

Kernspinresonanzspektroskopie an Molekularen Maschinen mit Hilfe der Dynamischen Kernpolarisation

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

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

vorgelegt von
Sascha Lange
aus Berlin

Berlin, Februar 2013

Diese Arbeit wurde von Juni 2008 bis Februar 2013 am Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP) unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Hartmut Oschkinat angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Hartmut Oschkinat
Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP),
Berlin

2. Gutachter: Prof. Dr. Christian Freund
Institut für Chemie und Biochemie
der Freien Universität Berlin

Disputation am: 03.05.2013

Inhaltsverzeichnis

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VII
TABELLENVERZEICHNIS	IX
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	XI
1. EINFÜHRUNG	1
1.1. Quantenmechanische Grundlagen der NMR	2
1.2. Festkörper-NMR	6
1.2.1. Heteronukleare dipolare Kopplung	6
1.2.2. Homonukleare dipolare Kopplung	7
1.2.3. Anisotropie der chemischen Verschiebung	7
1.2.4. Drehung im „magischen Winkel“	8
1.2.5. Kreuzpolarisation	9
1.2.6. 2D Korrelations-Experimente	10
1.2.7. Protonen-getriebene Spin-Diffusion	11
1.2.8. Wiedereinführung dipolarer Kopplungen	11
1.2.9. Zyklische Variation der RF-Puls-Phase	13
1.3. Grundlagen der Dynamischen Kernpolarisation	13
1.3.1. Polarisations-transfer-Mechanismen in der DNP	14
1.3.2. Verteilung der Kernpolarisation durch Spin-Diffusion	17
1.4. Notwendige Voraussetzungen für DNP Experimente in der Festkörper-NMR	18
1.4.1. Paramagnetische Zentren	18
1.4.2. Tieftemperaturen	19
1.5. Arretierte Komplexe aus Ribosomen und naszierenden Polypeptidketten	20

1.5.1.	Mechanismus der Translation	20
1.5.2.	Der ribosomale-Exit-Tunnel	21
1.5.3.	Faltungszustände naszierender Ketten innerhalb des Tunnels	23
1.5.4.	Einfluss der naszierenden Kette auf die Translation	24
1.5.5.	Die SecM Sequenz	26
1.6.	Fragestellung der Arbeit	28
2.	MATERIALIEN UND METHODEN	31
2.1.	Expression von SH3	31
2.2.	Herstellung von TOTAPOL	31
2.3.	Prolin-Lösungen	31
2.4.	Herstellung von Komplexen aus Neurotoxin II und Acetylcholin-Rezeptoren	32
2.5.	Herstellung von Komplexen aus naszierenden Ketten und Ribosomen (RNCs)	33
2.5.1.	Expression der RNCs	33
2.5.2.	Aufreinigung der RNCs	36
2.5.3.	Konzentrations- und Qualitätsbestimmung der RNCs	37
2.6.	Rotorfüllung	39
2.7.	Durchführung der DNP-NMR-Spektrometrie	40
2.7.1.	Aufbau des Spektrometers	40
2.7.2.	Messung von Relaxationszeiten	40
2.7.3.	Unterdrückung von Hintergrundsignalen durch POST-C7	42
2.7.4.	Auslöschen schmaler Frequenzbereiche	43
3.	ERGEBNISSE UND DISKUSSIONEN	45
3.1.	Der Einfluss des Biradikals TOTAPOL auf die Spektrale Qualität	45
3.1.1.	Fragestellung	45
3.1.2.	Ergebnisse	45
3.1.3.	Diskussion	53

3.2.	Einfluss tiefer Temperaturen auf die spektrale Qualität	53
3.2.1.	Fragestellung	53
3.2.2.	Ergebnisse	54
3.2.3.	Diskussion	69
3.3.	Messungen an naszierenden Peptidketten innerhalb des ribosomalen Tunnels	70
3.3.1.	Fragestellung	70
3.3.2.	Ergebnisse	73
3.3.3.	Diskussion	94
4.	SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSBLICK	97
5.	LITERATURVERZEICHNIS	105
	ZUSAMMENFASSUNG	115
	SUMMARY	117
	PUBLIKATIONEN	119
	LEBENS LAUF	121
	DANKSAGUNG	123
	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	125

Abbildungsverzeichnis

1-1:	Energiedifferenz zwischen zwei Zeeman-Level.....	3
1-2:	Mechanismus des Festkörper-Effektes.....	15
1-3:	Mechanismus des Kreuz-Effektes.....	16
1-4:	Schematische Darstellung der großen Untereinheit eines bakteriellen Ribosoms.....	22
1-5:	Regulationsmechanismus der Sekretionsaktivität durch SecM und SecA.....	27
2-1:	Schematische Darstellung der exprimierten naszierenden Ketten.....	33
2-2:	Expressionsschema der RNC-Komplexe.....	34
2-3:	Pulsschema der T_1 - und T_2 -Messungen.....	42
2-4:	Pulsschema der Doppel-Quanten gefilterten 2D ^{13}C - ^{13}C Experimente.....	43
2-5:	Pulsschema für 1D-Auslösch Experimente.....	44
3-1:	1D ^1H - ^{13}C CP Spektren von uniform ^{13}C , ^{15}N -markiertem Prolin mit variierender TOTAPOL Konzentration.....	46
3-2:	Abhängigkeit wichtiger NMR-Parameter von der TOTAPOL-Konzentration.....	48
3-3:	Abhängigkeit der CP-Effizienz von der TOTAPOL-Konzentration.....	49
3-4:	Modell der Signalunterdrückung durch TOTAPOL.....	52
3-5:	1D ^{13}C CP Spektren von SH3 bei unterschiedlichen Temperaturen.....	55
3-6:	2D ^{13}C - ^{13}C PDSO Spektren von SH3 bei unterschiedlichen Temperaturen.....	57
3-7:	Detailansicht der Seitenketten-Regionen von Thr, Pro und Ala.....	59
3-8:	Detailansicht der Kreuz- und Autokorrelations-Signale von Iso.....	60
3-9:	2D ^{13}C - ^{13}C PDSO Spektren der aromatischen Region bei unterschiedlichen Temperaturen.....	60
3-10:	Spektren der Signal-Auslöschungs Experimente.....	62
3-11:	2D ^{13}C - ^{13}C PDSO Spektrum von deuteriertem SH3 bei 95K.....	63
3-12:	Kristallstruktur von SH3.....	65
3-13:	2D ^{13}C - ^{13}C PDSO Spektren von Neurotoxin.....	67
3-14:	2D ^{13}C - ^{13}C PDSO und POST-C7 Spektren von DsbA-SecM innerhalb des Ribosoms.....	76
3-15:	2D ^{13}C - ^{13}C POST-C7 Spektren von DsbA-SecM (S16/18A-Mutante, und	

	S22/28A-Mutante) innerhalb des Ribosoms.....	79
3-16:	2D ^{13}C - ^{13}C POST-C7 Spektren von DsbA-SecM (S16/18A-Mutante, und S22/28A-Mutante) und statistische Verteilung der zu erwartenden Kreuzsignale.....	82
3-17:	2D ^{13}C - ^{13}C POST-C7 Spektren von DsbA-SecM (S16/18A-Mutante, und S22/28A-Mutante) und Bereiche hoher Wahrscheinlichkeit der Helix-Bildung.....	85
3-18:	2D ^{13}C - ^{13}C POST-C7 Spektren von DsbA-SecM (S16/18A-Mutante), gemessen bei 400 MHz und 600 MHz.....	87
3-19:	2D ^{13}C - ^{13}C POST-C7 Spektren von DsbA-SecM (S16/18A-Mutante, gemessen bei 600 MHz) und statistische Verteilung der zu erwartenden Kreuzsignale....	88
3-20:	2D ^{13}C - ^{13}C POST-C7 Spektren von DsbA-SecM (S16/18A-Mutante, gemessen bei 600 MHz) und Bereiche hoher Wahrscheinlichkeit der Helix-Bildung.....	89
3-21:	2D und 1D ^{13}C - ^{13}C POST-C7 Spektren von DsbA-SecM (S16/18A-Mutante, S22/28A-Mutante) innerhalb des Ribosoms und der Säulendurchflüsse.....	92

Tabellenverzeichnis

1-1:	Biologisch relevante Atomkerne mit ihren Kernspinquantenzahlen, ihren gyromagnetischen Verhältnissen und deren natürliche Häufigkeiten	2
2-1:	TOTAPOL-Konzentrationen der verwendeten Prolin-Lösungen	32
2-2:	Übersicht über die analysierten Peptidsequenzen	34
2-3:	Zusammensetzung des M9-Minimalmediums	35
2-4:	Zusammensetzung der M9-Salze (10-fach konzentriert)	35
2-5:	Zusammensetzung des RNC(-) –Puffers	37
2-6:	Zusammensetzung des RNC(+) –Puffers	37
2-7:	Zusammensetzung des Saccharose –Kissens	37
2-8:	Zusammensetzung des verwendeten SDS-PAGE Gels	38
2-9:	Zusammensetzung des SDS-PAGE Lauf-Puffers	38
2-10:	Zusammensetzung des Schafer-Nielsen Transfer-Puffers	38
3-1:	Mittlere chemische Verschiebungen der Kohlenstoffatome der RNA-Ribose und deren Standardabweichungen	77
3-2:	Zuverlässigkeit der Unterscheidung einer Helix von einer random coil-Konformation entsprechend der Sekundären Chemischen Verschiebung	80
3-3:	Chemischen Verschiebungen für ausgewählte Aminosäuren, in Abhängigkeit von Ihrem Auftreten in Sekundärstrukturen	81

Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat
BTnE	Bis-TEMPO-Poly-Ethylenglykol
CE	Kreuz-Effekt (cross effect)
CP	Kreupolarisation (cross polarization)
c_T	TOTAPOL-Konzentration
DNP	Dynamische Kernpolarisation (dynamic nuclear polarization)
DQC	Doppel-Quanten-Kohärenz (double quantum coherence)
DQF	Doppel-Quanten-Filter
DsbA	Disulfidbrücken-Oxidoreduktase A
ε	DNP-Signalverstärkung
EDS	Elektron-Dipolar-System
EM	Elektronen-Mikroskopie
EPR	(bzw. ESR) Elektronen-Spin-Resonanz (electron paramagnetic resonance)
EZS	Elektron-Zeeman-System
FID	Free Induction Decay
FRET	Förster-Resonanz-Energie-Transfer
FT	Fourier-Transformation
GTP	Guanosintriphosphat
HPLC	Hochleistungs-Flüssig-Chromatographie (high performance liquid chromatography)
κ	Sensitivität
LC-MAS	Flüssig-Chromatographie-Massenspektrometrie (liquid chromatography mass spectrometry)
MAS	magic angle spinning (Drehung im Magischen Winkel)
mRNA	“Boten”-RNA (messenger RNA)
MW	Mikrowelle
nAChR	nikotinerger Acetylcholin-Rezeptor
NMR	Kern-Magnet-Resonanz (nuclear magnetic resonance)
NTII	Neurotoxin II
NZS	Nuklear-Zeeman-System

PDS	Protonen-getriebene Spin-Diffusion (proton driven spin diffusion)
PE	paramagnetische Effekte
POST-C7	permutationally offset stabilized C7
PRE	paramagnetische Relaxationsverstärkung (paramagnetic relaxation enhancement)
PTC	Peptidyl-Transferase-Zentrum (peptidyl transferase center)
RF	Radio-Frequenz
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RNC	Komplex aus stabil arretierten Ribosom und naszierender Kette (ribosome bound nascent chain)
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur (295 K)
S/R	Signal-zu-Rausch-Verhältnis
SCS	sekundäre chemische Verschiebung (secondary chemical shift)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)
SE	Festkörper-Effekt (solid effect)
SecA	Sekretions-Aktivator (secretion activator)
SecM	Sekretions-Monitor (secretion monitor)
SH3	Src-homology 3 (abgeleitet von der Proteinkinase c-Src)
SQC	Einzel-Quanten-Kohärenz (single quantum coherence)
SRP	Signal-Erkennungs-Partikel (signal recognition particle)
SRT	Signal-zu-Rausch-Verhältnis pro Zeiteinheit
TD	Zeit-Domäne (time domain)
TEMPO	2,2,6,6-tetramethylpiperidinyl-1-oxyl
TF	Trigger-Faktor
TM	Thermische-Mischung (thermal mixing)
TOTAPOL	1-(TEMPO-4-oxy)-3-(TEMPO-4-amino)-propan-2-ol
tRNA	Transport-RNA
WT	Wild-Typ
ZQC	Null-Quanten-Kohärenz (zero quantum coherence)

1. Einführung

Die Funktion von Proteinen wird maßgeblich durch deren molekulare Struktur definiert. Ziel der Strukturbiologie ist es, durch Methoden der Biophysik, Biochemie, Bioinformatik und Molekularbiologie die Struktur von Proteinen und anderen biologischen Makromolekülen aufzuklären. Diese Strukturen bilden die Grundlage eines detaillierten Verständnisses der Funktion einzelner Proteine im Kontext zellulärer Prozesse. In der modernen pharmakologischen Grundlagenforschung fungiert die Strukturbiologie als Basis rationaler Wirkstoffsuche. Von den derzeit 79180 (Stand 08.02.2012) in der Protein Data Bank (PDB, <http://www.rcsb.org>) registrierten Proteinstrukturen wurden 69294 Strukturen durch Kristallstrukturanalyse und 9226 Strukturen durch Lösungs-NMR bestimmt. Deutlich unterrepräsentiert sind dabei jedoch Proteine welche schwer zu kristallisieren sind, sowie große Proteine und Proteinkomplexe. Die Lösungs-NMR setzt voraus, dass sich das zu untersuchende Protein in Lösung mit einer ausreichenden Rotationsgeschwindigkeit bewegt. Daher entziehen sich größere Proteine, bzw. Proteine, welche große heterogene Komplexe oder unlösliche Aggregate bilden, der Analyse durch Lösungs-NMR. Die Kristallstrukturanalyse setzt voraus, dass das Protein hoch-geordnete Kristalle bilden kann. Proteine, welche sowohl hydrophobe als auch hydrophile Seitenketten auf ihrer Oberfläche präsentieren, lassen sich jedoch nur schwer kristallisieren. Typische Beispiele hierfür sind Membranproteine, welche zwar etwa 30 % des gesamten menschlichen Genoms [1], jedoch lediglich 0,5 % der in der PDB hinterlegten Strukturen ausmachen.

Die Festkörper-NMR hingegen unterliegt nicht den oben genannten Beschränkungen. Da weder die Möglichkeit, geordnete dreidimensionale Kristalle zu bilden, noch eine hohe Beweglichkeit des Proteins in Lösung vorausgesetzt wird, können sowohl Membranproteine, als auch hoch-molekulare Aggregate untersucht werden. Hierbei muss jedoch eine deutliche Unterscheidung getroffen werden. Große Proteine oder ausgedehnte Protein-Komplexe können zwar prinzipiell mit der Festkörper-NMR untersucht werden, führen jedoch zu einer starken Signal-Überlagerung und erschweren so die Analyse der Daten. Heterogene Komplexe aus einer Vielzahl identischer kleinerer Untereinheiten (z.B. Fibrillen) können hingegen nahezu ohne Größenbegrenzung untersucht werden.

Daher stellt die Festkörper-NMR eine zu den beiden oben genannten Techniken und der Elektronenmikroskopie eine vierte, ergänzende Methode der Strukturbiologie dar.

In den vergangenen Jahren entwickelte sich die Festkörper-NMR zu einem unverzichtbaren Werkzeug der modernen Strukturbiologie. Dadurch konnten z.B. sowohl mikrokristalline Proben der SH3-Domäne [2], von GB1 [3] und des Ubiquitin [4], als auch nicht-kristalline Amyloid Protofilamente und Fibrillen sowie Membranproteine aufgeklärt werden [5-10].

1.1. Quantenmechanische Grundlagen der NMR

Im Folgenden soll eine kurze Einführung in die physikalischen Grundlagen der NMR sowie ein Überblick über grundlegende Besonderheiten der Festkörper-NMR gegeben werden. Eine ausführliche quantenmechanische Beschreibung der NMR liefert u.a. das Buch „Spin Dynamics“ von Malcom Levitt [11]. Ein detaillierter Überblick über die Besonderheiten der Festkörper-NMR wird z.B. in einem Übersichtsartikel von Laws et al. [12] gegeben.

Atomkerne mit einer Spinquantenzahl ungleich null weisen eine Eigenschaft auf, die als Kernspin bezeichnet wird. Tabelle 1 zeigt eine Auswahl der für die biologische NMR relevanten Kerne, einschließlich ihrer Spinquantenzahlen, ihrer gyromagnetischen Verhältnisse sowie ihrer natürlichen Häufigkeit wird in Tabelle 1 präsentiert.

Table 1-1: Übersicht über die in der biologischen NMR verwendeten Atomkerne mit ihren Kernspinquantenzahlen, ihren gyromagnetischen Verhältnissen und deren natürliche Häufigkeiten

Isotop	Kernspinquantenzahl I	$\gamma/2\pi$ [MHz/T]	Natürliche Häufigkeit [%]
^1H	$\frac{1}{2}$	42,576	99,98
^2H	1	6,539	0,02
^{12}C	0	nicht messbar	98,90
^{13}C	$\frac{1}{2}$	10,705	1,10
^{14}N	1	3,077	99,63
^{15}N	$\frac{1}{2}$	-4,316	0,37
^{16}O	0	nicht messbar	99,96
^{17}O	$\frac{5}{2}$	-5,772	99,96
e^-	$\frac{1}{2}$	28027,185	0,04

In erster Näherung führt ein Kernspin dazu, dass sich ein entsprechender Atomkern in einem externen magnetischen Feld B_0 wie ein kleiner Stabmagnet verhält. Spins mit der Spinquantenzahl $\frac{1}{2}$ können dabei zwei mögliche Eigenzustände einnehmen, welche als parallel (α) bzw. antiparallel (β) bezeichnet werden. Diese beiden Eigenzustände entsprechen dabei jeweils einem spezifischen Energieniveau (Zeeman-Level). Die Energiedifferenz zwischen diesen beiden Niveaus ist abhängig von B_0 (entsprechend Gleichung (1.1)) und wird als Kern-Zeeman-Aufspaltung bezeichnet.

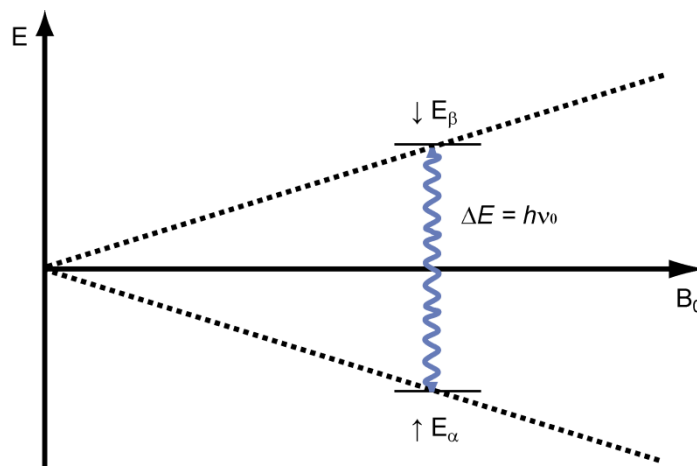


Abbildung 1-1: Energiedifferenz zwischen den Zeeman-Level eines Kerns mit der Spinquantenzahl $\frac{1}{2}$

$$\Delta E = \frac{\gamma h B_0}{2\pi} \quad (1.1)$$

Dabei bezeichnet γ das gyromagnetische Verhältnis, h das Plancksche Wirkungsquantum und B_0 die Feldstärke des externen Magnetfeldes. Abweichend von der Betrachtung eines Spins als Stabmagnet präzediert ein Spin mit einer charakteristischen Frequenz (Larmorfrequenz) um B_0 . Unter Verwendung der Bohr-Gleichung ($\Delta E = h\nu$) kann aus Gleichung (1.1) die Abhängigkeit der Larmorfrequenz ν_0 von B_0 und γ abgeleitet werden:

$$\nu_0 2\pi = \omega_0 = \gamma B_0 \quad (1.2)$$

Befindet sich in einem homogenen Magnetfeld B_0 ein Ensemble von Spins im thermodynamischen Gleichgewicht, so ist die Verteilung der einzelnen Spins auf die möglichen energetischen Zustände durch die Boltzmann-Verteilung gegeben:

$$\frac{N_\beta}{N_\alpha} = e^{\frac{-\Delta E}{kT}} = e^{\frac{-h\nu_0}{kT}} \quad (1.3)$$

N_α und N_β repräsentieren hier die jeweilige Population, d.h. die Anzahl der Spin im höheren bzw. niedrigeren Energieniveau, k die Boltzmann-Konstante und T die absolute Temperatur. Für eine vereinfachte Betrachtung denke man sich das B_0 -Feld entlang der Z-Achse im kartesischen Koordinatensystem. Aufgrund des Besetzungsunterschieds der Spins (parallel oder antiparallel) führt dieses Magnetfeld zu einer makroskopischen Netto-Magnetisierung M_0 parallel zum B_0 -Feld und damit zur Z-Achse. Diese longitudinale Magnetisierung der Kerne ist jedoch um etwa vier Größenordnungen kleiner als der Diamagnetismus der in der Probe vorliegenden Elektronen. Daher ist eine direkte Messung der longitudinalen Kernspin Magnetisierung technisch impraktikabel.

Wird orthogonal zu B_0 mit einer Radiowelle (RF-Puls) eingestrahlt, deren Frequenz nahe der Larmorfrequenz ist, so wird durch Resonanz des magnetischen Kernmoments mit dem oszillierenden magnetischen Feld des RF-Pulses das thermodynamische Gleichgewicht gestört und so die räumliche Orientierung der Magnetisierung verändert. Abhängig von der Dauer und der Amplitude der Radiowelle wird die makroskopische Z-Magnetisierung aus ihrem Gleichgewichtszustand um einen bestimmten Winkel in die orthogonale XY-Ebene ausgelenkt. Dadurch wird eine transversale Magnetisierung aufgebaut, deren Vektor mit der Kern-typischen Larmorfrequenz um B_0 präzediert. Nach Beendigung des RF-Pulses präzedieren die einzelnen Kernspins weiterhin mit ihrer Larmorfrequenz um die Z-Achse, relaxieren dabei jedoch zurück in ihre Gleichgewichtslage (Z-Magnetisierung). Zwei Arten der Relaxation können unterschieden werden: (i) Die longitudinale Relaxation (Spin-Gitter-Relaxation, Zeitkonstante T_1), d.h. eine Rückkehr zur Boltzmann-Verteilung entlang der Z-Achse unter Abgabe von Energie an die Umgebung (aus historischen Gründen als „Gitter“

bezeichnet) in Form von Vibrations- und Rotationsenergie. (ii) Die transversale Relaxation (Spin-Spin Relaxation, Zeitkonstante T_2) bezeichnet den Verlust der transversalen Kohärenz aufgrund zufälliger Variationen der Präzessionsfrequenzen der einzelnen Spins, welche durch Fluktuationen des jeweiligen lokalen magnetischen Feldes verursacht werden.

Befindet sich im rechten Winkel zum B_0 -Feld eine (Detektions-) Spule, so erzeugt die abklingende rotierende XY-Magnetisierung in dieser Spule wiederum einen Induktionsstrom. Dadurch entsteht ein abklingendes, zeitabhängiges Radiosignal, genannt FID („Free Induction Decay“). Durch Fourier-Transformation (FT) dieses FIDs wird dann das frequenzabhängige NMR-Spektrum gebildet. Grundlage der Interpretierbarkeit von NMR-Spektren sind Abweichungen der Resonanzfrequenzen von Atomkernen aufgrund ihrer chemischen Umgebung. Insbesondere der Einfluss von Elektronendichten um Atomkerne führt zu einer deutlichen Resonanzverschiebung (chemische Verschiebung), welche wiederum Informationen über die molekulare Struktur liefert.

Die Länge des FID begrenzt die theoretische Mindestbreite der so ermittelten Resonanzlinien ist im Wesentlichen von der Zeitkonstante T_2 abhängig. Die transversale Relaxation definiert daher die maximal zu erreichende Auflösung des Spektrums. Aus Formel (1.3) wird ersichtlich, dass bei Raumtemperatur in einem Magnetfeld von 20 T und damit einer Protonen-Larmorfrequenz von 800 MHz der Besatzungsunterschied etwa 0,01% beträgt, d.h. lediglich jedes zehntausendste Proton kann detektiert werden. Aufgrund dieser intrinsischen Insensitivität, werden im Allgemeinen Experimente in möglichst schneller Folge wiederholt und so das Signal-zu-Rausch-Verhältnis verbessert. Die minimale Zeit zwischen zwei Messungen wird dabei durch T_1 definiert. Die longitudinale Relaxation beeinflusst daher maßgeblich die Zeit welche benötigt wird, ein Spektrum geeigneter Signalintensität aufzuzeichnen.

Ein weiterer und für diese Arbeit besonders bedeutender Relaxationsmechanismus ist die Spin-Gitter-Relaxation im rotierenden Bezugssystem (Zeitkonstante $T_{1\rho}$). Diese findet während der Anwesenheit eines zusätzlichen zeitabhängigen Magnetfeldes (in Form eines RF-Pulses) statt, welches mit der Larmorfrequenz des entsprechenden Kernes senkrecht zum B_0 -Feld eingestrahlt wird. Der Prozess ähnelt dabei der T_1 -Relaxation im reinen B_0 -Feld. Die Zeitkonstante $T_{1\rho}$ beschreibt dabei die Zeit, in der die Magnetisierung senkrecht

zum B_0 -Feld durch Einstrahlung eines geeigneten RF-Pulses festgehalten (spin locking) werden kann. Damit begrenzt $T_{1\rho}$ unter anderem die Zeit, welche für einen effektiven Magnetisierungsaustausch zwischen Heterokernen zur Verfügung steht (siehe Abschnitt 1.2.5)

1.2. Festkörper-NMR

Aufgrund der stark reduzierten molekularen Bewegung in Festkörpern beeinflussen anisotrope Interaktionen wie hetero- oder homonukleare Kopplungen sowie die Anisotropie der chemischen Verschiebung das NMR-Signal. Im Folgenden werden die in Festkörpern dominierenden Spin-Wechselwirkungen beschrieben.

1.2.1. Heteronukleare dipolare Kopplung

Die heteronukleare dipolare Kopplung bezeichnet die Wechselwirkung zwischen (Hetero-) Kernen mit stark unterschiedlichen magnetischen Momenten, insofern sich diese in räumlicher Nähe ($< 10 \text{ \AA}$) zueinander befinden. Betrachtet man die Wechselwirkung zwischen zwei Heterokernen I und S , so erzeugt das magnetische Kernmoment von I ein kleines Magnetfeld, welches das lokale effektive Magnetfeld um S verändert. In gleicher Weise beeinflusst das von S erzeugte Magnetfeld das effektive Magnetfeld um I . Insgesamt verändert sich so die Resonanzfrequenz sowohl von I als auch von S . Die Stärke dieser dipolaren Kopplung wird durch folgenden Hamilton-Operator beschrieben:

$$H_{IS} = -d(3\cos^2\theta - 1)I_z S_z \quad (1.4)$$

Die dipolare Kopplungskonstante d ist dabei sowohl vom Abstand r der beiden Kerne zueinander, als auch von deren gyromagnetischen Verhältnissen γ abhängig:

$$d = \left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right) \frac{\hbar\gamma_I\gamma_S}{r_{IS}^3} \quad (1.5)$$

Der Winkel θ in Formel (1.4) bezeichnet die Orientierung des Kern-Kern-Vektors relativ zum äußeren magnetischen Feld. Die Stärke der dipolaren Kopplung hängt daher von der Orientierung der beiden Kerne ab.

1.2.2. Homonukleare dipolare Kopplung

Im Gegensatz zu heteronuklearen Kernen weisen homonukleare Kerne nur geringe Unterschiede in ihrer jeweiligen Resonanzfrequenz auf. Dadurch ist eine energieneutrale Wechselwirkung zwischen zwei benachbarten Spins (I_1 und I_2) möglich, infolgedessen ein „Flip-Flop“-Übergang stattfindet. Die Stärke der homonuklearen Kopplung wird durch folgenden Hamilton-Operator beschrieben.

$$H_{II} = -d \frac{1}{2} (3 \cos^2 \theta - 1) \left[2 I_{1z} I_{2z} - \frac{1}{2} (I_1^+ I_2^- + I_1^- I_2^+) \right] \quad (1.6)$$

Aufgrund der hohen natürlichen Häufigkeit von ^1H -Kernen (99,98%) und ihres hohen gyromagnetischen Verhältnisses, bilden Protonen in biologischen Materialien häufig ausgedehnte und schwer zu entkoppelnde Netzwerke mit Kopplungskonstanten von über 100 kHz. Dadurch sind Resonanzen von ^1H -Kernen in der biologischen Festkörper-NMR nur schwer aufzulösen. Eine Möglichkeit zur Nutzung des Informationsgehaltes von Protonenresonanzen besteht in dem partiellen Austausch von Protonen gegen Deuteronen. Durch die Verdünnung der Protonen können so ^1H -Netzwerke aufgebrochen und damit effektiver entkoppelt werden.

1.2.3. Anisotropie der chemischen Verschiebung

Die den Atomkern umgebenden Elektronen induzieren im äußeren Magnetfeld ein zusätzliches lokales Magnetfeld B_{lok} . Die Resonanzfrequenz (siehe Gleichung (1.2)) des Kerns ist dementsprechend sowohl von B_0 als auch von B_{lok} abhängig (chemische Verschiebung, siehe Abschnitt 1.2.1.). Da in Molekülen die Elektronendichte um Atome selten sphärisch-symmetrisch vorliegt, ist auch dieser Einfluss orientierungsabhängig, also anisotrop. Der Hamilton-Operator der chemischen Verschiebung kann in einen isotropen und einem anisotropen Term geteilt werden:

$$H_{CS} = \gamma B_0 I_z \left[\delta_{iso} + \frac{1}{2} \delta_{aniso} (3 \cos^2 \theta - 1) \right] \quad (1.7)$$

Hierbei wird eine ellipsoide Verteilung der Elektronen entlang von Bindungsachsen und nichtbindenden p-Orbitalen angenommen. Bei einer kugelsymmetrischen Verteilung entfällt der richtungsabhängige anisotrope Anteil.

1.2.4. Drehung im „magischen Winkel“

Die beschriebenen anisotropen Interaktionen führen zu Verbreiterung der Resonanzlinien und zu einer allgemein höheren Komplexität der Spektren, wodurch eine Interpretation im Sinne der Strukturaufklärung erschwert wird. Aus den Gleichungen (1.4) und (1.6) folgt, dass bei einer Ausrichtung der Kern-Kern-Vektoren im Winkel $\theta = 54,74^\circ$ zu B_0 sowohl homonukleare als auch heteronukleare dipolare Kopplungen verschwinden. Wird die Probe entlang dieses Winkels ausgerichtet und um seine eigene Längsachse gedreht (magic angle spinning, MAS), so wird mit zunehmender Drehgeschwindigkeit die axialsymmetrische Anisotropie zeitlich ausgemittelt, wodurch dipolare Kopplungen zunehmend unterdrückt werden. Analog dazu hängt der anisotrope Term in Gleichung (1.7) von $\cos^2 \theta - 1$ ab. MAS führt daher auch zu einer Unterdrückung des anisotropen Teils der chemischen Verschiebung während der isotrope Teil weiterhin detektiert werden kann. Hierbei finden NMR-Rotoren Anwendung, welche einen Durchmesser von 0,75 mm bis 7 mm und damit ein Rotorvolumen von 290 nl bis 400 μ l haben. Der Durchmesser bestimmt dabei die (theoretische) Höchstgeschwindigkeit, mit der der Rotor gedreht werden kann: Mit zunehmendem Rotordurchmesser nähert sich bei gleicher Rotationsgeschwindigkeit (MAS-Frequenz) die Bahngeschwindigkeit eines Punktes auf der Rotor-Oberfläche der Schallmauer, wodurch unkontrollierbare Turbulenzen entstehen. Prinzipiell ist jedoch eine möglichst hohe Drehgeschwindigkeit erwünscht, wodurch Rotoren mit immer kleinerem Durchmesser Anwendung finden. Gleichzeitig wird dadurch jedoch auch das zur Verfügung stehende Probenvolumen begrenzt. Der Antrieb des Rotors erfolgt meist durch komprimierte Luft, welche als stark fokussierter Strom seitlich auf die Turbinen-förmige Kappe des Rotors geleitet wird.

Derzeit standardmäßig verwendete Rotoren haben einen Außendurchmesser von 3-4 mm und können mit einer MAS-Frequenz von bis zu 24 kHz gedreht werden. Dadurch ist es

möglich, dipolare Kopplungen von Kernen mit niedrigem gyromagnetischem Verhältnis γ sowie die Anisotropie der chemischen Verschiebung effektiv zu unterdrücken. Eine typische Kopplungskonstante für eine kovalente ^1H - ^{13}C -Bindung beträgt ~ 30 kHz, für homonukleare Kopplungen zwischen Protonen bis zu 100 kHz. Um dennoch die dipolare Interaktion solcher Spin-Paare zu unterdrücken, wird kontinuierlich mit einem RF-Puls auf die Proton-Larmorfrequenz eingestrahlt und so ein permanentes Wechseln des ^1H -Spins zwischen dem α - und β -Zustand erzwungen. Diese, als „continuous wave“-Entkopplung bekannte Methode bewirkt, dass die mittlere Orientierung der magnetischen Momente der Protonen, und damit ihrer dipolaren Kopplung zu anderen Kernen, gegen Null geht.

1.2.5. Kreuzpolarisation

Wie bereits beschrieben, führt die Festkörper-NMR von Protonen in vollständig protonierten Proteinen zu breiten und sich stark überlagernden Signalen (siehe Abschnitt 1.2.2). Eine direkte Messung von Protonenresonanzen ist daher im Sinne der Strukturaufklärung nur unter bestimmten Bedingungen (z.B. Deuterierung des Proteins und/oder sehr hohe MAS-Frequenzen) praktikabel. Jedoch kann die hohe Protonenpolarisation genutzt werden, um das Signal-zu-Rausch-Verhältnis der ^{13}C - bzw. ^{15}N -Kerne zu verbessern [13]. Bei dieser als Kreuzpolarisation (cross polarization, CP) bekannten Methode wird zunächst rechtwinklig zum B_0 -Feld mit einem RF-Puls geeigneter Länge und Frequenz (Proton-Larmorfrequenz) eingestrahlt. Die Protonenspins werden so um 90° aus ihrer Gleichgewichtslage, d.h. senkrecht zum B_0 -Feld, ausgelenkt ($\pi/2$ -Puls). Anschließend wird gleichzeitig mit zwei kontinuierlichen RF-Pulsen eingestrahlt. Im Falle einer Kreuzpolarisation von ^1H zu ^{13}C wird jeweils mit der Larmorfrequenz der Protonen und des Kohlenstoffs eingestrahlt, und so eine Rotationsbewegung der Spin-Vektoren um den Richtungs-Vektor des RF Pulses erzwungen. Die Rotationsfrequenz der Spin-Vektoren wird dabei durch die Amplitude der jeweiligen resonanten Radiowelle bestimmt. Bei gleicher Rotationsfrequenz von ^1H und ^{13}C wird ein energieneutraler dipolarer Kontakt hergestellt und ein Übergang der ^1H -Kernpolarisation auf ^{13}C -Kerne ermöglicht. Nach dem Hartmann-Hahn-Prinzip [14], ist dies der Fall, wenn die Differenz der Amplituden der beiden RF-Pulse gleich oder ein Vielfaches der MAS-Rotationsfrequenz ist.

Prinzipiell können 1D Experimente in zwei Abschnitte unterteilt werden: Während der *Präparation* wird eine transversale Magnetisierung der zu untersuchenden Kerne generiert (z.B. durch eine CP von Protonen auf Kohlenstoffe). Die abklingende transversale Magnetisierung wird anschließend als FID aufgezeichnet (*Detektion*) und durch Fourier-Transformation (FT) das NMR-Spektrum gebildet.

1.2.6. 2D Korrelations-Experimente

Bei der Analyse von Proteinen führt die enorme Anzahl an Kernen schnell zu einer Überlagerung von Signalen im 1D Spektrum. Anstelle von seitenkettenspezifischen Signalen können in 1D Spektren im Allgemeinen lediglich schlecht aufgelöste Signalbereiche (Carbonyl, Aromaten- und Aliphaten-Region) unterschieden werden. Für die Strukturanalyse ist jedoch eine Zuordnung von Signalen zu einzelnen Aminosäuren zwingend notwendig. Daher werden in der NMR häufig 2D Experimente durchgeführt. Zwischen den weiter oben erwähnten Phasen eines 1D Experiments, Präparation und Detektion, müssen dazu zusätzlich zwei Elemente eingeführt werden, welche als *Evolution* und Mischzeit (*Mixing*) bezeichnet werden. Damit ergibt sich folgendes allgemeines Schema der zwei-dimensionalen NMR-Spektroskopie: Präparation → Evolution → Mixing → Detektion.

Die Evolution wird auch als t_1 -Periode bezeichnet. Sie beinhaltet eine variable Zeit (variable time delay) welche im Laufe des 2D Experiments inkrementiert wird. Dabei wird der variable time delay ausgehend von einem Startwert bis zum Endwert sukzessive erhöht. Die Anzahl der Inkremente wird als „time domain points“ (TD-points) bezeichnet. Aufgrund der geringen Sensitivität der NMR werden die Experimente jedoch vielfach wiederholt und die einzelnen aufgezeichneten FIDs pro Inkrement gemittelt. 2D Experimente werden in der Regel zyklisch aufgezeichnet. Das bedeutet, es wird ausgehend vom kleinsten variable delay sämtliche Inkremente durchlaufen, jeweils ein FID aufgezeichnet und dieser Prozess n -fach wiederholt, wobei n die Anzahl der Messungen darstellt. Während der Evolutions-Periode interagieren ^{13}C -Spins unter dem Einfluss ihrer chemischen Verschiebung. Je nach Länge t_1 des aktuellen Inkrements, entwickeln sich dadurch Kohärenzen unterschiedlicher Frequenz. Ein anschließender $\pi/2$ -Puls speichert diese Informationen der chemischen Verschiebungen entlang der Z-Achse.

Für gewöhnlich wird während der gesamten Evolutions-Periode Protonen durch RF-Pulse entkoppelt.

Während der Mischzeit werden die, während der Evolution entstandenen, unterschiedlichen Kohärenzen gemischt, d. h. ein Magnetisierungsaustausch zwischen den einzelnen Kernen etabliert. Abhängig von der Art des Experiments werden dabei ein oder mehrere RF-Pulse auf die zu untersuchenden Kerne appliziert. Allgemein kann hier zwischen der *Protonen-getriebenen Spin-Diffusion* und einer *Wiedereinführung dipolarer Kopplungen durch RF-Pulse* unterschieden werden. Beide Methoden werden weiter unten in einem jeweils separaten Abschnitt behandelt.

Durch FT des aufgezeichneten FIDs in zwei Dimensionen wird ein 2D-Spektrum gebildet. Anhand dieses Spektrums können sowohl die chemischen Verschiebungen der Kerne (T_1 -Periode) ermittelt werden, als auch Magnetisierungs-Austauschprozesse zwischen den Kernen identifiziert werden, welche während der Mischzeit stattgefunden haben. Diese Austausch-Prozesse äußern sich durch das Auftreten von Kreuzsignalen, welche nicht auf der Diagonale des 2D-Spektrums lokalisiert sind. Die Koordinaten des Kreuzsignals sind dabei identisch mit den chemischen Verschiebungen der austauschenden Kerne.

1.2.7. Protonen-getriebene Spin-Diffusion

Ohne Protonen-Entkopplung führt die starke Kopplung der ^{13}C -Spins zum ^1H -Netzwerk während der Mixing-Periode zu einem Magnetisierungsaustausch zwischen den ^{13}C -Kernen. Dieser als Protonen-getriebene Spin-Diffusion‘ (proton-driven spin diffusion, PDSD) bezeichnete Prozess ermöglicht den Magnetisierungsaustausch zwischen Kernen mit niedrigem gyromagnetischen Verhältnis (z.B. ^{13}C) unter Ausnutzung des Protonennetzwerkes.

1.2.8. Wiedereinführung dipolarer Kopplungen

Durch die Wiedereinführung dipolarer Kopplungen können Korrelationen durch den Raum, d.h. unabhängig von kovalenten Bindungen detektiert werden. MAS reduziert nicht nur das Ausmaß der Linienverbreiterung durch anisotrope Spin-Wechselwirkungen

sondern unterdrückt zudem auch die für die Strukturbiologie nützlichen räumlichen Informationen bestimmter schwacher dipolarer Kopplungen. Durch Einstrahlen eines 180° -Pulses (π -Puls) nach jeder halben Rotorperiode kann erreicht werden, dass die zeitliche Ausmittelung dipolarer Kopplungen durch MAS ineffektiv wird. Für diese als „recoupling“ bekannte Technik stehen eine Vielzahl von Pulssequenzen zur Verfügung, sowohl für homonukleares recoupling (z.B. RFDR [15]) als auch für heteronukleares recoupling (z.B. REDOR [16]). Zudem kann durch eine geeignete Wahl der Rotationsfrequenz bestimmte heteronukleare Kopplungen wiederhergestellt werden, in dem diese auf ein ganzzahliges Vielfaches der Differenz der isotropen chemischen Verschiebung zweier Kerne eingestellt wird [17]

Bei der Wiedereinführung von homonuklearen dipolaren Kopplungen durch RF-Pulse wird die Spin-Komponente des Hamilton-Operators (Gleichung (1.6)) synchron zur Probenrotation manipuliert. Dies basiert häufig auf der Anregung von Doppel-Quanten Kohärenzen (Double Quantum Coherence, DQC) oder Null-Quanten Kohärenzen (Zero Quantum Coherence, ZQC) zwischen Spin- $1/2$ -Kernen. Die Auswahl dieser Kohärenzen erfolgt dabei durch eine geeignete Wahl des Phasen-Zyklus der RF-Pulse (siehe Abschnitt 1.2.9) [18, 19]. Das Ergebnis dieser Kohärenz-Selektion ist eine Signalfilterung, bei der die Intensität der verbleibenden Signale eine Funktion der Anregungszeit der DQC ist. Die gemessenen Intensitäten können daher zur Berechnung von Kopplungskonstanten dipolarer Kopplungen genutzt werden kann. Eine weitere wichtige Anwendung der Wiedereinkopplung ist die Doppel-Quanten-Filtration, mit der Signale von Molekülen mit mindestens zwei benachbarten ^{13}C Atomen gegen das Signal natürlich vorkommender, isolierter ^{13}C -Isotope gefiltert werden können [20]. Diese Methode findet insbesondere bei der Analyse von Proteinen in ihrer nativen Umgebung (z.B. Membranrezeptoren in nativen Membranen, Liganden gebunden an Rezeptoren) Anwendung. In der vorliegenden Arbeit werden Doppel-Quanten-Filter (DQF) genutzt, um das Signal einer uniform ^{13}C -markierten naszierenden Kette innerhalb eines unmarkierten Ribosoms zu detektieren.

1.2.9. Zyklische Variation der RF-Puls-Phase

In der Festkörper-NMR wird die inhärente niedrige Sensitivität durch vielfache Wiederholung der Messung und der anschließenden Mittelung der aufgezeichneten Daten überwunden. Durch eine zyklische Variation der Phasen der einzelnen RF-Pulse (phase cycling) von Messung zu Messung können messtechnisch bedingte Artefakte durch einen geeigneten Phasenzklus minimiert werden. Weiterhin werden Phasenzyklen genutzt, um bestimmte kohärente NMR-Signale zu selektieren und so eine Signalfilterung zu erreichen.

1.3. Grundlagen der Dynamischen Kernpolarisation

Die in Abschnitt 1.2.5 beschriebene Signalverstärkung durch Kreuzpolarisation hängt vom Quotienten der gyromagnetischen Verhältnisse der verwendeten Kerne ab. Im Jahre 1953 spekulierte Overhauser [21] über die theoretische Möglichkeit durch Sättigung der Elektronen-Spin-Resonanz die Polarisationsenergie von Elektronen auf Atomkerne zu übertragen. Die theoretische Verstärkung einer solchen dynamischen Kernpolarisation (dynamic nuclear polarization DNP) für einen e^- -zu- ^1H -Transfer wäre dementsprechend ~ 660 -fach. Im gleichem Jahr zeigten Carver et al. die praktische Durchführung an metallischem Lithium [22] und verifizierten 1956 ihre Ergebnisse [23].

