



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

Aus dem Institut für Chemie
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Peters

Einfluss der Ligandenbindung auf Struktur und Dynamik von Glycosyltransferasen und Norovirus-Kapsidproteinen

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

Aus der Sektion Naturwissenschaften

vorgelegt von
Sophie Weißbach
aus Karl-Marx-Stadt jetzt Chemnitz

Lübeck 2016

1. Berichtstatter: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Peters
2. Berichtstatter: Prof. Dr. rer. nat. Christian Hübner

Tag der mündlichen Prüfung: 19.4.2016

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 21.4.2016

ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurde der Einfluss der Ligandenbindung auf Proteinstruktur und Proteindynamik der humanen Blutgruppenglycosyltransferasen GTA und GTB sowie der sogenannten *Protruding Domain* (P-Domain, P-Domäne) der Hüllproteine humaner Noroviren mit Hilfe der hochauflösenden NMR-Spektroskopie untersucht. GTA, GTB und P-Domäne bilden Homodimere mit einer Größe von etwa 70 kDa. Die aus den P-Domänen gebildeten P-Dimere wie auch GTA und GTB binden an Histo-Blutgruppen Antigene (HBGAs). Während GTA und GTB den letzten Schritt der Bildung der Blutgruppenantigene A und B katalysieren, ist die Bindung der viralen P-Dimere an HBGAs Voraussetzung für die Infektion der Wirtszellen.

GTA überträgt N-Acetyl- α -D-galactosamin des Donorsubstrats Uridindiphosphat-N-Acetyl- α -D-galactosamin (UDP-GalNAc) auf das H-Antigen. Bei GTB hingegen fungiert UDP- α -D-Galactose (UDP-Gal) als Donorsubstrat. Bei dem Glycosyltransfer bleibt die Konfiguration des anomeren Zentrums im Donorzucker erhalten. Der Mechanismus der konfigurationserhaltenden Glycosyltransferasen ist im Gegensatz zum Mechanismus der invertierenden Glycosyltransferasen noch nicht gut verstanden und wurde daher in dieser Arbeit weiter untersucht. Da aus Kristallstrukturen bekannt ist, dass GTA und GTB zwei flexible Schleifen besitzen, die in Abhängigkeit von der Ligandenbindung verschiedene Konformationen einnehmen, wurden besonders die Protein-Ligand-Interaktionen und die resultierende Proteindynamik analysiert.

Im ersten Teil der Arbeit wurde das Proteinrückgrat betrachtet und eine Zuordnung der NH-Resonanzsignale mit Hilfe von Tripelresonanzexperimenten durchgeführt. Aufgrund der Proteingröße und der daraus resultierenden ungünstigen Relaxationseigenschaften konnten nur 18 von 298 Aminosäuren zugeordnet werden. Es konnte dann Proteindynamik im Picosekunden- bis Nanosekundenbereich nachgewiesen werden. Aufgrund der fehlenden Zuordnung war eine sequenzspezifische Analyse leider nicht möglich. Interessanterweise werden bei UDP-Bindung an GTA für fast 50% der Signale signifikante Änderungen in der chemischen Verschiebung beobachtet. Dies lässt auf weitreichende Konformationsänderungen auch fernab von der eigentlichen Bindungsstelle schließen.

Diese Effekte wurden mit Hilfe von Isoleucin- ^{13}C -methylgruppenmarkierter GTA- und Methionin- ^{13}C -methylgruppenmarkierter GTB weiter untersucht. Durch Titration der ^{13}C -methylgruppenmarkierten Enzyme mit UDP und H-Disaccharid konnte erneut

gezeigt werden, dass nicht nur die interne Schleife und das aktive Zentrum, sondern auch benachbarte Regionen durch die Ligandenbindung beeinflusst werden. Dabei konnten vor allem bei den Methioninresten der GTB auch konformationelle Änderungen nachgewiesen werden. Der Teil des Proteins nahe der Dimerisierungsregion wird durch die Ligandenbindung hingegen nicht beeinflusst. Die beobachteten Änderungen in den chemischen Verschiebungen lassen auf Proteindynamik bzw. Austauschphänomene im μ s- bis ms-Bereich schließen. Die Untersuchung mit Hilfe von Relaxationsdispersionsexperimenten (CPMG-RD) zeigt, dass die Dynamik der internen Schleife durch Bindung von UDP- und H-Disaccharid moduliert wird. Bei Sättigung mit UDP und H-Disaccharid wird insbesondere die geschlossene Konformation stabilisiert.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass die Ligandenbindung an GTA und GTB deutlich komplexer ist, als nur die angenommene Bewegung der internen Schleife und des C-Terminus. Es konnte gezeigt werden, dass es sich bei GTA und GTB um sehr flexible Proteine handelt, deren Dynamik vom ns- bis in den hohen ms-Bereich reicht.

Zur weiteren Charakterisierung der Ligandenbindungsstasche wurde zusätzlich eine Methode zur Detektion von Sättigungstransfer vom Liganden auf das Protein unter Verwendung von Methyl-TROSY-Experimenten etabliert. Es konnte ein selektiver, abstandsabhängiger Sättigungstransfer des Liganden UDP-Gal auf eine Isoleucin-, Leucin-, Valin- ^{13}C -methylgruppenmarkierte GTA-Probe nachgewiesen werden.

In ähnlicher Weise wurden auch die P-Dimere des humanen Norovirus in dieser Arbeit NMR-spektroskopisch analysiert. Bei den P-Dimeren handelt es sich um den oberflächenexponierten Bereich des Viruskapsids VP1. P-Dimere stellen den initialen Kontakt zwischen Virus und Wirt her und binden unter anderem an HBGAs. Eine Untersuchung dieser Bindung kann zum Verständnis der Infektiosität des Virus beitragen und wichtige Informationen für die Entwicklung von *Entry*-Inhibitoren liefern. Aufgrund der Proteingröße wurde auch hier eine Isoleucin-, Valin- ^{13}C -methylgruppenmarkierte Probe verwendet. Anhand von CPMG-RD-Experimenten konnte gezeigt werden, dass P-Dimere keine Bewegung im μ s- bis ms-Bereich aufweisen und dass Ligandenbindung keine Änderung der Dynamik und vermutlich nur geringe strukturelle Änderungen zur Folge hat. Da für weitere Analysen eine Zuordnung essentiell ist, wurde die Zuordnung der ^{13}C -Methylgruppen mit Hilfe eines paramagnetischen Liganden mit komplexiertem Gadolinium getestet. Es konnten nur Methylgruppen mit einem Abstand $< 20 \text{ \AA}$ eindeutig zugeordnet werden. Eine weitere Optimierung dieser Methode scheint jedoch vielversprechend und könnte auch auf andere große Proteine wie GTA und GTB angewendet werden.

ABSTRACT

The influence of ligand binding on structure and dynamics of the human blood group glycosyltransferases GTA and GTB and the producing domain (P-domain) of the human norovirus capsid protein was investigated by NMR-spectroscopy.

GTA, GTB and P-domain form homodimers with a size of ca. 70 kDa. They all bind histo-blood group antigens (HBGAs). While GTA and GTB are responsible for the last step of the biosynthesis of the blood group A and B antigen, P-dimers, which are formed by the P-domain, bind HBGAs as a prerequisite for effective infection of the host.

GTA transfers N-Acetyl- α -D-galactosamin of Uridine diphosphate- α -D-N-acetylgalactosamine (UDP-GalNAc) to the H-antigen. However, for GTB UDP- α -D-Galactose (UDP-Gal) serves as donor substrate. Both reactions proceed with a net retention of configuration of the anomeric center of the donor sugar. In contrast to inverting glycosyltransferases the reaction mechanism for retaining glycosyltransferases is still not well understood. Therefore, this thesis aims at shining more light on critical details of the enzyme mechanism. Crystal structures show that GTA and GTB have two flexible loops that undergo conformational changes upon substrate binding. Therefore, protein-ligand-interactions and the resulting protein dynamics were analyzed here.

First, a protein backbone assignment was performed using triple resonance experiments. Due to the protein size and the resulting unfavorable relaxation properties only 18 out of 298 amino acids could be assigned. It could be shown that there is protein dynamics on the picosecond to nanosecond timescale. Unfortunately, because of the missing assignment a sequence specific analysis was not possible. Interestingly, the binding of UDP to GTA results in a significant change of chemical shifts for almost 50% of the signals. This suggests a far-reaching structural change also distant from the binding site.

These observations were further studied using isoleucine- ^{13}C -methyl labeled GTA and methionine- ^{13}C -methyl labeled GTB samples. Titration of the ^{13}C -methyl labeled enzymes with UDP and H-disaccharide also show that not only the internal loop and the active site is influenced by substrate binding but also adjacent regions. Especially for methionine residues conformational changes upon ligand binding were proven. However, residues close to the dimerization site are not affected by ligand binding. The chemical shift changes observed point to dynamic processes on the μs to ms timescale. Relaxation dispersion (CMPG-RD) experiments show that binding of UDP and

H-disaccharide modulates the movement of the internal loop of GTA and GTB. Saturation with donor and acceptor substrates stabilizes the closed conformation and significantly dampens molecular motions of the protein.

In summary, these results show that ligand binding to GTA and GTB is much more complex than just a shift of the internal loop and ordering of the C-term. GTA and GTB are both very flexible proteins with dynamics reaching from the nanosecond up to the high millisecond timescale.

For further characterization of the ligand binding site a method for detection of saturation transfer from a ligand to the protein was established. The technique makes use of methyl-TROSY experiments. A selective, distance-dependent saturation transfer of protons of the ligand UDP-Gal to isoleucine-, leucine-, or valine-¹³C-methyl labeled GTA was detected.

Similarly, P-dimers were investigated using NMR spectroscopy. P-dimers are the surface exposed part of the virus capsid protein VP1. They are responsible for the initial contact between virus and host and bind to HBGAs. A characterization of the binding process may further our understanding of the infection process and may lead to the development of novel entry inhibitors. Due to the protein size only isoleucine and valine methyl groups were selectively ¹³C-labeled. CPMG-RD experiments showed that P-dimers do not move on the μ s to ms timescale. Also, ligand binding has no influence on protein dynamics in this time window and induces only minor structural changes. For continuing studies an assignment is essential. An approach using paramagnetic ligands complexed with Gadolinium was tested. Methyl groups within a distance of 20 Å from the paramagnetic ion could be assigned unambiguously. Further optimization of this method is promising and also the transfer to other large proteins such as GTA and GTB could be possible.

INHALTSVERZEICHNIS

Zusammenfassung	5
Abstract	7
Inhaltsverzeichnis	9
Abkürzungsverzeichnis	14
1 Einleitung	17
1.1 Glycobiologie	17
1.2 Histo-Blutgruppen Antigene	18
1.3 Glycosyltransferasen.....	19
1.3.1 Klassifikation und Faltungsmotive.....	20
1.3.2 Katalysemechanismen	21
1.3.3 Proteindynamik	24
1.4 Humane Blutgruppe A und B Glycosyltransferasen – Biosynthese von A- und B-Blutgruppenantigenen.....	26
1.4.1 Strukturelle Eigenschaften und Ligandenbindung	27
1.5 Caliciviren	32
1.6 Humane Noroviren – Bindung an HBGAs.....	33
1.6.1 Klassifikation und genomische Organisation	34
1.6.2 Strukturelle Eigenschaften und Ligandenbindung an das Kapsid	35
2 Zielsetzung	39
3 Methoden	43
3.1 Einbringen von Punktmutationen	43
3.2 Präparation rekombinanter GTA und GTB.....	47
3.2.1 Plasmid und Bakterienstamm	47
3.2.2 Proteinbiosynthese.....	47
3.2.3 Proteinreinigung.....	52

3.3 Präparation von P-Dimeren des humanen Norovirus GII.4 Saga.....	55
3.3.1 Plasmid und Bakterienstamm.....	55
3.3.2 Isotopenmarkierte Proteinbiosynthese.....	56
3.3.3 Proteinreinigung.....	57
3.4 Proteinanalytik.....	59
3.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	60
3.4.2 Proteinbestimmung.....	61
3.4.3 Aktivitätstest für GTA und GTB	62
3.5 NMR-Spektroskopie.....	63
3.5.1 Probenpräparation	64
3.5.2 $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Experimente	66
3.5.3 Zuordnungsexperimente.....	67
3.5.4 Bestimmung von T_1 - und T_2 -Zeiten	69
3.5.5 $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -methyl-TROSY Experimente.....	70
3.5.6 HMQC-NOESY-Spektren.....	72
3.5.7 CPMG-Relaxations-Dispersions Messungen.....	72
3.5.8 STD-NMR- und inverse Sättigungstransfer Experimente	76
3.5.9 Titration verschiedener Liganden in GTA und GTB.....	78
3.5.10 K_D -Bestimmung bei $[\text{U-}^2\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -GTA und Met-GTB.....	79
3.5.11 SVD-Analyse und K_D -Bestimmung bei ILV-GTA.....	80
3.5.12 NMR-Spektroskopie mit paramagnetischen Komplexen.....	81
4 Ergebnisse	83
4.1 Untersuchungen am Proteinrückgrat der GTA	83
4.1.1 Proteinpräparation von Proteinrückgrat-markierten GTA-Proben	83
4.1.2 Bestimmung von Temperatur und Pufferbedingungen für NMR-Experimente	85
4.1.3 Aufnahme und Auswertung von Tripelresonanzspektren.....	88
4.1.4 Selektive ^{15}N -Markierung von Argininen und Methioninen	92

4.1.5	$^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Experimente zur Charakterisierung der UDP-Bindung an GTA	94
4.1.6	Untersuchung der Proteindynamik im ps-ns Bereich.....	97
4.1.7	Vergleich der $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ - HSQC Spektren von GTA und GTB.....	99
4.2	Seitenkettenanalyse von $[\text{U-}^2\text{H}, \{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}]$ -markierter GTA.....	100
4.2.1	Probenpräparation von Ile-GTA	100
4.2.2	$^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -methyl-TROSY-Experimente mit Ile-GTA und Charakterisierung der UDP- und HDis-Bindung.....	101
4.2.3	CPMG-Relaxations-Dispersions-Messungen mit Ile-GTA.....	104
4.2.4	Vergleich von Isoleucin- $\delta 1$ -methylgruppenmarkierter GTA und GTB ..	109
4.3	Seitenkettenanalyse von $[\text{U-}^2\text{H}, \{\text{Met}\beta, \gamma\text{-}^{12}\text{CH}_2\}, \{\text{Met}\epsilon\text{-}^{13}\text{CH}_3\}]$ -markierter GTB.....	111
4.3.1	Probenpräparation von Met-GTB	111
4.3.2	$^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -methyl-TROSY-Experimente mit Met-GTB und Charakterisierung der UDP- und HDis-Bindung.....	113
4.3.3	Zuordnung von Met-GTB	119
4.3.4	CPMG-Relaxations-Dispersions-Messungen mit Met-GTB.....	125
4.4	Etablierung von inversen Sättigungstransfer-Experimenten.....	131
4.4.1	Präparation von ILV-GTA und diverser Mutanten.....	131
4.4.2	Bindung von UDP-Gal an ILV-GTA.....	132
4.4.3	STD-NMR mit unmarkierter GTA und UDP-Gal.....	136
4.4.4	Kontrollexperimente zur Identifikation von Messbedingungen.....	136
4.4.5	Inverse Sättigungstransfer-Experimente mit ILV-GTA und UDP-Gal....	138
4.4.6	Einbringen von Punktmutationen in Valin 184, 212 und 351	140
4.5	Untersuchungen zu P-Dimeren des humanen NoV	142
4.5.1	Probenpräparation von P-Dimeren	143
4.5.2	$^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -methyl-TROSY-Experimente mit IV-P-Dimeren	144
4.5.3	CPMG-Relaxations-Dispersions-Messungen mit IV-P-Dimeren	145

4.5.4 Zuordnung von Isoleucin- δ 1-Methylgruppen mittels paramagnetischer Ligandenbindung	148
5 Diskussion	151
5.1 Präparation isotopenmarkierter GTA und GTB	151
5.2 Untersuchungen am Proteinrückgrat von GTA.....	154
5.3 Seitenkettenanalyse von [U- 2 H, {Ile δ 1- 13 CH $_3$ }]-markierter GTA und GTB.....	160
5.4 Seitenkettenanalyse von [U- 2 H, {Met β , γ - 12 CH $_2$ }, {Met ϵ - 13 CH $_3$ }]-markierter GTB.....	164
5.5 Etablierung von inversen Sättigungstransfer-Experimenten.....	169
5.6 Untersuchungen zu P-Dimeren des humanen Norovirus.....	172
5.7 Schlussfolgerung und Ausblick.....	175
6 Literaturverzeichnis	180
7 Anhang.....	197
7.1 Materialien.....	197
7.1.1 Chemikalien	197
7.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	200
7.1.3 Geräte	200
7.1.4 Aminosäure- und DNA-Sequenz.....	202
7.1.5 Primer.....	204
7.2 NMR-Pulsprogramme	205
7.3 NMR-Experimente	222
7.3.1 Zuordnungstabelle von [U- 2 H, 13 C, 15 N]-GTA.....	222
7.3.2 1 H, 13 C-methyl-TROSY-Spektren von Met-GTB während UDP- und HDis- Titration	226
7.3.3 Spektren der Met-GTB Mutanten.....	228
7.3.4 HMQC-NOESY-Spektren von Met-GTB.....	231
7.3.5 Spektren der V184A-, V212I- und V351A-GTA Mutanten	233
7.3.6 Spektren der I231V- I330V-, I509V-P-Dimer-Mutanten.....	234
7.3.7 CPMG-RD-Messungen mit Ile-GTA.....	235

7.3.8 CPMG-RD-Messungen mit Met-GTB.....	237
7.3.9 CPMG-RD-Messungen mit P-Dimeren.....	238
7.3.10 Rohdaten zu inversen STD-NMR Experimenten.....	247
7.4 SVD-Analyse für Titration von ILV-GTA mit UDP-Gal.....	256
Danksagung	259

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

μ	My, Mikro
α 3GT	bovine α -(1 \rightarrow 3)-Galactosyltransferase
Amp	Ampicillin
BGG	Bovines Gammaglobulin
BoGT6a	Glycosyltransferase aus <i>Bacteroides ovatus</i>
bp	Basenpaare
CAZy	<i>Carbohydrate-Active EnZymes</i>
chem.	Chemisch
CPMG	Carr-Purcell Meiboom-Gill
Da	Dalton
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
d _x	Anzahl der deuterierten Protonen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
f.c.	finale Konzentration
FPLC	<i>Fast protein liquid chromatography</i>
g	Gramm
Gal	Galactose
GalNAc	N-Acetylgalactosamin
GF	Gelfiltration
GT	Glycosyltransferase
GTA	α -(1 \rightarrow 3)-N-Acetylgalactosaminyltransferase
GTB	α -(1 \rightarrow 3)-Galactosyltransferase
h	Stunde
H	Wasserstoff
H ₂ O	Filtriertes Wasser
HBGA	Histo-Blutgruppen Antigen
HDis	H-Disaccharid, α -L-Fucp-1,2- β -D-Galp
Hex	Hexanolamin
HMQC	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Correlation</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid

ITC	Isothermale Titrationskalorimetrie
k	Kilo
L	Liter
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
LgtC	α -1,4-Galactosyltransferase aus <i>Neisseria meningitidis</i>
m	Milli
M	Molar, [mol/L]
MBP	Maltose-Bindungsprotein
min	Minute
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
MSG	Malat-Synthase G
MWCO	<i>Molecular weight cut off</i>
n	Nano
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy</i>
NoV	Norovirus
NUS	<i>Non Uniform Sampling</i>
OD	Optische Dichte
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
p	Piko
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Phosphat-Puffer	Pufferlösung aus Na_2HPO_4 und NaH_2PO_4
ppm	<i>Parts per million</i>
rpm	<i>Rounds per minute</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOB	<i>Super Optimal Broth</i>
SOC	SOB mit Katabolit-Inhibierung
SOP	<i>Standard Operating Procedure</i>
SP	Sulfopropyl
SPR	<i>Surface Plasmon Resonance</i>
STD	Sättigungstransfer-Differenz
TB	<i>Terrific Broth</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TROSY	<i>Transverse relaxation optimized spectroscopy</i>

TSP	Natriumtrimethylsilylpropionat
U-	Uniform
u.a.	Unter anderem
UDP	Uridindiphosphat
UMP	Uridinmonophosphat
UZ	Ultrazentrifugation
VLP	<i>Virus Like Particle</i>
z.B.	Zum Beispiel

Aminosäuren

Ala	A	Alanin
Arg	R	Arginin
Asn	N	Asparagin
Asp	D	Asparaginsäure
Cys	C	Cystein
Gln	Q	Glutamin
Glu	E	Glutaminsäure
Gly	G	Glycin
His	H	Histidin
Ile	I	Isoleucin
Leu	L	Leucin
Lys	K	Lysin
Met	M	Methionin
Phe	F	Phenylalanin
Pro	P	Prolin
Ser	S	Serin
Thr	T	Threonin
Trp	W	Tryptophan
Tyr	Y	Tyrosin
Val	V	Valin

1 Einleitung

1.1 Glycobiologie

Die Glycobiologie beschäftigt sich mit der Untersuchung von Struktur und Funktion von Glykanen. Dabei befindet sich nicht nur die Zuckerstruktur an sich im Fokus, sondern auch die Proteine, welche diese Strukturen auf- und abbauen bzw. binden (Varki et al., 2008). Glykane sind neben Nukleinsäuren, Proteinen und Lipiden die wichtigsten Grundbausteine des Lebens. Sie zählen zu den am häufigsten in der Natur vorkommenden Biomolekülen und spielen u.a. eine wesentliche Rolle im Energiestoffwechsel, bei Signal- und Erkennungswegen, wie Zelladhäsion, Rezeptor-Aktivierung, Signaltransduktion und Endozytose (Ohtsubo and Marth, 2006). Außerdem sind sie wichtig für den strukturellen Aufbau und die Stabilität von Biomolekülen (Varki, 1993). Durch die große Anzahl an natürlich vorkommenden Monosacchariden und die diversen glycosidischen Bindungen, welche durch Glycosyltransferasen gebildet werden, kommt es zu einer enormen Vielfalt an Oligo- und Polysacchariden. Dies hat auch diverse Funktionen zur Folge. Glykane kommen als separate Einheiten oder gekoppelt an Proteine oder Lipide vor; man spricht hier von sogenannten Glycokonjugaten. In eukaryotischen Zellen werden die meisten Proteine posttranslational modifiziert, beispielsweise durch die kovalente Anknüpfung dieser Zuckerstrukturen (Spiro, 1973; Spiro, 2002). Man unterscheidet hier zwischen einer O- und N-Glycosylierung. Bei der N-Glycosylierung werden die Zuckerbausteine an Asparagine geheftet, bei der O-Glycosylierung hingegen an Serine oder Threonine (Varki et al., 2008). Eine Veränderung des Glykanmusters kann zur Entstehung bzw. zum Fortschreiten von Krankheiten wie Krebs führen (Fuster and Esko, 2005; Varki et al., 2008). Glykane stellen aber auch Epitope für die Immunregulation dar und sind wichtig für die Wirt-Pathogen-Interaktion (Ohtsubo and Marth, 2006; Varki, 1993). So sind Glykane und Glycokonjugate beispielsweise auch für die Erkennung bzw. Bindung von Viruspartikeln an die Zelloberfläche von enormer Bedeutung (Han et al., 2012).

1.2 Histo-Blutgruppen Antigene

Die Histo-Blutgruppen Antigene (HBGAs) sind ein Beispiel für die zuvor beschriebenen Glykane. Es handelt sich dabei um terminale Kohlenhydratstrukturen auf Glycoproteinen und Glycolipiden. Das AB0-Blutgruppensystem wurde erstmals 1901 von Karl Landsteiner beschrieben (Landsteiner, 1901). Die vier Blutgruppenantigene A, B, AB und 0, welches auch als H-Antigen bezeichnet wird, wurden auf roten Blutkörperchen gefunden und später um weitere Subgruppen erweitert (Landsteiner, 1901; von Decastello and Sturli, 1902; Yamamoto et al., 1990). Diese Antigene wurden auch im Speichel, in verschiedenen Geweben, wie z.B. den Epithelien des Gastrointestinaltraktes sowie als freie Oligosaccharide im Serum nachgewiesen (Marionneau et al., 2001; Milland and Sandrin, 2006). Individuen mit Blutgruppe A besitzen Anti-B-Antikörper; mit Blutgruppe B Anti-A-Antikörper, mit Blutgruppe AB keine und Individuen mit Blutgruppe 0 besitzen Anti-A- sowie Anti-B-Antikörper.

Zusätzlich zu den ABH-Antigenen wurden auch sogenannte Lewis-Antigene auf Erythrozyten gefunden. Die Lewis-Antigene werden im Gegensatz zu den ABH-Antigenen nicht von den Erythrozyten selbst synthetisiert, sondern nur adsorbiert (Varki et al., 2008; Watkins, 1999). Die ABH-Antigene sind strukturell ähnlich zu den Lewis-Antigenen und werden als HBGAs zusammengefasst (Tabelle 1.1) (Marionneau et al., 2001; Watkins, 2001). Diese Antigene werden aus sechs verschiedenen Vorläufern durch das Anheften von Monosacchariden durch Glycosyltransferasen (GTs) synthetisiert (Marionneau et al., 2001; Meloncelli and Lowary, 2009). GTs sind donor- und akzeptorspezifisch und spezifisch für die jeweilige glycosidische Bindung (Kobata et al., 1968a, b; Marionneau et al., 2001; Mollicone et al., 1995).

Die ABH-Antigene kommen u.a. auf Darmepithelzellen aber auch auf einigen Darmbakterien vor. Einige Viren, wie z.B. das humane Norovirus erkennen spezifisch diese Antigene. Neueste Studien zeigen beispielsweise, dass die Bindung an Darmbakterien sowohl die Bindung an, als auch die Infektion von B-Zellen mit NoV erleichtert (Jones et al., 2014). Die ABH-Antigene dienen hier als sogenannte *attachment* Faktoren des Wirtes für Noroviren (Harrington et al., 2002; Hutson et al., 2002; Parrino et al., 1977). Sie werden nicht als Rezeptoren bezeichnet, da weitere Funktionen, neben dem initialen Kontakt zwischen Virus und Wirt, bisher nicht gezeigt werden konnte.

Tabelle 1.1: Übersicht über HBGA Strukturen im Menschen. R steht für ein Glycoprotein oder Glycolipid.

HBGA	Struktur
ABH-Antigene	
H-Antigen	L-Fuc- α (1,2)- β -D-Gal-R
A-Antigen	D-GalNAc- α (1,3)-[L-Fuc- α (1,2)]- β -D-Gal-R
B-Antigen	D-Gal- α (1,3)-[L-Fuc- α (1,2)]- β -D-Gal-R
Lewis-Antigene	
Lewis ^x (Le ^x)	D-Gal- β (1,4)-[L-Fuc- α (1,3)]- β -D-GlcNAc-R
Lewis ^a (Le ^a)	D-Gal- β (1,3)-[L-Fuc- α (1,4)]- β -D-GlcNAc-R
Lewis ^y (Le ^y)	L-Fuc- α (1,2)-D-Gal- β (1,4)-[L-Fuc- α (1,3)]- β -D-GlcNAc-R
Lewis ^b (Le ^b)	L-Fuc- α (1,2)-D-Gal- β (1,3)-[L-Fuc- α (1,4)]- β -D-GlcNAc-R
sialyl-Lewis ^x (sLe ^x)	D-Neu5Ac- α (2,3)-D-Gal- β (1,4)-[L-Fuc- α (1,3)]- β -D-GlcNAc-R
sialyl-Lewis ^a (sLe ^a)	D-Neu5Ac- α (2,3)-D-Gal- β (1,3)-[L-Fuc- α (1,4)]- β -D-GlcNAc-R

1.3 Glycosyltransferasen

Aufgrund der diversen biologischen Funktionen von Glykanen (Varki et al., 2008) und wegen des potentiellen Krankheitsrisikos bei einer Veränderung des Glycosylierungsmusters (Fuster and Esko, 2005; Hakomori, 1999) ist es von enormer Wichtigkeit, auch ihre Biosynthese durch Glycosyltransferasen und ihren Abbau durch Glycosidasen zu verstehen. Glycosidasen, welche die Hydrolyse der glycosidischen Bindung katalysieren, sind bereits gut charakterisiert (Davies et al., 1998; Lairson and Withers, 2004; Zechel and Withers, 1999). Der Mechanismus der Glycosyltransferasen ist hingegen noch nicht vollständig geklärt. GTs katalysieren die regio- und stereospezifische Übertragung eines aktivierten Donorzuckers auf einen Akzeptor. Die Aktivierung des Donorzuckers erfolgt meist durch Nucleosid-Diphosphate (z.B. UDP oder GDP), aber auch Nucleosid-Monophosphate oder Lipid-Phosphate. Bei dem Akzeptor handelt es sich meist um andere Zucker, aber auch um Lipide, Proteine, Nukleinsäuren, Antibiotika und andere kleine Moleküle (Lairson et al., 2008; Weadge and Palcic, 2008). GTs machen etwa 1-2% des jeweiligen Genoms aus, was die große Bedeutung dieser Enzymfamilie zusätzlich hervorhebt (Varki et al., 2008).

1.3.1 Klassifikation und Faltungsmotive

Anhand ihrer Primärstruktur können GTs in 98 Familien eingeteilt werden (Campbell et al., 1997; Coutinho et al., 2003) <http://www.cazy.org>, Stand Januar 2016). Trotz der großen Sequenzinhomogenität unterscheidet man nur zwischen zwei prinzipiellen Faltungsmustern, der GT-A- und GT-B-Faltung (Abbildung 1.1) (Bourne and Henrissat, 2001; Coutinho et al., 2003; Unligil and Rini, 2000). Des Weiteren wurden erste Proteine mit einer GT-C-Faltung gefunden (Alderwick et al., 2011). Die GT-C-Faltung wurde durch eine iterative Sequenzanalyse mittels BLAST gefunden (Liu and Mushegian, 2003). Es handelt sich um Transmembranproteine, welche lipidphosphataktivierte Donorsubstrate verwenden (Lairson et al., 2008).

Die GT-A-Faltung lässt sich durch zwei aneinandergrenzende $\beta/\alpha/\beta$ -Rossmann-Domänen beschreiben, die an der Nucleotid- und Akzeptorbindung beteiligt sind (Unligil and Rini, 2000). Viele Enzyme mit GT-A-Faltung besitzen ein DXD-Motiv, welches ein bivalentes Kation und/oder eine Ribose koordiniert (Breton et al., 1998).

GT-B Enzyme besitzen auch zwei $\beta/\alpha/\beta$ -Rossmann-Domänen, diese sind jedoch weniger eng miteinander assoziiert. Das aktive Zentrum befindet sich zwischen den beiden Domänen. Wie bei der GT-A-Faltung kommt es innerhalb der Domänen zur Donor- und Akzeptor-Bindung. Das Vorhandensein eines Metallions ist enzymabhängig (Morera et al., 2001).

GTs sind typischerweise im endoplasmatischen Retikulum oder im Golgi-Apparat lokalisiert, einige befinden sich aber auch im Cytosol oder im Zellkern (Spiro, 2002). Trotz der großen Sequenzunterschiede zwischen den GT-Familien haben alle Golgi-ständigen GTs den gleichen Aufbau. Es handelt sich um Typ II Transmembranproteine, bestehend aus einer kurzen N-terminalen cytoplasmatischen Domäne, einer Transmembrandomäne, gefolgt von einer Stammregion und der katalytischen Domäne im Lumen des Golgi-Apparates (Paulson and Colley, 1989; Varki et al., 2008). Durch proteolytische Spaltung im Bereich der Stammregion entstehen auch lösliche GTs. Diese werden sekretiert und sind in Körperflüssigkeiten wie Milch oder Serum zu finden (Varki et al., 2008).

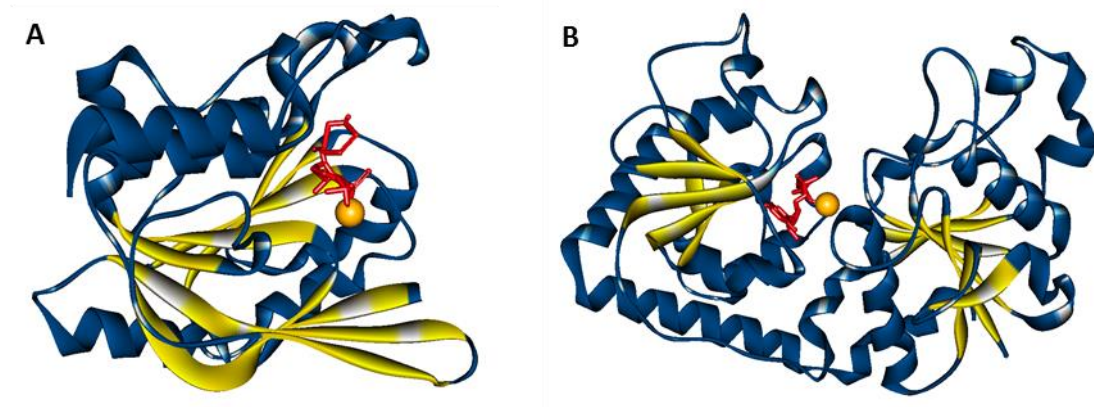


Abbildung 1.1: Faltungsmuster von Glycosyltransferasen. (A) GT-A Faltung am Beispiel von SpsA aus *Bacillus subtilis* (PDB 1QGQ). (B) GT-B Faltung am Beispiel von β -Glucosyltransferase aus T4-Phagen (PDB 1JG7). In rot ist der jeweilige Ligand und in orange ein Metallion dargestellt.

1.3.2 Katalysemechanismen

Zusätzlich zu der Einteilung aufgrund von Sequenzhomologien und aufgrund des Faltungsmusters werden GTs auch nach ihrer Stereospezifität unterteilt. Je nach der anomeren Konfiguration des Donorzuckers vor und nach Übertragung unterscheidet man zwischen konfigurationserhaltenden und -invertierenden GTs (Sinnott, 1990) (Abbildung 1.2). Diese Einteilung ist unabhängig vom Faltungsmuster (Coutinho et al., 2003).

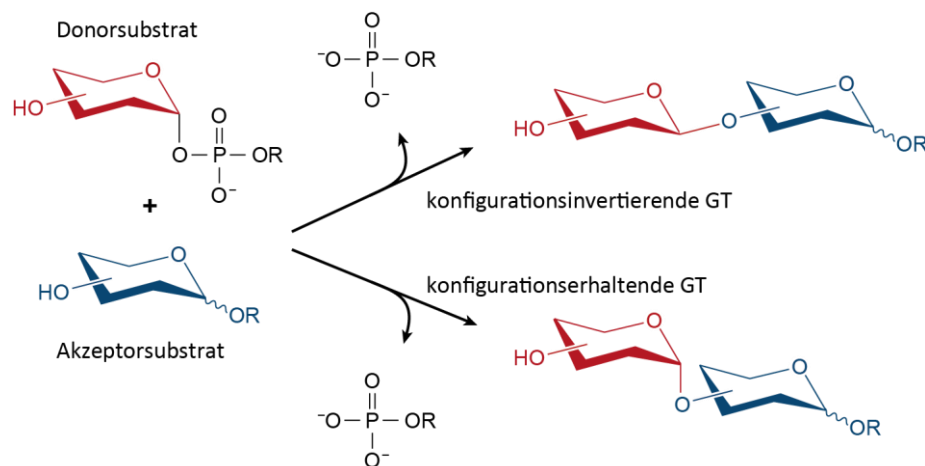


Abbildung 1.2: Stereochemie von konfigurationserhaltenden und invertierenden GTs. Abbildung nach (Lairson, Henrissat et al. 2008) mit R als Donor- bzw. Akzeptorsubstratrest.

Der Mechanismus der invertierenden GTs ist gut charakterisiert. Es handelt sich um einen sogenannten *direct displacement S_N2-like* Mechanismus (Abbildung 1.3). Eine katalytische Base im aktiven Zentrum deprotoniert den Akzeptor, wodurch es zu einem nukleophilen Angriff des Akzeptors auf den Donor kommt. Die Phosphat-Abgangsgruppe wird entweder durch ein Metallion oder durch eine bestimmte Aminosäure stabilisiert (Breton et al., 2006).

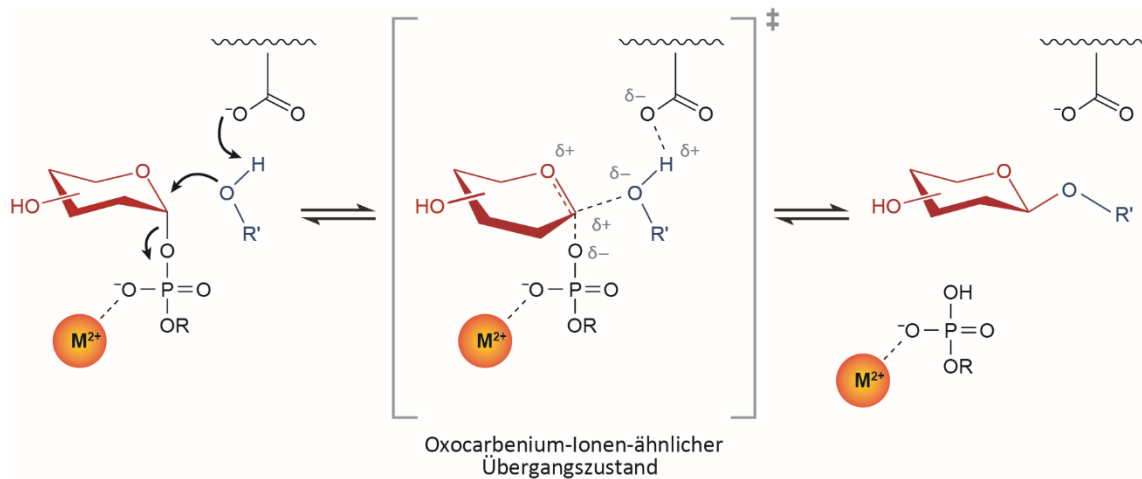


Abbildung 1.3: Direct displacement S_N2-like Mechanismus der invertierenden GTs, gezeigt mit einer metallionenabhängigen Reaktion. Abbildung übernommen von (Lairson and Withers 2004) mit R als Donor- bzw. Akzeptorsubstratrest.

Der Mechanismus der konfigurationserhaltenden GTs ist hingegen trotz vieler Versuche nicht geklärt (Lairson et al., 2008; Soya et al., 2010). Eine Möglichkeit ist der *double displacement* Mechanismus (Abbildung 1.4 A). Hier kommt es zu einem nukleophilen Angriff einer Aminosäure des Enzyms auf das anomere Zentrum des Donors. Es bildet sich ein kovalentes Glycosyl-Enzym-Intermediat, welches durch den nukleophilen Angriff des Akzeptors wieder aufgelöst wird (Breton et al., 2006; Davies, 2001). Bei Enzymmutanten konnte zwar ein Glycosyl-Enzym-Intermediat massenspektrometrisch nachgewiesen werden (Lairson et al., 2004; Soya et al., 2010), jedoch bisher nie bei Wildtyp-Enzymen. Außerdem blieben viele andere strukturelle, kinetische und spektroskopische Nachweisversuche des *double displacement* Mechanismus erfolglos (Gibson et al., 2002; Lobsanov et al., 2004; Ly et al., 2002; Martinez-Fleites et al., 2006; Monegal and Planas, 2006; Pedersen et al., 2003).

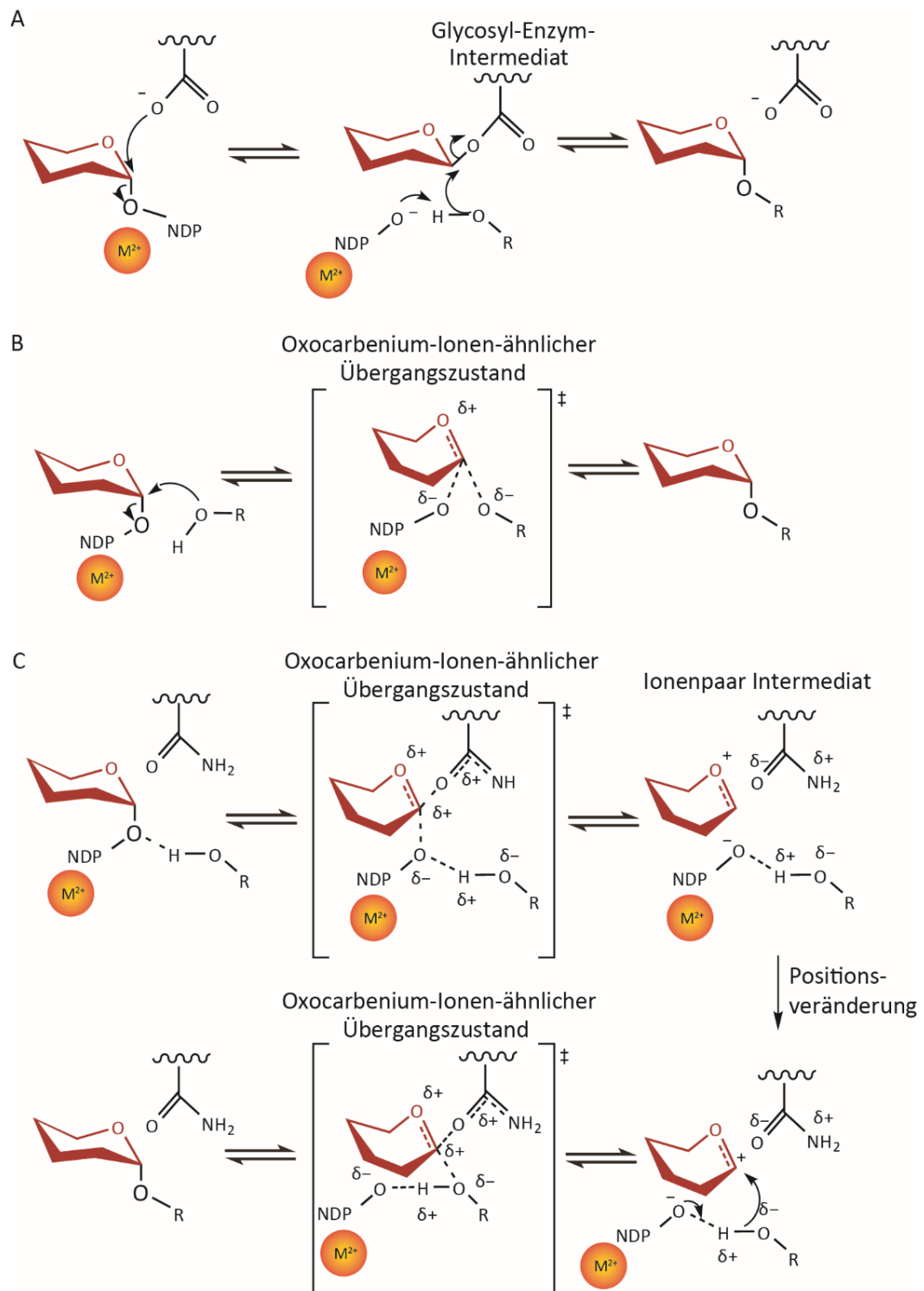


Abbildung 1.4: Mögliche Mechanismen von konfigurationserhaltenden GTs. (A) double displacement Mechanismus mit kovalentem Glycosyl-Enzym-Intermediat (Davies, 2001). (B) S_Ni Mechanismus mit Oxocarbenium-Ionen-ähnlichem Übergangszustand (Davies, 2001). (C) S_{Ni} -ähnlicher Mechanismus mit Bildung eines kurzlebigen Ionenpaar Intermediat (Lairson et al., 2008). Abbildung übernommen von (Soya et al., 2010).

Eine Alternative bietet der S_{Ni} Mechanismus (auch orthogonaler Mechanismus genannt) (Abbildung 1.4 B). Das Nukleophil und die Abgangsgruppe agieren an der gleichen Seite, es bildet sich ein Oxocarbenium-Ionen-ähnlicher Übergangszustand. Dieser Übergangszustand ist zwar entropisch ungünstig, jedoch favorisieren einige strukturelle und theoretische Berechnungen diesen Mechanismus (Gomez et al., 2012; Schuman et al., 2013). Eine weitere Möglichkeit ist der S_{Ni} -ähnliche Mechanismus. Hier wird ein kurzlebiges Ionenpaar-Intermediat gebildet. Es kommt zu einer Positionsänderung dieses Intermediates im aktiven Zentrum, wodurch ein Angriff des Akzeptors auf den Donor stattfinden kann. Über einen Oxocarbenium-Ionen-ähnlichen Übergangszustand kommt es zur Produktbildung (Goedl and Nidetzky, 2009; Lairson et al., 2008) (Abbildung 1.4 C). Auch dieser Mechanismus wird für einige konfigurationserhaltenden GTs vermutet, wie z.B. die GTA (Bobovska et al., 2014a), die Lipopolysaccharyl- α -1,4-Galactosyltransferase C (LgtC) (Tvaroska, 2004), die Trehalose-Phosphorylase (Goedl et al., 2006) sowie die Mannosyltransferase Kre2p/Mnt1p (Bobovska et al., 2014b). Jedoch kann auch dieser Mechanismus nicht auf alle GTs zutreffen, da nicht alle ein katalytisches Nukleophil im Bereich des aktiven Zentrums besitzen.

Trotz vieler Untersuchungen der letzten Jahre konnte der Mechanismus der konfigurationserhaltenden GTs noch nicht eindeutig geklärt werden. Es ist auch möglich, dass einige GTs den *double displacement* Mechanismus und andere den S_{Ni} -ähnlichen Mechanismus nutzen. Es wird auch diskutiert, ob der Mechanismus eine Kombination aus der S_{N1} , S_{N2} und S_{Ni} -ähnlichen Reaktion ist (Lairson et al., 2008).

1.3.3 Proteindynamik

Die Analyse von Strukturen allein kann jedoch nicht die Funktion und das biologische Verhalten von Proteinen erklären. Proteine sind dynamische Makromoleküle. Sie bewegen sich im Bereich von Picosekunden bis hin zum Sekundenbereich. Diese Bewegungen sind wichtig für viele biologische Prozesse wie die vorher beschriebene Katalyse, allosterische Regulation, Ligandenbindung und Proteinfaltung (Boehr et al., 2006; Loria et al., 2008). Die NMR-Spektroskopie ist eine sehr leistungsfähige Methode, um diese Bewegungen in den verschiedenen Zeitbereichen mit atomarer Auflösung zu untersuchen. Diese Untersuchungen beruhen auf den Interaktionen zwischen NMR-aktiven Kernen, welche durch Relaxationsmessungen sichtbar gemacht werden können (Bieri et al., 2011; Palmer, 2004).

Zu schnellen Bewegungen im Bereich von ps-ns gehören Bindungsvibrationen, die Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen und Seitenkettenrotationen. Diese Bewegungen lassen sich u.a. mit R_1 und R_2 -Relaxationsraten und anhand des NOE-Effektes zwischen Amidprotonen und dem gebundenen Stickstoff bestimmen, wodurch man Bewegungen des Proteinrückgrates charakterisieren kann (Farrow et al., 1994a; Morin, 2011). Konformationsänderungen durch z.B. Ligandenbindung und Katalysen finden im μ s-ms Bereich statt. Solche Bewegungen lassen sich anhand von Relaxations-Dispersions-Messungen sichtbar machen. Dabei können kinetische, thermodynamische und strukturelle Daten von sogenannten angeregten Zuständen gewonnen werden, die nur gering populiert und dadurch nicht direkt detektierbar sind (Loria et al., 1999; Mulder et al., 2001). Sehr langsame Bewegungen im hohen Millisekundenbereich wie z.B. Proteinfaltungen lassen sich durch Wasserstoff-Deuterium-Austausch messen. Ligandenbindung kann auch zu einem langsamen Austausch zwischen zwei Zuständen führen. Es entstehen zwei diskrete Signale, welche durch ZZ-Austauschexperimente näher charakterisiert werden können (Farrow et al., 1994b) (Abbildung 1.5).

Die Analyse dieser dynamischen Prozesse kann auch helfen, um den Mechanismus der konfigurationserhaltenden Glycosyltransferasen weiter aufzuklären. Im S_Ni -ähnlichen Mechanismus ist beispielsweise eine Positionsänderung der Liganden von essentieller Bedeutung (siehe 1.3.2). Diese Positionsänderung hat auch einen Einfluss auf die umliegenden Aminosäuren und damit auch auf deren Dynamik. Des Weiteren kommt es zur Bindung von Donor- und Akzeptorsubstrat. Eine genaue Analyse dieser Bindung und der möglichen induzierten Konformationsänderung der GTs ist von enormer Wichtigkeit für die Charakterisierung des Mechanismus.

Aus Kristallstrukturen der konfigurationserhaltenden humanen Blutgruppen A und B Glycosyltransferasen ist bekannt, dass es durch die Bindung des Donor- und Akzeptorsubstrates zu einer Konformationsänderung kommt. GTA und GTB besitzen eine interne flexible Schleife und einen flexiblen C-Terminus. Ohne Substrat liegt vor allem der C-Terminus ungeordnet vor. Wenn jedoch die beiden Substrate UDP und H-Antigen vorhanden sind, kommt es zu einer Ordnung dieser Region (Alfaro et al., 2008). Solche konformationellen Änderungen konnten auch bei anderen GTs beobachtet werden (Chiu et al., 2004; Persson et al., 2001). Eine genaue Dynamikanalyse der Schleifen und der dadurch resultierenden Veränderungen im Enzym können helfen, um den Mechanismus von konfigurationserhaltenden GTs weiter zu charakterisieren und aufzuklären.

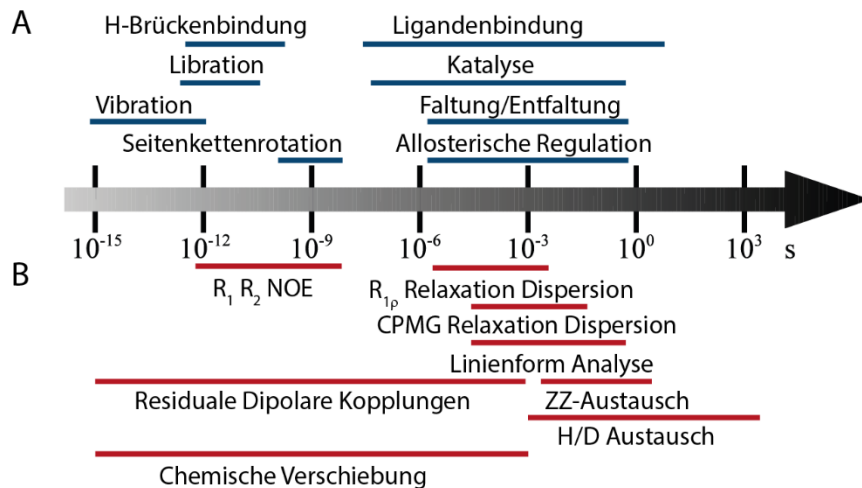


Abbildung 1.5: Zeitbereiche der Proteindynamik (A) und NMR-Experimente (B). Abbildung angepasst nach (Palmer, 2004).

1.4 Humane Blutgruppe A und B Glycosyltransferasen – Biosynthese von A- und B-Blutgruppenantigenen

Durch ihre vielfältigen Funktionen ist die Erforschung von Glykanen und ihrer Biosynthese durch GTs von enormer Bedeutung. Da der Mechanismus der konfigurationserhaltenden GTs noch nicht vollständig aufgeklärt ist, dienen die humanen Blutgruppe A und B Glycosyltransferasen als Modell. GTA (α -(1 \rightarrow 3)-N-Acetylgalactosaminyltransferase) und GTB (α -(1 \rightarrow 3)-Galactosyltransferase) sind für den letzten Schritt der ABH-Antigensynthese (siehe Abschnitt 1.2) verantwortlich. Die Gene befinden sich auf dem AB0-Genlocus und verhalten sich codominant zueinander. Sind beide Gene vorhanden, werden sowohl A- als auch B-Antigene produziert. Menschen mit Blutgruppe 0 besitzen 2 defekte Allele, sodass das H-Antigen unverändert bleibt (Yamamoto et al., 1990).

Das Grundgerüst für die A- und B-Antigensynthese bildet hierfür das H-Antigen, welches in sechs verschiedenen Varianten vorliegt (Clausen and Hakomori, 1989; Meloncelli and Lowary, 2009). Es besitzt terminal das Disaccharid L-Fuc- α (1,2)- β -D-Gal, welches auch als H-Disaccharid (HDis) bezeichnet wird. Es fungiert als minimaler Akzeptor, auf den die GTA das N-Acetyl- α -D-galactosamin des Donors Uridindiphosphat-N-Acetyl- α -D-galactosamin (UDP-GalNAc) überträgt. Die Galactoseeinheit von UDP- α -D-Galactose (UDP-Gal) wird von der GTB auf das H-

Antigen übertragen (Abbildung 1.6). GTA und GTB gehören nach der CAZy Datenbank zur Familie 6 der GTs.

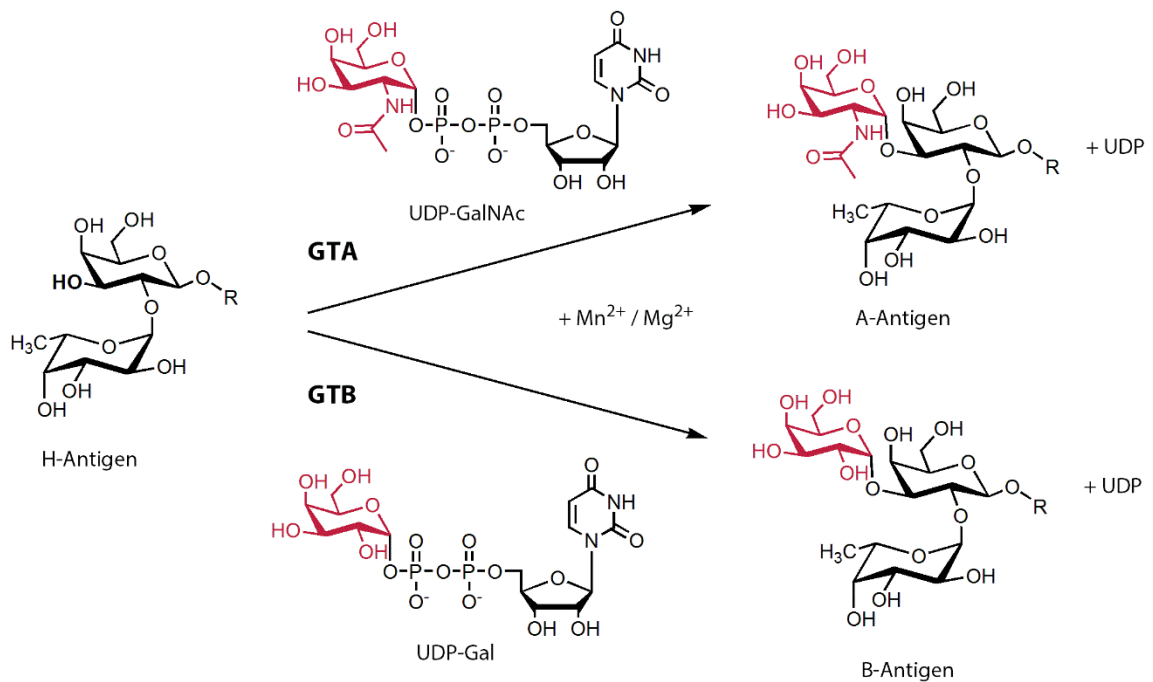


Abbildung 1.6: A- und B-Antigenbildung durch Übertragung eines aktivierten Donorzuckers von UDP-GalNAc bzw. UDP-Gal auf das H-Antigen durch die Enzyme GTA bzw. GTB. Die Reaktion findet nur in Anwesenheit eines bivalenten Kations statt. R steht für ein Glycoprotein oder Glycolipid.

1.4.1 Strukturelle Eigenschaften und Ligandenbindung

Die humanen Blutgruppen A und B Glycosyltransferasen sind Typ II-Transmembranproteine (Cai et al., 2003), welche im Golgi-Apparat lokalisiert sind (Berger et al., 1981; Roth et al., 1988). GTA und GTB bestehen aus 354 Aminosäuren und haben ein Molekulargewicht von 41 kDa. Sie setzen sich aus einer kurzen N-terminalen cytoplasmatischen Domäne, einer Transmembrandomäne gefolgt von einer Stammregion und einer großen katalytischen Domäne zusammen, welche in das Lumen des Golgi ragt. Wie viele andere GTs können GTA und GTB durch Abspaltung der katalytischen C-terminalen Domäne auch sekretiert in Körperflüssigkeiten vorliegen (Nagai et al., 1978a; Nagai et al., 1978b; Whitehead et al., 1974). Für systematische Studien konnten die löslichen Domänen – ein Teil der Stammregion und die katalytische Domäne – rekombinant in *E. coli* synthetisiert werden. Die Aminosäuren 63-354 haben

ein Molekulargewicht von 35 kDa. Die Aktivität und Substratspezifität der rekombinant hergestellten und der aus Seren isolierten GTA und GTB ist vergleichbar (Marcus et al., 2003; Seto et al., 1997; Seto et al., 1995). Mit Hilfe von Massenspektrometrie konnte gezeigt werden, dass GTA und GTB unter neutralen Bedingungen in Lösung als Homodimere vorliegen. Die Homodimere sind nicht kovalent miteinander verbunden und besitzen zwei äquivalente Substratbindungsstellen (Abbildung 1.7) (Shoemaker et al., 2007; Soya et al., 2009). Die Homodimer- als auch Heterodimerbildung ist typisch für GTs (Hassinen et al., 2010) und es wird vermutet, dass sie einen Einfluss auf den Verbleib der GTs im Golgi-Apparat hat und auch ihre Präzision und Effizienz erhöht (Colley, 1997; de Graffenried and Bertozzi, 2004).

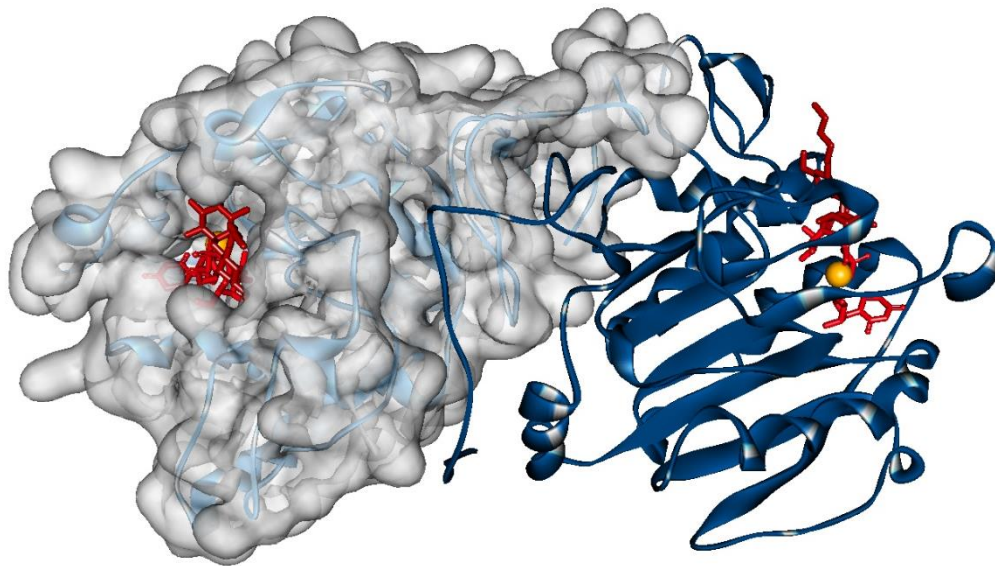


Abbildung 1.7: Kristallstruktur der Chimären AAB (G176R, S235G-GTB). Dargestellt ist ein Homodimer mit gebundenem UDP-Gal (rot), 3-Desoxy-H-Disaccharid (dunkelrot) und Mn^{2+} (orange). (PDB 2RJ7)

In den letzten Jahren konnten viele Kristallstrukturen von GTA, GTB und diversen Mutanten gelöst werden (Alfaro et al., 2008; Letts et al., 2006; Patenaude et al., 2002). GTA und GTB sind Metallionen-abhängige Enzyme mit einer GT-A-Faltung (siehe 1.3.1). Das aktive Zentrum befindet sich zwischen den zwei Domänen. Die N-terminale Domäne mit dem Rossmann-Faltungsmotiv erkennt das Donor-Nucleotid, die C-terminale Domäne hingegen bindet den Akzeptor (Patenaude et al., 2002). Ein konserviertes DXD-Motiv (Asp211-Val212-Asp213) im aktiven Zentrum koordiniert ein bivalentes Kation – Mn^{2+} oder Mg^{2+} – welches für die Donorbindung von UDP-GalNAc bzw. UDP-Gal essentiell ist.

GTA und GTB unterscheiden sich nur in vier Aminosäuren – Arg176Gly, Gly235Ser, Leu266Met, Gly268Ala (Yamamoto et al., 1990). Diese vier Aminosäuren sind jedoch verantwortlich für die hohe Donorsubstratspezifität und ein unterschiedliches kinetisches Verhalten. Die Umsatzrate der GTA liegt bei $17,5 \text{ s}^{-1}$, die der GTB hingegen nur bei $5,1 \text{ s}^{-1}$ (Marcus et al., 2003). Anhand von Kristallstrukturen und kinetischen Untersuchungen der Enzyme und ihrer Chimären konnte die Struktur-Funktions-Beziehung dieser vier Aminosäuren aufgeklärt werden. Die Chimären werden nach den vier kritischen Aminosäuren benannt, so beschreibt AAAA GTA, ABBB hingegen GTB mit einer Mutation an Position 176 von Glycin zu Arginin. Die Aminosäuren an Position 266 und 268 sind verantwortlich für die Unterscheidung zwischen den Donorsubstraten (Alfaro et al., 2008; Seto et al., 1999). Die Aminosäuren Met266 und Ala268 der GTB sind größer als die der GTA. Die Bindungstasche der GTB ist damit kleiner, sodass eine Bindung von UDP-GalNAc sterisch nicht möglich ist, die Bindung von UDP-Gal jedoch schon. Das aktive Zentrum der GTA ist hingegen zu groß, um auch das GTB-Substrat UDP-Gal korrekt zu binden. Durch die hohe Beweglichkeit von UDP-Gal in der GTA-Bindungstasche werden essentielle Interaktionen zwischen Donor und Enzym nur in sehr geringem Maße gebildet (Patenaude et al., 2002). Geringe Kreuzreaktionen zwischen den Enzymen und den Donorsubstraten konnten jedoch festgestellt werden (Seto et al., 2000).

Für die Akzeptorererkennung sind hingegen die Aminosäuren an Position 235 und 266 wichtig (Alfaro et al., 2008; Letts et al., 2006; Patenaude et al., 2002). Trotz sonst sehr guter Elektronendichte der Kristallstrukturen konnten zwei Bereiche nicht aufgelöst werden. Wie auch viele andere GTs besitzen GTA und GTB zwei ungeordnete Regionen: den C-Terminus (Aminosäuren 346-354) und eine interne Schleife (Aminosäuren 176-195). Eine der vier kritischen Aminosäuren befindet sich am „Scharnier“ der internen Schleife. Anhand von Kristallstrukturen konnte gezeigt werden, dass ein Arginin an Position 176 die Ordnung der internen Schleife sowie der C-Terminus erhöht und die Umsatzrate beeinflusst (Alfaro et al., 2008; Seto et al., 1999). Es wird vermutet, dass die interne Schleife und damit auch Aminosäure 176 wichtig für die Produktfreilassung ist (Abbildung 1.8) (Patenaude et al., 2002).

In Abhängigkeit von der Substratbindung nehmen die interne Schleife und der C-Terminus verschiedene Konformationen ein. Es wird von einem offenen, halbgeschlossenen und geschlossenen Zustand ausgegangen (Alfaro et al., 2008).

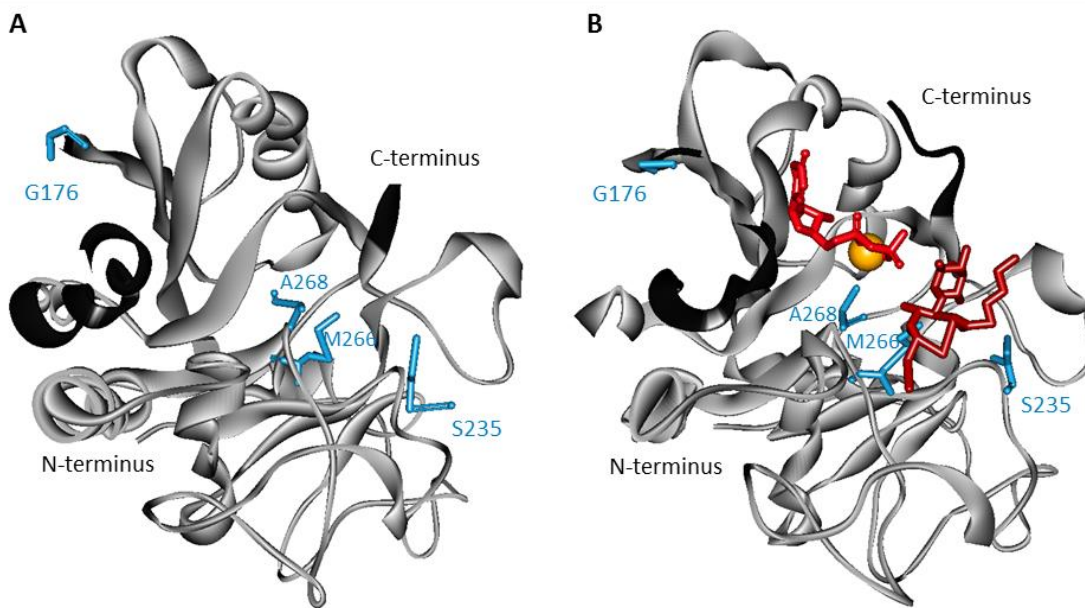


Abbildung 1.8: GTB-Kristallstruktur. GTB-Monomer (A) ohne Liganden (PDB 2RIT) und (B) in Anwesenheit von UDP-Gal (rot), 3-Desoxy-H-Disaccharid (dunkelrot) und Mn²⁺ (orange) (PDB 2RJ8). In blau sind Aminosäuren dargestellt, in denen sich GTA und GTB unterscheiden. Interne Schleife und C-Terminus sind schwarz dargestellt. Durch Bindung der Liganden kommt es zu einer Konformationsänderung, was eine bessere Auflösung der Aminosäuren der Schleifen zur Folge hat.

Ohne Substrate und wenn nur das HDIs gebunden ist, liegen die Enzyme im offenen Zustand vor, welches anhand von ABBB, AABB und BBBB gezeigt werden konnte. Der C-Terminus ist komplett und die interne Schleife teilweise ungeordnet. Die interne Schleife bildet zwei nur teilweise aufgelöste α -Helices. Die Bindung von UDP an die Chimären führt zu einer Bewegung der internen Schleife um ca. 6 Å zum gebundenen UDP, sodass die beiden α -Helices in einer Linie sind. Man spricht von einem halbgeschlossenen Zustand. Die Ordnung in den beiden flexiblen Bereichen wird durch die UDP-Bindung nicht erhöht. Wenn beide Substrate vorhanden sind, wird der geschlossene Zustand gebildet. Beide flexiblen Bereiche sind geordnet und die interne Schleife stabilisiert den C-Terminus. Sie interagieren mit den Substraten und Aminosäuren des aktiven Zentrums (Abbildung 1.9) (Alfaro et al., 2008).

In welchem Zeitbereich diese Bewegungen stattfinden, ist bisher noch nicht bekannt. Die kinetische Charakterisierung von BAAA zeigt jedoch eine dreifach erhöhte Umsatzrate k_{cat} für UDP-GalNAc im Vergleich zu GTA. Der Vergleich von ABBB mit GTB zeigt hingegen keinen wesentlichen Unterschied. Die Aminosäure an Position 176 hat demzufolge einen Einfluss auf die Umsatzrate von GTA, jedoch nicht auf die von GTB (Alfaro et al., 2008; Seto et al., 1999).

Es wird davon ausgegangen, dass bei der Katalyse die Donorbindung der Akzeptorbindung vorausgeht (Alfaro et al., 2008; Angulo et al., 2006; Kamath et al., 1999). Des Weiteren konnte ein positiver kooperativer Effekt zwischen den beiden Substraten beobachtet werden (Shoemaker et al., 2008; Sindhuwinata et al., 2013; Sindhuwinata et al., 2010).

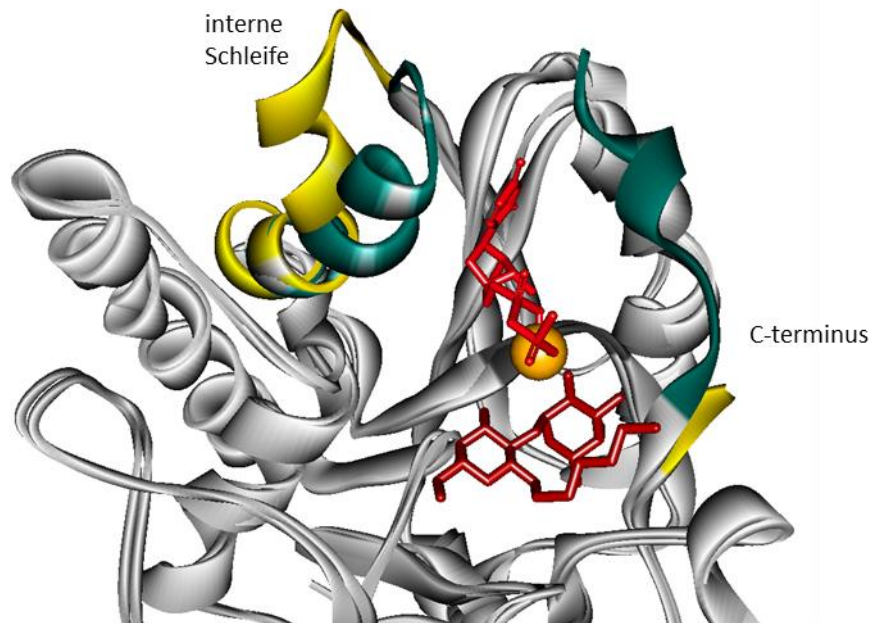


Abbildung 1.9: Offene (gelb) und geschlossene (grün) Konformation von ABBB. Ohne Substrate liegt ABBB in der offenen Form vor (PDB 2RIZ), der C-Terminus ist ungeordnet. Die Bindung von UDP (rot), H-Disaccharid (dunkelrot) und Mn²⁺ (orange) (PDB 2RJ8) führt zur geschlossenen Konformation. Die interne Schleife bewegt sich in Richtung des aktiven Zentrums und der C-Terminus wird geordnet. Das DXD-Motiv ist in dunkelgrau dargestellt.

Das minimale Akzeptorbindungsmotiv ist das H-Disaccharid. Die verwendeten H-Disaccharide tragen am reduzierenden Ende entweder eine Methylgruppe (HDis-O-Methyl) oder einen Octylrest (HDis-octyl) (Lowary and Hindsgaul, 1994; Palcic et al., 1988). Anhand von STD-NMR Experimenten konnte gezeigt werden, dass Uracil das minimale Donorbindungsmotiv darstellt. Uracil, UMP und UDP haben die gleichen Bindungsepitope wie UDP-Gal und binden mit aufsteigender Affinität (Blume et al., 2006). UDP eignet sich daher hervorragend als Donorsubstratanalogon, da UDP-Zucker durch die Enzyme hydrolysiert werden (Sindhuwinata et al., 2010).

NMR-Studien zeigen auch, dass UDP-Gal und UDP-Glc beide in einer rückgefalteten Konformation an GTB binden (Angulo et al., 2006). Diese Konformation ist für eine Katalyse erforderlich. Jedoch wird UDP-Glc nur in geringem Maße umgesetzt (Seto et

al., 2000). Eine Ursache hierfür könnte der höhere negative entropische Bindungsbeitrag sein (Sindhuwinata et al., 2013). Außerdem wird vermutet, dass die Glucose-Einheit die für die Katalyse erforderliche Schleifenbewegung verhindert (Gagnon et al., 2015). Die UDP-Einheit ist demzufolge für die Affinität, die Galactose-Einheit hingegen für die Spezifität verantwortlich (Angulo et al., 2006). Neue Kristallstrukturen zeigen auch, dass UDP-Gal und UDP-Glc in vier verschiedenen Konformationen an GTA, GTB und ihre Chimären binden können. Dabei ist die Position des UDP konserviert, der Zuckerrest hingegen interagiert je nach Konformation mit verschiedenen Aminosäuren des Proteins. Es wird vermutet, dass diese verschiedenen Konformationen nach der Bindung in die katalytisch aktive rückgefaltete Konformation umgewandelt werden (Gagnon et al., 2015).

Die Bewegung der flexiblen Schleifen ist essentiell für die Produktbildung und geht möglicherweise mit weiteren konformationellen Änderungen einher. Die alleinige Untersuchung der Struktur und der thermodynamischen Beiträge kann die beobachteten Effekte jedoch nicht vollständig erklären. Eine genaue Untersuchung der Proteindynamik bei der Substratbindung, als auch bei der Katalyse ist daher unerlässlich und kann weitere Informationen für die Aufklärung des Mechanismus der konfigurationserhaltenden GTs liefern.

1.5 Caliciviren

Die Familie der Caliciviridae (Caliciviren) wird in Gruppe IV der Baltimore Klassifikation eingeteilt. Es handelt sich um unbehüllte, lineare, positiv-einzelsträngige RNA Viren. Das Kapsid besitzt eine icosaedrische Symmetrie. Ein Virion hat typischerweise einen Durchmesser von 35-40 nm und das Genom umfasst ca. 8 kb (Flint et al., 2004). Zu den Caliciviren gehören die fünf Gattungen Lago-, Nebo-, Noro-, Sapo- und Vesivirus, welche wiederum in weitere Spezies unterteilt sind (International Committee on Taxonomy of Viruses, <http://ictvonline.org>). Caliciviren sind ubiquitär und eine häufige Krankheitsursache bei Menschen und Tieren. Das *Rabbit Haemorrhagic Disease Virus* (RHDV) gehört beispielsweise zur Gattung der Lagoviren. Dieses Virus befällt nur Kaninchen und hat eine hämorrhagische Viruserkrankung zu Folge, die meist innerhalb von 48 h tödlich verläuft (Liu et al., 1984; Parra and Prieto, 1990). Vesiviren verursachen u.a. vesikuläre Läsionen in Schweinen und Meeressäugern (Neill et al., 1995). Noroviren (NoV) hingegen befallen sowohl Menschen als auch Tiere und sind die am besten untersuchte Gattung. Sie führen u.a. zu Gastroenteritis bei Menschen, Kühen,

Schweinen und Mäusen. Humane Noroviren sind für ca. 90% der nicht-bakteriellen, epidemischen Ausbrüche von Gastroenteritis beim Menschen verantwortlich (Hansman et al., 2010) und fordern jährlich bis zu 200.000 Todesopfer bei Kindern unter 5 Jahren (Patel et al., 2008).

1.6 Humane Noroviren – Bindung an HBGAs

Humane Noroviren wurden 1972 erstmals in Norwalk, Ohio als Ursache für einen epidemischen Gastroenteritis-Ausbruch beschrieben (Kapikian et al., 1972). Zu Infektionen mit humanen NoV kommt es meist durch Aufnahme von kontaminierter Nahrung oder kontaminiertem Wasser bzw. durch direkten Kontakt mit einer infizierten Person oder Aerosolen, sowie durch den fäkal-oralen Weg (Parashar and Monroe, 2001). Noroviren haben eine sehr geringe Infektionsdosis, d.h. 10-100 Virionen reichen aus, um eine Infektion hervorzurufen. Außerdem sind die Viren sehr stabil und lassen sich durch herkömmliche Desinfektionsmittel nicht zerstören (Caul, 1994; Teunis et al., 2008). Durch diese Eigenschaften kommt es zu epidemischen Ausbrüchen des Virus. Vor allem ältere, sehr junge und immunsupprimierte Menschen sind anfällig für eine Infektion bzw. einen schwereren Krankheitsverlauf (Mattner et al., 2006). Die Inkubationszeit liegt zwischen 24-48 h und klinische Symptome (Erbrechen, Durchfall, Übelkeit, Unterleibskrämpfe) dauern ca. 12-72 h an (Donaldson et al., 2008; Kaplan et al., 1982). Durch den schnellen Krankheitsverlauf kommt es meist zu keiner Langzeitimmunität gegen NoV. Durch die hohe Diversität zwischen den Virusstämmen helfen Antikörper gegen einen Stamm meist nicht bei der Infektion mit einem anderen (Siebenga et al., 2007). Bisher ist die einzige Behandlungsmethode bei einer NoV-Infektion die Gabe von Wasser und Elektrolyten. Zurzeit existiert auch kein reproduzierbares Zellkultur- oder Tiermodell-System, was die Entwicklung von Medikamenten und Vakzinen erschwert. Die hohe genetische Drift von NoV ist eine weitere Limitierung bei Entwicklung von Medikamenten (Duizer et al., 2004; Lay et al., 2010). Eine Möglichkeit diese Limitationen zu umgehen, ist die Entwicklung von sogenannten *Entry*-Inhibitoren. Sie sollen den initialen Kontakt zwischen NoV und der Wirtszelle verhindern (Fiege, 2012). In vielen Studien konnte gezeigt werden, dass dieser initiale Kontakt durch die Bindung von Kapsidproteinen des humanen NoV an die HBGAs erfolgt (siehe 1.2) (Cao et al., 2007; Huang et al., 2005; Hutson et al., 2002; Hutson et al., 2003). Die Analyse dieser Bindung stellt daher ein ideales Target für die weitere Charakterisierung der humanen NoV und der Entwicklung von Inhibitoren zur Verhinderung von Ausbrüchen dar.

1.6.1 Klassifikation und genomische Organisation

Das humane NoV Genom hat eine Größe von ~ 7,5 kb mit drei offenen Leserastern (ORF, open reading frame), welche für Struktur (ORF2 und ORF3) und nicht-Struktur Proteine (ORF1) kodieren (Xi et al., 1990). ORF1 wird in ein großes Polyprotein translatiert, welches durch eine virale Protease in sechs Replikase-Protein gespalten wird. VP2, ein kleineres Strukturprotein, wird aus ORF3 translatiert. ORF2 kodiert für das 60 kDa große Kapsidprotein VP1. Dieses teilt sich wiederum in die N-terminale *Shell*-Domäne (S) und die *Protruding*-Domäne (P) auf (A). Die P2-Domäne enthält Antigen-Bindungsstellen und *attachment* Faktoren. Diese binden auch HBGAs, welche u.a. auf den Epithelien des Gastrointestinaltraktes zu finden sind (Hutson et al., 2003). Anhand ihrer VP1-Sequenz werden Noroviren in fünf Genogruppen unterteilt (GI-V), von denen Viren aus GI, GII und GIV Infektionen im Menschen hervorrufen können. Bei GIII bzw. GV handelt es sich um bovine bzw. murine NoV. Viren der Genogruppe II infizieren neben Menschen auch Schweine (Scipioni et al., 2008; Zheng et al., 2006). Die Genogruppen werden weiter in Gencluster unterteilt. Die Sequenzvariation innerhalb der Gencluster einer Gruppe liegt bei 20-40% und zwischen Gruppen bei 40-60% (Bok et al., 2009; Zheng et al., 2006).

Die meisten bisherigen humanen NoV-Ausbrüche wurden durch Viren der Gruppe GII.4 ausgelöst (Noel et al., 1999). Trotz der großen Sequenz-Diversität sind die Aminosäuren, welche direkt an der HBGA-Bindung in GII.4 Stämmen beteiligt sind, seit den letzten 30 Jahren konserviert (Bok et al., 2009). Es wird davon ausgegangen, dass die Bindung an HGBAs essentiell für eine erfolgreiche Virusinfektion ist und es daher zu einem Selektionsdruck kommt. Mutationen in Aminosäuren rund um die Bindungsstelle sind jedoch häufig und können die Bindungsspezifität beeinflussen (Lindesmith et al., 2008).

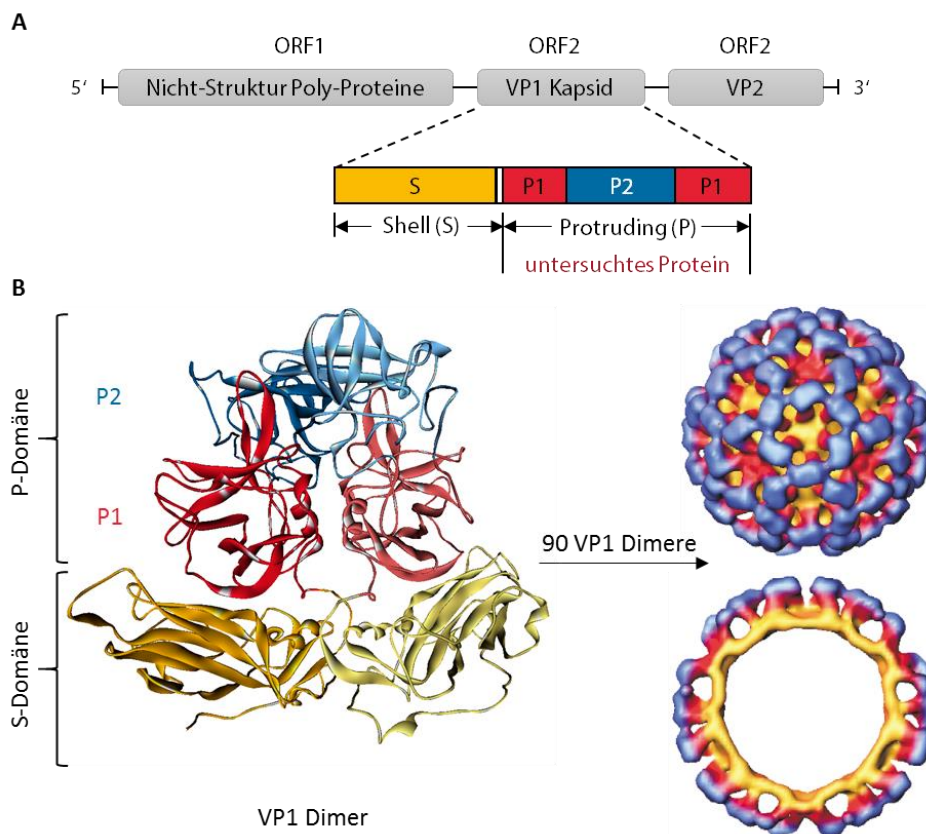


Abbildung 1.10: Genomischer Aufbau und Kapsidstruktur von humanen Noroviren. (A) Schematischer Aufbau des NoV Genoms. ORF1 kodiert für nicht-Struktur Proteine, ORF2 und ORF3 für die Strukturproteine VP1 und VP2. VP1 wird weiter in die *Shell* (S)- und *Protruding* (P)-Domäne unterteilt, welche durch eine Schleife voneinander getrennt sind. (B) Kristallstruktur des Kapsidproteins VP1 von GI.1 Norwalk Virus. VP1 bildet Dimere (intensive und schwache Farbgebung für das jeweilige Monomer). 90 Dimere bilden das Virus-Kapsid. Mit gelb: Shell-Domäne, rot: P1-Domäne, blau: P2-Domäne. Kapsidstruktur übernommen von (Hutson et al., 2004). (PDB 1ihm)

1.6.2 Strukturelle Eigenschaften und Ligandenbindung an das Kapsid

Die Charakterisierung der *attachment* Faktoren für Viren wird normalerweise durch Zell- oder Gewebekulturen und Tiermodellen erreicht. Solche Systeme sind für humane Noroviren bisher jedoch nicht verfügbar bzw. bisher nicht reproduzierbar (Duizer et al., 2004; Jones et al., 2014; Lay et al., 2010). Durch die Entwicklung eines rekombinanten *in vitro* Expressionssystems können die Kapsidproteine in ausreichenden Mengen hergestellt werden und so die Bindung an HBGAs weiter charakterisiert werden. Das gesamte VP1 kann in Baculoviren rekombinant in einem Insektenzellkultursystem hergestellt werden (Hale et al., 1999; Jiang et al., 1992). Die VP1-Proteine lagern sich

spontan zu sogenannten *Virus-like-Particles* (VLP) zusammen. Diese sind morphologisch identisch und besitzen die gleichen Antigene wie die NoV Virionen. VLPs können für Virus-Liganden-Interaktionen, Immunantwort- und Vakzin-Studien verwendet werden. Kristallstrukturen von VLPs zeigen, dass 180 VP1 Kopien, welche in Form von 90 Homodimeren vorliegen, das Kapsid mit einer $T = 3$ icosaedrischen Symmetrie bilden (Prasad et al., 1994). Die Monomere sind in die N-terminale S- und die C-terminale P-Domäne unterteilt, welche durch einen flexiblen Linker miteinander verbunden sind. Die P-Domäne ist wiederum in zwei Unterdomänen P1 und P2 unterteilt. P1 bildet die Stammregion zwischen der S- und P2-Domäne. P2 ist am weitesten exponiert und enthält die Kohlenhydrat-Bindungsstellen (Abbildung 1.10 B). Die P2 Sequenz ist genetisch sehr variabel (Prasad et al., 1999). Verkürzte P-Domänen können auch in *E. coli* rekombinant synthetisiert werden. Je nach Konstrukt werden entweder P-Dimere (Tan et al., 2004a) oder P-Partikel – 12 zusammengelagerte P-Dimere – (Tan and Jiang, 2005) gebildet. P-Dimere und P-Partikel zeigen eine ähnliche Antigenität und ein ähnliches HBGA Bindungsverhalten wie VLPs (Tan and Jiang, 2005; Tan et al., 2004b). Es wurden jedoch unterschiedliche Bindungsaffinitäten und unterschiedliches Verhalten bezüglich der Immunogenität festgestellt (Tamminen et al., 2012).

Die Bindungsstellen der HBGAs an P-Dimere konnte mittels Kristallographie gezeigt werden (Cao et al., 2007; Choi et al., 2008; Hansman et al., 2011; Mallagaray et al., 2015). Die erste Struktur von 2007 zeigt den Erregerstamm GII.4 VA387 mit A- bzw. B-Trisaccharid. Die Bindung erfolgt in der äußersten Region der P2-Domäne, nahe der Dimerisierungsstelle. A- und B-Trisaccharide zeigen ein ähnliches Bindungsmotiv, wobei die Fucose-Untereinheit durch Wasserstoffbrückenbindungen hauptsächlich mit dem P-Dimer interagiert (Cao et al., 2007). Stämme der Gruppe GII.4 zeigen ähnliche Bindungstaschen mit einigen konservierten Aminosäuren (Hansman et al., 2011). Die HBGA-Bindung an Stämme der Genogruppe GI.1 und GII.4 erfolgt jedoch an unterschiedlichen Bindungsstellen (Cao et al., 2007; Choi et al., 2008). Jedes Monomer bindet einen Liganden, welcher mit beiden Dimeren interagiert. Es wurde davon ausgegangen, dass die Bindungsstellen äquivalent und unabhängig voneinander sind. Neuste Studien zeigen jedoch, dass P-Dimere der Genogruppe GII.4 nicht nur zwei, sondern vier Fucose-Bindungsstellen besitzen (Abbildung 1.11) (Koromyslova et al., 2015; Mallagaray et al., 2015). NMR-Studien zeigen auch, dass es sich bei der Ligandenbindung um einen kooperativen, mehrstufigen Prozess handelt (Mallagaray et al., 2015). Diese Virus-HBGA-Interaktion stellt wahrscheinlich einen Selektions- oder Kontrollmechanismus bei der Virusaufnahme in die Zelle dar. Eine genaue

Untersuchung dieses schrittweisen Bindungsprozesses und der daraus resultierenden Dynamik im Virusprotein ist von enormer Wichtigkeit für das Verständnis der Infektiosität von humanen Noroviren. Auch für die Entwicklung von *Entry*-Inhibitoren sind diese Informationen essentiell.

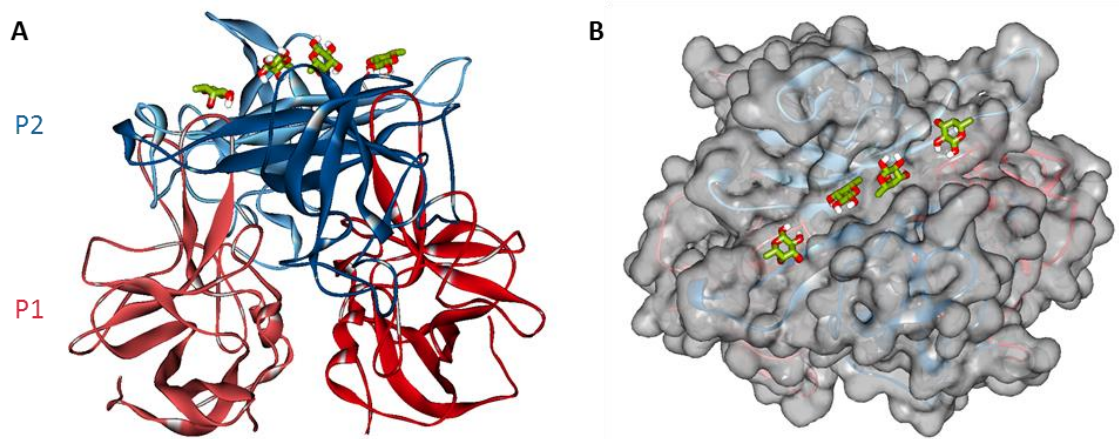


Abbildung 1.11: P-Dimer Kristallstruktur von GI.10 mit vier gebundenen Fucose-Molekülen in (A) Seitenansicht und (B) Draufsicht. Mit rot: P1-Domäne, blau: P2-Domäne (intensive und schwache Farbgebung für das jeweilige Monomer), grau: Proteinoberfläche und Fucose in Stab-Darstellung. (PDB 4Z4R)

2 Zielsetzung

In dieser Arbeit sollen die humane Blutgruppen-Glycosyltransferase GTA sowie die P-Dimere des humanen Norovirus näher charakterisiert werden. Dabei stehen vor allem die Untersuchung von Protein-Ligand-Interaktionen und die Bestimmung der Proteindynamik im Vordergrund. Beide Proteine erkennen und binden HBGAs. Während GTA für den letzten Schritt in der Biosynthese des A-Antigens verantwortlich ist, binden P-Dimere an HBGAs, was eine Infektion mit humanen Noroviren zur Folge hat. Beide Dimere haben eine Größe von etwa 70 kDa.

Der genaue Mechanismus konfigurationserhaltender Glycosyltransferasen ist nach wie vor umstritten. Um diesen näher zu charakterisieren, wurden in den Arbeiten von Nora Sindhuwinata (Sindhuwinata, 2012) und Lena Lisbeth Grimm (Grimm, 2015) bereits die Bindungsaffinitäten verschiedener Substrate und Substratanaloga bestimmt. Außerdem wurde Experimente zur Zuordnung des Proteinrückgrates der GTB durchgeführt. Es wurden auch NMR-spektroskopische Analysen bezüglich der Seitenkettendynamik von Isoleucinen der GTB durchgeführt.

In dieser Arbeit sollen nun speziell strukturelle Änderungen sowie die Proteindynamik der GTA bei Ligandenbindung untersucht werden. Weiterhin soll ein Vergleich mit den bereits ermittelten Daten der GTB erfolgen. Im ersten Teil der Arbeit wird das Proteinrückgrat der GTA betrachtet. Wie bei GTB soll auch hier eine partielle Signalzuordnung mit Hilfe von Tripelresonanzexperimenten erfolgen. Außerdem soll der Einfluss der UDP-Bindung auf die chemische Verschiebung der Proteinrückgrat-Signale und auf die Dynamik im Picosekunden- bis Nanosekundenbereich analysiert werden.

Bei einer Proteingröße von 70 kDa sind in den $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren häufig erhebliche Signalüberlagerungen zu beobachten. Des Weiteren führen verschiedene Relaxationsprozesse zu breiten bzw. nicht detektierbaren Signalen. Um diese Probleme zu umgehen, sollen zusätzlich zu den Untersuchungen am Proteinrückgrat auch Methylgruppen verschiedener Aminosäuren selektiv markiert werden. Dies hat eine Vereinfachung der Spektren zur Folge, da weniger Signale markiert werden. Gleichzeitig steigt die Signalintensität, da hier drei Protonen detektiert werden, im Vergleich zu nur einem Proton bei Amidn. Die Markierung von Isoleucinen und Methioninen ist für GTA und GTB besonders interessant, da sie über das gesamte

Protein verteilt sind (Abbildung 2.1). Durch die Analyse einzelner Aminosäuren können so Einblicke in verschiedene Bereiche im Protein erhalten werden.

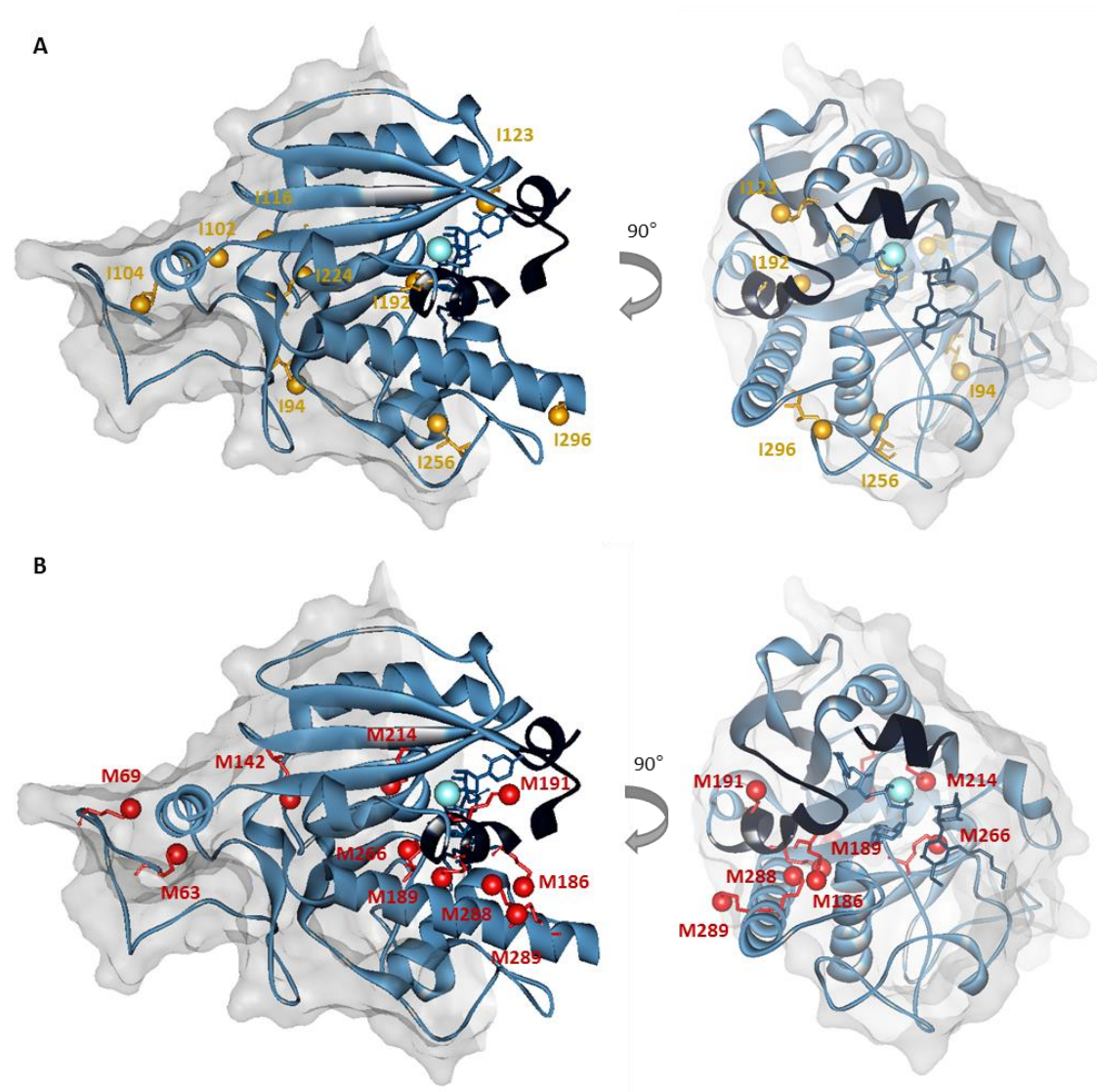


Abbildung 2.1: Kristallstruktur der Chimären ABB. Dargestellt ist ein Monomer mit gebundener UDP-Gal (dunkelblau), 3-Desoxy-H-Disaccharid (dunkelblau) und Mn^{2+} (hellblau). (A) Isoleucine sind gelb und (B) Methionine rot hervorgehoben. Die Methylgruppen sind jeweils als Kugel dargestellt. (PDB 2RJ7)

GTA weist insgesamt 10 Isoleucine auf, von denen eins am Rand der internen Schleife (Ile 192) und eins im aktiven Zentrum (Ile 123) zu finden ist. Eine der vier charakteristischen Aminosäuren, die GTA und GTB unterscheiden, ist ein Methionin an Position 266. Um dieses genauer zu analysieren soll für GTB eine Markierung der ϵ -Methylgruppe stattfinden. GTB besitzt insgesamt 11 Methionine von denen drei in der

internen Schleife (M186, M189 und M191), zwei im aktiven Zentrum (M214 und M266) und zwei in der näheren Umgebung des aktiven Zentrums (M288 und M289) liegen. Alle anderen Isoleucine und Methionine haben eine größere Entfernung zum aktiven Zentrum.

Durch die selektive Markierung der δ 1-Methylgruppe von Isoleucinen der GTA und der ϵ -Methylgruppe von Methioninen der GTB sollen Aussagen über strukturelle Änderungen der Methylgruppen bei der Zugabe von UDP und HDIs getroffen werden. Dabei soll nicht nur der Einfluss auf das aktive Zentrum, sondern auch auf weiter entfernte Aminosäuren untersucht werden. Dafür ist jedoch eine partielle Zuordnung der Signale notwendig, die mit Hilfe von Punktmutanten erreicht werden soll. Außerdem soll mit Hilfe von CPMG-RD-Messungen die Dynamik im μ s-ms-Bereich untersucht werden und inwiefern die Ligandenbindung einen Einfluss auf diese Dynamik hat. Die gefundenen Ergebnisse sollen mit den Daten der Isoleucinmethylgruppenmarkierten GTB (Grimm, 2015) verglichen werden.

Die Methode der Methylgruppenmarkierung soll auch zur Charakterisierung der Bindungsstasche und zur Analyse der Orientierung von Liganden genutzt werden. Dafür soll das Prinzip des inversen Sättigungstransfers auf ^1H , ^{13}C -markierte Proben angewendet werden. Bei ^1H , ^{15}N -markierten Proteinen konnte bereits ein selektiver Sättigungstransfer vom Liganden auf das Protein nachgewiesen werden (Sakakura et al., 2008). Diese Methode soll am Beispiel einer Isoleucin-, Leucin- und Valinmethylgruppenmarkierten GTA-Probe mit dem Substratanalogon UDP-Gal etabliert werden.

Zusätzlich zu den Ligandenbindungs- und Dynamik-Studien der Glycosyltransferasen soll auch anhand von P-Dimeren die Kohlenhydratbindung von humanen Noroviren untersucht werden. Bei P-Dimeren handelt es sich um eine Untereinheit des VP1-Kapsid, welches den initialen Kontakt zwischen Virus und Wirt herstellt. Das minimale Bindungsmotiv bei humanen Noroviren bildet die Fucose. Aufgrund der Dimergröße von 70 kDa soll auch hier mit einer Isoleucin- und Valinmethylgruppenmarkierten Probe gearbeitet werden. Durch ihre Verteilung über das gesamte Protein, kann so ein Einblick in verschiedene Proteinregionen gewonnen werden (Abbildung 2.2). Es sollen erstmals Dynamikstudien durchgeführt werden, um den Bindungsprozess zu charakterisieren. Dies soll mit Hilfe von CPMG-RD-Experimenten erfolgen. Die Experimente werden bei verschiedenen Fucosekonzentrationen durchgeführt, um den Einfluss der Ligandenbesetzung auf die Dynamik zu untersuchen. Für diese und zukünftige Experimente ist jedoch eine

Zuordnung erforderlich. Daher soll außerdem die Zuordnung der Isoleucin- δ 1-Methylgruppen mit Hilfe von paramagnetischen Liganden getestet werden. Als Ligand soll dafür eine Fucose mit chelatierendem Element und gebundenem Gadolinium dienen (Abbildung 3.2 und (Mallagaray et al., 2016)). Gadolinium führt abstandsabhängig zu einer Relaxationsverstärkung und damit zur Linienverbreiterung von räumlich nahen Signalen. Die Zuordnung soll anschließend durch Punktmutationen überprüft werden. Die Nutzung von paramagnetischen Liganden für die Signalzuordnung ist vor allem für große Proteine interessant, da sie eine Ergänzung zu Tripelresonanzexperimenten darstellen.

