm:	MFhsqcwtgf2	
Lösungsmittel:	MeOH	Markierungsmuster:	$^{13}\text{C}^{15}\text{N}$	
Parameter:	td = 1 024	td1 = 256	ns = 16	ds = 4
	swh = 10 000 Hz	O1 = 3 052 Hz	O2 = 12 000 Hz	in0 = 41,66 μs
	d1 = 1,3 s			

Prozessiert wurde mit $2\,048 \times 1\,024$ Datenpunkten und einem quadratischen Sinus als Apodisierungsfunktion (SSB = 2).

^{15}N -HSQC-11ECHO von Phycocyanobilin

Gerät:	AV600	Pulsprogramm:	MFhmqc11echof3	
Lösungsmittel:	MeOH	Markierungsmuster:	$^{13}\text{C}^{15}\text{N}$	
Parameter:	td = 1 024	td1 = 256	ns = 8	ds = 2
	swh = 10 000 Hz	O1 = 3 052 Hz	O2 = 9 000 Hz	in0 = 200 μs
	d1 = 1,3 s			

Als 1-1-ECHO-Delay wurden 60 μs verwendet. Prozessiert wurde mit $4\,096 \times 2\,048$ Datenpunkten und einem quadratischen Sinus als Apodisierungsfunktion (SSB = 3 in der direkten und SSB = 2 in der indirekten Dimension).

HNC-11ECHO von Phycocyanobilin

Gerät: AV600 Pulsprogramm: mrhnc.11echo
 Lösungsmittel: MeOH Markierungsmuster: $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$
 Parameter: $td = 1024$ $td1 = 256$ $ns = 32$ $ds = 4$
 $swh = 10\,000\text{ Hz}$ $O1 = 3\,062\text{ Hz}$ $O2 = 23\,000\text{ Hz}$ $in0 = 48\ \mu\text{s}$
 $d1 = 1,3\text{ s}$

Als 1-1-ECHO-Delay wurden $60\ \mu\text{s}$ verwendet. Prozessiert wurde mit $4\,096 \times 2\,048$ Datenpunkten und einem quadratischen Sinus als Apodisierungsfunktion (SSB = 2).

HNCRELAY-11ECHO

Gerät: AV600 Pulsprogramm: mrhncrelay11echo
 Lösungsmittel: MeOH Markierungsmuster: $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$
 Parameter: $td = 1024$ $td1 = 512$ $ns = 192$ $ds = 4$
 $swh = 10\,000\text{ Hz}$ $O1 = 3\,041\text{ Hz}$ $O2 = 16\,500\text{ Hz}$ $in0 = 40\ \mu\text{s}$
 $d1 = 1,3\text{ s}$

Als 1-1-ECHO-Delay wurden $60\ \mu\text{s}$ verwendet. Prozessiert wurde mit $4\,096 \times 2\,048$ Datenpunkten und einem quadratischen Sinus als Apodisierungsfunktion (SSB = 2).

CH₃AROM-11ECHO

Gerät: AV600 Pulsprogramm: mrch3arom11echo
 Lösungsmittel: MeOH Markierungsmuster: $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$
 Parameter: $td = 1024$ $td1 = 256$ $ns = 128$ $ds = 4$
 $swh = 10\,000\text{ Hz}$ $O1 = 3\,050\text{ Hz}$ $O2 = 2\,000\text{ Hz}$ $in0 = 220\ \mu\text{s}$
 $d1 = 1,3\text{ s}$ $cnst21 = 18\,000$ $cnst22 = 0\text{ Hz}$

Als 1-1-ECHO-Delay wurden $60\ \mu\text{s}$ verwendet. Es wurden selektive Square-Pulse auf dem Kohlenstoffkanal verwendet, wobei $p10$ mit einem Offset von $+18\,000\text{ Hz}$ und $p12$ von $-18\,000\text{ Hz}$ ausgeführt wurde. $cnst21$ und $cnst22$ stellen einen entsprechenden Frequenzsprung für die Evolutionszeit sicher. Prozessiert wurde mit $4\,096 \times 2\,048$ Datenpunkten und einem quadratischen Sinus als Apodisierungsfunktion (SSB = 2).

5.3.3. Protein-NMR-Experimente

Agp1-M15 – P_r

Gerät: AV900 Pulsprogramm: Fnoesy11echo
 Lösungsmittel: D₂O Markierungsmuster: –
 Parameter: td = 4 096 td1 = 512 ns = 256 ds = 4
 swh = 20 000 Hz O1 = 4 232 Hz O2 = 4 232 Hz in0 = 60 μs
 d1 = 1,3 s

Als Mischzeit wurden 50 ms verwendet. Prozessiert wurde mit $4\,096 \times 2\,048$ Datenpunkten und einer Gauss-Funktion in der direkten Dimension (LB = -30 Hz, GB = 0,05) und einem quadratischen Sinus (SSB = 2) in der indirekten Dimension.

Agp1-M15-C2oA –P_r

Gerät: AV900 Pulsprogramm: Fnoesy11echo
 Lösungsmittel: H₂O Markierungsmuster: –
 Parameter: td = 2 048 td1 = 640 ns = 128 ds = 4
 swh = 20 000 Hz O1 = 4 232 Hz O2 = 4 232 Hz in0 = 60 μs
 d1 = 1,3 s

Gerät: AV900 Pulsprogramm: MFnoesypre
 Lösungsmittel: D₂O Markierungsmuster: –
 Parameter: td = 4 096 td1 = 512 ns = 176 ds = 8
 swh = 15 015 Hz O1 = 4 239 Hz O2 = 4 239 Hz in0 = 80 μs
 d1 = 1,3 s

Als Mischzeit wurden 50 ms verwendet. Prozessiert wurde mit $4\,096 \times 2\,048$ Datenpunkten und einer Gauss-Funktion in der direkten Dimension (LB = -40 Hz, GB = 0,1) und einem quadratischen Sinus (SSB = 3) in der indirekten Dimension.

Gerät: AV900 Pulsprogramm: Fhmqc11echof3
 Lösungsmittel: H₂O Markierungsmuster: ¹⁵N
 Parameter: td = 2 048 td1 = 256 ns = 96 ds = 2
 swh = 20 000 Hz O1 = 4 231 Hz O2 = 649 Hz in0 = 100 μs
 d1 = 1,3 s

Prozessiert wurde mit $4\,096 \times 2\,048$ Datenpunkten und einer Gauss-Funktion in der direkten Dimension (LB = -20 Hz, GB = 0,1) und einem quadratischen Sinus (SSB = 2) in der indirekten Dimension.

Cph1Δz – P_r

Gerät: AV900	Pulsprogramm: Fnoesy11echo		
Lösungsmittel: H ₂ O	Markierungsmuster: ² H		
Parameter: td = 2 048	td1 = 512	ns = 192	ds = 4
swh = 20 000 Hz	O1 = 4 233 Hz	O2 = 4 233 Hz	in0 = 60 μs
d1 = 1,3 s			

Gerät: AV900	Pulsprogramm: Fnoesypr		
Lösungsmittel: D ₂ O	Markierungsmuster: ² H		
Parameter: td = 8 192	td1 = 900	ns = 176	ds = 2
swh = 15 151 Hz	O1 = 4 237 Hz	O2 = 4 237 Hz	in0 = 80 μs
d1 = 1,3 s			

Als Mischzeit wurden 50 ms verwendet. Prozessiert wurde mit $4\,096 \times 2\,048$ Datenpunkten und einer Gauss-Funktion in der direkten und indirekten Dimension (LB = -20 Hz, GB = 0,05).

Gerät: AV900	Pulsprogramm: MFhmqc11echof3		
Lösungsmittel: H ₂ O	Markierungsmuster: ² H ¹⁵ N		
Parameter: td = 2 048	td1 = 256	ns = 32	ds = 4
swh = 20 000 Hz	O1 = 4 232 Hz	O2 = 11 000 Hz	in0 = 100 μs
d1 = 1,3 s			

Prozessiert wurde mit $4\,096 \times 2\,048$ Datenpunkten und eine quadratischen Sinus (SSB = 2) in der direkten und indirekten Dimension.

Cph1Δz – P_{fr}

Gerät: AV900	Pulsprogramm: Fnoesy11echo		
Lösungsmittel: H ₂ O	Markierungsmuster: ² H		
Parameter: td = 2 048	td1 = 512	ns = 224	ds = 4
swh = 20 000 Hz	O1 = 4 233 Hz	O2 = 4 233 Hz	in0 = 54 μs
d1 = 1,3 s			

Gerät: AV900	Pulsprogramm: Fnoesypr		
Lösungsmittel: D ₂ O	Markierungsmuster: ² H		
Parameter: td = 8 192	td1 = 900	ns = 176	ds = 2
swh = 16 8325 Hz	O1 = 4 240 Hz	O2 = 4 240 Hz	in0 = 80 μs
d1 = 1,3 s			

Als Mischzeit wurden 50 ms verwendet. Prozessiert wurde mit $4\,096 \times 2\,048$ Datenpunkten und einer Gauss-Funktion in der direkten (LB = -20 Hz, GB = 0,05) und einem

quadratischen Sinus (SSB = 2) in der indirekten Dimension.

Gerät: AV900 Pulsprogramm: MFhmqc11echof3
Lösungsmittel: H₂O Markierungsmuster: ²H¹⁵N
Parameter: td = 2048 td1 = 256 ns = 64 ds = 4
 swh = 20 000 Hz O1 = 4 232 Hz O2 = 11 000 Hz in0 = 100 µs
 d1 = 1,3 s

Prozessiert wurde mit 4096 × 2048 Datenpunkten und eine quadratischen Sinus (SSB = 2) in der direkten und indirekten Dimension.

Cph1Δ2-C259A – P_r

Gerät: AV900 Pulsprogramm: Fnoesypr
Lösungsmittel: D₂O Markierungsmuster: ²H
Parameter: td = 406 td1 = 400 ns = 640 d1 = 1,3 s
 swh = 15 150 Hz in0 = 80 µs

Als Mischzeit wurden 50 ms verwendet.

Teil III.

Ergebnisse und Diskussion

6. Zuordnung von PCB in Lösung mittels Tripelresonanzspektren

Phycocyanobilin (PCB) ist nicht nur wegen seiner Funktion innerhalb der Phytochrome von Interesse. Seine Struktur mit relativ wenigen Protonen und seine hohe Symmetrie machen es zu einem anspruchsvollen Molekül für die NMR-Spektroskopie. Klassische Zuordnungsstrategien über COSY-, HMQC- und HMBC-Spektren sind bei solchen Molekülen durch die fehlenden Protonen-Protonen-Kopplungen und einer Signalüberlappung aufgrund der hohen Symmetrie häufig schwierig oder gänzlich unmöglich.

Aus diesen Gründen wurden für die Zuordnung der Signale von PCB in Lösung Tripelresonanzexperimente in Anlehnung an Experimenten aus der Protein-NMR erstellt. Dabei wurde das zu untersuchende (Lösungsmittel-)System so gewählt, dass PCB möglichst in einer Konformation vorliegt, die dem proteingebundenen Zustand ähnelt.

6.1. Lösungsmittelsystem

Einen elementaren Einfluss auf die Struktur des PCB in Lösung haben die Wahl des Lösungsmittels und der Protonierungsstatus des PCB. Für eine methanolische Lösung von PCB wurde von Knipp *et al.* eine helikale Struktur bestimmt.^[89] Wird in Methanol gelöstes PCB protoniert, scheint die helikale Struktur aufgrund des nun positiv geladenen Systems benachteiligt zu sein.^[90] Falk *et al.* untersuchten Bilatriene in HMPT mit UV/VIS- und NMR-Spektroskopie. Als Ergebnis zeigte sich für solche Systeme eine eher gestreckte Konformation.^[4]

Eine gestreckte Konformation sollte PCB in unseren Experimenten auch einnehmen, um die Situation im Protein (für Cph1: ZZZssa bzw. ZZEssa)^[2] bestmöglich nachzuvollziehen. Aufgrund der Ergebnisse von Falk *et al.* wurde daher HMPT als Lösungsmittel gewählt.

6.1.1. Hexamethylphosphorsäuretriamid (HMPT)

Hexamethylphosphorsäuretriamid, auch Hexamethylphosphorsäuretriamid oder Tris(dimethylamino)phosphinoxid, $OP(N(CH_3)_2)_3$, als HMPT oder im englischen Raum auch des öfteren als HMPA abgekürzt, ist ein farbloses, organisches, aprotisches

Lösungsmittel (Abbildung 6.1). Als Hexamethyl-substituiertes Triamid der Orthophosphorsäure fällt es vor allem durch sein großes elektrisches Dipolmoment und hohe Basizität auf. Letzteres wird durch die hohe Elektronendichte am Sauerstoffatom, welche eine Folge der stark polarisierten P–O-Bindung ist, hervorgerufen. Dies hat zur Folge, dass HMPT als Lösungsmittel über die freien Elektronenpaare am Sauerstoff partielle Elektronendichte an eine Lewis-Säure abgeben kann.^[91] Bei der Aufnahme von NMR-Spektren in HMPT kann dies zu einer Hochfeldverschiebung der Signale führen.

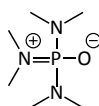


Abbildung 6.1.: Strukturformel von Hexamethylphosphorsäuretriamid (HMPT).

HMPT ist nur leicht toxisch (DL = 6 g/kg, Ratte), jedoch wird es wegen seiner sehr hohen Kanzerogenität (Gruppe III A 2 MAK-Werte-Liste 1996) auch als *liquid cancer* bezeichnet.

Aufgrund der gegebenen elektronischen Struktur ist HMPT als Lösungsmittel in der Lage die Struktur von Bilinen und somit auch PCB zu beeinflussen. Dabei kommt es zu einer Überkompensation der intramolekularen Wasserstoffbrücken im Bilin durch intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen zum Lösungsmittel.^[4]

Für die Aufnahme der NMR-Spektren wurde vollständig deuteriertes d_{18} -HMPT eingesetzt.

6.1.2. DMSO und Methanol

Als weitere Lösungsmittelsysteme wurden Dimethylsulfoxid (DMSO) und Methanol gewählt. Dies sind zwei häufig in der NMR-Spektroskopie eingesetzte Lösungsmittel. Beide Lösungsmittel wurden ebenfalls in ihrer deuterierten Form verwendet.

Während DMSO wie HMPT ein aprotisches Lösungsmittel ist, handelt es sich bei Methanol um ein protisches Lösungsmittel. Da PCB an allen vier Stickstoffen der Pyrrolringe austauschbare Protonen besitzt, muss Methanol dementsprechend als d_3 -Methanol eingesetzt werden, bei dem nur die Methylgruppe deuteriert ist. Würde die Hydroxylgruppe ebenfalls deuteriert sein, könnten die Protonen der Pyrrolstickstoffe durch den Austausch nicht mehr detektiert werden.

Durch das vorhandene Proton am d_3 -Methanol musste bei allen Experimente mit diesem Lösungsmittel eine entsprechende Lösungsmittelunterdrückung eingesetzt werden (Abschnitt 6.2.4).

6.1.3. Protonierungszustand des Phycocyanobilins

Wie oben ausgeführt, wird eine gestreckte Konformation des PCB durch Protonierung aller vier Pyrrolstickstoffe bevorzugt. Um eine Protonierung aller Stickstoffe sicherzustellen, wurde der Probe *p*-Toluolsulfonsäure (*p*-TsOH) hinzugefügt.

p-Toluolsulfonsäure gehört zu den starken organischen Säuren mit einem pK_a -Wert von ungefähr 0,7. Die Wahl fiel auf *p*-TsOH, da es in allen drei verwendeten Lösungsmitteln löslich ist und durch den niedrigen pK_a -Wert schon bei sehr geringen Konzentrationen von einer vollständigen Protonierung des Chromophors ausgegangen werden kann. Durch die niedrige Konzentration der *p*-TsOH sollen die zusätzlichen Signale in den NMR-Spektren möglichst unterdrückt werden.

6.2. Zuordnungsstrategie mittels Tripelresonanzspektren

Für die Etablierung einer Zuordnungsstrategie mittels Tripelresonanzspektren wurde ^{13}C - und ^{15}N -markiertes PCB eingesetzt. Dieses wurde aus *Synechocystis sp.* PCC6803-Cyanobakterien gewonnen, welche in entsprechend markiertem Medium angezogen wurden.

Unmarkiertes PCB wurde aus kommerziell erhältlichen *Spirulina platensis* Tabletten gewonnen und für die Aufnahme der COSY-, HMQC- und HMBC-Spektren verwendet.

6.2.1. Isolierung von hochreinem Phycocyanobilin

Während der Methanolyse (siehe Kapitel 4.3.1, S. 30) von PCB aus Cph1 fallen methylierte Nebenprodukte an. Für die NMR-Experimente muss PCB jedoch in hochreiner Form vorliegen, um eindeutige Signale zu erhalten. Dementsprechend wurde nach der Methanolyse eine Festphasenextraktion durchgeführt, der ein weiterer Reinigungsschritt mittels HPLC folgte.

Aufgrund der nur minimalen Änderung im Wechselwirkungspotential durch die Einführung der Methylgruppe ist der Trennvorgang nicht trivial. Jedoch konnte durch den Einsatz einer phenylgruppenmodifizierten RP18-Säule (Macherey & Nagel (5 μm EC250/10 NUCLEODUR[®] Sphinx) eine Basislinientrennung zur semipräparativen Reinigung erreicht werden. Die Details des HPLC-Laufes sind dem Material und Methoden-Teil zu entnehmen (Kapitel 4.3.3, S. 31).

6.2.2. Unmarkierter Chromophor

Ursprünglich sollte die Zuordnung des PCB über DQF-COSY, ^{13}C -HMQC und ^{13}C -HMBC Standardexperimente erfolgen. Jedoch konnte so nur eine partielle Zuordnung erreicht werden.

Mit Hilfe des DQF-COSY, des ^{13}C -HMQC (Abbildung 6.2a und b) und des ^{13}C -HMBC konnten die Seitenketten der Ringe A und D (2, 2¹, 3¹, 3², 18¹ und 18²) zugeordnet werden, die restlichen Protonen jedoch nicht. Der Grund hierfür liegt in den fast identischen chemischen Verschiebungen der Methylgruppen. Damit ist es nicht mehr möglich, die Signale im Spektrum zu unterscheiden. Außerdem zeigen die isolierten Methinbrücken keine Protonen-Protonen-Kopplungen mehr.

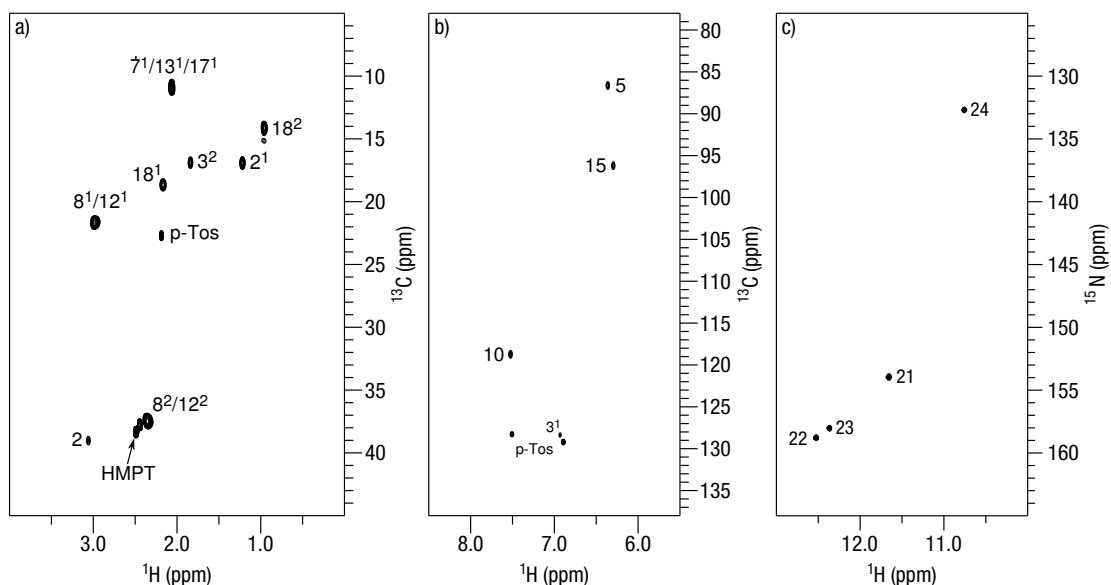


Abbildung 6.2.: ^{13}C -HMQC- (a und b) und ^{15}N -HMQC-Spektrum (c) von PCB. Das ^{15}N -HMQC wurde mit doppelt markiertem PCB aufgenommen. a) Aliphatische Region des ^{13}C -HMQC, b) Aromatische Region des ^{13}C -HMQC.

Eine Zuordnung der Kohlenstoffatome mittels des ^{13}C -HMBC war durch die sehr ähnlichen chemischen Verschiebungen innerhalb der Pyrrolringe ebenso nicht vollständig möglich. Aufgrund der hohen Molekülsymmetrie des PCB war dies jedoch zu erwarten gewesen.

6.2.3. Isotopenmarkierter Chromophor

Aufgrund der geschilderten Schwierigkeiten, aber auch im Hinblick auf die Strukturbestimmung mittels gekreuzkorrelierter Relaxationsexperimente wurden Tripelresonanzexperimente in Anlehnung an Standard Protein-NMR-Experimente für die Zuordnung entwickelt.^[92] Dabei wurde ausgenutzt, dass im PCB genauso wie in Proteinen eine H–N–C-Einheit existiert. Dementsprechend konnten Experimente wie das HNCA oder HNCOCA als Vorlage dienen.^[93]

Während in Proteinen die beiden zum Stickstoff benachbarten Kohlenstoffatome NMR-spektroskopisch durch ihre deutlich unterschiedliche chemische Verschiebung

gut differenziert werden können, verhält es sich im PCB nicht so. In den Ringen A und D ist analog zum Protein eine Carbonylgruppe und ein aromatisches Kohlenstoffatom an den Pyrrolstickstoff gebunden. Dies ist in den Ringen B und C anders. Dort ist keine Carbonylgruppe vorhanden und eine Unterscheidung beider Kerne anhand der chemischen Verschiebung nicht mehr möglich. Dementsprechend wurde in den Pulsprogrammen auf die Verwendung von selektiven Pulsen verzichtet. Stattdessen wurden nicht-selektive 90° -Rechteckpulse verwendet.

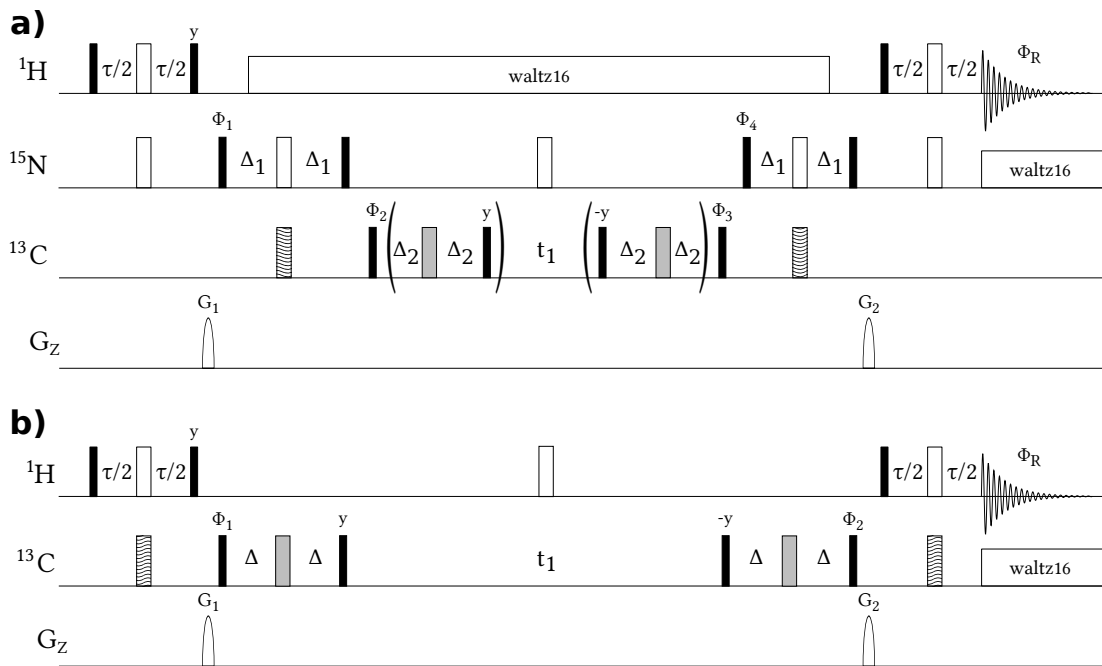


Abbildung 6.3.: Pulssequenzen für die Zuordnung von PCB. 90° -Pulse sind als schwarze, 180° -Pulse durch weiße Kästen repräsentiert. Kästen mit einem Wellenmuster sind *smoothed* Chirp-Pulse mit einer Bandbreite von 60 000 Hz und einer Dauer von 500 μs . Graue Rechtecke repräsentieren *smoothed composite* Chirp Pulse mit einer Bandbreite von 60 000 Hz und einer Dauer von 2000 μs . Soweit nicht anders angegeben, kommen alle Pulse aus der x-Richtung. Quadraturdetektion in t_1 und t_2 wurde über States-TPPI verwirklicht. G_1 und G_2 sind Gradienten mit einer Sinus-Form, einer Stärke von 25 G cm^{-1} bzw. 30 G cm^{-1} und einer Länge von 1 ms. a) Pulssequenzen der HNC- und HNCRELAY-Experimente. Der Teil innerhalb der Klammern ist nur im HNCRELAY vorhanden. Folgender Phasenzyklus wurde verwendet $\Phi_1 = 4x, 4(-x), \Phi_2 = x, -x, \Phi_3 = 8x, 8(-x), \Phi_4 = 2x, 2(-x), \Phi_R = x, -x, -x, x$. Die Zeit Δ_1 wurde auf $1/(8J_{\text{NC}}) = 8,3 \text{ ms}$ ($J_{\text{NC}} = 15 \text{ Hz}$), Δ_2 auf $1/(8J_{\text{CC}}) = 2,1 \text{ ms}$ ($J_{\text{CC}} = 60 \text{ Hz}$) und τ auf $1/(2J_{\text{HN}}) = 2,75 \text{ ms}$ ($J_{\text{HN}} = 90 \text{ Hz}$) gesetzt. b) Pulssequenz des HCC Experimentes. Der Phasenzyklus wurde folgendermaßen gewählt: $\Phi_1 = x, -x, \Phi_2 = 2x, 2(-x), \Phi_R = x, -x$. Abstand Δ_1 wurde auf $1/(8J_{\text{CC}}) = 1,75 \text{ ms}$ ($J_{\text{CC}} = 70 \text{ Hz}$) und τ auf $1/(2J_{\text{HC}}) = 3,5 \text{ ms}$ ($J_{\text{HC}} = 140 \text{ Hz}$) gesetzt.

Im ersten Schritt wurden mit dem HNC-Experiment (Abbildung 6.3a) die direkt an

die Pyrrol Stickstoffe gebundenen Kohlenstoffe detektiert. Das resultierende Spektrum ist in Abbildung 6.4a dargestellt. Grundvoraussetzung für dieses Experiment ist eine vollständige Protonierung aller Stickstoffatome im PCB. Die Protonierung konnte mit dem ^{15}N -HMQC bestätigt werden. (Abbildung 6.2c).

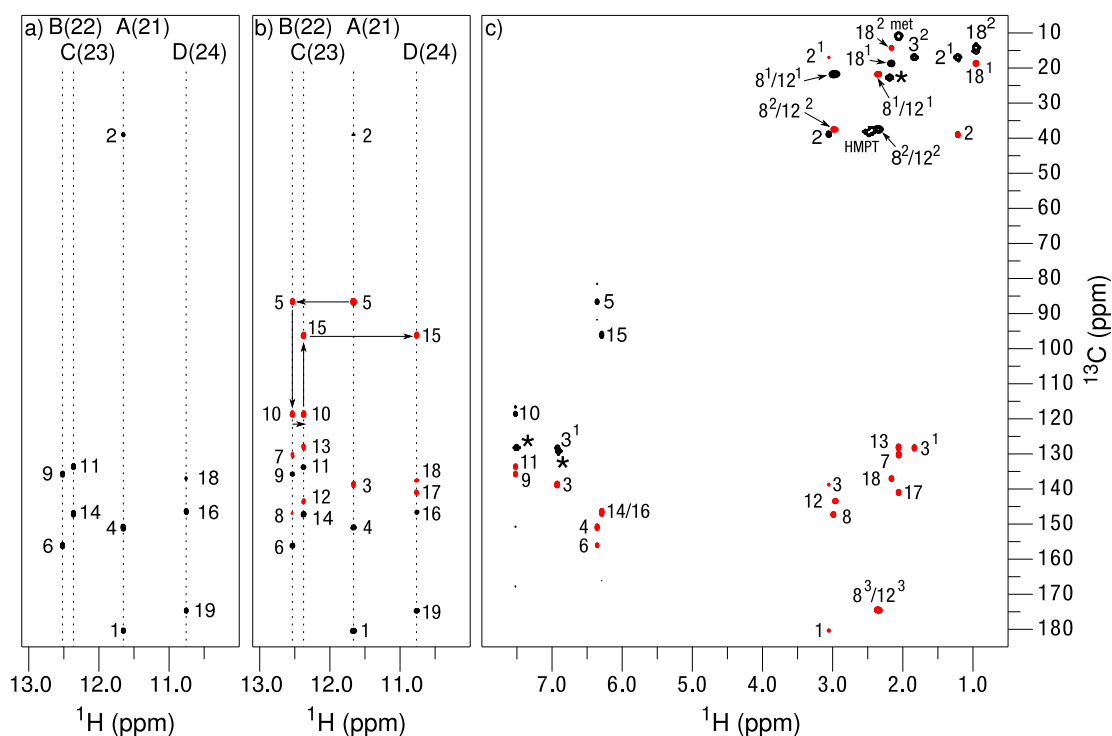


Abbildung 6.4.: Tripelresonanzspektren zur Zuordnung von PCB. a) HNC: Die chemischen Verschiebungen der Stickstoffprotonen H21 bis H24 (Ringe A bis D) sind durch gestrichelte Linien gekennzeichnet. b) HNCRELAY: Alle weiteren Kohlenstoffe der Pyrrolringe und der Methinbrücken sind zusätzlich zu den Signalen im HNC sichtbar. Die Relay-Signale können durch ihr entgegengesetztes Vorzeichen identifiziert werden (rot). Eine Zuordnung der Ringe A bis D ist über einen *sequential walk* möglich (angedeutet mit den Pfeilen). c) HCC: Korrelationen von kohlenstoffgebundenen Protonen. Relay-Signale können durch das entgegengesetzte Vorzeichen der Signale identifiziert werden (rot). Die Signale der Methylgruppen an Position 7¹, 13¹ und 17¹ können nicht aufgelöst werden und sind mit »met« gekennzeichnet.

Eine Zuordnung der Signale im HNC ist mit diesem Spektrum alleine nicht möglich. Jedoch können durch die eindeutige chemische Verschiebung der Carbonylkohlenstoffatome (180 ppm) die Ringe A und D identifiziert werden. Weiterhin sind neben den acht zu erwartenden Signalen (C1, C4, C6, C9, C11, C14, C16, C19) C2 und C18 sichtbar. Dies kann dadurch erklärt werden, dass die $^2\text{J}_{\text{CN}}$ -Kopplungskonstante über das Carbonylkohlenstoffatom groß genug ist, um zu einem Signal zu führen. Eine vergleichbare Situation wird in Proteinen im HNCA ausgenutzt.

Im nächsten Experiment, dem HNCRELAY, wurde ein zusätzlicher Relay-Schritt eingeführt (Abbildung 6.3a), welcher die Detektion des gesamten Kohlenstoffnetzwerks der Pyrrolringe inklusive der Methinbrücken ermöglicht. Für die Berechnung des Relay-Transfers wurde eine ${}^1J_{CC}$ -Kopplung von 60 Hz zu Grunde gelegt. Die Zeitspanne wurde mit $1/4J_{CC}$ (4,2 ms) so gewählt, dass während des Transfers möglichst wenig Signalintensität durch passive Kopplungen verloren geht. Im Spektrum (Abbildung 6.4b) sind alle zu erwartenden Signale sichtbar. Die Signale der direkt gebundenen Kohlenstoffatome stimmen im HNC und HNCRELAY überein. Zusätzlich können die Signale, die durch den Relay-Schritt hervorgerufen werden, durch das entgegengesetzt Vorzeichen im Spektrum identifiziert werden.

Das unterschiedliche Vorzeichen im Spektrum kann mit Hilfe des Produktoperatorformalismus erklärt werden.^[94] Dies soll beispielhaft am HCC gezeigt werden. Da der Zeitabschnitt τ auf $1/2J_{HC_1}$ gesetzt wurde, kann die Rechnung vereinfacht dargestellt werden. Für den INEPT-Block zum Magnetisierungstransfer vom Proton auf den Kohlenstoff C_1 ergibt sich folgendes:

$$\begin{aligned} H_x &\xrightarrow{90^\circ_{H_x}} -H_y \\ &\xrightarrow{\pi J_{HC_1} 2H_z C_{1z} \tau} 2H_x C_{1z} \\ &\xrightarrow[90^\circ_{C_x}]{90^\circ_{H_y}} 2H_z C_{1y} \end{aligned} \quad (6.1)$$

Während des folgenden Relay-Schrittes entwickelt sich die Kopplung zum nächsten Kohlenstoffatom C_2 . Da Δ auf $1/4J_{C_1C_2}$ gesetzt wurde, bleiben sowohl der cosinus- als auch der sinus-Term in der Rechnung erhalten.

$$2H_z C_{1y} \xrightarrow{\pi J_{C_1C_2} 2C_{1z} C_{2z} \Delta} 2H_z C_{1y} - 4H_z C_{1x} C_{2z} \quad (6.2)$$

Für die Pulse vor und nach der Evolutionszeit ergibt sich:

$$\begin{aligned} 2H_z C_{1y} - 4H_z C_{1x} C_{2z} &\xrightarrow{90^\circ_{C_y}} 2H_z C_{1y} + 4H_z C_{1z} C_{2x} \\ &\xrightarrow[\Omega_1 C_{1z} t_1]{\Omega_2 C_{2z} t_1} 2H_z C_{1y} \cos \Omega_1 t_1 \\ &\quad + 4H_z C_{1z} C_{2x} \cos \Omega_2 t_1 \\ &\xrightarrow{90^\circ_{C-y}} 2H_z C_{1y} \cos \Omega_1 t_1 \\ &\quad - 4H_z C_{1x} C_{2z} \cos \Omega_2 t_1 \end{aligned} \quad (6.3)$$

Im Anschluss an den nächsten Relay-Schritt bleiben die beiden folgenden relevanten Terme über.

$$2H_z C_{1y} \cos \Omega_1 t_1 - 4H_z C_{1x} C_{2z} \cos \Omega_2 t_1 \xrightarrow{\pi J_{C_1C_2} 2C_{1z} C_{2z} \Delta} \begin{aligned} &2H_z C_{1y} \cos \Omega_1 t_1 \\ &- 2H_z C_{1y} \cos \Omega_2 t_1 \end{aligned} \quad (6.4)$$

Daraus ergibt sich abschließend:

$$\begin{aligned}
 2H_z C_{1y} \cos \Omega_1 t_1 - 2H_z C_{1y} \cos \Omega_2 t_1 &\xrightarrow[90^\circ_{H_x}]{90^\circ_{C_x}} 2H_y C_{1z} \cos \Omega_1 t_1 \\
 &\quad - 2H_y C_{1z} \cos \Omega_2 t_1 \quad (6.5) \\
 &\xrightarrow{\pi J_{HC_1} 2HC_{1z} \tau} H_y \cos \Omega_1 t_1 \\
 &\quad - H_y \cos \Omega_2 t_1
 \end{aligned}$$

Durch das unterschiedliche Vorzeichen der beiden Terme besitzen auch die Signale im Spektrum unterschiedliche Vorzeichen.

Für die Zuordnung der Signale dient das Kohlenstoffatom an Position 2 als Startpunkt. Dabei handelt es sich um die CH-Gruppe im Ring A, welche sowohl durch ihre Verschiebung aber vor allem durch das ebenfalls im ^{13}C -HMQC vorhandene Signal eindeutig identifiziert werden kann. Somit kann ausgehend von Ring A und den leicht zu identifizierenden Signalen der Methinbrücken ein *sequential walk* durch alle Ringe gemacht werden (Pfeile in Abbildung 6.4b). Dementsprechend können alle Protonen- und Stickstoffverschiebungen der NH-Gruppen der Ringe A bis D zugeordnet werden. Weiterhin wird eine Zuordnung der Kohlenstoffe C1, C3, C4, C16 und C19 in Kombination mit dem HNC möglich.

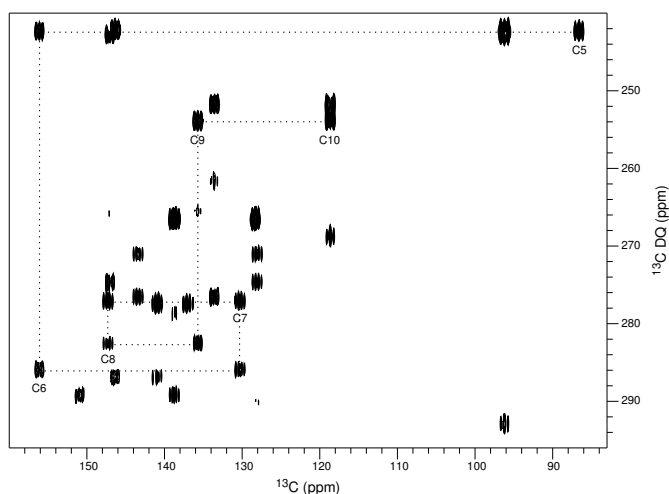


Abbildung 6.5.: 2D-INADEQUATE des ^{13}C uniform markiertem PCB. Es wurde exemplarisch ein Ausschnitt gewählt der die Verknüpfung von C5 bis C10 zeigt.

Mit Hilfe eines HCC (Abbildung 6.3b) können die Signale der Ringe B und C abschließend zugeordnet werden. Da die anzuregenden Kerne über einen großen Bereich von 180 ppm verteilt liegen, wurden anstatt der üblichen Rechteckpulse adiabatische Chirp-Pulse verwendet. Dabei wurden für die INEPT-Transfers einfache Chirp-Pulse

und für den Relay-Schritt *composite* Chirp-Pulse eingesetzt. Das resultierende Spektrum ist in Abbildung 6.4c zu sehen. Wieder zeigen direkt und über einen Relay-Schritt detektierte Kohlenstoffatome ein entgegengesetztes Vorzeichen. Hervorzuheben ist, dass eine Zuordnung der Kohlenstoffe der Positionen 14 und 16 trotz der sehr ähnlichen chemischen Verschiebung möglich ist. Ebenso sind die Carbonyle 8^3 und 12^3 der Propionsäureseitenketten zu erkennen. Während die fast identischen chemischen Verschiebungen der Protonen der Methylgruppen an Position 7^1 , 13^1 und 17^1 aufgrund ihrer Korrelation im HCC zu den Kohlenstoffen an Position 7, 13 und 17 bestimmt werden konnte können die chemischen Verschiebungen dieser Methylgruppenkohlenstoffe im HCC nicht bestimmt werden. Da diese ebenfalls sehr ähnlich sind reicht die Auflösung in der indirekten Dimension nicht aus um eine Zuordnung zu erhalten. Eine Zuordnung der Kerne der Propionsäureseitenketten ist nicht möglich.

Da PCB ^{13}C -uniform-markiert vorliegt, wurde ein 2D-INADEQUATE aufgenommen. Trotz der sehr gering konzentrierten Probe war es möglich, ein Spektrum mit gutem Signal zu Rausch-Verhältnis aufzunehmen (Abbildung 6.5). Aufgrund der Doppelquantendimension im INADEQUATE liegen die Signale der Methylgruppenkohlenstoffe an Position 7^1 , 13^1 und 17^1 nicht mehr, wie im HCC, direkt übereinander. Dies ermöglichte es, die chemische Verschiebung dieser Kohlenstoffe zu bestimmen. Die Kerne der Propionsäureseitenketten sind auch hier jedoch nicht unterscheidbar.

Mit Hilfe des HNC, HNCRELAY und des HCC ist eine einfache Zuordnung von PCB möglich. Auch wenn diese Strategie ^{13}C - und ^{15}N -markierte Proben voraussetzt, kann also in komplizierten Fällen wie PCB mit Hilfe von Tripelresonanzspektren eine Zuordnung erreicht werden.

6.2.4. Experimente mit Lösungsmittelunterdrückung

Eine vollständige Zuordnung der Signale konnte auch für PCB in methanolischer und DMSO-Lösung erreicht werden. Während für DMSO die gleichen Pulsprogramme verwendet werden konnten, war dies für Methanol nicht möglich. Der Grund hierfür ist, dass PCB vier austauschbare Protonen an den Pyrrolringen besitzt, die essentiell für die Funktionsweise der beschriebenen NMR-Experimente sind (Abschnitt 6.1.2). In d_4 -Methanol würden diese Protonen gegen Deuterium ausgetauscht werden und einen Magnetisierungstransfer verhindern.

Um dieses Problem zu umgehen, wurde d_3 -Methanol (CD_3OH) eingesetzt. Da das Hydroxylproton des Methanols eine Detektion des gering konzentrierten Chromophors nur schwer möglich machen würde, muss eine Lösungsmittelunterdrückung eingeführt werden. Die Wahl fiel dabei auf eine 1-1-ECHO-Sequenz. In Abbildung 6.6 ist die Pulssequenz des HNC/HNCRELAY-Experimentes inklusive der 1-1-ECHO-Sequenz gezeigt.