Erst durch die Entwicklung leistungsfähiger Gyrotrone zur Erzeugung von Hochfrequenz-Mikrowellen konnte das Potential der DNP auch für hohe Magnetfeldstärken genutzt werden [24-26]. Dies ermöglichte die erfolgreiche Implementierung von DNP in Festkörper-NMR-Experimenten an biologisch relevanten Systemen. Besonders umfangreich wurden Präparationen des Membranproteins Bakteriorhodopsin untersucht [27-30]. Schmale Resonanzlinien, DNP-Verstärkungsfaktoren von 40-50 sowie die verwendeten Tieftemperaturen (~ 90 K) ermöglichten es, anhand von multidimensionalen DNP-NMR-Spektren mehrere Intermediate des Chromophor-Photozyklus zu identifizieren, welche bislang für NMR-Methoden unzugänglich waren. Weiterhin wurden Bakteriophagen [31, 32], Fragmente von Purpurchromophoren [31] und Protein-Fibrillen [33-35] untersucht.

Kürzlich veröffentlichte Studien an besonders komplexen Systemen wie z.B. ein ^{13}C -markiertes Signalpeptid, gebunden an einem unmarkierten Sec-Translokon welches in Lipid-Doppelschichten rekonstituiert wurde [36], oder Präparationen kompletter *E. coli*-Zellen [37] und Membranfragmenten [38] zeigen die rasche Entwicklung dieser Methodik in den vergangenen Jahren.

1.3.1. Polarisationstransfer-Mechanismen in der DNP

Grundvoraussetzung der DNP ist das Vorhandensein freier Elektronen als paramagnetische Zentren. Aufgrund ihrer Löslichkeit und Stabilität in wässrigen Lösungen eignen sich besonders Nitroxid-Radikale [39] bzw. Nitroxid-Biradikale [40, 41] in biologischen Anwendungen der DNP. Derzeit stellt TOTAPOL (siehe Abschnitt 1.4.1) [42] das am häufigsten verwendete Biradikal dar. Um die Polarisierung der Elektronenspins auf Atomkerne zu übertragen, wird mit einer Mikrowelle nahe der Elektron-Larmorfrequenz eingestrahlt [43]. Für einen effektiven Polarisationstransfer muss die Relaxation der Elektronen verlangsamt werden. Dazu wird die Probe annähernd auf die Temperatur von flüssigem Stickstoff ($\sim 90\text{ K}$) gekühlt. In den meisten Fällen wird Glycerol in einer Gesamtkonzentration von 60 % zugegeben um die Bildung von Eiskristallen zu verhindern, eine homogene Verteilung des Biradikals zu gewährleisten und um eine Glas-Matrix zu bilden welche den DNP-Effekt verstärkt [35].

DNP führt zunächst zu einer räumlich begrenzten Erhöhung der Kernpolarisation um die paramagnetischen Zentren. Durch ^1H -Spin-Diffusion kann diese über eine Distanz von $\sim 1\ \mu\text{m}$ transportiert werden [35]. Da bei tiefen Temperaturen die Beweglichkeit der Lösungsmittel-Moleküle eingeschränkt ist, wird die dipolare Kopplung des Protonennetzwerkes verstärkt und so die Ausbreitung der Polarisierung beschleunigt [44].

In der Festkörper-NMR sind drei DNP Mechanismen beschrieben. Welcher Mechanismus dominiert, hängt von der Linienbreite des EPR Spektrums des verwendeten Radikals ab und unterscheidet sich in der Anzahl der involvierten Elektronen [28].

Der Festkörper-Effekt (solid effect)

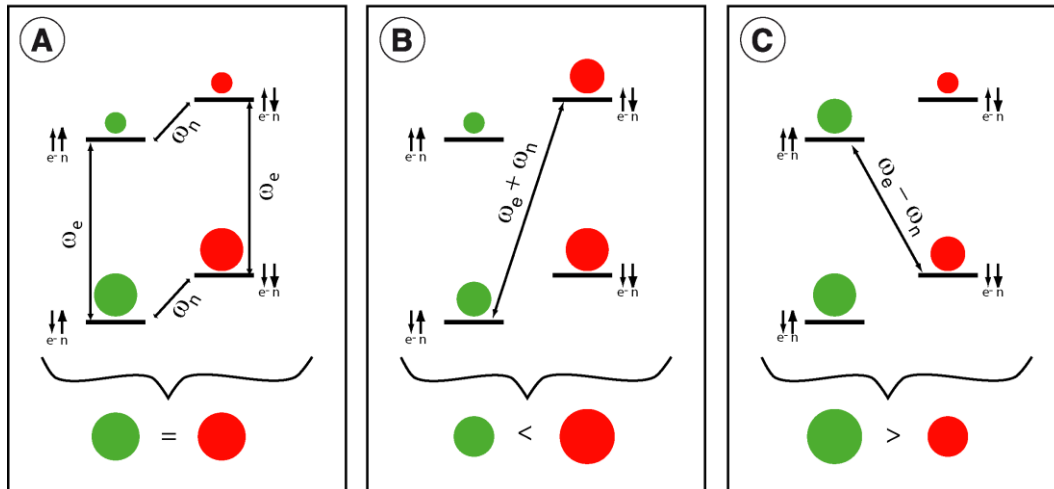


Abbildung 1-2: Mechanismus des Festkörper-Effektes, abgebildet sind Energie-Level und deren Population eines System aus einem Elektron (e^-) und einem dipolar gekoppelten Kern (n), die Populationen der Eigenzustände des Kerns sind durch grüne (α bzw. \uparrow) oder rote (β bzw. \downarrow) Kreise repräsentiert; **A.** im thermischen Gleichgewicht, **B.** Sättigung der verbotenen Nullquanten-Übergänge durch Mikrowellenbestrahlung mit $\omega_{MW} = \omega_e + \omega_n$ führt zu einer negativen Polarisationsverstärkung; **C.** Sättigung der verbotenen Doppelquanten-Übergänge durch Mikrowellenbestrahlung mit $\omega_{MW} = \omega_e - \omega_n$ führt zu einer positiven Polarisationsverstärkung.

Der solid effect (SE) ist der dominierende Mechanismus, wenn sowohl die homogene Linienbreite δ als auch die inhomogene Linienbreite Δ des EPR-Spektrums (EPR = electron paramagnetic resonance) des Radikals viel kleiner als die Larmorfrequenz ω des zu polarisierenden Kerns ist [45]. Grundlage dieses Effektes ist der Polarisationstransfer zwischen einem einzelnen Elektron und einem dipolar gekoppelten Kernspin (Abbildung 1-2A). Durch das Einstrahlen einer Mikrowelle geeigneter Frequenz können verbotene Nullquanten-Übergänge und Doppelquanten-Übergänge gesättigt werden: Ist die Frequenz der Mikrowelle gleich der Summe der Larmorfrequenzen von Elektron und Kern ($\omega_{MW} = \omega_e + \omega_n$), so tritt eine Sättigung der verbotenen Nullquanten-Übergänge und damit eine negative Polarisationsverstärkung des Kerns auf (Abbildung 1-2B). Entspricht sie der Differenz der Larmorfrequenzen ($\omega_{MW} = \omega_e - \omega_n$) werden hingegen verbotene Doppelquanten-Übergänge gesättigt, wodurch eine positive Verstärkung der Kernpolarisation auftritt (Abbildung 1-2C). Die Wahrscheinlichkeit des Polarisationstransfers ist dabei proportional zu B_0^{-2} , d.h. je stärker das verwendete B_0 -Feld, desto unwahrscheinlicher wird eine SE getriebene DNP [46].

Der Kreuz-Effekt (cross effect)

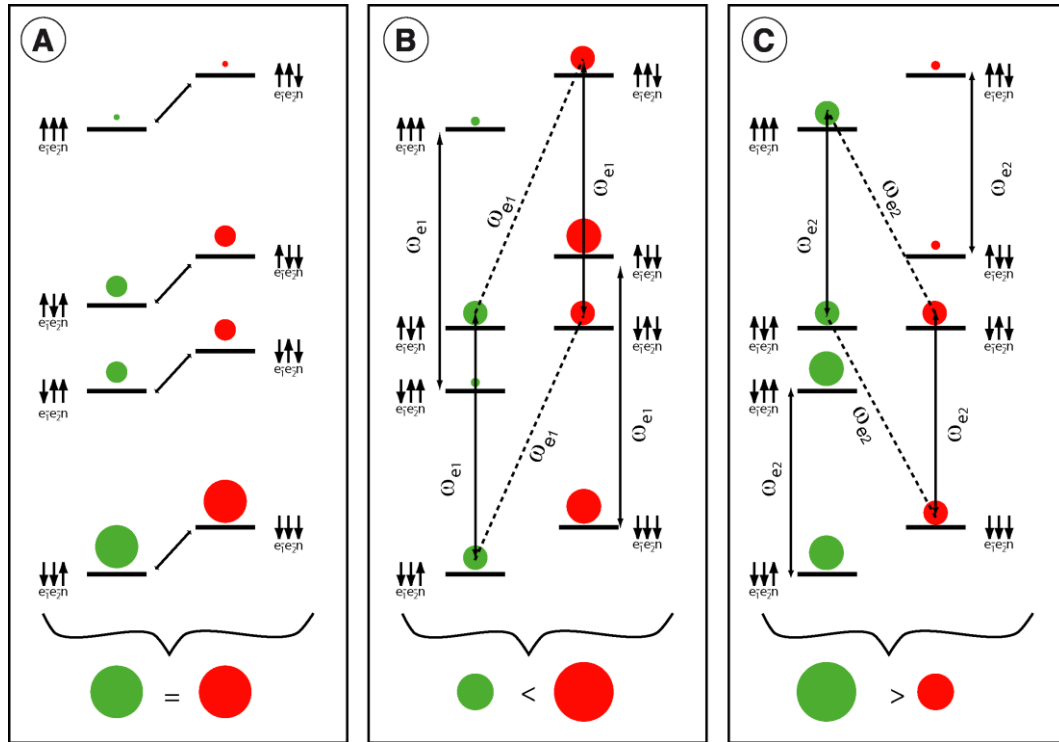


Abbildung 1-3: Mechanismus des Kreuz-Effektes, abgebildet sind Energie-Level und Population eines System aus zwei dipolar gekoppelten Elektronen (e_1 und e_2) und einem dipolar gekoppelten Kern (n), die Populationen der Eigenzustände des Kerns sind durch grüne (α bzw. \uparrow) oder rote (β bzw. \downarrow) Kreise repräsentiert; **A:** im thermischen Gleichgewicht, **B:** Sättigung der erlaubten EPR-Übergänge des ersten Elektrons durch Mikrowellenbestrahlung mit $\omega_{MW} = \omega_{e1}$ führt zu einer negativen Polarisationsverstärkung; **C:** Sättigung der erlaubten EPR-Übergänge des zweiten Elektrons durch Mikrowellenbestrahlung mit $\omega_{MW} = \omega_{e2}$ führt zu einer positiven Polarisationsverstärkung;

Zeigt das Radikal ein inhomogen verbreitertes EPR-Spektrum dessen Linienbreite Δ größer als die Larmorfrequenz des zu polarisierenden Kerns ω_{0I} ist, so ist der dominierende DNP Mechanismus des Kreuz-Effektes (cross effect, CE) [45]. Der CE beschreibt einen Polarisationstransfer zwischen zwei dipolar gekoppelten Elektronen und einem Kernspin (Abbildung 1-3). Voraussetzung ist, dass die Differenz der Elektron-Larmorfrequenzen der Kern-Larmorfrequenz entspricht ($\omega_{e1} - \omega_{e2} = \omega_n$). Dadurch sind die Zustände $e_1e_2n = \alpha\beta\alpha$ und $e_1e_2n = \beta\alpha\beta$ degeneriert, d.h. energetisch gleichwertig (Abbildung 1-3 A und B). Weiterhin muss die homogene Linienbreite des EPR-Spektrums kleiner als die Kern-Larmorfrequenz ($\delta < \omega_n$) ist. Eine

Mikrowellenbestrahlung mit $\omega_{\text{MW}} = \omega_{e1}$ sättigt die EPR-Übergänge des ersten Elektrons und induziert eine Spin-Umkehrung des zweiten Elektronenspins und des Kernspins. Dadurch wird eine negative DNP-Verstärkung erzielt. Durch Mikrowellen-Bestrahlung mit der Frequenz ω_{e2} wird eine simultane Spin-Umkehrung (spin-flip) des ersten Elektronenspins und des Kernspins induziert und so eine positive DNP-Verstärkung erzielt (Abbildung 1-3C). Die Effektivität dieses Mechanismus skaliert mit B_0^{-1} [47] und ist dementsprechend auch bei hohen Magnetfeldstärken aktiv und wird daher in der biologischen Festkörper-NMR am häufigsten verwendet. Durch den Einsatz geeigneter Biradikale (siehe Abschnitt 1.4.1.) kann dieser Mechanismus gezielt ausgenutzt werden.

Die thermische Mischung (thermal mixing)

Bilden mehrere dipolar gekoppelte Elektronen ein homogen verbreitertes EPR Spektrum ($\delta > \omega_h$) so erfolgt der Polarisationstransfer über den Mechanismus der thermischen Mischung (TM). Der TM-Mechanismus wird durch einen Formalismus beschrieben, in der die Elektronenpolarisation (Elektron-Zeeman-System, EZS) die Kernpolarisation (Nuklear-Zeeman-System, NZS) und das System der gekoppelten Elektronen (Elektron-Dipolar-System, EDS) als interagierende thermische Bäder beschrieben wird [43]. Diesem Konzept folgend, wird zunächst durch Mikrowellenbestrahlung außerhalb der EPR Frequenz das EDS im Kontakt zum EZS gebracht und dadurch „abgekühlt“. Da das EDS und das NZS im thermischen Kontakt stehen, wird durch einen drei-Spin (Elektron-Elektron-Kern) Austausch-Prozess auch das NZS „abgekühlt“, d.h. die Polarisation der Kerne erhöht. Aufgrund der benötigten hohen Konzentration an paramagnetischen Zentren und dem damit einhergehenden Verlust spektraler Auflösung (siehe Abschnitt 1.4.1 und 3.1) ist dieser Mechanismus viele Anwendungen ungeeignet.

1.3.2. Verteilung der Kernpolarisation durch Spin-Diffusion

Die in der biologischen DNP-MAS-NMR-Spektroskopie verwendeten Nitroxidradikale verstärken signifikant die T_2 -Relaxation und führen dadurch zu einer Linienverbreiterung benachbarter Kerne [48]. Dieser Effekt ist proportional zu r^{-6} , wobei r als Elektronen-Kern Abstand definiert ist, und kann zu einer vollständigen Signalunterdrückung für Kerne mit $r < 10 \text{ \AA}$ führen [49]. Um den Verlust spektraler Auflösung sowie detektierbarer Kerne zu minimieren, werden relativ niedrige Radikalkonzentrationen

(~ 20 mM im Falle von Biradikalen) verwendet. DNP führt so zu einer räumlich begrenzten Erhöhung der Kernpolarisation um die verdünnten paramagnetischen Zentren. Der Hauptteil der detektierten Kernpolarisation resultiert jedoch aus einem zusätzlichen Spin-Diffusionsprozess zu den entfernten Kernen [50]. In biologischen Proben beträgt die Protonenkonzentration ~ 100 M und bildet, wie in Abschnitt 1.2.2 beschrieben, ein starkes, dipolar gekoppeltes Netzwerk. Dieses wird für den benötigten Spin-Diffusionsprozess genutzt und so eine homogene Verteilung der Polarisationsverstärkung über die gesamte Probe innerhalb von Mikrosekunden erreicht [27]. Die in der DNP-MAS-NMR verwendeten Tieftemperaturen (< 100 K) verlängern sowohl die Elektronenrelaxation, wodurch der DNP Effekt ermöglicht wird, als auch die T_1 -Relaxation der Protonen. Dadurch wird eine Weiterleitung der Polarisierung über längere Distanzen begünstigt. Es konnte gezeigt werden, dass die ^1H -Polarisation in Peptid-Nanokristallen mit einer Dicke von ~ 100 bis 200 nm vollständig durch DNP verstärkt werden kann [35].

1.4. Notwendige Voraussetzungen für DNP Experimente in der Festkörper-NMR

1.4.1. Paramagnetische Zentren

Das Nitroxidradikal 2,2,6,6-tetramethylpiperidinyl-1-oxyl (TEMPO) ist eine, in wässrigen Lösungen gut lösliche, stabile paramagnetische Substanz welche in der EPR-Spektroskopie weit verbreitet ist. In TEMPO-Lösungen mit einer Konzentration von 10 mM beträgt die durchschnittliche dipolare Kopplung zwischen zwei paramagnetischen Zentren etwa 0,3 MHz. Bei hohen Konzentrationen begünstigt TEMPO den Polarisierungstransfer von Elektronen zu Kernen durch den TM-Mechanismus. Dies führt jedoch durch die Verstärkung der paramagnetischen Relaxation (siehe Abschnitt 3.1) zu einem Verlust spektraler Auflösung bzw. zur Reduktion detektierbarer Kerne. DNP-Experimente, bei denen der Polarisierungstransfer durch den CE-Effekt getrieben wird zeigen bei hohen Magnetfeldstärken die größten Signalverstärkungen. Um diesen 3-Spin-Prozess zu begünstigen (siehe Abschnitt 1.3.1) wurden Biradikale mit starker dipolarer Kopplung zwischen den ungepaarten Elektronen entwickelt. Die Biradikale der Form BT_nE werden z.B. durch die Verknüpfung zweier TEMPO-Moleküle über eine Polyethylenglykol-Kette gebildet, wobei n die Anzahl der Ethylen-Glykol-Einheiten bezeichnet. Aufgrund der chemischen Kopplung der TEMPO-Moleküle kann, in

Abhängigkeit von der Kettenlänge n , eine dipolare Kopplung der Elektronen von bis zu 30 MHz erreicht werden. Mit diesen Biradikale können daher im Vergleich zum monomeren TEMPO vierfach höhere Verstärkungen erzielt werden [28]. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Verstärkung mit abnehmender Kettenlänge n und damit einhergehend stärkerer dipolarer Kopplung der Elektronen zunimmt.[41]. Wesentlicher Nachteil von BT n E ist ihre schlechte Löslichkeit in Glycerol-Wasser-Gemischen welche in der biologischen Anwendung von DNP verwendet werden. Daher wurde ein weiteres, hydrophiles Biradikal entwickelt: 1-(TEMPO-4-oxy)-3-(TEMPO-4-amino) propan-2-ol (TOTAPOL) [42]. In diesem Biradikal sind zwei TEMPO-Moleküle über eine aus drei Kohlenstoff-Atomen, einem sekundären Amin sowie einer Hydroxylgruppe bestehenden Brücke verbunden. Aufgrund des kürzeren Elektron-Elektron-Abstandes, einer längeren Elektronen-Relaxationszeit sowie einer eingeschränkten Anzahl möglicher Orientierungen der beiden TEMPO-Gruppen zueinander, sind im Vergleich zu BT2E mit TOTAPOL größere Polarisationsverstärkungen zu erreichen [28]

1.4.2. Tieftemperaturen

Für einen effektiven Polarisationstransfer von Elektronen zu benachbarten Kernen, muss die Elektronenrelaxation verlangsamt werden. Dies wird durch ein Abkühlen der Probe auf eine Temperatur, annähernd der Siedetemperatur von Stickstoff erreicht. Dies kann jedoch dazu führen, dass verschiedene Konformationen des Analyten eingefroren werden, woraus eine signifikante inhomogene Linienverbreiterung des NMR-Signals resultiert. Entsprechend der Boltzmann-Gleichung (Gleichung (1.3)) wird der energetisch niedrigere Spin-Zustand stärker besetzt und damit die Netzmagnetisierung im Gleichgewicht durch tiefe Temperaturen erhöht. Dies führt zu einer zusätzlichen (Boltzmann-) Signalverstärkung. Weiterhin wird das thermische Rauschen der Probenkopf-Elektronen reduziert und aufgrund der permanenten Kühlung der Proben stärkere RF-Pulse, z.B für Entkopplungs-Sequenzen, ermöglicht. Neben dieser großen Bedeutung der Tieftemperaturen für die DNP-NMR ermöglicht sie, kurzlebige Intermediate funktioneller Zustände von Proteinen zu untersuchen. Mit Hilfe der konventionellen Festkörper-NMR wurde so z.B. Metall-Zentren [51] oder funktionelle Intermediate von Membranproteinen [52] untersucht.

Nichtsdestotrotz ist bislang wenig über die dynamischen Prozesse in Proteinen bei tiefen Temperaturen oder während des Prozesses des Einfrierens bekannt.

1.5. Arretierte Komplexe aus Ribosomen und naszierenden Polypeptidketten

Ribosomen sind die universellen molekularen Maschinen zur Synthese von Proteinen in allen lebenden Zellen, und damit zur Verwirklichung der genetischen Information. Sie bestehen aus zwei ungleichen Ribonukleoprotein-Untereinheiten welche zusammengenommen ein Molekulargewicht von ca. 2.5 MDa aufweisen. Erste elektronen-mikroskopische Aufnahmen dieser hoch komplexen Gebilde gelangen bereits im Jahre 1955 durch George Palade [53]. Die strukturelle Analyse von Ribosomen wurde maßgeblich durch die enormen Fortschritte in biochemischen und gentechnischen Methoden sowie der biologischen Kristallographie ermöglicht. Prokaryotische Ribosomen bestehen zu zwei Dritteln aus ribosomaler Ribonukleinsäuren (rRNA) und einem Drittel aus ribosomalen Proteinen. Die kleinere Untereinheit prokaryotischer Ribosomen besteht aus einem einzelnen Ribonukleinsäure-Strang (RNA-Strang) sowie 21 Proteinen und sedimentiert bei 30 Svedberg-Einheiten, sie wird daher als 30S Untereinheit bezeichnet. Sie ist verantwortlich für die korrekte Basenpaarung zwischen den Antikodons der tRNA Moleküle und der Boten-RNA (messenger RNA, mRNA). Die größere Untereinheit besteht hingegen aus zwei rRNA Strängen sowie 34 Proteinen und sedimentiert bei 50 S und wird daher als 50S Untereinheit bezeichnet. Diese Untereinheit beinhaltet das Peptidyl-Transferase-Zentrum (peptidyl transferase center, PTC), welches die Bildung von Peptidbindungen katalysiert. Da die Mehrzahl der derzeit bekannten Antibiotika an unterschiedlichen Stellen des Ribosoms binden (z.B. PTC, A-Stelle, P-Stelle, Ausgangstunnel) und so die Proteinproduktion hemmen (eine Übersicht liefert der Artikel von Spahn und Prescott [54]) sind Ribosomen Gegenstand intensiver pharmakologischer Forschung.

1.5.1. Mechanismus der Translation

Das Ribosom besitzt drei tRNA Bindestellen, die Aminoacyl-, Peptidyl- und die Exit-Stelle (auch als A-, P- bzw. E-Stelle bezeichnet). Während der Kettenverlängerung

(Elongation) der naszierenden Kette wechselt das Ribosom zwischen zwei Zuständen, dem prä- und dem posttranslationalen Zustand. Im prätranslationalen Zustand ist ein tRNA Molekül an der A-Stelle gebunden, gemeinsam mit dem Elongationsfaktor EF-Tu und GTP. Bei korrekter Kodon-Antikodon Paarung wird diese Bindung stabilisiert und unter GTP-Hydrolyse schwingt das Aminoacyl-Ende der tRNA in das PTC, wo diese spontan mit der Peptidyl-tRNA (naszierende Kette) an der P-Stelle reagiert. Die nun um eine Aminosäure verlängerte naszierende Kette befindet sich an der A-Stelle, die deacylierte tRNA an der P-Stelle. Unter Mitwirkung des Elongationsfaktors G (EF-G) wechselt das Ribosom in den posttranslationalen Zustand, wobei die deacylierte tRNA zur E-Stelle und die Peptidyl-tRNA zur P-Stelle wandert und sich das Ribosom um drei Basen auf der mRNA weiterbewegt. Die A-Stelle ist dementsprechend frei für die Bindung des nächsten tRNA Moleküls und präsentiert das folgende Kodon für die Interaktion der entsprechenden tRNA. Eine detaillierte Übersicht über die Struktur von Ribosomen im Zusammenhang mit dem Mechanismus der Translation bieten die Übersichtsartikel von V. Ramakrishnan [55] und T.A. Steitz [56].

1.5.2. Der ribosomale-Exit-Tunnel

Die neu synthetisierte Peptidkette verlässt das Ribosom durch eine tunnelartige Struktur, die sich vom PTC in der großen Untereinheit bis zur Oberfläche des Ribosoms erstreckt. Diese als ribosomaler-Exit-Tunnel bezeichnete Struktur wurde erstmalig 1982 von Unwin et al. in EM Aufnahmen von kristallinen Ribosomen aus Hühnerembryonen identifiziert [57]. Der definitive Beweis für die Existenz eines solchen Tunnels wurde 1995 durch Cryo-EM Aufnahmen erbracht [58] und ist in sämtlichen derzeit veröffentlichten hochaufgelösten Strukturen des 70S Ribosoms sichtbar [59-66]. Der ribosomale Exit-Tunnel hat eine Länge von 80-100 Å und einen Durchmesser von ca. 10 Å an seiner schmalsten Stelle, bis hin zu 20 Å an seiner weitesten Stelle [62, 64, 67]. Das nach außen gerichtete Ende des Tunnels weitet sich zu einem Vorhof [62, 64, 67-69]. Mit Hilfe der Röntgen-Kristall-Strukturanalyse konnte gezeigt werden, dass der Tunnel vorrangig aus rRNA gebildet wird [62, 64, 65, 67, 70], und daher hauptsächlich ein elektronegatives Potential aufweist [71, 72]. Nissen et al. argumentierten, dass diese hydrophile Eigenschaft der Tunnelwand Interaktionen mit Seitenketten der Aminosäuren minimiert, wodurch das Ribosom überhaupt erst seine Funktion als universeller Katalysator für die

Proteinproduktion ausführen könne [67]. Neben der rRNA zeigen jedoch Teile der ribosomalen Proteine L4 und L22 in den Tunnel und bilden dort, ca. 30 Å vom PTC entfernt, eine Verengung (Abbildung 1-4) [62, 67]. Beide Proteine erstrecken sich dabei bis zur Oberfläche des Ribosoms. Das innere Volumen des ribosomalen Exit-Tunnels ist zu 39% mit Zytoplasma gefüllt und mit diversen kleinen Kanälen verbunden, welche das gesamte Ribosom durchziehen [68].

Der an der Oberfläche des Ribosoms liegende Tunnelausgang wird durch rRNA, dem bereits erwähnten ribosomalen Protein L22, sowie von L23, L24 und L29 gebildet. Proteinketten, die den ribosomalen Exit-Tunnels verlassen werden schnell von zytosolischen Faktoren, wie z.B. dem Chaperon Trigger-Faktor (TF) oder dem Signal-Erkennungs-Partikel (signal recognition particle, SRP) erkannt und gebunden.

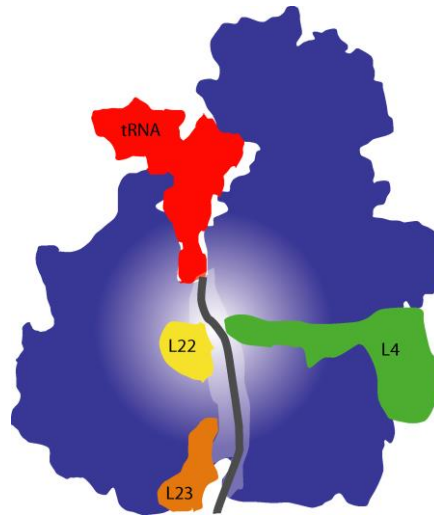


Abbildung 1-4: Schematische Darstellung der großen Untereinheit eines bakteriellen Ribosoms; abgebildet sind die am PTC gebundene tRNA sowie die ribosomalen Proteine L22, L4 und L23. Eine naszierende Kette innerhalb des ribosomalen Exit-Tunnels ist durch eine graue Linie angedeutet.

Die Bindung von TF an das Ribosom erfolgt an L23 [73], wodurch dieses ribosomale Protein einen Verknüpfungspunkt der Translation und der kotranslationalen Proteinfaltung darstellt. Zudem dient L23 als Bindestelle für SRP oder dem Translokator [73, 74] und scheint damit eine generelle Bindestelle für verschiedene Faktoren zu sein, die mit der naszierenden Kette interagieren. Interessanterweise weist eine Schleife von L23 in den ribosomalen Exit-Tunnel, so dass eine „Sensorfunktion“ dieses Protein postuliert werden kann [75]. Entsprechend der Sequenz und/oder Struktur der

naszierenden Ketten könnten dann entsprechende Faktoren an L23 rekrutiert werden, bevor das Peptid den Tunnel verlässt [76].

1.5.3. Faltungszustände naszierender Ketten innerhalb des Tunnels

Zunächst wurde vermutet, dass der Tunnel ein rigider, passiver Durchgang für Peptide sei, so dass diese unabhängig von ihrer Sequenz ungehindert passieren können [67]. Weiterhin wurde vermutet, dass die neu synthetisierte Kette den Tunnel in gestreckter Konformation passiert [77]. In einem vollständig gestreckten Peptid würde jede Aminosäure 3,0-3,4 Å des Tunnels benötigen. Somit würde sich eine Kette von 33 Aminosäuren bereits über die gesamte Länge des Tunnels erstrecken. Bei einer kompletten α -helikalen Konformation belegt jede Aminosäure etwa 1,5 Å, so dass sich ein Peptid von maximal 60-70 Aminosäuren im Tunnel befinden könnte [68, 78]. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass das Ribosom, abhängig von der jeweiligen Proteinsequenz, 30 bis 50 Aminosäuren vor proteolytischen Abbau schützen kann [79]. Dies deutet darauf hin, dass eine partielle Faltung naszierender Ketten im Tunnel möglich ist. Tatsächlich zeigen Cryo-EM-Rekonstruktion stabiler Komplexe aus Ribosomen mit naszierender Kette (ribosome-nascent chain complexes, RNCs) Dichten innerhalb des Tunnels, die als gefaltete Peptide interpretiert werden können [63, 80-82]. Mit Hilfe von Förster-Resonanz-Energietransfer-Messungen (FRET) wurde der Faltungszustand eines naszierenden Segments eines Membranproteins untersucht und für diesen Teil des Proteins wurde eine helikale Struktur im äußeren Abschnitt des ribosomalen Exit-Tunnel postuliert [83]. Zudem wurden mehr und mehr Hinweise gefunden, dass der Tunnel für bestimmte Peptidsequenzen eine aktive und flexible Rolle spielt [84, 85] und sogar als Chaperon fungieren könnte [83, 86]. Durch PEGylylation von Cystein-Resten an verschiedenen Positionen von naszierenden Ketten wurden Bereiche innerhalb des Tunnels identifiziert, in denen die relative Kompaktheit der Kette zunimmt [72]. Eine maximale Kompaktierung wurde interessanterweise am zum PTC gerichteten Eingang des Tunnels ausgemacht [87]. Es wurde eine Flexibilität des Tunneldurchmessers beobachtet und daraus eine aktive Rolle des Tunnels bei der Bewegung der naszierenden Kette [86, 88] sowie bei der Bildung kompakter Peptidstrukturen [83, 86] postuliert. In neuesten Veröffentlichungen konnte mit Hilfe von Cryo-EM-Rekonstruktionen von RNCs die naszierende Kette innerhalb des ribosomalen Exit-Tunnel visualisiert werden

[63, 80, 81, 86]. Die Möglichkeit, die naszierende Kette durch Cryo-EM-Rekonstruktionen zu visualisieren deutet bereits darauf hin, dass diese in kompakter, d.h. gefalteter Konformation vorliegt [89]. Die höchste Wahrscheinlichkeit der Helixbildung wurde dabei für den nach außen gerichteten Bereich des Tunnels und, für einige naszierende Ketten, nahe des PTC angegeben [63]. Dies würde sowohl die FRET-Studien als auch die PEGylierungs-Studien bestätigen und in Einklang bringen. Weiterhin deuten einige Publikationen darauf hin, dass kotranslationale Faltung, bis hin zu Tertiären Strukturen, bevorzugt in den letzten 20 Å des Tunnels auftreten könnten [86, 90]. Dies könnte entsprechende Spekulation über eine Chaperon-Aktivität des Ribosoms stützen [91]. Zusammenfassend kann der ribosomalen Exit-Tunnel somit in mehr oder weniger definierte Bereiche eingeteilt werden: Den oberen Teil, vom PTC bis zur Verengung, in dem eine Kompaktierung der Kette in begrenztem Maße möglich ist; die Verengung selbst, an der die Kette in gestreckter Konformation vorliegt und den distalen Teil, in dem die naszierende Kette sekundäre Strukturelemente ausbilden kann. Die Bildung von β -Faltblättern kann jedoch nur für Bereiche angenommen werden, welche sehr nahe am Tunnelausgang liegen und eine Durchmesser von 20 Å aufweisen [90].

1.5.4. Einfluss der naszierenden Kette auf die Translation

Eine wichtige Klasse der Antibiotika, die Makrolide, bindet innerhalb des ribosomalen Exit-Tunnel und inhibiert so die Translation durch Blockade der Elongationsbewegung naszierender Ketten. Dies wiederum führt zu einer Ablösung der Peptidyl-tRNA [54, 92, 93]. Es konnte gezeigt werden, dass Makrolide definierte Interaktionen mit der Tunnelwand nahe des PTC oder der Verengung (constriction point) eingehen [93-95] und so ihre translationsinhibierenden Eigenschaften entfalten. Zudem gibt es zahlreiche Beispiele von (zum Teil sequenzspezifischen) Interaktionen zwischen wachsenden Peptidketten und dem Tunnel welche die ribosomale Aktivität beeinflussen. Diese Interaktionen sind vielfältig, zum Teil detailliert beschrieben und werden bereits für moderne molekularbiologische Anwendungen gezielt genutzt. So können aufgrund von ladungsspezifischen Interaktionen positiv geladene Lysine oder Arginine in der naszierenden Kette deren Translation verlangsamen oder sogar anhalten [71, 72]. Weiterhin sind spezielle Sequenzmotive bekannt, welche die Translation zum Zeitpunkt

ihrer eigenen Synthese stoppen können (eine detaillierte Übersicht liefert z.B. Cruz-Vera et al. [96]).

In *E. coli* führt z.B. das 24 Aminosäuren lange regulatorische Peptid TnaC in Anwesenheit von Tryptophan zu einer vorübergehenden Pause der Translation und verhindert so die Expression von Genen, welche down-stream im gleichem Operon vorliegen [97]. Ein anderes Beispiel ist das 170 Aminosäuren lange sekretorische Peptid Sekretions-Monitor (SecM), welches den Sekretionsstatus der Zelle reguliert [98]. Während der Synthese dieses Peptids interagiert eine 17 Aminosäuren Konsensus-Sequenz mit dem Tunnel und führt so zu einem stabilen Arrest der Translation. Dieses sogenannte SecM-Arrest-Motiv kann mit einer beliebigen Proteinsequenz kombiniert werden [99] und stellt daher ein nützliches Werkzeug da, um RNCs *in vivo* und *in vitro* zu produzieren [100, 101]. Der SecM vermittelte Translationsarrest wurde auch für die vorliegende Arbeit genutzt. Daher soll im nachfolgenden Abschnitt detaillierter auf die molekularen Mechanismen dieser Interaktion eingegangen werden. Sequenzen, welche zu einem cotranslationalen Arrest führen, sind jedoch nicht nur auf Bakterien beschränkt. Zum Beispiel induziert das naszierende Peptid des Arginin-Attenuator-Peptids aus der Hefe einen Translationsarrest von Heferibosomen, und darüber hinaus auch in Ribosomen aus Kaninchen und Weizenkeimen [102].

Neben diesen translationsinhibierenden Effekten sind weitere Beispiele naszierender Ketten beschrieben, welche zu kurz sind um den Tunnel zu verlassen, jedoch bereits in diesem Stadium über das weitere Schicksal des vollständigen Proteins entscheiden. So konnte gezeigt werden, dass eine naszierende Kette eines integralen Membranproteins, welche sich noch vollständig im Inneren des ribosomalen Exit-Tunnels befindet, eine Konformationsänderung der Translokationspore im Endoplasmatischen Retikulum auslösen kann [103] wodurch die Integration des Proteins in die Membran ermöglicht wird. Zudem können in einem bislang nicht vollständig verstandenen Prozess bestimmte naszierende Ketten (mit Signalpeptid) innerhalb des Tunnels die Affinität des Ribosoms für SRP hundertfach erhöhen [104]. Dieser Prozess ist wahrscheinlich unabhängig von einer spezifischen Sequenz des Peptids. Vielmehr scheint die intrinsische Hydrophobizität der entsprechenden Signalpeptide für die SRP-Bindung verantwortlich zu sein [105]. Weiterhin wird vermutet, dass die SRP-Bindung durch eine Interaktion des ribosomalen Proteins L23 mit dem Peptid vermittelt wird. Eine Schleife von L23 reicht in

das Tunnelinnere, während sich ein weiterer Abschnitt dieses Proteins auf der Oberfläche nahe dem Tunnelvorhof befindet und dort einen Teil der SRP Bindungsstelle bildet [104]. Die Gegenwart einer hydrophoben Sequenz im Tunnel, welche typisch ist für integrale Membranproteine, stabilisiert maßgeblich die SRP Bindung. Weniger hydrophobe Sequenzen, welche typisch für zytosolische Proteine sind, werden hingegen von TF gebunden. Eine stabile Bindung von TF an naszierenden Ketten ist entsprechend neuesten *in vivo* Studien hingegen erst vollständig möglich, wenn die Kette eine Länge von mindestens 100 Aminosäuren erreicht hat [106].

Die Signalsequenz der periplasmatischen Disulfidbrücken-Oxidoreduktase A (periplasmatic disulfide bond oxidoreductase A, DsbA) weist beispielsweise eine für Membranproteine typische hohe Hydrophobizität auf. Es konnte gezeigt werden, dass durch Fusion dieser DsbA-Signalsequenz mit Thioredoxin 1 [107] oder dem Maltosebindenden Protein (maltose binding protein, MBP) [108] deren Exportrate über den SRP vermittelten Transportmechanismus erhöht werden konnte.

1.5.5. Die SecM Sequenz

Der Sec-Mechanismus ist eine der wichtigsten molekularen Maschinen zum Transport von Proteinen über die Plasmamembran in Prokaryoten bzw. über die Membranen des Endoplasmatischen Retikulums in Eukaryoten. Eine Übersicht über die molekularen Mechanismen und deren Regulation bietet der Artikel von Mori et al. [109]. Kern dieses Transportmechanismus ist die ATPase Sekretions-Aktivator (SecA), welche den Transport eines Präproteins über den integralen heterotrimeren Membrankomplex SecYEG stimuliert [109]. Der Sekretionsmonitor SecM überwacht dabei die Sekretionsaktivität der Zelle [98]. Sowohl SecM als auch SecA werden auf einer polyzistronischen mRNA kodiert (Abbildung 1-5). SecM wird dabei von der 5'-Region der secM-secA-mRNA kodiert und kann als ein periplasmatisches Protein angesehen werden, welches seine biologische Funktion ausschließlich als naszierende Kette im ribosomalen Tunnel ausführt [98]. Durch Interaktion des C-terminalen Bereichs von SecM mit dem Tunnel wird das translatierende Ribosom in einem inaktiven Zustand arretiert, das Ribosom verbleibt dabei an der secM-secA-mRNA. Die arretierte Bindung des Ribosoms an die mRNA verursacht wiederum die Auflösung einer Haarnadelstruktur in dieser mRNA, wodurch die Ribosomen-Bindestelle (Shine-Delgarno-Sequenz) für

SecA für ein weiteres Ribosom zugänglich wird [110] (Abbildung 1-5A). Der Translationsarrest wird durch den Sekretionsapparat aufgehoben, vermutlich durch die auf den N-Terminus von SecM ausgeübte Zugkraft eines von SecA aktivierten Translokationskomplexes [111].

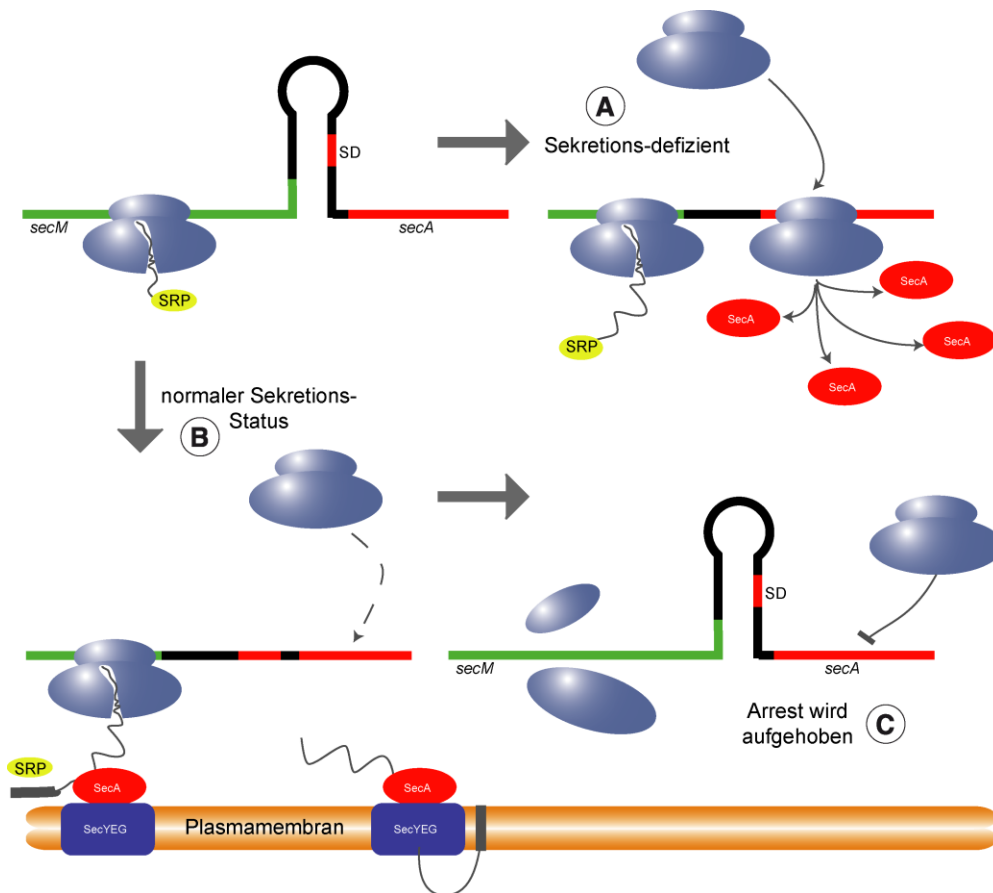


Abbildung 1-5: Regulationsmechanismus der Sekretionsaktivität durch SecM und SecA. Die für SecM und SecA kodierende mRNA bildet eine Haarnadel-Struktur, wodurch die Shine-Dalgarno-Sequenz (SD) von secA für Ribosomen unzugänglich ist; während der Translation verbleibt das Ribosom an der secM-secA-mRNA. Am N-Terminus des Peptids befindet sich eine Signalsequenz, welche vom Signal-Erkennungs-Partikel (SRP) erkannt und gebunden wird. **A.** Das SecM-Peptid arretiert seine eigene Translation; in Sekretions-defizienten Zellen bleibt der Translations-Arrest bestehen, das Ribosom verbleibt an der mRNA und die Haarnadelstruktur löst sich auf; dadurch kann ein zweites Ribosom an der SD-Sequenz binden und es wird SecA gebildet. **B.** Ein ausreichendes Level an SecA ermöglicht einen normalen Sekretions-Status. Der Komplex aus SecA und SecYEG (Translokon) löst den Translations-Arrest auf in dem SecM über die Plasmamembran transportiert wird. Das Ribosom verlässt die mRNA, die Haarnadel-Struktur wird gebildet und dadurch eine Synthese von SecA inhibiert.

Dadurch ergibt sich folgendes Modell der Sekretionsregulation: In Zellen mit physiologischem Expressionsstatus (d.h. ausreichend hoher SecA Konzentration) wird der Translations-Arrest schnell aufgehoben da der Sekretionsapparat für eine schnelle Freisetzung des arretierten Ribosoms sorgt. Das Resultat ist eine limitierte SecA-

Synthese, die ausreicht um das Zellwachstum aufrechtzuerhalten (Abbildung 1-5B). In Sekretions-defizienten Zellen hingegen bleibt der Arrest für einen längere Zeit bestehen, so dass mehr SecA gebildet, und so die Sekretionskapazität der Zelle erhöht wird (Abbildung 1-5A) [112]. Nach dem Transport von SecM in das Periplasma wird es dort durch periplasmatische Proteasen (z.B. Prc oder Tsp) abgebaut [98].