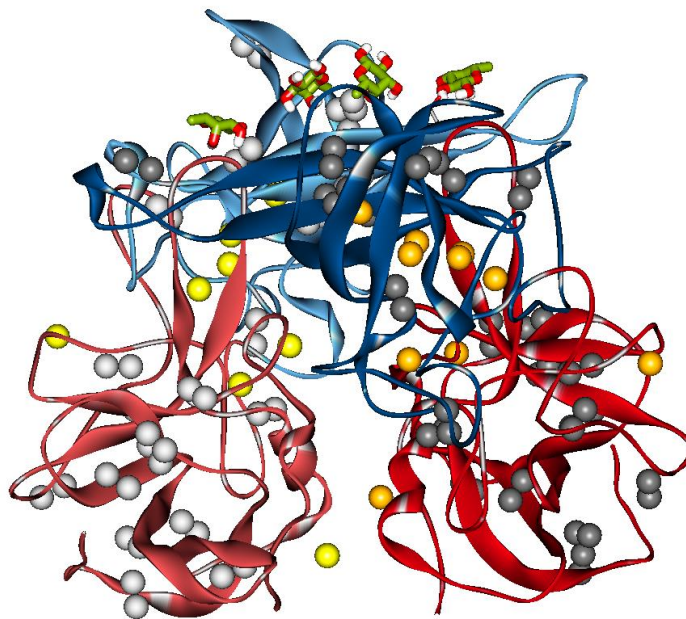


Abbildung 2.2: P-Dimer Kristallstruktur von GII.10 mit vier gebundenen Fucose-Molekülen. Mit rot: P1-Domäne, blau: P2-Domäne, gelb: Ile-Methylgruppen, grau: Val-Methylgruppen (intensive und schwache Farbgebung für das jeweilige Monomer) und grün: Fucose in Stab-Darstellung. (PDB 4Z4R)

3 Methoden

Alle Arbeiten wurden, wenn nicht anders angegeben mit Reinstwasser durchgeführt, welches im Folgenden als H₂O abgekürzt wird. Für Bakterienkulturen verwendete Nährmedien, Lösungen und Plastik-Reaktionsgefäße wurden vor der Benutzung bei 121°C für 20 min und verwendete Glasgeräte bei 134°C für 5 min sterilisiert. Temperaturempfindliche Substanzen wurden mit einem 0,22 µm Filter steril filtriert. Zusätzlich wurden die Arbeiten mit Bakterienkulturen an einer Bunsenbrennerflamme durchgeführt. Flüssige Abfälle der biologischen Sicherheitsstufe 1 wurden für 20 min bei 121°C und feste S1 Abfälle für 15 min bei 134°C inaktiviert.

3.1 Einbringen von Punktmutationen

Um einzelne NMR-Signale von GTA, GTB und von P-Dimeren eindeutig zuzuordnen, wurde die gerichtete Mutagenese verwendet. Das Einbringen der Punktmutationen in das Genom erfolgt mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Für GTA bzw. GTB wurde das Plasmid pCWΔlac-10GTA bzw. -10GTB verwendet und für P-Dimere pMalc2X.

Plasmidpräparation

Um die Plasmid-DNA aus transformierten *E. coli* Zellen zu isolieren, wurden 15 mL LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin versetzt und mit der entsprechenden Glycerinkultur inokuliert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C und 200 rpm. Die Bakterienkultur wurde für 10 min bei 3000xg zentrifugiert. Die Aufarbeitung des Bakterienpellets erfolgte mit dem QIAprep® Spin Miniprep Kit von QIAGEN. Abweichend davon wurde die Plasmidelution mit 30 µL autoklaviertem Wasser durchgeführt. Die spektroskopische Konzentrationsbestimmung fand bei 260 nm statt. Sie beruht auf der Annahme, dass 50 µg/µL doppelsträngige DNA eine OD₂₆₀ von 1 hat.

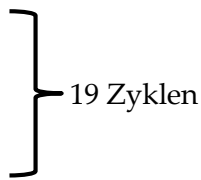
Mutagene PCR

Die Mutagenese erfolgte nach dem Protokoll des QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kits von Agilent Technologies. Die verwendeten Primer wurden bei Eurofins Genomics bestellt und sind im Anhang (Tabelle 7.4) zu finden. Ein 50 µL PCR-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

50 ng Plasmid
125 ng Primer 1 (forward)
125 ng Primer 2 (reverse)
0,2 mM dNTP
5 μ L 10x Pfu-Polymerase-Puffer
1 μ L Pfu Turbo DNA Polymerase (2,5 U/ μ L)

Die PCR fand unter folgenden Bedingungen statt:

120 s bei 95°C
40 s bei 95°C
60 s bei 55°C
6 bzw. 9 min bei 65-68°C bei -10GTA/GTB bzw. P-Dimer
6 bzw. 9 min bei 65-68°C bei -10GTA/GTB bzw. P-Dimer
bis zur Entnahme bei 4°C



Die Ansätze wurden anschließend für 1 h mit *Dpn I* bei 37°C behandelt und danach bei -20°C gelagert. Die Hybridisierungstemperatur wurde an die jeweiligen Schmelztemperaturen der Primer angepasst.

Herstellung von LB-Agarplatten mit Ampicillin

Für 500 mL LB-Agar wurden 5 g Trypton, 2,5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl und 7,5 g Agar mit H₂O aufgefüllt und autoklaviert. Nach dem Abkühlen des Mediums auf etwa 50°C wurde 100 μ g/ml Ampicillin hinzugefügt und die Platten unter der Sterilbank gegossen. Die LB-Agarplatten wurden bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

Herstellung von elektrokompetenten Zellen

Die Transformation der *E. coli* Zellen mit dem Plasmid erfolgte mittels Elektroporation. Hierfür wurden elektrokompetente *E. coli* DH5 α , BL21 und BL21 (DE3) Zellen benötigt. Je 5 mL SOB-Medium (ohne MgCl₂) (Tabelle 3.1) wurden mit dem jeweiligen Bakterienstamm inokuliert und über Nacht bei 37°C und 200 rpm inkubiert. 250 mL SOB-Medium (mit MgCl₂) wurden mit der Über-Nacht-Kultur angeimpft und bei 37°C und 200 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6-0,8 wachsen gelassen. Alle folgenden Schritte erfolgten auf Eis, um die Stoffwechselaktivität der Bakterien herabzusetzen. Die Zellen wurden 10 min bei 2600xg und 4°C in sterilen 50 mL-Röhrchen zentrifugiert, der Überstand verworfen und in 250 mL kaltem 10%igen Glycerin resuspendiert, um die Ionenstärke herabzusetzen. Nach erneuter Zentrifugation für 10 min bei 2600xg und 4°C, wurde dieser Vorgang mit 100 mL 10%igem Glycerin wiederholt. Anschließend wurden

die Pellets vereinigt (Volumen ca. 1,5 mL), je 100 µL in sterile 1,5 mL-Reaktionsgefäße aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die kompetenten Zellen wurden bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

Tabelle 3.1: Verwendete Vollmedien

Medium	f.c.	Substanz
Super Optimal Broth (SOB)-Medium, pH 7	20 g/L	Trypton
	5 g/L	Hefeextrakt
	0,5 g/L	NaCl
	2,5 mM	KCl
	Sterile Zugabe direkt vor Verwendung:	
	10 mM	MgCl ₂
SOB mit Katabolit-Inhibierung (SOC)-Medium	100%	SOB-Medium
	20 mM	Glucose
Lysogeny Broth (LB)-Medium	10 g/L	Trypton
	5 g/L	Hefeextrakt
	10 g/L	NaCl
Terrific Broth (TB)-Medium	13,2 g/L	Trypton
	26,4 g/L	Hefeextrakt
	4,4 mL	Glycerin
	6 g/L	Na ₂ HPO ₄
	3 g/L	KH ₂ PO ₄
	1 g/L	NH ₄ Cl
	0,5 g/L	NaCl
	Sterile Zugabe direkt vor Verwendung:	
	1 mM	MgCl ₂
1 mM	CaCl ₂	
5 mg/mL	Thiamin	
0,2%	Glucose	
0,4%	Casaminosäuren	
100 µg/mL	Ampicillin	

Bakterientransformation mittels Elektroporation

Die Elektroporation ist im Vergleich zur Transformation mittels Hitzeschock effektiver und vor allem für Plasmide >5000 bp gut geeignet. In einem ersten Schritt erfolgt die Transformation von DH5 α Zellen mit dem durch die PCR erhaltenen Produkt. Wenn die Klone das korrekte Plasmid trugen, wurden BL21-Zellen (bei -10GTA und -10GTB) bzw. BL21 (DE3) (beim P-Dimeren) mit diesen Plasmiden transformiert.

Für die Elektroporation wurden 3 oder 6 μ L des PCR-Produkts bzw. 0,5 μ L einer gereinigten 5 ng/ μ L Plasmidlösung zu den aufgetauten elektrokompenten Zellen gegeben und in eine gekühlte Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 400 Ω , 25 μ F und 1,75 kV. Anschließend wurden die Zellen mit 1 mL SOC-Medium (Tabelle 3.1) aus der Küvette in ein steriles 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt und für 1 h bei 37°C schüttelnd inkubiert. Nach einer 30 s Abtrennung bei 12000xg wurden die Zellen in 200 μ L LB-Medium mit 100 μ g/ml Ampicillin resuspendiert. Je 50 bzw. 100 μ L dieser Suspension wurden auf LB-Agarplatten mit Ampicillin ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Anlegen von Glycerinkulturen

Um Klone über einen längeren Zeitraum verwenden zu können, werden Glycerinkulturen angelegt und bei -80°C gelagert. Dabei ist es wichtig, dass diese nicht auftauen, da es beim Auftauen zum Verlust des Plasmids kommen kann.

Zum Anlegen einer Glycerinkultur wurden 1-3 isolierte Klone einer LB-Agarplatte gepickt und in 5-10 mL LB-Medium mit 100 μ g/mL Ampicillin bei 37°C und 200 rpm bis zur Trübung des Mediums inkubiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension mit f.c. 15% Glycerin versetzt und in Cryoröhrchen in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Die Klone erhielten für die institutseigene Dokumentation folgende Nummerierung:

-10 GTA	#171 – V184I	#172 – V212A	#173 – V351I
-10 GTB	#117 – M189A	#118 – M191A	#135 – M189V
	#136 – M186A	#177 – M288A	#178 – M142A
P-Dimere	#174 – I231V	#175 – I330V	#176 – I509V

Sequenzierung

Um sicherzustellen, dass es sich bei den verwendeten Klonen um die gewünschte Mutante handelt, wurde das mittels Plasmidpräparation isolierte Plasmid bei der Firma

Eurofins Genomics bzw. LGC Genomics sequenziert. Die verwendeten Primer sind im Anhang (Tabelle 7.4) zu finden. Die Auswertung erfolgte mittels GENTle 1.9.4.

3.2 Präparation rekombinanter GTA und GTB

In dieser Arbeit wurden die Enzyme GTA und GTB rekombinant hergestellt. Des Weiteren wurden diverse Mutanten der GTA (V184I, V212A, V351I), sowie GTB (M186A, M189A/V, M191A, M142A, M288A) für Zuordnungsexperimente synthetisiert.

3.2.1 Plasmid und Bakterienstamm

Für die Synthese der katalytischen Domäne von GTA und GTB wurde das Plasmid pCWΔlac verwendet. Das Plasmid trägt u.a. ein Gen mit Ampicillinresistenz und einen *lac*-Promotor für die Induktion mit IPTG. Das codonoptimierte Gen der -10GTA und -10GTB wurde von Marcus et al. in das Plasmid kloniert (Marcus et al., 2003) und ist durch die Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *HindIII* flankiert. Das Gen kodiert für die Aminosäuren 63-354 der natürlich vorkommenden GTA bzw. GTB. Auf die cytosolische Domäne, die Membrandomäne und 10 Aminosäuren der Stammregion wurde dabei verzichtet, um das Enzym in löslicher Form zu synthetisieren und die Stabilität und Aktivität zu verbessern. Aufgrund der Klonierung weist das Protein N-terminal noch die Aminosäuren M-A-I-G-E-F auf. Auf dem jeweiligen Plasmid der -10GTA bzw. -10GTB beruhen die eingebrachten Punktmutationen (siehe 3.1). Als Expressionsstamm wurde *E. coli* BL21 von Novagen verwendet. In dieser Arbeit wurde nur mit den -10 Varianten der Enzyme gearbeitet, weshalb sie im Folgenden vereinfacht als GTA und GTB bezeichnet werden.

3.2.2 Proteinbiosynthese

Für Struktur- und Dynamikmessungen waren unterschiedliche Isotopenmarkierungen erforderlich. GTA wurde [U-²H, ¹⁵N]; [U-²H, {Arg-¹⁵N}]; [U-²H, {Met-¹⁵N}]; [U-²H, ¹³C, ¹⁵N]; [U-²H, {Ileδ1-¹³CH₃}] und [U-²H, {Ileδ1-¹³CH₃}, {Leuδ1/2-¹³CH₃}, {Valγ1/2-¹³CH₃}] hergestellt. GTB wurde mit einer [U-²H, {Metβ,γ-¹²CH₂}, {Metε1-¹³CH₃}]-Markierung hergestellt. Im Folgenden werden die Seitenkettenmarkierungen als Ile-GTA, ILV-GTA und Met-GTB bezeichnet. Einige Mutanten (Met-M189V-GTB, Met-M142A-GTB, V-V184I-GTA, V-V212A-GTA) wurden in H₂O synthetisiert, aufgrund von zu geringen Ausbeuten und da für einige NMR-Experimente eine Deuterierung nicht

erforderlich war. Die isotoopenmarkierte Proteinbiosynthese erfolgte nach dem Protokoll von Tugarinov et al. (Tugarinov et al., 2006). Für die STD-NMR Experimente war weiterhin die Herstellung von unmarkierter GTA erforderlich.

Kulturmedien

Um einen möglichst hohen Deuterierungsgrad zu erreichen, wurden die Salze und Puffer vor Verwendung in D₂O (99,85%) gelöst und 1-2x lyophilisiert. Danach wurden die Substanzen in D₂O aufgenommen und bei -20°C gelagert. Die verwendeten Puffer wurden erst in H₂O gelöst, der pH auf 6,7 bei 25°C eingestellt, anschließend lyophilisiert und 1-2x in D₂O gelöst und erneut lyophilisiert. Die Vitaminlösung in D₂O wurde selbst angesetzt (Tabelle 3.2). Für die Proteinbiosynthese in H₂O wurden alle Lösungen in Wasser angesetzt und die Minimalmedien entsprechend angepasst (siehe Tabelle 3.4).

Für die selektive Markierung der δ 1-Methylgruppe von Isoleucin wurde 2-Keto-3-d₂-4-¹³C-butyrat verwendet. Dies wurde aus 2-Keto-4-¹³C-butyrat hergestellt, wobei die Protonen an Position 3 durch Deuteronen ausgetauscht wurden. Hierfür wurden 60 mg 2-Keto-4-¹³C-butyrat in 200 mL D₂O mit 0,57 g KH₂PO₄ gelöst und der pH Wert mit NaOD auf 10,5 eingestellt. Die Lösung wurde über Nacht bei 45°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Deuterierung mit einem ¹H-NMR-Spektrum überprüft. Es wurden 1,2 g Na₂HPO₄ × 2H₂O zugegeben und der pH auf 7,4 eingestellt. Bis zur Verwendung wurde die Substanz bei -20°C gelagert.

2-Keto-3-methyl-d₃-3-d₁-4-¹³C-butyrat ist der Vorläufer für die spezifische ¹³C-Markierung der Methylgruppen Leu δ 1/2 und Val γ 1/2. Es wird je eine der beiden Methylgruppen isotoopenmarkiert. Da die beiden Methylgruppen in der Nähe eines Chiralitätszentrums liegen, sind sie magnetisch nicht äquivalent und geben beide je ein Signal im ¹H,¹³C-Methyl-TROSY-Spektrum. Durch die Zugabe von deuteriertem Leucin-d₁₀, kann die Leu δ 1/2-Markierung reduziert werden, sodass nur noch isotoopenmarkierte Val γ 1/2 Methylgruppen detektierbar sind.

Durch die Zugabe von L-Arginin (¹⁵N) oder L-Methionin (¹⁵N) wird nur die jeweilige Aminosäure ¹⁵N-markiert. L-Methionin (methyl-¹³C) wurde für die Isotoopenmarkierung des Methylgruppen-Kohlenstoffes ϵ von Methionin verwendet.

Die Minimalmedien wurden wie in Tabelle 3.3 und Tabelle 3.4 beschreiben angesetzt und mit einem 0,22 μ m Filter steril filtriert. Für die Proteinrückgrat-Markierung wurden 500 mL bzw. 1000 mL für die [²H,¹³C,¹⁵N]-GTA Probe und für die Seitenkettenmarkierung 100-500 mL Medium verwendet.

Tabelle 3.2: Zusammensetzung der Vitaminlösung in D₂O

Zusammensetzung	
Riboflavin (Vitamin B2)	0,01 g/L
D-Biotin (Vitamin B7 oder H)	0,1 g/L
Cholinchlorid	0,1 g/L
Folsäure (Vitamin B9, B11 oder M)	0,1 g/L
Nicotinamid (Vitamin B3)	0,1 g/L
D-Pantothensäure (Vitamin B5)	0,1 g/L
Pyridoxal x HCl (Vitamin B6)	0,1 g/L
Cobalamin (Vitamin B12)	0,1 g/L
myo-Inositol	0,2 g/L

Tabelle 3.3: Verwendete Minimalmedien für die GTA Proteinrückgrat-Markierung in D₂O.

Zusammensetzung	[U- ² H, ¹⁵ N]	[U- ² H, {Arg- ¹⁵ N}] bzw. [U- ² H, {Met- ¹⁵ N}]	[U- ² H, ¹³ C, ¹⁵ N]
Eco E. coli OD 2 D	–	20% v/v	–
Eco E. coli OD 2 DN	20% v/v	–	–
Eco E. coli OD 2 CDN	–	–	20% v/v
Na ₂ HPO ₄	6 g/L	6 g/L	6 g/L
KH ₂ PO ₄	3 g/L	3 g/L	3 g/L
NaCl	1 g/L	1 g/L	1 g/L
¹⁵ NH ₄ Cl	1 g/L	–	1 g/L
¹⁴ NH ₄ Cl	–	1 g/L	–
MgCl ₂	1 mM	1 mM	1 mM
CaCl ₂	0,1 mM	0,1 mM	0,1 mM
MgSO ₄	4 mM	4 mM	4 mM
[U- ² H]-Glucose	2 g/L	2 g/L	–
[U- ² H, ¹³ C]-Glucose	–	–	2 g/L
Thiamin	20 µg/mL	20 µg/mL	20 µg/mL
Vitaminlösung	1x	1x	1x
Ampicillin	100 µg/mL	100 µg/mL	100 µg/mL
Zugabe je nach Isotopenmarkierung und 1 h vor Induktion mit IPTG:			
L-Arginin (¹⁵ N)		400 mg/L	
L-Methionin (¹⁵ N)		250 mg/L	

Tabelle 3.4: Verwendete Minimalmedien für die jeweilige Methylgruppen-Markierung in D₂O bzw. H₂O der GTA bzw. GTB.

Zusammensetzung	Ile bzw. ILV-GTA (D ₂ O)	Met-GTB (D ₂ O)	Met-GTB (H ₂ O)	V-V184I- bzw. V212A- GTA (H ₂ O)	LV-V351I- GTA (D ₂ O)
Eco E. coli OD 2 D	20% v/v	20% v/v	–	–	20% v/v
Na ₂ HPO ₄	6 g/L	6 g/L	6 g/L	6 g/L	6 g/L
KH ₂ PO ₄	3 g/L	3 g/L	3 g/L	3 g/L	3 g/L
NaCl	1 g/L	1 g/L	1 g/L	1 g/L	1 g/L
¹⁴ NH ₄ Cl	1 g/L	1 g/L	1 g/L	1 g/L	1 g/L
MgCl ₂	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM
CaCl ₂	0,1 mM	0,1 mM	0,1 mM	0,1 mM	0,1 mM
MgSO ₄	4 mM	4 mM	4 mM	4 mM	4 mM
Glucose	–	–	2 g/L	2 g/L	–
[U- ² H]-Glucose	2 g/L	2 g/L	–	–	2 g/L
Glycerin	–	–	0,4%	0,4%	–
Thiamin	20 µg/mL	20 µg/mL	20 µg/mL	20 µg/mL	20 µg/mL
100x Vitamin- lösung (D ₂ O)	1x	1x	–	–	1x
BME 100x Vitamin- lösung (H ₂ O)	–	–	1x	1x	–
Ampicillin	100 µg/mL	100 µg/mL	100 µg/mL	100 µg/mL	100 µg/mL
Zugabe je nach Markierung und 1 h vor Induktion mit IPTG:					
2-Keto-3-d ₂ -4- ¹³ C- butyrat	60 mg/L	–	–	–	–
2-Keto-3-methyl- d ₃ -3-d ₁ -4- ¹³ C butyrat	120 mg/L	–	–	120 mg/L	120 mg/L
L-Methionin (methyl- ¹³ C)	–	200 mg/L	200 mg/L	–	–
Leucin-d ₁₀	–	–	–	40 mg/L	–

Unmarkierte Proteinbiosynthese

Die unmarkierte Proteinbiosynthese fand in einem speziell für GTA und GTB optimierten TB-Medium statt (Tabelle 3.1). 40 mL TB-Medium wurden mit der entsprechenden *E. coli* Glycerinkultur versetzt. Die Inkubation der Bakterienlösung fand durchgehend bei 30°C und 200 rpm statt. Am nächsten Tag wurde 1 L TB-Medium mit der Übernachtskultur auf eine OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft. Sobald die Bakteriensuspension eine OD₆₀₀ von 0,6-0,8 erreicht hatte, wurde die Proteinüberexpression mit 1 mM IPTG induziert. Nach ca. 20 h wurden die Zellen bei 4°C und 5000 rpm geerntet und das Pellet bei -20°C bis zur Verwendung gelagert.

Isotopenmarkierte Proteinbiosynthese

Die Proteinbiosynthese isotopenmarkierter Proteine erfolgte am Institut für Chemie nach dem Protokoll von Marley et al. (Marley et al., 2001). Um den Deuterierungsgrad zu erhöhen wurde ein weiteres Protokoll von Tugarinov (Tugarinov et al., 2006) in Zusammenarbeit mit L.L. Grimm getestet. Dies lieferte vergleichbare Ausbeuten bei einem deutlich verbesserten Deuterierungsgrad (Grimm, 2015). In dieser Arbeit fand daher die Proteinbiosynthese basierend auf dem Protokoll von Tugarinov (Tugarinov et al., 2006) statt. Die Proteinbiosynthese in H₂O erfolgte analog.

Für die Proteinbiosynthese wurden 40 mL TB-Medium (Tabelle 3.1) mit dem entsprechenden Klon inokuliert und über Nacht inkubiert. Alle Inkubationsschritte wurden bei 37°C und 200 rpm durchgeführt. Um 10 mL des verwendeten Minimalmediums (Tabelle 3,4) mit einer OD₆₀₀ von 0,1 anzuimpfen, wurde eine entsprechende Menge der Übernachtskultur bei 1200xg für 10 min bei RT zentrifugiert. Das Wachstum der Starterkultur erfolgte bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6. Anschließend wurde die Bakteriensuspension zentrifugiert und in 10% des finalen Minimalmedium-Volumens (bei einer 500 mL Kultur, also in 50 mL Minimalmedium) resuspendiert, sodass die OD₆₀₀ 0,1 betrug. Die Inkubation fand bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4-0,5 statt. Die Bakteriensuspension wurde auf 20% des finalen Volumens mit Minimalmedium verdünnt (hier 100 mL) und weiter inkubiert bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4-0,5. Die Kulturen für die Proteinrückgrat-Markierung wurden anschließend auf das finale Volumen verdünnt. Die Kulturen mit Ile-Seitenkettenmarkierung wurden auf 80% (400 mL) verdünnt und alle anderen auf ca. 95%. Nach der Inkubation bis zu einer OD₆₀₀ von 0,25 wurde der jeweilige Vorläufer zugegeben. Der Vorläufer für die Isoleucin-Markierung 2-Keto-3-d₂-4-¹³C-butytrat liegt, wie weiter oben beschrieben, bereits in Lösung vor, alle anderen Vorläufer wurden im restlichen Minimalmedium gelöst. Die Kulturen wurden

ca. 1 h bis zu OD₆₀₀ 0,3-0,4 inkubiert. Nach Induktion mit 1 mM IPTG und einer erneuten Zugabe von 250 µL Ampicillin wurden die Zellen weiter über Nacht inkubiert und nach maximal 20 h bei 5000xg, 4°C für 15 min geerntet. Die Lagerung bis zur Verwendung erfolgte bei -20°C.

3.2.3 Proteinreinigung

Die Proteinreinigung aus den Bakterienzellen wurde nach dem speziell für die GTA und GTB entwickelten Protokoll durchgeführt (Seto et al., 1997). Nach dem Zellaufschluss erfolgten eine Kationenaustauschchromatographie und anschließend eine UDP-Hexanolamin-Affinitätschromatographie. Die einzelnen Schritte wurden mit Hilfe des ÄKTA-Systems durchgeführt und fanden bei 4°C statt.

Reinigungspuffer

Die verwendeten Reinigungspuffer (Tabelle 3.5) wurden in H₂O angesetzt. Das Reduktionsmittel wurde erst kurz vor Gebrauch zugegeben. Die im ÄKTA-System verwendeten Puffer wurden vor Gebrauch mit einem 0,45 µM Filter filtriert und entgast.

Tabelle 3.5: Reinigungspuffer der GTA und GTB

Reinigungspuffer	f.c. Substanz
Resuspensionspuffer	50 mM MOPS, pH 6,7 1 mM EDTA 1 mM DTT 1 Proteaseinhibitortablette auf 50 mL
SP-Sepharose-Waschpuffer	50 mM MOPS, pH 6,7 1 mM DTT
SP-Sepharose-Elutionspuffer	50 mM MOPS, pH 6,7 500 mM NaCl 1 mM DTT
UDP-Hexanolamin-Waschpuffer	50 mM MOPS, pH 6,7 500 mM NaCl 1 mM DTT 5 mM MnCl ₂

UDP-Hexanolamin- Elutionspuffer	50 mM MOPS, pH 6,7 500 mM NaCl 8 mM UDP 1 mM DTT 5 mM MnCl ₂
Dialyse-Puffer I	25 mM Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ , pH 6,7 1 mM 2-Mercaptoethanol 5 mM MgCl ₂
Dialyse-Puffer II	50 mM MOPS, pH 6,7 25 mM NaCl 1 mM DTT 5 mM MnCl ₂

Zellaufschluss

Die Zellen wurden langsam aus Eis aufgetaut und im Resuspensionspuffer resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte zweimal bei einem Druck von 1200 psi mit Hilfe einer *French Press*. Anschließend wurde die Suspension bei 110.000xg und 4°C für 1 h ultrazentrifugiert. Der Überstand wurde mit einem 0,8 µm Filter filtriert und das Protein daraus gereinigt.

Kationenaustauschchromatographie

Der erste Schritt der Proteinreinigung erfolgte mittels des starken Kationenaustauschers SP-Sepharose. GTA und GTB besitzen einen theoretischen pI von 8,27 und sind unter den gegebenen Pufferbedingungen (pH 6,7 bei 25°C) positiv geladen. Sie binden somit an die negativ geladenen Sulfopropylgruppen der Sepharosematrix. Die Elution erfolgte durch Erhöhung der Ionenstärke.

Eine Säule wurde mit 70 mL SP-Sepharose gepackt und mit 1-2 Säulenvolumina erst in H₂O und dann in SP-Sepharose-Waschpuffer äquilibriert. Alle Schritte am ÄKTA-System fanden mit einer Flussrate von 1 mL/min statt. Wenn der Druck im ÄKTA-System 0,57 MPa überstieg, wurde die Flussrate auf 0,4 mL/min reduziert. Die Säule wird 3x mit dem Zellysat im Kreislauf beladen. Anschließend wurde die Säule mit SP-Sepharose-Waschpuffer bis zu einer konstanten Absorption bei 280 nm gespült. Die

gebundenen Proteine wurden durch den SP-Sepharose-Elutionspuffer eluiert. Das Eluat wurde in 10 mL Fraktionen gesammelt. Mit Hilfe des qualitativen Bradford-Tests (siehe 3.4.2) wurden die Fraktionen bestimmt, welche Protein enthielten. Diese Fraktionen wurden vereinigt, mit 5 mM MnCl_2 versetzt und mittels Affinitätschromatographie weiter gereinigt.

Nach jeder Benutzung wurde das Säulenmaterial regeneriert. Dafür wurde es nacheinander mit drei Säulenvolumina der folgenden Substanzen gewaschen: 8 M Harnstoff, H_2O , 2 M NaCl, H_2O , 1 M NaOH, H_2O , 30 % Isopropanol, H_2O , 30 % Ethanol. Die Lagerung des Säulenmaterials erfolgte in 30% Ethanol bei 4°C.

Affinitätschromatographie mit UDP-Hexanolamin-Sepharose

Im zweiten Schritt der Reinigung wurde die spezifische Bindung von GTA und GTB an UDP in Anwesenheit von Mn^{2+} ausgenutzt. Als Säulenmaterial dient UDP-Hexanolamin-Sepharose. Die Elution erfolgte mittels UDP im Laufpuffer.

Die Säule wurde mit 10-15 mL UDP-Hexanolamin-Sepharose gepackt und mit 5-6 Säulenvolumina UDP-Hexanolamin-Waschpuffer äquilibriert. Die Flussrate während des gesamten Laufes lag bei 0,4 ml/min bzw. bei 0,1 ml/min, wenn der Systemdruck einen Wert von 0,32 MPa überschritten hat. Nach dem Beladen der Säule mit den vereinigten Elutionsfraktionen aus der Kationenaustauschchromatographie, wurde die Säule mit UDP-Hexanolamin-Waschpuffer bis zu einer konstanten Absorption bei 280 nm gewaschen. Die Elution von GTA bzw. GTB erfolgte mit UDP-Hexanolamin-Elutionspuffer. Es wurden 4 mL-Fraktionen gesammelt. Die Fraktionen, welche Protein enthielten, wurden anhand eines qualitativen Bradford-Test (siehe 3.4.2) ermittelt und vereinigt.

Nach jeder Benutzung wurde das Säulenmaterial regeneriert. Dafür wurde es nacheinander mit je 10-20 Säulenvolumina in folgender Reihenfolge gewaschen: H_2O , 8 M Harnstoff, H_2O und 30 % Ethanol. Die Lagerung des Säulenmaterials erfolgte bei 4°C in 30 % Ethanol.

Dialyse

Die vereinigten Fraktionen wurden gegen Dialyse-Puffer I bzw. II dialysiert um überschüssiges UDP aus den Proteinlösungen zu entfernen und ggf. einen Pufferwechsel durchzuführen.

Der Dialyseschlauch bzw. eine Slide-a-Lyzer-Kassette mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa wurden im Dialyse-Puffer äquilibriert. Bei der Dialyse gegen Dialyse-Puffer I

(Tabelle 3.5) wurde die Proteinlösung vorher mit 10 mM EDTA versetzt, um Mn^{2+} -Ionen zu komplexieren. Die Dialyse erfolgte 2x für 24 h gegen 4 L des jeweiligen Puffers bei 4°C. Die Proteinproben wurden anschließend bei 4°C gelagert.

3.3 Präparation von P-Dimeren des humanen Norovirus GII.4 Saga

Neben den Glycosyltransferasen wurden in dieser Arbeit auch die P-Dimere des humanen Norovirus GII.4 Saga untersucht. P-Dimere sind maßgeblich an der Bindung des Virus an die Wirtszelle beteiligt. Die Proteindynamik im μ s-ms Bereich in Abhängigkeit von gebundener Fucose wurde anhand von RD Experimenten untersucht. Des Weiteren wurden Zuordnungsexperimente mittels paramagnetischer Substanzen durchgeführt.

Die P-Dimere wurden rekombinant [$U\text{-}^2H,^{15}N$, {Ile δ 1- $^{13}CH_3$ }, {Val γ 1/2- $^{13}CH_3$ }]-isotopenmarkiert hergestellt. Sie werden im Folgenden nur noch als IV-P-Dimere bezeichnet. Weiterhin wurden drei Mutanten (I231V, I330V und I509V) für Zuordnungsexperimente in H_2O mit {Ile δ 1- $^{13}CH_3$ }-Markierung synthetisiert.

3.3.1 Plasmid und Bakterienstamm

Das codonoptimierte Gen der P-Dimere (Aminosäuren 224-539 der P-Domäne des VP1-Kapsid, GenBank Nummer AB447457) wurde in das Plasmid pMalc2X kloniert. N-terminal befindet sich zusätzlich das Gen für das Maltose-Bindungsprotein (MBP) und eine Asparagin-reiche Region, um die Proteinlöslichkeit zu erhöhen, sowie zwei Poly-Histidin Bereiche (His-Tag), für eine effiziente Bindung an das NiNTA-Säulenmaterial. Anschließend folgt eine HRV-3C Spaltstelle, um dieses Konstrukt wieder abzutrennen, sodass am Ende nur die P-Dimere isoliert werden können. Das Plasmid trägt weiterhin ein Gen mit Ampicillinresistenz und einen *lac*-Promotor für die Induktion mit IPTG. *E. coli* BL21 (DE3) Zellen wurden mit dem Plasmid transformiert. Die Punktmutationen wurden ausgehend von diesem Plasmid eingebracht.

3.3.2 Isotopenmarkierte Proteinbiosynthese

Kulturmedien

Die Herstellung der deuterierten Lösungen und von 2-Keto-3-d₂-4-¹³C-butyrat wurde, wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben, durchgeführt. Die Minimalmedien wurden wie in Tabelle 3.6 beschrieben angesetzt und mit einem 0,22 µm Filter steril filtriert.

Tabelle 3.6: Verwendete Minimalmedien für die Methylgruppen-Markierung in D₂O bzw. H₂O bei P-Dimeren.

Zusammensetzung	IV-P-Dimere (D ₂ O)	I-I2231V, I330V, I509V-P-Dimere (H ₂ O)
Eco <i>E. coli</i> OD 2 DN	20% v/v	–
Na ₂ HPO ₄	6 g/L	6 g/L
KH ₂ PO ₄	3 g/L	3 g/L
NaCl	1 g/L	1 g/L
¹⁵ NH ₄ Cl	1 g/L	–
¹⁴ NH ₄ Cl	–	1 g/L
MgCl ₂	1 mM	1 mM
CaCl ₂	0,1 mM	0,1 mM
MgSO ₄	4 mM	4 mM
Glucose	–	2 g/L
[U- ² H]-Glucose	2 g/L	–
Glycerin	–	0,4%
Thiamin	20 µg/mL	20 µg/mL
100x Vitaminlösung (D ₂ O)	1x	–
BME 100x Vitaminlösung (H ₂ O)	–	1x
Ampicillin	100 µg/mL	100 µg/mL
Zugabe 1 h vor Induktion mit IPTG:		
2-Keto-3-d ₂ -4- ¹³ C-butyrat	60 mg/L	60 mg/L
2-Keto-3-methyl-d ₃ -3-d ₁ -4- ¹³ C-butyrat	120 mg/L	–
Leucin-d ₁₀	40 mg/L	–

Isotopenmarkierte Proteinbiosynthese

Die isotopenmarkierte Proteinbiosynthese der P-Dimere fand wie für GTA und GTB in Kapitel 3.2.2 beschrieben statt. Nach der Zugabe der jeweiligen Vorläufer für die

spezifische Methylgruppenmarkierung und dem Wachstum bis zu einer OD_{600} von 0,3-0,4 wurde die Bakteriensuspension jedoch für 15 min auf Eis abgekühlt. Anschließend erfolgte die Induktion mit 1 mM IPTG. Die weitere Inkubation fand bei 16°C und 200 rpm statt, bis die Zellen sich in der stationären Phase befanden, was nach ca. 72 h eintrat. Alle 24 h wurde erneut 100 µg/mL Ampicillin zugegeben. Nach der Ernte bei 5000 rpm und 4°C wurden die Zellen bis zur Reinigung bei -20°C gelagert.

3.3.3 Proteinreinigung

Die Reinigung der P-Dimere erfolgte in drei Schritten. Nach der Zellyse wurde eine NiNTA-Affinitätschromatographie durchgeführt. Der His-Tag und das MBP wurden anschließend durch die HRV-3C Protease von den P-Dimeren getrennt. Eine weitere NiNTA-Affinitätschromatographie wurde durchgeführt, wobei der Durchfluss aufgefangen wurde und mittels Größenausschlusschromatographie weiter gereinigt wurde. Die NiNTA-Affinitätschromatographie fand im Batchverfahren im Kühlraum statt. Für die Größenausschlusschromatographie wurde das ÄKTA-System verwendet.

Tabelle 3.7: Reinigungspuffer für P-Dimere

Reinigungspuffer	Konzentration	Substanz
PBS	8 g/L	NaCl
	0,2 g/L	KCl
	1,78 g/L	Na ₂ HPO ₄ × 12 H ₂ O
	0,24 g/L	KH ₂ PO ₄
		pH 7,4 mit NaOH eingestellt
10 mM-Imidazolpuffer	20 mM	TRIS, pH 7,4
	200 mM	NaCl
	10 mM	Imidazol
20 mM-Imidazolpuffer	20 mM	TRIS, pH 7,4
	200 mM	NaCl
	20 mM	Imidazol
50 mM-Imidazolpuffer	20 mM	TRIS, pH 7,4
	200 mM	NaCl
	50 mM	Imidazol

250 mM-Imidazolpuffer	20 mM TRIS, pH 7,4 200 mM NaCl 250 mM Imidazol
500 mM-Imidazolpuffer	20 mM TRIS, pH 7,4 200 mM NaCl 500 mM Imidazol
GF-Puffer	25 mM TRIS, pH 7,4 300 mM NaCl

Zellaufschluss

Das Zellpellet wurde nach dem Auftauen in 15 mL PBS gelöst und pro Gramm Bakterienpellet folgende Lösungen zugegeben: 4 μ L von 1 mg/mL Aprotinin, 4 μ L von 1 mg/mL Leupeptin, 25 μ L von 10 mg/mL Hühnereiweiß Lysozym und 0,1 μ L von 25 U/ μ L Benzonase. Die Bakteriensuspension wurde 30 min bei 4°C rollend inkubiert und anschließend mittels *French Press* bei 1200 psi aufgeschlossen. Die Suspension wurde für 1 h und 4°C und 125.000xg ultrazentrifugiert.

NiNTA-Affinitätschromatographie

Circa 4 mL des NiNTA Säulenmaterials wurden in PBS äquilibriert und anschließend für 1 h mit dem proteinhaltigen Überstand nach der Ultrazentrifugation bei 4°C rollend inkubiert. Die Suspension wurde in eine 40 mL-Qiagen-Säule überführt, der Durchfluss aufgefangen und mit einem Säulenvolumen 10 mM-, 20 mM- und 50 mM-Imidazolpuffer gewaschen. Die Elution des P-Dimer Konstruktes fand mit 20 mL 250 mM-Imidazolpuffer statt. Anschließend wurde mit 10 mL 500 mM-Imidazolpuffer gewaschen, um das restliche gebundene Protein zu eluieren. Die Proteinkonzentration der Eluate wurde spektralphotometrisch bei 280 nm bestimmt (siehe 3.4.2) Die Eluate wurden vereinigt und über Nacht gegen 2 L 10 mM-Imidazolpuffer in einem Dialyseschlauch mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa dialysiert. Die Säule wurde anschließend mit einem Säulenvolumen 500 mM- und zwei Säulenvolumen 10 mM-Imidazolpuffer gewaschen. Nach jedem Schritt wurden Proben genommen, die am folgenden Tag mittels SDS-PAGE (siehe 3.4.1) analysiert wurden. Anhand der Verunreinigungen im Gel und der Konzentrationsbestimmung der Eluate wurde die

Menge an Fusionsprotein abgeschätzt und die HRV-3C Protease im Verhältnis 1:300-1:400 zugegeben. Zusätzlich wurden zweimal 28 mM DTT zugegeben um die Spaltungseffektivität zu erhöhen. Die Spaltung erfolgte über Nacht bei 4°C rollend und wurde am nächsten Tag mittels SDS-PAGE überprüft. Anschließend wurde die Proteinlösung erneut für 1 h mit dem NiNTA-Säulenmaterial inkubiert und in eine Qiagensäule überführt. Nach der HRV-3C-Spaltung band nur noch der His-Tag mit MBP an das Säulenmaterial. Die P-Dimere befanden sich im Durchfluss. Dieser wurde aufgefangen und die Säule mit 3x 5 mL 10 mM-Imidazolpuffer gewaschen. Das Säulenmaterial wurde mit je einem Säulenvolumen 20 mM-, 50 mM-, 250 mM-, 500 mM- und 10 mM-Imidazolpuffer regeneriert und anschließend in 30% Ethanol gelagert. Das Eluat wurde auf ca. 3 mL konzentriert mit Hilfe von Amicon-Filtern mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa. Die Proteinlösung wurde über Nacht gegen 2 L GF-Puffer in einem Dialyseschlauch mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa dialysiert.

Größenausschlusschromatographie

Die Größenausschlusschromatographie wurde am ÄKTA-System durchgeführt. Dafür wurden die Puffer vor der Verwendung mit einem 0,45 µm Filter filtriert und entgast. Es wurde eine vorgepackte Säule (HiLoad 26/600 Superdex 75 prep grade von GE Healthcare) verwendet, bestehend aus einer Matrix aus Dextran und hoch vernetzter Agarose.

Die Säule wurde mit einem Säulenvolumen H₂O gewaschen und anschließend in GF-Puffer bis zu einer konstanten Basislinie bei 280 nm äquilibriert mit einer Flussrate von 2 mL/min. Das dialysierte Protein wurde mit Hilfe eines 5 mL-Loops mit einer Flussrate von 0,5 mL/min aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte mit GF-Puffer bei einer Flussrate von 0,5 mL/min. Die ersten 90 mL wurden separat gesammelt und die folgenden 80 mL in 2,5 mL-Fractionen. Mittels SDS-PAGE wurden die proteinhaltigen Fraktionen bestimmt und anschließend vereinigt, konzentriert und umgepuffert. Die Konzentration wurde spektroskopisch bestimmt. Die Säule wurde mit einem Säulenvolumen H₂O und 20% Ethanol gespült und darin bei 4 °C gelagert.

3.4 Proteinanalytik

Zur Überprüfung der Reinheit und Qualität der Proteine wurden verschiedene Analysemethoden verwendet. Die Reinheit wurde mittels SDS-PAGE, die Konzentration spektralphotometrisch mittels NanoDrop und dem Bradford-Test

bestimmt. Die enzymatische Aktivität von GTA und GTB wurde durch einen radiochemischen Test ermittelt.

3.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ermöglicht die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht und lässt so auch Rückschlüsse auf das Vorhandensein von Verunreinigungen in der Probe zu. Für die Untersuchungen von GTA und GTB wurden Trenngele mit einem Polyacrylamidgehalt von 12% verwendet, bei den P-Dimeren von 10%. Das Sammelgel hatte einen Polyacrylamidgehalt von 6% (Tabelle 3.8) (Laemmli, 1970). Die Proben wurden 1:1 mit reduzierendem bzw. nicht-reduzierendem Probenpuffer (Tabelle 3.9) versetzt und für 15 min bei 85°C denaturiert. Es wurden je 5-20 µL der jeweiligen Proben zusammen mit einem Proteinstandard (6,5-200 kDa von Bio-Rad) aufgetragen. Die Kammer wurde mit Elektrodenpuffer (6 g/L Tris, 28,8 g/L Glycin und 1 g/L SDS) aufgefüllt. Die Auftrennung erfolgte im Sammelgel bei 80 V, im Trenngel bei 120-180 V. Anschließend wurde das Gel 3x 10 min in H₂O gewaschen und mit GelCode® Blue Stain Reagent gefärbt. Die Entfärbung erfolgte in H₂O. Das Gel wurde danach bei 80°C unter Vakuum für 2 h auf Filterpapier getrocknet.

Tabelle 3.8: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele. Die Zugabe von TEMED startet die Polymerisation. Mengen reichen aus für 2 Gele.

SDS-Polyacrylamidgel:	12 %iges Trenngel	10 %iges Trenngel	6 %iges Sammelgel
Rotiphorese® Gel 30 (Bis-Acrylamid/Acrylamid)	4 mL	3,33 mL	1 mL
1,5 M TRIS (OH-Form), pH 6,8	-	-	1,25 mL
1,5 M TRIS (OH-Form), pH 8,8	2,5 mL	2,5 mL	-
H ₂ O	3,2 mL	3,87 mL	2,58 mL
10% SDS	100 µL	100 µL	50 µL
87% Glycerin	200 µL	200 µL	100 µL
20% Ammoniumpersulfat	50 µL	50 µL	25 µL
TEMED	10 µL	10 µL	10 µL

Tabelle 3.9: Zusammensetzung der Probenpuffer nach Lämml.

Probenpuffer:	2x reduzierend	2x nicht-reduzierend
100% Glycerin	1,2 mL	1,2 mL
1,5 M TRIS (OH-Form), pH 6,8	1,2 mL	1,2 mL
10% SDS	3 mL	1,5 mL
2-Mercaptoethanol	0,5 mL	–
Bromphenolblau	10 mg	10 mg
Harnstoff	3 g	3 g
H ₂ O	ad 10 mL	ad 10 mL

3.4.2 Proteinbestimmung

Spektroskopische Proteinbestimmung

Um die Konzentration von Proteinen zu bestimmen, wurde die UV-Spektroskopie verwendet. Sie beruht auf dem Absorptionsmaximum der Aminosäure-Seitenketten von Tryptophan, Tyrosin und Cystin bei 280 nm. Anhand der Absorption kann mittels des Lambert-Beerschen Gesetzes ($A = \epsilon \times c \times d$, mit A = Absorption, ϵ = molare Absorption, c = Konzentration und d = Schichtdicke) die Konzentration bestimmt werden. ϵ ist eine stoffspezifische Konstante und beträgt für die P-Dimere $70820 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bei einem Molekulargewicht von 72,65 kDa. Alternativ zur molaren Absorption kann auch der Absorptionskoeffizient eingesetzt werden (Pace et al., 1995), welcher bei GTA und GTB auf $A_{280}^{1\%} \approx 10$ abgeschätzt werden kann (Sindhuwinata, 2007). GTA und GTB haben ein Molekulargewicht von 34,6 kDa (Monomer). Um eine Vergleichbarkeit zwischen den hier angegebenen Konzentrationen mit denen aus bereits veröffentlichten Daten zu gewährleisten, beziehen sich in dieser Arbeit alle GTA und GTB Konzentrationen auf ein Monomer, die P-Dimer-Konzentrationen hingegen auf ein Dimer.

Die Absorptionsmessung erfolgte mindestens in Doppelbestimmung mit einem NanoDrop ND 1000 Spektralphotometer. Zusätzlich zur Absorption bei 280 nm wurde auch die Absorption bei 260 nm bestimmt, wodurch man die Verunreinigung mit DNA abschätzen kann. Wenn $A_{260}/A_{280} \approx 0,6$ kann von einer reinen Proteinprobe ausgegangen werden.

Kolorimetrische Proteinbestimmung

Bei der Proteinbestimmung nach Bradford bindet der Farbstoff Coomassie-Brillantblau G-250 an basische und aromatische Aminosäure-Seitenketten. Es kommt dabei zu einer Verschiebung seines Absorptionsmaximums von 465 auf 595 nm

(Bradford, 1976), welche mit bloßem Auge sichtbar ist. Dies wurde beim qualitativen Bradford-Test ausgenutzt. Dafür wurden 20 µL der Proben mit 200 µL Bradford-Reagenz gemischt. Fand ein Farbumschlag von rot-braun zu blau statt, befand sich Protein in der Lösung.

Für den quantitativen Bradford-Test wurde zusätzlich ein Standardprotein benötigt, welches zur Bestimmung einer Kalibriergerade genutzt wurde. Bei den Glycosyltransferasen diente Bovines Gammaglobulin (BGG) als Standard. Die Kalibriergerade bestand aus folgenden Konzentrationen: 100, 200, 300, 400 und 500 µg/mL. Die Proteinprobe wurde so verdünnt, dass sie innerhalb der Standards lag. Der Leerwert, die Standards und drei Kontrollen wurden in Doppelbestimmung, die Proteinproben in Vierfachbestimmung gemessen. Dabei wurden je 10 µL Probe mit 200 µL Bradford-Reagenz in Mikrotiterplatten versetzt, für 15 min bei RT inkubiert und anschließend die Extinktionen bei 630 nm gemessen. Anhand der Kalibriergerade wurde der Proteingehalt bestimmt.

3.4.3 Aktivitätstest für GTA und GTB

Die Aktivität von GTA und GTB wurde mit Hilfe eines radiochemischen Tests bestimmt (Keshvara et al., 1992). Dabei wurde das uniform ^{14}C markierte N-Acetylgalactosamin (GalNAc) von UDP-GalNAc bzw. die Galactose von UDP-Gal auf den Akzeptor H-Disaccharid mit Octylspacer (HDis-octyl) übertragen. Das entstandene A- bzw. B-Trisaccharid band an eine *C18-reversed-phase* Säule in wässriger Umgebung und konnte so vom nicht umgesetzten Donor getrennt werden. Die Menge des gebildeten Produktes wurde mittels Flüssigszintillationszählung bestimmt.

Die Proteinprobe wurde auf eine Konzentration von 300-500 ng/µL mit 1x A/B-Puffer (siehe Tabelle 3.10) verdünnt, sodass die am Ende gemessene Zerfallsrate unter 10 % der maximalen Aktivität (A_{max}) von ca. 50.000 dpm lag. 4 µL dieser Verdünnung wurden mit 1 µL 10x A/B-Puffer und 5 µL des jeweiligen Stockmix gemischt, für 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und anschließend für 10 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 180 µL eiskaltem H₂O gestoppt. Die *C18-reversed-phase* Säulen wurden während der Inkubationszeit mit dreimal 2 mL Methanol und zweimal 2 mL Wasser unter Vakuum gewaschen. Die Probe wurde anschließend auf die noch etwa 100 µL H₂O enthaltende Säule gegeben, unter Vakuum getrocknet und zweimal mit 2 mL H₂O gewaschen. Das gebundene Produkt wurde dreimal mit 2 mL Methanol in Szintillationsröhrchen eluiert, mit 6 mL Szintillationsflüssigkeit Aquasafe 800 vermischt und mit einem Flüssigszintillationszähler vermessen.

Anhand der erhaltenen Aktivität (A_{Probe} in dpm) kann unter den gegebenen Bedingungen ($A_{\text{Leerwert}} = 100$ dpm, Inkubationszeit $t = 10$ min, $V_{\text{Probe}} = 4$ μL und $n_{\text{Donor}} = 2,66$ nmol) die Volumenaktivität (VA in U/mL) nach Gleichung 3.1 berechnet werden.

$$VA = \frac{(A_{\text{Probe}} - A_{\text{Leerwert}}) * n_{\text{Donor}}}{(A_{\text{max}} - A_{\text{Leerwert}}) * V_{\text{Probe}} * t} \quad \text{Gleichung 3.1}$$

Die Aktivität von 1 U entspricht dabei der Umsetzung von 1 μmol des Donors pro Minute durch das Enzym. Mit Hilfe der Volumenaktivität und der Proteinkonzentration konnte dann die spezifische Enzymaktivität in U/mg bestimmt werden.

Tabelle 3.10: Puffer für Aktivitätstest der GTA und GTB

Puffer	Konzentration	Stoffmenge	Substanz
10x A/B-Puffer	500 mM		MOPS (pH 7 bei 4°C)
	200 mM		MnCl ₂
	10 mg/ml		BSA
GTA Stockmix (5 μL)	0,992 mM	4,96 nmol	H-Disaccharid-octyl
	0,454 mM	2,27 nmol	UDP-GalNAc
	0,077 mM	0,386 nmol	UDP-[U- ¹⁴ C]-GalNAc
GTB Stockmix (5 μL)	0,992 mM	4,96 nmol	H-Disaccharid-octyl
	0,532 mM	2,66 nmol	UDP-Gal
	0,007 mM	0,067 nmol	UDP-[U- ¹⁴ C]-Gal

3.5 NMR-Spektroskopie

Die Kernspinresonanzspektroskopie (*Nuclear Magnetic Resonance*, NMR) ist eine wichtige biophysikalische Analysemethode zur Strukturanalyse von Molekülen. Zwei weitere große Anwendungsgebiete sind die Analyse von Ligandenbindung und die Untersuchung der Moleküldynamik. Des Weiteren liefert die NMR-Spektroskopie aber auch Informationen zur Kinetik und wird bei der Analyse von Metaboliten eingesetzt (Claridge, 1999; Keeler, 2010).

In dieser Arbeit wurde die Struktur und Dynamik von GTA auf Proteinebene untersucht, dafür wurden Zuordnungsexperimente aufgenommen und der Einfluss von Ligandenbindung auf T_1 und T_2 -Zeiten untersucht. Aufgrund der Proteingröße wurden

des Weiteren die Methylgruppen der Isoleucine der GTA und die Methylgruppen der Methionine der GTB isotopenmarkiert. Dabei wurde der Einfluss der Ligandenbindung und die Dynamik im μs -ms-Bereich mittels Relaxations-Dispersions-Messungen analysiert. Zusätzlich wurde das Prinzip des inversen Sättigungs-Transfers, also vom Liganden auf die Methylgruppen der Isoleucine, Valine und Leucine der GTA etabliert.

Außerdem wurden auch die Methylgruppen der Isoleucine, Valine und Leucine der P-Dimere weiter charakterisiert. Die Dynamik der Methylgruppen im μs -ms Bereich wurde in Anwesenheit von verschiedenen Fucose-Konzentrationen analysiert. Die Zuordnung der Isoleucin-Methylgruppen-Signale wurde mit Hilfe von Liganden durchgeführt, welche ein paramagnetisches Metallion gebunden hatten.

Die NMR-Messungen wurden, wenn nicht anders angegeben, mit einem Bruker Avance AVIII 500 Spektrometer mit einem TCI-Kryoprobekopf bei 298 K durchgeführt. Ein Teil der Relaxations-Dispersions-Messungen wurde zusätzlich am Avance AVI 700 Spektrometer mit TXI-Kryoprobekopf durchgeführt. Die Auswertung der Spektren erfolgte mit Topspin 3.1. Die Zuordnungsexperimente wurden am Zentrum für Biomolekulare Magnetresonanzspektroskopie der Goethe Universität Frankfurt an einem 600 MHz-, 800 MHz- oder 950 MHz-Spektrometer durchgeführt und prozessiert.

3.5.1 Probenpräparation

Die nach der Reinigung erhaltenen Proteinproben mussten für NMR-Experimente umgepuffert werden. Die Proben wurden mittels Ultrafiltration mit Amicon® Ultra 4 mL Filtern mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa bei 4°C und 3000xg umgepuffert. Für Experimente am Proteinrückgrat wurden Puffer mit 10% D₂O und 90% H₂O (NMR-Puffer I und II, siehe Tabelle 3.11) verwendet, für Seitenkettenexperimente wurden vollständig deuterierte Puffer verwendet (NMR-Puffer III und IV, siehe Tabelle 3.11). Die Reinigungspuffer (siehe Tabelle 3.5) von GTA und GTB enthielten 5 mM MnCl₂. Mangan ist paramagnetisch und führt zu ungewollten Linienverbreiterungen im NMR-Spektrum. Um Mn²⁺-Ionen vollständig aus der Proteinlösung zu entfernen, wurde die Proteinlösung zweimal mit einem EDTA-haltigen Puffer gespült. Anschließend erfolgte die Umpufferung in den jeweiligen NMR-Puffer (Tabelle 3.11), solange bis die Konzentration von ungewollten Substanzen, wie z.B. MOPS-Puffer oder EDTA nur noch im nanomolaren-Bereich lag. Die Proteinkonzentration wurde spektralphotometrisch (siehe 3.4.2) bestimmt.

Die Messung der Proben erfolgte in 3 mm NMR-Röhrchen mit einem Füllvolumen von 160 bis 180 μL , die Zuordnungsexperimente wurden in einem auf D₂O optimierten

5 mm Shigemi-Röhrchen durchgeführt. Alle GTA- und GTB-Proben enthielten 100 μM TSP-d₄, die P-Dimer Proben enthielten 100 μM DSS-d₆ als interne Referenz. Dabei wurde das ¹H-Signal auf 0 ppm referenziert, daraus wurde die ¹⁵N-Verschiebung über das Frequenzverhältnis von ¹⁵N/¹H=0,101329118 und ¹³C-Verschiebung über das Frequenzverhältnis von ¹³C/¹H=0,25144953 berechnet (Markley et al., 1998). Teilweise wurde noch 0,02% Natriumazid zugegeben, um einen möglichen Proteinverdau durch Mikroorganismen zu verhindern.

Tabelle 3.11: Verwendete NMR-Puffer für GTA, GTB und P-Dimere

Puffer	Konzentration	Substanz
EDTA-Puffer I	25 mM	MOPS, pH 6,7
H ₂ O	50 mM	NaCl
	10 mM	EDTA
	1 mM	2-Mercaptoethanol
EDTA-Puffer II	25 mM	Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ , pH 6,7
H ₂ O	10 mM	EDTA
	1 mM	2-Mercaptoethanol
NMR-Puffer I	25 mM	MOPS, pH 6,7
10% D ₂ O / 90% H ₂ O	50 mM	NaCl
	5 mM	MgCl ₂
	1 mM	2-Mercaptoethanol-d ₆
	100 μM	TSP-d ₄
NMR-Puffer II	25 mM	Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ , pH 6,7
10% D ₂ O / 90% H ₂ O	5 mM	MgCl ₂
	1 mM	2-Mercaptoethanol-d ₆
	100 μM	TSP-d ₄
NMR-Puffer III	25 mM	Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ , pH 6,7
99,8% D ₂ O	5 mM	MgCl ₂
	1 mM	2-Mercaptoethanol-d ₆
	100 μM	TSP-d ₄
NMR-Puffer IV	25 mM	TRIS-d ₁₁ , pH 7,4
99,8% D ₂ O	300 mM	NaCl
	100 μM	DSS-d ₆

3.5.2 $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Experimente

Sowohl bei GTA und GTB als auch bei den P-Dimeren handelt es sich um Homodimere mit einer Größe von etwa 70 kDa. Neben Signalüberlagerungen, aufgrund der hohen Anzahl an Resonanzen, zeigen Proteine dieser Größe ungünstige Relaxationseigenschaften. Mit steigender Proteingröße sinkt die transversale Relaxationszeit T_2 , was zu einer Linienverbreiterung bis hin zum Verschwinden von Signalen führen kann (Bloembergen et al., 1948; Cavanagh et al., 2001). Eine Möglichkeit um dem entgegen zu wirken, ist die Deuterierung des Proteins. Dadurch kommt es u.a. zur Reduktion der Relaxation und Spin-Diffusion und damit zu schärferen Linien, einer besseren Auflösung und einem verbesserten Signal-zu-Rausch-Verhältnis (Gardner and Kay, 1998). Eine weitere Möglichkeit ist die Nutzung des sogenannten *Transverse Relaxation Optimized Spectroscopy*-(TROSY)-Effektes (Pervushin et al., 1997). Bei dieser Methode werden bestimmte Relaxationsterme selektiert, was eine signifikante Verbesserung der Spektren zur Folge hat.

Bei einem $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Correlation*) wird die chemische Verschiebung eines Protons mit der des direkt gebundenen Heteroatoms, hier ^{15}N , korreliert. Die Kopplungskonstante $^1J_{\text{HN}}$ beträgt ca. 90 Hz. Das $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC-Experiment wird normalerweise mit Entkopplung aufgenommen, d.h. anstelle der eigentlich vier gekoppelten Resonanzsignale, wird nur ein gemittelt Signal detektiert. Der Einfluss der Dipol-Dipol Relaxation und der Chemischen-Verschiebungs-Anisotropie ist auf diese vier Komponenten unterschiedlich stark, sodass die einzelnen Signale unterschiedliche Linienbreiten aufweisen. Für das TROSY-Spektrum wird nur die Komponente mit den besten Relaxationseigenschaften, also das Signal mit der schmalsten Linienbreite, selektiert und dargestellt (Pervushin et al., 1997; Pervushin et al., 1998). Der TROSY-Effekt ist bei höheren Feldstärken (Optimum von $^1\text{H}^{\text{N}}$ und ^{15}N -Kernen bei 1,1 GHz) und deuterierten Proteinen verstärkt (Pervushin, 2000). Die TROSY-Sequenz kann neben der Verwendung in 2D-Experimenten u.a. auch in Tripelresonanzexperimente integriert werden.

Eine weitere Methode zur Verbesserung der Spektren ist die Nutzung von BEST-Sequenzen. Hier werden selektiv nur die Amidgruppen des Proteinrückgrates angeregt, was eine Verkürzung der Messzeit bei gleicher Anzahl an *Scans* und eine Erhöhung der Signalintensität zur Folge hat (Lescop et al., 2007).

Die 2D $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC-Experimente wurden mit einer TROSY-Sequenz (*trosytf3gpsi*) oder BEST-TROSY-Sequenz (*b_trosytf3gpsi.tb*) (siehe Anhang 7.2) aufgenommen. Es wurden 2k Datenpunkte bzw. 256 Inkremente mit einer spektralen Breite von 16/18 bzw.

32/45 ppm und einem spektralen Mittelpunkt von 4,7 bzw. 122 ppm in der ^1H - bzw. ^{15}N -Dimension aufgenommen. Je nach Proteinkonzentration wurde die Anzahl an *Scans* angepasst. Bei der BEST-TROSY-Sequenz wurden zusätzlich die Abschwächung folgender Pulse kalibriert: 90° -Anregungspuls (PC9_4_90.100 von 2,2 ms und 0,9 kHz), 180° -Refokussierungspuls (Reburp.1000 von 1,5 ms und 4,2 kHz) und 90° -Anregungspuls (Eburp2.100 bzw. Eburp2tr.1000 von 1,4 ms und 2,9 kHz) (Geen and Freeman, 1991).

3.5.3 Zuordnungsexperimente

Eine Zuordnung der Signale im $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC Spektrum ist die Grundlage für strukturelle NMR-Untersuchungen an Proteinen. Hierfür werden Tripelresonanzexperimente aufgenommen. Dabei werden die drei NMR-aktiven Kerne ^1H , ^{15}N und ^{13}C miteinander korreliert. Die Zuordnung basiert auf der sequentiellen Verknüpfung der Proteinrückgrat-Signale einzelner Aminosäuren. Für sehr große Proteine (> 250 Aminosäuren) ist dafür neben der ^{15}N - und ^{13}C -Markierung noch eine Deuterierung erforderlich. Durch die Deuterierung kann die Spin-Diffusion und die Dipol-Dipol-Relaxation der $^{13}\text{C}_\alpha$ reduziert werden, was zu deutlich verbesserten Spektren führt (Sattler et al., 1999). Durch Signalüberlagerung ist es zusätzlich von Vorteil, einen Teil der Spektren an Spektrometern mit höheren Feldstärken zu messen, um die Auflösung zu verbessern. Je nach Proteingröße, empfehlen sich verschiedene Spektren. Für GTA und GTB wurden die Spektren HNCA, HN(CO)CA, HNCO, HN(CA)CO und HNCACB aufgenommen. Der Transfer der Magnetisierung aufgrund von skalarer Kopplung spiegelt sich dabei in den Namen wider, wobei in Klammern stehende Kerne nicht detektiert werden (mit CA = C_α , CB = C_β und CO = C'). In alle Pulsprogramme war die TROSY- und BEST-Sequenz integriert. Im HNCA-Spektrum wird die chemische Verschiebung der NH-Gruppe mit dem C_α der eigenen (i) und dem C_α der vorherigen Aminosäure (i-1) korreliert. Dies ist möglich, da die Kopplungskonten $^1\text{J}_{\text{N}(i)-\text{C}_\alpha(i)}$ und $^2\text{J}_{\text{N}(i)-\text{C}_\alpha(i-1)}$ ähnlich sind. Im HN(CO)CA-Spektrum erfolgt der Magnetisierungstransfer über die Carbonylgruppe der vorherigen Aminosäure, sodass nur die Korrelation zwischen NH(i) und $\text{C}_\alpha(i-1)$ sichtbar ist. Die Korrelation im HNCO und HN(CA)CO sind analog, nur dass hier Carbonylgruppen detektiert werden. Durch die Kombination von HNCA und HN(CO)CA sowie von HNCO und HN(CA)CO ist eine sequentielle Zuordnung des Proteinrückgrates möglich. Mit Hilfe des HNCACB-Spektrums, welches auch die Korrelationen zu den C_β -Kernen der (i)-ten und (i-1)-ten Aminosäure zeigt, lassen sich einzelne Aminosäuren mit charakteristischen C_β -

Verschiebungen, wie z.B. Alanine einfach zuordnen. Dies liefert einen weiteren Ansatzpunkt für die sequenzielle Zuordnung des Proteinrückgrates.

Die Zuordnungsspektren wurden über Bio-NMR (<http://www.bio-nmr.net/>, letztmalig abgerufen am 25.11.2015) am Zentrum für Biomolekulare Magnetresonanzspektroskopie an der Universität Frankfurt von Dr. Frank Löhr aufgenommen. Die [U-²H, ¹³C, ¹⁵N]-GTA Probe wurde in NMR-Puffer I umgepuffert und in einem 5 mm Shigemi-Röhrchen gemessen. Die finale Konzentration betrug 500 µM. Die Messparameter sind in Tabelle 3.12 zusammengefasst. Zur Überprüfung der Stabilität der Probe wurde an allen Spektrometern ¹H, ¹⁵N-BEST-TROSY-HSQC-Experimente aufgenommen mit 1 - 2k Datenpunkten bzw. 512 - 640 Inkrementen in der ¹H- bzw. ¹⁵N-Dimension, einer spektralen Breite variierend von 14 - 18 bzw. 50 ppm und mit 4,7 ppm bzw. 118 ppm als Mittelpunkt des Spektrums in der ¹H- bzw. ¹⁵N-Dimension. Beim HNCA und beim HNCACB wurde zusätzlich die Methode des *Non-Uniform-Sampling* (NUS) angewendet (Manassen and Navon, 1988).

Die Prozessierung erfolgte in allen Dimensionen mit einer quadratischen Sinus-Funktion (QSINE) mit anschließender Fouriertransformation. Die Auswertung der Spektren wurde mit CCPNmr Analysis 2.3.1 durchgeführt (Vranken et al., 2005).

Tabelle 3.12: Messbedingungen für Tripelresonanzexperimente mit GTA. Die Probe enthielt 500 µM [U-²H, ¹³C, ¹⁵N]-GTA in 25 mM MOPS, pH 6,7, 50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM 2-Mercaptoethanol-d₆ und 100 µM TSP-d₄ in 10% D₂O. Die Messung erfolgte bei 298 K in einem 5 mm Shigemi-Röhrchen. Die von Dr. Frank Löhr modifizierten Pulsprogramme enthielten TROSY- und BEST-Sequenzen. Ein Teil der Spektren wurde mit Non-Uniform-Sampling (NUS) aufgenommen.

Experiment (Pulsprogramm)	v(¹ H) [MHz]	Scans	Datenpunkte / Inkremente (¹ H/ ¹³ C/ ¹⁵ N)	Spektrale Breite (¹ H/ ¹³ C/ ¹⁵ N) [ppm]	Mitte des Spektrums (¹ H/ ¹³ C/ ¹⁵ N) [ppm]	NUS [%]
HNCA (b_hncatr2H.fl)	950	40	1200 / 108 / 184	12 / 28 / 28	4,7 / 52,7 / 118	25%
HN(CO)CA (b_hncocacrtr2H.fl)	600	48	768 / 64 / 136	12 / 26 / 28	4,7 / 52,7 / 118	–
HNCO (b_hncotr.fl)	800	8	1k / 80 / 160	12 / 14 / 28	4,7 / 173 / 117,6	–
HN(CA)CO (b_hncacotr2H.fl)	800	64	1k / 76 / 136	12 / 14 / 28	4,7 / 173 / 118	–

HNCACB 950 48 1k / 200 / 184 12 / 63,4 / 28 4,7 / 40 / 118 28%

(b_hncacbr2H.fl)

3.5.4 Bestimmung von T₁- und T₂-Zeiten

Die Proteindynamik im Bereich von Picosekunden bis Nanosekunden kann durch die Messung von T₁- und T₂-Zeiten bestimmt werden. In diesem Zeitbereich kommt es u.a. zu Bindungsvibrationen und -librationen und Schleifenbewegungen (Kleckner and Foster, 2010). Diese Bewegungen können bei der Katalyse, Ligandenspezifität und -affinität und allosterischen Effekten wichtig sein (Popovych et al., 2006; Tzeng and Kalodimos, 2009).

Die Bestimmung der longitudinalen Relaxation (auch Spin-Gitter-Relaxation) T₁ beruht auf dem *Inversion-Recovery*-Experiment. Nach einem 180° Inversionspuls kommt es zu einer variablen Wartezeit τ , gefolgt von einem 90°-Puls und der Detektion. In Abhängigkeit von τ zeigen die Signale unterschiedlich Intensitäten $I(\tau)$ (Keeler, 2010). Durch Anpassung an eine Exponentialfunktion (Gleichung 3.2), können daraus die T₁-Zeiten bestimmt werden. Die NMR-Experimente wurden mit einer 512 μM [U-²H,¹⁵N]-GTA (2)-Probe und einer 205 μM [U-²H,¹⁵N]-GTA (2)-Probe mit 6,15 mM UDP (Nummerierung siehe Tabelle 4.1) in NMR-Puffer II durchgeführt. Das pseudo-3D-Experiment trt1etf3gpsi3d wurde mit den Wartezeiten $\tau = 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,5; 3,0$ und 5,0 s aufgenommen. Es wurden 2 k Datenpunkte bzw. 256 Inkremente bei einer spektralen Weite von 18 bzw. 45 ppm und einem spektralen Mittelpunkt von 4,7 bzw. 122 ppm in der ¹H bzw. ¹⁵N Dimension aufgenommen. Die Anzahl der *Scans* betrug im Spektrum ohne UDP 12 und mit UDP 16.

$$I_{\tau} = I_0 e^{-\tau/T_1/2} \quad \text{Gleichung 3.2}$$

Für die Bestimmung der transversalen Relaxation (auch Spin-Spin-Relaxation) T₂ wurde das Spin-Echo-Experiment angewendet (Keeler, 2010; Zhu et al., 2000). Die erhaltenen Intensitäten werden in Abhängigkeit von τ_2 aufgetragen und daraus durch Anpassung an eine Exponentialfunktion die T₂-Zeiten bestimmt. Die NMR-Experimente wurden mit einer 512 μM [U-²H,¹⁵N]-GTA (II)-Probe und einer 205 μM [U-²H,¹⁵N]-GTA (II)-Probe mit 6,15 mM UDP in NMR-Puffer II durchgeführt. Das pseudo-3D-Experiment trt2etf3gpsi3d wurde mit den Wartezeiten $\tau = 16,96; 33,92; 50,88; 67,84; 84,8; 101,76; 118,72; 135,68; 152,64; 169,60; 186,56$ und 203,52 ms aufgenommen. Es wurden 2k Datenpunkte bzw. 128 (ohne UDP) / 176 (mit UDP) Inkremente bei einer spektralen Weite von 18 bzw. 45 ppm und einem spektralen Mittelpunkt von 4,7 bzw. 122 ppm in

der ^1H bzw. ^{15}N Dimension mit 32 *Scans* aufgenommen. Die Auswertung aller Spektren erfolgte mit Topspin 3.1 und CCPNmr 2.3.1 (Vranken et al., 2005).

3.5.5 $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -methyl-TROSY Experimente

Trotz diverser Möglichkeiten die Qualität von $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren großer Proteine zu verbessern, besteht das Problem der Überlagerung weiterhin. Auch eine vollständige Zuordnung ist aufgrund fehlender Signale meist nicht möglich. Aus diesem Grund wurden andere Methoden zur Charakterisierung großer Proteine entwickelt. Eine vielversprechende Methode stellt die Isotopenmarkierung der Methylgruppen einzelner Aminosäuren dar, in einem ansonsten deuterierten Protein. Methylgruppen geben intensivere NMR-Signale als Amide, da sie drei entkoppelte Protonen tragen. Außerdem gibt es im Vergleich zu Spektren des Proteinrückgrates insgesamt weniger Signale, sodass die Spektren übersichtlicher sind. Durch die Deuterierung des Proteins und die Nutzung von vollständig deuteriertem Puffer kann auch die Relaxation der übrigen Protonen verlangsamt werden (Ollerenshaw et al., 2003).

Neben den oben beschriebenen Vorteilen, die die Analyse von Methylgruppen bietet, soll auch der TROSY-Effekt bei der Aufnahme der $^1\text{H},^{13}\text{C}$ HSQC-Spektren ausgenutzt werden, um eine weitere Verbesserung der Spektren zu erreichen. In großen, deuterierten Proteinen kann es unter bestimmten experimentellen Bedingungen im $^{13}\text{C},^1\text{H}_3$ -Spinsystem zur Aufhebung der ^1H - ^1H und der ^1H - ^{13}C Dipol-Dipol-Relaxation kommen. Dies ist beim HMQC-Experiment (*Heteronuclear Multiple Quantum Correlation*) der Fall, wo nur langsam relaxierende Komponenten das Signal bilden und damit scharfe Signale entstehen. Beim HSQC-Experiment werden hingegen langsam und schnell relaxierende Komponenten vermischt. Dies hat zur Folge, dass für große Proteine die Signale im HMQC-Spektrum dreimal intensiver sind als im HSQC-Spektrum (Ollerenshaw et al., 2003). Das in dieser Arbeit verwendete $^1\text{H},^{13}\text{C}$ methyl-TROSY Experiment beinhaltet zusätzlich *purge*-Pulse und Gradienten, um die Entstehung von Artefakten zu reduzieren (Tugarinov et al., 2003).

Die spezifische Markierung der Methylgruppen ($^{13}\text{C}^1\text{H}_3$) bei einem sonst deuterierten Protein kann durch die Zugabe spezieller Aminosäure-Vorläufer erreicht werden. Diese werden an einem bestimmten Punkt im Proteinbiosyntheseweg eingebaut. Eine Übersicht über mögliche Methylgruppenmarkierungen ist in Tabelle 3.13 zu finden. Die Zuordnung dieser Signale kann über das Einbringen von Punktmutationen erreicht werden. Wenn eine Zuordnung des Proteinrückgrates vorhanden ist, können auch die

Aminosäure-Seitenkette mit dem jeweiligen Amid korreliert werden (Tugarinov and Kay, 2003).

Tabelle 3.13: Übersicht über mögliche Methylgruppenmarkierungen einzelner Aminosäuren.

Aminosäure	Position der Markierung	Literatur
Alanin	β 1-Methylgruppe	(Ayala et al., 2009)
Isoleucin	δ 1-Methylgruppe	(Tugarinov and Kay 2004)
Leucin	eine der δ 1/2-Methylgruppen	(Tugarinov and Kay 2004)
Valin	eine der γ 1/2-Methylgruppen	(Tugarinov and Kay, 2004)
Methionin	ϵ 1-Methylgruppe	(Gelis et al., 2007)
Threonin	γ 1-Methylgruppe	(Velyvis et al., 2012)

Für alle $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -methyl-TROSY Experimente wurde das Pulsprogramm `metr-hmqcph_new.tb` (siehe Anhang 7.2) verwendet. Alle Experimente mit GTA und GTB wurden in NMR-Puffer III (Tabelle 3.11) durchgeführt. Im Vergleich zu den Zuordnungs-Spektren fand ein Pufferwechsel von MOPS-Puffer zu $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Puffer statt. MOPS-Puffer ist nicht deuteriert und erzeugt somit Signale im ^1H -Spektrum, welche nahe den Methylgruppen sind. Es kommt zu unerwünschten Relaxationseffekten und damit zu breiteren Signalen. Die Proteinkonzentrationen lagen zwischen 50 und 350 μM .

Für alle P-Dimer Experimente wurde der NMR-Puffer IV verwendet. Die Probenkonzentration lag zwischen 340 und 400 μM .

Die Aufnahmeparameter sind in Tabelle 3.14 dargestellt. Je nach Konzentration wurde die Aufnahmedauer angepasst. Die Relaxations-Wartezeit D1 lag bei 1,5 s. Die Prozessierung erfolgte durch eine quadratische Sinusfunktion (QSINE) mit anschließender Fouriertransformation.

Tabelle 3.14: Aufnahmeparameter diverser methylgruppen-markierter Proben. Diese Bedingungen galten auch für die jeweiligen Mutanten. Die Anzahl an *Scans* wurde an die Probenkonzentration angepasst.

Probe	$\nu(^1\text{H})$ [MHz]	Datenpunkte / Inkrement ($^1\text{H} / ^{13}\text{C}$)	Spektrale Breite ($^1\text{H} / ^{13}\text{C}$) [ppm]	Mitte des Spektrums ($^1\text{H} / ^{13}\text{C}$) [ppm]
Ile-GTA	500	768 / 120	8 / 20	0,5 / 12
	700	1024 / 120	6 / 11	0,5 / 11,5
ILV-GTA	500	1024 / 350	7,5 / 25	0,5 / 16,5
Met-GTB	500	1024 / 176	7,9 / 5	1,5 / 15,5
	700	1024 / 120	7,9 / 5	1,5 / 15,5
P-Dimer	500	256 / 480	2 / 15	0,6 / 16,5

3.5.6 HMQC-NOESY-Spektren

Für die eindeutige Zuordnung der Met-GTB Signale wurden zusätzlich HMQC-NOESY-Spektren aufgenommen (Pulsprogramm `hmqcetgpn0`). Aus den Kristallstrukturen ist bekannt, dass einige Methylgruppen nur einen Abstand von 6 Å zueinander haben. Räumlich nahe Methylgruppen können hier durch ihre dipolare Kopplung sichtbar gemacht werden. Es erscheint ein zusätzliches Korrelationssignal im HMQC-NOESY-Spektrum. Die Mischzeit betrug 500 ms. Die Aufnahmeparameter sind in Tabelle 3.14 zu finden.

3.5.7 CPMG-Relaxations-Dispersions Messungen

Mit Hilfe von Kristallographie und NMR-Spektroskopie kann u.a. die Struktur von Proteinen aufgeklärt werden. Die erhaltenen Strukturen sind jedoch nur Momentaufnahmen. Häufig besitzen Proteine flexible Regionen oder es kommt zu konformationellen Änderungen, welche für die Funktion essentiell sind. Die NMR-Spektroskopie ist eine der wenigen Methoden, die für die Aufklärung solcher dynamischer Prozesse und damit auch der Funktionsweise eines Proteins genutzt werden kann. Vereinfacht kann man von zwei Zuständen A und B mit den Resonanzfrequenzen ω_A und ω_B (in Hz) ausgehen, die sich im Austausch befinden. Dies kann z.B. bei Ligandenbindung, oder einer Konformationsänderung der Fall sein. Man unterscheidet zwischen schnellem, mittlerem und langsamem Austausch zwischen

diesen beiden Zuständen (Kleckner and Foster, 2010). Beim schnellen Austausch ($k_{ex} \gg |\Delta\omega|$), geben die beiden Zustände nur ein scharfes Signal. Die chemische Verschiebung ist je nach Population der Zustände gemittelt. Die Messung von Relaxationsraten R_1 , R_2 sowie heteronuklearen NOEs (siehe auch 3.5.4) können Informationen über den schnellen Austausch geben (Jarymowycz and Stone, 2006; Kempf and Loria, 2003). Weitere Möglichkeiten zur Bestimmung der Dynamik im ps-ms Bereich sind RDCs (*Residual Dipolar Coupling*) (Lakomek et al., 2008) und PREs (*Paramagnetic Relaxation Enhancement*) (Clare and Iwahara, 2009). Der mittlere Austausch zwischen zwei Zuständen ($k_{ex} \approx |\Delta\omega|$) wird durch eine starke Linienverbreiterung charakterisiert. Der mittlere bis schnelle Austausch kann mittels CPMG-RD- (Carr-Purcell Meiboom-Gill-Relaxations-Dispersions) Experimenten gemessen werden und wird im Folgenden genauer beschrieben. Beim langsamen Austausch sind zwei distinkte Signale detektierbar, wobei die Intensität die jeweilige Population beschreibt. Der langsame Austausch kann mit Hilfe von EXSY-Spektren (Palmer et al., 2001) oder *Lineshape Analysis* (Doucet et al., 2009) untersucht werden.

Mit CPMG-RD Messungen kann der intermediäre bis schnelle Austausch im μ s-ms-Bereich untersucht werden. Dabei werden strukturelle, thermodynamische und kinetische Eigenschaften, sowie Relaxationseigenschaften die austauschenden Zustände näher charakterisiert. Austauschende Signale erfahren eine verstärkte Relaxation, da es neben der transversalen Relaxation ($R_2 = 1/T_2$) zusätzlich zu einem chemischen Austausch zwischen den beiden Zuständen kommt (R_{ex}), was auch eine Linienverbreiterung zur Folge hat. Die CPMG-RD-Messungen beruhen auf dem Spin-Echo Experiment. Durch einen 180° Puls zwischen zwei Wartezeiten τ kommt es zur Refokussierung der chemischen Verschiebung. Kommt es jedoch zu einem zusätzlichen chemischen Austausch (R_{ex}), kann die chemische Verschiebung nicht refokussiert werden, sodass es zu einer Reduktion der Signalintensität kommt. Je länger die Wartezeit τ ist, umso mehr Austausch kann stattfinden und umso geringer ist die Signalintensität. Für die Bestimmung von R_{ex} wurde eine Reihe von NMR-Spektren mit einer Mischzeit T_{CPMG} , die der Dauer der Pulssequenz entspricht, aufgenommen. Innerhalb dieser Mischzeit wurde eine variable Anzahl an Spin-Echo Elementen mit verschiedenen Wartezeiten τ ($\tau = 0,5 - 5$ ms, alternativ auch als Feldstärke $\nu_{CPMG} = 1/(4\tau)$ ausgedrückt) durchgeführt. Aus den Signalintensitäten bei entsprechender ν_{CPMG} Feldstärke, der Referenzsignalintensität I_0 und der konstanten Wartezeit T_{CPMG} wird nach Gleichung 3.3 die effektive transversale Relaxationsrate ($R_{2,eff}(\nu_{CPMG})$ in s^{-1}) berechnet (Korzhnev et al., 2004).

$$R_{2,eff}(v_{CPMG}) = \frac{-\ln\left(\frac{I_{v(CPMG)}}{I_0}\right)}{T_{CPMG}} \quad \text{Gleichung 3.3}$$

Die erhaltenen effektiven transversalen Relaxationsraten $R_{2,eff}(v_{CPMG})$ werden in Abhängigkeit von der v_{CPMG} Feldstärke als Relaxations-Dispersions Profil dargestellt. Die Profile werden mit der Carver-Richards-Formel (Carver and Richards, 1972; Kleckner and Foster, 2010) angepasst. Es handelt sich um eine Fünf-Parameter-Anpassung, welche ein Zweizustandsmodell beschreibt. Bei den fünf angepassten Parametern handelt es sich um die Austauschrate (k_{ex} in s^{-1}), die Population (P_A in %), die chemische Verschiebungsdifferenz ($|\Delta\omega_H|$ bzw. $|\Delta\omega_X|$) der beiden Zustände in der jeweiligen Dimension, sowie die Relaxationsrate des höher populierte Zustands in Abwesenheit von chemischem Austausch (R_2^0 in s^{-1}) (siehe Abbildung 3.1).

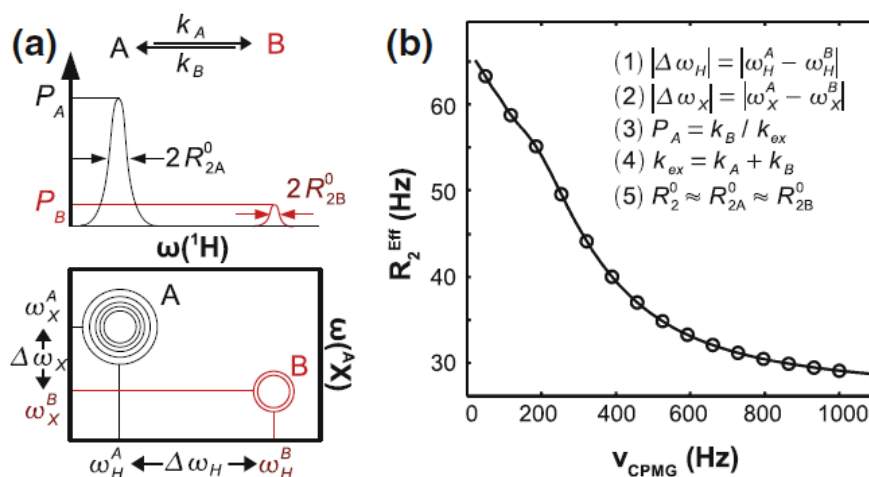


Abbildung 3.1: RD-Profil. Abbildung übernommen aus (Kleckner and Foster, 2010). Gezeigt ist ein Zweizustandsmodell. (a) Signal A und B beschreiben zwei Zustände mit chemischen Verschiebungen in der 1H (ω_H) und AX (ω_X) Dimension. Die Signale befinden sich im chemischen Austausch. Aufgrund der Linienverbreiterung oder einer zu geringen Population des Zustandes, ist Signal B im NMR-Spektrum nicht detektierbar. Der Austausch zwischen A und B hat einen quantitativen Effekt auf das RD-Profil von Signal A. (b) Das Multiquanten RD-Profil wird durch fünf Parameter des Zweizustandsmodell beschrieben und liefert strukturelle, thermodynamische und kinetische Eigenschaften, sowie Relaxationseigenschaften der austauschenden Zustände. Mit (1) $|\Delta\omega_H|$ bzw. (2) $|\Delta\omega_X|$ als Unterschied der chemischen Verschiebung zwischen den beiden Zuständen in der jeweiligen Dimension ($|\Delta\omega_H|$ wird bei Einzelquanten-Experimenten nicht detektiert) und (3) $P_A = k_B/k_{ex}$ als Gleichgewichtspopulation des Zustandes A mit $P_A + P_B = 1$. (4) $k_{ex} = k_A + k_B$ beschreibt die Austauschrate zwischen Zustand A und B und R_2^0 die transversale Relaxation in Abwesenheit von chemischem Austausch zwischen A und B. Es wird angenommen, dass $R_2^0 \approx R_{2A}^0 \approx R_{2B}^0$ ist (Ishima and Torchia, 2006).

Durch Messungen bei verschiedenen Spektrometer-Feldstärken und Temperaturen kann die Anpassung deutlich verbessert werden. Messungen bei verschiedenen Temperaturen ermöglichen weiterhin eine Arrhenius sowie van't Hoff Analyse (Winzor and Jackson, 2006). Die Analyse der Daten erfolgte mit dem Softwarepaket GUARDD (Kleckner and Foster, 2011), welches in Matlab implementiert ist.

Mit den Proben Ile-GTA, Met-GTB und P-Dimer wurden CPMG-RD Messungen an einem 500 MHz Spektrometer durchgeführt. Die Messungen mit Ile-GTA und Met-GTB wurden ohne Ligand, sowie unter Anwesenheit von Donor- bzw. Donor- und Akzeptorsubstrat durchgeführt. Diese Messungen erfolgten auch an einem 700 MHz-Spektrometer. Es wurden Mischzeiten $T_{\text{CPMG}} = 20$ ms und $T_{\text{CPMG}} = 40$ ms getestet. Die finalen Experimente wurden mit einer Mischzeit von $T_{\text{CPMG}} = 20$ ms für GTA und GTB bzw. $T_{\text{CPMG}} = 40$ ms für die P-Dimere und Feldstärken ν_{CPMG} von 50 Hz bis 500 Hz aufgenommen. Das verwendete Pulsprogramm am 500 MHz Spektrometer hieß `hmqcrexgpphpr.tb` bzw. `hmqcrexgpphpr_HH.2.tb` (siehe Anhang 7.2) am 700 MHz Spektrometer.

Die Ile-GTA Dispersionsprofile am 500 MHz Spektrometer wurden bei 283 K und 298 K aufgenommen. Die Probenkonzentration bei den Messungen ohne Ligand betrug 110 μM in NMR-Puffer III. Die Experimente unter Anwesenheit des Donorsubstrates fanden mit 71 μM Ile-GTA und 6 mM UDP statt. Die Experimente mit Donor- und Akzeptorsubstrat fanden mit 71 μM Ile-GTA, 6 mM UDP und 1 mM HDis mit O-Methyl-Spacer (HDis-O- ^{13}C -Methyl) statt. Die Messungen am 700 MHz Spektrometer erfolgten mit einer 106 μM Ile-GTA Probe bei 283 K, 290 K und 298 K. Die UDP- Konzentration betrug 5,7 mM und die HDis-O-Methyl-Konzentration 1 mM.

Die Dispersionprofile der Met-GTB Proben wurden am 500 MHz Spektrometer bei 288 K, 293 K und 298 K angenommen. Die Messungen ohne Ligand erfolgten mit einer Probenkonzentration von 130 μM Met-GTB. Die Konzentration des Donorsubstrates UDP betrug 6,1 mM bei einer Proteinkonzentration von 290 μM . Die Messungen mit Donor- und Akzeptorsubstrat wurden mit 276 μM Met-GTB, 6,1 mM UDP und 772 μM HDis-O-Methyl durchgeführt. Bei den Messungen am 700 MHz Spektrometer betrug die Proteinkonzentration 215 μM , die UDP-Konzentration 6 mM und die HDis-O-Methyl-Konzentration 800 μM . Die Spektren wurden bei 288 K, 293 K und 298 K aufgenommen.

Die RD-Profile der P-Dimere wurden nur am 500 MHz Spektrometer bei 283 K, 290 K und 298 K durchgeführt. Die Proteinkonzentration betrug 170 μM bei den Messungen ohne Ligand und mit 6 mM Fucose. Bei den Messungen mit 160 mM Fucose betrug die P-Dimer Konzentration 160 μM .

Alle Experimente fanden, wenn nicht anders angegeben, in Doppelbestimmung statt. Die Aufnahmebedingungen entsprachen den in Tabelle 3.14 dargestellten. Die Anzahl der *Scans* wurde je nach Probenkonzentration angepasst. Die Zugabe von UDP, HDis-O-Methyl bzw. Fucose führte zu einer Relaxationsbeschleunigung, sodass die aufgenommenen Inkremente in der indirekten Dimension gegebenenfalls reduziert wurden. Anhand der durch CCPNmr 2.3.1 extrahierten Intensitäten, wurde mittels Gleichung 3.3 die effektive transversale Relaxationsrate $R_{2,\text{eff}}(\text{VCPMG})$ bestimmt, welche mit GUARDD weiter ausgewertet wurden.

3.5.8 STD-NMR- und inverse Sättigungstransfer Experimente

Die Sättigungstransfer-Differenz (STD)-NMR-Spektroskopie wird bei der Charakterisierung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen eingesetzt. Es können Bindungs epitope (Mayer and Meyer, 2001) und K_D -Werte (Fielding, 2003; Mayer and Meyer, 1999) bestimmt werden, außerdem können auch Bindungspartner aus Substanzbibliotheken identifiziert werden (Rademacher et al., 2010).

Bei der STD-NMR-Spektroskopie wird ein Protein selektiv gesättigt, wobei die Sättigungsfrequenz (On-Resonanz-Frequenz) weit genug von der Anregungsfrequenz des Liganden entfernt sein muss, um eine direkte Ligandenanregung zu vermeiden. Die Sättigung wird innerhalb des Proteins durch Spin-Diffusion übertragen. Kommt es zur Bindung eines Liganden an das Protein, erfahren auch die Protonen des Liganden Sättigung. Je dichter der Ligand an dem Protein und je länger die Verweildauer, umso größer die übertragene Sättigung. Da sich die Liganden im ständigen Austausch zwischen dem gebundenen und ungebundenen Zustand befinden, häuft sich die Anzahl an Liganden, welche Sättigung erfahren. Die Sättigung führt zur Abschwächung des Ligandensignals im ^1H -Spektrum. Das Spektrum, in welchem das Protein direkt gesättigt wird, wird als On-Resonanz-Spektrum bezeichnet. Als Referenzspektrum dient das Off-Resonanz-Spektrum, in welchem die Sättigungsfrequenz weit entfernt von Protein- und Liganden-Resonanzen liegt. Die Subtraktion des On-Resonanz- vom Off-Resonanz-Spektrum liefert das sogenannte STD-Spektrum. In diesem sind nur Signale von bindenden Molekülen sichtbar (Mayer and Meyer, 1999, 2001; Meyer and Peters, 2003).

Der inverse Sättigungstransfer beruht auf dem gleichen Prinzip. Hier werden jedoch spezifisch Signale des Liganden gesättigt und die Sättigung abstandsabhängig auf das Protein übertragen. Eine Isotopenmarkierung des Proteins ist dafür erforderlich. Diese Methode wurde bereits auf ^1H , ^{15}N markierte Proteine angewendet (Sakakura et al.,

2008). In dieser Arbeit wurde das Prinzip des inversen Sättigungstransfers auf ^1H , ^{13}C -methylgruppenmarkierte Proteinproben übertragen. Als Modell diente ILV-GTA mit dem Substratanalogon UDP-Gal. Die Intensitätsunterschiede der Proteinsignale zwischen dem Spektrum mit und ohne einer selektiven Liganden-Sättigungspulskaskade wurden bestimmt.

Mit Hilfe eines STD-NMR Experiments wurden die Bindungsepitope von UDP-Gal an GTA bestimmt. Dafür wurde unmarkierte GTA in NMR-Puffer III (Tabelle 3.11) umgepuffert. Die NMR-Proben enthielten 20 μM GTA und 2 mM UDP-Gal. Das Pulsprogramm `stddiffesgp.3.tb` (siehe Anhang 7.2) mit Wasserunterdrückung wurde verwendet. Die On-Resonanz-Frequenz lag bei -2 ppm, die Off-Resonanz-Frequenz bei 80 ppm. Die Sättigungszeit betrug 2 s mit einer Kaskade von Gauß-Pulsen mit einer Feldstärke von 50 Hz. Das Spektrum wurde mit 24 k Datenpunkten aufgenommen, die spektrale Breite lag bei 14 ppm und der Mittelpunkt des Spektrums bei 4,7 ppm. Es wurden 1496 *Scans* aufgenommen mit einer Wartezeit D1 von 5 s. Die Auswertung erfolgte mittels Topspin 3.1. Die relativen STD-Effekte wurden durch Skalierung des Off-Resonanz-Spektrums an das On-Resonanz-Spektrum bestimmt. Das Signal, welches die größte Sättigung erhielt, wurde auf 100% gesetzt und die anderen relativ dazu skaliert (Angulo et al., 2010). Um eine direkte Anregung des Liganden auszuschließen, wurde ein Kontrollexperiment unter den gleichen Bedingungen aufgenommen, jedoch ohne Protein.

Für die Etablierung des inversen Sättigungstransfers an selektiv isotoopenmarkierte Methylgruppen, wurden erst Kontrollmessungen am Liganden bzw. am Protein allein durchgeführt. Die Bedingungen für den Sättigungspuls wurden am Liganden mit Hilfe von STD-NMR Experimenten bestimmt. Die Probe enthielt 2 mM UDP-Gal in NMR-Puffer III. Die optimale Sättigung der Signale bei 5,56 ppm, 5,91 ppm und 7,87 ppm (Angaben ohne TSP- d_4 -Referenzierung) wurde mit einer 2 s-Sättigungspulskaskade von Gauß-Pulsen mit einer Feldstärke von 70 Hz (Abschwächung der Gauß-Pulse von 45 dB bei einer maximalen Leistung von -7 dB) erreicht. Um direkte Proteinsättigung auszuschließen, wurde die Sättigung dieser Frequenzen an einer ILV-markierten GTA Probe mit einer Konzentration von 250 μM in NMR-Puffer III getestet. Bei dem Pulsprogramm `stdmetrhmqcph_new.tb` (siehe Anhang 7.2) wurde das Spektrum mit dem entsprechenden Sättigungspuls und das Referenz-Spektrum ohne Sättigungspuls alternierend aufgenommen. Die Aufnahmebedingungen sind in Tabelle 3.14 dargestellt. Die finalen Spektren wurden mit einer 250 μM ILV-GTA Probe mit 2 mM UDP-Gal in NMR-Puffer III aufgenommen. Die Sättigungszeit betrug 2 s, die Gauß-Pulse hatten eine

Feldstärke von 70 Hz und die Wartezeit zwischen den Durchgängen betrug 4 s. Es wurden 16 *Scans* aufgenommen. Die Auswertung der Spektren erfolgte mit Hilfe von Topspin 3.1 und mit CCPNmr Analysis 2.3.1 (Vranken et al., 2005). Die relative Intensitätsreduktion RIR wurde nach Gleichung 3.4 mit I_{sat} bzw. I_{ref} als Intensität des jeweiligen Signals im Sättigungs- bzw. Referenz-Spektrum berechnet. Die Unsicherheit dieser Quantifizierung wurde nach Gleichung 3.5 bestimmt (Taylor, 1988).

$$RIR = \frac{I_{\text{ref}} - I_{\text{sat}}}{I_{\text{ref}}} * 100 \quad \text{Gleichung 3.4}$$

$$\Delta(RIR) = \frac{I_{\text{sat}}}{I_{\text{ref}}} * I_{\text{noise,ref}} + \frac{1}{I_{\text{ref}}} * I_{\text{noise,sat}} \quad \text{Gleichung 3.5}$$

3.5.9 Titration verschiedener Liganden in GTA und GTB

Um den Einfluss der Ligandenbindung an das jeweilige System zu untersuchen, wurden Titrations durchgeföhrt. Durch die schrittweise Zugabe des Liganden können Änderungen in der chemischen Verschiebung nachvollzogen werden und so Rückschlüsse auf die Proteindynamik erhalten werden.

