

# Entwicklung von Lanthanoid-Tags für die biomolekulare NMR-Spektroskopie

Dissertation

zur Erlangung des mathematisch-naturwissenschaftlichen Doktorgrades

*Doctor rerum naturalium*

der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von

Fabian Peters

aus Oldenburg

Göttingen 2010

D 7

Referent:

Prof. Dr. Ulf Diederichsen,  
Georg-August-Universität, Göttingen

Korreferent:

Prof. Dr. Christian Griesinger,  
Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Dezember 2010



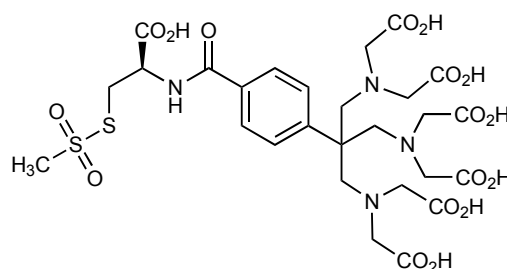
*für Oma Lülala*



## Zusammenfassung

Paramagnetische Markierungen, so genannte Tags, finden in der Protein-NMR-Spektroskopie immer breitere Anwendung. Ein chelatisierender Ligand wird dabei mit einem paramagnetischen Lanthanoidion beladen und über eine Disulfidbrücke selektiv an einzelnen Cystein-Aminosäureresten des Proteins verankert. Wird eine derart markierte NMR-Probe in ein starkes Magnetfeld eingebracht, so erfolgt eine partielle Ausrichtung der Gesamtheit der Moleküle entlang des Feldes, bedingt durch die magnetisch anisotrope Suszeptibilität der paramagnetischen Ionen. Durch die kovalente Verbindung mit dem Liganden wird die Vorzugsorientierung des Ions auf das zu untersuchende Protein übertragen. Residuale dipolare Kopplungen (RDCs), die in isotroper Lösung durch Diffusion und Gleichverteilung zu Null gemittelt sind, sowie Pseudokontaktverschiebungen (PCSs), werden messbar. Für die dreidimensionale Strukturaufklärung sind beide Messgrößen sehr wertvolle Parameter, da sie neben Distanz- vor allem Winkelinformationen in Form relativer Orientierungen von Interspinvektoren enthalten. Eine besondere Bedeutung kommt der paramagnetischen NMR-Spektroskopie bei der Beschreibung relativer Bewegungen zweier Proteindomänen zu, da RDCs dynamische Prozesse im Bereich von Piko- bis Millisekunden beschreiben.

Bislang wurden im Arbeitskreis EDTA-basierte Tags verwendet. Hiermit traten jedoch zahlreiche Probleme auf, sowohl in Bezug auf die Probenherstellung als auch die Größe der RDCs und deren Korrelation mit den berechneten Daten. Innerhalb der vorliegenden Arbeit wurde ein neuartiger, paramagnetischer Tag auf der Grund-



**Abb. 1:** Cys-Ph-TAHA.

lage des neunzähligen TAHA-Liganden (*triaminohexaacetate*) entwickelt, da dieser Chelator die Koordinationssphäre von Lanthanoidionen besser absättigt als EDTA. Die Erhöhung der Koordinationszahl unterbindet ungewollte Interaktionen des Proteins mit dem Metallion. Gleichzeitig lässt sich erwarten, dass ein stärkerer sterischer Anspruch des Tags zu einer Verstärkung der Molekülausrichtung führt.

Der Cys-Ph-TAHA-Tag (Cysteinyl-Phenyl-TAHA, siehe Abbildung 1) wurde in neun Stufen erfolgreich dargestellt. Dabei ließ die Schlichtheit der Synthese auch Maßstäbe von mehreren hundert Milligramm zu, wodurch Cys-Ph-TAHA sehr leicht zugänglich ist. Für die Herstellung Tag-modifizierter, beladener Proteinproben wurde eine effektive und reproduzierbare Methode entwickelt, mit der der zuvor beladene Tag am Protein angebracht werden kann. Auch dieses Protokoll zeichnet sich durch eine einfache Durchführbarkeit aus.