Der SecM vermittelte Translations-Arrest wird durch eine Interaktion der (17 Aminosäuren langen) C-terminale Konsensus Sequenz 150-FxxxxWIxxGIRAGP-166 mit der ribosomalen 23S rRNA sowie den ribosomalen Proteinen L22 und L4 ausgelöst [99, 113]. Pro166 verbleibt dabei an der ribosomalen A-Stelle ohne eine Peptidbindung mit der naszierenden Kette an der P-Stelle zu bilden. D.h. das Ribosom befindet sich in einem prä-translationalen Zustand mit SecM-tRNA^{Gly} an der P-Stelle und einer tRNA^{Pro} an der A-Stelle [114]. Weiterhin wurde durch Cryo-EM Rekonstruktionen von SecM arretierten RNCs gezeigt, dass in der rRNA keine wesentlichen Konformationsänderungen induziert werden [81]. Vielmehr interagieren einzelne Reste der naszierenden Kette, insbesondere Arg163, direkt mit dem Tunnel oberhalb der von L22 und L4 gebildeten Verengung (constriction point) [99, 115] und blockieren so die weitere Passage der wachsenden Kette [99, 113]. Die Interaktion des SecM Peptids kann durch gezielte Mutationen in der rRNA und L22 verhindert werden [99]. Daher wird vermutet, dass der ribosomalen Exit-Tunnel, insbesondere der Teil, welcher von L22 gebildet wird, die räumliche Struktur des naszierenden SecM Peptids detektiert [116].

1.6. Fragestellung der Arbeit

In den vergangen zwei bis drei Jahrzehnten erlangte die Festkörper-NMR einen hohen Stellenwert innerhalb der Strukturbiologie. Dieser Erfolg basiert auf der Tatsache, dass mit Hilfe der Festkörper-NMR sowohl die atomare Struktur von Proteinen als auch deren molekulare Dynamik bestimmt werden kann. Zudem kann, im Gegensatz zur Kristallstrukturanalyse, auf eine aufwendige Kristallisation des zu untersuchenden Proteins verzichtet werden. Damit eröffnet sich die Möglichkeit, Proteine in ihrer weitgehend nativen Umgebung zu untersuchen. Dies ist von herausragender Bedeutung, da sich die Funktionen von Proteinen meist durch deren vielfältigen Interaktionen mit ihrer jeweiligen Umgebung definiert. Limitiert wird diese Methode durch ihre geringe Sensitivität. Die Dynamische Kernpolarisation (DNP) bietet hier die Möglichkeit, eine

Empfindlichkeitssteigerung um bis zu drei Größenordnungen zu erzielen. Im Vergleich zur konventionellen Festkörper-NMR müssen für die DNP zwei Grundvoraussetzungen erfüllt werden: Zugabe eines stabilen Radikals bzw. Biradikals und eine Proben temperatur nahe des Siedepunktes von Stickstoff.

Ziel dieser Arbeit ist es, zunächst den Einfluss dieser eben genannten Besonderheiten auf die gewonnenen NMR-Signale zu ermitteln. Weiterhin sollen die dabei zugrundeliegenden Prozesse sowohl qualitativ als auch quantitativ untersucht werden. Im Fokus stehen dabei Veränderungen von relevanten Relaxationsparametern sowie Veränderungen der Mobilität von Seitenketten.

Die Zugabe von Radikalen führt zu einer Verstärkung von Relaxationsprozessen während des NMR-Experiments. Dieses als PRE (paramagnetische Relaxationsverstärkung bzw. paramagnetic relaxation enhancement) bekannte Phänomen ist seit langem bekannt und wird in der Festkörper-NMR für die Analyse von lokalen Strukturen, zur Messung von Atomabständen sowie zur Steigerung der Wiederholungsrate von NMR-Experimenten genutzt [49, 117, 118].

Ziel dieser Arbeit ist es, die Abhängigkeit zwischen einzelnen Relaxationsparametern und der Konzentration des eingesetzten Biradikals zu untersuchen. Anhand eines Modellsystems sollen dabei eine optimale Radikalkonzentration, bzw. Richtlinien zur Auswahl geeigneter Radikalkonzentrationen ermittelt werden. Am Beispiel eines Rezeptor-Liganden-Komplexes soll zu dem geklärt werden, ob die negativen Effekte des Zugegebenen Biradikals durch eine räumliche Trennung zwischen Analyt und Lösungsmittel minimiert werden können.

Proben temperaturen nahe dem Siedepunkt von Stickstoff ermöglichen einen effektiven Polarisationstransfer zwischen Elektronen und Atomkernen. Gleichzeitig besteht ein enger Zusammenhang zwischen der Dynamik von Seitenketten und der Proben temperatur. Für die Durchführung der DNP-verstärkten Festkörper-NMR ergeben sich dadurch sowohl neue experimentelle Herausforderungen als auch neue Möglichkeiten. Entscheiden ist hierbei die zeitliche Auflösung dynamischer Prozesse, welche mit der Festkörper-NMR erreicht werden kann. Prozesse, deren Zeitkonstante deutlich kleiner ist als die verwendete Akquisitionszeit werden nicht zeitlich aufgelöst.

Das Resultat ist eine für diesen Prozess zeitlich gemittelte Struktur. Im Gegensatz dazu führen langsame Prozesse, welche sich über ein Vielfaches der Akquisitionszeit erstrecken, zur Detektion von strukturellen Subpopulationen. Prozesse mit einer intermediären Dynamik können direkt mit der Messung interferieren und zu einer signifikanten Verbreiterung des detektierten Signales führen. Ein Absenken der Proben temperatur kann damit einerseits Prozesse intermediärer Dynamik derart verlangsamen, dass einzelne Subpopulationen detektiert werden und so der Informationsgewinn des NMR-Experiments erhöht wird. Andererseits können tiefe Temperaturen auch zu einer Verlangsamung schneller Prozesse hin zu einer intermediären Dynamik verursachen und so die spektrale Qualität reduzieren.

Ziel dieser Arbeit ist es daher, anhand des Modellsystems SH3 den Einfluss der Proben temperatur auf die Signalbreiten einzelner Seitenketten zu analysieren. Insbesondere soll dabei untersucht werden, in welchem Ausmaß die Positionen der einzelnen Seitenketten innerhalb des Moleküls die Dynamik beeinflusst. Anhand des Rezeptor-Liganden-System soll anschließend untersucht werden, ob für Seitenketten deren Beweglichkeit bei Raumtemperatur stark eingeschränkt ist, bei tiefen Temperaturen Signale vergleichbarer Breite detektiert werden können.

Schließlich soll die Dynamische Kernpolarisation auf ein komplexes und für die pharmakologische Grundlagenforschung relevantes System angewendet werden. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist die strukturelle Analyse einer naszierenden Kette innerhalb des bakteriellen Ribosoms. Dazu werden *in vivo* Komplexe aus ^{13}C -markierten naszierenden Peptiden und unmarkierten Ribosomen exprimiert und hinsichtlich des Faltungszustandes der naszierenden Kette untersucht. Hierbei soll überprüft werden, ob bzw. in welchem Ausmaß sich einfache Sekundärstrukturen naszierender Ketten innerhalb des Ribosoms nachweisen lassen. Aus diesen Experimenten sollten sich Antworten auf eine Vielzahl derzeit stark umstrittener Fragen ableiten lassen. Sollten sich erste Sekundärstrukturen bereits innerhalb des Ribosoms herausbilden, so hätte die einen wesentlichen Einfluss sowohl auf cotranslationale Faltungsprozesse als auch auf mögliche Regulationsmechanismen der Proteinexpression und des intra- und interzellulären Proteintransportes.

2. Materialien und Methoden

2.1. Expression von SH3

Die in dieser Arbeit verwendete SH3-Domäne (SRC Homology 3 Domain) ist eine Spektrin α -Kette aus dem Zentralen Nervensystem von *Gallus gallus* mit einer Länge von 60 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 7229,3 (PDB Eintrag: 1M8M [2]). Expression und Aufreinigung des SH3 folgte der von Pauli et al. [119] veröffentlichten Prozedur. Verwendet wurde der *E.coli* Stamm BL21 sowie ein M9-Minimalmedium, welches mit ^{13}C -markierter Glucose und ^{15}N -markiertem Ammoniumchlorid angereichert wurde. Dadurch konnten ausreichende Mengen uniform ^{15}N , ^{13}C -markiertes SH3 gewonnen werden. Für die vorliegende Arbeit wurden ausschließlich Präzipitate des SH3 verwendet. Dazu wurde der pH-Wert des Puffers vom sauren Bereich in den basischen Bereich (pH 7,5) verschoben und nach drei Tagen Inkubation bei 4 °C das entstehende Präzipitat abzentrifugiert. Für die durchgeführten DNP-Messungen wurde das SH3 in einem Gemisch aus deuteriertem Glycerol (d_8 -Glycerol), D_2O und H_2O im Verhältnis 60:30:10 (V:V:V) und der entsprechenden Menge TOTAPOL gelöst.

2.2. Herstellung von TOTAPOL

Die Synthese von TOTAPOL wurde von Dr. Edgar Specker (FMP, Berlin) entsprechend Song et al. [42] durchgeführt. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

2.3. Prolin-Lösungen

Zur Untersuchung der Paramagnetischen Effekte von TOTAPOL (siehe Abschnitt 3.1) wurde ^{13}C , ^{15}N -Lösung aus 50 mM markiertem Prolin (Fa. Sigma-Aldrich, USA) und DNP-Puffer (60 % d_8 -Glycerol, 30 % D_2O , 10 % H_2O) hergestellt. In Aliquote zu je 25 μl wurde dann entsprechend Tabelle 2-1 TOTAPOL zugegeben. Die höchste Konzentration (196 mM) konnte jedoch selbst nach mehrtägiger Inkubation (4 °C) nicht vollständig gelöst werden.

Tabelle 2-1: TOTAPOL-Konzentrationen der verwendeten Prolin-Lösungen

TOTAPOL -Konzentration [mM]	Zugabe TOTAPOL [μ mol]	Zugabe TOTAPOL [mg]
14,8	0,295	0,1179
25,8	0,516	0,2063
52,2	1,044	0,4170
102,8	2,056	0,8213
196	3,919	1,5660

2.4. Herstellung von Komplexen aus Neurotoxin II und Acetylcholin-Rezeptoren

Das in dieser Arbeit verwendete Neurotoxin II ist das α -Neurotoxin aus *Naja naja oxiana* (Zentral-Asiatische Cobra). Das aus fünf über Disulfidbrücken verbundenen β -Strängen bestehende Nervengift hat ein Molekulargewicht von 6889 und eine Länge von 61 Aminosäuren (PDB Eintrag: 1NOR [120]). Die Präparationen von Komplexen aus Neurotoxin II (NTII) und nikotinergen Acetylcholin-Rezeptor (nAChR) in Membranen wurden von Ludwig Krabben zur Verfügung gestellt. Ihre Herstellung folgte dem von Krabben et al. veröffentlichtem Schema[121]. Das NTII wurde unter Verwendung von ^{15}N markierten Ammoniumchlorid und 2- ^{13}C -markierter Glucose im *E.coli* Stamm BL21 exprimiert. Sämtliche Arbeiten an freiem NTII wurden dabei von der Arbeitsgruppe Arseniev durchgeführt (Shemyakin-Ovchinnikov Institut für Bioorganische Chemie der Russischen Akademie der Wissenschaften, Moskau). Die nAChR-reichen Membranen wurden aus dem Elektrischen Organ von *Torpedo californica* (Kalifornischer Zitterrochen), wie von Schiebler et al. [122] beschrieben, isoliert. Eine Suspension dieser Membranen wurde mit Ringer-Lösung verdünnt und mit NTII für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von Triton X-100, zur Verbesserung der Zugänglichkeit der Rezeptor-Bindungsstelle, und einer weiteren Inkubation für 30 min, wurden die Membranen abzentrifugiert. Nach mehreren Wasch- und Zentrifugationsschritten wurden schließlich die sedimentierten Membranen in einen NMR-Rotor überführt und bei $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Zur Herstellung der DNP-Proben wurden die Membranen in einem Gemisch aus deuteriertem Glycerol (d_8 -Glycerol), D_2O und H_2O im Verhältnis 60:30:10 (V:V:V) und der entsprechenden Menge TOTAPOL gelöst.

2.5. Herstellung von Komplexen aus naszierenden Ketten und Ribosomen (RNCs)

Eine entscheidende Schwierigkeit für die Durchführung von Festkörper-NMR-Experimenten an naszierenden Ketten innerhalb des Ribosoms ist das Größenverhältnis zwischen Ribosom und naszierender Kette. Die Gesamtheit der ribosomalen Proteine besteht aus über 10.000 Aminosäuren. Um die 37 Aminosäure lange Kette innerhalb des Tunnels detektieren zu können, muss sichergestellt werden, dass die Kette vollständig ^{13}C , ^{15}N markiert wird, während das Ribosom selbst unmarkiert bleibt.

2.5.1. Expression der RNCs

Sämtliche *in vivo* Expressionen von Komplexen aus Ribosomen und naszierenden Ketten (RNCs) wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Bernd Bukau am ZMBH Heidelberg durchgeführt. Die Prozedur folgte dabei im wesentlichen dem von Rutkowska et al. publiziertem Protokoll [101] und ist in Abbildung 2-2 schematisch dargestellt. Die in dieser Arbeit untersuchten naszierenden Ketten sind Fusionsprodukte aus der Signalsequenz der periplasmatischen Disulfidbrücken-Oxidoreduktase A (periplasmatic disulfide bond oxidoreductase A, DsbA) und der Arrest-Sequenz des Sekretionsmonitor M (secretion monitor, SecM) sowie einer Ulp1-Schnittstelle gefolgt von einer SUMO-SDomäne und drei Strep-tags am N-Terminus der DsbA-Signalsequenz. Abbildung 2-1 zeigt eine schematische Darstellung der in dieser Arbeit verwendeten naszierenden Ketten.

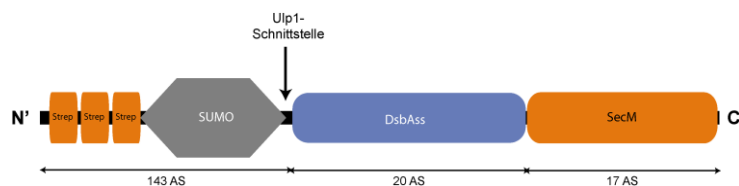


Abbildung 2-1: Schematische Darstellung der exprimierten naszierenden Ketten

Neben dem Wild-Typ (WT) des DsbA-SecM-Peptids wurden zwei Doppelmutanten, S16/18A und S22/28A exprimiert. Sämtliche Plasmide zur Expression dieser Konstrukte wurden von der Arbeitsgruppe um Prof. Bernd Bukau hergestellt.

Tabelle 2-2: Übersicht über die analysierten Peptidsequenzen

Konstrukt	Peptidsequenz
WT-DsbA-SecM	¹ MKKIWLALAG LVLAFSASAA ²⁰ ²¹ FSTPVWISQ AQQIRAGP ³⁷
S16/18A-DsbA-SecM	¹ MKKIWLALAG LVLAF <u>AAAA</u> A ²⁰ ²¹ FSTPVWISQ AQQIRAGP ³⁷
S22/28A-DsbA-SecM	¹ MKKIWLALAG LVLAFSASAA ²⁰ ²¹ F <u>A</u> TPVW <u>I</u> AQ AQQIRAGP ³⁷

Pro Konstrukt wurden zunächst 100 ml Luria-Bertani-Medium (LB-Medium) mit *E. coli* BL21 Zellen angeimpft, die zuvor mit dem entsprechenden Plasmid transformiert wurden. Nach Inkubation über Nacht bei 30 °C wurden jeweils 4 x 1-Liter LB-Medium mit 20 ml der Übernachtskultur im 5-Liter Kolben (mit Schikane) angeimpft und bei 30 °C bis zu einer Optischen Dichte bei 600 nm von 1 inkubiert (ca. 3 h). Durch Zugabe von 1mM IPTG wurde dann die Expression der auf dem Chromosom kodierten T7-Polymerase induziert. Nach einer 5 min Inkubation wurde der Ansatz in 4 eiskalte Zentrifugationsgefäße überführt und bei 2500 x g und 4 °C für 20 min abzentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die Pellets jeweils in 50 ml eiskaltem M9-Minimalmedium resuspendiert. Je zwei der vier resuspendierten Pellets wurden anschließend vereinigt, so dass zwei Reaktionsansätze mit jeweils 100 ml entstanden. Diese wurden jeweils auf 400 ml mit eiskaltem M9-Minimalmedium aufgefüllt und erneut bei 2500 x g und 4 °C für 20 min abzentrifugiert. Beide Pellets wurden in M9-Minimalmedium resuspendiert, in einem 5 l Kolben (ohne Schikane) vereinigt und das Gesamtvolumen wurde auf 1 l eingestellt. Hierbei ist es sehr wichtig, dass das Zentrifugieren und Resuspendieren so schnell wie möglich durchgeführt werden.

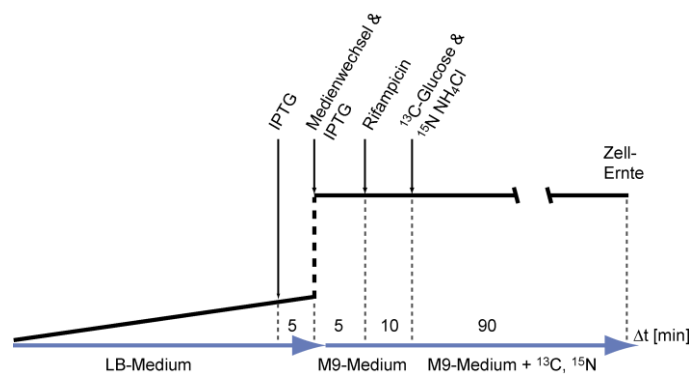


Abbildung 2-2: Expressionsschema der RNC-Komplexe

Anschließend erfolgten die erneute Zugabe von 1 mM IPTG und eine Inkubation bei 30 °C für 5 min. Durch Zugabe von 3 ml einer 100 mg/ml Rifampicin Lösung und einer weiteren Inkubation für 10 min bei 30 °C wurde die bakterielle RNA-Polymerase inhibiert, während die durch IPTG Zugabe exprimierte T7-Polymerase Rifampicin-resistent ist. Ziel dieses Schrittes ist es, die Expression des *E. coli* Genoms effektiv zu unterbinden, so dass ausschließlich die IPTG induzierte Transkription des auf dem Plasmid kodierten Gens stattfindet, welches unter der Kontrolle eines T7-Promotors steht. Um die RNCs zu markieren erfolgte anschließend die Zugabe von 100 ml ¹⁵N,¹³C-markiertem Silantes *E.coli* OD2 CN-Medium, 50 ml ¹⁵N,¹³C-markiertem Silantes *Yeast* OD2 CN-Medium, sowie 2 g ¹³C- Glucose und 1 g ¹⁵N-Ammoniumchlorid. Inkubation für 90 min bei 30°C führte anschließend zu einer uniformen ¹³C,¹⁵N-Markierung des DsbA-SecM-Peptids. Die Zellen wurden dann durch Zentrifugation bei 2.200 x g und 4 °C für 15 min geerntet, durch Resuspendieren in eiskaltem M9 Medium und wiederholter Zentrifugation gewaschen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert.

Tabelle 2-3: Zusammensetzung des M9-Minimalmediums

M9-Minimalmedium	1 l
20 µM Biotin	0,25 ml (80 mM)
60 µM Thiamin	1 ml (60 mM)
1 mM MgSO ₄	1 ml (1M)
0,1 mM CaCl ₂	100 µl (1M)
H ₂ O	ad 900 ml
M9-Salze	100 ml (10x)

Tabelle 2-4: Zusammensetzung der M9-Salze (10-fach konzentriert)

10x M9-Salze	1 l
M Na ₂ HPO ₄ (2*H ₂ O)	76 g
KH ₂ PO ₄	30 g
NaCl	5g
H ₂ O	ad 1 l

2.5.2. Aufreinigung der RNCs

Die Aufreinigung der RNCs wurde ebenfalls in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um Prof. Bukau am ZMBH durchgeführt. Zunächst wurde dazu das Zellpellet in RNC-Puffer mit Protease-Inhibitoren (RNC(+)-Puffer) in einem Gesamtvolumen von 35 ml resuspendiert und die Zellen in drei Durchgängen mit der French-Press bei 1000 psi aufgeschlossen. Das Lysat wurde dann bei 30.000 x g und 4 °C für 25 min zentrifugiert und das Pellet verworfen. Die Salzkonzentration des Überstandes wurde auf 1 M Kaliumacetat und 12 mM Magnesiumacetat eingestellt. Anschließend wurde das Lysat auf ein Hochsalzkissen mit gleicher Salzkonzentration aufgetragen und bei 225.000 x g und 4°C für 5 Stunden zentrifugiert. Das dabei entstehende Ribosomenpellet wurde über Nacht in 5 ml RNC-Puffer mit Protease-Inhibitoren resuspendiert. Diese Lösung wurde dann 30 min mit 3 ml einer mit RNC Puffer ohne Protease-Inhibitoren (RNC(-)-Puffer) equilibrierten, 50 %-igen Strep-Tactin-Lösung (IBA, Deutschland) inkubiert. Nach Überführung des Ansatzes in ein Säulengefäß wurde der Durchfluss (FT1) aufgefangen, die Säule fünfmal mit jeweils 5 ml RNC(-)-Puffer gewaschen und die gebundenen RNCs mit Elutionspuffer (RNC(-)-Puffer mit 2,5 mM Desthiobiotin) eluiert. Anschließend wurde mit FT1 in gleicher Weise verfahren, d.h. FT1 wurde mit Strep-Tactin inkubiert, Durchfluss (FT2) aufgefangen, Säule fünfmal gewaschen und anschließend RNCs eluiert. Diese Prozedur wurde ein drittes Mal wiederholt. Sämtliche Eluate wurden gesammelt und FT4 für Kontrollmessungen bei -80 °C gelagert.

Die gereinigten RNCs weisen neben den 37 Aminosäuren im Inneren des Ribosoms eine SUMO Sequenz sowie ein dreifaches Strep-tag außerhalb des Ribosoms auf. Durch einen Verdau der naszierenden Kette mit Ulp1-Protease kann der gesamte, außerhalb des Ribosoms befindliche Teil, abgespalten werden. Dazu wurde das Säulenuelat mit 200 µl einer Ulp1-Proteaselösung (~ 4 mg/ml) für 4 h bei 4°C inkubiert. Da die Ulp1-Protease nach einiger Zeit in dem RNC-Puffer ausfällt wurde sie durch Zentrifugation für 5 min bei 4000 rpm und 4°C entfernt (das Pellet wird verworfen). Dieser Vorgang (Protease-Verdau und Zentrifugation) wurde dreimal wiederholt und anschließend wurde der Verdau durch Zugabe von Protease-Inhibitoren gestoppt. Um die abgeschnittenen Fragmente der naszierenden Kette zu entfernen (SUMO-Domäne mit den drei Strep-tags), wurden die RNCs erneut durch ein Saccharose-Kissen pelletiert. Dazu wurde zunächst

die Kaliumacetat-Konzentration der RNC-Lösung und des Kissens auf 300 mM eingestellt. Anschließend wurden die Proben auf 6,5 ml Kissenvolumen geschichtet und bei 4 °C und 200.000 x g für 4,5 h zentrifugiert. Das dabei entstehende Pellet wurde dann über Nacht bei 4 °C in 100 µl RNC(-)-Puffer gelöst, anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Tabelle 2-5: Zusammensetzung des RNC(-) –Puffers

RNC (-) Puffer	l
50 mM Hepes pH 7,5	50 ml (1M)
100 mM Kaliumacetat	25 ml (4M)
12 mM Magnesiumacetat	12 ml (1M)
1 mM DTT	1 ml (1M)
H ₂ O	Ad 1 l

Tabelle 2-6: Zusammensetzung des RNC(+) –Puffers

RNC (+) Puffer	l
1 mM PMSF	10 ml (100 mM)
10 µg/µl Aprotinin	1 ml (10 mg/ml)
5 µg/µl Leupeptin	1 ml (5 mg/ml)
8 µg/µl Pepstatin	8 ml (1mg/ml)
RNC (-) Puffer	Ad 1 l

Tabelle 2-7: Zusammensetzung des Saccharose –Kissens

Hoch-Salz Saccharose Kissen	800 ml
25 % Saccharose	200 g
1 M Kaliumacetat	200 ml (4M)
12 mM Magnesiumacetat	9,6 ml (1M)
50 mM Hepes pH 7,5	40 ml (1M)
1 mM DTT	0,8 ml (1M)
H ₂ O	Ad 1 l

2.5.3. Konzentrations- und Qualitätsbestimmung der RNCs

Die Konzentration der RNCs wurde durch eine Absorption-Messung bei 260 nm bestimmt. Die Reinheit der RNCs wurde durch SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Blaufärbung überprüft. Dabei wurden ein 13,5 % Lauf-Gel und ein 5 % Sammel-Gel verwendet (Zusammensetzung siehe Tabelle 2-8).

Tabelle 2-8: Zusammensetzung des verwendeten SDS-PAGE Gels

	5 % Sammel-Gel	13,5 % Lauf-Gel
H ₂ O	11 ml	12 ml
1,5 M Tris-HCL (pH 8,8), 0,4 % SDS	---	10 ml
0,5 M Tris-HCL (pH 6,8), 0,4 % SDS	5 ml	---
30 %-ige Acrylamid-Lösung	4 ml	18 ml
TEMED	40 µl	80 µl
10 %-ige APS-Lösung	200 µl	200 µl

Tabelle 2-9: Zusammensetzung des SDS-PAGE Lauf-Puffers

SDS-PAGE Lauf-Puffer	1 l
25 mM Tris	3,03 g
0,2 M Glyzin	15 g
3,47 mM SDS	1g
H ₂ O	ad 1l

Um zu überprüfen, ob die naszierende Kette an der Ulp1-Schnittstelle geschnitten wurde, wurde ein Western-Blot (semi-dry), unter Verwendung des Schafer-Nielsen Transfer-Puffers und einer Affinitätsmatrix (StrepTactin, gebundenen an alkalische Phosphatase) oder eines SecM-Antikörpers durchgeführt.

Table 2-10: Zusammensetzung des Schafer-Nielsen Transfer-Puffers

Schafer-Nielsen Transfer-Puffer	500 ml
24 mM Tris	2,9 g
20 mM Glyzin	1,5 g
0,66 mM SDS	0,19 g
20 % Methanol	100 ml
H ₂ O	ad 500 ml

Die Bestimmung der ¹³C,¹⁵N-Markierungseffizienz erfolgte über Flüssig-Chromatographie-Massenspektrometrie (liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS). Dazu wurde zunächst 200 pmol des von der Ulp1-Protease abgeschnittenen

Fragments der naszierenden Kette (SUMO und Strep-tags, siehe Abbildung 2-1) in eine Hochleistung-Flüssig-Chromatographie (high performance liquid chromatography, HPLC) -Apparatur injiziert (Agilent 1100 Serie, Agilent Technologies, Deutschland). Als Säulenmaterial wurde POROS 10 R1 Medium (Applied Biosystems, USA), gepackt in einer 1 mm x 2 cm Säule, verwendet. Anschließend wurde für 3 Minuten die Probe mit einer 0,05 %-igen Trichloressigsäure (Trichloroacetic acid, TCA) -Lösung entsalzt (Zugeleitet mit einer Fließgeschwindigkeit von 400 µl/min).

Elution und Separation der Probe erfolgte über eine analytische 0,8 x 80 mm Umkehr-Phasen Säule, gepackt mit 50 x 0,5 mm BioBasic 8 KAPPA Säule (Partikelgröße 5 µm, Thermo Scientific, Deutschland). Dabei wurde eine 10 min Gradient von 15 % auf 55 % Acetonitril in einer 0,05 %-igen TCA-Lösung verwendet (Zugeleitet mit einer Fließgeschwindigkeit von 17,5 µl/min).

Die aus der HPLC eluierten Proben wurden in einem Elektrospray-Ionisations-Quadrupol-Flugzeitmassenspektrometer (electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometer, QSTAR Pulsar; Applied Biosystems) gemessen. Bei der Auswertung der Daten wurde das Programm BioAnalyst (Applied Biosystems) verwendet und die aufgenommenen Spektren gegen Apomyoglobin kalibriert.

2.6. Rotorfüllung

Sämtliche Messungen wurden mit 3,2 mm Standard Rotoren aus Zirkonium (Bruker) durchgeführt. Zur Versiegelung flüssiger Proben wurden kleine, etwa 1 mm dicke und konisch geschnittene Silikon-Scheiben (Eigenproduktion) verwendet. Mit Ausnahme der Komplexen aus naszierenden Ketten und Ribosomen (RNCs) wurden die Rotoren mit Hilfe einer Tischzentrifuge und eines Trichters (Eigenproduktion) gefüllt. RNCs wurden durch Ultrazentrifugation (125.000 x g, 4°C, 4h) in die Rotoren überführt. Dazu wurde zunächst des RNC-Pellet (siehe Abschnitt 2.5) in 1 ml DNP-Puffer (60 % d₈-Glycerol, 30 % D₂O, 10 % H₂O), mit 50 mM HEPES pH 7,5, 100 mM Kaliumacetat und 12 mM Magnesiumacetat gelöst. Für die Ultrazentrifugation wurden NMR-Rotor-Halter für Beckmann-Ultrazentrifugen (Rotor: SW 40TI) verwendet (Eigenproduktion von ETH Zürich, AG Beat Meier). Die Lagerung sämtlicher DNP Proben erfolgte bei -80°C.

2.7. Durchführung der DNP-NMR-Spektrometrie

2.7.1. Aufbau des Spektrometers

Sämtliche NMR-Messungen wurden an einem BRUKER 400 MHz (9,4 T) Spektrometer, ausgerüstet mit einer AVANCE III Konsole (BRUKER) und einem Wärmeaustauscher (BRUKER) durchgeführt. Als Probenkopf diente ein spezieller DNP/Cryo-Probenkopf (BRUKER) welcher sowohl im Zwei-Kanal Modus (^1H , ^{13}C) als auch im Dreikanal-Modus (^1H , ^{13}C , ^{15}N) betrieben werden konnte. Die Steuerung des Spektrometers, sowie die Verarbeitung der Daten, erfolgte mit dem Programm Topspin (Version 2.1). Zur Referenzierung der Daten wurde entweder das ^{13}C -Signal der Silikon-Scheibe (siehe Abschnitt 2.5.3) oder die ^{13}C -Signale des Glycerols (74,11 ppm für C2, 63,8 ppm für C1/C3) [123] verwendet. Die Proben temperatur wurde mittels der von Thurber et al. [124] publizierten Methode bestimmt und für sämtliche Messungen auf 100 K (+/- 5K) eingestellt. Unter Mikrowellenbestrahlung und Probenrotation mit 8889 Hz liegt die Proben temperatur um etwa 3 K über dem arithmetischen Mittel der Temperaturen der verwendeten Stickstoff-Ströme (Kühlstrom, Antriebsstrom, Trägerstrom). Die Energie der 90° Pulse für ^1H wurde auf einen Wert eingestellt, bei dem die Pulslänge 2,5 μs beträgt (100 kHz). Für ^{13}C wurde eine Länge des 90° Pulses von 4 μs (62,5 kHz) eingestellt. Für CP-Experimente wurden eine ^{13}C -Pulsstärke von 62,5 KHz und einer ^1H -Pulsstärke von etwa 71,4 KHz [14] verwendet. Um die Robustheit der Kreuzpolarisation zu steigern wurde eine 70-100% Rampe auf Protonen angewendet.

Als Mikrowellenquelle diente ein 263 GHz Gyrotron (BRUKER). Die emittierte Mikrowelle wurde über einen Mikrowellenleiter direkt in den Probenkopf gespeist und dort auf den Rotor fokussiert. Als Mikrowellenleistung wird vom Hersteller 20W angegeben. Durch Verluste bei der Weiterleitung der Mikrowelle zum Rotor wird dieser jedoch nur mit etwa 4W [125] bestrahlt.

2.7.2. Messung von Relaxationszeiten

Wie in Abschnitt 1.1 beschrieben ist eine genaue Kenntnis der ^1H - T_1 -Relaxationszeiten entscheidend, um die optimale Wartezeit d_1 zwischen zwei Wiederholungen eines Experiments zu berechnen. Für eine optimale Signalintensität pro Zeiteinheit wird die Wartezeit d_1 zwischen den Experimenten wie folgt berechnet: $d_1 = ^1\text{H}-T_1 * 1,3$. Insofern

nicht anders angegeben wurden für sämtliche Versuche die Protonen- T_1 mit Hilfe des in Abbildung 2-3A dargestellten Pulsschemas ermittelt. Zunächst wird die Magnetisierung der Protonen durch Einstrahlung eines 180° -Pulses entgegengesetzt dem äußeren magnetischen Feld ausgerichtet. Nach einer variablen Zeit (variable delay, vd) wird die verbleibende longitudinale Magnetisierung durch einen 90° -Puls in die XY-Ebene gebracht und über einen CP-Schritt auf die Kohlenstoffe übertragen und ausgelesen. An dem exponentiellen Signalabfall mit steigender Wartezeit t_{vd} wird die Formel (2.1) gefittet und so die T_1 -Konstante berechnet. Dabei ist I_0 die Ausgangsintensität, t die variable Wartezeit und P ein Korrekturfaktor.

$$T_1 = I_0 + P \cdot e^{-t/T_1} \quad (2.1)$$

Der Verlust der transversalen Kohärenz (T_2 -Relaxation, siehe Abschnitt 1.1) limitiert die zu erreichende Linienbreite im NMR-Experiment. Für die Untersuchung der paramagnetischen Effekte des Biradikals TOTAPOL (siehe Abschnitt 1.4.1) wurde die T_2 -Relaxation der Protonen mittels der in Abbildung 2-3B abgebildeten Pulsfolge bestimmt. Die longitudinale ^1H -Magnetisierung wird durch einen 90° -Puls in eine kohärente transversale Magnetisierung überführt. Während einer variablen Zeit t_{vd} dephasiert diese und wird anschließend durch einen 180° -Puls, gefolgt von der gleichen Wartezeit t_{vd} , refokussiert. Durch einen CP Transfer wird diese refokussierte (kohärente) Magnetisierung auf Kohlenstoffe übertragen und ausgelesen. An die gemessenen Signalintensitäten wird die Formel (2.2) gefittet und so T_2 berechnet.

$$T_2 = P \cdot e^{-t/T_2} \quad (2.2)$$

Die genaue T_2 -Zeit lässt sich jedoch experimentell kaum messen. Aufgrund der Inhomogenität des Magnetfeldes oder der Proben temperatur liegt der gemessene Wert niedriger als die tatsächliche Relaxationskonstante und wird daher meist als T_2^* bezeichnet. Da diese Unterscheidung in der praktischen Anwendung vernachlässigbar ist wird im Folgenden zwischen T_2 und T_2^* nicht unterschieden.

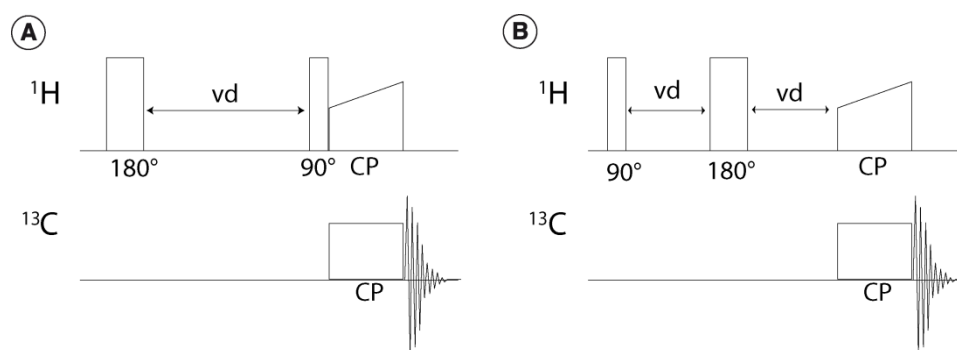


Abbildung 2-3: Pulsschema der T_1 -Messungen (A) und der T_2 -Messungen (B), vd = variable delay, CP = cross polarization (Kreuzpolarisation).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Pulssequenz POST-C7 (permutationally offset stabilized C7) [20, 126] verwendet um die Signale über Doppel-Quanten Kohärenzen zu filtern und den Einfluss der Anisotropie der chemischen Verschiebung zu minimieren.

Abbildung 2-4 zeigt das Puls-Chema der POST-C7 Sequenz. Nach dem $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$ CP Schritt wird ein 90° -Puls auf ^{13}C eingestrahlt und so eine longitudinale Magnetisierung (entlang der Z-Achse) der Kohlenstoffe aufgebaut (Position 1 in Abbildung 2-4). Diese Z-Magnetisierung wird dann durch die POST-C7 Anregungssequenz in Doppel-Quanten Kohärenz umgewandelt (Position 2 in Abbildung 2-4). Dies erfolgt jedoch ausschließlich für zwei-Spin-Systeme (zwei direkt verbundene ^{13}C -Atome), wodurch isolierte Spins ausgefiltert werden. Die Länge t_{C7} der Anregungssequenz entsprach in allen Versuchen zwei Rotorperioden (bei einer Rotationsfrequenz von 8889 Hz: $t_{C7} = 22,5$ ms). Eine Wiederholung der POST-C7 Anregungssequenz (jetzt Rückwandlungssequenz genannt) überführt die Doppel-Quanten Kohärenz in longitudinale Magnetisierung (Position 3 in Abbildung 2-4), welche schließlich durch einen weiteren 90° -Puls in detektierbare transversale Magnetisierung umgewandelt wird (Position 4 in Abbildung 2-4).

2.7.3. Unterdrückung von Hintergrundsignalen durch POST-C7

Für die Aufzeichnung von 2D Spektren der Ribosomen-Präparationen (siehe Abschnitt 3.3) wurden Pulsprogramme gewählt, bei denen NMR-Signale isolierter Kerne durch einen Doppel-Quanten Filter unterdrückt werden. Durch die uniforme ^{13}C -Markierung der naszierenden Kette innerhalb des unmarkierten Ribosoms ist die Wahrscheinlichkeit

zweier benachbarter Kohlenstoffe, dem Isotop ^{13}C zu entsprechen, annähernd 100 %. Für das unmarkierte Ribosom ergibt sich eine Wahrscheinlichkeit von $(1:100) * (1:100) = 1:10.000$. Daher ergibt sich eine 10.000-fache Filtereffizienz für die Signale der naszierenden Kette.

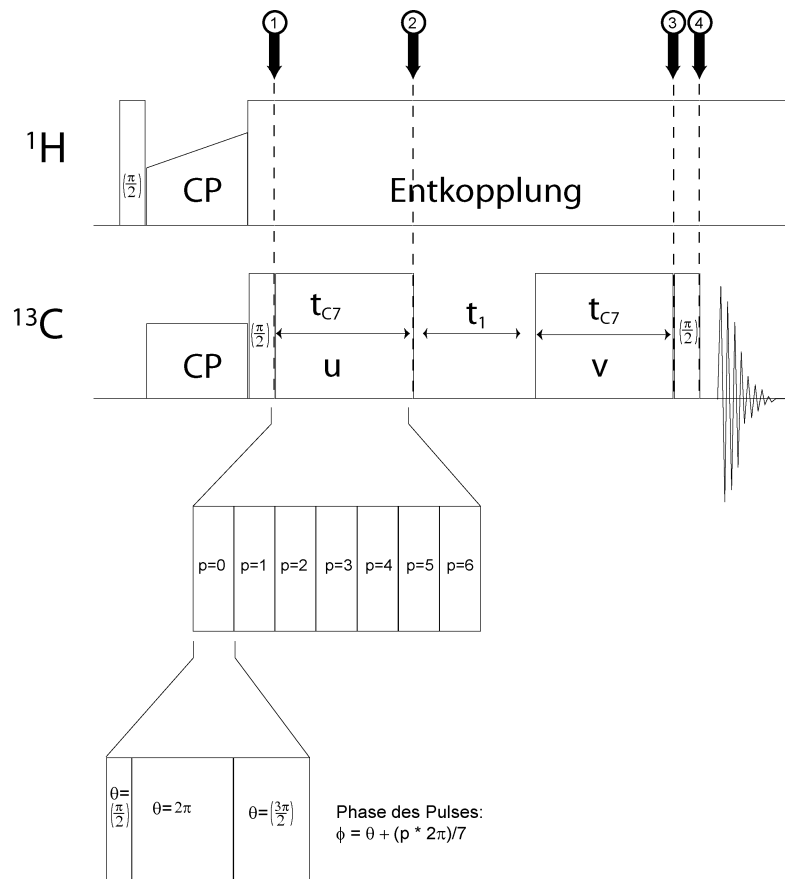


Abbildung 2-4: Pulschema der Doppel-Quanten gefilterten 2D ^{13}C - ^{13}C Experimente. Durch Anwendung der Anregungssequenz (u) werden Doppel-Quanten Kohärenzen benachbarter ^{13}C Kerne selektiert, welche während t_1 evolvieren und durch die Rückwandlungssequenz v wieder in Einzel-Quanten Kohärenzen übertragen werden. Nach dem ein 90° Puls auf die Kohlenstoffe eingestrahlt wird, kann das NMR-Signal detektiert werden. Nähere Erläuterungen im Text.

2.7.4. Auslöschen schmaler Frequenzbereiche

Um die Frage zu klären, ob bei tiefen Temperaturen die Linienverbreiterung homogener oder inhomogener Natur ist, werden schmale Frequenzbereiche eines 1D ^{13}C -Spektrum ausgelöscht. Dazu wurde entsprechend Abbildung 2-5 zunächst die ^{13}C -Magnetisierung

durch einen 90° -Puls entlang Z gespeichert und anschließend ein langer, schwacher RF-Puls mit definierter Trägerfrequenz eingestrahlt. Nach Anwendung eines weiteren 90° - ^{13}C -Pulses kann das Kohlenstoffsignal als 1D Spektrum ausgelesen werden.

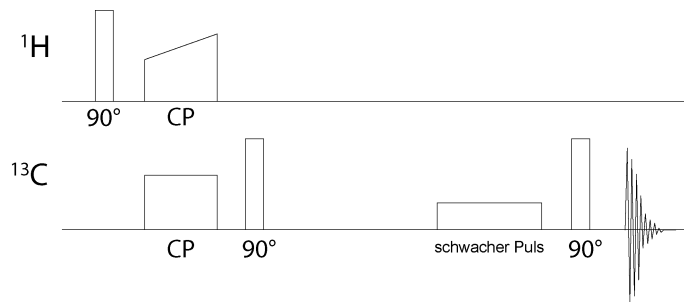


Abbildung 2-5: Pulsschema für 1D-Auslösch Experimente. Die transversale Kohlenstoff-Magnetisierung wird nach Z ausgerichtet. Durch Einstrahlen eines schwachen, langen Pulses mit definierter Träger-Frequenz wird ein begrenzter spektraler Bereich ausgelöscht. Nähere Erläuterungen; Siehe Text.

3. Ergebnisse und Diskussionen

3.1. Der Einfluss des Biradikals TOTAPOL auf die Spektrale Qualität

3.1.1. Fragestellung

Die Anwesenheit paramagnetischer Zentren beeinflusst das Relaxationsverhalten benachbarter Kerne. Die dadurch hervorgerufenen Effekte treten simultan auf und können die Spektrale Qualität sowohl positiv als auch negativ beeinflussen. Um das Potential der DNP optimal zu nutzen ist es daher notwendig, das Ausmaß der paramagnetischen Effekte in Relation zu der eingesetzten Konzentration des Biradikals zu untersuchen. Ziel dieses Abschnittes ist es, abhängig von den experimentellen Erfordernissen, Richtwerte für die Radikalkonzentration zu ermitteln und so ein Kompromiss zwischen positiven Effekten (Signalverstärkung, kürzere T_1 -Zeiten) und negativen Effekten (paramagnetische Relaxationsverstärkung, paramagnetische Verschiebung) zu erreichen. TOTAPOL ist aufgrund seiner guten Wasserlöslichkeit für die Verwendung in biologischen Proben besonders geeignet. Zudem können mit diesem Biradikal besonders hohe Polarisationsverstärkungen unter Ausnutzen des CE-Mechanismus bei hohen Magnetfeldstärken erzielt werden (siehe Abschnitt 1.3.1). Daher stellt TOTAPOL das derzeitige Agens der Wahl da, und wird im Folgenden ausschließlich behandelt.

3.1.2. Ergebnisse

Um die Auswirkungen der Konzentration des Biradikals TOTAPOL (C_T) auf die Polarisationsverstärkung und der paramagnetischen Relaxationsverstärkung zu untersuchen, wurden jeweils 25 μl einer 50 mM Lösung von uniform ^{13}C , ^{15}N -markiertem Prolin mit unterschiedlichem C_T vermessen.

Zunächst wurde für jede C_T die Spin-Gitter-Relaxationskonstante der Protonen ($^1\text{H}-T_1$) bestimmt. Dieser Wert definiert die optimale Wartezeit (d_1) zwischen zwei aufeinanderfolgenden Wiederholungen des NMR-Experiments zur Steigerung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses (S/R). Lange $^1\text{H}-T_1$ Zeiten limitieren die Anzahl möglicher Wiederholungen in einem gegebenen Zeitintervall und damit das sogenannte Signal-Zu-Rausch-Verhältnis pro Zeitintervall (SRT).

Anschließend wurden zwei Serien von 1D Spektren aufgenommen: a) Mit einer konstanten Anzahl von Experimenten (1024) innerhalb einer variablen Zeit, b) Spektren mit einer variablen Anzahl von Experimenten innerhalb einer konstanten Zeit (10 min). Die Wartezeit zwischen den einzelnen Experimenten wurde auf $1,3 * {}^1\text{H-T}_1$ gesetzt.