Zu [U-²H,¹⁵N]-GTA wurde das Substratanalogon UDP zugegeben, zu Ile-GTA, Met-GTB und Mutanten der Met-GTB wurde erst UDP und dann gegebenenfalls HDis-O-Methyl zu titriert. UDP-Gal wurde zu ILV-GTA schrittweise zugegeben. Die Ligandenzugabe erfolgte bis zu einer >90%igen Sättigung (Berechnung siehe Gleichung 3.6) der Proteinbindungsstellen mit Ligand. Die dafür verwendeten K_D -Werte sind Tabelle 3.15 zu finden.

$$\text{Sättigung [\%]} = \frac{[PL]}{[P]} * 100 \quad \text{Gleichung 3.6}$$

$$\text{mit } [PL] = \frac{1}{2} * (([P] + [L] + K_D) - \sqrt{([P] + [L] + K_D)^2 - 4 * [P] * [L]})$$

Es wurden je 4-9 Schritte durchgeföhrt, die genauen Schritte sind dem jeweiligen Ergebnis teil zu entnehmen. Das Protein wurde aus dem 3 mm-Röhrrchen entfernt, mit einer Stammlösung versetzt und wieder ins NMR-Röhrrchen gefüllt. Die Stammlösung hatte dieselbe Zusammensetzung wie die NMR-Probe, versetzt mit einer genügend hohen Ligandenkonzentration. Vor den jeweiligen 2D-Experimenten (Parameter siehe Tabelle 3.14 und Abschnitt 3.5.2) wurde ein 1D-Spektrum mit Wasserunterdrückung

(Pulsprogramm zgsgp) mit 32k Datenpunkten, einer spektralen Breite von 18 ppm, einem spektralen Mittelpunkt von 4,7 ppm und 16 *Scans* aufgenommen. Anhand der ^{13}C -Verschiebung der Isoleucin-Methylgruppen kann man zusätzlich den Anteil ρ der Methylgruppen in Gauche(-)-Konformation bestimmen (Gleichung 3.7) (Hansen et al., 2010a).

$$\rho_{\text{Gauche(-)}} \approx \begin{cases} 1 & \text{für } \delta(\text{C}^{\delta_1}) < 9,3 \text{ ppm} \\ 0 & \text{für } \delta(\text{C}^{\delta_1}) > 14,8 \text{ ppm} \\ \text{sonst} & \\ [14,8 \text{ ppm} - \delta(\text{C}^{\delta_1})]/5,5 \text{ ppm} & \end{cases} \quad \text{Gleichung 3.7}$$

Tabelle 3.15: Dissoziationskonstanten verschiedener Substrate gegenüber GTA und GTB. Messungen wurden in 50 mM MOPS (pH6,7 bei 25°C), 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ und teilweise 1 mM 2-Mercaptoethanol durchgeführt. K_Ds wurden mit Isothermaler Titrationskalorimetrie (ITC) bzw. *Surface Plasmon Resonance* (SPR) bestimmt. Substrat, mit welchem das Protein vor der Titration gesättigt wurde, steht in Klammern. ^a Werte aus (Grimm, 2015), ^b Werte aus (Sindhuwinata et al., 2013), ^c Abschätzung aufgrund der vorhandenen GTB-Daten (Sindhuwinata et al., 2013).

Protein	Substrat	K _D (Bestimmungsmethode)
GTA	UDP	540 μM ^a (SPR)
	HDis-octyl (UDP)	20 μM ^c
	UDP-Gal	1,6 mM ^a (SPR)
GTB	UDP	570 μM ^b (SPR, STD)
	HDis-octyl (UDP)	7 μM ^b (ITC)

3.5.10 K_D-Bestimmung bei [U-²H, ¹⁵N]-GTA und Met-GTB

Aus den Titrationsexperimenten von [U-²H, ¹⁵N]-GTA mit UDP und von Met-GTB mit UDP und HDis-O-Methyl wurden Dissoziationskonstanten bestimmt. Dafür wurden die Daten mittels CCPNmr 2.3.1. (Vranken et al., 2005) und Origin 7 weiter ausgewertet. Es wurden die chemischen Verschiebungen (UDP-Titrations) und die Intensitäten (HDis-O-Methyl-Titration) extrahiert und die durchschnittliche euklidische Verschiebung nach Gleichung 3.8 berechnet (Williamson, 2013).

$$d = \sqrt{\frac{1}{2}[\delta_H^2 + (\alpha * \delta_C)^2]} \quad \text{Gleichung 3.8}$$

δ_H und δ_C stehen dabei für die Differenz der chemischen Verschiebungen zwischen dem jeweiligen Titrationspunkt und der Referenz der jeweiligen Kerne. α ist ein Skalierungsfaktor errechnet aus dem Signalbereich von 1H und ^{15}N bzw. ^{13}C und beträgt hier 0,14 bzw. 0,37 (Williamson, 2013). Für die K_D -Bestimmung wurden nur Abstände betrachtet, die größer als die einfache Standardabweichung aller Abstände sind. Bei der Bestimmung des K_D -Wertes für die HDis-O-Methyl-Titration bei Met-GTB wurden nur Intensitäten der entstehenden Signale betrachtet, da sich die Signale im langsamen Austausch befanden.

Die euklidischen Verschiebungen bzw. Intensitäten wurden gegen die Ligandenkonzentration aufgetragen. Aus den Bindungsisothermen wurden durch Anpassung an Gleichung 3.9 die Dissoziationskonstanten bestimmt.

$$\Delta d = \Delta d_{max} \frac{(n*[P]+[L]+K_D) - \sqrt{(n*[P]+[L]+K_D)^2 - 4n*[P]*[L]}}{2*n*[P]} \quad \text{Gleichung 3.9}$$

3.5.11 SVD-Analyse und K_D -Bestimmung bei ILV-GTA

Für die Titration von ILV-GTA mit UDP-Gal wurde zusätzliche eine SVD-Analyse durchgeführt um das Signalrauschen zu entfernen und die Anzahl an Bindungsereignissen zu bestimmen. Es wird angenommen, dass die chemische Verschiebung δ_{obs} eine Linearkombination der chemischen Verschiebung des Grundzustandes δ_f und der NMR-spektroskopisch nachgewiesenen ligandengebundenen Zustände δ_l ist, unter Berücksichtigung des Anteils an freiem und ligandengebundenem Protein p_f und p_l (siehe Gleichung 3.10) (Arai et al., 2012).

$$\delta_{obs} = \delta_f * p_f + \sum_{i=1}^{n-1} (\delta_l * p_l) \quad \text{Gleichung 3.10}$$

Durch die SVD Analyse konnten vier Komponenten identifiziert werden, deren Autokorrelations-Wert größer als Null ist und deren v_i Vektor einen gleichmäßigen Verlauf zeigt. Die Daten wurden anschließend mit diesen vier Komponenten rekonstruiert und waren mit den Rohdaten vergleichbar (siehe Anhang 7.4). Bei der Nutzung von weniger Komponenten kommt es zu einem Verlust von Daten. Dabei entspricht eine Komponente dem Grundzustand und drei den gebundenen Zuständen. Aus diesen Daten wurden chemische Verschiebungsdifferenzen $\Delta\delta$ der einzelnen Titrationsschritte in der 1H - und ^{13}C -Dimension gebildet und gegen die Ligandenkonzentration aufgetragen. Die drei Zustände spiegeln sich in den Kurven wider (siehe Abbildung 4.34). Aus den größten Verschiebungsdifferenzen $\Delta\delta$ der einzelnen Signale wurde die Standardabweichung für 1H - und ^{13}C -Dimension getrennt

bestimmt. Alle Signale, deren chemische Verschiebungsdifferenzen größer als die jeweilige berechnete Standardabweichung waren (23 Signale in der direkten und 19 Signale in der indirekten Dimension), wurden für die K_D -Bestimmung weiter betrachtet.

Die Anpassung der Daten erfolgte an die Hill-Gleichung (Gleichung 3.11) unter Annahme von $n = 3$ kooperativen Bindungsereignissen.

$$\Delta\delta = \frac{[L]}{K_{D1} + [L]} * \Delta\delta_{max,1} + \sum_{i=2}^n \frac{[L]^{h_i}}{(K_{D_i})^{h_i} + [L]^{h_i}} * \Delta\delta_{max,i} \quad \text{Gleichung 3.11}$$

Mit $\Delta\delta$ als chemische Verschiebungsdifferenz, $\Delta\delta_{max}$ als maximale chemische Verschiebungsdifferenz, K_D als Dissoziationskonstante, n als Anzahl der Bindungsereignisse und h_i als Hill-Koeffizient. Die Bestimmung von K_{D3} erfolgte unter der Annahme, dass $[L] = [L]_{tot}$, da der Ligand hier im deutlichen Überschuss im Vergleich zum Protein vorliegt. Für die ersten beiden Dissoziationskonstanten K_{D1} und K_{D2} wurde die Ligandenkonzentration anhand von Gleichung 3.12, welche auf dem Massenwirkungsgesetz basiert, korrigiert.

$$a = 2 [P]_{tot} - [L]_{tot} + K_{D1} + K_{D2}$$

$$b = ([P]_{tot} - [L]_{tot}) * (K_{D1} + K_{D2}) + (K_{D1} * K_{D2})$$

$$c = -K_{D1} * K_{D2} * [L]_{tot}$$

$$d = \arccos \frac{-2a^3 + 9ab - 27c}{2\sqrt{(a^2 - 3b)^3}}$$

$$[L] = -\frac{a}{3} + \frac{2}{3}\sqrt{(a^2 - 3b)} \cos \frac{d}{3} \quad \text{Gleichung 3.12}$$

Die Dissoziationskonstanten wurden erst von einzelnen Kurven bestimmt und als Grundlage für die globale Kurvenanpassung nach der Hill-Gleichung verwendet. Für die globale Anpassung wurden alle Parameter als variabel betrachtet. Aufgrund der geringen Anzahl an Datenpunkten und der dadurch hohen Fehler in den Hill-Koeffizienten wurden diese am Ende der Anpassung fixiert.

3.5.12 NMR-Spektroskopie mit paramagnetischen Komplexen

NMR Spektroskopie mit paramagnetischen Substanzen stellt eine weitere Methode zur Charakterisierung der Struktur und Dynamik von Biomolekülen dar. Paramagnetismus tritt bei Stoffen mit einem magnetischen Moment und ungepaarten Elektronen auf, wie z.B. bei Mn^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} und Co^{2+} und den meisten Metallionen der Lanthanoide (Otting, 2010). Bei der Bindung von Paramagneten an Biomoleküle kommt es abhängig vom Abstand und der Orientierung des Paramagneten zu Veränderungen in der chemischen Verschiebung, der Linienbreite und den Kopplungskonstanten im

NMR-Spektrum (Pintacuda et al., 2004). Für Struktur- und Dynamikuntersuchungen werden vor allem vier Effekte ausgenutzt: *Paramagnetic Relaxation Enhancement* (PRE), *Pseudocontact Shifts* (PCS), *Residual Dipolar Couplings* (RDCs) und *Cross-Correlated Relaxation* (CCR) (Otting, 2010). Für Untersuchungen mit Paramagneten ist eine dreidimensionale Struktur z.B. durch Kristallographie und die genaue Kenntnis einer Bindungsstelle für den Paramagneten unbedingt erforderlich (Pintacuda et al., 2004).

Für die Zuordnung der Isoleucin- δ 1-Methylgruppen der P-Dimere wurde eine Fucose mit einer chelatierenden Einheit synthetisiert (siehe Abbildung 3.2 und (Mallagaray et al., 2016)), welche u.a. Lanthanoide bindet. In einem Kontrollversuch war La^{3+} (Lanthan) in dem Fucose-Tag chelatiert und im Hauptversuch Gd^{3+} (Gadolinium). Beide werden im Folgenden als La^{3+} -Fucose bzw. Gd^{3+} -Fucose bezeichnet. Gd^{3+} hat die besondere Eigenschaft, dass es nur zu einem PRE-Effekt, nicht aber zu PCS-, RDC- und CCR-Effekten kommt. Das heißt bei der Titration mit Gd^{3+} kommt es nur zu einer abstandsabhängigen Linienverbreiterung der Signale. La^{3+} dient als Referenz, da es diamagnetisch ist, der Ionenradius aber vergleichbar mit dem von Paramagneten ist.

Es wurden 200 μM IV-P-Dimere (2) in NMR-Puffer IV schrittweise mit 100, 250, 350, 500, 650, 750, 1000, 1250, 1500 und 1750 μM La^{3+} - bzw. Gd^{3+} -Fucose versetzt. Bis zu einer Konzentration von 1750 μM ist nur die erste Bindungsstelle von P-Dimeren besetzt (Mallagaray et al., 2016). Anhand der experimentellen Daten und der Daten aus der Kristallstruktur ist so eine potentielle Zuordnung der Isoleucin- δ 1-Methylgruppen möglich. Die Zuordnung wurde durch das Einbringen von Punktmutationen (siehe Abschnitt 3.1) überprüft.

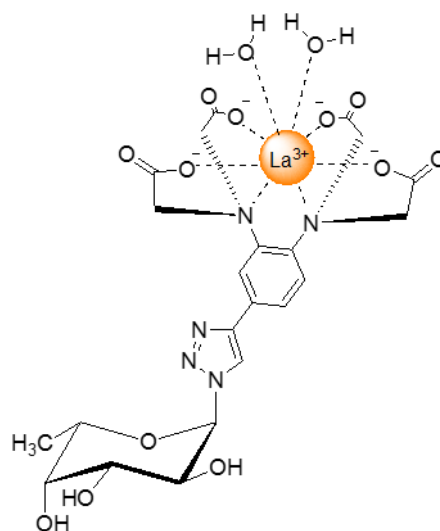


Abbildung 3.2: Fucose mit chelatierendem Element und gebundenem Lanthan-Ion.

4 Ergebnisse

Diese Arbeit gliedert sich in zwei Teile. Im ersten Teil wird die Ligandenbindung und Proteindynamik der GTA und GTB untersucht. Dafür wurden unterschiedliche Markierungsmuster angewendet. Es wurde die Proteindynamik in verschiedenen Zeitbereichen bestimmt, wobei zwischen der Proteinrückgratdynamik und der Seitenkettendynamik unterschieden wird. Des Weiteren wurde das Prinzip des inversen STD-Transfers auf eine methylgruppenmarkierte GTA-Probe angewendet. Der zweite Teil beschäftigt sich mit P-Dimeren von humanen Noroviren. Auch hier werden Dynamikmessungen in Abhängigkeit der Ligandenbindung durchgeführt. Eine Zuordnung der Methylgruppensignale von Isoleucinen mittels paramagnetischer Liganden wird geprüft.

4.1 Untersuchungen am Proteinrückgrat der GTA

Das Proteinrückgrat stellt einen hervorragenden Ansatzpunkt zur Charakterisierung der Ligandenbindung und Proteindynamik dar, da jede Aminosäure (außer Prolin) einzeln betrachtet werden kann. Eine Zuordnung der GTA-Signale sollte mittels Tripelresonanzexperimenten und der selektiven Markierung von einzelnen Aminosäuren (Arginine und Methionine) erfolgen. Die Ligandenbindung des Substratanalogon UDP und dessen Einfluss auf die Proteindynamik im ps-ns-Bereich wurde durch die Bestimmung von T_1 - und T_2 -Zeiten untersucht. Die erhaltenen Daten der GTA werden mit von Lena Lisbeth Grimm erhobenen GTB-Daten verglichen.

4.1.1 Proteinpräparation von Proteinrückgrat-markierten GTA-Proben

Mit einer Dimergröße von 70 kDa ist eine Deuterierung der GTA erforderlich, um ungünstigen Relaxationseigenschaften entgegen zu wirken. Zur Charakterisierung der Ligandenbindung und der Proteindynamik wurden $[U\text{-}^2\text{H},^{15}\text{N}]$ -markierte Proben verwendet. Die Zuordnungsexperimente wurden mit einer $[U\text{-}^2\text{H},^{13}\text{C},^{15}\text{N}]$ -markierten GTA-Probe durchgeführt. Um die Zuordnung zu vervollständigen, wurden in einem sonst deuterierten Protein zusätzlich Methionine bzw. Arginine selektiv ^{15}N -markiert.

Die jeweilige GTA-Probe wurde wie in Abschnitt 3.2.2 beschrieben in *E. coli* synthetisiert und anschließend mittels Säulenchromatographie gereinigt (siehe 3.2.3). Die Qualitätskontrolle fand mittels SDS-PAGE (Abschnitt 3.4.1) und einem

Aktivitätstest (Abschnitt 3.4.3) statt. Die Proteinbestimmung erfolgte durch das NanoDrop ND100 Spektralphotometer und zusätzlich durch einen Bradford-Test mit BGG als Standard (Abschnitt 3.4.2). Alle angegebenen Konzentrationen und Aktivitäten beruhen auf der mittels NanoDrop bestimmten Konzentration. Verunreinigungen der Proteinprobe mit DNA oder UDP werden anhand des Quotienten A_{260}/A_{280} , welcher mittels NanoDrop bestimmt wird, detektiert. Die Ergebnisse sind mit den jeweiligen für die NMR-Experimente verwendeten Puffer in Tabelle 4.1 zusammengefasst. Abbildung 4.1 zeigt ein SDS-Polyacrylamidgel zur Kontrolle der Reinigung von $[U-^2H,^{13}C,^{15}N]$ -GTA, alle anderen Gele waren vergleichbar und werden im Folgenden nicht dargestellt.

Tabelle 4.1: Qualitätskontrolle von Proteinrückgrat-markierten GTA Proben. Angegeben ist das eingesetzte Volumen an Minimalmedium, die Ausbeute pro Liter Kulturmedium, die spezifische Aktivität und der Quotient A_{260}/A_{280} nach Umpufferung in den jeweiligen NMR-Puffer. Die Pufferzusammensetzung ist in Tabelle 3.11 zu finden.* Aktivität nicht bestimmt.

Probe	$[U-^2H,^{15}N]$ -GTA (1)	$[U-^2H,^{15}N]$ -GTA (2)	$[U-^2H,^{13}C,^{15}N]$ -GTA	$[U-^2H,^{15}N]$ -GTA {Met- ^{15}N]-GTA	$[U-^2H,^{15}N]$ -GTA {Arg- ^{15}N]-GTA
Kulturvolumen [mL]	500	500	1000	500	500
Ausbeute [mg/L]	6	8	14	10	6
Spezifische Aktivität [U/mg]	24,3	11,6	12,5	9,6	-*
A_{260}/A_{280}	0,68	0,56	0,57	0,56	0,57
NMR-Puffer	II	II	I	II	II

Die Ausbeute der einzelnen GTA-Proben lag zwischen 6-14 mg pro Liter Bakterienkultur. SDS-PAGE und der Aktivitätstest zeigen, dass alle Proteinproben rein und aktiv sind. Eine Verunreinigung mit DNA oder UDP kann durch den Koeffizient A_{260}/A_{280} von $\sim 0,6$ ausgeschlossen werden.

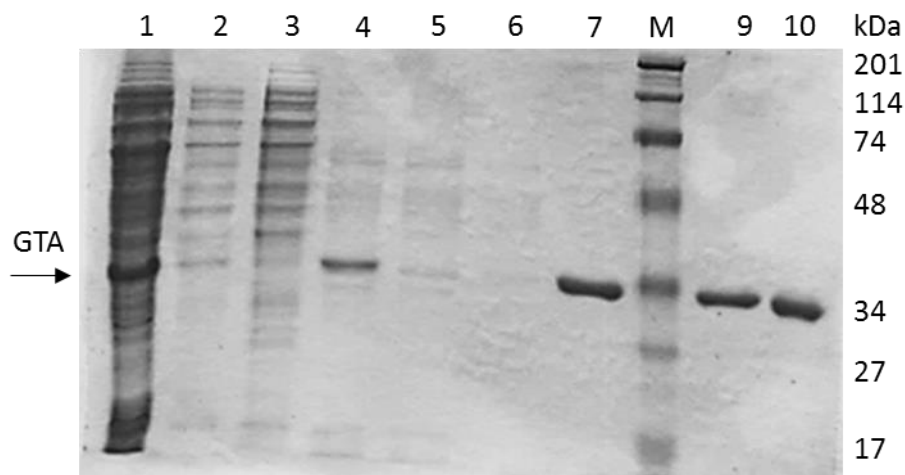


Abbildung 4.1: Exemplarisches SDS-Polyacrylamidgel mit Proben der einzelnen GTA/GTB-Reinigungsschritte. Dargestellt ist die Reinigung von $[U\text{-}^2\text{H},^{13}\text{C},^{15}\text{N}]$ -GTA. Proben wurden 1:1 in 2x reduzierendem Probenpuffer denaturiert und in folgender Reihenfolge auf ein 12%iges SDS-Gel aufgetragen: (1) Zellysate nach Ultrazentrifugation, (2) SP-Sepharose-Durchfluss, (3) SP-Sepharose-Waschfraktion, (4) SP-Sepharose-Eluat, (5) UDP-Hexanolamin-Sepharose-Durchfluss, (6) UDP-Hexanolamin-Sepharose-Waschfraktion, (7) UDP-Hexanolamin-Sepharose-Eluat, (M) Marker, (9) Dialysat und (10) Dialysat in 2x nicht-reduzierendem Probenpuffer.

4.1.2 Bestimmung von Temperatur und Pufferbedingungen für NMR-Experimente

In dieser Arbeit wurden erstmals NMR-Experimente mit isotopenmarkierten GTA-Proben durchgeführt. Aus diesem Grund wurden die optimale Messtemperatur und Pufferbedingung untersucht.

Bei einer Lagerung bei 4-8°C ist die GTA über einen Zeitraum von ca. 6 Monaten ohne erhebliche Protein- und Aktivitätsverluste stabil. Bei höheren Temperaturen ist die GTA instabil und aggregiert mit der Zeit. Die maximale Aktivität wird jedoch bei 37°C erreicht. Um das Temperaturoptimum für die NMR-Experimente zu finden, wurde die Probe $[U\text{-}^2\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -GTA (1) in NMR-Puffer II bei Temperaturen zwischen 275-318 K gemessen. Eine Änderung der Temperatur führt zu einer Veränderung der chemischen Verschiebung. Je höher die Temperatur umso mehr diamagnetisch verschoben sind die Signale. Bei 283 K sind zusätzlich deutlich weniger Signale als bei 298 K detektierbar. (Abbildung 4.2 A). Spektren im Bereich von 298 bis 318 K zeigen ein ähnliches Verteilungsmuster (Abbildung 4.2 B). Durch eine Erhöhung der Temperatur über 298 K kommt es zu einer leichten Verbesserung der Spektren, schwache Signale werden stärker. Jedoch wird das Protein deutlich instabiler. Nach einer 10 h-Messung bei 318 K war das Protein stark ausgefallen und konnte auch nicht wieder in Lösung gebracht

werden. Die NMR-Spektren sollten daher bei 298 K aufgenommen werden, da hier einerseits die meisten Signale zu sehen sind und die Proben andererseits noch über einen längeren Zeitraum von mindestens vier Wochen stabil sind.

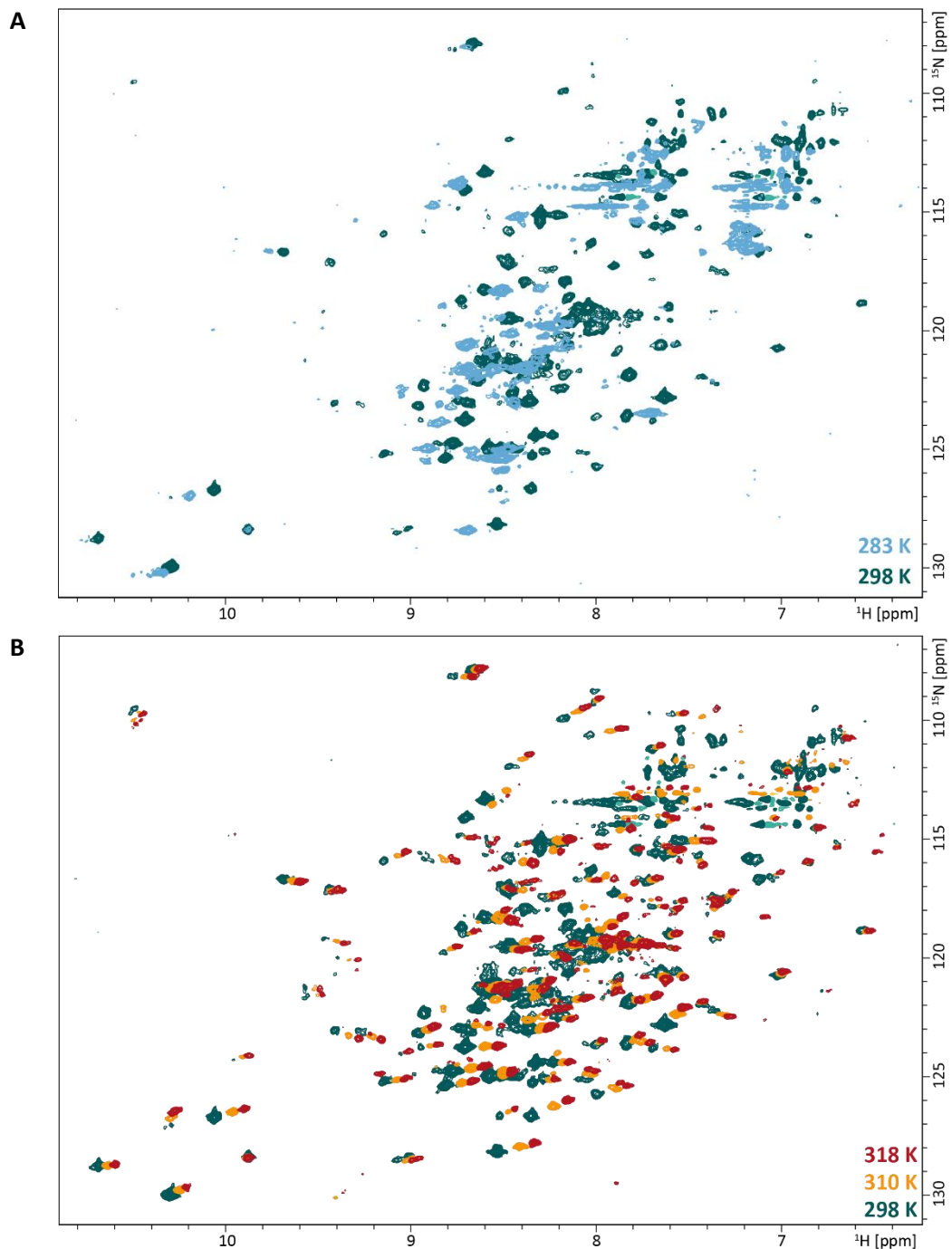


Abbildung 4.2: $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -BEST-TROSY-HSQC Spektren von $[\text{U-}^2\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -GTA (1) bei (A) 283 K (blau), 298 K (grün) und bei (B) 298 K (grün), 310 K (gelb) und 318 K (rot). Gemessen wurde $558 \mu\text{M}$ $[\text{U-}^2\text{H},^{15}\text{N}]$ -GTA (1) in NMR-Puffer II an einem 500 MHz-Spektrometer.

Bisherige SPR- und ITC-Experimente mit GTA und GTB wurden in einem MOPS-Puffer bei pH 6,7 bei RT mit NaCl und Mg^{2+} - oder Mn^{2+} -Ionen durchgeführt. Da Mn^{2+} -Ionen paramagnetisch sind, wird für die NMR-Experimente Mg^{2+} verwendet. MOPS-Puffer zeigt Resonanzsignale im Bereich von 2-4 ppm im 1H -Spektrum. Diese sind zwar außerhalb des Signalbereiches der Amidgruppen, es kann jedoch durch Relaxationsprozesse zum Verlust von Magnetisierung kommen. Vor allem bei Dynamikmessungen sollte dies vermieden werden. Aus diesem Grund wurde weiterhin ein Phosphat-Puffer getestet. Aufgrund von austauschenden Protonen kann dieser vollständig deuteriert werden. Abbildung 4.3 zeigt eine Überlagerung von $[U-^2H,^{15}N]$ -GTA (1) in Phosphat-Puffer und MOPS-Puffer. Es ist erkennbar, dass der Puffer bei einigen Signalen zu einer Änderung in der chemischen Verschiebung führt und zu unterschiedlichen Signalintensitäten. Das GTA-Spektrum in MOPS-Puffer zeigt an einigen Stellen mehr Signale. Prinzipiell sind beide Spektren jedoch vergleichbar, sodass beide Puffer für NMR-Experimente verwendet werden können.

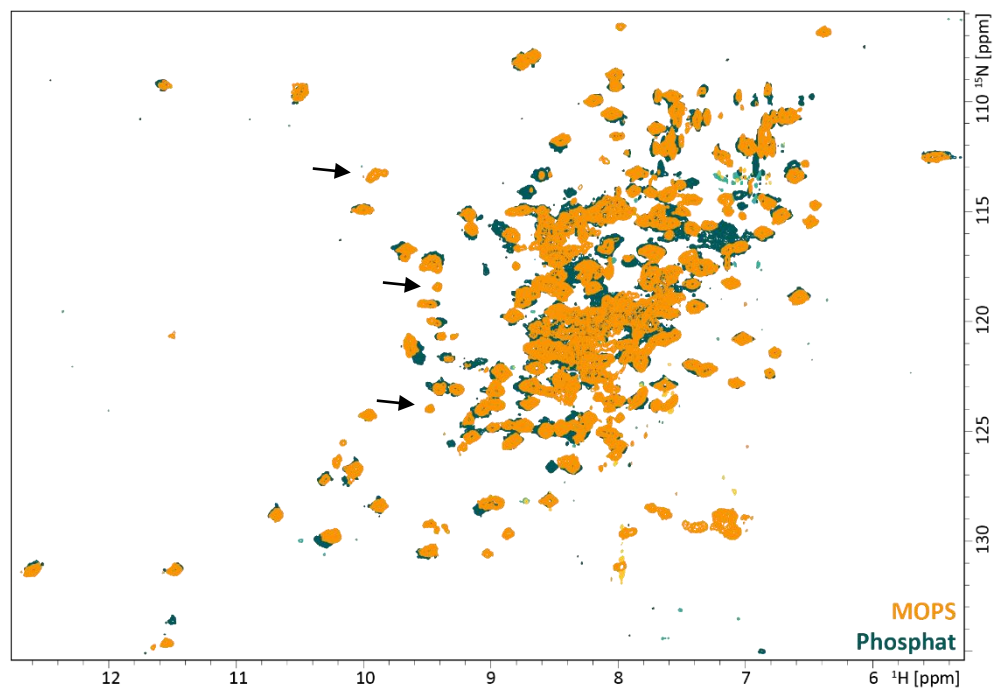


Abbildung 4.3: $^1H,^{15}N$ -TROSY-HSQC-Spektren von $[U-^2H,^{15}N]$ -GTA (1). Grünes Spektrum zeigt 558 μM $[U-^2H,^{15}N]$ -GTA (1) in 25 mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 -Puffer bei pH 6,7, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM 2-Mercaptoethanol und 100 μM TSP- d_4 . Gelbes Spektrum zeigt 300 μM $[U-^2H,^{15}N]$ -GTA (1) in 25 mM MOPS-Puffer bei pH 6,7, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM 2-Mercaptoethanol und 100 μM TSP- d_4 . Gelbes Spektrum wurde mit einer anderen spektralen Weite in der indirekten Dimension aufgenommen, sodass Signale der Arginin-Seitenketten hier bei 129 ppm in der ^{15}N -Dimension erscheinen, anstelle von 116 ppm im Phosphat-Spektrum. Pfeil zeigt Signale, die nur bei der Verwendung von MOPS-Puffer detektierbar sind.

4.1.3 Aufnahme und Auswertung von Tripelresonanzspektren

Aus Kristallstrukturen ist bekannt, dass es bei Ligandenbindung an GTA und GTB zu strukturellen Veränderungen kommt. Um diese strukturellen Veränderungen und auch die Veränderungen in der Dynamik zu untersuchen, ist eine Zuordnung der Amid-Signale im $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektrum unbedingt erforderlich.

Die Zuordnung der GTB-Signale konnte bisher trotz einiger Versuche nicht erfolgen (Grimm, 2015; Sindhuwinata, 2012). Trotz der Unterscheidung in nur vier Aminosäuren, zeigen GTA und GTB deutliche Unterschiede in ihrer Enzymkinetik und Proteindynamik. Die Proteindynamik hat auch einen Einfluss auf die Signalqualität von NMR-Spektren, sodass eine Zuordnung der GTA-Signale möglicherweise erfolgsversprechender ist. Aus diesem Grund wurden Tripelresonanzexperimente mit einer $500\ \mu\text{M}$ [$^2\text{H},^{13}\text{C},^{15}\text{N}$]-GTA-Probe in NMR-Puffer I aufgenommen. Im Vergleich zu den Zuordnungsspektren der GTB fand ein Pufferwechsel von Phosphat- zu MOPS-Puffer statt. MOPS-Puffer ist der Standardpuffer der GTA und GTB und wurde auch für alle bisherigen kinetischen Experimente genutzt. In Abbildung 4.3 ist zusätzlich erkennbar, dass im MOPS-Puffer mehr Signale als im Phosphatpuffer detektiert werden können. Die Messungen erfolgten am BMRZ der Goethe Universität Frankfurt. Sie wurden von Dr. Frank Löhr an einem 600 MHz, 800 MHz oder 950 MHz Spektrometer durchgeführt, da je nach Experiment verschiedene Feldstärken von Vorteil sind. Die Messparameter sind in Abschnitt 3.5.3 und Tabelle 3.12 zu finden. Die Messzeit betrug ungefähr eine Woche. Die Erhöhung der Feldstärke hat eine Verbesserung der Auflösung der Signale im $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektrum zur Folge. Jedoch kommt es trotzdem noch zu einer Überlagerung der Signale, was eine Zuordnung erschwert (Abbildung 4.6). Zusätzlich zu den Amidgruppen des Proteinrückgrates sind auch Seitenkettensignale von Asparagin und Glutamin im Bereich von 6 - 8 ppm bzw. 110 - 114 ppm in der ^1H bzw. ^{15}N -Dimension detektierbar. Diese sind auch in Tripelresonanzspektren zu sehen und überlagern teilweise mit Signalen des Proteinrückgrates. Die Seitenkettensignale der Arginine ($\text{N}\epsilon\text{-H}\epsilon$) werden gefaltet und liegen hier bei 7 bzw. 134 ppm.

Die Tripelresonanzexperimente sind in Abbildung 4.4 dargestellt. Die Auswertung der Spektren erfolgte mit CCPNmr 2.3.1. (Vranken et al., 2005). In Tabelle 4.2 sind die Anzahl der erwarteten und detektierten Signale dargestellt. Im HSQC-Spektrum werden 353 Signale erwartet, diese setzen sich zusammen aus 281 Proteinrückgrat- (298 Aminosäuren - 17 Proline) und 72 Seitenkettensignalen (2x 7 Asn, 2x 15 Gln, 22 Arg und 6 Trp). Mit 93% der erwarteten Signale ist das HSQC Spektrum von sehr guter Qualität.

Im HNCO bzw. HN(CA)CO Spektrum wird die Amidgruppe der jeweiligen Aminosäure mit der Carbonylgruppe der vorherigen bzw. der eigenen und vorherigen Aminosäure korreliert. Im HNCO Spektrum sind 260 von 325 Signalen zu sehen. Im HN(CA)CO Spektrum hingegen nur 219 von 562 erwarteten. Da hier 60% der Signale fehlen, können viele Konnektivitäten nicht gefunden werden. Die Korrelation der Amidgruppe mit der C α -Gruppe der eigenen und vorherigen Aminosäure oder nur der vorherigen Aminosäure findet im HNCA bzw. HN(CO)CA statt. In beiden Spektren werden ca. 50% der erwarteten Signale detektiert. Im HNCACB wird die Amidgruppe des Proteinrückgrates mit C α - und C β -Kohlenstoffen der eigenen und vorherigen Aminosäure korreliert. Das HNCACB Spektrum ist wichtig für die Zuordnung des Aminosäure-Typs. Serine, Threonine und Alanine haben spezifische C β -Verschiebungen, sodass diese eindeutig identifiziert werden können und so einen Ansatzpunkt für die Zuordnung liefern. Es wurden 43% der erwarteten Signale detektiert.

Insgesamt wurden 20 Verknüpfungen von zwei Aminosäure-Resten, 7 Verknüpfungen von 3 Aminosäure-Resten und eine Verknüpfung von 10 Aminosäure-Resten gefunden, welche in Abbildung 4.5 dargestellt ist. Von diesen Verknüpfungen konnten 18 Aminosäuren eindeutig zugeordnet werden (Abbildung 4.6).

Tabelle 4.2: Erwartete und detektierte Signale in Tripelresonanzexperimenten der [U- $^2\text{H},^{13}\text{C},^{15}\text{N}$]-markierten GTA bei 298 K. Probe enthielt 500 μM GTA in NMR-Puffer I. + Asn, Gln und Arg bzw. * Asn und Gln Seitenkettensignale bei Zählung mit berücksichtigt, da diese nicht eindeutig von Rückgrat-Signalen zu trennen waren. Aufnahmeparameter siehe Tabelle 3.12.

Spektrum	Erwartete Signale	Detektierte Signale	Prozentsatz
$^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC	353*	328*	93%
HNCO	325*	260*	80%
HN(CA)CO	562	219	39%
HNCA	562	270	48%
HN(CO)CA	281	130	46%
HNCACB	1134*	492*	43%

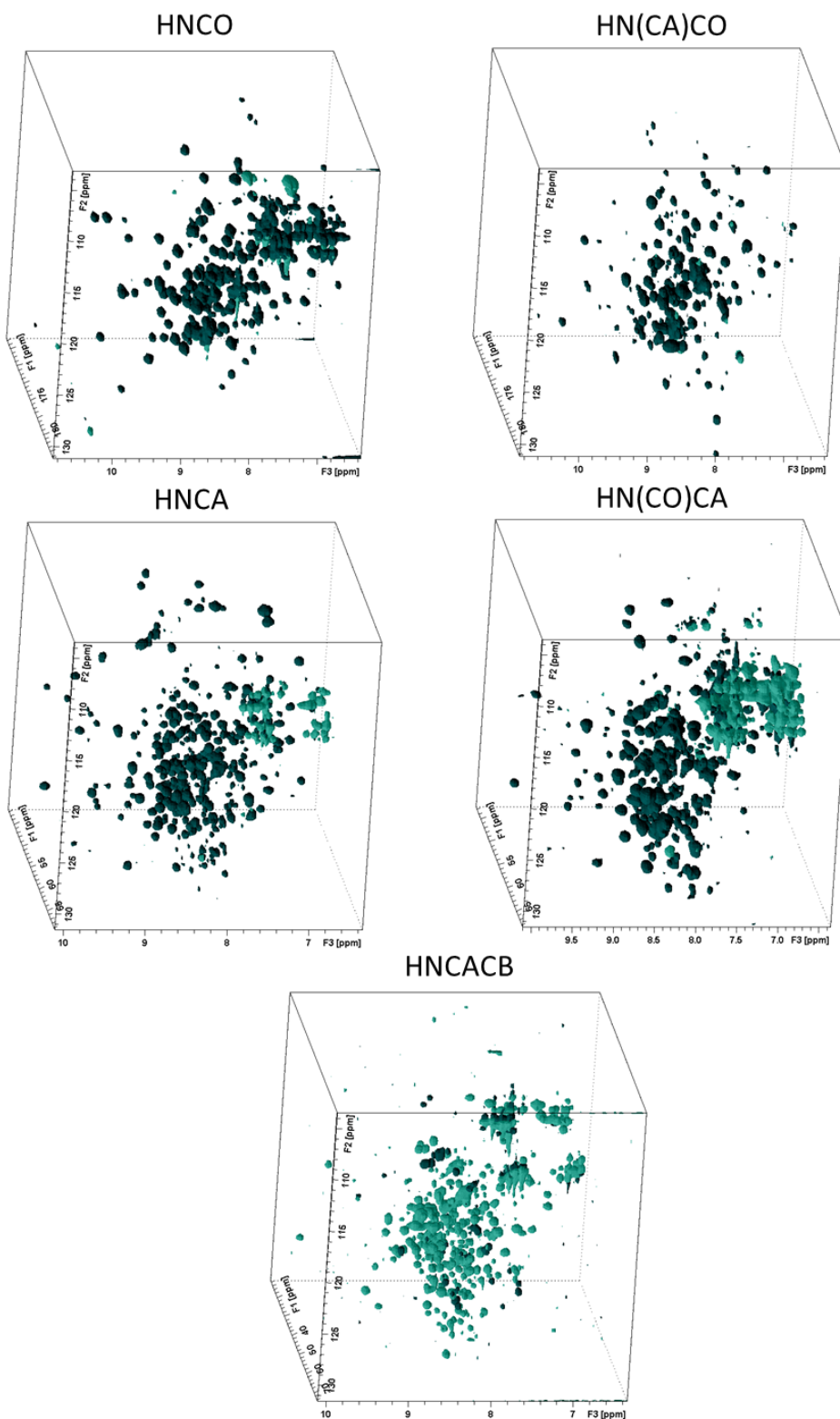


Abbildung 4.4: Mit $[U\text{-}^2\text{H},^{13}\text{C},^{15}\text{N}]$ -GTA aufgenommene Tripelresonanzspektren. Probe enthält $500\ \mu\text{M}$ GTA in NMR-Puffer I. Aufnahmeparameter siehe Tabelle 3.12. Positive Signale in dunkelgrün, negative Signale in hellgrün dargestellt. F1 ist die ^{13}C -, F2 die ^{15}N - und F3 die ^1H -chemische Verschiebung.

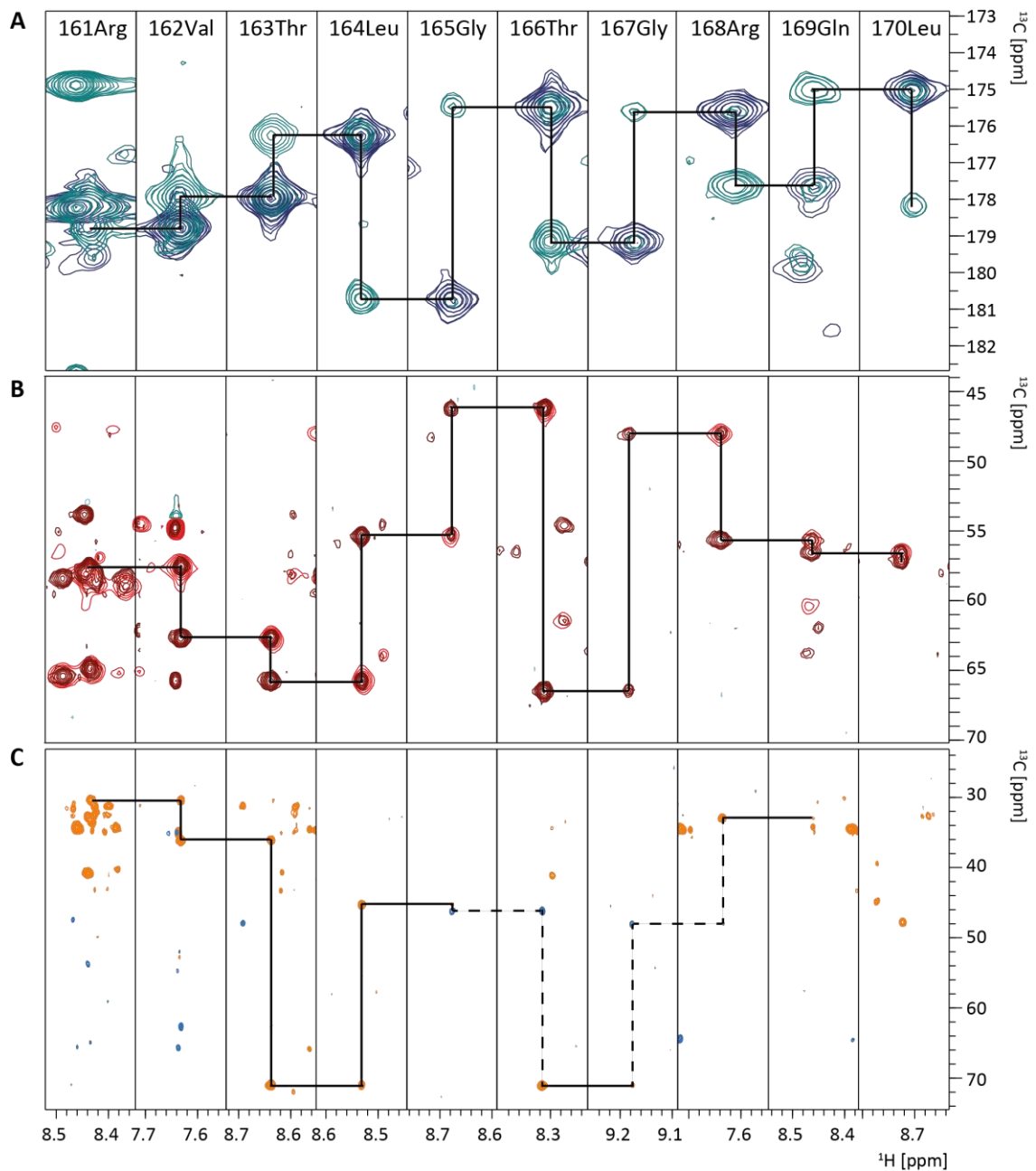


Abbildung 4.5: Zuordnungsbeispiel von $[\text{U-}^2\text{H},^{13}\text{C},^{15}\text{N}]$ -GTA durch Tripelresonanzexperimente. Probe enthielt 500 μM GTA in NMR-Puffer I. Beispiel zeigt Zuordnung der Reste 161-170. Gezeigt sind die jeweiligen ^{15}N -Ebenen von (A) HNCOC (blau) und HN(CA)CO (grün), (B) HNCA (braun) und HN(CO)CA (rot) und (C) HNCACB Spektren. Korrelationen sind durch schwarze Linien dargestellt. Korrelation im HNCACB Spektrum sind über $\text{C}\beta$ -Signale (orange) durch durchgezogenen Linien bzw. über $\text{C}\alpha$ -Signale (blau) durch gestrichelte Linien dargestellt.

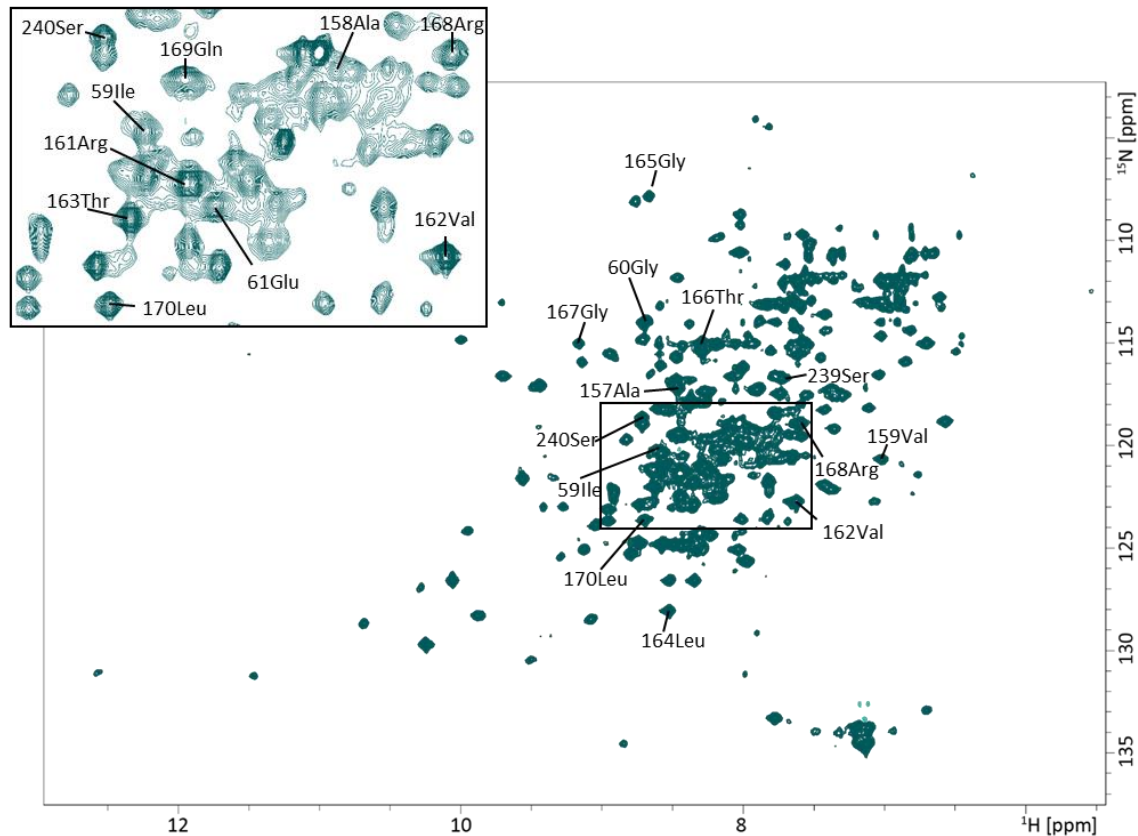


Abbildung 4.6: $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC Spektrum von $[\text{U-}^2\text{H},^{13}\text{C},^{15}\text{N}]$ -GTA bei 800 MHz. Probe enthält 500 μM GTA in NMR-Puffer I. Gezeigt sind zusätzlich durch Tripelresonanzspektren zugeordnete Aminosäuren.

4.1.4 Selektive ^{15}N -Markierung von Argininen und Methioninen

Mit Hilfe der Tripelresonanzspektren konnten nur 6% der Aminosäuren zugeordnet werden. Um trotzdem einen Einblick in das aktive Zentrum bzw. die Schleifenregionen zu bekommen, sollten einzelne Aminosäuren selektiv markiert werden. Dafür können nur Aminosäuren verwendet werden, welche sich am Ende der Aminosäure-Stoffwechselkette befinden, da es sonst zu ungewollten Kreuzmarkierungen kommt. Dies trifft u.a. auf Methionine und Arginine zu. Diese beiden Aminosäuren sind auch an sehr interessanten Regionen im Protein zu finden. Die interne Schleife enthält beispielsweise drei Methionine und das Arginin an Position 352 interagiert im geschlossenen Zustand mit der internen Schleife.

Die ^{15}N -markierten Aminosäuren wurden wie in Abschnitt 3.3.2 beschrieben, 1 h vor Induktion dem Minimalmedium zugegeben (siehe auch Tabelle 3.3). Das Minimalmedium enthielt außerdem *Eco E. coli OD 2 D-Medium*, welches hauptsächlich aus deuterierten Aminosäuren besteht, um möglichen Kreuzmarkierungen zwischen

den Aminosäuren vorzubeugen. Die Proben $[U\text{-}^2\text{H}, \{\text{Met-}^{15}\text{N}\}]$ -GTA und $[U\text{-}^2\text{H}, \{\text{Arg-}^{15}\text{N}\}]$ -GTA wurden in NMR-Puffer I umpuffert.

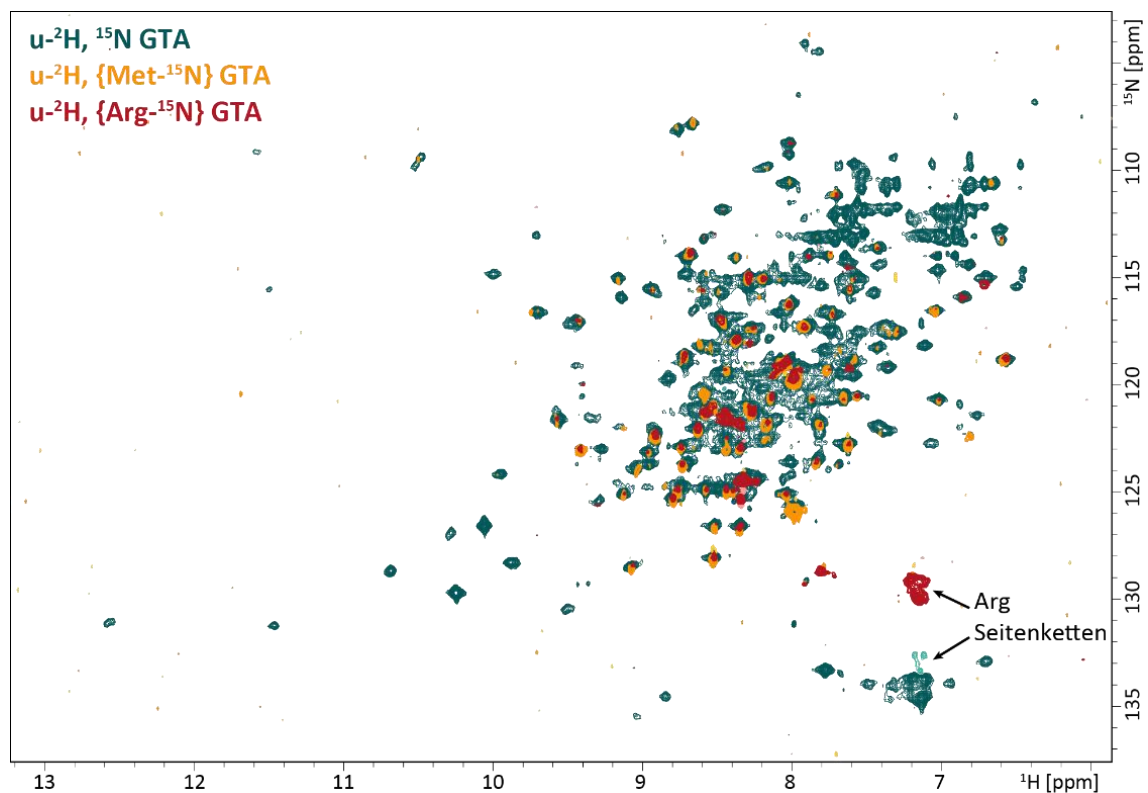


Abbildung 4.7: $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektren von $[U\text{-}^2\text{H},^{15}\text{N},^{13}\text{C}]$ -GTA (grün) mit selektiv ^{15}N -Met (gelb) und ^{15}N -Arg (rot) markierter GTA. $[U\text{-}^2\text{H},^{15}\text{N}]$ -GTA Probe enthielt $500\ \mu\text{M}$ GTA in NMR-Puffer I, gemessen bei $800\ \text{MHz}$. Spektrum überlagert mit $675\ \mu\text{M}$ $[U\text{-}^2\text{H}, \{\text{Met-}^{15}\text{N}\}]$ -GTA und $378\ \mu\text{M}$ $[U\text{-}^2\text{H}, \{\text{Arg-}^{15}\text{N}\}]$ -GTA in NMR-Puffer I, gemessen bei $500\ \text{MHz}$. Arg-Seitenketten sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Wegen unterschiedlichen spektralen Mittelpunkten sind die chemischen Verschiebungen der Seitenkettensignale unterschiedlich.

Im $[U\text{-}^2\text{H}, \{\text{Met-}^{15}\text{N}\}]$ GTA Spektrum wurden zehn Signale, im $[U\text{-}^2\text{H}, \{\text{Arg-}^{15}\text{N}\}]$ GTA Spektrum 22 Signale des Proteinrückgrates und 22 Seitenkettensignale erwartet. In Abbildung 4.7 ist erkennbar, dass beide Spektren deutlich mehr Signale zeigen. Das $[U\text{-}^2\text{H}, \{\text{Met-}^{15}\text{N}\}]$ GTA Spektrum zeigt ca. 90 Signale und $[U\text{-}^2\text{H}, \{\text{Arg-}^{15}\text{N}\}]$ -GTA Spektrum ca. 140. Beide zeigen jedoch keine Trp-, Asn- und Gln-Seitenketten. Die Arg-Seitenketten sind nur im Arginin-markierten Spektrum detektierbar. Weiterhin sollten sie aufgrund des Markierungsmusters komplett unterschiedliche Signale zeigen, jedoch überlagern die meisten. Es fanden also Kreuzmarkierungen zwischen den Aminosäuren statt. Eine eindeutige Zuordnung der Methionin- und Arginin-Proteinrückgrat-Signale ist daher nicht möglich.

4.1.5 $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Experimente zur Charakterisierung der UDP-Bindung an GTA

Anhand von Kristallstrukturen wurde bereits gezeigt, dass es durch die Bindung von UDP zu strukturellen Änderungen im Protein kommt (Alfaro et al., 2008). Diese sollten auch mittels NMR-Spektroskopie analysiert werden. Da bisher keine vollständige Zuordnung möglich war, wird die Bindung von UDP an GTA nur phänomenologisch betrachtet.

Eine $370\ \mu\text{M}$ $[\text{U-}^2\text{H},^{15}\text{N}]$ -GTA (2) (Nummerierung siehe Tabelle 4.1) wurde schrittweise mit UDP titriert. Die Titrationslösung enthielt die gleiche GTA-Konzentration wie die NMR-Probe, um die Proteinkonzentration konstant zu halten. Die UDP-Konzentrationen der Titrationschritte lagen bei $137\ \mu\text{M}$ (15% Sättigung), $315\ \mu\text{M}$ (30% Sättigung), $680\ \mu\text{M}$ (50% Sättigung), $2,4\ \text{mM}$ (80% Sättigung) und $5,9\ \text{mM}$ (91% Sättigung). Die Sättigung wurde anhand des mittels SPR-bestimmten K_D von $540\ \mu\text{M}$ mit Gleichung 3.6 ermittelt (Grimm, 2015).

Während der Titration wurde UDP teilweise zu Uracil abgebaut. In Abbildung 4.8 ist jedoch erkennbar, dass $>80\%$ noch als UDP vorliegt. Eine genaue Abschätzung der tatsächlichen UDP-Konzentration ist aufgrund der Linienverbreiterung des UDP-Signals bei $7,97\ \text{ppm}$ nicht möglich. Diese Linienverbreiterung bestätigt jedoch, dass nur UDP, nicht aber UMP oder Uracil an GTA binden, da hier keine Verbreiterung zu beobachten ist.

Die Zugabe von UDP führt unter anderem zu einer schrittweisen Verschiebung der Signale, diese Signale befinden sich im schnellen Austausch. Etwa 40 Signale verschwinden durch die UDP-Zugabe, andere kommen wiederum dazu. Bei einigen Signalen ist ein langsamer Austausch zu beobachten. Die Zugabe von UDP führt außerdem bei einigen Signalen zu einem Intensitätsverlust. Im Laufe der Titration erlangen einige dieser Signale jedoch ihre Anfangsintensität zurück. Weitere Signale bewegen sich erst ab einer Sättigung von 30% oder ändern während der Titration ihre Bewegungsrichtung (Abbildung 4.9). Um die chemische Verschiebungsänderung genauer zu untersuchen, wurden die euklidischen Verschiebungen in Bezug auf das Referenzspektrum ohne UDP gebildet (siehe Abschnitt 3.5.10 und Gleichung 3.8) und ihre Standardabweichung bestimmt. Alle Werte, die größer als die einfache Standardabweichung sind, wurden näher betrachtet. Es wurden insgesamt 254 Signale detektiert, von denen sich 39 bei einer Zugabe von $137\ \mu\text{M}$ (15% UDP-Sättigung) bewegen. Je mehr UDP zugegeben wird, umso mehr Signale zeigen eine Änderung in der chemischen Verschiebung. Bei 91%iger UDP-Sättigung haben knapp 50% der

Signale (121 von 254) eine euklidische Verschiebung, welche größer als die einfache Standardabweichung ist.

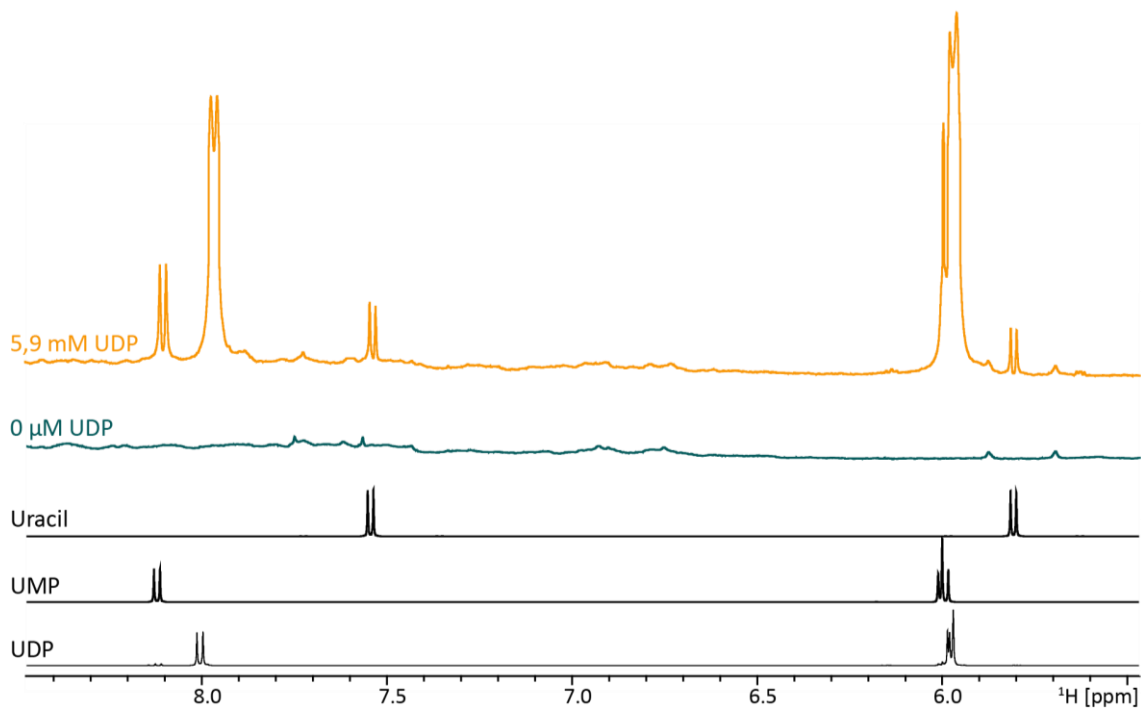


Abbildung 4.8: ^1H -Spektren von $[\text{U-}^2\text{H},^{15}\text{N}]$ -GTA mit und ohne UDP. Dargestellt sind Protonenspektren einer $370\ \mu\text{M}$ $[\text{U-}^2\text{H},^{15}\text{N}]$ -GTA (2) Probe in NMR-Puffer II (Tabelle 3.11) (grün) sowie mit $5,9\ \text{mM}$ UDP (gelb). In schwarz sind Referenzspektren von Uracil, UMP und UDP gezeigt.

Aus den chemischen Verschiebungsänderungen der jeweiligen Titrationschritte ist es möglich, den K_D -Wert abzuschätzen. Für die Auswertung wurden nur Signale im schnellen Austausch betrachtet, bei welchen die euklidische Verschiebung aller Titrationschritte größer als die einfache Standardabweichung war. Aus den euklidischen Verschiebungen und den UDP-Konzentrationen wurden Bindungsisotherme gebildet, welche an Gleichung 3.9 angepasst wurden (Abbildung 4.10). Der K_D -Wert der Bindung von UDP an GTA liegt bei $100 \pm 13\ \mu\text{M}$.

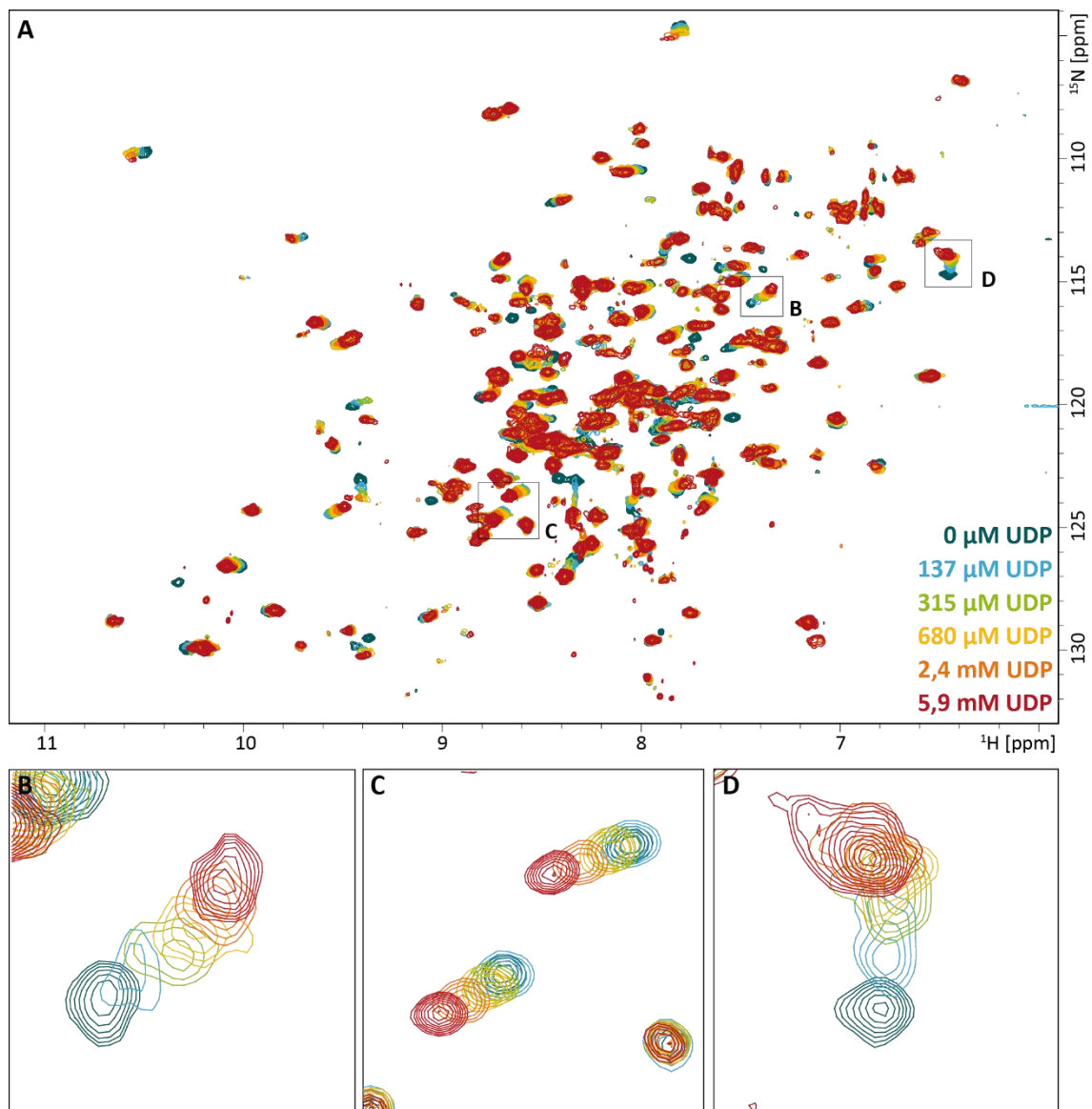


Abbildung 4.9: UDP-Titration von $[\text{U-}^2\text{H},^{15}\text{N}]$ -GTA. Eine 280 μM $[\text{U-}^2\text{H},^{15}\text{N}]$ -GTA (2) Probe in NMR-Puffer II (Tabelle 3.11) (grün) wurde schrittweise mit UDP versetzt. Die $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektren zeigen die schrittweise Änderung der chemischen Verschiebung induziert durch UDP-Bindung. Die jeweiligen Spektren und UDP-Konzentrationen sind farbkodiert. Legende siehe Bild. (A) zeigt gesamtes Spektrum, (B) – (D) zeigen Ausschnitte aus (A). Während der Titration kommt es u.a. zu (B) schnellem Austausch, (C) Verschiebungen erst ab 315 μM UDP (30% Sättigung) und (D) zur Änderung der Bewegungsrichtung während der Titration.

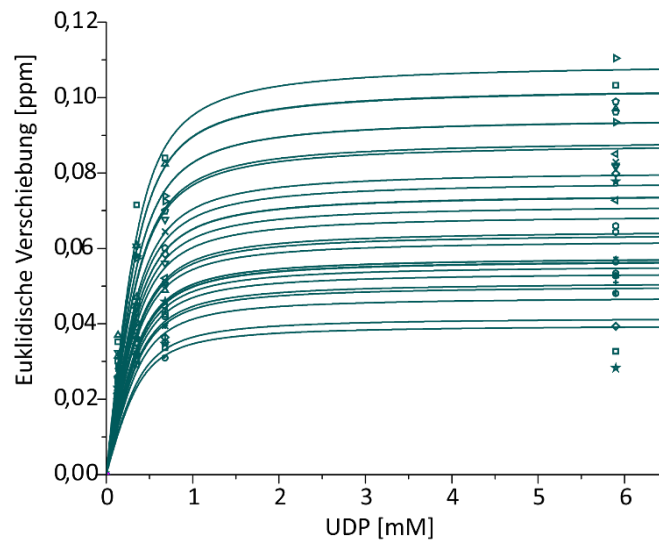


Abbildung 4.10: Bindungsisotherme der Bindung von UDP an [U- ^2H , ^{15}N]-GTA. Ausgewertet wurden Signale, deren euklidische Verschiebung während der gesamten Titration größer als die einfache Standardabweichung war. Die euklidische Verschiebung wurde gegen die UDP-Konzentration aufgetragen und an Gleichung 3.9. angepasst. Die Proteinkonzentration betrug $280\ \mu\text{M}$ und es wurde von $n = 1$ Bindungsstellen ausgegangen. Der ermittelte K_D -Wert beträgt $100 \pm 13\ \mu\text{M}$ ($R^2 = 0,94$ und $\chi^2 = 4,3 \times 10^{-5}$).

4.1.6 Untersuchung der Proteindynamik im ps-ns Bereich

Die Dynamik im ps-ns-Bereich wird durch die Messung von longitudinalen (T_1) und transversalen (T_2) Relaxationszeiten charakterisiert. Da keine vollständige Zuordnung der Amidsignale des ^1H , ^{15}N -TROSY-HSQC-Spektrums vorhanden ist, können zwar nicht einzelne flexible Regionen identifiziert werden, jedoch kann ein Überblick über das gesamte Protein gewonnen werden. Außerdem wurde der Einfluss der UDP-Bindung auf die Proteindynamik untersucht.

Die mittlere longitudinale Relaxationszeit der GTA beträgt $1,50 \pm 0,53\ \text{s}$. Die Zugabe von UDP hat eine deutliche Erhöhung der T_1 -Zeit auf $2,61 \pm 0,77\ \text{s}$ zur Folge. Die Werte schwanken ohne UDP zwischen 0,4 und 3 s und mit UDP zwischen 0,8 und 4,5 s. Auch die T_2 -Zeiten weisen eine sehr große Schwankung auf, auch erkennbar an der großen Standardabweichung (Abbildung 4.11 und Tabelle 4.3). Viele Signale konnten nicht ausgewertet werden, da die Magnetisierung bereits nach sehr kurzen Wartezeiten τ von 17-51 ms relaxiert war. Die hier bestimmte mittlere T_2 -Zeit ist demzufolge zu hoch. Dieser schnelle Verlust der Magnetisierung ist auch eine Erklärung für das Fehlen vieler Kreuzsignale in den 3D-Spektren. Die Bindung von UDP hat auf die mittlere transversale Relaxationszeit keinen erkennbaren Einfluss (Tabelle 4.3).

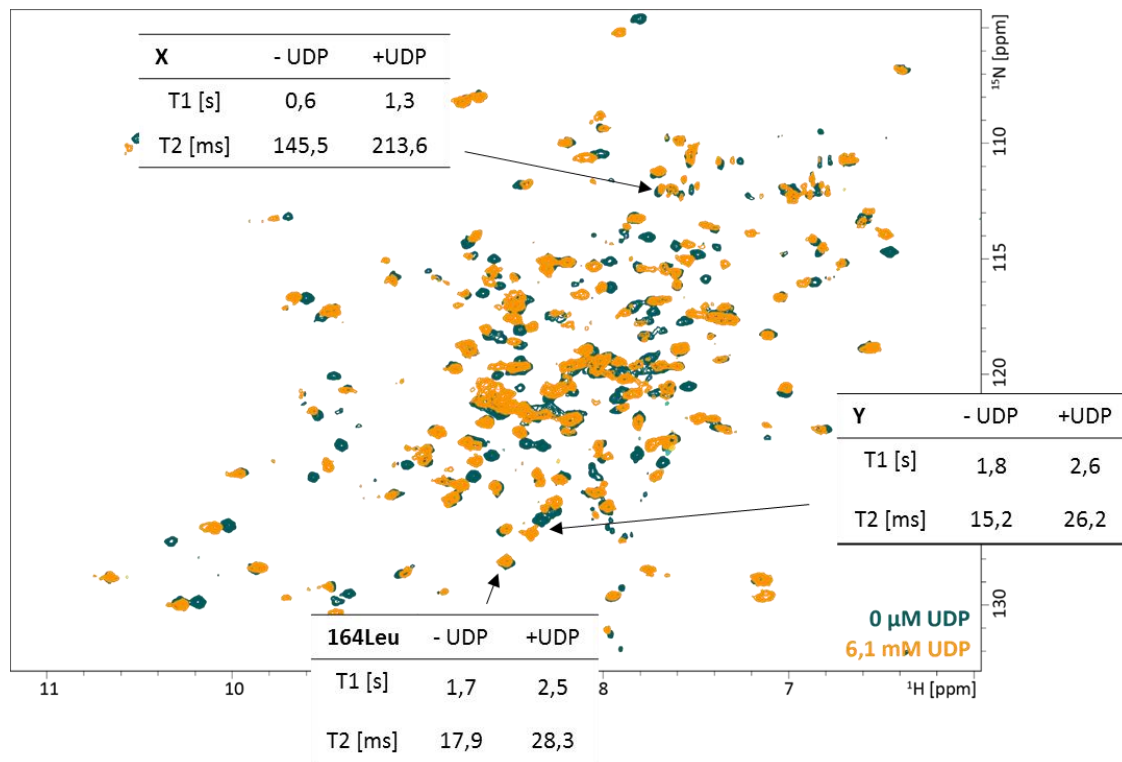


Abbildung 4.11: $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC Spektren von $[\text{U}-^2\text{H},^{15}\text{N}]$ -GTA ohne (grün) und mit UDP (gelb). Das grüne Spektrum zeigt eine $512 \mu\text{M}$ $[\text{U}-^2\text{H},^{15}\text{N}]$ -GTA (2) Probe in NMR-Puffer II, das gelbe eine $205 \mu\text{M}$ $[\text{U}-^2\text{H},^{15}\text{N}]$ -GTA (II) Probe mit $6,15 \text{ mM}$ UDP. Tabellen in der Abbildung zeigen Beispiele für T_1 - und T_2 -Zeiten einzelner Aminosäuren.

Tabelle 4.3: Zusammenfassung der T_1 - und T_2 -Zeiten der GTA-Amidgruppen in An- und Abwesenheit des Donorsubstrates UDP. Gezeigt sind Mittelwerte und ihre Standardabweichung. Zahlen in Klammern geben die Anzahl der analysierten Daten an.

	ohne UDP	mit UDP
T_1 [s]	$1,50 \pm 0,53$ (118)	$2,61 \pm 0,77$ (65)
T_2 [ms]	$85,30 \pm 73,51$ (80)	$78,80 \pm 62,28$ (68)

4.1.7 Vergleich der $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC Spektren von GTA und GTB

GTA und GTB unterscheiden sich nur in vier Aminosäuren. In Abbildung 4.12 ist erkennbar, dass die Grundstruktur von GTA und GTB gleich ist. Jedoch sind auch deutliche Unterschiede zwischen den Spektren sichtbar. Einige Signale sind verschoben, andere sind nicht vorhanden bzw. kommen hinzu. Eine eindeutige Zuordnung der vier unterschiedlichen Aminosäuren an Position 176, 235, 266 und 268 ist nicht möglich. Jedoch können die in Abschnitt 4.1.3 erfolgten Zuordnungen auf die GTB übertragen werden. Nur für die Zuordnung von Ser 239 ist keine eindeutige Übertragung möglich. L. L. Grimm hat bereits Zuordnungsexperimente mit GTB durchgeführt und konnte sechs Aminosäuren zuordnen, welche die Übertragung bestätigen (Grimm, 2015). Die Zuordnungsspektren der GTB wurden in Phosphat-Puffer, die von GTA hingegen in MOPS-Puffer durchgeführt.

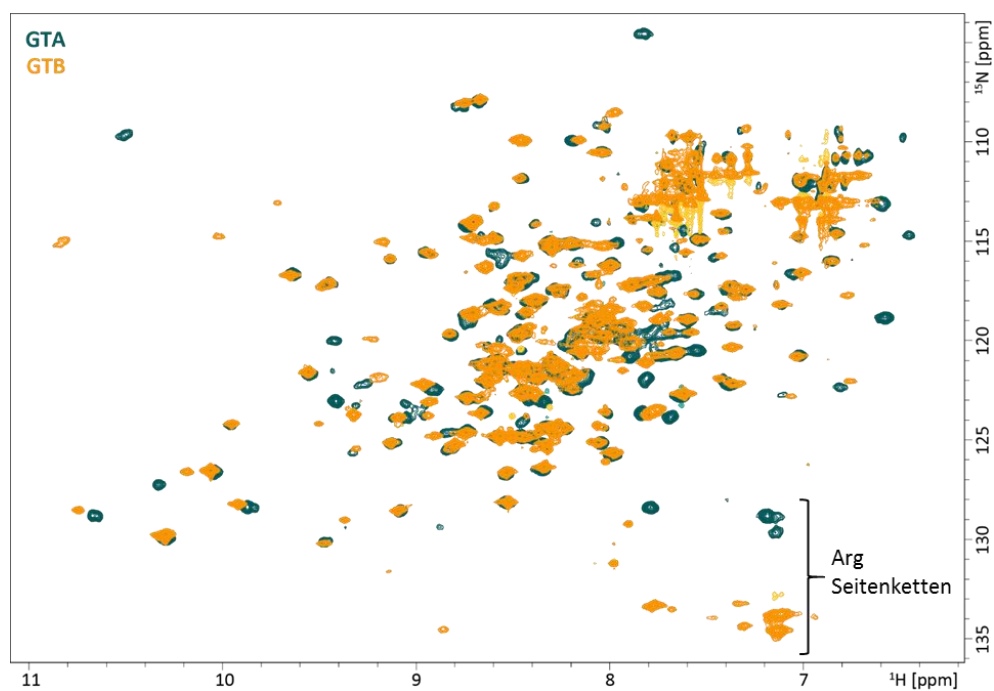


Abbildung 4.12: Vergleich von $[\text{U-}^2\text{H},^{15}\text{N}]$ -GTA (grün) und $[\text{U-}^2\text{H},^{15}\text{N},^{13}\text{C}]$ -GTB (gelb). Dargestellt ist $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektrum einer $512\ \mu\text{M}$ $[\text{U-}^2\text{H},^{15}\text{N}]$ -GTA (2) Probe bei $500\ \text{MHz}$ und $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -BEST-TROSY-HSQC Spektrum einer $1\ \text{mM}$ $[\text{U-}^2\text{H},^{15}\text{N},^{13}\text{C}]$ -GTB Probe bei $950\ \text{MHz}$. Beide Proben befinden sich in NMR-Puffer II. Arg-Seitenketten zeigen unterschiedliche chemische Verschiebungen wegen unterschiedlichen spektralen Mittelpunkten. GTB-Spektrum von L.L. Grimm zur Verfügung gestellt.

Bei der Bindung von UDP an GTA und GTB zeigen beide Proteine ein ähnliches Verhalten. Neben Signalen, die sich im schnellen Austausch befinden und sich kontinuierlich bewegen, existieren auch Signale, welche sich im langsamen Austausch befinden oder sich erst bei höheren Sättigungskonzentrationen bewegen. Dies deutet auf einen mehrstufigen Bindungsprozess hin. Die Anzahl der Signale, welche sich bei 90%iger UDP-Sättigung insgesamt verschieben, unterscheidet sich stark zwischen GTA und GTB. Bei der GTA sind es ca. 48% (siehe Abschnitt 4.1.5) bei der GTB nur 22% der Signale. Die UDP-Bindung an GTA hat demnach einen deutlich größeren Einfluss als die Bindung an GTB. Jedoch kann man aufgrund des starken UDP-Abbaus während der Titration mit GTB nicht von einer vollständigen Sättigung ausgehen, sodass der Wert von 22% wahrscheinlich falsch zu niedrig ist (Grimm, 2015).

4.2 Seitenkettenanalyse von $[U\text{-}^2\text{H}, \{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}]$ -markierter GTA

Aufgrund der Proteindimergröße von ca. 70 kDa ist die Proteinrückgrat-Analyse der GTA sehr schwierig, da viele Signale überlagern bzw. Signale in den Tripelresonanzspektren fehlen, sodass eine vollständige Signalzuordnung nicht möglich ist. Die Markierung von Methylgruppen der Aminosäure-Seitenketten stellt eine sehr gute Alternative dar, da es insgesamt zu einer Signalreduktion kommt. Außerdem geben Methylgruppen intensivere NMR-Signale als Amide, da sie drei Protonen tragen.

Eine Möglichkeit der Methylgruppenmarkierung, ist die spezifische ^{13}C -Isotopenmarkierung der Isoleucinmethylgruppe an Position $\delta 1$. GTA hat 10 Isoleucine, von denen eins nah an der internen Schleife liegt (Ile 192) und eins im aktiven Zentrum (Ile 123). Eine Analyse dieser Methylgruppen kann Informationen über die Substratbindung und Katalyse der GTA geben. In dieser Arbeit wurde die UDP- und HDis-Bindung an $[U\text{-}^2\text{H}, \{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}]$ -markierte GTA – im Folgenden nur als Ile-GTA bezeichnet – sowie die Methylgruppendiffusionsdynamik im μs -ms Bereich untersucht. Diese Daten werden mit den von Lena Lisbeth Grimm erhobenen Ile-GTB-Daten verglichen (Grimm, 2015).

4.2.1 Probenpräparation von Ile-GTA

Die Synthese, Reinigung und Qualitätskontrolle von Ile-GTA erfolgte wie in Abschnitt 3.2.2, 3.2.3 und 3.4 beschrieben. Es wurden insgesamt drei Präparationen

durchgeführt. Alle Proben wurden in NMR-Puffer III umgepuffert. Die angegebenen Konzentrationen beruhen auf der mittels NanoDrop bestimmten. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.4 zusammengefasst.

Die Ausbeuten der Präparationen 2 und 3 sind deutlich geringer als die der ersten. Die Glycerinkultur als Ursache kann ausgeschlossen werden, da auch andere Präparationen damit inokuliert wurden und Ausbeuten im Bereich von 6-14 mg/L damit erzielt wurden (siehe Tabelle 4.1). Auch die Medienzusammensetzung war gleich. In den SDS-Polyacrylamid-Gelen ist jedoch erkennbar, dass es bei der Kationenaustauschchromatographie zu Verlusten kam. Sowohl im Durchfluss als auch in der Waschfraktion der SP-Sepharose Reinigungsschritte ist eine GTA-Bande erkennbar. Jedoch sind alle Proben aktiv und rein (exemplarische SDS-PAGE siehe Abschnitt 4.1.1). Eine DNA- und UDP-Verunreinigung kann anhand des Koeffizient A_{260}/A_{280} von $\sim 0,57$ ausgeschlossen werden.

Tabelle 4.4: Qualitätskontrolle von Ile-GTA Proben. Angegeben ist das eingesetzte Volumen an Minimalmedium, die Ausbeute pro Liter Kulturmedium, die spezifische Aktivität und der Quotient A_{260}/A_{280} nach Umpufferung in NMR-Puffer III. Die Pufferzusammensetzung ist in Tabelle 3.11 zu finden.

Probe	Ile-GTA (1)	Ile-GTA (2)	Ile-GTA (3)
Kulturvolumen [mL]	100	200	200
Ausbeute [mg/L]	7,5	2,7	3,6
Spezifische Aktivität [U/mg]	10,5	8,6	13,6
A_{260}/A_{280}	0,56	0,56	0,59

4.2.2 $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -methyl-TROSY-Experimente mit Ile-GTA und Charakterisierung der UDP- und HDIs-Bindung

Die NMR-Analyse der Ile-GTA Proben erfolgte durch $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -methyl-TROSY-Spektren. Diese wurden von L. L. Grimm und T. Biet am Institut für Chemie etabliert. Ein großer Vorteil dieser Methode liegt in der geringen benötigten Proteinkonzentration (Konzentrationen ab $50 \mu\text{M}$) und der kurzen Spektrenmesszeit (ab 15 min).

In Abbildung 4.13 A ist ein $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -methyl-TROSY-Spektrum von Ile-GTA gezeigt. Es werden 10 Signale erwartet, welche auch detektiert werden können. Zusätzlich ist das TSP- d_4 Methylgruppensignal aufgrund der natürlichen Häufigkeit von ^{13}C zu beobachten, welches wegen der spektralen Weite reingefaltet ist.

Wie bei der [U-²H,¹⁵N]-markierten GTA Probe, soll auch mit der Ile-GTA Probe der Einfluss der UDP- und zusätzlich auch der Einfluss der HDis-Bindung an das Protein untersucht werden. Eine 71 μ M Ile-GTA (2) Probe wurde schrittweise mit 71 μ M (10% Sättigung), 152 μ M (20% Sättigung), 398 μ M (40% Sättigung), 866 μ M (60% Sättigung), 2,28 mM (80% Sättigung) und 6 mM (92% Sättigung) UDP versetzt. Die Proteinkonzentration der Titrationslösung entsprach dabei der NMR-Probenkonzentration. Während der Titration war kein UDP-Abbau zu beobachten. In Abbildung 4.13 B ist der Endpunkt der UDP-Titration (gelb) dargestellt. Vor allem die Signale 3 und 4 und in geringerem Maße auch Signale 2 und 8 erfahren eine Änderung in der chemischen Verschiebung durch die Zugabe von UDP. Aus den Abständen in ppm wurde die euklidische Verschiebung berechnet (siehe Gleichung 3.8). Signale 3 und 4 zeigen eine euklidische Verschiebung, welche größer als die einfache Standardabweichung ist. Jedoch ist bei Signal 4 die ¹H-Verschiebung unterhalb der digitalen Auflösung von 0,02 ppm. Auf eine K_D -Bestimmung wird aufgrund der geringen Anzahl an auswertbaren Signalen verzichtet. Bei Signal 4 ist während der Titration ein langsamer Austausch zwischen der ungebundenen und UDP-gebundenen Form zu erkennen. Bei allen anderen Signalen tritt ein schneller Austausch auf. Jedoch sind die Verschiebungen teilweise unterhalb der digitalen Auflösung, sodass eine Fehlinterpretation möglich ist.

Zu der UDP-gesättigten Probe wurde anschließend 1 mM HDis-O-Methyl zugegeben. Ein K_D für die Bindung von HDis an GTA in Anwesenheit von UDP ist bisher nicht bekannt und wurde anhand von bekannten GTB-Daten (Sindhuwinata et al., 2013) auf 20 μ M abgeschätzt. Die Zugabe von 1 mM HDis-O-Methyl entspricht demnach einer Sättigung von ca. 98%. In Abbildung 4.13 B ist erkennbar, dass das Signal 4 in der ¹³C-Dimension die größte Verschiebung erfährt. Außerdem ist hier eine Änderung in der Bewegungsrichtung im Vergleich zur UDP-Titration erkennbar. Da sich dieses Signal sowohl bei der UDP- als auch bei der HDis-Zugabe verschiebt, welche mit einer Änderung der Bewegungsrichtung einhergeht, könnte es sich hierbei um Ile 192 handeln.

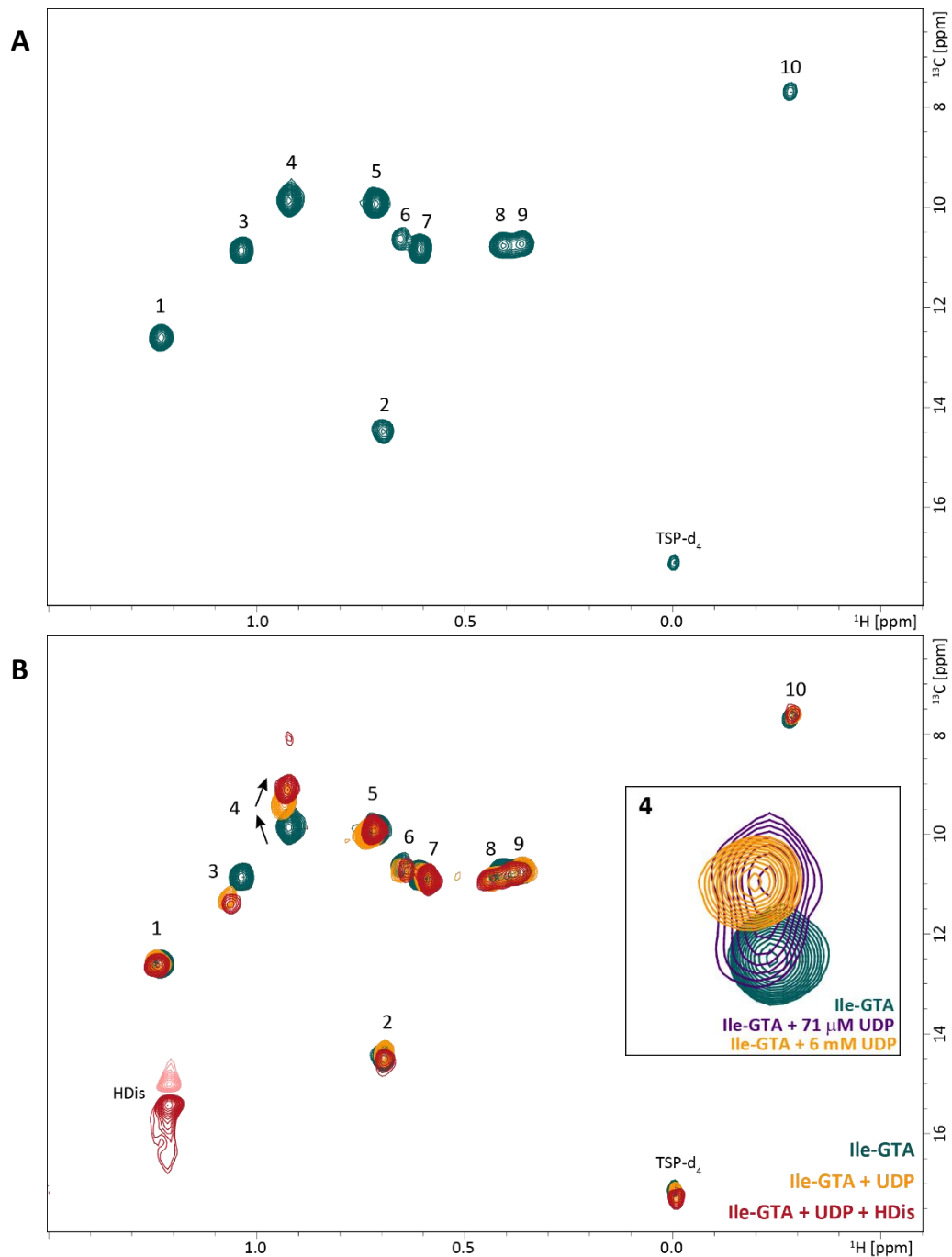


Abbildung 4.13: ^1H , ^{13}C -methyl-TROSY-Spektren von Ile-GTA und Einfluss der Ligandenbindung von UDP und HDis. (A) Dargestellt ist das ^1H , ^{13}C -methyl-TROSY-Spektrum einer 71 μM Ile-GTA (2) Probe in NMR-Puffer III (Nummerierung siehe Tabelle 4.4 und Tabelle 3.11). (B) ^1H , ^{13}C -methyl-TROSY-Spektren der Ausgangs- und Endpunkte der UDP-Titration und HDis-O- ^{13}C -Methyl Zugabe. Gezeigt sind Spektren einer 71 μM Ile-GTA (2) Probe in NMR-Puffer III ohne Substrat (grün), zusammen mit 6 mM UDP (gelb) sowie 6 mM UDP und 1 mM HDis-O- ^{13}C -Methyl (rot). Pfeile geben Änderung der Verschiebungsrichtung bei UDP- bzw. HDis-Titration an. Einschub zeigt langsamen Austausch während UDP-Titration, welcher nur bei Signal 4 zu beobachten ist.

Ile192 liegt am Rand der internen Schleife, welche in Abhängigkeit der Substrate unterschiedliche Konformationen eingeht. Kristallstrukturen deuten auf einen offenen, halb-geschlossenen und geschlossenen Zustand der GTA hin (Alfaro et al., 2008).

Signal 3, welches bei der UDP-Titration die größte Verschiebung erfahren hat, bleibt bei der HDis-Zugabe fast konstant. Dieses Verhalten lässt vermuten, dass es sich um Ile 123 handelt, welches sich im aktiven Zentrum befindet und an der UDP-Bindung beteiligt ist, jedoch nicht an der HDis-Bindung. Die Verschiebungen von den Signalen 1, 5, 7,8 und 10 sind unterhalb der digitalen Auflösung. Die Signale 2, 6 und 9 zeigen in der ^{13}C -Dimension eine leichte Verschiebung.

Der Einfluss der UDP- und HDis-Bindung an das Protein hat also nur auf zwei Ile- δ 1-Methylgruppen einen deutlichen Einfluss. Dies stimmt mit den anhand der Verteilung der Isoleucine im Protein erwarteten Veränderungen überein. Die potentielle Zuordnung der Signale 3 und 4 kann durch einen Vergleich mit GTB bestätigt werden (Abschnitt 4.2.4).

4.2.3 CPMG-Relaxations-Dispersions-Messungen mit Ile-GTA

Die Ile-Seitenketten befinden sich in verschiedenen interessanten Bereichen des Proteins, wie z.B. im aktiven Zentrum oder nahe der internen Schleife. Die Ile-GTA Probe eignet sich damit sehr gut, um die Dynamik in diesen Bereichen näher zu charakterisieren. Mit Hilfe von CPMG-RD-Messungen kann die Dynamik im μs -ms-Bereich untersucht werden.

Die Messungen ohne Substrat am 500 MHz Spektrometer wurden mit der 110 μM Ile-GTA (1) Probe (siehe Tabelle 4.4) durchgeführt. Für Messungen mit 6 mM UDP sowie 6 mM UDP und 1 mM HDis-O- ^{13}C -Methyl wurde eine 71 μM Ile-GTA (2)-Probe verwendet. Alle Messungen am 700 MHz Spektrometer wurden mit Ile-GTA (3) durchgeführt. Die Proteinkonzentration lag bei 106 μM , die Substratkonzentrationen betragen hier 5,7 mM UDP und 1 mM HDis-O-Methyl. Alle Proben befanden sich in NMR-Puffer III.

Vor Beginn der Messung wurden die Messbedingungen bestimmt. Dafür wurden verschiedene Temperaturen getestet. Da bekannt ist, dass GTA bei höheren Temperaturen als 298 K aggregiert (siehe Abschnitt 4.1.2), wurden hier nur geringere Temperaturen getestet. Abbildung 4.14 zeigt $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -methyl-TROSY-Spektren von Ile-GTA bei 275 K, 283 K und 298 K. Diese Spektren zeigen ein zusätzliches Signal bei 0,77 ppm in der ^1H - und 10,05 ppm in der ^{13}C -Dimension. Da es jedoch nicht in allen Chargen auftritt, handelt es sich vermutlich um inaktives Protein. Dieses Signal wird im

Folgenden nicht weiter betrachtet. Die Temperaturerniedrigung hat eine Änderung der chemischen Verschiebung zur Folge. Alle Verschiebungen können jedoch eindeutig nachvollzogen werden. Des Weiteren führt die Temperaturerniedrigung vor allem bei Signal 4 zu einer Intensitätsreduktion. Bei 275 K ist dieses Signal kaum noch detektierbar. Da für die Auswertung ein möglichst hohes Signal-zu-Rausch-Verhältnis wichtig ist, finden alle Messungen zwischen 283 K und 298 K statt.

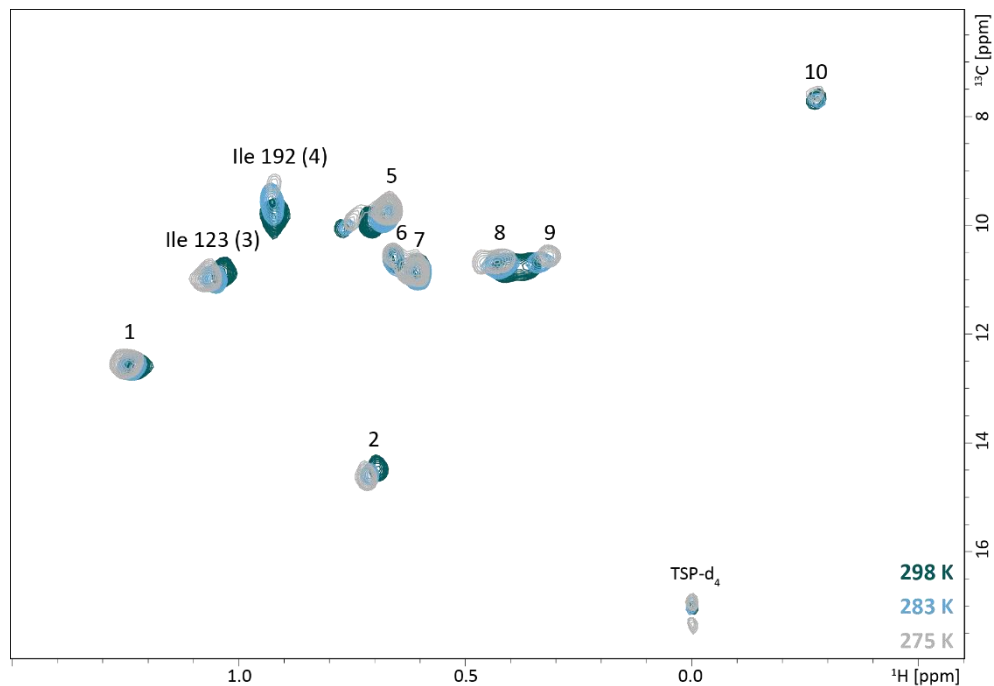


Abbildung 4.14: $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -methyl-TROSY-Spektren von Ile-GTA bei 298 K (grün), 283 K (blau) und 275 K (grau). Die Probe enthielt $110\ \mu\text{M}$ Ile-GTA (1) in NMR-Puffer III (Nummerierung siehe Tabelle 4.4 und Tabelle 3.11).

Neben der Temperatur wurde auch die Mischzeit T_{CPMG} für die Experimente getestet. Je länger diese Zeit ist, umso mehr Zeit hat das Protein um zu relaxieren und umso geringer ist die Signalintensität. Da jedes Protein unterschiedliche Relaxationseigenschaften hat, ist es erforderlich die Mischzeiten mit den erhaltenen Signalintensitäten zu vergleichen. Für die CPMG-RD-Messungen werden Spektren mit Feldstärken ν_{CPMG} von 50 Hz bis 500 Hz aufgenommen. Die Intensitäten der 50 Hz-Spektren sind am geringsten und werden mit dem Referenzspektrum ohne CPMG-Pulskaskade verglichen. Ziel ist es, eine Signalreduktion um etwa 50% zu erreichen. Typische Mischzeiten von Proteinen liegen meist zwischen 20 und 60 ms. Es wurden Spektren mit einer Feldstärke von 50 Hz bei 283 K und 298 K aufgenommen. Die erhaltenen Signalintensitäten wurden mit den jeweiligen Referenzspektren ins

Verhältnis gesetzt. Die relativen Signalintensitäten sind in Abbildung 4.15 dargestellt. Bei 298 K haben alle Signale eine relative Intensität von über 50% im Vergleich zum Referenzspektrum. Nur Signal 4 zeigt bei einer Mischzeit von 40 ms eine relative Intensität von 30%. Bei 283 K zeigen alle Signale geringere relative Intensitäten als bei 298 K. Vor allem Signal 4 zeigt eine deutliche Reduktion und befindet sich nah am Rauschen. Um eine genügend hohe Signalintensität sicher zu stellen, werden alle Messungen mit einer Mischzeit von 20 ms durchgeführt.

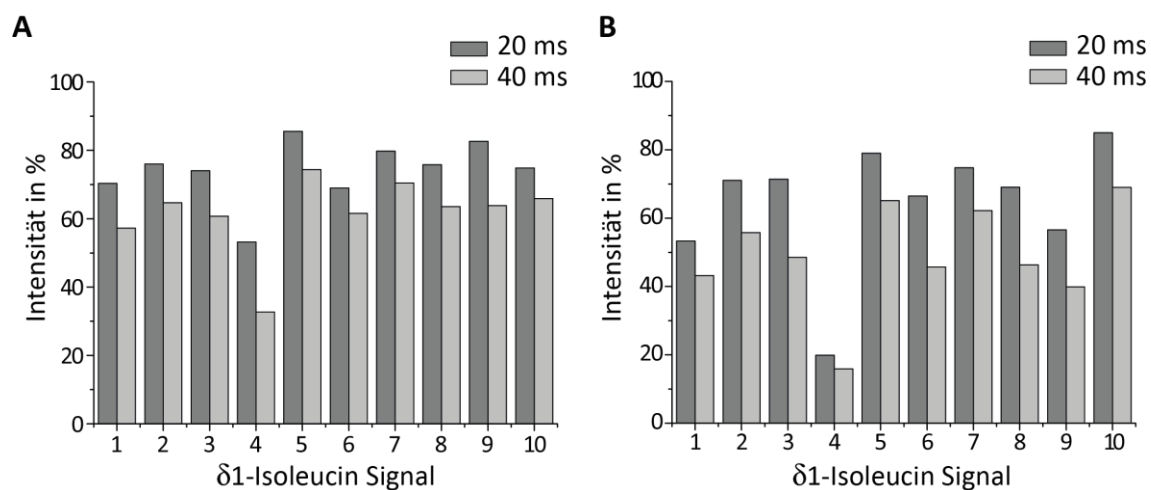


Abbildung 4.15: Einfluss der Mischzeit T_{CPMG} auf die Signalintensität bei (A) 298 K und (B) 283 K. Dargestellt ist die relative Signalintensität von CPMG-RD- ^1H , ^{13}C -methyl-TROSY Spektren bei einer Feldstärke von 50 Hz im Vergleich zum Referenzspektrum ohne CPMG-Sequenz bei Mischzeiten T_{CPMG} von 20 und 40 ms. Probe enthielt 110 μM Ile-GTA (1) in NMR-Puffer III (Nummerierung siehe Tabelle 4.4 und Tabelle 3.11) und wurde bei 298 und 283 K an einem 500 MHz Spektrometer gemessen. Messparameter siehe Abschnitt 3.5.6.