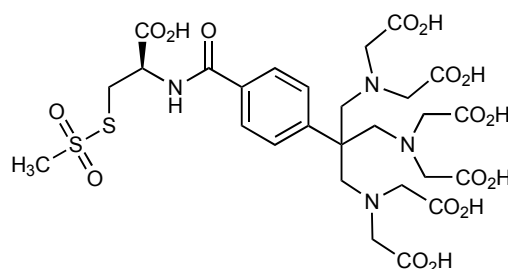
Der mit paramagnetischem  $Tb^{3+}$  und  $Tm^{3+}$  vorbeladene Cys-Ph-TAHA-Tag wurde an zwei verschiedene Ubiquitin-Cysteinmutanten (T12C und S57C) gebunden. Ubiquitin eignet sich hervorragend als Testprotein, da es einerseits relativ unempfindlich gegenüber diversen äußeren Einflüssen, wie pH Wert, Temperatur oder Puffersystem ist und andererseits die Aufnahme von gut aufgelösten NMR-Spektren ermöglicht. Darüber hinaus ist die NMR-Struktur von Ubiquitin bekannt und konnte als Referenz bei der Zurückrechnung der RDCs und PCSs genutzt werden.

Aus den Spektren konnten große RDCs und PCSs von hoher Qualität extrahiert werden, die in exzellenter Übereinstimmung mit den zurück berechneten Werten waren. Es zeigte sich, dass der neunzählige TAHA-Ligand für die Anforderungen der paramagnetischen NMR-Spektroskopie sehr gut geeignet ist.

Mit dem Cys-Ph-TAHA-Tag wurde ein viel versprechendes Werkzeug für die NMR-Spektroskopie entwickelt. Zukünftig soll Cys-Ph-TAHA zur Strukturaufklärung und -validierung eingesetzt werden. Darüber hinaus ermöglicht die Größe der erhaltenen RDCs dynamische Untersuchungen an Proteinen mit mehreren Domänen, wie beispielsweise Calmodulin.

## Summary

Paramagnetic labels (tags) have gained increasing interest and application in protein NMR spectroscopy. A chelating ligand is loaded with paramagnetic lanthanide ions and selectively linked via a disulfide bridge to a single cysteine residue. If such a labeled protein sample is introduced into a strong magnetic field, a partial alignment of the molecules occurs along the magnetic field due to the anisotropic magnetic susceptibility of the paramagnetic ions. In consequence of the covalent connection with the ligand, the preferred orientation of the ion is transferred to the protein. Residual dipolar couplings (RDCs), which are averaged to zero in isotropic solution, become observable as well as pseudocontact shifts (PCSs). For the determination of three-dimensional structures both measurands are valuable parameters since they contain information about distances and relative orientations of inter spin vectors. Paramagnetic NMR spectroscopy is of special importance when it comes to the description of relative protein domain motions since RDCs can report on dynamic processes from pico- to milliseconds. To date in our group, tags based on EDTA were used. But with these tags problems had occurred regarding the sample preparation as well as the size of the induced RDCs and their correlation with the back-calculated data. Within this dissertation a new paramagnetic tag based on the nonadentate TAHA ligand (triaminohexaacetate) was developed. The TAHA ligand provides a higher saturation of the coordination sphere of lanthanide ions than EDTA. This increase of coordination should suppress unwanted interactions of the protein side chains



**Abb. 2:** Cys-Ph-TAHA.

with the metal ion. At the same time one can then expect that the sterically higher demanding ligand results in an enhanced molecular alignment.

The Cys-Ph-TAHA tag (cysteiny-phenyl-TAHA, figure 2) was successfully synthesized in nine steps. The simplicity of the synthesis allowed for the large scale production of several hundred milligrams making Cys-Ph-TAHA easily accessible. Additionally, an effective and reproducible method for the preparation of tag-modified and loaded protein samples was established. This procedure is again characterized by its easiness.

Cys-Ph-TAHA, pre-loaded with either paramagnetic  $Tb^{3+}$  or  $Tm^{3+}$ , was tagged to two different single cysteine mutants of ubiquitin (T12C and S57C). Ubiquitin is excellently suitable as a test-protein because it is on the one hand very stable against various conditions like pH, temperature, or the buffer system and produces well resolved NMR spectra. Furthermore, the liquid-state NMR structure of ubiquitin is well known and was used as a reference for the back-calculation of the RDCs and PCSs.

Large RDCs and PCSs of high quality were extracted from the spectra. The experimental data were in excellent agreement with the back-calculated values. It was shown, that the TAHHA ligand satisfies the demands of paramagnetic NMR spectroscopy.

With Cys-Ph-TAHA a promising tool for liquid state NMR spectroscopy was developed. In the future, Cys-Ph-TAHA shall be used both for structure determination and validation. Additionally, the sizes of the obtained RDCs allow further investigations of protein dynamics.