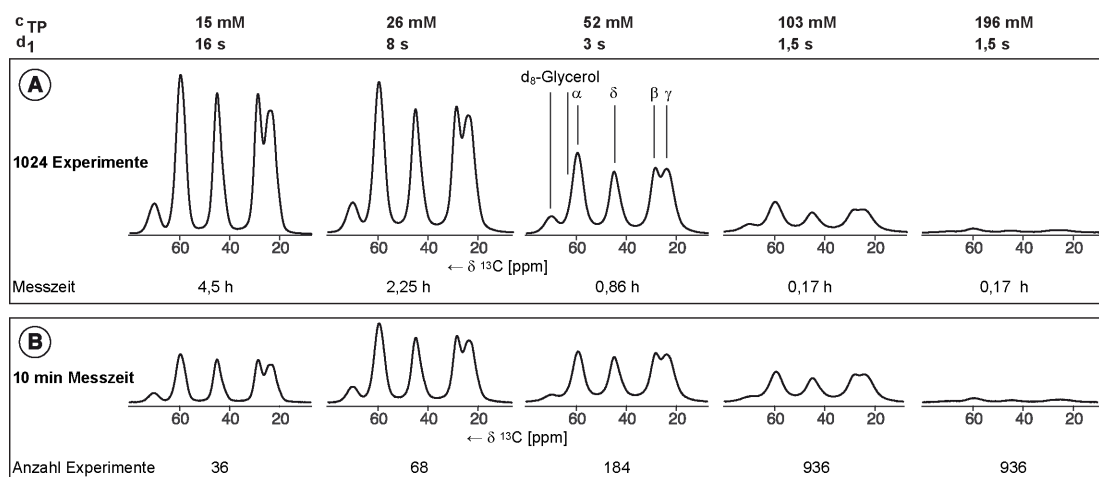


Abbildung 3-1: 1D ${}^1\text{H-}^{13}\text{C}$ CP Spektren von uniform $^{13}\text{C}, {}^{15}\text{N}$ -markiertem Prolin mit variierender TOTAPOL Konzentration, aufgenommen entweder mit (A) 1024 Experimenten und unterschiedlicher Messzeit; oder (B) mit einer maximalen Anzahl Experimente innerhalb von 10 min Messzeit. Die Wartezeit zwischen den einzelnen Experimenten wurde entsprechend der gemessenen ${}^1\text{H-T}_1$ -Zeit eingestellt ($1,3 * {}^1\text{H-T}_1$), mit Ausnahme der Probe mit 196 mM TOTAPOL (aufgrund von Hardware-bedingten Limitationen). Sämtliche Spektren wurden bei einer Proben temperatur von 100K, einer CP-Zeit von 500 μs und einer Akquisitionszeit von 25 ms aufgezeichnet. Die Spektren wurden ohne Window-Funktion prozessiert und auf gleichem Rausch-Level normiert.

Abbildung 3-1A zeigt 1D Spektren der aliphatischen Kohlenstoffe und des d_8 -Glycerols im Bereich 80 – 10 ppm, welche mit einer konstanten Anzahl von Wiederholungen aufgezeichnet wurden. Es wird deutlich, dass mit steigender C_T das S/R abnimmt. Im Gegensatz dazu zeigt Abbildung 3-1B Spektren des gleichen Bereichs, jedoch aufgenommen in einer konstanten Zeit. Aus dieser Darstellung wird deutlich, dass das SRT bei einem C_T von 26 mM ein Maximum erreicht und mit weiter steigender C_T abnimmt. Der Einfluss der Radikalkonzentration auf das SRT bzw. S/R soll durch eine detaillierte Betrachtung paramagnetischer Effekte geklärt werden.

Das Radikal reduziert signifikant die Spin-Gitter-Relaxation der Kerne. Ohne TOTAPOL beträgt die ${}^1\text{H-T}_1$ 27,8 s bei 100 K. Durch die Zugabe von 15 mM des Biradikals wird ${}^1\text{H-T}_1$ um etwa den Faktor 5 reduziert (5,4 s). Erhöhung der C_T auf 26 mM halbiert die Relaxationszeit auf 2,7 s

(Abbildung 3-2). Während bei einer Konzentration von 15 mM die optimale Wartezeit (${}^1\text{H-T}_1$) 16 beträgt, kann sie daher mit einem C_T von 26 mM auf die Hälfte reduziert werden. Dadurch können innerhalb des gleichen Zeitabschnitts (10 min) etwa doppelt so viele Experimente aufgezeichnet werden. Der Verlust an Signalintensität pro Experiment durch Steigerung der C_T auf 26 mM (Abbildung 3-1A) kann also durch den Zeitgewinn einer höheren Wiederholungsrate des Experiments kompensiert werden (Abbildung 3-1B). Eine weitere C_T -Erhöhung führt jedoch zu einer S/R-Reduzierung welche durch eine Verkürzung der Wartezeit nicht kompensiert werden kann, wodurch das SRT gleichermaßen abfällt.

Bei näherer Betrachtung der Abbildung 3-1 wird zudem deutlich, dass mit steigender C_T die spektrale Auflösung abnimmt. Während die Signale der C- β und C- γ Atome bei niedrigen Radikalkonzentrationen deutlich zu unterscheiden sind, führt bei steigender C_T eine Linienverbreiterung zu einer zunehmenden Verschmelzung beider NMR-Linien.

Bereits dieser einfache Versuch zeigt deutlich, dass die durch DNP erreichte Signalverstärkung ε allein wenig über die spektrale Qualität aussagt. Der Wert ε ist hierbei definiert als der Quotient der Signalthöhe einer bestimmten NMR-Linie mit Mikrowellenbestrahlung und ohne. Um die DNP-Effekte der einzelnen Proben besser zu vergleichen, wurde entsprechend der Definition von Ernst et al. [19] die Sensitivitäten κ der Prolin-Lösungen wie folgt berechnet:

$$\kappa = \frac{S/R}{n_A * \sqrt{T_1} * n_s * 1,3} \quad (3.1)$$

Dabei bezeichnet n_A die Menge des zu untersuchenden Materials in μmol und n_s die Anzahl der Messungen. In Abbildung 3-2B wird deutlich das bei einer C_T von über 50 mM, κ im Vergleich zu ε stärker abnimmt. Dies deutet darauf hin, dass neben der verringerten DNP-Effizienz weitere paramagnetische Effekte zum Tragen kommen, welche die Anzahl detektierbarer Kerne durch Zugabe des Radikals reduzieren.

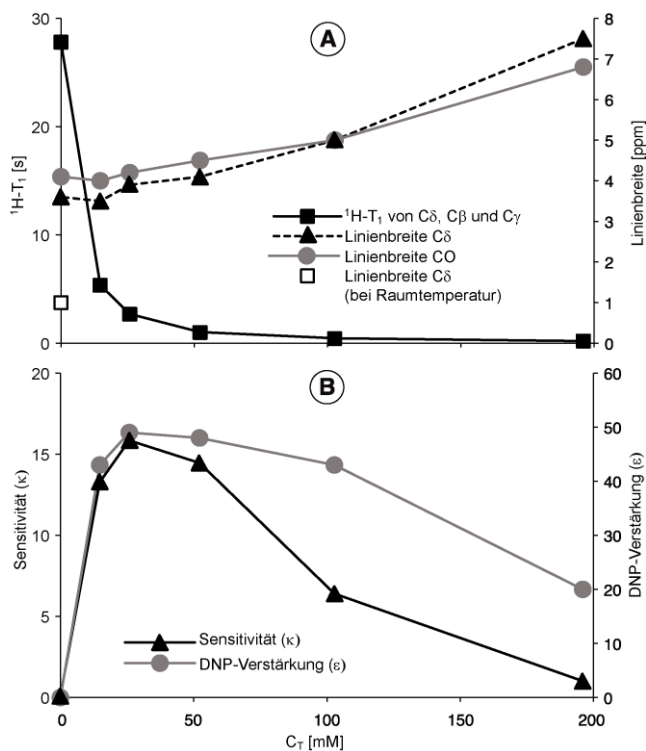


Abbildung 3-2: A. T_1 -Relaxationszeiten von Protonen (linke Achse, schwarze Quadrate) und Linienbreiten (gemessen bei halber Signalhöhe) der $\text{C}\delta$ - (rechte Achse, Dreiecke) und CO - (rechte Achse, Kreise) Signale gemessen an Proben mit 50 mM ^{13}C , ^{15}N -markiertem Prolin und unterschiedlicher TOTAPOL Konzentration C_T bei 100K; Linienbreite gemessen an 120 mg unmarkiertem Prolin bei Raumtemperatur und ohne Zugabe von TOTAPOL (Quadrat, rechte Achse); B. Sensitivität (κ , linke Achse, Dreiecke) und DNP-Verstärkung (ϵ , rechte Achse, Kreise) des Prolin- $\text{C}\delta$ Signals von 50mM ^{13}C , ^{15}N -markiertem Prolin und variierender C_T bei 100K. Sämtliche Datenpunkte wurden anhand von 1D CP Spektren gemessen, welche mit einer CP Zeit von 500 μs aufgezeichnet wurden.

Ein weiterer paramagnetischer Effekt, welcher bei der Wahl der geeigneten C_T beachtet werden muss, ist die Verkürzung der Spin-Spin Relaxation T_2 der zu beobachtenden Kerne. Wie in Abschnitt 1.1 beschrieben, ist T_2 als Verlust der transversalen Kohärenz bzw. als „Länge“ des FIDs definiert. Eine Verkürzung von T_2 bedeutet dementsprechend eine zusätzliche (homogene) Linienverbreiterung. Es sei angemerkt, dass im vorliegenden Fall einer gefrorenen Prolin-Lösung dieser Effekt maßgeblich durch inhomogene Linienverbreiterung maskiert wird. Diese resultiert aus einer Vielzahl unterschiedlicher Konformationen, welche bei tiefen Temperaturen eingefroren werden. Dennoch lässt sich bei C_T über 50 mM eine eindeutige Zunahme der Linienbreite feststellen (Abbildung 3-2A) wodurch auf eine verkürzte T_2 -Zeit geschlossen werden kann. Sowohl für eine niedrige C_T (26 mM), als auch für eine hohe C_T (196 mM) wurde die T_2 -Zeit bestimmt (siehe Abschnitt 2.7.2) bestimmt und die resultierende Mindest-Linienbreite bei halber Höhe ($w_{1/2} = 1/(\pi T_2)$) berechnet. Die aus den 1D-Spektren gemessenen Linienbreiten für diese beiden Konzentrationen (3,9 bzw. 7,5 ppm) liegen deutlich über den berechneten Linienbreiten (1,6 bzw.

5,3 ppm). Diese Differenz ist, wie bereits erwähnt, auf inhomogene Linienverbreiterung aufgrund der tiefen Temperaturen sowie auf unzureichendes elektronisches Entkoppeln (siehe Abschnitt 1.1) zurückzuführen.

Zusätzlich beeinflusst die Radikalkonzentration die Spin-Gitter-Relaxation im rotierenden Bezugssystem ($T_{1\rho}$). Diese ist der limitierende Faktor für die maximale Länge einer effizienten Kreuzpolarisation (CP, siehe Abschnitt 1.1 [14]. Da die $T_{1\rho}$ mit zunehmender Radikalkonzentration abnimmt, kann eine hohe C_T zu einem signifikanten Verlust der Signalintensität für lange CP-Schritte führen. Für Experimente mit mehreren CP-Schritten gewinnt dieser Effekt besondere Bedeutung da sich die Signalverluste multiplizieren. Um diesen Effekt zu untersuchen, wurde die CP-Effizienz in Abhängigkeit von der Länge des CP (t_{CP}) und der C_T bestimmt. Abbildung 3-3 zeigt für drei unterschiedliche C_T den Verlauf der Signalintensität in Abhängigkeit von t_{CP} . Für niedrige C_T (15 mM) erreicht die CP-Effizienz ein Maximum nach 100 μ s und bleibt im gemessenen Bereich (bis 1000 μ s) annähernd konstant. Eine Erhöhung der C_T auf 52 mM führt zunächst zu einer niedrigeren maximalen Intensität welche bei gleicher t_{CP} erreicht wird. Längere Kontaktzeiten führen zudem zu einem steten Abfall der gemessenen Signalintensität auf 63 % bei 1000 μ s. Bei sehr hohen C_T wird die maximal zu erreichende Signalintensität drastisch reduziert. Mit einer C_T von 196 mM wird diese drastisch reduzierte maximale Signalintensität bei einer Kontaktzeit von 50 μ s erreicht und sinkt bei 1000 μ s auf lediglich 6 % dieser Intensität ab.

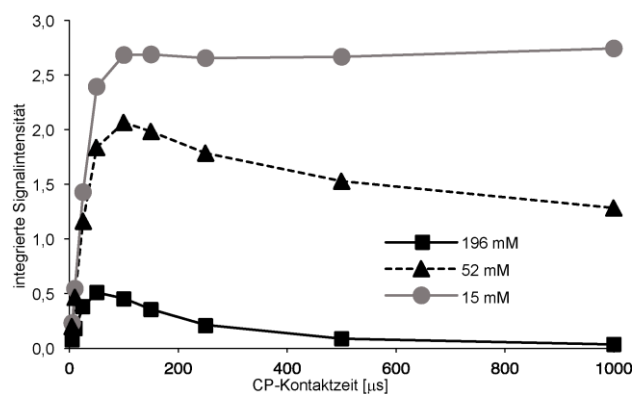


Abbildung 3-3: Effizienz der ^1H - ^{13}C Kreuzpolarisation in Abhängigkeit von unterschiedlichen Kontaktzeiten und der TOTAPOL-Konzentration (C_T). Die Integrale (linke Achse) wurden an 1D Spektren von ^{13}C , ^{15}N -markierten Prolin-Proben mit variierender C_T ermittelt, welche bei 100K aufgezeichnet wurden (jeweils 128 Experimente). Die Zeit zwischen den Experimenten (d_1) betrug jeweils $T_1 \cdot 1,3$, mit der technisch bedingten Ausnahme der höchsten C_T (196 mM), die d_1 Zeit wurde ihr höher gesetzt.

Zwei weitere Effekte führen zu einer Abnahme der spektralen Qualität bei höheren Radikalkonzentrationen: die paramagnetische Relaxationsverstärkung (paramagnetic relaxation enhancement, PRE) [27, 127, 128] sowie die Einführung paramagnetischer Verschiebungen der Protonen-Resonanzen. PRE kann zu einer massiven Signalverbreiterung von Resonanzlinien führen und dadurch deren Höhe unterhalb des Detektionslimits herabsetzen. Die paramagnetische Verschiebung der ^1H -Resonanzen kann zu einer verminderten Effektivität der Protonenentkopplung [129] und damit zu verbreiterten NMR-Linien führen. Beide Effekte werden im Folgenden zu paramagnetische Effekte (PE) zusammengefasst. Wie bereits erwähnt, wird der in der Literatur häufig verwendete DNP-Verstärkungsfaktor ε durch Skalierung eines ohne Mikrowellenbestrahlung aufgenommenen Spektrums mit einem DNP-verstärktem Spektrum ermittelt. Dadurch werden jedoch Effekte, welche beide Spektren gleichermaßen beeinflussen, nicht beachtet. Daher zeigt der in Abbildung 3-2B dargestellte Kurvenverlauf von ε in Abhängigkeit von C_T ein breites Maximum gefolgt von einem stetigen Abfall. Die Sensitivität κ andererseits, hängt von den erwähnten PE ab und fällt folglich bei steigender C_T schneller ab.

In erster Näherung führen die PE zu einem Verlust detektierbarer Kerne. Der Einfluss der paramagnetischen Zentren nimmt jedoch mit r^{-6} ab und ist daher räumlich stark begrenzt. Dennoch verursacht jedes TOTAPOL-Molekül ein kleines Volumenelement, in dem aufgrund der PE keine Resonanzen detektiert werden können. Um das Ausmaß des Signalverlustes bei unterschiedlichen C_T abzuschätzen, wurden diese einzelnen Volumina als sich überlappende Zylinder mit halbkugelförmigen Kappen (siehe Abbildung 3-4) modelliert. Mit steigender C_T füllt sich dementsprechend, bei homogener Verteilung der Moleküle, das Probenvolumen mit immer stärker überlappenden Volumenelementen V_s . Im Zentrum des Volumens befindet sich das TOTAPOL-Molekül, repräsentiert durch ein nichtüberlappendes Volumenelement V_m . Weiterhin wurde die r^{-6} Abhängigkeit der PE vereinfacht, in dem der Radius von V_s als Mindestabstand definiert wurde, innerhalb dessen keine Kerne detektiert werden können [128].

Dementsprechend berechnet sich das gesamte Volumen $V_{b,N}$, in dem keine Kerne detektiert werden können nach:

$$V_{b,N} = \sum_{i=1}^N B_i \quad (3.2)$$

wobei B_i , das Volumen des Zylinders i , wie folgt berechnet wird:

$$B_i = V_m + (V_s * a_i) \quad (3.3)$$

Hierbei ist a_i ein Korrekturfaktor welcher die Überlappung der V_s -Volumina beschreibt:

$$a_i = \left(\frac{V - (i * V_m) - \sum_{j=1}^{i-1} D_j}{V - (i * V_m)} \right) \quad (3.4)$$

wobei,

$$D_j = V_s * a_j \quad || j < i \quad (3.5)$$

Das Auffüllen des Probenvolumens mit sich überlappenden Zylindern kann, wie in Melnyk et al. beschrieben [130], vereinfacht werden:

$$V_r = V - V_{b,N} \approx V - e^{-k * c_T} \quad (3.6)$$

V_r ist dabei das verbleibende, nicht belegte, Probenvolumen und k ein zu r proportionaler Faktor.

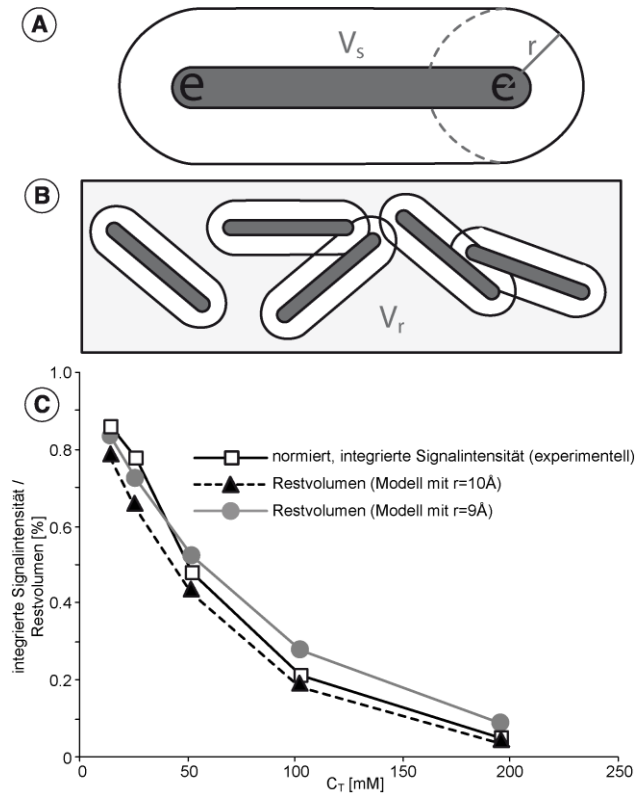


Abbildung 3-4: A. Modell des Bereiches um ein einzelnes TOTAPOL-Molekül (grau) in dem Kerne aufgrund von paramagnetischen Effekten (PE) nicht detektiert werden können (weiß); modelliert aus zwei Halbkugeln um die beiden radikalischen Zentren und verbunden durch einen Zylinder. B. Diese Bereiche können sich gegenseitig überlappen, jedoch nicht die TOTAPOL-Moleküle selbst. Das detektierbare Probenvolumen V_r wird durch Erhöhung der C_T limitiert; C. Normierte Integrale (Quadrate) der NMR-Signale gemessen an 50 mM ^{13}C , ^{15}N -markierten Prolin und unterschiedlichen C_T ; berechnetes prozentuales Restvolumen eines 3,2 mm BRUKER-Rotors bei unterschiedlicher C_T und zwei verschiedenen PE-Radii (9 Å, Kreise; bzw. 10 Å, Dreiecke) in dem Kerne detektiert werden können.

Es wurden für verschiedene Radii der entsprechende Wert von k berechnet und die so erhaltenden Funktionen gemeinsam mit den normierten Signal-Integralen gegen C_T aufgetragen (Abbildung 3-4C).

Durch einen Vergleich der Modell-Daten und der gemessenen Integrale ergibt sich, dass aufgrund der PE keine Kerne detektiert werden können, welche sich näher als 10 Å am paramagnetischen Zentrum befinden. Bei einer C_T von 50 mM reduziert sich daher das verbleibende detektierbare Volumen auf lediglich 48 % des ursprünglichen Probenvolumens. Der durch dieses Modell abgeschätzte Radius deckt sich mit anderen effektiven PRE-Abständen, welche zuvor beschrieben wurden [128].

3.1.3. Diskussion

Die Zugabe eines Radikals ist eine der Grundvoraussetzungen für die Durchführung von DNP-Experimenten. In der DNP-verstärkten Festkörper-NMR von biologischen Proben finden derzeit hauptsächlich Biradikale Anwendung (siehe Abschnitt 1.4.1). Neben der erstrebten DNP-Verstärkung beeinflussen Biradikale auf vielfältige Weise die Breiten der detektierten NMR-Signale. In der vorliegenden Arbeit wurde daher der Einfluss der Konzentration des Biradikals TOTAPOL auf die Signalbreiten von Prolin-Lösungen untersucht.

Insgesamt konnte hierbei gezeigt werden, dass eine ausreichend hohe Konzentration eine enorme DNP-Signalverstärkung ermöglicht und gleichzeitig die notwendige Wartezeit zwischen den Experimenten reduziert. Beide Effekte führen zu einer signifikanten Steigerung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses pro Zeiteinheit. Andererseits kann jedoch eine zu hohe Konzentration die spektrale Qualität signifikant verschlechtern. In biologischen Anwendungen der Festkörper-NMR werden häufig multidimensionale Spektren aufgezeichnet. Wie gezeigt wurde, werden die dafür benötigten CP-Schritte durch hohe TOTAPOL-Konzentration zunehmend ineffektiv. Der daraus resultierende Signalverlust muss daher möglichst klein gehalten werden. Daher ist es denkbar, dass die optimale Radikalkonzentration für die Aufnahme multidimensionaler Spektren unterhalb des Wertes liegt, der für 1D Spektren die höchste Sensitivität liefert. Da die hier gewonnenen Erkenntnisse am System einer einzelnen Aminosäure gewonnen wurden, muss bei der Übertragung dieser, auf komplexere biologische Proben, wesentliche Unterschiede beachtet werden. Für größere Moleküle kann es zu einer Abschirmung von Aminosäuren im inneren Kern des Moleküls kommen, wodurch negative paramagnetische Effekte minimiert werden und gleichzeitig eine effektive Polarisationsverstärkung ermöglicht wird [34]. In diesen Fällen könnte eine höhere Radikalkonzentration bessere Ergebnisse liefern.

3.2. Einfluss tiefer Temperaturen auf die spektrale Qualität

3.2.1. Fragestellung

Um einen effizienten Polarisationstransfer von Elektronen zu den Kernen zu ermöglichen, muss die T_1 -Relaxation der Elektronen stark vermindert werden. Dazu wird die Probentemperatur auf etwa 100 K während der gesamten Messung konstant gehalten. Zudem kann die Polarisierung der Kerne im äußeren Magnetfeld durch Absenken der Probentemperatur verstärkt werden (siehe Gleichung

(1.3)). Bei 95 K wird dadurch eine Signalverstärkung von 2-3, auch ohne Ausnutzung des DNP Effektes, erreicht. Weiterhin bieten tiefe Proben Temperaturen die Möglichkeit, kurzlebige Reaktionsintermediate thermisch zu stabilisieren und zu analysieren. Die durch tiefe Temperaturen stark veränderte Dynamik der zu untersuchenden Peptide und Proteine ist jedoch komplex und bislang nur unzureichend verstanden. Da jedoch tiefe Proben Temperaturen zu signifikanten Linienverbreiterungen führen können, soll im Folgenden der Einfluss tiefer Temperaturen auf die Signalbreiten einzelner Aminosäuren innerhalb der Proteindomäne SH3 (siehe Abschnitt 2.1) und des Rezeptor-gebundenen Liganden Neurotoxin II (siehe Abschnitt 2.4) analysiert werden. Für diese beiden Systeme werden sehr unterschiedliche Seitenketten-Dynamiken erwartet. Die SH3-Domäne verfügt sowohl über sehr flexible, als auch weniger flexible Bereiche, und soll hier als Modellsystem für kristalline Proben betrachtet werden. Da in diesem System ausschließlich der Einfluss tiefer Temperaturen auf die Signalbreiten untersucht werden soll und die Proben in ausreichend hoher Konzentration vorliegen, wird auf eine Zugabe des TOTAPOLs verzichtet. Im zweiten zu untersuchenden System hingegen sollte die feste Bindung des Neurotoxin II (NTII) in die Bindungstasche des Rezeptors die Mobilität nahezu aller Seitenketten drastisch reduzieren. Anhand dieses Systems soll daher geklärt werden, ob eine Reduzierung der Seitenkettendynamik helfen kann, die Signalbreiten und damit die Auflösung der aufgenommenen Spektren zu verbessern. Aufgrund der geringen Konzentration des NTII wird in diesem Fall TOTAPOL zugegeben um die DNP-Signalverstärkung nutzen zu können.

3.2.2. Ergebnisse

Um den Effekt tiefer Temperaturen auf die Qualität von NMR-Spektren zu untersuchen, wurde zunächst die SH3-Domäne des α -Spektrins bei verschiedenen Temperaturen (zwischen 295 K und 95 K) untersucht. Die Temperaturveränderungen zwischen den einzelnen Messpunkten erfolgten dabei durch langsames Abkühlen der Probe ($\sim 1^\circ/\text{min}$). Abbildung 3-5A zeigt eine Serie von 1D- ^{13}C -Spektren, welche bei jeweils unterschiedlichen Temperaturen aufgezeichnet wurden. Der Vergleich dieser Spektren zeigt deutlich, dass bei langsamer Abkühlung der Probe die spektrale Auflösung signifikant abnimmt. Während das bei Raumtemperatur (295 K, RT) aufgezeichnete Spektrum eine Auflösung aufweist, bei der sogar einige skalare Kopplungen (Abbildung 3-5B) sichtbar sind, so sind bei 95K lediglich drei breite Resonanzen sichtbar.

Der Übergang zwischen diesen beiden Extrema scheint bei langsamer Abkühlung der Probe kontinuierlich zu verlaufen und ist reversibel. Auch nach fünfmaliger Wiederholung eines Gefrier-

und Auftauzyklus kann keine Veränderung der chemischen Verschiebung oder spektralen Auflösung festgestellt werden (Abbildung 3-5A, unterstes Spektrum). Dies deutet darauf hin, dass die Struktur der Probe durch den Einfrierprozess nicht verändert wird. Die kontinuierliche Linienverbreiterung bei absinkender Temperatur weist zudem darauf hin, dass im untersuchten System kein definierter Wechsel des Aggregatzustandes (Glas-Übergang) stattfindet. Wie zu erwarten, verlangsamt sich die ^1H - T_1 -Relaxation absinkender Temperatur. Während bei RT die ^1H - T_1 -Zeit 0,5 s beträgt, erhöht sich diese auf 13 s bei 98K. Die T_1 -Zeiten wurden dabei mittels Inversionserholung (siehe Abschnitt 2.7.2) und anschließender CP (siehe Abschnitt 1.2) ermittelt.

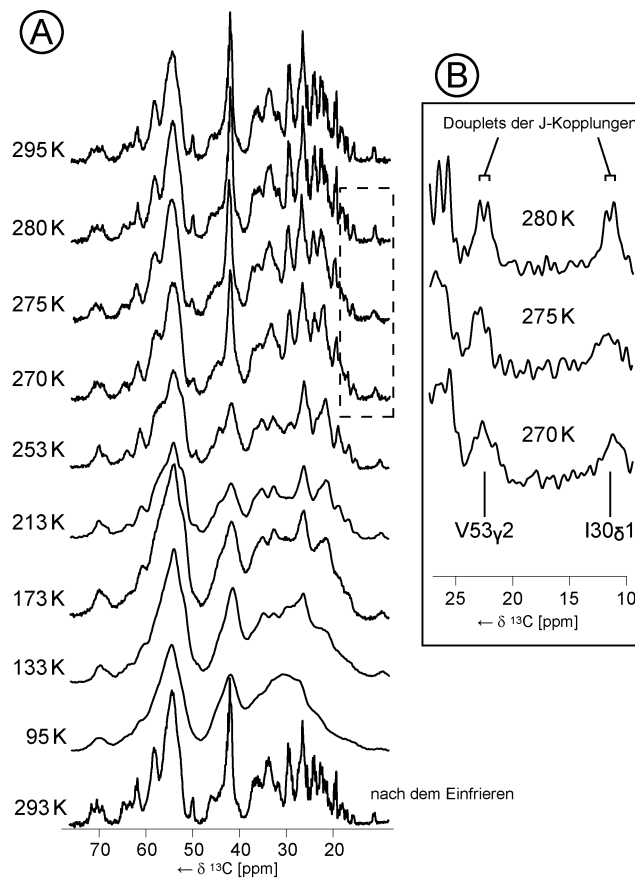


Abbildung 3-5: A. 1D ^{13}C CP Spektren von SH3 (nur aliphatische Region) bei unterschiedlichen Temperaturen; B. Für drei Temperaturen eine Vergrößerung des C δ 1-Signals von Isoleucin 30 und des C γ 2 Signals von Valin 53. Abbildung nach Linden et al. [131].

Um die Breite und Intensitäten der einzelnen Seitenketten-Signale in Abhängigkeit zur Proben­temperatur zu stellen, wurden 2D ^{13}C - ^{13}C PDS­D Spektren (Abschnitt 0) aufgezeichnet (Abbildung 3-6). Zudem lassen sich anhand der Hauptdiagonalen dieser Spektren Rückschlüsse auf die Art der Linienverbreiterung ziehen. Wie zu erwarten, verbreitern sich die einzelnen Kreuzsignale mit absinkender Temperatur so dass die spektrale Auflösung stark abnimmt.

Interessanterweise können einzelne separierte Signale identifiziert werden, welche bei tiefen Temperaturen ($< 153\text{K}$) in mehrere Signale aufgespalten werden. Die Linienbreiten der aufgespaltenen Signale ist dabei ähnlich der Signalbreite des ursprünglichen Kreuzsignals bei RT. Weiterhin lässt sich feststellen, dass die Signale der Hauptdiagonalen (Autokorrelationen) nicht verbreitert werden. Dies deutet auf eine inhomogene Verbreiterung der Kreuzsignale aufgrund einer strukturellen Inhomogenität hin. In Kombination mit der beobachteten Aufspaltung bestimmter Kreuzsignale deutet dies darauf hin, dass für die einzelnen Seitenketten jeweils Subpopulationen von SH3-Molekülen vorliegen, in denen unterschiedliche Konformation für die Dauer einer einzelnen Messung ($\sim 25\text{ms}$) bestehen bleiben. Dadurch wird eine zeitliche Mittelung aller möglichen Konformationen in diesem Zeitabschnitt verhindert. Je nach Ausmaß der Resonanzverschiebung der einzelnen Konformer zueinander tritt dadurch eine Signalaufspaltung oder -Verbreiterung auf.

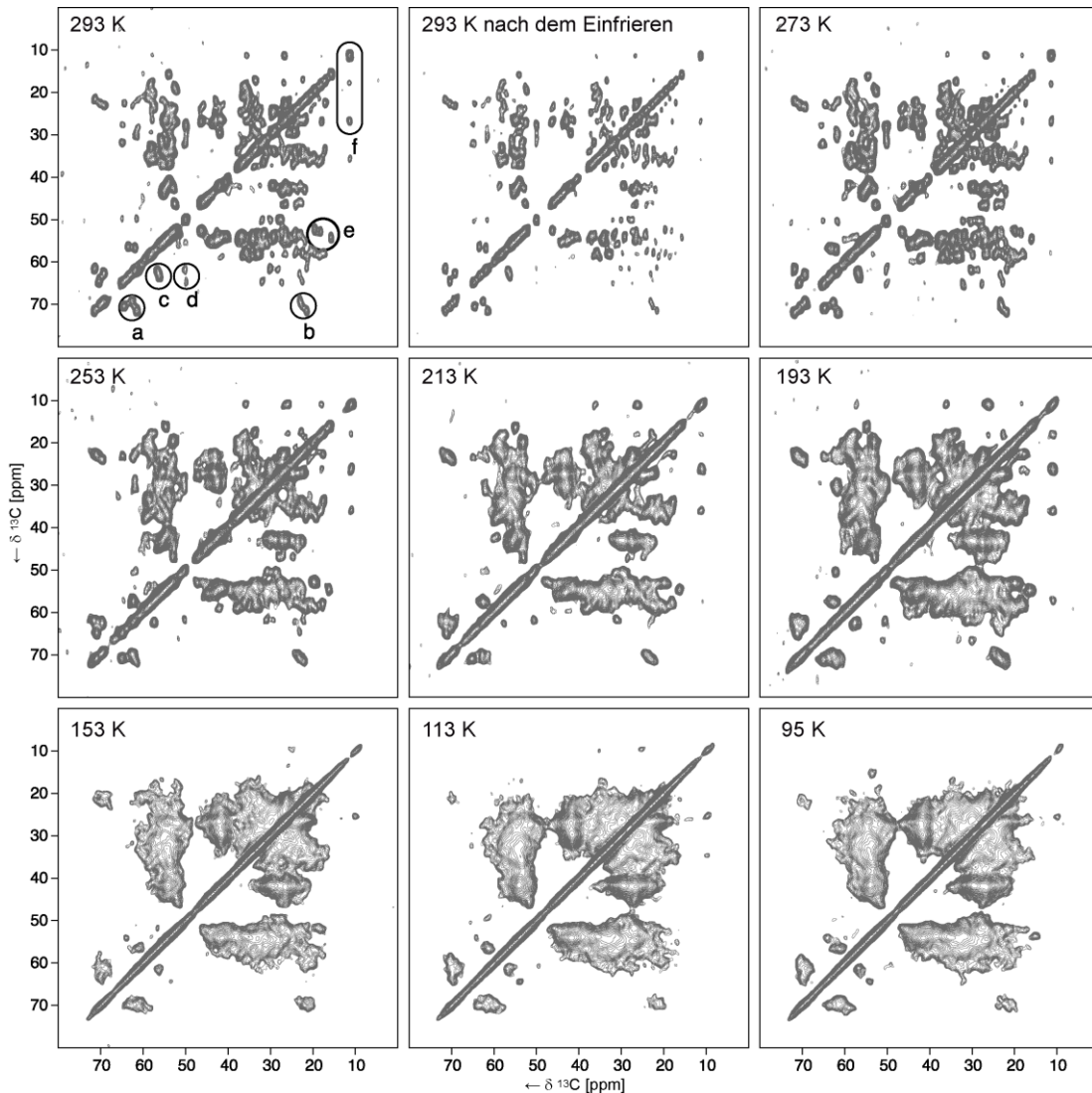


Abbildung 3-6: ^{13}C - ^{13}C PDSD Spektren von SH3, aufgenommen bei unterschiedlichen Temperaturen. Die Temperaturveränderungen zwischen den einzelnen Spektren verliefen langsam. Sämtliche Spektren wurden mit einer CP Kontaktzeit von 2 ms und einer PDSD Mischzeit von 11,25 ms aufgenommen. Im oberen linken Spektrum sind die im Text diskutierten Bereiche markiert: a) Thr C β -C α ; b) Thr C β -C γ ; c) Ser C β -C α ; d) Pro C α -C δ ; e) Ala C α -C β ; f) Ile C δ 1, C δ 1-C γ 2, C δ 1-C γ 1. Das Basislevel der Spektren wurde auf das Sechsfache des Rauschens gelegt. Abbildung nach Linden et al. [131].

Die beschriebene Signalaufspaltung und -Verbreiterung bei tiefen Temperaturen führt zu einer starken Überlagerung von Signalen in großen Teilen des Spektrums. Um dennoch eine Seitenkettenspezifische Analyse dieses Vorgangs durchzuführen, wurden besonders separierte Bereiche des Spektrums ausgewählt, in denen bei RT gut aufgelöste Signale aufgezeichnet werden können. Diese sind die Threonin (T24, T32, T37) C β -C α und C β -C γ , die Serin (S19, S36) C β -C α , die

Prolin (P20, P54) $C\alpha$ - $C\delta$, sowie die Alanin (A11, A55, A56) $C\alpha$ - $C\beta$ -Kreuzkorrelationen. Zudem wurde das $C\delta$ -Diagonalsignal und das $C\gamma$ - $C\delta$ -Kreuzsignal von Isoleucin I30 analysiert.

Die ersten drei Spalten in Abbildung 3-7 zeigen die $C\beta$ -CO, $C\beta$ - $C\alpha$ und $C\beta$ - $C\gamma$ Kreuzsignale von T24, T32 und T37. Das vierte Threonin (T4) ist im untersuchten Temperaturbereich nur bei RT und unter direkter ^{13}C -Anregung, jedoch nicht in CP Experimenten sichtbar. Obwohl T4 in der folgenden Analyse vernachlässigt wird, ist es nicht auszuschließen, dass T4 insbesondere bei tiefen Temperaturen die gemessenen Signalintensitäten und -Breiten beeinflusst. Insgesamt zeigen die detektierbaren Threonine eine Zunahme der Linienbreite bei sinkender Temperatur, und schließlich eine Signalaufspaltung. Die Signale von T37 werden jedoch in geringerem Maße und bei tieferen Temperaturen im Vergleich zu den verbleibenden zwei Threoninen verbreitert.

In der vierten Spalte von Abbildung 3-7 sind die $C\alpha$ - $C\gamma$ Signale der beiden Proline dargestellt. Die Kreuzsignale sind bei RT als separierte Punkte sichtbar. Bei 235 K verschwindet das Signal von P20 während das von P54 unverändert bleibt. Nach Abkühlung auf 153 K verschwindet jedoch auch dieses Signal und erscheint erneut im Spektrum ab 113 K. Zudem zeigt sich bei 95 K eine Signalaufspaltung.

In Spalte 5 von Abbildung 3-7 sind die $C\alpha$ - $C\beta$ -Kreuzsignale von A11, A55 sowie A56 abgebildet. Von diesen bei RT separierten Signalen verschmelzen bei 253 K die Signale von A11 und A56 zu einem breiten Signal, welches bis 153 K detektierbar bleibt, bei 113 K verschwindet und schließlich bei 95 K als mehrere individuelle Signale zurückkehrt. Das Signal von A55 bleibt bis 193 K detektierbar, verschwindet bei 113 K und erscheint als Signal-Duplett bei 95 K.

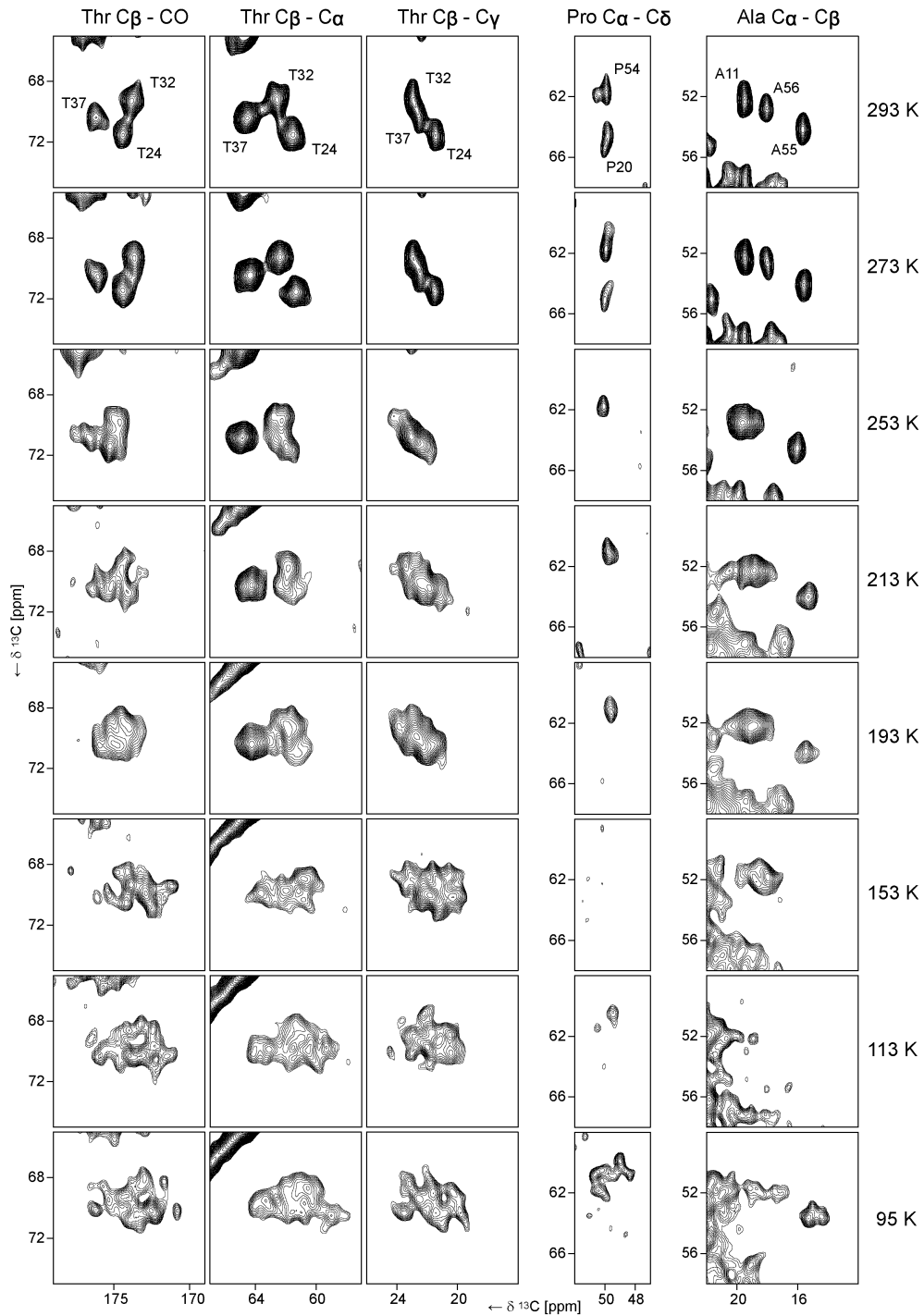


Abbildung 3-7: ^{13}C - ^{13}C PDSD Spektren der Seitenketten-Regionen von Threonin, Prolin und Alanin bei unterschiedlichen Temperaturen. Abbildung nach Linden et al. [131].

Die Isoleucin-Signale (Abbildung 3-8) können über den gesamten Temperaturbereich detektiert werden, wobei Temperaturen unter 193 K zu einer zunehmenden Signalaufspaltung führen. Signale der aromatischen Seitenketten zeigen bei langsamer Abkühlung der Probe eine bemerkenswerte

3.2. Einfluss tiefer Temperaturen auf die spektrale Qualität

Zunahme der Signalintensitäten, welche jedoch mit einer Zunahme der Signalbreite verbunden ist (Abbildung 3-9).

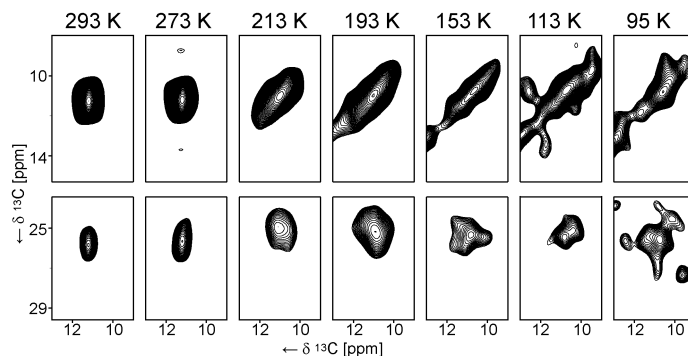


Abbildung 3-8: ^{13}C - ^{13}C PDSD Spektren der $\text{C}\delta 1$ -Autokorellationssignale (obere Zeile) und der $\text{C}\gamma 1$ - $\text{C}\delta 1$ -Kreuzsignale von Isoleucin bei unterschiedlichen Temperaturen. Abbildung nach Linden et al. [131].