Die finalen Messbedingungen sind in Abschnitt 3.5.6 beschrieben. Die Anzahl der *Scans* wurde an die Temperatur und die Proteinkonzentration angepasst. Da bei niedrigen Temperaturen und geringeren Konzentrationen die Signalintensität sinkt, wurden hier mehr *Scans* aufgenommen. Die Anzahl der *Scans* lag zwischen 8 und 48.

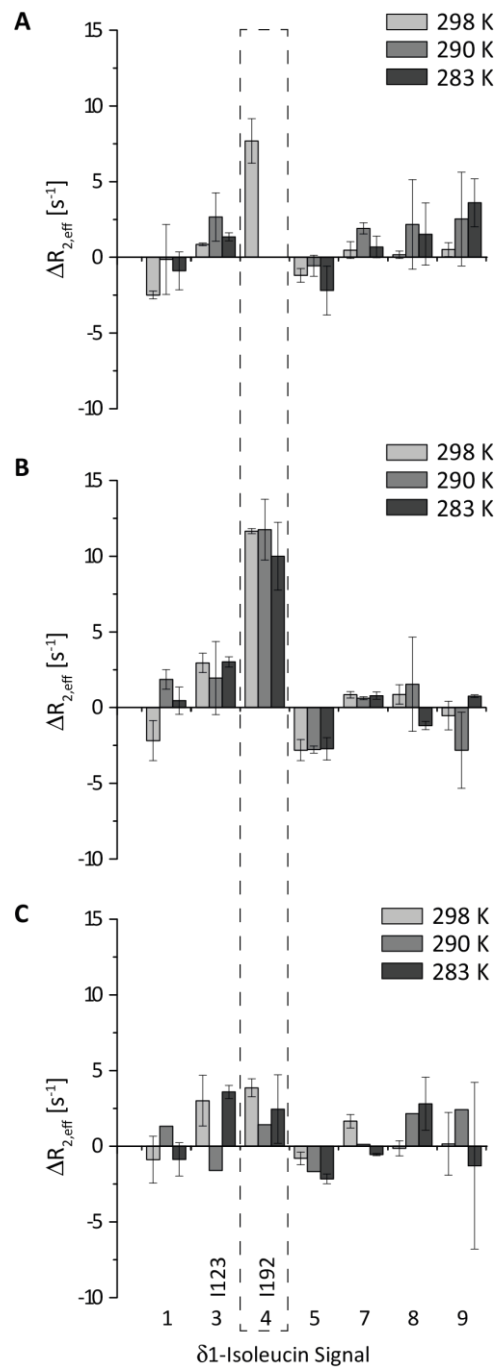


Abbildung 4.16: CPMG-Relaxations-Dispersions-Experimente mit Ile-GTA. Dargestellt ist die Differenz der transversalen Relaxationsraten mit $\Delta R_{2,eff} = R_{2,eff}(50 \text{ Hz}) - R_{2,eff}(500 \text{ Hz})$. Messungen wurden mit 106 μM Ile-GTA (3) bei 298 K, 290 K und 283 K an einem 700 MHz Spektrometer durchgeführt. Die CPMG-RD-Experimente wurden **(A)** ohne Substrate, **(B)** mit 5,7 mM UDP und **(C)** mit 5,7 mM UDP und 1 mM HDis-O-Methyl durchgeführt. Signal 4 ist durch eine gestrichelte Linie hervorgehoben und war ohne Substrate nur bei 298 K detektierbar. Alle Messungen, außer die bei 290 K in Anwesenheit von UDP und HDis, wurden in Doppelbestimmung durchgeführt. Signale 2, 6 und 10 sind aufgrund ihrer geringen Intensität stark fehlerbehaftet und daher nicht mit dargestellt.

Abbildung 4.16 gibt einen Überblick, welche Isoleucin- $\delta 1$ Signale Dispersionen aufweisen. Dargestellt ist die Differenz der transversalen Relaxationsraten $\Delta R_{2,eff}$ bei einer CPMG-Feldstärke von 50 bzw. 500 Hz für die jeweiligen Signale. Ist diese Differenz nahe Null findet keine Bewegung im μs -ms Bereich statt. Nur Signal 4, welches sich bei Substratbindung am meisten verschiebt, siehe Abbildung 4.13 B, hat ohne Substrat und mit UDP einen $\Delta R_{2,eff}$ -Wert von ungefähr $12 s^{-1}$. Auffällig ist auch, dass Signal 4 bei 290 K und 283 K in den Experimenten mit CPMG-Sequenz nicht detektiert werden kann und somit schnell relaxiert. In Anwesenheit von UDP zusammen mit HDis ist nur ein geringer Unterschied in den transversalen Relaxationsraten von etwa $4 s^{-1}$ zu beobachten. Die HDis-Bindung führt demnach zu einer Dynamikänderung im Protein an dieser Position. Die in Abbildung 4.17 dargestellten Relaxations-Dispersions-Profile bestätigen diese Beobachtung. Signal 3 zeigt auch eine Änderung in der chemischen Verschiebung bei Substratbindung. Die Dispersionsprofile deuten hier bei tieferen Temperaturen in Anwesenheit der Substrate auf eine leichte Dispersion hin. Diese Daten sind jedoch stark fehlerbehaftet, sodass keine eindeutige Aussage getroffen werden kann. Alle anderen Signale (beispielhaft an Signal 8 gezeigt) zeigen keine Dispersionen und bewegen sich somit nicht im μs -ms Bereich. Eine Temperaturenniedrigung führt zu einer leichten Erhöhung der Dispersionen, was darauf hindeutet, dass schnellere Bewegungen im Protein stattfinden. Da die Differenzen der transversalen Relaxationsraten $\Delta R_{2,eff}$ von Signal 4 mit etwa $12 s^{-1}$ relativ gering sind, konnten keine verlässlichen Austauschraten, Populationen und chemischen Verschiebungsdifferenzen bestimmt werden (siehe Abbildung 3.1).

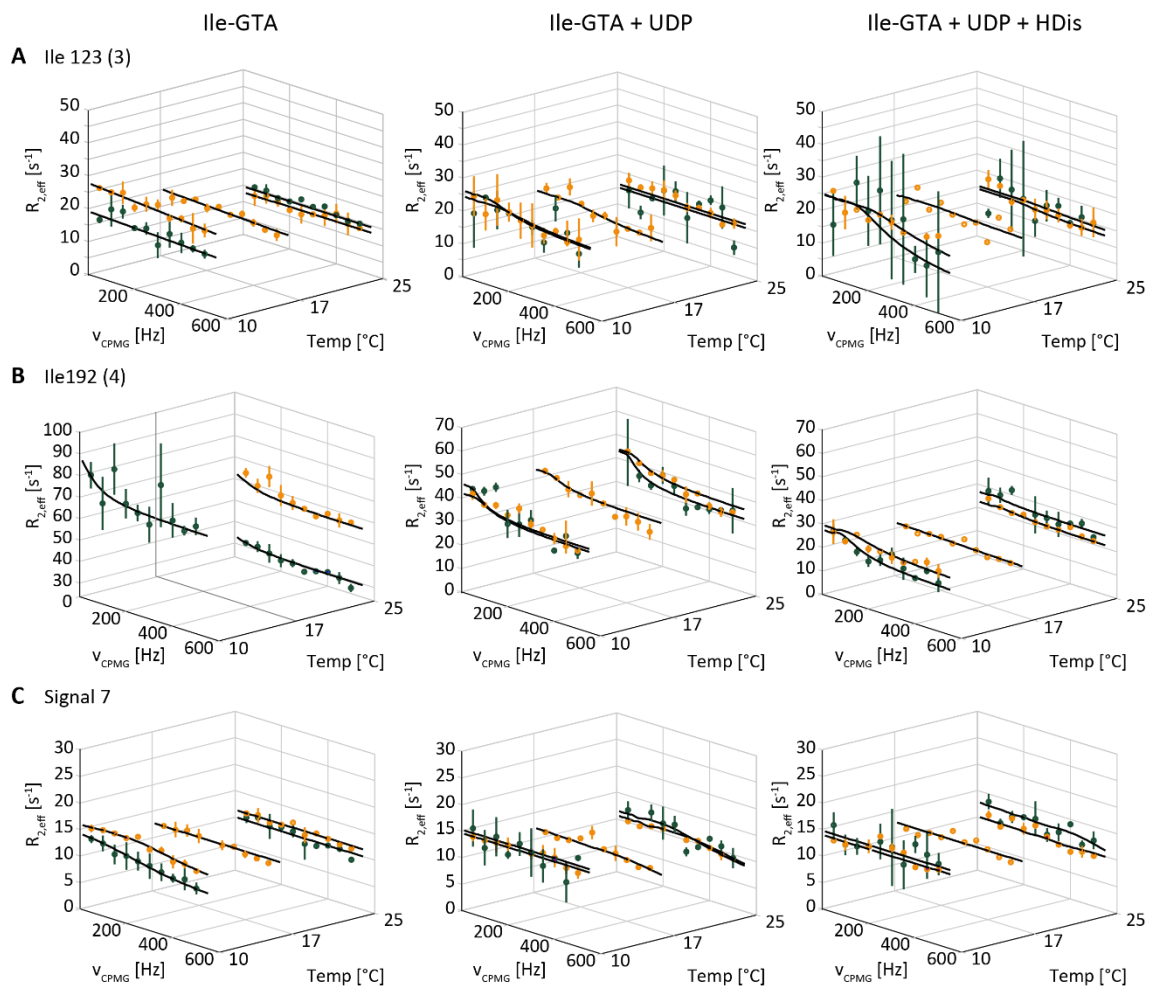


Abbildung 4.17: Einfluss der UDP und HDis-Bindung auf Relaxations-Dispersions-Profile von ausgewählten Signalen der Ile-GTA. CPMG-RD-Experimente wurden mit Ile-GTA an einem 500 MHz (grün) und 700 MHz (gelb) Spektrometer bei 298 K, 290 K und 283 K mit CPMG-Feldstärken von 50-500 Hz durchgeführt. Gezeigt sind RD-Profile von (A) Ile 123, (B) Ile 192, und (C) Signal 7 ohne Substrate (**links**), mit UDP (**mittig**) und mit UDP und HDis (**rechts**). Experimente wurden in Doppelbestimmung durchgeführt, außer bei 290 K in Anwesenheit von UDP und HDis. Fehlerbalken entsprechen Standardabweichung der Doppelbestimmungen. Auswertung erfolgte mit GUARD (Kleckner and Foster, 2011). Restliche Relaxations-Dispersions-Profile siehe Anhang Abschnitt 7.3.7.

4.2.4 Vergleich von Isoleucin- δ 1-methylgruppenmarkierter GTA und GTB

In Abschnitt 4.1.7 konnte mittels $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC-Experimenten gezeigt werden, dass GTA und GTB zwar die gleiche Grundstruktur haben, jedoch auch deutliche Unterscheidungsmerkmale aufweisen. Um die Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen GTA und GTB besser zu verstehen, soll nun auch ein Vergleich der Ile-

Seitenketten erfolgen. Lena Lisbeth Grimm hat ähnliche Arbeiten mit Isoleucin- δ 1-methylgruppenmarkierter GTB (Ile-GTB) durchgeführt. Abbildung 4.18 zeigt, dass beide Enzyme die gleiche Isoleucin- δ 1-Signalverteilung aufweisen. Die Signale können eindeutig einander zugeordnet werden. Für Ile 192 und Ile 123 der GTB existiert bereits eine Zuordnung. Diese kann, wie in Abbildung 4.18 ersichtlich, eindeutig auf GTA übertragen werden und stimmt mit der in Abschnitt 4.2.2 postulierten überein. Die Signale von Ile 192, welche sich in der internen Schleife befinden, weichen am weitesten zwischen GTA und GTB voneinander ab.

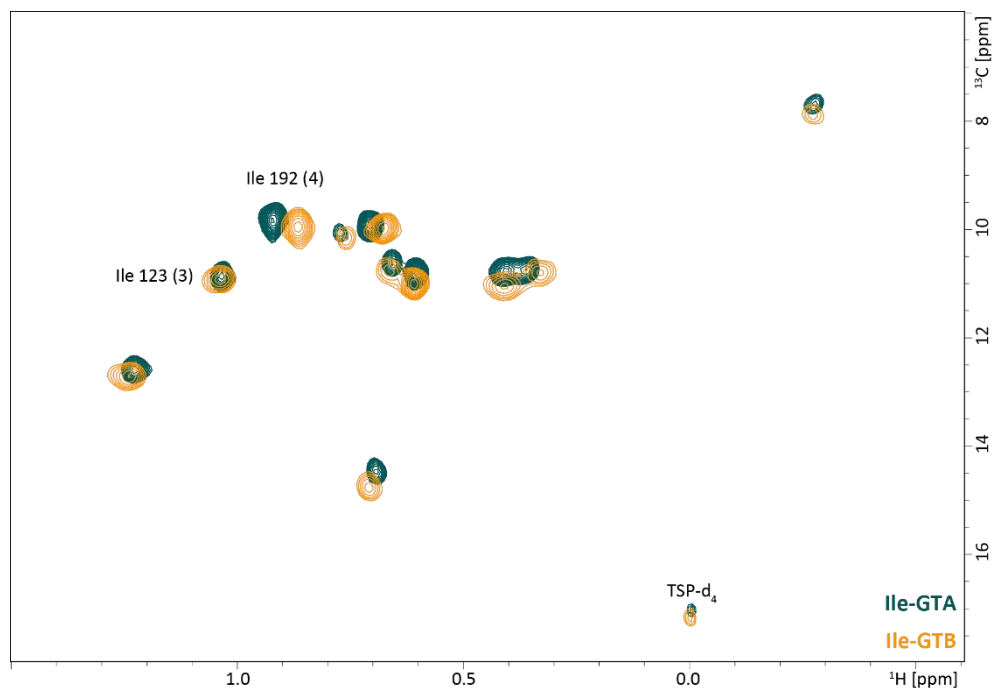


Abbildung 4.18: Vergleich von Isoleucin- δ 1-methylgruppenmarkierter GTA und GTB. Dargestellt sind ^1H , ^{13}C -methyl-TROSY-Spektren von 110 μM Ile-GTA (1) (grün) und 194 μM Ile-GTB (gelb) in NMR-Puffer III (Nummerierung siehe Tabelle 4.4 und Tabelle 3.11). GTB-Spektrum von L. L. Grimm zur Verfügung gestellt.

Auch die UDP- und HDis-Bindung an GTA und GTB ist vergleichbar. Ile 192 und Ile 123 bewegen sich am stärksten. Bei GTB befinden sich alle Signale bei UDP-Bindung im schnellen Austausch. Bei GTA kommt es bei Ile 192 zum langsamen Austausch zwischen dem ungebundenen und UDP-gebundenen Zustand.

Des Weiteren zeigt nur Ile 192 Dispersionen in Anwesenheit von UDP sowohl bei GTA als auch bei GTB. Jedoch ist dieser Effekt bei GTB deutlich stärker mit $\Delta R_{2,\text{eff}}$ mit ca. 40 s^{-1} im Vergleich zu ca. 10 s^{-1} . Die Zugabe von HDis hat bei beiden Enzymen eine Abnahme der Dispersion zur Folge.

4.3 Seitenkettenanalyse von [U-²H, {Met β , γ -¹²CH₂}, {Met ϵ -¹³CH₃}]-markierter GTB

Neben der spezifischen Methylgruppenmarkierung von Isoleucinen ist es auch möglich, die Methylgruppe von Methioninen an Position ϵ spezifisch zu markieren. Die Markierung von Methioninen ist für GTA und GTB von besonderem Interesse, da eine der vier kritischen Aminosäuren, welche GTA von GTB unterscheiden, ein Methionin ist. GTB trägt an Position 266 ein Methionin, welches für die Donorsubstrat- und Akzeptorsubstraterkennung wichtig ist (Alfaro et al., 2008; Patenaude et al., 2002; Seto et al., 1999). Außerdem sind drei Methionine in der internen Schleife zu finden. Eine Analyse der Substratbindung von UDP und HDis und der damit einhergehenden Dynamik im μ s-ms-Bereich der Methionin-Methylgruppen kann also einerseits Informationen über das aktive Zentrum, als auch über die interne Schleife liefern. Aus diesem Grund wurden die folgenden Experimente mit GTB durchgeführt, welche ein Methionin an Position 266 trägt. Die [U-²H, {Met β , γ -¹²CH₂}, {Met ϵ -¹³CH₃}]-Markierung wird im Folgenden als „Met“ bezeichnet und vor die Proteinbezeichnung gesetzt.

4.3.1 Probenpräparation von Met-GTB

Met-GTB und seine Mutanten wurden wie Abschnitt 3.2.2 und 3.2.3 beschreiben, synthetisiert und gereinigt. Die Ergebnisse der Qualitätskontrolle sind in Tabelle 4.5 und Tabelle 4.6 zusammengefasst. Die SDS-PAGE-Gele zeigen reine Proteine nach der Reinigung (Daten nicht gezeigt). In den Gelen von Präparation 2 und 4 ist jedoch eine deutliche Bande in der Waschfraktion des SP-Sepharose Reinigungsschrittes zu erkennen. Die Waschfraktionen hatten ein Volumen von etwa 150 mL, die SP-Sepharose-Durchfluss-Fraktion hingegen von nur etwa 45 mL. Dies ist bei Präparation 1 und 3 nicht der Fall und erklärt die variierenden Ausbeuten zwischen den einzelnen Präparationen (Abbildung 4.19).

Alle Mutanten außer Met-M186A-GTB weisen im Vergleich zum Wildtyp deutlich geringere Ausbeuten auf. Die Mutanten Met-M189V-GTB und Met-M142A-GTB wurden in H₂O synthetisiert, da die Syntheseausbeute in D₂O-haltigem Minimalmedium zu gering für NMR-Experimente war.

Met-M186A-GTB und Met-M142A-GTB besitzen eine leicht erhöhte, Met-M189V-GTB und Met-GTA hingegen eine leicht erniedrigte Aktivität im Vergleich zu GTB. Insgesamt sind jedoch alle Proben rein und aktiv und können für weitere Experimente verwendet werden. Alle Proben wurden in NMR-Puffer III umgepuffert.

Tabelle 4.5: Qualitätskontrolle von Met-GTB Proben. Angegeben ist das eingesetzte Volumen an Minimalmedium, die Ausbeute pro Liter Kulturmedium, die spezifische Aktivität und der Quotient A_{260}/A_{280} nach Umpufferung in NMR-Puffer III. Die Pufferzusammensetzung ist in Tabelle 3.11 zu finden.

Probe	Met-GTB (1)	Met-GTB (2)	Met-GTB (3)	Met-GTB (4)
Kulturvolumen [mL]	150	100	200	200
Ausbeute [mg/L]	16	4	22	7
Spezifische Aktivität [U/mg]	11,7	14,1	13,6	14,8
A_{260}/A_{280}	0,57	0,58	0,56	0,57

Tabelle 4.6: Qualitätskontrolle von Met-GTB-Mutanten. Angegeben ist das eingesetzte Volumen an Minimalmedium, die Ausbeute pro Liter Kulturmedium, die spezifische Aktivität und der Quotient A_{260}/A_{280} nach Umpufferung in NMR-Puffer III. Die Pufferzusammensetzung ist in Tabelle 3.11 zu finden. Mit * gekennzeichnete Proben wurden in H_2O synthetisiert, alle anderen in D_2O .

Probe	Met-M186A-GTB	Met-M189V-GTB*	Met-M191A-GTB	Met-M142A-GTB*	Met-M288A-GTB	Met-GTA
Kulturvolumen [mL]	100	500	100	500	150	100
Ausbeute [mg/L]	17	0,8	5	4	0,5	7
Spezifische Aktivität [U/mg]	19,7	6,2	12,7	17,9	11,1	6,3
A_{260}/A_{280}	0,57	0,58	0,57	0,57	0,59	0,57

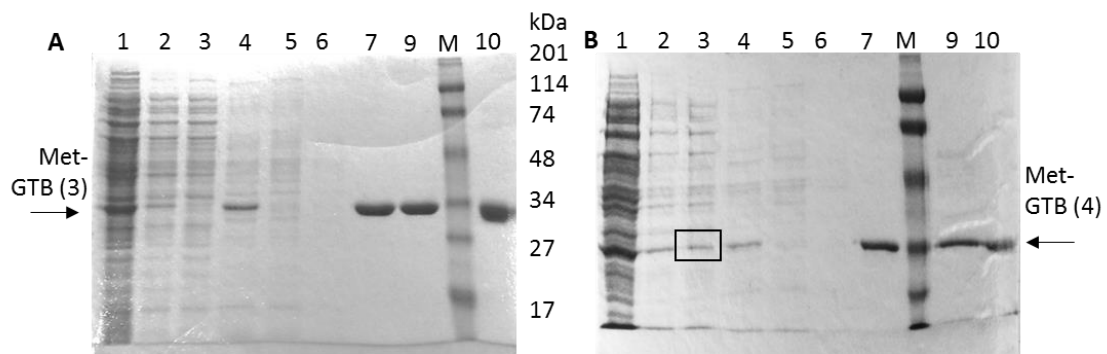


Abbildung 4.19: SDS-Polyacrylamidgel mit Proben der Reinigungsschritte von (A) Met-GTB (3) und (B) Met-GTB (4). Proben wurden 1:1 in 2x reduzierendem Probenpuffer denaturiert und in folgender Reihenfolge auf ein 12%iges SDS-Gel aufgetragen: (1) Zellysate nach Ultrazentrifugation, (2) SP-Sepharose-Durchfluss, (3) SP-Sepharose-Waschfraktion, (4) SP-Sepharose-Eluat, (5) UDP-Hexanolamin-Sepharose-Durchfluss, (6) UDP-Hexanolamin-Sepharose-Waschfraktion, (7) UDP-Hexanolamin-Sepharose-Eluat, (M) Marker, (9) Dialysat und (10) Dialysat in 2x nicht-reduzierendem Probenpuffer. Rechteck zeigt Met-GTB Bande der SP-Sepharose-Waschfraktion.

4.3.2 $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -methyl-TROSY-Experimente mit Met-GTB und Charakterisierung der UDP- und HDis-Bindung

Die hier verwendete GTB-Variante besitzt insgesamt 11 Methionine, wobei zwei N-terminale Methionine an Position 57 und 63 durch die Klonierung bedingt sind (siehe Abschnitt 3.2.1). In Abbildung 4.21 A ist ein $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -methyl-TROSY Spektrum von Met-GTB gezeigt. Die Zuordnung der Methionin-Signale wird in Abschnitt 4.3.3 genauer beschrieben, zur besseren Übersichtlichkeit in diesem Abschnitt aber schon dargestellt. Es können nur 10 von 11 Methioninen detektiert werden. Folgt ein Alanin auf das N-terminale Methionin, wird das Methionin in über 90% der Fälle enzymatisch abgespalten (Frottin et al., 2006). Da das hier der Fall ist, handelt es sich bei dem fehlenden Methionin vermutlich um das am N-Terminus. Die Signale liegen innerhalb eines engen spektralen Bereiches von nur 1,5 ppm in der direkten bzw. 3,5 ppm in der indirekten Dimension, was teilweise zu Signalüberlagerungen führt. Außerdem sind die einzelnen Signale unterschiedlich intensiv. M142, welches in der Mitte des Proteins liegt, hat beispielsweise eine sehr geringe Intensität und ist teilweise nicht detektierbar. Signal 3, welches M63 oder M69 entspricht und in der Dimerisierungsregion liegt, ist hingegen das intensivste Signal.

Der Einfluss der UDP-Bindung auf die chemische Verschiebung der Methionin-Methylgruppen wurde mit Titrationsexperimenten untersucht. Zu einer 350 μM Met-GTB (3) (Nummerierung Tabelle 4.5) wurden schrittweise 154 μM (15% Sättigung), 350 μM (30% Sättigung), 753 μM (50% Sättigung), 1,59 mM (70% Sättigung) und 6,3 mM (90% Sättigung) UDP zugegeben. Die prozentuale Sättigung der Bindungsstellen wurde anhand des mittels SPR-ermittelten K_D -Wertes von 575 μM bestimmt (Tabelle 3.15). Die Titrationslösung enthielt die gleiche Proteinkonzentration wie die NMR-Probe. Während der Titration war wieder der Abbau von UDP zu UMP detektierbar (Abbildung 4.20 und zum Vergleich Abbildung 4.8). Der Hauptanteil liegt jedoch in Form von UDP vor. Eine exakte Abschätzung ist aufgrund der Linienverbreiterung des Signals bei 7,97 ppm (Proton an Position 6 des Uracilrings) nicht möglich.

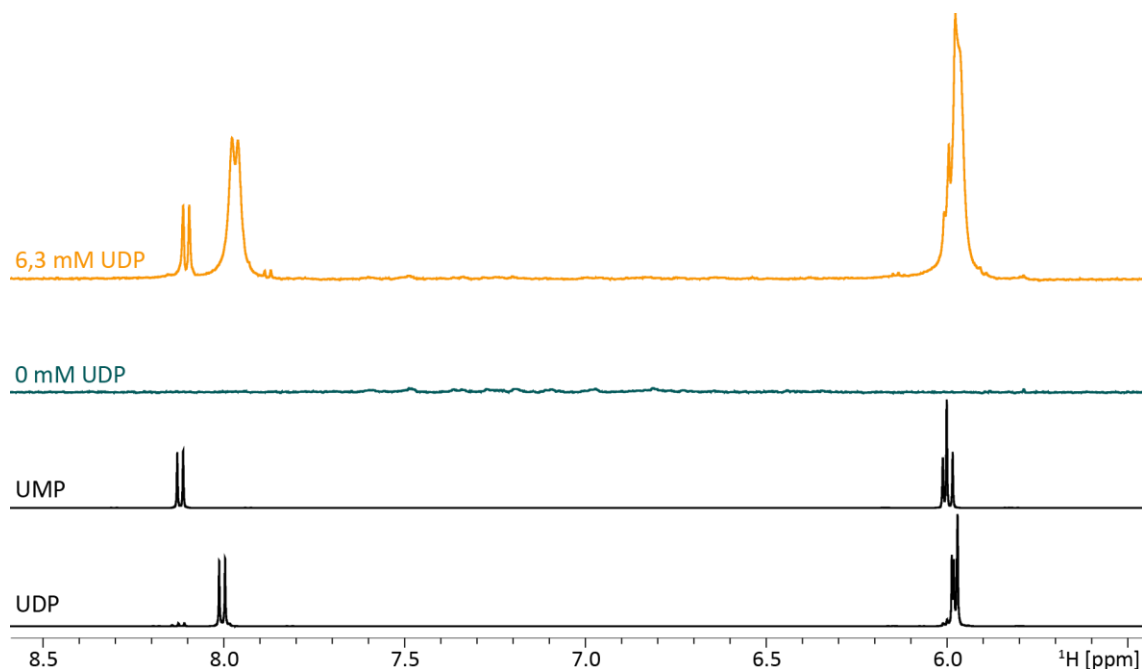


Abbildung 4.20: ^1H -Spektren von Met-GTB (3) mit (gelb) und ohne (grün) UDP. Dargestellt sind Protonenspektren einer 350 μM Met-GTB (3)-Probe in NMR-Puffer III (Tabelle 3.11) ohne UDP sowie mit 6,3 mM UDP. In schwarz sind Referenzspektren von UMP und UDP gezeigt.

Wie in Abbildung 4.21 B erkennbar, hat die UDP Bindung einen großen Einfluss auf die chemische Verschiebung der Methionin-Methylgruppen. Die Spektren der einzelnen Titrationschritte sind zusätzlich im Anhang Abschnitt 7.3.2 zu finden. Bei M186, M189, M266, M288 und M289 ist ein schneller Austausch und bei M191 und M214 ein intermediärer Austausch zwischen dem freien und UDP-gebundenen Enzym beobachtbar.

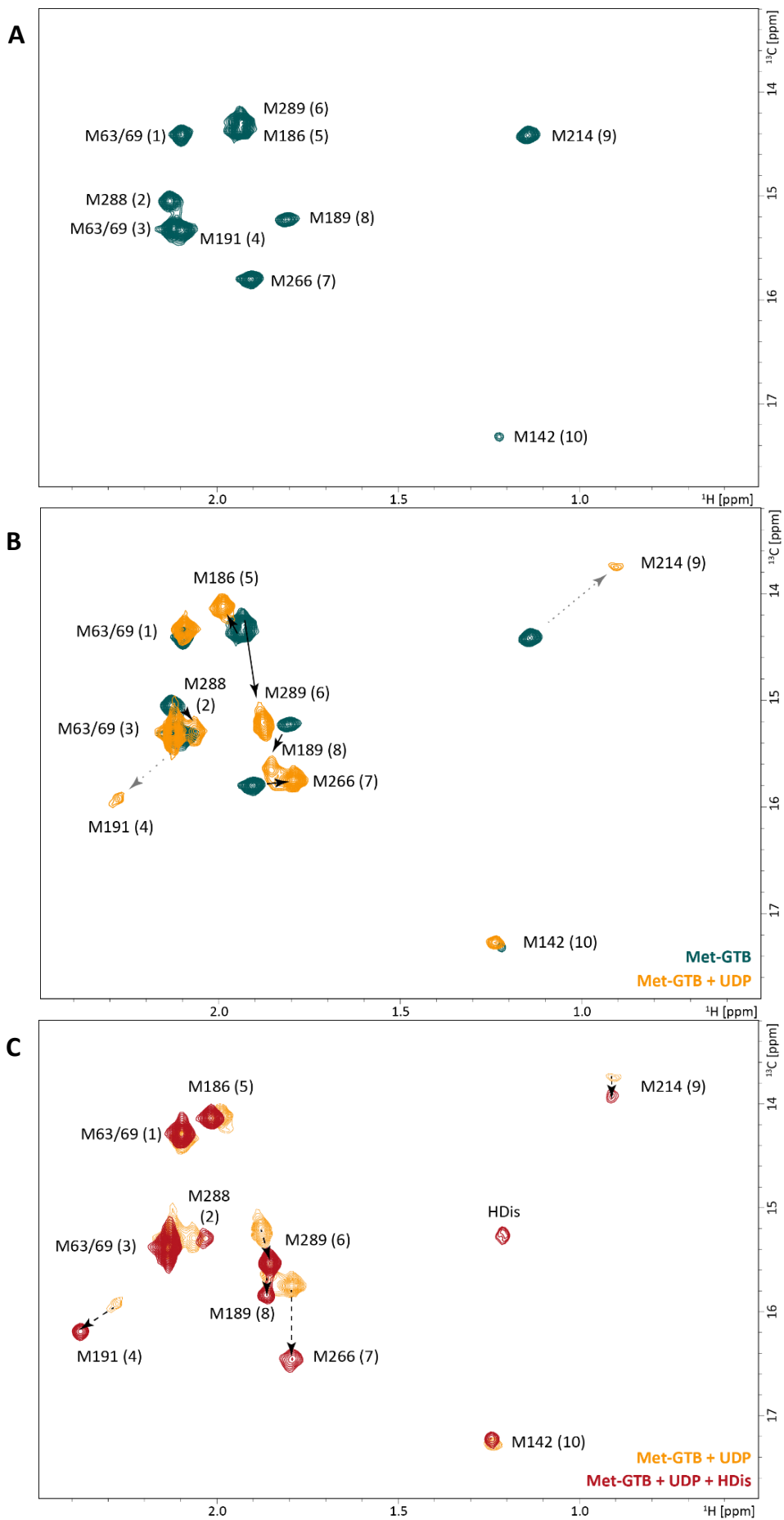


Abbildung 4.21: $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -methyl-TROSY-Spektren von (A) Met-GTB (grün), (B) Met-GTB überlagert mit UDP-gesättigter Met-GTB (gelb) und (C) UDP-gesättigte Met-GTB (gelb) überlagert mit UDP- und HDis-gesättigter Met-GTB (rot). Alle Proben befinden sich in NMR-Puffer III. Die Konzentration der Met-GTB (1)-Probe beträgt $220\ \mu\text{M}$. Das UDP- und HDis-gesättigte Met-GTB Spektrum wurde mit einer $290\ \mu\text{M}$ Met-GTB (3)-Probe aufgenommen (Nummerierung siehe Tabelle 4.5), die UDP-Konzentration liegt bei $6,1\ \text{mM}$, die HDis-O-Methyl-Konzentration bei $852\ \mu\text{M}$. Pfeile zeigen den Signalverlauf während der Titration. Durchgängige Pfeile stehen für einen schnellen Austausch zwischen den Signalen, gestrichelte für einen langsamen Austausch und grau gepunktete für einen intermediären Austausch.

Die Signale von M191 und M214 sind während der Titration aufgrund von Linienverbreiterung nicht detektierbar, erst ab einer UDP-Sättigung von 80% kann der UDP-gebundene Zustand wieder nachgewiesen werden. Die chemische Verschiebungsdifferenz der Signale im intermediären Austausch liegt in der Protonendimension bei 95-120 Hz und in der ^{13}C -Dimension bei etwa 80 Hz (siehe Tabelle 4.7). Drei von zehn Signalen (M63, M69 und M142) zeigen keine Änderung in der chemischen Verschiebung. Anhand der chemischen Verschiebungsdifferenzen der Signale im schnellen Austausch wurden nach Gleichung 3.8 die euklidischen Verschiebungen berechnet. Aus den maximalen euklidischen Verschiebungen der einzelnen Signale wurde die Standardabweichung ermittelt. Nur Signale, deren euklidische Verschiebung größer als diese Standardabweichung war, wurden für die K_D -Ermittlung mit einbezogen. Für die K_D -Bestimmung wurden die euklidischen Verschiebungen gegen die Ligandenkonzentration aufgetragen und an Gleichung 3.9 angepasst. Die Dissoziationskonstante K_D der Bindung von UDP an GTB liegt bei $185 \pm 54\ \mu\text{M}$ (Abbildung 4.23 A). Jedoch ist zu beachten, dass dieser Wert aufgrund des UDP-Abbaus fehlerbehaftet ist.

Des Weiteren wurde die Bindung von HDis-O- ^{13}C -Methyl an Met-GTB untersucht. Dafür wurden zu einer UDP-gesättigten $290\ \mu\text{M}$ Met-GTB (3) Probe schrittweise HDis-O- ^{13}C -Methyl zugegeben. Die HDis-Konzentrationen der Titrationsschritte betragen $81\ \mu\text{M}$ (25% Sättigung), $172\ \mu\text{M}$ (50% Sättigung), $297\ \mu\text{M}$ (75% Sättigung), $574\ \mu\text{M}$ (92% Sättigung) und $852\ \mu\text{M}$ (96% Sättigung). Im Anhang Abschnitt 7.3.2 sind die Spektren der einzelnen Titrationsschritte dargestellt. In Abbildung 4.21 C ist erkennbar, dass die HDis-Bindung im Vergleich zur UDP-Bindung einen geringeren Einfluss auf die Methionin-Signale hat. Jedoch ist bei fünf von zehn Signalen ein langsamer Austausch beobachtbar. Es handelt sich hierbei um M189, M191, M214, M266 und M289. M191 verschiebt sich sowohl in der direkten, als auch der indirekten Dimension. Alle anderen

Signale zeigen nur Änderungen in der ^{13}C -Dimension. M266, welches an der Donor- und Akzeptorerkennung beteiligt ist, zeigt den größten Effekt. Die Intensitätsänderung in Abhängigkeit der HDis-Konzentration ist in Abbildung 4.22 exemplarisch dargestellt. Die chemische Verschiebungsdifferenz des UDP- bzw. UDP- und HDis-gesättigten Zustandes liegt bei 91 Hz in der ^{13}C -Dimension, die von M189, M289 und M214 hingegen nur bei 20-40 Hz (siehe Tabelle 4.7). Die Intensitäten der neu entstehenden Signale wurde gegen die HDis-O- ^{13}C -Methyl-Konzentration aufgetragen und an Gleichung 3.9 angepasst (Abbildung 4.23 B). Es ergibt sich ein K_D von $2 \pm 5 \mu\text{M}$ für die Bindung von HDis an Met-GTB bei UDP-Sättigung.

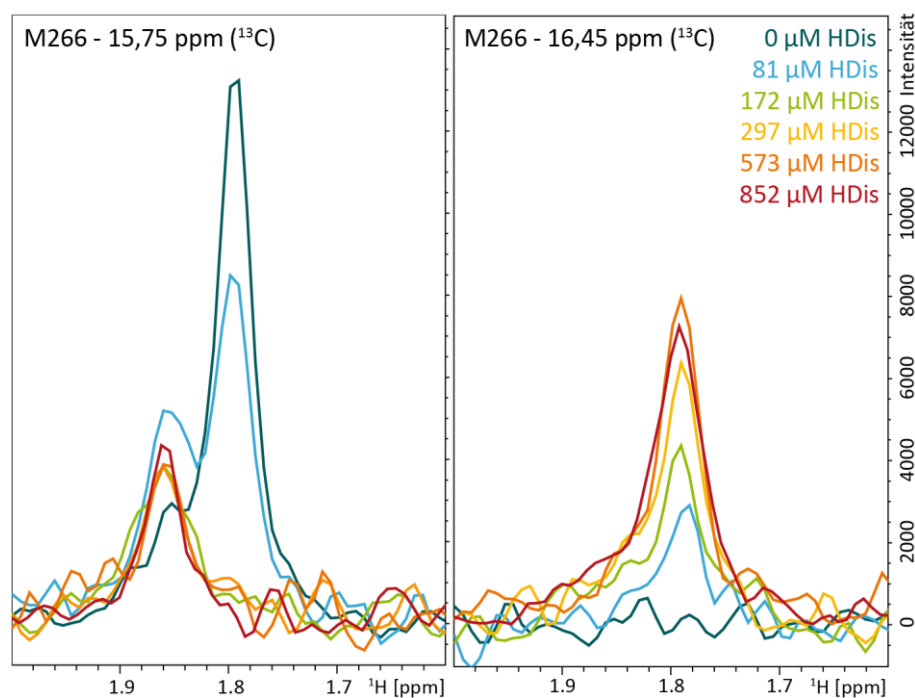


Abbildung 4.22: 1D-Projektionen von Signal M266 im langsamen Austausch. Dargestellt sind 1D-Spektren bei 15,75 ppm (chemische Verschiebung nach UDP-Sättigung) und 16,45 ppm (chemische Verschiebung nach UDP- und HDis-Sättigung) in der ^{13}C -Dimension in Abhängigkeit der HDis-Konzentration. Probe enthielt $290 \mu\text{M}$ Met-GTB (3) und $6,1 \text{ mM}$ UDP in NMR-Puffer III. HDis-O-Methyl wurde schrittweise zugegeben. Farbkodierung siehe Abbildung. M266 entspricht Signal bei $1,8 \text{ ppm}$.

Bei M186 und M288 ist die chemische Verschiebungsänderung im Vergleich zur Linienbreite der Signale zu gering, sodass nicht eindeutig gesagt werden kann, ob es sich um langsamen oder schnellen Austausch handelt.

M63, M69 und M142, welche sich in der Dimerisierungsregion bzw. im Inneren des Proteins befinden, zeigen wie bei der UDP-Titration keine signifikante Änderung in ihrer chemischen Verschiebung.

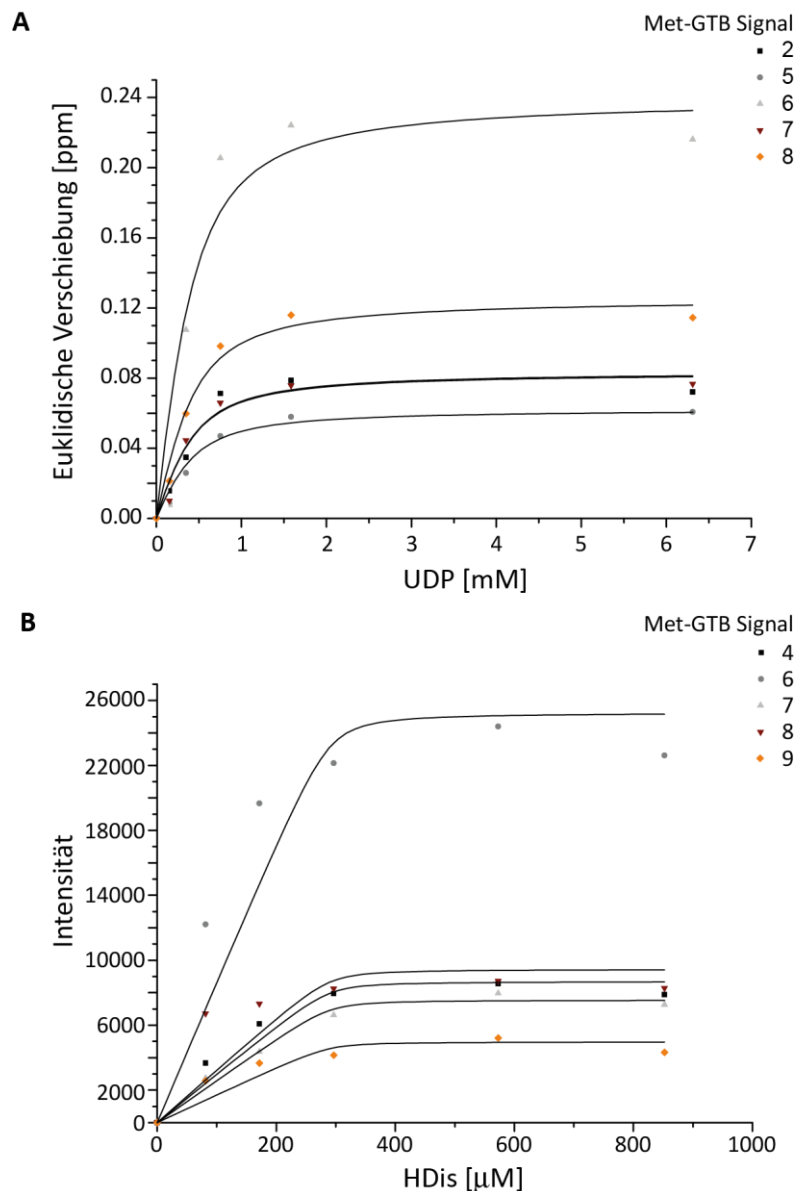


Abbildung 4.23: Bindungsisotherme der Bindung von (A) UDP und (B) HDis unter Anwesenheit von UDP an Met-GTB. (A) Ausgewertet wurden Signale im schnellen Austausch, deren euklidische Verschiebung größer als die einfache Standardabweichung der maximalen Verschiebungen der einzelnen Signale war. Die euklidische Verschiebung wurde gegen die UDP-Konzentration aufgetragen und an Gleichung 3.9. angepasst. Die Met-GTB (3)-Konzentration betrug $350 \mu\text{M}$ und es wurde von $n = 1$ Bindungsstellen ausgegangen. Der ermittelte K_D -Wert beträgt $185 \pm 54 \mu\text{M}$ ($R^2 = 0,95$ und $\chi^2 = 0,00022$). (B) Ausgewertet wurden Signale im langsamen Austausch. Dabei wurden die Intensitäten der neu entstandenen Signale gegen die HDis- O^{13}C -Methyl-Konzentration aufgetragen und an Gleichung 3.9. angepasst. Die Met-GTB (3)-Konzentration betrug $290 \mu\text{M}$ und die UDP-Konzentration $6,1 \text{ mM}$. Es wurde von $n = 1$ Bindungsstellen ausgegangen. Der ermittelte K_D -Wert beträgt $2 \pm 5 \mu\text{M}$ ($R^2 = 0,93$ und $\chi^2 = 3,7 \times 10^6$).

Tabelle 4.7: Abstände der Signale, welche sich im intermediären bzw. langsamen Austausch befinden.

	Signal	Abstand in ^1H - Dimension	Abstand in ^{13}C - Dimension
Bindung von UDP an Met-GTB (intermediärer Austausch)	M191	95 Hz	77 Hz
	M214	119 Hz	82 Hz
Bindung von HDis an UDP- gesättigte Met-GTB (langsamer Austausch)	M191	49 Hz	35 Hz
	M214	3 Hz	23 Hz
	M189	4 Hz	23 Hz
	M266	1 Hz	91 Hz
	M289	13 Hz	41 Hz

4.3.3 Zuordnung von Met-GTB

Die Methionin-Reste von Met-GTB sind über das gesamte Protein verteilt und können so einen Einblick in verschiedene Regionen des Proteins geben. Drei Methionine befinden sich in der internen Schleife (M186, M189 und M191) und zwei in einer benachbarten α -Helix (M288 und M289). Im aktiven Zentrum befinden sich M214 und M266, eine der vier Aminosäuren die GTB von GTA unterscheiden. M142 befindet sich in der Mitte des Proteins und M63 und M69 in der Dimerisierungsregion von GTB (siehe Abbildung 2.1 B). Um diese Signale zuzuordnen wurden Punktmutationen eingebracht. Die Mutanten wurden mittels $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -methyl-TROSY-Spektren analysiert. Wegen der Überlagerung einiger Signale wurde teilweise eine Ligandentitration durchgeführt. So konnte das Verhalten der Mutanten mit dem des Wildtyps bei Ligandenzugabe verglichen werden. Des Weiteren wurden HMQC-NOESY-Experimente (siehe Abschnitt 3.5.6) durchgeführt, um räumlich nahe Methionin-Methylgruppen zu identifizieren. Es wurden insgesamt fünf Mutanten synthetisiert: Met-M186A-, Met-M189V-, Met-M191A-, Met-M142A- und Met-M288A-GTB. Durch die Met-Markierung von GTA konnte zusätzlich M266 zugeordnet werden.

Die Methionine 189, 142 und 266 konnten anhand der $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -methyl-TROSY-Spektren der Mutanten (ohne Ligand) eindeutig den Signalen 8, 10 und 7 (Nummerierung siehe Abbildung 4.28) zugeordnet werden (Spektren siehe Anhang Abschnitt 7.3.4). Die Zuordnung von M186, M191 und M288 erforderte die Titration bzw. Zugabe von UDP und HDis. Der Weg zur Zuordnung von M186 ist in Abbildung

4.24 exemplarisch dargestellt. Wegen der Überlagerung der Signale 5 und 6 im ^1H , ^{13}C -methyl-TROSY-Spektrum ist eine eindeutige Zuordnung von M186 vorerst nicht möglich. Es wurde eine Titration mit UDP (Titrationsschritte: 292 μM (30% Sättigung), 956 μM (60% Sättigung), 5,9 mM (91% Sättigung) UDP unter der Annahme eines K_D von 575 μM) und HDis-O-Methyl (Titrationsschritte: 30 μM (16% Sättigung), 143 μM (60% Sättigung), 549 μM (91% Sättigung) HDis-O-Methyl unter der Annahme eines K_D von 40 μM) durchgeführt. Die Endpunkte der Titrationsen sind in Abbildung 4.24 B dargestellt. Ein Vergleich mit Wildtyp-GTB (Abbildung 4.24 C) macht deutlich, dass das unbekannte Signal (Abbildung 4.24 A) des Met-M186A-GTB Spektrums, das gleiche Verhalten wie Signal 6 des Wildtyps aufweist. Die Zugabe von HDis führt zu einem langsamen Austausch zwischen den beiden Proteinzuständen. Des Weiteren sind beide Signale bei einer ähnlichen chemischen Verschiebung detektierbar. Das unbekannte Signal kann somit Signal 6 des Wildtyps zugeordnet werden. Demnach handelt es sich bei Signal 5 um M186. Die eindeutige Zuordnung von M191 zu Signal 4 und von M288 zu Signal 2 konnte durch den Vergleich der Signale bei UDP-Bindung erzielt werden. Die Spektren sind in Abbildung 4.26 und im Anhang Abschnitt 7.3.3 dargestellt.

Zusätzlich wurden HMQC-NOESY-Spektren (Mischzeit: 500 ms) mit den Met-GTB-Proben mit und ohne Liganden, sowie mit der Met-GTA und Met-M186A-GTB Probe aufgenommen. Anhand von Kristallstrukturen (PDB 2RIT, 2RIX und 2RJ8) wurden die Abstände zwischen C_ϵ der Methionine in Abhängigkeit der Ligandenbindung gemessen. Die Signale M186, M189, M288 und M289 weisen untereinander Abstände von 4 bis 12 Å auf. Bei einer Mischzeit von 500 ms werden hier Kreuzsignale im HMQC-NOESY-Spektrum erwartet. Da viele Signale entweder eine sehr ähnliche ^1H - oder ^{13}C -Verschiebung haben, können einige Kreuzsignale nicht eindeutig einem Signal zugeordnet werden. Aus diesem Grund wurde nur betrachtet, welche Signale überhaupt Kreuzsignale zeigen. In allen Spektren gibt es insgesamt fünf Signale, die untereinander NOE-Kreuzsignale zeigen, es handelt sich um Signale M186 (5), M189 (8), M191 (4), M288 (2) und Signal 6 (HMQC-NOESY-Spektren siehe Anhang Abschnitt 7.3.4). Die erwarteten und beobachteten Kreuzsignale und die bereits zugeordneten Signale lassen darauf schließen, dass es sich bei Signal 6 um M289 handeln muss. Das in Abbildung 4.25 gezeigte HMQC-NOESY-Spektrum von Met-GTA bestätigt diese Zuordnung. Es kann eindeutig ein Kreuzsignal zwischen M186 (5) und M289 (6) beobachtet werden kann. Die Methylgruppen von M186 und M289 haben laut Kristallstruktur einen Abstand von 6,5 Å.

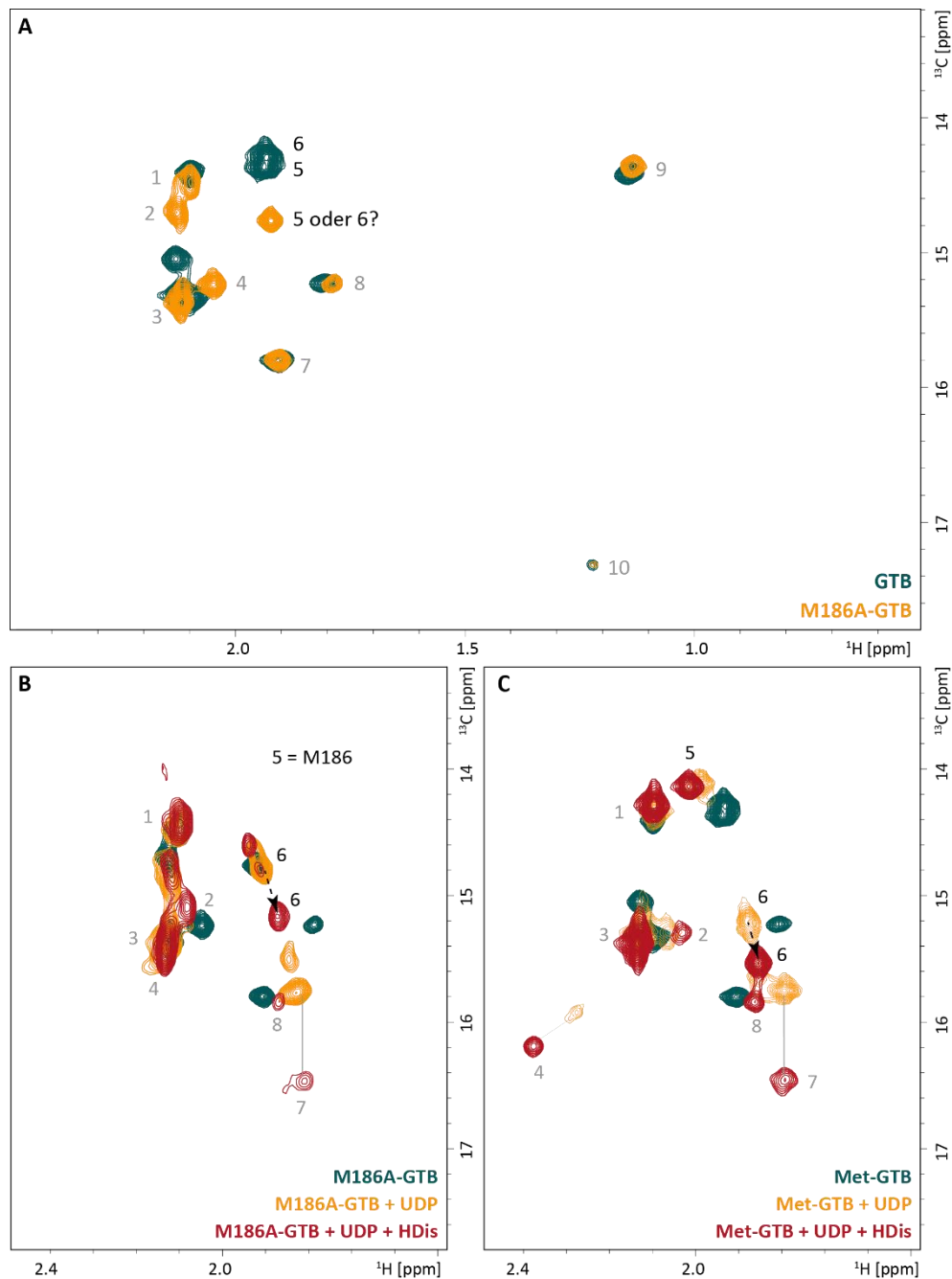


Abbildung 4.24: $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -methyl-TROSY-Spektren von Met-GTB und Met-M186A-GTB. (A) Gezeigt ist ein 220 μM Met-GTB (1)-Spektrum (grün) (Nummerierung siehe Tabelle 4.5) überlagert mit einem 150 μM Met-M186A-GTB Spektrum (gelb). (B) Überlagerung von Met-M186A-GTB Spektrum (grün) mit UDP-gesättigtem Spektrum (gelb) und HDis-O-Methyl-gesättigtem Spektrum (rot). Die UDP-Konzentration beträgt 5,9 mM, die HDis-O-Methyl-Konzentration 548 μM . (C) Überlagerung von Met-GTB Spektrum (grün) mit UDP-gesättigtem Spektrum (gelb) und HDis-O-Methyl-gesättigtem Spektrum (rot). Die UDP-Konzentration beträgt 6,1 mM, die HDis-O-Methyl-Konzentration 852 μM . Weitere Details siehe Abbildung 4.21. Alle Proben befanden sich in NMR-Puffer III.

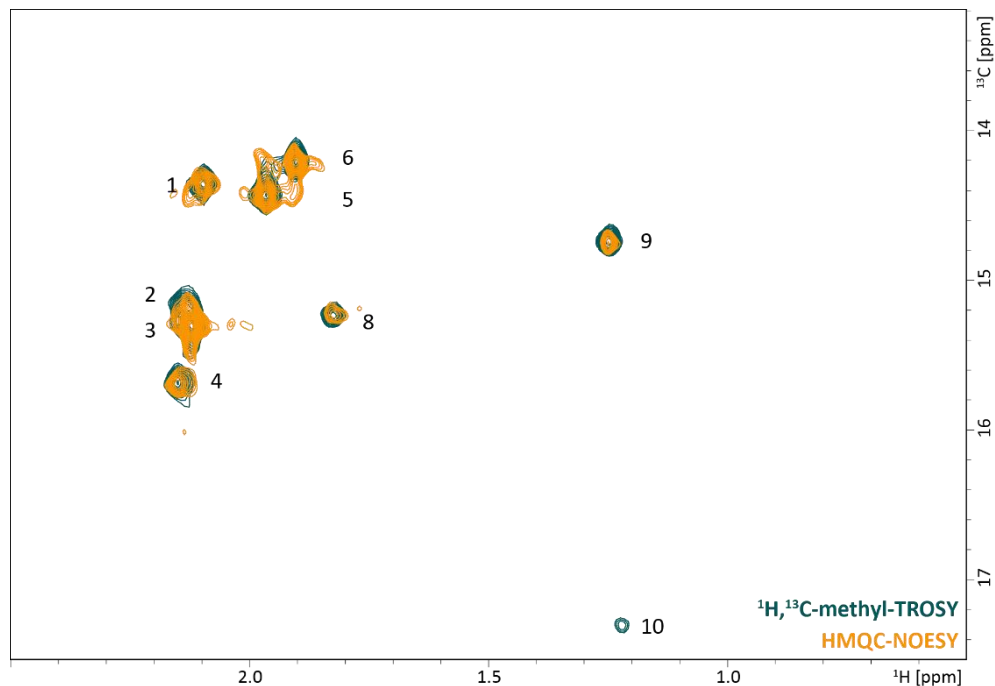


Abbildung 4.25: $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -methyl-TROSY-Spektrum (grün) und HMQC-NOESY-Spektrum von Met-GTA. Dargestellt ist eine 100 μM Met-GTA-Probe in NMR-Puffer III. Die Mischzeit im HMQC-NOESY Spektrum betrug 500 ms.

Abbildung 4.26 und Abbildung 4.27 geben nochmal einen Überblick über das Verhalten von Met-GTB und ihren Mutanten im freien, UDP-gebundenen Zustand und UDP- und HDis-gebundenen Zustand. Signal 9 zeigt außer bei Met-GTA immer eine Hochfeldverschiebung in beiden Dimensionen bei der Zugabe von UDP. Die HDis-Zugabe führt hier nur zu geringen Änderungen. Anhand dieses Verhaltens und der bereits zugeordneten Signale wird Signal 9 M214 zugeordnet. Aufgrund der geringen Intensität ist dieses Signal teilweise nicht detektierbar. Eine Tieffeldverschiebung ist bei Signal 4 (M191) sowohl bei UDP-, als auch HDis-Zugabe zu beobachten. Durch dieses Verhalten ist eine eindeutige Unterscheidung der Signale 2 (M288) und 4 (M191) in den Spektren möglich (siehe Abbildung 4.26 F und G). Bei Signal 6 (M289) kommt es sowohl bei der UDP- als auch bei der HDis-Bindung zu großen Änderungen in der chemischen Verschiebung in der indirekten Dimension. Bei den Mutanten M1896A- und M189V-Met-GTB sind beispielsweise auch zwei Zustände für Signal 6 (M289) in Anwesenheit von UDP detektierbar.

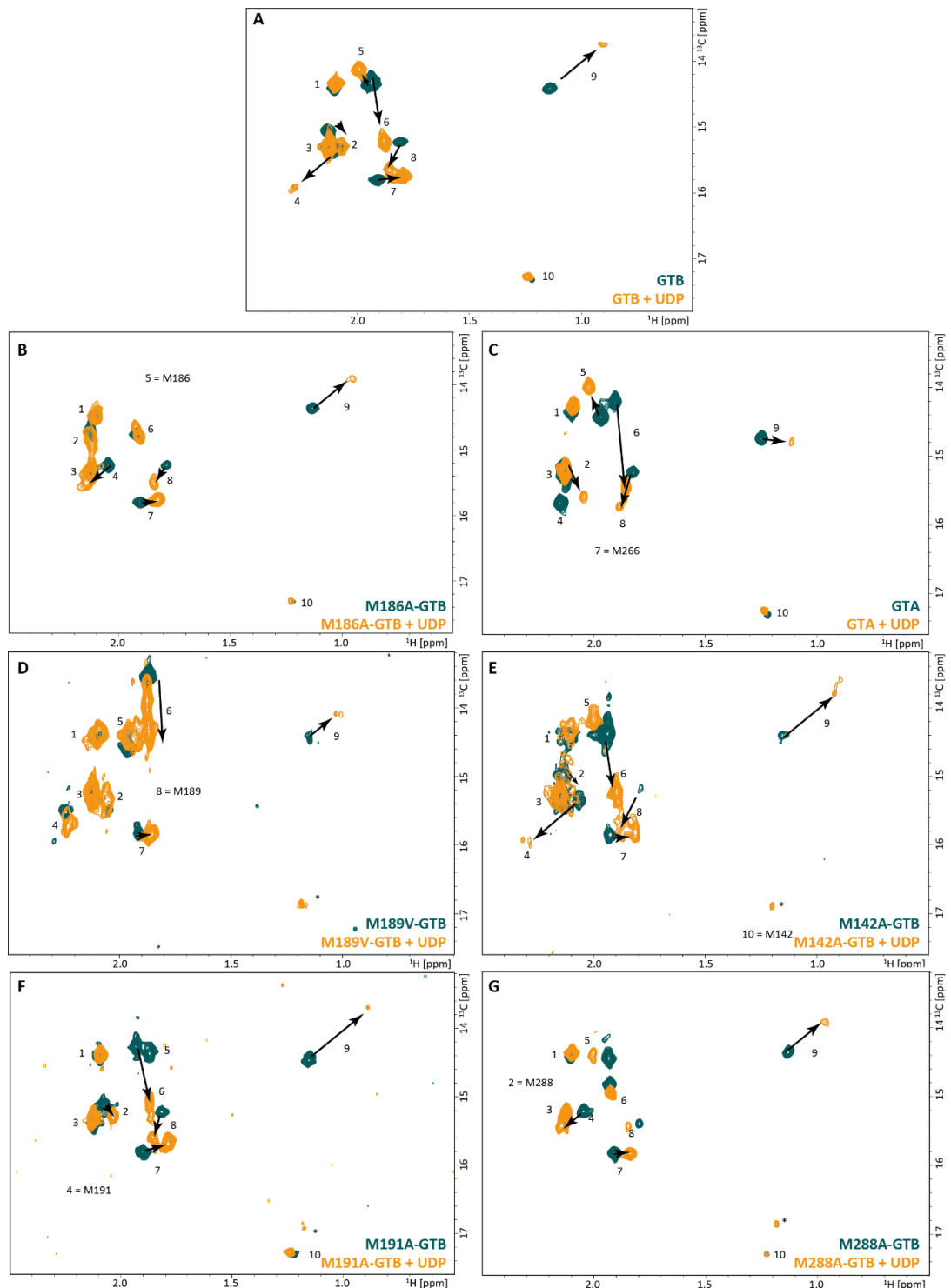


Abbildung 4.26: $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -methyl-TROSY-Spektren von Met-GTB und ihren Mutanten im freien und UDP-gebundenen Zustand. In grün sind jeweils die Proben im freien Zustand und in gelb die im UDP-gebundenen Zustand dargestellt. Alle Proben befinden sich in NMR-Puffer III. **(A)** 290 μM Met-GTB (3) mit und ohne 6,1 mM UDP. **(B)** 150 μM Met-M186A-GTB mit und ohne 6 mM UDP. **(C)** 100 μM Met-GTA mit und ohne 7,5 mM UDP. **(D)** 70 μM Met-M189V-GTB mit und ohne 4,8 mM UDP. **(E)** 133 μM Met-M142A-GTB mit und ohne 6 mM UDP. **(F)** 75 μM Met-M191A-GTB mit und ohne 6 mM UDP. **(G)** 14 μM Met-M288A-GTB mit und ohne 6 mM UDP.

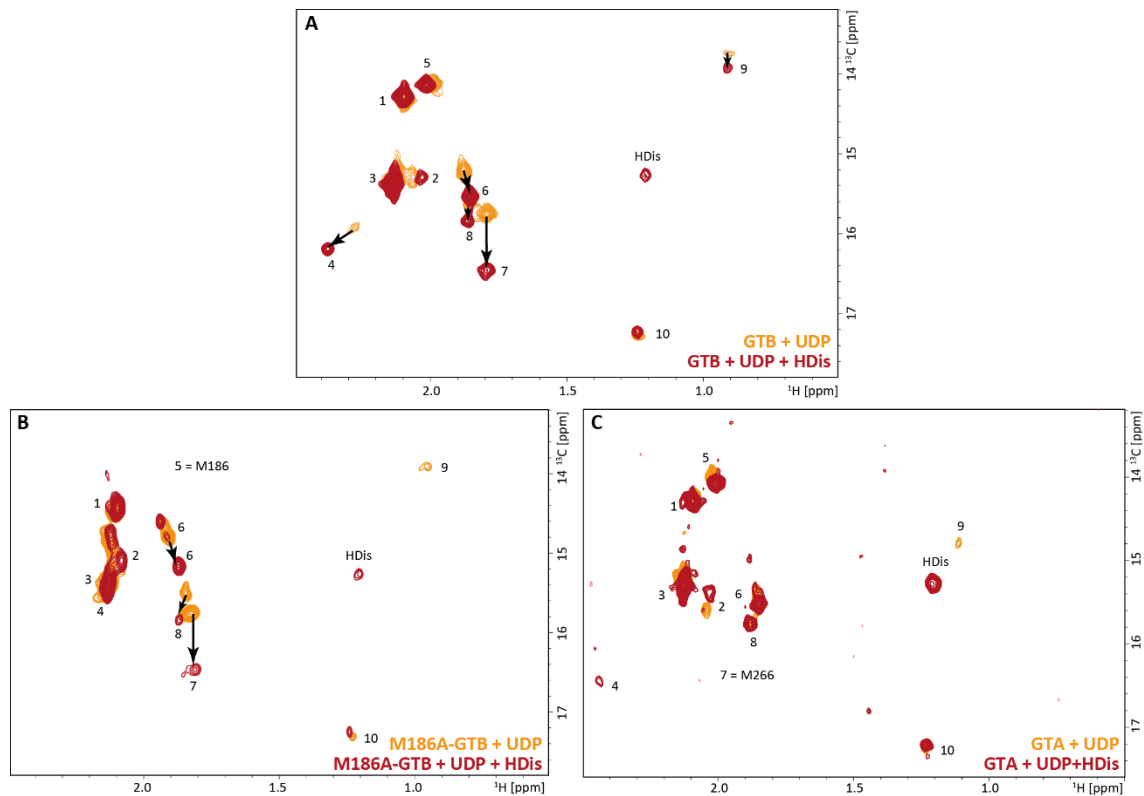


Abbildung 4.27: $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -methyl-TROSY-Spektren von Met-GTB und ihren Mutanten im UDP-gebundenen Zustand (gelb) und UDP- und HDis-gebundenen Zustand (rot). Alle Proben befinden sich in NMR-Puffer III. (A) 290 μM Met-GTB (3) mit 6,1 mM UDP und mit 852 μM HDis. (B) 150 μM Met-M186A-GTB mit 6 mM UDP und mit 548 μM HDis. (C) 100 μM Met-GTA mit 7,5 mM UDP und mit 776 μM HDis.

Die Signale 1, 3 und 10 zeigen sowohl bei der Ligandenbindung, als auch durch das Einbringen von Mutationen keine Änderungen in ihrer chemischen Verschiebung. Signal 10 wurde bereits M142 zugeordnet. Bei Signal 1 und 3 handelt es sich demnach um die N-terminalen Methionine 63 und 69. Eine Zusammenfassung der Zuordnung ist in Abbildung 4.28 zu finden.

Die Zugabe von HDis zu Met-GTB und zu der Mutante Met-M186A-GTB hat bei einigen Signalen einen langsamen Austausch zwischen dem gebundenen und ungebundenen Zustand zur Folge. Wird HDis zu UDP-gesättigter Met-GTA zugegeben, ist dies nicht zu beobachten. Die HDis-Zugabe führt hier nur zu einer Verschiebung von M288 (Signal 2) und M186 (Signal 5), alle anderen Signale verschieben sich nicht.

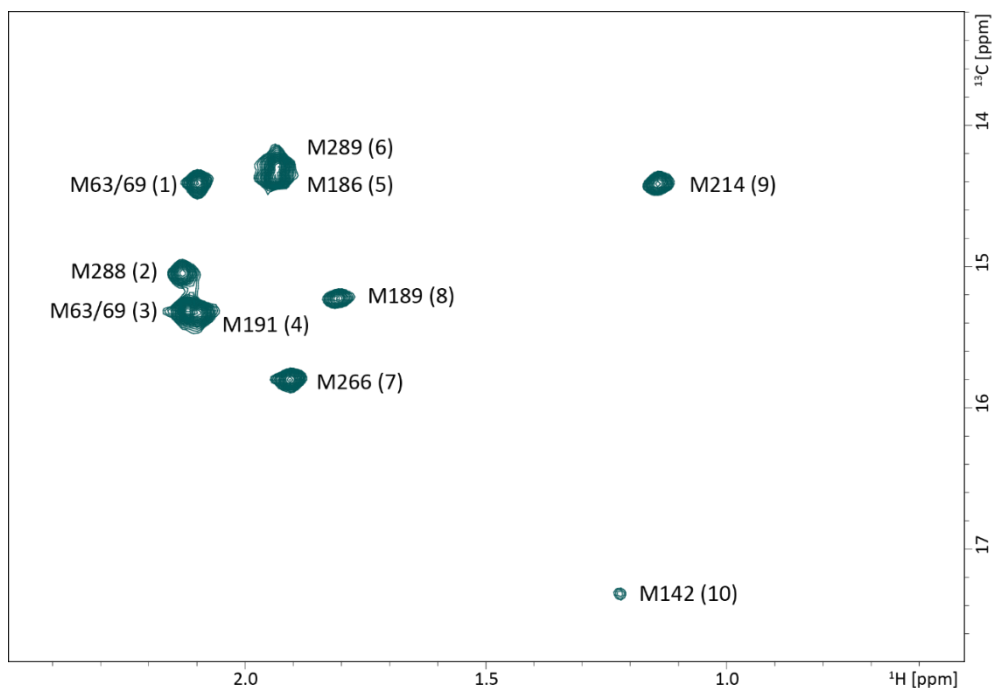


Abbildung 4.28: Zuordnung der Signale des $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -methyl-TROSY-Spektrums von Met-GTB. Dargestellt ist eine 220 μM Met-GTB (1)-Probe in NMR-Puffer III.

4.3.4 CPMG-Relaxations-Dispersions-Messungen mit Met-GTB

In Abschnitt 4.3.2 konnte gezeigt werden, dass die Ligandenbindung einen Einfluss auf die Konformation von GTB hat. In diesem Abschnitt wird anhand von CPMG-RD-Experimenten untersucht, ob die Methionin-Methylgruppen sich im μs -ms Bereich bewegen und inwiefern die Ligandenbindung von UDP und HDis die Proteindynamik beeinflusst.

Die CPMG-RD-Experimente wurden bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt. Da GTB bei Temperaturen über 298 K leicht aggregiert, wurden geringere Temperaturen für die Messungen getestet. In Abbildung 4.29 sind $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -methyl-TROSY-Spektren von Met-GTB bei 298 K, 293 K und 288 K dargestellt. Bei tiefen Temperaturen sind die Signale von M186 und M289 besser trennbar. Das Signal von M191 verschiebt sich jedoch unter Signal 3 und ist dadurch nicht auswertbar. An den Signalen von M142, M288 und M189 ist erkennbar, dass die Signalintensität bei tieferen Temperaturen abnimmt. Bei 283 K sind diese kaum noch detektierbar (Daten nicht gezeigt). Da die CPMG-RD-Experimente auf Intensitätsmessungen beruhen, ist ein gutes Signal-zu-Rausch-Verhältnis notwendig. Alle CPMG-RD-Messungen wurden daher bei 298 K, 293 K und 288 K durchgeführt.

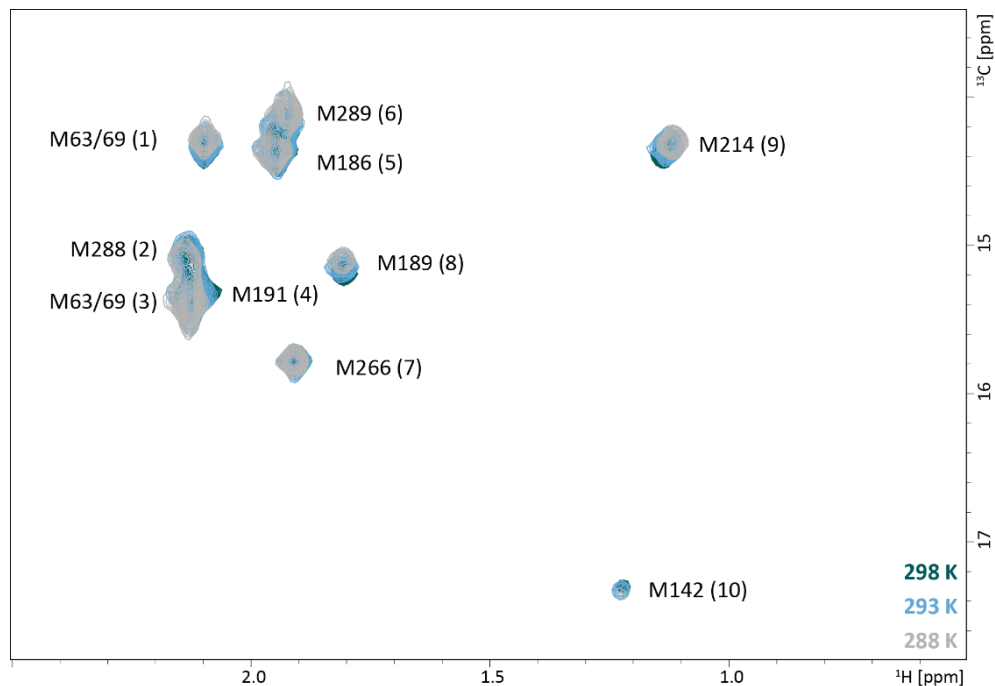


Abbildung 4.29: ^1H , ^{13}C -methyl-TROSY-Spektren von Met-GTB bei 298 K (grün), 293 K (blau) und 288 K (grau). Probe enthielt 215 μM Met-GTB (4) in NMR-Puffer III (Nummerierung siehe Tabelle 4.5 und Tabelle 3.11).

Außerdem wurden die Mischzeiten $T_{\text{CPMG}} = 20$ ms und $T_{\text{CPMG}} = 40$ ms getestet. T_{CPMG} gibt die Gesamtdauer der CPMG-Pulskaskade an. Bei einer CPMG-Frequenz von 50 Hz soll die Signalintensität ungefähr 50% der Signalintensität des Referenzspektrums entsprechen. So kann einerseits ein genügend hohes Signal-zu-Rausch-Verhältnis gewährleistet werden, andererseits ist ein möglicher Austausch zwischen zwei Zuständen im μs -ms-Bereich schon detektierbar. Abbildung 4.30 zeigt die relativen Intensitäten der Spektren mit 50 Hz CPMG-Pulsen im Vergleich zu den Referenzspektren ohne CPMG-Pulskaskade. Die Spektren wurden bei 298 K und 288 K aufgenommen. Schon bei 298 K und einer Mischzeit T_{CPMG} von 40 ms sind einige relative Intensitäten unter 50%. Bei einer Mischzeit von 20 ms sind sowohl bei 298 K, als auch bei 288 K die relativen Intensitäten bei etwa 50%. Die CPMG-RD-Messungen mit Met-GTB werden mit einer Mischzeit T_{CPMG} von 20 ms aufgenommen.

Für die finalen Experimente wurden verschiedene Met-GTB-Präparationen verwendet. Die verwendeten Konzentrationen sind in Tabelle 4.8 zusammengefasst. Eine Zusammenfassung aller Messparameter ist in Abschnitt 3.5.6 zu finden.

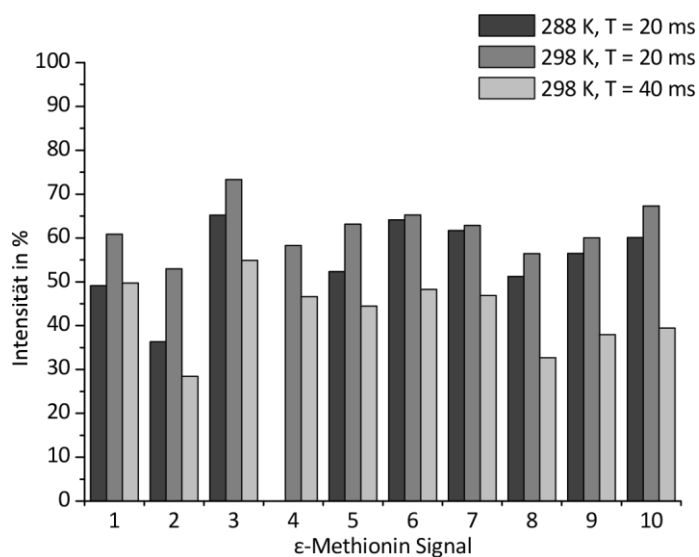


Abbildung 4.30: Einfluss der Mischzeit T_{CPMG} auf die Signalintensität bei 298 K und 288 K. Dargestellt ist die relative Signalintensität von CPMG-RD- ^1H , ^{13}C -methyl-TROSY-Spektren bei einer Feldstärke von 50 Hz im Vergleich zum Referenzspektrum ohne CPMG-Sequenz bei Mischzeiten T_{CPMG} von 20 ms und 40 ms. Die Probe enthielt 130 μM Met-GTB (1) NMR-Puffer III (Nummerierung Tabelle 4.5 und Tabelle 3.11) und wurde bei 298 und 288 K an einem 500 MHz Spektrometer gemessen. Messparameter siehe Abschnitt 3.5.6.

Tabelle 4.8: Verwendete Proben, Konzentrationen und Messparameter für CPMG-RD-Messungen mit Met-GTB. Alle Proben befanden sich in NMR-Puffer III. Nummerierung Tabelle 4.5.

Spektrometer	RD-Messungen	Proben	Scans
500 MHz	ohne Ligand	130 μM Met-GTB (1)	24-48
		55 μM Met-GTB (2)	
	mit Donorsubstrat	125 μM Met-GTB (1) + 9 mM UDP 290 μM Met-GTB (3) + 6,1 mM UDP	16-32
700 MHz	ohne Ligand	215 μM Met-GTB (4)	16-24
	mit Donorsubstrat	213 μM Met-GTB (4) + 6 mM UDP	32-40
	mit Donor- und Akzeptorsubstrat	210 μM Met-GTB (4) + 6 mM UDP + 800 μM HDis- O - ^{13}C -Methyl	64

In Abbildung 4.31 sind Differenzen der transversalen Relaxationsraten $\Delta R_{2,\text{eff}}$ bei einer CPMG-Feldstärke von 50 und 500 Hz dargestellt. Eine Differenz größer als Null, deutet auf Dispersionen und somit Bewegungen im μs -ms-Bereich hin. Insgesamt sind die hier beobachteten Werte für $\Delta R_{2,\text{eff}}$ sehr gering und schwanken teilweise stark zwischen den gemessenen Temperaturen. Nur Signal 3 (M63/69) und Signal 6 (M289) zeigen erhöhte $\Delta R_{2,\text{eff}}$ -Werte. Die Dispersionsprofile dieser beiden, sowie von Methionin 186, welches sich in der internen Schliefe befindet und von Methionin 266, welches im aktiven Zentrum lokalisiert ist, sind in Abbildung 4.32 dargestellt. Signal 3 (M63/69) zeigt eine geringe Dispersion, welche unabhängig von der Anwesenheit der Liganden ist. Für Signal 6 (M289) ist im Vergleich zum freien Enzym bei UDP-Sättigung, sowie HDis-Sättigung ein leichter Anstieg der Dispersion zu beobachten. Bei M186 der internen Schleife ist in Anwesenheit von UDP und HDis keine Bewegung im μs -ms-Bereich zu beobachten. Das freie Enzym zeigt hier eine leichte Dispersion. M266 des aktiven Zentrums (Abbildung 4.32 A bis D) zeigt unabhängig von der Ligandenbindung keine Dispersionen. Eine genaue Bestimmung der Austauschraten ist aufgrund der insgesamt sehr niedrigen Dispersionen nicht möglich.

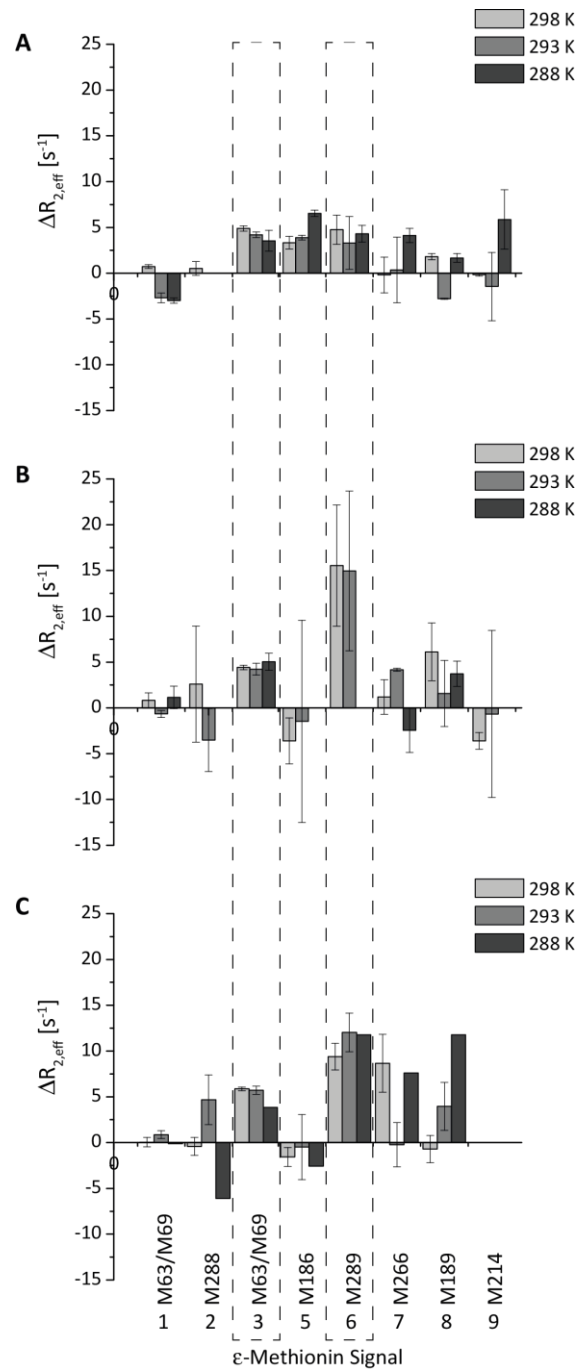


Abbildung 4.31: CPMG-Relaxations-Dispersions-Experimente mit Met-GTB. Dargestellt ist die Differenz der transversalen Relaxationsraten mit $\Delta R_{2,eff} = R_{2,eff}(50 \text{ Hz}) - R_{2,eff}(500 \text{ Hz})$. Die CPMG-RD-Experimente wurden (A) ohne Substrate, (B) mit 6 mM UDP und (C) mit 6 mM UDP und 0,8 mM HDis-O-Methyl durchgeführt. Spektren wurden mit 215 μM Met-GTB (4) bei 298 K, 293 K und 288 K an einem 700 MHz Spektrometer aufgenommen. Signale 2 (M288), 4 (M191), 9 (M214) und 10 (M142) konnten aufgrund von zu geringer Intensität teilweise nicht ausgewertet werden. Signal 4 überlagert zusätzlich mit Signal 3. Gestrichelte Linien zeigen Signale, welche geringe Dispersionen zeigen. Alle Messungen, außer die bei 288 K in Anwesenheit von UDP und HDis, wurden in Doppelbestimmung durchgeführt.

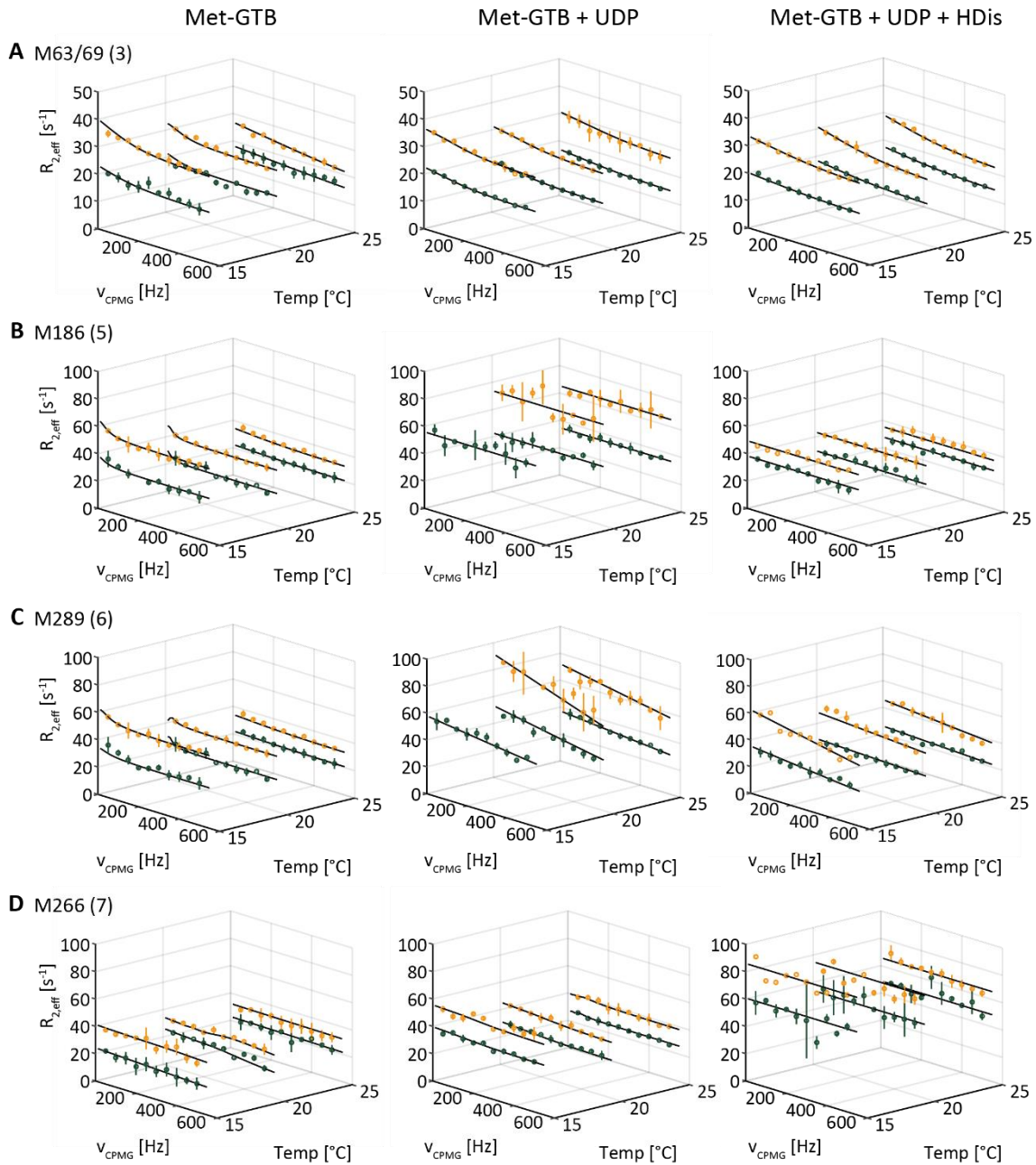


Abbildung 4.32: Einfluss der UDP und HDis-Bindung auf Relaxations-Dispersions-Profile von ausgewählten Signalen von Met-GTB. CPMG-RD-Experimente wurden mit Met-GTB an einem 500 MHz (grün) und 700 MHz (gelb) Spektrometer bei 298 K, 293 K und 288 K mit CPMG-Feldstärken von 50-500 Hz durchgeführt. Gezeigt sind RD-Profile von M63/69, M186, M289 und M266 ohne Substrate (links), mit UDP (mittig) und mit UDP und HDis (rechts). Experimente wurden in Doppelbestimmung durchgeführt, abgesehen von Experimenten am 700 MHz-Spektrometer bei 288 K und in Anwesenheit von UDP und HDis. Fehlerbalken entsprechen Standardabweichung der Doppelbestimmungen. Auswertung erfolgte mit GUARDD (Kleckner and Foster, 2011). Restliche Relaxations-Dispersions-Profile siehe Anhang Abschnitt 7.3.8.

4.4 Etablierung von inversen Sättigungstransfer-Experimenten

Bei klassischen STD-NMR Experimenten werden die Spins des Proteins gesättigt. Bindet ein Ligand an das Protein, wird diese Sättigung auf die Spins des Liganden übertragen. Der Nachweis erfolgt anhand von Protonenspektren des Liganden mit und ohne Proteinsättigung. Beim inversen Sättigungstransfer hingegen werden die Spins des Liganden gesättigt und die Sättigung auf die Spins des Proteins übertragen. Der Nachweis wird proteinbasiert durchgeführt. Diese Methode wurden bereits auf ^1H , ^{15}N -markierte Proteine angewendet (Sakakura et al., 2008) und sollen nun mit ^1H , ^{13}C -markierten Proben durchgeführt werden. Durch diese Methode kann einerseits die Orientierung des Liganden im Protein untersucht werden, andererseits kann, wenn bereits Kristallstrukturen vorhanden sind, außerdem eine abstandsabhängige Proteinsignalzuordnung erfolgen.

Als Modell diente hier eine [$\text{U-}^2\text{H}$, $\{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$, $\{\text{Leu}\delta 1/2\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$, $\{\text{Val}\gamma 1/2\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$]-markierte GTA-Probe, welche im Folgenden nur als ILV-GTA bezeichnet wird. Als Ligand diente das Substratanalogon UDP-Gal. Neben den inversen Sättigungstransferexperimenten fanden zum Vergleich der Bindungsepitope auch klassische STD-Experimente mit einer unmarkierten GTA-Probe statt. Zusätzlich wurde das Bindungsverhalten von UDP-Gal an ILV-GTA anhand von Titrationsexperimenten untersucht. Des Weiteren wurden drei Mutanten hergestellt, die entweder nur $\{\text{Val}\gamma 1/2\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markiert (V-V184I-GTA und V-V212A-GTA) oder $\{\{\text{Leu}\delta 1/2\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$, $\{\text{Val}\gamma 1/2\text{-}^{13}\text{CH}_3\}\}$ -markiert waren (LV-V351I-GTA).

Die hier dargestellten Ergebnisse wurden zusammen mit Robert Creutzmacher basierend auf seiner Bachelorarbeit erarbeitet.

4.4.1 Präparation von ILV-GTA und diverser Mutanten

Die Proben ILV-GTA (1), ILV-GTA (2) und LV-V351I-GTA waren deuteriert, alle anderen wurden in H_2O synthetisiert. Die Proteinbiosynthese ist in Abschnitt 3.2.2 beschrieben. Die Medienzusammensetzung ist in Tabelle 3.4 bzw. für die unmarkierte GTA-Probe in Tabelle 3.1 zu finden. Die Reinigung wurde, wie in Abschnitt 3.2.3 beschrieben, durchgeführt. Die in Minimalmedium synthetisierten Proben weisen vergleichbare Ausbeuten auf. Alle Proben sind aktiv, jedoch haben die Proben ILV-GTA (1) und ILV-GTA (2) eine vergleichsweise geringe Aktivität, die Mutante V-V212A-GTA hingegen eine hohe. Alle Proben sind rein und können für weitere Experimente verwendet werden.

Tabelle 4.9: Qualitätskontrolle von ILV-GTA und drei Mutanten. Angegeben ist das eingesetzte Volumen an Minimalmedium, die Ausbeute pro Liter Kulturmedium, die spezifische Aktivität und der Quotient A_{260}/A_{280} nach Umpufferung in NMR-Puffer III. Die Pufferzusammensetzung ist in Tabelle 3.11 zu finden. Mit * gekennzeichnete Proben wurden in H₂O synthetisiert.

Probe	ILV- GTA (1)	ILV- GTA (2)	GTA (unmar- kiert)*	V- V184I- GTA*	V- V212A- GTA*	LV- V351I- GTA
Kulturvolumen [mL]	300	300	1000	500	500	500
Ausbeute [mg/L]	8	8	75	6	5	5
Spezifische Aktivität [U/mg]	4,2	5,5	10,7	13,1	22,5	13,7
A_{260}/A_{280}	0,58	0,58	0,58	0,56	0,56	0,58

4.4.2 Bindung von UDP-Gal an ILV-GTA

ILV-GTA besitzt 10 Isoleucine, 29 Leucine und 31 Valine. Es werden insgesamt 130 Signale im $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -methyl-TROSY-Spektrum erwartet, von denen 117 detektiert werden können (Abbildung 4.33). Für Ile 123 und Ile 192 ist bereits eine Zuordnung vorhanden (siehe Abschnitt 4.2.4 und (Grimm, 2015)). Des Weiteren konnte Leu 266 durch Vergleich von ILV-GTA und ILV-GTB-Spektren zugeordnet werden (Creutzmacher, 2014).

Der Einfluss der UDP-Gal Bindung an ILV-GTA wurde durch Titrationsexperimente untersucht. Es wurden insgesamt zwei Titrations durchgeföhrt, welche in Tabelle 4.10 beschrieben sind. Für die Analyse wurden die Daten vereinigt. Dafür wurde bei den drei überlappenden Titrationsschritten (15%, 30% und 45% Sättigung) der Mittelwert der chemischen Verschiebungen der einzelnen Signale gebildet. Während der Titration befinden sich die meisten Signale im schnellen Austausch (siehe Abbildung 4.33 C), bei wenigen Signalen ist auch ein langsamer Austausch zu beobachten. Insgesamt konnte die Verschiebung von 113 Signalen nachvollzogen werden.

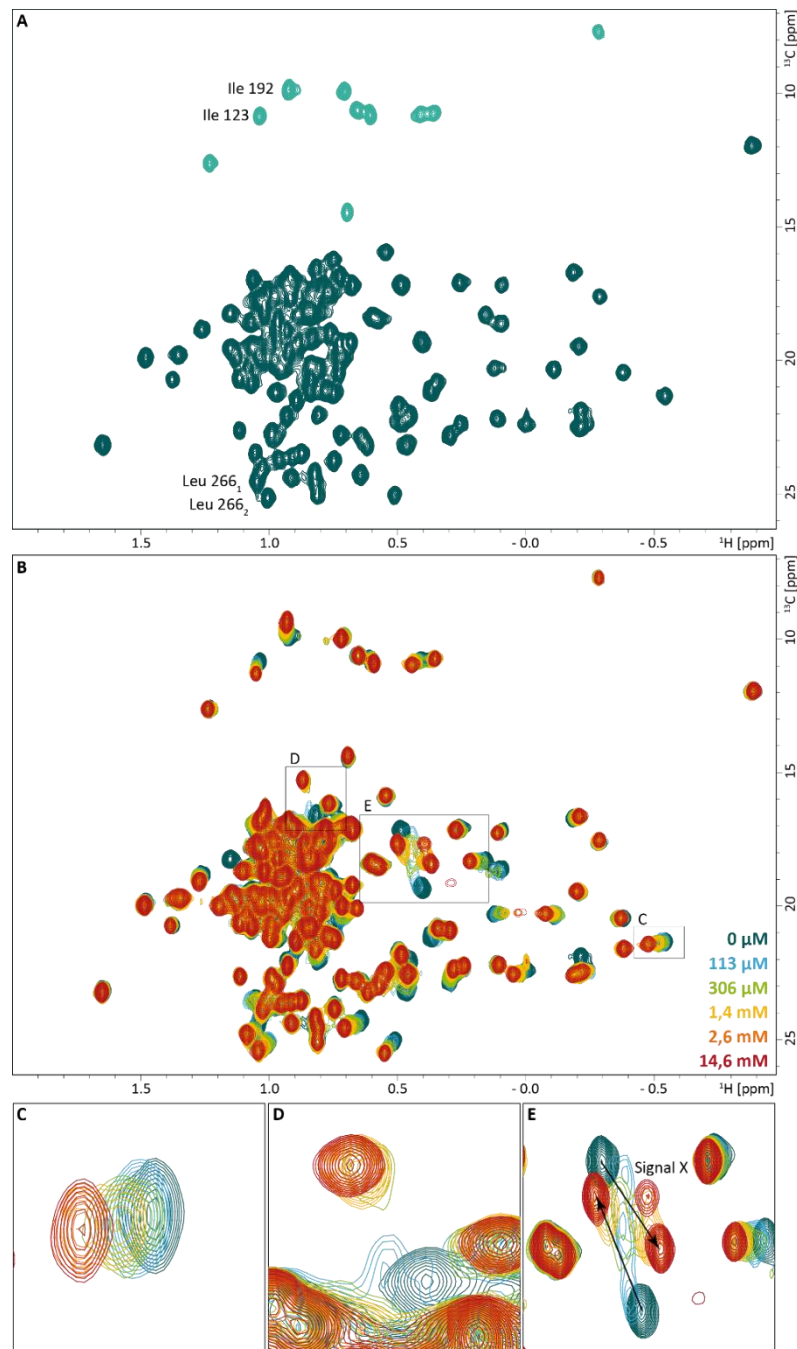


Abbildung 4.33: ^1H , ^{13}C -methyl-TROSY-Spektren von ILV-GTA und UDP-Gal. (A) Dargestellt ist ein ^1H , ^{13}C -methyl-TROSY-Spektrum einer 150 μM ILV-GTA (2) Probe in NMR-Puffer III (Nummerierung siehe Tabelle 4.9 und Tabelle 3.11). Hellgrüne Signale stellen Isoleucine dar. (B) Überlagerte ^1H , ^{13}C -methyl-TROSY-Spektren einzelner Titrationsschritte mit UDP-Gal. Spektren mit 2,6 mM und 14,6 mM UDP-Gal wurden mit 250 μM ILV-GTA (2) erstellt, alle anderen mit 150 μM ILV-GTA (2). Alle Proben befanden sich in NMR-Puffer III (Tabelle 3.11). Die jeweiligen Spektren und UDP-Gal Konzentrationen sind farbkodiert. Legende siehe Bild. (C) – (E) zeigen Ausschnitte aus (B). Während der Titration kommt es zu (C) schnellem Austausch, (D) langsamen Austausch zwischen dem freien und ligandengebundenem Zustand und (E) zur Entstehung neuer Signale.

Tabelle 4.10: Titrationschritte ILV-GTA (2) mit UDP-Gal. Titration 1 wurde mit 150 μM ILV-GTA (2) und Titration 2 mit 250 μM ILV-GTA (2) durchgeführt. Beide Proben befanden sich in NMR-Puffer III (siehe Tabelle 3.11). Sättigung wurde mit Gleichung 3.6 berechnet.

Sättigung	Titration 1 – UDP-Gal [mM]	Titration 2 – UDP-Gal [mM]
4,1%	0,075	-
6,1%	0,113	-
7,9%	0,150	-
15%	0,306	0,320
30%	0,735	0,760
45%	1,380	1,420
60%	-	2,550
75%	-	5,000
90%	-	14,625

Aus den chemischen Verschiebungsdifferenzen in Abhängigkeit von der Ligandenkonzentration wurden Bindungsisotherme gebildet. Eine Analyse dieser zeigt, dass die Bindung von UDP-Gal ein mehrstufiger Prozess ist. Je nach Signal ist ein unterschiedliches Bindungsverhalten beobachtbar (siehe Abbildung 4.34). Um die Anzahl an Bindungsereignissen zu isolieren und um Signalrauschen zu entfernen, wurde eine Singulärwertzerlegung mit den chemischen Verschiebungen der Titrationschritte durchgeführt (siehe Abschnitt 3.5.11). Bei den Bindungsereignissen kann es sich einerseits um Bindungsstellen, aber auch um strukturelle Änderungen im Protein handeln. Es wurden insgesamt vier Bindungsereignisse festgestellt, wobei eins dem freien Zustand des Proteins entspricht. Die chemische Verschiebungs-Matrix wurde mit den vier identifizierten Komponenten rekonstruiert. Aus diesen Daten wurden chemischen Verschiebungsdifferenzen $\Delta\delta$ der einzelnen Titrationschritte in der ^1H - und ^{13}C -Dimension gebildet und gegen die Ligandenkonzentration aufgetragen. Die Kurven waren mit den Rohdaten vergleichbar (Abschnitt 7.4). Die K_D -Bestimmung erfolgte wie in Abschnitt 3.5.11 beschrieben. In Tabelle 4.11 sind die ermittelten Dissoziationskonstanten dargestellt. K_{D1} und K_{D2} liegen mit 35 μM und 95 μM unterhalb der eingesetzten Proteinkonzentration. K_{D3} liegt ungefähr bei der Hälfte des mittels SPR ermittelten K_D von 1,6 mM (Grimm, 2015).