## Zugehörige Publikationen

Peters, F., Maestre Martinez, M., Leonov, A., Kovačič, L., Becker, S. Boelens, R., & C. Griesinger, *Cys-Ph-TAHA: A lanthanide binding tag for RDC and PCS enhanced protein NMR*, Manuskript in Vorbereitung.

# Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Griesinger, für die interessante Aufgabenstellung, die gewährten Freiheiten zur Bearbeitung des Themas und seine stete Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. Diederichsen möchte ich für die Betreuung dieser externen Doktorarbeit von Seiten der Universität Göttingen danken. Ohne seine bereitwillige und freundliche Unterstützung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Dr. Andrei Leonov danke ich für die Unterstützung beim synthetischen Teil dieser Arbeit, Dr. Stefan Becker und Karin Giller danke ich für die Herstellung des Proteins.

Dr. Mitcheell Maestre Martinez bin ich sehr dankbar für die enge und fruchtbare Zusammenarbeit im letzten Jahr dieser Arbeit. Dr. Holger Schmidt danke ich für die Einweisungen in die Protein-NMR-Spektroskopie.

Kerstin Overkamp und Gerhard Wolf danke ich für die Aufnahme von Massenspektren und HPLC-Chromatogrammen, sowie die Einarbeitungen in die HPLC-Anlage und das Massenspektrometer. Danke auch an Dr. Dirk Bockelmann und Jürgen Arve für die Hilfe bei Computer-Problemen aller Art.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Edith Wöltjen, Asst. Prof. Dr. Mate Erdélyi, Dr. Volker Klaukien, Florian Siepel und Sebastian Täubert für die tolle Atmosphäre im Labor. Gleiches gilt für die Bürokollegen Dr. Luigi Russo, Philip Lottmann und Prof. Dr. Uwe Reinscheid.

Des weiteren möchte ich Dr. Mitcheell Maestre Martinez, Dr. Edward d'Auvergne, Florian Siepel, Dr. Donghan Lee, Korvin Walter und David Ban für zahlreiche Diskussion danken.



Ein riesen Dankeschön an alle Korrekturleser!!!

Dem gesamten Arbeitskreis danke ich für die freundliche, angenehme Arbeitsatmosphäre und die allgemeine Hilfsbereitschaft.

André, Alex, Venita, Saskia und Manuel danke ich für die tolle Zeit in Göttingen und die vielen gemeinsamen Unternehmungen.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei meinen Eltern, meiner Schwester und meinen Großeltern bedanken. Dafür, dass sie mich immer unterstützt haben, mir Mut gemacht haben und immer an mich geglaubt haben.

Mirjam...danke, für so viele kleine und große Dinge...

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b>	<b>v</b>
<b>Summary</b>	<b>vii</b>
<b>Zugehörige Publikationen</b>	<b>ix</b>
<b>Danksagungen</b>	<b>x</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Strukturbiologie . . . . .	1
1.2 Ubiquitin . . . . .	2
1.3 Tagging von Proteinen . . . . .	4
1.4 Zielsetzung der Arbeit . . . . .	8
<b>2 Paramagnetische NMR-Spektroskopie</b>	<b>9</b>
2.1 Residuale dipolare Kopplungen . . . . .	9
2.2 Pseudokontaktverschiebungen . . . . .	19
2.3 Lanthanoide . . . . .	22
2.4 Paramagnetische Relaxationsverstärkung . . . . .	23
<b>3 Paramagnetische Tags</b>	<b>25</b>
3.1 Übersicht publizierter Tags . . . . .	25
3.2 Entwicklung des TAHA-basierten Tags . . . . .	33
<b>4 Synthese</b>	<b>37</b>
4.1 Darstellung von Cys-TAHA . . . . .	37
4.2 Synthese von Cys-Ph-TAHA . . . . .	46

4.3	Herstellung der NMR-Proben . . . . .	49
<b>5</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>55</b>
5.1	Pseudokontaktverschiebungen . . . . .	55
5.2	Temperaturverhalten von T12C Tm . . . . .	68
5.3	Residuale dipolare Kopplungen . . . . .	74
5.4	Vergleich der PCS- und RDC-Tensoren . . . . .	78
5.5	Zusammenfassung und Einordnung der Ergebnisse . . . . .	94
<b>6</b>	<b>Experimenteller Teil</b>	<b>97</b>
6.1	Material und Methoden . . . . .	97
6.2	Charakterisierung der Substanzen . . . . .	98
6.3	Protein-NMR . . . . .	99
6.4	Synthesevorschriften . . . . .	103
6.5	Präparation von getagtem, beladenem Ubiquitin . . . . .	115
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>117</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>133</b>
	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>137</b>
	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>139</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>143</b>
	<b>Lebenslauf</b>	<b>187</b>

# Kapitel 1

## Einleitung

### 1.1 Strukturbiologie

Um das Leben auf molekularer Ebene begreifen zu können, ist der Zusammenhang von Struktur und Funktion biologischer Makromoleküle in der Strukturbiologie von großem Interesse.