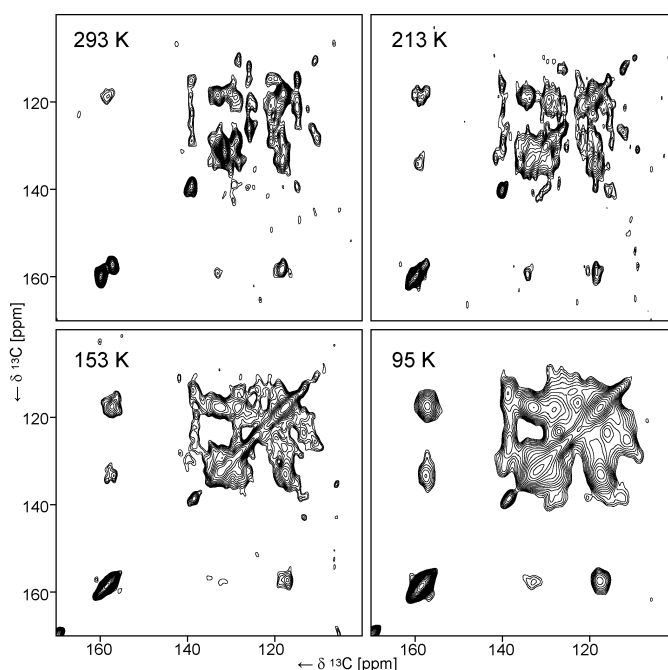


Abbildung 3-9: ^{13}C - ^{13}C PDSD Spektren der aromatischen Region bei unterschiedlichen Temperaturen. Die Spektren wurden mit einer CP Kontaktzeit von 2 ms und einer PDSD Mischzeit von 11,25 ms aufgenommen. Abbildung nach Linden et al. [131].

Die beschriebene Veränderung der gemessenen NMR-Signale kann auf eine unterschiedliche Dynamik der beteiligten Gruppen bei der jeweiligen Messtemperatur zurückgeführt werden. Generell können in der NMR drei unterschiedliche Geschwindigkeitsbereiche in Bezug auf die Akquisitionszeit unterschieden werden. Sehr schnelle Konformationsänderungen, wie sie z.B. bei aliphatischen Gruppen auftreten, interferieren nicht bzw. vernachlässigbar mit der NMR-Messung,

da sie im Verlaufe einer Messung ausgemittelt werden. Diese Prozesse können mittels NMR nicht zeitaufgelöst analysiert werden. Eine intermediäre Dynamik hingegen kann dazu führen, dass während der Messung Subpopulationen der entsprechenden Gruppe vorliegen, welche unterschiedliche Konformationen aufweisen und dadurch zu verbreiterten Signalen oder Signalaufspaltungen führen. Prozesse mit einer langsamen Dynamik können zu unterschiedlichen, separierten Signalen führen, werden also als unterschiedliche Zustände detektiert.

Die Dynamik der aromatischen Ringe besteht im Wesentlichen aus einem Springen des Ringes zwischen zwei Konformationen und kann bei RT als intermediäre Dynamik beschrieben werden. Diese kann in schlecht detektierbare, breite Signale resultieren. Bei 95 K kann eine langsame Dynamik vorliegen und so beide Konformationen über die Dauer der Signalaufzeichnung bestehen bleiben. Dadurch kann die Signalintensität zunehmen und unter Umständen zwei separierte Signale detektiert werden. Die drei Tyrosin-Reste zeigen beispielsweise sechs unterschiedliche Signale bei 95 K. Zudem kann durch die verlangsamte Dynamik die Effizienz des CP-Transfers und damit die Signalintensität verbessert werden [132].

Die bei RT gut aufgelösten Ala C α -C β sowie Pro C α -C γ -Signale hingegen werden durch eine schnelle Dynamik charakterisiert. Je nach strukturellen Kontext innerhalb des SH3-Moleküls verbreitern sich die Signale bei absinkender Proben temperatur aufgrund eines Übergangs in eine intermediäre Dynamik. Beim Erreichen einer positionsabhängigen Koaleszenz-Temperatur (253 K für P20, 153 K für A55 und P54, bzw. 113 K für A11 und A56) kommt es dann zu einem Verschwinden der Signale. Eine weitere Temperaturniedrigung resultiert führt zu einem Übergang zur langsamen Dynamik und damit zum Wiederauftauchen der Signale, welche dann als Multipletts vorliegen. Für die Thr C β -C, C β -C α und C β -C γ -Signale konnte bei den gemessenen Temperaturen keine Verschwinden der Signale, jedoch eine signifikante Linienverbreiterung und Signalaufspaltung gezeigt werden. Auch hier scheint als Ursache ein Übergang in eine intermediäre bis langsame Dynamik vorzuliegen.

Um die Argumentation, Signalverbreiterungen bei tiefen Temperaturen resultieren aus einer strukturellen Inhomogenität, zu stützen, wurden zusätzlich Signal-Auslöschungs-Experimente durchgeführt (siehe Abschnitt 2.7.4). Unabhängig von der Proben temperatur oder der Wahl des Frequenzbereiches wiesen alle „Löcher“ in Abbildung 3-10 vergleichbare Tiefen und Breiten auf. Dies unterstützt die Annahme einer vorrangig inhomogenen Linienverbreiterung: Die Signalbreite resultiert aus einer Überlagerung vieler dicht beieinanderliegender individueller Signale. Das

Einstrahlen mit einem schwachen Puls innerhalb eines schmalen Frequenzbereiches löscht nur die Signale innerhalb dieses Frequenzbereiches aus.

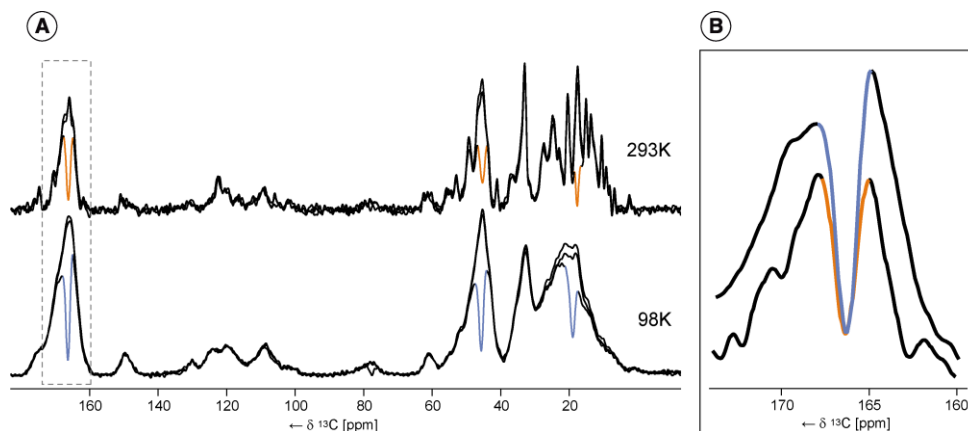


Abbildung 3-10: A. Überlagerung von jeweils drei ^1H - ^{13}C CP Spektren bei einer Proben­temperatur von 293 K und 98 K. Nach dem CP Transfer wurde die ^{13}C Magnetisierung durch einen 90° Puls entlang der Z-Achse gespeichert und anschließend ein schwacher, jedoch langer 180° Puls (10 ms) mit jeweils unterschiedlicher ^{13}C -Trägerfrequenz eingestrahlt. Die entstehenden „Löcher“ sind orange (293 K) bzw. blau (98 K) gefärbt. B. Detailansicht der Carbonylregion. Abbildung nach Linden et al. [131].

Ein weiterer möglicher Einfluss auf die Linienbreite wäre eine unzureichende Protonenentkopplung (siehe Abschnitt 0). Diese Möglichkeit ergibt sich aus der reduzierten Dynamik der Seitenketten, welche dadurch im gleichen Frequenzbereich wie die Protonenentkopplung liegen kann. Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurde eine SH3-Probe verwendet, in der das ^1H -Netzwerk durch Deuterierung aufgebrochen wurde. Dazu wurde zunächst vollständig deuteriertes SH3 exprimiert und dieses in protonierten Puffer gelöst. An den Lösungsmittel-exponierten Seitenketten kommt es dadurch zu einem Austausch zwischen Deuteronen und Protonen. Abbildung 3-11 zeigt ein ^{13}C - ^{13}C -Spektrum des deuterierten SH3, gemessen bei 95 K. Ein Vergleich mit Abbildung 3-6 zeigt, dass durch die Deuterierung zwar weniger Kreuzsignale detektiert werden, diese jedoch in ihrer Linienbreite unverändert bleiben. Dadurch kann eine ineffektive Protonenentkopplung auch für die vollständig protonierte Probe ausgeschlossen werden.

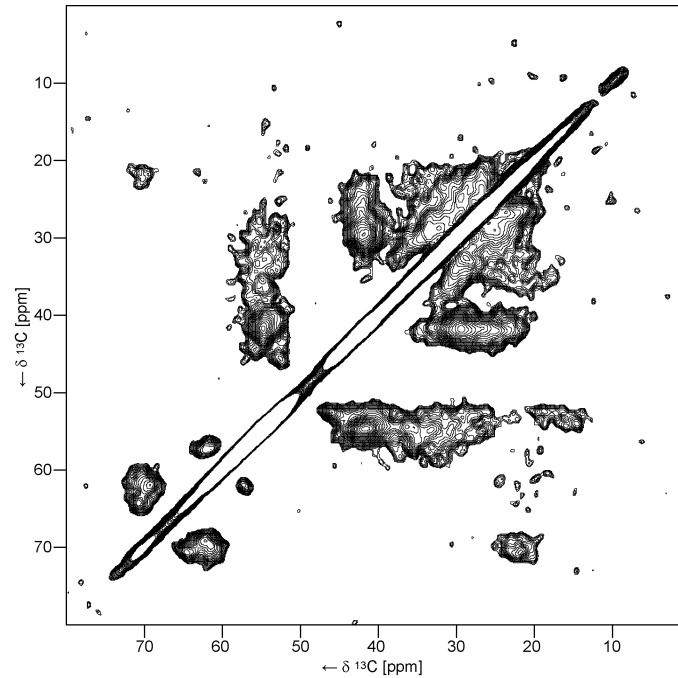


Abbildung 3-11: ^{13}C - ^{13}C PDSD Spektrum von deuteriertem SH3 bei 95K. In dieser Probe sind nur die austauschbaren Positionen protoniert. Aufgrund der geringeren Anzahl an Protonen ist das Signal-zu-Rausch-Verhältnis im Vergleich zu vollständig protonierten Proben geringer. Die homogene Linienverbreiterung ist jedoch sehr ähnlich. Das Spektrum wurde mit einer CP Kontaktzeit von 3 ms und einer PDSD Mischzeit von 50 ms aufgenommen. Abbildung nach Linden et al. [131].

Wie bereits erwähnt, hängt die Dynamik einzelner Aminosäuren innerhalb des Proteins nicht nur von ihren Seitenketten, sondern auch von der jeweiligen Position im Molekül ab. Bei einer vorrangig inhomogenen Linienverbreiterung sollten die unterschiedlichen Koaleszenz-Temperaturen gleicher Aminosäuren an unterschiedlichen Positionen den jeweiligen strukturellen Kontext widerspiegeln. Die Spalten 1-3 in Abbildung 3-7 zeigen Kreuzsignale von drei der vier Threonine des SH3. Das vierte Threonin (T4) ist selbst bei RT in einem CP-Experiment nicht detektierbar. Bei einer Temperatur von 213 K können keine der Kreuzkorrelationen eindeutig T24 zugeordnet werden. Offensichtlich koalesziert also T24 zwischen 253 K und 213 K. Das $\text{C}\beta$ - $\text{C}\gamma$ -Signal von T32 verschwindet bei Temperaturen unterhalb von 273 K, wohingegen dessen $\text{C}\beta$ - CO -Signal bei 253 K und das $\text{C}\beta$ - $\text{C}\alpha$ -Signal erst bei 213 K verschwindet. Die Koaleszenz-Temperatur für T32 ist dementsprechend etwa 246 K. Für T37 ergibt sich eine durchschnittliche Koaleszenz-Temperatur von 200 K ($\text{C}\beta$ - Co : 253 K, $\text{C}\beta$ - $\text{C}\alpha$: 193 K und $\text{C}\beta$ - $\text{C}\gamma$: 153 K). Insgesamt ergibt sich also folgende Reihenfolge der Threonine, entsprechend ihrer Koaleszenz-Temperatur: T24 (253 K) > T32 (246 K) > T37 (220 K).

Eine Analyse der in Abbildung 3-12 dargestellten Kristallstruktur von SH3 (PDB-Eintrag: 1U06, Chevelkov et al. [133]) deutet auf einen klaren Zusammenhang zwischen der Flexibilität bzw. der Dynamik und der Koaleszenz-Temperatur hin. T4, welches selbst bei RT nicht detektierbar ist liegt in einer sehr mobilen Schleife. T24 befindet sich ebenfalls in einer Schleife, wohingegen T32 in einem β -Strang lokalisiert ist und über eine Wasserstoffbrücke mit N38 eines angrenzenden SH3-Moleküls verbunden ist. T32 ist daher Teil eines Wasserstoffbrücken-Netzwerkes, wodurch dessen Flexibilität eingeschränkt wird. Das Threonin mit der niedrigsten Koaleszenz-Temperatur (T37) ist Teil einer Schleifenstruktur aber auch eines Kristallkontaktes. Zudem befindet sich T37 in einer Tasche der Hydrationshülle eines benachbarten SH3-Moleküls. Weiterhin unterscheidet sich T37 von den anderen beiden detektierbaren Threoninen durch den Winkel $\chi_1 = +59^\circ$, den C α und C β zueinander einnehmen, wohingegen χ_1 von T32 -65° und von T24 -66° beträgt [133]. Daher ist die Methylgruppe von T37 dichter am NH, als am CO des Proteinrückrads, wodurch die Beweglichkeit der Seitenkette stärker eingeschränkt wird. Ein weiterer Indiz für einen Zusammenhang zwischen Flexibilität und Linienverbreiterung bietet der Vergleich der in der Röntgen-Kristallographie verwandten Debye-Waller-Faktoren (im Folgendem als *B*-Wert bezeichnet)[134, 135] der einzelnen Aminosäuren. Ein kleiner *B*-Wert deutet dabei auf eine geringe Flexibilität hin. Der *B*-Wert von T37 (9,81) ist deutlich niedriger als die *B*-Werte von T24 und T32 (12,02 bzw. 14,15). Insgesamt spiegelt demnach die Reihenfolge der Threonine entsprechend ihrer Seitenkettenflexibilität, die Reihenfolge ihrer Koaleszenz-Temperaturen wieder.

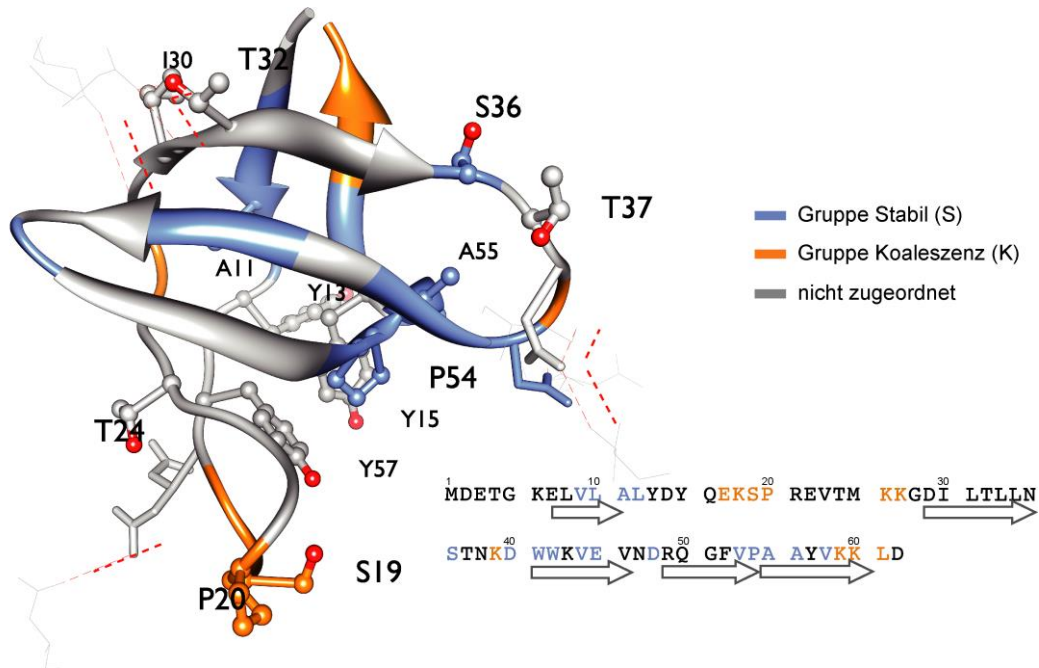


Abbildung 3-12: Kristallstruktur von SH3 (PDB-Eintrag: 1U06, Chevelkov et al.[133]), die einzelnen Aminosäuren sind entsprechend des Verhaltens der entsprechenden NMR-Signale bei tiefen Temperaturen gefärbt; Aminosäuren deren Signale zwischen 193 und 213 detektierbar sind: blau, Aminosäuren deren Signale in diesem Bereich verschwinden: orange, alle weiteren: grau. Die Primärsequenz von SH3 unten links zeigt die selbe Farbcodierung, die Pfeile deuten β -Stränge an. Abbildung nach Linden et al. [131].

Eine ähnliche Analyse lässt sich für die beiden Prolinen durchführen. P20 (B -Wert: 14,58) befindet sich in einer Schleife, welche zwischen zwei Tyrosin-Resten eines benachbarten SH3-Moleküls liegt. Die hohe Flexibilität dieser Schleifenstruktur in Verbindung mit den vielen unterschiedlichen Konformationen des Prolins und der benachbarten Tyrosin-Reste zueinander, ergibt eine Vielzahl magnetisch unterschiedlicher Zustände in der sich P20 befinden kann. Dies kann als Ursache der relativ hohen Koaleszenz-Temperatur (273 K) interpretiert werden. Im Gegensatz dazu, befindet sich die Seitenkette von P54 (B -Wert: 12,18) zum Proteinkern gerichtet und liegt in einem β -Strang. Das Signal von P54 verschwindet daher erst bei 193 K und erscheint unterhalb von 113 K wieder im Spektrum. Dies bedeutet, sehr tiefe Temperaturen verursachen hier ein Übergang von einer intermediären Dynamik in eine langsame Dynamik.

Die Signale der drei Alanine zeigen eine ähnliche Temperaturabhängigkeit wie P54. A11 befindet sich in der Mitte eines β -Stranges während sich A55 und A56 zwischen zwei β -Strängen befinden. Die Koaleszenz-Temperaturen der $C\alpha$ - $C\beta$ -Signale sind dementsprechend niedrig (153 K für A55 und A56, 113 K für A11). Auch hier zeigt sich eine Wiederkehr der Signale in Form von Multiplets bei sehr tiefen Temperaturen (95 K).

Neben den eben beschriebenen Threonin-, Prolin und Alanin-Signalen können einige weitere Signale über einen Temperaturbereich von 293 bis 213 K verfolgt werden. Aufgrund der möglichen Überlappung von nahe beieinander liegenden Kreuzsignalen, lassen sich jedoch nur 26 Reste eindeutig zuordnen und über diesen Temperaturbereich verfolgen. Diese 26 Aminosäuren wurden in zwei Gruppen aufgeteilt. Kann das entsprechende NMR-Signal über den gesamten Temperaturbereich von 293 bis 213 K mit einem S/R von mindestens 6 beobachtet werden, wurde diese Aminosäure der Gruppe 1 (G1) zugeordnet. Alle anderen, d.h. über dem gesamten Bereich eindeutig identifizierbare Signale, wurden der Gruppe 2 (G2) zugeordnet. Diese Aminosäuren müssen jedoch nicht konstant mit einem S/R von mindestens 6 detektierbar sein. Anschließend wurde das Ergebnis auf die Struktur des SH3-Moleküls [133] (PDB:1U06) übertragen (Abbildung 3-12).

Interessanterweise befinden sich sämtliche 16 Aminosäuren von G1 entweder direkt in β -Strängen oder nur eine Position davon entfernt (Abbildung 3-12, blaue Bereiche). Im Gegensatz dazu befinden sich die 10 Aminosäuren der G2 vorrangig in Schleifen (Abbildung 3-12, orangene Bereiche). Ausnahmen sind dabei K59 und K60, welche zwar in einem β -Strang, jedoch nahe des C-terminus lokalisiert sind. Auch hier zeigt sich ein eindeutiger Zusammenhang zwischen sinkender Signalintensität (bzw. zunehmender Signalverbreiterung) und der Dynamik einzelner Seitenketten: Signale besonders flexibler Seitenketten, z.B. in Schleifenregionen, koaleszieren bereits bei relativ hohen Temperaturen aufgrund des Überganges zu einer intermediären Dynamik. Ein Vergleich der durchschnittlichen B -Werte der Seitenketten (d.h. ohne N, CO, und $C\alpha$) von G1 und G2 zeigt auch hier eine direkte Korrelation zwischen Flexibilität und Koaleszenz-Temperatur: Während die Seitenketten von G2 mit einem B -Wert von 19,81 (+/- 3,8) in der Röntgenstruktur flexibel erscheinen und bei höheren Temperaturen in NMR-Spektren koaleszieren, sind G1 Seitenketten mit einem durchschnittlichen B -Wert von 14,91 (+/- 3,7) weniger flexibel und verschwinden erst bei niedrigeren Temperaturen aus dem Spektrum. Einen weiteren Einfluss auf die Koaleszenz-Temperatur einzelner Seitenketten kann die Exposition dieser gegenüber dem Lösungsmittel haben. Dieser Effekt lässt sich jedoch schwer von der strukturellen Flexibilität trennen, da sich naturgemäß Lösungsmittel-exponierte Seitenketten auf der Oberfläche des Proteins befinden und damit in der Regel flexibler sind als Seitenketten im Kern des Proteins.

Als nächstes wurde der Ligand NTII, gebunden an einem nikotinergen Acetylcholin-Rezeptor innerhalb nativer Membranen untersucht. NTII bindet im pikomolaren Bereich [121], wodurch ein sehr stabiles Rezeptor-Ligand-System hergestellt werden kann, in dem die Seitenkettendynamik

des Liganden stark eingeschränkt ist. Der Rezeptor wurde aus dem elektrischen Organ des Kalifornischen Zitterrochens (*Torpedo californica*) gewonnen [122]. Da in diesem Gewebe die Dichte der Rezeptoren sehr hoch ist, kann nAChR ohne weitere Aufreinigung hoch konzentriert isoliert werden (siehe Abschnitt 2.4). Die Struktur des 62 Aminosäuren langen NTII wurde mittels Lösungs-NMR gelöst und ist über den PDB Eintrag 1NOR abrufbar [120]. Zudem wurden am FMP bereits umfangreiche Untersuchungen an nAChR-gebundenem NTII mit Hilfe konventioneller Festkörper-NMR durchgeführt, einschließlich der Zuordnung der meisten Signale [121, 136].

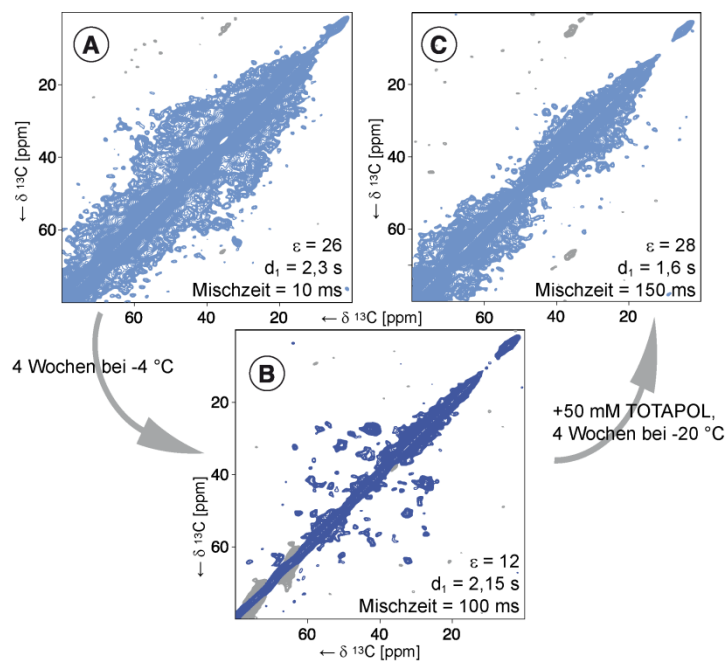


Abbildung 3-13: Bei tiefen Temperaturen und mit DNP-Verstärkung aufgezeichnete 2D ^{13}C - ^{13}C PDSD Spektren von $[2\text{-}^{13}\text{C}]$ Glycerol-markiertem NT II gebunden an nAChR mit **A.** 50 mM (0,625 mmol) TOTAPOL; **B.** nach Lagerung der Probe für 4 Wochen bei 253 K; **C.** nach Auftauen der Probe und erneuter Zugabe von 0,625 mmol. Neben der PDSD Mischzeit und der Wartezeit zwischen den Experimenten ist in den Spektren die DNP Signalverstärkung (ermittelt durch den Vergleich von 1D CP Spektren) angegeben. Abbildung nach Linden et al. [137].

Für die bei tiefen Temperaturen und mit DNP-Verstärkung aufgezeichneten Spektren wurde eine Probe der nAChR-haltigen nativen Membranen, welche mit $[2\text{-}^{13}\text{C}]$ Glycerol-markiertem NT II inkubiert wurden, aus einem NMR-Rotor entfernt. Anschließend wurde diese mit 50 mM TOTAPOL versetzt und wieder in den Rotor überführt. Die so entstandene Probe zeigte ein zunächst unerwartetes Verhalten: Das direkt nach der Probenpräparation aufgenommene Spektrum (Abbildung 3-13A) deutlich inhomogen verbreiterte Kreuzsignale sowie die für homogene Signalverbreiterungen typische breite Hauptdiagonale auf. Nachdem die Probe jedoch für vier

Wochen bei 253 K gelagert wurde, zeigt das aufgezeichnete 2D-Spektrum (Abbildung 3-13B) eine deutliche Abnahme der Signalverbreiterungen (Abbildung 3-13B). Auftauen der Probe, Zugabe von weiteren 0,625 mmol TOTAPOL und erneutes Einfrieren, führten abermals zu starken Signalverbreiterungen, sowohl der Kreuzsignale als auch der Hauptdiagonalen (Abbildung 3-13C). In ähnlicher Weise veränderten sich dabei die zu beobachtenden DNP-Signalverstärkungen von $\varepsilon = 26$ direkt nach der Präparation, auf $\varepsilon = 12$ nach vier Wochen und schließlich eine Erhöhung auf $\varepsilon = 28$ nach der erneuten TOTAPOL-Zugabe.

Da die Spektren, welche direkt nach der Zugabe von TOTAPOL aufgezeichnet wurden (Abbildung 3-13 (A und C)), verbreiterte Hauptdiagonalen zeigen, scheinen in diesen Fällen die paramagnetischen Effekte des Biradikals eine wesentliche Rolle zu spielen. Über das Ausmaß der durch die Tief-Temperatur bedingten inhomogenen Signalverbreiterungen kann an diesen Spektren jedoch keine Aussage getroffen werden. Das Spektrum in Abbildung 3-13B hingegen, zeigt eine schmale Hauptdiagonale. Hier führt als offensichtlich die Lagerung bei 253 K zu einer Abnahme der paramagnetischen Effekte auf die beobachteten NTII-Signale. Eine mögliche Ursache wäre eine chemische Inaktivierung der TOTAPOL-Moleküle welche sich an der Membran- bzw. Proteinoberfläche befinden, z.B. durch Reaktion mit den Thiolgruppen der Cysteine [138]. Dies würde zudem die reduzierte DNP-Signalverstärkung nach der Lagerungsphase erklären. Das Auftauen der Probe und die Zugabe von TOTAPOL führen dementsprechend zu einem Austausch der aktiven und der inaktivierten TOTAPOL-Moleküle an der Membran, wodurch der Ausgangszustand wiederhergestellt wird. Eine weitere Deaktivierung kann aber durch die begrenzte Konzentration von Reaktionspartnern in der Membran oder dem Protein nur zum Teil erfolgen.

Durch die verminderten paramagnetischen Einflüsse, kann in Abbildung 3-13B folglich das Ausmaß der inhomogenen Signalverbreiterungen weitgehend isoliert betrachtet werden. Die relativen scharfen Kreuzkorrelationen weisen dabei auf eine verminderte Flexibilität der Seitenketten hin. Tatsächlich ist der größte Teil des NTII innerhalb der nAChR-Bindungstasche lokalisiert. Die beobachteten relativ schmalen Linienbreiten können daher aus einer stark reduzierten Mobilität großer Teile des NTII resultieren.

3.2.3. Diskussion

Um einen effektiven Polarisationstransfer von Elektronen auf Atomkerne zu ermöglichen, werden DNP-Experimente in der Festkörper-NMR bei tiefen Temperaturen durchgeführt (siehe Abschnitt 1.4.2.). Die Proben temperatur beeinflusst dabei maßgeblich sowohl die Stärke als auch die Form des detektierten NMR-Signals. Prinzipiell gilt, dass die Relaxation mit abnehmender Temperatur verlangsamt und somit die Effektivität eines möglichen Polarisationsstranfers auf Atomkerne verstärkt wird. Zudem verstärken tiefe Temperaturen entsprechend der Boltzmann-Gleichung (Gleichung (1.3) in Abschnitt 1.1.) die Polarisierung der Atomkerne und damit die Sensitivität sowohl von konventionellen als auch von DNP-verstärkten NMR-Experimenten. Gleichzeitig können tiefe Temperaturen wesentlich die detektierten Signalbreiten beeinflussen. Um diesen zu analysieren wurden in dieser Arbeit die Signalbreiten einzelner Seitenketten des SH3 bei unterschiedlichen Temperaturen gemessen.

Insgesamt kann dabei festgestellt werden, dass sich NMR-Signale von Aminosäuren in flexiblen Regionen bereits bei höheren Temperaturen verbreitern und somit schneller unterhalb des Detektionslimits fallen. Die Linienverbreiterung wird dabei durch inhomogene Prozesse dominiert und beeinflusst signifikant die spektrale Qualität. Hierbei muss jedoch festgestellt werden, dass dieser Effekt zwar die Interpretation von NMR-Daten, welche bei tiefen Temperaturen aufgezeichnet wurden, erschwert, zugleich aber ein Zugewinn an Informationen bedeutet. Wäre es möglich, z.B. unter Verwendung stärkerer Magnete, die einzelnen aufgespaltenen Signale zu detektieren, so könnte damit eine Vielzahl von Informationen über den molekularen Aufbau und unterschiedlichen Freiheitsgraden von Atomgruppen innerhalb eines Proteins gewonnen werden.

Insbesondere für die Anwendung der DNP auf biologische Proben wurden und werden große Anstrengungen unternommen, die Signalverbreiterung bei tiefen Temperaturen zu minimieren. Eine Möglichkeit besteht darin, DNP bei höheren Temperaturen durchzuführen. Jedoch wird bei sämtlichen derzeitig verwendeten Radikalen ein drastischer Verlust der DNP Verstärkung bei minimaler Erhöhung der Temperatur beobachtet. Neue Radikale, mit einer intrinsisch längeren Elektronen-Relaxation könnten helfen, diese Probleme einzuschränken. Weiterhin wurden Versuche unternommen durch besonders schnelles oder besonders langsames Einfrieren die Signalverbreiterung zu minimieren, bislang jedoch erfolglos. Problematisch erscheint dabei die geringe Energiedifferenz zwischen zwei magnetisch inäquivalenten Konformationen für die

meisten Seitenketten. Selbst bei 95 K werden dynamische Prozesse nicht vollständig gestoppt, sondern laufen mit einer intermediären Geschwindigkeit ab. Das Auftreten der Aufspaltung in schmale Einzelsignale bestimmter Seitenketten bei tiefen Temperaturen deutet auf einen Übergang zu einer langsamen Dynamik hin. Bei Proben Temperaturen weit unterhalb der 95 K könnte dies auch für flexible Seitenketten eintreten und damit eine deutliche Erhöhung der spektralen Auflösung bewirken. Diese Möglichkeit ist jedoch mit enormen technischen Schwierigkeiten verbunden und bedingt zumeist die Verwendung des ungleich wertvolleren Heliums anstelle von Stickstoff als Kühlgas.

Anhand des Rezeptor-gebundenen NTII konnte gezeigt werden, dass in bestimmten Systemen inhomogene Signalverbreiterungen bei Tieftemperaturen nur in sehr geringen Umfang auftreten. Insbesondere Rezeptor-gebundene Liganden innerhalb nativer Membranen scheinen dabei ein besonders aussichtsreiches Gebiet für zukünftige DNP-Anwendungen zu sein, da die Liganden-Bindung die Seitenketten-Dynamik deutlich verringert. Gleichzeitig führt DNP zu einer Signalverstärkung, die es ermöglicht auf eine aufwändige Aufreinigung der Rezeptoren oder Membranproteine zu verzichten. Die Tatsache, dass die Struktur und Funktion bestimmter Membranproteine von ihrer Lipidumgebung abhängig ist, zeigt dabei besonderen Wert dieser Methode.

3.3. Messungen an naszierenden Peptidketten innerhalb des ribosomalen Tunnels

3.3.1. Fragestellung

Im vorherigen Abschnitt wurden die Prozesse analysiert, die zu einer inhomogenen Linienverbreiterung bei tiefen Temperaturen führen. Dabei wurde gezeigt, dass das Ausmaß dieser Signalverbreiterung von der veränderten Mobilität der einzelnen Seitenketten und damit vom strukturellen Kontext abhängt. Gleichzeitig wurde anhand des Rezeptor-gebundenen Neurotoxin II gezeigt, dass Signale von Seitenketten, welche bereits bei Raumtemperatur in ihrer Dynamik eingeschränkt sind, beim Absenken der Proben Temperatur nur kaum verbreitert werden. Dieser Effekt könnte auch für andere Systeme zutreffen, in denen die Mobilität der zu analysierenden Seitenketten durch Bindung an größere Komplexe eingeschränkt wird. Zugleich sollen die gewonnenen Erkenntnisse über die optimale TOTAPOL-Konzentration (Abschnitt 3.1.2) und den

Einfluss tiefer Temperaturen auf die spektrale Qualität (Abschnitt 3.2.2) genutzt werden, um ein System zu untersuchen, welches mit konventioneller Festkörper-NMR bislang nicht zugänglich ist. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um Prof. B. Bukau (Zentrum für Molekulare Biologie der Universität Heidelberg, ZMBH) sollen stabile Komplexe aus arretierten, unmarkierten Ribosomen und uniform ^{13}C , ^{15}N -markierten naszierenden Ketten exprimiert (siehe Abschnitt 2.5) und mit Hilfe der DNP-verstärkten Festkörper-NMR untersucht werden. Als naszierende Kette wurde ein Konstrukt aus der Signalsequenz der periplasmatischen Disulfidbrücken-Oxidoreduktase A (periplasmatic disulfide bond oxidoreductase A, DsbA) und der bekannten Arrest-Sequenz des Proteins Sekretionsmonitor M (secretion monitor, SecM) exprimiert. Aufgrund der Längen der beiden Peptidsegmente ist die SecM-Sequenz in dem Abschnitt des ribosomalen Exit-Tunnel lokalisiert, welcher oberhalb der Verengung (constriction point) liegt (siehe Abschnitt 1.5.2). Dementsprechend wird für diese Peptidsequenz eine gestreckte Konformation mit eingeschränkter Beweglichkeit angenommen. Der DsbA-Anteil hingegen liegt im unteren Teil des ribosomalen Exit-Tunnels, für den die Möglichkeit der Ausbildung von helikalen Strukturen postuliert wurde [59, 63, 69, 81, 139].

Die Analyse der naszierenden Ketten im Komplex mit stabil arretierten Ribosomen stellt eine besondere Herausforderung dar, sowohl im Hinblick auf die Expression dieser Konstrukte, als auch im Hinblick auf die Durchführung der DNP-verstärkten NMR-Experimente. Die Ziele dieser Studie sind im Einzelnen:

1. Es soll zunächst überprüft werden, ob es prinzipiell möglich ist, NMR-Signale der aus 37 Aminosäuren bestehenden naszierenden Kette (nascent chain, NC) DsbA-SecM innerhalb eines 2,5 MDa großen Ribosoms von *E. coli* zu detektieren. Das Ribosom besteht aus über 10.000 Aminosäuren und mehr als 4.500 Ribonukleotiden. Daraus ergibt sich zum einen eine enorme Limitierung der Analyt-Konzentration auf maximal etwa 10-15 nmol pro Rotor (25 μl für 3,2 mm Standard Bruker Rotoren). Zum anderen kann die natürliche Häufigkeit der Isotope ^{13}C und ^{15}N zu einem enormen Hintergrundsignal führen und so die selektive Analyse der NC-Signale stören.
2. Weiterhin, soll die Frage geklärt werden, ob durch eine geeignete Wahl des Expressionsschemas die Markierung der ribosomalen Proteine unterdrückt werden kann. Nur durch eine selektive ^{13}C , ^{15}N -Markierung der naszierenden Ketten kann diese innerhalb des ribosomalen Tunnels untersucht werden. Die entscheidende Vorarbeit wurde dabei

von der Arbeitsgruppe um Prof. Bukau geleistet (siehe Abschnitt 2.5) [101]. Zudem müssen ausreichende Mengen stabil arretierter Ribosomen exprimiert und aufgereinigt werden. Dies gestaltet sich naturgemäß schwierig, da im Gegensatz zur Expression von reinen Proteinen kein Ribosom-recycling stattfindet.

3. Insofern NC-spezifische Signale detektiert werden können, sollen analysiert werden, welche Informationen sich aus diesen Signalen bezüglich der Konformation und Dynamik der naszierenden Kette gewinnen lassen. Aus den vorhergegangenen Abschnitten wird deutlich, dass sowohl die für DNP-verstärkte NMR-Messungen benötigten tiefen Temperaturen als auch die Zugabe von TOTAPOL die spektrale Auflösung negativ beeinflussen können. Daher muss zunächst das Ausmaß dieser negativen Effekte auf die spektrale Qualität ermittelt werden. Gegebenenfalls müssen Wege gefunden werden, die Signalüberlappung zu reduzieren und so eine Seitenketten-spezifische Zuordnung der Signale zu ermöglichen. Weiterhin wurde beschrieben, dass es unter bestimmten Bedingungen zu Signalaufspaltungen bzw. Signalvervielfältigungen bei tiefen Temperaturen kommen kann. Dieser Effekt wird für Seitenketten erwartet, welche bei Raumtemperatur eine intermediäre Dynamik aufweisen und kann unter Umständen eine sequenzspezifische Signalzuordnung erschweren.
4. Abschließend soll die Frage geklärt werden, in welchem Faltungszustand sich die naszierende Kette befindet. Durch Cryo-EM Rekonstruktionen wurde bereits die Bildung einer α -Helix im unteren Teil des ribosomalen Tunnels gezeigt [63]. Dazu wurde jedoch ein Peptid verwendet, welches aus einer fünffachen Wiederholung eines Glu-Ala-Ala-Ala-Lys-Motivs besteht und dementsprechend in Lösung eine sehr stabile Struktur mit über 80% Helixanteil bildet. In der vorliegenden Arbeit wird hingegen eine natürlich vorkommende Signalsequenz (des Proteins DsbA) verwendet, deren Faltungszustand innerhalb des Tunnels wahrscheinlich für die Regulation posttranslationaler Prozesse verantwortlich ist [104, 105, 140, 141]. Anhand der chemischen Verschiebung der NMR-Signale [142-144] und deren Signalform sollen Rückschlüsse auf den Faltungszustand der Kette und deren Flexibilität innerhalb des ribosomalen Ausgangstunnels gezogen werden. Hierbei kann nicht ausgeschlossen werden, dass die zu untersuchenden Proben Subpopulationen von RNCs aufweisen, in denen die naszierenden in leicht unterschiedlichen Faltungszuständen vorliegen. Diese würden zu entsprechenden

Signalvervielfältigungen führen, welche schwer von Tieftemperatur-bedingten Signalaufspaltungen zu unterscheiden sind.

3.3.2. Ergebnisse

Um zu überprüfen, in welchem Ausmaß inhomogene und homogene Linienverbreiterungen die Auflösung von DNP-verstärkten NMR-Spektren naszierender Peptidketten im ribosomalen Ausgangstunnel vermindert, wurden zunächst einfache ein- und zweidimensionale ^{13}C - ^{13}C CP-Experimente durchgeführt. Um die beobachtbare Magnetisierung möglichst auf die naszierende Kette zu begrenzen, wurden dabei sowohl kurze CP-Kontaktzeiten, als auch kurze Mischzeiten verwendet. Abbildung 3-14 (A und B) zeigt ein 2D PDS-D-Spektrum von DsbA-SecM innerhalb des Ribosoms, aufgenommen mit einer Mischzeit von 10 ms und einer CP-Kontaktzeit von 750 μs . Sowohl die Hauptdiagonale als auch die Kreuzkorrelationen dieses Spektrums sind deutlich verbreitert. Die verbreiterte Hauptdiagonale ist ein Indiz für eine homogene Signalverbreiterung, verursacht durch die Anwesenheit des Biradikals. Da das gesamte Ribosom von Kanälen durchzogen ist (siehe Abschnitt 1.5.2) und der Durchmesser des ribosomalen Tunnels den Zugang kleiner Moleküle an die Kette ermöglicht [145, 146], können sich TOTAPOL-Moleküle in direkter Nähe zur naszierenden Kette befinden. Die vom Biradikal verursachte paramagnetische Relaxationsverstärkung (siehe Abschnitt 3.1) könnte dementsprechend zu homogen verbreiterten Signalen führen.

Verbreiterte Kreuzkorrelationen können hingegen, wie in Abschnitt 3.2 beschrieben, aus einer strukturellen Inhomogenität resultieren. Dies deutet auf eine, im Vergleich zum Rezeptor-gebundenen Neurotoxin II (siehe Abschnitt 3.2), hohe molekulare Flexibilität der naszierenden Kette hin.

Sowohl inhomogene, als auch homogene Signalverbreiterungen erschweren die Analyse der aufgezeichneten Spektren. Die Zuordnung einzelnen Resonanzen zu spezifische Seitenketten ist aufgrund der Signaltbreite und der fehlenden (Diagonal-) Symmetrie nicht möglich. Ferner kann nicht ausgeschlossen werden, dass die im aliphatischen Bereich (Abbildung 3-14 B) detektierten Signale von Rauschen überlagert werden. Dies liegt an den intensiven und stark verbreiterten Autokorrelationssignalen: Für die Abbildung 3-14 A und B wurden als unterste Konturlevel der dreifache Wert des durchschnittlichen Rauschens verwendet. In direkter Nähe zur Hauptdiagonalen kann jedoch aufgrund einer ineffektiven Basislinien-Korrektur das Rauschen angehoben werden. In Verbindung mit einem breiten, unspezifischen Signal (sowohl von der naszierenden Kette, als auch

vom Ribosom), erscheint ein aufgelöstes, jedoch unsymmetrisches und nicht-reproduzierbares vermeintliches „Signalmuster“. Tatsächlich konnten bei wiederholten Messungen der gleichen Probe keine signifikanten Signale reproduziert werden.

Um dennoch eine Seitenketten-spezifische Zuordnung von Signalen zu ermöglichen, wurden unter Verwendung der POST-C7-Pulssequenz (siehe Abschnitt 2.7.3, [126]) Doppel-Quanten-gefilterte (DQ-gefilterte) ^{13}C - ^{13}C -Spektren aufgezeichnet. Dabei wurde die im Vergleich zu den unmarkierten Bestandteilen der Probe (Ribosom, Glycerol, evtl. Verunreinigungen) 10.000fach höhere Intensität der DQ-Korrelationen der markierten naszierenden Kette ausgenutzt. Abbildung 3-14C zeigt ein solches Spektrum von DsbA-SecM. Die direkte Dimension (X-Achse) zeigt dabei die chemischen Verschiebungen der Einzelquanten-Kohärenzen (single quantum coherence, SQC), während die indirekte Dimension einer Doppelquanten-Kohärenz (double quantum coherence, DQC) entspricht. Zudem entspricht die Koordinate der Signale zweier gekoppelter Kerne in der indirekten Dimension der Summe ihrer chemischen Verschiebungen (Koordinaten der direkten Dimension).