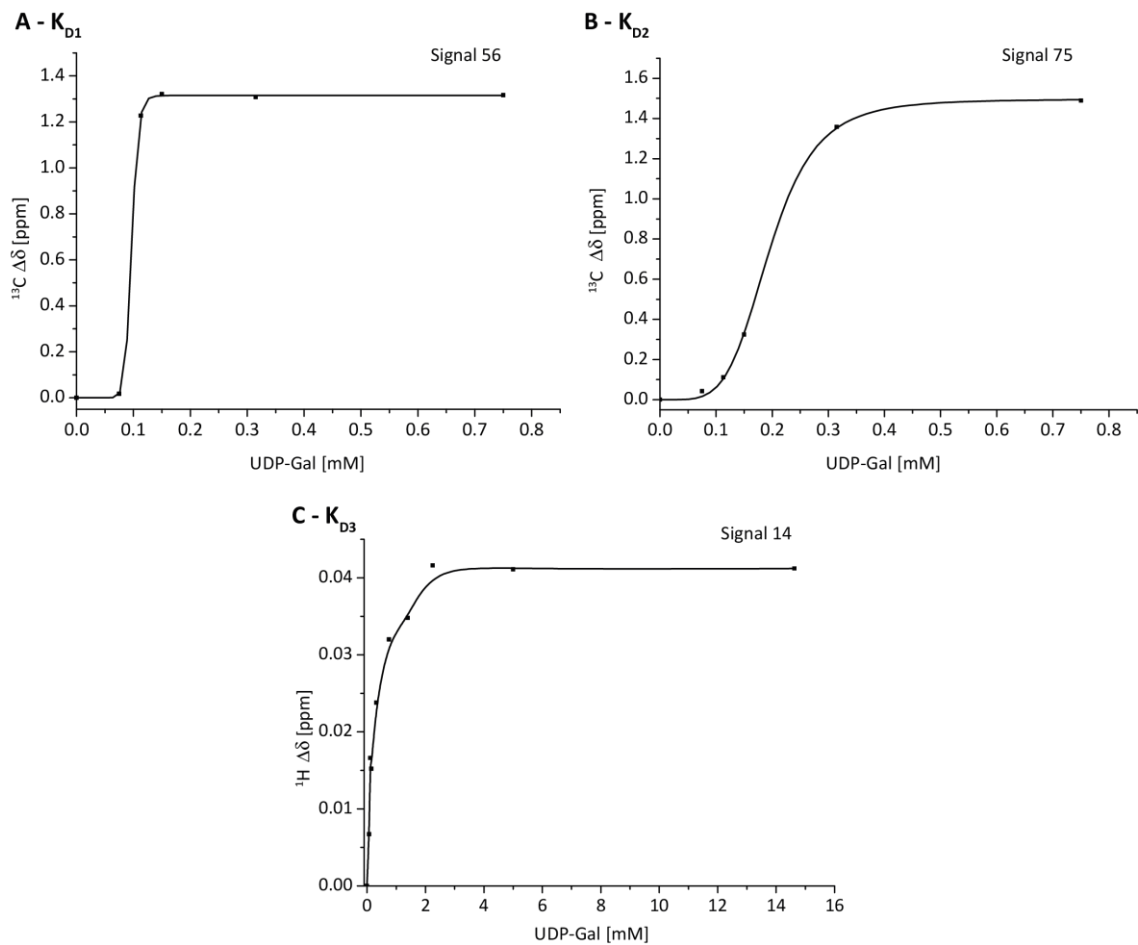


Abbildung 4.34: Darstellung der drei detektierten Bindungsereignisse bei Titration von ILV-GTA mit UDP-Gal. In (A) und (B) sind Bindungsereignisse bis zu einer 800 μM Ligandenkonzentration dargestellt. (C) zeigt eine gesamte Bindungsisotherme. Darstellung der Daten nach SVD-Analyse mit vier Komponenten.

Tabelle 4.11: Dissoziationskonstanten K_D und Hill-Koeffizienten aus $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -methyl-TROSY-Titrationsexperimenten mit entsprechenden R^2 und χ^2 -Werten. Die Proteinkonzentration wurde auf $73,5 \pm 9,8 \mu\text{M}$ angepasst.

K_{D1} [μM]	K_{D2} [μM]	K_{D3} [μM]	h_1	h_2	h_3	R^2	χ^2
35 ± 10	93 ± 15	668 ± 45	12,1	4,9	1,8	0,999153	0,000143

4.4.3 STD-NMR mit unmarkierter GTA und UDP-Gal

Um die Bindungsepitope von UDP-Gal zu bestimmen, wurden STD-NMR-Experimente mit UDP-Gal und einer unmarkierten GTA-Probe durchgeführt. Die experimentellen Bedingungen sind in Abschnitt 3.5.8 zu finden. Abbildung 4.35 zeigt die Bindungsepitope von UDP-Gal. Die Protonen H5 und H1' überlagern im ^1H -Protonenspektrum bei 5,91 ppm (siehe Abbildung 4.36) und erhalten den größten Sättigungstransfer. Demnach ist bei den inversen Sättigungstransfer-Experimenten bei der Sättigungsfrequenz von 5,91 ppm ebenfalls der größte Transfer zu erwarten. Der STD-Effekt von H6, H1'', H3'' und H4'' liegt bei 30-40%. Aufgrund der Signalüberlagerung konnten nicht alle Bindungsepitope eindeutig bestimmt werden.

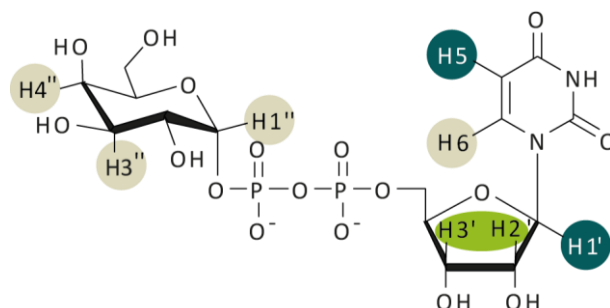


Abbildung 4.35: Mittels STD-NMR bestimmte Bindungsepitope von UDP-Gal in Gegenwart von GTA. Die NMR-Probe enthielt 20 μM GTA und 2 mM UDP-Gal in NMR-Puffer III (Tabelle 3.11). Die Kreise stellen prozentualen STD-Effekt dar. Signal mit höchstem Effekt wurde auf 100% normalisiert. Signale mit STD-Effekt > 80% in dunkelgrün, mit STD-Effekt zwischen 50 – 80% in hellgrün und STD-Effekte < 50% in blassgrün dargestellt. Sättigungstransfer fand auch auf andere Protonen statt, diese konnten aber aufgrund der Signalüberlagerung nicht quantifiziert werden.

4.4.4 Kontrollexperimente zur Identifikation von Messbedingungen

Die Etablierung von inversen Sättigungsexperimenten erfordert Kontrollexperimente sowohl am Liganden, als auch am Protein. Es wurden isolierte Signale am Liganden identifiziert, welche spezifisch gesättigt werden können. Des Weiteren wurde getestet, ob die gefundenen Liganden-Sättigungsbedingungen auch am Protein (ohne Ligand) direkte Sättigung hervorrufen.

Als Ligand dient hier UDP-Gal, welches in Abbildung 4.36 dargestellt ist. UDP-Gal weist drei isolierte Signale auf – Signal H6 des Uracil-Rings bei 7,87 ppm, Signal H5 des Uracil-Rings und Signal H1' der Ribose überlagern bei 5,91 ppm und Signal H1'' der Galactose bei 5,56 ppm (Hinweis: die angegebenen Verschiebungen beziehen sich auf das unreferenzierte Spektrum). Alle anderen Signale im Bereich von 3,6 ppm bis 4,4 ppm

haben nur geringe Unterschiede in ihrer chemischen Verschiebung, sodass eine selektive Signalanregung nicht möglich ist. Außerdem überlagern sie mit den aliphatischen Protonen der Aminosäureseitenketten. Durch eine spezifische Ligandensättigung in diesem Bereich kann es zu einer ungewollten Sättigung von Protonen des Proteins kommen.

Die bestmögliche Ligandensättigung wurde bei einer Sättigungszeit von 2 s und selektiven Gauß-Pulsen mit einer Länge von 50 ms und einer Feldstärke von 70 Hz erreicht (siehe 3.5.8). Die eben beschriebenen Bedingungen wurden auf eine ILV-GTA (1)-Probe ohne Ligand angewendet, um eine direkte Anregung des Proteins zu untersuchen. Anhand der Signalintensitäten des Referenzspektrums und des Sättigungsspektrums wurde die relative Intensitätsreduktion (RIR) anhand von Gleichung 3.4 berechnet (Tabelle 4.12).

Es ist erkennbar, dass bei größerer Hochfeldverschiebung die direkte Anregung zunimmt. Bei dem in Abbildung 4.37 C dargestellten Kontrollspektrum ist auch erkennbar, dass Signal 37 eine signifikante Intensitätsreduktion zeigt, im finalen Spektrum und auch bei allen anderen Sättigungsfrequenzen jedoch nicht. Es handelt sich hierbei um ein Artefakt, welches daher im Folgenden nicht weiter betrachtet wird.

Insgesamt ist die direkte Anregung jedoch gering, sodass alle getesteten Anregungsfrequenzen für die inversen Sättigungstransferexperimente mit Protein und Ligand verwendet werden können.

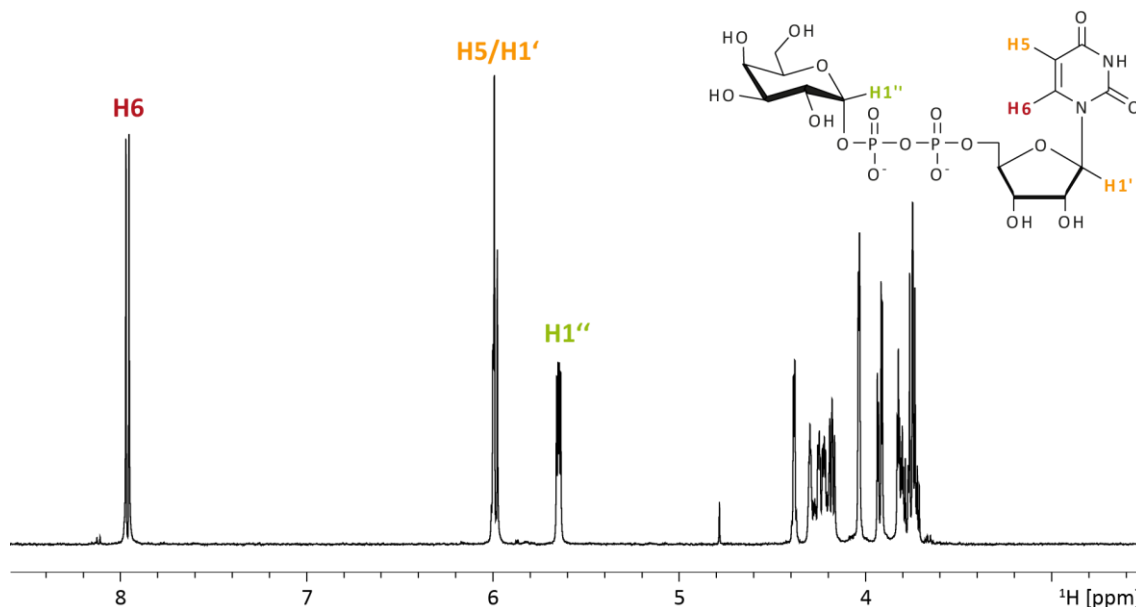


Abbildung 4.36: ^1H -Spektrum und Struktur von UDP-Gal. Dargestellt ist ein ^1H -Spektrum einer 2 mM UDP-Gal-Probe in NMR-Puffer III (Tabelle 3.11). In der Struktur und im Spektrum sind einzelne gut isolierte Signale hervorgehoben, welche im Folgenden spezifisch gesättigt wurden.

Tabelle 4.12: Einfluss von Sättigungspulskaskaden auf ILV-GTA ohne Ligand. Angegeben ist die chemische Verschiebung, auf welche die Sättigungspulskaskade eingestrahlt wurde, die Anzahl der auswertbaren Signale und die mittlere RIR (nach Gleichung 3.4) und deren Standardabweichung. Die NMR-Experimente wurden mit einer 250 μM ILV-GTA (1)-Probe in NMR-Puffer III durchgeführt.

Chemische Verschiebung des gesättigten Signals	Anzahl der ausgewerteten Signale	Mittlere RIR \pm Standardabweichung
7,87 ppm	116	$3,8 \pm 3,0\%$
5,91 ppm	116	$4,1 \pm 2,6\%$
5,56 ppm	116	$4,7 \pm 3,4\%$

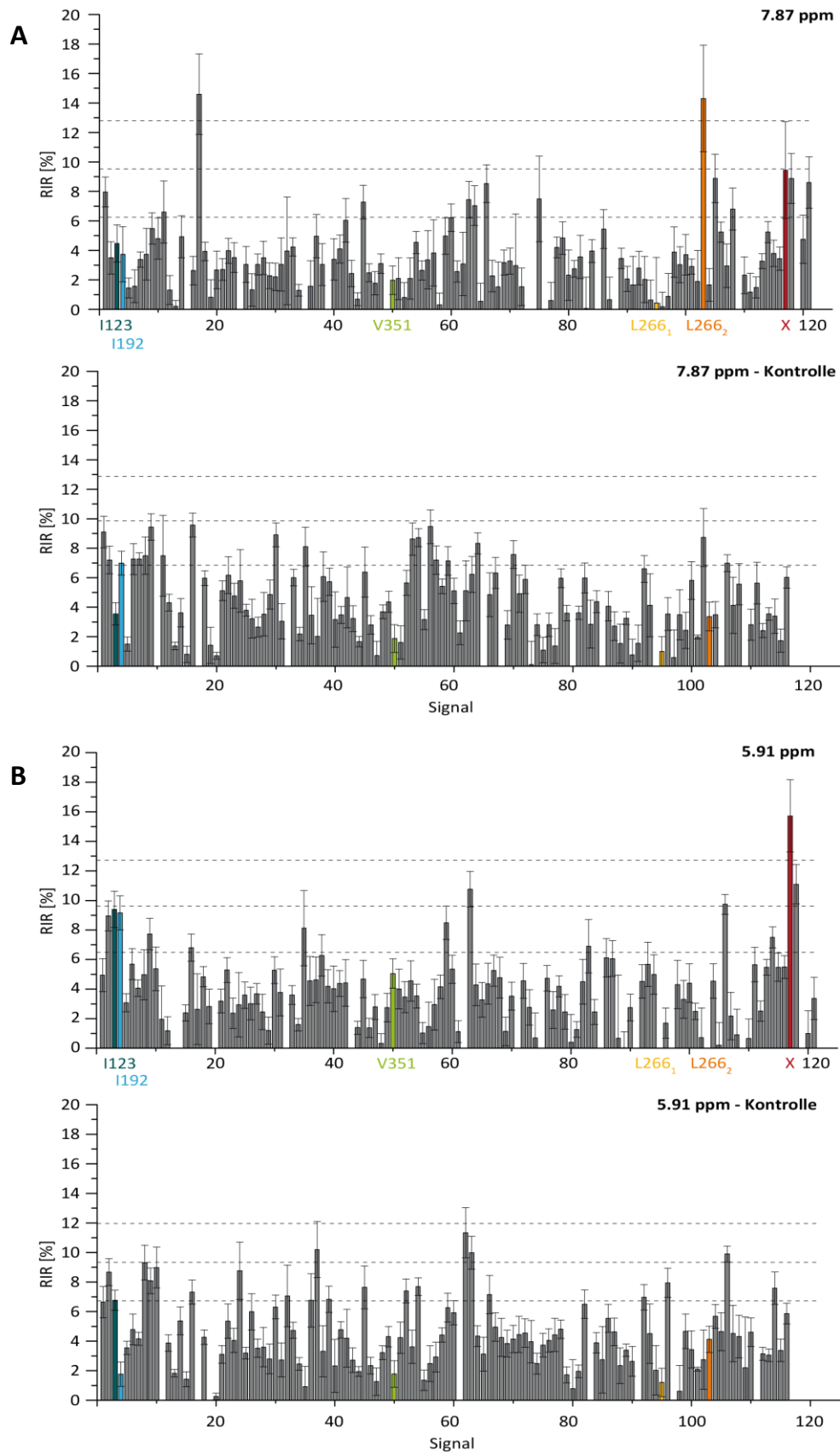
4.4.5 Inverse Sättigungstransfer-Experimente mit ILV-GTA und UDP-Gal

Um den Sättigungstransfer einzelner UDP-Gal Spins auf das Protein nachzuweisen, wurde eine ILV-markierte GTA-Probe mit UDP-Gal versetzt. Der Sättigungstransfer wurde anhand von $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -methyl-TROSY-Spektren mit und ohne Anregungspulskaskade getestet (Details siehe Abschnitt 3.5.8). Da durch die Zugabe von UDP-Gal einige neue Signale sichtbar werden, wurden insgesamt 121 Signale ausgewertet. Die Berechnung der relativen Intensitätsreduktion erfolgte nach Gleichung 3.4. Die absoluten Intensitäten, sowie die chemische Verschiebung der einzelnen Signale sind im Anhang Abschnitt 7.3.10 zu finden. Nur relative Intensitätsreduktionen, welche größer als der Mittelwert aller RIR, addiert mit seiner dreifachen Standardabweichung, sind, werden als signifikant betrachtet.

In Abbildung 4.37 ist die relative Intensitätsreduktion jedes Signales bei den drei Anregungsfrequenzen dargestellt. Bei jeder Anregungsfrequenz kommt es bei mindestens einer Methylgruppe zur Übertragung der Sättigung des Liganden auf eine Methylgruppe. Die Sättigung von H6 der UDP-Gal bei 7,87 ppm führt zu einer Intensitätsreduktion von Signal 17 und Leu266₂. Signal 85 wird durch die Sättigung von H1'' der Galactose bei 5,56 ppm signifikant beeinflusst.

Erwartungsgemäß ist der größte Sättigungstransfer bei einer Sättigungsfrequenz von 5,91 ppm zu beobachten (siehe Abschnitt 4.4.3), die RIR liegt bei 15,7%. Dieses Signal X wird erst durch die Zugabe von UDP-Gal sichtbar. Da der inverse Sättigungstransfer abstandsabhängig ist, sollte es sich um die räumlich nächste Methylgruppe der Signale H5 bzw. H1' handeln. Laut Kristallstruktur (PDB: 3SXE) entspricht dies Val 184, dessen Methylgruppen einen Abstand von 4,6 Å bzw. 5,1 Å zu H5 bzw. H1' haben. Es wird

postuliert, dass es sich bei Signal X um Val184 handelt. Diese potentielle Zuordnung wird im Folgenden Abschnitt durch das Einbringen von Punktmutationen überprüft.



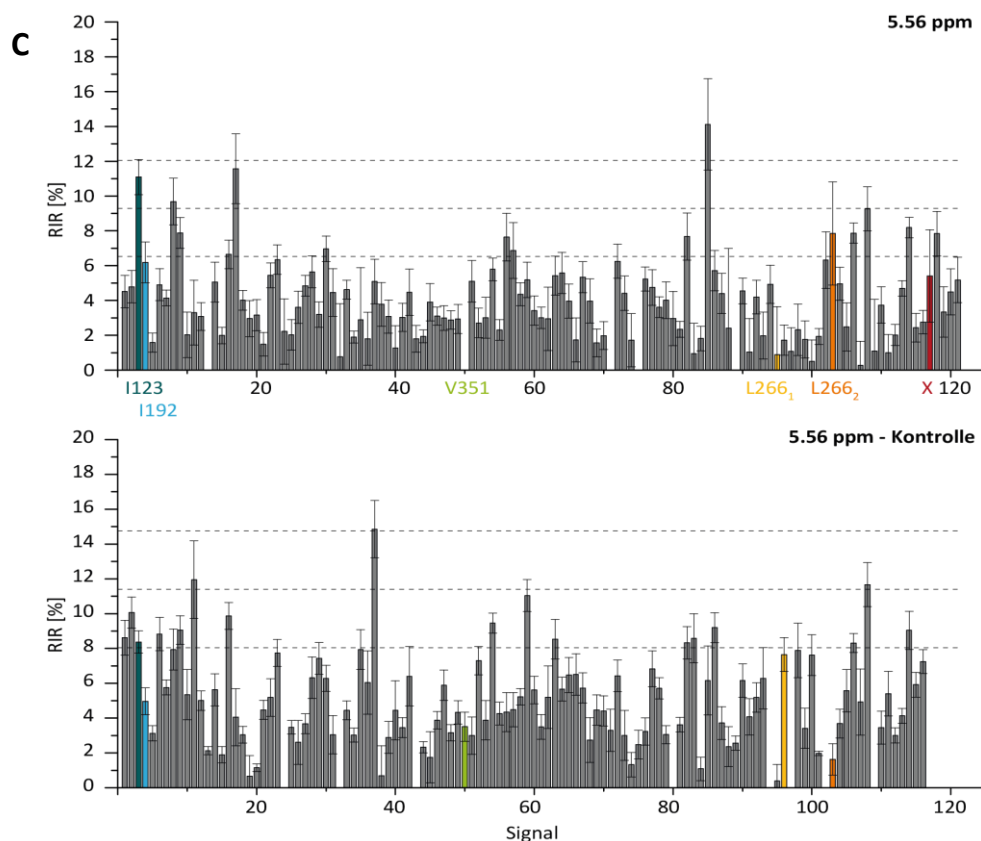


Abbildung 4.37: Relative Intensitätsreduktionen der $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -methyl-TROSY-Signale bei Sättigungsfrequenzen von (A) 7,87 ppm, (B) 5,91 ppm und (C) 5,56 ppm. Oben ist jeweils die Auswertung der finalen Spektren mit 250 μM ILV-GTA (2) und 2 mM UDP-Gal in NMR-Puffer III dargestellt. Unten die Auswertung der Kontrollspektren ohne Ligand (250 μM ILV-GTA (1) in NMR-Puffer III, Nummerierung siehe Tabelle 4.9 und Tabelle 3.11). Zugeordnete Signale sind farblich hervorgehoben. Signale mit negativem RIR nicht gezeigt. Gestrichelte Linien entsprechen dem Mittelwert x plus der jeweiligen Standardabweichung σ ($x + 1\sigma$ bzw. $x + 2\sigma$ bzw. $x + 3\sigma$).

4.4.6 Einbringen von Punktmutationen in Valin 184, 212 und 351

Um die im vorherigen Abschnitt postulierte Zuordnung von Signal X zu Val184 zu bestätigen, wurden Punktmutationen in GTA eingebracht. Neben Val 184 wurden auch Val 212 und Val 351 mutiert, welche einen Abstand von 6 Å bis 10 Å zu den Signalen H5 und H1' der UDP-Gal haben. In den Mutanten wurden die Methylgruppen der Leucine und Valine durch die Zugabe von 2-Keto-3-methyl- d_3 -3- d_1 -4- ^{13}C isotoopenmarkiert. Die Mutanten V184I- und V212A-GTA wurden H_2O synthetisiert, zusätzlich wurde Leucin- d_{10} dem Minimalmedium zugegeben, um nur die Methylgruppen γ_1 und γ_2 der Valine selektiv zu markieren. V351I-GTA wurde in D_2O synthetisiert (Details siehe Abschnitt 3.1 und 3.2.2). Die Proben werden im Folgenden als V-V184I-GTA, V-V212A-GTA und LV-V351I-GTA bezeichnet. Alle Proben wurden in NMR-Puffer III umgepuffert und

mittels $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -methyl-TROSY-Spektren analysiert. Anschließend wurden alle Proben mit 9,6 mM UDP-Gal versetzt (85% Sättigung bei einem K_D von 1,6 mM, siehe auch Tabelle 3.15). Mit V-V212A-GTA wurde zusätzlich eine Titration mit UDP-Gal durchgeführt, um die Bewegung der Signale zu verfolgen. Es wurden folgende Titrationsschritte durchgeführt: 105 μM (5,5% Sättigung), 210 μM (10,5% Sättigung), 441 μM (20% Sättigung), 1,7 mM (50% Sättigung), 4,9 mM (75% Sättigung) und 9,6 mM (85% Sättigung).

Durch die Zugabe von Leucin- d_{10} bei der Synthese von V-V184I- und V-V212A-GTA werden die Signale der Leucin-Methylgruppen zwar deutlich reduziert, jedoch sind je nach Schnittebene auch Leucine im Spektrum detektierbar. Eine eindeutige Unterscheidung zwischen Leucin- und Valin-Signalen ist daher nicht bei allen Signalen möglich. Allerdings kann gesagt werden, dass es sich bei Signal 17 und Signal 85, welche beim inversen Sättigungstransfer Sättigung erhalten, um Leucine handelt. Diese beiden Signale sind weder im V-V184I- noch im V-V212A-GTA-Spektrum detektierbar. Durch die Synthese in H_2O ist außerdem eine deutliche Linienverbreiterung im Vergleich zu in D_2O synthetisierten Proben erkennbar. Eine eindeutige Zuordnung der Signale Val 184 und Val 212 in Abwesenheit des Liganden ist dadurch nicht möglich. V351 hingegen ist in den $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -methyl-TROSY-Spektren der LV-V351I-GTA-Probe durch den Vergleich zum Wildtyp eindeutig identifizierbar (siehe Anhang 7.3.5).

Signal X, welches bei Ligandenanregung bei 5,91 ppm Sättigung erhält, entsteht erst durch die Zugabe von UDP-Gal. In Abbildung 4.38 ist eine Überlagerung der $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -methyl-TROSY-Spektren der Wildtyp-GTA sowie der drei Mutanten V-V184I-, V-V212A- und LV-V351I-GTA dargestellt. Signal X tritt bei allen Spektren auf, außer dem von V-V184I-GTA. Bei der Titration von V-V212A-GTA mit UDP-Gal ist Signal X erst ab einer 50% Sättigung zu sehen (Daten nicht gezeigt). Dies stimmt mit den Beobachtungen beim Wildtyp überein. Signal X kann demnach V184 zugeordnet werden. Die in Abschnitt 4.4.5 postulierte Zuordnung wird somit bestätigt.

Die Etablierung des $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -methyl-TROSY-basierten inversen Sättigungstransfers war demnach erfolgreich. Ein selektiver Sättigungstransfer des Liganden auf das Protein kann nachgewiesen werden.

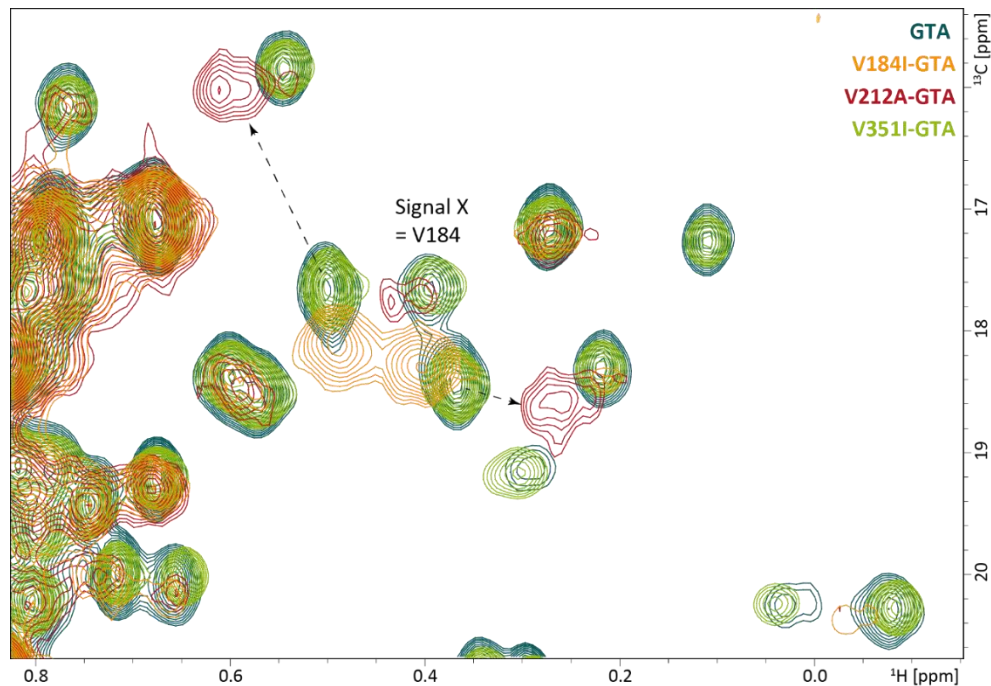


Abbildung 4.38: Überlagerung von $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -methyl-TROSY-Spektren von ILV-Wildtyp-GTA (dunkelgrün), V-V184I- (gelb), V-V212A- (rot) und LV-V351I-GTA (hellgrün) in Anwesenheit von UDP-Gal. Alle Proben befinden sich in NMR-Puffer III (Tabelle 3.11). Die Konzentration von ILV-GTA beträgt $250\ \mu\text{M}$, von V-V184I-GTA $250\ \mu\text{M}$, von V-V212A- $220\ \mu\text{M}$ und von V-V351I-GTA $350\ \mu\text{M}$. Die ILV-GTA-Probe enthalten zusätzlich $14,6\ \text{mM}$ UDP-Gal und die Mutanten $9,6\ \text{mM}$ UDP-Gal. Pfeile zeigen zusammengehörige Signale.

4.5 Untersuchungen zu P-Dimeren des humanen NoV

Neben den HBGA-synthetisierenden Glycosyltransferasen GTA und GTB wurden in dieser Arbeit auch die HBGA-bindenden P-Dimere der humanen Noroviren untersucht. Es handelt sich auch hier um ein Dimer, welches eine Größe von etwa $73\ \text{kDa}$ hat. Die Methylgruppen der Isoleucine und Valine sind über das gesamte Protein verteilt. Eine selektive Markierung dieser kann so einen Einblick in die verschiedenen Bereiche des Proteins liefern. Die Proteindynamik im μs -ms-Bereich wurde in Abhängigkeit verschiedener Fucose-Konzentrationen analysiert. Außerdem wurde eine abstandsabhängige Zuordnung der Isoleucin- δ 1-Methylgruppen anhand von paramagnetischen Liganden untersucht und mit Hilfe von Punktmutationen überprüft.

4.5.1 Probenpräparation von P-Dimeren

Die in dieser Arbeit verwendeten P-Dimere waren [U-²H, {Ile δ 1-¹³CH₃}, {Val γ 1/2-¹³CH₃}]-markiert. Die Mutanten wurden hingegen nur [U-²H, {Ile δ 1-¹³CH₃}]-markiert. Die Markierung wird im Folgenden nur als IV- oder I- bezeichnet und vor die Proteinbezeichnung gesetzt.

Die isotoopenmarkierte Proteinbiosynthese in *E. coli* und die anschließende Reinigung erfolgte wie in Abschnitt 3.3.2 und 3.3.3 beschrieben. Die Reinheit der P-Dimere nach den einzelnen Reinigungsschritten wurde mittels SDS-PAGE (siehe Abschnitt 3.4.1) untersucht. Alle nach Größenaustauschchromatographie erhaltenen Proben waren rein, was in Abbildung 4.39 exemplarisch gezeigt ist. Die Proben wurden in NMR-Puffer IV (Tabelle 3.11) umgepuffert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte spektralphotometrisch mittels NanoDrop (siehe Abschnitt 3.4.2). Die Probe IV-P-Dimer (1) wurde von Dr. Alvaro Mallagaray synthetisiert, jedoch wurde hier kein Leucin-d₁₀ dem Minimalmedium zugesetzt. Das Markierungsmuster ist jedoch gleich, da unter den angegebenen Bedingungen bei P-Dimeren keine Leucinmarkierung stattfindet.

Die drei Mutanten wurden in H₂O synthetisiert. Die Mutante I-I509V-P-Dimer zeigt im Vergleich zum Wildtyp eine geringere Ausbeute, welche jedoch für NMR-Experimente ausreichend war. Insgesamt waren alle hergestellten Proben rein und konnten für weitere Experimente verwendet werden.

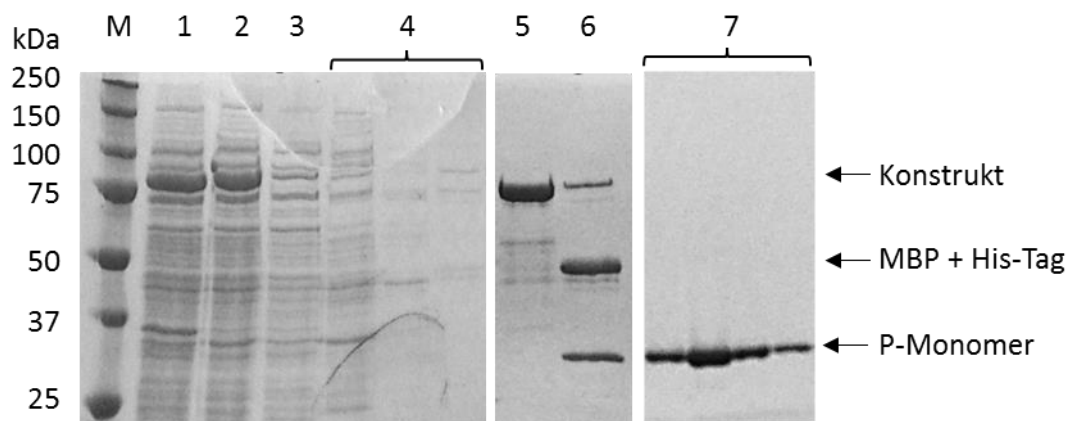


Abbildung 4.39: Exemplarische SDS-PAGE mit Proben einzelner P-Dimer-Reinigungsschritte. Dargestellt ist die Reinigung von IV-P-Dimer. Proben wurden 1:1 in 2x reduzierendem Probenpuffer denaturiert und in folgender Reihenfolge auf ein 10%iges SDS-Gel aufgetragen: (M) Marker, (1) Zellysate vor Ultrazentrifugation, (2) Überstand nach Ultrazentrifugation, (3) NiNTA-Durchfluss, (4) NiNTA-Waschfraktionen, (5) NiNTA-Eluat, (6) NiNTA-Eluat nach HRV3C-Spaltung, (7) Elutionsfraktionen nach Größenaustauschchromatographie. Aufbau des Konstrukts siehe Abschnitt 3.3.1.

Tabelle 4.13: Qualitätskontrolle von P-Dimer Proben. Angegeben ist das eingesetzte Volumen an Minimalmedium, die Ausbeute pro Liter Kulturmedium und der Quotient A_{260}/A_{280} nach Umpufferung in NMR-Puffer IV. Die Pufferzusammensetzung ist in Tabelle 3.11 zu finden. + Probe wurde von Dr. Alvaro Mallagaray hergestellt. * Proben in H_2O synthetisiert.

Probe	IV-P-Dimer (1) ⁺	IV-P-Dimer (2)	I-I231V-P-Dimer*	I-I330V-P-Dimer*	I-I509V-P-Dimer
Kulturvolumen [mL]	300	300	500	500	500
Ausbeute [mg/L]	13	14	17	13	9
A_{260}/A_{280}	0,66	0,66	0,65	0,65	0,67

4.5.2 $^1H,^{13}C$ -methyl-TROSY-Experimente mit IV-P-Dimeren

P-Monomere weisen 8 Isoleucine und 24 Valine auf. In einem $^1H,^{13}C$ -methyl-TROSY-Spektrum von symmetrischen Homodimeren werden demnach insgesamt 56 Signale erwartet. Das in Abbildung 4.40 dargestellte $^1H,^{13}C$ -methyl-TROSY-Spektrum von IV-P-Dimeren weist hingegen 63 Signale auf, bestehend aus 8 Isoleucin-Methylgruppen und 55 Valin-Methylgruppen. Einige Aminosäuren liegen demnach in zwei Zuständen vor.

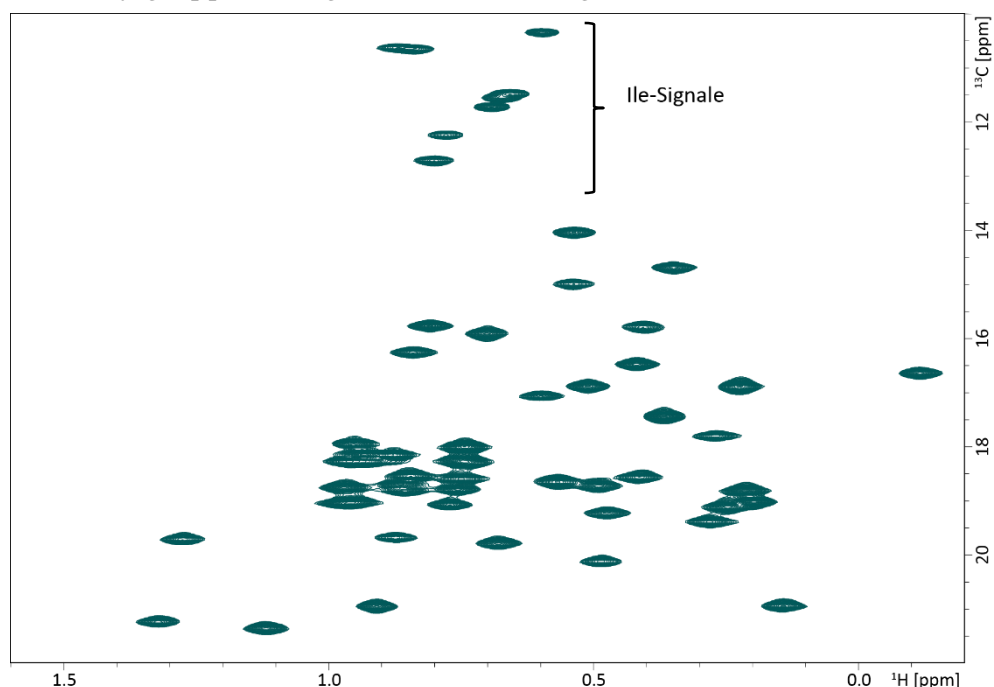


Abbildung 4.40: $^1H,^{13}C$ -methyl-TROSY-Spektrum von IV-P-Dimeren. Dargestellt ist $^1H,^{13}C$ -methyl-TROSY-Spektrum von 200 μM IV-P-Dimer (2) in NMR-Puffer IV (Nummerierung siehe Tabelle 3.11 und Tabelle 4.13).

4.5.3 CPMG-Relaxations-Dispersions-Messungen mit IV-P-Dimeren

Die Dynamik von humanen Noroviren ist bisher noch völlig unbekannt und soll hier anhand von CPMG-Relaxations-Dispersions-Experimenten mit P-Dimeren untersucht werden. Des Weiteren wird der Einfluss der Fucosebindung auf die Proteindynamik untersucht. Fucose ist das minimale Bindungsmotiv der humanen P-Dimere.

Mittels STD-NMR wurden zwei Bindungskonstanten mit $K_{D1} = 2,4$ mM und $K_{D2} = 9,6$ mM bestimmt (Mallagaray, 2014). Die Experimente wurden ohne Ligand und mit 6 mM Fucose durchgeführt. Bei dieser Konzentration ist die erste Bindungstasche zu 70% gesättigt, die Belegung der zweiten beginnt jedoch erst. Bei einer Fucosekonzentration von 160 mM ist auch die zweite Bindungstasche zu 94% gesättigt. Abbildung 4.41 A zeigt eine Überlagerung der drei Zustände. Es ist erkennbar, dass die Fucosebindung kaum eine Änderung der Signalverteilung im $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -methyl-TROSY-Spektrum hervorruft. Auch eine Temperatureniedrigung um 15 K führt nur zu minimalen Änderungen in der chemischen Verschiebung (Abbildung 4.41 B). Eine Intensitätsreduktion, wie sie bei GTA und GTB zu beobachten war (siehe Abschnitt 4.3.4), findet bei P-Dimeren nicht statt. Bei Temperaturen über 298 K präzipitiert das Protein und kann danach nicht wieder in Lösung gebracht werden. Die finalen CPMG-RD-Messungen werden daher bei 298 K, 290 K und 283 K durchgeführt.

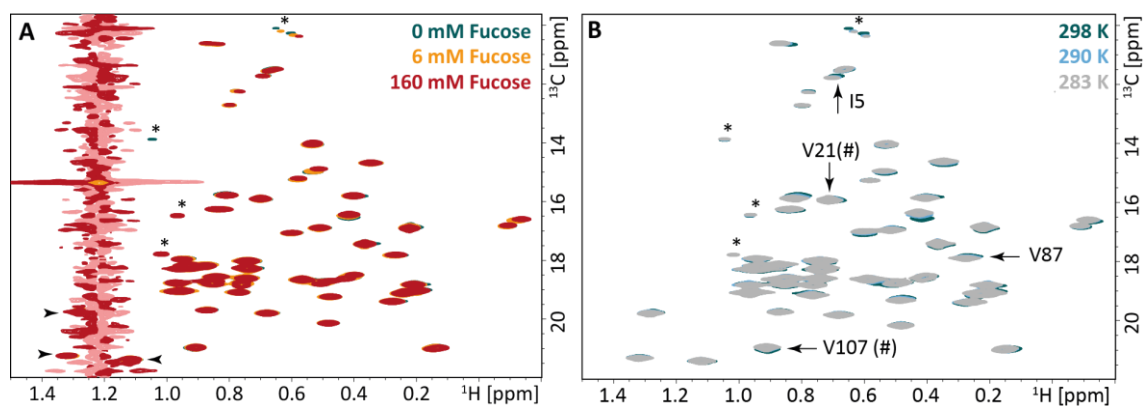


Abbildung 4.41: $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -methyl-TROSY-Spektren von IV-P-Dimeren (A) in Anwesenheit von Fucose und (B) bei verschiedenen Temperaturen. Dargestellt sind $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -methyl-TROSY-Spektren von 170 μM IV-P-Dimer (1) in NMR-Puffer IV (A) Dargestellt sind Spektren ohne Ligand (grün), mit 6 mM Fucose (gelb) und mit 160 mM Fucose (rot). Die Methylgruppe an C_6 der Fucose liefert ein breites Signal bei 1,2 ppm, welches mit drei Valin-Methylgruppen-Signalen überlagert. Diese Signale sind mit Pfeilen markiert. (B) $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -methyl-TROSY-Spektren von IV-P-Dimeren bei 298 K (grün), 293 K (blau) und 288 K (grau). Von den gekennzeichneten Signalen sind in Abbildung 4.43 exemplarisch Dispersionsprofile gezeigt. Mit # gekennzeichnete Signale zeigen leichte Dispersion. Mit * gekennzeichnete Signale sind Artefakte. Die Nummern entsprechen einer internen Nummerierung, keiner Zuordnung.

Für die CPMG-RD-Messungen wurden weiterhin Mischzeiten T_{CPMG} von 20 ms und 40 ms getestet. Abbildung 4.42 zeigt den Einfluss der Mischzeit auf die Signalintensität im Vergleich zum Referenzspektrum ohne CPMG-Pulskaskade. Die mittlere Intensitätsreduktion aller Signale beträgt bei einer Mischzeit von 20 ms 68%, bei einer Mischzeit von 40 ms 51%. Die Intensitätsreduktion sollte bei etwa 50% liegen, um schon eine Dispersion sehen zu können, aber trotzdem ein genügend hohes Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu haben. Die CPMG-RD-Experimente mit IV-P-Dimeren werden daher mit einer Mischzeit von 40 ms durchgeführt.

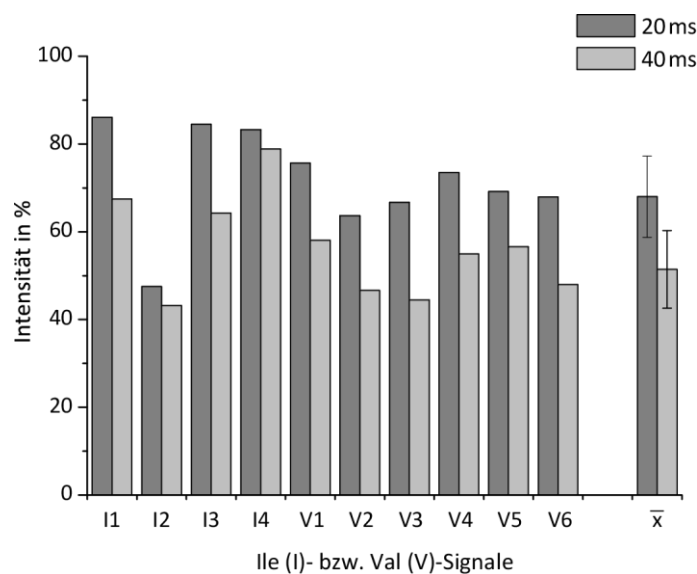


Abbildung 4.42: Einfluss der Mischzeit T_{CPMG} auf die Signalintensität bei 298 K. Dargestellt sind die relativen Signalintensität aus CPMG-RD- ^1H , ^{13}C -methyl-TROSY Spektren bei einer Feldstärke von 50 Hz im Vergleich zum Referenzspektrum ohne CPMG-Sequenz bei Mischzeiten T_{CPMG} von 20 und 40 ms. Exemplarische Darstellung für vier Isoleucine und sechs Valine. Letzte Spalte gibt Mittelwert und Standardabweichung aller Signale an. Die Probe enthielt 170 μM IV-P-Dimer (1) in NMR-Puffer IV (Nummerierung siehe Tabelle 4.13 und Tabelle 3.11) und wurde bei 298 K an einem 500 MHz Spektrometer gemessen. Messparameter siehe Abschnitt 3.5.6.

In Abbildung 4.43 sind exemplarisch Relaxations-Dispersions-Profile von drei Signalen gezeigt. Die Signale wurden nummeriert, entsprechen aber keiner Zuordnung. Insgesamt zeigen nur zwei Signale (Val 21 und Val 107) eine leichte Dispersion. Die transversalen Relaxationsraten $\Delta R_{2,\text{eff}}$ liegen zwischen 4-6 s^{-1} und sind unabhängig von der Fucosebindung. Alle anderen Signale zeigen keine Dispersion, was exemplarisch an Ile 5 und Val 87 für alle Isoleucine bzw. Valine gezeigt ist. Alle anderen Dispersionsprofile befinden sich im Anhang Abschnitt 7.3.9.

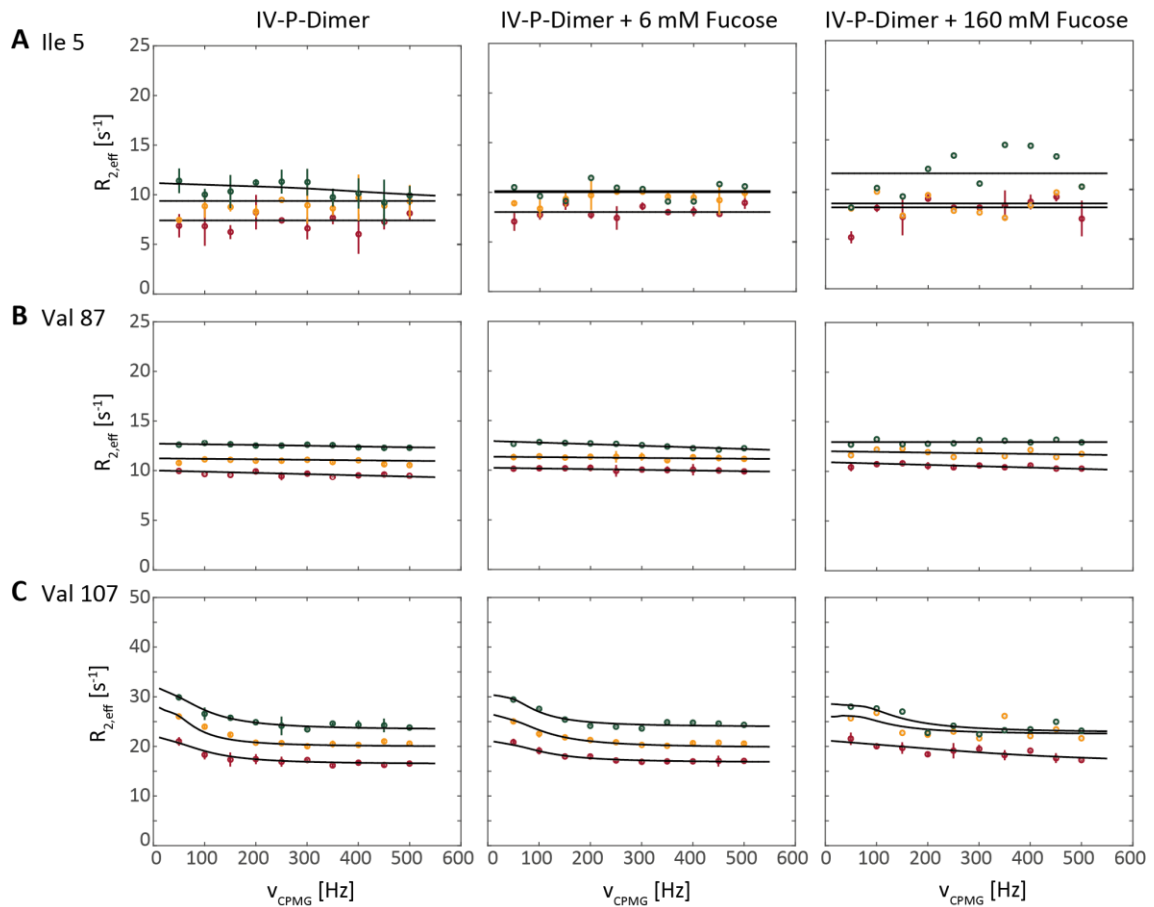


Abbildung 4.43: Einfluss der Fucose-Bindung auf Relaxations-Dispersions-Profile von ausgewählten Signalen von IV-P-Dimeren. CPMG-RD-Experimente wurden mit IV-P-Dimeren an einem 500 MHz Spektrometer bei 298 K (rot), 290 K (gelb) und 283 K (grün) mit CPMG-Feldstärken von 50-500 Hz durchgeführt. Gezeigt sind RD-Profile von (A) Ile 5, (B) Val 87 und (C) Val 107 ohne Substrate (links), mit 6 mM Fucose (mittig) und mit 160 mM Fucose (rechts). Die Nummern entsprechen einer internen Nummerierung, keiner Zuordnung. Abbildung 4.41 B zeigt Lokalisation der Signale im $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -methyl-TROSY-Spektrum. Experimente wurden in Doppelbestimmung durchgeführt, außer Experimente bei 283 K in Anwesenheit von 6 mM Fucose und Messungen bei 290 K und 283 K in Anwesenheit von 160 mM Fucose. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung der Doppelbestimmung. Auswertung erfolgte mit GUARDD (Kleckner and Foster, 2011).

4.5.4 Zuordnung von Isoleucin- δ 1-Methylgruppen mittels paramagnetischer Ligandenbindung

Um die Bindung von Liganden an P-Dimere und die damit einhergehenden konformationellen Änderungen zu untersuchen, ist eine Zuordnung erforderlich. Bei einem Molekulargewicht von 70 kDa ist diese anhand von Tripelresonanzexperimenten jedoch häufig nicht möglich, da viele Signale überlagern, andere hingegen fehlen. Eine andere Möglichkeit der Zuordnung bieten paramagnetische Liganden. Sie ermöglichen die Charakterisierung von sonst möglicherweise schlecht zugänglichen Bindungsstellen.

In dieser Arbeit wurde die Zuordnung von Isoleucin- δ 1-Methylgruppen durch die Zugabe von Gd^{3+} -Fucose (siehe Abschnitt 3.5.11) untersucht. Gadolinium führt zu einer abstandsabhängigen Relaxationsverstärkung, was eine Linienverbreiterung zur Folge hat. Um Änderungen im Protein, welche durch die Bindung des Liganden gegebenenfalls hervorgerufen werden mit einzubeziehen, wurde zusätzlich eine Referenztitration mit La^{3+} -Fucose durchgeführt.

Die experimentellen Bedingungen sind in Abschnitt 3.5.12 beschrieben. In Abbildung 4.44 ist die durch Gd^{3+} -Fucose hervorgerufene Signalreduktion erkennbar. Die Analyse der Signalintensitäten und der aus der Kristallstruktur (PDB: 4X07) ermittelten Abstände führt zu der in Tabelle 4.14 dargestellten Zuordnung. Der größte PRE-Effekt ist in einem Abstand von 5-20 Å vom Gd^{3+} -Ion zu erwarten (Otting, 2010). Ile 389 hat einen Abstand von 14 Å vom Gd^{3+} -Ion und sollte daher den größten Effekt zeigen. Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass nur Signal 7 bei einer 100 μ M Gd^{3+} -Fucose-Konzentration verschwunden ist. Signal 7 kann demnach Ile389 zugeordnet werden.

Zur Überprüfung der Zuordnungen von Signalen mit Abständen > 20 Å wurden die drei Punktmutanten I231V-, I330V- und I509V-P-Dimer hergestellt. Die drei Isoleucin-Methylgruppen konnten durch $^1H,^{13}C$ -methyl-TROSY-Experimente eindeutig identifiziert werden (siehe Anhang Abschnitt 7.3.6). Die Zuordnung anhand der Mutanten stimmt nicht mit der Zuordnung laut Gd^{3+}/La^{3+} -Fucose Titration überein. Signale mit Abständen > 20 Å können demnach nicht eindeutig zugeordnet werden. Da alle Valine in einem Abstand von 20 – 50 Å vom Liganden liegen, werden diese nicht weiter betrachtet.

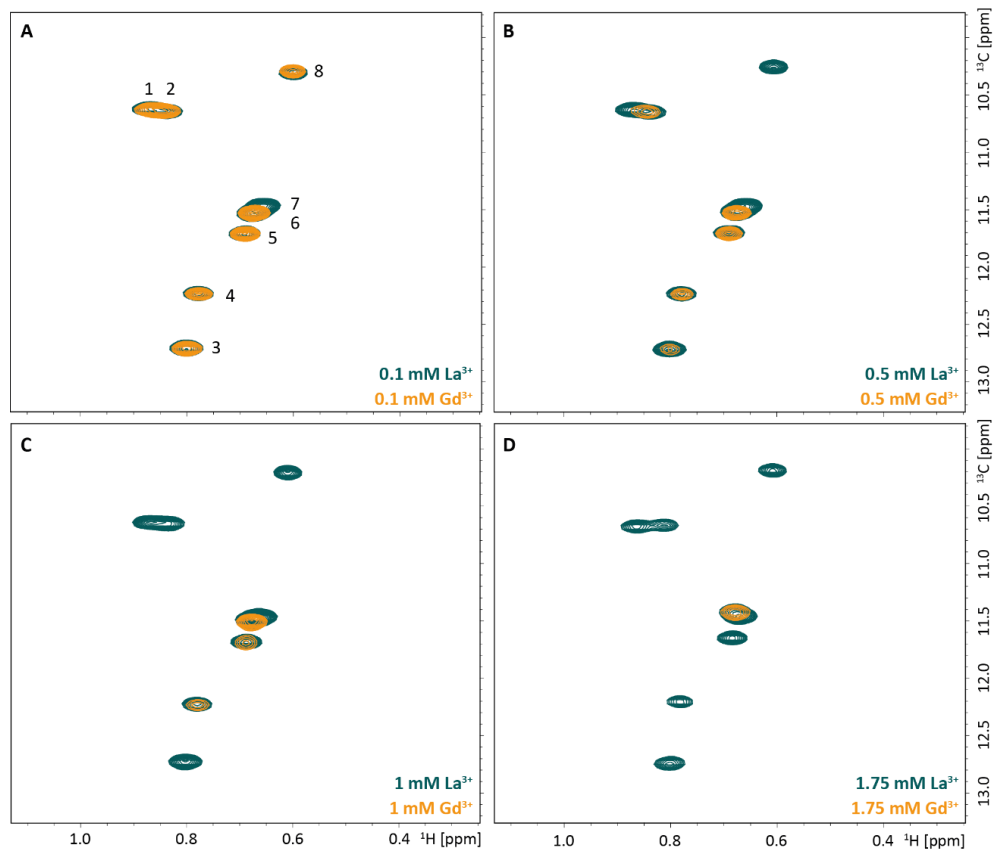


Abbildung 4.44: ^1H , ^{13}C -methyl-TROSY-Spektren von IV-P-Dimeren in Anwesenheit von La^{3+} - (grün) oder Gd^{3+} - (gelb) Fucose. Proben enthielten $200\ \mu\text{M}$ IV-P-Dimer (2) in NMR-Puffer IV (Nummerierung siehe Tabelle 4.13 und Tabelle 3.11). Gezeigt sind einzelne Titrationsschritte mit (A) $100\ \mu\text{M}$, (B) $500\ \mu\text{M}$, (C) $1\ \text{mM}$ und (D) $1,75\ \text{mM}$ La^{3+} - bzw. Gd^{3+} -Fucose mit dem jeweiligen Lanthanid.

Tabelle 4.14: Abstand der einzelnen Isoleucine zum gebundenem Lanthanid-Ion und Zuordnung durch La^{3+} -/ Gd^{3+} -Fucose-Titration und Punktmutanten. Nummerierung der Signale entspricht der in Abbildung 4.44 A angegebenen.

Ile	Entfernung zu $\text{Gd}^{3+}/\text{La}^{3+}$ in Å	Zuordnung laut $\text{Gd}^{3+}/\text{La}^{3+}$ -Fucose Titration	Zuordnung durch Mutanten
389	14,1	7	-
330	24,0	1	4
293	24,6	8	-
244	27,8	3	-
283	34,5	2	-
317	40,1	5	-
509	40,3	4	2
231	51,7	6	5

5 Diskussion

Glykane gehören zu den am häufigsten vorkommenden Biomolekülen. Sie dienen u.a. als Rezeptoren und spielen eine essentielle Rolle bei der Signaltransduktion (Ohtsubo and Marth, 2006). Aufgrund der enormen zellulären Bedeutung von Glykanen, ist es auch wichtig ihre Entstehung durch Glycosyltransferasen näher zu charakterisieren, welche die glycosidischen Bindungen zwischen den einzelnen Zucker-Untereinheiten bilden. Während der Mechanismus der konfigurationsinvertierenden GTs bereits gut charakterisiert ist (Breton et al., 2006), wird der Mechanismus der konfigurationserhaltenden GTs noch diskutiert. Aus Kristallstrukturen ist bekannt, dass konfigurationserhaltende GTs flexible Bereiche besitzen, welche sich bei Substratbindung bewegen (Alfaro et al., 2008; Persson et al., 2001). In dieser Arbeit wurden diese dynamischen Prozesse NMR-spektroskopisch untersucht. Als Modell dienen die humanen Blutgruppen Glycosyltransferasen GTA und GTB, welche für den letzten Schritt der Bildung der HBGAs verantwortlich sind. Dabei wurden einerseits der Einfluss der Ligandenbindung und die Dynamik des Proteinrückgrates, andererseits aber auch der Einfluss einzelner Aminosäureseitenketten untersucht.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Bindung an Glykane untersucht. Als Beispiel dient die Bindung von P-Dimeren der humanen Noroviren an HBGAs. Humane Noroviren führen zu einem epidemischen Ausbruch von Gastroenteritis beim Menschen. Durch die Entwicklung von *Entry*-Inhibitoren sollen diese Ausbrüche verhindert werden (Fiege, 2012). Es wurden erstmals Dynamikmessungen im μ s-ms-Bereich durchgeführt, um den Einfluss der Bindung des minimalen Liganden Fucose auf die Proteindynamik zu charakterisieren. Außerdem wurde die Zuordnung von Isoleucin-Seitenketten durch Titration mit paramagnetischen Liganden untersucht.

Alle erhaltenen Ergebnisse werden im Folgenden diskutiert.

5.1 Präparation isotoopenmarkierter GTA und GTB

Die NMR-Spektroskopie ist eine der wenigen Methoden, die eine Analyse der Proteindynamik in verschiedenen Zeitbereichen ermöglicht. Für diese Untersuchungen sowie für die proteinbasierte Charakterisierung der Ligandenbindung ist eine Isotoopenmarkierung des Proteins erforderlich. Aufgrund der Größe des Protein-Dimers von 70 kDa ist außerdem eine Deuterierung des Proteins essentiell. Durch die

Deuterierung kommt es zu einer Reduktion der heteronuklearen dipolaren Relaxation, was längere T_2 -Zeiten zur Folge hat. Außerdem ist die Spin-Diffusion reduziert (Sattler et al., 1999). Alle isotopenmarkierten Proteine wurden nach dem Protokoll von Tugarinov et al. hergestellt (Tugarinov et al., 2006). Dieses Protokoll führt im Vergleich zu dem Protokoll von Marley et al. (Marley et al., 2001) zu einem besseren Deuterierungsgrad bei vergleichbarer Ausbeute (Grimm, 2015).

Die Ausbeuten aller zehn Wildtyp-GTA-Proben mit insgesamt sechs verschiedenen Markierungsmustern ($[U\text{-}^2\text{H}, ^{15}\text{N}]$, $[U\text{-}^2\text{H}, ^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}]$, $[U\text{-}^2\text{H}, \{\text{Met-}^{15}\text{N}\}]$, $[U\text{-}^2\text{H}, \{\text{Arg-}^{15}\text{N}\}]$, $[U\text{-}^2\text{H}, \{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}]$ und $[U\text{-}^2\text{H}, \{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3, \{\text{Leu}\delta 1/2\text{-}^{13}\text{CH}_3, \{\text{Val}\gamma 1/2\text{-}^{13}\text{CH}_3\}\}]$) lagen zwischen 6 mg und 14 mg pro Liter Kulturmedium (siehe Tabelle 4.1, Tabelle 4.4 und Tabelle 4.9), wobei zwei Proben mit 3 - 4 mg eine deutlich reduzierte Ausbeute aufweisen. Diese ist auf ungenügende Bindung an das SP-Sepharose-Säulenmaterial zurückzuführen. Ursache hierfür kann möglicherweise ein falsch eingestellter pH-Wert der Reinigungspuffer sein. Die Mutanten V184I-, V212A- und V351I-GTA zeigen mit 5 - 6 mg pro Liter Medium vergleichbare Ausbeuten im Vergleich zum Wildtyp. In allen Chargen ist im SDS-Polyacrylamidgel am Ende der Reinigung nur eine Bande erkennbar (Abbildung 4.1). Die Sensitivität der Färbelösung liegt laut Herstellerangaben bei 8 ng pro Bande, demnach können grobe Verunreinigungen mit anderen Proteinen ausgeschlossen werden. Bei allen Proben lag der Quotient A_{260}/A_{280} bei unter 0,6. Die Proben sind demnach auch nicht mit DNA verunreinigt. Die Aktivitäten schwanken mit 4 - 23 U/mg um den erwarteten Wert von 10 U/mg. Diese Schwankungen liegen einerseits an Ungenauigkeiten bei der Proteinbestimmung, andererseits auch an Ungenauigkeiten beim Aktivitätstest. Beim Aktivitätstest wird nur der aktive Proteinanteil berücksichtigt, bei der Proteinbestimmung ist eine Unterscheidung zwischen aktivem und inaktivem Protein hingegen nicht möglich. Dadurch kommt es zu Fehlern bei der Berechnung der spezifischen Aktivität. Des Weiteren ist der Aktivitätstest aufgrund der hohen Verdünnungen und der geringen Volumina fehlerbehaftet.

Die vier Wildtyp-Met-GTB-Proben weisen im Vergleich zu den GTA-Proben höhere Ausbeuten auf (Tabelle 4.5) Die Ausbeuten liegen bei 16 bzw. 22 mg pro Liter Kulturmedium. Wie bei GTA ist hier bei zwei Proben ein Proteinverlust während der Kationenaustauschchromatographie zu beobachten, dadurch lag die Ausbeute nur bei 4 bzw. 7 mg pro Liter Kulturmedium (Abbildung 4.19). Bei allen Mutanten außer M186A-GTB ist eine deutlich geringere Ausbeute im Vergleich zum Wildtyp zu verzeichnen (Tabelle 4.6). M189V- und M142A-GTB mussten in Wasser synthetisiert werden, da eine

Synthese in D₂O nicht genügend Ausbeute für NMR-Experimente brachte. Die Konzentration der Met-M288A-GTB-Probe betrug 7 µM. Dies stellt die minimale Konzentration für die Aufnahme von ¹H,¹³C-methyl-TROSY-Spektren dar und erfordert eine Messzeit von mindestens 12 h für ein Spektrum, welche bei Proteinkonzentrationen von etwa 100 µM sonst nur 15 min beträgt. Der Unterschied zwischen den Ausbeuten zwischen GTA und GTB bzw. zwischen GTB und den GTB-Mutanten ist auf den Austausch der einzelnen Aminosäuren zurück zu führen. Wie bei vielen anderen Expressionssystemen auch, können minimale Sequenzänderungen zu großen Unterschieden im Expressionsverhalten führen (Chan et al., 2009; Persson et al., 2001). Die Aktivität der Wildtyp-GTB-Proben liegt zwischen 12 und 15 U/mg, die der Mutanten zwischen 6 und 20 U/mg. M186A- und M142A-Met-GTB weisen demnach eine leicht erhöhte und M189V-GTB eine leicht erniedrigte Aktivität auf. Es kann sich hierbei jedoch auch, wie bereits erläutert, um Schwankungen innerhalb des Aktivitätstests handeln. Insgesamt sind alle Proben jedoch aktiv. Die Mutationen haben keinen wesentlichen Einfluss auf die Enzymaktivität, jedoch auf die Proteinbiosynthese. Sowohl bei den Wildtyp-GTB-Proben, als auch bei den Mutanten ist nach der Dialyse nur eine Bande im SDS-Polyacrylamidgel detektierbar, die Proben sind also rein und weisen keine Verunreinigung mit DNA auf ($A_{260}/A_{280} < 0,6$).

Die Isotopenmarkierung aller GTA- und GTB-Proben wurde anhand von ¹H,¹⁵N-TROSY-HSQC bzw. ¹H,¹³C-methyl-TROSY-Spektren überprüft. Die einzelnen Spektren werden in den folgenden Abschnitten näher erläutert.

Die Präparation und der Aktivitätstest erfolgte in Mn²⁺-haltigen Puffern, alle folgenden Experimente hingegen in Mg²⁺-haltigen Puffern. GTA und GTB zeigen in Anwesenheit von Mn²⁺ deutlich höhere Aktivitäten, sind jedoch auch in Gegenwart von Mg²⁺ noch aktiv (Blume et al., 2006). Welchen Cofaktor GTA und GTB *in vivo* nutzen ist noch nicht abschließend geklärt. Die Nutzung von Mn²⁺ oder Mg²⁺ als Cofaktor wird für viele Glycosyltransferasen diskutiert (Charnock and Davies, 1999; Lairson et al., 2008). Da Mn²⁺ jedoch paramagnetisch ist, was zu Linienverbreiterungen im NMR-Spektrum führt, werden für NMR-Experimente ausschließlich Mg²⁺-haltige Puffer verwendet. Eine vollständige Entfernung von Mn²⁺-Ionen ist nur durch die Zugabe von EDTA möglich.

5.2 Untersuchungen am Proteinrückgrat von GTA

Durch die ^1H , ^{15}N -Markierung des Proteinrückgrates kann jede einzelne Aminosäure (außer Prolin) sichtbar gemacht werden. Durch Zugabe des Liganden kann der Einfluss auf die einzelnen Aminosäuren nachvollzogen werden. Auch eine Unterscheidung, welche Aminosäuren direkt an der Bindung beteiligt sind und welche sich aufgrund von konformationellen Änderungen bewegen, ist möglich (Arai et al., 2012). Dies ermöglicht auch die Charakterisierung der Proteindynamik in verschiedenen Zeitbereichen (Morin, 2011). Für diese Untersuchungen ist jedoch eine Zuordnung der Signale erforderlich. Das Ziel dieser Arbeit war eine Zuordnung im Bereich des aktiven Zentrums um Protein-Ligand-Wechselwirkungen zu untersuchen. Dafür wurden zuerst die Messbedingungen getestet. Wie bei GTB ist bei GTA die Spektrenqualität bei einer Messtemperatur von 298 K am besten (Sindhuwinata, 2012). Bei höheren Temperaturen verliert das Protein über die Zeit an Stabilität und neigt zur Aggregation, außerdem ist keine wesentliche Verbesserung der Spektren erkennbar. Da die Aufnahme von Tripelresonanzspektren mindestens eine Woche dauert, muss die Stabilität des Proteins gewährleistet werden. Bei Temperaturen unter 298 K sind deutlich weniger Signale detektierbar (Abbildung 4.2). Bei tieferen Temperaturen steigt die Korrelationszeit des Proteins. Dies führt zu einer Reduktion der T_2 -Zeit und damit zu einer Linienverbreiterung (Bloembergen et al., 1948; Cavanagh et al., 2001). In dieser Arbeit wurden sowohl ein MOPS- als auch ein Phosphat-Puffer für die Experimente verwendet (Tabelle 3.11). Die erhaltenen Spektren sind vergleichbar (Abbildung 4.3). Die in MOPS-Puffer aufgenommenen Spektren zeigen geringfügig mehr Signale. Dieser Puffer wurde für alle bisherigen Experimente verwendet, da hier einerseits die höchste Proteinaktivität erzielt werden kann, andererseits ist dieser Puffer auch mit Mangan kompatibel. Dies ist bei Phosphatpuffer nicht der Fall. Der MOPS-Puffer wurde für die Tripelresonanzexperimente verwendet, welche am BMRZ der Goethe Universität in Frankfurt am Main aufgenommen wurden. Das ^1H , ^{15}N -TROSY-HSQC-Spektrum war von sehr hoher Qualität. Es konnten 93% der erwarteten Signale detektiert werden (328 von 353, siehe Tabelle 4.2). Im $\text{HN}(\text{CA})\text{CO}$, HNCA , $\text{HN}(\text{CO})\text{CA}$ und HNCACB konnten jedoch jeweils nur etwa 40 bis 50% der erwarteten Signale detektiert werden. Daher konnten insgesamt nur 28 Verknüpfungen gefunden werden. Es wurden 18 Aminosäuren eindeutig zugeordnet (Abbildung 4.6 und Abbildung 5.1). Die zugeordneten Aminosäuren liegen weit entfernt von der Ligandenbindungsstelle und können daher keine Informationen über das Ligandenbindungsverhalten liefern.

Die Qualität der Tripelresonanzspektren von GTA und GTB ist trotz verschiedener Pufferbedingungen und Proteinkonzentration vergleichbar (Grimm, 2015). Ein Vergleich der gefundenen Zuordnungen von GTA und GTB zeigt, dass für beide Enzyme der gleiche Bereich zugeordnet werden konnte. Die zusätzlichen GTA-Zuordnungen konnten auf GTB übertragen werden.

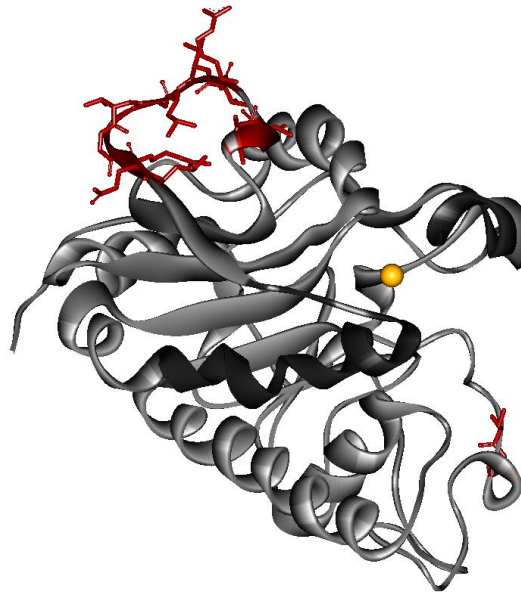


Abbildung 5.1: Zugeordnete Aminosäuren von GTA. Kristallstruktur des GTA-Monomers mit Mn^{2+} in orange, interner Schleife und C-Terminus in schwarz und zugeordneten Aminosäuren in rot (PDB 3SXE).

Die Hauptursache für diese geringe Anzahl an Zuordnungen ist die schlechte Spektrenqualität. Da meist nur 50% der Signale detektiert werden konnten, fehlen viele Verknüpfungen bzw. sind nur bei den $C\alpha$ - bzw. CO-Kohlenstoffen zu beobachten, wodurch eine eindeutige Zuordnung nicht möglich ist. Das Fehlen der Signale ist u.a. durch die hohe Proteindynamik zu erklären. Konformationelle Bewegungen im Mikrosekunden- bis Millisekundenbereich können hier eine Ursache sein, welche zu einer Linienverbreiterung führen. Lena Lisbeth Grimm konnte für die GTB zeigen, dass innerhalb von einem Tag ein fast vollständiger Protonen-Deuterium-Austausch stattfindet (Grimm, 2015). Auch konnten in Kristallstrukturen aufgrund der hohen Proteinflexibilität für einige Signale keine Elektronendichten gefunden werden (Alfaro et al., 2008). Mit einer Dimergröße von etwa 70 kDa liegen GTA und GTB an der oberen Grenze der derzeit zuordenbaren Proteine. Die Relaxationszeit T_2 sinkt mit steigender Proteingröße, d.h. die Signale relaxieren schneller (Bloembergen et al., 1948; Cavanagh et al., 2001). Außerdem ist die Spin-Diffusion durch die Deuterierung zwar reduziert,

findet aber immer noch in geringerem Maße statt. Diese Relaxationsmechanismen führen zu einem schnellen Verlust der Magnetisierung und damit zu fehlenden Signalen. Außerdem sind die Pulsprogramme an sich sehr lang und es finden viele Magnetisierungstransferschritte statt, was wiederum zu einem Verlust der Magnetisierung führt (Sattler, 2009). Trotz vieler fehlender Signale ist aufgrund der Proteingröße eine Überlagerung in den verbleibenden Signalen zu beobachten. Die Aufnahme der Spektren bei höheren Feldstärken von 800 MHz und 950 MHz verbessert zwar die Auflösung der Spektren, es gibt aber immer noch Bereiche starker Signalüberlagerung. Außerdem steigt die *chemical shift anisotropy* (CSA) Relaxation quadratisch mit der Feldstärke. Die betrifft vor allem die Carbonyl-Kohlenstoffe (Claridge, 1999). Aus diesem Grund wurde das HN(CO)CA-Spektrum nur bei 600 MHz aufgenommen (Tabelle 3.12). Die Überlagerung der Signale erschwert abermals die Zuordnung der Aminosäuren. Da mittels der Tripelresonanzexperimente nur 18 von 298 Aminosäuren zugeordnet werden konnten, wurden anschließend die Aminosäuren Methionin und Arginin selektiv ^{15}N -markiert. Beide befinden sich an Endpunkten im Aminosäurestoffwechselweg, sodass keine Kreuzmarkierung zwischen den Aminosäuren (*scrambling*) auftreten sollte (Waugh, 1996). Nora Sindhuwinata konnte bei GTB bereits eine erfolgreiche ^{15}N -Lysin-Markierung erreichen (Sindhuwinata, 2012). Dem Medium wurde Eco E. coli OD 2 D-Medium zugefügt, welches u.a. deuterierte Aminosäuren enthält, um mögliche Kreuzmarkierungen weiter zu reduzieren. In Abbildung 4.7 ist jedoch erkennbar, dass sowohl bei der ^{15}N -Met- als auch bei der ^{15}N -Arg-Markierung Kreuzmarkierungen zwischen den Aminosäuren zu verzeichnen sind. Um dies zu verhindern, ist es möglich entweder andere *E. coli*-Stämme zu verwenden, oder aber den verwendeten Stamm zu mutieren. Dafür wird das Enzym, welches für den letzten Schritt der Bildung der jeweiligen Aminosäure verantwortlich ist, mutiert. Bei Methionin handelt es sich um das Gen *metA*, welches für die Homoserin-Succinyltransferase und bei Arginin um das Gen *argH*, welches für die Arginosuccinat-Lyase kodiert (Waugh, 1996). Eine andere Möglichkeit der Zuordnung ist das selektive nicht-Markieren einzelner Aminosäuren durch die Zugabe einer unmarkierten Aminosäure zum Minimalmedium (Atreya, 2012).

Ähnliche Tripelresonanz-Zuordnungsexperimente wurden auch mit der Galactosyltransferase LgtC aus *Neisseria Meningitidis* durchgeführt. Es handelt sich auch um eine konfigurationserhaltende GT mit GT-A-Faltung, welche aber der CAZy-Familie 8 zugeordnet wird. Hier konnten zwar mit 146 von 210 detektierten Aminosäuren deutlich mehr zugeordnet werden, jedoch befanden sich keine der

zugeordneten Aminosäuren im aktiven Zentrum (Chan et al., 2012b). Weiterhin konnten aber nur 70% (210 vom 300) der erwarteten Signale im $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektrum detektiert werden. Für beide Enzyme ist eine Zuordnung des aktiven Zentrums aufgrund der Proteindynamik unter den beschriebenen Bedingungen nicht möglich.

Eine weitere Möglichkeit der Zuordnung bietet die zellfreie Proteinsynthese. Diese bietet die Vorteile, dass es zu weniger Kreuzmarkierungen kommt, nur eine geringere Menge an markierten Aminosäuren benötigt wird und eine schnellere Probenpräparation möglich ist. Allerdings muss das System für jedes Protein optimiert werden (Apponyi et al., 2008). Die Zellfreie Proteinsynthese ermöglicht die Nutzung der kombinatorischen Markierung von Aminosäuren, bei der verschiedene Aminosäuren innerhalb einer Probe markiert werden. Durch eine geringe Anzahl an Markierungen können dadurch sequentielle Informationen gewonnen werden (Lohr et al., 2012; Ozawa et al., 2006).

Eine Alternative bietet auch die Nutzung von paramagnetischen Liganden. Diese können entweder kovalent an das Enzym gebunden sein oder aber die vorhandene Ligandenbindungsstelle nutzen. Diese Methode ermöglicht eine abstandsabhängige Zuordnung (Liu et al., 2014).

Trotz der fehlenden Zuordnung wurde eine $[\text{U-}^2\text{H},^{15}\text{N}]$ -GTA-Probe mit dem Donorsubstrat UDP titriert. Chemische Verschiebungen sind sehr sensitiv gegenüber Veränderungen in der lokalen Umgebung (Gao et al., 2004). Des Weiteren können anhand der chemischen Verschiebungsänderungen auch wenig affine Bindungen nachgewiesen werden und Informationen über die Bindungsstelle gewonnen werden. Hier wurde untersucht, wie viele Aminosäuren sich bei der Titration bewegen und die Dissoziationskonstante K_D wurde bestimmt. Während der Titration wurde UDP teilweise zu UMP und Uracil abgebaut (Abbildung 4.8). Dieser Abbau ist chargenabhängig. Der Abbau erfolgt vermutlich durch UDP-bindende Enzyme, welche auch an das Affinitätschromatographie-Säulenmaterial binden und so auch mit gereinigt werden. Es handelt sich vermutlich um Nukleotidasen, die die Hydrolyse der Phosphatgruppe katalysieren. Der Abbau von Uridin zu Uracil erfolgt vermutlich durch eine Uridin-Phosphorylase (Walton et al., 1989). Eine Möglichkeit diesen Verunreinigungen zu entgehen, ist die Durchführung einer Größenausschlusschromatographie im Anschluss an die Affinitätschromatographie. Weiterhin könnte man die UDP-Hexanolamin-Affinitätschromatographie durch einen Chromatographieschritt ersetzen, in welchem die Bindung von GTA und GTB an HDIs ausgenutzt wird. An den Linienbreiten der Abbauprodukte ist jedoch erkennbar, dass

diese im Gegensatz zu UDP nicht an GTA binden (Abbildung 4.8). Daher kann eine Auswertung der Titration erfolgen. Während der Titration ist ein schneller Austausch der Signale zu beobachten. Am Anfang bewegen sich nur 39 Signale signifikant. Diese Signale sind vermutlich direkt an der UDP-Bindung beteiligt. Im Laufe der Titration kommt es zu immer mehr Verschiebungen und bei einer 91%igen UDP-Sättigung haben sich insgesamt 121 von 254 auswertbaren Signalen signifikant verschoben. Außerdem zeigen einige Signale eine Änderung der Bewegungsrichtung im Laufe der Titration (Abbildung 4.9). Dies deutet darauf hin, dass die UDP-Bindung ein mehrstufiger Prozess ist. Neben den direkten Interaktionen kommt es wahrscheinlich noch zu allosterischen Effekten im Protein (Arai et al., 2012). Während der Titration sind weiterhin Linienverbreiterungen zu beobachten, einige Signale verschwinden auch. Dies ist ein Hinweis auf konformationelle Änderungen im Mikrosekunden- bis Millisekundenbereich (Chan et al., 2012b). Ähnliches wurde auch bei GTB beobachtet (Grimm, 2015). Auch hier verschieben sich einige Signale erst bei höheren UDP-Konzentrationen. Zusätzlich wurden bei der GTB auch Signale beobachtet, welche sich im langsamen Austausch befinden.

Aus den erhaltenen euklidischen Verschiebungen wurde in Abhängigkeit der UDP-Konzentration der K_D -Wert auf $100 \pm 13 \mu\text{M}$ abgeschätzt. Dieser liegt somit deutlich unter dem mittels SPR-bestimmten von $540 \mu\text{M}$. Bei unterschiedlichen Bestimmungsmethoden kommt es meist zu Abweichungen. Ein Nachteil der SPR-Methode ist, dass das Protein immobilisiert wird. Durch diese Beeinflussung kann es zu Fehlern bei der K_D -Bestimmung kommen. Die in Sindhuwinata et al. beschriebenen Dissoziationskonstanten, welche mittels ITC, SPR, STD-NMR und MS bestimmt wurden, weichen teilweise bis zu einem Faktor sechs untereinander ab (Sindhuwinata et al., 2013). Außerdem beruht der aus den Titrationsexperimenten ermittelte K_D -Wert nur auf ausgewählten Daten. Bei der Betrachtung des gesamten Proteins kann es möglicherweise zu Abweichungen kommen. Außerdem wurden nur fünf Punkte in die Auswertung mit einbezogen und die verwendete UDP-Konzentration ist falsch zu hoch. Der hier ermittelte K_D -Wert ist also nur eine grobe Abschätzung, zeigt aber, dass das System prinzipiell funktioniert.

Eine Betrachtung der Kristallstrukturen von GTA und GTB ohne Ligand und mit gebundenem Donorsubstrat zeigt vor allem Änderungen in der internen Schleife. Der C-Terminus ist erst in Anwesenheit des Akzeptorsubstrats aufgelöst (Alfaro et al., 2008). Ähnliche Beobachtungen sind bei der bovinen α -(1 \rightarrow 3)-Galactosyltransferase (α 3GT) zu machen. Dieses Enzym gehört auch zur CAZy Familie 6 und ist mit einer

Sequenzhomologie von 45% GTA und GTB am ähnlichsten. Auch hier führt die Bindung von UDP hauptsächlich zu Änderungen in der internen Schleife und im C-Terminus. Allerdings kann der C-Terminus hier schon nach UDP-Bindung vollständig aufgelöst werden (Boix et al., 2001). Die interne Schleife ist im freien Zustand schon aufgelöst, bei UDP-Bindung formen fünf Reste eine Helix (Boix et al., 2001; Jamaluddin et al., 2007). Auch die Metallionen-unabhängige Glycosyltransferase BoGT6a aus *Bacteroides ovatus* ist strukturell GTA, GTB und α 3GT ähnlich, wenngleich kein DXD-Motiv vorhanden ist. Dieses Enzym zeigt ein ähnliches Substratbindungsverhalten. Es besitzt beispielsweise eine interne Schleife, die erst nach Akzeptorsubstratbindung aufgelöst werden kann (Thiyagarajan et al., 2012). Die anhand von NMR-Spektroskopie ermittelten Titrationsdaten der GTA und GTB deuten jedoch auf ein komplexeres Ligandenbindungsverhalten hin, als die mittels Kristallographie bestimmten Strukturen, die nur Änderungen in den flexiblen Schleifen zeigen. Um dieses komplexe Verhalten genauer zu untersuchen, ist es erforderlich, die Titration mit mehr Titrationschritten zu wiederholen. Vor allem im niedrigen mikromolaren Bereich sind mehr Schritte erforderlich, da der abgeschätzte K_D -Wert unterhalb des ersten Titrationspunktes liegt. Des Weiteren sollte eine Singularwertzerlegung mit den erhaltenen Daten durchgeführt werden, um das Signalrauschen zu reduzieren und die Anzahl an Bindungsereignissen zu bestimmen, auf die die bereits durchgeführten Versuche hinweisen (Arai et al., 2012).

Um das prinzipielle Vorhandensein von Proteinrückgratdynamik im Pikosekunden- bis Nanosekundenbereich zu untersuchen, wurden T_1 - und T_2 -Zeiten mit einer [$^2\text{H}, ^{15}\text{N}$]-markierten GTA bestimmt. Die Messungen fanden im Phosphat-Puffer statt, da dieser im Gegensatz zum MOPS-Puffer vollständig deuteriert werden kann. Durch die Deuterierung werden Relaxationsprozesse zwischen Protein und Puffer reduziert, wodurch Relaxationszeiten genauer bestimmt werden können. In Tabelle 4.3 ist erkennbar, dass sowohl die longitudinale ($1,50 \pm 0,53$ s) als auch die transversale Relaxationszeit ($85,30 \pm 73,51$ ms) stark zwischen den einzelnen Aminosäuren schwankt. Bei gleichbleibenden T_1 - und T_2 -Zeiten kann von einem starren Protein ausgegangen werden. Die großen Schwankungen deuten demnach auf dynamische Prozesse im Proteinrückgrat der GTA hin. Es existieren flexible Bereiche in denen Bewegungen im ps-Bereich stattfinden. Die Zugabe von UDP führt zu einer deutlichen Erhöhung der T_1 -Zeit. Die T_2 -Zeit hingegen sinkt leicht ab.

Je größer ein Protein, umso größer seine Korrelationszeit τ_c . Die T_1 - und T_2 -Zeiten sinken mit steigender Korrelationszeit. Ab einer gewissen Proteingröße steigt die T_1 -Zeit

wieder an, wohingegen die T_2 -Zeit weiter fällt (Bloembergen et al., 1948; Cavanagh et al., 2001). GTA und GTB zählen zu großen Proteinen, genauso wie die Malat-Synthase G (MSG) mit einer Größe von 81 kDa. Die T_1 -Zeit von MSG liegt bei $3,48 \pm 0,74$ s (Tugarinov et al., 2002). Wie bei dem Molekulargewicht erwartet, ist diese im Vergleich zur T_1 -Zeit der GTA erhöht. Die transversale Relaxationszeit von MSG liegt bei $18,8 \pm 4,8$ ms und wurde aus $T_{1\rho}$ -Daten bestimmt (Peng and Wagner, 1992). Die T_2 -Zeiten für GTA wurden direkt bestimmt und weisen erhebliche Schwankungen auf. Bei großen Proteinen ist eine akkurate Messung der geringen T_2 -Zeiten schwierig, da sie mit der kreuzkorrelierten Relaxation überlagert. Die hier ermittelten Daten sind demnach fehlerbehaftet. Außerdem sind sie falsch zu hoch, da einige Signale sehr schnell relaxieren und daher nicht in die Mittelwertberechnung mit einbezogen werden konnten. Diese kurzen T_2 -Zeiten und damit schnell relaxierenden Signale liefern jedoch auch eine Erklärung für die schlechte Qualität der Tripelresonanzspektren.

Die Zugabe von UDP führt zu einer deutlichen Erhöhung der T_1 -Zeit, die T_2 -Zeit hingegen fällt leicht ab. Durch die Bindung von UDP erhöht sich das Molekulargewicht geringfügig, sodass mit einer geringen Erhöhung der T_1 -Zeit zu rechnen ist. Der starke Anstieg hingegen ist vermutlich auf die Alterung der Probe zurückzuführen. Die Spektren mit der UDP-gesättigten GTA wurden zwei Monate nach der Proteinreinigung aufgenommen. Es haben sich möglicherweise Aggregate gebildet, die zu dieser beobachteten starken Erhöhung der T_1 -Zeit führen könnten. Um den Einfluss der UDP-Bindung auf die Dynamik im Pikosekunden- bis Nanosekundenbereich eindeutig zu klären, sollten die Experimente mit einer frischen Probe wiederholt werden. Insgesamt kann jedoch gesagt werden, dass sich das GTA-Proteinrückgrat im Pikosekunden- bis Nanosekundenbereich bewegt.

5.3 Seitenkettenanalyse von $[U\text{-}^2\text{H}, \{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}]$ -markierter GTA und GTB

Da aufgrund der Proteingröße die Zuordnung des Proteinrückgrates bisher nicht möglich war, wurde alternativ eine Seitenkettenanalyse einzelner Aminosäuren durchgeführt. Vor allem die Markierung von Methylgruppen ist für große Proteine von Vorteil, da es einerseits zu einer deutlichen Signalreduktion und damit auch zu einer verminderten Signalüberlagerung kommt. Andererseits sind sie über das gesamte Protein verteilt. Außerdem geben sie im Vergleich zu Amidgruppen intensivere Signale (Ollerenshaw et al., 2003; Rosen et al., 1996; Ruschak and Kay, 2010).

Bei GTA wurden die Isoleucin- δ 1-Methylgruppen selektiv $^{13}\text{C}^1\text{H}_3$ -markiert (Tugarinov and Kay, 2004). GTA besitzt 10 Isoleucine von denen sich eins in der internen Schleife – Ile 192 – und eins nahe dem aktiven Zentrum befindet – Ile 123. Das Verhalten dieser beiden Aminosäuren bei UDP- und HDis-Titration kann Aufschluss über strukturelle Änderungen im Vergleich zu peripheren Regionen geben. Die $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -methyl-TROSY-Spektren zeigen, dass die Markierung erfolgreich war. Es können alle 10 erwarteten Signale detektiert werden (Abbildung 4.13). Die Spektren von Ile-GTA und Ile-GTB stimmen sehr gut überein, sodass die Zuordnung von Ile 123 und Ile 192 der GTB auf die GTA übertragen werden kann (Grimm, 2015). Diese Zuordnung wird auch durch das Verhalten dieser beiden Signale bei Ligandenbindung bestätigt. Beide Signale erfahren bei UDP-Bindung eine signifikante Verschiebung, aber nur Ile 192 verschiebt sich auch bei HDis-Bindung. Ile 123, welches nahe der Donorbindungsstelle liegt, zeigt hier keine Verschiebung. Im Gegensatz zu den Amidsignalen, erfahren die anderen Ile- δ 1-Methylgruppen auch bei 90%iger UDP-Sättigung keine signifikante Verschiebung. Interessant ist jedoch, dass sich der freie und UDP-gebundene Zustand von Ile 192 im langsamen Austausch befinden. Bei GTB befinden sich diese Signale im schnellen Austausch (Grimm, 2015). Die Signale haben einen Abstand von 6 Hz in der direkten und von 68 Hz in der indirekten Dimension. Hier ist jedoch zu beachten, dass die digitale Auflösung in der direkten Dimension bei 10 Hz liegt. Da im langsamen Austausch die Austauschrate deutlich kleiner als die chemische Verschiebungsdifferenz ist (Kleckner and Foster, 2010), kann man davon ausgehen, dass die Austauschrate hier deutlich kleiner als 6 bis 10 Hz sein muss. Diese Daten zeigen, dass die Bewegung der internen Schleife an Position Ile 192 bei GTA langsamer erfolgt als bei GTB. Die beiden Zustände von Ile 123 haben bei GTA einen Abstand von 16 Hz in der ^1H - bzw. 60 Hz in der ^{13}C -Dimension. Die Austauschrate muss hier dementsprechend deutlich größer als 16 Hz sein und liegt damit im Millisekundenbereich. Dies ist auch bei GTB zu beobachten (Grimm, 2015), die Dynamik nahe der Donorbindungsstelle scheint daher zwischen GTA und GTB vergleichbar zu sein. Die Zugabe von HDis führt nur zu geringen chemischen Verschiebungsänderungen. Die größte Änderung erfährt Ile 192, welches sich nun im schnellen Austausch befindet. Der Einfluss der HDis-Bindung ist damit zwischen GTA und GTB vergleichbar.

Neben der Bestimmung der Austauschraten ist es auch möglich, die Seitenkettenkonformation anhand der chemischen Verschiebung zu beurteilen (Hansen et al., 2010a; Hansen et al., 2010b; London et al., 2008). Bei Isoleucinen unterscheidet man in Abhängigkeit des χ_2 Winkels zwischen vier Konformationen, wobei zwei nur mit

einer 2%igen Wahrscheinlichkeit vorkommen. Hauptsächlich treten die Konformationen Trans ($\chi_2 = 170^\circ$) und Gauche(-) ($\chi_2 = 300^\circ$) auf (Hansen et al., 2010a). Anhand der chemischen Verschiebung liegt demnach Signal 2 (Abbildung 4.13) in der Trans-Konformation vor, Signal 10 hingegen in Gauche(-). Ohne Ligand befinden sich 90% der Ile an Position 192 in einer Gauche(-)-Konformation. Durch die Zugabe von UDP und HDis erhöht sich dieser Anteil auf 99% bzw. 100% (Gleichung 3.7). Die Ligandenzugabe führt also zur Stabilisierung der Gauche(-)-Konformation bei Ile 192. Diese Änderung kann durch die Bewegung der internen Schleife erklärt werden, welche auch kristallographisch festgestellt werden konnte (Alfaro et al., 2008). Bei Ile 123 liegen vor Ligandenzugabe 72% der Signale in einer Gauche(-)-, nach Ligandenzugabe nur noch 62% in einer Gauche(-)-Konformation vor. Auch im aktiven Zentrum kommt es demnach zu konformationellen Änderungen. Bei den restlichen Isoleucinseitenketten kommt es nur vereinzelt zu Konformationsänderungen (Population < 2%).

Zusätzlich zur Untersuchung der Ligandenbindung wurde auch die Dynamik im μ -ms-Bereich mit Hilfe von CPMG-RD-Experimenten untersucht. Dafür wurden zuerst die für GTA optimalen Messbedingungen bestimmt. Die Mischzeit wurde für alle Experimente auf 20 ms gesetzt, da hier alle Signale auch bei einer Feldstärke ν_{CPMG} von 50 Hz noch eine genügend hohe Intensität zeigen (Abbildung 4.15). Für Proteine liegt dieser Wert meist zwischen 20 und 60 ms. Eine längere Mischzeit lässt mehr Zeit zur Relaxation, was wiederum zu einer Verringerung der Signalintensität führt (Korzhnev et al., 2004). Kürzere Mischzeiten deuten demnach auf ein flexibles Protein hin. Für einige Signale wäre auch eine längere Mischzeit von Vorteil gewesen, jedoch sind die Messungen sehr zeitaufwendig, sodass dies nicht berücksichtigt werden kann. Die Messungen wurden an einem 500 MHz und einem 700 MHz Spektrometer durchgeführt. Ohne Substrate zeigt nur Ile 192 (Signal 4) eine leichte Dispersion. Bei den Messungen am 700 MHz Spektrometer konnte dieses Signal bei 290 K und 283 K nicht detektiert werden, was auf einen Austausch zwischen zwei Zuständen schließen lässt. Die Dispersion nimmt also bei tieferen Temperaturen zu. Auch bei UDP-Sättigung zeigt Ile 192 Dispersionen. Erst durch die zusätzliche Zugabe von HDis kommt es zu einer Abflachung der Kurven. Ile 192, welches am Rand der internen Schleife liegt, bewegt sich also ohne Substrat und wenn UDP gebunden ist im μ -ms-Bereich. Durch die Zugabe des Akzeptors wird diese Bewegung inhibiert. Ohne Substrat und mit gebundenem UDP findet vermutlich ein Austausch zwischen der von Alfaro et al. postulierten offenen und halb-geschlossenen Konformation statt. Bei Sättigung mit HDis

befindet sich das Protein im geschlossenen Zustand (Alfaro et al., 2008). In diesem Zeitbereich findet kein Austausch mit den anderen Zuständen mehr statt.

CPMG-RD-Messungen mit Ile-GTB zeigen, dass auch die Bewegung von Ile 192 der GTB durch die Zugabe von HDis inhibiert wird. Ein Unterschied zwischen den beiden Enzymen ist jedoch im ungebundenen Zustand zu finden. Bei GTB wird eine Bewegung im μs -ms-Bereich erst durch die Zugabe von UDP induziert (Grimm, 2015). GTA hingegen zeigt auch ohne Substrate eine leichte Bewegung im Bereich der internen Schleife. Die Dynamik des freien Zustandes von GTA und GTB unterscheidet sich also. Während es im freien Zustand bei Ile 192 der GTA zu Bewegungen im μs -ms-Bereich kommt, bewegt sich Ile 192 der GTB vermutlich schneller (Grimm, 2015). Dies korreliert auch mit den beobachteten Austauschprozessen bei UDP-Zugabe. Während bei GTA ein langsamer Austausch zwischen dem gebundenen und freien Zustand beobachtet werden kann, ist dieser bei GTB schneller.

Ile 123, welches sich nahe dem aktiven Zentrum befindet, zeigt ohne Substrat keine Dispersionen, die Zugabe der Liganden führt zu einer leichten Änderung der Dispersionsprofile, jedoch sind diese stark fehlerbehaftet, sodass keine eindeutige Aussage getroffen werden kann. Alle anderen Signale zeigen, wie bei GTB auch unabhängig von den Liganden keine Bewegung im μs -ms-Bereich.

Die Zunahme der Dispersion bei tieferen Temperaturen deutet auf eine schnellere Bewegung hin, die mit CPMG-RD-Messungen nicht mehr nachgewiesen werden kann. Diese Bewegungen könnten mit Hilfe von $R_{1\rho}$ -RD-Messungen bestimmt werden. Hier werden anstelle der CPMG-Pulskaskade Spin-Lock-Pulse verwendet. Dadurch kann ein größerer Frequenzbereich abgedeckt werden, was die Messungen von schnelleren Austauschraten ermöglicht (Bothe et al., 2014; Kleckner and Foster, 2010).

Auch bei LgtC, einer konfigurationserhaltenden Glycosyltransferase der CAZy Familie 8, wurden die Isoleucin- δ 1-Methylgruppen selektiv markiert. In den ^1H , ^{13}C -methyl-TROSY-Spektren ist erkennbar, dass das Protein in zwei Konformationen vorliegt, welche sich im langsamen Austausch befinden. Jedoch binden die Substrate nur eine der beiden Konformationen (Chan et al., 2012b). Bei GTA und GTB wird dies nicht beobachtet. Jedes Isoleucin zeigt nur ein Signal, welches sich bei Substratbindung ggf. verschiebt. Durch CPMG-RD-Messungen an Isoleucin-Seitenketten der LgtC konnte nachgewiesen werden, dass sowohl beide Zustände, als auch Isoleucine nah und weit entfernt vom aktiven Zentrum sich im μs -ms-Bereich bewegen. Diese Bewegung wird durch die Bindung des Donorsubstrates verlangsamt, ist jedoch immer noch nachweisbar (Chan et al., 2012a). Im Gegensatz dazu zeigt bei GTA und GTB nur das Ile

am Rand der internen Schleife eine Bewegung in dieser Zeitskala. Auch kommt es bei GTA und GTB erst bei der Bindung des Akzeptorsubstrates zu einer Reduktion der Bewegung. Obwohl es sich bei beiden Enzymen um konfigurationserhaltende GTs mit GT-A-Faltung, mit flexiblen Schleifen und einer Metallionenabhängigkeit handelt, kommt es zu großen Unterschieden in der Konformation und Dynamik. Ursachen hierfür können einerseits Sequenzunterschiede zwischen den Proteinen sein, aber auch der Mechanismus an sich, welcher für beide Enzyme noch nicht bekannt ist. Jedoch führt bei beiden die Ligandenbindung zur Reduktion der Bewegung im μs -ms-Bereich.