Die üblicherweise eingesetzten Lösungsmittelunterdrückungsmethoden wie die

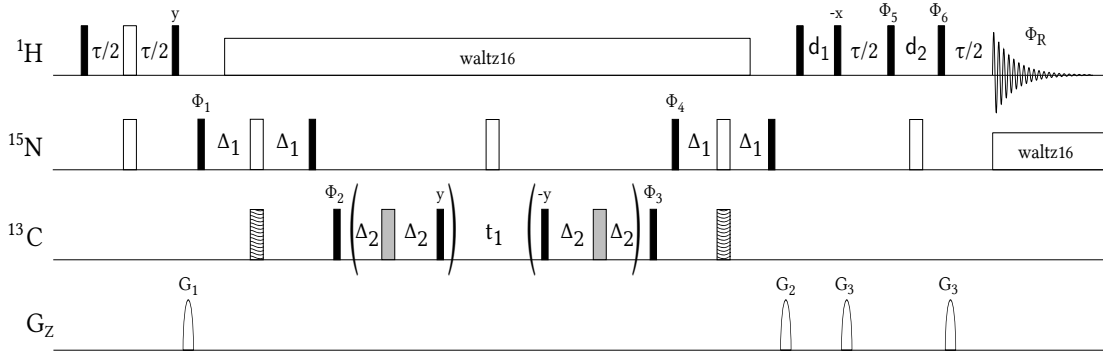


Abbildung 6.6.: Pulssequenzen für das HNC- als auch HNCRELAY-Experiment inklusive einer 1-1-ECHO Wasserunterdrückung. Der Teil innerhalb der Klammern ist nur im HNCRELAY vorhanden. 90° -Pulse sind durch schwarze, 180° -Pulse durch weiße Kästen repräsentiert. Kästen mit einem Wellenmuster sind *smoothed* Chirp Pulse mit einer Bandbreite von 60 000 Hz und einer Dauer von 500 μs . Graue Rechtecke repräsentieren *smoothed composite* Chirp-Pulse mit einer Bandbreite von 60 000 Hz und einer Dauer von 2000 μs . Soweit nicht anders angegeben, kommen alle Pulse aus der x-Richtung. Quadraturdetektion in t_1 und t_2 wurde über States-TPPI verwirklicht. G_1 und G_2 sind Gradienten mit einer Sinus-Form, einer Stärke von 35 G cm^{-1} bzw. 40 G cm^{-1} und einer Länge von 1 ms. G_3 und G_4 sind Gradienten mit einer Stärke von 30 G cm^{-1} und einer Länge von 200 μs . Folgender Phasenzklus wurde verwendet $\Phi_1 = 8x$, $8(-x)$, $\Phi_2 = x$, $-x$, $\Phi_3 = 16x$, $16(-x)$, $\Phi_4 = 4x$, $4(-x)$, $\Phi_5 = 2x$, $2y$, $2(-x)$, $2(-y)$, $\Phi_6 = 2(-x)$, $2(-y)$, $2x$, $2y$, $\Phi_R = x$, $-x$, $-x$, x , $2(-x$, x , x , $-x)$, x , $-x$, $-x$, x , $-x$, x , x , $-x$, $2(x$, $-x$, $-x$, $x)$, $-x$, x , x , $-x$. Die Zeit Δ_1 wurde auf $1/(8J_{\text{NC}}) = 8,3 \text{ ms}$ ($J_{\text{NC}} = 15 \text{ Hz}$), Δ_2 auf $1/(8J_{\text{CC}}) = 2,1 \text{ ms}$ ($J_{\text{CC}} = 60 \text{ Hz}$) und τ auf $1/(2J_{\text{HN}}) = 2,75 \text{ ms}$ ($J_{\text{HN}} = 90 \text{ Hz}$) gesetzt. Für eine optimale Lösungsmittelunterdrückung wurde d_1 auf 60 μs und d_2 auf 180 μs gesetzt.

Vorsättigung oder die 3-9-19-WATERGATE-Sequenz sind für die Detektion der Pyrrolprotonen von Nachteil. Die Methode der Vorsättigung unterdrückt neben dem Lösungsmittelsignal ebenso austauschbare Protonen, wie sie im PCB vorhanden sind. Die 3-9-19-WATERGATE-Methode besitzt im Bereich der Pyrrolprotonen ein ungünstiges Anregungsprofil.

Das Anregungsprofil der 1-1-ECHO-Sequenz, wie sie in der Gruppe implementiert ist, ist etwas breiter als das der 3-9-19-WATERGATE-Sequenz. Durch den Einsatz der 1-1-ECHO-Sequenz kann ohne eine weitere Optimierung der anderen Methoden eine optimale Anregung dieser Protonen gewährleistet werden.

7. Konformationelle Analyse von PCB in Lösung

Zur Bestimmung der Konformation von PCB in Lösung wurden zwei Strategien verfolgt. Zum einen sollten NOE-Daten ausgewertet, zum anderen Tripelresonanzexperimente zur Bestimmung von kreuzkorrelierten Korrelationen aufgenommen werden.^[5,6]

Dabei wurde angenommen, dass der Chromophor nach der HPLC-Reinigung dieselbe ZZZ-Konfiguration an den Doppelbindungen hat, wie im Cph1 P_r-Grundzustand. Damit eine lichtinduzierte Reaktion an den Doppelbindungen ausgeschlossen werden kann, wurde unter Lichtausschluss bzw. unter Grünlicht gearbeitet.

Weiterhin besitzen im PCB alle vier Pyrrolringe eine planare Struktur. Bei den Ringen B, C und D ist dies eine direkte Folge der Aromatizität, während Ring A nicht aromatisch ist. Allerdings besitzt das Kohlenstoffatom an Position 4 eine sp²-Konfiguration. Dementsprechend liegen die Kerne C3, C4, C5 und N21 in einer Ebene. Das gleiche gilt für die Kerne C2, C1, O1' und N21, da das Carbonylkohlenstoffatom an Position 1 ebenfalls sp²-hybridisiert ist. Ring A muss somit nicht zwangsweise vollkommen planar sein. Im Weiteren wird Einfachheit halber von keiner größeren Abweichung aller Kerne aus der Ebene von Ring A ausgegangen.

Auch wenn die Strukturformel von PCB (Abbildung 7.1b) suggeriert, dass an den Methinbrücken eine lokalisierte Doppelbindung vorliegt, so ist dies durch das konjugierte π -System nicht der Fall. Dennoch ist eine gewisse freie Drehbarkeit der C-C-Bindungen in den Methinbrücken gegeben. Dies ist deutlich an der Struktur des PCBs in der Kristallstruktur von Cph1 in der P_r-Form zu erkennen.^[2]

Mit diesen Annahmen wird das System soweit vereinfacht, dass es ausreicht, die Lage der Ringe zueinander zu bestimmen, um eine Struktur von PCB in Lösung zu bestimmen.

7.1. Nomenklatur

Zur weiteren Diskussion wird ein von der IUPAC vorgeschlagenes System zur Beschreibung der Konformation der Alkylkette verwendet.^[95] Dabei wird der dihedrale Winkel θ zwischen den beiden Kernen mit der höchsten Priorität nach Cahn-Ingold-Prelog betrachtet.^[96,97]

Stehen die beiden Kerne direkt gegenüber ($\theta = 0^\circ$), so wird diese Position als *syn* bezeichnet. Ein Winkel von 180° beschreibt die *anti*-Position. Weiterhin wird der Kreis in 4 Bereiche aufgeteilt. Man unterscheidet dabei zwischen +synperiplanar (+sp),

+synclinal (+sc), -anticlinal (-ac), -antiperiplanar (-ap) (Abbildung 7.1a).

Möchte man zum Beispiel die Konformation der Bindung zwischen C14 und C15 beschreiben, so muss als erstes nach Cahn-Ingold-Prelog die Priorität der an die Doppelbindung gebundenen Kerne bestimmt werden. Dementsprechend bestimmen N23 und C16 die Konformation. Beide Kerne stehen sich gegenüber, die Bindung besitzt somit eine *anti*-Konformation (Abbildung 7.1c, links). In Abbildung 7.1c (rechts) stehen dieselben Kerne -anticlinal zueinander.

Die Konformation kann mittels NOE-Daten nur schwer beantwortet werden. Eindeutig ist eine ZZZsss- von einer ZZZssa-Konformation durch eine zu erwartende starke NOE-Wechselwirkung zwischen der Methylgruppe C17' und dem Proton H15 an der Methinbrücke zu unterscheiden. Diese Unterscheidung kann mit Sicherheit jedoch nur für eine *syn*- oder *anti*-Konformation getroffen werden. Eine feinere Abstufung ist nicht möglich. Mit Hilfe von kreuzkorrelierten Kopplungen ist man jedoch in der Lage, diese Unterscheidung zu treffen.

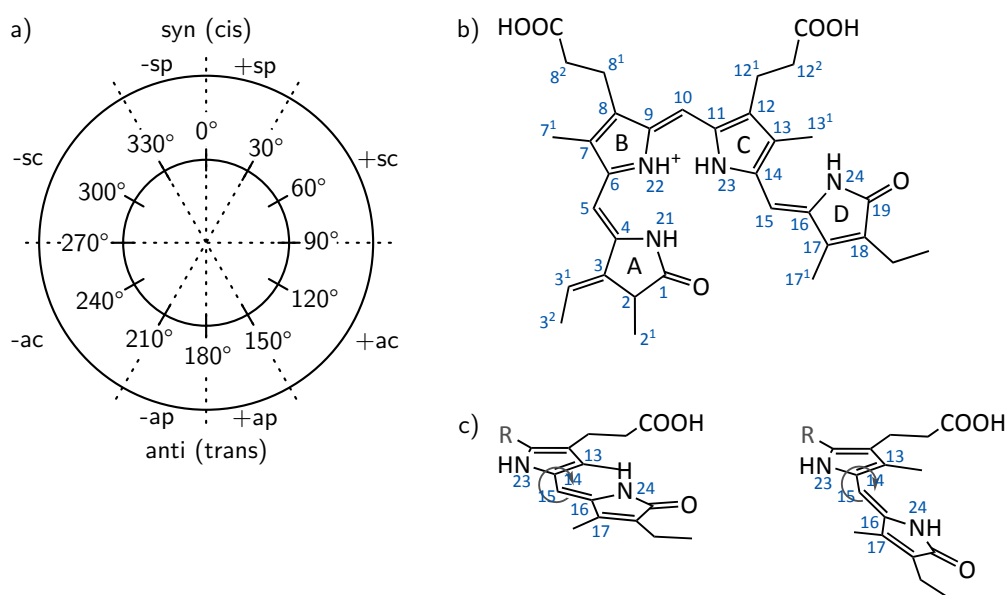


Abbildung 7.1.: a) Syn-anti Terminologie zur Beschreibung verschiedener konformationeller Regionen. *sp*, synperiplanar; *sc*, synclinal; *ap*, antiperiplanar; *ac*, anticlinal. b) Strukturformel von PCB frei in Lösung. c) Zwei mögliche Konformationen an der Einfachbindung der Methinbrücke zwischen Ring C und D. Links: *anti*; Rechts: -*ac*

7.2. Spektroskopische Untersuchungen

7.2.1. UV/VIS Spektroskopie

Wie bereits in Kapitel 6.1 ausgeführt, wird als Arbeitshypothese eine eher gestreckte Konformation von PCB in einer HMPT-Lösung angenommen. Untersuchungen dazu wurden bereits 1985 von Falk *et al.* unter anderem mit Hilfe der UV/VIS-Spektroskopie durchgeführt.^[4]

Biline besitzen zwei charakteristische Absorptionsmaxima bei ca. 390 nm und 690 nm. Intensität und Wellenlänge der Maxima hängen dabei von der vorliegenden elektronischen Struktur und somit auch von der Konformation des Bilinmoleküls ab. Eine hypsochrome Verschiebung der langwelligen Bande sowie eine Verkleinerung des Verhältnisses E_{UV}/E_{VIS} der beiden Absorptionsmaxima sind dabei charakteristisch für eine gestrecktere Konformation eines Bilin-Moleküls in Lösung. Diese Untersuchungen erfolgten unter anderem an Aeotobiliverdin-IV- γ . Zum Vergleich der Konformationen wurden Messungen in Tetrachlormethan CCl_4 und HMPT durchgeführt.

In dieser Arbeit wurde an Stelle von Aeotobiliverdin PCB untersucht. Während die Grundstruktur unverändert ist, besitzt PCB zwei zusätzliche Propionsäuregruppen an den Ringen B und C sowie eine unterschiedliche Seitenkettenkonfiguration an den Ringen A und D. Bei den Propionsäureseitenketten ist davon auszugehen, dass diese wesentlichen Einfluss auf die Struktur des gesamten PCB-Moleküls in Lösung nehmen. Weiterhin war in der Arbeit von Falk *et al.* das Bilin nicht an allen Pyrrolstickstoffen protoniert. Die zusätzliche, über das Molekül delokalisierte Ladung wird ebenfalls für die Struktur in Lösung ausschlaggebend sein.

Um einen ersten Eindruck vom Verhalten des Systems zu erhalten, wurden die UV/VIS-Spektren von protoniertem und unprotoniertem PCB in HMPT verglichen (Abbildung 7.2). Die Protonierung erfolgte durch die Zugabe einer geringen Menge *p*-TsOH. Die erhaltenen Spektren wurden auf das Absorptionsmaximum E_{UV} normiert. Wie in Abbildung 7.2 zu sehen, findet bei der Zugabe von *p*-TsOH eine deutliche hypsochrome Verschiebung von E_{VIS} statt. Ebenso ist eine Verkleinerung des Verhältnisses E_{UV}/E_{VIS} von 1,97 auf 1,17 festzustellen. Beide Punkte weisen auf eine Veränderung der elektronischen Verhältnisse nach der Zugabe von *p*-TsOH hin. Dieses ist jedoch durch die Einführung der positiven Ladung zu erwarten gewesen, vor allem da HMPT als aprotisches Lösungsmittel nicht zu einer Kompensation der Ladung beitragen kann. Dies kann primär nur durch die Ausbildung eines Sulfonats, Bildung von Dimeren sowie Multimeren oder konformationelle Veränderungen geschehen.

Ob und in welchem Maße die beobachteten Veränderungen im UV/VIS-Spektrum auf eine konformationelle Veränderung zurückzuführen sind, sollte durch weitere NMR-Experimente untersucht werden.

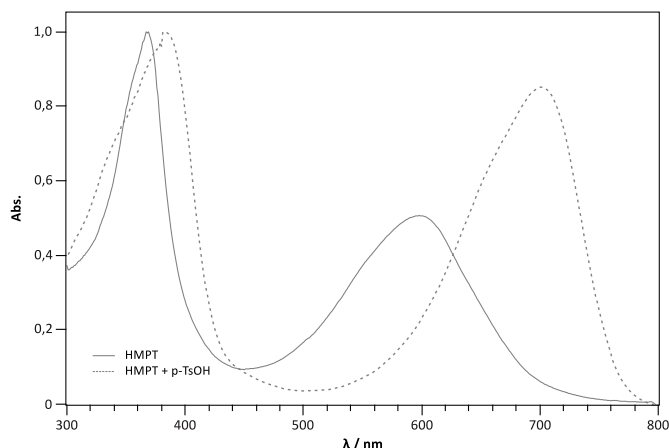


Abbildung 7.2.: UV/VIS-Spektren von PCB in HMPT mit und ohne *p*-TsOH. Nach der Zugabe von *p*-TsOH ist eine deutliche Veränderung des Verhältnisses von E_{UV}/E_{VIS} zu beobachten.

7.2.2. Skalare Kopplungen

Konformationelle Veränderungen im PCB könnten über Veränderungen der dihedralen Winkel der Methinbrücken zwischen einzelnen Pyrrolringen detektiert werden.

Für die Bestimmung dieser dihedralen Winkel liegt es nahe, eine Analyse von vicinalen Protonen-Protonen-Kopplungen durchzuführen. Diese erstmals von M. Karplus vorgestellte Methode liefert aufgrund der konformationellen Abhängigkeit dieser 3J -Kopplung den dihedralen Winkel zwischen den beiden koppelnden Protonen.^[98–100]

Jedoch ist diese Methode nicht am PCB anwendbar, da die Methinbrückenprotonen an Position 5, 10 und 15 keine vicinale Kopplung zu einem anderen Proton aufweisen. Selbst wenn ein geeignetes System z. B. zur Bestimmung der $^3J_{H,C}$ -Kopplung gefunden werden könnte, so fehlt zur Interpretation der Daten eine sogenannte Karplus-Kurve. Diese Karplus-Kurve beschreibt mathematisch den Zusammenhang zwischen Kopplung und dihedralem Winkel und ist für die Gruppe der Biline nicht bekannt.

7.2.3. RDC-Messungen

Eine weitere Möglichkeit zur Strukturbestimmung besteht in der Messung der restlichen dipolaren Kopplung (*residual dipolar coupling*, RDC). Während in einer isotropen Lösung der dipolare Anteil einer Kopplung nicht messbar ist, so kann dieser Anteil durch das Herstellen einer anisotropen Lösung sichtbar gemacht werden. Diese anisotropen Lösungen werden üblicherweise durch die Zugabe eines Alignmentmediums, meist ein Polymer, zur Lösung erreicht. Geschieht dies bei konstantem Volumen, so führt das Aufquellen des Polymers dazu, dass die Freiheitsgrade der Moleküle eingeschränkt werden und eine anisotrope Lösung entsteht. Neben dem beschriebenen

Verfahren kann eine anisotrope Lösung ebenso durch die Zugabe von Bakteriophagen oder mit Hilfe eines flüssigkristallinen Systems hergestellt werden.

Der nun messbare Anteil der dipolaren Kopplung einer Bindung besitzt eine Winkelabhängigkeit zum äußeren Magnetfeld. Somit kann die Orientierung der Bindung zum äußeren Magnetfeld bestimmt werden. Da dieser Winkel mit relativ hoher Genauigkeit bestimmt werden kann, ist die Messung von RDCs zu einer wichtigen Methode für die Strukturaufklärung von Proteinen aber auch kleinen Molekülen geworden.^[101-103]

Voraussetzung ist jedoch, dass ein geeignetes Alignmentmedium für das verwendete Lösungsmittel existiert. Während Bakteriophagen ausschließlich für wässrige Systeme geeignet sind, wurden flüssigkristalline als auch Gel-artige Alignmentmedia auf eine Kompatibilität mit HMPT hin untersucht.

Als flüssigkristallines System wurde poly- γ -benzyl-D-glutamat (PBDG) getestet.^[104] Weiterhin wurden folgende Gele auf die Quellbarkeit in HMPT hin untersucht:

- PH-poly Dimethylacrylamidgel (PH-PDMAA)^[105]
- poly(acrylonitril) (PAN)^[106]
- poly(methylmetacrylate) (PEG-PMMA)^[106]
- PEO-MDI poly(ethylenoxide) 4,4'-methylenediphenyl diisocyanate
- PEO- γ poly(ethylenoxid)

Keines der genannten Systeme bildete mit HMPT eine anisotrope Lösung, die für eine Messung von RDCs geeignet gewesen wäre. Aus diesem Grund musste sich die konformationelle Analyse von PCB in HMPT auf die Auswertung von NOE-Wechselwirkungen und der Aufnahme von kreuzkorrelierten Kopplungen beschränken.

7.2.4. NOE-Wechselwirkungen

Wechselwirkungen die auf dem Nuclear Overhauser Effekt (NOE) beruhen, eignen sich zur Bestimmung intermolekularer Kontakte. Dementsprechend sind sie eine häufig genutzte Methode zur Aufklärung von dreidimensionalen Strukturen größerer Moleküle. Vor allem für die Bestimmung von Proteinstrukturen ist die Auswertung von NOE-Wechselwirkungen von herausragender Bedeutung.

Wie bereits in Kapitel 2.2.3 erwähnt, handelt es sich bei dem Nuclear Overhauser Effekt um eine Dipol-Dipol-Wechselwirkung. Aufgrund der Abstandsabhängigkeit (r^{-6}) der Dipol-Dipol-Wechselwirkungen ist ein NOE nur über kurze Abstände wirksam. Allerdings besteht ein Zusammenhang zwischen der gemessenen Signalintensität und dem Abstand der beiden koppelnden Kerne.

Im PCB können $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -NOE-Wechselwirkungen vor allem Aufschluss darüber geben, ob eine gestreckte oder eine helikale Konformation in Lösung vorliegt. Bei einer

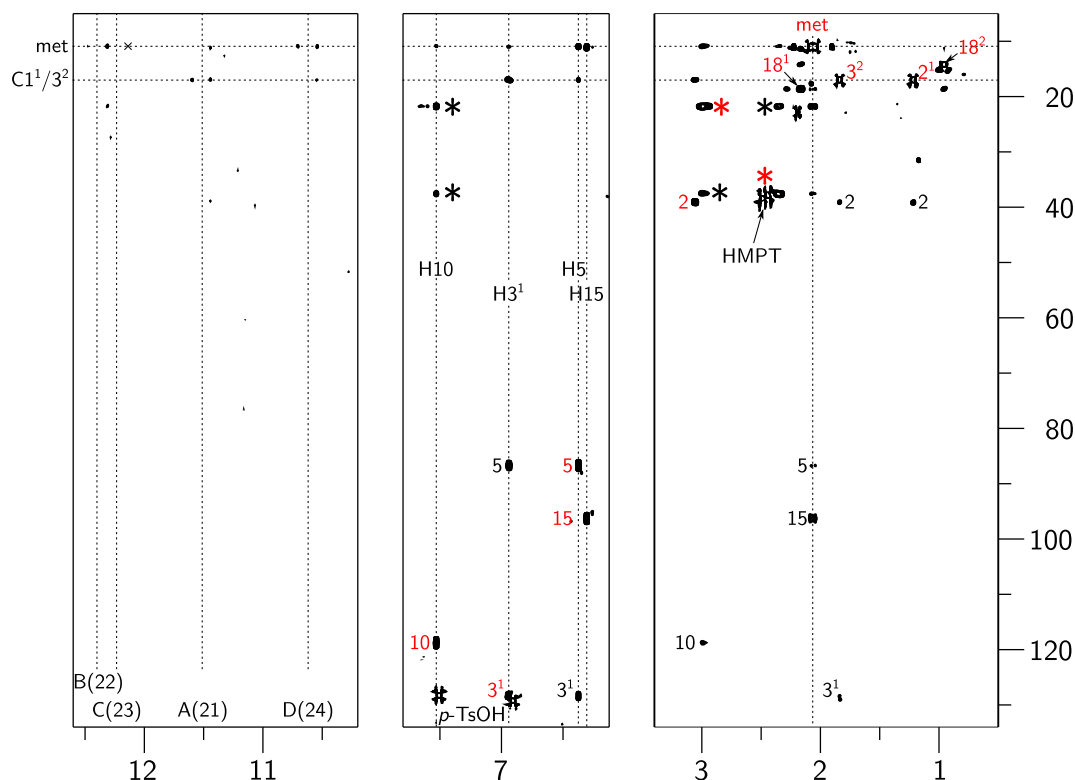


Abbildung 7.3.: HSQC-NOESY von $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -markiertem PCB in d_{18} -HMPT. Signale, die denen im ^{13}C -HMQC entsprechen, sind rot markiert. Eine detaillierte Diskussion ist dem Text zu entnehmen.

helikalen Struktur wären Kreuzsignale zwischen den Seitenkettenprotonen der Ringe A und D zu erwarten.

In Abbildung 7.3 ist ein $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HSQC-NOESY mit einer Mischzeit von 300 ms gezeigt. Wie zu erwarten, zeigen die Seitenkettenprotonen eines Ringes deutliche NOE-Wechselwirkungen zu ihren direkten Nachbarn. Zum Beispiel zeigt das Proton in Position 2 (Ring A) deutliche Kreuzsignale zu den Protonen an den Positionen 3^1 und 3^2 . Strukturelle Informationen sind an dieser Stelle jedoch nicht enthalten.

Diese könnte man aus den Korrelationen der Methylgruppen an Position 7^1 , 13^1 und 17^1 mit den Methinbrückenprotonen an Position 5 und 15 erhalten. Ist zum Beispiel die $\text{C}_5\text{-C}_6$ -Einfachbindung *syn*-konfiguriert (wie in Abbildung 7.1b gezeigt), so stehen sich das Methinbrückenproton H5 und die Methylgruppe an Position 7^1 direkt gegenüber. Der Abstand ist klein und eine entsprechend intensive NOE-Wechselwirkung ist zu erwarten. Ist die selbe Bindung *anti*-konfiguriert ist der Abstand zwischen H5 und der Methylgruppe an Position 7^1 maximal und die NOE-Wechselwirkung entsprechend

klein oder gar nicht mehr im Spektrum sichtbar.

Abbildung 7.3 zeigt deutliche Kreuzsignale ausgehend von den Methylgruppen 7^1 , 13^1 und 17^1 »met« zu den Methinbrückenprotonen an Position 5 und 15. Die Methylgruppe an Position 7^1 besitzt eine recht intensive Wechselwirkung zum Methinbrückenproton H5. Somit ist eine *syn* Konformation der C_5 - C_6 -Einfachbindung wahrscheinlicher. Über die Konformation der C_{14} - C_{15} -Einfachbindung kann anhand des NOEs keine Aussagen getroffen werden, da eine Unterscheidung zwischen den Methylgruppen an Position 13^1 und 17^1 aufgrund der fehlenden Auflösung in der indirekten Dimension nicht möglich ist.

Interessanterweise zeigen sowohl das Proton an Position 3^1 als auch das Methinbrückenproton H10 Korrelationen zu den drei genannten Methylgruppen. Aufgrund des intramolekularen Abstandes der Kerne zueinander ist diese Wechselwirkung nicht zu erwarten gewesen. Eine Erklärung könnte die sogenannte Spin-Diffusion bieten, bei der die Magnetisierung ausgehend von der Methylgruppe an Position 7^1 über das Methinbrückenproton H5 hin zum Proton an Position 3^1 übertragen werden kann.

Ebenso können erste Informationen aus den Korrelationen der Protonen an Position 8^1 und 12^1 zum Methinbrückenproton H10 gewonnen werden. Beide CH_2 -Gruppen zeigen eine gleich intensive Korrelation zum Proton H10 (mit einem Stern markierte Signale im mittleren Ausschnitt in Abbildung 7.3). Geht man von einer *Z*-konfigurierten C_9 - C_{10} -Doppelbindung aus, deutet diese Korrelation auf eine *syn*-konfigurierte C_{10} - C_{11} -Einfachbindung hin. Nichtsdestotrotz muss man bedenken, dass die Proton-Proton Abstandsänderungen während der Drehung um eine Bindung der Methinbrücken relativ gering sind. Dementsprechend klein können die Veränderungen der Signalintensitäten im Spektrum sein.

Während die Unterscheidung zwischen einer *syn*- und einer *anti*-Konformation möglich wird, ist dies, wie bereits weiter oben beschrieben, für die Zwischenstufen nicht mehr der Fall. Der Abstand zwischen dem Methinbrückenproton H5 und der Methylgruppe an Position 7^1 ist zum Beispiel bei einer +anticlinalen oder -anticlinalen Konformation der Bindung C_5 - C_6 derselbe.

Abbildung 7.3 zeigt zusätzlich schwache Wechselwirkungen der Methylgruppenprotonen »met« zu allen Pyrrolprotonen H21 bis H24. Die N-H-Kopplung von 90 Hz aufgrund des isotonenmarkierten Materials ist im Spektrum deutlich zu erkennen. Darüber hinaus zeigen die Methylgruppen an Position 2^1 und 3^2 eine NOE-Wechselwirkung zum Pyrrolproton H21 und schwach zum Pyrrolproton H24.

Diese Ergebnisse präferieren eine geschlossene bzw. helikale Struktur von PCB in der vorliegenden Lösung.

Das gleiche Bild ergibt ein $^1H, ^1H$ -NOESY von unmarkiertem PCB in d_{18} -HMPT (Abbildung 7.4). Hier zeigen alle vier Pyrrolprotonen untereinander deutliche NOE-Wechselwirkungen. Vor allem die schwache Wechselwirkung zwischen den Protonen an Position 21 und 24 lässt auf eine eher kompakte Form von PCB in HMPT schließen.

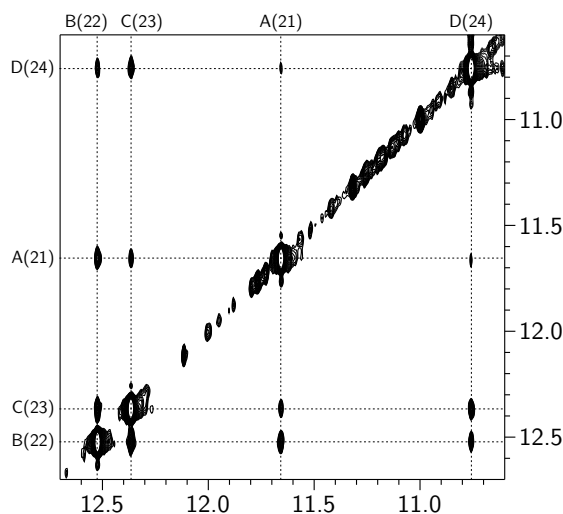


Abbildung 7.4.: $^1\text{H},^1\text{H}$ -NOESY von unmarkiertem PCB in d_{18} -HMPT. Es ist deutlich zu erkennen, dass alle vier Stickstoffprotonen untereinander Kreuzsignale zeigen.

7.2.5. Kreuzkorrelierte Relaxationsmessungen

Über die Messung und Auswertung der kreuzkorrelierten Kopplungen können die Schwachpunkte der oben beschriebenen Methoden adressiert werden. Theoretisch ist es möglich den Winkel zwischen zwei Bindungsvektoren in einem Molekül relativ genau zu bestimmen.

Wie bereits in der Einleitung erläutert (Kapitel 2.2.3, S. 15) kann durch die Aufnahme eines Doppel- (DQ) oder eines Nullquantenspektrums (ZQ) ohne eine Entkopplung während der Evolutionszeit die Kreuzkorrelation der *chemical shift anisotropy* (CSA) und der Dipol-Dipol-Wechselwirkung sichtbar gemacht werden. Die Intensitäten der detektierten Signale sind proportional zu dem Winkel zwischen den beiden Bindungsvektoren (Gleichung 2.17, S. 16).

Das PCB-Molekül bietet einen idealen Anwendungsfall. Hier kann man eine Korrelation der N-H-Gruppen der Pyrrolringe und der C-H-Gruppen der Methinbrücken ausnutzen. Theoretisch sind im PCB sechs solcher Kopplungen vorhanden und messbar. Dies sind die Kopplungen zwischen $\text{N}_{21}\text{-H}_{21}$ und $\text{C}_5\text{-H}_5$, $\text{N}_{22}\text{-H}_{22}$ und $\text{C}_5\text{-H}_5$, $\text{N}_{22}\text{-H}_{22}$ und $\text{C}_{10}\text{-H}_{10}$, $\text{N}_{23}\text{-H}_{23}$ und $\text{C}_{10}\text{-H}_{10}$, $\text{N}_{23}\text{-H}_{23}$ und $\text{C}_{15}\text{-H}_{15}$ sowie zwischen $\text{N}_{24}\text{-H}_{24}$ und $\text{C}_{15}\text{-H}_{15}$. Daraus würden sich sechs Winkel ergeben, die aufgrund der Planarität der Pyrrolringe die Konformation des PCB in Lösung beschreiben.

Die Herausforderung besteht nun darin, ein geeignetes Experiment zu finden, mit dem man alle kreuzkorrelierten Kopplungen messen kann. Die Voraussetzung, ^{13}C - und ^{15}N -isotopenmarkiertes PCB, ist gegeben.

Prinzipiell kann hierfür das für die Zuordnung verwendete HNCRELAY benutzt werden. Die Kopplungen zwischen allen Pyrrolprotonen und Methinbrückenkohlen-

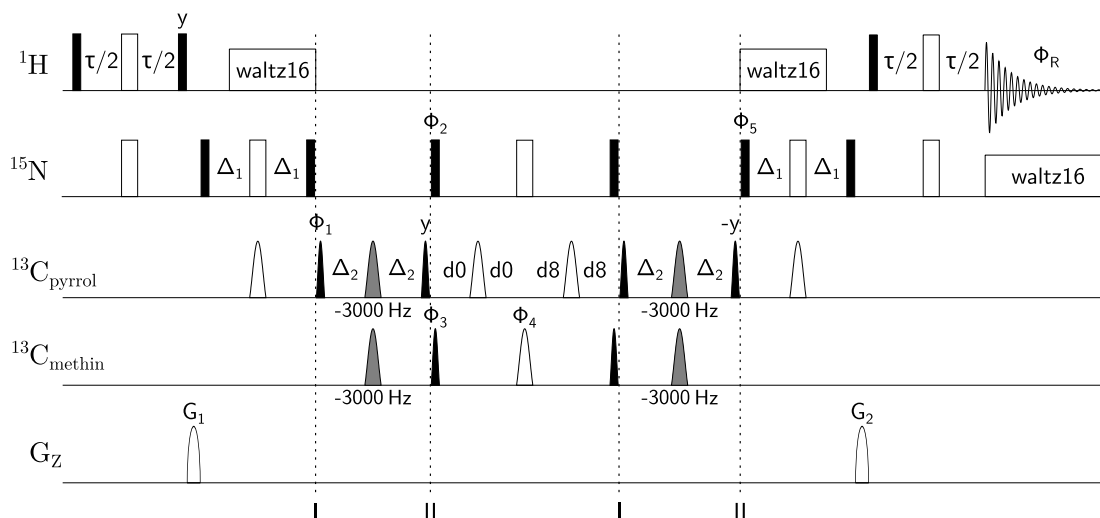


Abbildung 7.5.: Pulssequenz zur Messung der kreuzkorrelierten Relaxationen im PCB. 90° -Pulse sind durch schwarze, 180° -Pulse durch weiße Rechtecke repräsentiert. Soweit nicht anders angegeben, kommen alle Pulse aus der x-Richtung. Quadraturdetektion in t_1 und t_2 wurde über States-TPPI verwirklicht. Für die Evolutionszeit wurde ein *constant-time*-Block verwendet. Auf dem Kohlenstoffkanal wurden zur Anregung Q5 bzw. Q5 *time-reversed* Gauß-Pulskaskaden mit einer Dauer von $1\,000\ \mu\text{s}$ verwendet, was einer Anregungsbreite von ca. $40\ \text{ppm}$ entspricht. Als 180° -Pulse wurden Q3 Gauß-Pulskaskaden mit einer Dauer von $576\ \mu\text{s}$ (weiß) bzw. $190\ \mu\text{s}$ (grau) verwendet, was einer Anregungsbreite von $40\ \text{ppm}$ bzw. $120\ \text{ppm}$ entspricht. Als Offset auf dem Kohlenstoffkanal wurden $13\,700\ \text{Hz}$ ($91\ \text{ppm}$) gewählt. Dementsprechend wurden alle 180° -Pulse auf die Pyrrolkohlenstoffatome um $+7\,500\ \text{Hz}$ ($50\ \text{ppm}$) verschoben ausgeführt. Für den 180° -Puls (grau) im zweiten INEPT-Schritt wurde eine Frequenzdifferenz von $-3\,000\ \text{Hz}$ ($20\ \text{ppm}$) gewählt. An Position I im Pulsprogramm wurde ein Frequenzwechsel auf $21\,200\ \text{Hz}$ ($141\ \text{ppm}$) vorgenommen, während an Position II wieder auf $13\,700\ \text{Hz}$ gewechselt wurde. G_1 und G_2 sind Gradienten mit einer Sinus-Form, einer Länge von $1\ \text{ms}$ sowie einer Stärke von $35\ \text{G cm}^{-1}$ bzw. $40\ \text{G cm}^{-1}$. Folgender Phasenzklus wurde verwendet: $\Phi_1 = 16(x), 16(-x)$, $\Phi_2 = 8(x), 8(y)$, $\Phi_3 = 4(x, -x), 4(y, -y)$, $\Phi_4 = 4(x), 4(y), 4(-x), 4(-y)$, $\Phi_5 = 2(x), 2(-x)$, $\Phi_R = x, 2(-x), x, 2(-x), x, x, -x, -x, 2(x), -x, 2(x, -x, -x, x), x, 2(-x), x$. Die Zeit Δ_1 wurde auf $1/(8J_{\text{NC}}) = 8\ \text{ms}$ ($J_{\text{NC}} = 15\ \text{Hz}$), Δ_2 auf $1/(8J_{\text{CC}}) = 2\ \text{ms}$ ($J_{\text{CC}} = 60\ \text{Hz}$) und τ auf $1/(2J_{\text{HN}}) = 2,75\ \text{ms}$ ($J_{\text{HN}} = 90\ \text{Hz}$) gesetzt.

stoffatomen sind mit einer guten Intensität im Spektrum sichtbar. Die Erzeugung von Multiquantenkohärenzen ist ebenfalls problemlos durch die Einführung zweier zusätzlicher Pulse auf dem Stickstoffkanal möglich. Diese müssen gleichzeitig mit den beiden Pulsen auf dem Kohlenstoffkanal, welche die Evolutionszeit flankieren, ausgeführt werden. Wird zusätzlich die Entkopplung auf dem Protonenkanal während der Evolutionszeit weggelassen, so wird die kreuzkorrelierte Relaxation im Spektrum messbar. Wichtig bei der Durchführung des Experimentes ist, dass die Evolutionszeit als *constant-time* Block durchgeführt wird. Da bei der klassischen Durchführung

die Evolutionszeit stetig durch ein Inkrement vergrößert wird, vergrößert sich damit auch die Zeit, welche den Spins zur Relaxation zur Verfügung steht. Somit würde nach jedem Inkrement mehr Zeit für die Relaxation der Spins zur Verfügung stehen. Dementsprechend würden sich auch die Intensitäten der einzelnen Signale im Spektrum durch die unterschiedlich lange Relaxation von Inkrement zu Inkrement unterscheiden. Dies macht eine zuverlässige Auswertung der Intensitäten unmöglich.

Im Anhang B.3 ist ein modifiziertes HNCRELAY zur Detektion von DQ- oder ZQ-Kohärenzen aufgeführt. Jedoch führte dieses Experiment nicht zu dem gewünschten Erfolg. Der Einbau eines *constant-time* Blocks führte zu einer enormen Verschlechterung des Signal zu Rausch-Verhältnisses. Die Detektion von DQ- oder ZQ-Kohärenzen war anschließend nicht mehr möglich. Eine Erklärung könnten die durch die Isotopenmarkierung vorhandenen passiven Kopplungen im Molekül liefern. Somit musste eine Alternative gefunden werden.

Anstatt mit harten bzw. adiabatischen Pulsen zu arbeiten und somit alle Kerne des PCB anzuregen, sollte nun mit selektiven Pulsen ein gezielter Magnetisierungs-transfer vom Pyrrolproton zu den Methinbrücken erreicht werden. Jedoch können die Anregungsbreiten der selektiven Pulse nicht beliebig schmal gewählt werden, da zum einen durch die zu verwendenden sehr langen Pulse ein Verlust von Intensität durch die stattfindende Relaxation zu erwarten ist, und zum anderen die Pulslänge des selektiven Pulses ab einem bestimmten Punkt die Länge des INEPT-Schrittes übersteigt. Als Kompromiss wurde eine Anregungsbreite von 40 ppm gewählt, was einer Pulslänge für einen 90° Puls, der mit Hilfe einer Q5 Gauß Puls-kaskade realisiert wurde, von 1 ms entspricht. Für die Q3 Gauß-Puls-kaskaden (180° Puls) ergibt sich für diese Anregungsbreite eine Pulslänge von 576 ms.

Somit ist eine Differenzierung zwischen den zu den Stickstoffen benachbarten Kohlenstoffatomen, welche einen Bereich von 133 ppm bis 156 ppm abdecken und den Methinbrücken C5 und C15 bei 86.6 sowie 96.2 ppm möglich. Durch die relativ hohe chemische Verschiebung der Methinbrücke C10 von 118.6 ppm ist es nicht mehr möglich, hier eine saubere Trennung der Signale zu erhalten. Dementsprechend können mit dem folgenden HNCOCA_PCB-Experiment nur zwei der drei Methinbrücken abgedeckt werden.

Beim HNCOCA_PCB-Experiment (Abbildung 7.5) wird mit Hilfe von harten Pulsen die Magnetisierung durch einen INEPT-Schritt von den Protonen auf die Stickstoffe übertragen. Anschließend erfolgt ein weiterer INEPT-Schritt, in dem mit Hilfe von Q3- und Q5-Gauß-Puls-kaskaden ein Magnetisierungstransfer auf die Pyrrolkohlenstoffe erreicht wird. Der Offset des Kohlenstoffkanals wurde so gewählt, dass er in der Mitte der chemischen Verschiebung der Methinbrückenkohlenstoffe (91 ppm) sitzt. Nach dem Ende des zweiten INEPT-Blockes folgt der Magnetisierungstransfer auf die Methinbrückenkohlenstoffe was ebenfalls durch ein INEPT erreicht wird. Hier erfolgt am Anfang ein Frequenzwechsel hin zu einer entsprechenden chemischen Verschiebung von 141 ppm. Die selektive Anregung der Methinbrückenkohlenstoffe

wird möglich. Da der 180°-Puls innerhalb des dritten INEPT-Schrittes sowohl die Pyrrol- als auch die Methinbrückenkohlenstoffatome treffen muss, wurde hier ein breiteres Anregungsprofil gewählt. Anstatt eines Hartpulses wurde ebenfalls ein Q3-Puls eingesetzt, jedoch mit einer Länge von 190 μ s, was einer Anregungsbreite von 120 ppm entspricht. Nach dem erfolgten Magnetisierungstransfer auf die Methinbrücken wird die Anregungsfrequenz des Kohlenstoffkanals wieder auf den ursprünglich eingestellten Offset von 91 ppm zurück gewechselt. Dadurch ergibt sich, dass alle 180°-Pulse außerhalb der Bereiche mit dem Frequenzwechsel um +50 ppm verschoben ausgeführt werden müssen (In Abbildung 7.5 weiß dargestellt). Nach der Evolutionszeit wird die Magnetisierung nach dem gleichen Schema wieder zurück auf die Protonen transferiert und anschließend mit aktiver ^{15}N -Entkopplung detektiert. Zur erfolgreichen Aufnahme der kreuzkorrelierten Kopplungen muss die Entkopplung auf dem Protonenkanal während des dritten INEPT-Schrittes und der Evolutionszeit deaktiviert werden. Doppel- bzw. Nullquantenkohärenzen können durch eine Veränderung des Phasenzylus am Receiver selektiert werden. Der genaue Phasenzylus ist dem Anhang B.13 und B.14 zu entnehmen.