In dem aliphatischen Bereich (Abbildung 3-14 D) können zwei Bereiche definiert werden, in denen die Mehrzahl der $\text{C}\alpha$ - bzw. $\text{C}\beta$ -Signale vorliegen. Diese erstrecken sich von etwa 50 ppm bis etwa 65 ppm für Signale der $\text{C}\alpha$ -Kohlenstoffe, bzw. 25 ppm bis 45 ppm für $\text{C}\beta$ -Signale. In diesen beiden Bereichen ist die Zuordnung einzelner Kreuzkorrelation sowohl durch die Vielzahl der auftretenden Signale, als auch deren Signalbreiten erschwert. Die Signale der $\text{C}\alpha$ - und $\text{C}\beta$ -Kerne des Serins liegen jedoch im statistischen Mittel bei 58,8 ppm bzw. 63,8 ppm in der direkten Dimension und bei 122,6 ppm in der indirekten Dimension. Damit erscheinen beide Signale separiert von $\text{C}\alpha$ - $\text{C}\beta$ -Korrelationen anderer Aminosäuren. Ähnliches gilt für die Aminosäure Threonin ($\text{C}\alpha$: 62,26 ppm, $\text{C}\beta$: 69,70 ppm). Zudem wären evtl. auftretende Alanin $\text{C}\alpha$ - und $\text{C}\beta$ -Signale aufgrund der deutlich ausgeprägten Hochfeld-Verschiebung der $\text{C}\beta$ -Signale leicht zu identifizieren. In Abbildung (Abbildung 3-14 D) sind diese Bereiche zwar markiert, zeigen jedoch keine Signalintensitäten. Schwierigkeiten die Alanin-Methylgruppen unter DNP-Bedingungen zu detektieren wurden bereits berichtet [36] und sind wahrscheinlich auf bei tiefen Temperaturen intermediären Dynamik dieser Gruppen zurückzuführen. Entsprechend Abschnitt 3.2 kann dies zu einer Signalverbreiterung unterhalb der Detektionsgrenze führen. Insgesamt kann jedoch festgestellt werden, dass durch Anwendung des DQ-Filters für bestimmte Aminosäuren kann eine bessere Separierung erzielt werden kann. Zudem werden durch den DQ-Filter Autokorrelationen vollständig unterdrückt, so dass keine Hauptdiagonale vorliegt und so eine Überlagerung von

Kreuzsignalen durch Autokorrelationen verhindert wird. Weiterhin reduziert sich wesentlich das Signal des Glycerols (63 ppm und 73 ppm in der direkten Dimension, 136 ppm in der indirekten Dimension), welches zudem im Vergleich zum PDS-D-Spektrum besser separiert vom aliphatischen Bereich der Protein Signale vorliegt.

Die Vorteile eines DQ-gefilterten Spektrums gehen jedoch mit einer um etwa 60 % Prozent reduzierten Sensitivität einher. Das PDS-D-Spektrum in Abbildung 3-14 (A und B) wurde dementsprechend mit einer Wiederholung von 224 Messungen aufgenommen, wogegen für das DQ-gefilterte Spektrum (C und D) über 768 Messungen gemittelt wurden.

Aufgrund der Größe des Ribosoms und der überlappenden Resonanzen der Kohlenstoffatome der Ribose erscheinen auf der Hauptdiagonale des PDS-D-Spektrums im Bereich 60 ppm bis 90 ppm starke Signale, welche zum Teil den aliphatischen Bereich der Proteinsignale überlagern (siehe Tabelle 3-1). Aus Abbildung 3-14C wird ersichtlich, dass zwar trotz des DQ-Filters starke Ribose-Signale detektiert werden, diese jedoch aufgrund ihrer Positionen in der indirekten Dimension weniger stark mit dem aliphatischen Bereich interferieren.

Aus Abbildung 3-14C wird weiterhin ersichtlich, dass in der Probe sowohl Peptidoglykane als auch Lipide vorliegen. Diese wiederum führen zu intensiven Signalen, welche aufgrund ihrer starken Überlagerung nicht vollständig rausgefiltert werden können.

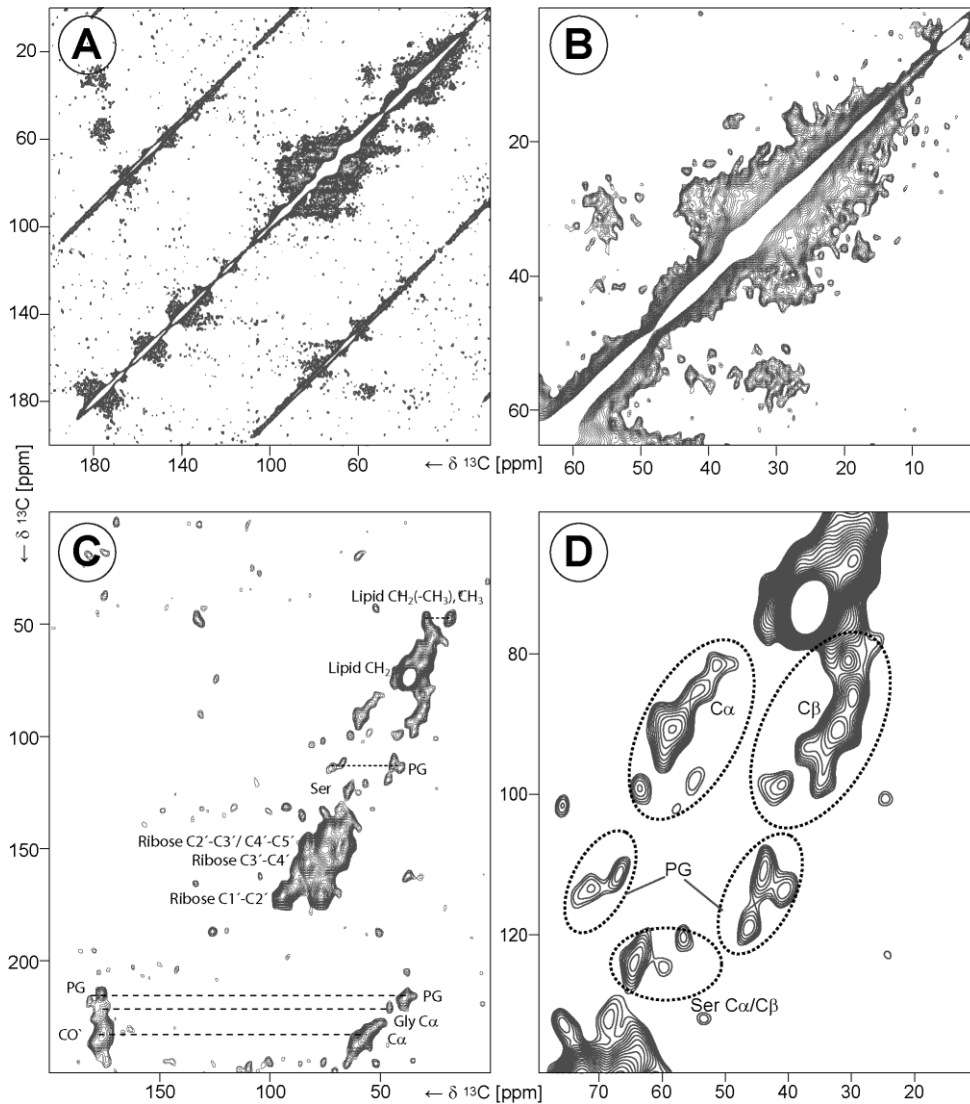


Abbildung 3-14: A. 2D ^{13}C - ^{13}C PDSD Spektren von uniform ^{13}C , ^{15}N -markiertem DsbA-SecM innerhalb des ribosomalen Exit-Tunnels aufgenommen mit DNP-Verstärkung, einer Mischzeit von 10 ms und einer CP-Kontaktzeit von 750 μs , gemittelt aus 224 Experimenten. B. Vergrößerung des aliphatischen Bereichs des selben Spektrums; C. DQ gefiltertes Spektrum, gemittelt aus 768 Experimenten; die Signal-Koordinaten in der indirekten Dimension (Y-Achse) entsprechen den Summen der chemischen Verschiebung der jeweils gekoppelten Kerne in der direkten Dimension (X-Achse); angegeben sind die Signale der Ribose, von Peptidoglykan (PG), Lipiden sowie Gruppen von Peptidsignalen. D. Vergrößerung des aliphatischen Bereichs des DQ gefilterten Spektrums.

Trotz der soeben beschriebenen Vorteile der DQ-Filterung, weist der aliphatische Bereich in Abbildung 3-14C, bzw. D eine starke Signalüberlagerung auf. Wie bereits erwähnt können, aufgrund ihrer besonderen chemischen Verschiebung, die $\text{C}\alpha$ - und $\text{C}\beta$ -Resonanzen der Serine als isolierte Signale identifiziert werden. Die Signalbreiten verhindern dabei jedoch eine sequenzspezifische Zuordnung der Serin-Signale. Zudem konnten 3D Experimente, wie z.B. NCOX oder NCACX [119], aufgrund der schlechten Sensitivität der Probe und der durch die

Kontourlevel der dreifache Wert des durchschnittlichen Rauschens gewählt wurde. Vergrößerungen des jeweiligen aliphatischen Bereichs befinden sich auf der rechten Seite. Der Vergleich der aliphatischen Bereiche zeigt, dass zwar in allen Spektren Proteinsignale deutlich oberhalb des Rauschens sichtbar sind, sich die Proben in ihrer Sensitivität jedoch unterscheiden. Da für alle Proben die gleiche TOTAPOL Konzentration verwendet wurde (30 mM), kann dies lediglich auf unterschiedliche Konzentrationen der RNCs zurückgeführt werden. Zudem scheint das RNA-zu-Protein-Verhältnis der S22/28A-Mutante im Vergleich zur S16/18A-Mutante höher zu sein. Dies zeigt sich in den stärkeren Signalen der Ribose und dem deutlichen Auftauchen von C5-C6-Korrelationen der Pyrimidin-basierenden Nukleotide Cytosin und Uracil (Cytosin: ~ 97 ppm und 141 ppm in der direkten Dimension, bzw. ~238 ppm in der indirekten Dimension; Uracil: ~103 ppm und ~141 ppm bzw. 244 ppm; siehe Abbildung 3-15, unten links). Ursache dieses Ungleichverhältnisses könnte eine verminderte Effizienz des Translationsarrestes aufgrund der Mutation im SecM Bereich der naszierenden Kette sein. Daher wäre es möglich, dass neben den stabil arretierten Ribosomen mit naszierenden Ketten eine nicht-vernachlässigbare Population freier Ribosomen vorhanden ist.

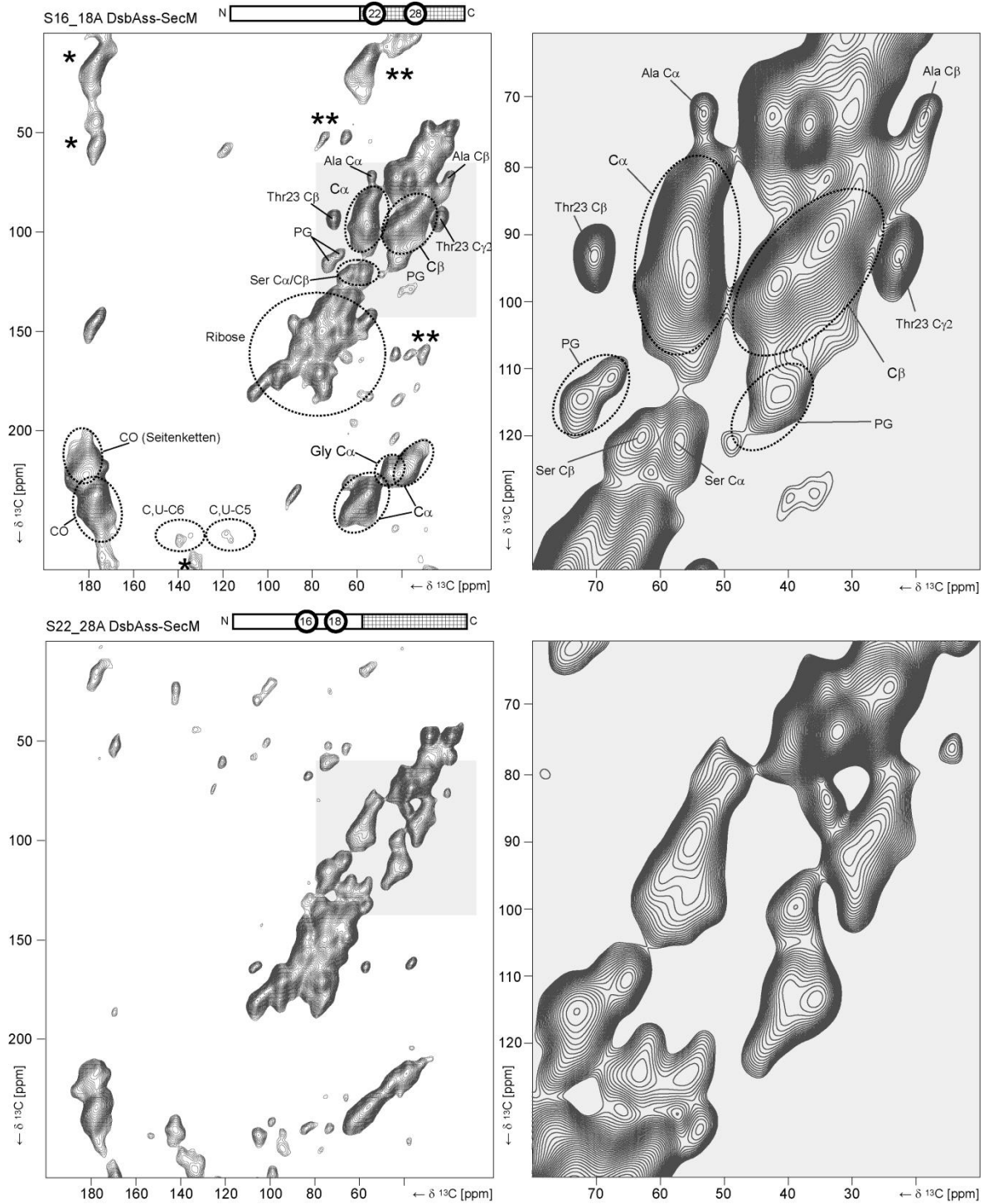


Abbildung 3-15: DQ gefilterte (POST-C7) 2D ^{13}C - ^{13}C Spektren der S16/18A-Mutante (oben) und der S22/28A-Mutante (unten). Gezeigt sind sowohl die Spektren über deren gesamte spektrale Breite (links), als auch Vergrößerungen der aliphatischen-Bereiche (rechts).

Abweichungen der chemischen Verschiebungen vom statistischen Mittelwert, sogenannte sekundäre chemische Verschiebungen (secondary chemical shift, SCS) können genutzt werden, die Sekundärstruktur der jeweiligen Aminosäure vorherzusagen [144]. Im Allgemeinen erfahren CO- und C α -Kohlenstoffe eine Verschiebung zum niedrigeren Feld (d.h. zu höheren Werten auf der ppm-Skala) wenn sich diese in einer α -Helix befinden, wogegen sie zu einem höheren Feld (d.h. zu niedrigeren Werten auf der ppm-Skala) verschoben sind, wenn sie sich in einem β -Strang befinden. Die SCS der C β -Kerne verhält sich in gegengesetzter Weise. Die Zuverlässigkeit $R_{\text{Helix/coil}}$ der Unterscheidung einer α -Helix von einer unstrukturierten Konformation (random coil) der ^{13}C -SCS verhält ist entsprechend Wang et al. [147] vom untersuchten Kern abhängig. Allgemein gilt, C α -Verschiebungen sind zuverlässiger als CO-Verschiebungen, welche wiederum zuverlässiger als C β -Verschiebungen sind. Für die Unterscheidung eines β -Strangs von einer random coil $R_{\text{Strang/coil}}$ gilt hingegen: C α - und CO-Verschiebungen sind in etwa gleichem Maße zuverlässig, jedoch weniger signifikant als C β -Verschiebungen. Für die Aminosäuren Serin und Threonin sind in Tabelle 3-2 die Werte für $R_{\text{Helix/coil}}$ entsprechend der Formel (3.7) angegeben [147]:

$$R_{\text{Helix/coil}} = \frac{|\overline{\delta_{\text{Helix}}} - \overline{\delta_{\text{coil}}}|}{|\overline{\sigma_{\text{Helix}}} - \overline{\sigma_{\text{coil}}}|} \quad (3.7)$$

Hierbei repräsentiert $\overline{\delta_{\text{Helix}}}$ bzw. $\overline{\delta_{\text{Coil}}}$ die mittlere sekundäre chemische Verschiebung aufgrund einer Helix- bzw. coil-Struktur und $\overline{\sigma_{\text{Helix}}}$ bzw. $\overline{\sigma_{\text{Coil}}}$ die entsprechende Standardabweichung.

Tabelle 3-2: Zuverlässigkeit der Unterscheidung einer Helix von einer random coil-Konformation entsprechend der sekundären chemischen Verschiebung (aus Wang et al. [141]).

	$R_{\text{Helix/coil}}$		
	C β	C α	CO
Serin	0,48	0,79	0,76
Threonin	0,54	1,21	0,61

Statistische Werte der durchschnittlichen chemischen Verschiebungen aller 20 proteinogener Aminosäuren, entsprechend ihres Auftretens in einer Sekundärstruktur, liefert die Datenbank von Wishart et al. [148] bzw. <http://refdb.wishartlab.com/stat.html>. In Tabelle 3-3 sind die chemischen Verschiebungen einiger Aminosäuren zusammengefasst. Die in dieser Tabelle aufgelisteten

Aminosäuren wurden sowohl insbesondere unter dem Gesichtspunkt außergewöhnlicher chemischer Verschiebungen der C α - und C β -Signale (Alanin, Serin, Threonin) ausgewählt.

Tabelle 3-3: Gemittelte Werte der Chemischen Verschiebungen (CS) und deren Standardabweichungen (STD) für ausgewählte Aminosäuren, in Abhängigkeit von ihrem Auftreten in einer α -Helix, einem β -Strang oder einer random coil Struktur (Werte aus <http://refdb.wishartlab.com/stat.html>, vom 24.11.2012).

	α -Helix			β -Strang			random coil		
	CS [ppm] (STD)			CS [ppm] (STD)			CS [ppm] (STD)		
	C β	C α	CO	C β	C α	CO	C β	C α	CO
Alanin	18,26 (0,88)	54,83 (1,05)	179,40 (1,32)	21,14 (2,05)	51,53 (1,48)	176,09 (1,51)	19,06 (1,26)	52,84 (1,64)	177,67 (1,57)
Isoleucin	37,60 (1,15)	64,57 (1,74)	177,72 (1,29)	39,86 (1,98)	60,05 (1,57)	174,86 (1,39)	38,65 (1,69)	61,03 (1,90)	175,57 (1,67)
Prolin	31,46 (0,95)	65,49 (1,08)	178,34 (1,45)	32,27 (1,20)	62,64 (1,03)	176,18 (1,40)	31,94 (0,95)	63,47 (1,26)	176,89 (1,34)
Serin	63,08 (1,12)	60,88 (1,61)	175,94 (1,39)	65,16 (1,51)	57,54 (1,40)	173,55 (1,50)	64,03 (1,27)	58,38 (1,69)	174,49 (1,31)
Threonin	68,88 (1,17)	65,61 (2,39)	175,92 (1,15)	70,75 (1,51)	61,06 (1,59)	173,66 (1,50)	70,12 (1,33)	61,64 (2,07)	174,70 (1,47)
Valin	31,49 (0,72)	66,16 (1,55)	177,65 (1,38)	33,91 (1,61)	60,83 (1,64)	174,80 (1,39)	32,71 (1,37)	62,06 (2,16)	175,66 (1,47)

Wie bereits erwähnt, ist eine zweifelsfreie Zuordnung von der aliphatischen Signale zu den einzelnen Aminosäuren aufgrund der individuellen Signalbreiten stark erschwert. Ausnahmen bilden dabei insbesondere die Aminosäuren Serin, Threonin und Alanin.

Abbildung 3-16 zeigt die aliphatischen Bereiche der POST-C7 Spektren beider Mutanten. In dieser Abbildung wurden außerdem die Positionen markiert, an denen entsprechend der statistischen Werte der sekundären chemischen Verschiebungen (<http://refdb.wishartlab.com/stat.html>, vom 24.11.2012), Signale der naszierenden Kette zu erwarten sind.

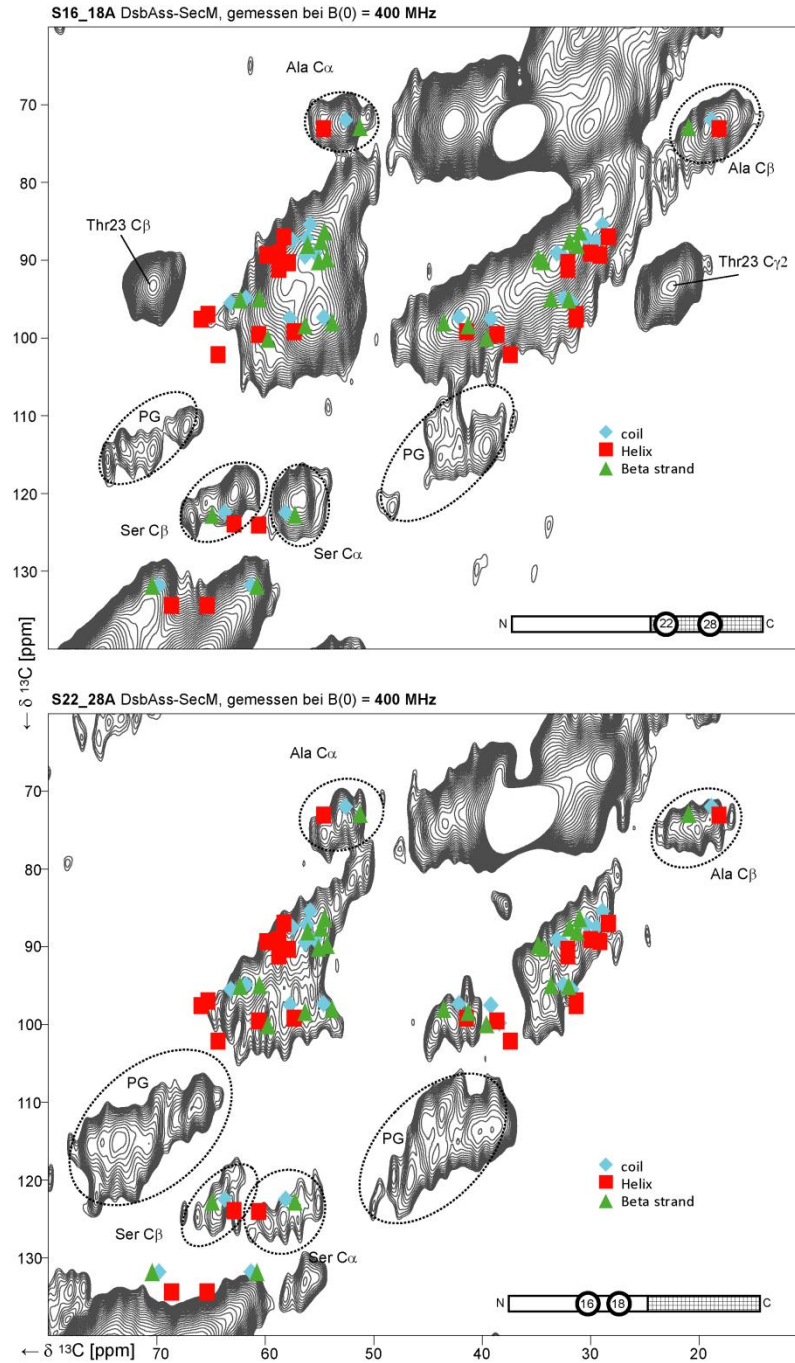


Abbildung 3-16: DQ gefilterte (POST-C7) 2D ^{13}C - ^{13}C Spektren der S16/18A-Mutante (oben) und der S22/28A-Mutante (unten) des DsbA-SecM Plasmids in stabil arretierten Ribosomen, gemessen bei einer magnetischen Feldstärke von 400 MHz, gezeigt ist jeweils der aliphatische Bereich, sowie die entsprechend <http://refdb.wishartlab.com/stat.html> zu erwartenden Signalpositionen der in der naszierenden Kette vorkommenden Aminosäuren bei unterschiedlichem strukturellen Kontext

Sowohl im Spektrum der S16/18A- als auch der S22/28A-Mutante treten Signalintensitäten in einem Bereich auf, der auf das Vorliegen einer teilweisen helikalen Konformation hindeutet. Insbesondere die Bereiche, in denen $C\alpha$ - $C\beta$ -Korrelationen der Aminosäuren Alanin, Serin, Threonin, Prolin, Valin und Isoleucin auftreten, ermöglichen eine nähere Analyse der aufgezeichneten Signalintensitäten bezüglich des wahrscheinlichen Faltungszustandes der untersuchten Peptidketten. Aus den statistischen Werten der mittleren sekundären chemischen Verschiebungen dieser Aminosäuren (Tabelle 3-3) wurden daher die spektralen Bereiche berechnet, bei denen das Auftreten von Kreuzsignalen ein deutlicher Hinweis auf das Vorliegen einer helikalen Konformation darstellt. Hierbei wurde jeweils der Mittelwert der chemischen Verschiebung als Zentrum eines Rechteckes gewählt dessen Kantlänge in der direkten Dimension der zweifachen Standardabweichung (Tabelle 3-3) entspricht. Für die Kantlänge in der indirekten Dimension wurde jeweils die Summe der beiden Standardabweichungen (der $C\alpha$ - und $C\beta$ -Verschiebungen) verwendet. Abbildung 3-17 zeigt diese Bereiche auf den gleichen Spektren, welche in Abbildung 3-16 abgebildet wurden. Der Vergleich der Spektren der beiden Mutanten zeigt nun sowohl eindeutige Gemeinsamkeiten als auch Unterschiede welche Rückschlüsse auf den Faltungszustand der naszierenden Kette für begrenzte Bereiche zulassen.

Aufgrund der Substitution der jeweiligen Serine gegen Alanine unterscheiden sich die beiden Mutanten in der Anzahl der Alanine im SecM- bzw. DsbA-Abschnitt. Im Falle der S16/18A-Mutante liegen 8 Alanin-Reste in der DsbA-Sequenz und damit im dem Bereich des Tunnels unter der Verengung und 2 Alanin-Reste im SecM-Anteil. Die S22/28-Mutante hingegen weist lediglich 6 Alanine unterhalb, jedoch 4 Alanine oberhalb der Verengung auf. Tatsächlich zeigt das Spektrum der S16/18A-Mutante stärkere Alanin- $C\alpha$ und Alanin- $C\beta$ Signale, welche im Bereich einer wahrscheinlichen helikalen Konformation liegen (Abbildung 3-17, oben). Dies deutet darauf hin, dass zumindest ein Bereich des DsbA-Anteils der naszierenden Kette in einer helikalen Konformation vorliegt und der Austausch der beiden Serin-Reste in diesem Abschnitt gegen Alanine entsprechend zu zwei zusätzlichen Alanin-Resten in einer helikalen Konformation führt. Noch deutlichere Unterschiede können im Bereich der Serin-Signale festgestellt werden. Beide Mutanten weisen jeweils zwei Serin-Reste auf, welche sich jedoch in einem unterschiedlichen strukturellen Kontext befinden. Das Signalmuster der Serin $C\alpha$ - und $C\beta$ -Korrelationen der S22/28A-Mutante (Abbildung 3-17, unten) zeigt Anteile in dem spektralen Bereich, der für das Vorliegen einer Helix indikativ ist. Beide Serin-Reste dieser Mutante liegen im DsbA-Anteil und daher in jenem Bereich des Tunnels, in die Möglichkeit der Ausbildung einer Helix angenommen

wird. Im Gegensatz dazu zeigt die S16/18A-Mutante, deren Serin-Reste im SecM-Anteil der Kette vorliegen, keine eindeutigen Signale in diesem spektralen Bereich.

Bei der Betrachtung der Serin-Bereiche fällt zudem auf, dass sich die Spektren der beiden Mutanten in der Anzahl ihrer C α - und C β -Signale unterscheiden. Für beide Spektren werden jeweils zwei Serin C α - und C β -Korrelationen erwartet. Insbesondere im Falle der S22/28-Mutante können jedoch deutlich mehr (vier bis fünf) Signalmaxima definiert werden. Im Spektrum der S16/18A-Mutante sind jeweils drei Signale sichtbar. In beiden Fällen deutet die Signalaufspaltung, auf eine strukturelle Inhomogenität hin. Zum einen könnte dies auf eine langsame Dynamik der Serin-Seitenketten bei tiefen Temperaturen zurückzuführen sein. Die Signalaufspaltung würde dann unterschiedlichen Subpopulationen von Ketten entsprechen, welche mit einer langsamen Dynamik ineinander übergehen (ein ähnlicher Prozess wurde für einzelne Seitenketten Des SH3 in Abschnitt 3.2. beschrieben). Andererseits könnte die Signalaufspaltung auf ein strukturelles Ensemble von RNCs hindeuten, in denen naszierenden Ketten in unterschiedlichen Konformationen vorliegen, jedoch nicht ineinander übergehen. Um diese beiden denkbaren Szenarien voneinander zu trennen, müssten Spektren bei unterschiedlichen Temperaturen aufgenommen werden. Ist die Signalaufspaltung auf dynamische Prozesse zurückzuführen, so sollte diese bei höheren Temperaturen deutlich reduziert werden. Jedoch ist es derzeit nicht möglich, Spektren bei hohen Temperaturen und gleichzeitiger ausreichend effektiver DNP-Verstärkung aufzunehmen.

Nichtsdestotrotz deutet die Tatsache, dass sich die Spektren der beiden Mutanten in der Anzahl der Serin-Signale unterscheiden, auf einen unterschiedlichen strukturellen Kontext der jeweiligen Serin-Seitenketten hin. Offensichtlich zeichnen sich die Serine der S22/28A-Mutante, d.h. die Serine im DsbA-Anteil der naszierenden Kette durch eine im Vergleich zu den Serinen im SecM-Bereich höhere strukturelle Inhomogenität hin.

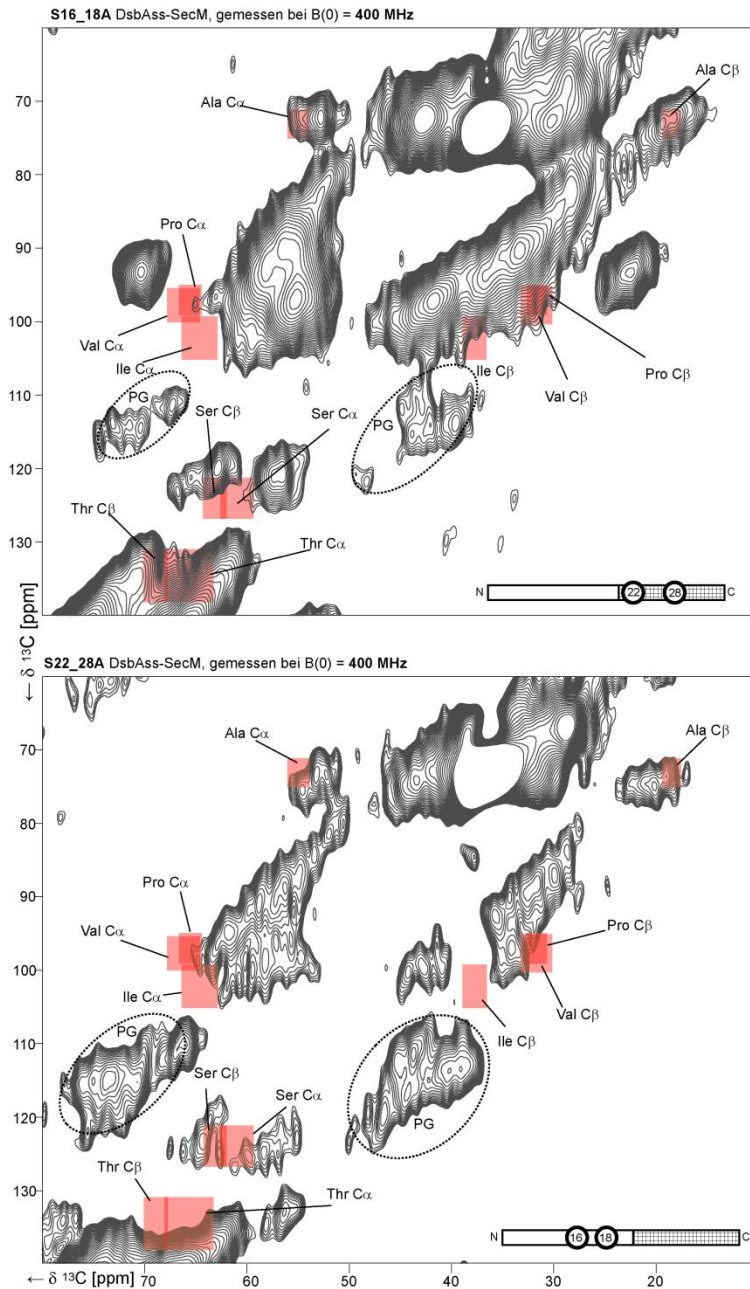


Abbildung 3-17: DQ gefilterte (POST-C7) 2D ^{13}C - ^{13}C Spektren der S16/18A-Mutante (oben) und der S22/28A-Mutante (unten) des DsbA-SecM Plasmids in stabil arretierten Ribosomen, gemessen bei einer magnetischen Feldstärke von 400 MHz, gezeigt ist jeweils der aliphatische Bereich, sowie die Bereiche (rot) welche auf eine helikale Konformation der Aminosäuren Serin, Threonin, Alanin, Valin, Prolin und Isoleucin hinweisen (Daten entsprechend <http://refdb.wishartlab.com/stat.html>)

Das Auftreten der Prolin-, Valin, und Isoleucin-Reste wurden durch die Punktmutationen nicht verändert. Zugleich weisen die Spektren dieser beiden Mutanten keine signifikanten Unterschiede

der Signalmuster dieser Seitenketten auf. Daher kann angenommen werden, dass die Substitution der Serin-Reste gegen Alanine die Faltung der naszierenden Kette nicht oder nur unwesentlich beeinflusst. Interessant ist im Bereich der sekundären chemischen Verschiebung von helikalen Prolinen und Valinen, das Auftreten eines schwachen Signals, welches dementsprechend auf mindestens einen Prolin- oder Valin-Rest in einer helikalen Konformation hindeutet.

Im DsbA-Segment der naszierenden Kette befindet sich lediglich ein Isoleucin (Position 4). Das vollständige Fehlen eines Signales, welches auf ein helikales Isoleucin hindeutet, kann dahingehend interpretiert werden, dass nicht der vollständige DsbA-Bereich in einer helikalen Konformation vorliegt. Wahrscheinlicher ist es, dass diese an der 5-6 Aminosäure beginnt und sich bis zur Verengung, d.h. bis zum Ende des DsbA-Bereiches erstreckt.

Weiterhin wurde versucht, die Signale des Threonins an Position 23 zu analysieren. Entsprechend ihrer isolierten Position innerhalb der POST-C7 Spektren und der Werte aus Tabelle 3-2 sind diese Signale zur Bestimmung der Sekundärstruktur ähnlich zuverlässig wie die zuvor analysierten Serin-Signale. Aufgrund der Überlagerung mit den Signalen der RNA-Ribose kann jedoch keine genaue Aussage über eventuelle Signalmaxima getroffen werden.

Die in Abbildung 3-16 bzw. Abbildung 3-17 dargestellten Spektren ermöglichen zwar die Analyse einzelner isolierter Signale, zeigen jedoch zugleich deutliche Signalüberlagerungen in weiten Teilen des aliphatischen Bereiches. Ein möglicher Weg die Auflösung der Spektren zu verbessern ist die Verwendung höherer Magnetfeldstärken. Neben der zu erwartenden Steigerung der Boltzmann-Polarisation (siehe Abschnitt 1.1 und Formel (1.3)), welche auch ohne DNP-Effekt zu einer verbesserten Sensitivität führt, kann eine höhere Magnetfeldstärken zu einer deutlich besseren Signaldispersion führen. Voraussetzung für die Implementierung hoher Magnetfeldstärken in die DNP Technik ist jedoch die Verfügbarkeit einer leistungsfähigen und stabilen Mikrowellenquelle. Durch die Einführung eines kommerziellen 395 GHz Gyrotrons durch die Firma BRUKER können nun Magnetfeldstärken von bis zu 600 MHz angewendet werden.

Von der S16/18A-Mutante wurde ein POST-C7 Spektrum unter Verwendung dieser neuen Technik in der Firmenzentrale von BRUKER in Billerica (MA, USA) aufgezeichnet. Abbildung 3-18 zeigt einen Vergleich dieses Spektrums mit dem bei 400 MHz aufgezeichneten Spektrum der gleichen Probe.

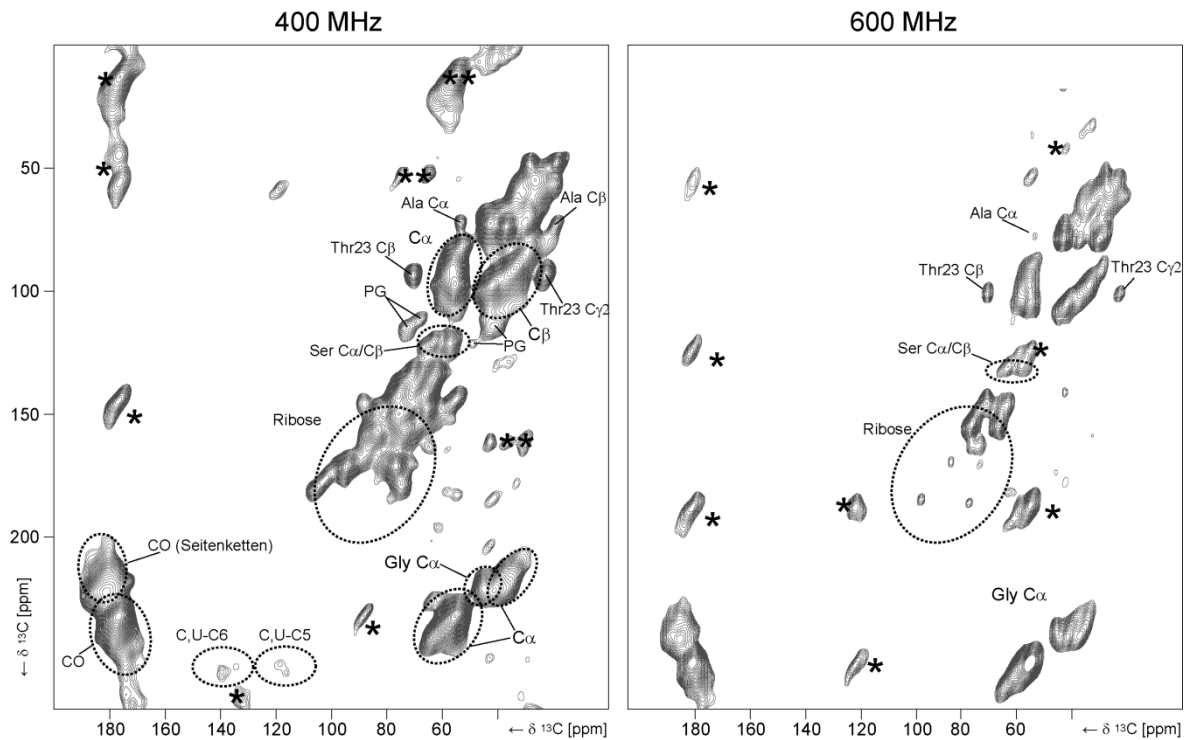


Abbildung 3-18: DQ gefilterte (POST-C7) 2D ^{13}C - ^{13}C Spektren der S16/18A-Mutante des DsbA-SecM Plasmids in stabil arretierten Ribosomen, gemessen bei einer magnetischen Feldstärke von 400 MHz und einer 263 GHz Mikrowelle (links), und bei einer Feldstärke von 600 MHz und einer 395 GHz Mikrowelle (rechts). Rotationsseitenbanden sind mit einem * gekennzeichnet. Für das erste Kontourlevel wurde jeweils der dreifache Wert des durchschnittlichen Rauschens gewählt.

Das bei einer Magnetfeldstärke von 400 MHz aufgezeichnete Spektrum (Abbildung 3-18, links) lässt keine Zuordnung der $\text{C}\alpha$ - $\text{C}\beta$ -Korellation des Thr23 zu, da diese maßgeblich durch die Signale des Glycerols und der Ribose überlagert wird. Aufgrund einer allgemein besseren Auflösung des bei 600 MHz aufgezeichneten Spektrums (Abbildung 3-18, rechts), insbesondere im Bereich der Kohlenstoff-Signale der Ribose, können nun zwei Signale dem Thr23 zugeordnet werden. Bemerkenswert ist dabei, dass das bei höherer Feldstärke aufgezeichnete Spektrum nur schwache Signale der Ribose und deutlich reduzierte Lipid-Signale zeigt. Beide Spektren wurden an der gleichen Probe aufgezeichnet, welche zwischen den Messungen nicht aus dem Rotor entfernt wurde. Daher hat sich entweder während der Lagerung eine Veränderung der Probe eingestellt (z.B. Inaktivierung eines Teils der TOTAPOL-Moleküle in direkter Nähe zur Ribose) oder die Effektivität des DQ-Filters kann durch Verwendung hoher Magnetfeldstärken gesteigert werden.

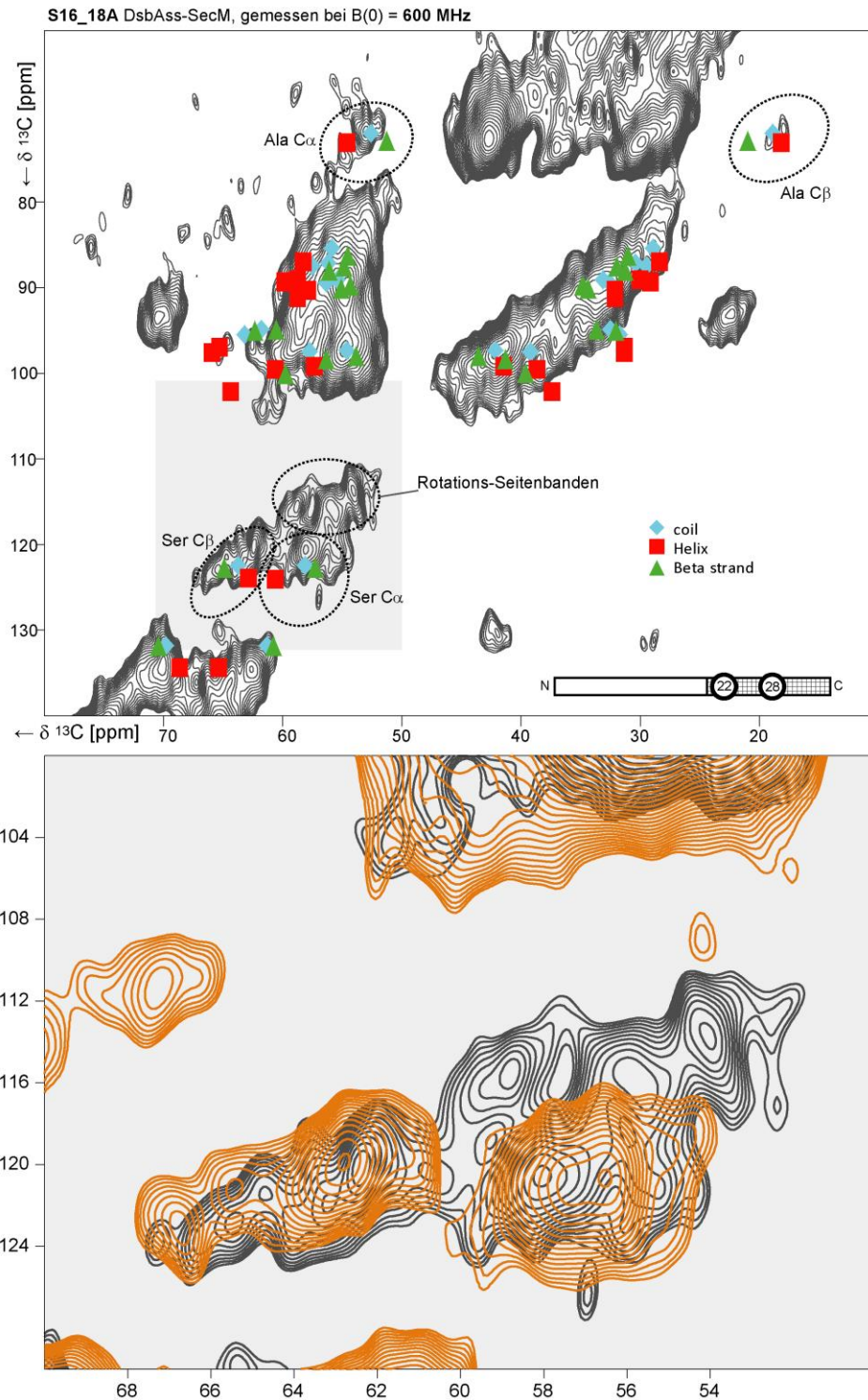


Abbildung 3-19 :DQ gefilterte (POST-C7) 2D ^{13}C - ^{13}C Spektren der S16/18A-Mutante gemessen bei einer magnetischen Feldstärke von 600 MHz, gezeigt ist der aliphatische Bereich (oben) einschließlich der entsprechend <http://refdb.wishartlab.com/stat.html> zu erwartenden Signalpositionen der in der naszierenden Kette vorkommenden Aminosäuren bei unterschiedlichem strukturellen Kontext, sowie eine Überlagerung der Serin-Region (unten) mit dem bei 400MHz aufgezeichneten Spektrum (orangene Linien)

Abbildung 3-19 zeigt eine Vergrößerung des Aliphatischen Bereiches mit den bereits in Abbildung 3-16 dargestellten Positionen der zu erwartenden Signale. Deutlich sichtbar sind zusätzliche Signale im Bereich der Serine. Anhand des Vergleich dieses Bereiches mit dem bei 400 MHz aufgezeichneten Spektrum der gleichen Probe (Abbildung 3-19, unten) konnten diese Signale jedoch eindeutig als Rotationsseitenbanden identifiziert werden. Weiterhin zeigt das bei 600 MHz aufgezeichnete Spektrum deutlich reduzierte Signalintensitäten der Alanin C α - und C β -Korrelationen. Ursache hierfür könnte sowohl ein verändertes Relaxationsverhalten bei höheren Feldstärken oder eine leicht unterschiedliche Proben­temperatur sein. Etwas höher ist die Intensität des Signales, welches im Bereich der C α -Korrelationen der Prolin- bzw. Valin-Seitenketten in helikalen Umgebungen liegt. Eine eindeutige Zuordnung dieses Signales ist jedoch weiterhin nicht möglich.