5.4 Seitenkettenanalyse von $[\text{U-}^2\text{H}, \{\text{Met}_{\beta,\gamma}\text{-}^{12}\text{CH}_2\}, \{\text{Met}_{\epsilon}\text{-}^{13}\text{CH}_3\}]$ -markierter GTB

Auch die Methylgruppen von Methioninen können selektiv isotoopenmarkiert werden. Dies ist für GTA und GTB besonders interessant, da sich drei Methionine in der internen Schleife und eins bzw. zwei im aktiven Zentrum befinden. GTB besitzt ein Methionin mehr, da es an Position 266 ein Methionin anstelle eines Leucins aufweist. Diese Aminosäure ist sowohl für die Donor-, als auch für die Akzeptorerkennung wichtig (Alfaro et al., 2008; Patenaude et al., 2002; Seto et al., 1999).

In Abbildung 4.21 ist erkennbar, dass die $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -Markierung der Methionin-Methylgruppen an Position ϵ funktioniert. Es können 10 von 11 erwarteten Signalen detektiert werden. N-terminal befinden sich zusätzlich zur GTB-Sequenz sechs Aminosäuren (M-A-I-G-E-F). N-terminale Methionine auf die ein Alanin folgt, werden zu 90% von Methionin-Aminopeptidasen abgespalten (Frottin et al., 2006). M57 wurde also vermutlich enzymatisch abgespalten und liefert somit kein Signal im $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -methyl-TROSY-Spektrum. Die Intensität der Signale unterscheidet sich teilweise stark. Vor allem Met 142, welches in der Mitte des Enzyms liegt, ist im Vergleich zu den anderen Signalen sehr schwach. Die geringe Intensität deutet auf Austauschprozesse hin, welche zum Verlust von Magnetisierung führen. Signal 3 (M63 oder M69) ist hingegen sehr intensiv, was eine starre Umgebung vermuten lässt (Keeler, 2010). Die Zuordnung der Aminosäuren erfolgte durch Punktmutationen. Es ist wichtig darauf zu achten, dass die neue Aminosäure der ursprünglichen Aminosäure möglichst ähnlich ist. Bei zu großen Abweichungen kann es sein, dass Mutanten nicht synthetisiert werden können oder falsch gefaltet sind. Außerdem kann es zu erheblichen Änderungen in der chemischen Verschiebung umgebender Signale führen. In dieser Arbeit wurden einzelne Methionine gegen Alanine oder Valine ausgetauscht. Aufgrund des engen spektralen Bereiches der

Methionin Signale im $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -methyl-TROSY-Spektrum, waren einige Zuordnungen anfangs nicht eindeutig. Anhand von Lingandenbindungsstudien und HMQC-NOESY-Experimenten konnten alle Signale eindeutig zugeordnet werden.

Die Bindung von UDP hat einen signifikanten Einfluss auf die Met-GTB-Signale. Alle Methionine, die sich im aktiven Zentrum (M214 und M266), in der internen Schleife (M186, M189 und M191) sowie in einer α -Helix direkt neben der internen Schleife (M288 und M289) befinden, zeigen eine Änderung in der chemischen Verschiebung bei UDP-Zugabe (Abbildung 4.21). M191 und M214 befinden sich im intermediären Austausch in Bezug auf die chemische Verschiebungsskala. Der Abstand zwischen den austauschenden Signalen liegt bei etwa 100 Hz in der ^1H -Dimension und entspricht in diesem Fall ungefähr der Austauschrate zwischen den Zuständen (Kleckner and Foster, 2010; Williamson, 2013). Die anderen Signale befinden sich im schnellen Austausch und haben einen Abstand von etwa 20 Hz, der Austausch zwischen dem freien und dem UDP-gebundenen Zustand muss also deutlich größer als 20 Hz sein. Diese Daten lassen vermuten, dass die UDP-Bindung auf M191 und M214 in Bezug auf die chemische Verschiebungsänderung zwar den größten Einfluss hat. Die Austauschraten zwischen den Zuständen sind jedoch für alle sieben beobachteten Methionine vergleichbar (Abbildung 5.2).

Die Zugabe von HDis hat hingegen bei M189, M191, M214, M266 und M289 ein langsames Austauschverhalten zur Folge. Außerdem zeigen einige Methionine im Vergleich zum UDP-gesättigten Zustand intensivere Signale. Wenn nur UDP gebunden ist, kommt es also immer noch zu dynamischen Prozessen im Bereich des aktiven Zentrums. Durch die HDis-Bindung werden diese jedoch reduziert. Außer bei M191 ist nur ein Abstand von wenigen Hz in der ^1H -Dimension zwischen dem UDP- und UDP-, HDis-gesättigten Zustand zu erkennen (siehe Abbildung 4.21). Die Austauschrate zwischen den Zuständen ist demnach sehr langsam, was auf eine sehr enge Bindung schließen lässt (Abbildung 5.2) (Williamson, 2013).

Diese Beobachtung spiegelt sich auch in den bestimmten K_D -Werten wider. Aus den durch die UDP-Bindung induzierten chemischen Verschiebungsänderungen wurde der K_D auf $185 \pm 54 \mu\text{M}$ bestimmt. Die Dissoziationskonstante der Bindung von HDis an die UDP-gesättigte GTB liegt hingegen bei $2 \pm 5 \mu\text{M}$. Dieses Ergebnis stimmt mit den mittels ITC, SPR und STD-NMR bestimmten Dissoziationskonstanten überein, welche bei $570 \mu\text{M}$ für die UDP-Bindung und bei $7 \mu\text{M}$ für die Bindung von HDis an die UDP-gesättigte GTB liegen. Ursachen für Abweichungen zwischen den Werten wurden bereits in Abschnitt 5.2 diskutiert. Außerdem war auch hier bei der UDP-Titration ein

UDP-Abbau zu UMP zu beobachten. Es kommt also zu Abweichungen von der angenommenen UDP-Konzentration und damit zu einem Fehler in der K_D -Bestimmung.

Die chemische Verschiebung von Kohlenstoffen ist u.a. auch abhängig von den lokalen Diederwinkeln. Gleichzeitig sind Kohlenstoffverschiebungen im Vergleich zu Protonenverschiebungen weniger von äußeren Effekten beeinflusst, da sie weniger oberflächenexponiert sind (Williamson, 2013). Eine Änderung in der ^{13}C -Dimension ist demnach ein Hinweis auf eine Änderung des Diederwinkels und damit auf eine Umorientierung der Methylgruppe. Die Zugabe von UDP führt bei M189, M191, M289 zu Tieffeldverschiebungen in der ^{13}C -Dimension. Diese Methionine nehmen demnach eine Konformation mit weniger sterischen Hinderungen ein (London et al., 2008). Das neben dem DXD-Motiv liegende M214 erfährt hingegen eine Hochfeldverschiebung in beiden Dimensionen. Die UDP-Bindung führt hier demnach zu einer Konformationsänderung, aber auch zu einer Änderung in der Umgebung von M214. Die anschließende HDis-Bindung führt bei allen sich ändernden Signalen zu einer Tieffeldverschiebung und damit zu verminderten sterischen Hinderungen in der Seitenkettenkonformation. Den größten Effekt mit einer ^{13}C -Verschiebung um 91 Hz bzw. 0,7 ppm zeigt M266, einer der vier für GTB charakteristischen Aminosäuren. Insgesamt führt die Ligandenbindung zu einer Verminderung von sterischen Hinderungen innerhalb der Seitenkettenkonformation. Außerdem hat sie nicht nur einen Einfluss auf das aktive Zentrum und die beiden flexiblen Schleifen, sondern auch auf die umliegenden Aminosäuren. Als Beispiel sei hier M289 zu nennen, welches sowohl beim Wildtyp als auch bei den Mutanten eine Orientierungsänderung bei UDP-Zugabe erfährt (Abbildung 4.26). Auch durch die HMQC-NOESY-Experimente konnte gezeigt werden, dass die interne Schleife mit der benachbarten α -Helix interagiert. Die stattfindende Bewegung bei Ligandenbindung ist somit komplexer als die einfache Schleifenbewegung, die mittels Kristallographie detektiert werden konnte (Alfaro et al., 2008). Generell können unterschiedliche Seitenkettenkonformationen mit Hilfe von Kristallstrukturen nur selten identifiziert werden (MacArthur and Thornton, 1999). Ein Vergleich der Kristallstrukturen des offenen, halb-geschlossenen und geschlossenen Zustandes zeigt auch, dass M186 sich am meisten bewegt und somit die größten Änderungen in der chemischen Verschiebung zu erwarten sind. Dies kann jedoch bei den durchgeführten Titrationsexperimenten nicht beobachtet werden. Ähnliches wurde auch für Trp 181 beobachtet, welches sich in der Mitte der internen Schleife befindet und sich laut Kristallstrukturen um 6,9 Å bei UDP-Bindung bewegt. Auch hier zeigen NMR-Experimente keine signifikante Änderung in der chemischen Verschiebung der

Seitenkette (Flügge, 2014). Ein Grund hierfür ist in den unterschiedlichen experimentellen Bedingungen bei Kristallographie und NMR-Studien zu finden. Als Hauptursache seien hier die Temperaturunterschiede zu nennen. Kristallstrukturen werden bei etwa 100 K aufgenommen, was dazu führt, dass häufig nur Konformere mit der geringsten Energie abgebildet werden. NMR-Studien finden hingegen meist bei 298 K statt, wo verschiedene Konformere beobachtet werden können (London et al., 2008).

In Abbildung 4.26 und Abbildung 4.27 ist weiterhin erkennbar, dass Met-GTB und seine Einzelmutanten ein vergleichbares Ligandenbindungsverhalten aufweisen, was für die Zuordnung einzelner Signale genutzt werden konnte. Vergleicht man jedoch die HDis-Bindung an GTA und GTB fällt auf, dass die Zugabe von HDis bei GTA kaum Änderungen der Seitenkettenkonformationen hervorruft, bei GTB jedoch schon. Die Zugabe von UDP scheint bei GTA demnach schon zur Bildung einer stabilen Konformation zu führen.

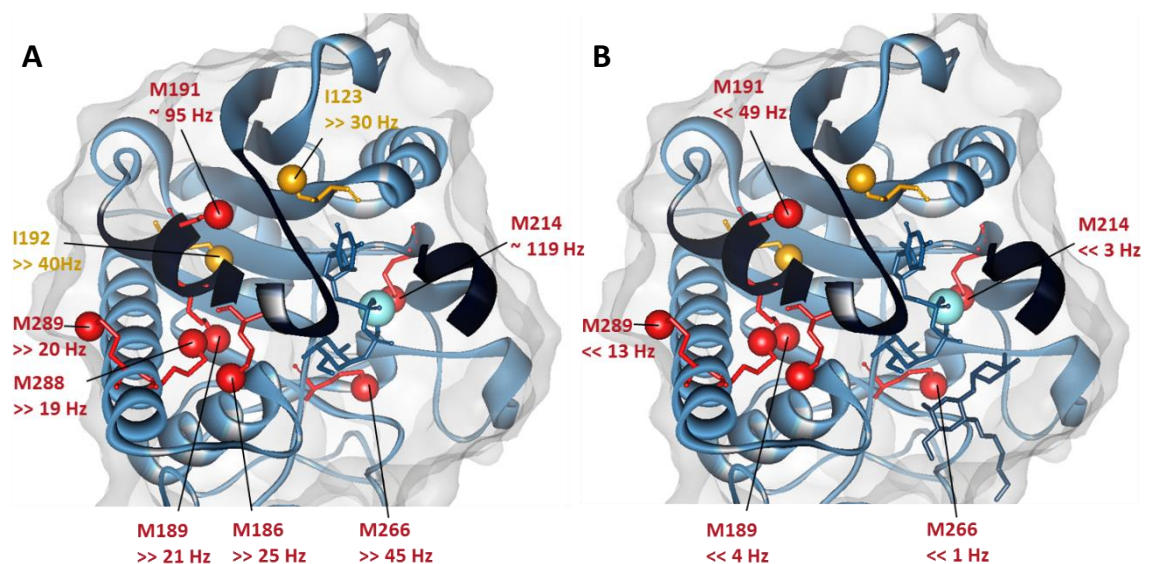


Abbildung 5.2: Kristallstruktur der Chimären AABB. Dargestellt ist ein Monomer mit gebundener UDP-Gal (dunkelblau), 3-Desoxy-H-Disaccharid (dunkelblau) und Mn^{2+} (hellblau). Isoleucine sind gelb und Methionine rot hervorgehoben. Die Methylgruppen sind jeweils als Kugel dargestellt. In (A) sind die Austauschraten einzelner Aminosäuren von GTB zwischen dem freien und UDP-gebundenen Zustand dargestellt. (B) zeigt Austauschraten von GTB zwischen dem UDP- bzw. UDP- und HDis-gebundenen Zustand. (PDB 2RJ7)

M191 und I192 liegen nebeneinander am Rand der internen Schleife. Die chemische Verschiebungsdifferenz des freien und UDP-gebundenen Zustands von M191 der GTB liegt bei 100 Hz. Da sich die Signale im intermediären Austausch befinden, kann von einer Austauschrate von etwa 100 Hz ausgegangen werden, bezogen auf die chemische Verschiebungsskala. I192 hingegen befindet sich im schnellen Austausch. Bei einem

Abstand von 40 Hz in der Protonendimension muss die Austauschrate zwischen den Zuständen dementsprechend deutlich größer als 40 Hz sein (Grimm, 2015). Dies steht im Einklang mit der Austauschrate von M191 (siehe Abbildung 5.2) und deutet darauf hin, dass die Bindung von UDP einen ähnlichen Einfluss auf die beiden benachbarten Signale hat. Des Weiteren lässt es auf eine Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Markierungsmethoden schließen. Der beobachtete Effekt hängt also nicht von der Markierung ab, sondern spiegelt den tatsächlichen Austausch zwischen den beiden Zuständen wider.

Die aus den chemischen Verschiebungsdifferenzen ermittelten Austauschraten zwischen dem freien und dem UDP gebundenen Zustand, lassen Dynamiken im Millisekundenbereich vermuten. Um dies zu überprüfen wurden CPMG-RD-Messungen durchgeführt. Wie bei Ile-GTA und Ile-GTB (Grimm, 2015) wurden die Experimente mit einer Mischzeit von 20 ms durchgeführt um eine genügend hohe Signalintensität zu gewährleisten, bei gleichzeitig möglichst hohem Austausch (Korzhnev et al., 2004). Die Messungen wurden hier nur bei einer minimalen Temperatur von 288 K durchgeführt. Bei tieferen Temperaturen nimmt die Signalintensität aufgrund von kleiner werdenden T_2 -Zeiten immer weiter ab, sodass eine Auswertung teilweise nicht mehr möglich ist. Wie bei Ile-GTA und Ile-GTB sind nur geringe Dispersionen detektierbar. Auffällig ist, dass das N-terminale M63 oder M69 eine leichte Dispersion ($\Delta R_{2,eff} = 4 \text{ s}^{-1}$) zeigt. Sowohl M63 als auch M69 befinden sich in der Dimerisierungsregion von GTB. Die Dispersion ist jedoch unabhängig von der Ligandenbindung und hat daher vermutlich keinen Einfluss auf die Katalyse.

L.L. Grimm konnte zeigen, dass bei I192 durch Zugabe von UDP eine Dispersion zu beobachten ist. Es handelt sich vermutlich um den Austausch zwischen dem offenen und halb-geschlossenen Zustand. Bei HDis-Zugabe ist diese Bewegung nicht nachweisbar (Grimm, 2015). Ein Vergleich mit M191 ist leider nicht möglich, da dieses Signal teilweise mit Signal 3 überlagert ist, oder eine zu geringe Intensität zeigt, was eine große Fehlerbelastung zur Folge hat. Ein Vergleich mit M186 zeigt jedoch, dass die UDP-Bindung zwar zu einer Erhöhung der Relaxationsrate $R_{2,0}$ führt, jedoch kein Austausch im μs -ms-Bereich beobachtbar ist. Die Zugabe von HDis hat aber auch hier eine vollständige Abflachung der Kurve zur Folge, welche sowohl bei GTA als auch bei GTB zu beobachten ist. I123 und M266 befinden sich beide im aktiven Zentrum und zeigen bei Anwesenheit von UDP und HDis eine Änderung im Kurvenverlauf, welche jedoch aufgrund der großen Fehler nicht genauer interpretiert werden kann. Auch bei M289, welches in einer α -Helix neben der internen Schleife liegt, sind Änderungen in den

Dispersionskurven bei Ligandenbindung erkennbar. Dies kann einerseits an einer durch die Ligandenbindung induzierten Konformationsänderung liegen, aber auch an Interaktionen mit der benachbarten internen Schleife.

Insgesamt zeigen sowohl die Titrationsexperimente, als auch die CMPG-RD-Experimente, dass die Ligandenbindung nicht nur einen Einfluss auf das aktive Zentrum und die flexiblen Schleifen hat, sondern auch auf umliegende Regionen. Der hintere Teil des Proteins wird jedoch durch die Ligandenbindung sowohl in seiner chemischen Verschiebung als auch in der Dynamik nicht beeinflusst. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den Beobachtungen für LgtC. Die Ligandenbindung führt zwar auch hier vor allem im Bereich des aktiven Zentrums zu Änderungen in der chemischen Verschiebung, jedoch kommt es bei LgtC auch bei weiter entfernten Isoleucinen zu Änderungen der Dynamik im μs -ms-Bereich (Chan et al., 2012a; Chan et al., 2012b).

5.5 Etablierung von inversen Sättigungstransfer-Experimenten

Neben Titrationsexperimenten sind auch Sättigungstransfer-Experimente ein wichtiges Werkzeug zur Charakterisierung von Protein-Ligand-Interaktionen. Anhand von ligandenbasierten Experimenten kann einerseits festgestellt werden, ob eine Substanz bindet und wenn ja, mit welcher Bindungsaffinität, andererseits können aber auch Bindungsepitope bestimmt werden (Meyer and Peters, 2003). Der proteinbasierte Ansatz, bei dem der Ligand gesättigt wird und die auf das Protein übertragene Sättigung detektiert wird, bietet zusätzlich die Möglichkeit, die Struktur und Funktion der Bindungstasche zu analysieren. Das Prinzip des inversen Sättigungstrfers wurde hier erstmalig auf eine methylgruppenmarkierte Probe angewendet. Als Modell diente ILV-GTA mit dem Donorsubstratanalogon UDP-Gal. UDP-Gal wird nur mit einem k_{cat} von $0,088 \text{ s}^{-1}$ umgesetzt, wohingegen der k_{cat} des eigentlichen Donors UDP-GalNac bei $17,5 \text{ s}^{-1}$ liegt (Marcus et al., 2003). Allerdings kommt es zur enzymatischen Hydrolyse von UDP-GalNac bei Abwesenheit des Akzeptors, sodass in den Studien stattdessen UDP-Gal verwendet wurde (Patenaude et al., 2002; Sindhuwinata et al., 2010).

Um die Signale des freien und UDP-Gal-gebundenen Zustandes der ILV-GTA einander zuordnen zu können, wurden zusätzlich Titrationsexperimente durchgeführt. Außerdem wurde aus den chemischen Verschiebungsdifferenzen die Dissoziationskonstante der Bindung von UDP-Gal an GTA bestimmt. Die Verschiebungen der Ile-Signale entsprechen dabei den Verschiebungen die bei der Titration von Ile-GTA mit UDP beobachtet wurden (siehe Abschnitt 4.4.2). Bei den

Leucin- und Valin-Signalen zeigen 35 von 113 ausgewerteten Signalen signifikante Verschiebungen. Da nur 6 Leucine und Valine einen Abstand von unter 10 Å zum aktiven Zentrum haben, führt auch hier die Ligandenbindung nicht nur zu Änderungen im aktiven Zentrum, sondern auch in den umliegenden Regionen. Eine genaue Analyse der Daten zeigt, dass es sich bei der Bindung um einen mehrstufigen Prozess handelt. Eine Singularwertzerlegung der Daten lässt erkennen, dass es sich insgesamt um vier Bindungsereignisse handelt, wobei eins dem freien und eins dem gebundenen Zustand entspricht. Die anderen Bindungsereignisse können entweder Bindungsstellen oder aber auch strukturelle Veränderungen widerspiegeln (Arai et al., 2012; Mallagaray et al., 2015). Aus den rekonstruierten Daten wurden Dissoziationskonstanten bestimmt (Abbildung 4.34 und Tabelle 4.11). Dabei ist auffällig, dass sich K_{D1} und K_{D2} mit 35 ± 10 bzw. $93 \pm 15 \mu\text{M}$ unterhalb der eingesetzten Proteinkonzentration von $150 \mu\text{M}$ und auch unterhalb des ersten Titrationspunktes ($75 \mu\text{M}$) befinden. Eine Sättigung des Proteins mit Ligand kann hier noch nicht erfolgt sein. Daher wird vermutet, dass es sich bei diesen beiden Bindungsereignissen nicht um die Besetzung einer Bindungsstelle, sondern um strukturelle Änderungen im Protein handelt. Ursachen hierfür könnten die postulierte Bewegung der flexiblen inneren Schleife und des C-Terminus sein (Alfaro et al., 2008) oder aber auch Konformationsänderungen im aktiven Zentrum. K_{D3} entspricht mit $668 \pm 45 \mu\text{M}$ ungefähr der Hälfte des mittels SPR ermittelten Wertes für die Bindung von UDP-Gal an GTA (Grimm, 2015). Diese Dissoziationskonstante spiegelt demnach die Bindung von UDP-Gal an ILV-GTA wider. Wie schon bei der Titration von $[\text{U-}^2\text{H},^{15}\text{N}]\text{-GTA}$ mit UDP (Abschnitt 5.2), oder von Met-GTB mit UDP (Abschnitt 5.4) beobachtet, kommt es häufig zu Abweichungen zwischen den mittels Titrationsexperimenten und SPR bestimmten Dissoziationskonstanten.

Weiterhin wurde in Abschnitt 5.2 postuliert, dass es sich bei der Bindung von UDP an $[\text{U-}^2\text{H},^{15}\text{N}]\text{-GTA}$ um einen mehrstufigen Prozess handelt. Diese Vermutung kann für die Bindung von UDP-Gal an ILV-GTA bestätigt werden. Dadurch, dass zwei Titrationsen für die Analyse vereinigt wurden, ist die Fehlerwahrscheinlichkeit der detektierten chemischen Verschiebungen zwar höher, jedoch wurde durch die Singularwertzerlegung auch das Signalrauschen reduziert und somit auch der eingebrachte Fehler. Durch eine weitere Erhöhung der Anzahl der Titrationschritte, könnten die ersten beiden Bindungsereignisse weiter charakterisiert werden.

Für den Nachweis des inversen Sättigungstransfers vom Liganden auf das Protein sind Kontrollmessungen sowohl am Liganden als auch am Protein essentiell. Durch die selektive Sättigung einzelner Signale des Liganden, kann auch die Orientierung des

Liganden in der Bindungstasche untersucht werden. Dazu muss der Ligand isolierte Protonen aufweisen, deren chemische Verschiebung möglichst weit von den zu detektierenden Proteinsignalen entfernt sein sollte. UDP-Gal erfüllt diese Bedingungen. Insgesamt drei Signale können selektiv gesättigt werden (Abbildung 4.36). Das Einstrahlen dieser Sättigungsfrequenzen auf das Protein hat nur eine geringe direkte Anregung zur Folge (< 5%). Es ist jedoch erkennbar, dass bei Frequenzen, die weiter hochfeldverschoben sind, eine geringfügig größere direkte Proteinsignalanregung erfolgt. Ursache hierfür ist wahrscheinlich eine unvollständige Deuterierung. Die Resonanzen von H_{α} liegen typischerweise bei etwa 4-5 ppm. Je näher der Sättigungspuls an diesen Bereich kommt, umso höher ist die Wahrscheinlichkeit einer direkten Anregung des Proteins. Ein möglichst hoher Deuterierungsgrad ist für inverse Sättigungstransferexperimente also essentiell.

Die inversen STD-NMR-Experimente wurden mit einer UDP-Gal gesättigten GTA-Probe durchgeführt. Bei allen drei getesteten Sättigungsfrequenzen konnte ein signifikanter Sättigungstransfer auf je ein bis zwei Signale nachgewiesen werden. Der größte Transfer erfolgte bei einer Sättigungsfrequenz von 5,91 ppm auf ein Signal, welches erst während der Titration sichtbar wurde. Ohne Ligand kann dieses Signal vermutlich aufgrund von Austauschprozessen nicht detektiert werden oder es überlagert mit einem anderen Signal. Wie in Abschnitt 4.4.6 beschrieben, konnte es Valin 184 zugeordnet werden. V184 hat auch laut Kristallstruktur (PDB: 3SXE) den geringsten Abstand zu H5 bzw. H1' der UDP-Gal und erhält somit erwartungsgemäß den größten Sättigungstransfer. Diese Beobachtung stimmt auch mit den Ergebnissen des ligandenbasierten STD-Experimentes überein, bei dem der größte Sättigungstransfer vom Protein auf H5 bzw. H1' der UDP-Gal stattfand. Die Etablierung des $^1H,^{13}C$ -methyl-TROSY-basierten inversen Sättigungstrfers war demnach erfolgreich. Ein abstandsabhängiger Sättigungstransfer des Liganden auf das Protein kann nachgewiesen werden.

Bei den Punktmutanten V184A- und V212A-GTA fand nur eine Valin-Markierung statt. Die Markierung der Leucine wurde durch die Zugabe von Leucin- d_{10} unterdrückt. Da je nach Schnittebene jedoch noch Leucin-Restsignale detektierbar sind, sollte für weitere Versuche mehr Leucin- d_{10} eingesetzt werden. Bei den Signale 17 und 85 ist bei Sättigung von H6 des Uracilrings bzw. von H1'' der Galactose ein Sättigungstransfer nachweisbar. Diese Signale können jedoch Leucinen zugeordnet werden. Anhand der Kristallstruktur könnte es sich demnach bei Signal 17 um Leucin 130 handeln und bei Signal 85 um Leucin 232, 306, 324 oder 329. Die aus den Kristallstrukturen ermittelten

Abstände sind jedoch fehlerbehaftet, da eine Kristallisation mit UDP-Gal bisher nicht möglich war, sondern nur mit UDP und Galactose einzeln (Johal et al., 2012). Außerdem wurde gezeigt, dass das Donorsubstrat in mehreren Konformationen bindet (Gagnon et al., 2015). Auf eine abstandsabhängige Zuordnung sollte daher verzichtet werden. Jedoch kann gesagt werden, welche Aminosäuren sich prinzipiell in der Umgebung des Liganden befinden.

Insgesamt konnte die Methode des inversen Sättigungstransfers auf ^1H , ^{13}C -markierte Proben etabliert werden. Um den Fehler bei der Intensitätsmessung möglichst gering zu halten, ist ein gutes Signal-zu-Rausch-Verhältnis essentiell. Dafür sollte einerseits eine genügend hohe Anzahl an *Scans* durchgeführt werden, andererseits sollte die Proteinkonzentration bei mindestens 150 μM liegen. Die Methode setzt allerdings das Vorhandensein von Methylgruppen im Bereich der Bindungstasche voraus. Außerdem muss der Ligand isolierte Signale für eine gezielte Sättigung aufweisen.

Der inverse Sättigungstransfer bietet im Vergleich zu STD-Experimenten den Vorteil, dass deutlich mehr Signale ausgewertet werden können und so Aussagen über die Ligandenbindungstasche gemacht werden können und gegebenenfalls auch über die Orientierung des Liganden. Allerdings ist sie aufgrund der unterschiedlichen Relaxationseigenschaften von Proteinen und Liganden nicht so sensitiv wie die ligandenbasierte Methode.

Zur Untersuchung der Ligandenbindungstasche kann neben dem inversen Sättigungstransfer auch die Methode des sogenannten SOS-NMR eingesetzt werden. Dafür werden klassische STD-NMR-Experimente mit selektiv-methylgruppenmarkierten Proben durchgeführt. So kann die Aminosäurezusammensetzung der Bindungstasche bestimmt werden und mit der Kristallstruktur verglichen werden (Hajduk et al., 2004).

5.6 Untersuchungen zu P-Dimeren des humanen Norovirus

Zusätzlich zu den humanen Blutgruppen-Glycosyltransferasen GTA und GTB, welche für die Bildung der HBGAs verantwortlich sind, wurden auch P-Dimere der humanen Noroviren untersucht, welche HBGAs binden. P-Dimere sind die oberflächenexponierte Untereinheit des VP1-Kapsidproteins. Wie bei GTA und GTB liegt die Dimergröße bei etwa 70 kDa, was auch hier eine Zuordnung des Proteinrückgrates erschwert. Aus diesem Grund wurde auch auf P-Dimere die Methode der selektiven Methylgruppenmarkierung von Isoleucinen, Leucinen und Valinen

angewendet. Die Ausbeute der Proteinbiosynthese von P-Dimeren und seinen Mutanten war vergleichbar. Aufgrund der guten Auflösung der Ile-Signale, war für die drei Isoleucin-Mutanten eine Proteinbiosynthese in Wasser ausreichend. Dies führt zwar aufgrund von Spin-Diffusion zu einer erheblichen Linienverbreiterung der Signale, trotzdem können alle Signale eindeutig zugeordnet werden (siehe Anhang Abschnitt 7.3.6).

Bei den angewendeten Expressionsbedingungen für die Proteinbiosynthese von ILV-P-Dimern kommt es allerdings nur zur Markierung von Isoleucinen und Valinen. Eine Temperaturabhängigkeit konnte bereits ausgeschlossen werden (Müller-Hermes, 2015). Um eine Leucin-Markierung zu erreichen, können unter anderen verschiedene Medienzusammensetzungen getestet werden, auch eine Erhöhung der Konzentration des Vorläufers 2-Keto-3-methyl-d₃-3-d₁-4-¹³C-butyrat könnte vielversprechend sein. Für die hier durchgeführten Experimente stellt die IV-Markierung jedoch einen Vorteil dar. Die Spektren sind weniger komplex und es kommt nur vereinzelt zu Signalüberlagerungen.

In den ¹H,¹³C-methyl-TROSY-Spektren der IV-P-Dimere werden 55 Valin-Signale detektiert, bei allerdings nur 48 erwarteten. Diese erhöhte Signalanzahl könnte ein Hinweis auf mehrere Konformationen des Proteins sein. Ähnliches konnte bei LgtC beobachtet werden, allerdings werden hier große Unterschiede in den Signalintensitäten zwischen den Zuständen beobachtet (Chan et al., 2012b). Dies ist bei P-Dimeren nicht der Fall. Um den langsamen Austausch zwischen zwei Konformationen nachzuweisen, könnten ZZ-Austausch-Experimente durchgeführt werden (Farrow et al., 1994b; Wagner et al., 1985). Eine weitere Ursache für die erhöhte Anzahl an detektierten Signalen ist eine unvollständige Symmetrie der Homodimere. Durch Unterschiede in ihrer Umgebung zeigen einige Valin-Methylgruppen möglicherweise zwei Signale. Wie erwartet, wurden 8 Isoleucin-Signale detektiert.

Die Dynamik von P-Dimeren ist bisher völlig unbekannt. Zur Untersuchung der Bewegungen im µs-ms-Bereich wurden CPMG-RD-Messungen durchgeführt. Wie bei GTA und GTB wurde auch hier die Temperaturabhängigkeit und der Einfluss der Mischzeit getestet. Auch P-Dimere neigen bei Temperaturen über 298 K zur Aggregation. Bei tiefen Temperaturen sind sie jedoch stabil und es findet keine Intensitätsreduktion statt. Aufgrund dieses Verhaltens konnte für P-Dimere auch eine Mischzeit von 40 ms gewählt werden. Auch bei längeren Relaxationszeiten ist das Signal-zu-Rausch-Verhältnis ausreichend für Intensitätsmessungen. P-Dimere relaxieren damit deutlich langsamer als GTA und GTB und sind daher rigider.

Die CMPG-RD-Messungen wurden ohne Ligand sowie mit 6 mM und 160 mM Fucose durchgeführt. Die Fucosekonzentrationen wurden ausgehend von zwei unabhängigen Bindungsstellen pro Dimer, basierend auf den mittels STD-NMR bestimmten Dissoziationskonstanten gewählt. Anhand der chemischen Verschiebungsänderungen während der Titration konnte jedoch später gezeigt werden, dass es insgesamt vier Ligandenbindungsstellen gibt, wobei die dritte und vierte gleichzeitig besetzt werden (Mallagaray et al., 2015). Bei einer Konzentration von 6 mM Fucose ist also nur die erste Bindungstasche zu 70 % besetzt, bei 160 mM sind die ersten beiden zu über 94% und die dazwischen liegenden Bindungstaschen drei und vier zu 80% besetzt. Die Fucose-Bindung hat jedoch keinen Einfluss auf die μ s-ms-Dynamik von P-Dimeren. Insgesamt zeigen nur zwei Valin-Reste leichte Dispersionen. Alle anderen Signale zeigen keine Austauschprozesse in diesem Zeitbereich. Um sicher zu stellen, dass es sich hier um eine Eigenschaft aller P-Dimere handelt, sollten diese Versuche z.B. mit murinen P-Dimeren wiederholt werden. Für die Dihydrofolat Reduktase aus *E. coli* und des Menschen konnte beispielsweise gezeigt werden, dass sich hier die Dynamik im μ s-ms-Bereich unterscheidet und es auch zu unterschiedlichen konformationellen Änderungen kommt (Tuttle et al., 2014).

Die Zuordnung von Proteinen kann einerseits durch die bereits vorgestellten Zuordnungsexperimente (Frueh, 2014; Sattler et al., 1999) oder anhand von Punktmutationen einzelner Aminosäuren erfolgen. Für große Proteine mit einem Molekulargewicht von über 30 kDa reichen die genannten Methoden jedoch häufig nicht aus. Eine Ergänzung bzw. Alternative bilden beispielsweise paramagnetische Liganden (Frueh, 2014). Paramagnetische Metalle führen zu *Paramagnetic Relaxation Enhancement* (PRE) (Gueron, 1975; Macnaughtan et al., 2007), *Pseudocontact Shifts* (PCS) (Canales et al., 2013), *Residual Dipolar Couplings* (RDCs) (Shealy et al., 2011) und *Cross-Correlated Relaxation* (CCR) (Madhu et al., 2001). Diese Effekte können u.a. für die Zuordnung, für die Bestimmung von Strukturen und für Dynamikmessungen verwendet werden. In dieser Arbeit sollte die Zuordnung von Isoleucin- δ 1-Methylgruppen mit Hilfe eines Gadolinium-tragenden Fucose-Tags (Gd^{3+} -Fucose) (Mallagaray et al., 2016) stattfinden. Gadolinium führt zu einem abstandsabhängigen PRE-Effekt (Otting, 2010) d.h. zur Linienverbreiterung von räumlich nahen Signalen. Der größte Effekt ist dabei bei einem Abstand von 5 bis 20 Å vom Metallion zu erwarten. Der Abstand der Isoleucin- δ 1-Methylgruppen vom Gd^{3+} -Ion liegt zwischen 14 und 52 Å. Ile389 kann aufgrund des geringen Abstandes und des Verschwindens nach dem ersten Titrationsschritt Signal 7 zugeordnet werden. Die abstandsabhängige Zuordnung der im Laufe der Titration

schrittweise verschwindenden Signale stimmt jedoch nicht mit den Zuordnungen der drei Mutanten überein. Die Möglichkeit, dass der gebundene Ligand auch die Signale des anderen Monomers beeinflusst, kann vernachlässigt werden. Die Isoleucine des anderen Monomers haben Abstände von 30 bis 50 Å vom Paramagneten und werden somit kaum noch beeinflusst. Bildet man außerdem den Mittelwert der einzelnen Signalabstände, ergibt sich dieselbe Reihenfolge für die Entfernung der einzelnen Isoleucin-Methylgruppen vom Paramagneten. Je nach Ligand und System sind die Zuordnungen ab einem gewissen Abstand jedoch nicht verlässlich. Vlasie et al. konnte mit einem $^{64}\text{CLaNP}$ -Liganden Amidgruppen bis zu einem Abstand von 20-30 Å mit einer Abweichung von ± 3 Å zuordnen (Vlasie et al., 2007), Yagi et al. spricht hingegen nur von 15 Å bei Nutzung eines $[\text{Gd}(\text{DPA})_3]^{3-}$ -Liganden (Yagi et al., 2010). Dabei ist auch das Verhältnis zwischen Protein und Ligand entscheidend. Aufgrund der hohen Dissoziationskonstante von Fucose gegenüber P-Dimeren kommt es während der Titration zu einem starken Ligandenüberschuss in Bezug auf die Proteinkonzentration. Ein Teil des Liganden diffundiert also durch die Lösung und hat so auch einen Einfluss auf die Linienbreite von oberflächenexponierten Isoleucin- $\delta 1$ -Signalen, was wiederum Fehler in der Zuordnung zur Folge hat. Um den Einfluss dieses Effektes zu untersuchen wird zurzeit ein neuer Ligand synthetisiert, der Anstelle der Fucose eine Säuregruppe trägt. Dieser Ligand bindet also nicht an P-Dimere und sollte so bei der Titration nur den Einfluss des freien Liganden widerspiegeln. Außerdem könnte statt der Fucose ein Ligand mit höherer Affinität wie z.B. HDis oder B-Trisaccharid genutzt werden (Mallagaray et al., 2015). Um die Lanthanoidbindung noch stabiler und rigider zu machen könnte man auch Phenyl-Triaminohexaacetat als chelatierendes Element nutzen, welches neun Koordinationsstellen besitzt (Peters et al., 2011). Alternativ können paramagnetische Tags auch kovalent an Cysteine oder künstliche Aminosäuren gebunden werden (Liu et al., 2014). Durch die Synthese von mehreren Mutanten, die jeweils nur ein Cystein tragen, können so verschiedene Proteinregionen näher charakterisiert werden (Lee et al., 2015).

5.7 Schlussfolgerung und Ausblick

In dieser Arbeit wurden die HBGA-bildenden Glycosyltransferasen GTA und GTB sowie die HBGA-bindenden P-Dimere der humanen Noroviren untersucht. Bei allen drei Proteinen handelt es sich um Dimere mit einer Größe von etwa 70 kDa. Eine Charakterisierung so großer Proteine ist aus NMR-spektroskopischer Sicht sehr

schwierig. Eine Proteinrückgrat-Analyse, wie sie für Proteine <20 kDa durchgeführt wird, ist häufig aufgrund von ungünstigen Relaxationseigenschaften und Signalüberlagerung nicht möglich. Eine Alternative bildet die Seitenkettenanalyse. Hierfür bietet sich vor allem eine selektive Methylgruppenmarkierung an, da es u.a. zu einer Reduktion der Signalanzahl kommt und die Signale aufgrund der jeweils drei detektierten Protonen deutlich intensiver sind (Ollerenshaw et al., 2003; Rosen et al., 1996; Ruschak and Kay, 2010).

Um den bisher unbekanntem Mechanismus der konfigurationserhaltenden GTs weiter zu untersuchen, sollten mit GTA und GTB Protein-Ligand-Interaktionen untersucht und die Proteindynamik in verschiedenen Zeitbereichen bestimmt werden. Dafür wurden sowohl proteinrückgrat-, als auch seitenketten-markierte Proben genutzt. Anhand von Tripelresonanzexperimenten konnten nur 18 von 298 Aminosäuren zugeordnet werden. Dies ist einerseits durch die ungünstigen Relaxationseigenschaften großer Protein zu begründen (Bloembergen et al., 1948; Cavanagh et al., 2001; Sattler, 2009). GTA und GTB weisen andererseits aber auch eine intrinsische Proteindynamik auf, was die Qualität der Spektren weiter verschlechtert. Neben den Kristallstrukturen (Alfaro et al., 2008) und Protonen-Deuterium-Austauschexperimenten (Grimm, 2015), zeigt auch die Analyse der Dynamik im Picosekunden- bis Nanosekundenbereich (T_1 - und T_2 -Zeiten), dass es sich um sehr flexible Enzyme handelt. Um trotzdem eine Zuordnung zu erreichen, sollten alternative Methoden, wie die Nutzung von paramagnetischen Liganden (Lee et al., 2015) und die kombinatorische Markierung von Aminosäuren (Lohr et al., 2012; Parker et al., 2004) herangezogen werden.

Die Analyse der UDP-Bindung an GTA lässt vermuten, dass die Ligandenbindung auch allosterische Effekte induziert, die nicht nur das aktive Zentrum und die flexiblen Schleifen betreffen. Diese Effekte wurden mit Hilfe von methylgruppenmarkierten Proben weiter untersucht. Mit Ile-GTA und Met-GTB wurden dafür UDP- und HDis-Titrationen durchgeführt. Sowohl bei Ile-GTA als auch bei Ile-GTB (Grimm, 2015) hat die Ligandenbindung den größten Einfluss auf Ile192 (am Rand der internen Schleife) und auf Ile123 (nahe dem aktiven Zentrum). Bei der Met-GTB-Probe zeigen neben den Methioninen der internen Schleife (M186, M189 und M191) und des aktiven Zentrums (M214 und M266) auch benachbarte Methionine (M288 und M289) signifikante Änderungen bei Ligandenbindung. Die HDis-Zugabe führt hier zu einer Verlangsamung des Austauschs zwischen dem halb-geschlossenen und geschlossenen Zustand und hat konformationelle Änderungen innerhalb der Seitenketten zur Folge. Auch die Titration von ILV-GTA mit UDP-Gal zeigt, dass auch Leucine und Valine

außerhalb des aktiven Zentrums beeinflusst werden. Außerdem konnte hier gezeigt werden, dass es während der Titration zu mehreren Bindungsereignissen kommt. Die mittels NMR beobachteten Effekte, lassen auf ein deutlich komplexeres Bindungsverhalten der Liganden schließen, als bisherige Kristallstrukturen zeigen. Es wird vermutet, dass diese Konformationsänderungen in Kristallstrukturen aufgrund von z.B. experimentellen Bedingungen bisher nicht sichtbar gemacht werden konnten (MacArthur and Thornton, 1999; Nussinov and Tsai, 2015). Die Durchführung von chemischen Verschiebungsexperimenten ermöglicht es, die strukturellen Änderungen des Proteins bei Ligandenbindung schrittweise nachzuvollziehen und bietet damit zusammen mit Dynamikmessungen einen Vorteil gegenüber der Kristallographie.

Die Ergebnisse der Titrations und CPMG-RD-Messungen zeigen jedoch auch, dass der mittlere Teil und die Region im Bereich der Dimerisierungsstelle von der Ligandenbindung nicht beeinflusst sind. Diese Ergebnisse ermöglichen eine Einteilung von GTA und GTB in eine ligandenunabhängige und ligandenbeeinflusste Regionen (Abbildung 5.3).

Bei den CPMG-Messungen ist auffällig, dass eine etwaige μs -ms-Dynamik in der internen Schleife durch die Bindung von HDIs inhibiert wird. Insgesamt finden jedoch kaum Bewegungen im μs -ms-Bereich statt. Die Beobachtung, dass es bei tieferen Temperaturen teilweise zu stärkeren Dispersionen kommt, deutet auf eine schnellere Bewegung hin. Diese könnten mit $R_{1\rho}$ -Experimenten untersucht werden (Bothe et al., 2014; Kleckner and Foster, 2010). Eine zusätzliche Markierung von Alanin-Methylgruppen könnte weitere Informationen über die Protein-Ligand-Interaktionen liefern und den Bereich des Ligandeneinflusses weiter eingrenzen (Ayala et al., 2009; Liu et al., 2014).

Zur näheren Charakterisierung der Bindungstasche wurde weiterhin das Prinzip des inversen Sättigungstransfers bei ^1H , ^{13}C -markierten Proben angewendet. Es konnte gezeigt werden, dass ein spezifischer, abstandabhängiger Sättigungstransfer vom Liganden auf das Protein erfolgt. Diese Methode ist vor allem für Proteine von Vorteil, deren Bindungstasche noch unbekannt ist. Außerdem kann für große Liganden mit mehreren isolierten Signalen die Orientierung in der Bindungstasche charakterisiert werden.

Die Seitenkettenmarkierung von Isoleucinen und Valinen konnte auch auf P-Dimere des humanen Norovirus angewendet werden. Auch hier sind die markierten Aminosäuren über das gesamte Protein verteilt, sodass anhand der Methylgruppen Aussagen über das gesamte Protein getroffen werden können. Die CPMG-RD-

Messungen zeigen, dass P-Dimere keine Dynamik im μ s-ms-Bereich aufweisen und dass auch die Ligandenbindung darauf keinen Einfluss hat. Da in den Spektren mehr Signale als erwartet zu sehen sind, könnte man eine langsame Bewegung im Millisekundenbereich vermuten. Um das zu überprüfen sollten ZZ-Austausch-Experimente durchgeführt werden (Farrow et al., 1994b; Palmer et al., 2001; Wagner et al., 1985).

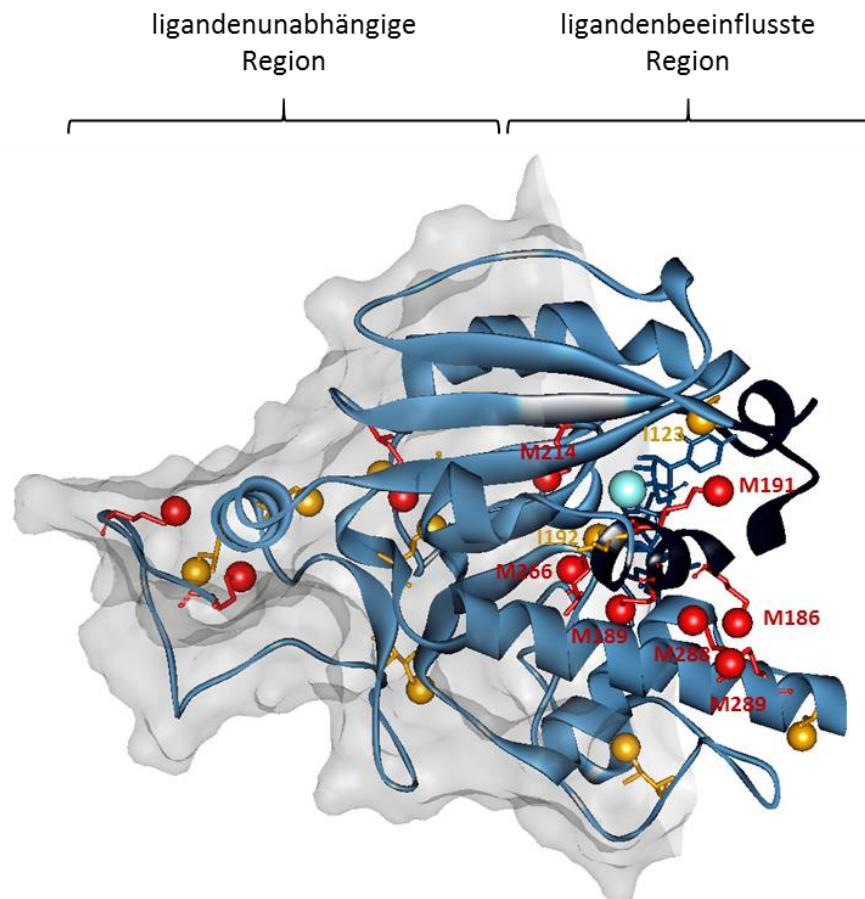


Abbildung 5.3: Kristallstruktur der Chimären AABB. Dargestellt ist ein Monomer mit gebundenem UDP-Gal (dunkelblau), 3-Desoxy-H-Disaccharid (dunkelblau) und Mn^{2+} (hellblau). Methionine sind rot und Isoleucine gelb hervorgehoben. Die Methylgruppen sind jeweils als Kugel dargestellt. Sich bewegende Methylgruppen wurden beschriftet. (PDB 2RJ7)

Die Zuordnung der Isoleucin- δ 1-Methylgruppen mit Hilfe eines paramagnetischen Liganden ist nur für Signale mit einem Abstand von unter 20 Å vom paramagnetischen Ion möglich. Um weiter entfernte Signale zuzuordnen, sollten Liganden mit höherer Affinität verwendet werden um das Verhältnis von Ligand zu Protein reduzieren zu können. Eine weitere Möglichkeit stellt die Nutzung eines kovalent gebundenen Liganden dar, um dem Einfluss der frei in Lösung befindlichen Liganden entgegen zu wirken (Liu et al., 2014).

Alles in allem konnte durch diese Arbeit ein Einblick in das komplexe Bindungsverhalten und die Dynamik der humanen Glycosyltransferasen GTA und GTB gewonnen werden. Es konnte gezeigt werden, dass eine Zuordnung der Proteinrückgratsignale prinzipiell möglich ist, jedoch alternative Methoden, wie z.B. die Nutzung von paramagnetischen Liganden erfordert. Mit Hilfe der methylgruppenmarkierten GTA und GTB konnten erstmals Austauschraten zwischen dem offenen, halb-geschlossenen und geschlossenen Zustand bestimmt werden. Auch konnten durch Ligandenbindung induzierte Konformationsänderungen in Isoleucin- und Methionin-Seitenketten nachvollzogen werden. Dieses Wissen zusammen mit der Charakterisierung weiterer ^{13}C -methylgruppenmarkierter Proteinproben und des Proteinrückgrates kann es ermöglichen, die Funktionsweise von GTA und GTB Schritt für Schritt nachzuvollziehen und somit Informationen über den bisher unbekanntem Mechanismus liefern.

Für P-Dimere konnte gezeigt werden, dass es sich insgesamt um ein vergleichsweise starres Protein handelt, das nur geringe Struktur- und Dynamikänderungen im μs -ms-Zeitbereich bei Ligandenbindung erfährt. Die Nutzung von paramagnetischen Liganden stellt außerdem ein vielversprechendes Werkzeug für die Zuordnung dar, welche für weitere Experimente essentiell ist. Aufbauend auf diesem Wissen kann die Ligandenbindung weiter charakterisiert werden, was wiederum die Entwicklung von *Entry*-Inhibitoren ermöglicht.

6 Literaturverzeichnis

- Alderwick, L.J., Lloyd, G.S., Ghadbane, H., May, J.W., Bhatt, A., Eggeling, L., Futterer, K., and Besra, G.S. (2011). The C-terminal domain of the Arabinosyltransferase *Mycobacterium tuberculosis* EmbC is a lectin-like carbohydrate binding module. *PLoS Pathog* 7, e1001299.
- Alfaro, J.A., Zheng, R.B., Persson, M., Letts, J.A., Polakowski, R., Bai, Y., Borisova, S.N., Seto, N.O., Lowary, T.L., Palcic, M.M., *et al.* (2008). ABO(H) blood group A and B glycosyltransferases recognize substrate via specific conformational changes. *J Biol Chem* 283, 10097-10108.
- Angulo, J., Enriquez-Navas, P.M., and Nieto, P.M. (2010). Ligand-receptor binding affinities from saturation transfer difference (STD) NMR spectroscopy: the binding isotherm of STD initial growth rates. *Chemistry* 16, 7803-7812.
- Angulo, J., Langpap, B., Blume, A., Biet, T., Meyer, B., Krishna, N.R., Peters, H., Palcic, M.M., and Peters, T. (2006). Blood group B galactosyltransferase: insights into substrate binding from NMR experiments. *J Am Chem Soc* 128, 13529-13538.
- Apponyi, M.A., Ozawa, K., Dixon, N.E., and Otting, G. (2008). Cell-free protein synthesis for analysis by NMR spectroscopy. *Methods Mol Biol* 426, 257-268.
- Arai, M., Ferreón, J.C., and Wright, P.E. (2012). Quantitative analysis of multisite protein-ligand interactions by NMR: binding of intrinsically disordered p53 transactivation subdomains with the TAZ2 domain of CBP. *J Am Chem Soc* 134, 3792-3803.
- Atreya, H.S. (2012). Isotope labeling in Biomolecular NMR (Springer).
- Ayala, I., Sounier, R., Use, N., Gans, P., and Boisbouvier, J. (2009). An efficient protocol for the complete incorporation of methyl-protonated alanine in perdeuterated protein. *J Biomol NMR* 43, 111-119.
- Berger, E.G., Mandel, T., and Schilt, U. (1981). Immunohistochemical localization of galactosyltransferase in human fibroblasts and HeLa cells. *J Histochem Cytochem* 29, 364-370.
- Bieri, M., Kwan, A.H., Mobli, M., King, G.F., Mackay, J.P., and Gooley, P.R. (2011). Macromolecular NMR spectroscopy for the non-spectroscopist: beyond macromolecular solution structure determination. *FEBS J* 278, 704-715.
- Bloembergen, N., Purcell, E.M., and Pound, R.V. (1948). Relaxation Effects in Nuclear Magnetic Resonance Absorption. *Physical Review* 73, 679-746.
- Blume, A., Angulo, J., Biet, T., Peters, H., Benie, A.J., Palcic, M., and Peters, T. (2006). Fragment-based screening of the donor substrate specificity of human blood group B galactosyltransferase using saturation transfer difference NMR. *J Biol Chem* 281, 32728-32740.
- Bobovska, A., Tvaroska, I., and Kona, J. (2014a). Theoretical study of enzymatic catalysis explains why the trapped covalent intermediate in the E303C mutant of

- glycosyltransferase GTB was not detected in the wild-type enzyme. *Glycobiology* 25, 3-7.
- Bobovska, A., Tvaroska, I., and Kona, J. (2014b). A theoretical study on the catalytic mechanism of the retaining alpha-1,2-mannosyltransferase Kre2p/Mnt1p: the impact of different metal ions on catalysis. *Org Biomol Chem* 12, 4201-4210.
- Boehr, D.D., Dyson, H.J., and Wright, P.E. (2006). An NMR perspective on enzyme dynamics. *Chem Rev* 106, 3055-3079.
- Boix, E., Swaminathan, G.J., Zhang, Y., Natesh, R., Brew, K., and Acharya, K.R. (2001). Structure of UDP complex of UDP-galactose:beta-galactoside-alpha -1,3-galactosyltransferase at 1.53-A resolution reveals a conformational change in the catalytically important C terminus. *J Biol Chem* 276, 48608-48614.
- Bok, K., Abente, E.J., Realpe-Quintero, M., Mitra, T., Sosnovtsev, S.V., Kapikian, A.Z., and Green, K.Y. (2009). Evolutionary dynamics of GII.4 noroviruses over a 34-year period. *J Virol* 83, 11890-11901.
- Bothe, J.R., Stein, Z.W., and Al-Hashimi, H.M. (2014). Evaluating the uncertainty in exchange parameters determined from off-resonance R1rho relaxation dispersion for systems in fast exchange. *J Magn Reson* 244, 18-29.
- Bourne, Y., and Henrissat, B. (2001). Glycoside hydrolases and glycosyltransferases: families and functional modules. *Curr Opin Struct Biol* 11, 593-600.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Breton, C., Bettler, E., Joziassse, D.H., Geremia, R.A., and Imberty, A. (1998). Sequence-function relationships of prokaryotic and eukaryotic galactosyltransferases. *J Biochem* 123, 1000-1009.
- Breton, C., Snajdrova, L., Jeanneau, C., Koca, J., and Imberty, A. (2006). Structures and mechanisms of glycosyltransferases. *Glycobiology* 16, 29R-37R.
- Cai, Y.D., Zhou, G.P., and Chou, K.C. (2003). Support vector machines for predicting membrane protein types by using functional domain composition. *Biophys J* 84, 3257-3263.
- Campbell, J.A., Davies, G.J., Bulone, V., and Henrissat, B. (1997). A classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J* 326 (Pt 3), 929-939.
- Canales, A., Mallagaray, A., Perez-Castells, J., Boos, I., Unverzagt, C., Andre, S., Gabius, H.J., Canada, F.J., and Jimenez-Barbero, J. (2013). Breaking pseudo-symmetry in multiantennary complex N-glycans using lanthanide-binding tags and NMR pseudo-contact shifts. *Angew Chem Int Ed Engl* 52, 13789-13793.
- Cao, S., Lou, Z., Tan, M., Chen, Y., Liu, Y., Zhang, Z., Zhang, X.C., Jiang, X., Li, X., and Rao, Z. (2007). Structural basis for the recognition of blood group trisaccharides by norovirus. *J Virol* 81, 5949-5957.

- Carver, J.P., and Richards, R.E. (1972). A General Two-Site Solution for the Chemical Exchange Produced Dependence of T₂ Upon the Carr-Purcell Pulse Separation. *J Magn Reson* 6, 89-105.
- Caul, E.O. (1994). Small round structured viruses: airborne transmission and hospital control. *Lancet* 343, 1240-1242.
- Cavanagh, J., Fairbrother, W.J., Palmer, A.G., 3rd, and Seltron, N.J. (2001). *Protein NMR Spectroscopy - Principles and Practice* (Academic Press).
- Chan, P.H., Cheung, A.H., Okon, M., Chen, H.M., Withers, S.G., and McIntosh, L.P. (2012a). Investigating the structural dynamics of alpha-1,4-galactosyltransferase C from *Neisseria meningitidis* by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* 52, 320-332.
- Chan, P.H., Lairson, L.L., Lee, H.J., Wakarchuk, W.W., Strynadka, N.C., Withers, S.G., and McIntosh, L.P. (2009). NMR spectroscopic characterization of the sialyltransferase CstII from *Campylobacter jejuni*: histidine 188 is the general base. *Biochemistry* 48, 11220-11230.
- Chan, P.H., Weissbach, S., Okon, M., Withers, S.G., and McIntosh, L.P. (2012b). Nuclear Magnetic Resonance Spectral Assignments of alpha-1,4-Galactosyltransferase LgtC from *Neisseria meningitidis*: Substrate Binding and Multiple Conformational States. *Biochemistry*.
- Charnock, S.J., and Davies, G.J. (1999). Structure of the nucleotide-diphospho-sugar transferase, SpsA from *Bacillus subtilis*, in native and nucleotide-complexed forms. *Biochemistry* 38, 6380-6385.
- Chiu, C.P., Watts, A.G., Lairson, L.L., Gilbert, M., Lim, D., Wakarchuk, W.W., Withers, S.G., and Strynadka, N.C. (2004). Structural analysis of the sialyltransferase CstII from *Campylobacter jejuni* in complex with a substrate analog. *Nat Struct Mol Biol* 11, 163-170.
- Choi, J.M., Hutson, A.M., Estes, M.K., and Prasad, B.V. (2008). Atomic resolution structural characterization of recognition of histo-blood group antigens by Norwalk virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 9175-9180.
- Claridge, T.D.W. (1999). *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*. Elsevier.
- Clausen, H., and Hakomori, S. (1989). ABH and related histo-blood group antigens; immunochemical differences in carrier isotypes and their distribution. *Vox Sang* 56, 1-20.
- Clore, G.M., and Iwahara, J. (2009). Theory, practice, and applications of paramagnetic relaxation enhancement for the characterization of transient low-population states of biological macromolecules and their complexes. *Chem Rev* 109, 4108-4139.
- Colley, K.J. (1997). Golgi localization of glycosyltransferases: more questions than answers. *Glycobiology* 7, 1-13.
- Coutinho, P.M., Deleury, E., Davies, G.J., and Henrissat, B. (2003). An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases. *J Mol Biol* 328, 307-317.

- Creutzmacher, R. (2014). Anwendung Methyl-TROSY-basierter Sättigungstransfer-Experimente auf die humane Blutgruppe A Glycosyltransferase In Institut für Chemie (Universität zu Lübeck).
- Davies, G.J. (2001). Sweet secrets of synthesis. *Nat Struct Biol* 8, 98-100.
- Davies, G.J., Mackenzie, L., Varrot, A., Dauter, M., Brzozowski, A.M., Schulein, M., and Withers, S.G. (1998). Snapshots along an enzymatic reaction coordinate: analysis of a retaining beta-glycoside hydrolase. *Biochemistry* 37, 11707-11713.
- de Graffenried, C.L., and Bertozzi, C.R. (2004). The roles of enzyme localisation and complex formation in glycan assembly within the Golgi apparatus. *Curr Opin Cell Biol* 16, 356-363.
- Donaldson, E.F., Lindesmith, L.C., Lobue, A.D., and Baric, R.S. (2008). Norovirus pathogenesis: mechanisms of persistence and immune evasion in human populations. *Immunol Rev* 225, 190-211.
- Doucet, N., Watt, E.D., and Loria, J.P. (2009). The flexibility of a distant loop modulates active site motion and product release in ribonuclease A. *Biochemistry* 48, 7160-7168.
- Duizer, E., Schwab, K.J., Neill, F.H., Atmar, R.L., Koopmans, M.P., and Estes, M.K. (2004). Laboratory efforts to cultivate noroviruses. *J Gen Virol* 85, 79-87.
- Farrow, N.A., Muhandiram, R., Singer, A.U., Pascal, S.M., Kay, C.M., Gish, G., Shoelson, S.E., Pawson, T., Forman-Kay, J.D., and Kay, L.E. (1994a). Backbone dynamics of a free and phosphopeptide-complexed Src homology 2 domain studied by ¹⁵N NMR relaxation. *Biochemistry* 33, 5984-6003.
- Farrow, N.A., Zhang, O., Forman-Kay, J.D., and Kay, L.E. (1994b). A heteronuclear correlation experiment for simultaneous determination of ¹⁵N longitudinal decay and chemical exchange rates of systems in slow equilibrium. *J Biomol NMR* 4, 727-734.
- Fiege, B. (2012). Insights into Binding of Attachment Factors and Inhibitors to a Human Norovirus from NMR and SPR Experiments. In Institute of Chemistry (University of Lübeck).
- Fielding, L. (2003). NMR methods for the determination of protein-ligand dissociation constants. *Curr Top Med Chem* 3, 39-53.
- Flint, S.J., Enquist, L.W., Racaniello, V.R., and Skala, A.M. (2004). Principles of Virology, second edition edn (ASM Press).
- Flügge, F. (2014). "Hot spot" tryptophan residues as reporters of protein dynamics of human blood group glycosyltransferases. In Institut für Chemie (Universität zu Lübeck).
- Frottin, F., Martinez, A., Peynot, P., Mitra, S., Holz, R.C., Giglione, C., and Meinnel, T. (2006). The proteomics of N-terminal methionine cleavage. *Mol Cell Proteomics* 5, 2336-2349.
- Frueh, D.P. (2014). Practical aspects of NMR signal assignment in larger and challenging proteins. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc* 78, 47-75.

- Fuster, M.M., and Esko, J.D. (2005). The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets. *Nature Reviews Cancer* 5, 526-542.
- Gagnon, S.M., Meloncelli, P.J., Zheng, R.B., Haji-Ghassemi, O., Johal, A.R., Borisova, S.N., Lowary, T.L., and Evans, S.V. (2015). High resolution structures of the human ABO(H) blood group enzymes in complex with donor analogs reveal that the enzymes utilize multiple donor conformations to bind substrates in a step-wise manner. *J Biol Chem*.
- Gao, G., Williams, J.G., and Campbell, S.L. (2004). Protein-protein interaction analysis by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Methods Mol Biol* 261, 79-92.
- Gardner, K.H., and Kay, L.E. (1998). The use of ²H, ¹³C, ¹⁵N multidimensional NMR to study the structure and dynamics of proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 27, 357-406.
- Geen, H., and Freeman, R. (1991). Band-Selective Radiofrequency Pulses. *Journal of Magnetic Resonance* 93, 93-141.
- Gelis, I., Bonvin, A.M., Keramisanou, D., Koukaki, M., Gouridis, G., Karamanou, S., Economou, A., and Kalodimos, C.G. (2007). Structural basis for signal-sequence recognition by the translocase motor SecA as determined by NMR. *Cell* 131, 756-769.
- Gibson, R.P., Turkenburg, J.P., Charnock, S.J., Lloyd, R., and Davies, G.J. (2002). Insights into trehalose synthesis provided by the structure of the retaining glucosyltransferase OtsA. *Chem Biol* 9, 1337-1346.
- Goedl, C., Griessler, R., Schwarz, A., and Nidetzky, B. (2006). Structure-function relationships for *Schizopyllum commune* trehalose phosphorylase and their implications for the catalytic mechanism of family GT-4 glycosyltransferases. *Biochem J* 397, 491-500.
- Goedl, C., and Nidetzky, B. (2009). Sucrose phosphorylase harbouring a redesigned, glycosyltransferase-like active site exhibits retaining glucosyl transfer in the absence of a covalent intermediate. *Chembiochem* 10, 2333-2337.
- Gomez, H., Polyak, I., Thiel, W., Lluch, J.M., and Masgrau, L. (2012). Retaining glycosyltransferase mechanism studied by QM/MM methods: lipopolysaccharyl-alpha-1,4-galactosyltransferase C transfers alpha-galactose via an oxocarbenium ion-like transition state. *J Am Chem Soc* 134, 4743-4752.
- Grimm, L.L. (2015). Ligandenbindung und Proteindynamik bei *humaner Blutgruppe B Galactosyltransferase* und *West-Nil Virus Protease NS2B-NS3* In Institut für Chemie (Universität zu Lübeck).
- Gueron, M. (1975). Nuclear-Relaxation in Macromolecules by Paramagnetic-Ions - Novel Mechanism. *Journal of Magnetic Resonance* 19, 58-66.
- Hajduk, P.J., Mack, J.C., Olejniczak, E.T., Park, C., Dandliker, P.J., and Beutel, B.A. (2004). SOS-NMR: a saturation transfer NMR-based method for determining the structures of protein-ligand complexes. *J Am Chem Soc* 126, 2390-2398.

- Hakomori, S. (1999). Antigen structure and genetic basis of histo-blood groups A, B and O: their changes associated with human cancer. *Biochim Biophys Acta* 1473, 247-266.
- Hale, A.D., Crawford, S.E., Ciarlet, M., Green, J., Gallimore, C., Brown, D.W., Jiang, X., and Estes, M.K. (1999). Expression and self-assembly of Grimsby virus: antigenic distinction from Norwalk and Mexico viruses. *Clin Diagn Lab Immunol* 6, 142-145.
- Han, L., Kitov, P.I., Kitova, E.N., Tan, M., Wang, L., Xia, M., Jiang, X., and Klassen, J.S. (2012). Affinities of recombinant norovirus P dimers for human blood group antigens. *Glycobiology* 23, 276-285.
- Hansen, D.F., Neudecker, P., and Kay, L.E. (2010a). Determination of isoleucine side-chain conformations in ground and excited states of proteins from chemical shifts. *J Am Chem Soc* 132, 7589-7591.
- Hansen, D.F., Neudecker, P., Vallurupalli, P., Mulder, F.A., and Kay, L.E. (2010b). Determination of Leu side-chain conformations in excited protein states by NMR relaxation dispersion. *J Am Chem Soc* 132, 42-43.
- Hansman, G.S., Biertumpfel, C., Georgiev, I., McLellan, J.S., Chen, L., Zhou, T., Katayama, K., and Kwong, P.D. (2011). Crystal structures of GII.10 and GII.12 norovirus protruding domains in complex with histo-blood group antigens reveal details for a potential site of vulnerability. *J Virol* 85, 6687-6701.
- Hansman, G.S., Jiang, X.J., and Green, K.Y. (2010). *Caliciviruses: Molecular and Cellular Virology* (Caister Academic Press).
- Harrington, P.R., Lindesmith, L., Yount, B., Moe, C.L., and Baric, R.S. (2002). Binding of Norwalk virus-like particles to ABH histo-blood group antigens is blocked by antisera from infected human volunteers or experimentally vaccinated mice. *J Virol* 76, 12335-12343.
- Hassinen, A., Rivinoja, A., Kauppila, A., and Kellokumpu, S. (2010). Golgi N-glycosyltransferases form both homo- and heterodimeric enzyme complexes in live cells. *J Biol Chem* 285, 17771-17777.
- Huang, P., Farkas, T., Zhong, W., Tan, M., Thornton, S., Morrow, A.L., and Jiang, X. (2005). Norovirus and histo-blood group antigens: demonstration of a wide spectrum of strain specificities and classification of two major binding groups among multiple binding patterns. *J Virol* 79, 6714-6722.
- Hutson, A.M., Atmar, R.L., and Estes, M.K. (2004). Norovirus disease: changing epidemiology and host susceptibility factors. *Trends Microbiol* 12, 279-287.
- Hutson, A.M., Atmar, R.L., Graham, D.Y., and Estes, M.K. (2002). Norwalk virus infection and disease is associated with ABO histo-blood group type. *J Infect Dis* 185, 1335-1337.
- Hutson, A.M., Atmar, R.L., Marcus, D.M., and Estes, M.K. (2003). Norwalk virus-like particle hemagglutination by binding to h histo-blood group antigens. *J Virol* 77, 405-415.

- Ishima, R., and Torchia, D.A. (2006). Accuracy of optimized chemical-exchange parameters derived by fitting CPMG R2 dispersion profiles when R2(0a) not = R2(0b). *J Biomol NMR* 34, 209-219.
- Jamaluddin, H., Tumbale, P., Withers, S.G., Acharya, K.R., and Brew, K. (2007). Conformational changes induced by binding UDP-2F-galactose to alpha-1,3 galactosyltransferase- implications for catalysis. *J Mol Biol* 369, 1270-1281.
- Jarymowycz, V.A., and Stone, M.J. (2006). Fast time scale dynamics of protein backbones: NMR relaxation methods, applications, and functional consequences. *Chem Rev* 106, 1624-1671.
- Jiang, X., Wang, M., Graham, D.Y., and Estes, M.K. (1992). Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. *J Virol* 66, 6527-6532.
- Johal, A.R., Schuman, B., Alfaro, J.A., Borisova, S., Seto, N.O., and Evans, S.V. (2012). Sequence-dependent effects of cryoprotectants on the active sites of the human ABO(H) blood group A and B glycosyltransferases. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 68, 268-276.
- Jones, M.K., Watanabe, M., Zhu, S., Graves, C.L., Keyes, L.R., Grau, K.R., Gonzalez-Hernandez, M.B., Iovine, N.M., Wobus, C.E., Vinje, J., *et al.* (2014). Enteric bacteria promote human and mouse norovirus infection of B cells. *Science* 346, 755-759.
- Kamath, V.P., Seto, N.O., Compston, C.A., Hindsgaul, O., and Palcic, M.M. (1999). Synthesis of the acceptor analog alphaFuc(1-->2)alphaGal-O(CH2)7 CH3: a probe for the kinetic mechanism of recombinant human blood group B glycosyltransferase. *Glycoconj J* 16, 599-606.
- Kapikian, A.Z., Wyatt, R.G., Dolin, R., Thornhill, T.S., Kalica, A.R., and Chanock, R.M. (1972). Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J Virol* 10, 1075-1081.
- Kaplan, J.E., Schonberger, L.B., Varano, G., Jackman, N., Bied, J., and Gary, G.W. (1982). An outbreak of acute nonbacterial gastroenteritis in a nursing home. Demonstration of person-to-person transmission by temporal clustering of cases. *Am J Epidemiol* 116, 940-948.
- Keeler, J. (2010). *Understanding NMR Spectroscopy*, 2nd Edition. WILEY, 526.
- Kempf, J.G., and Loria, J.P. (2003). Protein dynamics from solution NMR: theory and applications. *Cell Biochem Biophys* 37, 187-211.
- Keshvara, L.M., Newton, E.M., Good, A.H., Hindsgaul, O., and Palcic, M.M. (1992). Enzyme-linked immunosorbent assays for the measurement of blood group A and B glycosyltransferase activities. *Glycoconj J* 9, 16-20.
- Kleckner, I.R., and Foster, M.P. (2010). An introduction to NMR-based approaches for measuring protein dynamics. *Biochim Biophys Acta* 1814, 942-968.
- Kleckner, I.R., and Foster, M.P. (2011). GUARDD: user-friendly MATLAB software for rigorous analysis of CPMG RD NMR data. *J Biomol NMR* 52, 11-22.
- Kobata, A., Grollman, E.F., and Ginsburg, V. (1968a). An enzymatic basis for blood type B in humans. *Biochem Biophys Res Commun* 32, 272-277.

- Kobata, A., Grollman, E.F., and Ginsburg, V. (1968b). An enzymic basis for blood type A in humans. *Arch Biochem Biophys* 124, 609-612.
- Koromyslova, A.D., Leuthold, M.M., Bowler, M.W., and Hansman, G.S. (2015). The sweet quartet: Binding of fucose to the norovirus capsid. *Virology* 483, 203-208.
- Korzhnev, D.M., Kloiber, K., Kanelis, V., Tugarinov, V., and Kay, L.E. (2004). Probing slow dynamics in high molecular weight proteins by methyl-TROSY NMR spectroscopy: application to a 723-residue enzyme. *J Am Chem Soc* 126, 3964-3973.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lairson, L.L., Chiu, C.P., Ly, H.D., He, S., Wakarchuk, W.W., Strynadka, N.C., and Withers, S.G. (2004). Intermediate trapping on a mutant retaining alpha-galactosyltransferase identifies an unexpected aspartate residue. *J Biol Chem* 279, 28339-28344.
- Lairson, L.L., Henrissat, B., Davies, G.J., and Withers, S.G. (2008). Glycosyltransferases: structures, functions, and mechanisms. *Annu Rev Biochem* 77, 521-555.
- Lairson, L.L., and Withers, S.G. (2004). Mechanistic analogies amongst carbohydrate modifying enzymes. *Chem Commun (Camb)*, 2243-2248.
- Lakomek, N.A., Lange, O.F., Walter, K.F., Fares, C., Egger, D., Lunkenheimer, P., Meiler, J., Grubmuller, H., Becker, S., de Groot, B.L., *et al.* (2008). Residual dipolar couplings as a tool to study molecular recognition of ubiquitin. *Biochem Soc Trans* 36, 1433-1437.
- Landsteiner, K. (1901). Ueber Agglutinationserscheinungen normalen menschlichen Blutes. *Wien Klin Wochenschr*.
- Lay, M.K., Atmar, R.L., Guix, S., Bharadwaj, U., He, H., Neill, F.H., Sastry, K.J., Yao, Q., and Estes, M.K. (2010). Norwalk virus does not replicate in human macrophages or dendritic cells derived from the peripheral blood of susceptible humans. *Virology* 406, 1-11.
- Lee, M.D., Loh, C.T., Shin, J., Chhabra, S., Dennis, M.L., Otting, G., Swarbrick, J.D., and Graham, B. (2015). Compact, hydrophilic, lanthanide-binding tags for paramagnetic NMR spectroscopy. *Chemical Science* 6, 2614-2624.
- Lescop, E., Schanda, P., and Brutscher, B. (2007). A set of BEST triple-resonance experiments for time-optimized protein resonance assignment. *J Magn Reson* 187, 163-169.
- Letts, J.A., Rose, N.L., Fang, Y.R., Barry, C.H., Borisova, S.N., Seto, N.O., Palcic, M.M., and Evans, S.V. (2006). Differential recognition of the type I and II H antigen acceptors by the human ABO(H) blood group A and B glycosyltransferases. *J Biol Chem* 281, 3625-3632.
- Lindesmith, L.C., Donaldson, E.F., Lobue, A.D., Cannon, J.L., Zheng, D.P., Vinje, J., and Baric, R.S. (2008). Mechanisms of GII.4 norovirus persistence in human populations. *PLoS Med* 5, e31.

- Liu, J., and Mushegian, A. (2003). Three monophyletic superfamilies account for the majority of the known glycosyltransferases. *Protein Sci* 12, 1418-1431.
- Liu, S., Xue, H., Pu, B., and Quian, N. (1984). A new viral disease in rabbits. *Anim Husb Vet Med Care* 16, 253-255.
- Liu, W.M., Overhand, M., and Ubbink, M. (2014). The application of paramagnetic lanthanoid ions in NMR spectroscopy on proteins. *Coordination Chemistry Reviews* 273, 2-12.
- Lobsanov, Y.D., Romero, P.A., Sleno, B., Yu, B., Yip, P., Herscovics, A., and Howell, P.L. (2004). Structure of Kre2p/Mnt1p: a yeast alpha1,2-mannosyltransferase involved in mannoprotein biosynthesis. *J Biol Chem* 279, 17921-17931.
- Lohr, F., Reckel, S., Karbyshev, M., Connolly, P.J., Abdul-Manan, N., Bernhard, F., Moore, J.M., and Dotsch, V. (2012). Combinatorial triple-selective labeling as a tool to assist membrane protein backbone resonance assignment. *J Biomol NMR* 52, 197-210.
- London, R.E., Wingad, B.D., and Mueller, G.A. (2008). Dependence of amino acid side chain ¹³C shifts on dihedral angle: application to conformational analysis. *J Am Chem Soc* 130, 11097-11105.
- Loria, J.P., Berlow, R.B., and Watt, E.D. (2008). Characterization of enzyme motions by solution NMR relaxation dispersion. *Acc Chem Res* 41, 214-221.
- Loria, J.P., Rance, M., and Palmer, A.G., 3rd (1999). A TROSY CPMG sequence for characterizing chemical exchange in large proteins. *J Biomol NMR* 15, 151-155.
- Lowary, T.L., and Hindsgaul, O. (1994). Recognition of synthetic O-methyl, epimeric, and amino analogues of the acceptor alpha-L-Fuc p-(1->2)-beta-D-Gal p-OR by the blood-group A and B gene-specified glycosyltransferases. *Carbohydr Res* 251, 33-67.
- Ly, H.D., Loughheed, B., Wakarchuk, W.W., and Withers, S.G. (2002). Mechanistic studies of a retaining alpha-galactosyltransferase from *Neisseria meningitidis*. *Biochemistry* 41, 5075-5085.
- MacArthur, M.W., and Thornton, J.M. (1999). Protein side-chain conformation: a systematic variation of chi 1 mean values with resolution - a consequence of multiple rotameric states? *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 55, 994-1004.
- Macnaughtan, M.A., Kamar, M., Alvarez-Manilla, G., Venot, A., Glushka, J., Pierce, J.M., and Prestegard, J.H. (2007). NMR structural characterization of substrates bound to N-acetylglucosaminyltransferase V. *J Mol Biol* 366, 1266-1281.
- Madhu, P.K., Grandori, R., Hohenthanner, K., Mandal, P.K., and Muller, N. (2001). Geometry dependent two-dimensional heteronuclear multiplet effects in paramagnetic proteins. *J Biomol NMR* 20, 31-37.
- Mallagaray, A. (2014). KD Bestimmung der Bindung von Fucose an P-Dimere mittels STD-NMR (Universität zu Lübeck, Institut für Chemie).

- Mallagaray, A., Dominguez, G., Peters, T., and Perez-Castells, J. (2016). A rigid lanthanide binding tag to aid NMR studies of a 70 kDa homodimeric coat protein of human norovirus. *Chem Commun (Camb)*.
- Mallagaray, A., Lockhauserbaumer, J., Hansman, G., Uetrecht, C., and Peters, T. (2015). Attachment of Norovirus to Histo Blood Group Antigens: A Cooperative Multistep Process. *Angew Chem Int Ed Engl* 54, 12014-12019.
- Manassen, Y., and Navon, G. (1988). Nonuniform Sampling in Nmr Experiments. *Journal of Magnetic Resonance* 79, 291-298.
- Marcus, S.L., Polakowski, R., Seto, N.O., Leinala, E., Borisova, S., Blancher, A., Roubinet, F., Evans, S.V., and Palcic, M.M. (2003). A single point mutation reverses the donor specificity of human blood group B-synthesizing galactosyltransferase. *J Biol Chem* 278, 12403-12405.
- Marionneau, S., Cailleau-Thomas, A., Rocher, J., Le Moullac-Vaidye, B., Ruvoen, N., Clement, M., and Le Pendu, J. (2001). ABH and Lewis histo-blood group antigens, a model for the meaning of oligosaccharide diversity in the face of a changing world. *Biochimie* 83, 565-573.
- Markley, J.L., Bax, A., Arata, Y., Hilbers, C.W., Kaptein, R., Sykes, B.D., Wright, P.E., and Wuthrich, K. (1998). Recommendations for the presentation of NMR structures of proteins and nucleic acids. *J Mol Biol* 280, 933-952.
- Marley, J., Lu, M., and Bracken, C. (2001). A method for efficient isotopic labeling of recombinant proteins. *J Biomol NMR* 20, 71-75.
- Martinez-Fleites, C., Proctor, M., Roberts, S., Bolam, D.N., Gilbert, H.J., and Davies, G.J. (2006). Insights into the synthesis of lipopolysaccharide and antibiotics through the structures of two retaining glycosyltransferases from family GT4. *Chem Biol* 13, 1143-1152.
- Mattner, F., Sohr, D., Heim, A., Gastmeier, P., Vennema, H., and Koopmans, M. (2006). Risk groups for clinical complications of norovirus infections: an outbreak investigation. *Clin Microbiol Infect* 12, 69-74.
- Mayer, M., and Meyer, B. (1999). Characterization of ligand binding by saturation transfer difference NMR spectroscopy. *Angewandte Chemie-International Edition* 38, 1784-1788.
- Mayer, M., and Meyer, B. (2001). Group epitope mapping by saturation transfer difference NMR to identify segments of a ligand in direct contact with a protein receptor. *J Am Chem Soc* 123, 6108-6117.
- Meloncelli, P.J., and Lowary, T.L. (2009). Synthesis of ABO Histo-Blood Group Type V and VI Antigens. *Aust J Chem* 62, 558-574.
- Meyer, B., and Peters, T. (2003). NMR spectroscopy techniques for screening and identifying ligand binding to protein receptors. *Angew Chem Int Ed Engl* 42, 864-890.
- Milland, J., and Sandrin, M.S. (2006). ABO blood group and related antigens, natural antibodies and transplantation. *Tissue Antigens* 68, 459-466.

- Mollicone, R., Cailleau, A., and Oriol, R. (1995). Molecular genetics of H, Se, Lewis and other fucosyltransferase genes. *Transfus Clin Biol* 2, 235-242.
- Monegal, A., and Planas, A. (2006). Chemical rescue of alpha3-galactosyltransferase. Implications in the mechanism of retaining glycosyltransferases. *J Am Chem Soc* 128, 16030-16031.
- Morera, S., Lariviere, L., Kurzeck, J., Aschke-Sonnenborn, U., Freemont, P.S., Janin, J., and Ruger, W. (2001). High resolution crystal structures of T4 phage beta-galactosyltransferase: induced fit and effect of substrate and metal binding. *J Mol Biol* 311, 569-577.
- Morin, S. (2011). A practical guide to protein dynamics from 15N spin relaxation in solution. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc* 59, 245-262.
- Mulder, F.A., Skrynnikov, N.R., Hon, B., Dahlquist, F.W., and Kay, L.E. (2001). Measurement of slow (micro-s-ms) time scale dynamics in protein side chains by (15)N relaxation dispersion NMR spectroscopy: application to Asn and Gln residues in a cavity mutant of T4 lysozyme. *J Am Chem Soc* 123, 967-975.
- Müller-Hermes, C. (2015). NMR Studies into Selective Isotope-labelled Norovirus P-dimers. In Institut für Chemie (Universität zu Lübeck).
- Nagai, M., Dave, V., Kaplan, B.E., and Yoshida, A. (1978a). Human blood group glycosyltransferases. I. Purification of n-acetylgalactosaminyltransferase. *J Biol Chem* 253, 377-379.
- Nagai, M., Dave, V., Muensch, H., and Yoshida, A. (1978b). Human blood group glycosyltransferase. II. Purification of galactosyltransferase. *J Biol Chem* 253, 380-381.
- Neill, J.D., Meyer, R.F., and Seal, B.S. (1995). Genetic relatedness of the caliciviruses: San Miguel sea lion and vesicular exanthema of swine viruses constitute a single genotype within the Caliciviridae. *J Virol* 69, 4484-4488.
- Noel, J.S., Fankhauser, R.L., Ando, T., Monroe, S.S., and Glass, R.I. (1999). Identification of a distinct common strain of "Norwalk-like viruses" having a global distribution. *J Infect Dis* 179, 1334-1344.
- Nussinov, R., and Tsai, C.J. (2015). Allostery without a conformational change? Revisiting the paradigm. *Curr Opin Struct Biol* 30, 17-24.
- Ohtsubo, K., and Marth, J.D. (2006). Glycosylation in Cellular Mechanisms of Health and Disease. *Cell* 126, 855-867.
- Ollerenshaw, J.E., Tugarinov, V., and Kay, L.E. (2003). Methyl Trosy: explanation and experimental verification. *Magn Reson Chem* 41, 843-852.
- Otting, G. (2010). Protein NMR using paramagnetic ions. *Annu Rev Biophys* 39, 387-405.
- Ozawa, K., Wu, P.S., Dixon, N.E., and Otting, G. (2006). N-Labelled proteins by cell-free protein synthesis. Strategies for high-throughput NMR studies of proteins and protein-ligand complexes. *FEBS J* 273, 4154-4159.

- Pace, C.N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G., and Gray, T. (1995). How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci* 4, 2411-2423.
- Palcic, M.M., Heerze, L.D., Pierce, M., and Hindsgaul, O. (1988). The use of hydrophobic synthetic glycosides as acceptors in glycosyltransferase assays. *Glycoconjugate Journal* 5, 49-63.
- Palmer, A.G., 3rd (2004). NMR Characterization of the Dynamics of Biomacromolecules. *Chemical Review* 104.
- Palmer, A.G., 3rd, Kroenke, C.D., and Loria, J.P. (2001). Nuclear magnetic resonance methods for quantifying microsecond-to-millisecond motions in biological macromolecules. *Methods Enzymol* 339, 204-238.
- Parashar, U.D., and Monroe, S.S. (2001). "Norwalk-like viruses" as a cause of foodborne disease outbreaks. *Rev Med Virol* 11, 243-252.
- Parker, M.J., Aulton-Jones, M., Hounslow, A.M., and Craven, C.J. (2004). A combinatorial selective labeling method for the assignment of backbone amide NMR resonances. *J Am Chem Soc* 126, 5020-5021.
- Parra, F., and Prieto, M. (1990). Purification and characterization of a calicivirus as the causative agent of a lethal hemorrhagic disease in rabbits. *J Virol* 64, 4013-4015.
- Parrino, T.A., Schreiber, D.S., Trier, J.S., Kapikian, A.Z., and Blacklow, N.R. (1977). Clinical immunity in acute gastroenteritis caused by Norwalk agent. *N Engl J Med* 297, 86-89.
- Patel, M.M., Widdowson, M.A., Glass, R.I., Akazawa, K., Vinje, J., and Parashar, U.D. (2008). Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. *Emerg Infect Dis* 14, 1224-1231.
- Patenaude, S.I., Seto, N.O., Borisova, S.N., Szpacenko, A., Marcus, S.L., Palcic, M.M., and Evans, S.V. (2002). The structural basis for specificity in human ABO(H) blood group biosynthesis. *Nat Struct Biol* 9, 685-690.
- Paulson, J.C., and Colley, K.J. (1989). Glycosyltransferases. Structure, localization, and control of cell type-specific glycosylation. *J Biol Chem* 264, 17615-17618.
- Pedersen, L.C., Dong, J., Taniguchi, F., Kitagawa, H., Krahn, J.M., Pedersen, L.G., Sugahara, K., and Negishi, M. (2003). Crystal structure of an alpha 1,4-N-acetylhexosaminyltransferase (EXTL2), a member of the exostosin gene family involved in heparan sulfate biosynthesis. *J Biol Chem* 278, 14420-14428.
- Peng, J.W., and Wagner, G. (1992). Mapping of Spectral Density-Functions Using Heteronuclear Nmr Relaxation Measurements. *Journal of Magnetic Resonance* 98, 308-332.
- Persson, K., Ly, H.D., Dieckelmann, M., Wakarchuk, W.W., Withers, S.G., and Strynadka, N.C. (2001). Crystal structure of the retaining galactosyltransferase LgtC from *Neisseria meningitidis* in complex with donor and acceptor sugar analogs. *Nat Struct Biol* 8, 166-175.
- Pervushin, K. (2000). Impact of transverse relaxation optimized spectroscopy (TROSY) on NMR as a technique in structural biology. *Q Rev Biophys* 33, 161-197.

- Pervushin, K., Riek, R., Wider, G., and Wuthrich, K. (1997). Attenuated T2 relaxation by mutual cancellation of dipole-dipole coupling and chemical shift anisotropy indicates an avenue to NMR structures of very large biological macromolecules in solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 12366-12371.
- Pervushin, K.V., Wider, G., and Wuthrich, K. (1998). Single Transition-to-single Transition Polarization Transfer (ST2-PT) in [15N,1H]-TROSY. *J Biomol NMR* 12, 345-348.
- Peters, F., Maestre-Martinez, M., Leonov, A., Kovacic, L., Becker, S., Boelens, R., and Griesinger, C. (2011). Cys-Ph-TAHA: a lanthanide binding tag for RDC and PCS enhanced protein NMR. *J Biomol NMR* 51, 329-337.
- Pintacuda, G., Keniry, M.A., Huber, T., Park, A.Y., Dixon, N.E., and Otting, G. (2004). Fast structure-based assignment of 15N HSQC spectra of selectively 15N-labeled paramagnetic proteins. *J Am Chem Soc* 126, 2963-2970.
- Popovych, N., Sun, S., Ebright, R.H., and Kalodimos, C.G. (2006). Dynamically driven protein allostery. *Nat Struct Mol Biol* 13, 831-838.
- Prasad, B.V., Hardy, M.E., Dokland, T., Bella, J., Rossmann, M.G., and Estes, M.K. (1999). X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science* 286, 287-290.
- Prasad, B.V., Rothnagel, R., Jiang, X., and Estes, M.K. (1994). Three-dimensional structure of baculovirus-expressed Norwalk virus capsids. *J Virol* 68, 5117-5125.
- Rademacher, C., Landstrom, J., Sindhuwinata, N., Palcic, M.M., Widmalm, G., and Peters, T. (2010). NMR-based exploration of the acceptor binding site of human blood group B galactosyltransferase with molecular fragments. *Glycoconj J* 27, 349-358.
- Rosen, M.K., Gardner, K.H., Willis, R.C., Parris, W.E., Pawson, T., and Kay, L.E. (1996). Selective methyl group protonation of perdeuterated proteins. *J Mol Biol* 263, 627-636.
- Roth, J., Greenwell, P., and Watkins, W.M. (1988). Immunolocalization of blood group A gene specified alpha 1,3N-acetylgalactosaminyltransferase and blood group A substance in the trans-tubular network of the Golgi apparatus and mucus of intestinal goblet cells. *Eur J Cell Biol* 46, 105-112.
- Ruschak, A.M., and Kay, L.E. (2010). Methyl groups as probes of supra-molecular structure, dynamics and function. *J Biomol NMR* 46, 75-87.
- Sakakura, M., Oo-Puthinan, S., Moriyama, C., Kimura, T., Moriya, J., Irimura, T., and Shimada, I. (2008). Carbohydrate binding mechanism of the macrophage galactose-type C-type lectin 1 revealed by saturation transfer experiments. *J Biol Chem* 283, 33665-33673.
- Sattler, M. (2009). NMR of large proteins and complexes. In EMBO World Practical Course 2009, Rosario, Argentina.
- Sattler, M., Schleucher, J., and Griesinger, C. (1999). Heteronuclear multidimensional NMR experiments for the structure determination of proteins in solution

- employing pulsed field gradients. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 34, 93-158.
- Schuman, B., Evans, S.V., and Fyles, T.M. (2013). Geometric attributes of retaining glycosyltransferase enzymes favor an orthogonal mechanism. *PLoS One* 8, e71077.
- Scipioni, A., Mauroy, A., Vinje, J., and Thiry, E. (2008). Animal noroviruses. *Vet J* 178, 32-45.
- Seto, N.O., Compston, C.A., Evans, S.V., Bundle, D.R., Narang, S.A., and Palcic, M.M. (1999). Donor substrate specificity of recombinant human blood group A, B and hybrid A/B glycosyltransferases expressed in *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* 259, 770-775.
- Seto, N.O., Compston, C.A., Szpacenko, A., and Palcic, M.M. (2000). Enzymatic synthesis of blood group A and B trisaccharide analogues. *Carbohydr Res* 324, 161-169.
- Seto, N.O., Palcic, M.M., Compston, C.A., Li, H., Bundle, D.R., and Narang, S.A. (1997). Sequential interchange of four amino acids from blood group B to blood group A glycosyltransferase boosts catalytic activity and progressively modifies substrate recognition in human recombinant enzymes. *J Biol Chem* 272, 14133-14138.
- Seto, N.O., Palcic, M.M., Hindsgaul, O., Bundle, D.R., and Narang, S.A. (1995). Expression of a recombinant human glycosyltransferase from a synthetic gene and its utilization for synthesis of the human blood group B trisaccharide. *Eur J Biochem* 234, 323-328.
- Shealy, P., Liu, Y., Simin, M., and Valafar, H. (2011). Backbone resonance assignment and order tensor estimation using residual dipolar couplings. *J Biomol NMR* 50, 357-369.
- Shoemaker, G.K., Kitova, E.N., Palcic, M.M., and Klassen, J.S. (2007). Equivalency of binding sites in protein-ligand complexes revealed by time-resolved tandem mass spectrometry. *J Am Chem Soc* 129, 8674-8675.
- Shoemaker, G.K., Soya, N., Palcic, M.M., and Klassen, J.S. (2008). Temperature-dependent cooperativity in donor-acceptor substrate binding to the human blood group glycosyltransferases. *Glycobiology* 18, 587-592.
- Siebenga, J.J., Vennema, H., Renckens, B., de Bruin, E., van der Veer, B., Siezen, R.J., and Koopmans, M. (2007). Epochal evolution of GGII.4 norovirus capsid proteins from 1995 to 2006. *J Virol* 81, 9932-9941.
- Sindhuwinata, N. (2007). NMR-Studien zum Mechanismus der humanen Blutgruppe B Galactosyltransferase Masterarbeit, Institut für Chemie, Universität zu Lübeck.
- Sindhuwinata, N. (2012). Zum Katalysemechanismus der humanen Blutgruppe B Galactosyltransferase In Institut für Chemie (Universität zu Lübeck).
- Sindhuwinata, N., Grimm, L.L., Weissbach, S., Zinn, S., Munoz, E., Palcic, M.M., and Peters, T. (2013). Thermodynamic signature of substrates and substrate analogs binding to human blood group B galactosyltransferase from isothermal titration calorimetry experiments. *Biopolymers* 99, 784-795.

- Sindhuwinata, N., Munoz, E., Munoz, F.J., Palcic, M.M., Peters, H., and Peters, T. (2010). Binding of an acceptor substrate analog enhances the enzymatic activity of human blood group B galactosyltransferase. *Glycobiology* 20, 718-723.
- Sinnott, M.L. (1990). Catalytic Mechanisms of Enzymatic Glycosyl Transfer. *Chem Rev* 90, 1171-1202.
- Soya, N., Fang, Y., Palcic, M.M., and Klassen, J.S. (2010). Trapping and characterization of covalent intermediates of mutant retaining glycosyltransferases. *Glycobiology* 21, 547-552.
- Soya, N., Shoemaker, G.K., Palcic, M.M., and Klassen, J.S. (2009). Comparative study of substrate and product binding to the human ABO(H) blood group glycosyltransferases. *Glycobiology* 19, 1224-1234.
- Spiro, R.G. (1973). Glycoproteins. *Adv Protein Chem* 27, 349-467.
- Spiro, R.G. (2002). Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology* 12, 43R-56R.
- Tamminen, K., Huhti, L., Koho, T., Lappalainen, S., Hytonen, V.P., Vesikari, T., and Blazevic, V. (2012). A comparison of immunogenicity of norovirus GII-4 virus-like particles and P-particles. *Immunology* 135, 89-99.
- Tan, M., Hegde, R.S., and Jiang, X. (2004a). The P domain of norovirus capsid protein forms dimer and binds to histo-blood group antigen receptors. *J Virol* 78, 6233-6242.
- Tan, M., and Jiang, X. (2005). The p domain of norovirus capsid protein forms a subviral particle that binds to histo-blood group antigen receptors. *J Virol* 79, 14017-14030.
- Tan, M., Zhong, W., Song, D., Thornton, S., and Jiang, X. (2004b). E. coli-expressed recombinant norovirus capsid proteins maintain authentic antigenicity and receptor binding capability. *J Med Virol* 74, 641-649.
- Taylor, J.R. (1988). Fehleranalyse: Eine Einführung in die Untersuchung von Unsicherheiten in physikalischen Messungen. Weinheim, Wiley-VCH.
- Teunis, P.F., Moe, C.L., Liu, P., Miller, S.E., Lindesmith, L., Baric, R.S., Le Pendu, J., and Calderon, R.L. (2008). Norwalk virus: how infectious is it? *J Med Virol* 80, 1468-1476.
- Thiyagarajan, N., Pham, T.T., Stinson, B., Sundriyal, A., Tumbale, P., Lizotte-Waniewski, M., Brew, K., and Acharya, K.R. (2012). Structure of a metal-independent bacterial glycosyltransferase that catalyzes the synthesis of histo-blood group A antigen. *Sci Rep* 2, 940.
- Tugarinov, V., Hwang, P.M., Ollerenshaw, J.E., and Kay, L.E. (2003). Cross-correlated relaxation enhanced ^1H - ^{13}C NMR spectroscopy of methyl groups in very high molecular weight proteins and protein complexes. *J Am Chem Soc* 125, 10420-10428.
- Tugarinov, V., Kanelis, V., and Kay, L.E. (2006). Isotope labeling strategies for the study of high-molecular-weight proteins by solution NMR spectroscopy. *Nat Protoc* 1, 749-754.

- Tugarinov, V., and Kay, L.E. (2003). Ile, Leu, and Val methyl assignments of the 723-residue malate synthase G using a new labeling strategy and novel NMR methods. *J Am Chem Soc* 125, 13868-13878.
- Tugarinov, V., and Kay, L.E. (2004). An isotope labeling strategy for methyl TROSY spectroscopy. *J Biomol NMR* 28, 165-172.
- Tugarinov, V., Muhandiram, R., Ayed, A., and Kay, L.E. (2002). Four-dimensional NMR spectroscopy of a 723-residue protein: chemical shift assignments and secondary structure of malate synthase g. *J Am Chem Soc* 124, 10025-10035.
- Tuttle, L.M., Dyson, H.J., and Wright, P.E. (2014). Side chain conformational averaging in human dihydrofolate reductase. *Biochemistry* 53, 1134-1145.
- Tvaroska, I. (2004). Molecular modeling insights into the catalytic mechanism of the retaining galactosyltransferase LgtC. *Carbohydrate Research* 339, 1007-1014.
- Tzeng, S.R., and Kalodimos, C.G. (2009). Dynamic activation of an allosteric regulatory protein. *Nature* 462, 368-372.
- Unligil, U.M., and Rini, J.M. (2000). Glycosyltransferase structure and mechanism. *Curr Opin Struct Biol* 10, 510-517.
- Varki, A. (1993). Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* 3, 97-130.
- Varki, A., Cummings, R.D., Esko, J.D., Freeze, H.H., Stanley, P., Bertozzi, C.R., Hart, G.W., and Etzler, M.E. (2008). *Essentials of Glycobiology*, 2nd edition edn (CSH Press).
- Velyvis, A., Ruschak, A.M., and Kay, L.E. (2012). An economical method for production of (2)H, (13)CH₃-threonine for solution NMR studies of large protein complexes: application to the 670 kDa proteasome. *PLoS One* 7, e43725.
- Vlasie, M.D., Comuzzi, C., van den Nieuwendijk, A.M., Prudencio, M., Overhand, M., and Ubbink, M. (2007). Long-range-distance NMR effects in a protein labeled with a lanthanide-DOTA chelate. *Chemistry* 13, 1715-1723.
- von Decastello, A., and Sturli, A. (1902). Über die Isoagglutinine im Serum gesunder und kranker Menschen. *München Med Wochen* 49, 1090-1095.
- Vranken, W.F., Boucher, W., Stevens, T.J., Fogh, R.H., Pajon, A., Llinas, M., Ulrich, E.L., Markley, J.L., Ionides, J., and Laue, E.D. (2005). The CCPN data model for NMR spectroscopy: development of a software pipeline. *Proteins* 59, 687-696.
- Wagner, G., Bodenhausen, G., Muller, N., Rance, M., Sorensen, O.W., Ernst, R.R., and Wuthrich, K. (1985). Exchange of 2-Spin Order in Nuclear Magnetic-Resonance - Separation of Exchange and Cross-Relaxation Processes. *Journal of the American Chemical Society* 107, 6440-6446.
- Walton, L., Richards, C.A., and Elwell, L.P. (1989). Nucleotide sequence of the *Escherichia coli* uridine phosphorylase (udp) gene. *Nucleic Acids Res* 17, 6741.
- Watkins, M.W. (1999). A Half Century of Blood-Group Antigen Research Some Personal Recollections. *Trens Glycosci Glycotechnol* 11, 391-411.