Tabelle 7.1.: Doppel- (DQ) und Nullquantenfrequenzen (ZQ) der Pyrrolstickstoffe und der Methinbrückenkohlenstoffe mit den entsprechenden relativen Intensitäten der 4 Signale.

Korrelation	DQ-Frequenz (Hz)	Intensität	ZQ-Frequenz (Hz)	Intensität
N21C5	-572	$\alpha\alpha$ 140440	-1278	$\alpha\alpha$ 136509
		$\alpha\beta$ 145309		$\alpha\beta$ 135132
		$\beta\alpha$ 103788		$\beta\alpha$ 104779
		$\beta\beta$ 98411		$\beta\beta$ 85243
N22C5	-276	$\alpha\alpha$ 54700	-1571	$\alpha\alpha$ 52969
		$\alpha\beta$ 62586		$\alpha\beta$ 49361
		$\beta\alpha$ 43192		$\beta\alpha$ 47008
		$\beta\beta$ 38063		$\beta\beta$ 28011
N23C15	1113	$\alpha\alpha$ 80564	-81	$\alpha\alpha$ 71064
		$\alpha\beta$ 77603		$\alpha\beta$ 53269
		$\beta\alpha$ 51027		$\beta\alpha$ 36256
		$\beta\beta$ 57162		$\beta\beta$ 40541
N24C15	-424	$\alpha\alpha$ 69316	1459	$\alpha\alpha$ 63366
		$\alpha\beta$ 69477		$\alpha\beta$ 50688
		$\beta\alpha$ 49762		$\beta\alpha$ 46695
		$\beta\beta$ 48500		$\beta\beta$ 29851

In dem so erhaltenen Spektrum werden vier Kreuzsignale erwartet, jeweils eines von den Korrelationen H21 zu C5, H22 zu C5, H23 zu C15 und H24 zu C15. In der direkten

Dimension wird die chemische Verschiebung der Protonen detektiert, während in der indirekten Dimension die DQ- bzw. ZQ-Frequenz abzulesen ist. Die DQ- oder ZQ-Frequenz setzt sich aus der Stickstoff- und Kohlenstofffrequenz der entsprechenden Methinbrücke zusammen. Durch die aktive C–H- und N–H-Kopplung setzt sich jedes Kreuzsignal aus vier einzelnen Signalen zusammen. Das entsprechende DQ- und ZQ-Spektrum ist in Abbildung 7.6a und b zu sehen. Die gemessenen DQ- und ZQ-Frequenzen der Korrelationen sind Tabelle 7.1 zu entnehmen.

Unterhalb der dargestellten 2D-Spektren in Abbildung 7.6 sind die eindimensionalen Projektionen der einzelnen Kreuzsignale der 2D-Spektren zu sehen. Es ist deutlich zu erkennen, dass diese sich in Intensität und Auflösung unterscheiden. Während z. B. die Korrelation N23C15 vor allem im DQ-Spektrum eine gute Basislinientrennung der Signale aufweist, ist dies z. B. für die Korrelation N24C15 nicht der Fall. Um die Intensitäten der einzelnen Signale mit guter Sicherheit bestimmen zu können, ist eine Basislinientrennung jedoch von Vorteil.

Des Weiteren weisen sowohl das DQ- als auch das ZQ-Spektrum ein relativ schlechtes S/N -Verhältnis auf. Dies ist auf die gering konzentrierte Probe zurückzuführen. Aufgrund der geringen Verfügbarkeit von $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -markiertem PCB konnte nur mit einer Konzentration von 41 mmol L^{-1} gearbeitet werden. Dadurch ist auch die lange Messzeit von fast zwei Tagen pro Spektrum zu erklären.

Für die Auswertung der Daten wurden die bereits in der Einleitung vorgestellten Formeln

$$\Gamma_{i,j+1}^c = \frac{1}{4T} \cdot \ln \left(\frac{I(\alpha\beta) \cdot I(\beta\alpha)}{I(\alpha\alpha) \cdot I(\beta\beta)} \right) \quad (7.1)$$

und

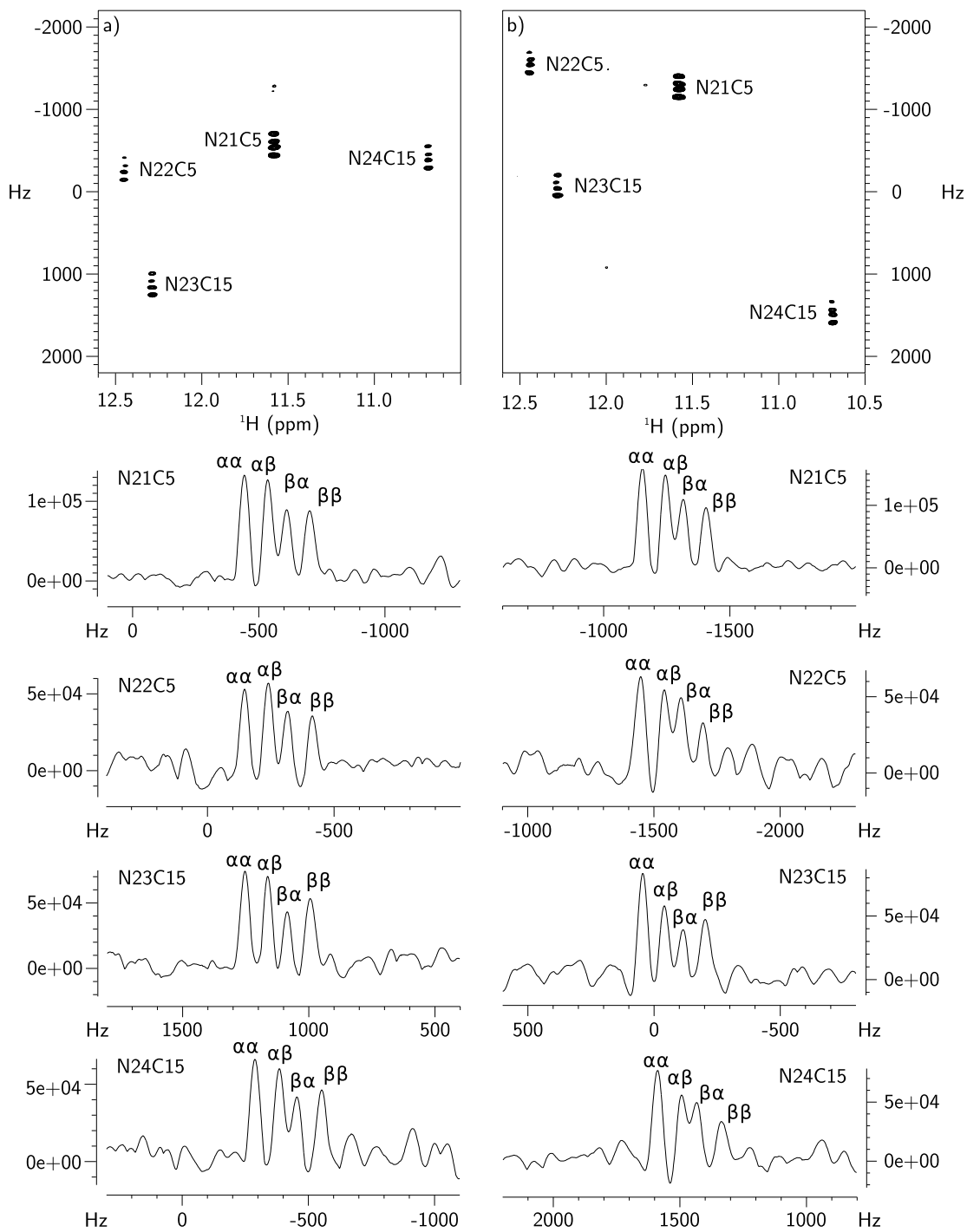
$$\cos(\theta) = \sqrt{\frac{80 \Gamma_{i,j}^c r_{N,H}^3 r_{C,H}^3 \pi^2}{3 \gamma_H^2 \gamma_N \gamma_C \hbar^2 \mu^2 \tau_c} + \frac{1}{3}} \quad (7.2)$$

verwendet.

Mit Hilfe der Relaxationsrate der kreuzkorrelierten Relaxation aus Gleichung 7.1 kann in Verbindung mit Gleichung 7.2 der Winkel Θ zwischen den beiden Bindungsvektoren der N–H- und der C–H-Bindung berechnet werden.

Die Berechnung der Relaxationsrate $\Gamma_{N,C}^c$ erfolgte aus den gemessenen Intensitäten $I(\alpha\alpha)$, $I(\alpha\beta)$, $I(\beta\alpha)$ und $I(\beta\beta)$ (Tabelle 7.1). Die Evolutionszeit, in der sich die

Abbildung 7.6. (gegenüberliegende Seite): Spektren zur Messung der kreuzkorrelierten Kopplungen an $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -PCB in d_{18} -HMPT. »N21C5« bezeichnet zum Beispiel die Korrelation zwischen dem Stickstoffatom an Position 21 und dem Methinbrückenkohlenstoffatom C5. Alle anderen Korrelationen sind entsprechend gekennzeichnet. Oben sind die zweidimensionalen Spektren zu sehen, darunter die entsprechenden Projektionen der Kreuzkorrelationen. a) Doppelquantenversion (DQ) des Experimentes. b) Nullquantenversion (ZQ) des Experimentes.



Doppel- bzw. Nullquantenkohärenz entwickeln konnte, betrug 20 ms. Die Werte der Relaxationsraten für die einzelnen Korrelationen sind in Tabelle 7.2 aufgeführt.

Anschließend erfolgte die Berechnung des Winkels Θ zwischen der N–H- und der C–H-Bindung. Da $\Theta \propto \arccos(\sqrt{\Gamma_{N,C}^c})$, ergeben sich vier Lösungen für Θ , die die Gleichung 7.2 erfüllen.

Problematisch bei der Berechnung vom Winkel Θ ist die Abschätzung der Korrelationszeit τ_c von PCB in HMPT. In nicht viskosen Lösungsmitteln findet man Korrelationszeiten für kleine Moleküle im Bereich von Pikosekunden bis hin zu Nanosekunden für Proteine. HMPT gehört mit einer Viskosität von $3,222 \text{ mPa s}^{-1}$ zu den höherviskosen Lösungsmitteln.^[107]

Da die Korrelationszeit nicht direkt bestimmt werden konnte, musste eine Methode gefunden werden, um diese begründet ableiten zu können. Für sphärische Moleküle kann man dies mit Hilfe der Stokesschen Gleichung erreichen.

$$\tau_c = \frac{4\pi\eta r^3}{3kT} \quad (7.3)$$

wobei η die Viskosität des Lösungsmittels ist, k die Boltzmann-Konstante, T die Temperatur in Kelvin und r der hydrodynamische Radius des zu betrachtenden Moleküls. Während für Proteine Gleichungen zur Abschätzung des hydrodynamischen Radius existieren, ist dies für kleine Moleküle wie dem PCB wiederum nicht der Fall.

Deshalb wurde für PCB der maximale Abstand zwischen den Kohlenstoffatomen an Position 3² und 18² bestimmt, welcher bei ca. 16 \AA liegt. Da hierbei die van-der-Waals Radien nicht mit einbezogen wurden, kann der eigentliche Durchmesser durchaus etwas höher liegen. Da PCB eine eher ellipsoide Form besitzt, muss ein weiterer Korrekturfaktor von 1,07 eingeführt werden.^[108] Damit kann nun der effektive Radius r_{eff} berechnet werden.

$$r_{eff} = 8 \text{ \AA} \cdot 1,07 = 8,56 \text{ \AA} \quad (7.4)$$

Mit Hilfe von Gleichung 7.3 ergibt sich somit eine Korrelationszeit von PCB in HMPT von 2,04 ns bei einer Temperatur von 300 K. Während dieser Wert sicherlich nicht die reale Korrelationszeit vom PCB in HMPT widerspiegelt, so zeigt er doch den Einfluss der hohen Viskosität von HMPT auf die Korrelationszeit.

Für die weitere Rechnung wurden eine N–H-Bindungslänge von $1,02 \text{ \AA}$ und eine C–H-Bindungslänge von $1,08 \text{ \AA}$ verwendet. Über Gleichung 7.2 kann nun der Winkel Θ berechnet werden. Die Werte sind Tabelle 7.2 zu entnehmen.

Wie Tabelle 7.2 zu entnehmen ist, werden negative Relaxationsraten für die Korrelation N23C15 erhalten. Das führt dazu, dass für diese ZQ-Korrelationen keine Winkel berechnet werden konnten.

Mit den Ergebnissen der Messungen der kreuzkorrelierten Relaxationen wurde anschließend eine Strukturberechnung von PCB mit Hilfe des Programms CNSsolve 1.2 durchgeführt.^[109] Es wurden die Winkel der DQ-Korrelationen verwendet, da hier

Tabelle 7.2.: Relaxationsraten $\Gamma_{N,C}^c$ (s^{-1}) mit den daraus berechneten Winkeln in Grad aus den gemessenen Intensitäten der DQ- und ZQ-Spektren. Aufgrund der großen negativen Relaxationsrate der ZQ-Korrelation von N23C15 konnten keine Werte für den Winkel Θ bestimmt werden.

Korrelation	DQ				
	$\Gamma_{N,C}^c$ (s^{-1})	Θ_1 (Grad)	Θ_2 (Grad)	Θ_3 (Grad)	Θ_4 (Grad)
N21C5	1,09	49,94	130,06	310,06	229,94
N22C5	3,79	38,40	141,60	321,60	218,40
N23C15	-1,89	63,90	116,10	296,10	243,90
N24C15	0,35	53,17	126,83	306,83	233,17

Korrelation	ZQ				
	$\Gamma_{N,C}^c$ (s^{-1})	Θ_1 (Grad)	Θ_2 (Grad)	Θ_3 (Grad)	Θ_4 (Grad)
N21C5	2,45	44,14	135,86	315,86	224,14
N22C5	5,59	30,17	149,83	329,83	210,17
N23C15	-5,09	-	-	-	-
N24C15	2,80	42,65	137,35	317,35	222,65

ein kompletter Satz vorhanden ist. Dabei gibt es vier valide Lösungen Θ_1 – Θ_4 mit jeweils vier Winkeln, welche die Konformation der Ringe A, B und C, D zueinander beschreiben. Diese Winkel wurden in einen Parametersatz von PCB für CNSsolve übertragen (siehe Anhang D). Die Position der Ringe B und C zueinander wurde durch eine NOE-Abstandsrandbedingung zwischen den Protonen an Position 22 und 23 definiert. Somit besitzt das PCB an dieser Stelle eine gewisse Flexibilität, aber eine signifikante Konformationsänderung, z. B. von *syn* zu *anti* ist nicht möglich. Anschließend erfolgte mit Hilfe der Standard-Skripte `generate_seq.inp`, `generate_extended.inp` und `anneal.inp` eine Strukturberechnung von PCB in Lösung. Die vier resultierenden Strukturen sind in Abbildung 7.7 zu sehen.

Es ist zu erkennen, dass die Winkel Θ_1 und Θ_3 einer geschlosseneren und die Winkel Θ_2 und Θ_4 einer offenen Konformation entsprechen. Alle gezeigten Strukturen sind mathematisch korrekt. Welche der Lösungen die Realität widerspiegelt und ob in Lösung eine Konformation dominiert, muss durch den Vergleich mit den NOE-Daten geklärt werden.

Aufgrund des in Abbildung 7.4 gezeigten NOESY-Spektrums können an dieser Stelle die in Abbildung 7.7c und d gezeigten Konformationen ausgeschlossen werden. Vor allem die Abstände der Pyrrolprotonen von Ring A zu Ring C und Ring B zu Ring

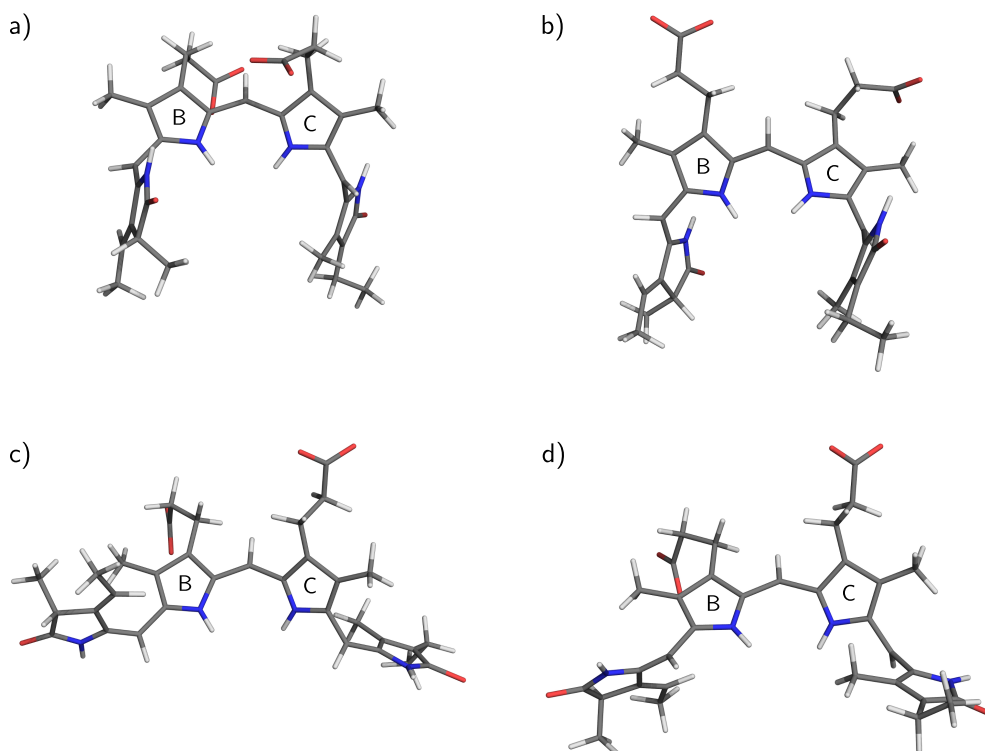


Abbildung 7.7.: Strukturen von PCB in HMPT, welche sich aus den vier aus den kreuzkorrelierten Kopplungen berechneten Winkeln ergeben. Als Basis wurden die Winkel der DQ-Korrelation verwendet. a) Winkel Θ_1 b) Winkel Θ_3 c) Winkel Θ_2 d) Winkel Θ_4

D sind mit 8 \AA zu groß, als dass hier eine intensive NOE-Wechselwirkung zu sehen wäre. Ebenso ist in Abbildung 7.4 eine schwache NOE-Wechselwirkung zwischen den Pyrrrolprotonen an Ring A und D zu erkennen. Der Abstand in den eher gestreckten Konformationen mit 13 \AA lässt diese Wechselwirkung hingegen nicht zu.

Die Situation in den beiden eher geschlossenen Konformationen in Abbildung 7.7a und b ist nur bedingt besser. Hier liegt der Abstand zwischen den Pyrrrolprotonen von Ring A und Ring C und Ring B und Ring D bei 7 \AA , was ebenfalls über dem erwarteten Abstand einer NOE-Wechselwirkung ist. Der Abstand zwischen den Pyrrrolprotonen an Ring A und D ist mit 11 \AA ebenfalls nur geringfügig niedriger, aber immer noch zu groß für eine NOE-Wechselwirkung.

Eine Erklärung für die trotzdem sichtbaren NOE-Wechselwirkungen zwischen den Pyrrrolprotonen könnte der Effekt der sogenannten Spin-Diffusion sein. Hierbei wird Magnetisierung ausgehend von einem Proton über ein benachbartes zu einem dritten Proton übertragen. Im Fall des PCBs z. B. von dem Proton an Position 21 zum Proton an Position 22 und davon ausgehend weiter zum Proton an Position 23.

7.2.6. PCB in anderen Lösungsmitteln

Neben HMPT wurde ebenfalls versucht, in DMSO und Methanol eine Struktur von PCB zu bestimmen.

DMSO In den NOE-Spektren ergibt sich dieselbe Situation wie in HMPT. Die Protonen an den Pyrrolstickstoffen zeigen alle untereinander deutliche NOE-Wechselwirkungen. Vor allem die Wechselwirkung zwischen dem Pyrrolproton vom Ring A zu dem von Ring D zeigt, dass das PCB auch in DMSO eine eher helikale Struktur besitzt.

Ebenso wurden Experimente zur Messung der kreuzkorrelierten Relaxationen (CCR) an DMSO durchgeführt. Hier war jedoch die Intensität der Signale wesentlich schlechter als bei den Messungen in HMPT. Dies führte dazu, dass sowohl in den DQ- als auch in den ZQ-Spektren keine Intensitäten für die Kopplung N₂₂-C₅ gemessen werden konnten. Für die restlichen möglichen Kopplungen konnten Intensitäten bestimmt und entsprechende Relaxationsraten sowie Winkel berechnet werden (Tabelle 7.3).

Tabelle 7.3.: Relaxationsraten $\Gamma_{N,C}^c$ (s⁻¹) mit den daraus berechneten Winkeln in Grad aus den gemessenen Intensitäten der DQ- und ZQ-Spektren von PCB in DMSO. Für die Korrelationen N22C5 konnten keine Signale im Spektrum detektiert werden.

Korrelation	DQ				
	$\Gamma_{N,C}^c$ (s ⁻¹)	Θ_1 (Grad)	Θ_2 (Grad)	Θ_3 (Grad)	Θ_4 (Grad)
N21C5	-1,83	63,57	116,43	296,43	243,57
N22C5	–	–	–	–	–
N23C15	3,83	38,23	141,77	321,77	218,23
N24C15	-2,65	68,29	111,71	291,71	248,27

Korrelation	ZQ				
	$\Gamma_{N,C}^c$ (s ⁻¹)	Θ_1 (Grad)	Θ_2 (Grad)	Θ_3 (Grad)	Θ_4 (Grad)
N21C5	4,54	35,08	144,92	324,92	215,08
N22C5	–	–	–	–	–
N23C15	2,38	44,43	135,57	315,57	224,43
N24C15	2,80	42,65	137,35	317,35	222,65

Methanol In Methanol konnten keine Strukturinformationen gewonnen werden. Zum einen waren die NOE-Spektren von schlechter Qualität, zum anderen war die

Intensität in den DQ- und ZQ-Spektren zur Messung der kreuzkorrelierten Relaxationsraten so niedrig, dass teilweise gar keine oder nur zwei oder drei der vier zu erwartenden Signale messbar waren.

7.3. Diskussion

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse führt zu der Schlussfolgerung, dass eine definierte Struktur von PCB in Lösung mit den vorliegenden Daten nicht bestimmt werden kann.

Aus den Daten der CCR-Messungen ergibt sich keine eindeutige Konformation. Vielmehr gibt es vier mathematisch korrekte Lösungen. Jede dieser sich daraus ergebenden Konformationen ist mit der Struktur von PCB vereinbar, da keine der Lösungen eine sterische Hinderung ergibt.

Auffällig ist jedoch, dass keiner der berechneten Winkel einer zu erwartenden Doppelbindung an den Methinbrücken entspricht. Eine Doppelbindung würde einem Winkel von 0° oder 180° entsprechen. Das ist nicht gegeben. Wenn in Lösung dennoch eine Z/E-Isomerisierung stattfindet, so könnte dies erklären, warum kein Winkel von 0° oder 180° gemessen werden konnte. Aufgrund des konjugierten Doppelbindungssystems und der sich daraus ergebenden Bindungsordnung von < 2 wäre dies prinzipiell denkbar.

Da die konformationellen Änderungen wesentlich schneller ablaufen als die Aufnahme eines NMR-Spektrums, würde eine gemittelte Struktur über alle möglichen Konformationen gemessen werden. Dies könnte eine Erklärung für die gemessenen Winkel liefern.

Jedoch müssen schlussendlich die Daten aus den CCR-Messungen mit einer gewissen Vorsicht betrachtet werden. Da keine verlässlichen Daten zur Korrelationszeit vorliegen und auch der hydrodynamische Radius zur Berechnung der Korrelationszeit nur einer groben Abschätzung entspricht, müssten die Daten anderweitig verifiziert werden. Diese Verifizierung hätte anhand der NOE-Daten und RDC-Messungen erfolgen sollen. Aus bereits dargelegten Gründen sind keine RDC-Daten verfügbar und die verfügbaren NOE-Daten können die gefundenen Winkel der CCR-Messungen nicht bestätigen.

Die NOE-Daten aus dem HSQC-NOESY präferieren für die C_5-C_6 -Bindung eine *syn*-Konfiguration. Dies ist durchaus für die beiden eher zyklischen Strukturen in Abbildung 7.7a und b gegeben. Jedoch zeigt das $2D-^1H, ^1H$ -NOESY-Spektrum eindeutige NOE-Wechselwirkungen zwischen allen vier Protonen der Pyrrolstickstoffe. Vor allem die Wechselwirkung zwischen dem Pyrrolproton von Ring A zu dem Pyrrolproton an Ring D, wenn auch nicht so stark wie die anderen Wechselwirkungen, lässt dem Tetrapyrrolsystem keine konformellen Freiheiten, um eine offene oder auch gestreckte Struktur auszubilden.

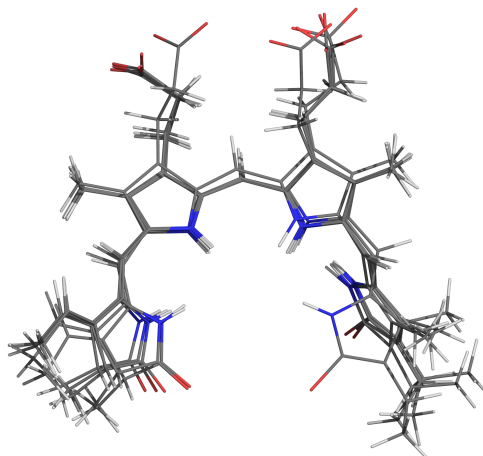


Abbildung 7.8.: Modell der Konformation vom PCB in einer Lösung von HMPT auf Basis der NOE-Wechselwirkungen zwischen den Pyrrolprotonen. Gezeigt sind die fünf energieärmsten Konformationen.

Verwendet man die detektierten NOE-Wechselwirkungen zwischen den Pyrrolprotonen, erhält man durch eine Strukturrechnung mit Hilfe von CNSsolve, wie in Abbildung 7.8 gezeigt. Für die Rechnung wurden ein mittlerer Abstand für die NOE-Wechselwirkungen zwischen den Protonen $H_{21}-H_{22}$, $H_{22}-H_{23}$ und $H_{23}-H_{24}$ von $3 \pm 1,5 \text{ \AA}$ angenommen. Für den Abstand $H_{21}-H_{24}$ wurde ein Abstand von $5 \pm 1,5 \text{ \AA}$ angenommen. Aufgrund der wenigen Abstandsrandbedingungen für die Rechnung und da keine Möglichkeit besteht, die Integrale der NOE-Kreuzsignale zu kalibrieren, ist die resultierende Konformation vom PCB nur als Modell zu betrachten. Gezeigt ist eine Überlagerung der fünf Strukturen mit den niedrigsten Gesamtenergien (Abbildung 7.8).

Das in Abbildung 7.8 gezeigte Modell soll verdeutlichen, dass die Konformation aus den NOE-Daten nicht mit denen der CCR-Daten in Übereinstimmung gebracht werden kann. Somit entsprechen auch die in Abbildung 7.7a und b vorgeschlagenen Strukturen auf Basis der kreuzkorrelierten Kopplungen keiner Struktur, die mit den NOE-Modell von PCB in Einklang zu bringen wäre.

Ebenso verhält es sich mit den Daten aus den DMSO-Messungen. Auch hier sind die berechneten Winkel aus den CCR-Messungen nicht im Einklang mit den NOE-Daten. Die NOE-Wechselwirkungen zwischen den Pyrrolprotonen lassen wie im HMPT eine helikale Konformation wahrscheinlich werden, während der Abstand zwischen $H_{21}-H_{24}$ in der Konformation, die sich aus den Winkeln der CCR-Messungen ergeben dafür wieder zu groß wäre.

In Methanol konnte aufgrund der schlechten Intensität der Signale in den Spektren gar keine Struktur bestimmt werden.

In allen drei Lösungsmitteln scheint PCB eine hohe konformelle Mobilität zu besitzen und entgegen der ursprünglichen Annahme keine definierte Struktur einzunehmen.

8. Chromophordynamik in der Bindungstasche

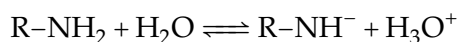
Wie bereits in der Einleitung beschrieben (Kapitel 3) gibt es trotz der hohen strukturellen Homologie innerhalb der Familie der Phytochrome funktionelle Unterschiede. Diese Unterschiede, z. B. die verschieden schnelle Dunkelreversion, können nur bedingt oder gar nicht anhand der vorhandenen Kristallstrukturen erklärt werden. Während der sehr einheitliche Photozyklus ein anfängliches Verständnis der Phytochrome relativ einfach macht, müssen die Gründe für die Unterschiede in strukturellen Details gesucht werden. Die vorhandenen Kristallstrukturen liefern diese Detailinformationen nur bedingt. Trotz der guten Auflösung der Strukturen (zum Beispiel hat die Kristallstruktur vom Cph1 eine Auflösung von 2,45 Å, PDB Code: 2VEA) enthalten sie keine Informationen über austauschbare Aminosäureseitenkettenprotonen.^[2] Ebenso sind keine Informationen über die Dynamik des Chromophors in der Protein-Bindungstasche vorhanden.

Im folgenden Abschnitt soll auf die Mobilität des Chromophors innerhalb der Bindungstasche eingegangen werden. Dabei werden zwei Systeme miteinander verglichen: Ein cyanobakterielles Phytochrom (Cph1), welches Phycocyanobilin als Chromophor besitzt, sowie ein bakterielles Phytochrom (Agp1) mit Biliverdin als Chromophor. Um den Einfluss der kovalenten Chromophor-Protein-Bindung auf die Dynamik des Chromophors zu untersuchen, wurde von beiden Phytochromen jeweils eine Mutante eingesetzt, in der das chromophorbindende Cystein gegen Alanin ausgetauscht wurde. Aus den Linienbreiten der aufgenommenen NMR-Spektren wurden Rückschlüsse auf das dynamische Verhalten des Chromophors innerhalb der Bindungstasche gezogen.

8.1. NMR-Spektroskopie

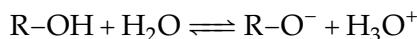
Während in der Lösungs-NMR die Linienbreite durch die Anisotropie der vorliegenden Probenlösung meistens sehr klein ist, können dennoch verschiedene Prozesse zu einer Linienverbreiterung führen. Für die Untersuchungen der Dynamik des Chromophors innerhalb der Bindungstasche des Proteins sind dies vor allem chemische- und konformationelle Austauschprozesse.

Chemische Austauschprozesse Unter chemischen Austauschprozessen versteht man zum Beispiel den Austausch eines N-H-Protons mit seiner Umgebung. Natürlicherweise befinden sich Proteine in wässriger Umgebung. Die Protonen von primären Aminen können daher folgenden chemischen Austauschprozessen unterliegen:



Ein solcher Austausch führt zu einer Signalverbreiterung bis hin zu einem vollständigen Verschwinden des Signals im Spektrum.

Die analoge Überlegung gilt für Hydroxylgruppen, wie sie zum Beispiel in Tyrosinen vorkommen:



Kann dennoch ein Signal von einem einen schnellen Austausch unterliegenden Proton beobachtet werden, so muss eine Veränderung im Austauschverhalten dieses Protons vorliegen. Gründe hierfür können schwache Wechselwirkungen, wie z. B. Wasserstoffbrücken sein. Die Existenz eines Signals für ein normalerweise austauschbares Proton im Spektrum kann somit als Hinweis auf eine vorhandene Wasserstoffbrücke interpretiert werden.

Konformationelle Austauschprozesse Die chemische Verschiebung eines Kernes im Spektrum hängt von seiner Umgebung ab. Besitzt eine funktionelle Gruppe in einem Molekül eine gewisse Mobilität, zum Beispiel durch eine minimale Bewegung des Moleküls selbst, so kommt es zu marginalen Änderungen der chemischen Verschiebung. Diese minimalen Veränderungen um einen Mittelwert herum sind in einem Spektrum als eine Verbreiterung des Signals zu erkennen. Scheidet also ein chemischer Austauschprozess für eine Linienverbreiterung aus, so deutet dies auf einen dynamisch ablaufenden Vorgang hin.

8.2. Ergebnisse und Diskussion

Um Informationen über chemische Austauschprozesse in der Bindungstasche zu bekommen, wurde die Signalbreite der NH-Protonen der vier Pyrrolringe verwendet. Konformationeller Austausch wurde anhand der Methinbrückenprotonen untersucht.

Pyrrolprotonen Als Referenzspektrum zur Untersuchung der stickstoffgebundenen Protonen wurde der Chromophor in einem organischen Lösungsmittel (HMPT) gelöst. Das anschließend aufgenommene ^{15}N -HMQC Spektrum zeigte die typische Linienbreite für ein, in einem organischen Lösungsmittel gelöstes kleines organisches Molekül (Abbildung 8.1a). Die Protonierung aller Stickstoffe wurde durch die Zugabe einer kleinen Menge *p*-TsOH sichergestellt.

Vergleicht man die so gemessenen Linienbreite mit der von PCB als kovalent gebundenen Chromophor in Phycocyanin, so stellt man fest, dass die Linienbreite sich nicht signifikant verändert hat (Abbildung 8.1b). Dies lässt darauf schließen, dass

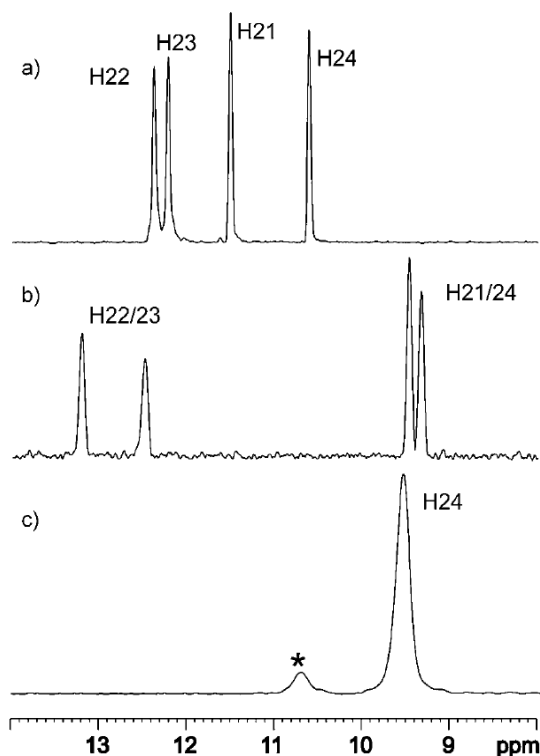


Abbildung 8.1.: Projektionen von ^1H , ^{15}N Korrelationen von PCB. Dargestellt sind Spektren in verschiedenen chemischen Umgebungen. a) PCB in HMPT, b) PCB in Phycocyanin, c) PCB in der P_r -Form von Cph1. Das mit einem Sternchen markierte Signal kann nicht eindeutig einem der Pyrrolprotonen von Ring A, B oder C zugeordnet werden. Es ist deutlich zu erkennen, dass PCB in der Bindungstasche vom Cph1 eine deutlich vergrößerte Linienbreite aufweist.

die Inkorporation von PCB in ein Protein nicht zwangsläufig zu einer Linienverbreiterung führen muss. Phycocyanin verwendet genauso wie die Phytochrome PCB als Chromophor, jedoch führen Phycocyanine keinen Photozyklus durch. Sie sind akzessorische Pigmente der Photosynthese.^[110] Phycocyanin absorbiert Licht des sichtbaren Spektrums bei 615 nm und überträgt die aufgenommene Energie weiter an das Chlorophyll.

Im Spektrum von PCB in Cph1 fällt auf, dass nur noch das Proton an Position 24 eindeutig zugeordnet werden kann. Die Pyrrolprotonen an den Ringen A, B und C sind nicht mehr zu sehen bzw. könnte der mit einem Stern markierte Peak von diesen drei Protonen stammen (Abbildung 8.1c). Eine eindeutige Zuordnung ist jedoch nicht möglich. Das lässt darauf schließen, dass die Protonen an Position 21, 22 und 23 einem schnellen Austausch mit der Umgebung unterliegen müssen. Dies ist einleuchtend, da zum einen in der Kristallstruktur Wassermoleküle in der Bindungstasche nach-

gewiesen werden konnten, zum anderen über die vier Pyrrolstickstoffe eine positive Ladung am PCB delokalisiert ist. Dieser Destabilisierung des Systems kann durch eine Delokalisierung über die ersten drei Ringe entgegengewirkt werden.

Die Austauschprozesse sind offensichtlich am Ring D verlangsamt. Die größere Signalbreite im Vergleich zu den Spektren von PCB in HMPT und Phycocyanin deutet jedoch darauf hin, dass es immer noch einen, wenn auch stark verlangsamen Austausch mit der Umgebung gibt.

Das veränderte Verhalten des Pyrrolprotons am Ring D korreliert mit seiner Funktion innerhalb des Photozyklus. Während des Photozyklus erfährt Ring D durch die Z/E-Isomerisierung eine 180° Drehung. Diese konformationelle Änderung muss von der Proteinumgebung wahrgenommen und als Signal weitergeleitet werden. Hierfür kommen Wasserstoffbrücken in Frage. Man kann den verlangsamen Austausch des Pyrrolprotons an Ring D dadurch erklären, dass dieses als Wasserstoffbrückendonor fungiert und in ein Wasserstoffbrückennetzwerk eingebunden ist.

Methinbrückenprotonen Konformationelle Austauschprozesse des Chromophors können über die Linienbreite der Methinbrückenprotonen an Position 5, 10 und 15 beobachtet werden. Da diese Protonen keinem chemischen Austausch unterliegen, kann aus einer Verbreiterung der Linien direkt auf eine Vergrößerung der Mobilität des Chromophors innerhalb der Bindungstasche geschlossen werden.

In Abbildung 8.2a ist die Projektion der Kreuzsignale eines $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HMQC von PCB in HMPT dargestellt. Die Linienbreite entspricht der eines kleinen Moleküls in einem organischen Lösungsmittel. Vergleicht man diese Situation mit der innerhalb der Chromophorbindungstasche des Cph1 (Abbildung 8.2b), so fällt auf, dass es zu einer deutlichen Linienverbreiterung kommt. Diese Linienverbreiterung kann nur durch die Mobilität des Chromophors in der Bindungstasche erklärt werden. Man sieht außerdem, dass die Linienbreite der Protonensignale von H5 über H10 zu H15 abnimmt. Dementsprechend besitzt der Chromophor an Ring A eine andere Mobilität als an Ring D. Hierfür ist die Anknüpfung an das Cystein über das Kohlenstoffatom an Position 3¹ des Chromophors verantwortlich. Diese kovalente Bindung nimmt einen anderen Einfluss auf die Mobilität des Chromophors als eine Bindung über das Kohlenstoffatom an Position 3², wie es zum Beispiel im Agp1 der Fall ist (weitere Diskussion unten).

Die Situation ändert sich komplett, wenn man sich die Linienbreite von PCB in der Cph1-C259A Mutante anschaut. In dieser Mutante kann der Chromophor nicht mehr kovalent an das Protein gebunden werden. Es kommt hier zu einer Verkleinerung der Linienbreite, die vor allem am Signal des Methinbrückenprotons H5 sehr ausgeprägt ist. Durch die Verbesserung der Spektrenqualität kann nun ebenfalls das Proton an Position 3¹ der nun vorhandenen Doppelbindung am PCB zugeordnet werden. Diese Veränderung des Spektrums spricht dafür, dass die kovalente Bindung einen Einfluss

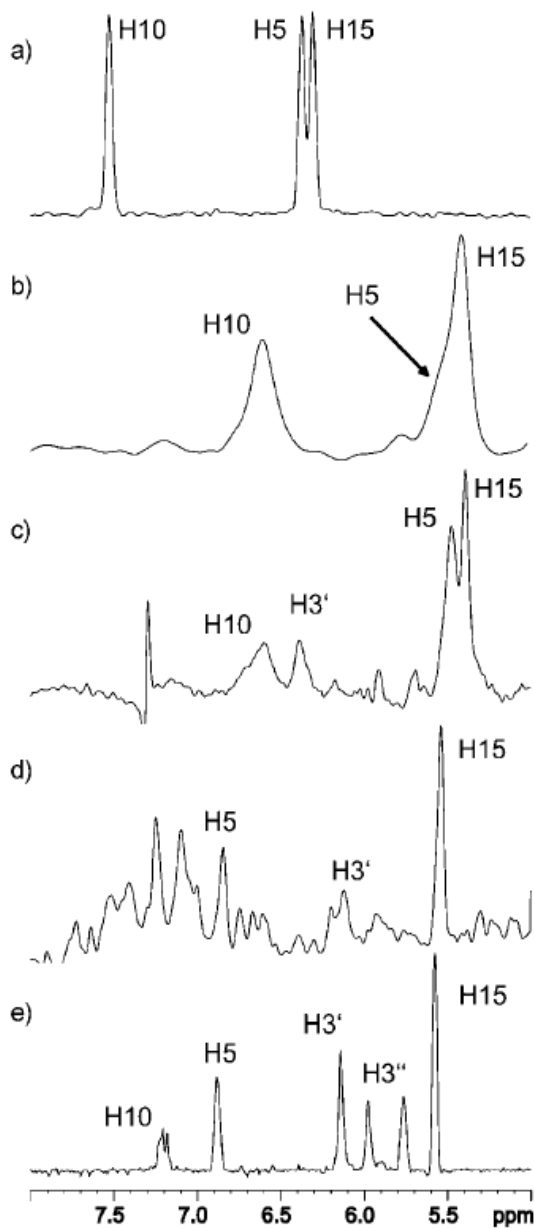


Abbildung 8.2.: Projektionen der Signale der Methinbrückenprotonen H5, H10 und H15 von den Chromophoren PCB und BV in verschiedenen chemischen Umgebungen. a) $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HMQC von PCB in HMPT. b) NOESY von Cph1 Δ 2 in der P_T-Form. c) NOESY von Cph1 Δ 2-C259A in der P_T-Form. d) NOESY von Agp1-M15 in der P_T-Form. e) NOESY von Agp1-M15-C20A in der P_T-Form. Weitere Informationen zur Zuordnung der Signale in den Spektren von Agp1 und zu den Linienbreite sind in der Diskussion aufgeführt.

auf die Dynamik des PCB, vor allem im Bereich des Ringes A in der Bindungstasche des Cph1 hat.