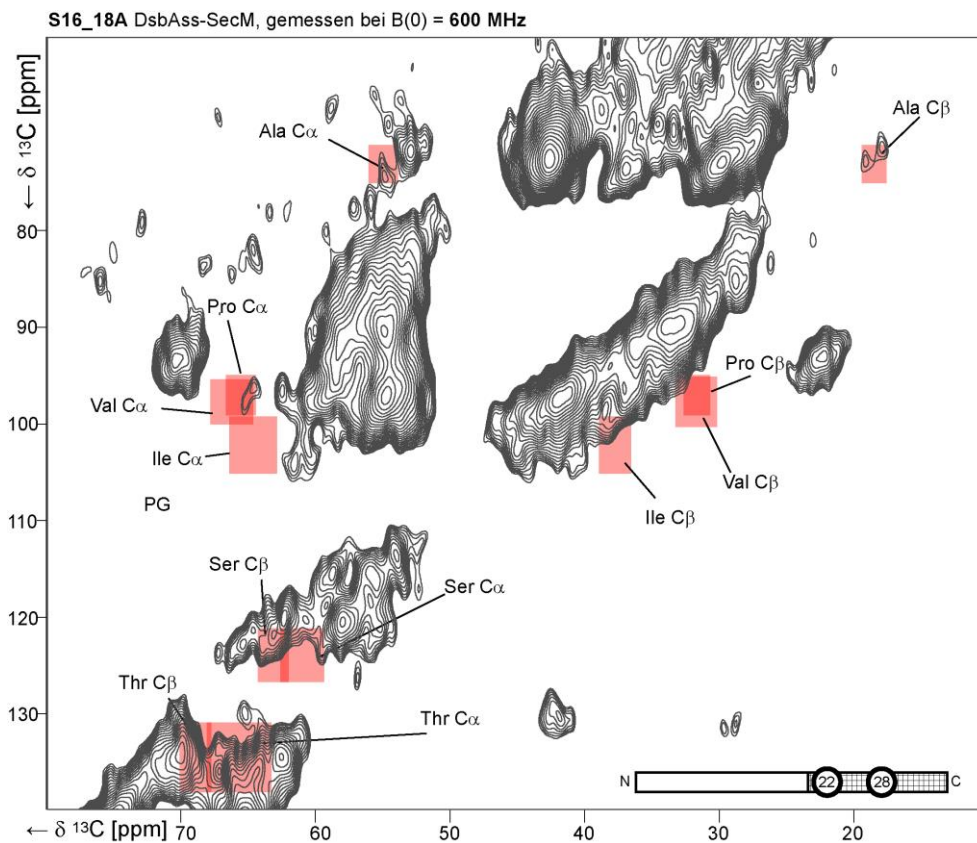


Abbildung 3-20: DQ gefilterte (POST-C7) 2D ^{13}C - ^{13}C Spektren der S16/18A-Mutante (oben) gemessen bei einer magnetischen Feldstärke von 400 MHz, gezeigt ist der aliphatische Bereich, sowie die Bereiche (rot) welche auf eine helikale Konformation der Aminosäuren Serin, Threonin, Alanin, Valin, Prolin und Isoleucin hinweisen (Daten entsprechend <http://refdb.wishartlab.com/stat.html>)

Auch das bei 600 MHz aufgezeichneten Spektrums wurde gezielt auf Kreuzsignale untersucht, welche auf eine helikale Konformation von Bereichen der naszierenden Kette hindeuten. Abbildung 3-20 zeigt die entsprechenden Bereiche überlagert mit dem in Abbildung 3-19 abgebildeten Spektrum. Es zeigen sich deutliche Signale, die auf eine helikale Umgebung für einen Teil der Alanine hindeuten. Weiterhin deutet die Analyse der C α -Signale der Serine darauf hin, dass keines der beiden in der S16/18A-Mutante vorliegenden Serine in einer helikalen Konformation vorliegt. Die Analyse der C β -Signale der Serine lässt diesen Schluss jedoch nicht zu. Ob diese Diskrepanz mit der allgemein geringeren Signifikanz der sekundären chemischen Verschiebung C β -Signale erklärt werden kann, muss mit weiteren Experimenten, insbesondere an der S22/28A-Mutante überprüft werden. Die C α - und C β -Signale des Thr23 deuten auf eine sehr geringe Wahrscheinlichkeit einer helikalen Struktur für diese Aminosäure hin. Trotz der vielversprechenden Resultate, konnte derzeit noch keine weiteren Spektren der RNCs bei einer Magnetfeldstärke von 600 MHz aufgezeichnet werden. Aus der gemeinsamen Analyse der bei 400 MHz und 600 MHz aufgezeichneten Spektren kann jedoch folgende Schlussfolgerung bezüglich der Faltungszustände der beiden naszierenden Ketten gezogen werden:

S16/18A: ¹M|K|K|I|W|L|A|L|A|G|L|V|L|A|F|A|A|A|A|A|^{20 21}F|S|T|P|V|W|I|S|Q|A|Q|G|I|R|A|G|P|³⁷
S22/28A: ¹M|K|K|I|W|L|A|L|A|G|L|V|L|A|F|S|A|S|A|A|^{20 21}F|A|T|P|V|W|I|A|Q|A|Q|G|I|R|A|G|P|³⁷

Hierbei markieren die blau hinterlegten Felder Aminosäuren, die höchstwahrscheinlich in einer ungefalteten bzw. gestreckten Konformation vorliegen. Die Serinsignale der S22/28A-Mutante deuten hingegen zumindest auf eine höhere Wahrscheinlichkeit der Helixbildung hin (Rot-Blau hinterlegte Felder). Dies würde im Einklang mit der Überlegung stehen, dass die Proben ein Ensemble von Strukturen widerspiegeln, in denen der Faltungszustand der naszierenden Ketten insbesondere im DsbA-Bereich eine gewisse Variabilität bzw. Dynamik aufweist.

Ob und in welchem Ausmaß die DNP-Signalverstärkung mit steigender Magnetfeldstärke abnimmt wird derzeit intensiv diskutiert. Mit Hilfe des am FMP installierten 400 MHz DNP-Systems konnte an der S16/18A -Mutante eine DNP-Signalverstärkung von $\epsilon = 37$ erzielt werden. Bei einer angenommenen linearen Abnahme der DNP-Verstärkung mit steigendem B₀-Feld [47] (siehe Abschnitt 1.3.1) sollte bei 600 MHz eine DNP-Verstärkung von $\epsilon = 25,5$ zu erwarten sein. Der tatsächliche Wert betrug jedoch lediglich $\epsilon = 15,5$. In beiden Fällen wurde die Verstärkung durch das Skalieren eines ohne Mikrowelleneinstrahlung aufgezeichneten ¹H-¹³C CP-Spektrums auf die

Signalintensität eines unter gleichen Bedingungen, jedoch mit Mikrowellenbestrahlung aufgezeichneten Spektrums bestimmt. Dadurch wird weder die verbesserte Boltzmann-Verteilung bei höherem B_0 -Feld, noch die Sensitivität des jeweiligen Probenkopfs beachtet. Obwohl für das bei 600 MHz aufgezeichnete 2D Spektrum (Abbildung 3-18) nur etwa halb so viele Experimenten gemittelt wurde, zeigt das bei 400 MHz aufgenommene Spektrum keine wesentlich höheren Intensitäten der Protein-spezifischen Signale. Dies kann sowohl durch die schmalere Signalbreite, als auch an einer allgemein besseren Sensitivität des in Billerica verwendeten Probenkopfes liegen.

Um zu überprüfen, ob das Expressionsschema (siehe Abschnitt 2.5) geeignet ist, stabil arretierte Komplexe aus uniform ^{13}C , ^{15}N -markierten naszierenden Ketten und unmarkierten Ribosomen zu erhalten, wurden Kontrollmessungen am Säulendurchfluss durchgeführt. Wie in Abschnitt 2.5 beschrieben, erfolgte die Aufreinigung der RNCs über eine Strep-Tactin Säule. Ribosomen, welche keine naszierende Kette tragen, verfügen folglich nicht über einen dreifachen N-terminalen Strep-tag und werden von der Strep-Tactin Säule nicht gebunden. Die Menge der aufgereinigten RNCs entspricht lediglich etwa 10 % der zu erwartenden Gesamtheit zellulärer Ribosomen [101, 149]. Der Säulendurchfluss besteht dementsprechend hauptsächlich aus Ribosomen ohne naszierende Kette und weiteren zellulären Proteinen. Um eine vergleichbare Ribosomen-Konzentration im Rotor zu erhalten wurde nach erfolgter Konzentrationsbestimmung die Proben entsprechend verdünnt und mit 30mM TOTAPOL versetzt. Abbildung 3-21 zeigt Überlagerungen von DQ-gefilterten 2D Spektren und DQ-gefilterten 1D Spektren der S16/18A-Mutante sowie der S22/28A-Mutante innerhalb des ribosomalen Tunnels, mit Spektren des jeweiligen Säulendurchflusses.

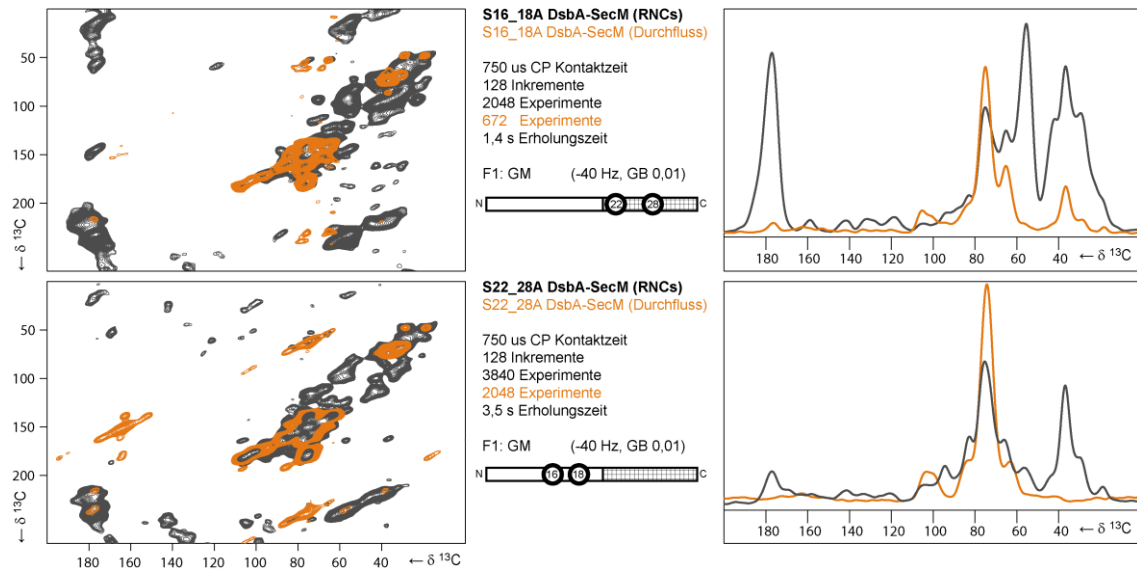


Abbildung 3-21: DQ gefilterte (POST-C7) 2D ^{13}C - ^{13}C Spektren (links) und DQ gefilterte (POST-C7) 1D ^{13}C -Spektren (rechts) der DsbA-SecM Mutanten S16/18A (oben) und S22/28A (unten) überlagert mit Spektren des jeweiligen Säulendurchflusses (orange). Als erstes Kontourlevel der 2D Spektren wurde der dreifache Wert des durchschnittlichen Rauschlevels gewählt.

Sowohl für die Spektren des Säulendurchflusses, als auch für die Spektren der RNCs wurde das erste Kontourlevel auf den dreifachen Wert des durchschnittlichen Rauschens gelegt und die gleiche Prozessierung wie in Abbildung 3-15 gewählt. Dadurch ist ein direkter Vergleich zu den weiter oben analysierten Spektren möglich. Für beide Mutanten können keine wesentlichen Proteinsignale in den 2D Spektren detektiert werden. Lediglich im Bereich der $\text{C}\alpha$ -CO-Korrelationen (~ 60 ppm, ~ 180 ppm in der direkten und ~ 240 ppm in der indirekten Dimension) sind schwache Signale sichtbar. Vergleichbare Signalintensitäten hingegen können für den Bereich der Ribose und der Lipidsignale festgestellt werden. Entscheidend ist jedoch das vollständige Fehlen von Serin-Signalen in den Spektren der Säulendurchflüsse. Damit resultieren die oben beschriebenen $\text{C}\alpha$ - und $\text{C}\beta$ -Resonanzen der S16/8A-Mutante und der S22/28A-Mutante ausschließlich aus den jeweils verbleibenden zwei Serinen der naszierenden Kette.

Der Vergleich der 1D Spektren (Abbildung 3-21, rechts) zeigt besonders deutlich das Fehlen von Proteinsignalen in den Spektren der Säulendurchflüsse. Insbesondere der Carbonyl-Bereich (etwa 160 ppm bis 190 ppm) zeigt keine wesentlichen Signalintensitäten. Die Probe der S22/28A-Mutante scheint deutlich geringer konzentriert zu sein. Dies kann aus der im Vergleich zur S16/18A-Mutante geringeren Intensitäten der Protein-spezifischen Signale geschlossen werden.

Obwohl beide Spektren mit der gleichen Anzahl von Messungen aufgezeichnet wurde, ist z.B. die Höhe des Carbonyl-Signals (180 ppm) der S16/18A-Mutante etwa fünffach höher im Vergleich zum Carbonyl-Signal der S22/18A-Mutante. Dies kann darauf hinweisen, dass die Effizienz der Arretierungs-Sequenz durch den Austausch der beiden Serine gegen Alanine die Effizienz des Translationsarrestes verringert und damit die Expressionsrate verschlechtert. Die Konsensussequenz des SecM-Peptids lautet FxxxxWlxxxxGIRAGP [99], wobei ‚x‘ austauschbare Aminosäuren repräsentiert. Die Serine an Position 22 und 28 sind dementsprechend keine notwendige Voraussetzung für den Translationsarrest. Tatsächlich konnte anhand einer Alanin-Scan-Mutagenese gezeigt werden, dass eine Substitution dieser Serine gegen Alanine keinen signifikanten Einfluss auf das Arretierungsverhalten der SecM Sequenz hat [99]. Mit Hilfe von Absorptionmessungen bei 260 nm wurde die Menge der isolierten Ribosomen bestimmt, bevor diese in den NMR-Rotor transferiert wurde. Für die S16/18A Mutante wurde ein Wert von 3,09 nmol, für die S22/28A-Mutante ein Wert von 3,03 nmol bestimmt. Bei einer angenommenen vollständigen Transferierung beider Proben in den NMR-Rotor sollte die Ribosomen-Konzentration beider Proben gleich sein. Daher verbleiben zwei mögliche Ursachen: Die Konzentration freier Ribosomen in der Probe der S22/28A-Mutante ist höher, oder die ¹³C-Markierungseffizienz dieser Mutante ist geringer.

Eine massenspektrometrische Analyse der RNCs ergab tatsächlich eine ¹³C, ¹⁵N-Markierungseffizienz von 95 % für die S16/18A-Mutante und 87 % für die S22/28A-Mutante. Dies kann jedoch nicht vollständig die fünffach reduzierte Signalintensität erklären. Dementsprechend kann vermutet werden, dass die Anzahl der freien Ribosomen in der Probe der SecM-Mutante deutlich höher ist. Dies kann entweder durch ein Entlassen der Kette aus dem ribosomalen Exit-Tunnel im Laufe der Probenpräparation, -Lagerung oder -Messung verursacht werden, oder auf eine unvollständige Aufreinigung der RNC zurückgeführt werden. Als weitere mögliche Ursachen verbleiben zudem ein unvollständiger Transfer der isolierten RNCs in den NMR-Rotor, geringe Abweichungen der gewählten NMR-Parameter (Energie oder Länge der eingestrahlten RF-Pulse) vom optimalen Wert oder eine veränderte Konzentration des zugegebenen TOTAPOLs.

3.3.3. Diskussion

Anhand dieser Studie konnte gezeigt werden, dass es prinzipiell möglich ist, uniform ^{13}C -markierte naszierende Ketten innerhalb unmarkierter Ribosomen mit Hilfe der DNP-verstärkten Festkörper-NMR zu untersuchen. Zum einen konnte nachgewiesen werden, dass durch die Verwendung des Antibiotikum Rifampicin die Expression und damit die Markierung von naszierenden Ketten von der Synthese zelleigener Proteine entkoppelt werden kann. Zum anderen wurde gezeigt, dass Hintergrundsignale, welche durch die natürliche Häufigkeit des ^{13}C -Isotops auftreten, durch die Verwendung der POST-C7-Sequenz effektiv unterdrückt werden können. Insbesondere die Größe der Ribosomen limitierte die Analytkonzentration der gemessenen Proben auf etwa 200 μM . Nur durch die enorme Signalverstärkung, welche die DNP-Technik ermöglicht, konnten innerhalb einer durchschnittlichen Messzeit von fünf Tagen Spektren mit ausreichendem Signal-zu-Rausch-Verhältnis aufgezeichnet werden.

Die Seitenketten-spezifische Analyse dieser Spektren gestaltet sich jedoch deutlich schwieriger. Sowohl die Zugabe des Biradikals als auch die niedrige Proben temperatur, beides notwendige Voraussetzung der DNP-Technik in der Festkörper-NMR, führen zu stark verbreiterten Signalen. Zudem kann derzeit nicht ausgeschlossen werden, dass die naszierenden Ketten auch bei Raumtemperatur in unterschiedlichen Konformationen vorliegen. Dies würde bedeuten, dass zusätzlich zur Tieftemperatur-bedingten Veränderung der molekularen Dynamik und der damit einhergehenden strukturellen Inhomogenität, ein Ensemble von RNCs mit naszierenden Ketten in unterschiedlichen Faltungszuständen vorliegt. In Verbindung mit einer uniformen Markierung der naszierenden Kette, führt dies bereits bei einer Länge von 37 Aminosäuren zu einer starken Überlagerung der Signale. Nichtsdestotrotz konnten anhand ausgewählter spektraler Bereiche erste Schlussfolgerungen auf die Faltungszustände einzelner Abschnitte der naszierenden Kette gezogen werden. Auf Grundlage statistischer Werte der sekundären chemischen Verschiebungen konnte gezeigt werden, dass ein Teil der naszierenden Kette in einer helikalen Konformation vorliegt, während der Rest der Kette in einer nicht-helikalen bzw. gestreckten Konformation vorliegt.

Die Analyse von Faltungszuständen auf Grundlage der sekundären chemischen Verschiebungen wurde bereits erfolgreich an Spektren Membranprotein-gebundener Peptidliganden durchgeführt [150, 151]. Ausgangspunkt dieser Analysen sind jedoch stets Mittelwerte einer Vielzahl von NMR-Daten, welche bei Raumtemperatur aufgezeichnet wurden. Im Gegensatz dazu wurde in dieser

Arbeit Spektren bei kryogenen Temperaturen aufgezeichnet. Anhand des Modellsystems SH3 und des Rezeptor-gebundenen NTII (siehe Abschnitt 3.2) konnten wir allerdings keine signifikante Abweichung der Signalpositionen bei unterschiedlichen Temperaturen feststellen. An unterschiedlichen Präparationen des GNNQQNY-Peptids berichten Debelouchina et al. jedoch deutlichen Verschiebungen der Signale bei tiefen Temperaturen für die nanokristalline Form, im Gegensatz zur amyloiden Form welche Raumtemperatur-ähnliche Spektren liefert [34]. Dies wird auf eine stärkere Lösungsmittel-Exposition der einzelnen Seitenketten in der kristallinen Form zurückgeführt. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass aufgrund der Lösungsmittelzugänglichkeit der naszierenden Kette ähnliche Effekte zu beachten sind.

Die beobachtete Signalverbreiterung und -Aufspaltungen erschweren einerseits die Analyse der Daten bieten jedoch andererseits gleichzeitig Hinweise auf die Dynamik und damit den Strukturellen Kontext von Aminosäuren. Es konnte gezeigt werden, dass Serine, welche sich im distalen Ende des Tunnels befinden sich durch eine höhere Flexibilität und strukturelle Inhomogenität auszeichnen. .

Insgesamt konnten erste Schritte unternommen werden, diese hoch-komplexe molekulare Maschine auf atomarer Ebene mittels NMR zu analysieren. Strukturelle Untersuchungen naszierender Ketten innerhalb von Ribosomen wurden bislang ausschließlich mit kristallographischen Methoden durchgeführt. Mit Hilfe der DNP-verstärkten Festkörper-NMR sollte es möglich sein, weitere Einblicke in das komplexe Zusammenspiel zwischen naszierender Kette und Ribosom zu gewinnen. Insbesondere die Möglichkeit auf hochauflösende Kristalle zu verzichten, könnte die Beantwortung bislang ungeklärter Fragen vorantreiben. Messungen an RNCs im Komplex mit verschiedenen Faktoren, strukturelle Analysen des cotranslationalen Transports von naszierenden Ketten über Membranen oder von cotranslationalen Faltungsprozesses innerhalb des Chaperons TF sind nur wenige Beispiele möglicher Anwendungen.

Es konnte deutlich gezeigt werden, dass die Implementierung von Magneten höherer Feldstärken in die DNP-Technik maßgeblich dazu beitragen kann, die Auflösung der Spektren zu verbessern und damit die Interpretation der Daten zu vereinfachen. Eine weitere Möglichkeit die spektrale Auflösung zu verbessern, wäre eine Seitenketten-spezifische ^{13}C -Markierung der naszierenden Kette [36]. Da im Gegensatz zur üblichen Expression von Proteinen und Peptiden bei der Expression von RNCs kein Ribosomen-Recycling stattfindet, muss mit großen Mengen Nährmedien und entsprechend hohen Konzentrationen an markierten Aminosäuren gearbeitet werden. Wirtschaftlicher hingegen wäre eine *in-vitro* Expression der RNCs. Neben der höheren

Ribosomen-Konzentration kann in zellfreien System die Verstoffwechslung von Aminosäuren effektiv unterdrückt, und somit mit nahezu beliebigen Markierungsschemata exprimiert werden. Weiterhin zeigen diese Ergebnisse, dass die veränderte Dynamik der einzelnen Seitenketten bei den unterschiedlichen Temperaturen zugleich eine große Herausforderung als auch eine große Chance darstellt die Struktur von Proteinen zu erforschen. Zwar erschweren Signalverbreiterungen und – Aufspaltungen die sequenzspezifische Analyse der Daten, lassen jedoch gleichzeitig weitgehende Rückschlüsse auf die Mobilität und damit dem strukturellen Kontext der einzelnen Seitenketten zu.

4. Schlussfolgerungen und Ausblick

Die dynamische Kernpolarisation kann genutzt werden, um die Sensitivität der Festkörper-NMR signifikant zu verstärken. In der gegenwärtigen Anwendung dieser Technik werden zwei Grundvoraussetzungen benötigt, welche die Intensitäten und die Breiten der NMR-Signale beeinflussen: Zugabe eines Radikals und tiefe Probertemperaturen. Spektren, welche mit der DNP-Technik aufgenommen wurden, können sich daher stark von konventionellen NMR-Spektren unterscheiden. So weisen z.B. Spektren, welche bei tiefen Temperaturen aufgezeichnet wurden, zum Teil stark verbreiterte NMR-Linien auf. Dies erschwert eine folgende Analyse der Spektren im Sinne der Strukturaufklärung. Ein ähnlich negativer Einfluss wurde für hohe Radikalkonzentrationen beschrieben. Eine genaue Kenntnis der Ursache und Wirkung dieser Effekte ist daher sowohl für ein tieferes Verständnis der aufgenommenen Spektren als auch für eine weitere Optimierung der DNP-Technik notwendig.

Im ersten Abschnitt dieser Arbeit wurde der Einfluss der Biradikal-Konzentration auf die Signalintensitäten und Signalbreiten untersucht. Die Anwesenheit paramagnetischer Zentren führt zu einer Steigerung der T_2 -Relaxation und damit zu einem schnelleren Verlust der transversalen Kohärenz (Abschnitt 3.1). Die daraus resultierende homogene Signalverbreiterung kann jedoch in den meisten Anwendungen vernachlässigt werden. Zum einen wird sie häufig durch inhomogene Linienverbreiterungen überdeckt, zum anderen tritt sie erst bei einer TOTAPOL-Konzentration (C_T) von 50 mM in signifikanter Weise auf. Für die Mehrzahl der bislang veröffentlichten DNP-Studien wurden hingegen C_T s von 10-40 mM verwendet [33, 35, 36, 41, 42, 125, 152-156]. Neben der verstärkten T_2 -Relaxation treten jedoch weitere paramagnetische Effekte auf, welche bei der Durchführung von DNP-Experimenten zu beachten sind. Die Spin-Gitter-Relaxation im rotierenden Bezugssystem ($T_{1\rho}$) nimmt ebenfalls bei zunehmender Radikalkonzentration ab und verkürzt wesentlich die maximale Länge einer effizienten Kreuzpolarisation. Insbesondere für Experimente mit mehreren CP-Schritten, oder Experimenten, die auf eine lange CP-Kontaktzeit basieren, ist dieser Faktor entscheidend. Weiterhin kann aufgrund von paramagnetischen Verschiebungen der Protonenresonanzen sowie der paramagnetischen Relaxationsverstärkung die Anzahl detektierbarer Kerne reduziert werden. Anhand einer Modellrechnung konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass bei einer C_T von 50 mM bereits die Signale von 52 % aller in der Probe befindlichen Kerne unterhalb der Detektionsgrenze verbreitert werden können. Dies setzt natürlich

voraus, dass das TOTAPOL, sowie das zu untersuchende Protein oder Peptid jeweils homogen in der Probe verteilt sind. Das heißt, bei einer räumlichen Trennung von Analyt und Biradikal können negative Effekte minimiert und so die spektrale Auflösung trotz hoher C_T aufrechterhalten werden. Daher ergeben sich sowohl Möglichkeiten in Bezug auf die Auswahl geeigneter Systeme zur Untersuchung mit DNP-NMR als auch in Bezug auf veränderte Präparationsmethoden der Proben. Am Beispiel des Neurotoxin II, gebunden am nicotinergen Acetylcholinrezeptor, konnte gezeigt werden, dass durch Inaktivierung der TOTAPOL-Moleküle in direkter Nähe zum Analyt eine homogene Signalverbreiterung nahezu vollständig eliminiert werden kann.

Neben den genannten negativen Effekten des zugegebenen Biradikals auf die spektrale Qualität verkürzen diese paramagnetischen Substanzen wesentlich die $^1\text{H-T}_1$ -Zeit. Dadurch ist es möglich, auch bei niedrigen Temperaturen sehr kurze Wartezeiten zwischen den einzelnen Experimenten zu verwenden. Daher wird bei Zugabe von TOTAPOL das pro Zeiteinheit detektierbare Signal-Zu-Rausch-Verhältnis optimiert. In der vorliegenden Arbeit werden diese Effekte des zugegebenen Biradikals gegeneinander abgewogen und in diesem Zusammenhang der Begriff „Sensitivität“ dem häufig in der DNP-Literatur verwendeten Begriff „enhancement“ (Verstärkung) gegenübergestellt. Im Gegensatz zur Sensitivität, definiert die DNP-Verstärkung lediglich den Unterschied im Signal-zu-Rausch-Verhältnis gemessen an einer Probe mit und ohne Mikrowelleneinstrahlung. Die Sensitivität hingegen ermöglicht einen Vergleich unterschiedlicher Proben mit jeweils unterschiedlichen Analyt- und Biradikal-Konzentrationen.

Der zweite Faktor, welcher in dieser Arbeit untersucht wurde, ist die Proben temperatur (Abschnitt 3.2). Zum einen sind bei der Verwendung der derzeit verfügbaren Biradikale und Spektrometern Temperaturen um 100 K zwingend notwendig um einen effektiven Polarisations transfer zu gewährleisten, zum anderen erhöhen tiefen Temperaturen die Boltzmann-Verteilung der Kernspins im Grundzustand und damit die Sensitivität der NMR-Methode an sich. Zudem schützt die permanente Probenkühlung die zu untersuchenden Proteine vor einer thermischen Denaturierung während der Mikrowellenbestrahlung.

Bei den meisten der derzeit veröffentlichten DNP-Studien wurden cryogene Temperaturen verwendet [27, 29, 30, 33, 35-37, 154, 157-159]. Abhängig vom untersuchten System treten dabei mehr oder weniger stark verbreiterte Signale auf. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Signalverbreiterung dabei vorrangig inhomogener Natur ist (siehe Abschnitt 3.2.2). Im Gegensatz zu anderen Methoden, wie der Röntgenbeugung [160] oder der Neutronenstreuung [161, 162], lassen sich bei der Tieftemperatur-NMR (und damit in der DNP-Verstärkten Festkörper-NMR)

keine distinkten Übergangstemperaturen definieren. Die beobachtbare Zunahme der Signalbreiten und Signalaufspaltungen erstrecken sich vielmehr über große Temperaturbereiche. Eine mögliche Ursache für diese Diskrepanz könnte die unterschiedliche zeitliche Auflösung der zugrundeliegenden dynamischen Prozesse liegen. Während in den eben genannten Methoden umgebungsabhängige Dynamiken über der gesamten Probe und im Verlauf einer Messung gemittelt werden, können in der NMR dynamische Prozesse unterschiedlicher Zeitskalen unterschieden werden. In der vorliegenden Arbeit wird argumentiert, dass prinzipiell drei unterschiedliche Arten der molekularen Dynamik unterschieden werden können: Schnelle, intermediäre und langsame Prozesse. In Abhängigkeit von der molekularen Umgebung wechseln dadurch Atome oder Atomgruppen beim Absenken der Proben temperatur von einer schnellen zu einer intermediären oder von einer intermediären zu einer langsamen Dynamik. Im ersten Fall tritt eine inhomogene Signalverbreiterung, im zweiten Fall eine Signalaufspaltung oder, in seltenen Fällen, eine Abnahme der Signalbreite auf. In diesem Zusammenhang kann die Tieftemperatur-NMR, bzw. DNP-NMR auch als Möglichkeit verstanden werden, neue Erkenntnisse über die Dynamik einzelner Atome eines Moleküls zu gewinnen. Die beobachtbaren Linienverbreiterungen und -Aufspaltungen sind schließlich das Resultat zusätzlicher Informationen, welche evtl. in Zukunft spektroskopisch aufgelöst werden können.

Allgemein können im Umgang mit diesen Signalverbreiterungen unterschiedliche Lösungsstrategien verfolgt werden:

(i) Durch eine geeignete Wahl des zu untersuchenden Systems

Ist die Dynamik der zu untersuchenden Atome und Atomgruppen bereits bei Raumtemperatur derart verlangsamt, dass während der Messung nur eine oder sehr wenige unterschiedliche Konformationen auftreten, so führt ein Absenken der Proben temperatur zu keiner weiteren Signalverbreiterung. In der vorliegenden Arbeit wurde beispielsweise an Hand des Rezeptor-gebundenen Neurotoxin II gezeigt, dass diejenigen Atome welche durch die enge Bindung in die Rezeptortasche in ihrer Mobilität stark beeinträchtigt sind, auch bei tiefen Temperaturen sehr gut aufgelöst detektiert werden können. In diesem Zusammenhang scheint auch die Lösungsmittel-Zugänglichkeit der zu beobachtenden Atome bedeutend zu sein. In Proteinkristallen bilden Wassermoleküle einen integralen Bestandteil der Kristallstruktur (das sogenannte Kristallwasser [133, 163, 164]). Gefrieren die Wassermoleküle in direkter Nähe zum Kristall (Hydrationshülle), verändert sich deren Konformation und folglich,

deren Einfluss auf die Mobilität. Da Lösungsmittel-exponierte Atomgruppen im Allgemeinen über eine hohe Flexibilität verfügen, ist dieser Effekt schwer abzugrenzen. Durch den Vergleich nanokristalliner und amyloider Präparationen des GNNQQNY-Peptids bei tiefen Temperaturen (100 K) konnten Debelouchina et al. eine signifikant stärkere Signalverbreiterung der nanokristallinen Probe nachweisen und führen dies auf den Einfluss des Kristallwasser zurück [34]. Die amyloide Form des Peptids zeichnet sich durch eine hohe Hydrophobizität aus, wodurch in diesen Präparationen große Teile des Peptid vollständig dehydriert vorliegen [35].

Aus biophysikalischer Sicht scheinen meines Erachtens membrangebundene Liganden-Rezeptor Systeme besonders vielversprechende Forschungsobjekte für die DNP-verstärkte Festkörper-NMR zu sein. Wenn die Bindung des Liganden die Signalverbreiterung bei tiefen Temperaturen minimiert, kann das Potential der DNP ausgenutzt werden um kleinere funktionelle Moleküle in einer weitgehend nativen Umgebung zu untersuchen. Dadurch könnte die DNP-NMR eine bedeutende, zur Cryo-EM komplementäre, Funktion innerhalb der pharmakologischen Grundlagenforschung erlangen.

(ii) Neue Methoden der Probenpräparation

Derzeit werden Versuche unternommen, an Stelle des Glycerols Succrose-Lösungen als Frostschutzmittel einzusetzen. Die hohe Hydrophobizität soll in diesem Fall die Hydrationshülle des zu untersuchenden Proteins entfernen. Durch Zugabe von Kaliumaluminiumsulfat (Alaune) könnte zudem die Viskosität dieser Zuckerlösung gesteigert werden, wodurch die Mobilität von Aminosäuren-Seitenketten weiter eingeschränkt wird. Bereits in der Vergangenheit wurde versucht, sowohl durch sehr langsames, als auch durch sehr schnelles Einfrieren der Probe die strukturelle Inhomogenität der Proben zu minimieren. Zum jetzigen Zeitpunkt wurden auf diesem Gebiet jedoch keinerlei Erfolge erzielt. Grundlage dieser Versuche, ist die Überlegung, Proteine während des Abkühlens in ein strukturelles energetisches Minimum zu überführen. Für jedes Molekül mit mehreren Freiheitsgraden sind unterschiedliche Konformationen möglich, jede dieser Konformationen entspricht einem bestimmten energetischen Zustand. Sollten einzelne Konformationen gegenüber anderen energetisch stark begünstigt sein, so könnte es möglich sein dessen Population zu vergrößern. Da die „Barrieren“ zwischen den einzelnen (lokalen) Zuständen in der

Regel sehr gering sind, d.h. kein deutliches globales Minimum zu erwarten ist, ist die praktische Durchführbarkeit jedoch sehr spekulativ.

(iii) Messungen bei höheren Temperaturen

Wie bereits erwähnt, können bei tiefen Temperaturen schnelle Prozesse in den Bereich intermediärer Dynamik verlangsamt werden und so zu einer inhomogenen Linienverbreiterung resultieren. Um dies zu verhindern, werden derzeit Anstrengungen unternommen, den Polarisationstransfer auch bei höheren Temperaturen und damit bei einer hohen Seitenketten-Flexibilität zu ermöglichen. Hierfür wurden beispielsweise Versuche an teilweise deuteriertem SH3 bei 173 K durchgeführt [158]. Grundlagen dieser Versuche sind die zu erwartende stärkere Polarisierung der verbleibenden Protonen, ein Aufbrechen des stark gekoppelten Protonennetzwerkes (siehe Abschnitt 1.2.2), sowie die Möglichkeit die quadrupolare Kopplungen der Deuteronen direkt zu messen. Bei diesen Versuchen wurden zwar geringere DNP-Verstärkungsfaktoren, jedoch zugleich deutlich schmalere Signalbreiten detektiert. Nachteile dieser Methodik sind der Verlust mittels ^1H , ^{13}C -CP detektierbarer Kohlenstoffe, eine generell geringe Transfereffizienz des ^2H - ^{13}C -CP im Vergleich zur ^1H - ^{13}C CP und die höheren Kosten, welche bei der Expression deuterierter Proteine entstehen.

Weitere Möglichkeiten böten neue Biradikale deren Elektronenrelaxation gegenüber dem TOTAPOL deutlich reduziert ist. Dadurch könnte auch bei höheren Proben Temperaturen ein effektiver Polarisationstransfer stattfinden und so eine hohe Signalverstärkung ermöglichen. Für biologische Anwendungen scheint dabei eine der größten Herausforderungen zu sein, gleichzeitig eine hohe Wasserlöslichkeit des Biradikals zu gewährleisten.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, die Möglichkeiten der Dynamischen Kernpolarisation zur strukturellen Analyse von molekularen Maschinen zu ergründen. Der Begriff „molekulare Maschine“ wird dabei als komplexes, zum Teil hoch-molekulares System von miteinander interagierenden Proteinen und anderen Zellbestandteilen verstanden. Aufgrund der prinzipiellen Größenunabhängigkeit der Festkörper-NMR, eignet sich diese Methode, die Struktur und Dynamik von Proteinen und Peptiden in ihrer nativen Umgebung zu erforschen. DNP stellt dabei eine Möglichkeit da, die schwache Sensitivität dieser Methode zu überwinden. Wie in den vorangegangenen Abschnitten zusammengefasst wurde, schränken verschiedene Faktoren die

Anwendbarkeit der DNP-Technik innerhalb der biologischen Festkörper-NMR ein. Insbesondere die homogene und inhomogene Signalverbreiterung limitiert derzeit wesentlich die Bandbreite potentieller Untersuchungsobjekte. Gelingt es jedoch, mit der Hilfe der DNP einzelne Bestandteile einer molekularen Maschine – sozusagen ein einzelnes Zahnrad – innerhalb der gesamten, intakten Maschine selektiv zu detektieren, so erlangt diese Methode einen unschätzbaren Wert. Aufbauend auf den in den ersten beiden Abschnitten dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnissen über den Einfluss der Biradikal-Konzentration und der tiefen Proben temperatur auf spektroskopisch relevante Parameter, wurden zwei sehr unterschiedliche Modellsysteme analysiert.

Es konnte gezeigt werden, dass DNP eine sehr geeignete Methode darstellt Rezeptor-gebundene Peptidliganden in nativen Membranen zu untersuchen. Aufgrund der engen Bindung des Toxins in die Bindungstasche des Rezeptors werden strukturelle Inhomogenitäten bei tiefen Temperaturen vermindert. Aufgrund der postulierten Reduzierung aktiver TOTAPOL-Moleküle in direkter Nähe zum Liganden, konnte zudem eine inhomogene Signalverbreiterung aufgrund paramagnetischer Effekte minimiert werden. Dadurch war es möglich, DNP-verstärkte 2D ^{13}C - ^{13}C -Spektren aufzuzeichnen, deren Auflösung und Signalintensität eines konventionellen Spektrums der gleichen Probe vergleichbar sind. Im Vergleich zu konventionellen NMR wurde dabei jedoch lediglich 6,5 % der Messzeit benötigt. Dies demonstriert eindrucksvoll die potentielle Möglichkeit, mit Hilfe der DNP kleinere Moleküle zu untersuchen, welche entweder nicht über-exprimiert werden können, deren Struktur in einer nativen Umgebung untersucht werden soll oder deren Aufreinigung im Allgemeinen unmöglich oder unerwünscht ist. Insbesondere im Kontext der pharmakologischen Grundlagenforschung stellen diese Systeme besonders vielversprechende Forschungsobjekte da.

Abschließend wurde gezeigt, dass naszierende Ketten innerhalb des ribosomalen Tunnels untersucht werden können (Abschnitt 3.3). Die hohe Mobilität dieser Ketten und deren Lösungsmittelzugänglichkeit stellten hierbei besondere Herausforderungen da. Mit Hilfe von Punktmutationen und der Anwendung eines Doppelquanten-Filters wurde versucht, Seitenkettenspezifische Signale isoliert zu analysieren und so Erkenntnisse über unterschiedliche Faltungszustände innerhalb der Kette zu gewinnen. Die Auswertung dieser Signale basierte dabei im Wesentlichen auf einem Vergleich der Signalmaxima mit statistischen Werten über die sekundäre chemische Verschiebung von Kohlenstoffsignalen in Abhängigkeit des Faltungszustandes. Aufgrund der stark verbreiterten Signale und der der zum Teil geringen Sensitivität, konnte bislang keine endgültige Aussage über unterschiedliche Faltungszustände getroffen werden. Die Expression und Präparation der verwendeten Proben, das Größenverhältnis

zwischen Ribosom und naszierender Kette, sowie das zur Verfügung stehende Rotorvolumen begrenzen die Analyt-Konzentration auf etwa 200 μM . Die Tatsache, dass selektiv Signale der naszierenden Kette detektiert werden konnten, demonstriert daher das enorme Potential dieser Methode. Insbesondere das bei einer Feldstärke von 600 MHz aufgezeichnete Spektrum, deutet darauf hin, dass durch die derzeitige rapide Entwicklung der zur Verfügung stehenden DNP-Spektrometer, eine eindeutige seitenkettenspezifische Analyse von naszierenden Ketten zeitnah möglich sein wird. Derzeit werden erste 800 MHz Spektrometer installiert und getestet. In Verbindung mit neuen Biradikalen, welche auch bei hohen Feldstärken vergleichbare Signalverstärkungen ermöglichen, wird sich die DNP-Technik zu einem neuen Standard in der Festkörper-NMR entwickeln.

5. Literaturverzeichnis

1. Fagerberg, L., et al., *Prediction of the human membrane proteome*. Proteomics, 2010. **10**(6): p. 1141-9.
2. Castellani, F., et al., *Structure of a protein determined by solid-state magic-angle-spinning NMR spectroscopy*. Nature, 2002. **420**(6911): p. 98-102.
3. Franks, W.T., et al., *Dipole tensor-based atomic-resolution structure determination of a nanocrystalline protein by solid-state NMR*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(12): p. 4621-6.
4. Zech, S.G., A.J. Wand, and A.E. McDermott, *Protein structure determination by high-resolution solid-state NMR spectroscopy: application to microcrystalline ubiquitin*. J Am Chem Soc, 2005. **127**(24): p. 8618-26.
5. Ferguson, N., et al., *General structural motifs of amyloid protofilaments*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(44): p. 16248-53.
6. Jaroniec, C.P., et al., *High-resolution molecular structure of a peptide in an amyloid fibril determined by magic angle spinning NMR spectroscopy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(3): p. 711-6.
7. Wasmer, C., et al., *Amyloid Fibrils of the HET-s(218–289) Prion Form a β Solenoid with a Triangular Hydrophobic Core*. Science, 2008. **319**(5869): p. 1523-1526.
8. Shahid, S.A., et al., *Membrane-protein structure determination by solid-state NMR spectroscopy of microcrystals*. Nat Methods, 2012. **9**(12): p. 1212-7.
9. Shahid, S.A., et al., *Assignment and secondary structure of the YadA membrane protein by solid-state MAS NMR*. Sci Rep, 2012. **2**: p. 803.
10. Han, Y., et al., *Solid-State NMR Studies of HIV-1 Capsid Protein Assemblies*. Journal of the American Chemical Society.
11. Levitt, M.H., *Spin dynamics: Basics of Nuclear Magnetic Resonance*. 2. edition ed2008: Wiley.
12. Laws, D.D., H.M. Bitter, and A. Jerschow, *Solid-state NMR spectroscopic methods in chemistry*. Angew Chem Int Ed Engl, 2002. **41**(17): p. 3096-129.
13. Pines, A., M.G. Gibby, and J.S. Waugh, *Proton-enhanced nuclear induction spectroscopy ^{13}C chemical shielding anisotropy in some organic solids*. Chemical Physics Letters, 1972. **15**(3): p. 373-376.
14. Hartmann, S.R. and E.L. Hahn, *Nuclear Double Resonance in the Rotating Frame*. Physical Review, 1962. **128**(5): p. 2042-2042.
15. Bennett, A.E., et al., *Chemical-Shift Correlation Spectroscopy in Rotating Solids - Radio Frequency-Driven Dipolar Recoupling and Longitudinal Exchange*. Journal of Chemical Physics, 1992. **96**(11): p. 8624-8627.
16. Griffiths, J.M. and R.G. Griffin, *Nuclear magnetic resonance methods for measuring dipolar couplings in rotating solids*. Analytica Chimica Acta, 1993. **283**(3): p. 1081-1101.