- Watkins, W.M. (2001). The ABO blood group system: historical background. *Transfusion Medicine* 11, 243-265.
- Waugh, D.S. (1996). Genetic tools for selective labeling of proteins with alpha-15N-amino acids. *J Biomol NMR* 8, 184-192.
- Weadge, J.T., and Palcic, M.M. (2008). Chemistry of Glycosyltransferases. In *Wiley Encyclopedia of Chemical Biology* (John Wiley & Sons, Inc), pp. 198-211.
- Whitehead, J.S., Bella, A., Jr., and Kim, Y.S. (1974). An N-acetylgalactosaminyltransferase from human blood group A plasma. I. Purification and agarose binding properties. *J Biol Chem* 249, 442-447.
- Williamson, M.P. (2013). Using chemical shift perturbation to characterise ligand binding. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc* 73, 1-16.
- Winzor, D.J., and Jackson, C.M. (2006). Interpretation of the temperature dependence of equilibrium and rate constants. *J Mol Recognit* 19, 389-407.
- Xi, J.N., Graham, D.Y., Wang, K.N., and Estes, M.K. (1990). Norwalk virus genome cloning and characterization. *Science* 250, 1580-1583.
- Yagi, H., Loscha, K.V., Su, X.C., Stanton-Cook, M., Huber, T., and Otting, G. (2010). Tunable paramagnetic relaxation enhancements by [Gd(DPA)(3)] (3-) for protein structure analysis. *J Biomol NMR* 47, 143-153.
- Yamamoto, F., Clausen, H., White, T., Marken, J., and Hakomori, S. (1990). Molecular genetic basis of the histo-blood group ABO system. *Nature* 345, 229-233.
- Zechel, D.L., and Withers, S.G. (1999). Glycosidase Mechanisms: Anatomy of a Finely Tuned Catalyst. *Accounts of Chemical Research* 33, 11-18.
- Zheng, D.P., Ando, T., Fankhauser, R.L., Beard, R.S., Glass, R.I., and Monroe, S.S. (2006). Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology* 346, 312-323.
- Zhu, G., Xia, Y., Nicholson, L.K., and Sze, K.H. (2000). Protein dynamics measurements by TROSY-based NMR experiments. *J Magn Reson* 143, 423-426.

7 Anhang

7.1 Materialien

7.1.1 Chemikalien

Tabelle 7.1: Verwendete Chemikalien

Substanz	Hersteller
2-Keto-3-methyl-d ₃ -3-d ₁ -4- ¹³ C-butyrat	Euriso-top
2-Keto-4- ¹³ C-butyrat	CortecNet
2-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich
2-Mercaptoethanol-d ₆ (98 % D)	Euriso-Top
2-Propanol	Merck, Roth
4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulfonic acid (DSS)	Sigma Aldrich
Ammonium persulfat (APS)	Sigma Aldrich
Ammoniumchlorid (15NH ₄ Cl, 99 % 15N)	Cambridge Isotope Laboratories
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	ICN Biomedicals, Merck
Ammoniumpersulfat	Sigma Aldrich
Ampicillin Natriumsalz	Gerbu
Benzonase	Novagen
BME Vitaminlösung 100x	Sigma Aldrich
Bovines Serumalbumin, Fraktion V, pH7	Serva
Bradford-Reagenz Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad
Farbstoff-Konzentrat	
Bromphenolblau	Sigma
Calciumchlorid-Dihydrat (CaCl ₂ · 2H ₂ O)	Merck, Sigma Aldrich
Casaminosäuren, Caseinhydrolysat	Merck
Cholinchlorid	Fluka
Cobalamin	Sigma Aldrich
D-Biotin	Sigma Aldrich
Deuteriumoxid (D ₂ O) 99,85 % D	Euriso-Top, CortecNet
Deuteriumoxid 100 % (D ₂ O) 99,97 % D	Euriso-Top
D-Glucose	Merck
D-Glucose (1,2,3,4,5,6,6 D ₇)	Euriso-Top
D-Glucose (98 % u- ¹³ C ₆ , 1,2,3,4,5,6,6 D ₇)	Euriso-Top
di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na ₂ HPO ₄ · H ₂ O)	Merck

Dithiothreitol (DTT)	Gerbu
D-Pantothersäure Hemicalciumsalz	Sigma Aldrich
Eco E. coli OD 2 CDN	Silantes
Eco E. coli OD 2 D	Silantes
Eco E. coli OD 2 DN	Silantes
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat (Titrierkomplex III)	Roth
Ethanol, absolut	Roth
Ethanol, vergällt	Büfa Chemikalien
Folsäure	Sigma Aldrich
Gadoliniumchlorid (GdCl ₃)	Sigma Aldrich
Gd ³⁺ -Fucose	A. Mallagaray (Institut für Chemie)
Gel Code® Blue Stain Reagent	Pierce
Glycerin	Roth
Glycin	Merck, Sigma
Harnstoff	Gerbu
HDis-O-13C-Methyl	W. Hellebrandt (Institut für Chemie)
HDis-octyl	W. Hellebrandt (Institut für Chemie)
HDis-O-Methyl	W. Hellebrandt (Institut für Chemie)
Hefeextrakt	Roth, Serva
HRV3C Protease	Sigma Aldrich
Hühnerei Lysozym	Novagen
Imidazol	Fluka
Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranosid (IPTG)	Gerbu
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Sigma Aldrich, Fluka
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Roth
La ³⁺ -Fucose	A. Mallagaray (Institut für Chemie)
Lanthanchlorid (LaCl ₃)	Sigma Aldrich
L-Arginin (¹⁵ N)	CortecNet
Leucin-d ₁₀	CortecNet
Leupeptin	Roth
L-Fucose	Sigma Aldrich
L-Methionin (¹⁵ N)	Eurisio-Top
L-Methionin (methyl- ¹³ C)	Eurisio-Top
Magensiumchlorid-Hexahydrat (MgCl ₂ · 6H ₂ O)	Merck

Magnesiumsulfat-Heptahydrat (MgSO ₄ · 7H ₂ O)	Merck
Manganchlorid-Tetrahydrat (MnCl ₂ · 4H ₂ O)	Sigma Aldrich
Methanol	Merck
MOPS	Gerbu
myo-Inositol	Sigma Aldrich
Natriumazid (NaN ₃)	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Merck
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat (NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O)	Merk
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck
Nicotinamid	Sigma Aldrich
Ni-NTA agarose	Qiagen
Proteaseinhibitortabletten, cOmplete, EDTA-free	Roche
Proteinstandard Bovines Gammaglobulin	Pierce
Proteinstandard SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range	Bio-Rad
Pyridoxalhydrochlorid	Sigma Aldrich
Riboflavin	Sigma Aldrich
Rotiphorese® Gel 30 (Acrylamid:Bis-Acrylamid 37,5:1)	Roth
Salzsäure	Merck
Sodium dodecyl sulfat (SDS)	Serva, Sigma Aldrich
SP-Sepharose TM Fast Flow	GE Healthcare
Szinti Mix Aquasafe 800	Zinsser Analytik
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Sigma Aldrich
Thiaminhydrochlorid	Sigma Aldrich
Tris/HCl	Roth, Merck
TRIS-d11	Eurisio-Top
Trypton	Roth
TSP-d4 Natriumsalz (98 % D)	Aldrich
UDP Dinatriumsalz	Sigma Aldrich
UDP-[U- ¹⁴ C]-Gal	Amersham Biosciences
UDP-[U- ¹⁴ C]-GalNAc	ARC
UDP-GalNAc Dinatriumsalz	Sigma Aldrich
UDP-Hexanolamin-Sepharose	Prof. Dr. M. M. Palcic, Kopenhagen, Dänemark W. Hellebrandt (Institut für Chemie)
UDP- α -D-Gal Dinatriumsalz	Prof. Dr. B. Ernst, Basel, Schweiz

Uridin	Fluka
Vitamin B12 (Cyanocobalamin)	Sigma Aldrich

7.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 7.2: Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller
Dialysekassetten, Slide-A-Lyzer, 10 kDa	Thermo Scientific
Dialyseschlauch, SnakeSkin® Pleated, 10 kDa	Thermo Scientific, Pierce
Filtereinheit, Flow Bottle Top Filter, aPES Membran, 0,2 µm	Thermo Scientific
Filtereinheit, Steritop™-GP, 500 ml, 0,22 µm	Millipore
Kanülen, steril	B/Braun
Küvetten, Einmal-Viereck-	Sarstedt
Mikrotestplatten, 96 Vertiefungen, flach	Roth
NMR-Röhrchen, 3 mm für Bruker Match™ System	Hilgenberg
NMR-Röhrchen, 5 mm Whigemie für D2O, Bruker	Shigemi
pH-Universalindikatorpapier	Merck
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies
Reaktionsgefäße, 0.5 mL, 1.5 mL, 2 mL	Eppendorf
Reaktionsgefäße, steril, 15 mL, 50 mL	Sarstedt
Sep-Pak® Vac RC (100 mg) C18-Cartridges	Waters
Spritzen, steril	B/Braun, BD
Spritzenfilter, Millex®-GB, steril, PVDF, 0,22 µm	Millipore
Spritzenfilter, Rotilabo®, steril, CME, 0,22 µm	Carl Roth
Spritzenfilter, Rotilabo®, unsteril, CME, 0,8 µm	Carl Roth
Szintillationsflaschen mit Deckel, PE, 20 ml	PerkinElmer
Zentrifugen-Filtereinheit, Amicon® Ultra-4, 10 kDa	Millipore
Zentrifugen-Filtereinheit, Vivaspin 15R, 10 kDa	Satorius

7.1.3 Geräte

Tabelle 7.3: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
ÄKTA purifier 10: CU-950, Frac-950, Mixer M-925, Monitor UV-900, Monitor pH/C-900, Pump P-903, Valve INV-907, Valve PV-908	GE Healthcare
Autoklav Laboklav MSV 55	SHP Steriltechnik AG

Bradford-Reagenz Bio-Rad Protein Assay Farbstoff-Konzentrat	Bio-Rad
Elektroporator Gene Pulser II	Bio-Rad
Flüssigkeitsszintillationszähler Wallac 1409	Wallac
French Press Cell Disrupter: French-Pressure Cell Press, French Pressure Cell 40K, rapid Fill Kit	Thermo IEC
Gefriertrocknungsanlage Alpha 1-2 LD plus	Christ
Gefriertrocknungsanlage BETA A	Christ
Geltrockner Model 543	Bio-Rad
Glasfritte P3	
Glasfritte P4	
HiLoad 26/600 Superdex TM 75 pepgrade	GE Healthcare
Inkubator Innova 4330 Refridgerated Incubator Shaker	New Brunswick Scientific
Inkubator Orbital Shaker Model 420	Forma Scientific
MRX Microplate Reader	Dynex Technologies
NMR-Spektrometer Bruker Avance DRX-500/AVIII-500 mit TCI-Kryoprobenkopf (Lübeck), SampleXpress	Bruker
NMR-Spektrometer Bruker Avance II 600 mit TCI-Kryoprobenkopf (Frankfurt)	Bruker
NMR-Spektrometer Bruker Avance III 800 mit TCI-Kryoprobenkopf (Frankfurt)	Bruker
NMR-Spektrometer Bruker Avance III 950 mit TCI-Kryoprobenkopf (Frankfurt)	Bruker
NMR-Spektrometer Bruker Avance I 700 mit TXI-Kryoprobenkopf (Hamburg)	Bruker
Orbitalschüttler IKA KS 125 basic	IKA Labortechnik
pH-Meter pH 320	WTW
Pumpe Econo Pumpe	Bio-Rad
Reinstwassersystem RS 90-4/UF	SG Wasseraufbereitung und Regenerierstation GmbH
Säule XK 16/20 + Adapter	GE Healthcare
Säule XK 26/40 + Adapter	GE Healthcare
Säulen Econo-Column® + Flow Adaptor	Bio-Rad
SDS-PAGE-Zubehör Mini-PROTEAN® 3	Bio-Rad
Spannungsquelle Power Pac 300	Bio-Rad
Spektralphotometer MRX TC	Dynex Tehcnologies
Spektralphotometer NanoDrop ND-1000	peqlab
Spektralphotometer V550 UV/VIS	Jasco

Thermomixer 5436	Eppendorf
Thermomixer comfort	Eppendorf
Thermomixer Thermostat 5320	Eppendorf
Thermomixer Thermostat plus	Eppendorf
Vakuüm-Controlller B161	Büchi
Vakuümkammer BAKER spe-12G	J. T. Baker
Vakuümpumpe Duo 5	Pfeiffer Vakuüm
Waage KERN BA BC 200	Kern
Waage KERN PCB 1000-2	Kern
Waage Microwaage MC 210 S	Sartorius
Zentrifuge 5810	Eppendorf
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf
Zentrifuge Heraeus Pico 17	Thermo Scientific
Zentrifuge Minispin	Eppendorf
Zentrifuge Optima™ LE-80K	Beckmann Coulter
Zentrifuge Sorvall RC-5B Plus	Du Pont
Zentrifuge Universal 320 R	Hettich Zentrifugen

7.1.4 Aminosäure- und DNA-Sequenz

-10GTA - Basensequenz

ATGGCTATTGGCGAATTCATGGTTTTCCCTGCCGCGTATGGTTTTACCCGCAGCCGAAAGTTCT
 GACCCCATGCCGTAAAGACGTTCTGGTTGTTACCCCGTGGCTGGCTCCGATCGTTTTGGGAAGGC
 ACCTTCAACATCGATATCCTGAACGAACAGTTCGGTCTGCAAAACACCACCATCGGTCTGACCG
 TTTTCGCTATCAAAAAATACGTTGCTTTTCCCTGAAACTGTTCTTGAAACTGCTGAAAAACACTT
 CATGGTTGGTCACCGTGTTCACTACTACGTTTTTACCGACCAGCCGGCCGCGTTCCGCGTGTT
 ACCCTGGGCACCGGTCGTCAACTGTCCGTTCTGGAAGTGCGCGCCTACAAACGTTGGCAGGACG
 TTTCCATGCGTCGTATGGAATGATCAGCGACTTCTGCGAACGTCGTTTCTGTCCGAAGTTGA
 CTACCTGGTTTGCGTTGACGTTGACATGGAGTTCCGTGACCACGTTGGTGTTGAAATCCTGACC
 CCGCTGTTCCGTACCCTGCACCCGGGCTTCTACGGTTCCTCCCGTGAAGCATTCACCTACGAAC
 GTCGTCCGCAGTCCCAGGCCTACATCCCGAAAGACGAAGGTGACTTCTACTACCTGGGTGGTTT
 CTTCGGTGGTTCCGTTTCCGGAAGTTCAGCGTCTGACCCGTGCATGCCACCAGGCTATGATGGTT
 GACCAGGCGAACGGTATCGAAGCTGTTTGGCACGACGAATCCCACCTGAACAAATACCTGCTGC
 GTCACAAACCGACCAAAGTTCTGTCCCCGGAATACCTGTGGGACCAGCAACTGCTGGGTGGCC
 GGCTGTTCTGCGTAAACTGCGTTTTCACTGCAGTTCGAAAAACCACCAGGCTGTTTCGTAACCCG

-10GTA - Proteinsequenz

M A I G E F M V S L P R M V Y P Q P K V L T P C R K D V L V V
 T P W L A P I V W E G T F N I D I L N E Q F R L Q N T T I G L T V

F A I K K Y V A F L K L F L E T A E K H F M V G H R V H Y Y V F T
D Q P A A V P R V T L G T G R Q L S V L E V R A Y K R W Q D V S M
R R M E M I S D F C E R R F L S E V D Y L V C V D V D M E F R D H
V G V E I L T P L F G T L H P G F Y G S S R E A F T Y E R R P Q S
Q A Y I P K D E G D F Y Y L G G F F G G S V Q E V Q R L T R A C H
Q A M M V D Q A N G I E A V W H D E S H L N K Y L L R H K P T K V
L S P E Y L W D Q Q L L G W P A V L R K L R F T A V P K N H Q A V
R N P

-10GTB - Basensequenz

ATGGCTATTGGCGAATTCATGGTTTCCCTGCCGCGTATGGTTTACCCGCAGCCGAAAGTTCT
GACCCCATGCCGTAAAGACGTTCTGGTTGTTACCCCGTGGCTGGCTCCGATCGTTTGGGAAGGCACCTTCAACAT
CGATATCCTGAACGAACAGTTCGGTCTGCAAAACACCACCATCGGTCTGACCGTTTTCGCTATCAAAAAATACGTTGC
TTTCTGAAACTGTTCTGAAACTGCTGAAAAACTTTCATGGTTGGTCCACCGTGTCACTACTACGTTTTCACCGA
CCAGCCGGCCGCGGTTCCGCGTGTACCCTGGGCACCGGTCGTCAACTGTCCGTTCTGGAAGTGGGCGCTACAAACG
TTGGCAGGACGTTTCCATGCGTCGTATGGAAATGATCAGCGACTTCTGCGAACGTCGTTTCTGTCCGAAAGTTGACTA
CCTGGTTTGCCTGACGTTGACATGGAGTTCGGTACCACGTTGGTGTGAAATCCTGACCCCGCTGTTCGGTACCCT
GCACCCGAGCTTCTACGTTTCTCCCGTGAAGCATTCACCTACGAACGTCGTCCGAGTCCCAGGCCTACATCCCGAA
AGACGAAGGTGACTTCTACTACATGGGCGCCTTCTTCGGTGGTTCCGTTTCCGAAAGTTCAGCGTCTGACCCGTGCATG
CCACCAGGCTATGATGGTTGACCAGGCGAACGGTATCGAAGCTGTTTGGCACGACGAATCCACCTGAACAAATACCT
GCTGCGTCACAAACCGACCAAAGTCTGTCCCCGGAATACCTGTGGGACCAGCAACTGCTGGGTTGGCCGGCTGTTCT
GCGTAAACTGCGTTTCACTGCAGTTCGAAAAACCACCAGGCTGTTTCGTAACCCG

-10GTB - Proteinsequenz

M A I G E F M V S L P R M V Y P Q P K V L T P C R K D V L V V
T P W L A P I V W E G T F N I D I L N E Q F R L Q N T T I G L T V
F A I K K Y V A F L K L F L E T A E K H F M V G H R V H Y Y V F T
D Q P A A V P R V T L G T G R Q L S V L E V G A Y K R W Q D V S M
R R M E M I S D F C E R R F L S E V D Y L V C V D V D M E F R D H
V G V E I L T P L F G T L H P S F Y G S S R E A F T Y E R R P Q S
Q A Y I P K D E G D F Y Y M G A F F G G S V Q E V Q R L T R A C H
Q A M M V D Q A N G I E A V W H D E S H L N K Y L L R H K P T K V
L S P E Y L W D Q Q L L G W P A V L R K L R F T A V P K N H Q A V
R N P

P-Dimer-Konstrukt – Basensequenz

CCTGTGGCGCGCAGACTATTCGAGCTCGAACAACAACAATAACAATAACAACAACCTCG
GGATCGAGGGAAGGATCAGCGGCCACCACCACCACCACCACCACGACTACGACATCCCCTC
CTCCGAGAACCTGTACTTCCAGGGATCTGCTAGCTGGAGCCACCCGCGAGTTTCGAAAAAGCGGC
CACCACCACCACCACCACCACCACCACCACCACGACTACGACATCCCCTCCTCCCTGGAAGTTCTGTTCCAGG
GGCCCCGATCCAAACCGTTTACCGTTCCGATTCTGACCGTTGAAGAAATGACCAATAGCCGTTT

TCCGATTCGGCTGGAAAACTGTTTACCGGTCCGAGCGGTGCATTTGTTGTTTCAGCCGCAGAAT
GGTCGTTGTACCACCGATGGTGTCTGCTGGGCACCACCCAGCTGTCTCCGGTTAATATTTGTA
CCTTTCGCGGTGATGTTACCCATATTGCCGGTAGCCGTAATTATACCATGAATCTGGCCAGCCT
GAATTGGAATAATTATGACCCGACCGAAGAAATTCGGCACCGCTGGGTACACCGGATTTTGT
GGTAAAATTCAGGGTCTGCTGACCCAGACCACCAAAGGTGATGGTAGCACCCGTGGTCATAAAG
CAACCGTTTATACCGGTAGCGCACCGTTTACCCCGAAACTGGGTAGCGTTTCAGTTTAGCACCGA
TACCGAAAACGATTTTGAACCCATCAGAACACCAAATTTACACCGGTTGGTGTATTTCAGGAT
GGTTCTACCACCCATCGTAATGAACCGCAGCAGTGGGTTCTGCCGAGCTATAGCGGTCTGTAATG
TTCATAATGTGCATCTGGCACCGGCAGTTGCACCGACCTTTCGGGTGAACAGCTGCTGTTTTT
TCGTAGCACCATGCCCTGGTTGTAGCGGTTATCCGAATATGGATCTGGATTGTCTGCTGCCGAG
GAATGGGTTTCAGCATTTTTATCAGGAAGCAGCACCGGCACAGTCTGATGTTGCACTGCTGCGTT
TTGTTAATCCGGATACCGTCTGTTCTGTTTGAATGCAAACCTGCATAAAAGCGTTTATGTTAC
CGTTGCACATAACCGTCTGATGATCTGGTTATTCGGCCTAATGGCTATTTTCGTTTTGATAGC
TGGGTGAACCAGTTTTATACCTGGCACCGATG

P-Dimer-Konstrukt - Proteinsequenz

L W R A D Y S S S N N N N N N N N N N N L G I E G R I S G H H H
H H H H H D Y D I P S S E N L Y F Q G S A S W S H P Q F E K S G H
H H H H H H H D Y D I P S S L E V L F Q G P G S K P F T V P I L T
V E E M T N S R F P I P L E K L F T G P S G A F V V Q P Q N G R C
T T D G V L L G T T Q L S P V N I C T F R G D V T H I A G S R N Y
T M N L A S L N W N N Y D P T E E I P A P L G T P D F V G K I Q G
L L T Q T T K G D G S T R G H K A T V Y T G S A P F T P K L G S V
Q F S T D T E N D F E T H Q N T K F T P V G V I Q D G S T T H R N
E P Q Q W V L P S Y S G R N V H N V H L A P A V A P T F P G E Q L
L F F R S T M P G C S G Y P N M D L D C L L P Q E W V Q H F Y Q E
A A P A Q S D V A L L R F V N P D T G R V L F E C K L H K S G Y V
T V A H T G Q H D L V I P P N G Y F R F D S W V N Q F Y T L A P M

7.1.5 Primer

Tabelle 7.4: Verwendete Primer

Protein	Sequenzierungsprimer (<i>forward und reverse</i>)
GTA/GTB	5`- ACAGGATCCATCGATGCTTAGG - 3` 5`- CAGATCTGCTCATGTTTGACAGC - 3`
P-Dimer	5`- CTTCTGCGTTCGATTTAATCTG - 3` 5`- GGTCGTCAGACTGTCGATGAAGCC - 3`
Protein	Mutation Mutationsprimer (<i>forward und reverse</i>)
GTA	V184I 5`- CAAACGTTGGCAGGACATTTCCATGCGTTCG - 3` 5`- CGACGCATGGAAATGTCCTGCCAACGTTTG - 3`

GTA	V212A	5`- GGT TTGCG TTGACGCTGACATGGAGTTCCG - 3` 5`- CGGAACTCCATGTCAGCGTCAACGCAAACC - 3`
GTA	V351I	5`- GAAAAACCACCAGGCTATTCGTAACCCGTG - 3` 5`- CACGGGTTACGAATAGCCTGGTGGTTTTTC - 3`
GTB	M186A	5`- GGCAGGACGTTTCCGCGCGTCGTATGGAATGATC - 3` 5`- GATCATTTCCATACGACGCGGAAACGTCTGCC - 3`
GTB	M191A	5`- CATGCGTCGTATGGAAGCGATCAGCGACTTCTGCG - 3` 5`- CGCAGAAGTCGCTGATCGCTTCCATACGACGCATG - 3`
GTB	M288A	5`- CATGCCACCAGGCTGCGATGGTTGACCAGGCGAAC - 3` 5`- GTTCGCCTGGTCAACCATCGCAGCCTGGTGGCATG - 3`
GTB	M142A	5`- CTGCTGAAAAACACTTCGCGGTTGGTCACCGTGTTTC - 3` 5`- GAACACGGTGACCAACCGCGAAGTGTTTTTTCAGCAG - 3`
P-Dimer	I231V	5`- CGTTTACCGTGCCGGTTCTGACCGTGGAAG - 3` 5`- CTTCCACGGTCAGAACCGGCACGGTAAACG - 3`
P-Dimer	I330V	5`- GATTTTGTTGGTAAAGTTCAGGGTCTGCTG - 3` 5`- CAGCAGACCCTGAACTTTACCAACAAAATC - 3`
P-Dimer	I509V	5`- CAGCATGATCTGGTGGTTCCGCCGAATGGC - 3` 5`- GCCATTCGGCGGAACCACCAGATCATGCTG - 3`

7.2 NMR-Pulsprogramme

Dargestellt sind nur Pulsprogramme, welche nicht im Burker Standardkatalog zu finden sind.

b_trosytf3gpsi.tb

```

;modifiziert am 15. November 2012, T.Biet
;avance-version (10/02/12)
;best-TROSY
;2D H-1/X correlation via TROSY
; using sensitivity improvement
;phase sensitive using Echo/Antiecho gradient selection
;using f3 - channel
;uncompensated version d25=d26
;(use parameterset B_TROSYETF3GPSI)
;
;(E. Lescop, P. Schanda & B. Brutscher,
; J. Magn. Reson. 187 163-169 (2007))
;(T. Schulte-Herbrueggen & O.W. Sorensen, J. Magn. Reson. 144,
; 123 - 128 (2000))
;
;$CLASS=HighRes
;$DIM=2D
;$TYPE=
;$SUBTYPE=
;$COMMENT=

```

```

prosol relations=<triple>

#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>
define list<gradient> EA3 = { 1.0000 0.8750 }
define list<gradient> EA5 = { 0.6667 1.0000 }
define list<gradient> EA7 = { 1.0000 0.6595 }
"p22=p21*2"
"d11=30m"
"d25=2.7m"
"d26=2.7m"
"p29=300u"
"d0=3u"
"in0=inf1/2"
"DELTA1=d26-p29-d16-p41*cnst41-p42*cnst40"
"DELTA6=d25-p29-d16-larger(p22,p42)/2"
"DELTA7=d26-p16-d16-p42/2"
"DELTA8=p43*cnst44-de"
#   ifdef LABEL_CN
"DELTA=d0*2+p8+p21*4/3.1416"
#   else
"DELTA=d0*2+p21*4/3.1416"
#   endif /*LABEL_CN*/
"spoff13=bf2*(cnst26/1000000)-o2"
"spoff25=bf1*(cnst19/1000000)-o1"
"spoff26=bf1*(cnst19/1000000)-o1"
"spoff27=bf1*(cnst19/1000000)-o1"
"spoff28=bf1*(cnst19/1000000)-o1"
"spoff29=bf1*(cnst19/1000000)-o1"
"acqt0=0"
baseopt_echo
1 d11 ze
2 d11
3 d1 p11:f1
   50u UNBLKGRAD
   (p41:sp25 ph3)
   p29:gp1
   d16
   DELTA1
   (center (p42:sp26 ph2) (p22 ph1):f3 )
   DELTA1
   p29:gp1
   d16
   (p41:sp27 ph2):f1
   p16:gp2
   d16
   (p21 ph5):f3
   d0
#   ifdef LABEL_CN
   (p8:sp13 ph1):f2
#   else
#   endif /*LABEL_CN*/
   d0
   (p22 ph1):f3
   DELTA
   p16:gp3*EA3

```

```

d16

(p43:sp28 ph6)
p29:gp4
d16
DELTA6
(center (p42:sp26 ph2) (p22 ph2):f3 )
DELTA6
p29:gp4
d16
(p43:sp29 ph1)
p16:gp5*EA5
d16
(p21 ph1):f3
p16:gp6
d16
DELTA7 p10:f1
(center (p42:sp26 ph2) (p22 ph2):f3 )
DELTA7
p16:gp6
d16 p11:f1
(p21 ph7:r):f3
p16:gp7*EA7
d16
DELTA8
4u BLKGRAD
go=2 ph31
d11 mc #0 to 2
    F1EA(calgrad(EA3) & calgrad(EA5) & calgrad(EA7) & calph(ph6, +180) & calph(ph7,
+180), caldel(d0, +in0) & calph(ph5, +180) & calph(ph31, +180))
exit

ph1=0
ph2=1
ph3=2
ph4=3
ph5=0 2
ph6=1
ph7=1
ph31=0 2

;p10 : 0W
;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p13 : f3 channel - power level for pulse (default)
;sp13: f2 channel - shaped pulse 180 degree (Ca and C=O, adiabatic)
;sp25: f1 channel - shaped pulse 90 degree (Pc9_4_90.1000)
;sp26: f1 channel - shaped pulse 180 degree (Reburp.1000)
;sp27: f1 channel - shaped pulse 90 degree (Pc9_4_90.1000)
;
    for time reversed pulse
;sp28: f1 channel - shaped pulse 90 degree (Eburp2.1000)
;sp29: f1 channel - shaped pulse 90 degree (Eburp2tr.1000)
;
    for time reversed pulse
;p16: homospoil/gradient pulse [1 msec]
;p21: f3 channel - 90 degree high power pulse
;p22: f3 channel - 180 degree high power pulse
;p8 : f2 channel - 180 degree shaped pulse for inversion (adiabatic)
;p29: gradient pulse 3 [300 usec]
;p41: f1 channel - 90 degree shaped pulse for excitation

```

```

;                               Pc9_4_90.1000           (2.2ms)
;p42: f1 channel - 180 degree shaped pulse for refocussing
;                               Reburp.1000           (1.5ms)
;p43: f1 channel - 90 degree shaped pulse for excitation
;                               Eburp2.1000/Eburp2tr.1000 (1.4ms)
;d0 : incremented delay (F1)                               [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d11: delay for disk I/O                                   [30 msec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d25: 1/(4J'(NH))                                         [2.7 msec]
;d26: 1/(4J(NH))                                          [2.7 msec]
;cnst19: H(N) chemical shift (offset, in ppm)
;cnst26: Call chemical shift (offset, in ppm)             [101 ppm]
;cnst40: compensation of chemical shift evolution during p42
;                               Reburp.1000: 0.5
;                               compensate to the extend the other delays allow
;cnst41: compensation of chemical shift evolution during p41
;                               Pc9_4_90.1000: 0.529
;cnst44: compensation of chemical shift evolution during p43
;                               Eburp2.1000: 0.69
;in1: 1/SW(N) = 2 * DW(N)
;in0: 1/(2 * SW(N)) = DW(N)
;nd0: 2
;NS: 2 * n
;DS: >= 16
;td1: number of experiments in F1
;FnMODE: echo-antiecho in F1

;for z-only gradients:
;gpz1: 2%
;gpz2: 21%
;gpz3: -80%
;gpz4: 5%
;gpz5: 30%
;gpz6: 45%
;gpz7: 30.13%
;use gradient files:
;gpnam1: SMSQ10.32
;gpnam2: SMSQ10.100
;gpnam3: SMSQ10.100
;gpnam4: SMSQ10.32
;gpnam5: SMSQ10.100
;gpnam6: SMSQ10.100
;gpnam7: SMSQ10.100
;Processing
;PHC0 (F1): 45.0
;$Id: b_trosytf3gpsi,v 1.1.2.2 2010/07/23 13:17:44 ber Exp $

```

metr-hmqcph_new.tb

```

;avance-version (09/04/17)
;Methyl-TROSY HMQC with optional Water supression
;2D H-1/X correlation via heteronuclear zero and double quantum
; coherence
;phase sensitive
;with decoupling during acquisition
;

```

```
;V. Tugarinov, P.W. Hwang, J.E. Ollerenshaw & L.E. Kay,
;                               J. Magn. Reson. 125, 10420-10428 (2003)
;
;$CLASS=HighRes
;$DIM=2D
;$TYPE=
;$SUBTYPE=
;$COMMENT=

#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>

"p2=p1*2"
"d2=3.6m"
"d11=30m"
"d12=20u"
"d13=4u"
"d0=3u"
"in0=infl/2"
"DELTA1=d2-p19-d16-d13"

1 ze
2 d11 do:f2
3 4u
# ifdef WATER
  d11 fq=cnst20 (bf ppm) :f1
  d11 p19:f1
  d1 cw:f1 ph29
  d13 do:f1
  d13 p12:f2
# else
  d1 p12:f2
# endif
  p3:f2 ph0
  d13 UNBLKGRAD
# ifdef WATER
  4u
  p16:gp1
  d16 fq=0 :f1
# else
  4u
  p16:gp1
  d16
# endif
  d12 p11:f1
  p1 ph1
  d13
  p19:gp2
  d16
  DELTA1
  p3:f2 ph3
  d0
  p2 ph2
  d0
  p3:f2 ph4
  DELTA1
  p19:gp2
```

```

d16 p112:f2
d13 BLKGRAD
go=2 ph31 cpd2:f2
d11 do:f2 mc #0 to 2 F1PH(calph(ph3, +90) & calph(ph29, +90), caldel(d0, +in0))
exit

ph0=0
ph1=0
ph2=0
ph3=0 2
ph4=0 0 2 2
ph29=0
ph31=0 2 2 0

;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p12 : f2 channel - power level for pulse (default)
;p19 : f1 channel - power level for presaturation
;p112: f2 channel - power level for CPD/BB decoupling
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p3 : f2 channel - 90 degree high power pulse
;p16: homospoil/gradient pulse [1 msec]
;p19: gradient pulse 2 [500 usec]
;d0 : incremented delay (2D) [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d2 : 1/(2J)XH [3.6 ms]
;d11: delay for disk I/O [30 msec]
;d12: delay for power switching [20 usec]
;d13: short delay [4 usec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;cnst20: chemical shift of residual Water peak (in ppm) [4.7 ppm]
;inf1: 1/SW(X) = 2 * DW(X)
;in0: 1/(2 * SW(X)) = DW(X)
;nd0: 2
;NS: 4 * n
;DS: 16
;td1: number of experiments
;FnMODE: States-TPPI, TPPI, States or QSEQ
;cpd2: decoupling according to sequence defined by cpdprg2
;pcpd2: f2 channel - 90 degree pulse for decoupling sequence
;for z-only gradients:
;gpz1: 30%
;gpz2: 40%
;use gradient files:
;gpnam1: SMSQ10.100
;gpnam2: SMSQ10.100
;preprocessor-flags-start
;WATER: for optional Watersupression start experiment with
; option -DWATER (eda: ZGOPTNS)
;preprocessor-flags-end
;$Id: hmqcphpr,v 1.5 2009/07/02 16:40:44 ber Exp $

```

hmqcrexgpphpr_new.tb

```

;avance-version (09/04/17)
;HMQC
;2D H-1/X correlation via heteronuclear zero and double quantum

```

```
; coherence
;phase sensitive
;with decoupling during acquisition
;
;D.M. Korzhnev, K. Kloiber, V. Kanelis, V. Tugarinov & L.E. Kay,
; J. Magn. Reson. 126, 3964-3973 (2004)
;
;$CLASS=HighRes
;$DIM=2D
;$TYPE=
;$SUBTYPE=
;$COMMENT=

#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>

"p2=p1*2"
"d2=1s/(cnst2*2)"
"d11=30m"
"d12=20u"
"d13=4u"
"d0=3u"
"in0=infl/2"
"DELTA1=d2-p19-d16-d13"

1 ze
2 d11 do:f2
3 4u

# ifdef WATER
d11 fq=cnst20 (bf ppm) :f1
d11 p19:f1
d1 cw:f1 ph29
d13 do:f1
d13 p12:f2
# else
d1 p12:f2
# endif
"if (cnst9 == 0) \
{ \
DELTA3=1s; \
COUNTER=0; \
} \
else \
{ \
DELTA3=(1 / (cnst9*4) ) - p30/2000000; \
COUNTER=d21*cnst9*2; \
}"
p3:f2 ph0
d13 UNBLKGRAD
# ifdef WATER
4u
p16:gpl
d16 fq=0 :f1
# else
4u
p16:gpl
```

```

d16
# endif
d12 p11:f1
p1 ph1
d13
p19:gp2
d16
DELTA1
p3:f2 ph3
4u p123:f2
if "cnst9 == 0"
{
4u
}
else
{
4u
6 DELTA3
(p30 ph5):f2
DELTA3
lo to 6 times COUNTER
}
p2 ph6
if "cnst9 == 0"
{
4u
}
else
{
4u
7 DELTA3
(p30 ph5):f2
DELTA3
lo to 7 times COUNTER
}
d0
p2 ph2
d0 p12:f2
p3:f2 ph4
p2 ph1
DELTA1
p19:gp2
d16 p112:f2
d13 BLKGRAD
go=2 ph31 cpd2:f2
d11 do:f2 mc #0 to 2 F1PH(calph(ph4, -90) & calph(ph29, +90), caldel(d0, +in0))
exit

ph0=0
ph1=0
ph2=0
ph3=0 2
ph4=0
ph5=1
ph6=0 0 1 1 2 2 3 3
ph29=0
ph31=0 2 2 0

```

```

;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p12 : f2 channel - power level for pulse (default)
;p19 : f1 channel - power level for presaturation
;p112: f2 channel - power level for CPD/BB decoupling
;p123: f3 channel - power level for 13C CPMG pulse
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p3 : f2 channel - 90 degree high power pulse
;p30: f2 channel - 180 degree pulse at p123 (CPMG block) [60 usec]
;p16: homospoil/gradient pulse [1 msec]
;p19: gradient pulse 2 [500 usec]
;d0 : incremented delay (2D) [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d2 : 1/(2J)XH [3.6 ms]
;d11: delay for disk I/O [30 msec]
;d12: delay for power switching [20 usec]
;d13: short delay [4 usec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d21: length of mixing time per CPMG block [1/2 T] [10 - 20 ms]
;cnst2: = J(XH)
;cnst9: RF-field for CPMG block [Hz] [0 - 500]
;cnst20: chemical shift of residual Water peak (in ppm) [4.7 ppm]
;inf1: 1/SW(X) = 2 * DW(X)
;in0: 1/(2 * SW(X)) = DW(X)
;nd0: 2
;NS: 8 * n
;DS: 16
;td1: number of experiments
;FnMODE: States-TPPI
;cpd2: decoupling according to sequence defined by cpdprg2
;pcpd2: f2 channel - 90 degree pulse for decoupling sequence
;for z-only gradients:
;gpz1: 10%
;gpz2: 40%
;use gradient files:
;gpnam1: SMSQ10.100
;gpnam2: SMSQ10.100
;preprocessor-flags-start
;WATER: for optional Watersupression start experiment with
; option -DWATER (eda: ZGOPTNS)
;preprocessor-flags-end
;$Id: hmqcphpr,v 1.5 2009/07/02 16:40:44 ber Exp $

```

hmqcrexgpphpr_HH.2.tb

```

;avance-version (09/04/17)
;HMQC
;2D H-1/X correlation via heteronuclear zero and double quantum
; coherence
;phase sensitive
;with decoupling during acquisition
;
;D.M. Korzhnev, K. Kloiber, V. Kanelis, V. Tugarinov & L.E. Kay,
; J. Magn. Reson. 126, 3964-3973 (2004)
;
;$CLASS=HighRes
;$DIM=2D

```

```
;$TYPE=
;$SUBTYPE=
;$COMMENT=

#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>

"p2=p1*2"
"d2=1s/(cnst2*2)"
"d11=30m"
"d12=20u"
"d13=4u"
"d0=3u"
"in0=inf1/2"
"DELTA1=d2-p19-d16-d13"

1 ze
2 d11 do:f2
3 4u
# ifdef WATER
  d11 fq=cnst20 (bf ppm) :f1
  d11 p19:f1
  d1 cw:f1 ph29
  d13 do:f1
  d13 p12:f2
# else
  d1 p12:f2
# endif
if "cnst9 == 0"
  {
    "DELTA3=1s"
    "COUNTER=0"
  }
else
  {
    "DELTA3=(1 / (cnst9*4) ) - p30/2000000"
    "COUNTER=d21*cnst9*2+0.5"
  }
p3:f2 ph0
d13 UNBLKGRAD
# ifdef WATER
  p16:gp1
  d16 fq=0 :f1
# else
  p16:gp1
  d16
# endif
d12 p11:f1
p1 ph1
d13
p19:gp2
d16
DELTA1
p3:f2 ph3
4u p123:f2
if "cnst9 == 0"
  {
```

```

    4u
  }
else
  {
    4u
6  DELTA3
  (p30 ph5):f2
  DELTA3
  lo to 6 times COUNTER
  }

p2 ph6

if "cnst9 == 0"
  {
    4u
  }
else
  {
    4u
7  DELTA3
  (p30 ph5):f2
  DELTA3
  lo to 7 times COUNTER
  }

d0
p2 ph2
d0 p12:f2
p3:f2 ph4
p2 ph1
DELTA1
p19:gp2
d16 p112:f2
d13 BLKGRAD
go=2 ph31 cpd2:f2
d11 do:f2 mc #0 to 2 F1PH(ip4 & ip29, id0)
exit

ph0=0
ph1=0
ph2=0
ph3=0 2
ph4=0
ph5=1
ph6=0 0 1 1 2 2 3 3
ph29=0
ph31=0 2 2 0

;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p12 : f2 channel - power level for pulse (default)
;p19 : f1 channel - power level for presaturation
;p112: f2 channel - power level for CPD/BB decoupling
;p123: f3 channel - power level for 13C CPMG pulse
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p3 : f2 channel - 90 degree high power pulse
;p30: f2 channel - 180 degree pulse at p123 (CPMG block) [60 usec]
;p16: homospoil/gradient pulse [1 msec]

```

```

;p19: gradient pulse 2 [500 usec]
;d0 : incremented delay (2D) [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d2 : 1/(2J)XH [3.6 ms]
;d11: delay for disk I/O [30 msec]
;d12: delay for power switching [20 usec]
;d13: short delay [4 usec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d21: length of mixing time per CPMG block [1/2 T] [10 - 20 ms]
;cnst2: = J(XH)
;cnst9: RF-field for CPMG block [Hz] [0 - 500]
;cnst20: chemical shift of residual Water peak (in ppm) [4.7 ppm]
;inf1: 1/SW(X) = 2 * DW(X)
;in0: 1/(2 * SW(X)) = DW(X)
;nd0: 2
;NS: 8 * n
;DS: 16
;td1: number of experiments
;FnMODE: States-TPPI
;cpd2: decoupling according to sequence defined by cpdprg2
;pcpd2: f2 channel - 90 degree pulse for decoupling sequence
;for z-only gradients:
;gpz1: 10%
;gpz2: 40%
;use gradient files:
;gpnam1: SMSQ10.100
;gpnam2: SMSQ10.100
;preprocessor-flags-start
;WATER: for optional Watersupression start experiment with
; option -DWATER (eda: ZGOPTNS)
;preprocessor-flags-end
;$Id: hmqcphpr,v 1.5 2009/07/02 16:40:44 ber Exp $

```

stdiffesgp.3.tb

```

;avance-version (11/01/24)
;pseudo 2D sequence
; for saturation transfer difference
;with shaped pulse train for saturation on f2 channel
;alternating between on and off resonance
; to be defined by fq2list
;with spoil sequence to destroy unwanted magnetization
;water suppression using excitation sculpting with gradients
;with spinlock to suppress protein signals
;(use parameterset STDDIFFESGP.3)
;
;M. Mayer & B. Meyer, Angew. Chem. Int. Ed. 38, 1784-1788 (1999)
;M. Mayer & B. Meyer, Angew. Chem. 111, 1902-1906 (1999).
;T.-L. Hwang & A.J. Shaka, J. Magn. Reson.,
; Series A 112 275-279 (1995)
;
;$CLASS=HighRes
;$DIM=2D
;$TYPE=
;$SUBTYPE=
;$COMMENT=

#include <Avance.incl>

```

```

#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>

define list<frequency> stdlist=<${FQ2LIST}>

"p2=p1*2"
"d12=20u"
"d11=30m"
"p29=d29"
"p42=d42"
"l5=d20/p42"
"d31=p42*l5"
"DELTA1=d1-d31"
"TAU=de+p1*2/3.1416+50u"
"nbl=td1"
"acqt0=0"
baseopt_echo

1 ze
  3m stdlist:f2 st0
2 6m
3 6m
4 d11
  6m
5 50u UNBLKGRAD
  4u p110:f1
  (p17 ph2)
  (p17*2 ph3)
  4u
  p30:gp1
  10m p11:f1
  4u BLKGRAD
  DELTA1
6 (p42:sp9 ph4):f2
  4u
  lo to 6 times l5
  p1 ph1
  4u p129:f1
  (p29 ph5)

  50u UNBLKGRAD
  p16:gp2
  d16 p10:f1
  (p40:sp10 ph6:r):f1
  4u
  d12 p11:f1
  p2 ph7
  4u
  p16:gp2
  d16
  TAU
  p16:gp3
  d16 p10:f1
  (p40:sp10 ph8:r):f1
  4u
  d12 p11:f1
  p2 ph9
  p16:gp3

```

```

d16
4u BLKGRAD
goscnp ph31
3m stdlist.inc
3m stdlist:f2 st
1o to 3 times nbl
3m ipp1 ipp5 ipp6 ipp7 ipp8 ipp9 ipp31
3m stdlist.res
1o to 4 times ns
d11 wr #0
3m rppall
3m zd
1o to 5 times l4
exit

ph1=0 2
ph2=0
ph3=1
ph4=0
ph5=1 1 1 1 1 1 1 1 3 3 3 3 3 3 3
ph6=0 0 1 1
ph7=2 2 3 3
ph8=0 0 0 0 1 1 1 1
ph9=2 2 2 2 3 3 3 3
ph31=0 2 2 0 2 0 0 2

;p10 : 0W
;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p12 : f2 channel - power level for pulse (default) [120 dB]
;p110: f1 channel - power level for TOCSY-spinlock
;p129: f1 channel - power level for trim pulse
;sp9 : f2 channel - shaped pulse for saturation [40 - 60 dB]
;sp10: f1 channel - shaped pulse 180 degree
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p16: homospoil/gradient pulse
;p17: f1 channel - trim pulse [2.5 msec]
;p29: f1 channel - trim pulse
;p30: gradient pulse [3 msec]
;p40: f1 channel - 180 degree shaped pulse (Squa100.1000) [2 msec]
;p42: f2 channel - shaped pulse for saturation [50 msec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d11: delay for disk I/O [30 msec]
;d12: delay for power switching [20 usec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d20: saturation time
;d29: spinlock time [10 - 50 msec]
;d31: saturation time as executed
;d42: shaped pulse
;l4: 14 = number of averages = (total number of scans) / NS
;l5: loop for saturation: p42 * 15 = saturation time
;NS: 8 * n
;DS: 4
;td1: number of experiments
;NBL: NBL = number of irradiation frequencies

;define FQ2LIST (irradiation frequencies)
; (list has to be stored in "/u/exp/stan/nmr/lists/f1")

```

```

;use gradient ratio:    gp 1 : gp 2 : gp 3
;                        40 :   31 :   11
;for z-only gradients:
;gpz1: 40%
;gpz2: 31%
;gpz3: 11%
;use gradient files:
;gpnam1: SMSQ10.100
;gpnam2: SMSQ10.100
;gpnam3: SMSQ10.100
;this pulse program produces a ser-file (PARMOD = 2D)
;The STD experiment is protected by international patents owned by:
;Alepharma Licensing, Raamfeld 67, 22397 Hamburg, Germany.
;For commercial use (direct or indirect) please contact the company for
;licensing information at:
;E-mail: info@alepharma-licensing.com,
;Fax: +49 4060847812,
;Tel: +49 1701685158 or +49 1712788867.
;$Id: stddiffesgp.3,v 1.9.2.1 2011/01/24 15:49:24 ber Exp $

```

stdmetrhmqcph.tb

```

;avance-version (09/04/17)
;STD-Methyl-TROSY HMQC with optional Water supression
;2D H-1/X correlation via heteronuclear zero and double quantum
; coherence
;phase sensitive
;with decoupling during acquisition
;recording no saturation and saturation interleaved
;V. Tugarinov, P.W. Hwang, J.E. Ollerenshaw & L.E. Kay,
; J. Magn. Reson. 125, 10420-10428 (2003)
;
;$CLASS=HighRes
;$DIM=2D
;$TYPE=
;$SUBTYPE=
;$COMMENT=

#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>

"p2=p1*2"
"d2=1s/(cnst2*2)"
"d11=30m"
"d12=20u"
"d13=4u"
"l4=d20/p42"
"d31=p42*l4"
"d21=4u*l4"
"d0=3u"
"in0=infl/2"
"DELTA1=d2-p19-d16-d13"
"DELTA2=d1-d31-d21-4u"
"l0=1"

1 ze

```

```

2 d11 do:f2
3 4u p12:f2

if "10 %2 == 1"
{
d1
}
else
{
DELTA2 fq=cnst21 (bf ppm) :f1
4 (p42:sp9 ph6):f1
4u
lo to 4 times 14
4u
}

p3:f2 ph0
d13 UNBLKGRAD
# ifdef WATER
4u
p16:gp1
4u fq=cnst20 (bf ppm) :f1
d16 p10:f1
(p11:sp1 ph5:r):f1
# else
4u
p16:gp1
d16
# endif
4u fq=0 :f1
d12 p11:f1
p1 ph1
d13
p19:gp2
d16
DELTA1
p3:f2 ph3
d0
p2 ph2
d0
p3:f2 ph4
DELTA1
p19:gp2
d16 p112:f2
d13 BLKGRAD
go=2 ph31 cpd2:f2
d11 do:f2 mc #0 to 2
F1I(iu0, 2)
F1PH(calph(ph3, +90) & calph(ph29, +90), caldel(d0, +in0))

exit

ph0=0
ph1=0
ph2=0
ph3=0 2
ph4=0 0 2 2
ph5=2
ph6=0

```

```
ph29=0
ph31=0 2 2 0

;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p12 : f2 channel - power level for pulse (default)
;p19 : f1 channel - power level for presaturation
;p112: f2 channel - power level for CPD/BB decoupling
;sp1 : f1 channel - shaped pulse 90 degree
;sp9 : f2 channel - shaped pulse for saturation [40 - 60 dB]
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p3 : f2 channel - 90 degree high power pulse
;p11 : f1 channel - 90 degree shaped pulse (Squal100.1000) [1 msec]
;p16 : homospoil/gradient pulse [1 msec]
;p19 : gradient pulse 2 [500 usec]
;p42: f2 channel - shaped pulse for saturation [50 msec]
;d0 : incremented delay (2D) [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d2 : 1/(2J)XH [3.6 ms]
;d11: delay for disk I/O [30 msec]
;d12: delay for power switching [20 usec]
;d13: short delay [4 usec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d20: saturation time
;d31: saturation time as executed
;l4: loop for saturation: p42 * l4 = saturation time
;cnst2: = J(XH)
;cnst20: chemical shift of residual Water peak (in ppm) [4.7 ppm]
;cnst21: chemical shift for saturation (in ppm)
;inf1: 1/SW(X) = 2 * DW(X)
;in0: 1/(2 * SW(X)) = DW(X)
;nd0: 2
;NS: 4 * n
;DS: 16
;td1: total number of experiments
; = number of experiments for each 2D * 2
;FnMODE: States-TPPI, TPPI, States or QSEQ
;cpd2: decoupling according to sequence defined by cpdprg2
;pcpd2: f2 channel - 90 degree pulse for decoupling sequence
;for z-only gradients:
;gpz1: 30%
;gpz2: 40%
;use gradient files:
;gpnam1: SMSQ10.100
;gpnam2: SMSQ10.100
;preprocessor-flags-start
;WATER: for optional Watersupression start experiment with
; option -DWATER (eda: ZGOPTNS)
;preprocessor-flags-end
;$Id: hmqcphpr,v 1.5 2009/07/02 16:40:44 ber Exp $
```

7.3 NMR-Experimente

7.3.1 Zuordnungstabelle von [U-²H,¹³C,¹⁵N]-GTA

Tabelle 7.5: Chemische Verschiebung der Signale im ¹H,¹⁵N-BEST-TROSY-HSQC Spektrum von [U-²H,¹³C,¹⁵N]-GTA bei 800 MHz. Probe enthielt 500 μM GTA in NMR-Puffer I. Angegeben sind die Zuordnungen bzw. die Spinsysteme und die dazugehörige chemische Verschiebung.

Aminosäure/Spinsystem		¹ H ^N [ppm]	¹⁵ N ^H [ppm]	Aminosäure/Spinsystem		¹ H ^N [ppm]	¹⁵ N ^H [ppm]
59IleH	59IleN	8.585	120.447	{156}H[313]	{156}N[314]	9.712	113.071
60GlyH	60GlyN	8.702	114.023	{157}H[315]	{157}N[316]	7.028	113.015
61GluH	61GluN	8.362	121.812	{158}H[317]	{158}N[318]	6.877	110.787
157AlaH	157AlaN	8.468	117.218	{159}H[319]	{159}N[320]	7.539	110.849
158AlaH	158AlaN	7.976	119.309	{160}H[321]	{160}N[322]	6.646	111.741
159ValH	159ValN	7.020	120.715	{161}H[323]	{161}N[324]	8.744	124.766
161ArgH	161ArgN	8.431	121.412	{162}H[325]	{162}N[326]	8.327	120.051
162ValH	162ValN	7.629	122.767	{164}H[329]	{164}N[330]	7.427	113.657
163ThrH	163ThrN	8.631	122.063	{165}H[331]	{165}N[332]	8.916	122.234
164LeuH	164LeuN	8.525	128.089	{166}H[333]	{166}N[334]	6.881	111.902
165GlyH	165GlyN	8.669	107.878	{167}H[335]	{167}N[336]	7.560	120.530
166ThrH	166ThrN	8.296	115.022	{168}H[337]	{168}N[338]	8.141	120.611
167GlyH	167GlyN	9.165	115.068	{169}H[339]	{169}N[340]	7.935	121.499
168ArgH	168ArgN	7.606	118.996	{170}H[341]	{170}N[342]	8.348	122.954
169GlnH	169GlnN	8.454	119.459	{171}H[343]	{171}N[344]	10.061	126.627
170LeuH	170LeuN	8.701	123.663	{172}H[345]	{172}N[346]	10.252	129.757
239SerH	239SerN	7.731	116.770	{173}H[347]	{173}N[348]	6.661	110.671
240SerH	240SerN	8.719	118.668	{174}H[349]	{174}N[350]	6.878	112.976
{1}H[1]	{1}N[2]	8.360	119.523	{175}H[351]	{175}N[352]	6.865	122.035
{2}H[3]	{2}N[4]	8.161	119.593	{176}H[353]	{176}N[354]	8.401	124.940
{4}H[7]	{4}N[8]	7.431	121.958	{177}H[355]	{177}N[356]	7.824	123.455
{5}H[9]	{5}N[10]	8.084	118.951	{178}H[357]	{178}N[358]	8.467	111.856
{6}H[11]	{6}N[12]	9.071	133.275	{179}H[359]	{179}N[360]	9.160	121.970
{7}H[13]	{7}N[14]	7.984	119.841	{180}H[361]	{180}N[362]	8.712	114.855
{8}H[15]	{8}N[16]	8.532	118.328	{181}H[363]	{181}N[364]	9.288	123.500
{9}H[17]	{9}N[18]	8.040	125.140	{182}H[365]	{182}N[366]	8.381	116.854
{10}H[19]	{10}N[20]	6.991	112.982	{183}H[367]	{183}N[368]	7.825	119.771
{11}H[21]	{11}N[22]	8.056	117.316	{184}H[369]	{184}N[370]	9.140	115.992
{12}H[23]	{12}N[24]	8.011	124.266	{185}H[371]	{185}N[372]	7.656	120.599
{13}H[25]	{13}N[26]	7.832	113.190	{186}H[373]	{186}N[374]	8.603	118.234
{14}H[27]	{14}N[28]	7.135	117.259	{187}H[375]	{187}N[376]	7.720	112.177
{15}H[29]	{15}N[30]	7.388	117.242	{188}H[377]	{188}N[378]	7.815	119.259
{16}H[31]	{16}N[32]	8.232	124.409	{189}H[379]	{189}N[380]	9.299	125.488
{17}H[33]	{17}N[34]	6.601	113.345	{190}H[381]	{190}N[382]	7.704	109.844
{18}H[35]	{18}N[36]	7.946	115.078	{191}H[383]	{191}N[384]	8.082	120.229

{19}H[37]	{19}N[38]	7.363	111.998	{192}H[385]	{192}N[386]	8.022	119.763
{20}H[39]	{20}N[40]	8.497	124.892	{193}H[387]	{193}N[388]	8.291	124.862
{21}H[41]	{21}N[42]	8.021	111.565	{194}H[389]	{194}N[390]	8.138	115.597
{22}H[43]	{22}N[44]	8.192	115.113	{195}H[391]	{195}N[392]	6.801	110.811
{23}H[45]	{23}N[46]	7.991	131.202	{196}H[393]	{196}N[394]	7.994	111.516
{24}H[47]	{24}N[48]	7.863	104.513	{197}H[395]	{197}N[396]	8.276	117.959
{25}H[49]	{25}N[50]	7.062	109.803	{198}H[397]	{198}N[398]	8.014	123.647
{26}H[51]	{26}N[52]	8.849	134.557	{199}H[399]	{199}N[400]	7.111	118.213
{27}H[53]	{27}N[54]	8.059	126.176	{201}H[403]	{201}N[404]	7.756	123.974
{28}H[55]	{28}N[56]	7.141	113.054	{202}H[405]	{202}N[406]	7.626	114.339
{29}H[57]	{29}N[58]	6.910	114.038	{203}H[407]	{203}N[408]	7.752	113.054
{30}H[59]	{30}N[60]	8.535	114.819	{204}H[409]	{204}N[410]	6.848	115.980
{31}H[61]	{31}N[62]	8.523	126.619	{205}H[411]	{205}N[412]	7.301	117.615
{32}H[63]	{32}N[64]	7.421	110.443	{206}H[413]	{206}N[414]	8.445	124.908
{33}H[65]	{33}N[66]	7.672	118.365	{207}H[415]	{207}N[416]	8.505	123.099
{34}H[67]	{34}N[68]	7.398	114.456	{208}H[417]	{208}N[418]	8.122	114.623
{35}H[69]	{35}N[70]	9.560	121.664	{209}H[419]	{209}N[420]	7.562	117.596
{36}H[71]	{36}N[72]	6.897	113.320	{210}H[421]	{210}N[422]	7.978	125.726
{36}H[91]	{36}N[72]	7.595	113.319	{211}H[423]	{211}N[424]	8.740	122.926
{37}H[73]	{37}N[74]	9.882	128.335	{212}H[425]	{212}N[426]	7.874	120.805
{38}H[75]	{38}N[76]	8.480	115.749	{213}H[427]	{213}N[428]	8.282	125.870
{39}H[77]	{39}N[78]	7.524	111.904	{214}H[429]	{214}N[430]	7.915	104.123
{40}H[79]	{40}N[80]	9.452	119.176	{215}H[431]	{215}N[432]	7.099	113.218
{41}H[81]	{41}N[82]	9.951	124.202	{216}H[433]	{216}N[434]	8.766	108.151
{42}H[83]	{42}N[84]	7.743	117.519	{217}H[435]	{217}N[436]	8.984	124.858
{44}H[87]	{44}N[88]	7.589	109.730	{218}H[437]	{218}N[438]	8.956	123.735
{45}H[89]	{45}N[90]	8.209	115.910	{219}H[439]	{219}N[440]	7.437	114.447
{46}H[92]	{46}N[93]	8.302	116.942	{220}H[441]	{220}N[442]	9.579	121.207
{47}H[94]	{47}N[95]	9.324	121.639	{221}H[443]	{221}N[444]	8.430	115.176
{48}H[96]	{48}N[97]	7.025	114.038	{222}H[445]	{222}N[446]	7.565	111.595
{49}H[98]	{49}N[99]	10.003	114.880	{223}H[447]	{223}N[448]	9.403	119.963
{50}H[100]	{50}N[101]	7.641	111.990	{224}H[449]	{224}N[450]	8.082	116.687
{51}H[102]	{51}N[103]	7.590	118.001	{225}H[451]	{225}N[452]	6.703	121.452
{52}H[104]	{52}N[105]	6.880	120.989	{226}H[453]	{226}N[454]	7.707	111.193
{53}H[106]	{53}N[107]	6.808	110.514	{227}H[455]	{227}N[456]	8.598	115.588
{54}H[108]	{54}N[109]	8.715	119.020	{228}H[457]	{228}N[458]	7.640	112.963
{56}H[112]	{56}N[113]	8.483	117.043	{229}H[459]	{229}N[460]	7.768	114.038
{57}H[114]	{57}N[115]	6.844	113.444	{230}H[461]	{230}N[462]	8.013	116.260
{58}H[116]	{58}N[117]	8.023	109.295	{231}H[463]	{231}N[464]	6.808	109.887
{59}H[118]	{59}N[119]	8.457	121.394	{232}H[465]	{232}N[466]	10.493	109.451
{60}H[120]	{60}N[121]	7.672	115.253	{233}H[467]	{233}N[468]	7.805	115.449
{61}H[122]	{61}N[123]	9.029	135.538	{234}H[469]	{234}N[470]	7.908	129.192
{62}H[124]	{62}N[125]	9.446	117.083	{235}H[471]	{235}N[472]	9.278	123.007
{63}H[126]	{63}N[127]	8.281	119.725	{236}H[473]	{236}N[474]	8.314	124.306
{64}H[128]	{64}N[129]	7.026	114.715	{238}H[477]	{238}N[478]	7.964	114.714

{65}H[130]	{65}N[131]	7.617	116.092	{239}H[479]	{239}N[480]	7.477	112.005
{66}H[132]	{66}N[133]	7.032	111.967	{240}H[481]	{240}N[482]	8.163	109.836
{67}H[134]	{67}N[135]	7.824	121.840	{241}H[483]	{241}N[484]	8.916	115.763
{68}H[136]	{68}N[137]	8.060	115.106	{242}H[485]	{242}N[486]	8.277	117.393
{69}H[138]	{69}N[139]	9.508	130.517	{243}H[487]	{243}N[488]	6.716	110.696
{70}H[140]	{70}N[141]	7.072	122.787	{244}H[489]	{244}N[490]	8.659	121.179
{72}H[144]	{72}N[145]	6.790	111.967	{245}H[491]	{245}N[492]	7.885	113.956
{73}H[146]	{73}N[147]	7.362	117.658	{246}H[493]	{246}N[494]	7.617	115.588
{74}H[148]	{74}N[149]	7.300	110.736	{247}H[495]	{247}N[496]	6.976	112.041
{75}H[150]	{75}N[151]	6.764	121.452	{248}H[497]	{248}N[498]	8.580	121.261
{76}H[152]	{76}N[153]	6.903	112.268	{249}H[499]	{249}N[500]	8.511	115.116
{77}H[154]	{77}N[155]	9.019	128.316	{250}H[501]	{250}N[502]	8.348	126.653
{78}H[156]	{78}N[157]	8.594	113.246	{251}H[503]	{251}N[504]	7.691	123.767
{79}H[158]	{79}N[159]	9.174	124.632	{252}H[505]	{252}N[506]	8.828	119.755
{80}H[160]	{80}N[161]	8.432	120.538	{253}H[507]	{253}N[508]	7.496	120.595
{82}H[164]	{82}N[165]	9.414	123.028	{254}H[509]	{254}N[510]	8.422	127.974
{84}H[168]	{84}N[169]	8.446	122.588	{255}H[511]	{255}N[512]	6.824	112.000
{85}H[170]	{85}N[171]	8.094	121.691	{257}H[515]	{257}N[516]	10.292	126.990
{86}H[172]	{86}N[173]	8.383	114.109	{259}H[519]	{259}N[520]	9.363	129.272
{87}H[174]	{87}N[175]	7.217	112.315	{260}H[521]	{260}N[522]	6.712	111.775
{88}H[176]	{88}N[177]	7.356	119.240	{261}H[523]	{261}N[524]	8.961	123.158
{89}H[178]	{89}N[179]	9.048	123.958	{262}H[525]	{262}N[526]	6.569	118.863
{90}H[180]	{90}N[181]	6.830	110.935	{263}H[527]	{263}N[528]	7.368	110.948
{91}H[182]	{91}N[183]	8.155	117.896	{264}H[529]	{264}N[530]	8.599	114.833
{92}H[184]	{92}N[185]	7.925	119.311	{265}H[531]	{265}N[532]	6.806	122.378
{93}H[186]	{93}N[187]	8.953	115.537	{266}H[533]	{266}N[534]	8.251	121.358
{94}H[188]	{94}N[189]	7.750	120.730	{267}H[535]	{267}N[536]	9.431	123.754
{95}H[190]	{95}N[191]	8.381	117.912	{268}H[537]	{268}N[538]	8.200	120.225
{96}H[192]	{96}N[193]	7.765	119.363	{270}H[541]	{270}N[542]	7.954	106.543
{97}H[194]	{97}N[195]	8.921	122.566	{271}H[543]	{271}N[544]	8.953	124.779
{98}H[196]	{98}N[197]	6.780	113.098	{272}H[545]	{272}N[546]	8.309	120.464
{99}H[198]	{99}N[199]	8.111	119.499	{273}H[547]	{273}N[548]	7.677	109.827
{100}H[201]	{100}N[202]	6.912	112.960	{274}H[549]	{274}N[550]	8.370	124.670
{101}H[203]	{101}N[204]	8.198	109.954	{275}H[551]	{275}N[552]	7.841	123.647
{102}H[205]	{102}N[206]	7.520	112.975	{276}H[553]	{276}N[554]	7.778	118.449
{103}H[207]	{103}N[208]	7.384	122.200	{277}H[555]	{277}N[556]	8.168	121.779
{104}H[209]	{104}N[210]	7.923	112.285	{278}H[557]	{278}N[558]	7.683	119.502
{106}H[213]	{106}N[214]	8.444	118.589	{279}H[559]	{279}N[560]	7.909	124.000
{107}H[215]	{107}N[216]	6.808	114.443	{280}H[561]	{280}N[562]	6.701	115.087
{108}H[217]	{108}N[218]	8.066	124.447	{281}H[563]	{281}N[564]	7.866	120.106
{109}H[219]	{109}N[220]	7.298	111.696	{283}H[567]	{283}N[568]	7.331	134.077
{110}H[221]	{110}N[222]	7.653	114.038	{284}H[569]	{284}N[570]	7.468	132.992
{111}H[223]	{111}N[224]	7.039	116.600	{285}H[571]	{285}N[572]	7.119	133.817
{112}H[225]	{112}N[226]	7.661	123.003	{286}H[573]	{286}N[574]	7.354	134.822
{113}H[227]	{113}N[228]	8.332	125.162	{287}H[575]	{287}N[576]	6.938	133.947

{114}H[229]	{114}N[230]	6.613	112.809	{288}H[577]	{288}N[578]	7.682	133.527
{115}H[231]	{115}N[232]	9.703	116.640	{289}H[579]	{289}N[580]	7.139	134.637
{116}H[233]	{116}N[234]	8.578	124.861	{290}H[581]	{290}N[582]	7.185	133.755
{117}H[235]	{117}N[236]	8.600	115.134	{291}H[583]	{291}N[584]	6.700	132.967
{118}H[237]	{118}N[238]	8.796	125.328	{292}H[585]	{292}N[586]	7.781	133.338
{119}H[239]	{119}N[240]	7.818	104.498	{293}H[587]	{293}N[588]	7.493	133.995
{120}H[241]	{120}N[242]	7.594	119.605	{296}H[591]	{296}N[592]	8.639	122.793
{121}H[243]	{121}N[244]	7.698	110.850	{297}H[593]	{297}N[594]	8.391	125.464
{122}H[245]	{122}N[246]	8.294	115.421	{298}H[595]	{298}N[596]	7.814	122.152
{123}H[247]	{123}N[248]	8.188	122.500	{299}H[597]	{299}N[598]	8.248	121.883
{124}H[249]	{124}N[250]	7.177	112.414	{300}H[599]	{300}N[600]	8.677	120.558
{125}H[251]	{125}N[252]	7.424	118.319	{316}H[631]	{316}N[632]	6.959	113.455
{126}H[253]	{126}N[254]	9.357	121.591	{317}H[633]	{317}N[634]	6.968	112.617
{128}H[257]	{128}N[258]	7.906	117.295	{318}H[635]	{318}N[636]	6.847	112.327
{129}H[259]	{129}N[260]	8.025	110.621	{319}H[637]	{319}N[638]	6.970	113.819
{130}H[261]	{130}N[262]	8.587	116.155	{320}H[639]	{320}N[640]	6.910	114.610
{131}H[263]	{131}N[264]	9.204	122.056	{321}H[641]	{321}N[642]	7.633	121.474
{132}H[265]	{132}N[266]	7.456	115.791	{332}H[663]	{332}N[664]	9.476	117.210
{133}H[267]	{133}N[268]	7.534	110.226	{333}H[665]	{333}N[666]	8.315	117.957
{134}H[269]	{134}N[270]	8.031	118.960	{335}H[669]	{335}N[670]	8.202	121.473
{135}H[271]	{135}N[272]	10.513	109.723	{337}H[673]	{337}N[674]	8.477	119.396
{136}H[273]	{136}N[274]	8.297	120.975	{338}H[675]	{338}N[676]	7.592	123.694
{137}H[275]	{137}N[276]	7.715	113.212	{339}H[677]	{339}N[678]	8.281	125.327
{138}H[277]	{138}N[278]	8.160	118.682	{340}H[679]	{340}N[680]	6.934	111.989
{139}H[279]	{139}N[280]	7.785	116.645	{341}H[681]	{341}N[682]	6.986	112.091
{140}H[281]	{140}N[282]	7.600	112.271	{342}H[683]	{342}N[684]	6.878	111.594
{141}H[283]	{141}N[284]	8.654	116.526	{343}H[685]	{343}N[686]	6.891	113.078
{142}H[285]	{142}N[286]	9.128	125.146	{344}H[687]	{344}N[688]	8.162	120.648
{143}H[287]	{143}N[288]	8.526	113.043	{345}H[689]	{345}N[690]	8.104	119.438
{144}H[289]	{144}N[290]	7.813	113.750	{348}H[695]	{348}N[696]	8.183	120.179
{145}H[291]	{145}N[292]	6.815	109.417	{368}H[735]	{368}N[736]	8.076	125.245
{146}H[293]	{146}N[294]	9.079	128.506	{374}H[747]	{374}N[748]	8.028	123.227
{148}H[297]	{148}N[298]	8.024	108.761	{378}H[755]	{378}N[756]	8.216	120.962
{149}H[299]	{149}N[300]	8.566	121.018	{379}H[757]	{379}N[758]	8.035	120.145
{150}H[301]	{150}N[302]	7.411	111.722	{380}H[759]	{380}N[760]	7.997	120.441
{151}H[303]	{151}N[304]	7.575	115.022	{393}H[785]	{393}N[786]	8.574	124.810
{153}H[307]	{153}N[308]	8.005	114.064	{405}H[809]	{405}N[810]	8.394	123.791
{154}H[309]	{154}N[310]	7.371	111.703	{423}H[845]	{423}N[846]	7.564	112.587
{155}H[311]	{155}N[312]	7.321	109.465	{436}H[1159]	{436}N[1160]	7.003	113.212

7.3.2 $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -methyl-TROSY-Spektren von Met-GTB während UDP- und HDis-Titration

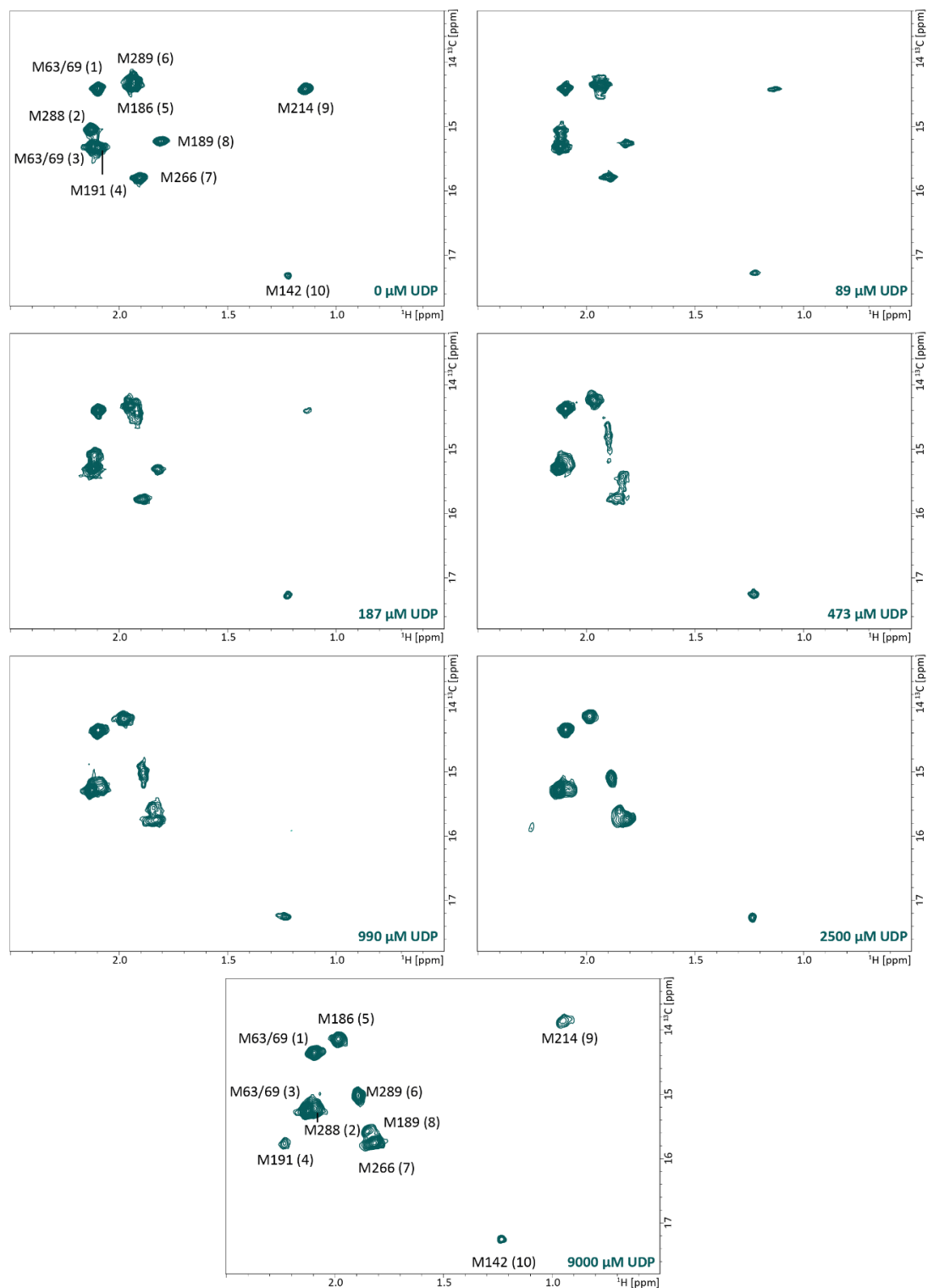


Abbildung 7.1: UDP-Titration von Met-GTB. Eine 220 μM Met-GTB (1)-Probe in NMR-Puffer III wurde schrittweise mit UDP versetzt. Die $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -methyl-TROSY-Spektren zeigen die schrittweise Änderung der chemischen Verschiebung induziert durch UDP-Bindung. Die jeweiligen UDP-Konzentrationen sind in den einzelnen Spektren angegeben.

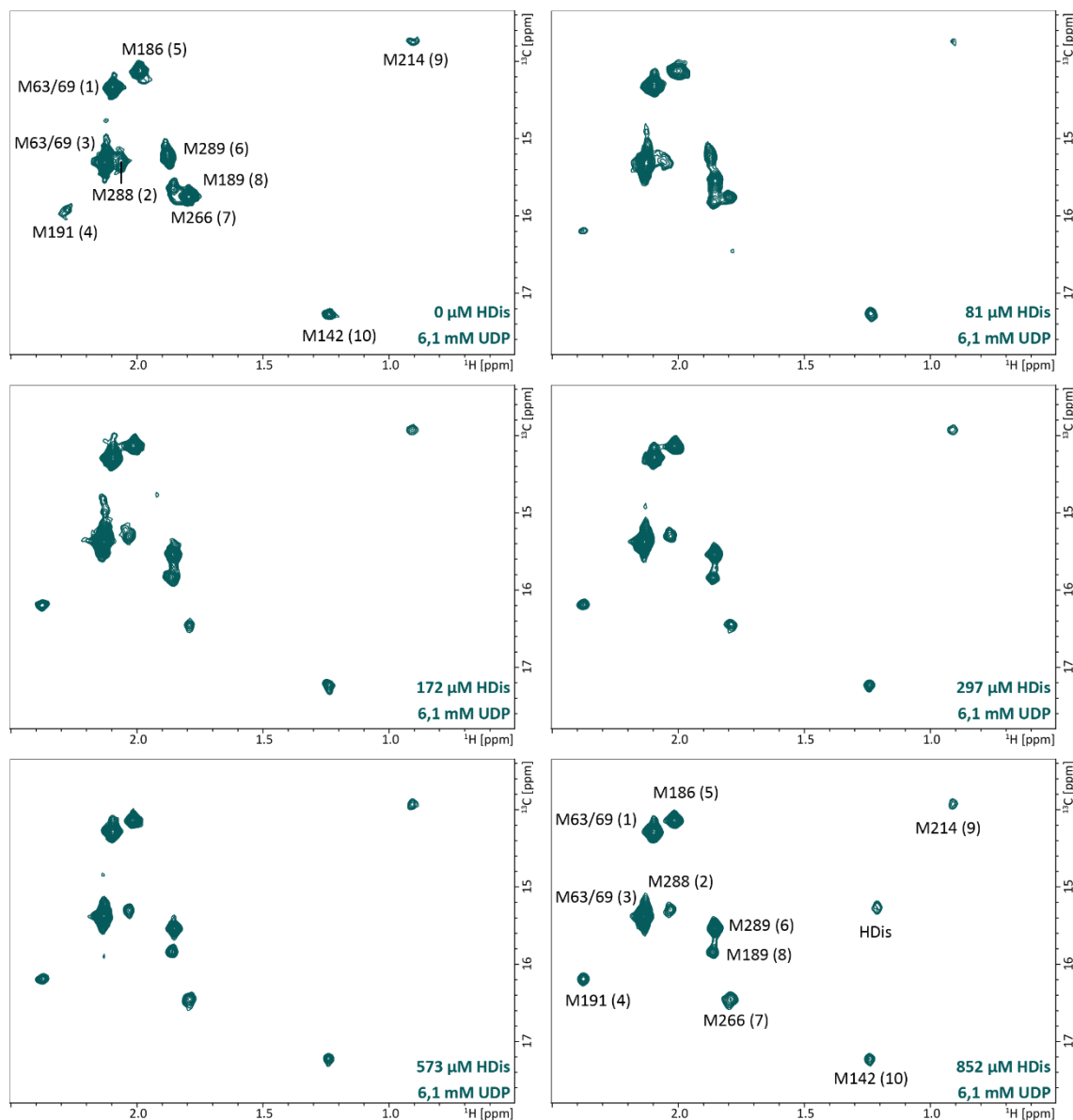


Abbildung 7.2: HDIs-Titration von UDP-gesättigter Met-GTB. Eine 290 μM Met-GTB (3)-Probe mit 6,1 mM UDP in NMR-Puffer III wurde schrittweise mit HDIs-O-Methyl versetzt. Die ^1H , ^{13}C -methyl-TROSY-Spektren zeigen die schrittweise Änderung der chemischen Verschiebung induziert durch HDIs-Bindung. Die jeweiligen HDIs-O-Methyl-Konzentrationen sind in den einzelnen Spektren angegeben.

7.3.3 Spektren der Met-GTB Mutanten

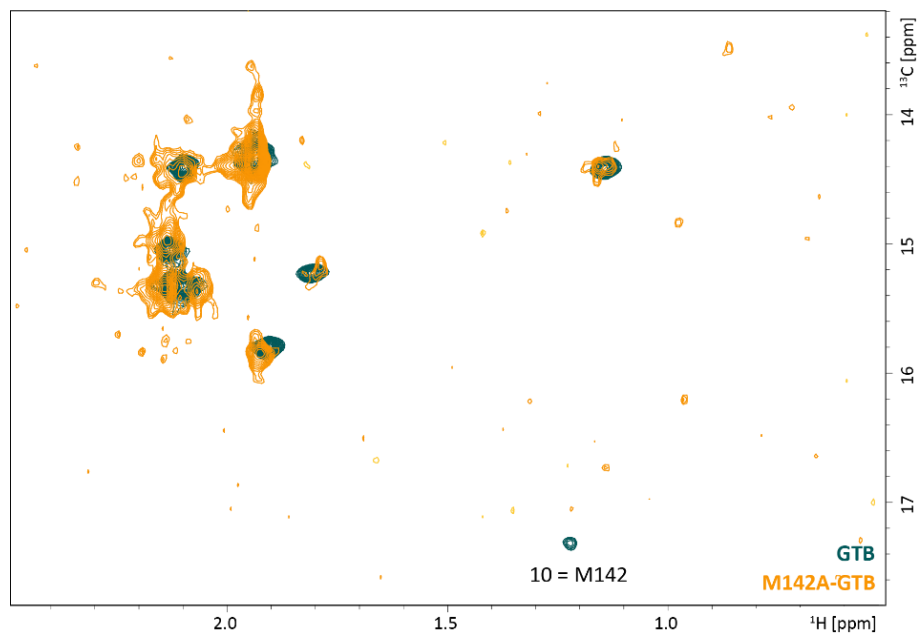


Abbildung 7.3: Überlagerung von $^1\text{H},^{13}\text{C}$ methyl-TROSY Spektren von Wildtyp Met-GTB (dunkelgrün) mit Met-M142A-GTB (gelb). Proben befanden sich in NMR-Puffer III. Die Konzentration von Met-GTB-Probe betrug $220\ \mu\text{M}$, von Met-M142A-GTB $133\ \mu\text{M}$.

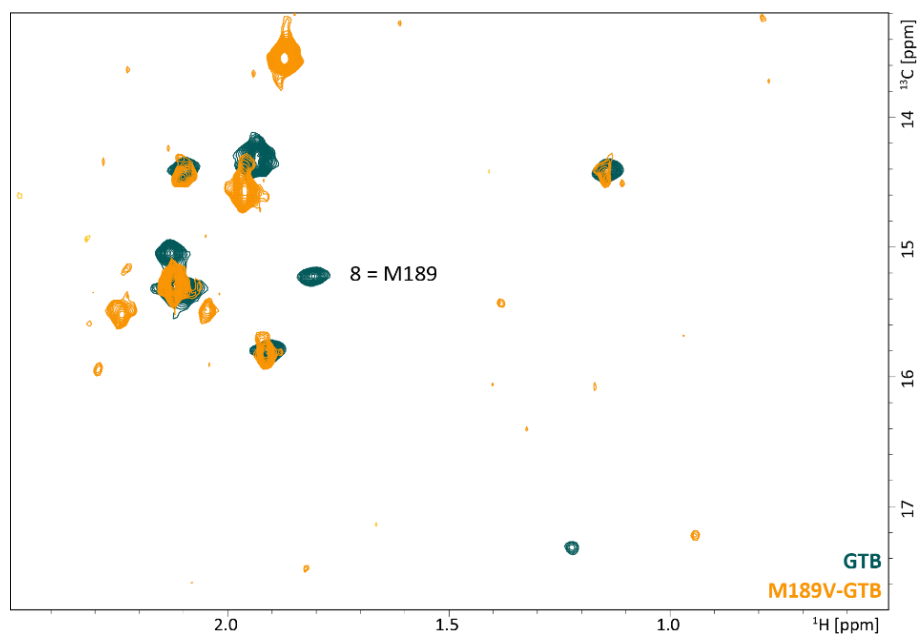


Abbildung 7.4: Überlagerung von $^1\text{H},^{13}\text{C}$ methyl-TROSY Spektren von Wildtyp Met-GTB (dunkelgrün) mit Met-M189V-GTB (gelb). Proben befanden sich in NMR-Puffer III. Die Konzentration von Met-GTB-Probe betrug $220\ \mu\text{M}$, von Met-M189A-GTB $70\ \mu\text{M}$.

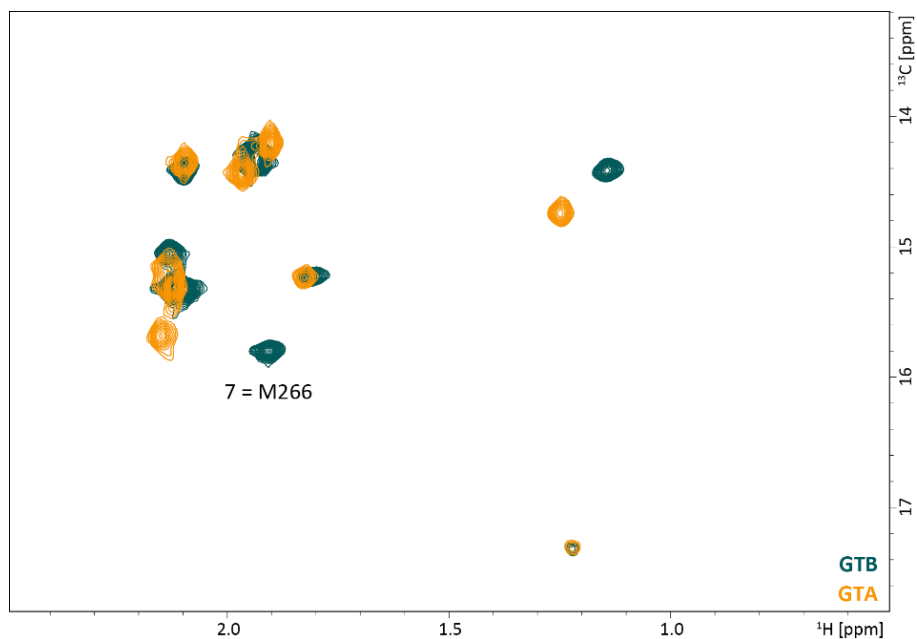


Abbildung 7.5: Überlagerung von $^1\text{H},^{13}\text{C}$ methyl-TROSY Spektren von Wildtyp Met-GTB (dunkelgrün) mit Met-GTA (gelb). Proben befanden sich in NMR-Puffer III. Die Konzentration von Met-GTB-Probe betrug $220\ \mu\text{M}$, von Met-GTA $100\ \mu\text{M}$.

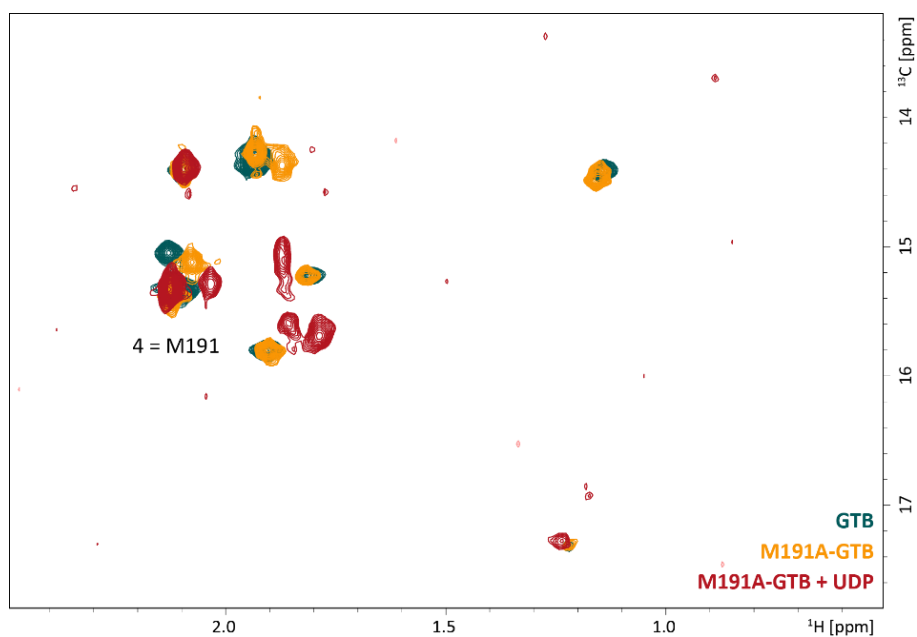


Abbildung 7.6: Überlagerung von $^1\text{H},^{13}\text{C}$ methyl-TROSY Spektren von Wildtyp Met-GTB (dunkelgrün) mit Met-M191A-GTB (gelb) und mit UDP-gesättigter Met-M191A-GTB (rot). Proben befanden sich in NMR-Puffer III. Die Konzentration von Met-GTB-Probe betrug $220\ \mu\text{M}$, von Met-M191A-GTB $100\ \mu\text{M}$ und von UDP $6\ \text{mM}$.

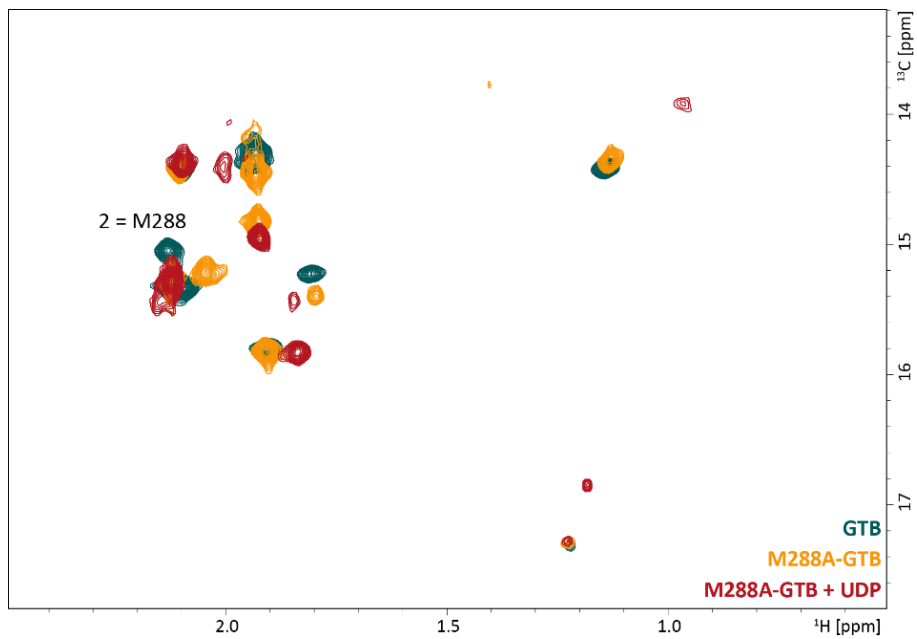
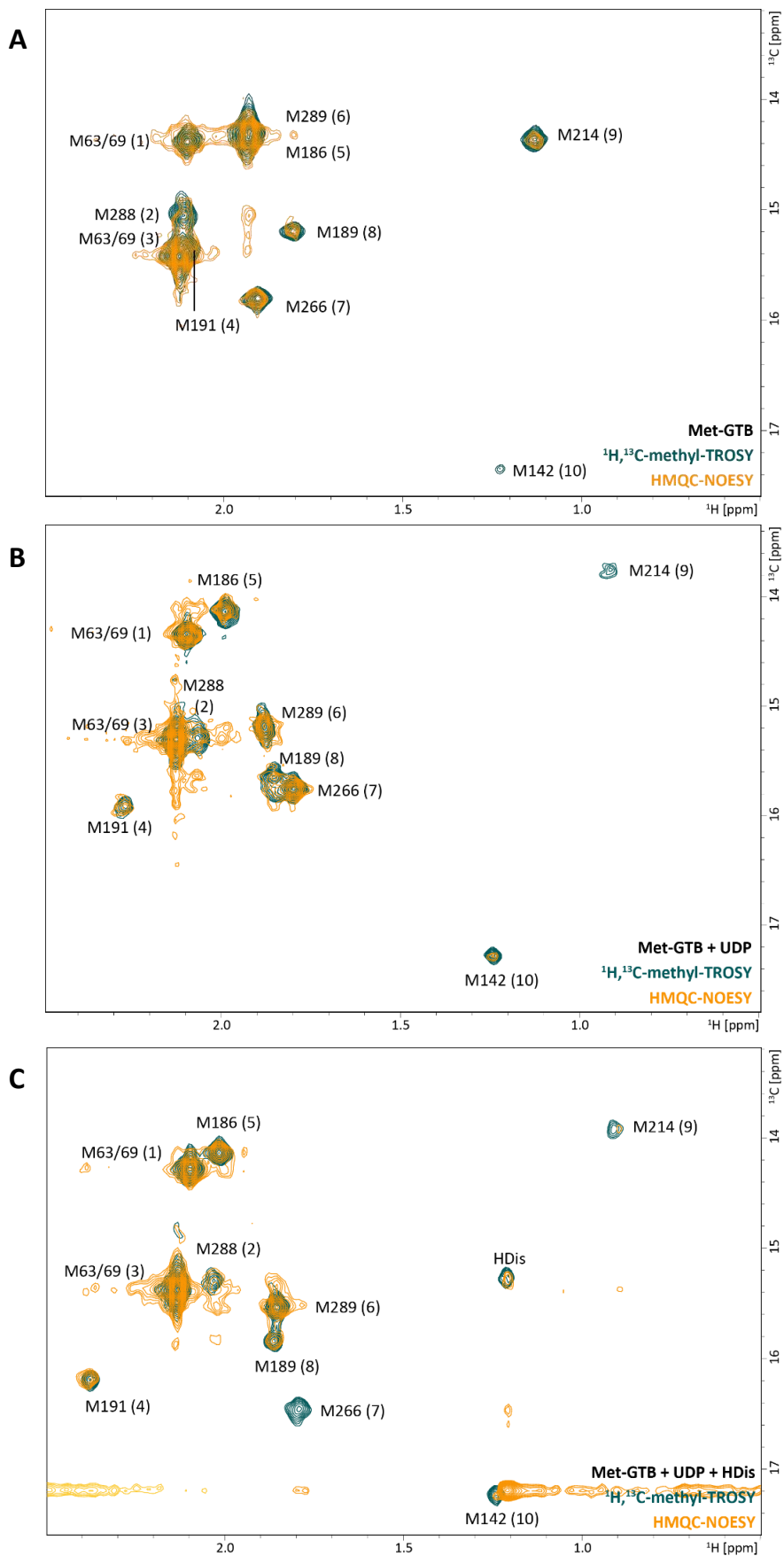


Abbildung 7.7: Überlagerung von $^1\text{H},^{13}\text{C}$ methyl-TROSY Spektren von Wildtyp Met-GTB (dunkelgrün) mit Met-M288A-GTB (gelb) und mit UDP-gesättigter Met-M288A-GTB (rot). Proben befanden sich in NMR-Puffer III. Die Konzentration von Met-GTB-Probe betrug $220\ \mu\text{M}$, von Met-M288A-GTB $14\ \mu\text{M}$ und von UDP $6\ \text{mM}$.

7.3.4 HMQC-NOESY-Spektren von Met-GTB



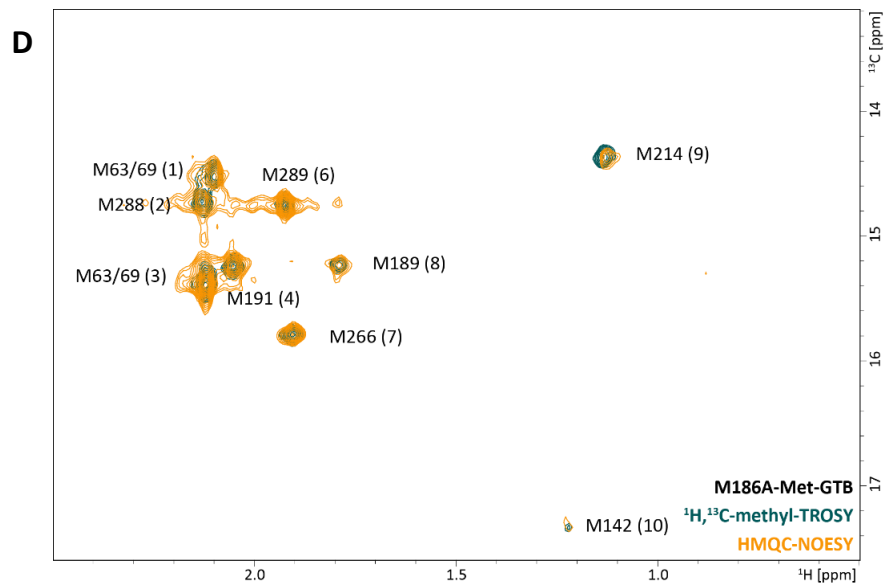


Abbildung 7.8: $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -methyl-TROSY-Spektrum (grün) und HMQC-NOESY-Spektrum von verschiedenen Präparationen. Die Mischzeit im HMQC-NOESY Spektrum betrug 500 ms. **(A)** Dargestellt ist eine 350 μM Met-GTB-Probe in NMR-Puffer III. **(B)** Dargestellt ist eine 350 μM Met-GTB-Probe mit 6 mM UDP in NMR-Puffer III. **(C)** Dargestellt ist eine 290 μM Met-GTB-Probe mit 6,1 mM UDP und 852 μM HDis in NMR-Puffer III. **(D)** Dargestellt ist eine 150 μM Met-M186A-GTB-Probe in NMR-Puffer III.

7.3.5 Spektren der V184A-, V212I- und V351A-GTA Mutanten

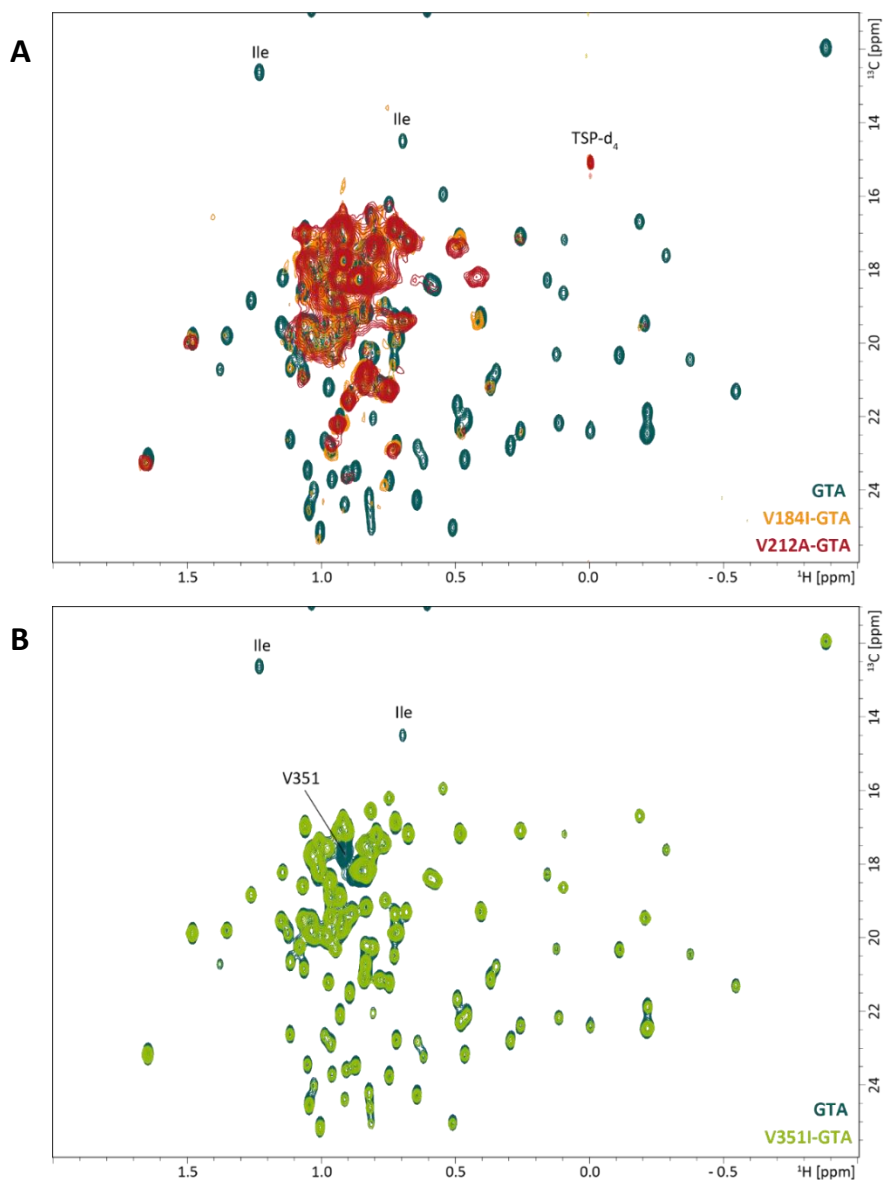


Abbildung 7.9: Überlagerung von ^1H , ^{13}C methyl-TROSY Spektren von Wildtyp-GTA (dunkelgrün), mit (A) V184I- (gelb) und V212A- (rot) bzw. (B) V351I-GTA (hellgrün). Alle Proben befanden sich in NMR-Puffer III. Die Konzentration von ILV-GTA betrug $250\ \mu\text{M}$, von V-V184I-GTA $250\ \mu\text{M}$, von V-V212A- $220\ \mu\text{M}$ und von LV-V351I-GTA $350\ \mu\text{M}$.