Vergleicht man die Situation in dem cyanobakteriellen Phytochrom Cph1 mit der in einem bakteriellen Phytochrom (Agp1), so wird deutlich, dass es Unterschiede in der Mobilität der beiden Chromophore PCB bzw. BV in der Bindungstasche gibt. Die Linienbreite der Methinbrückenprotonen des kovalent gebundenen Chromophors BV in Agp1 ist signifikant kleiner als die des kovalent gebundenen PCB in Cph1 (Abbildung 8.2d). Es scheint so zu sein, dass die kovalente Anknüpfung an das Cystein, welche in einem bakteriellen Phytochrom über das Kohlenstoffatom 3² des Chromophors stattfindet, keinen Einfluss auf die Mobilität des Chromophors nimmt. Zumindest zeigen alle Signale der Protonen H5, H10 und H15 die gleiche Linienbreite, was auf ein einheitliches dynamisches Verhalten des Chromophors hindeutet. Da die Linienbreite in den Spektren von BV in Agp1 gebunden kleiner ist als die von PCB in Cph1, scheint BV in der Bindungstasche vom Agp1 unterschiedliche Eigenschaften bezüglich der Mobilität zu besitzen. Dies wird auch beim direkten Vergleich der Probenpräparation der Cystein-Alanin-Mutanten beider Proteine deutlich. Während PCB in Cph1-C259A nach der Assemblierung einfach wieder herausgewaschen werden kann, ist dies in Agp1-C20A mit BV nicht möglich. Anscheinend wird die Mobilität in diesem Fall durch eine stärkere Wechselwirkung mit der Bindungstasche bestimmt.

In Abbildung 8.2e ist die Projektion eines NOESY-Spektrums der C20A-Mutante von Agp1 zu sehen. Das wesentlich bessere Signal-zu-Rausch-Verhältnis in diesem Spektrum im Vergleich zu dem WT-Agp1 Spektrum (Abbildung 8.2d) ist durch eine signifikant bessere Deuterierung dieser Mutante zu erklären. Für die Untersuchung der Dynamik des Chromophors ist jedoch nur die Linienbreite wichtig. Es ist zu erkennen, dass die kovalente Bindung hier keinen Einfluss auf die Verhältnisse in der Bindungstasche nimmt.

Abschließend kann festgestellt werden, dass es in bakteriellen und cyanobakteriellen Phytochromen Unterschiede in der Mobilität des Chromophors in der Bindungstasche gibt. Während BV in dem untersuchten bakteriellen Phytochrom anscheinend eine definierte Struktur im P_r-Zustand einnimmt, so ist dies in dem vorliegenden cyanobakteriellen Phytochromen nicht der Fall.

Neben dem allgemein unterschiedlichen Verhalten von BV und PCB in der Bindungstasche kann beim PCB eine Veränderung der Mobilität innerhalb des Tetrapyrrols von Ring A hin zu Ring D festgestellt werden.

Für eine Interpretation des Phytochrom Photozyklus muss also immer die Mobilität des Chromophors beachtet werden. Die gefundenen strukturellen Unterschiede zwischen bakteriellen und cyanobakteriellen Phytochromen können einen ersten Ansatz zur Klärung der funktionellen Unterschiede innerhalb der Phytochrom-Subklassen liefern. Allerdings sind hierzu weitere Untersuchungen sowohl an den hier vermessenen als auch an den anderen Phytochromen nötig, um allgemein gültige Aussagen machen zu können.

9. Chromophor–Protein Interaktion

Nicht nur die dynamischen Eigenschaften des Chromophors in der Bindungstasche sind für das Verständnis des Photozyklus wichtig. Da eine Signalübertragung während der Z/E-Isomerisierung wahrscheinlich durch eine Umlagerung eines Wasserstoffbrückennetzwerkes ausgelöst wird, ist es von Interesse, Wasserstoffbrücken zwischen Chromophor und Protein nachzuweisen.

Dies ist jedoch keine triviale Aufgabe.

Wasserstoffbrückenbindungen können nur schwer über Kristallstrukturen nachgewiesen werden, und keine der bis jetzt vorliegenden Phytochromkristallstrukturen besitzt eine genügend hohe Auflösung, um die Position von Protonen bestimmen zu können. Ein direkter Nachweis von Wasserstoffbrückenbindungen kann über die Detektion von skalaren Kopplungen über die Bindung geschehen. Diese Methode ist aufgrund der Größe des untersuchten Systems und der mäßigen Signalintensität jedoch nicht anwendbar.

Neben der direkten Nachweismethode können in der NMR-Spektroskopie Wasserstoffbrücken indirekt nachgewiesen werden. Dafür bedient man sich der Signale von Protonen, die als Wasserstoffbrückenbindungsdonoren wirken. Sind diese Protonen austauschbar, so wird der Grad des Austauschs dieses Protons aufgrund der bestehenden Wasserstoffbrücke herabgesetzt. In dem vorliegenden Fall liegt der Fokus dabei auf austauschbaren Protonen von Aminosäureresten innerhalb der Chromophorbindungsstasche. Hierfür kommen vor allem die beiden in der Bindungstasche vorhandenen Histidine und mehrere Tyrosine in direkter Nachbarschaft zum Chromophor in Frage, wie Mutationsstudien und auch die Kristallstrukturen gezeigt haben

Typische Wasserstoffbrückendonoren sind die Protonen $H_{\epsilon 2}$ der Histidinseitenketten. Ihre chemische Verschiebung ist typischerweise >10 ppm. Bei den Tyrosinen ist das Hydroxylproton von Interesse, welches bei einer chemischen Verschiebung um 10 ppm erwartet wird. Bei beiden Aminosäuren handelt es sich um austauschbare Protonen. Ein schneller Austausch mit der Umgebung hat zur Folge, dass eine Verbreiterung des Signals stattfindet. Aus diesem Grund sind diese Protonen für gewöhnlich nicht zu detektieren. Sind diese Protonen jedoch an einer Wasserstoffbrücke beteiligt, so ist der Austausch verlangsamt. In diesem Fall können die Protonen mittels NMR-Spektroskopie wieder detektiert werden. Bezogen auf die Histidine heißt dies, dass eine Wasserstoffbrücke zum $H_{\epsilon 2}$ aus der Existenz eines Signals im Spektrum abgeleitet werden kann. Aufgrund der räumlichen Nähe zweier Histidine in der Bindungstasche des Proteins zum Chromophor sind Kreuzsignale in 2D-NOESY-Spektren zu erwarten, die wichtige strukturelle Informationen liefern können.

Für die Untersuchung der Interaktionen zwischen Chromophor und Protein wurden zwei Systeme verwendet. Zum einen das bakterielle Agp1 und zum anderen das cyanobakterielle Phytochrom Cph1. Cph1 wurde sowohl im P_r -Grundzustand als auch im angeregten P_{fr} -Zustand untersucht. Agp1 konnte wegen der schnellen Dunkelreversion des angeregten P_{fr} -Zustandes nur im P_r -Grundzustand untersucht werden. Mit diesen Experimenten können, strukturelle Informationen sowohl über den P_{fr} -Zustand eines cyanobakteriellen Phytochroms als auch über den P_r -Zustand eines bakteriellen Phytochroms erhalten werden. Dies ist von besonderem Interesse, da keine Kristallstrukturen dieser Zustände verfügbar sind.

9.1. Interaktionen in Cph1

9.1.1. Probenvorbereitung

Für die Aufnahme der Spektren wurde deuteriertes Protein verwendet. Dadurch konnten die Spektren soweit vereinfacht werden, dass eine Zuordnung des Chromophors möglich wurde. Zur Detektion der austauschbaren Protonen wurden das Protein in 90 % H_2O und 10 % D_2O gelöst.

Weiterhin wurden zwei Proben hergestellt. Das ^{15}N -HMQC wurde mit ^{15}N -uniform markiertem und zusätzlich deuteriertem Cph1 mit unmarkiertem PCB aufgenommen. Als Lösungsmittel wurde 90 % H_2O und 10 % D_2O verwendet. Für die 2D-NOESY Spektren wurde deuteriertes Protein mit unmarkiertem PCB, ebenfalls in 90 % H_2O und 10 % D_2O gelöst, verwendet. Die Konversion des P_r - in den P_{fr} -Zustandes wurde mit Rotlicht vor der Messung durchgeführt. Eine Dunkelreversion innerhalb des Zeitrahmens der NMR-Experimente ist für Cph1 nicht bekannt und somit für die folgenden Experimente vernachlässigbar.

9.1.2. NMR-Spektroskopie

Von Cph1 wurden zuerst in der P_r -Form 1H 1D-Spektren aufgenommen. Standardmäßig aufgenommene Spektren mit Vorsättigung als auch einer 3-9-19-WATERGATE-Wasserunterdrückung zeigten eine gute Dispersion der Signale des gefalteten Proteins. Da es sich bei dem Proton He2 des Histidins als auch beim Hydroxylproton des Tyrosins um austauschbare Protonen handelt, kann zu deren Detektion keine Vorsättigung als Wasserunterdrückung verwendet werden, da hier austauschbare Protonen ebenfalls unterdrückt werden.

Signale der Seitenkettenprotonen He2 der beiden Histidine innerhalb der Bindungstasche sind bei einer chemischen Verschiebung >10 ppm zu erwarten. Da das Anregungsprofil der 3-9-19-WATERGATE-Sequenz im Bereich >10 ppm nicht mehr optimal ist, wurde für die Aufnahme der Spektren die 1-1-ECHO Sequenz verwendet.^[111]

Diese besitzt ein breiteres Anregungsprofil und ist dementsprechend gut geeignet für eine Anregung von Protonen in den höheren ppm-Bereichen.

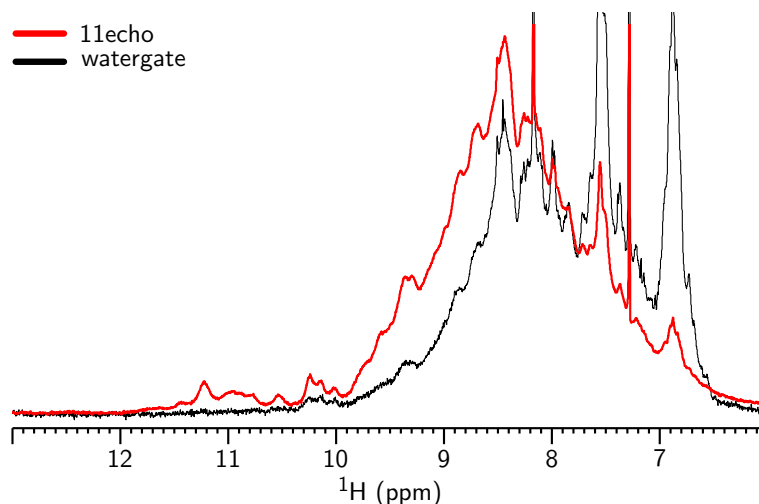


Abbildung 9.1.: Ausschnitt aus dem Protonenspektrum vom $^2\text{D}^{15}\text{N}$ -Cph1 Δ 2 in H_2O mit unmarkiertem PCB. Die zusätzlichen Signale um 11 ppm stammen unter anderem vom His-290 in der Chromophorbindungstasche.

Das Protonen 1D-Spektrum mit 1-1-ECHO Wasserunterdrückung zeigt deutliche Signale im Bereich >10 ppm. Ebenso ist zu erkennen, dass diese Signale im WATER-GATE Protonenspektrum nicht mehr vorhanden sind (Abbildung 9.1). Im nächsten Schritt bleibt zu klären, ob es sich hierbei um stickstoffgebundene Protonen, also Histidinseitenketten handeln kann. Dafür wurde ein ^{15}N -HMQC des ^{15}N uniform markierten Proteins aufgenommen, welches zwei deutliche Signale bei hohen chemischen Verschiebungen zeigt. Aufgrund der chemischen Verschiebung muss es sich um Histidinseitenketten handeln (Abbildung 9.2e). Innerhalb der Proteinsequenz gibt es mehrere Histidine¹, jedoch nur zwei davon liegen in direkter Nachbarschaft zum Chromophor innerhalb der Bindungstasche (siehe Sequenzalignment Anhang C). Im Cph1 sind dies His-260 und His-290. Die Möglichkeit, dass es sich bei den auftretenden Signalen um solche von Protonen des PCB handelt, kann aufgrund vorliegender Untersuchungen ausgeschlossen werden.^[112] Solche Signale würden eine wesentlich größere Signalbreite aufweisen und bei chemischen Verschiebungen kleiner 11 ppm liegen.

Um eine Wechselwirkung zum Chromophor zu untersuchen, wurde ein 2D-NOESY Spektrum des deuterierten Cph1 mit ebenfalls unmarkiertem Chromophor aufgenommen. Dieses ist in Abbildung 9.2a und c zu sehen. Ausgehend vom Signal bei 11.2 ppm

¹Die genaue Anzahl ist abhängig vom betrachteten Konstrukt. Im Cph1 Δ 2 (PDB: 2VEA) sind es 24 Histidine.

konnten NOE-Wechselwirkungen zu den Methylgruppen im Chromophor an Position 13^1 und 18^2 sowie zum Pyrrolproton H24 detektiert werden. Die Zuordnung der chemischen Verschiebungen des PCB wurde anhand der Ergebnisse von Hahn *et al.* durchgeführt.

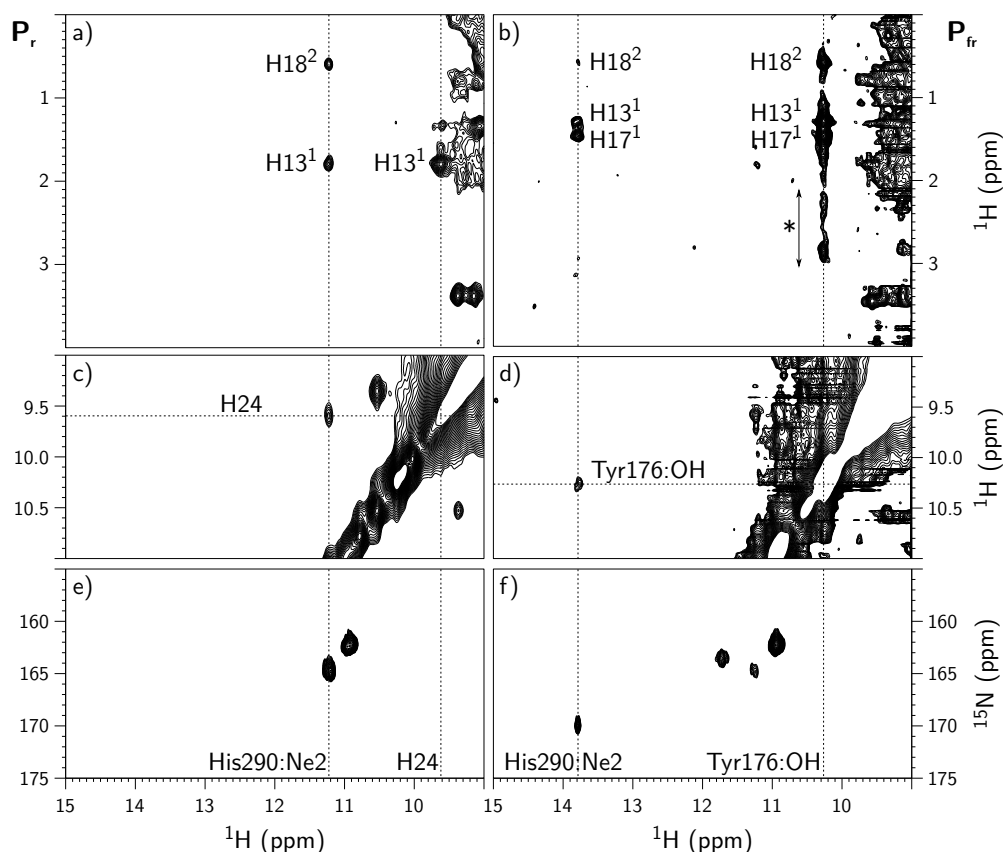


Abbildung 9.2.: Zweidimensionale Spektren von Cph1 in der P_r - (links) und der P_{fr} -Form (rechts). Die Spektren wurden mit deuteriertem Cph1 und unmarkiertem PCB in H_2O aufgenommen. In a), b), c) und d) sind Ausschnitte aus dem 2D-NOESY mit den entsprechenden Korrelationen zum PCB gezeigt. Die Korrelation zum H24 (P_r -Form) und zum Tyr-176 (P_{fr} -Form) ist mit einer gestrichelten Linie markiert. Signale mit einem Sternchen sind den Propionsäureseitenketten zuzuordnen. e) und f) zeigen die Ausschnitte der Histidin-Seitenketten signale im ^{15}N -HMQC. Die deutliche Tieffeldverschiebung und kleinere Linienbreite vom His-290 He2 in f) im Vergleich zu e) zeigt den deutlich verlangsamten Austausch des Protons mit der Umgebung.

Bis zum jetzigen Zeitpunkt existiert keine vollständige Zuordnung aller NMR-Signale vom Cph1 in Lösung. Die Größe vom Cph1 macht dies außerordentlich schwierig. Dementsprechend kann die Zuordnung der Signale zum Histidin-290 nicht alleine anhand von NMR spektroskopischen Daten erfolgen.

Abhilfe schafft die vorliegende Kristallstruktur des Cph1 im P_r-Grundzustand.^[2] Während Histidin 260 in der Nähe vom Ring C lokalisiert ist, befindet sich Histidin 290 in direkter Nachbarschaft zu Ring D. Eine Abstandsanalyse mit Pymol zeigt, dass die Abstände zwischen dem Seitenkettenproton Hε2 vom Histidin 290 eine NOE-Wechselwirkung zum Chromophor zulässt. Mit Hilfe der vorliegenden Kristallstruktur (PDB: 2VEA) ist somit eine Zuordnung der gefundenen Signale möglich.

Die gleichen Experimente wurden anschließend für den aktiven P_{fr}-Zustand von Cph1 durchgeführt. Das Protonenspektrum zeigte ebenfalls Signale bei 11 ppm und höhere bei einer verwendeten 1-1-ECHO Sequenz. Das daraufhin aufgenommene ¹⁵N-HMQC enthielt vier Signale in dem Bereich zwischen 10 und 14 ppm (Abbildung 9.2f). Das Signal bei 11.2 ppm, welches in der P_r-Form als Hε2 von His-290 identifiziert wurde, ist ebenfalls vorhanden. Da Cph1, aufgrund der überlappenden Absorptionsspektren vom P_r- und P_{fr}-Zustand durch Bestrahlung, nicht zu 100 % in den P_{fr}-Zustand überführt werden kann, war dies zu erwarten. Es unterstreicht vielmehr noch den Punkt, dass die Spektren die strukturelle Änderung während des Photozyklus wiedergeben.

Ein anschließend aufgenommenes 2D-NOESY-Spektrum zeigt deutliche Korrelationen des Signals bei 14 ppm zum Chromophor (Abbildung 9.2b). Die Signale können den Protonen an Position 13¹, 17¹ und 18² zugeordnet werden. Ebenso ist eine deutliche Korrelation zu einem Signal bei 10.3 ppm von einem nicht stickstoffgebundenem Proton zu sehen, welches ebenso deutliche NOE-Wechselwirkungen zum Chromophor zeigt (Methylgruppen an Position 13¹, 17¹ und 18² sowie den Propionsäureseitenketten). Eine Korrelation zum Proton H24 kann nicht mehr detektiert werden.

Da keine NMR-Zuordnung für Cph1 verfügbar ist, muss eine Interpretation der Signale auf einem anderen Weg erfolgen. Eine Kristallstruktur des Cph1 in der P_{fr}-Form ist zum aktuellen Zeitpunkt nicht verfügbar. Alternativ kann die vorliegende Kristallstruktur des PaBphP verwendet werden.^[3] Dieses ist ein bakterielles Phytochrom, weist aber als Besonderheit einen inversen Photozyklus auf. Hier ist P_{fr} der Grund- und P_r der angeregte Zustand. Mit Hilfe eines Homologiemodelles des Cph1 im P_{fr}-Zustand auf der Basis der Struktur vom PaBphP konnten die Signale dem Tyrosin-176 und Histidin-290 zugeordnet werden.

9.1.3. Cph1-P_{fr}-Homologiemodell

Für die Interpretation der NMR-Daten von Cph1 in der P_{fr}-Form wurde ein Homologiemodell der Struktur erstellt. Die Grundlage dafür war die P_r-Kristallstruktur des Cph1 (PDB: 2VEA).^[2] Diese wurde an die P_{fr}-Kristallstruktur vom PaBphP (PDB: 3C2W) angepasst.^[3] Dafür wurde das Programm Sybyl von Tripos verwendet.

Zuerst wurde ein Alignment der beiden Sequenzen erzeugt. Alle konservierten Aminosäuren wurden in den anschließenden Optimierungen in ihrer räumlichen Struktur möglichst nicht verändert. Fehlende Aminosäuresequenzen sowohl in der P_r-

als auch in der P_{fr} -Struktur wurden durch eine Datenbanksuche in der *Protein Database* (PDB) mit dem Biopolymer Modul von Sybyl auf der Basis der C_{α} -Atome ermittelt. Ebenso wurde das Cystein für die kovalente Bindung zum Chromophor an die Cph1-Leitstruktur angepasst. Die so ermittelten Loop-Strukturen wurden anschließend per Hand auf eine möglichst gute strukturelle Homologie untersucht und das beste Resultat für die weitere Erstellung des Homologiemodells verwendet. Ebenso wurde der Chromophor Biliverdin (BV) aus dem bakteriellen Phytochrom PaBphP gegen Phycocyanobilin (PCB) des cyanobakteriellen Phytochroms Cph1 ausgetauscht. Die Position der für die Stabilisierung des Chromophors notwendigen Wassermoleküle wurde beibehalten.

Anschließend erfolgten mehrere Schritte zur Energieminimierung. Zuerst wurden nur die substituierten Loop-Bereiche, dann alle Aminosäure, die in dem Alignment nicht konserviert sind, optimiert. Der Optimierung der Methylgruppen im Protein folgte eine weitere Minimierung, bei der die Seitenketten aller nicht konservierten Aminosäuren relaxiert wurden. Die eingefügten Loops unterlagen dabei keinen Beschränkungen. Bereiche hoher Energie in der resultierenden Struktur wurden überprüft und gegebenenfalls unter Verwendung einer Bibliothek eine zur Seitenkettenkonformation bevorzugte Seitenkettenorientierung eingestellt.^[113] Danach folgte ein weiterer Minimierungsschritt aller nicht konservierten Aminosäuren. Zuletzt wurde nochmals die gesamte Struktur hinsichtlich ihrer Energie optimiert, jedoch wurden alle C_{α} -Atome im Raum fixiert.

Fehlende Wassermoleküle in der Chromophorbindungstasche wurden anschließend ergänzt.

9.1.4. Diskussion

Die Spektren der P_r -Struktur des Cph1 zeigen eine deutliche Korrelation von Histidin-290 zu Ring D am PCB (Abbildung 9.3). Aufgrund der räumlichen Nähe der Histidinseitenkette war dies durchaus zu erwarten. Vielmehr ist die Tatsache interessant, dass überhaupt ein Signal zu sehen ist.

Wie bereits oben erwähnt, unterliegt das Seitenkettenproton $H_{\epsilon 2}$ normalerweise einem schnellen Austausch mit der Umgebung. Das NMR-Signal wird dementsprechend breit und ist in den meisten Fällen überhaupt nicht zu erkennen. Auch wenn die Bindungstasche des Cph1 durch ein »Zungenmotiv« von äußeren Einflüssen abgeschirmt ist, sind dennoch Wassermoleküle innerhalb der Bindungstasche vorhanden. Ein Austausch ist somit prinzipiell möglich.

Die Detektion des Histidinprotons deutet nun darauf hin, dass dieser Austauschprozess verlangsamt ist oder nicht mehr stattfindet. Als Ursache kommen Wasserstoffbrückenbindungen in Frage. Es wird auf der Basis der verfügbaren Kristallstrukturen vermutet, dass der Chromophor ein Netzwerk von Wasserstoffbrückenbindungen mit den ihn umgebenden Aminosäuren ausbildet. Protonen, die in Wasserstoffbrücken-

bindungen inkorporiert, sind erfahren keinen schnellen Austausch mehr mit ihrer Umgebung. Als Resultat können solche Protonen in der NMR-Spektroskopie detektiert werden. Die Existenz eines NMR-Signals für das Histidin 290 Seitenkettenproton $H\epsilon_2$ ist ein sicheres Zeichen dafür, dass es an einer Wasserstoffbrückenbindung beteiligt ist.

Das ϵ_2 -Proton der Histidinseitenkette fungiert als Wasserstoffbrückenbindungsdonor. Als Akzeptor kommen die Sauerstoffatome der Propionsäureseitenketten in Frage, sowie die Carbonylgruppe am Ring D des PCB. Auch wenn diese Frage nicht eindeutig mit Hilfe der vorliegenden Experimente geklärt werden kann, so ändert es nichts an der Schlussfolgerung, dass Histidin-290 mit seiner Seitenkette als Interaktionspartner des Chromophors zu Verfügung steht.

Ähnlich verhält es sich mit dem Pyrrolproton H24 an Ring D. Normalerweise ist auch hier ein schneller Austausch mit der Umgebung zu erwarten. Im Falle der Pyrrolprotonen der Ringe A, B, und C scheint dies auch der Fall zu sein, da entsprechende Signale nicht detektiert werden können. Der Fakt, dass H24 ein scharfes Signal mit einer Korrelation zu der Methylgruppe 13^1 zeigt, belegt, dass auch H24 an einer Wasserstoffbrückenbindung beteiligt ist.

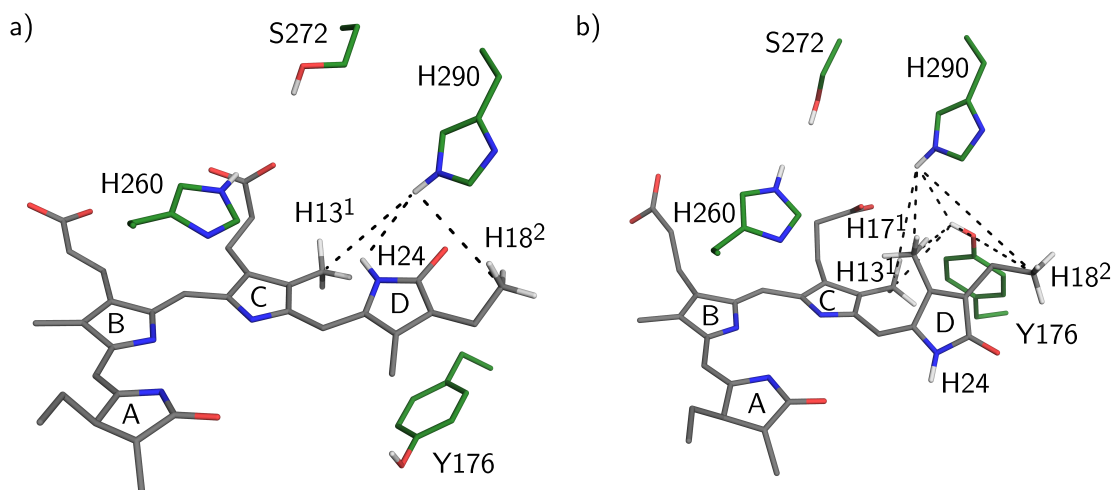


Abbildung 9.3.: NOE-Interaktionen zwischen PCB und der Chromophorbindungstasche des Cph1 sind als gestrichelte Linien dargestellt. a) P_r -Form. Die dargestellte Struktur entspricht der von Essen *et al.* veröffentlichten Kristallstruktur.^[2] b) P_{fr} -Form. Für die Darstellung wurde das auf der Basis der von Yang *et al.* veröffentlichten Kristallstruktur erstellte Homologiemodell von Cph1 in der P_{fr} -Form verwendet.^[3]

Der P_{fr} -Zustand kann nun analog auf der Basis des Homologiemodelles betrachtet werden. Auch hier gilt, dass das Seitenkettenproton His-290- ϵ_2 normalerweise einem schnellen Austausch mit der Umgebung unterliegt. Da jedoch ein Signal und entsprechende Korrelationen zum PCB detektiert werden konnten, muss auch dieses in einer Wasserstoffbrückenbindung involviert sein. Weiterhin fällt die starke Tieffeldverschie-

bung des Histidinsignals um fast 3 ppm auf. Das ist ein Hinweis darauf, dass die Stärke der Wasserstoffbrückenbindung im Vergleich zum P_r-Zustand zugenommen hat.

Im P_{fr}-Zustand konnte keine Korrelation zum Pyrrolwasserstoff an Ring D beobachtet werden. Stattdessen wurde eine eindeutige Korrelation zu der Methylgruppe an Position 17¹ detektiert. Dies ist nur möglich, wenn an der Doppelbindung C15 eine Z/E-Isomerisierung stattfindet. Die Ergebnisse dieser Arbeit widerlegen eindeutig die Aussagen von Ulijasz *et al.*, wonach die primäre strukturelle Änderung während des Photozyklus an Ring A stattfindet.^[83] Allerdings untersuchten Ulijasz *et al.* strukturelle Änderungen während des Photozyklus von Cyanobakteriochromen, die keine kanonischen Phytochrome repräsentieren. Ein unterschiedlicher Mechanismus ist also durchaus möglich, eine Verallgemeinerung der Aussagen von Ulijasz *et al.* auf alle Phytochrome ist in unserer Meinung nach jedoch unzulässig.

Aus dem Intensitätsunterschied der Korrelationen zwischen His-ε2-290 und der Methylgruppe an Position 18² im P_r- und P_{fr}-Zustand kann man ableiten, dass der Abstand größer geworden sein muss. Auch wenn die Seitenkette im P_{fr}-Zustand nunmehr in Richtung des His-290 zeigt, scheint es, dass die Methylgruppe durch Rotation an der Einfachbindung vom Histidin weg zeigt.

Die Zuordnung des Tyrosin-176 erfolgte auf der Basis des erstellten Homologie-modells, welches auf der Struktur des bakteriellen Phytochroms PaBphP (PDB code: 3C2W) aufbaut. Während im P_r-Zustand das Tyr-176 unterhalb des PCB liegt, so liegt das Tyrosin in der Struktur des PaBphP im P_{fr}-Zustand zwischen dem Ring D und dem His-290. Diese Bewegung des Tyrosins kann mit den vorliegenden Ergebnissen bestätigt werden. Dementsprechend muss auch im angeregten P_{fr}-Zustand in Cph1 das Tyrosin zwischen dem Ring D und dem His-290 liegen. Würde diese Bewegung nicht stattfinden, könnte kein NOE zwischen dem Tyrosin Hydroxylproton und His-290, sowie dem Chromophor beobachtet werden.

Das Hydroxylproton des Tyrosins fungiert ebenfalls als Wasserstoffbrückendonator. Ein schneller Austausch dieses Protons scheint nicht mehr gegeben zu sein. Es liegt nahe, dass Tyrosin-176 eine wichtige Rolle innerhalb des Phytochrom Photozyklus spielt. Dies wird durch Ergebnisse von Mutationsstudien in Cph1 gestützt.

Aus den vorliegenden Ergebnissen kann abgeleitet werden, dass die Photozyklen von bakteriellen und cyanobakteriellen Phytochromen große Übereinstimmung aufweisen. Im Bereich der Bindungstasche um Ring D scheinen His-290 und Tyr-176 eine elementare Rolle während des Photozyklus zu spielen. Sehr wahrscheinlich sind beide Aminosäuren für eine Signalübertragung vom Chromophor auf das Protein mitverantwortlich. Da cyanobakterielle Phytochrome aufgrund ihrer großen Ähnlichkeit zu pflanzlichen Phytochromen als Modellsystem eingesetzt werden, scheint eine Übertragung der Ergebnisse auf diese Phytochromklasse ebenfalls möglich.

In wieweit sich der Photozyklus von Phytochromen wie Cph2 oder den Cyanobakteriochrome von denen der pflanzlichen, bakteriellen und cyanobakteriellen Phytochromen

me unterscheidet, muss durch weitere Untersuchungen geklärt werden. Die bisherigen Ergebnisse von Ulijasz *et. al.* weisen jedoch darauf hin, dass dies der Fall ist.

9.2. Interaktionen in Agp1

Nachdem in Cph1 ein Histidin sowie ein Tyrosin als wichtige Interaktionspartner des Chromophors identifiziert werden konnten wurde ein bakterielles Phytochrom als Vergleichssystem hinzugezogen. Die Wahl fiel dabei auf Agp1 aus *Agrobacterium tumefaciens*. Durch die schnelle Dunkelreversion dieses Phytochroms ist eine NMR-spektroskopische Untersuchung des P_{fr} -Zustandes nicht möglich. Wie bereits erwähnt, existiert vom P_r -Zustand keine Kristallstruktur, was eine strukturelle Untersuchung des Systems von einem besonderen Interesse macht.

Aufgrund der schlechteren Deuterierung der Agp1-Probe und der daraus resultierenden schlechteren Qualität der Spektren erfolgt die Diskussion anhand der Spektren der C20A-Mutante. Alle Signale der Spektren der C20A-Mutante konnten ebenso in den Spektren des Wildtyps identifiziert werden.

9.2.1. Probenvorbereitung

Für die NMR-Messungen wurde das Agp1-M15 Konstrukt eingesetzt, dem die Histidin-Kinase fehlt. Es wurden der Wildtyp und die C20A-Mutante verwendet. Während im Wildtyp der Chromophor kovalent innerhalb der Bindungstasche gebunden ist, ist dies in der Mutante nicht mehr möglich.

2D-NOESY Spektren wurden mit deuteriertem Protein (Agp1-M15, Agp1-M15-C20A) in D_2O aufgenommen. Stickstoff-Protonen-Korrelationen (^{15}N -HMQC) wurden mit ^{15}N uniform markiertem Protein in H_2O (Agp1-M15, Agp1-C20A) aufgenommen.

9.2.2. NMR-Spektroskopie

Da keine Zuordnung der Signale des Chromophors Biliverdin in der Bindungstasche verfügbar ist, musste diese zuerst durchgeführt werden. Die Schwierigkeit hierbei ist, dass Biliverdin im Gegensatz Phycocyanobilin nicht in einer isotopenmarkierten Form hergestellt werden kann. Es muss somit bei natürlicher Häufigkeit gearbeitet werden. Um dennoch zu einer Zuordnung zu gelangen, wurde die C20A-Mutante des Agp1 in deuteriertem Medium angezogen und als Apoprotein isoliert, um einen hohen Grad an Deuterierung zu erhalten. Biliverdin wurde anschließend hinzugegeben. Der in die Bindungstasche eingelagerte Chromophor (Biliverdin) ist somit protoniert. Das ermöglicht die Aufnahme von 2D-NOESY-Spektren, mit denen eine Zuordnung möglich war (Abbildung 9.4).

Die Zuordnung der Signale erfolgte unter der Annahme, dass Biliverdin innerhalb der Bindungstasche eine ZZZssa-Konfiguration besitzt. Als Startpunkt dienten die vier

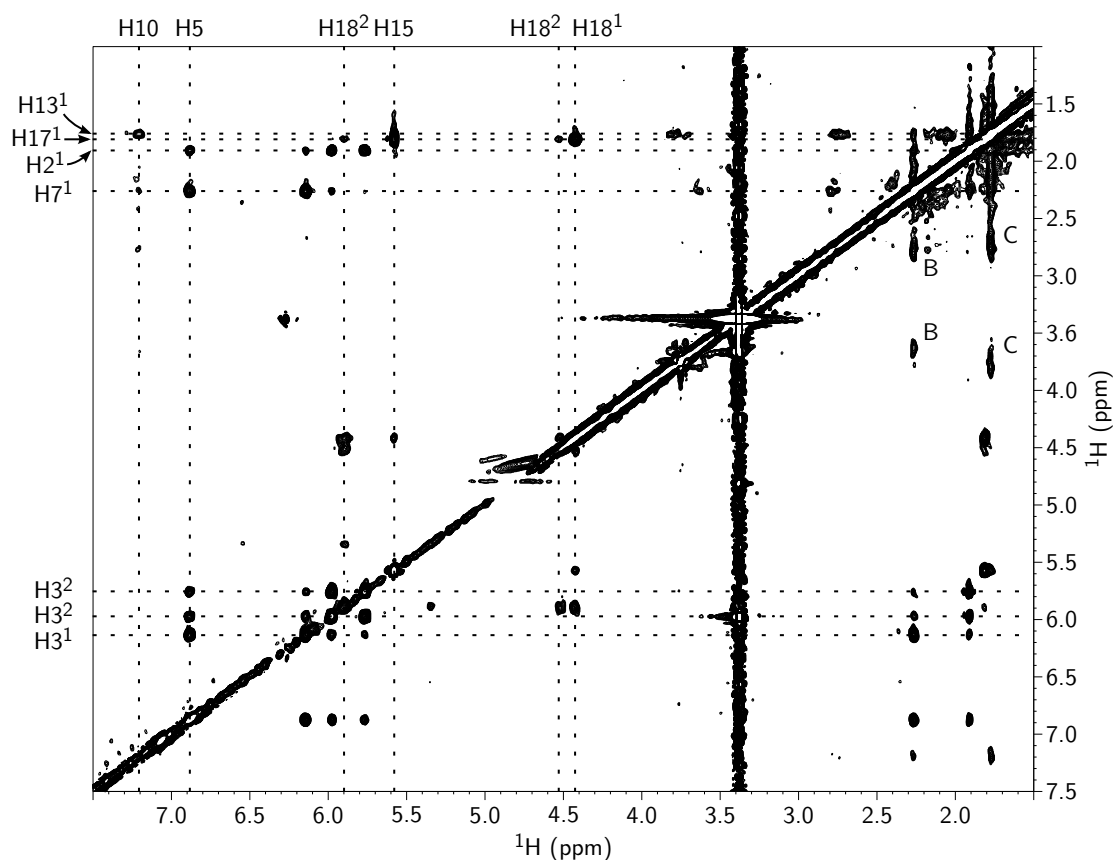


Abbildung 9.4.: 2D-NOESY Spektrum von Agp1-M15-C20A in der P_r -Form, aufgenommen in D_2O . Die Zuordnung der Signale basiert auf der Annahme, dass der Chromophor eine ZZZssa Konfiguration besitzt. Korrelationen zu den Propionsäureseitenketten der Ringe B und C sind entsprechend gekennzeichnet.

Methylgruppen an den Ringen A bis D. Durch die Korrelation der Methylgruppen an Position 7^1 und 13^1 zu den Propionsäureseitenketten konnten diese zugeordnet werden. Eine Zuordnung der einzelnen Protonen der Propionsäureseitenketten ist nicht möglich. Außerdem ist eine starke Korrelation der Methylgruppe an Position 17^1 mit dem Methinbrückenproton H15 aufgrund der räumlichen Nähe zu erwarten. Somit kann die Methylgruppe 17^1 ebenfalls im Spektrum identifiziert werden. Sind diese drei Gruppen zugeordnet, kann die verbleibende Resonanz der Methylgruppe an Position 2^1 zugeordnet werden. Die restliche Zuordnung erfolgte anhand der Intensität der Wechselwirkungen zwischen den Protonen $H3^1/H3^2$ mit der Methylgruppe an Position 7^1 und zwischen den Seitenkettenprotonen der Vinylgruppe an Position 18 mit den Methylgruppenprotonen $H17^1$.

Nach erfolgter Zuordnung der Signale wurde der gleiche Spektrensatz wie für Cph1

(^{15}N -HMQC und 2D-NOESY mit 1-1-ECHO Wasserunterdrückung) aufgenommen. Es stellten sich wie bei Cph1 die gleichen Fragen. Können die Seitenkettenprotonen von den benachbarten Histidinen und ggf. Tyrosinen identifiziert werden? Können daraus Wasserstoffbrückenbindungen abgeleitet werden?

Das ^{15}N -HMQC Spektrum des ^{15}N markierten Agp1 zeigt zwei Kreuzsignale, die bei einer Protonen chemischen Verschiebung >10 ppm und Stickstoff chemischen Verschiebungen >160 ppm liegen. Das ist der Bereich, in dem die Seitenkettenprotonen $\text{H}\epsilon_2$ der Histidine erwartet werden. Beide Signale zeigen im 2D-NOESY eindeutige Korrelationen zum Chromophor und können somit den Aminosäureresten Histidin 250 sowie 280 zugeordnet werden (Abbildung 9.5).

Ebenso kann das Hydroxylproton $\text{H}\gamma$ von Serin-262 durch Interaktionen zu dem dem $\text{H}\epsilon_2$ -Proton von Histidin-250 und 280 identifiziert werden. Das Proton $\text{H}\eta$ von Tyrosin-206 zeigt Wechselwirkungen zum Chromophor, unter anderem zu den Methylgruppen an Position 7¹ und 13¹.

Die Interpretation der Spektren basiert auf Grundlage der Kristallstruktur des Phytochroms aus *Deinococcus radiodurans* (DrBphP, PDB: 1ZTU).

9.2.3. Diskussion

Im Gegensatz zu Cph1 ist der Chromophor in Agp1-M15-C20A nicht kovalent gebunden. Die außerordentlich gute Qualität der Spektren lässt sich in diesem Fall durch den sehr hohen Deuterierungsgrad des Proteins erklären. Dies macht die beschriebene Interpretation der Spektren erst möglich. Für eine detailliertere Diskussion der Mobilität des Chromophors in der Bindungstasche siehe Kapitel 8.