-
17. Raleigh, D.P., M.H. Levitt, and R.G. Griffin, *Rotational Resonance in Solid-State Nmr*. Chemical Physics Letters, 1988. **146**(1-2): p. 71-76.
 18. Wokaun, A. and R.R. Ernst, *Selective Detection of Multiple Quantum Transitions in Nmr by 2-Dimensional Spectroscopy*. Chemical Physics Letters, 1977. **52**(3): p. 407-412.
 19. Ernst, R.R., G. Bodenhausen, and A. Wokaun, *Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions* 1990: Oxford University Press.
 20. Lee, Y.K., et al., *Efficient dipolar recoupling in the NMR of rotating solids. A sevenfold symmetric radiofrequency pulse sequence*. Chem. Phys. Lett, 1995. **242**: p. 304-309.
 21. Overhauser, A.W., *Polarization of Nuclei in Metals*. Physical Review, 1953. **92**(2): p. 411-411.
 22. Carver, T.R. and C.P. Slichter, *Polarization of Nuclear Spins in Metals*. Physical Review, 1953. **92**(1): p. 212-213.
 23. Carver, T.R. and C.P. Slichter, *Experimental Verification of the Overhauser Nuclear Polarization Effect*. Physical Review, 1956. **102**(4): p. 975-980.
 24. Bajaj, V.S., et al., *Dynamic nuclear polarization at 9T using a novel 250 GHz gyrotron microwave source*. Journal of Magnetic Resonance, 2003. **160**(2): p. 85-90.
 25. Bajaj, V.S., et al., *250GHz CW gyrotron oscillator for dynamic nuclear polarization in biological solid state NMR*. J Magn Reson, 2007. **189**(2): p. 251-79.
 26. Becerra, L.R., et al., *Dynamic Nuclear-Polarization with a Cyclotron-Resonance Maser at 5-T*. Physical Review Letters, 1993. **71**(21): p. 3561-3564.
 27. Barnes, A.B., et al., *Resolution and polarization distribution in cryogenic DNP/MAS experiments*. Phys Chem Chem Phys, 2010. **12**(22): p. 5861-7.
 28. Barnes, A.B., et al., *High-Field Dynamic Nuclear Polarization for Solid and Solution Biological NMR*. Appl Magn Reson, 2008. **34**(3-4): p. 237-263.
 29. Mak-Jurkauskas, M.L., et al., *Energy transformations early in the bacteriorhodopsin photocycle revealed by DNP-enhanced solid-state NMR*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(3): p. 883-8.
 30. Rosay, M., et al., *High-frequency dynamic nuclear polarization in MAS spectra of membrane and soluble proteins*. Journal of the American Chemical Society, 2003. **125**(45): p. 13626-7.
 31. Rosay, M., et al., *Sensitivity-enhanced NMR of biological solids: dynamic nuclear polarization of Y21M fd bacteriophage and purple membrane*. J Am Chem Soc, 2001. **123**(5): p. 1010-1.
 32. Sergeyev, I.V., et al., *Chemical Shifts for the Unusual DNA Structure in Pfl Bacteriophage from Dynamic-Nuclear-Polarization-Enhanced Solid-State NMR Spectroscopy*. J. Am. Chem. Soc., 2011.
 33. Bayro, M.J., et al., *Intermolecular structure determination of amyloid fibrils with magic-angle spinning and dynamic nuclear polarization NMR*. J Am Chem Soc, 2011. **133**(35): p. 13967-74.
 34. Debelouchina, G.T., et al., *Dynamic nuclear polarization-enhanced solid-state NMR spectroscopy of GNNQQNY nanocrystals and amyloid fibrils*. Phys Chem Chem Phys, 2010. **12**(22): p. 5911-9.
-

-
35. van der Wel, P.C., et al., *Dynamic nuclear polarization of amyloidogenic peptide nanocrystals: GNNQQNY, a core segment of the yeast prion protein Sup35p*. J Am Chem Soc, 2006. **128**(33): p. 10840-6.
 36. Reggie, L., et al., *Dynamic Nuclear Polarization-Enhanced Solid-State NMR of a ¹³C-Labeled Signal Peptide Bound to Lipid-Reconstituted Sec Translocon*. J. Am. Chem. Soc., 2011. **133**(47): p. 19084-19086.
 37. Renault, M., et al., *Solid-state NMR spectroscopy on cellular preparations enhanced by dynamic nuclear polarization*. Angew Chem Int Ed Engl, 2012. **51**(12): p. 2998-3001.
 38. Jacso, T., et al., *Characterization of Membrane Proteins in Isolated Native Cellular Membranes by Dynamic Nuclear Polarization Solid-State NMR Spectroscopy without Purification and Reconstitution*. Angewandte Chemie-International Edition, 2012. **51**(2): p. 432-435.
 39. Gerfen, G.J., et al., *High-Frequency (140 Ghz) Dynamic Nuclear-Polarization - Polarization Transfer to a Solute in Frozen Aqueous-Solution*. Journal of Chemical Physics, 1995. **102**(24): p. 9494-9497.
 40. Hu, K.-N., et al., *High-frequency dynamic nuclear polarization using biradicals: a multifrequency EPR lineshape analysis*. J Chem Phys, 2008. **128**(5): p. 052302-052302.
 41. Hu, K.N., et al., *Dynamic nuclear polarization with biradicals*. J Am Chem Soc, 2004. **126**(35): p. 10844-5.
 42. Song, C., et al., *TOTAPOL: a biradical polarizing agent for dynamic nuclear polarization experiments in aqueous media*. J Am Chem Soc, 2006. **128**(35): p. 11385-90.
 43. Farrar, C.T., et al., *Mechanism of dynamic nuclear polarization in high magnetic fields*. Journal of Chemical Physics, 2001. **114**(11): p. 4922-4933.
 44. Zagdoun, A., et al., *Non-aqueous solvents for DNP surface enhanced NMR spectroscopy*. Chemical Communications, 2012. **48**(5): p. 654-656.
 45. Maly, T., et al., *Dynamic nuclear polarization at high magnetic fields*. J Chem Phys, 2008. **128**(5): p. 052211-052211.
 46. Hovav, Y., A. Feintuch, and S. Vega, *Theoretical aspects of dynamic nuclear polarization in the solid state - the solid effect*. Journal of Magnetic Resonance, 2010. **207**(2): p. 176-89.
 47. Hovav, Y., A. Feintuch, and S. Vega, *Theoretical aspects of Dynamic Nuclear Polarization in the solid state - the cross effect*. J Magn Reson, 2012. **214**(1): p. 29-41.
 48. Bertini, I., C. Luchinat, and S. Aime, *NMR of paramagnetic substances*. Coordination Chemistry Reviews, 1996. **150**: p. R7-+.
 49. Nadaud, P.S., et al., *Long-Range Structural Restraints in Spin-Labeled Proteins Probed by Solid-State Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*. Journal of the American Chemical Society, 2007. **129**(24): p. 7502-7503.
 50. Hall, D.A., et al., *Polarization-enhanced NMR spectroscopy of biomolecules in frozen solution*. Science, 1997. **276**(5314): p. 930-2.
 51. Lipton, A.S., et al., *Low temperature ⁶⁵Cu NMR spectroscopy of the Cu⁺ site in azurin*. J Am Chem Soc, 2009. **131**(39): p. 13992-9.
-

-
52. Gansmuller, A., et al., *Towards an interpretation of ¹³C chemical shifts in bathorhodopsin, a functional intermediate of a G-protein coupled receptor*. *Biochim Biophys Acta*, 2009. **1788**(6): p. 1350-7.
 53. Palade, G.E., *A Small Particulate Component of the Cytoplasm*. *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 1955. **1**(1): p. 59-&.
 54. Spahn, C.M. and C.D. Prescott, *Throwing a spanner in the works: antibiotics and the translation apparatus*. *J Mol Med (Berl)*, 1996. **74**(8): p. 423-39.
 55. Ramakrishnan, V., *Ribosome structure and the mechanism of translation*. *Cell*, 2002. **108**(4): p. 557-572.
 56. Steitz, T.A., *A structural understanding of the dynamic ribosome machine*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2008. **9**(3): p. 242-253.
 57. Milligan, R.A. and P.N. Unwin, *In vitro crystallization of ribosomes from chick embryos*. *J Cell Biol*, 1982. **95**(2 Pt 1): p. 648-53.
 58. Frank, J., et al., *A model of protein synthesis based on cryo-electron microscopy of the E. coli ribosome*. *Nature*, 1995. **376**(6539): p. 441-4.
 59. Wilson, D.N. and R. Beckmann, *The ribosomal tunnel as a functional environment for nascent polypeptide folding and translational stalling*. *Current Opinion in Structural Biology*, 2011. **21**(2): p. 274-282.
 60. Klinge, S., et al., *Crystal Structure of the Eukaryotic 60S Ribosomal Subunit in Complex with Initiation Factor 6*. *Science*, 2011. **334**(6058): p. 941-948.
 61. Frauenfeld, J., et al., *Cryo-EM structure of the ribosome-SecYE complex in the membrane environment*. *Nat Struct Mol Biol*, 2011. **18**(5): p. 614-21.
 62. Ban, N., et al., *The Complete Atomic Structure of the Large Ribosomal Subunit at 2.4 Å Resolution*. *Science*, 2000. **289**(5481): p. 905-920.
 63. Bhushan, S., et al., *alpha-Helical nascent polypeptide chains visualized within distinct regions of the ribosomal exit tunnel*. *Nature structural & molecular biology*, 2010. **17**(3): p. 313-U76.
 64. Harms, J., et al., *High Resolution Structure of the Large Ribosomal Subunit from a Mesophilic Eubacterium*. *Cell*, 2001. **107**(5): p. 679-688.
 65. Schuwirth, B.S., et al., *Structures of the bacterial ribosome at 3.5 Å resolution*. *Science*, 2005. **310**(5749): p. 827-34.
 66. Yusupov, M.M., et al., *Crystal Structure of the Ribosome at 5.5 Å Resolution*. *Science*, 2001. **292**(5518): p. 883-896.
 67. Nissen, P., et al., *The Structural Basis of Ribosome Activity in Peptide Bond Synthesis*. *Science*, 2000. **289**(5481): p. 920-930.
 68. Voss, N.R., et al., *The geometry of the ribosomal polypeptide exit tunnel*. *J Mol Biol*, 2006. **360**(4): p. 893-906.
-

-
69. Lu, J. and C. Deutsch, *Folding zones inside the ribosomal exit tunnel*. Nat Struct Mol Biol, 2005. **12**(12): p. 1123-9.
 70. Selmer, M., et al., *Structure of the 70S ribosome complexed with mRNA and tRNA*. Science, 2006. **313**(5795): p. 1935-42.
 71. Lu, J. and C. Deutsch, *Electrostatics in the Ribosomal Tunnel Modulate Chain Elongation Rates*. Journal of Molecular Biology, 2008. **384**(1): p. 73-86.
 72. Lu, J., W.R. Kobertz, and C. Deutsch, *Mapping the Electrostatic Potential within the Ribosomal Exit Tunnel*. Journal of Molecular Biology, 2007. **371**(5): p. 1378-1391.
 73. Kramer, G., et al., *L23 protein functions as a chaperone docking site on the ribosome*. Nature, 2002. **419**(6903): p. 171-174.
 74. Kramer, G., et al., *The ribosome as a platform for co-translational processing, folding and targeting of newly synthesized proteins*. Nat Struct Mol Biol, 2009. **16**(6): p. 589-597.
 75. Luijck, J. and I. Sinning, *SRP-mediated protein targeting: structure and function revisited*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 2004. **1694**(1-3): p. 17-35.
 76. Berndt, U., et al., *A signal-anchor sequence stimulates signal recognition particle binding to ribosomes from inside the exit tunnel*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(5): p. 1398-403.
 77. Bernabeu, C. and J.A. Lake, *Nascent polypeptide chains emerge from the exit domain of the large ribosomal subunit: immune mapping of the nascent chain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(10): p. 3111-5.
 78. Picking, W.D., et al., *Fluorescence characterization of the environment encountered by nascent polyalanine and polyserine as they exit Escherichia coli ribosomes during translation*. Biochemistry, 1992. **31**(8): p. 2368-2375.
 79. Malkin, L.I. and A. Rich, *Partial resistance of nascent polypeptide chains to proteolytic digestion due to ribosomal shielding*. Journal of Molecular Biology, 1967. **26**(2): p. 329-346.
 80. Seidelt, B., et al., *Structural Insight into Nascent Polypeptide Chain-Mediated Translational Stalling*. Science, 2009. **326**(5958): p. 1412-1415.
 81. Bhushan, S., et al., *SecM-Stalled Ribosomes Adopt an Altered Geometry at the Peptidyl Transferase Center*. Plos Biology, 2011. **9**(1): p. e1000581-e1000581.
 82. Becker, T., et al., *Structure of monomeric yeast and mammalian Sec61 complexes interacting with the translating ribosome*. Science, 2009. **326**(5958): p. 1369-73.
 83. Woolhead, C.A., P.J. McCormick, and A.E. Johnson, *Nascent Membrane and Secretory Proteins Differ in FRET-Detected Folding Far inside the Ribosome and in Their Exposure to Ribosomal Proteins*. Cell, 2004. **116**(5): p. 725-736.
 84. Tenson, T. and M. Ehrenberg, *Regulatory Nascent Peptides in the Ribosomal Tunnel*. Cell, 2002. **108**(5): p. 591-594.
 85. Lovett, P.S. and E.J. Rogers, *Ribosome regulation by the nascent peptide*. Microbiological Reviews, 1996. **60**(2): p. 366-+.
-

-
86. Gilbert, R.J., et al., *Three-dimensional structures of translating ribosomes by Cryo-EM*. Mol Cell, 2004. **14**(1): p. 57-66.
 87. Lu, J. and C. Deutsch, *Secondary structure formation of a transmembrane segment in Kv channels*. Biochemistry, 2005. **44**(23): p. 8230-43.
 88. Moore, P.B. and T.A. Steitz, *The structural basis of large ribosomal subunit function*. Annu Rev Biochem, 2003. **72**: p. 813-50.
 89. Halic, M., et al., *Following the signal sequence from ribosomal tunnel exit to signal recognition particle*. Nature, 2006. **444**(7118): p. 507-511.
 90. Kosolapov, A. and C. Deutsch, *Tertiary Interactions within the Ribosomal Exit Tunnel*. Nature structural & molecular biology, 2009. **16**(4): p. 405-411.
 91. Pal, S., et al., *Complementary role of two fragments of domain V of 23 S ribosomal RNA in protein folding*. J Biol Chem, 1999. **274**(46): p. 32771-7.
 92. Mankin, A.S., *Macrolide myths*. Curr Opin Microbiol, 2008. **11**(5): p. 414-21.
 93. Starosta, A.L., et al., *Interplay between the Ribosomal Tunnel, Nascent Chain, and Macrolides Influences Drug Inhibition*. Chemistry & Biology, 2010. **17**(5): p. 504-514.
 94. Hansen, J.L., et al., *The structures of four macrolide antibiotics bound to the large ribosomal subunit*. Mol Cell, 2002. **10**(1): p. 117-28.
 95. Schlunzen, F., et al., *Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria*. Nature, 2001. **413**(6858): p. 814-21.
 96. Cruz-Vera, L.R., et al., *Nascent polypeptide sequences that influence ribosome function*. Current Opinion in Microbiology, 2011. **14**(2): p. 160-166.
 97. Gong, F. and C. Yanofsky, *Instruction of Translating Ribosome by Nascent Peptide*. Science, 2002. **297**(5588): p. 1864-1867.
 98. Nakatogawa, H. and K. Ito, *Secretion Monitor, SecM, Undergoes Self-Translation Arrest in the Cytosol*. Molecular Cell, 2001. **7**(1): p. 185-192.
 99. Nakatogawa, H. and K. Ito, *The Ribosomal Exit Tunnel Functions as a Discriminating Gate*. Cell, 2002. **108**(5): p. 629-636.
 100. Evans, M.S., et al., *Homogeneous stalled ribosome nascent chain complexes produced in vivo or in vitro*. Nature Methods, 2005. **2**(10): p. 757-62.
 101. Rutkowska, A., et al., *Large-scale purification of ribosome-nascent chain complexes for biochemical and structural studies*. FEBS Letters, 2009. **583**(14): p. 2407-2413.
 102. Fang, P., et al., *A nascent polypeptide domain that can regulate translation elongation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(12): p. 4059-64.
 103. Liao, S., et al., *Both luminal and cytosolic gating of the aqueous ER translocon pore are regulated from inside the ribosome during membrane protein integration*. Cell, 1997. **90**(1): p. 31-41.
-

-
104. Bornemann, T., et al., *Signal sequence-independent membrane targeting of ribosomes containing short nascent peptides within the exit tunnel*. Nature structural & molecular biology, 2008. **15**(5): p. 494-499.
 105. Lee, H.C. and H.D. Bernstein, *The targeting pathway of Escherichia coli presecretory and integral membrane proteins is specified by the hydrophobicity of the targeting signal*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(6): p. 3471-6.
 106. Oh, E., et al., *Selective ribosome profiling reveals the cotranslational chaperone action of trigger factor in vivo*. Cell, 2011. **147**(6): p. 1295-308.
 107. Jonda, S., et al., *Complementation of DsbA deficiency with secreted thioredoxin variants reveals the crucial role of an efficient dithiol oxidant for catalyzed protein folding in the bacterial periplasm*. EMBO J, 1999. **18**(12): p. 3271-81.
 108. Schierle, C.F., et al., *The DsbA Signal Sequence Directs Efficient, Cotranslational Export of Passenger Proteins to the Escherichia coli Periplasm via the Signal Recognition Particle Pathway*. J. Bacteriol., 2003. **185**(19): p. 5706-5713.
 109. Mori, H. and K. Ito, *The Sec protein-translocation pathway*. Trends in Microbiology, 2001. **9**(10): p. 494-500.
 110. McNicholas, P., R. Salavati, and D. Oliver, *Dual regulation of Escherichia coli secA translation by distinct upstream elements*. J Mol Biol, 1997. **265**(2): p. 128-41.
 111. Butkus, M.E., L.B. Prundeanu, and D.B. Oliver, *Translocon "pulling" of nascent SecM controls the duration of its translational pause and secretion-responsive secA regulation*. J Bacteriol, 2003. **185**(22): p. 6719-22.
 112. Murakami, A., H. Nakatogawa, and K. Ito, *Translation arrest of SecM is essential for the basal and regulated expression of SecA*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004. **101**(33): p. 12330-12335.
 113. Woolhead, C.A., A.E. Johnson, and H.D. Bernstein, *Translation Arrest Requires Two-Way Communication between a Nascent Polypeptide and the Ribosome*. Molecular Cell, 2006. **22**(5): p. 587-598.
 114. Muto, H., H. Nakatogawa, and K. Ito, *Genetically Encoded but Nonpolypeptide Prolyl-tRNA Functions in the A Site for SecM-Mediated Ribosomal Stall*. Molecular Cell, 2006. **22**(4): p. 545-552.
 115. Yap, M.N. and H.D. Bernstein, *The Plasticity of a Translation Arrest Motif Yields Insights into Nascent Polypeptide Recognition inside the Ribosome Tunnel*. Molecular Cell, 2009. **34**(2): p. 201-211.
 116. Jenni, S. and N. Ban, *The chemistry of protein synthesis and voyage through the ribosomal tunnel*. Curr Opin Struct Biol, 2003. **13**(2): p. 212-9.
 117. Linsler, R., et al., *Sensitivity enhancement using paramagnetic relaxation in MAS solid-state NMR of perdeuterated proteins*. J Magn Reson, 2007. **189**(2): p. 209-16.
 118. Linsler, R., U. Fink, and B. Reif, *Probing surface accessibility of proteins using paramagnetic relaxation in solid-state NMR spectroscopy*. J Am Chem Soc, 2009. **131**(38): p. 13703-8.
-

-
119. Pauli, J., et al., *Backbone and side-chain ^{13}C and ^{15}N signal assignments of the alpha-spectrin SH3 domain by magic angle spinning solid-state NMR at 17.6 Tesla*. *Chembiochem*, 2001. **2**(4): p. 272—281-272—281.
120. Golovanov, A.P., et al., *2-Dimensional ^1H -Nmr Study of the Spatial Structure of Neurotoxin-Ii from *Naja-Naja-Oxiana**. *European Journal of Biochemistry*, 1993. **213**(3): p. 1213-1223.
121. Krabben, L., et al., *Towards structure determination of neurotoxin II bound to nicotinic acetylcholine receptor: a solid-state NMR approach*. *FEBS Lett*, 2004. **564**(3): p. 319-324.
122. Schiebler, W. and F. Hucho, *Membranes Rich in Acetylcholine-Receptor - Characterization and Reconstitution to Excitable Membranes from Exogenous Lipids*. *European Journal of Biochemistry*, 1978. **85**(1): p. 55-63.
123. Kalinowski, H.O., S. Berger, and S. Braun, *^{13}C -NMR-spektroskopie*. Vol. 121. 1984: Thieme Stuttgart.
124. Thurber, K.R. and R. Tycko, *Measurement of sample temperatures under magic-angle spinning from the chemical shift and spin-lattice relaxation rate of ^{79}Br in KBr powder*. *Journal of Magnetic Resonance*, 2009. **196**(1): p. 84-87.
125. Rosay, M., et al., *Solid-state dynamic nuclear polarization at 263 GHz: spectrometer design and experimental results*. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2010. **12**(22): p. 5850-5860.
126. Hohwy, M., et al., *Broadband dipolar recoupling in the nuclear magnetic resonance of rotating solids: A compensated $C7$ pulse sequence*. *The Journal of Chemical Physics*, 1998. **108**(7): p. 2686-2694.
127. Bloembergen, N., *On the Interaction of Nuclear Spins in a Crystalline Lattice*. *Physica*, 1949. **15**(3-4): p. 386-426.
128. Clore, G.M. and J. Iwahara, *Theory, Practice, and Applications of Paramagnetic Relaxation Enhancement for the Characterization of Transient Low-Population States of Biological Macromolecules and Their Complexes*. *Chemical Reviews*, 2009. **109**(9): p. 4108-4139.
129. Brough, A.R., C.P. Grey, and C.M. Dobson, *Paramagnetic-Ions as Structural Probes in Solid-State Nmr - Distance Measurements in Crystalline Lanthanide Acetates*. *Journal of the American Chemical Society*, 1993. **115**(16): p. 7318-7327.
130. Melnyk, T.W. and J.S. Rowlinson, *The statistics of the volumes covered by systems of penetrating spheres*. *Journal of Computational Physics*, 1971. **7**(3): p. 385-393.
131. Linden, A.H., et al., *Cryogenic temperature effects and resolution upon slow cooling of protein preparations in solid state NMR*. *J Biomol NMR*, 2011. **51**(3): p. 283-92.
132. Long, J.R., et al., *Molecular-Dynamics and Magic-Angle-Spinning Nmr*. *J Am Chem Soc*, 1994. **116**(26): p. 11950-11956.
133. Chevelkov, V., et al., *Detection of dynamic water molecules in a microcrystalline sample of the SH3 domain of alpha-spectrin by MAS solid-state NMR*. *J Biomol NMR*, 2005. **31**(4): p. 295-310.
134. Debye, P., *Interference of x rays and heat movement*. *Annalen Der Physik*, 1913. **43**(1): p. 49-95.
-

-
135. Waller, I., *On the question of the influence of thermal motion on the interference of X-rays*. Zeitschrift Fur Physik, 1923. **17**: p. 398-408.
 136. Krabben, L., et al., *Loop 3 of Short Neurotoxin II is an Additional Interaction Site with Membrane-bound Nicotinic Acetylcholine Receptor as Detected by Solid-state NMR Spectroscopy*. Journal of Molecular Biology, 2009. **390**(4): p. 662-671.
 137. Linden, A.H., et al., *Neurotoxin II bound to acetylcholine receptors in native membranes studied by dynamic nuclear polarization NMR*. J Am Chem Soc, 2011. **133**(48): p. 19266-9.
 138. Giotta, G.J. and H.H. Wang, *Reduction of nitroxide free radicals by biological materials*. Biochem Biophys Res Commun, 1972. **46**(4): p. 1576-80.
 139. Ziv, G., G. Haran, and D. Thirumalai, *Ribosome exit tunnel can entropically stabilize α -helices*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(52): p. 18956-18961.
 140. Ullers, R.S., et al., *Sequence-specific Interactions of Nascent Escherichia coli Polypeptides with Trigger Factor and Signal Recognition Particle*. Journal of Biological Chemistry, 2006. **281**(20): p. 13999-14005.
 141. Ullers, R.S., et al., *Interplay of signal recognition particle and trigger factor at L23 near the nascent chain exit site on the Escherichia coli ribosome*. The Journal of Cell Biology, 2003. **161**(4): p. 679-684.
 142. Zhang, H., S. Neal, and D.S. Wishart, *RefDB: a database of uniformly referenced protein chemical shifts*. J Biomol NMR, 2003. **25**(3): p. 173-95.
 143. Wishart, D.S., *Interpreting protein chemical shift data*. Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, 2011. **58**(1-2): p. 62-87.
 144. Wishart, D.S., B.D. Sykes, and F.M. Richards, *Relationship between nuclear magnetic resonance chemical shift and protein secondary structure*. Journal of Molecular Biology, 1991. **222**(2): p. 311-333.
 145. Weisblum, B., *Insights into erythromycin action from studies of its activity as inducer of resistance*. Antimicrob Agents Chemother, 1995. **39**(4): p. 797-805.
 146. Weisblum, B., *Erythromycin resistance by ribosome modification*. Antimicrob Agents Chemother, 1995. **39**(3): p. 577-85.
 147. Wang, Y. and O. Jardetzky, *Probability-based protein secondary structure identification using combined NMR chemical-shift data*. Protein Science, 2002. **11**(4): p. 852-861.
 148. Ulrich, E.L., et al., *BioMagResBank*. Nucleic Acids Research, 2008. **36**: p. D402-D408.
 149. Rutkowska, A., et al., *Dynamics of trigger factor interaction with translating ribosomes*. Journal of Biological Chemistry, 2008. **283**(7): p. 4124-32.
 150. Luca, S., et al., *The conformation of neurotensin bound to its G protein-coupled receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(19): p. 10706-11.
-

-
151. Lopez, J.J., et al., *The structure of the neuropeptide bradykinin bound to the human G-protein coupled receptor bradykinin B2 as determined by solid-state NMR spectroscopy*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2008. **47**(9): p. 1668-71.
 152. Matsuki, Y., et al., *Dynamic Nuclear Polarization with a Rigid Biradical*. *Angewandte Chemie International Edition*, 2009. **48**(27): p. 4996-5000.
 153. Vitzthum, V., M.A. Caporini, and G. Bodenhausen, *Solid-state nitrogen-14 nuclear magnetic resonance enhanced by dynamic nuclear polarization using a gyrotron*. *Journal of Magnetic Resonance*, 2010. **205**(1): p. 177-179.
 154. Thurber, K.R., W.M. Yau, and R. Tycko, *Low-temperature dynamic nuclear polarization at 9.4 T with a 30 mW microwave source*. *Journal of Magnetic Resonance*, 2010. **204**(2): p. 303-313.
 155. Lesage, A., et al., *Surface Enhanced NMR Spectroscopy by Dynamic Nuclear Polarization*. *Journal of the American Chemical Society*, 2010. **132**(44): p. 15459-15461.
 156. Maly, T., A.-F. Miller, and R.G. Griffin, *In situ High-Field Dynamic Nuclear Polarization - Direct and Indirect Polarization of ¹³C nuclei*. *ChemPhysChem*, 2010. **11**(5): p. 999-1001.
 157. Bajaj, V.S., et al., *Functional and shunt states of bacteriorhodopsin resolved by 250 GHz dynamic nuclear polarization-enhanced solid-state NMR*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(23): p. 9244-9.
 158. Akbey, U., et al., *Dynamic nuclear polarization of deuterated proteins*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2010. **49**(42): p. 7803-6.
 159. Rosay, M., et al., *Two-dimensional (¹³C)-(¹³C) correlation spectroscopy with magic angle spinning and dynamic nuclear polarization*. *J Am Chem Soc*, 2002. **124**(13): p. 3214-5.
 160. Teeter, M.M., et al., *On the nature of a glassy state of matter in a hydrated protein: Relation to protein function*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(20): p. 11242-7.
 161. Capaccioli, S., M.S. Thayyil, and K.L. Ngai, *Critical issues of current research on the dynamics leading to glass transition*. *J Phys Chem B*, 2008. **112**(50): p. 16035-49.
 162. Ngai, K.L., S. Capaccioli, and N. Shinyashiki, *The protein "glass" transition and the role of the solvent*. *J Phys Chem B*, 2008. **112**(12): p. 3826-32.
 163. Lesage, A. and A. Bockmann, *Water-protein interactions in microcrystalline crh measured by ^{1H}-¹³C solid-state NMR spectroscopy*. *J Am Chem Soc*, 2003. **125**(44): p. 13336-7.
 164. Lesage, A., et al., *Investigation of dipolar-mediated water-protein interactions in microcrystalline Crh by solid-state NMR spectroscopy*. *J Am Chem Soc*, 2006. **128**(25): p. 8246-55.

Zusammenfassung

Die dynamische Kernpolarisation (DNP) ermöglicht es, die Sensitivität der Kern-Magnetresonanz-Spektroskopie (NMR-Spektroskopie) um zwei bis drei Größenordnungen zu steigern. Grundlage der DNP ist der Transfer der relativ starken Polarisation ungepaarter Elektronen auf benachbarte Atomkerne. Eine erfolgreiche Implementierung dieser Technik in das Standard-Repertoire der Festkörper-NMR würde zu einem enormen Fortschritt in der Strukturbiologie führen. So sollte es beispielsweise möglich sein, Peptide und Proteine in ihrer nativen Umgebung zu untersuchen. Um die DNP effektiv nutzen zu können, müssen jedoch mindestens zwei grundlegende Bedingungen erfüllt sein: Das Vorhandensein ausreichender Mengen freier Elektronen (bzw. Radikalen) in der Probe sowie ein Absenken der Proben temperatur auf unter 100 K. Beide Bedingungen können jedoch zu einer signifikanten Signalverbreiterung führen und so die Interpretation der aufgezeichneten Spektren im Sinne der Strukturaufklärung erschweren.

Ein Ziel dieser Arbeit war daher, zunächst den Einfluss des derzeit am häufigsten verwendeten Biradikals (TOTAPOL) auf die NMR-Signale zu untersuchen (Abschnitt 3.1). Anhand von DNP-Spektren von Prolin-Lösungen unterschiedlicher TOTAPOL-Konzentration wurde dabei gezeigt, dass eine optimale Radikalkonzentration definiert werden kann, mit der eine möglichst hohe Sensitivität bei möglichst geringer Signalverbreiterung erzielt werden kann. Untersuchungen an einem Liganden-Rezeptorsystem zeigten zudem, dass bei einer räumlichen Trennung zwischen dem Biradikal und dem zu untersuchenden Protein die durch freie Elektronen verursachten Signalverbreiterungen nahezu vollständig verhindert werden können.

In weiteren Versuchen wurde der Einfluss tiefer Proben temperaturen auf die NMR-Signale untersucht (Abschnitt 3.2). Zu diesem Zweck wurden 2D Spektren des Proteins SH3 bei unterschiedlichen Proben temperaturen im Bereich 295 K bis 95 K aufgezeichnet und analysiert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass ein enger Zusammenhang zwischen der Koaleszenz-Temperatur einzelner Signale und des jeweiligen strukturellen Kontext der entsprechenden Seitenketten besteht. Der Vergleich der gemessenen Signalbreiten mit der verfügbaren Struktur des SH3 zeigt deutlich, dass bei einem sukzessiven Absenken der Proben temperatur die Signale der sehr flexiblen Seitenketten bzw. besonders mobilen Regionen als erstes unterhalb der Detektionsgrenze verbreitert werden. In dieser Arbeit wird die Hypothese aufgestellt, dass diese Seitenketten bei Raumtemperatur einer schnellen Dynamik unterliegen, welche durch Abkühlen

der Probe zu einer intermediären Dynamik verlangsamt wird. Diese intermediäre Dynamik interferiert mit der NMR-Messung und führt so zu einer Signalverbreiterung. Im Gegensatz dazu kann für Seitenketten, welche bei Raumtemperatur eine geringe Mobilität aufweisen, bei tiefen Temperaturen eine langsame Dynamik angenommen werden, welche nicht zu breiteren Signalen führt. Dies konnte durch Messungen am Rezeptor-gebundenen Neurotoxin II bestätigt werden.

Abschließend wurde mittels DNP-verstärkter Festkörper-NMR der Faltungszustand naszierender Ketten innerhalb stabil arretierter Ribosomen untersucht (Abschnitt 3.3). Bei dieser molekularen Maschine limitiert die Größe der Ribosomen wesentlich die Analyt-Konzentration und erschwert zudem die selektive Detektion von NMR-Signalen der naszierenden Kette. Unter Verwendung der DNP und eines Doppelquantenfilters war es dennoch möglich, Signale zu detektieren welche eindeutig und ausschließlich der naszierenden Kette zugeordnet werden können. Eine Zuordnung von einzelnen Signalen zu bestimmten Seitenketten wurde dabei auf Grundlage von Punktmutationen durchgeführt. Diese zugeordneten Signale wurden anschließend verwendet, um den Faltungszustand der naszierenden Kette zu analysieren. Dazu wurden in erster Linie sekundäre Chemische Verschiebungen von Serin-Signalen ermittelt und mit statistischen Werten verglichen. Dabei konnte gezeigt werden, dass der strukturelle Kontext die Position der detektierten Serin-Signale im Spektrum beeinflusst. Obwohl eine endgültige und eindeutige Aussage über den Faltungszustand einzelner Kettenabschnitte noch aussteht, konnte gezeigt werden, dass die Einführung höherer Magnetfeldstärken die spektrale Auflösung verbessern kann. Vor dem Hintergrund des rasanten technischen Fortschrittes auf dem Gebiet der Mikrowellen- und NMR-Technik sollte in naher Zukunft die Qualität der an solch komplexen Systemen aufgezeichneten Spektren deutlich zunehmen.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass bereits mit den heute zur Verfügung stehenden DNP-Spektrometern und Biradikalen gut aufgelöste Spektren von Proteinen in einer weitgehend nativen Umgebung aufgezeichnet werden können. Entscheidend bei der Durchführung der DNP-Experimente sind dabei sowohl die Wahl einer geeigneten Biradikal-Konzentration als auch eine optimale Proben-Präparation. Es konnte gezeigt werden, dass die Auflösung und damit die Interpretierbarkeit der aufgezeichneten Spektren, im Wesentlichen durch die Veränderung der Dynamik einzelner Seitenketten bei tiefen Temperaturen bestimmt wird. Biradikale, welche eine langsame Elektronenrelaxation aufweisen, könnten einen effektiven Polarisationstransfer bei hohen Temperaturen ermöglichen und so die Bedeutung der DNP in der NMR-gestützten Strukturforschung maßgeblich steigern.

Summary

Solid state nuclear magnetic resonance (ssNMR) enables the analysis of protein structures and dynamics on an atomic scale. With this method, it is possible to investigate proteins which are difficult to crystallize as well as large monomeric or heteromeric complexes. Therefore, solid state NMR is an indispensable method for structural biology. The low intrinsic sensitivity of ssNMR method can be overcome through dynamic nuclear polarization (DNP). This opens new possibilities to analyze molecular machines within their native environment.

The current implementation of DNP in the solid state requires addition of radicals or biradicals, and cryogenic sample temperatures. These prerequisites can lead to significantly broadened signals and, therefore, to a reduced spectral resolution. The range of viable systems which can be investigated by DNP is thus limited. The aim of this work is to analyze the cause and extent of the broadening effects of both the biradical dopant and the cryogenic temperatures. These studies should indicate ways to reduce the negative effects in order to exploit the potential of DNP.

The influence of the biradical concentration on proline solutions were investigated (section 3.1). On one hand, the addition of the biradical decreases the T_1 -Relaxation of the protons, which reduces the time needed for the recycle delay. On the other hand, it also leads to decreased T_2 - and $T_{1\rho}$ -relaxation. Such relaxation decreases cause line broadening and decrease the efficiency of cross polarization steps. Furthermore, it was shown that the number of detectable nuclei is decreased at high biradical concentration due to other paramagnetic effects. It is shown that TOTAPOL concentrations of only 50 mM cause a 50 % reduction in number of detectable nuclei in a homogeneous solution of a small analyte based on a simple model

At low temperatures homogenous line broadening is often masked by inhomogeneous line broadening. Therefore, in the second part of this work the influence of low temperatures on the spectral resolution of SH3 spectra is investigated (section 3.2). For this purpose, 2D spectra were recorded at different sample temperatures in the range of 295 K to 95 K. This revealed a close relationship between the coalescence temperature and the respective molecular environment of the side chains. Side chain dynamics should decrease with the sample temperature. If this leads to a transition from fast to intermediate dynamics, it results in broadened lines. If the decrease in temperature leads to a transition from intermediate to slow dynamics, it will lead to signal multiplication and splitting and, in some special cases, to an improved line width.

In the case of the neurotoxin II bound to a nAChR receptor, it was possible to record DNP enhanced spectra with a resolution comparable to room temperature data. To obtain such well resolved data it was shown that reduced side chain mobility at room temperature and spatial separation between the biradical and the side chains are crucial prerequisites. Therefore, it should be possible to limit the line broadening by developing new biradicals that are still operational at higher sample temperatures. Furthermore, it should be possible to reduce the negative paramagnetic effects of the biradical by optimizing the sample preparation to reduce the proximity of dopant to analyte.

Finally, the folding state of stable arrested nascent chains that are contained in then ribosome exit tunnel were investigated by DNP enhanced ssNMR. The size of the ribosome limits the analyte concentration, making the detection of nascent chain specific resonances a challenging task. We approached this challenge by implementing double quantum filtering into two-dimensional carbon correlation spectroscopy. The introduction of serine-to-alanine substitutions within the nascent chain enabled us to exploit the advantage of the unique chemical shift properties of the serine aliphatic resonances. Furthermore, the nascent chain contains four serines, each two serines within the N-terminal and the C-terminal half. Therefore, two double mutants were expressed in which serines appear either exclusively in the N-terminal or C-terminal half of the nascent chain.

Comparison of the two double mutants revealed slight differences in the respective serine resonances. According to available statistical datasets, these slight differences can be addressed to a different structural context of the respective serine residues. Nevertheless, a final clear assessment of the folding state of the nascent chain is still pending. But, it was demonstrated that higher magnetic fields will lead to more resolved resonances. Thus, recent developments in the microwave sources and superconducting magnets will lead to an improvement of the spectral quality and enable a non-ambiguous analysis of the folding state.

In summary, with currently available techniques, it is possible to obtain sufficiently well resolved spectra of proteins in their native environments. The investigation of ligand-receptor systems are significantly improved using DNP if additional line broadening can be prevented. In this respect choosing the right biradical concentration and sample preparation method is a crucial point.

Publikationen

Erstautorenschaften

Ü. Akbey¹, **S. Lange**¹, W. T. Franks, R. Linser, K. Rehbein, A. Diehl, B.-J. van Rossum, B. Reif, H. Oschkinat, *Optimum levels of exchangeable protons in perdeuterated proteins for proton detection in MAS solid-state NMR spectroscopy*. J Biomol NMR, 2010. **46**(1): p. 67-73.

S. Lange¹, A. H. Linden¹, Ü. Akbey, W. T. Franks, N. M. Loening, B.-J. van Rossum, H. Oschkinat, *The effect of biradical concentration on the performance of DNP-MAS-NMR*. J Magn Reson, 2012. **216**: p. 209-12.

Andere Publikationen

Ü. Akbey, W. T. Franks, A. Linden, **S. Lange**, R. G. Griffin, B.-J. van Rossum, H. Oschkinat, *Dynamic nuclear polarization of deuterated proteins*. Angew Chem Int Ed Engl, 2010. **49**(42): p. 7803-6.

J. R. Lewandowski, J. N. Dumez, Ü. Akbey, **S. Lange**, L. Emsley, H. Oschkinat, *Enhanced Resolution and Coherence Lifetimes in the Solid-State NMR Spectroscopy of Perdeuterated Proteins under Ultrafast Magic-Angle Spinning*. Journal of Physical Chemistry Letters, 2011. **2**(17): p. 2205-2211.

A. H. Linden, W. T. Franks, Ü. Akbey, **S. Lange**, B.-J. van Rossum, *Cryogenic temperature effects and resolution upon slow cooling of protein preparations in solid state NMR*. J Biomol NMR, 2011. **51**(3): p. 283-92.

A. H. Linden, **S. Lange**, W. T. Franks, Ü. Akbey, E. Specker, B.-J. van Rossum, H. Oschkinat, *Neurotoxin II bound to acetylcholine receptors in native membranes studied by dynamic nuclear polarization NMR*. J Am Chem Soc, 2011. **133**(48): p. 19266-9.

¹ Gleichmaßen beteiligte Autoren

Lebenslauf

Name: Sascha Lange
Geboren am: 23.01.1981
Geburtsort: Berlin

BERUFSERFAHRUNG

Seit 06.2008 Doktorand bei Prof. H. Oschkinat
Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP)

HOCHSCHULSTUDIUM

05.2008 Abschluss als Diplom-Biophysiker
Humboldt-Universität zu Berlin

05.2007-05.2008 Diplomarbeit bei Dr. Burkhard Wiesner
„In vivo FRAP-Studien zur IFN γ -induzierten
DNA-Bindung von STAT1“
Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP)

10.2001-05.2008 Studium der Biophysik
Humboldt-Universität zu Berlin

ZIVILDIENTST

2000-2001 Krankenhaus-Apotheke „Krankenhaus im Friedrichshain“, Berlin

SCHULAUFBILDUNG

1997-2000 Allgemeine Hochschulreife „Olof-Palme-Oberschule“, Berlin

Danksagung

Ich möchte mich bei allen Freunden und Kollegen bedanken, die mich über die letzten Jahre mit Wort und Tat unterstützt haben. Insbesondere möchte ich den folgenden Personen danken:

Hartmut Oschkinat für die vielen spannenden großen und kleinen Projekte und dafür, dass er mich mit seiner ehrlichen und direkten Art gefordert und gefördert hat.

Christian Freund, welcher sich als Gutachter zur Verfügung gestellt hat.

Barth-Jan van Rossum und Arne Linden, die sehr genau die vorliegende Arbeit gelesen und mich mit tollen Vorschlägen unterstützt haben.

Arne Linden, mit dem ich in den vergangenen vier Jahren mehr Zeit verbracht habe als mit meiner Familie...und der trotzdem zu einem sehr guten Freund geworden ist (wir sehen uns bald im Willy's!).

Trent Franks, who teached me a lot about NMR and american curse words, worked with me on the ribosome project, spend a lot of time filling nitrogen and was always a good friend of mine.

Meinem guten Freund Barth-Jan von Rossum, der es stets geschafft hat, trockenste NMR Theorie unterhaltsam zu erklären und der mich mit seiner ehrlichen und humorvollen Art so manches Mal wieder aufgebaut hat.

Umit Akbey für viele interessante Diskussionen, nicht nur über NMR.

“The DNPers” (Arne Linden, Trent Franks, Ümit Akbey and Barth-Jan van Rossum), we had a lot of fun fixing the spectrometer, mostly “redneck-style”.

Besonders natürlich Günter Kramer, Kristina Döring, Nandhakishore Rajagopalan („Kishore“) und Bernd Bukau für ihren Enthusiasmus, ihre Hilfsbereitschaft und die tolle Zeit, die ich in Heidelberg verbringen durfte.

Melanie Rosay, Leo Temetich, Ekhard Bez, Marc Caporini and all the other Billerica-DNPers from Bruker for the support and, of course, the nice time we (Arne and I) had in Billerica.

Andrea Steuer, die mir geduldig geholfen hat, meine Dienstreisen zu organisieren und immer ein offenes Ohr hatte.

Anne Diehl und ihr Team, für jede Hilfe im Labor, die vielen hilfreichen Diskussionen und zahlreiche SH3-Proben.

Markus Bernd, für die moralische Unterstützung und die vielen Gespräche.

Nicht vergessen möchte ich all die anderen Kollegen und Wegbegleiter: Benjamin Bardiaux, Matthias Hiller, Joren Retel, Matthias Dorn, Marco Röben, Stefan Markovic, Anne Wartenberg, Shakeel Ahmad Shahid, Andrew Nieuwkoop, Marcella Orwick, Peter Schmieder, Victoria Davis, Nico Loening, Heidi Petschick, Alexandra Chylla, Gabriele Schumacher, Ingo Breng, Nils Cremer, Kristina Rehbein, Janet Zapke, Jenny Eichhorst und Burkhard Wiesner.

Ganz besonders möchte ich meiner Frau Katharina und meinen Kindern Emilia und Ilias danken, die mich lieben wie ich bin und mir den Rückhalt geben den ich brauche. Außerdem danke ich meinen Eltern, die mich immer unterstützt und an mich geglaubt haben.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe. Des Weiteren versichere ich, dass die vorliegende Arbeit nie Gegenstand eines früheren Promotionsverfahrens war. Die dem Verfahren zugrunde liegende Promotionsordnung ist mir bekannt.

Berlin, Januar 2013

Sascha Lange