7.3.6 Spektren der I231V-, I330V-, I509V-P-Dimer-Mutanten

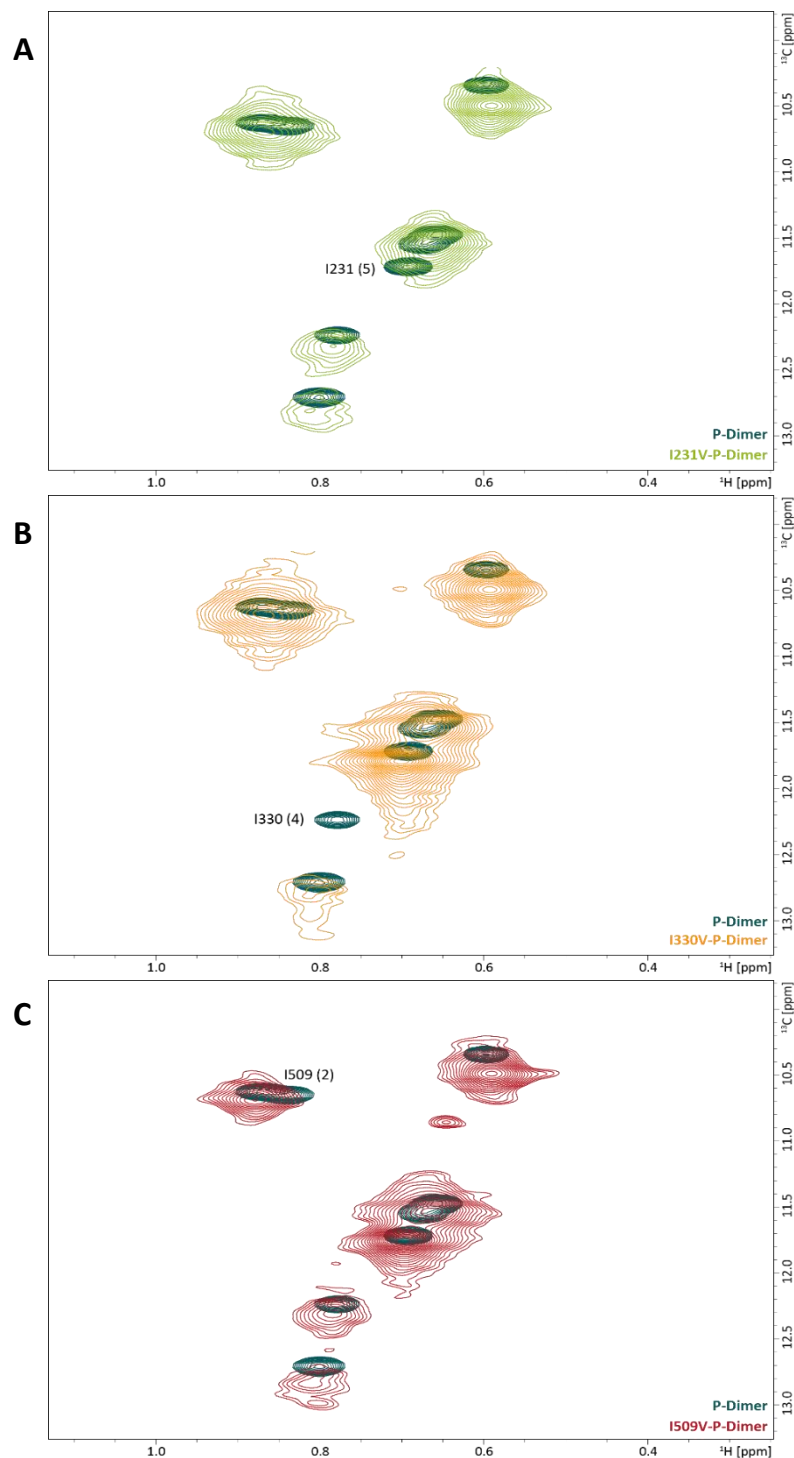


Abbildung 7.10: Überlagerung von ^1H , ^{13}C methyl-TROSY Spektren von Wildtyp P-Dimeren (dunkelgrün), mit (A) I231V- (grün), (B) I330V- (gelb) und (C) I509V-P-Dimeren (rot). Alle Proben befanden sich in NMR-Puffer IV. Die Konzentration von IV-P-Dimeren betrug $200\ \mu\text{M}$, von I-I231V-P-Dimeren $200\ \mu\text{M}$, von I-I330V-P-Dimeren $250\ \mu\text{M}$ und von I-I509V-P-Dimeren $100\ \mu\text{M}$.

7.3.7 CPMG-RD-Messungen mit Ile-GTA

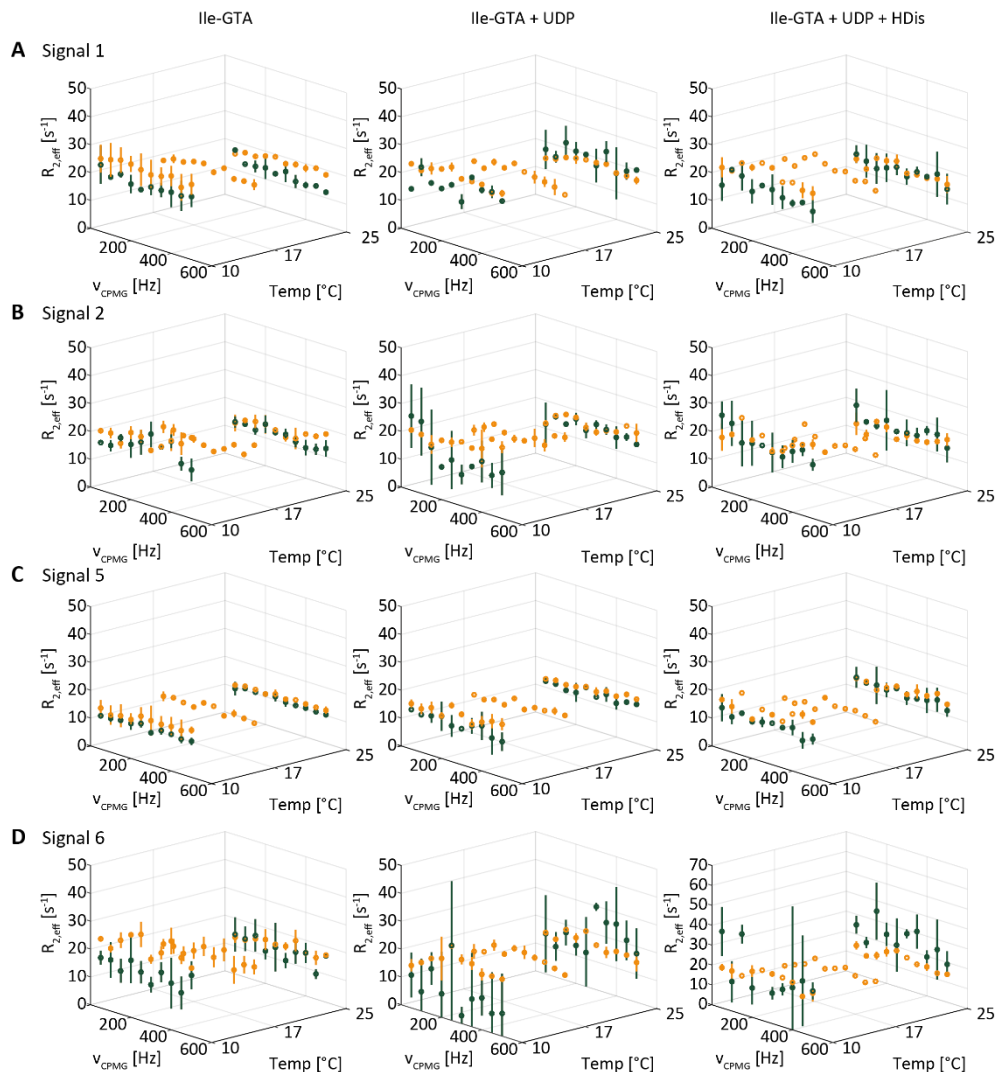


Abbildung 7.11: Einfluss der UDP und HDis-Bindung auf Relaxations-Dispersions-Profile von Signalen der Ile-GTA. CPMG-RD-Experimente wurden mit Ile-GTA an einem 500 MHz (grün) und 700 MHz (gelb) Spektrometer bei 298 K, 290 K und 283 K mit CPMG-Feldstärken von 50-500 Hz durchgeführt. Gezeigt sind RD-Profile von (A) Signal 1, (B) Signal 2, (C) Signal 5 und (D) Signal 6 ohne Substrate (links), mit UDP (mittig) und mit UDP und HDis (rechts). Experimente wurden in Doppelbestimmung durchgeführt, außer bei 290 K in Anwesenheit von UDP und HDis. Fehlerbalken entsprechen Standardabweichung der Doppelbestimmungen. Auswertung erfolgte mit GUARDD (Kleckner and Foster, 2011).

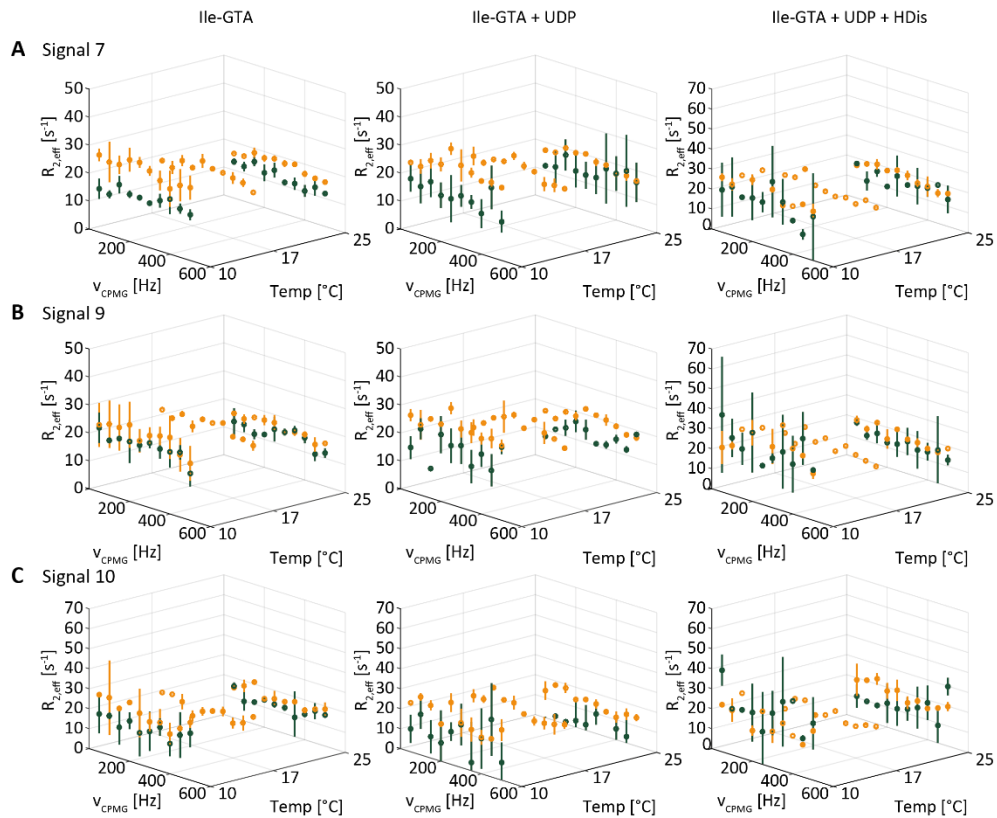


Abbildung 7.12: Einfluss der UDP und HDis-Bindung auf Relaxations-Dispersions-Profile von Signalen der Ile-GTA. CPMG-RD-Experimente wurden mit Ile-GTA an einem 500 MHz (grün) und 700 MHz (gelb) Spektrometer bei 298 K, 290 K und 283 K mit CPMG-Feldstärken von 50-500 Hz durchgeführt. Gezeigt sind RD-Profile von **(A)** Signal 1, **(B)** Signal 2, **(C)** Signal 5 und **(D)** Signal 6 ohne Substrate (links), mit UDP (mittig) und mit UDP und HDis (rechts). Experimente wurden in Doppelbestimmung durchgeführt, außer bei 290 K in Anwesenheit von UDP und HDis. Fehlerbalken entsprechen Standardabweichung der Doppelbestimmungen. Auswertung erfolgte mit GUARDD (Kleckner and Foster, 2011).

7.3.8 CPMG-RD-Messungen mit Met-GTB

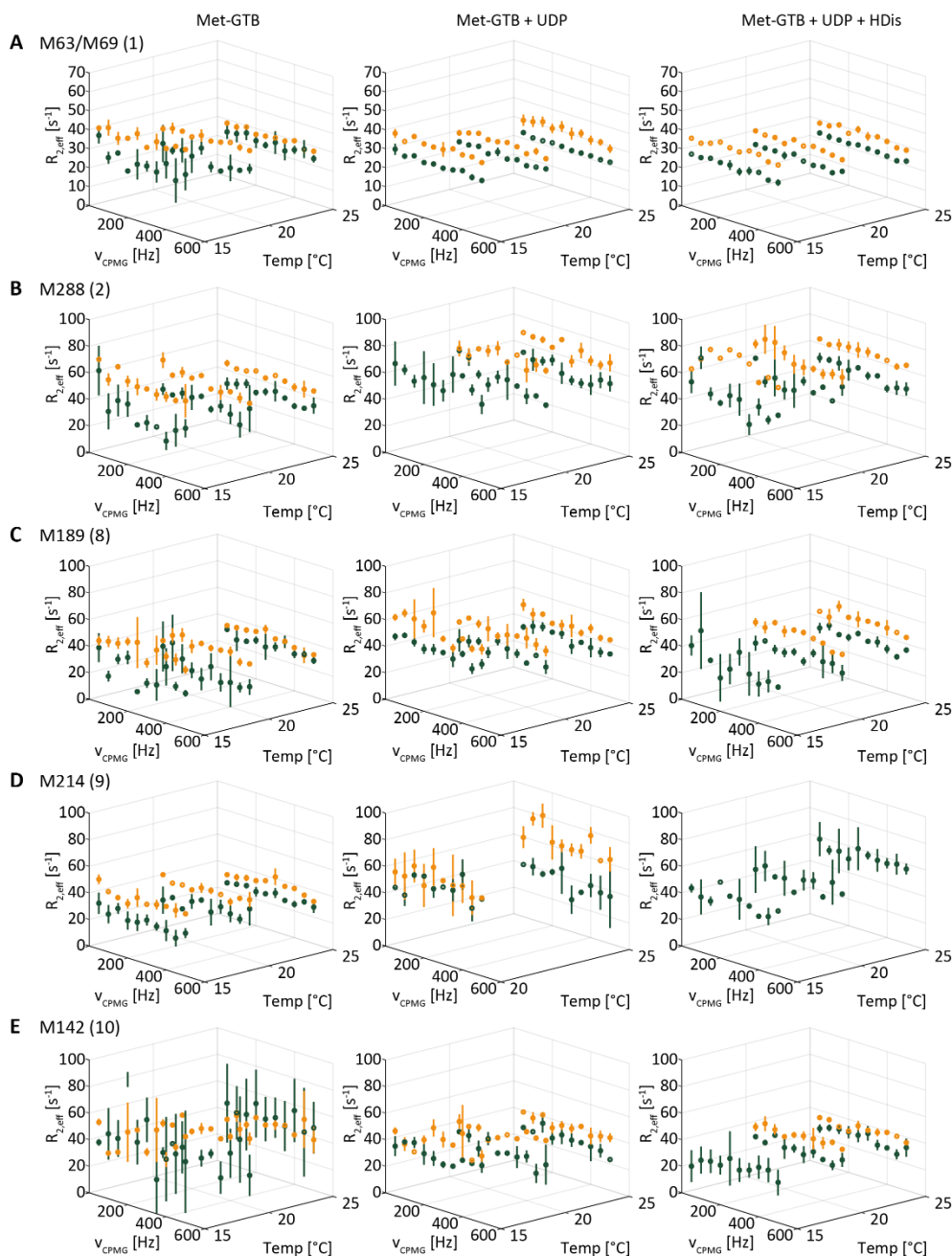
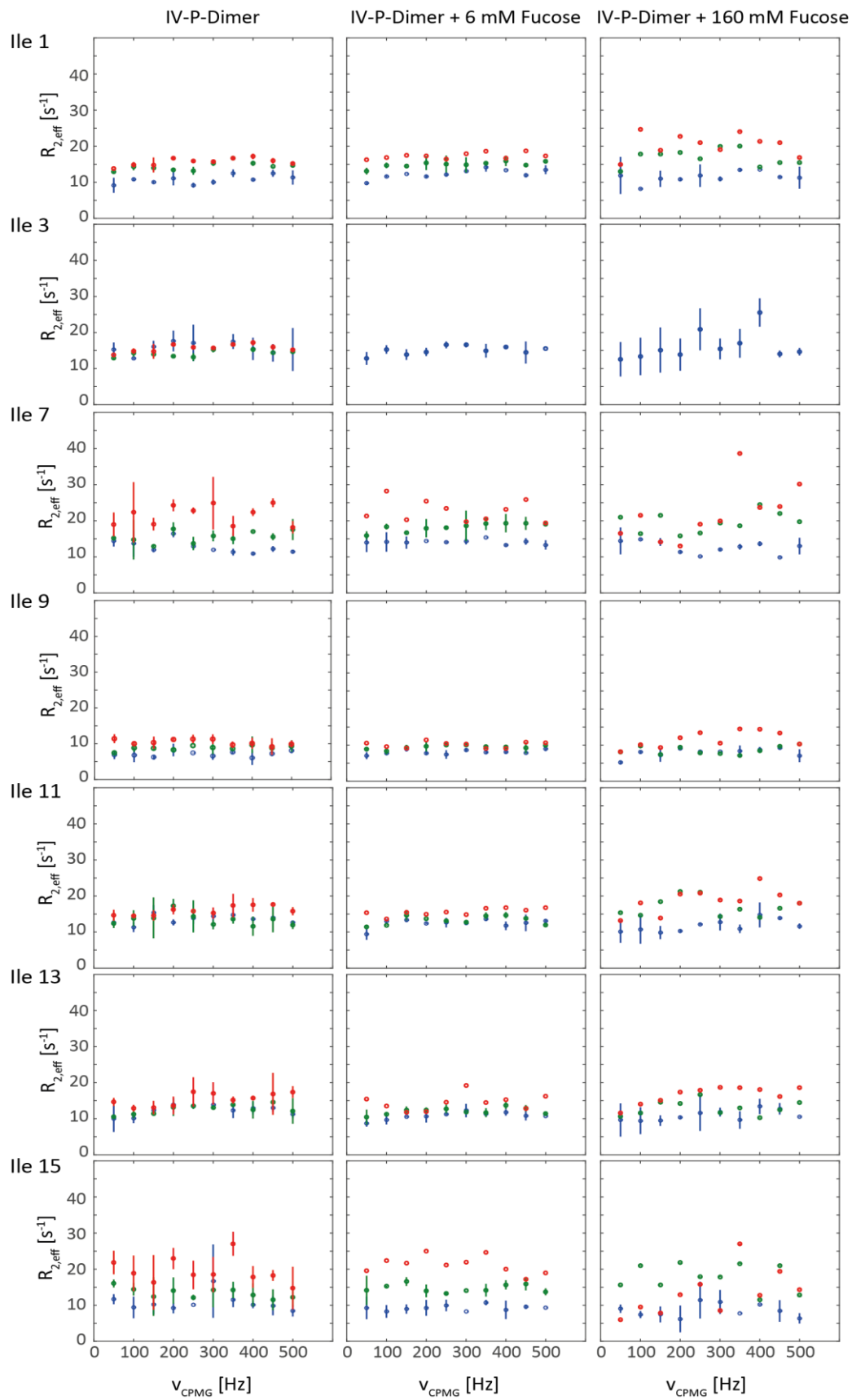
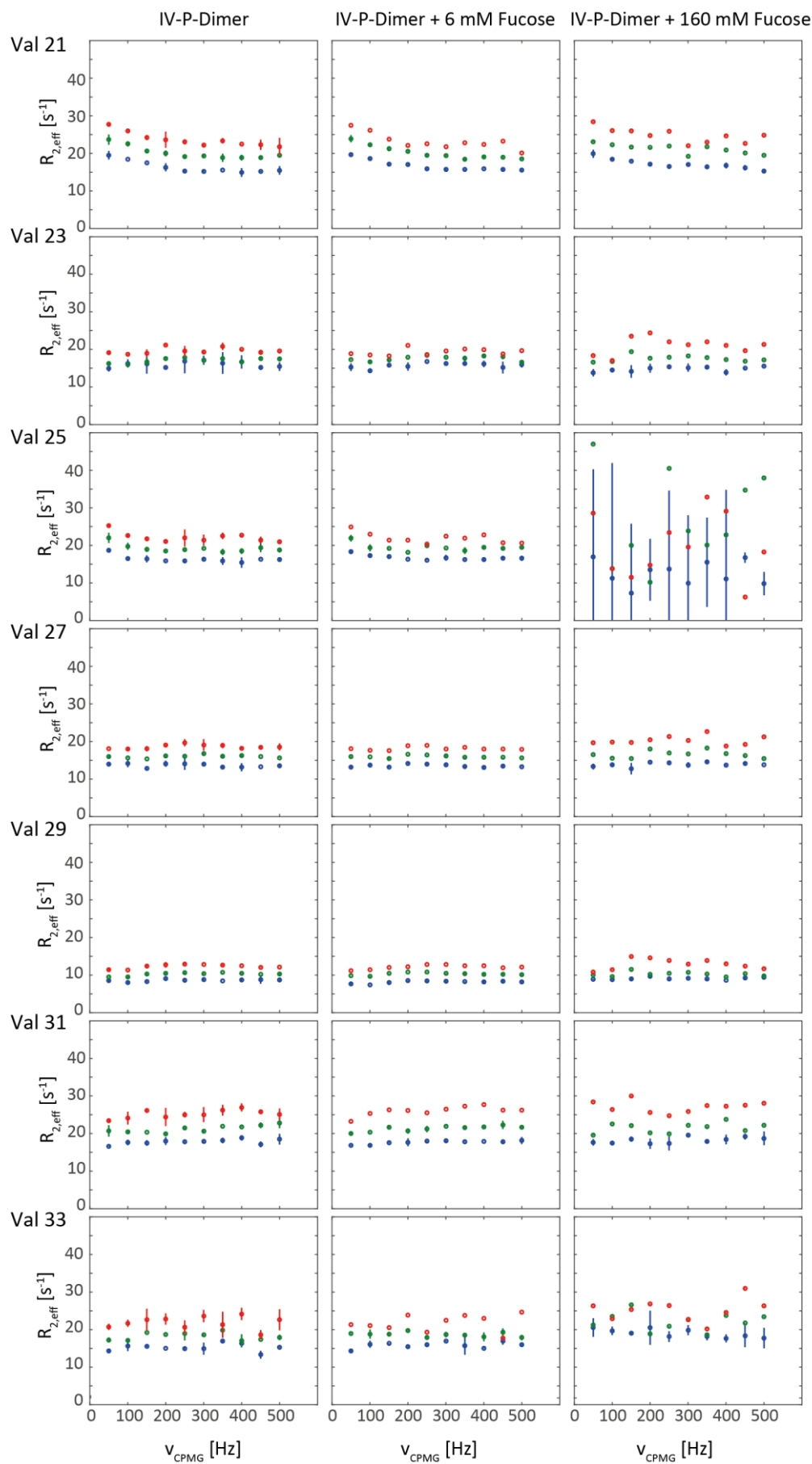
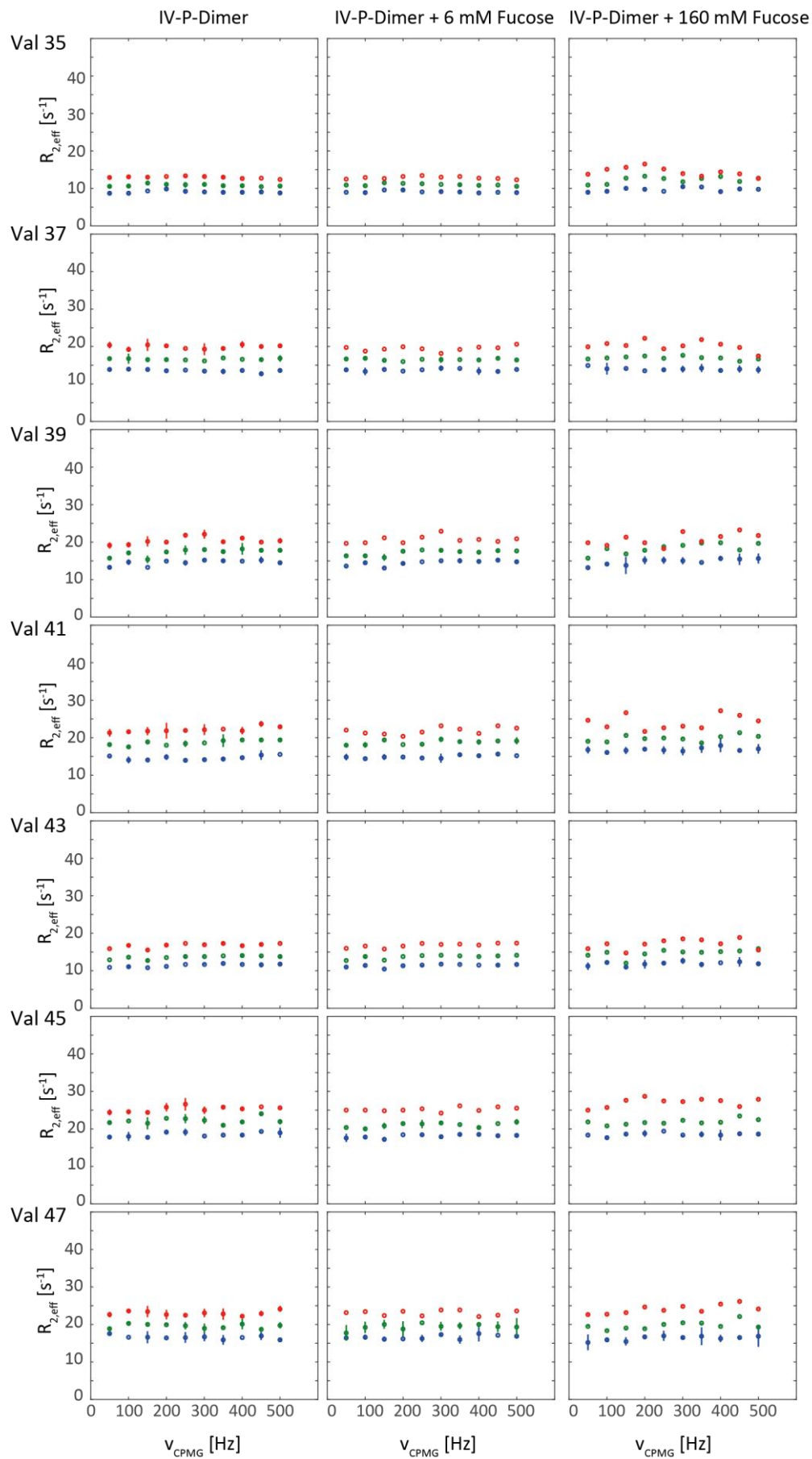


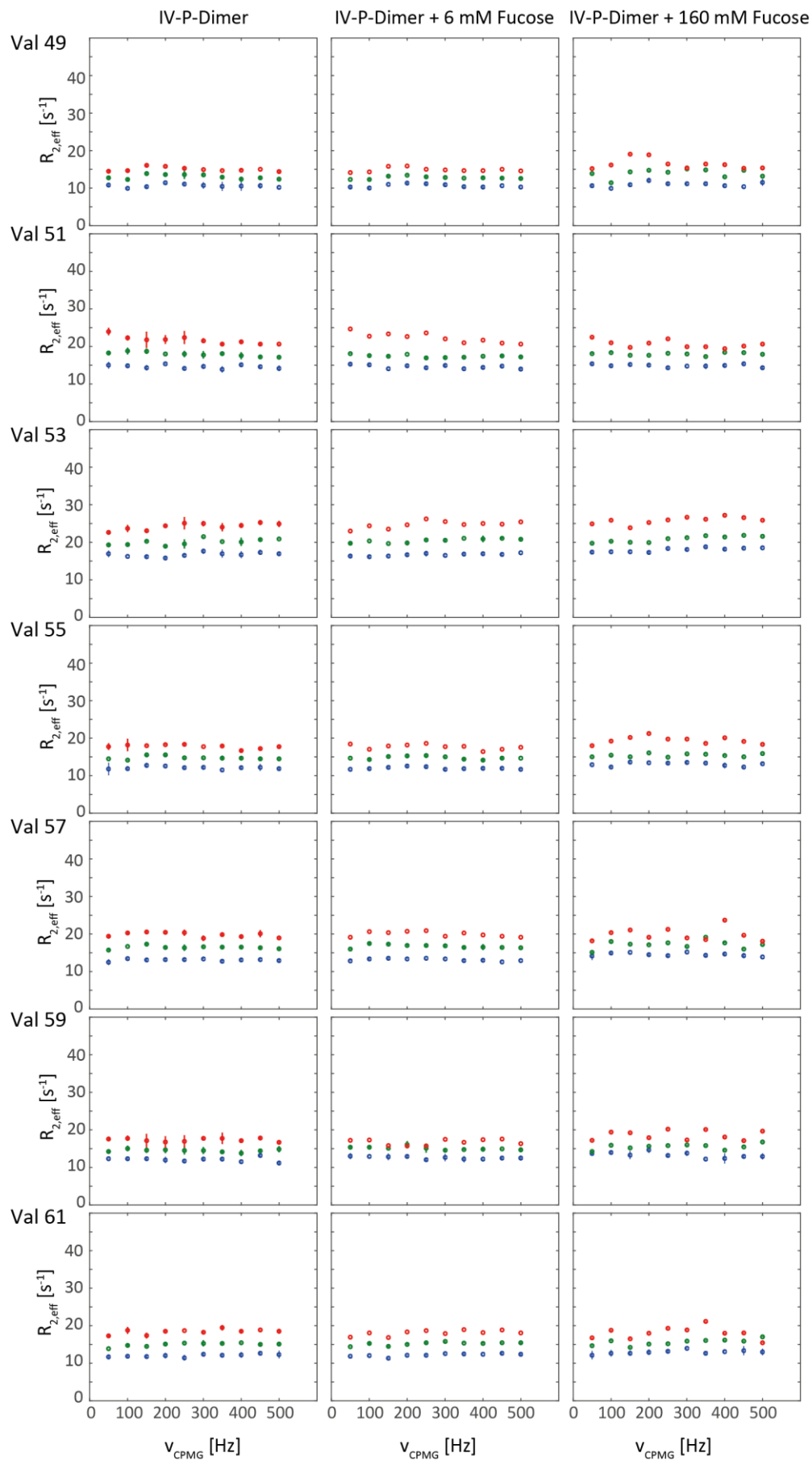
Abbildung 7.13: Einfluss der UDP und HDis-Bindung auf Relaxations-Dispersions-Profile von Signalen der Met-GTB. CPMG-RD-Experimente wurden mit Met-GTB an einem 500 MHz (grün) und 700 MHz (gelb) Spektrometer bei 298 K, 293 K und 288 K mit CPMG-Feldstärken von 50-500 Hz durchgeführt. Gezeigt sind RD-Profile von **(A)** M63/M69 (1), **(B)** M288 (2), **(C)** M189 (8), **(D)** M214 (9) und **(E)** M142 (10) ohne Substrate (links), mit UDP (mittig) und mit UDP und HDis (rechts). Experimente wurden in Doppelbestimmung durchgeführt, abgesehen von Experimenten am 700 MHz-Spektrometer bei 288 K und in Anwesenheit von UDP und HDis. Fehlerbalken entsprechen Standardabweichung der Doppelbestimmungen. Auswertung erfolgte mit GUARDD (Kleckner and Foster, 2011).

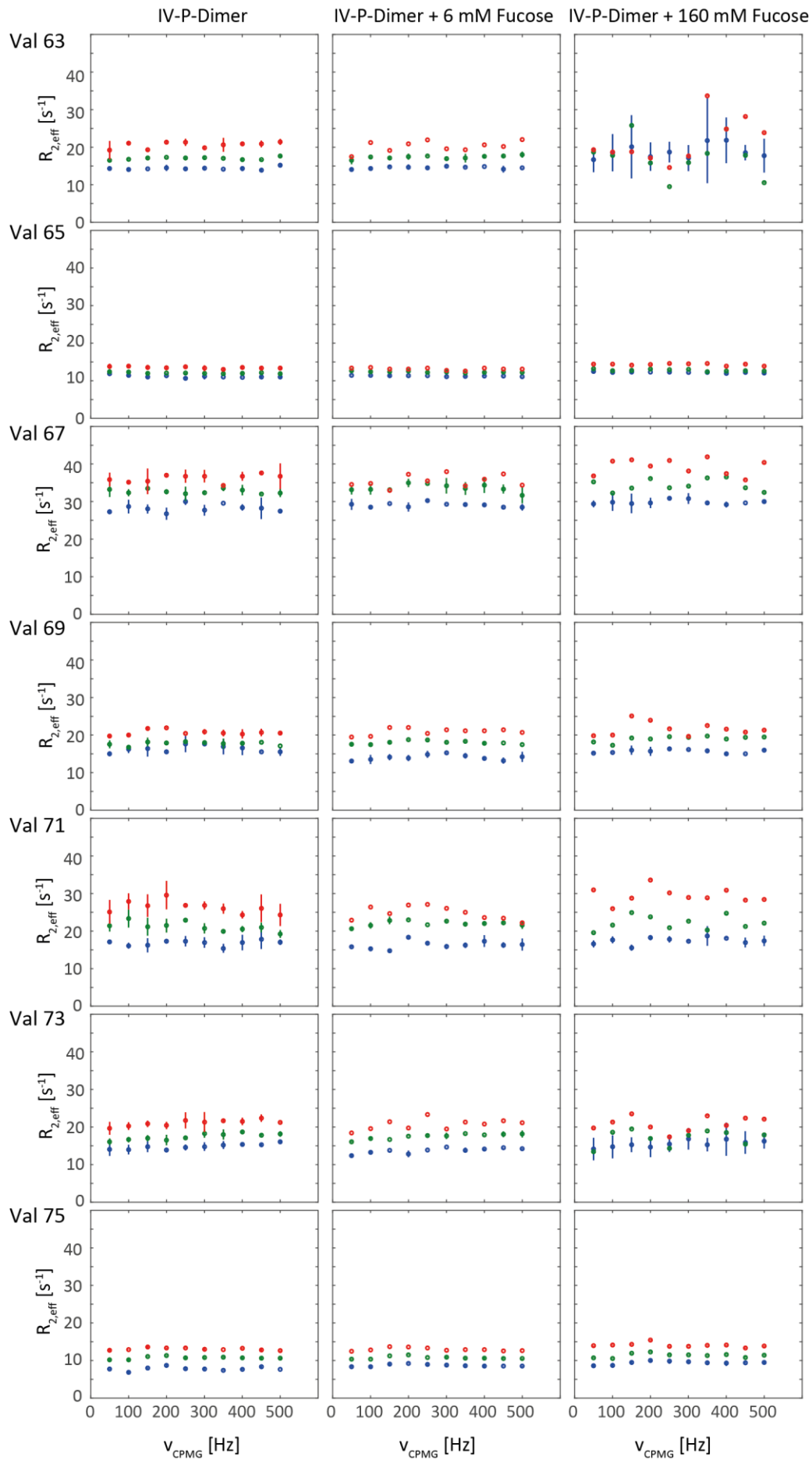
7.3.9 CPMG-RD-Messungen mit P-Dimeren

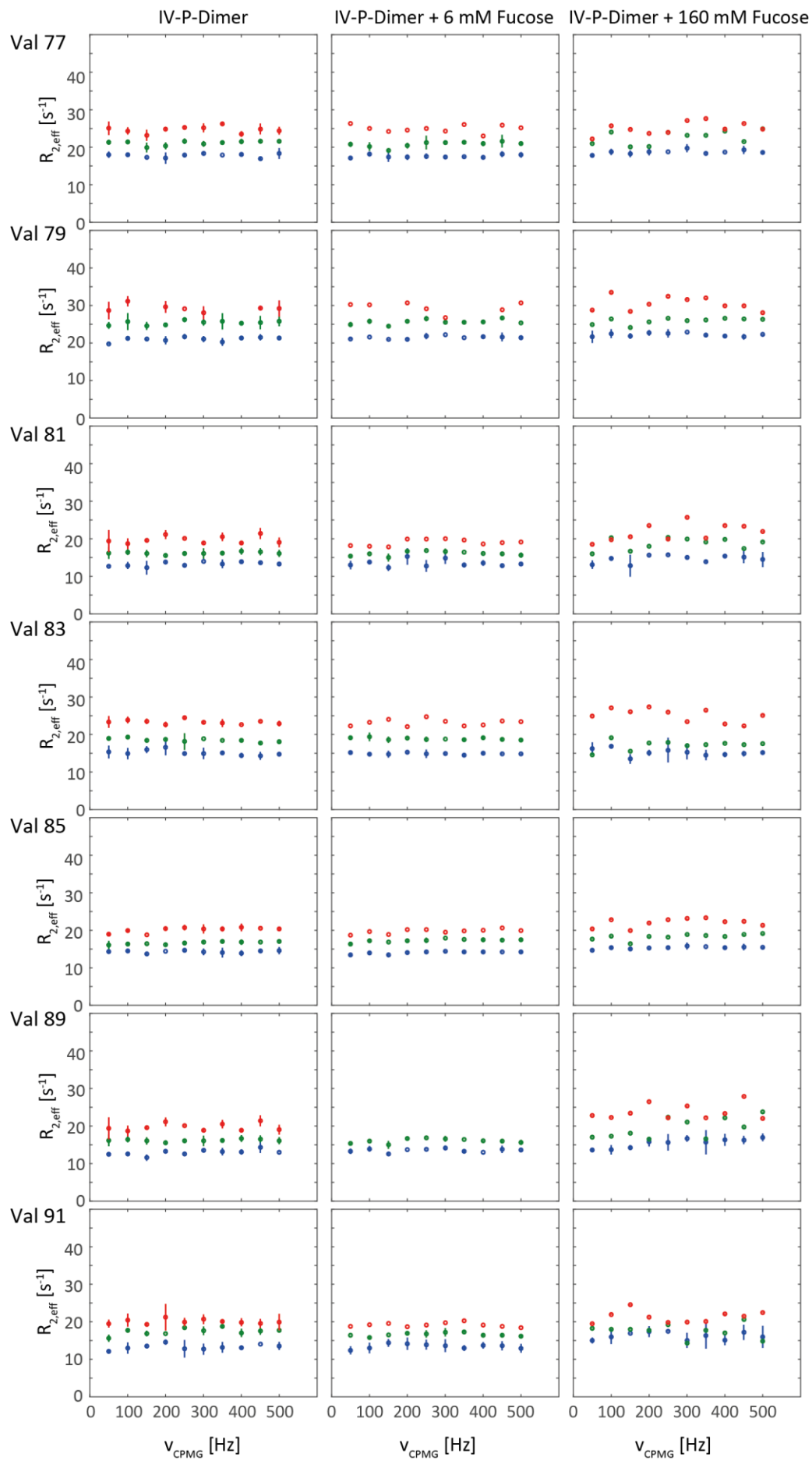


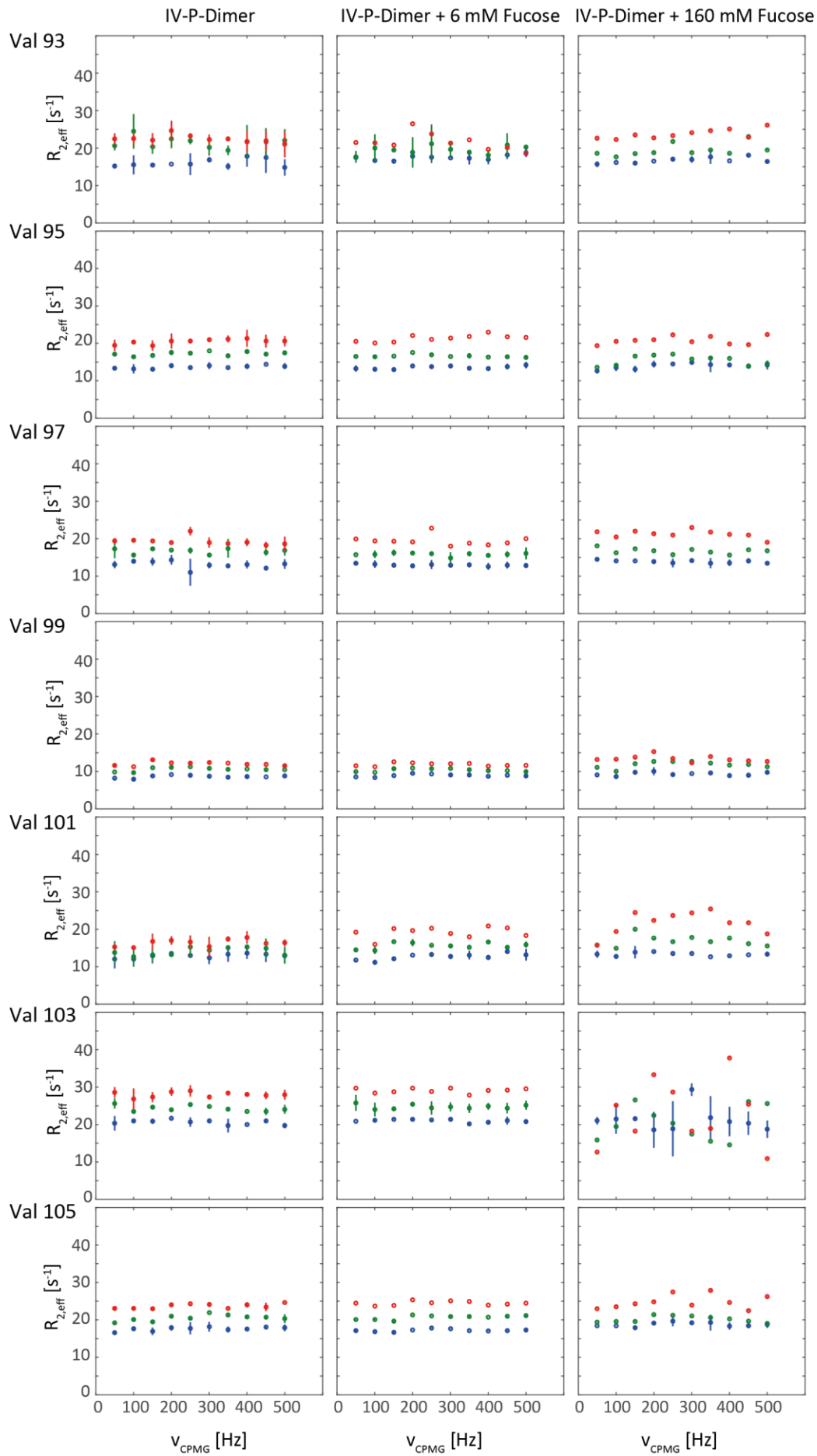


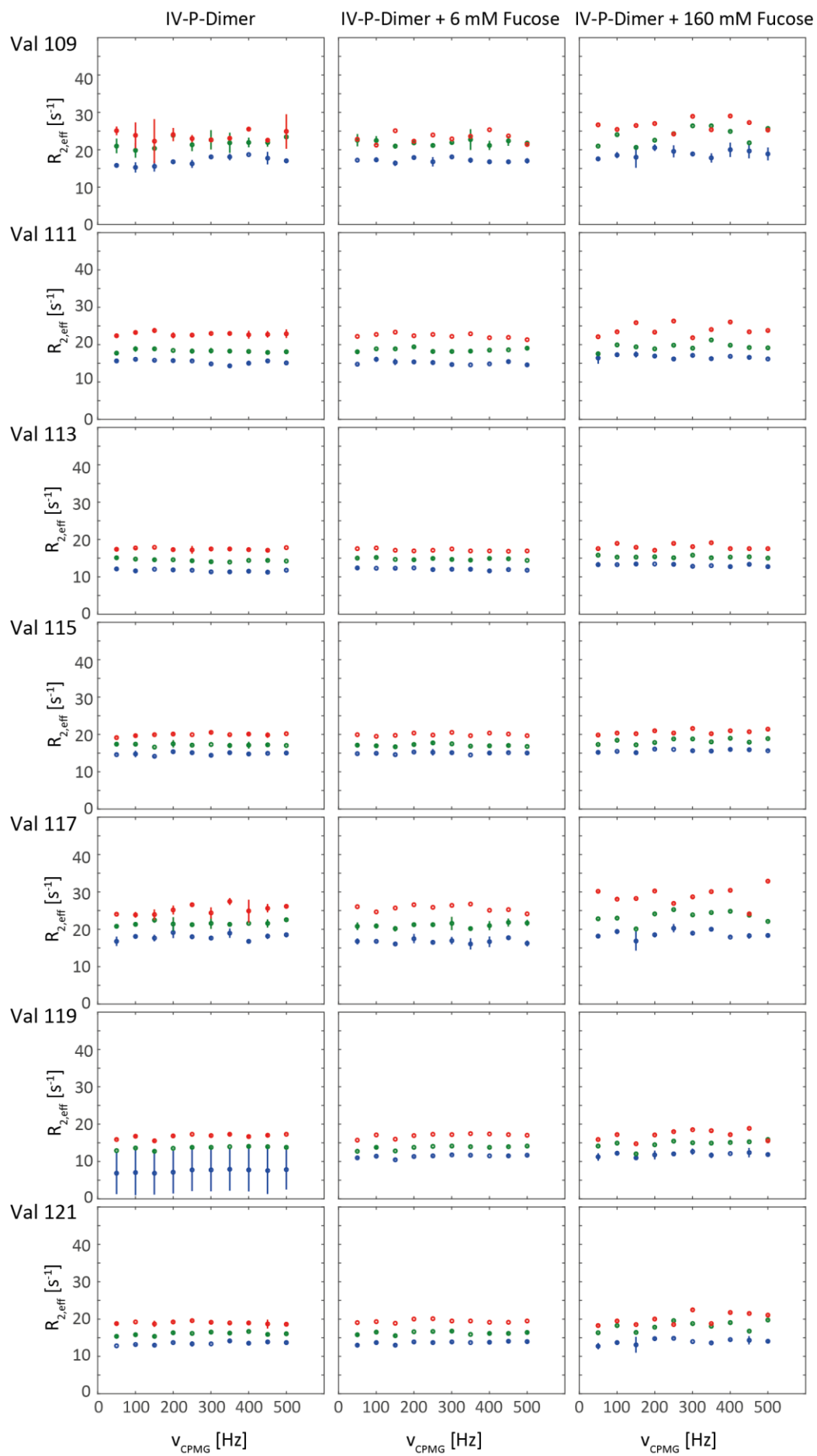












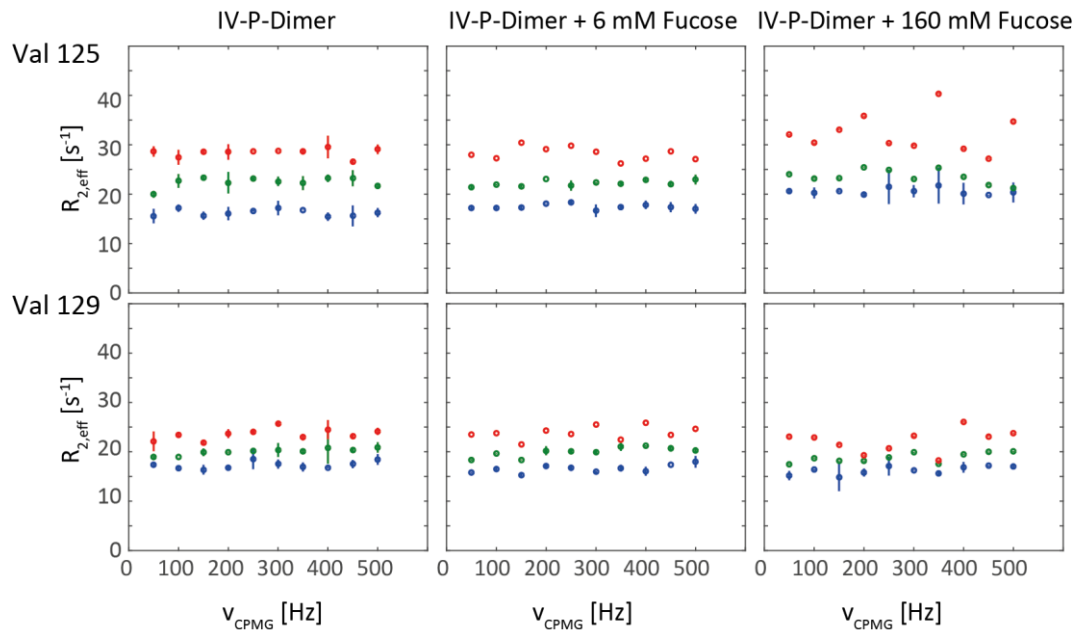


Abbildung 7.14: Einfluss der Fucose-Bindung auf Relaxations-Dispersions-Profile von IV-P-Dimeren. CPMG-RD-Experimente wurden mit IV-P-Dimeren an einem 500 MHz Spektrometer bei 298 K (blau), 290 K (grün) und 283 K (rot) mit CPMG-Feldstärken von 50-500 Hz durchgeführt. Gezeigt sind RD-Profile ohne Substrate (links), mit 6 mM Fucose (mittig) und mit 160 mM Fucose (rechts). Die Nummern entsprechen einer internen Nummerierung, keiner Zuordnung. Abbildung 7.15 zeigt Lokalisation der Signale im $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -methyl-TROSY-Spektrum. Experimente wurden in Doppelbestimmung durchgeführt, außer Experimente bei 283 K in Anwesenheit von 6 mM Fucose und Messungen bei 290 K und 283 K in Anwesenheit von 160 mM Fucose. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung der Doppelbestimmung. Auswertung erfolgte mit GUARDD (Kleckner and Foster, 2011).

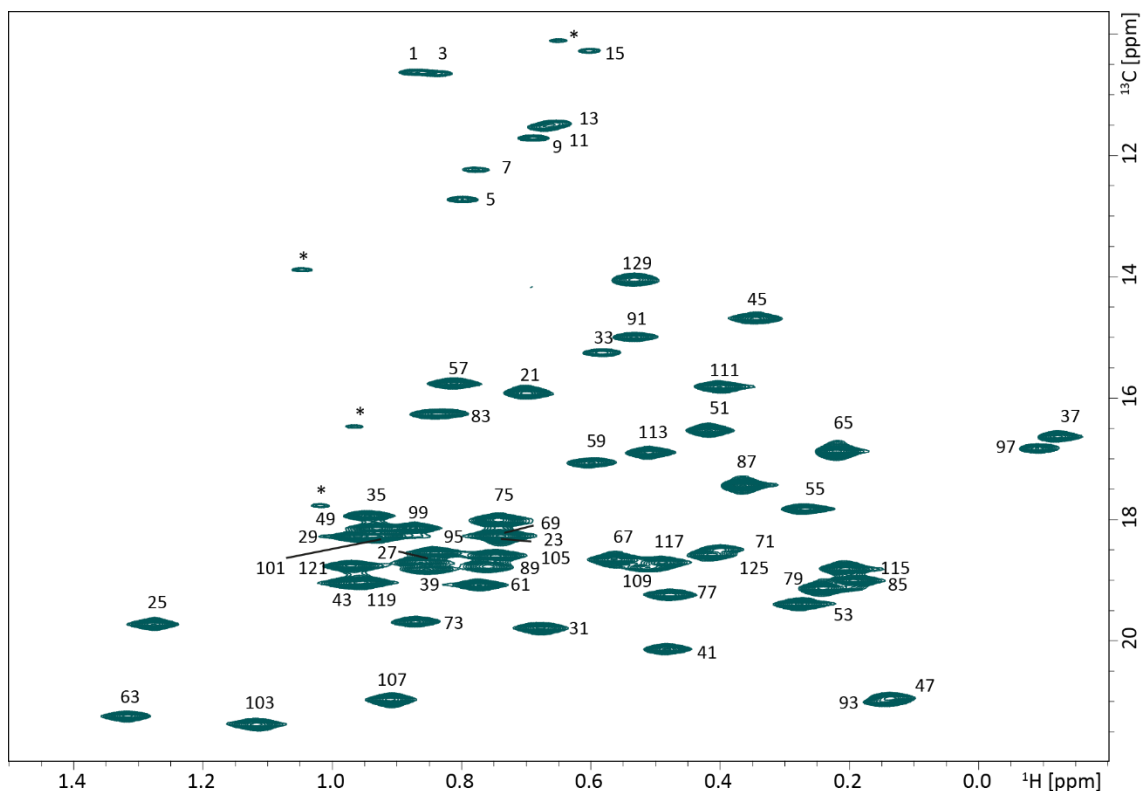


Abbildung 7.15: $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -methyl-TROSY-Spektrum von IV-P-Dimeren. Dargestellt ist $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -methyl-TROSY-Spektrum von 200 μM IV-P-Dimer (2) in NMR-Puffer IV mit interner Signalnummerierung. Mit * gekennzeichnete Signale sind Artefakte.

7.3.10 Rohdaten zu inversen STD-NMR Experimenten

Tabelle 7.6: Rohdaten zur Sättigung bei 5,91 ppm

Nr	Kontrolle ohne Ligand				ILV-GTA gesättigt mit UDP-Gal			
	Intensität Referenz	Intensität Sättigung	RIR	$\Delta(\text{RIR})$	Intensität Referenz	Intensität Sättigung	RIR	$\Delta(\text{RIR})$
1	24929.4	23273.6	6.64	1.06	30915.9	29387.5	4.94	1.12
2	28457.2	25988.1	8.68	0.91	32493.4	29584.2	8.95	1.02
I123	38667.4	36049.9	6.77	0.68	26815.1	24293.9	9.40	1.23
I192	33495.8	32904.4	1.77	0.83	28654.4	26030.1	9.16	1.15
5	61652.1	59469.3	3.54	0.44	57625.1	55852.3	3.08	0.61
6	25860.0	24620.8	4.79	1.05	32520.8	30671.1	5.69	1.05
7	62123.2	59540.2	4.16	0.44	62071.4	59548.0	4.07	0.56
8	21795.9	19765.4	9.32	1.18	20462.8	19446.0	4.97	1.69
9	30174.5	27734.1	8.09	0.87	31364.7	28943.6	7.72	1.07
10	18847.0	17154.5	8.98	1.37	23290.6	22039.1	5.37	1.48
11	9833.5	10030.6	-2.00	2.94	15901.7	15588.8	1.97	2.24
12	48627.3	46742.1	3.88	0.56	37898.2	37452.4	1.18	0.95
13	111879.0	109831.0	1.83	0.25	87830.8	87837.5	-0.01	0.41
14	28437.4	26908.5	5.38	0.95	24828.4	25416.1	-2.37	1.50

15	55269.8	54480.2	1.43	0.51	64038.5	62510.2	2.39	0.55
16	32175.1	29820.0	7.32	0.82	36955.1	34441.0	6.80	0.92
17	15502.9	15695.8	-1.24	1.85	14779.5	14389.9	2.64	2.39
18	55537.1	53166.5	4.27	0.49	50396.7	47959.3	4.84	0.69
V351	22897.5	23187.5	-1.27	1.26	30134.3	29285.5	2.82	1.17
20	127579.0	127254.0	0.25	0.22	39784.2	39815.4	-0.08	0.91
21	45797.2	44376.7	3.10	0.60	43912.6	42514.4	3.18	0.80
22	23026.1	21793.4	5.35	1.17	41231.1	39048.4	5.29	0.84
23	33209.2	31863.0	4.05	0.82	34119.7	33310.9	2.37	1.04
24	13390.7	12217.2	8.76	1.94	16220.1	15743.1	2.94	2.18
25	69641.9	67416.3	3.20	0.39	39211.4	37804.3	3.59	0.89
26	21834.2	20526.3	5.99	1.22	31901.7	30936.8	3.02	1.11
27	44774.9	43200.2	3.52	0.61	50033.9	48192.7	3.68	0.70
28	20623.0	19881.7	3.59	1.33	29594.9	28868.8	2.45	1.20
29	27439.0	26672.5	2.79	1.01	38880.6	38415.6	1.20	0.92
30	33158.6	31066.1	6.31	0.80	37717.7	35728.8	5.27	0.91
31	23922.3	23269.2	2.73	1.15	22039.5	21208.1	3.77	1.59
32	12697.0	11800.9	7.06	2.08	11414.7	12087.6	-5.90	3.37
33	49483.6	47142.7	4.73	0.55	54843.9	52869.0	3.60	0.64
34	64804.1	63207.8	2.46	0.43	85314.5	83950.1	1.60	0.42
35	20626.0	20434.7	0.93	1.36	13173.6	12103.8	8.12	2.54
36	14612.5	13624.8	6.76	1.81	20944.4	19992.1	4.55	1.66
37	13408.3	12041.0	10.20	1.90	22419.4	21382.5	4.63	1.55
38	15900.7	15374.1	3.31	1.73	24270.2	22749.0	6.27	1.40
39	29786.7	27751.4	6.83	0.89	31036.0	29735.2	4.19	1.12
40	15446.5	15087.6	2.32	1.80	22694.2	21781.8	4.02	1.54
41	48839.2	46508.6	4.77	0.55	39499.8	37771.7	4.37	0.88
42	13938.6	13352.7	4.20	1.95	22023.2	21050.1	4.42	1.58
43	33381.9	32475.7	2.71	0.83	40451.2	40568.4	-0.29	0.90
44	83700.2	82071.3	1.95	0.33	81768.5	80631.8	1.39	0.44
45	18109.7	16725.6	7.64	1.45	27433.6	26149.0	4.68	1.26
46	49316.8	48162.5	2.34	0.56	55426.2	54663.6	1.38	0.65
47	30089.8	29711.2	1.26	0.93	41471.9	40314.0	2.79	0.85
48	58841.9	56946.3	3.22	0.47	55957.1	55771.2	0.33	0.65
49	39604.8	37899.8	4.31	0.69	36661.7	35655.3	2.75	0.96
50	30979.6	30428.1	1.78	0.90	35081.2	33309.8	5.05	0.98
51	25606.1	24522.7	4.23	1.06	25954.4	24915.9	4.00	1.34
52	32349.8	29956.5	7.40	0.81	33392.9	32235.8	3.47	1.05
53	24278.3	23399.9	3.62	1.13	25515.0	24354.3	4.55	1.36
54	44035.4	40648.3	7.69	0.60	42945.4	41429.8	3.53	0.82
55	40312.2	39765.0	1.36	0.69	49866.2	49354.4	1.03	0.72
56	22840.2	22274.3	2.48	1.21	21695.8	21379.5	1.46	1.65
57	27346.7	26545.8	2.93	1.01	20579.9	19973.2	2.95	1.71
58	56143.0	53664.2	4.42	0.48	44087.0	42255.3	4.15	0.79
59	27161.2	25459.3	6.27	0.98	29530.2	27024.9	8.48	1.13

60	32707.3	30771.6	5.92	0.82	36192.9	34258.0	5.35	0.95
61	35777.4	35792.5	-0.04	0.79	48213.1	47674.2	1.12	0.75
62	14831.6	13149.2	11.34	1.70	16729.1	16909.1	-1.08	2.20
63	23022.5	20724.6	9.98	1.11	26864.0	23975.1	10.75	1.21
64	38249.6	36590.7	4.34	0.71	24619.6	23563.7	4.29	1.41
65	23807.3	23064.7	3.12	1.16	29761.8	28787.4	3.27	1.18
66	20348.9	18892.9	7.16	1.30	25219.9	24118.5	4.37	1.38
67	28042.2	26652.5	4.96	0.96	32526.0	30818.6	5.25	1.06
68	20992.8	20099.8	4.25	1.30	25138.0	23937.2	4.78	1.38
69	30161.7	29004.7	3.84	0.91	37027.9	36605.8	1.14	0.97
70	29494.2	28271.1	4.15	0.92	37038.5	35732.1	3.53	0.95
71	22187.7	21200.4	4.45	1.22	13185.8	13357.3	-1.30	2.79
72	28362.8	27071.2	4.55	0.96	29415.6	28077.3	4.55	1.18
73	19139.0	18380.0	3.97	1.43	29419.9	28606.5	2.76	1.20
74	39109.4	38141.3	2.48	0.71	21272.4	21125.6	0.69	1.70
75	33903.3	32639.4	3.73	0.81	18062.5	18607.3	-3.02	2.07
76	34771.9	33362.2	4.05	0.78	40167.7	38268.7	4.73	0.86
77	24036.9	22973.6	4.42	1.13	28337.9	27605.6	2.58	1.25
78	43143.2	41068.6	4.81	0.63	48631.4	46593.7	4.19	0.72
79	51139.3	50261.2	1.72	0.55	30283.2	29537.3	2.46	1.17
80	14317.0	14205.2	0.78	1.97	19203.5	19127.0	0.40	1.89
81	63668.2	62423.8	1.95	0.44	67484.7	66630.7	1.27	0.53
82	27403.9	25622.9	6.50	0.97	22832.9	21805.5	4.50	1.52
83	17361.6	17412.6	-0.29	1.64	18729.7	17437.7	6.90	1.81
84	39552.2	38015.5	3.89	0.69	41841.0	40814.0	2.45	0.85
85	12241.0	11904.8	2.75	2.26	11125.6	11528.7	-3.62	3.38
86	28202.7	26637.6	5.55	0.95	26186.2	24583.5	6.12	1.30
87	28770.3	27440.3	4.62	0.94	28257.5	26543.8	6.06	1.21
88	23090.7	22550.4	2.34	1.20	8438.3	8381.3	0.68	4.28
89	66410.2	64158.6	3.39	0.41	33158.5	33149.7	0.03	1.10
90	27221.5	26503.2	2.64	1.02	39087.3	38010.9	2.75	0.90
91	23833.2	23930.2	-0.41	1.20	15898.3	15991.9	-0.59	2.30
92	30888.9	28736.6	6.97	0.86	30484.0	29106.9	4.52	1.14
93	13495.4	12887.2	4.51	2.01	22849.1	21552.0	5.68	1.50
94	16587.1	16251.6	2.02	1.68	25922.9	24630.5	4.99	1.33
Leu266 (1)	29017.3	28668.6	1.20	0.97	16019.4	16090.4	-0.44	2.28
96	26353.7	24259.0	7.95	0.99	35067.8	34474.7	1.69	1.02
97	16228.4	16353.8	-0.77	1.76	21517.0	21871.5	-1.65	1.72
98	16049.9	15951.8	0.61	1.76	21299.0	20380.7	4.31	1.63
99	23169.6	22087.0	4.67	1.17	27468.8	26561.2	3.30	1.28
100	21797.0	21049.1	3.43	1.26	26533.3	25364.4	4.41	1.31
101	213212.0	208729.0	2.10	0.13	64439.5	62834.8	2.49	0.55
102	13795.9	13417.1	2.75	2.00	17941.9	17814.7	0.71	2.01
Leu266 (2)	30571.1	29311.5	4.12	0.89	12733.7	12840.5	-0.84	2.88
104	33146.7	31263.9	5.68	0.81	29690.6	28341.2	4.54	1.17

105	21049.5	20071.3	4.65	1.29	23533.9	23486.4	0.20	1.54
106	46908.9	42267.1	9.90	0.55	49083.1	44306.7	9.73	0.67
107	14193.4	13551.9	4.52	1.91	22155.1	21672.0	2.18	1.61
108	18749.2	17940.5	4.31	1.45	20900.6	20709.6	0.91	1.72
109	8073.2	7895.7	2.20	3.44	10184.2	10367.0	-1.79	3.63
110	28270.7	26966.3	4.61	0.96	27354.1	27173.4	0.66	1.32
111	19880.9	19925.0	-0.22	1.43	29332.0	27675.1	5.65	1.17
112	62415.1	60453.3	3.14	0.44	51718.4	50419.6	2.51	0.69
113	63994.1	62042.5	3.05	0.43	63540.4	60060.1	5.48	0.54
114	24034.5	22210.6	7.59	1.09	47678.9	44104.1	7.50	0.71
115	36382.1	35155.4	3.37	0.75	36008.3	34034.5	5.48	0.95
116	37929.4	35706.0	5.86	0.70	44300.4	41869.7	5.49	0.78
V184					12536.4	10565.5	15.72	2.45
118					24206.0	21521.2	11.09	1.34
119					21065.4	21121.7	-0.27	1.73
120					23444.2	23209.9	1.00	1.53
121					24611.2	23782.6	3.37	1.43

Tabelle 7.7: Rohdaten zur Sättigung bei 5,56 ppm

Nr	Kontrolle ohne Ligand				ILV-GTA gesättigt mit UDP-Gal			
	Intensität Referenz	Intensität Sättigung	RIR	$\Delta(\text{RIR})$	Intensität Referenz	Intensität Sättigung	RIR	$\Delta(\text{RIR})$
1	27888.6	25484.1	8.62	1.00	27268.1	26037.2	4.51	0.93
2	30711.6	27622.1	10.06	0.90	27285.5	25978.0	4.79	0.93
I123	43502.6	39863.3	8.37	0.64	23396.0	20801.5	11.09	1.01
I192	37703.7	35831.4	4.97	0.77	21332.7	20011.7	6.19	1.17
5	67850.9	65728.0	3.13	0.44	47360.9	46612.2	1.58	0.55
6	29218.2	26640.0	8.82	0.95	27568.6	26216.5	4.90	0.92
7	67297.1	63419.8	5.76	0.43	55649.1	53343.7	4.14	0.46
8	23971.5	22068.7	7.94	1.17	17949.2	16211.0	9.68	1.34
9	33902.7	30832.4	9.06	0.82	27710.2	25526.8	7.88	0.89
10	20088.9	19015.6	5.34	1.44	19951.2	19546.5	2.03	1.31
11	12075.6	10632.1	11.95	2.23	13805.7	13350.0	3.30	1.87
12	52462.8	49838.0	5.00	0.55	32478.6	31480.0	3.07	0.79
13	126821.0	124122.0	2.13	0.24	76280.7	76345.0	-0.08	0.35
14	31382.9	29617.9	5.62	0.92	22045.3	20931.0	5.05	1.15
15	64451.9	63228.4	1.90	0.46	55077.1	53982.7	1.99	0.47
16	35654.1	32137.8	9.86	0.77	30439.9	28415.4	6.65	0.82
17	17851.3	17128.6	4.05	1.64	11763.9	10403.2	11.57	2.00
18	62032.5	60146.4	3.04	0.48	45136.9	43327.0	4.01	0.57
V351	25549.3	25378.9	0.67	1.19	25006.0	24266.6	2.96	1.03
20	139643.0	138038.0	1.15	0.22	28898.9	27986.7	3.16	0.89
21	53137.9	50764.5	4.47	0.55	38889.8	38311.3	1.49	0.67
22	26680.7	25298.9	5.18	1.09	35310.6	33388.4	5.44	0.71
23	36187.8	33386.7	7.74	0.78	29330.2	27468.3	6.35	0.85

24	14037.1	14272.2	-1.67	2.21	13874.2	13566.1	2.22	1.88
25	76207.4	73558.2	3.48	0.39	29744.2	29142.2	2.02	0.88
26	23684.0	23066.9	2.61	1.26	27644.5	26648.4	3.60	0.93
27	51467.8	49577.8	3.67	0.57	42717.2	40646.7	4.85	0.59
28	24009.5	22492.8	6.32	1.19	27351.9	25808.7	5.64	0.92
29	30915.1	28618.5	7.43	0.92	35190.2	34066.6	3.19	0.73
30	38086.1	35692.2	6.29	0.75	33501.0	31169.0	6.96	0.74
31	27012.9	26191.3	3.04	1.10	18601.3	17772.8	4.45	1.37
32	13856.3	13922.1	-0.47	2.21	8628.8	8563.5	0.76	3.06
33	54588.2	52159.7	4.45	0.53	46948.2	44777.4	4.62	0.54
34	73759.9	71529.5	3.02	0.40	75337.8	73906.4	1.90	0.35
35	24469.6	22528.0	7.93	1.15	8639.2	8389.1	2.90	2.99
36	15798.3	14843.7	6.04	1.82	17182.4	16873.4	1.80	1.52
37	15882.9	13523.3	14.86	1.64	19731.0	18727.6	5.09	1.28
38	17632.1	17510.1	0.69	1.72	20354.1	19585.3	3.78	1.26
39	32509.9	31571.3	2.89	0.91	27103.0	26270.0	3.07	0.95
40	17215.8	16450.6	4.44	1.70	20545.4	20283.2	1.28	1.28
41	51457.6	49679.2	3.46	0.57	31816.6	30852.7	3.03	0.81
42	16790.2	15714.5	6.41	1.70	19153.3	18296.3	4.47	1.33
43	35841.8	36144.1	-0.84	0.86	33928.0	33318.4	1.80	0.77
44	91889.9	89753.2	2.33	0.32	71137.8	69762.1	1.93	0.37
45	20460.1	20102.5	1.75	1.47	23879.4	22946.5	3.91	1.07
46	58583.7	56313.6	3.87	0.50	49221.7	47697.1	3.10	0.52
47	33070.5	31123.0	5.89	0.87	36435.3	35344.9	2.99	0.71
48	63828.6	61811.4	3.16	0.46	48558.7	47160.1	2.88	0.53
49	43805.7	41910.5	4.33	0.67	31221.1	30304.5	2.94	0.83
50	35189.3	33954.9	3.51	0.84	28348.8	28434.8	-0.30	0.94
51	27740.3	26910.0	2.99	1.07	21197.1	20114.8	5.11	1.19
52	34797.2	32257.1	7.30	0.81	30586.8	29759.2	2.71	0.85
53	26104.1	25091.7	3.88	1.12	22028.8	21365.8	3.01	1.17
54	48264.8	43701.8	9.45	0.57	38579.2	36345.0	5.79	0.65
55	44738.3	42834.0	4.26	0.65	43918.4	42905.0	2.31	0.59
56	26001.2	24871.1	4.35	1.12	17986.6	16612.4	7.64	1.37
57	29665.7	28336.2	4.48	0.98	15455.9	14394.3	6.87	1.61
58	61499.5	58287.4	5.22	0.47	38228.6	36562.3	4.36	0.67
59	29608.9	26340.6	11.04	0.92	24898.6	23607.3	5.19	1.01
60	36469.9	34421.8	5.62	0.79	30528.6	29483.9	3.42	0.84
61	41570.2	40116.2	3.50	0.71	41957.4	40697.0	3.00	0.62
62	16142.3	15302.8	5.20	1.79	14210.9	13792.6	2.94	1.82
63	24628.7	22527.1	8.53	1.14	22457.7	21239.8	5.42	1.12
64	41754.6	39391.2	5.66	0.69	21299.2	20111.2	5.58	1.18
65	28395.4	26556.3	6.48	1.01	26164.4	25126.8	3.97	0.98
66	23881.1	22326.9	6.51	1.20	20783.4	20423.2	1.73	1.26
67	33203.8	31302.0	5.73	0.87	28522.3	27000.1	5.34	0.88
68	23113.4	22481.2	2.74	1.29	20162.6	19362.4	3.97	1.27

69	33376.4	31886.2	4.46	0.87	32773.4	32261.2	1.56	0.80
70	33528.6	32049.5	4.41	0.87	32457.2	31814.2	1.98	0.80
71	24428.9	23624.1	3.29	1.21	9249.8	9682.5	-4.68	3.01
72	31462.9	29439.7	6.43	0.91	25443.6	23852.3	6.25	0.98
73	20572.6	19953.7	3.01	1.44	25716.5	24580.8	4.42	0.99
74	42602.6	42039.3	1.32	0.71	17165.6	16871.2	1.72	1.52
75	36428.2	35525.1	2.48	0.82	13229.4	13968.1	-5.58	2.12
76	37501.8	36290.9	3.23	0.79	36613.6	34696.8	5.24	0.69
77	27474.6	25599.8	6.82	1.04	24747.8	23573.2	4.75	1.03
78	47272.4	44572.8	5.71	0.61	42789.6	41243.1	3.61	0.60
79	56813.2	55078.3	3.05	0.52	24305.7	23330.8	4.01	1.05
80	15174.2	15556.4	-2.52	2.06	16569.0	16078.5	2.96	1.56
81	70684.1	68125.9	3.62	0.42	56434.4	55114.2	2.34	0.46
82	30116.5	27607.8	8.33	0.93	18247.7	16847.5	7.67	1.35
83	19813.5	18112.8	8.58	1.41	15119.1	14976.5	0.94	1.74
84	44855.8	44369.4	1.08	0.67	37498.5	36818.5	1.81	0.70
85	14464.4	13573.6	6.16	1.98	8742.4	7508.5	14.11	2.62
86	32222.6	29259.6	9.20	0.86	21682.9	20443.6	5.72	1.16
87	31256.7	30094.9	3.72	0.94	21981.3	21013.6	4.40	1.16
88	26089.5	25472.7	2.36	1.14	5681.8	5545.0	2.41	4.57
89	73609.5	71721.1	2.57	0.40	32616.2	33389.3	-2.37	0.84
90	29872.2	28034.8	6.15	0.96	34197.2	32641.7	4.55	0.74
91	28012.7	26872.0	4.07	1.05	13763.9	13620.4	1.04	1.91
92	34338.6	32558.4	5.18	0.84	26423.9	25314.4	4.20	0.97
93	16285.2	15261.0	6.29	1.76	19313.6	18930.7	1.98	1.35
94	18432.3	18440.3	-0.04	1.66	22954.6	21823.4	4.93	1.10
Leu266 (1)	31837.8	31715.7	0.38	0.96	9545.2	9460.5	0.89	2.77
96	28755.1	26556.3	7.65	0.98	30222.1	29701.3	1.72	0.87
97	17757.0	17989.4	-1.31	1.74	19482.8	19272.2	1.08	1.35
98	17949.9	16534.6	7.88	1.57	17675.3	17265.6	2.32	1.47
99	25584.9	24713.4	3.41	1.15	24339.5	23911.1	1.76	1.07
100	24178.5	22336.8	7.62	1.17	21542.1	21433.0	0.51	1.23
101	234531.0	229894.0	1.98	0.13	57511.6	56399.8	1.93	0.45
102	14666.7	15239.7	-3.91	2.16	15372.3	14400.7	6.32	1.62
Leu266 (2)	33363.5	32819.3	1.63	0.90	8277.5	7627.6	7.85	2.97
104	35643.0	34330.2	3.68	0.83	26810.3	25479.9	4.96	0.94
105	23684.5	22365.6	5.57	1.22	18815.5	18348.1	2.48	1.38
106	51549.6	47264.5	8.31	0.54	42319.8	38990.2	7.87	0.58
107	15279.4	14527.3	4.92	1.90	19052.4	19001.5	0.27	1.39
108	21336.8	18847.9	11.66	1.27	19151.9	17376.4	9.27	1.26
109	8244.5	9028.6	-9.51	4.05	8835.2	8739.4	1.08	2.98
110	31050.6	29978.9	3.45	0.95	24420.0	23507.7	3.74	1.05
111	22547.3	21330.4	5.40	1.28	25193.6	24941.6	1.00	1.05
112	68972.6	66896.6	3.01	0.43	43369.5	42496.0	2.01	0.60
113	68902.9	66059.8	4.13	0.43	56993.4	54316.0	4.70	0.45

114	25318.7	23029.7	9.04	1.10	41254.3	37876.9	8.19	0.59
115	40745.0	38333.5	5.92	0.71	31822.7	31047.9	2.43	0.82
116	41125.8	38145.0	7.25	0.69	38587.4	37524.4	2.75	0.67
V184					9487.4	8974.9	5.40	2.66
118					19143.8	17643.1	7.84	1.28
119					17819.9	17224.7	3.34	1.44
120					19221.1	18358.0	4.49	1.32
121					19355.6	18353.4	5.18	1.31

Tabelle 7.8: Rohdaten zur Sättigung bei 7,87 ppm

Nr	Kontrolle ohne Ligand				ILV-GTA gesättigt mit UDP-Gal			
	Intensität Referenz	Intensität Sättigung	RIR	Δ (RIR)	Intensität Referenz	Intensität Sättigung	RIR	Δ (RIR)
1	22843.8	20764.1	9.10	1.07	28953.1	26647.8	7.96	1.02
2	26513.7	24604.5	7.20	0.94	28157.7	27173.9	3.49	1.10
I123	34414.9	33192.9	3.55	0.75	24164.8	23084.2	4.47	1.27
I192	31000.4	28833.4	6.99	0.81	16485.9	15871.1	3.73	1.87
5	55562.4	54730.1	1.50	0.48	46519.1	45842.3	1.45	0.68
6	23662.3	21942.4	7.27	1.05	28311.7	27866.9	1.57	1.11
7	60072.9	55704.8	7.27	0.42	59440.5	57432.8	3.38	0.52
8	19589.1	18121.6	7.49	1.27	17655.5	16995.6	3.74	1.75
9	27358.3	24776.4	9.44	0.89	28613.8	27045.5	5.48	1.06
10	16654.7	16730.5	-0.46	1.62	21831.8	20784.0	4.80	1.40
11	9095.3	8413.8	7.49	2.74	14214.9	13277.3	6.60	2.11
12	44807.5	42879.5	4.30	0.57	32085.6	31665.6	1.31	0.99
13	106552.0	105087.0	1.37	0.25	82321.3	82144.7	0.21	0.39
14	26824.4	25853.9	3.62	0.97	21335.0	20283.0	4.93	1.43
15	48233.0	47845.1	0.80	0.55	57707.0	57756.7	-0.09	0.56
16	30147.3	27262.6	9.57	0.81	32460.2	31607.2	2.63	0.96
17	13053.4	13333.2	-2.14	2.10	10020.8	8558.2	14.60	2.73
18	50146.8	47151.8	5.97	0.50	49521.3	47576.4	3.93	0.62
V351	21700.9	21394.5	1.41	1.22	26751.0	26531.4	0.82	1.19
20	119456.0	118611.0	0.71	0.22	24328.3	23678.5	2.67	1.28
21	38305.3	36344.8	5.12	0.67	42177.0	41034.9	2.71	0.74
22	20266.3	19015.4	6.17	1.25	36245.5	34805.2	3.97	0.85
23	30129.1	28692.4	4.77	0.85	30693.9	29615.7	3.51	1.01
24	11977.9	11285.1	5.78	2.12	13005.1	13167.1	-1.25	2.49
25	64847.9	62385.8	3.80	0.40	25571.5	24794.2	3.04	1.21
26	19654.4	19022.2	3.22	1.32	28525.0	28149.4	1.32	1.11
27	38837.6	37808.4	2.65	0.67	43459.8	42138.6	3.04	0.71
28	17570.3	16951.5	3.52	1.48	27375.3	26417.5	3.50	1.13
29	25975.2	24713.8	4.86	0.98	35580.1	34769.3	2.28	0.88
30	30491.6	27776.4	8.90	0.80	33790.6	33045.5	2.21	0.93
31	21860.5	21195.4	3.04	1.19	17264.6	16738.9	3.04	1.80
32	11149.1	11608.2	-4.12	2.51	8408.0	8075.0	3.96	3.66

33	44801.7	42111.1	6.01	0.56	49069.4	46990.5	4.24	0.63
34	57370.4	56121.1	2.18	0.46	81019.3	79973.8	1.29	0.39
35	18586.2	17079.3	8.11	1.33	8010.0	8059.1	-0.61	4.02
36	13408.7	12946.2	3.45	1.94	18131.9	17848.6	1.56	1.74
37	10240.6	10033.0	2.03	2.57	20711.0	19683.7	4.96	1.47
38	15022.7	14110.5	6.07	1.68	21862.4	21198.3	3.04	1.42
39	27332.4	25767.9	5.72	0.93	28162.6	28593.8	-1.53	1.15
40	13786.8	13351.3	3.16	1.89	22014.9	21266.9	3.40	1.41
41	45182.8	43610.2	3.48	0.57	32236.0	30917.1	4.09	0.95
42	12406.8	11828.7	4.66	2.07	20322.4	19094.8	6.04	1.48
43	29913.1	28948.5	3.22	0.87	34902.6	34053.2	2.43	0.90
44	75881.0	74619.1	1.66	0.35	73010.1	72509.6	0.69	0.44
45	14816.9	13871.1	6.38	1.70	26003.8	24112.3	7.27	1.14
46	41668.0	40500.7	2.80	0.63	51740.0	50456.6	2.48	0.60
47	27345.1	27150.1	0.71	0.98	39855.6	39148.8	1.77	0.79
48	55120.5	53090.8	3.68	0.47	47193.3	45732.4	3.10	0.66
49	36088.4	34514.7	4.36	0.71	32158.1	32304.0	-0.45	1.00
50	28019.5	27495.8	1.87	0.94	32281.2	31642.6	1.98	0.97
51	23328.7	22953.4	1.61	1.13	22105.3	21643.0	2.09	1.42
52	30218.7	28509.9	5.65	0.84	31780.1	31521.9	0.81	1.00
53	22353.4	20426.3	8.62	1.10	22493.4	22023.1	2.09	1.39
54	40523.9	36990.4	8.72	0.61	40451.4	38615.4	4.54	0.76
55	38283.3	37073.7	3.16	0.68	47799.6	46537.4	2.64	0.65
56	21377.9	19354.7	9.46	1.14	15613.1	15088.3	3.36	1.98
57	25759.5	23906.5	7.19	0.97	13713.7	13188.2	3.83	2.25
58	51702.2	48903.7	5.41	0.49	40013.8	39890.9	0.31	0.80
59	25702.1	23866.7	7.14	0.97	24684.2	23457.1	4.97	1.23
60	29754.8	28238.0	5.10	0.86	32281.9	30273.8	6.22	0.93
61	32308.7	31578.2	2.26	0.81	43173.8	42065.8	2.57	0.72
62	12507.2	11868.2	5.11	2.04	14471.5	14025.6	3.08	2.15
63	20633.1	19349.5	6.22	1.22	23963.4	22180.5	7.44	1.24
64	34323.0	31464.9	8.33	0.72	22066.0	20512.8	7.04	1.35
65	19727.8	19789.1	-0.31	1.37	26067.0	25923.6	0.55	1.22
66	17230.7	16396.4	4.84	1.48	22912.3	20958.2	8.53	1.28
67	23888.0	22378.3	6.32	1.05	29198.4	28536.8	2.27	1.07
68	18146.9	18591.5	-2.45	1.52	18593.9	18311.5	1.52	1.70
69	26906.5	26154.3	2.80	0.97	36146.0	34999.8	3.17	0.86
70	26206.4	24221.0	7.58	0.95	35229.1	34076.1	3.27	0.88
71	20240.2	19244.5	4.92	1.26	8866.2	8603.5	2.96	3.51
72	26313.7	24764.3	5.89	0.96	24750.2	24369.6	1.54	1.27
73	16904.5	16887.4	0.10	1.59	25959.0	26858.7	-3.47	1.28
74	35354.1	34361.5	2.81	0.74	12982.8	13893.7	-7.02	2.64
75	30750.8	30415.5	1.09	0.86	10227.0	9461.3	7.49	2.90
76	32837.9	31917.0	2.80	0.80	38039.7	38116.8	-0.20	0.84
77	22445.7	22137.6	1.37	1.18	25862.1	25707.0	0.60	1.23

78	39787.6	37415.5	5.96	0.64	43435.8	41612.6	4.20	0.71
79	49249.1	47479.0	3.59	0.53	27579.5	26247.1	4.83	1.11
80	13166.4	13326.0	-1.21	2.07	18287.7	17863.5	2.32	1.71
81	58299.0	56193.7	3.61	0.44	55242.1	53724.0	2.75	0.56
82	24922.2	23431.3	5.98	1.01	20978.7	20233.5	3.55	1.47
83	16013.3	15557.4	2.85	1.63	15033.8	15024.2	0.06	2.13
84	34611.5	33097.1	4.38	0.74	39690.9	38119.0	3.96	0.78
85	10979.1	11600.2	-5.66	2.58	8572.2	8857.4	-3.33	3.86
86	25888.1	24835.7	4.07	1.00	23093.7	21835.8	5.45	1.31
87	26956.8	26225.6	2.71	0.97	20774.8	20638.9	0.65	1.53
88	20040.0	19732.0	1.54	1.32	3375.0	3789.2	-12.27	10.64
89	59604.2	57663.7	3.26	0.44	44795.5	43246.7	3.46	0.69
90	25256.9	25063.3	0.77	1.06	36665.0	35909.7	2.06	0.86
91	21447.1	21115.3	1.55	1.23	16317.3	16046.8	1.66	1.93
92	27837.3	26001.5	6.59	0.90	27378.7	26613.6	2.79	1.14
93	12070.7	11572.5	4.13	2.14	20017.8	19611.9	2.03	1.57
94	14825.2	15150.9	-2.20	1.85	23521.7	23373.2	0.63	1.35
Leu266 (1)	26356.1	26094.9	0.99	1.01	10332.5	10287.3	0.44	3.09
96	23401.9	22575.1	3.53	1.11	32662.5	32603.4	0.18	0.98
97	14272.7	14189.1	0.59	1.87	20368.6	20189.5	0.88	1.56
98	15199.0	14669.8	3.48	1.71	18006.0	17306.3	3.89	1.71
99	21252.1	20734.9	2.43	1.23	25380.4	24611.7	3.03	1.22
100	19736.5	18589.2	5.81	1.28	22444.2	21612.2	3.71	1.37
101	192621.0	188811.0	1.98	0.14	60971.6	59200.3	2.91	0.51
102	12519.1	11426.7	8.73	1.96	14925.9	14643.6	1.89	2.11
Leu266 (2)	26497.4	25606.3	3.36	0.98	7605.6	6518.0	14.30	3.62
104	29178.2	28160.0	3.49	0.89	28371.6	27899.0	1.67	1.11
105	18549.9	18930.0	-2.05	1.48	17778.2	16199.4	8.88	1.64
106	43859.7	40795.5	6.99	0.57	44410.7	42084.4	5.24	0.68
107	13481.8	12925.5	4.13	1.91	20988.5	20368.7	2.95	1.48
108	18193.3	17182.9	5.55	1.40	20951.7	19526.6	6.80	1.43
109	7546.2	7791.3	-3.25	3.68	9025.9	9069.3	-0.48	3.57
110	24718.3	24023.6	2.81	1.06	25185.0	24602.8	2.31	1.24
111	17952.2	16942.1	5.63	1.41	24977.0	24683.9	1.17	1.27
112	54733.7	53415.9	2.41	0.48	43977.3	43323.0	1.49	0.72
113	60987.1	58827.0	3.54	0.43	60791.5	58803.6	3.27	0.51
114	22355.5	21598.1	3.39	1.16	42400.5	40179.0	5.24	0.72
115	33634.9	33051.9	1.73	0.79	34314.5	33011.4	3.80	0.90
116	34654.7	32569.6	6.02	0.73	39346.0	37993.6	3.44	0.79
V184					8840.6	8005.3	9.45	3.28
118					17247.4	15716.7	8.87	1.69
119					16488.3	16589.1	-0.61	1.95
120					18725.3	17834.6	4.76	1.63
121					16814.3	15368.3	8.60	1.74

Tabelle 7.9: Verwendete Rauschintensitäten. Zur Bestimmung des Signalrauschens wurden im Bereich von -2,5 bis -1 ppm in der direkten und im Bereich von 6 bis 14 ppm in der indirekten Dimension die Intensitäten aller Signale bestimmt. I_{noise} entspricht der Standardabweichung der ausgewerteten Signalintensitäten.

Sättigungsfrequenz	Kontrolle ohne Ligand		ILV-GTA gesättigt mit UDP-Gal	
	$I_{\text{noise,ref}}$	$I_{\text{noise,sat}}$	$I_{\text{noise,ref}}$	$I_{\text{noise,sat}}$
5,91 ppm	281	272	359	354
5,56 ppm	302	303	263	255
7,87 ppm	266	272	317	314

7.4 SVD-Analyse für Titration von ILV-GTA mit UDP-Gal

Abbildung 7.16 zeigt die aus der SVD-Analyse ermittelten Komponenten. Nur die ersten vier Komponenten besitzen einen Autokorrelationswert größer als Null und spiegeln wahrscheinlich Bindungsereignisse wieder. Die Vektoren der ersten beiden Komponenten zeigen einen gleichmäßigen Verlauf. Bei den Komponenten 3 und 4 kommt es zu leichten Unebenheiten in den Vektoren. Um die tatsächliche Anzahl an vorkommenden Bindungsereignissen zu bestimmen, wurden die Daten mit zwei, drei und vier Komponenten rekonstruiert. In Abbildung 7.17 ist erkennbar, dass die mit vier Komponenten rekonstruierten Daten etwa den Rohdaten entsprechen. Durch eine Rekonstruktion mit mehr Komponenten wird nur das Signalrauschen erhöht. Neben dem freien Zustand des Proteins können also drei Bindungsereignisse nachgewiesen werden. Die mit vier Komponenten rekonstruierten Daten wurden für weitere Analysen genutzt.

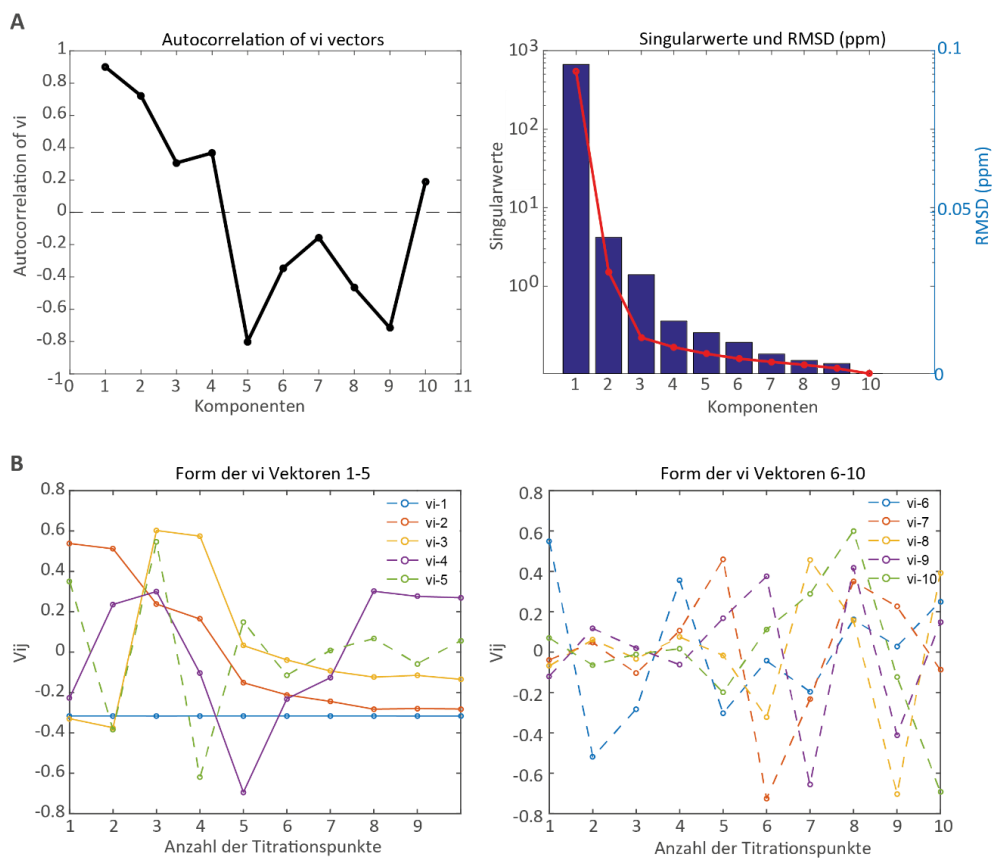


Abbildung 7.16: Ergebnis der SVD-Analyse. (A) Größe und Autokorrelation der einzelnen Komponenten. (B) Form der Vektoren der einzelnen Komponenten.

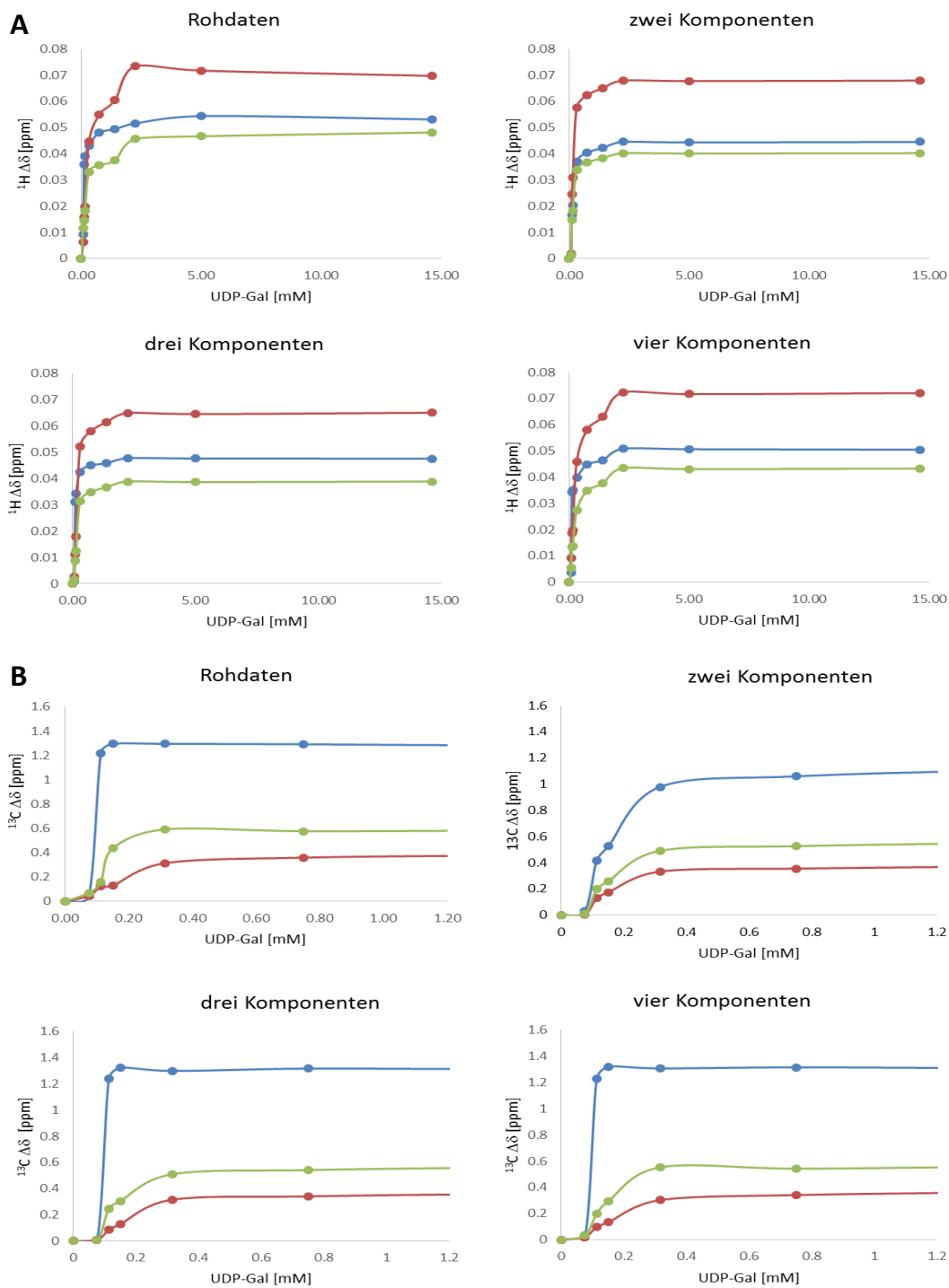


Abbildung 7.17: Rohdaten und rekonstruierten Daten nach SVD-Analyse. Aufgetragen ist die chemische Verschiebungsdifferenz einzelner Signale in der ^1H - bzw. ^{13}C -Dimension gegen die UDP-Gal-Konzentration. In **(A)** ist die gesamte Titration dargestellt. **(B)** zeigt nur die ersten Punkte der Titration bis zu einer UDP-Gal-Konzentration von 800 μM . Die Daten zeigen, dass nur die mit vier Komponenten rekonstruierten Daten den Verlauf der Rohdaten widerspiegeln. Bei der Nutzung von weniger Komponenten kommt es zu einem Informationsverlust.

DANKSAGUNG

Ich bedanke mich bei **Prof. Dr. Thomas Peters**, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, an diesen interessante Themen zu forschen. Durch die vielen wertvollen Diskussionen und Ideen, die fortwährende Unterstützung und die hervorragende Betreuung konnte ich mich fachlich und persönlich weiterentwickeln.

Für die ergiebigen Diskussionen und ihren unermüdlichen Einsatz für dieses Projekt danke ich auch **Prof. Dr. Monica M. Palcic**.

Ich danke **Prof. Dr. Volker Dötsch** für die Möglichkeit die Tripelresonanzexperimente an der Goethe Universität Frankfurt am Main durchzuführen und **Dr. Frank Löhr** für die Hilfe bei der Aufnahme der Spektren.

Für die Synthese der verwendeten Substanzen möchte ich **Prof. Dr. Beat Ernst** von der Universität Basel und **Wilfried Hellebrandt** von der Universität zu Lübeck danken.

Auch das angenehme Arbeitsklima am Institut für Chemie hat dem Erstellen dieser Arbeit beigetragen. Besonders möchte ich mich bei **Dr. Thorsten Biet** für seine offene Tür bei jeglichen NMR- und auch Lebensfragen bedanken. Ich danke **Dr. Hannelore Peters, Dr. Karsten Seeger** und **PD Dr. Thomas Weimar** für die vielen inspirierenden Diskussionen und ihre Hilfe bei experimentellen Problemen. Mein größter Dank gilt auch **Dr. Lena Lisbeth Grimm** und **Dr. Alvaro Mallagaray de Benito** für die Einführung in die Themen und die sehr gute Zusammenarbeit. Ich danke auch **Friedemann Flügge** für die Weiterführung der Projekte sowie **Nikolai Yürttagül, Robert Creutzmacher** und **Till Zickmantel**, die durch ihre Mitarbeit verschiedene Aspekte des Themas genauer beleuchten konnten. Ich danke auch allen ehemaligen und derzeitigen Mitarbeitern für ihre Hilfsbereitschaft und die motivierende Arbeitsatmosphäre: **Christiane Blunk, Nora Begemann, Mailin Döpkens, Brigitte Fiege, Anika Hellberg, Elisabeth Höltig, Thies Köhli, Sarah Leineweber, Mila Leuthold, Petra Lipp, Rosa Pulz, Barbara Richer, Tobias Schöne, Sarah Schönig, Anna Tomhardt** und **Cordula Windler**.

Für die Finanzierung des Projektes danke ich der *Deutschen Forschungsgemeinschaft*.

Von ganzem Herzen danke ich **meinen Eltern, meiner Schwester, meiner ganzen Familie** und **meinen Freunden**. Durch ihre stetige Unterstützung, Ermutigung aber auch Ablenkung konnte ich die Arbeit zu einem erfolgreichen Abschluss bringen.

**Dankt dem Herrn, denn er ist gut
und seine Gnade hört niemals auf!**

Psalm 118,1