Ebenso wie in Cph1 ist keine vollständige Zuordnung der NMR-Signale des Agp1 vorhanden. Eine Interpretation musste somit auf Grundlage einer Kristallstruktur eines bakteriellen Phytochroms erfolgen. Hierfür wurde das DrBphP aus *Deinococcus radiodurans* (PDB: 1ZTU) verwendet. Da es sich ebenfalls um ein bakterielles Phytochrom mit Biliverdin im P_r -Grundzustand handelt, wird von einer hohen strukturellen Homologie der Bindungstasche ausgegangen.

In Abbildung 9.6 sind alle in den Spektren sichtbaren NOE-Wechselwirkungen durch gestrichelte Linien dargestellt. Die Wechselwirkungen zeigen deutlich, dass der Chromophor in einer ZZZ-Konfiguration innerhalb der Bindungstasche vorliegt. Eine Wechselwirkung vom Proton His-280- ϵ_2 zum Pyrrolproton H24 wäre sonst nicht möglich.

Eine weitere Voraussetzung für eine NOE-Wechselwirkung ist, dass das Pyrrolproton in eine Wasserstoffbrücke eingebunden sein muss. Der normalerweise vorliegende schnelle Austausch mit der Umgebung würde eine Detektion in der NMR-Spektroskopie verhindern. Dementsprechend ist das Vorhandensein eines Signals ein deutliches Zeichen dafür, dass dieses Proton in eine Wasserstoffbrücke eingebunden ist. Überträgt man diese Argumentation auf die Pyrrolprotonen H21 bis 23, so scheint

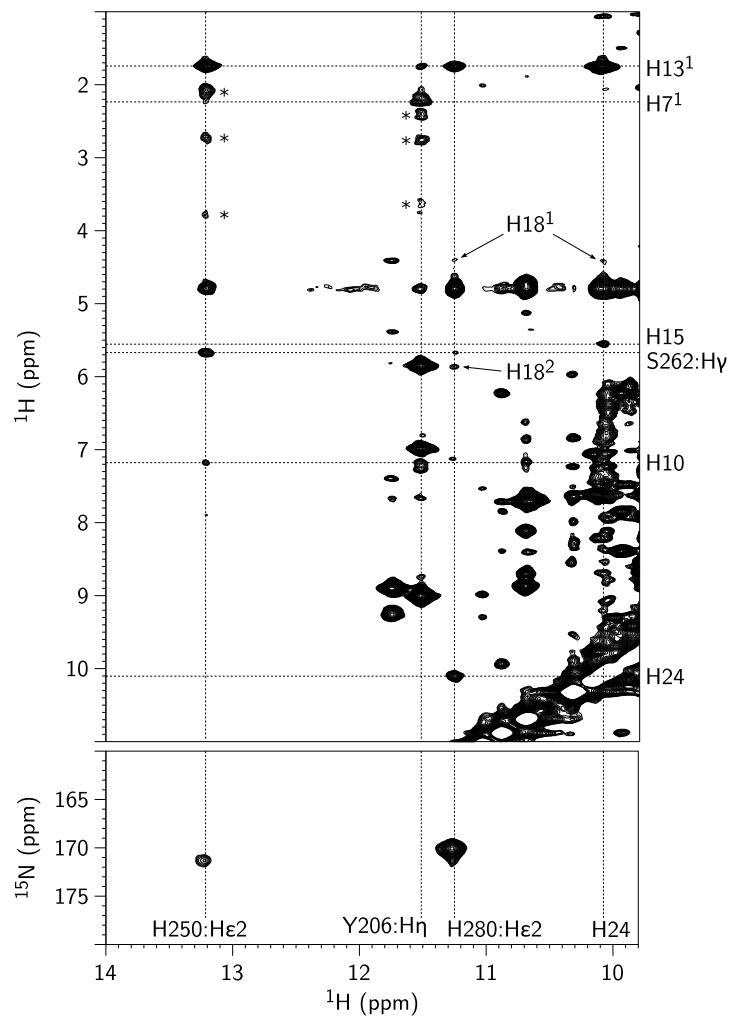


Abbildung 9.5.: ^{15}N -HMOC vom ^{15}N uniform markiertem Agp1-M15-C20A (unten) und 2D-NOESY vom unmarkiertem Agp1-M15-C20A (oben). Es sind deutliche Korrelationen von den beiden Seitenkettenprotonen He2 der Histidine H250 und H280 zu erkennen. Ebenfalls kann eine Wechselwirkung zum H γ des Serins-262 identifiziert werden.

sicher, dass diese einem schnellen Austausch mit den Wassermolekülen in der Bindungstasche unterliegen, da keine Kern-Overhauser-Wechselwirkungen zu sehen sind. Der Chromophor liegt innerhalb der Bindungstasche vollständig protoniert vor und trägt somit eine positive Ladung, die kompensiert werden muss. Durch eine Delokalisierung der Ladung über die Ringe A bis C und einen Austausch mit der Umgebung könnte die Kompensation stattfinden. Das Pyrrolproton von Ring D scheint durch seine eher statische Lokalisierung eine wichtige Rolle im Photozyklus zu spielen, zum Beispiel als Wasserstoffbrückendonator.

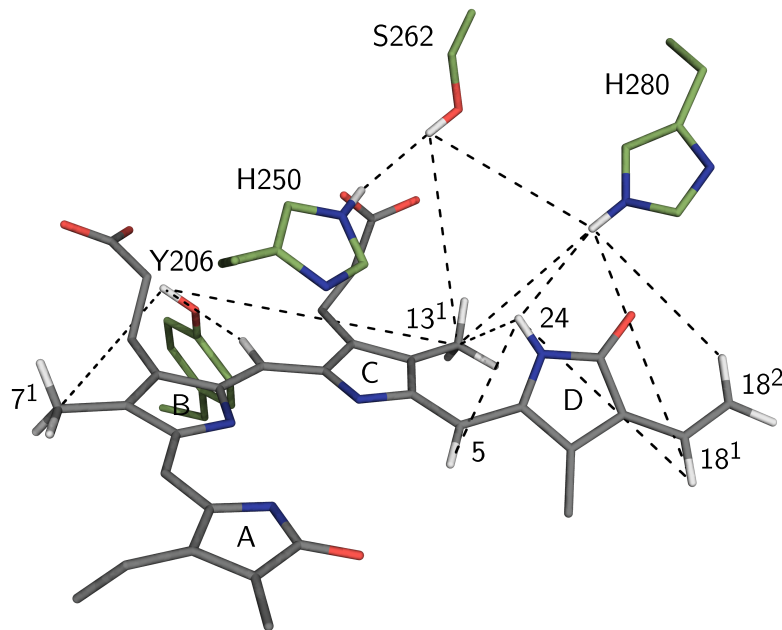


Abbildung 9.6.: NOE-Wechselwirkungen (gestrichelte Linien) im bakteriellen Phytochrom Agp1. Die dargestellte Struktur basiert auf der Kristallstruktur vom Phytochrom DrBphP aus *Deinococcus radiodurans*.^[1]

Die Argumentation wird gestützt durch das Verhalten der austauschbaren Protonen der Histidin-, Serin- und Tyrosinreste. Wie in Abbildung 9.6 zu sehen ist, zeigen die Protonen H γ , H ϵ 2 und H η von Serin 262, Histidin 250 und 280 bzw. Tyrosin 206 deutliche Interaktionen zum Chromophor. Somit muss in der Bindungstasche ein Netzwerk von Wasserstoffbrückenbindungen vorliegen. Dieses Wasserstoffbrückennetzwerk kann sowohl für die Stabilisierung der Konformation des Chromophors im P_r- oder P_{fr}-Zustand aber auch für die Signalübertragung von enormer Wichtigkeit sein.

9.3. Vergleich der Interaktionen im Cph1 und Agp1

Vergleicht man die Ergebnisse der Cph1 P_r-Struktur mit der Agp1 P_r-Struktur, fällt auf, dass in Agp1 wesentlich mehr NOE-Wechselwirkungen detektiert werden konnten. Während in Cph1 ausschließlich H ϵ 2 von Histidin 290 als Interaktionspartner detektiert werden konnte, so sind in Agp1 neben dem homologen Histidin-280 (Cph1: H290) ebenso Histidin-250 (Cph1: H260), Tyrosin-206 (Cph1: Y216) und Serin-262 (Cph1: S272) im Spektrum sichtbar.

Untersucht man die Abstände vom Chromophor zu den umgebenden Aminosäuren, stellt man fest, dass Serin-272 in Cph1 weiter als 6 Å vom PCB entfernt liegt. Aufgrund

des Abstandes kann keine NOE-Wechselwirkung detektiert werden. An dieser Stelle scheint die Bindungstasche in Agp1 etwas kompakter zu sein als in Cph1.

Im Cph1 sind ebenso keine NOE-Wechselwirkungen zu den Resten Tyr-216 und His-260 zu erkennen. Diese Reste liegen im Cph1 durchaus nah am Chromophor, so dass eine NOE-Interaktion möglich ist. Die Gründe für den fehlenden NOE müssen somit andere sein. Entweder unterliegen die Protonen einem Austausch mit der Umgebung oder die Dynamik des Chromophors verhindert die Detektion einer NOE-Wechselwirkung. Anhand der vorliegenden Daten kann dies jedoch nicht abschließend bestätigt werden.

Man kann jedoch abschließend feststellen, dass der Biliverdinchromophor in Agp1 im Vergleich zu Phycocyanobilin in Cph1 in einem dichteren Wasserstoffbrückennetzwerk gebunden ist.

9.4. Vergleich der Ergebnisse mit Festkörper NMR-Spektren

Kürzlich wurden zwei Artikel zur Struktur und den Interaktionen von Phycocyanobilin in der Cph1-Bindungstasche veröffentlicht, die auf Festkörper-NMR-Messungen beruhen.^[54,62] An dieser Stelle bietet es sich an, die vorliegenden Ergebnisse der Lösungs-NMR Messungen mit diesen zu vergleichen.

Mittels MELODI-HETCOR NMR-Messungen wurden in der Festkörper-NMR mehrere Kontakte vom Chromophor zu den Aminosäuren in der Bindungstasche bestimmt. In Übereinstimmung mit den hier vorliegenden Ergebnissen konnte eine Rotation von Ring D während des Photozyklus nachgewiesen werden. Dafür wurden Kontakte zwischen H24 und Kohlenstoffatomen an Position 13, 13¹ und 14 verwendet, die im P_{fr}-Zustand nicht mehr sichtbar waren. Darüber hinaus konnten keine signifikanten Veränderungen bei den Kontakten zwischen H21 und den Kohlenstoffatomen an Position 6, 9 und 5 detektiert werden, was darauf schließen lässt, dass die konformationelle Änderung auf Ring D beschränkt ist.^[62]

Durch ¹H-¹³C-Kontakte vom Chromophor zu den umgebenden Aminosäuren in einem Radius von 5,5 Å konnte die Struktur der P_r-Form mit der Kristallstruktur vom Cph1 in Einklang gebracht werden. Ebenso zeigte ein P_{fr}-Modell von Cph1, basierend auf der Struktur vom PaBphP, eine deutliche Übereinstimmung mit den experimentellen Daten. Die in dieser Arbeit vorgelegte Interpretation der Ergebnisse ist somit im Einklang mit den Festkörper-NMR-Experimenten am gleichen System.

In den Festkörper-NMR-Untersuchungen wurden für Cph1-P_r zwei Zustände, P_r-I und P_r-II, postuliert, die durch zwei vorhandene Signalsätze in den Spektren charakterisiert sind. In dieser Arbeit konnte eine erhöhte Mobilität des PCB in der Cph1-Bindungstasche anhand einer signifikanten Linienverbreiterung nachgewiesen werden. Es kann sein, dass die beiden in den Festkörper-NMR-Spektren nachgewiesenen Zustände die erhöhte Mobilität in Lösung widerspiegeln. Während eine Bewegung

des Chromophors in Lösung möglich ist, kann diese in der Festkörper-NMR-Probe in den beiden Zuständen P_r -I und P_r -II »eingefroren« sein.

Interessant ist, dass der P_r -II-Zustand, in dem das $N\epsilon_2$ -H-Tautomer vorliegt, aufgrund der größeren Signalintensität anscheinend bevorzugt wird. Auch dies ist im Einklang mit den in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnissen in denen eine deutliche NOE-Korrelation zum $N\epsilon_2$ -H sichtbar ist und dieses Proton somit in eine Wasserstoffbrücke inkorporiert sein muss.

Weiterhin wurde in den Festkörper-Arbeiten eine Konformation vom Ring D in der P_{fr} -Form α (oberhalb) oder β (unterhalb) der durch die anderen Ringe aufgespannten Ebene diskutiert. Dabei wurde die D - β_f - P_{fr} -Cph1-Struktur bevorzugt. Diese Konformation konnte anhand des in dieser Arbeit erstellten Homologiemodells nicht bestätigt werden. Bei einer solchen Konformation würde die Ethylgruppe an Position 18 durch das in direkter Nachbarschaft stehende Tyrosin-190 eine enorme sterische Hinderung erfahren. Daher müsste entweder das Tyrosin-190 weiter vom Chromophor in der P_{fr} -Form wegrücken oder der Chromophor müsste weitere sterische Veränderungen erfahren. Die P_{fr} -Kristallstruktur des PaBphP stützt keine dieser beiden Hypothesen.

Abschließend kann gesagt werden, dass eine Kombination beider Methoden, der Lösungs- und der Festkörper-NMR, zu einer Aufklärung des Photozyklus beitragen kann.

10. Zusammenfassung

Phytochrome sind licht-sensitive Proteine, welche als Rotlichtrezeptoren fungieren. Ein kovalent gebundener Chromophor verleiht den Phytochromen dabei ihre spektroskopischen Eigenschaften. Durch einen Photozyklus, maßgeblich eine Z/E-Isomerisierung am Chromophor, der durch die Absorption von rotem Licht ausgelöst wird, sind sie in der Lage, verschiedene Lichtverhältnisse zu detektieren. Unter anderem nehmen sie so Einfluss auf die Photomorphogenese von höheren Pflanzen. Bis zum heutigen Tag sind die genauen strukturellen Veränderungen am Chromophor und die der benachbarten Aminosäuren während des Photozyklus, welche schlussendlich zur Auslösung einer Signaltransduktionskaskade führen, nicht vollständig verstanden.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem Phytochrom Photozyklus und hatte unter anderem zum Ziel, Informationen zum Verhalten des Chromophors gebunden in der Bindungstasche und im ungebundenen Zustand zu erhalten. Zum einen wurde der cyanobakterielle Chromophor Phycocyanobilin (PCB) isoliert in einem organischen Lösungsmittel betrachtet und zum anderen wurde PCB und der bakterielle Chromophor Biliverdin (BV) innerhalb der Bindungstasche im Phytochrom untersucht.

PCB wurde dabei aus einer *Synechocystis sp.* Kultur isoliert. Durch die Anzucht in einem isotonenmarkierten Medium war ^{15}N - als auch $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -markiertes PCB für die Experimente verfügbar. Biliverdin stand nur in einer Isotopenverteilung mit natürlicher Häufigkeit zur Verfügung.

Der Chromophor PCB in Lösung

Für eine Zuordnung der Signale und eine anschließende strukturelle Betrachtung wurde PCB gelöst in einem organischen Lösungsmittel (Methanol, Dimethylsulfoxid (DMSO) und Hexamethylphosphorsäuretriamid (HMPT)) betrachtet.

Durch die hohe Symmetrie, den wenigen vorhandenen Protonen am PCB und aufgrund der geringen Konzentration der Probe führte eine eindeutige Zuordnung aller NMR-Signale mit Hilfe von COSY-, HMQC- und HMBC-Spektren nicht zum Erfolg. Somit musste eine Zuordnungsstrategie, angelehnt an Experimente wie dem HNCA oder HNCOCA, aus der Protein-NMR angewendet werden. Dafür wurden die Experimente HNC und HNCRELAY entwickelt. Hierbei wurden Magnetisierungstransfers ausgehend vom Pyrrolproton über den Stickstoff hin zu den benachbarten Kohlenstoffen verwendet. Somit wurde zum Beispiel eine eindeutige Zuordnung der Signale zu den vier Pyrrolringen des PCB möglich. Für eine vollständige Zuordnung musste zusätzlich ein drittes Experiment, das HCC, verwendet werden. Hierbei wurde

ausgehend von den Protonen ein Magnetisierungstransfer über zwei benachbarte Kohlenstoffe verwendet. Die sich so gegenseitig ergänzenden Spektren führten zu einer eindeutigen Zuordnung aller Signale zu den entsprechenden Kernen im PCB.

Das beschriebene Tripelresonanzexperiment HNCRELAY wurde anschließend durch die Verwendung von selektiven Pulsen dahingehend erweitert, dass die Messung der kreuzkorrelierten Relaxation (*cross correlated relaxation*, CCR) zwischen der *chemical shift anisotropy* (CSA) und der Dipol-Dipol-Wechselwirkung möglich wurde. Die in diesem Experiment erhaltenen Intensitäten der NMR-Signale wurden in einen Winkel zwischen dem Bindungsvektor der N–H-Gruppe der Pyrrole und der C–H-Gruppe der drei Methinbrücken umgerechnet. Die Vorgehensweise zur Berechnung des Winkels aus den CCR-Messungen basiert auf einer von Reif *et al.* beschriebenen Methode.^[5,6] In Verbindung mit 2D-NOESY-Spektren ließen sich zwei Modelle, eines basierend auf den CCR-Messungen und eines auf der Grundlage der NOE-Daten erstellen. Das CCR-Modell zeigte eine geöffnete Konformation während das NOE-Modell eine eindeutig helikale Struktur lieferte. Für eine zuverlässige Auswertung von CCR-Messungen muss eine rigide Struktur vorliegen. Da diese Bedingung schlussendlich nicht gewährleistet werden konnte, wurde für die berechneten Winkel ein größerer Fehlerbereich angenommen. Dementsprechend musste das helikale NOE-Modell dem CCR-Modell vorgezogen werden.

Betrachtung von PCB und BV innerhalb der Bindungstasche

Für die Betrachtung der Mobilität der Chromophore PCB und BV in der Bindungstasche wurden die Linienbreiten der N–H-Protonen der Pyrrole und die C–H-Gruppen der Methinbrücken verglichen.

Die Linienbreiten der N–H-Protonen vom PCB im Cph1 wurden anhand der Projektionen von ^1H , ^{15}N Korrelationen aus HMQC-Spektren bestimmt. Die Gründe für die nicht mehr sichtbaren Protonen H21, H22 und H23, sowie für das breite Signal vom Proton an Position 24 liegen in chemischen Austauschprozessen mit der Umgebung innerhalb der Bindungstasche. Es konnte festgestellt werden, dass bis auf das Proton an Position H24 alle Pyrrolprotonen des Chromophors einen schnellen Austausch mit der Umgebung erfahren.

Konformationelle Austauschprozesse, wie sie die Methinbrückenprotonen erfahren, lassen einen direkten Rückschluss auf die gesamte Mobilität des Chromophors in der Bindungstasche zu. Für diese Experimente wurden die Linienbreiten der Methinbrückenprotonen der Chromophore PCB und BV in den jeweiligen Phytochromen, Cph1 bzw. Agp1, verglichen. Neben dem Wildtyp (WT) der Phytochrome wurde eine Cystein zu Alanin Mutante eingesetzt, bei denen die Chromophore in der Bindungstasche sitzen, jedoch nicht mehr kovalent an das Protein gebunden sind. Dabei konnten eindeutige Unterschiede festgestellt werden. Während im WT des Cph1 PCB eine wesentlich höhere Linienbreite als in der C259A-Mutante detektiert wurde, war

dieser Unterschied für das BV im WT-Agp1 und der C20A-Agp1-Mutante nicht mehr sichtbar. Die Mobilität des Chromophors in den beiden Phytochromklassen wird durch die kovalente Bindung unterschiedlich stark beeinflusst. Die große Linienbreite vom PCB im WT-Cph1 war ein Indiz für eine wesentlich höhere Mobilität dieses Chromophors verglichen mit den anderen Systemen. Dieses ist im Einklang mit den Ergebnissen von Song *et al.* und den Ergebnissen von Yang *et al.*, die für den Grundzustand zwei Konformationen mit Hilfe der Festkörper NMR bzw. der Femtosekunden VIS/IR-Spektroskopie nachweisen konnten.^[62,114]

Neben der Betrachtung der Dynamik wurden die Interaktionen zwischen Chromophor und Protein untersucht. Hier lag der Fokus auf den austauschbaren Protonen des Chromophors und der Aminosäuren Histidin, Tyrosin und Serin in direkter Nachbarschaft zum Chromophor. Zeigten diese normalerweise durch die ablaufenden Austauschprozesse nicht sichtbaren Protonen NOE-Korrelationen in den Spektren, wurde dies als ein direkter Nachweis einer Wasserstoffbrücke interpretiert. Die Wasserstoffbrücken verlangsamten die Austauschprozesse für das beteiligte Proton wodurch die Detektion einer NOE-Korrelation möglich wird.

Die Phytochrome Cph1 und Agp1 wurden im P_r -Grundzustand untersucht. Bei beiden Phytochromen konnte eine Wasserstoffbrücke am Proton H24 des Chromophors und He2 vom Histidin 290 (His-280 im Agp1) nachgewiesen werden. Zusätzlich dazu wurden im Agp1 Wasserstoffbrücken, in denen die Seitenkettenprotonen He2 vom Histidin 250, H η vom Tyrosin 206 und H γ vom Serin 262 beteiligt sind, nachgewiesen. Im Agp1 wurde somit ein dichteres Netzwerk an Wasserstoffbrücken nachgewiesen werden.

Vom Cph1 konnte aufgrund der sehr langsamen vorhandenen Dunkelreversion der angeregte P_{fr} -Zustand untersucht werden. Das Pyrrolproton H24 vom Chromophor war in den Spektren nicht mehr sichtbar. Stattdessen wurde eine NOE-Wechselwirkung vom Proton He2 der Seitenkette vom Histidin 290 hin zu dem Methylprotonen an Position 17 im Chromophor beobachtet. Mit dieser Korrelation in den Spektren wurde die Z/E-Isomerisierung während des Photozyklus eindeutig nachgewiesen. Damit wurde die Funktionsweise der kanonischen Phytochrome bestätigt, welche 2010 von Ulijasz *et al.* in Frage gestellt wurde.^[83]

Weiterhin konnte für das Signal der Stickstoff-Protonen-Korrelation eine Veränderung der chemischen Verschiebungen, bezogen auf die P_r -Form, von 11 zu 14 ppm in der Protonen- und von 165 zu 170 ppm in der Stickstoffdimension festgestellt werden. Diese Tieffeldverschiebung zeigte, dass die Stärke der Wasserstoffbrücke, in der das Proton He2 eingebunden ist, in der P_{fr} -Form zunimmt.

Bei einer Protonenverschiebung von ca. 10 ppm wurde eine weitere NOE-Korrelation in der P_{fr} -Form vom Cph1 detektiert. Die Zuordnung dieser Resonanz zum Hydroxylproton des Tyrosin 176 war in Verbindung mit der Kristallstruktur des bakteriellen Phytochroms PaBphP aus *Pseudomonas aruginosa* möglich. Der Grundzustand vom PaBphP ist die P_{fr} -Form, weshalb ein Homologiemodell vom Cph1 in der P_{fr} -Form

erstellt werden konnte. Vergleicht man die Kristallstruktur der P_r -Form des Cph1 mit dem Homologiemodell, so kann man feststellen, dass die Seitenkette vom Tyrosin 176 die Position ändert. Liegt die Seitenkette in der P_r -Form unter dem Chromophor, so zeigt sie in der P_{fr} -Form nach oben. Das Hydroxylproton des Tyrosins ist nach erfolgter Photokonversion in den P_{fr} -Zustand in direkter Nachbarschaft zum Histidin 290 und kann die erwähnte NOE-Wechselwirkung hervorrufen. Somit wurde die strukturelle Veränderung in der P_{fr} -Form, sowie eine Wasserstoffbrücke, an der das Hydroxylproton beteiligt ist, nachgewiesen.

11. Abstract

Phytochromes are light receptor proteins used by plants as well as by bacteria and fungi. They are responsible for the detection of red/far-red light and trigger light dependent functions like flowering, seed germination or shade avoidance. The light receiving moieties within the phytochromes are linear tetrapyrroles, which differ throughout the phytochrome classes. The major structural change throughout the phytochrome photocycle is a Z/E isomerization of the C15 double bond of the chromophore. The Z-configuration defines the P_r -ground state and the E-configuration the P_{fr} -active state of the phytochrome photocycle. Even though crystal structures of the chromophore binding domain (CBD) providing a view on the P_r -ground state, the phytochrome photocycle is still not fully understood. There is only a vague understanding of structural rearrangements and the interactions between the chromophore and the protein in the binding pocket during the photocycle. Therefore structural data of the chromophore is needed. This includes detailed information about hydrogen bonds, protons of amino acid residues and as well information about the dynamics of the chromophore.

Within this work the chromophore phycocyanobilin (PCB) from a cyanobacterial phytochrome was used in an organic solution of *hexa*-methylphosphoramide (HMPT). Due to the physical properties of HMPT, PCB should mimic a conformation close to the situation in the protein. By using novel triple resonance experiments for the assignment and furthermore so called cross-correlated relaxation (CCR) experiments structural information about PCB in solution was achieved.

Based on existing crystal structures, possible interaction sides of the chromophore with the protein surrounding have been suggested. Mobility and hydrogen bonding of Agp1 a bacterial phytochrome and Cph1 in the P_r state was studied.

The linewidth of the chromophore in an solution of HMPT, Cph1 Δ 2, Agp1-M15, Cph1 Δ 2 C259A and a Agp1-M15 C20A mutant was studied. These mutants no longer covalently bind the chromophore. It was found that the chromophore in Agp1-M15 is more rigidly incorporated in the binding pocket than in Cph1 Δ 2. A C259A mutation leads to sharper lines, whereas the C20A mutation of Agp1-M15 has no effect on the linewidth. Using 2D-NOESY experiments, resonances from the side chains of His250, His280, Ser262 and Tyr206 of Agp1-M15 could be assigned. These protons (normally hardly visible due to fast exchange) show NOE correlations to the chromophore. The mere fact that these protons are visible shows that these protons are part of hydrogen bonds. Furthermore in Cph1, Tyr176 is undergoing the proposed rearrangement from P_r to P_{fr} as it is the case in PaBphP. In combination with the phytochrome photocycle

these hydrogen bond networks could play a vital role in triggering signal transduction.

Literatur

1. J. R. Wagner, J. S. Brunzelle, K. T. Forest, R. D. Vierstra, »A light-sensing knot revealed by the structure of the chromophore-binding domain of phytochrome«, *Nature* **Nov. 2005**, 438, 325–331, DOI 10.1038/nature04118 (siehe S. 3, 20 f., 93).
2. L. O. Essen, J. Mailliet, J. Hughes, »The structure of a complete phytochrome sensory module in the Pr ground state«, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **Sep. 2008**, 105, 14709–14714, DOI 10.1073/pnas.0806477105 (siehe S. 3, 20 ff., 45, 55, 75, 85, 87, 143).
3. X. Yang, J. Kuk, K. Moffat, »Crystal structure of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophytochrome: Photoconversion and signal transduction«, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **Sep. 2008**, 105, 14715–14720, DOI 10.1073/pnas.0806718105 (siehe S. 3, 22, 85, 87, 143).
4. H. Falk, N. Müller, S. Wansch, »Zur Chemie der Pyrrolpigmente, 63. Mitt.«, *Monatsh. Chem.* **1985**, 116, 1087–1097, DOI 10.1007/BF00809199 (siehe S. 4, 45 f., 57).
5. B. Reif, M. Hennig, C. Griesinger, »Direct Measurement of Angles Between Bond Vectors in High-Resolution NMR«, *Science* **1997**, 276, 1230–1233, DOI 10.1126/science.276.5316.1230 (siehe S. 5, 15, 55, 98).
6. B. Reif, H. Steinhagen, B. Junker, M. Reggelin, C. Griesinger, »Determination of the Orientation of a Distant Bond Vector in a Molecular Reference Frame by Cross-Correlated Relaxation of Nuclear Spins«, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 1903–1906, DOI 10.1002/(SICI)1521-3773(19980803)37:13/14<1903::AID-ANIE1903>3.0.CO;2-Y (siehe S. 5, 15, 55, 98).
7. W. Gerlach, O. Stern, »Der experimentelle Nachweis der Richtungsquantelung im Magnetfeld«, *Z Phys. A-Hadron Nucl.* **1922**, 9, 349–352, DOI 10.1007/BF01326983 (siehe S. 7).
8. H. Friebolin, *Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie*, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 3. Aufl., **1999** (siehe S. 8, 14).
9. D. S. Wishart, C. G. Bigam, J. Yao, F. Abildgaard, H. J. Dyson, E. Oldfield, J. L. Markley, B. D. Sykes, »¹H, ¹³C and ¹⁵N chemical shift referencing in biomolecular NMR.«, *J. Biomol. NMR* **Sep. 1995**, 6, 135–140, DOI 10.1007/BF00211777 (siehe S. 9).

10. R. R. Ernst, Nobel Lecture, Nobelprize.org, **1991**, http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1991/ernst-lecture.html (besucht am 10.06.2011) (siehe S. 10).
11. H. Kessler, S. Mronga, G. Gemmecker, »Multi-dimensional NMR experiments using selective pulses«, *Magn. Reson. Chem.* **1991**, *29*, 527–557, DOI DOI:10.1002/mrc.1260290602 (siehe S. 10).
12. L. Emsley, G. Bodenhausen, »Gaussian pulse cascades: New analytical functions for rectangular selective inversion and in-phase excitation in NMR«, *Chem. Phys. Lett.* **1990**, *165*, 469–476, DOI DOI:10.1016/0009-2614(90)87025-M (siehe S. 11).
13. L. Emsley in *Nuclear Magnetic Resonance, Part C*, (Hrsg.: N. J. O. Thomas L. James), *Methods in Enzymology*, Academic Press, **1994**, S. 207–246, DOI DOI:10.1016/S0076-6879(94)39007-X (siehe S. 11).
14. J. Keele, R. T. Clowes, A. L. Davis, E. D. Laue in *Nuclear Magnetic Resonance, Part C*, (Hrsg.: N. J. O. Thomas L. James), *Methods in Enzymology*, Academic Press, **1994**, S. 145–207, DOI DOI:10.1016/S0076-6879(94)39006-1 (siehe S. 11).
15. R. Freeman, »Shaped radiofrequency pulses in high resolution NMR«, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1998**, *32*, 59–106, DOI DOI:10.1016/S0079-6565(97)00024-1 (siehe S. 11).
16. W. S. Warren, S. M. Mayr, »Shaped Pulses«, *Encyclopedia of Nuclear Magnetic Resonance* **2002**, *7*, 1–9 (siehe S. 11).
17. L. Emsley, »Selective Pulses«, *Encyclopedia of Nuclear Magnetic Resonance* **2002**, *7*, 1–9 (siehe S. 11).
18. J.-M. Böhlen, I. Burghardt, M. Rey, G. Bodenhausen, »Frequency-modulated pulses for broadband inversion recovery in magnetic resonance«, *J. Magn. Reson.* **1990**, *90*, 183–191, DOI DOI:10.1016/0022-2364(90)90377-L (siehe S. 12).
19. A. Tannús, M. Garwood, »Improved Performance of Frequency-Swept Pulses Using Offset-Independent Adiabaticity«, *J. Magn. Reson. Ser. A* **1996**, *120*, 133–137, DOI DOI:10.1006/jmra.1996.0110 (siehe S. 12).
20. E. Kupce, R. Freeman, »Optimized Adiabatic Pulses for Wideband Spin Inversion«, *J. Magn. Reson. Ser. A* **1996**, *118*, 299–303, DOI DOI:10.1006/jmra.1996.0042 (siehe S. 12).
21. M. Garwood, L. DelaBarre, »The Return of the Frequency Sweep: Designing Adiabatic Pulses for Contemporary NMR«, *J. Magn. Reson.* **2001**, *153*, 155–177, DOI DOI:10.1006/jmre.2001.2340 (siehe S. 12 f.).

22. Z. Starcuk, K. Bartusek, Z. Starcuk, »Heteronuclear Broadband Spin-Flip Decoupling with Adiabatic Pulses«, *J. Magn. Reson. Ser. A* **1994**, *107*, 24–31, DOI DOI:10.1006/jmra.1994.1043 (siehe S. 12).
23. J. M. Böhlen, G. Bodenhausen, »Experimental Aspects of Chirp NMR Spectroscopy«, *J. Magn. Reson. Ser. A* **1993**, *102*, 293–301, DOI DOI:10.1006/jmra.1993.1107 (siehe S. 13).
24. T.-L. Hwang, P. C. M. van Zijl, M. Garwood, »Broadband Adiabatic Refocusing without Phase Distortion«, *J. Magn. Reson.* **1997**, *124*, 250–254, DOI DOI:10.1006/jmre.1996.1049 (siehe S. 13).
25. V. L. Ermakov, J. M. Böhlen, G. Bodenhausen, »Improved Schemes for Refocusing with Frequency-Modulated Chirp Pulses«, *J. Magn. Reson. Ser. A* **1993**, *103*, 226–229, DOI DOI:10.1006/jmra.1993.1158 (siehe S. 13).
26. I. Burghardt, J.-M. Böhlen, G. Bodenhausen, »Broadband multiple-quantum nuclear magnetic resonance with frequency-modulated “chirp” pulses: Applications to pairs of scalar-coupled spin $I=1/2$ nuclei«, *J. Chem. Phys.* **1990**, *93*, 7687–7697, DOI 10.1063/1.459348 (siehe S. 13).
27. J. Keeler, *Understanding NMR Spectroscopy*, John Wiley & Sons, Ltd., **2006** (siehe S. 14).
28. M. H. Levitt, *Spin Dynamics: Basics of Nuclear Magnetic Resonance*, John Wiley & Sons, Ltd., **2005** (siehe S. 14).
29. M. J. J. Blommers, W. Jahnke, »Die direkte Bestimmung von Diederwinkeln mit hochauflösender NMR-Spektroskopie«, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 470–472, DOI 10.1002/(SICI)1521-3757(19980216)110:4<470::AID-ANGE470>3.0.CO;2-N (siehe S. 15).
30. B. Reif, A. Diener, M. Hennig, M. Maurer, C. Griesinger, »Cross-Correlated Relaxation for the Measurement of Angles between Tensorial Interactions«, *J. Magn. Reson.* **2000**, *143*, 45–68, DOI 10.1006/jmre.1999.1980 (siehe S. 15).
31. H. Schwalbe, T. Carlomagno, M. Hennig, J. Tunker, B. Reif, C. Richter, C. Griesinger, »Cross-correlated relaxation for measurement of angles between tensorial interactions«, *Meth. Enzymol.* **2002**, *338*, 35–81, DOI 10.1016/S0076-6879(02)38215-6 (siehe S. 15).
32. H. Takahashi, I. Shimada, »Pairwise NMR experiments for the determination of protein backbone dihedral angle Phi based on cross-correlated spin relaxation«, *J. Biomol. NMR März* **2007**, *37*, 179–185, DOI 10.1007/s10858-006-9108-8 (siehe S. 15).

33. W. L. Butler, K. H. Norris, H. W. Siegelman, S. B. Hendricks, »Detection, Assay, And Preliminary Purification Of The Pigment Controlling Photoresponsive Development Of Plants«, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **Dez. 1959**, *45*, 1703–1708 (siehe S. 17).
34. R. N. Van Gelder, »Tales from the Crypt(ochromes)«, *J. Biol. Rhythm* **2002**, *17*, 110–120, DOI 10.1177/074873002129002401 (siehe S. 17).
35. C. Lin, D. Shalitin, »Cryptochrome structure and signal transduction«, *Annu. Rev. Plant Biol.* **2003**, *54*, 469–496, DOI 10.1146/annurev.arplant.54.110901.160901 (siehe S. 17).
36. Q.-H. Li, H.-Q. Yang, »Cryptochrome Signaling in Plants«, *Photochem. Photobiol.* **2007**, *83*, 94–101, DOI 10.1562/2006-02-28-IR-826 (siehe S. 17).
37. W. R. Briggs, *Handbook of Photosensory Receptors*, (Hrsg.: W. R. Briggs, J. L. Spudich), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, **2005** (siehe S. 17).
38. A. Möglich, X. Yang, R. A. Ayers, K. Moffat, »Structure and Function of Plant Photoreceptors«, *Annu. Rev. Plant Biol.* **2010**, *61*, 21–47, DOI 10.1146/annurev-arplant-042809-112259 (siehe S. 17).
39. H. Smith, »Light Quality, Photoperception, and Plant Strategy«, *Ann. Rev. Plant Physio.* **1982**, *33*, 481–518, DOI 10.1146/annurev.pp.33.060182.002405 (siehe S. 17).
40. J. M. Christie, »Phototropin blue-light receptors«, *Annu. Rev. Plant Biol.* **2007**, *58*, 21–45, DOI 10.1146/annurev.arplant.58.032806.103951 (siehe S. 17).
41. N. C. Rockwell, Y.-S. Su, J. C. Lagarias, »Phytochrome structure and signaling mechanisms«, *Annu. Rev. Plant Biol.* **2006**, *57*, 837–858, DOI 10.1146/annurev.arplant.56.032604.144208 (siehe S. 17 f.).
42. H. Wang, »Signaling mechanisms of higher plant photoreceptors: a structure-function perspective«, *Curr. Top. Dev. Biol.* **2005**, *68*, 227–261, DOI 10.1016/S0070-2153(05)68008-8 (siehe S. 17).
43. A. Nagatani, »Phytochrome: structural basis for its functions«, *Curr. Opin. Plant Biol.* **Okt. 2010**, *13*, 565–570, DOI 10.1016/j.pbi.2010.07.002 (siehe S. 17).
44. N. C. Rockwell, J. C. Lagarias, »The Structure of Phytochrome: A Picture Is Worth a Thousand Spectra«, *The Plant Cell* **2006**, *18*, 4–14 (siehe S. 17).
45. J. J. Casal, L. G. Luccioni, K. A. Oliverio, H. E. Boccacandro, »Light, phytochrome signalling and photomorphogenesis in Arabidopsis«, *Photochemical & Photobiological Sciences* **2003**, *2*, 625, DOI 10.1039/b300094j (siehe S. 17).
46. M. M. Neff, C. Fankhauser, J. Chory, »Light: an indicator of time and place«, *Genes Dev.* **Feb. 2000**, *14*, 257–271, DOI 10.1101/gad.14.3.257 (siehe S. 17).

47. G. C. Whitelam, S. Patel, P. F. Devlin, »Phytochromes and photomorphogenesis in Arabidopsis«, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **Sep. 1998**, 353, 1445–1453, DOI 10.1098/rstb.1998.0300 (siehe S. 17).
48. H. A. W. Schneider-Poetsch, B. Braun, S. Marx, A. Schaumburg, »Phytochromes and bacterial sensor proteins are related by structural and functional homologies. Hypothesis on phytochrome-mediated signal-transduction«, *FEBS Lett.* **Apr. 1991**, 281, 245–249, DOI 10.1016/0014-5793(91)80403-P (siehe S. 17).
49. C. P. Ponting, L. Aravind, »PAS: a multifunctional domain family comes to light«, *Curr. Biol.* **Nov. 1997**, 7, 674–677, DOI 10.1016/S0960-9822(06)00352-6 (siehe S. 17).
50. L. Aravind, C. P. Ponting, »The GAF domain: an evolutionary link between diverse phototransducing proteins«, *Trends Biochem. Sci.* **Dez. 1997**, 22, 458–459, DOI 10.1016/S0968-0004(97)01148-1 (siehe S. 17).
51. S. E. Martinez, J. A. Beavo, W. G. Hol, »GAF Domains: Two-Billion-Year-Old Molecular Switches that Bind Cyclic Nucleotides«, *Mol. Interv.* **2002**, 2, 317–323, DOI 10.1124/mi.2.5.317 (siehe S. 17).
52. G. P. Moss, »Nomenclature of tetrapyrroles«, *Pure Appl. Chem.* **1987**, 59, 779–832 (siehe S. 18).
53. N. C. Rockwell, J. C. Lagarias, »A Brief History of Phytochromes«, *ChemPhysChem* **Feb. 2010**, 11, 1172–1180, DOI 10.1002/cphc.200900894 (siehe S. 18, 25).
54. T. Rohmer, C. Lang, C. Bongards, K. B. Gupta, J. Neugebauer, J. Hughes, W. Gärtner, J. Matysik, »Phytochrome as Molecular Machine: Revealing Chromophore Action during the Pfr → Pr Photoconversion by Magic-Angle Spinning NMR Spectroscopy«, *J. Am. Chem. Soc.* **März 2010**, 132, 4431–4437, DOI 10.1021/ja9108616 (siehe S. 19, 94).
55. S. Braslavsky, W. Gärtner, K. Schaffner, »Phytochrome photoconversion«, *Plant Cell Environ.* **1997**, 20, 700–706, DOI 10.1046/j.1365-3040.1997.d01-101.x (siehe S. 19).
56. W. Rudiger, F. Thummler, E. Cmiel, S. Schneider, »Chromophore Structure of the Physiologically Active Form (Pfr) of Phytochrome«, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1983**, 80, 6244–6248 (siehe S. 19).
57. F. A. III, K. C. Hasson, F. Gai, P. A. Anfinrud, R. A. Mathies, »Femtosecond time-resolved spectroscopy of the primary photochemistry of phytochrome«, *Biospectroscopy* **1997**, 3, 421–433, DOI 10.1002/(SICI)1520-6343(1997)3:6<421::AID-BSPY1>3.0.CO;2-3 (siehe S. 19).

58. L. J. van Wilderen, I. P. Clark, M. Towrie, J. J. van Thor, »Mid-Infrared Picosecond Pump-Dump-Probe and Pump-Repump-Probe Experiments to Resolve a Ground-State Intermediate in Cyanobacterial Phytochrome Cph1«, *J. Phys. Chem. B* **Dez. 2009**, DOI 10.1021/jp9038539 (siehe S. 19).
59. H. Kandori, K. Yoshihara, S. Tokutomi, »Primary process of phytochrome: initial step of photomorphogenesis in green plants«, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10958–10959, DOI 10.1021/ja00053a041 (siehe S. 19).
60. K. Heyne, J. Herbst, D. Stehlik, B. Esteban, T. Lamparter, J. Hughes, R. Diller, »Ultrafast Dynamics of Phytochrome from the Cyanobacterium *Synechocystis*, Reconstituted with Phycocyanobilin and Phycoerythrobilin«, *Biophys. J.* **Feb. 2002**, *82*, 1004–1016 (siehe S. 19).
61. C. F. Zhang, D. L. Farrens, S. C. Bjorling, P. S. Song, D. S. Kliger, »Time-resolved absorption studies of native etiolated oat phytochrome«, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 4569–4580, DOI 10.1021/ja00038a019 (siehe S. 19).
62. C. Song, G. Psakis, C. Lang, J. Mailliet, W. Gärtner, J. Hughes, J. Matysik, »Two ground state isoforms and a chromophore D-ring photoflip triggering extensive intramolecular changes in a canonical phytochrome«, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **März 2011**, *108*, 3842–3847, DOI 10.1073/pnas.1013377108 (siehe S. 19, 25, 94, 99).
63. H. M. Strauss, J. Hughes, P. Schmieder, »Heteronuclear Solution-State NMR Studies of the Chromophore in Cyanobacterial Phytochrome Cph1«, *Biochemistry* **Juli 2005**, *44*, 8244–8250, DOI 10.1021/bi050457r (siehe S. 20, 22, 29 f.).
64. T. Rohmer, C. Lang, J. Hughes, L.-O. Essen, W. Gärtner, J. Matysik, »Light-induced chromophore activity and signal transduction in phytochromes observed by ¹³C and ¹⁵N magic-angle spinning NMR«, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **Okt. 2008**, *105*, 15229–15234, DOI 10.1073/pnas.0805696105 (siehe S. 20).
65. J. M. Kelly, J. C. Lagarias, »Photochemistry of 124-kilodalton *Avena* phytochrome under constant illumination in vitro«, *Biochemistry* **1985**, *24*, 6003–6010, DOI 10.1021/bi00342a047 (siehe S. 20).
66. J. C. Lagarias, J. M. Kelly, K. L. Cyr, W. O. Smith, »Comparative photochemical analysis of highly purified 124 kilodalton oat and rye phytochromes in vitro«, *Photochem. Photobiol.* **1987**, *46*, 5–13, DOI 10.1111/j.1751-1097.1987.tb04729.x (siehe S. 20).
67. A. L. Mancinelli, »Comparison of Spectral Properties of Phytochromes from Different Preparations«, *Plant Physiol.* **1986**, *82*, 956–961, DOI 10.1104/pp.82.4.956 (siehe S. 20).

68. J. R. Wagner, J. Zhang, J. S. Brunzelle, R. D. Vierstra, K. T. Forest, »High resolution structure of Deinococcus bacteriophytochrome yields new insights into phytochrome architecture and evolution«, *J. Biol. Chem.* **Apr. 2007**, 282, 12298–12309, DOI 10.1074/jbc.M611824200 (siehe S. 21).
69. X. Yang, E. A. Stojkovic, J. Kuk, K. Moffat, »Crystal structure of the chromophore binding domain of an unusual bacteriophytochrome, RpBphP3, reveals residues that modulate photoconversion«, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **Juli 2007**, 104, 12571–12576, DOI 10.1073/pnas.0701737104 (siehe S. 21).
70. T. Rohmer, H. Strauss, J. Hughes, H. de Groot, W. Gärtner, P. Schmieder, J. Matysik, »¹⁵N MAS NMR studies of cph1 phytochrome: Chromophore dynamics and intramolecular signal transduction.«, *J Phys Chem B Condens Matter Mater Surf Interfaces Biophys* **Okt. 2006**, 110, 20580–20585, DOI 10.1021/jp062454+ (siehe S. 22).
71. M. Röben, J. Hahn, E. Klein, T. Lamparter, G. Psakis, J. Hughes, P. Schmieder, »NMR Spectroscopic Investigation of Mobility and Hydrogen Bonding of the Chromophore in the Binding Pocket of Phytochrome Proteins«, *ChemPhysChem* **März 2010**, 11, 1248–1257, DOI 10.1002/cphc.200900897 (siehe S. 22, 33, 115).
72. X. Yang, J. Kuk, K. Moffat, »Conformational differences between the Pfr and Pr states in *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophytochrome«, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **Aug. 2009**, 106, 15639–15644, DOI 10.1073/pnas.0902178106 (siehe S. 23).
73. J. Hahn, H. M. Strauss, F. T. Landgraf, H. F. Gimenez, G. Lochnit, P. Schmieder, J. Hughes, »Probing protein-chromophore interactions in Cph1 phytochrome by mutagenesis.«, *FEBS J.* **Apr. 2006**, 273, 1415–1429, DOI 10.1111/j.1742-4658.2006.05164.x (siehe S. 23 f., 33).
74. J. J. van Thor, B. Borucki, W. Crielaard, H. Otto, T. Lamparter, J. Hughes, K. J. Hellingwerf, M. P. Heyn, »Light-induced proton release and proton uptake reactions in the cyanobacterial phytochrome Cph1.«, *Biochemistry* **Sep. 2001**, 40, 11460–11471, DOI 10.1021/bi002651d (siehe S. 24).
75. A. J. Fischer, N. C. Rockwell, A. Y. Jang, L. A. Ernst, A. S. Waggoner, Y. Duan, H. Lei, J. C. Lagarias, »Multiple roles of a conserved GAF domain tyrosine residue in cyanobacterial and plant phytochromes«, *Biochemistry* **Nov. 2005**, 44, 15203–15215, DOI 10.1021/bi051633z (siehe S. 24).
76. A. J. Fischer, J. C. Lagarias, »Harnessing phytochrome's glowing potential.«, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **Dez. 2004**, 101, 17334–17339, DOI 10.1073/pnas.0407645101 (siehe S. 24).

77. X. Shu, A. Royant, M. Z. Lin, T. A. Aguilera, V. Lev-Ram, P. A. Steinbach, R. Y. Tsien, »Mammalian expression of infrared fluorescent proteins engineered from a bacterial phytochrome«, *Science* **Mai 2009**, 324, 804–807, DOI 10.1126/science.1168683 (siehe S. 24).
78. Nobelprize.org, The Nobel Prize in Chemistry 2008, Nobelprize.org, **2011**, http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2008/ (besucht am 10.06.2011) (siehe S. 24).
79. O. Shimomura, F. H. Johnson, Y. Saiga, »Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusan, Aequorea«, *Journal of Cellular and Comparative Physiology* **1962**, 59, 223–239, DOI 10.1002/jcp.1030590302 (siehe S. 24).
80. A. A. Samma, C. K. Johnson, S. Song, S. Alvarez, M. Zimmer, »On the origin of fluorescence in bacteriophytochrome infrared fluorescent proteins«, *J. Phys. Chem. B* **Nov. 2010**, 114, 15362–15369, DOI 10.1021/jp107119q (siehe S. 24).
81. J. R. Wagner, J. Zhang, D. von Stetten, M. Günther, D. H. Murgida, M. A. Mrogin-ski, J. M. Walker, K. T. Forest, P. Hildebrandt, R. D. Vierstra, »Mutational analysis of *Deinococcus radiodurans* bacteriophytochrome reveals key amino acids necessary for the photochromicity and proton exchange cycle of phytochromes«, *J. Biol. Chem.* **Mai 2008**, 283, 12212–12226, DOI 10.1074/jbc.M709355200 (siehe S. 24).
82. D. von Stetten, S. Seibeck, N. Michael, P. Scheerer, M. A. Mrogin-ski, D. H. Murgida, N. Krauss, M. P. Heyn, P. Hildebrandt, B. Borucki, T. Lamparter, »Highly conserved residues Asp-197 and His-250 in Agp1 phytochrome control the proton affinity of the chromophore and Pfr formation.«, *J. Biol. Chem.* **Jan. 2007**, 282, 2116–2123, DOI 10.1074/jbc.M608878200 (siehe S. 24).
83. A. T. Ulijasz, G. Cornilescu, C. C. Cornilescu, J. Zhang, M. Rivera, J. L. Markley, R. D. Vierstra, »Structural basis for the photoconversion of a phytochrome to the activated Pfr form«, *Nature* **Jan. 2010**, 463, 250–254, DOI 10.1038/nature08671 (siehe S. 25, 88, 99).
84. T. Ishizuka, A. Kamiya, H. Suzuki, R. Narikawa, T. Noguchi, T. Kohchi, K. Inomata, M. Ikeuchi, »The cyanobacteriochrome, TePixJ, isomerizes its own chromophore by converting phycocyanobilin to phycoviolobin«, *Biochemistry* **Feb. 2011**, 50, 953–961, DOI 10.1021/bi101626t (siehe S. 25).
85. G. Cornilescu, A. T. Ulijasz, C. C. Cornilescu, J. L. Markley, R. D. Vierstra, »Solution structure of a cyanobacterial phytochrome GAF domain in the red light-absorbing ground state«, *J. Mol. Biol.* **2008**, 383, 403–413, DOI 10.1016/j.jmb.2008.08.034 (siehe S. 25).

86. R. J. Beuhler, R. C. Pierce, L. Friedman, H. W. Siegelman, »Cleavage of phycocyanobilin from C-phycocyanin. Separation and mass spectral identification of the products«, *J. Biol. Chem.* **Apr. 1976**, 251, 2405–2411 (siehe S. 30).
87. T. Lamparter, B. Esteban, J. Hughes, »Phytochrome Cph1 from the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803. Purification, assembly, and quaternary structure«, *Eur. J. Biochem.* **Sep. 2001**, 268, 4720–4730, DOI 10.1046/j.1432-1327.2001.02395.x (siehe S. 33).
88. T. Lamparter, N. Michael, F. Mittmann, B. Esteban, »Phytochrome from *Agrobacterium tumefaciens* has unusual spectral properties and reveals an N-terminal chromophore attachment site«, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **Sep. 2002**, 99, 11628–11633, DOI 10.1073/pnas.152263999 (siehe S. 33).
89. B. Knipp, M. Müller, N. Metzler-Nolte, T. S. Balaban, S. E. Braslavsky, K. Schaffner, »NMR Verification of Helical Conformations of Phycocyanobilin in Organic Solvents«, *Helv. Chim. Acta* **1998**, 81, 881–888, DOI 10.1002/hlca.19980810509 (siehe S. 45).
90. D. Krois, »Geometry versus basicity of bilatrienes: Stretched and helical protonated biliverdins«, *Monatsh. Chem.* **1991**, 122, 495–506, DOI 10.1007/BF00809802 (siehe S. 45).
91. H. Normant, »Hexamethyl-phosphorsäuretriamid«, *Angew. Chem.* **1967**, 79, 1029–1050, DOI 10.1002/ange.19670792302 (siehe S. 46).
92. J. Cavanagh, W. J. Fairbrother, A. G. Palmer III, N. J. Skelton, *Protein NMR Spectroscopy Principles And Practice*, Academic Press, San Diego, **1996** (siehe S. 48).
93. L. E. Kay, M. Ikura, R. Tschudin, A. Bax, »Three-dimensional triple-resonance NMR spectroscopy of isotopically enriched proteins«, *J. Magn. Reson.* **Okt. 1990**, 89, 496–514, DOI 10.1016/0022-2364(90)90333-5 (siehe S. 48).
94. O. W. Sørensen, G. W. Eich, M. H. Levitt, G. Bodenhausen, R. R. Ernst, »Product operator formalism for the description of NMR pulse experiments«, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1984**, 16, 163–192, DOI 10.1016/0079-6565(84)80005-9 (siehe S. 51).
95. »IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). Abbreviations and symbols for the description of conformations of polynucleotide chains. Recommendations 1982.«, eng, *Eur. J. Biochem.* **März 1983**, 131, 9–15, DOI 10.1111/j.1432-1033.1983.tb07225.x (siehe S. 55).
96. R. S. Cahn, C. Ingold, V. Prelog, »Spezifikation der molekularen Chiralität«, *Angew. Chem.* **1966**, 78, 413–447, DOI 10.1002/ange.19660780803 (siehe S. 55).

97. V. Prelog, G. Helmchen, »Grundlagen des CIP-Systems und Vorschläge für eine Revision«, *Angew. Chem.* **1982**, *94*, 614–631, DOI 10.1002/ange.19820940805 (siehe S. 55).
98. M. Karplus, »Contact Electron-Spin Coupling of Nuclear Magnetic Moments«, *J. Chem. Phys.* **Jan. 1959**, *30*, 11–15, DOI 10.1063/1.1729860 (siehe S. 58).
99. M. Karplus, »Vicinal Proton Coupling in Nuclear Magnetic Resonance«, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2870–2871, DOI 10.1021/ja00901a059 (siehe S. 58).
100. W. A. Thomas, »Unravelling molecular structure and conformation—the modern role of coupling constants«, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1997**, *30*, 183–207, DOI 10.1016/S0079-6565(96)01033-3 (siehe S. 58).
101. C. M. Thiele, »Residual Dipolar Couplings (RDCs) in Organic Structure Determination«, *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, *2008*, 5673–5685, DOI 10.1002/ejoc.200800686 (siehe S. 59).
102. R. S. Lipsitz, N. Tjandra, »Residual Dipolar Couplings In NMR Structure Analysis«, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2004**, *33*, 387–413, DOI 10.1146/annurev.biophys.33.110502.140306 (siehe S. 59).
103. F. Kramer, M. Deshmukh, H. Kessler, S. Glaser, »Residual dipolar coupling constants: An elementary derivation of key equations«, *Concepts in Magnetic Resonance Part A* **2004**, *21A*, 10–21, DOI 10.1002/cmr.a.20003 (siehe S. 59).
104. A. Marx, C. Thiele, »Orientational Properties of Poly- γ -benzyl-L-glutamate: Influence of Molecular Weight and Solvent on Order Parameters of the Solute«, *Chemistry – A European Journal* **2009**, *15*, 254–260, DOI 10.1002/chem.200801147 (siehe S. 59).
105. P. Haberz, J. Farjon, C. Griesinger, »A DMSO-Compatible Orienting Medium: Towards the Investigation of the Stereochemistry of Natural Products«, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 427–429, DOI 10.1002/anie.200461267 (siehe S. 59).
106. G. Kummerlöwe, B. Luy, »Residual dipolar couplings as a tool in determining the structure of organic molecules«, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2009**, *28*, 483–493, DOI 10.1016/j.trac.2008.11.016 (siehe S. 59).
107. J.-C. Bollinger, G. Yvernault, T. Yvernault, »Physical properties of the solvent mixtures triethylphosphate+hexamethylphosphoric triamide at 25°C«, *J. Solution Chem.* **1978**, *7*, 317–324 (siehe S. 68).
108. C. R. Cantor, P. R. Schimmel, *Biophysical Chemistry, Part 2: Techniques for the Study of Biological Structure and Function (Pt. 2)*, W. H. Freeman und Company, **1980** (siehe S. 68).

109. A. T. Brünger, P. D. Adams, G. M. Clore, W. L. DeLano, P. Gros, R. W. Grosse-Kunstleve, J.-S. Jiang, J. Kuszewski, M. Nilges, N. S. Pannu, R. J. Read, L. M. Rice, T. Simonson, G. L. Warren, »Crystallography & NMR System: A New Software Suite for Macromolecular Structure Determination«, *Acta Crystallographica Section D* **Sep. 1998**, *54*, 905–921, DOI 10.1107/S0907444998003254 (siehe S. 68).
110. H.-W. Heldt, B. Pechulla, *Pflanzenbiochemie*, Spektrum Akademischer Verlag, 4. Auflage, **2008** (siehe S. 77).
111. V. Sklenár, A. Bax, »Spin-echo water suppression for the generation of pure-phase two-dimensional NMR spectra«, *J. Magn. Reson.* **1987**, *74*, 469–479, DOI 10.1016/0022-2364(87)90269-1 (siehe S. 82).
112. J. Hahn, R. Kühne, P. Schmieder, »Solution-State ¹⁵N NMR Spectroscopic Study of alpha-C-Phycocyanin: Implications for the Structure of the Chromophore-Binding Pocket of the Cyanobacterial Phytochrome Cph1«, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 2249–2255, DOI 10.1002/cbic.200700256 (siehe S. 83).
113. S. C. Lovell, J. M. Word, J. S. Richardson, D. C. Richardson, »The penultimate rotamer library«, *Proteins Structure Function and Bioinformatics* **2000**, *40*, 389–408, DOI 10.1002/1097-0134(20000815)40:3<389::AID-PROT50>3.0.CO;2-2 (siehe S. 86).
114. Y. Yang, M. Linke, T. von Haimberger, J. Hahn, R. Matute, L. González, P. Schmieder, K. Heyne in International conference on tetrapyrrole photoreceptors of photosynthetic organisms (ICTPPO), **2011** (siehe S. 99).
115. M. Röben, P. Schmieder, »Assignment of phycocyanobilin in HMPT using triple resonance experiments«, *Magn. Reson. Chem.* **Aug. 2011**, *49*, 543–548, DOI 10.1002/mrc.2776 (siehe S. 115).
116. J. Willmann, M. Röben, S. Woynowski, M. Spraul, H. Thiele, D. Leibfritz, »Characterization of lysophosphatidylcholine in lipid extracts by hyphenated techniques«, *Chem. Phys. Lipids* **2007**, *149*, S89, DOI 10.1016/j.chemphyslip.2007.06.206 (siehe S. 115).
117. »The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.4.1«, The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.4, Schrödinger, LLC., **Mai 2011** (siehe S. 143).

Publikationsliste

Im Rahmen dieser Arbeit sind folgende Publikationen erschienen.

- M. Röben, J. Hahn, E. Klein, T. Lamparter, G. Psakis, J. Hughes, P. Schmieder, »NMR Spectroscopic Investigation of Mobility and Hydrogen Bonding of the Chromophore in the Binding Pocket of Phytochrome Proteins«, *ChemPhysChem* **März 2010**, *11*, 1248–1257, DOI 10.1002/cphc.200900897
- M. Röben, P. Schmieder, »Assignment of phycocyanobilin in HMPT using triple resonance experiments«, *Magn. Reson. Chem.* **Aug. 2011**, *49*, 543–548, DOI 10.1002/mrc.2776

Weitere Publikationen:

- J. Willmann, M. Röben, S. Woynowski, M. Spraul, H. Thiele, D. Leibfritz, »Characterization of lysophosphatidylcholine in lipid extracts by hyphenated techniques«, *Chem. Phys. Lipids* **2007**, *149*, S89, DOI 10.1016/j.chemphyslip.2007.06.206

Teil IV.
Anhang

A. Zuordnung von Phycocyanobilin

A.1. PCB in HMPT

Tabelle A.1.: Chemische Verschiebungen des Chromophors Phycocyanobilin gelöst in HMPT. Die Protonierung aller vier Pyrrolstickstoffe wurde durch die Zugabe einer geringen Menge *p*-TsOH sichergestellt.

Atom	¹ H/ppm	¹³ C/ppm	¹⁵ N/ppm	Atom	¹ H/ppm	¹³ C/ppm	¹⁵ N/ppm
1		180.3		12 ¹ a	2.977	21.6	
2	3.046	38.9		12 ¹ b	2.977		
2 ¹	1.207	16.9		12 ² a	2.341	37.5	
3		138.7		12 ² b	2.341		
3 ¹	7.497	128.2		12 ³		174.4	
3 ²	1.832	16.9		13		127.9	
4		150.9		13 ¹	2.057	10.8	
5	6.365	86.6		14		146.9	
6		156.1		15	6.299	96.2	
7		10.2		16		146.4	
7 ¹	2.061	10.6		17		140.8	
8		147.3		17 ¹	2.056	11.0	
8 ¹ a	2.977	21.6		18		136.9	
8 ¹ b	2.977			18 ¹ a	2.154	18.6	
8 ² a	2.341	37.5		18 ¹ b	2.154		
8 ² b	2.341			18 ²	0.946	14.1	
8 ³		174.4		19		174.6	
9		135.7		21	11.652		153.6
10	7.520	118.6		22	12.523		158.7
11		133.5		23	12.363		157.9
12		143.4		24	10.756		132.6

A.2. PCB in Methanol

Tabelle A.2.: Chemische Verschiebungen des Chromophors Phycocyanobilin gelöst in Methanol. Die Protonierung aller vier Pyrrolstickstoffe wurde durch die Zugabe einer geringen Menge *p*-TsOH sichergestellt.

Atom	¹ H/ppm	¹³ C/ppm	¹⁵ N/ppm	Atom	¹ H/ppm	¹³ C/ppm	¹⁵ N/ppm
1		180.3		12 ¹ a	2.977	21.6	
2	3.046	38.9		12 ¹ b	2.977		
2 ¹	1.207	16.9		12 ² a	2.341	37.5	
3		138.7		12 ² b	2.341		
3 ¹	7.497	128.2		12 ³		174.4	
3 ²	1.832	16.9		13		127.9	
4		150.9		13 ¹	2.057	10.8	
5	6.365	86.6		14		146.9	
6		156.1		15	6.299	96.2	
7		10.2		16		146.4	
7 ¹	2.061	10.6		17		140.8	
8		147.3		17 ¹	2.056	11.0	
8 ¹ a	2.977	21.6		18		136.9	
8 ¹ b	2.977			18 ¹ a	2.154	18.6	
8 ² a	2.341	37.5		18 ¹ b	2.154		
8 ² b	2.341			18 ²	0.946	14.1	
8 ³		174.4		19		174.6	
9		135.7		21	11.652		153.6
10	7.520	118.6		22	12.523		158.7
11		133.5		23	12.363		157.9
12		143.4		24	10.756		132.6

A.3. PCB in DMSO

Tabelle A.3.: Chemische Verschiebungen des Chromophors Phycocyanobilin gelöst in DMSO. Die Protonierung aller vier Pyrrolstickstoffe wurde durch die Zugabe einer geringen Menge *p*-TsOH sichergestellt.

Atom	¹ H/ppm	¹³ C/ppm	¹⁵ N/ppm	Atom	¹ H/ppm	¹³ C/ppm	¹⁵ N/ppm
1		182,0		12 ¹ a	3.03	22.7	
2	3.36	40.0		12 ¹ b	3.03		
2 ¹	1.37	18,6		12 ² a	2.54	37.7	
3		139.2		12 ² b	2.54		
3 ¹	6.86	130.4		12 ³		176.7	
3 ²	1.97	18.2		13		130.0	
4		151.2		13 ¹	2.18	12.3	
5	6.17	86.9		14		146.0	
6		155.5		15	6.20	97.2	
7		132.0		16		145.2	
7 ¹	2.16	12.4		17		140.8	
8		149.2		17 ¹	2.18	12.5	
8 ¹ a	3.05	22.8		18		138.1	
8 ¹ b	3.05			18 ¹ a	2.34	19.6	
8 ² a	2.54	37.7		18 ¹ b	2.34		
8 ² b	2.54			18 ²	1.08	16.1	
8 ³		176.7		19		175.2	
9		135.1		21	11.22		154.3
10	7.40	118.9		22	11.59		153.6
11		133.2		23	11.45		153.0
12		145.2		24	10.32		132.8

B. Pulsprogramme

Die Pulsprogramme wurden mit größtmöglicher Sorgfalt übertragen. Trotzdem können an dieser Stelle Fehler nicht ausgeschlossen werden. Werden Pulsprogramme oder Teile der hier aufgeführten Programme übernommen, so sollten diese vorher noch einmal kontrolliert und auf die eigenen Gegebenheiten angepasst werden.

B.1. HNC

```

1  #include <FMP.incl>
2  #include <Avance.incl>
3  #include <Grad.incl>
4  #include <Delay.incl>
5
6  "in0 = inf1/2"
7
8  "p2 = 2.0*p1"
9  "p6 = 2.0*p5"
10
11 "d11 = 30m"
12 "d12 = 20u"
13 "d13 = 3u"
14
15 "TAU1 = 1s/(cnst1*4)"
16 "TAU = TAU1*2"
17
18 "TAU2 = 1s/(cnst2*8)"
19
20 "DELTA1 = TAU2"
21 "DELTA2 = DELTA1 - TAU - d12"
22
23
24 #ifdef CT
25 "DELTA4 = (1s/(cnst4*2)) - p16/2"
26
27 "d0 = 3u"
28 "d8 = DELTA4 + p6 + d0 - p16/2"
29
30 "in8 = in0"
31
32 #else
33 "d0 = (cnst0*in0 - p6 - 1.28*p13)/2"
34
35 #endif /*CT*/
36
37
38 1 ze
39 2 d1 do:f3
40   d12 p12:f2
41   d12 p13:f3
42   p1 ph1
43   TAU1
44   d13
45   (center (p2 ph1) (p6 ph1):f3)
46   d13
47   TAU1
48   p1 ph4
49   50u UNBLKGRAD
50   p22:gp22
51   d22
52   d12 p119:f1
53   (p5 ph9):f3
54   TAU
55   d12 cpds1:f1 ph1
56   DELTA2
57   (center (p14:sp14 ph1):f2 (p6 ph1):f3)
58   DELTA1
59   (p5 ph1):f3
60 #ifdef NOCPD
61   d12 do:f1
62 #else
63   d13
64 #endif /*NOCPD*/
65   (p13:sp13 ph8):f2
66 #ifdef CT
67   d0
68   (p6 ph1):f3
69   DELTA4
70   (p16:sp16 ph1):f2
71   d8
72 #else
73   d0
74   (p6 ph1):f3
75   d0
76 #endif /*CT*/

```

```

77     (p13:sp13 ph7):f2
78 #ifdef NOCPD
79     dl2 cpds1:f1 ph1
80 #else
81     dl3
82 #endif /*NOCPD*/
83     (p5 ph5):f3
84     DELTA1
85     (center (p14:sp14 ph1):f2 (p6 ph1):f3)
86     DELTA2
87     dl2 do:f1
88     TAU
89     (p5 ph1):f3
90     50u
91     p23:gp23
92     d23 BLKGRAD
93     dl2 p11:f1
94     p1 ph1
95     TAU1
96     dl3
97     (center (p2 ph1) (p6 ph1):f3)
98     dl3
99     TAU1 p116:f3
100    go=2 ph31 cpd3:f3
101    dl1 do:f3 mc #0 to 2
102 #ifdef CT
103         F1PH(ip8, id0 & dd8)
104 #else
105         F1PH(ip8, id0)
106 #endif /*CT*/
107 exit
108
109 ph1 = 0
110 ph4 = 1
111
112 ph5 = 0 0 2 2
113 ph7 = 0 0 0 0 0 0 0 0 2 2 2 2 2 2 2
114 ph8 = 0 2
115 ph9 = 0 0 0 0 2 2 2 2
116
117 ph31 = 0 2 2 0 2 0 0 2 2 0 0 2 0 2 2 0

```

B.2. HNCRELAY

```

1 #include <FMP.incl>
2 #include <Avance.incl>
3 #include <Grad.incl>
4 #include <Delay.incl>
5
6 "in0=infl/2"
7
8
9 "p2 = 2.0*p1"
10 "p6 = 2.0*p5"
11
12 "d11 = 30m"
13 "d12 = 20u"
14 "d13 = 3u"
15
16 "TAU1 = 1s/(cnst1*4)"
17 "TAU = TAU1*2"
18
19 "TAU2 = 1s/(cnst2*8)"
20
21 "DELTA1 = TAU2"
22 "DELTA2 = DELTA1 - TAU - d12"
23
24 "DELTA3 = (1s/(cnst3*8)) - p16/2"
25
26 #ifdef CT
27 "DELTA4 = (1s/(cnst4*2)) - p16/2"
28
29 "d0 = 3u"
30 "d8 = (1s/(cnst4*2)) + p6 + d0 - p16/2"
31
32 "in8 = in0"
33 #else
34 "d0 = (cnst0*in0 - p6 - 1.28*p13)/2"
35 #endif /*CT*/
36
37 1 ze
38 2 dl do:f3
39     dl2 p12:f2
40     dl2 p13:f3
41     p1 ph1
42     TAU1
43     dl3
44     (center (p2 ph1) (p6 ph1):f3)
45     dl3
46     TAU1
47     p1 ph4
48     50u UNBLKGRAD
49     p22:gp22
50     d22
51     dl2 p119:f1
52     (p5 ph9):f3
53     TAU
54     dl2 cpds1:f1 ph1
55     DELTA2
56     (center (p14:sp14 ph1):f2 (p6 ph1):f3)
57     DELTA1
58     (p5 ph1):f3
59 #ifdef NOCPD
60     dl2 do:f1
61 #else
62     dl3

```

```

63 #endif /*NOCPD*/
64 (p13:sp13 ph8):f2
65 DELTA3
66 (p16:sp16 ph11):f2
67 DELTA3
68 (p13:sp13 ph6):f2
69 #ifdef CT
70 d0
71 (p6 ph1):f3
72 DELTA4
73 (p16:sp16 ph1):f2
74 d8
75 #else
76 d0
77 (p6 ph1):f3
78 d0
79 #endif /*CT*/
80 (p13:sp13 ph10):f2
81 DELTA3
82 (p16:sp16 ph1):f2
83 DELTA3
84 (p13:sp13 ph7):f2
85 #ifdef NOCPD
86 d12 cpds1:f1 ph1
87 #else
88 d13
89 #endif /*NOCPD*/
90 (p5 ph5):f3
91 DELTA1
92 (center (p14:sp14 ph1):f2 (p6 ph1):f3)
93 DELTA2
94 d12 do:f1
95 TAU
96 (p5 ph1):f3
97 50u
98 p23:gp23
99 d23 BLKGRAD
100 d12 p11:f1
101 p1 ph1
102 TAU1
103 d13
104 (center (p2 ph1) (p6 ph1):f3)
105 d13
106 TAU1 p116:f3
107 go=2 ph31 cpd3:f3
108 d11 do:f3 mc #0 to 2
109 #ifdef CT
110 F1PH(ip6 & ip8 & ip11, id0 & dd8)
111 #else
112 F1PH(ip6 & ip8 & ip11, id0)
113 #endif /*CT*/
114 exit
115
116 ph1 = 0
117 ph4 = 1
118
119 ph5 = 0 0 2 2
120 ph6 = 1
121 ph7 = 0 0 0 0 0 0 0 0 2 2 2 2 2 2 2
122 ph8 = 0 2
123 ph9 = 0 0 0 0 2 2 2 2
124 ph10= 3
125 ph11= 0
126
127 ph31 = 0 2 2 0 2 0 0 2 2 0 0 2 0 2 2 0

```

B.3. HNCRELAY.MQ

```

1 #include <FMP.incl>
2 #include <Avance.incl>
3 #include <Grad.incl>
4 #include <Delay.incl>
5
6 "in0=infl/2"
7
8 "p2 = 2.0*p1"
9 "p6 = 2.0*p5"
10
11 "d11 = 30m"
12 "d12 = 20u"
13 "d13 = 3u"
14
15 "TAU1 = 1s/(cnst1*4)"
16 "TAU = TAU1*2"
17
18 "TAU2 = 1s/(cnst2*8)"
19
20 "DELTA1 = TAU2"
21 "DELTA2 = DELTA1 - TAU - d12"
22
23 "DELTA3 = (1s/(cnst3*8)) - p16/2"
24
25 #ifdef CT
26 "d0 = (1s/(cnst4*2)) - larger(p6,p16)/2"
27
28 "d8 = d0"
29 "in8 = in0"
30
31 "max_TD1 = 2*(1 + d8/in8)"
32 "cnst29 = max_TD1"
33
34 #else
35 "d0 = cnst0*in0 - 1.28*p5"
36 #endif /*CT*/
37
38 1 ze

```

```

39 2 dl do:f3
40 dl2 p12:f2
41 dl2 p13:f3
42 p1 ph1
43 TAU1
44 dl3
45 (center (p2 ph1) (p6 ph1):f3)
46 dl3
47 TAU1
48 p1 ph4
49 50u UNBLKGRAD
50 p22:gp22
51 d22
52 dl2 p119:f1
53 (p5 ph9):f3
54 TAU
55 dl2 cpds1:f1 ph1
56 DELTA2
57 (center (p14:sp14 ph1):f2 (p6 ph1):f3)
58 DELTA1
59 (p5 ph1):f3
60 #ifdef NOCPD
61 dl2 do:f1
62 #else
63 dl3
64 #endif /*NOCPD*/
65 (p13:sp13 ph8):f2
66 DELTA3
67 (p16:sp16 ph11):f2
68 DELTA3
69 (lalign (p13:sp13 ph6):f2 (p5 ph12):f3)
70 #ifdef CT
71 d0
72 (center (p16:sp16 ph1):f2 (p6 ph1):f3)
73 d8
74 #else
75 d0
76 #endif /*CT*/
77 (ralign (p13:sp13 ph10):f2 (p5 ph1):f3)
78 DELTA3
79 (p16:sp16 ph1):f2
80 DELTA3
81 (p13:sp13 ph7):f2
82 #ifdef NOCPD
83 dl2 cpds1:f1 ph1
84 #else
85 dl3
86 #endif /*NOCPD*/
87 (p5 ph5):f3
88 DELTA1
89 (center (p14:sp14 ph1):f2 (p6 ph1):f3)
90 DELTA2
91 dl2 do:f1
92 TAU
93 (p5 ph1):f3
94 50u
95 p23:gp23
96 d23 BLKGRAD
97 dl2 p11:f1
98 p1 ph1
99 TAU1
100 dl3
101 (center (p2 ph1) (p6 ph1):f3)
102 dl3
103 TAU1 p116:f3
104 go=2 ph31 cpd3:f3
105 dl1 do:f3 mc #0 to 2
106 #ifdef CT
107 F1PH(ip6 & ip8 & ip11, id0 & dd8)
108 #else
109 F1PH(ip6 & ip8 & ip11, id0)
110 #endif /*CT*/
111 exit
112
113 ph1 = 0
114 ph4 = 1
115
116 ph5 = 0 0 2 2
117 ph6 = 1 1 1 1 1 1 1 1 2 2 2 2 2 2 2 2
118 ph7 = 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
119 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2
120 ph8 = 0 2
121 ph9 = 0 0 0 0 2 2 2 2
122 ph10= 3
123 ph11= 0
124 ph12= 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 1 1 1 1 1 1
125
126 #ifdef DQ
127 ph31= 0 2 2 0 2 0 0 2 2 0 0 2 0 2 2 0
128 2 0 0 2 0 2 2 0 0 2 2 0 2 0 2 0 2
129 #else
130 ph31= 0 2 2 0 2 0 0 2 0 2 2 0 2 0 0 2
131 2 0 0 2 0 2 2 0 2 0 2 0 2 0 2 2 0
132 #endif /*DQ*/

```

B.4. HNC-11ECHO

```

1 #include <FMP.incl>
2 #include <Avance.incl>
3 #include <Grad.incl>
4 #include <Delay.incl>
5
6 "in0=inf1/2"
7
8 "p2 = 2.0*p1"
9 "p6 = 2.0*p5"
10

```



```

11 "d11 = 30m"
12 "d12 = 20u"
13 "d13 = 3u"
14
15 "TAU1 = 1s/(cnst1*4) "
16 "TAU = TAU1*2"
17
18 "TAU2 = 1s/(cnst2*8) "
19
20 "DELTA1 = TAU2"
21 "DELTA2 = DELTA1 - TAU - d12"
22
23 "DELTA20 = TAU1 - p27 - d27 - 50u"
24 "DELTA21 = (2*d6 - p6)/2"
25
26 #ifdef CT
27 "DELTA4 = (1s/(cnst4*2)) - p16/2"
28
29 "d0 = 3u"
30 "d8 = DELTA4 + p6 + d0 - p16/2"
31
32 "in8 = in0"
33 #else
34 "d0 = (cnst0*in0 - p6 - 1.28*p13)/2"
35 "l1 = 1"
36 #endif /*CT*/
37
38
39 1 ze
40 2 d1 do:f3
41   d12 pl2:f2
42   d12 pl3:f3
43   p1 ph1
44   TAU1
45   d13
46   (center (p2 ph1) (p6 ph1):f3)
47   d13
48   TAU1
49   p1 ph4
50   50u UNBLKGRAD
51   p22:gp22
52   d22
53   d12 pl19:f1
54   (p5 ph9):f3
55   TAU
56   d12 cpds1:f1 ph1
57   DELTA2
58   (center (p14:sp14 ph1):f2 (p6 ph1):f3)
59   DELTA1
60   (p5 ph1):f3
61 #ifdef NOCPD
62   d12 do:f1
63 #else
64   d13
65 #endif /*NOCPD*/
66   (p13:sp13 ph8):f2
67 #ifdef CT
68   d0
69   (p6 ph1):f3
70   DELTA4
71   (p16:sp16 ph1):f2
72   d8
73 #else
74   d0
75   (p6 ph1):f3
76   d0
77 #endif /*CT*/
78   (p13:sp13 ph7):f2
79 #ifdef NOCPD
80   d12 cpds1:f1 ph1
81 #else
82   d13
83 #endif /*NOCPD*/
84   (p5 ph5):f3
85   DELTA1
86   (center (p14:sp14 ph1):f2 (p6 ph1):f3)
87   DELTA2
88   d12 do:f1
89   TAU
90   (p5 ph1):f3
91   50u
92   p23:gp23
93   d23 BLKGRAD
94   d12 pl1:f1
95   p1 ph21
96   d6
97   p1 ph22
98   50u
99   p27:gp21
100  d27
101  DELTA20
102  p1 ph23
103  DELTA21
104  (p6 ph1):f3
105  DELTA21
106  p1 ph24
107  45u
108  p27:gp21
109  d27
110  DELTA20 pl16:f3
111  5u BLKGRAD
112  go=2 ph31 cpd3:f3
113  d11 do:f3 mc #0 to 2
114 #ifdef CT
115     F1PH(ip8, id0 & dd8)
116 #else
117     F1PH(ip8, id0)
118 #endif /*CT*/
119 exit
120
121 ph1 = 0
122 ph4 = 1
123
124 ph5 = 0 0 0 0 2 2 2 2
125 ph7 = 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
126     2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2

```

```

127 ph8 = 0 2
128 ph9 = 0 0 0 0 0 0 0 0 2 2 2 2 2 2 2 2
129
130 ph21= 0
131 ph22= 2
132 ph23= 0 0 1 1 2 2 3 3
133 ph24= 2 2 3 3 0 0 1 1
134
135 ph31 = 0 2 2 0 2 0 0 2 2 0 0 2 0 2 2 0
136         2 0 0 2 0 2 2 0 0 2 2 0 2 0 0 2

```

B.5. HNCRELAY-11ECHO

```

1 #include <FMP.incl>
2 #include <Avance.incl>
3 #include <Grad.incl>
4 #include <Delay.incl>
5
6 "in0=infl/2"
7
8 "p2 = 2.0*p1"
9 "p6 = 2.0*p5"
10
11 "d11 = 30m"
12 "d12 = 20u"
13 "d13 = 3u"
14
15 "TAU1 = 1s/(cnst1*4)"
16 "TAU = TAU1*2"
17
18 "TAU2 = 1s/(cnst2*8)"
19
20 "DELTA1 = TAU2"
21 "DELTA2 = DELTA1 - TAU - d12"
22
23 "DELTA3 = (1s/(cnst3*8)) - p16/2"
24
25 "DELTA20 = TAU1 - p27 - d27 - 50u"
26 "DELTA21 = (2*d6 - p6)/2"
27
28 #ifdef CT
29 "DELTA4 = (1s/(cnst4*2)) - p16/2"
30
31 "d0 = 3u"
32 "d8 = DELTA4 + p6 + d0 - p16/2"
33
34 "in8 = in0"
35 #else
36 "d0 = (cnst0*in0 - p6 - 1.28*p13)/2"
37 #endif /*CT*/
38
39 1 ze
40 2 d1 do:f3
41   d12 p12:f2
42   d12 p13:f3
43   p1 ph1
44   TAU1
45   d13
46   (center (p2 ph1) (p6 ph1):f3)
47   d13
48   TAU1
49   p1 ph4
50   50u UNBLKGRAD
51   p22:gp22
52   d22
53   d12 p119:f1
54   (p5 ph9):f3
55   TAU
56   d12 cpds1:f1 ph1
57   DELTA2
58   (center (p14:sp14 ph1):f2 (p6 ph1):f3)
59   DELTA1
60   (p5 ph1):f3
61 #ifdef NOCPD
62   d12 do:f1
63 #else
64   d13
65 #endif /*NOCPD*/
66   (p13:sp13 ph8):f2
67   DELTA3
68   (p16:sp16 ph11):f2
69   DELTA3
70   (p13:sp13 ph6):f2
71 #ifdef CT
72   d0
73   (p6 ph1):f3
74   DELTA4
75   (p16:sp16 ph1):f2
76   d8
77 #else
78   d0
79   (p6 ph1):f3
80   d0
81 #endif /*CT*/
82   (p13:sp13 ph10):f2
83   DELTA3
84   (p16:sp16 ph1):f2
85   DELTA3
86   (p13:sp13 ph7):f2
87 #ifdef NOCPD
88   d12 cpds1:f1 ph1
89 #else
90   d13
91 #endif /*NOCPD*/
92   (p5 ph5):f3
93   DELTA1
94   (center (p14:sp14 ph1):f2 (p6 ph1):f3)

```

```

95 DELTA2
96 d12 do:f1
97 TAU
98 (p5 ph1):f3
99 50u
100 p23:gp23
101 d23 BLKGRAD
102 d12 p11:f1
103 p1 ph21
104 d6
105 p1 ph22
106 50u
107 p27:gp21
108 d27
109 DELTA20
110 p1 ph23
111 DELTA21
112 (p6 ph1):f3
113 DELTA21
114 p1 ph24
115 45u
116 p27:gp21
117 d27
118 DELTA20 p116:f3
119 go=2 ph31 cpd3:f3
120 d11 do:f3 mc #0 to 2

121 #ifdef CT
122 F1PH(ip6 & ip8 & ip11, id0 & dd8)
123 #else
124 F1PH(ip6 & ip8 & ip11, id0)
125 #endif /*CT*/
126 exit
127
128 ph1 = 0
129 ph4 = 1
130
131 ph5 = 0 0 0 0 2 2 2 2
132 ph6 = 1
133 ph7 = 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
134 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2
135 ph8 = 0 2
136 ph9 = 0 0 0 0 0 0 0 0 2 2 2 2 2 2 2 2
137 ph10= 3
138 ph11= 0
139
140 ph21= 0
141 ph22= 2
142 ph23= 0 0 1 1 2 2 3 3
143 ph24= 2 2 3 3 0 0 1 1
144
145 ph31 = 0 2 2 0 2 0 0 2 2 0 0 2 0 2 2 0
146 2 0 0 2 0 2 2 0 0 2 2 0 2 0 0 2

```

B.6. HNCRELAY-11ECHO.MQ

```

1 #include <FMP.incl>
2 #include <Avance.incl>
3 #include <Grad.incl>
4 #include <Delay.incl>
5
6 "in0=inf1/2"
7
8
9 "p2 = 2.0*p1"
10 "p6 = 2.0*p5"
11
12 "d11 = 30m"
13 "d12 = 20u"
14 "d13 = 3u"
15
16 "TAU1 = 1s/(cnst1*4)"
17 "TAU = TAU1*2"
18
19 "TAU2 = 1s/(cnst2*8)"
20
21 "DELTA1 = TAU2"
22 "DELTA2 = DELTA1 - TAU - d12"
23
24 "DELTA3 = (1s/(cnst3*8)) - p16/2"
25
26 "DELTA20 = TAU1 - p27 - d27 - 50u"
27 "DELTA21 = (2*d6 - p6)/2"

28
29 #ifdef CT
30 "DELTA4 = (1s/(cnst4*2)) - p16/2"
31
32 "d0 = 3u"
33 "d8 = DELTA4 + p6 + d0 - p16/2"
34
35 "in8 = in0"
36 #else
37 "d0 = (cnst0*in0 - p6 - 1.28*p13)/2"
38 #endif /*CT*/
39
40 1 ze
41 2 d1 do:f3
42 d12 p12:f2
43 d12 p13:f3
44 p1 ph1
45 TAU1
46 d13
47 (center (p2 ph1) (p6 ph1):f3)
48 d13
49 TAU1
50 p1 ph4
51 50u UNBLKGRAD
52 p22:gp22
53 d22
54 d12 p119:f1

```

```

55     (p5 ph9):f3
56     TAU
57     dl2 cpds1:f1 ph1
58     DELTA2
59     (center (p14:sp14 ph1):f2 (p6 ph1):f3)
60     DELTA1
61     (p5 ph1):f3
62     #ifdef NOCPD
63     dl2 do:f1
64     #else
65     dl3
66     #endif /*NOCPD*/
67     (p13:sp13 ph8):f2
68     DELTA3
69     (p16:sp16 ph11):f2
70     DELTA3
71     (ralign (p13:sp13 ph6):f2 (p5 ph12):f3)
72     #ifdef CT
73     d0
74     (p6 ph1):f3
75     DELTA4
76     (p16:sp16 ph1):f2
77     d8
78     #else
79     d0
80     (p6 ph1):f3
81     d0
82     #endif /*CT*/
83     (lalign (p13:sp13 ph10):f2 (p5 ph1):f3)
84     DELTA3
85     (p16:sp16 ph1):f2
86     DELTA3
87     (p13:sp13 ph7):f2
88     #ifdef NOCPD
89     dl2 cpds1:f1 ph1
90     #else
91     dl3
92     #endif /*NOCPD*/
93     (p5 ph5):f3
94     DELTA1
95     (center (p14:sp14 ph1):f2 (p6 ph1):f3)
96     DELTA2
97     dl2 do:f1
98     TAU
99     (p5 ph1):f3
100    50u
101    p23:gp23
102    d23 BLKGRAD
103    dl2 p11:f1
104    p1 ph21
105    d6
106    p1 ph22
107    50u
108    p27:gp21
109    d27
110    DELTA20
111    p1 ph23
112    DELTA21
113    (p6 ph1):f3
114    DELTA21
115    p1 ph24
116    45u
117    p27:gp21
118    d27
119    DELTA20 p116:f3
120    go=2 ph31 cpd3:f3
121    dl1 do:f3 mc #0 to 2
122    #ifdef CT
123        F1PH(ip6 & ip8 & ip11, id0 & dd8)
124    #else
125        F1PH(ip6 & ip8 & ip11, id0)
126    #endif /*CT*/
127    exit
128
129    ph1 = 0
130    ph4 = 1
131
132    ph5 = 0 0 0 0 2 2 2 2
133    ph6 = 1 1 1 1 1 1 1 1 2 2 2 2 2 2 2 2
134    ph7 = 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
135        0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
136        2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2
137        2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2
138    ph8 = 0 2
139    ph9 = 0 0 0 0 0 0 0 0 2 2 2 2 2 2 2 2
140    ph10= 3
141    ph11= 0
142    ph12= 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1
143        2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2
144
145    ph21= 0
146    ph22= 2
147    ph23= 0 0 1 1 2 2 3 3
148    ph24= 2 2 3 3 0 0 1 1
149
150    #ifdef DQ
151    ph31= 0 2 2 0 2 0 0 2 0 2 2 0 2 0 0 2
152        2 0 0 2 0 2 2 0 2 0 0 2 0 2 2 0
153    #else
154    ph31= 0 2 2 0 2 0 0 2 2 0 0 2 0 2 2 0
155        2 0 0 2 0 2 2 0 0 2 2 0 2 0 0 2
156    #endif /*DQ*/

```

B.7. HCC

```

1 #include <FMP.incl>
2 #include <Avance.incl>
3 #include <Grad.incl>
4 #include <Delay.incl>
5
6 "in0 = inf1/2"
7
8 "p2 = 2.0*p1"
9
10 "d11 = 30m"
11 "d12 = 20u"
12 "d13 = 3u"
13
14 "TAU = 1.75m - p14/2"
15
16 "DELTA = 2m - p16/2"
17
18 "d0 = (cnst0*in0 - p2 - 1.28*p13)/2"
19
20 1 ze
21 2 d1 do:f2
22   d12 p12:f2
23   p1 ph1
24   TAU
25   d13
26   (center (p2 ph1) (p14:sp14 ph1):f2)
27   d13
28   TAU
29   p1 ph2
30   50u UNBLKGRAD
31   p22:gp22
32   d22
33   (p13:sp13 ph3):f2
34   DELTA
35   (p16:sp16 ph4):f2
36   DELTA
37   (p13:sp13 ph5):f2
38   d0
39   p2 ph1
40   d0
41   (p13:sp13 ph6):f2
42   DELTA
43   (p16:sp16 ph1):f2
44   DELTA
45   (p13:sp13 ph7):f2
46   p23:gp23
47   d23 BLKGRAD
48   p1 ph1
49   TAU
50   d13
51   (center (p2 ph1) (p14:sp14 ph1):f2)
52   d13
53   TAU p112:f2
54   go=2 ph31 cpd2:f2
55   d11 do:f2 mc #0 to 2
56       F1PH(ip5 & ip3 & ip4, id0)
57   exit
58
59   ph1 = 0
60   ph2 = 1
61
62   ph3 = 0 2
63   ph4 = 0
64
65   ph5 = 1
66   ph6 = 3
67
68   ph7 = 0 0 2 2
69
70   ph31 = 0 2 2 0

```

B.8. CH₃AROM

```

1 #include <FMP.incl>
2 #include <Avance.incl>
3 #include <Grad.incl>
4 #include <Delay.incl>
5
6 "in0 = inf1/2"
7
8 "p2=2.0*p1"
9
10 "d11 = 30m"
11 "d12 = 20u"
12 "d13 = 3u"
13
14 "d0 = (cnst0*in0 - 1.28*p7 - p12)/2"
15
16 "TAU1 = 2.0m"
17 "TAU2 = TAU1 - p27 - d27 - 50u"
18 "TAU3 = (2*d6 - p4)/2"
19
20 "DELTA1 = 4.5m"
21 "DELTA = DELTA1 - p10 - d13"
22
23 1 ze
24 2 d11 do:f2
25   d12 p12:f2
26   d12 p19:f1
27   p18 ph29
28   d13
29   d12 p11:f1
30   p1 ph1
31   TAU1
32   (center (p2 ph1) (p4:sp4 ph1):f2)
33   TAU1
34   p1 ph4

```

```

35 50u UNBLKGRAD
36 p20:gp20
37 d20
38 (p3:sp3 ph6):f2
39 DELTA
40 (p10:sp10 ph1):f2
41 d13
42 (p4:sp4 ph1):f2
43 DELTA1
44 (p10:sp10 ph1):f2
45 d13
46 (p3:sp3 ph7):f2
47 50u
48 p20:gp20
49 d20
50 d12 fq=cnst21:f2
51 (p7:sp7 ph5):f2
52 d0
53 (center (p2 ph1):f1 (p12:sp12 ph1):f2)
54 d0
55 (p7:sp7 ph9):f2
56 d12 fq=cnst22:f2
57 50u
58 p20:gp20
59 d20
60 (p3:sp3 ph1):f2
61 DELTA
62 (p10:sp10 ph1):f2
63 d13
64 (p4:sp4 ph1):f2
65 DELTA1
66 (p10:sp10 ph1):f2
67 d13
68 (p3:sp3 ph8):f2
69 50u
70 p20:gp20
71 d20 BLKGRAD
72 p1 ph1
73 d6
74 p1 ph12
75 50u
76 p27:gp21
77 d27
78 TAU2
79 p1 ph13
80 TAU3
81 (p4:sp4 ph1):f2
82 TAU3
83 p1 ph14
84 45u
85 p27:gp21
86 d27
87 TAU2 pl12:f2
88 go=2 ph31 cpd2:f2
89 d11 do:f2 mc #0 to 2
90 F1PH(ip5, id0)
91 exit
92
93 ph1 = 0
94 ph4 = 1
95
96 ph5 = 0 2
97 ph6 = 0 0 0 0 2 2 2 2
98 ph7 = 1
99 ph8 = 1
100 ph9 = 0 0 0 0 0 0 0 0
101 2 2 2 2 2 2 2 2
102
103 ph12 = 2
104 ph13 = 0 0 1 1 2 2 3 3
105 ph14 = 2 2 3 3 0 0 1 1
106
107 ph29 = 0
108
109 ph31 = 0 2 2 0 2 0 0 2 2 0 0 2 0 0 2 2 0

```

B.9. HNCA_PCB

```

1 #include <FMP.incl>
2 #include <Avance.incl>
3 #include <Grad.incl>
4 #include <Delay.incl>
5
6 "in0 = inf1/2"
7
8 "p2 = 2.0*p1"
9 "p6 = 2.0*p5"
10
11 "d11 = 30m"
12 "d12 = 20u"
13 "d13 = 3u"
14
15 "TAU = 5.5m"
16 "TAU1 = 2.75m"
17
18 "DELTA1 = 8m"
19 "DELTA2 = DELTA1 - TAU - d12"
20
21 1 ze
22 2 d1 do:f3
23 d12 pl2:f2
24 d12 pl3:f3
25 p1 ph1
26 TAU1
27 d13
28 (center (p2 ph1) (p6 ph1):f3)
29 d13
30 TAU1

```

```

31  p1 ph4
32  50u UNBLKGRAD
33  p22:gp22
34  d22
35  d12 p119:f1
36  (p5 ph9):f3
37  TAU
38  d12 cpds1:f1 ph1
39  DELTA2
40  (center (p4:sp4 ph1):f2 (p6 ph1):f3)
41  DELTA1
42  (p5 ph1):f3
43  d13
44  (p3:sp3 ph8):f2
45  d0
46  (p6 ph1):f3
47  d0
48  (p13:sp13 ph1):f2
49  d13
50  (p5 ph5):f3
51  DELTA1
52  (center (p4:sp4 ph1):f2 (p6 ph1):f3)
53  DELTA2
54  d12 do:f1
55  TAU
56  (p5 ph1):f3
57  45u
58  p23:gp23
59  d23
60  5u BLKGRAD
61  d12 p11:f1
62  p1 ph1
63  TAU1
64  d13
65  (center (p2 ph1) (p6 ph1):f3)
66  d13
67  TAU1 p116:f3
68  go=2 ph31 cpd3:f3
69  d11 do:f3 mc #0 to 2
70  F1PH(ip8, id0)
71  exit
72
73  ph1 = 0
74  ph4 = 1
75
76  ph5 = 0 0 2 2
77  ph8 = 0 2
78  ph9 = 0 0 0 0 2 2 2 2
79
80  ph31 = 0 2 2 0 2 0 0 2

```

B.10. HNCA_PCB.CT

```

1  #include <FMP.incl>
2  #include <Avance.incl>
3  #include <Grad.incl>
4  #include <Delay.incl>
5
6
7
8  "p2 = 2.0*p1"
9  "p6 = 2.0*p5"
10
11  "d11 = 30m"
12  "d12 = 20u"
13  "d13 = 3u"
14
15  "TAU = 5.5m"
16  "TAU1 = 2.75m"
17
18  "DELTA1 = 8m"
19  "DELTA2 = DELTA1 - TAU - d12"
20
21  "d19 = cnst19 * 7.1m"
22
23  "d0 = 3u"
24  "d8 = d19 - p6 - d0"
25
26  "in0 = inf1/2"
27  "in8 = in0"
28
29  "max_TD1 = 2*(1 + d8/in8)"
30  "cnst29 = max_TD1"
31
32  1 ze
33  2 d1 do:f3
34  d12 p12:f2
35  d12 p13:f3
36  p1 ph1
37  TAU1
38  d13
39  (center (p2 ph1) (p6 ph1):f3)
40  d13
41  TAU1
42  p1 ph4
43  50u UNBLKGRAD
44  p22:gp22
45  d22
46  d12 p119:f1
47  (p5 ph9):f3
48  TAU
49  d12 cpds1:f1 ph1
50  DELTA2
51  (center (p4:sp4 ph1):f2 (p6 ph1):f3)
52  DELTA1
53  (p5 ph1):f3
54  #ifdef nocpd
55  d12 do:f1
56  #else

```

```

57     dl3
58 #endif
59     (p3:sp3 ph8):f2
60     d0
61     (p6 ph1):f3
62     d8
63     (p13:sp13 ph1):f2
64 #ifdef nocpd
65     dl2 cpds1:f1 ph1
66 #else
67     dl3
68 #endif
69     (p5 ph5):f3
70     DELTA1
71     (center (p4:sp4 ph1):f2 (p6 ph1):f3)
72     DELTA2
73     dl2 do:f1
74     TAU
75     (p5 ph1):f3
76     45u
77     p23:gp23
78     d23
79     5u BLKGRAD
80     dl2 pl1:f1
81     p1 ph1
82     TAU1
83     dl3
84     (center (p2 ph1) (p6 ph1):f3)
85     dl3
86     TAU1 pl16:f3
87     go=2 ph31 cpd3:f3
88     dl1 do:f3 mc #0 to 2
89         F1PH(ip8, id0 & dd8)
90     exit
91
92     ph1 = 0
93     ph4 = 1
94
95     ph5 = 0 0 2 2
96     ph8 = 0 2
97     ph9 = 0 0 0 0 2 2 2 2
98
99     ph31 = 0 2 2 0 2 0 0 2

```

B.11. HNCOCA_PCB

```

1 #include <FMP.incl>
2 #include <Avance.incl>
3 #include <Grad.incl>
4 #include <Delay.incl>
5
6 "in0 = inf1/2"
7
8 "p2 = 2.0*p1"
9 "p6 = 2.0*p5"
10
11 "d11 = 30m"
12 "d12 = 20u"
13 "d13 = 3u"
14
15 "TAU = 5.5m"
16 "TAU1 = 2.75m"
17
18 "DELTA1 = 8m"
19 "DELTA2 = DELTA1 - TAU - d12"
20 "DELTA3 = cnst3 * 2m"
21
22 1 ze
23 2 dl do:f3
24     dl2 pl2:f3
25     dl2 pl3:f3
26     p1 ph1
27     TAU1
28     dl3
29     (center (p2 ph1) (p6 ph1):f3)
30     dl3
31     TAU1
32     p1 ph4
33     50u UNBLKGRAD
34     p22:gp22
35     d22
36     dl2 pl19:f1
37     (p5 ph8):f3
38     TAU
39     dl2 cpds1:f1 ph1
40     DELTA2
41     (center (p10:sp10 ph1):f2 (p6 ph1):f3)
42     DELTA1
43     (p5 ph1):f3
44     dl3
45     dl2 fq=cnst22:f2
46 #ifdef nocpd
47     dl2 do:f1
48 #else
49     dl3
50 #endif
51     (p9:sp9 ph7):f2
52     DELTA3
53     (p11:sp11 ph1):f2
54     DELTA3
55     (p19:sp19 ph9):f2
56     dl3
57     dl2 fq=cnst21:f2
58     dl3
59     (p3:sp3 ph5):f2
60     d0
61     (center (p10:sp10 ph1):f2 (p6 ph1):f3)
62     d0

```



```

63 (p4:sp4 ph1):f2
64 d13
65 (p10:sp10 ph1):f2
66 d13
67 (p13:sp13 ph1):f2
68 d13
69 d12 fq=cnst22:f2
70 d13
71 (p9:sp9 ph1):f2
72 DELTA3
73 (p11:sp11 ph1):f2
74 DELTA3
75 (p19:sp19 ph9):f2
76 #ifndef nocpd
77 d12 cpds1:f1 ph1
78 #else
79 d13
80 #endif
81 d12 fq=cnst21:f2
82 d13
83 (p5 ph6):f3
84 DELTA1
85 (center (p10:sp10 ph1):f2 (p6 ph1):f3)
86 DELTA2
87 d12 do:f1
88 TAU
89 (p5 ph1):f3
90 45u
91 p23:gp23
92 d23
93 5u BLKGRAD
94 d12 p11:f1
95 p1 ph1
96 TAU1
97 d13
98 (center (p2 ph1) (p6 ph1):f3)
99 d13
100 TAU1 p116:f3
101 go=2 ph31 cpd3:f3
102 d11 do:f3 mc #0 to 2
103 F1PH(ip5, id0)
104 exit
105
106 ph1 = 0
107 ph4 = 1
108
109 ph5 = 0 2
110 ph6 = 0 0 0 0 2 2 2 2
111 ph7 = 0 0 2 2
112 ph8 = 0 0 0 0 0 0 0 2 2 2 2 2 2 2 2 2
113 ph9 = 1
114
115 ph31 = 0 2 2 0 2 0 0 2 2 0 0 2 0 2 2 0

```

B.12. HNCOCA_PCB.CT

```

1 #include <FMP.incl>
2 #include <Avance.incl>
3 #include <Grad.incl>
4 #include <Delay.incl>
5
6 "in0=infl/2"
7
8 "p2 = 2.0*p1"
9 "p6 = 2.0*p5"
10
11 "d11 = 30m"
12 "d12 = 20u"
13 "d13 = 3u"
14
15 "TAU = 5.5m"
16 "TAU1 = 2.75m"
17
18 "DELTA1 = 8m"
19 "DELTA2 = DELTA1 - TAU - d12"
20 "DELTA3 = cnst3 * 2m"
21 "DELTA4 = cnst4 * 7.1m"
22
23 "d8 = DELTA4 - p6 - d0"
24
25 "in8 = in0"
26
27 1 ze
28 2 d1 do:f3
29 d12 p12:f2
30 d12 p13:f3
31 p1 ph1
32 TAU1
33 d13
34 (center (p2 ph1) (p6 ph1):f3)
35 d13
36 TAU1
37 p1 ph4
38 50u UNBLKGRAD
39 p22:gp22
40 d22
41 d12 p119:f1
42 (p5 ph8):f3
43 TAU
44 d12 cpds1:f1 ph1
45 DELTA2
46 (center (p10:sp10 ph1):f2 (p6 ph1):f3)
47 DELTA1
48 (p5 ph1):f3
49 d13
50 d12 fq=cnst22:f2
51 #ifndef NOCPD
52 d12 do:f1

```

```

53 #else
54   dl3
55 #endif
56   (p9:sp9 ph7):f2
57   DELTA3
58   (p11:sp11 ph1):f2
59   DELTA3
60   (p19:sp19 ph9):f2
61   dl3
62   dl2 fq=cnst21:f2
63   dl3
64   (p3:sp3 ph5):f2
65   d0
66   (p6 ph1):f3
67   DELTA4
68   (p4:sp4 ph1):f2
69   d8
70   (p13:sp13 ph1):f2
71   DELTA3
72   dl3
73   dl2 fq=cnst22:f2
74   dl3
75   (p9:sp9 ph1):f2
76   DELTA3
77   (p11:sp11 ph1):f2
78   DELTA3
79   (p19:sp19 ph9):f2
80 #ifdef NOCPD
81   dl2 cpds1:f1 ph1
82 #else
83   dl3
84 #endif
85   dl2 fq=cnst21:f2
86   dl3
87   (p5 ph6):f3
88   DELTA1
89   (center (p10:sp10 ph1):f2 (p6 ph1):f3)
90   DELTA2
91   dl2 do:f1
92   TAU
93   (p5 ph1):f3
94   45u
95   p23:gp23
96   d23
97   5u BLKGRAD
98   dl2 p11:f1
99   p1 ph1
100  TAU1
101  dl3
102  (center (p2 ph1) (p6 ph1):f3)
103  dl3
104  TAU1 p116:f3
105  go=2 ph31 cpd3:f3
106  dl1 do:f3 mc #0 to 2
107      F1PH(ip5, id0 & dd8)
108  exit
109
110  ph1 = 0
111  ph4 = 1
112
113  ph5 = 0 2
114  ph6 = 0 0 0 0 2 2 2 2
115  ph7 = 0 0 2 2
116  ph8 = 0 0 0 0 0 0 0 2 2 2 2 2 2 2 2
117  ph9 = 1
118
119  ph31 = 0 2 2 0 2 0 0 2 2 0 0 2 0 2 2 0

```

B.13. HNCOCA_PCB.CTDQ

```

1  #include <FMP.incl>
2  #include <Avance.incl>
3  #include <Grad.incl>
4  #include <Delay.incl>
5
6  "p2 = 2.0*p1"
7  "p6 = 2.0*p5"
8
9  "d11 = 30m"
10 "d12 = 20u"
11 "d13 = 3u"
12
13 "TAU = 5.5m"
14 "TAU1 = 2.75m"
15
16 "DELTA1 = 8m"
17 "DELTA2 = DELTA1 - TAU - d12"
18 "DELTA3 = cnst3 * 2m"
19
20 "d0 = d19/4"
21 "d8 = d19/4"
22
23 "in0 = inf1/4"
24 "in8 = in0"
25
26 "max_TD1 = 2*(1 + d8/in8)"
27 "cnst29 = max_TD1"
28
29 1 ze
30 2 dl do:f3
31   dl2 p12:f3
32   dl2 p13:f3
33   p1 ph1
34   TAU1
35   dl3
36   (center (p2 ph1) (p6 ph1):f3)

```

```

37  d13
38  TAU1
39  p1 ph4
40  50u UNBLKGRAD
41  p22:gp22
42  d22
43  d12 p119:f1
44  (p5 ph1):f3
45  TAU
46  d12 cpds1:f1 ph1
47  DELTA2
48  (center (p10:sp10 ph1):f2 (p6 ph1):f3)
49  DELTA1
50  (p5 ph1):f3
51  d13
52  d12 fq=cnst22:f2
53  #ifdef nocpd
54  d12 do:f1
55  #else
56  d13
57  #endif
58  (p9:sp9 ph7):f2
59  DELTA3
60  (p11:sp11 ph1):f2
61  DELTA3
62  (p19:sp19 ph9):f2
63  d13
64  d12 fq=cnst21:f2
65  d13
66  (ralign (p3:sp3 ph5):f2 (p5 ph8):f3)
67  d0
68  (p10:sp10 ph1):f2
69  d0
70  (center (p4:sp4 ph14):f2 (p6 ph1):f3)
71  d8
72  (p10:sp10 ph1):f2
73  d8
74  (lalign (p13:sp13 ph1):f2 (p5 ph1):f3)
75  d13
76  d12 fq=cnst22:f2
77  d13
78  (p9:sp9 ph1):f2
79  DELTA3
80  (p11:sp11 ph1):f2
81  DELTA3
82  (p19:sp19 ph9):f2
83  #ifdef nocpd
84  d12 cpds1:f1 ph1
85  #else
86  d13
87  #endif
88  d12 fq=cnst21:f2
89  d13
90  (p5 ph6):f3
91  DELTA1
92  (center (p10:sp10 ph1):f2 (p6 ph1):f3)
93  DELTA2
94  d12 do:f1
95  TAU
96  (p5 ph1):f3
97  45u
98  p23:gp23
99  d23
100  5u BLKGRAD
101  d12 p11:f1
102  p1 ph1
103  TAU1
104  d13
105  (center (p2 ph1) (p6 ph1):f3)
106  d13
107  TAU1 p116:f3
108  go=2 ph31 cpd3:f3
109  d11 do:f3 mc #0 to 2
110  F1PH(ip5, id0 & dd8)
111  exit
112
113  ph1 = 0
114  ph4 = 1
115
116  ph5 = 0 2 0 2 0 2 0 2 1 3 1 3 1 3 1 3
117  ph6 = 0 0 2 2
118  ph7 = 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
119  2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2
120  ph8 = 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 1 1 1 1 1 1
121  ph9 = 1
122
123  ph14= 0 0 0 0 1 1 1 1 2 2 2 2 3 3 3 3
124
125  ph31= 0 2 2 0 2 0 0 2 2 0 0 2 0 2 2 0
126  2 0 0 2 0 2 2 0 0 2 2 0 2 0 0 2

```

B.14. HNCOCA_PCB.CTZQ

```

1  #include <FMP.incl>
2  #include <Avance.incl>
3  #include <Grad.incl>
4  #include <Delay.incl>
5
6  "p2 = 2.0*p1"
7  "p6 = 2.0*p5"
8
9  "d11 = 30m"
10 "d12 = 20u"
11 "d13 = 3u"
12
13 "TAU = 5.5m"
14 "TAU1 = 2.75m"

```

```

15
16 "DELTA1 = 8m"
17 "DELTA2 = DELTA1 - TAU - d12"
18 "DELTA3 = cnst3 * 2m"
19
20 "d0 = d19/4"
21 "d8 = d19/4"
22
23 "in0 = inf1/4"
24 "in8 = in0"
25
26 "max_TD1 = 2*(1 + d8/in8)"
27 "cnst29 = max_TD1"
28
29 1 ze
30 2 d1 do:f3
31   d12 p12:f3
32   d12 p13:f3
33   p1 ph1
34   TAU1
35   d13
36   (center (p2 ph1) (p6 ph1):f3)
37   d13
38   TAU1
39   p1 ph4
40   50u UNBLKGRAD
41   p22:gp22
42   d22
43   d12 p119:f1
44   (p5 ph1):f3
45   TAU
46   d12 cpds1:f1 ph1
47   DELTA2
48   (center (p10:sp10 ph1):f2 (p6 ph1):f3)
49   DELTA1
50   (p5 ph1):f3
51   d13
52   d12 fq=cnst22:f2
53 #ifdef nocpd
54   d12 do:f1
55 #else
56   d13
57 #endif
58   (p9:sp9 ph7):f2
59   DELTA3
60   (p11:sp11 ph1):f2
61   DELTA3
62   (p19:sp19 ph9):f2
63   d13
64   d12 fq=cnst21:f2
65   d13
66   (ralign (p3:sp3 ph5):f2 (p5 ph8):f3)
67   d0
68   (p10:sp10 ph1):f2
69   d0
70   (center (p4:sp4 ph14):f2 (p6 ph1):f3)
71   d8
72   (p10:sp10 ph1):f2
73   d8
74   (lalign (p13:sp13 ph1):f2 (p5 ph1):f3)
75   d13
76   d12 fq=cnst22:f2
77   d13
78   (p9:sp9 ph1):f2
79   DELTA3
80   (p11:sp11 ph1):f2
81   DELTA3
82   (p19:sp19 ph9):f2
83 #ifdef nocpd
84   d12 cpds1:f1 ph1
85 #else
86   d13
87 #endif
88   d12 fq=cnst21:f2
89   d13
90   (p5 ph6):f3
91   DELTA1
92   (center (p10:sp10 ph1):f2 (p6 ph1):f3)
93   DELTA2
94   d12 do:f1
95   TAU
96   (p5 ph1):f3
97   45u
98   p23:gp23
99   d23
100  5u BLKGRAD
101  d12 p11:f1
102  p1 ph1
103  TAU1
104  d13
105  (center (p2 ph1) (p6 ph1):f3)
106  d13
107  TAU1 p116:f3
108  go=2 ph31 cpd3:f3
109  d11 do:f3 mc #0 to 2
110      F1PH(ip5, id0 & dd8)
111  exit
112
113  ph1 = 0
114  ph4 = 1
115
116  ph5 = 0 2 0 2 0 2 0 2 1 3 1 3 1 3 1 3
117  ph6 = 0 0 2 2
118  ph7 = 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
119      2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2
120  ph8 = 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 1 1 1 1 1
121  ph9 = 1
122
123  ph14= 0 0 0 0 1 1 1 1 2 2 2 2 3 3 3 3
124
125  ph31= 0 2 2 0 2 0 0 2 0 2 2 0 2 0 0 2
126      2 0 0 2 0 2 2 0 2 0 0 2 0 2 2 0

```

B.15. HNCOCA_PCB11ECHO

```

1 #include <FMP.incl>
2 #include <Avance.incl>
3 #include <Grad.incl>
4 #include <Delay.incl>
5
6 "in0 = inf1/2"
7
8 "p2 = 2.0*p1"
9 "p6 = 2.0*p5"
10
11 "d0 = 3u"
12 "d11 = 30m"
13 "d12 = 20u"
14 "d13 = 3u"
15
16 "TAU = 5.5m"
17 "TAU1 = 2.75m"
18 "TAU2 = 2.75m - p27 - d27 - 50u"
19 "TAU3 = (2*d6 - p6)/2"
20
21 "DELTA1 = 8m"
22 "DELTA2 = DELTA1 - TAU - d12"
23 "DELTA3 = cnst3 * 2m"
24
25 1 ze
26 2 d1 do:f3
27   d12 p12:f2
28   d12 p13:f3
29   p1 ph1
30   TAU1
31   (center (p2 ph1) (p6 ph1):f3)
32   TAU1
33   p1 ph4
34   50u UNBLKGRAD
35   p22:gp22
36   d22
37   d12 p119:f1
38   (p5 ph8):f3
39   TAU
40   d12 cpds1:f1 ph1
41   DELTA2
42   (center (p10:sp10 ph1):f2 (p6 ph1):f3)
43   DELTA1
44   (p5 ph1):f3
45   d13
46   d12 fq=cnst22:f2
47 #ifdef nocpd
48   d12 do:f1
49 #else
50   d13
51 #endif
52   (p9:sp9 ph7):f2
53   DELTA3
54   (p11:sp11 ph1):f2
55   DELTA3
56   (p19:sp19 ph9):f2
57   d13
58   d12 fq=cnst21:f2
59   d13
60   (p3:sp3 ph5):f2
61   d0
62   (center (p10:sp10 ph1):f2 (p6 ph1):f3)
63   d0
64   (p4:sp4 ph1):f2
65   d13
66   (p10:sp10 ph1):f2
67   d13
68   (p13:sp13 ph1):f2
69   d13
70   d12 fq=cnst22:f2
71   d13
72   (p9:sp9 ph1):f2
73   DELTA3
74   (p11:sp11 ph1):f2
75   DELTA3
76   (p19:sp19 ph9):f2
77 #ifdef nocpd
78   d12 cpds1:f1 ph1
79 #else
80   d13
81 #endif
82   d12 fq=cnst21:f2
83   d13
84   (p5 ph6):f3
85   DELTA1
86   (center (p10:sp10 ph1):f2 (p6 ph1):f3)
87   DELTA2
88   d12 do:f1
89   TAU
90   (p5 ph1):f3
91   45u
92   p23:gp23
93   d23
94   d12 p11:f1
95   p1 ph11
96   d6
97   p1 ph12
98   50u
99   p27:gp21
100  d27
101  TAU2
102  p1 ph13
103  TAU3
104  (p6 ph1):f3
105  TAU3
106  p1 ph14
107  45u
108  p27:gp21
109  d27
110  TAU2 p116:f3
111  5u BLKGRAD
112  go=2 ph31 cpd3:f3

```

```

113     dl1 do:f3 mc #0 to 2
114     F1PH(ip5, id0)
115     exit
116
117     ph1 = 0
118     ph4 = 1
119
120     ph5 = 0 2
121     ph6 = 0 0 0 0 2 2 2 2
122     ph7 = 0 0 0 0 0 0 0 2 2 2 2 2 2 2 2 2
123     ph8 = 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0

```

```

124         2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2
125     ph9 = 1
126
127     ph11 = 0
128     ph12 = 2
129     ph13 = 0 0 1 1 2 2 3 3
130     ph14 = 2 2 3 3 0 0 1 1
131
132     ph31 = 0 2 2 0 2 0 0 2 2 0 0 2 0 2 2 0
133         2 0 0 2 0 2 2 0 0 2 2 0 2 0 0 2

```

B.16. HNCOCA_PCB11ECHO.CT

```

1  #include <FMP.incl>
2  #include <Avance.incl>
3  #include <Grad.incl>
4  #include <Delay.incl>
5
6  "d11 = 30m"
7  "d12 = 20u"
8  "d13 = 3u"
9
10 "p2 = 2.0*p1"
11 "p6 = 2.0*p5"
12
13 "d0 = d19/4"
14 "d8 = d19/4"
15
16 "in0 = inf1/4"
17 "in8 = in0"
18
19 "TAU = 5.5m"
20 "TAU1 = 2.75m"
21 "TAU2 = 2.75m - p27 - d27 - 50u"
22 "TAU3 = (2*d6 - p6)/2"
23
24 "DELTA1 = 8m"
25 "DELTA2 = DELTA1 - TAU - d12"
26 "DELTA3 = cnst3 * 2m"
27
28 "max_TD1 = 2*(1 + d8/in8)"
29 "cnst29 = max_TD1"
30
31 1 ze
32 2 dl do:f3
33     dl2 p12:f2
34     dl2 p13:f3
35     p1 ph1
36     TAU1
37     (center (p2 ph1) (p6 ph1):f3)
38     TAU1
39     p1 ph4
40     50u UNBLKGRAD
41     p22:gp22
42     d22

```

```

43     dl2 p119:f1
44     (p5 ph8):f3
45     TAU
46     dl2 cpds1:f1 ph1
47     DELTA2
48     (center (p10:sp10 ph1):f2 (p6 ph1):f3)
49     DELTA1
50     (p5 ph1):f3
51     d13
52     dl2 fq=cnst22:f2
53 #ifdef nocpd
54     dl2 do:f1
55 #else
56     d13
57 #endif
58     (p9:sp9 ph7):f2
59     DELTA3
60     (p11:sp11 ph1):f2
61     DELTA3
62     (p19:sp19 ph9):f2
63     d13
64     dl2 fq=cnst21:f2
65     d13
66     (p3:sp3 ph5):f2
67     d0
68     (center (p10:sp10 ph1):f2 (p6 ph1):f3)
69     d0
70     (p4:sp4 ph1):f2
71     d8
72     (center (p10:sp10 ph1):f2 (p6 ph1):f3)
73     d8
74     (p13:sp13 ph1):f2
75     d13
76     dl2 fq=cnst22:f2
77     d13
78     (p9:sp9 ph1):f2
79     DELTA3
80     (p11:sp11 ph1):f2
81     DELTA3
82     (p19:sp19 ph9):f2
83 #ifdef nocpd
84     dl2 cpds1:f1 ph1

```

```

85 #else
86 d13
87 #endif
88 d12 fq=cnst21:f2
89 d13
90 (p5 ph6):f3
91 DELTA1
92 (center (p10:sp10 ph1):f2 (p6 ph1):f3)
93 DELTA2
94 d12 do:f1
95 TAU
96 (p5 ph1):f3
97 45u
98 p23:gp23
99 d23
100 d12 pl1:f1
101 p1 ph11
102 d6
103 p1 ph12
104 50u
105 p27:gp21
106 d27
107 TAU2
108 p1 ph13
109 TAU3
110 (p6 ph1):f3
111 TAU3
112 p1 ph14
113 45u
114 p27:gp21
115 d27
116 TAU2 pl16:f3
117 5u BLKGRAD
118 go=2 ph31 cpd3:f3
119 d11 do:f3 mc #0 to 2
120 F1PH(ip5, id0 & dd8)
121 exit
122
123 ph1 = 0
124 ph4 = 1
125
126 ph5 = 0 2
127 ph6 = 0 0 0 0 2 2 2 2
128 ph7 = 0 0 0 0 0 0 0 0 2 2 2 2 2 2 2 2
129 ph8 = 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
130 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2
131 ph9 = 1
132
133 ph11 = 0
134 ph12 = 2
135 ph13 = 0 0 1 1 2 2 3 3
136 ph14 = 2 2 3 3 0 0 1 1
137
138 ph31 = 0 2 2 0 2 0 0 2 2 0 0 2 0 2 2 0
139 2 0 0 2 0 2 2 0 0 2 2 0 2 0 2 0 2

```

B.17. HNCOCA_PCB11ECHO.CTZQ

```

1 #include <FMP.incl>
2 #include <Avance.incl>
3 #include <Grad.incl>
4 #include <Delay.incl>
5
6 "d11 = 30m"
7 "d12 = 20u"
8 "d13 = 3u"
9
10 "p2 = 2.0*p1"
11 "p6 = 2.0*p5"
12
13 "d0 = d19/4"
14 "d8 = d19/4"
15
16 "in0 = inf1/4"
17 "in8 = in0"
18
19 "TAU = 5.5m"
20 "TAU1 = 2.75m"
21 "TAU2 = 2.75m - p27 - d27 - 50u"
22 "TAU3 = (2*d6 - p6)/2"
23
24 "DELTA1 = 8m"
25 "DELTA2 = DELTA1 - TAU - d12"
26 "DELTA3 = cnst3 * 2m"
27
28 "max_TD1 = 2*(1 + d8/in8)"
29 "cnst29 = max_TD1"
30
31 1 ze
32 2 d1 do:f3
33 d12 pl2:f2
34 d12 pl3:f3
35 p1 ph1
36 TAU1
37 (center (p2 ph1) (p6 ph1):f3)
38 TAU1
39 p1 ph4
40 50u UNBLKGRAD
41 p22:gp22
42 d22
43 d12 pl19:f1
44 (p5 ph1):f3
45 TAU
46 d12 cpds1:f1 ph1
47 DELTA2
48 (center (p10:sp10 ph1):f2 (p6 ph1):f3)
49 DELTA1
50 (p5 ph1):f3

```

```

51     dl3
52     dl2 fq=cnst22:f2
53     #ifdef nocpd
54     dl2 do:f1
55     #else
56     dl3
57     #endif
58     (p9:sp9 ph7):f2
59     DELTA3
60     (p11:sp11 ph1):f2
61     DELTA3
62     (p19:sp19 ph9):f2
63     dl3
64     dl2 fq=cnst21:f2
65     dl3
66     (ralign (p3:sp3 ph5):f2 (p5 ph8):f3)
67     d0
68     (p10:sp10 ph1):f2
69     d0
70     (center (p4:sp4 ph10):f2 (p6 ph1):f3)
71     d8
72     (p10:sp10 ph1):f2
73     d8
74     (lalign (p13:sp13 ph1):f2 (p5 ph1):f3)
75     dl3
76     dl2 fq=cnst22:f2
77     dl3
78     (p9:sp9 ph1):f2
79     DELTA3
80     (p11:sp11 ph1):f2
81     DELTA3
82     (p19:sp19 ph9):f2
83     #ifdef nocpd
84     dl2 cpds1:f1 ph1
85     #else
86     dl3
87     #endif
88     dl2 fq=cnst21:f2
89     dl3
90     (p5 ph6):f3
91     DELTA1
92     (center (p10:sp10 ph1):f2 (p6 ph1):f3)
93     DELTA2
94     dl2 do:f1
95     TAU
96     (p5 ph1):f3
97     45u
98     p23:gp23
99     d23
100    d12 p11:f1
101    p1 ph11
102    d6
103    p1 ph12
104    50u
105    p27:gp21
106    d27
107    TAU2
108    p1 ph13
109    TAU3
110    (p6 ph1):f3
111    TAU3
112    p1 ph14
113    45u
114    p27:gp21
115    d27
116    TAU2 p116:f3
117    5u BLKGRAD
118    go=2 ph31 cpd3:f3
119    d11 do:f3 mc #0 to 2
120        F1PH(ip5, id0 & dd8)
121    exit
122
123    ph1 = 0
124    ph4 = 1
125
126    ph5 = 0 2 0 2 0 2 0 2 1 3 1 3 1 3 1 3
127    ph6 = 0 0 0 0 2 2 2 2
128    ph7 = 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
129        0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
130        2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2
131        2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2
132    ph8 = 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 1 1 1 1 1 1
133    ph9 = 1
134
135    ph10 = 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
136        1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1
137        2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2
138        3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3
139
140    ph11 = 0
141    ph12 = 2
142    ph13 = 0 0 1 1 2 2 3 3
143    ph14 = 2 2 3 3 0 0 1 1
144
145    ph31 = 0 2 2 0 2 0 0 2 0 2 2 0 2 0 0 2
146        2 0 0 2 0 2 2 0 2 0 0 2 0 2 2 0
147        2 0 0 2 0 2 2 0 2 0 0 2 0 2 2 0
148        0 2 2 0 2 0 0 2 0 2 2 0 2 0 2 0 2

```


C. Sequenzalignment

Das Sequenzalignment wurde mit CLUSTAL W 2.0 erstellt. Die Aminosäuren innerhalb der definierten Radien wurden mit Hilfe von Pymol bestimmt.^[117] Dafür wurde folgender Befehl verwendet:

```
PyMol> select [name of selection], all within [distance in Ångström]
of resi [resid of chromophore]
```

Für die Abstandsbestimmung wurden die in der PDB verfügbaren Kristallstrukturen verwendet (Cph1: 2VEA, PaBphP: 3C2W).^[2,3]

Die Abstände sind folgendermaßen farblich kodiert:

■ 2 Å ■ 3 Å ■ 4 Å ■ 5 Å ■ 6 Å

DrBphP	MSRDPLPFFPPLYLGGPEITTENCEREPIH	30 (30)	Agp1	GLRFPAGDIPPQARQLYTINRLRMIPVDY	240 (219)
Cph1	-----MATTVQLSDQSLRQLETIAIH	30 (21)		* : * . * * * * * * : : * : . *	
PaBphP	-----MTSITPVLANCDEDEPIH	30 (18)	DrBphP	AAVPLDPVLNPQTNAPTPLGGAVLRATSPM	270 (259)
Agp1	MQRER----LEKVMSSHTPKLSDCGAEPH	30 (26)	Cph1	VAVPLTPAVNPSTNRAVDLTESILRSAYHC	270 (259)
 * *		PaBphP	TPMRVFPALNPETNESFDLSYSVLSVSPH	270 (246)
DrBphP	IPGSIQPHGALLTADGHSGEVLQMSLNAAT	60 (60)	Agp1	KPVPPIRPEVNAETGAVLDMSFSQLRSVSPV	270 (249)
Cph1	TAHLIQPHGLVVVLQEPDLTISQISANCTG	60 (51)		. : * : * . * . * . : : * * : .	
PaBphP	VPGAIQPHGALVTLRA-DGMVLAASENIQA	60 (47)	DrBphP	HMQYLRNMGVGSSLSVSVVVGGQLWGLIAC	300 (289)
Agp1	IPGAIQEHGALLVLSAREFSVQQASDNLAN	60 (56)	Cph1	HLTYLKNMGVGSALTISLIKDGHLWGLIAC	300 (289)
	. * * * * : : . : * *		PaBphP	HCEYLTNMGVRSMSISIVVGGKLGWGLFC	300 (276)
DrBphP	FLGQEPTVLRGQTLAALLPE-QWP--ALQA	90 (87)	Agp1	HLEYMRNMGTAAASMSVSIIVVNGALWGLIAC	300 (279)
Cph1	ILGRSPEDLLGRTLGEVDFSFQID--PIQS	90 (79)		* * : * * * . : * : * : * : * * * * : *	
PaBphP	LLG-----FVASPGSYLTQEQVGP--EVL	90 (70)	DrBphP	HHQTPYVLPDDLRTTLEYLGRLLSLQVQVK	330 (319)
Agp1	YIG-----VDLPIGAVATEANLPPFISVLS	90 (80)	Cph1	HHQTPKVIPPELRKACEFFGRVVFNSISQA	330 (319)
	: * :		PaBphP	HHMSPKLIYPVVRMSFQIFSQVCSAIVERL	330 (306)
DrBphP	ALPPGCPDALQYRATLDWPAAGH---LSLT	120 (114)	Agp1	HHATPHSVSLAVREACDFAAQLLSMRIAME	330 (309)
Cph1	RLTAGISSLNPKLNAWVMGDDFVIFDGV	120 (109)		** : * : . : * : : : . : :	
PaBphP	MLEEGLTGNGPWSNSVETRIGE--LFDVI	120 (98)	DrBphP	EAADVAAFRQSLREHHRVALAAASHLSLSPH	360 (349)
Agp1	AWYSGEESNFRYA--WAEKK-----LDVS	120 (102)	Cph1	EDTETFDYRVQLAEHEAVLLDKMTAADFV	360 (349)
	* :		PaBphP	EQGRIAE LLRVSTERRLARRARDADDLF	360 (336)
DrBphP	VHRVGE-LLILEFEPTAOWS---TGPHAL	150 (140)	Agp1	QSSQDASRRVELGHTQARLLKGMAAAEKWW	360 (339)
Cph1	FHRNSDGLLVCELEPAYTSDNLPFLGFYHM	150 (139)		: :	
PaBphP	GHSYKE-VFYLEFE-IRTADTLTITSFTLN	150 (126)	DrBphP	DTL---SDPALDLLGLMRAGGLILRFEGRW	390 (376)
Agp1	AHRSGT-LVILEVEKAGVGEAEEKLMGELT	150 (131)	Cph1	EGL---TNHPDRLGLTGSQGAICFGEKL	390 (376)
	* : . * . * . : . :		PaBphP	GAL---AHPDDGIAALIPCDGALVMLGGRT	390 (363)
DrBphP	RNAMFA-LESAPNLRALAEVATQTVRELTG	180 (169)	Agp1	DGLLGGEGEREDLLKQVGADGAALVLGDY	390 (369)
Cph1	ANAALNRLRQANLRDFYDVIIEVRRMTG	180 (169)		* : . : * * : :	
PaBphP	AQRITIAQVQLHNDTASLLSNVTDELRRMTG	180 (156)	DrBphP	QTLGEVPPAPAVDALLAWLETQP-GALVQT	420 (405)
Agp1	SLAKY--LNSAPSLDELALFRTAQLVSSISG	180 (159)	Cph1	ILVGETPDEKAVQYLLQWLENREVQDVFFT	420 (406)
 : : * * :		PaBphP	LSIRGDFERQA-GNVLQRLQRDPERDIYHT	420 (392)
DrBphP	FDRVMLYKFPADATGEVIAEARREGLHAF	210 (199)	Agp1	ELVGNTPSREQVEELIWLGEREIAVDFAT	420 (399)
Cph1	FDRVMYRFDENNHDGVI AEDKRDDMEPYL	210 (199)		: : * : : *	
PaBphP	YDRVMAYRFRHDDSGEVVAESRREDLESYL	210 (186)	DrBphP	DALGQLWPAGADLAPSAAGLLAISVGEWGS	450 (435)
Agp1	HDRTLIIYDFGLDWSGHVVAEAGSGALPSYL	210 (189)	Cph1	SSLSQIYDPAVNFKSVASGLLAIP IARH--	450 (435)
	. * * . : * * : * * : * * : : * *		PaBphP	DNWPQSPEDSPD-GDCGCCVLAIRFHRQES	450 (421)
DrBphP	GHRFPASDIPAQARALYTRHLLRLTADTRA	240 (229)	Agp1	DNLAGNYPTAAAYASVAGSIAMRVSELHG	450 (429)
Cph1	GLHYPESDIPQARRLFIHNPIRIVIPDVIY	240 (229)	 * * : * : . .	
PaBphP	GQRYPASDIPQARRLYIQNPIRLIADVAY	240 (216)			

DrBphP	ECLVWLRLPELRLLEVAVGG-----ATPDQ	480 (458)	DrBphP	RVVDDVLQDLEPRIADTGASIEVAPPELPI	660 (635)
Cph1	NFLWFRPEVLQTVNWWGGDPNHAYEATQED	480 (464)	Cph1	EVVDKALANLQRIEESGAEIEVGS-MPAV	660 (635)
PaBphP	GWIFWFRHEEVHRIRWGGKPEKLLTIGPSG	480 (451)	PaBphP	QLVRQIVCETDVAYPGLVIEIAIDPQVRAV	660 (609)
Agp1	SWLIWFRPEVIKTVRWGGDPHK---TVQES	480 (456)	Agp1	KVSEVRRSLSHAVSDRQIEWRIGA-LPVI	660 (624)
	..:* * : * * .			..* : . : . :	
DrBphP	AKDDLGRHSFDTYLEEKRGYAEWPHPGEI	510 (488)	DrBphP	AADAGLLRDLHLLHIGNALTFGGPE-PR--	690 (663)
Cph1	GKIELHPRQSFDLWKEIVRLQSLPWQSVET	510 (494)	Cph1	MADQIQLMQVFNLIANGIKFAGDKSPK--	690 (664)
PaBphP	PR--LTPRGSFEAWEEVVRGHSTPWSSETDL	510 (479)	PaBphP	V-DPDRYAQVAANLLSNARHHGLPGRP---	690 (636)
Agp1	GR--IHPRKSFETWKEQLRNTSFPWSEPEL	510 (484)	Agp1	FGDPTLLRQVWYNLIENAIKYSRE-PVSI	690 (653)
	: : * * * : * * : * * ::			* : : * : * . . . *	
DrBphP	EEAQDLRDTLTGALGERLSVIRDLNRALTQ	540 (518)	DrBphP	IAVRTERQGAGWSIAVSDQGAGIAPEYQER	720 (692)
Cph1	QSALALKKAIIVNLIIRQAEEAQLARNLER	540 (524)	Cph1	IKIWGDRQEDAWFAVDNGIGIDPQFFER	720 (693)
PaBphP	AIAEKLRDLMECLNHAEEVDRMRQRLIA	540 (509)	PaBphP	VLVTLTRQGDEVCLSVLNETSGLSEAQLAN	720 (665)
Agp1	AAARELRGAIIGIVLRKTEEMADLTRELQR	540 (514)	Agp1	ITISAVETEDDVTYSVEDNGVGFDMAYYNK	720 (683)
	* * : : . : : : * :			: : . : * : : * :	
DrBphP	SNAEWRQYGFVISHHMQEPVRLISQFAELL	570 (548)	DrBphP	IFLLFQR--LGSLEALGNGLGLPLCRKIA	750 (722)
Cph1	SNADLKKFAYIASHDLQEPNQSIVYVQLL	570 (554)	Cph1	IFVIFQR--LHTRDEYKGTGMGLAICKKII	750 (723)
PaBphP	-----VLGHDLRNLQSQISMAAALL	570 (529)	PaBphP	LFEPFKRESADNRNRNGLGIGLYISQAIA	750 (697)
Agp1	TNKELEAFYSVSHDLRAPFRHIVGFAQLL	570 (544)	Agp1	LFGVFQR--LQRVEDEFEGTIGLALVRRIV	750 (713)
	. * . : * . : . * *			: * * : * : * * * : * :	
DrBphP	TRQ-PRAQDQSPDSPQTERITGFLRETSR	600 (577)	DrBphP	ELHGGTLTVESAPGEGSTFCRWLPDAGPLP	780 (752)
Cph1	EMRYSEALD-----EDAKDFIDFAVIGVSL	600 (579)	Cph1	EGHQGQIWLESNPGEGSTFYFSIPIGN---	780 (749)
PaBphP	S-----SSD-----TRTTELQHISASSR	600 (549)	PaBphP	QAHQGRIDVDCR-DDVITFCRLRPVQAET	780 (726)
Agp1	RER-SDALD-----EKSLHYLQMISEAAALG	600 (568)	Agp1	ERHHGLVGAEGTVGEGATFSFTLPVKVEE	780 (743)
	: * : : :			: * * : : . : * * : *	
DrBphP	LRSLTQDLHTYTALLSAPPVVRP--TPLG	630 (605)	DrBphP	GAADA-----	792 (756)
Cph1	MQTLIDDLTYAKVDTYAQLTF---TDVQ	630 (606)	Cph1	-----	792 (749)
PaBphP	MERLVSQILDMSRLQSGIGLTVNVDTDVS	630 (579)	PaBphP	GSSS-----	792 (729)
Agp1	AGRLVDDLLNFSQLGRGQ-LILKP--VDMQ	630 (595)	Agp1	EKIARSHHHHHH	792 (754)
	* . : : : : . :				

D. CNSsolve Topologie- und Parametersätze

D.1. Topologiesatz für PCB

```
remark file pcb.top
remark Geometric energy function parameters for phycoyanobilin free in solution
remark Most of the data taken from the crystal structure of Cph1 (2vea)
remark or as noticed within the file
remark Author: Marco Roeben, Leibniz-Institut fuer Molekulare Pharmakologie (FMP)
remark Berlin, Germany

set echo off message off end

checkversion 1.2

set message off echo off end

autogenerate
  angles=true
  dihedrals=false
end

mass H 1.008
mass H2 1.008
mass H31 1.008
mass H32 1.008
mass H5 1.008
mass H71 1.008

mass C 12.011
mass C1 12.011
mass C2 12.011
mass C3 12.011
mass C4 12.011
mass C5 12.011
mass C6 12.011
mass C7 12.011
mass C71 12.011
mass C8 12.011
mass C9 12.011
mass C10 12.011
mass C11 12.011

mass NH21 14.007
mass NH22 14.007
mass NH23 14.007
mass NH24 14.007

mass OC 15.999
mass O1 15.999
```

```
! =====  
! ### Phycocyanobilin free in solution                                     ###  
! -----  
residue pcb  
  group  
    atom H2   type=H2   charge=-0.30 end  
    atom H21a type=H   charge=-0.30 end  
    atom H21b type=H   charge=-0.30 end  
    atom H21c type=H   charge=-0.30 end  
    atom H31   type=H31 charge=-0.30 end  
    atom H32a type=H   charge=-0.30 end  
    atom H32b type=H   charge=-0.30 end  
    atom H32c type=H   charge=-0.30 end  
    atom H5    type=H5   charge=-0.30 end  
    atom H71a type=H   charge=-0.30 end  
    atom H71b type=H   charge=-0.30 end  
    atom H71c type=H   charge=-0.30 end  
    atom H81a type=H   charge=-0.30 end  
    atom H81b type=H   charge=-0.30 end  
    atom H82a type=H   charge=-0.30 end  
    atom H82b type=H   charge=-0.30 end  
    atom H10   type=H10 charge=-0.30 end  
    atom H12a type=H   charge=-0.30 end  
    atom H12b type=H   charge=-0.30 end  
    atom H12c type=H   charge=-0.30 end  
    atom H12d type=H   charge=-0.30 end  
    atom H13a type=H   charge=-0.30 end  
    atom H13b type=H   charge=-0.30 end  
    atom H13c type=H   charge=-0.30 end  
    atom H15   type=H15 charge=-0.30 end  
    atom H17a type=H   charge=-0.30 end  
    atom H17b type=H   charge=-0.30 end  
    atom H17c type=H   charge=-0.30 end  
    atom H18a type=H   charge=-0.30 end  
    atom H18b type=H   charge=-0.30 end  
    atom H18c type=H   charge=-0.30 end  
    atom H18d type=H   charge=-0.30 end  
    atom H18e type=H   charge=-0.30 end  
  
    atom H21   type=NH21 charge=-0.30 end  
    atom H22   type=NH22 charge=-0.30 end  
    atom H23   type=NH23 charge=-0.30 end  
    atom H24   type=NH24 charge=-0.30 end  
  
    atom C1   type=C1   charge=-0.30 end  
    atom C2   type=C2   charge=-0.30 end  
    atom C21  type=C   charge=-0.30 end  
    atom C3   type=C3   charge=-0.30 end  
    atom C31  type=C31  charge=-0.30 end  
    atom C32  type=C   charge=-0.30 end  
    atom C4   type=C4   charge=-0.30 end  
    atom C5   type=C5   charge=-0.30 end  
    atom C6   type=C6   charge=-0.30 end  
    atom C7   type=C7   charge=-0.30 end  
    atom C71  type=C   charge=-0.30 end  
    atom C8   type=C8   charge=-0.30 end  
    atom C81  type=C   charge=-0.30 end  
    atom C82  type=C   charge=-0.30 end
```

```
atom C83 type=C charge=-0.30 end
atom C9 type=C9 charge=-0.30 end
atom C10 type=C10 charge=-0.30 end
atom C11 type=C11 charge=-0.30 end
atom C12 type=C12 charge=-0.30 end
atom C121 type=C charge=-0.30 end
atom C122 type=C charge=-0.30 end
atom C123 type=C charge=-0.30 end
atom C13 type=C13 charge=-0.30 end
atom C131 type=C charge=-0.30 end
atom C14 type=C14 charge=-0.30 end
atom C15 type=C15 charge=-0.30 end
atom C16 type=C16 charge=-0.30 end
atom C17 type=C17 charge=-0.30 end
atom C171 type=C charge=-0.30 end
atom C18 type=C18 charge=-0.30 end
atom C181 type=C charge=-0.30 end
atom C182 type=C charge=-0.30 end
atom C19 type=C19 charge=-0.30 end

atom N21 type=N21 charge=-0.30 end
atom N22 type=N22 charge=-0.30 end
atom N23 type=N23 charge=-0.30 end
atom N24 type=N24 charge=-0.30 end

atom O1 type=O1 charge=0.00 end
atom O19 type=O19 charge=0.00 end
atom O84a type=OC charge=0.00 end
atom O84b type=OC charge=0.00 end
atom O12a type=OC charge=0.00 end
atom O12b type=OC charge=0.00 end

bond C1 N21 bond N21 H21
bond C1 O1
bond C1 C2 bond C2 H2 bond C2 C21 bond C21 H21a bond C21 H21b bond C21 H21c
bond C2 C3 bond C3 C31 bond C31 H31 bond C31 C32 bond C32 H32a bond C32 H32b
bond C32 H32c
bond C3 C4
bond C4 N21
bond C4 C5
bond C5 H5
bond C5 C6
bond C6 N22 bond N22 H22
bond C6 C7 bond C7 C71 bond C71 H71a bond C71 H71b bond C71 H71c
bond C7 C8 bond C8 C81 bond C81 H81a bond C81 H81b bond C81 C82 bond C82 H82a
bond C82 H82b bond C82 C83 bond C83 O84a bond C83 O84b
bond C8 C9
bond C9 N22
bond C9 C10 bond C10 H10
bond C10 C11
bond C11 N23 bond N23 H23
bond C11 C12 bond C12 C121 bond C121 H12a bond C121 H12b bond C121 C122
bond C122 H12c bond C122 H12d bond C122 C123 bond C123 O12a bond C123 O12b
bond C12 C13 bond C13 C131 bond C131 H13a bond C131 H13b bond C131 H13c
bond C13 C14
bond C14 N23
bond C14 C15 bond C15 H15
bond C15 C16
```

```
bond C16 N24 bond N24 H24
bond C16 C17 bond C17 C171 bond C171 H17a bond C171 H17b bond C171 H17c
bond C17 C18 bond C18 C181 bond C181 H18a bond C181 H18b bond C181 C182
bond C182 H18c bond C182 H18d bond C182 H18e
bond C18 C19
bond C19 N24
bond C19 O19

!## ring A ###
! situation is a little different here since ring A is not perfectly planar

! impropers for the planarity of the ring
improper N21 C1 C2 C3
improper C2 C3 C4 N21
improper C1 N21 C4 H21

! impropers to force side chains into the ring plane
improper N21 C1 C2 O1
improper C3 C4 N21 C5
improper C2 C3 C4 C31

! stereochemistry on C2
improper C3 C2 C1 H2

! stereochemistry on C3 double bond
improper H31 C31 C3 C4

! vinyl group planarity
improper C32 C31 H31 C3

!### methine bridge C5 ###
improper H5 C5 C6 C4

! Z configuration on C4 double bond
! improper C6 C5 C4 N21

! configuration of impropers for ccr N21C5 and N22C5
improper N21 C4 C5 H5
improper N22 C6 C5 H5

!### ring B ###
! impropers for the planarity of the ring
improper N22 C6 C7 C8
improper C7 C8 C9 N22
improper C6 N22 C9 H22

! impropers to force side chains into the ring plane
improper N22 C6 C7 C5
improper C6 C7 C8 C71
improper C7 C8 C9 C81
improper C8 C9 N22 C10

!### methine bridge C10 ###
improper H10 C10 C11 C9

! Z configuration on C9 double bond
improper N22 C9 C10 C11
```

```
!### ring C ###
! impropers for the planarity of the ring
  improper N23 C11 C12 C13
  improper C12 C13 C14 N23
  improper C11 N23 C14 H23

! impropers to force side chain into the ring plane
  improper C12 C11 N23 C10
  improper C11 C12 C13 C121
  improper C12 C13 C14 C131
  improper C13 C14 N23 C15

!### methine bridge C15 ###
  improper C14 C15 H15 C16

! Z configuration on C15 double bond
!   improper C14 C15 C16 N24

! configuration of impropers for ccr N23C15 and N24C15
  improper N23 C14 C15 H15
  improper N24 C16 C15 H15

!### ring D ###
! impropers for the planarity of the ring
  improper N24 C16 C17 C18
  improper C17 C18 C19 N24
  improper C16 N24 C19 H24

! impropers to force side chains into the ring plane
  improper C17 C16 N24 C15
  improper C16 C17 C18 C171
  improper C17 C18 C19 C181
  improper C18 C19 N24 O19

end
! =====
! =====
! ### Patches to change conformation                                     ###
! -----
residue EZZ
  delete improper C6 C5 C4 N21
  add improper H5 C5 C4 N21
end

residue ZEZ
  delete improper N22 C9 C10 C11
  add improper N22 C9 C10 H10
end

residue ZZE
  delete improper C14 C15 C16 N24
  add improper C14 C15 C16 C17
end

residue ZEE
  delete improper N22 C9 C10 C11
  delete improper C14 C15 C16 N24
```

```

add improper N22 C9 C10 H10
add improper C14 C15 C16 C17
end

residue EEZ
delete improper C6 C5 C4 N21
delete improper N22 C9 C10 C11
add improper H5 C5 C4 N21
add improper N22 C9 C10 H10
end

residue EZE
delete improper C6 C5 C4 N21
delete improper C14 C15 C16 N24
add improper H5 C5 C4 N21
add improper C14 C15 C16 C17
end

residue EEE
delete improper C6 C5 C4 N21
delete improper N22 C9 C10 C11
delete improper C14 C15 C16 N24
add improper H5 C5 C4 N21
add improper N22 C9 C10 H10
add improper C14 C15 C16 C17
end
! =====
set echo=true end

```

D.2. Parametersatz für PCB

```

set echo off message off end

checkversion 1.2

! =====
! ### ring A ###
! -----
BOND N21 NH21 1000.000 {sd= 0.001} 1.000

BOND C1 N21 1000.000 {sd= 0.001} 1.300
BOND C1 C2 1000.000 {sd= 0.001} 1.500
BOND C2 C3 1000.000 {sd= 0.001} 1.500
BOND C3 C4 1000.000 {sd= 0.001} 1.500
BOND C4 N21 1000.000 {sd= 0.001} 1.300

ANGLE N21 C1 C2 500.00 {sd= 0.031} 113.0000
ANGLE C1 C2 C3 500.00 {sd= 0.031} 102.1000
ANGLE C2 C3 C4 500.00 {sd= 0.031} 102.0000
ANGLE C3 C4 N21 500.00 {sd= 0.031} 111.3000
ANGLE C4 N21 C1 500.00 {sd= 0.031} 111.3000
ANGLE C1 N21 NH21 500.00 {sd= 0.031} 124.3000
ANGLE C4 N21 NH21 500.00 {sd= 0.031} 124.3000

IMPRoper N21 C1 C2 C3 500.00 {sd= 0.031} 0 0.0000

```



```

IMPRoper C2 C3 C4 N21 500.00 {sd= 0.031} 0 0.0000
IMPRoper C1 N21 C4 NH21 500.00 {sd= 0.031} 0 180.0000

! => carbonyl
BOND C1 O1 1000.000 {sd= 0.001} 1.300

ANGLE C2 C1 O1 500.00 {sd= 0.031} 122.7000
ANGLE N21 C1 O1 500.00 {sd= 0.031} 124.2000

IMPRoper N21 C1 C2 O1 500.00 {sd= 0.031} 0 180.0000

! => methyl group
BOND C2 C 1000.000 {sd= 0.001} 1.500

ANGLE C1 C2 C 500.00 {sd= 0.031} 111.4000
ANGLE C3 C2 C 500.00 {sd= 0.031} 112.1000
ANGLE C2 C H 500.00 {sd= 0.031} 109.5000
ANGLE H2 C2 C 500.00 {sd= 0.031} 104.2000

IMPRoper C3 C2 C1 H2 500.00 {sd= 0.031} 0 122.5000

! => C2 proton
BOND C2 H2 1000.000 {sd= 0.001} 1.100

ANGLE C1 C2 H2 500.00 {sd= 0.031} 114.0000
ANGLE H2 C2 C3 500.00 {sd= 0.031} 113.3000

! => vinyl group
BOND C3 C31 1000.000 {sd= 0.001} 1.300
BOND C31 H31 1000.000 {sd= 0.001} 1.100 ! unsure
BOND C31 C 1000.000 {sd= 0.001} 1.500 ! unsure

ANGLE C2 C3 C31 500.00 {sd= 0.031} 125.0000 ! not sure about the angle
ANGLE C4 C3 C31 500.00 {sd= 0.031} 126.0000 ! not sure about the angle
ANGLE C3 C31 H31 500.00 {sd= 0.031} 120.0000 ! not sure about the angle
ANGLE C3 C31 C 500.00 {sd= 0.031} 120.0000 ! not sure about the angle
ANGLE C C31 H31 500.00 {sd= 0.031} 120.0000 ! not sure about the angle
ANGLE C31 C H 500.00 {sd= 0.031} 109.5000

IMPRoper C2 C3 C4 C31 500.00 {sd= 0.031} 0 180.0000
IMPRoper C C31 H31 C3 500.00 {sd= 0.031} 0 180.0000
IMPRoper H31 C31 C3 C4 500.00 {sd= 0.031} 0 0.0000

! => methine bridge C5
BOND C4 C5 1000.000 {sd= 0.001} 1.300

ANGLE C3 C4 C5 500.00 {sd= 0.031} 122.4000
ANGLE N21 C4 C5 500.00 {sd= 0.031} 126.2000
ANGLE C4 C5 H5 500.00 {sd= 0.031} 116.0000

IMPRoper C3 C4 N21 C5 500.00 {sd= 0.031} 0 180.0000
! =====
! ##### methine bridge C5 #####
! -----
BOND C5 H5 1000.000 {sd= 0.001} 1.100

```

```

ANGLE C4 C5 C6 500.00 {sd= 0.031} 127.9000

IMPProper H5 C5 C6 C4 500.00 {sd= 0.031} 0 180.0000
! IMPProper C6 C5 C4 N21 500.00 {sd= 0.031} 0 0.0000
! IMPProper H5 C5 C4 N21 500.00 {sd= 0.031} 0 0.0000

! N21C5 - theta1
! IMPProper N21 C4 C5 H5 500.00 {sd= 0.031} 0 49.9400
! N21C5 - theta2
! IMPProper N21 C4 C5 H5 500.00 {sd= 0.031} 0 130.0600
! N21C5 - theta3
! IMPProper N21 C4 C5 H5 500.00 {sd= 0.031} 0 310.0600
! N21C5 - theta4
IMPProper N21 C4 C5 H5 500.00 {sd= 0.031} 0 229.9400

! N22C5 - theta1
! IMPProper N22 C6 C5 H5 500.00 {sd= 0.031} 0 38.4000
! N22C5 - theta2
! IMPProper N22 C6 C5 H5 500.00 {sd= 0.031} 0 141.6000
! N22C5 - theta3
! IMPProper N22 C6 C5 H5 500.00 {sd= 0.031} 0 321.6000
! N22C5 - theta4
IMPProper N22 C6 C5 H5 500.00 {sd= 0.031} 0 218.4000
! =====

! =====
! ### ring B ###
! -----
BOND N22 NH22 1000.000 {sd= 0.001} 1.000

BOND C6 N22 1000.000 {sd= 0.001} 1.400
BOND C6 C7 1000.000 {sd= 0.001} 1.500
BOND C7 C8 1000.000 {sd= 0.001} 1.500
BOND C8 C9 1000.000 {sd= 0.001} 1.500
BOND C9 N22 1000.000 {sd= 0.001} 1.400

ANGLE N22 C6 C7 500.00 {sd= 0.031} 114.0000
ANGLE C6 C7 C8 500.00 {sd= 0.031} 105.9000
ANGLE C7 C8 C9 500.00 {sd= 0.031} 101.5000
ANGLE C8 C9 N22 500.00 {sd= 0.031} 112.9000
ANGLE C6 N22 C9 500.00 {sd= 0.031} 105.7000
ANGLE C6 N22 NH22 500.00 {sd= 0.031} 127.2000
ANGLE C9 N22 NH22 500.00 {sd= 0.031} 127.2000

IMPProper N22 C6 C7 C8 500.00 {sd= 0.031} 0 0.0000
IMPProper C7 C8 C9 N22 500.00 {sd= 0.031} 0 0.0000
IMPProper C6 N22 C9 NH22 500.00 {sd= 0.031} 0 180.0000

! => methine bridge C5
BOND C5 C6 1000.000 {sd= 0.001} 1.500

ANGLE C6 C5 H5 500.00 {sd= 0.031} 116.0000
ANGLE C5 C6 N22 500.00 {sd= 0.031} 126.4000
ANGLE C5 C6 C7 500.00 {sd= 0.031} 119.5000

IMPProper N22 C6 C7 C5 500.00 {sd= 0.031} 0 180.0000

! => methyl group

```

```

BOND  C7  C      1000.000 {sd=  0.001}      1.500

ANGLe  C6  C7  C      500.00 {sd=  0.031}      128.2000
ANGLe  C8  C7  C      500.00 {sd=  0.031}      130.2000
ANGLe  C7  C   H      500.00 {sd=  0.031}      109.5000

IMPRoper  C6  C7  C8  C      500.00 {sd=  0.031}      0      180.0000

! => propionic acid group
BOND  C8  C      1000.000 {sd=  0.001}      1.500

ANGLe  C7  C8  C      500.00 {sd=  0.031}      130.9000
ANGLe  C9  C8  C      500.00 {sd=  0.031}      122.6000
ANGLe  C8  C   H      500.00 {sd=  0.031}      103.1000 ! CHECK ANGLE AGAIN
ANGLe  C8  C   C      500.00 {sd=  0.031}      111.3121 ! value taken from
protein-ahldg.param

IMPRoper  C7  C8  C9  C      500.00 {sd=  0.031}      0      180.0000

! => methine bridge C10
BOND  C9  C10     1000.000 {sd=  0.001}      1.500

ANGLe  C8  C9  C10     500.00 {sd=  0.031}      116.1000
ANGLe  N22 C9  C10     500.00 {sd=  0.031}      131.0000
ANGLe  C9  C10  H10     500.00 {sd=  0.031}      112.0000

IMPRoper  C8  C9  N22  C10     500.00 {sd=  0.031}      0      180.0000
! =====
! ##### methine bridge C10 #####
! -----
BOND  C10  H10     1000.000 {sd=  0.001}      1.100

ANGLe  C9  C10  C11     500.00 {sd=  0.031}      136.0000

IMPRoper  H10  C10  C11  C9      500.00 {sd=  0.031}      0      180.0000
IMPRoper  N22  C9  C10  C11     500.00 {sd=  0.031}      0      0.0000
IMPRoper  N22  C9  C10  H10     500.00 {sd=  0.031}      0      0.0000
! =====
! ##### ring C #####
! -----
BOND  N23  NH23     1000.000 {sd=  0.001}      1.000

BOND  C11  N23     1000.000 {sd=  0.001}      1.300
BOND  C11  C12     1000.000 {sd=  0.001}      1.500
BOND  C12  C13     1000.000 {sd=  0.001}      1.500
BOND  C13  C14     1000.000 {sd=  0.001}      1.400
BOND  C14  N23     1000.000 {sd=  0.001}      1.400

ANGLe  N23  C11  C12     500.00 {sd=  0.031}      113.8000
ANGLe  C11  C12  C13     500.00 {sd=  0.031}      102.6000
ANGLe  C12  C13  C14     500.00 {sd=  0.031}      103.2000
ANGLe  C13  C14  N23     500.00 {sd=  0.031}      116.4000
ANGLe  C14  N23  C11     500.00 {sd=  0.031}      103.9000
ANGLe  C11  N23  NH23     500.00 {sd=  0.031}      128.0000

```

```

ANGLE  C14 N23  NH23    500.00 {sd=    0.031}    128.0000

IMPRoper  N23  C11  C12  C13    500.00 {sd=    0.031}    0      0.0000
IMPRoper  C12  C13  C14  N23    500.00 {sd=    0.031}    0      0.0000
IMPRoper  C11  N23  C14  NH23    500.00 {sd=    0.031}    0     180.0000

! => methine bridge C10
BOND  C11  C10    1000.000 {sd=    0.001}    1.500

ANGLE  C10  C11 N23    500.00 {sd=    0.031}    126.6000
ANGLE  C10  C11 C12    500.00 {sd=    0.031}    119.6000
ANGLE  C11  C10 H10    500.00 {sd=    0.031}    112.0000

IMPRoper  C12  C11  N23  C10    500.00 {sd=    0.031}    0     180.0000

! => propionic acid group
BOND  C12  C    1000.000 {sd=    0.001}    1.400

ANGLE  C11  C12  C    500.00 {sd=    0.031}    124.0000
ANGLE  C    C12  C13    500.00 {sd=    0.031}    133.4000
ANGLE  C12  C    H    500.00 {sd=    0.031}    109.5000
ANGLE  C12  C    C    500.00 {sd=    0.031}    111.3121 ! value taken from
protein-aldhg.param

IMPRoper  C11  C12  C13  C    500.00 {sd=    0.031}    0     180.0000

! => methyl group
BOND  C13  C    1000.000 {sd=    0.001}    1.400

ANGLE  C12  C13  C    500.00 {sd=    0.031}    128.0000
ANGLE  C    C13  C14    500.00 {sd=    0.031}    128.8000
ANGLE  C13  C    H    500.00 {sd=    0.031}    109.5000

IMPRoper  C12  C13  C14  C    500.00 {sd=    0.031}    0     180.0000

! => methine bridge C15
BOND  C14  C15    1000.000 {sd=    0.001}    1.500

ANGLE  C15  C14  N23    500.00 {sd=    0.031}    114.6000
ANGLE  C13  C14  C15    500.00 {sd=    0.031}    128.5000
ANGLE  C14  C15  H15    500.00 {sd=    0.031}    115.2000

IMPRoper  C13  C14  N23  C15    500.00 {sd=    0.031}    0     180.0000
! =====
! ##### methine bridge C15 #####
! -----
BOND  C15  H15    1000.000 {sd=    0.001}    1.100

ANGLE  C14  C15  C16    500.00 {sd=    0.031}    129.6000

IMPRoper  C14  C15  H15  C16    500.00 {sd=    0.031}    0     180.0000
! IMPRoper  C14  C15  C16  N24    500.00 {sd=    0.031}    0      0.0000
IMPRoper  C14  C15  C16  C17    500.00 {sd=    0.031}    0      0.0000

! N23C15 - theta1
! IMPRoper  N23  C14  C15  H15    500.00 {sd=    0.031}    0     63.9000

```

```

! N23C15 - theta2
! IMPRoper N23 C14 C15 H15 500.00 {sd= 0.031} 0 116.1000
! N23C15 - theta3
! IMPRoper N23 C14 C15 H15 500.00 {sd= 0.031} 0 296.1000
! N23C15 - theta4
! IMPRoper N23 C14 C15 H15 500.00 {sd= 0.031} 0 243.9000

! N24C15 - theta1
! IMPRoper N24 C16 C15 H15 500.00 {sd= 0.031} 0 53.1700
! N24C15 - theta2
! IMPRoper N24 C16 C15 H15 500.00 {sd= 0.031} 0 126.8300
! N24C15 - theta3
! IMPRoper N24 C16 C15 H15 500.00 {sd= 0.031} 0 306.8300
! N24C15 - theta4
! IMPRoper N24 C16 C15 H15 500.00 {sd= 0.031} 0 233.1700
! =====

! =====
! ### ring D ###
! -----
BOND N24 NH24 1000.000 {sd= 0.001} 1.000

BOND C16 N24 1000.000 {sd= 0.001} 1.400
BOND C16 C17 1000.000 {sd= 0.001} 1.400
BOND C17 C18 1000.000 {sd= 0.001} 1.400
BOND C18 C19 1000.000 {sd= 0.001} 1.400
BOND C19 N24 1000.000 {sd= 0.001} 1.400

ANGLE N24 C16 C17 500.00 {sd= 0.031} 112.0000
ANGLE C16 C17 C18 500.00 {sd= 0.031} 108.8000
ANGLE C17 C18 C19 500.00 {sd= 0.031} 101.5000
ANGLE C18 C19 N24 500.00 {sd= 0.031} 116.0000
ANGLE C19 N24 C16 500.00 {sd= 0.031} 101.7000
ANGLE C16 N24 NH24 500.00 {sd= 0.031} 129.1000
ANGLE C19 N24 NH24 500.00 {sd= 0.031} 129.1000

IMPRoper N24 C16 C17 C18 500.00 {sd= 0.031} 0 0.0000
IMPRoper C17 C18 C19 N24 500.00 {sd= 0.031} 0 0.0000
IMPRoper C16 N24 C19 NH24 500.00 {sd= 0.031} 0 180.0000

! => methine bridge C15
BOND C15 C16 1000.000 {sd= 0.001} 1.500

ANGLE C15 C16 N24 500.00 {sd= 0.031} 125.3000
ANGLE C15 C16 C17 500.00 {sd= 0.031} 122.7000
ANGLE C16 C15 H15 500.00 {sd= 0.031} 115.2000

IMPRoper C17 C16 N24 C15 500.00 {sd= 0.031} 0 180.0000

! => methyl group
BOND C17 C 1000.000 {sd= 0.001} 1.500

ANGLE C16 C17 C 500.00 {sd= 0.031} 126.0000
ANGLE C18 C17 C 500.00 {sd= 0.031} 125.2000
ANGLE C17 C H 500.00 {sd= 0.031} 109.5000

IMPRoper C16 C17 C18 C 500.00 {sd= 0.031} 0 180.0000

```

```

! => ethyl group
  BOND  C18  C      1000.000 {sd= 0.001} 1.500

  ANGLE  C17 C18  C      500.00 {sd= 0.031} 126.8000
  ANGLE  C19 C18  C      500.00 {sd= 0.031} 131.7000
  ANGLE  C18  C   H      500.00 {sd= 0.031} 109.5000
  ANGLE  C18  C   C      500.00 {sd= 0.031} 109.5000

  IMPRoper  C17  C18  C19  C      500.00 {sd= 0.031} 0 180.0000

! => carbonyl
  BOND  C19  O19      1000.000 {sd= 0.001} 1.500

  ANGLE  C18 C19  O19      500.00 {sd= 0.031} 121.9000
  ANGLE  N24 C19  O19      500.00 {sd= 0.031} 122.9000

  IMPRoper  C18  C19  N24  O19      500.00 {sd= 0.031} 0 180.0000
! =====
! ##### some standard values #####
! ##### e.g used for methyl groups #####
! -----
  BOND  C   C      1000.000 {sd= 0.001} 1.500
  BOND  C   OC     1000.000 {sd= 0.001} 1.249 ! value taken from
protein-allhdg.param
  BOND  C   H      1000.000 {sd= 0.001} 1.100

  ANGLE  C   H   H      500.00 {sd= 0.031} 109.5000
  ANGLE  H   C   H      500.00 {sd= 0.031} 109.5000
  ANGLE  H   C   C      500.00 {sd= 0.031} 108.7236 ! value taken from
protein-allhdg.param
  ANGLE  C   C   C      500.00 {sd= 0.031} 111.3121 ! value taken from
protein-allhdg.param
  ANGLE  C   C   OC     500.00 {sd= 0.031} 120.9106 ! value taken from
protein-allhdg.param
  ANGLE  OC  C   OC     500.00 {sd= 0.031} 123.3548 ! value taken from
protein-allhdg.param
! =====
! ##### NONBonded parameters (taken from protein-allhdg.param) #####
! -----
NONBonded  C      0.0903  3.3409  0.0903  3.3409
NONBonded  C1     0.0903  3.3409  0.0903  3.3409
NONBonded  C2     0.0903  3.3409  0.0903  3.3409
NONBonded  C3     0.0903  3.3409  0.0903  3.3409
NONBonded  C31    0.0903  3.3409  0.0903  3.3409
NONBonded  C4     0.0903  3.3409  0.0903  3.3409
NONBonded  C5     0.0903  3.3409  0.0903  3.3409
NONBonded  C6     0.0903  3.3409  0.0903  3.3409
NONBonded  C7     0.0903  3.3409  0.0903  3.3409
NONBonded  C8     0.0903  3.3409  0.0903  3.3409
NONBonded  C9     0.0903  3.3409  0.0903  3.3409
NONBonded  C10    0.0903  3.3409  0.0903  3.3409
NONBonded  C11    0.0903  3.3409  0.0903  3.3409
NONBonded  C12    0.0903  3.3409  0.0903  3.3409
NONBonded  C13    0.0903  3.3409  0.0903  3.3409

```

NONBonded	C14	0.0903	3.3409	0.0903	3.3409
NONBonded	C15	0.0903	3.3409	0.0903	3.3409
NONBonded	C16	0.0903	3.3409	0.0903	3.3409
NONBonded	C17	0.0903	3.3409	0.0903	3.3409
NONBonded	C18	0.0903	3.3409	0.0903	3.3409
NONBonded	C19	0.0903	3.3409	0.0903	3.3409
NONBonded	H	0.0498	2.2272	0.0498	2.2272
NONBonded	H2	0.0498	2.2272	0.0498	2.2272
NONBonded	H31	0.0498	2.2272	0.0498	2.2272
NONBonded	H5	0.0498	2.2272	0.0498	2.2272
NONBonded	H71	0.0903	3.3409	0.0903	2.2272
NONBonded	H10	0.0498	2.2272	0.0498	2.2272
NONBonded	H15	0.0498	2.2272	0.0498	2.2272
NONBonded	NH21	0.0498	2.2272	0.0498	2.2272
NONBonded	NH22	0.0498	2.2272	0.0498	2.2272
NONBonded	NH23	0.0498	2.2272	0.0498	2.2272
NONBonded	NH24	0.0498	2.2272	0.0498	2.2272
NONBonded	N21	0.1592	3.0068	0.1592	3.0068
NONBonded	N22	0.1592	3.0068	0.1592	3.0068
NONBonded	N23	0.1592	3.0068	0.1592	3.0068
NONBonded	N24	0.1592	3.0068	0.1592	3.0068
NONBonded	OC	0.2342	2.7755	0.2342	2.7755
NONBonded	O1	0.2342	2.7755	0.2342	2.7755
NONBonded	O19	0.2342	2.7755	0.2342	2.7755

! =====

set echo on message on end