Für die Strukturaufklärung sind die Röntgenstrukturanalyse und NMR-Spektroskopie die Methoden der Wahl. Mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse wurden bislang annähernd 60000 Strukturen gelöst und in der Proteindatenbank (PDB) hinterlegt. Darunter finden sich auch sehr große Komplexe mit einem Gewicht bis in den unteren MDa-Bereich, wie beispielsweise die große ribosomale 50S Untereinheit aus dem Archaeon *Haloarcula marismortui* (Ban et al. (2000)). Für ein funktionelles Verständnis ist eine statische Kristallstruktur jedoch in der Regel nicht ausreichend. Durch die Entwicklung dreidimensionaler NMR-Methoden (Griesinger et al. (1987); Oschkinat et al. (1988); Ikura et al. (1990)) können heutzutage Strukturen monomerer Proteine von 30–50 kDa standardisiert aufgeklärt werden.

Mit Hilfe der NMR-Spektroskopie können Proteine oder Oligonukleotide in ihrer nativen Konformation unter annähernd physiologischen Bedingungen gemessen werden. Ein herausragender Unterschied zur Röntgenstrukturanalyse besteht darin, dass mittels NMR-Spektroskopie Einblicke in die Dynamik von Systemen gewonnen werden können. Eine besondere Bedeutung kommt hierbei den residualen dipolaren Kopplungen (*residual dipolar couplings*, RDCs) zu. Diese Parameter sind in isotro-

per Lösung zu Null gemittelt. Für die Messung von RDCs bedarf es deshalb einer partiellen Ausrichtung des Teilchenensembles. Dies wird in den Abschnitten 1.3.2 und 2.1 näher behandelt. RDCs sind sensitiv für Bewegungen im Bereich von Piko- bis Millisekunden und überspannen damit auch das Zeitfenster von 500 ns–500  $\mu$ s, in welchem Relaxationsmessungen unempfindlich sind. Viele, für die Proteinfunktion wichtige dynamische Prozesse, verlaufen jedoch langsamer als die rotatorische Korrelationszeit  $\tau_c$ , welche für Ubiquitin etwa 4 ns beträgt (Lakomek et al. (2006); Meiler et al. (2003); Peti et al. (2002)). So konnten beispielsweise mit Hilfe von RDCs bis dahin verborgene Bewegungen im Proteinrückgrat von Ubiquitin identifiziert werden. Ein auf Grundlage dieser RDC-Daten entwickeltes Strukturensemble (EROS, (*ensemble refinement with orientational restraints*)) deckt die gesamte strukturelle Heterogenität ab, die für Ubiquitin mit verschiedenen Komplexpartnern im Kristall beobachtet wurde. Als Mechanismus der molekularen Erkennung impliziert dies eine Konformationsselektion (Lange et al. (2008); Lakomek et al. (2008)).

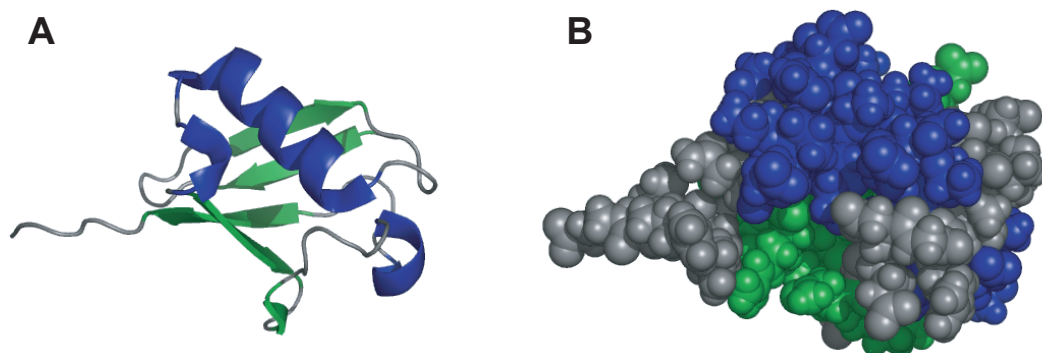
## 1.2 Ubiquitin

Ubiquitin ist ein kleines, globuläres Protein von universeller Bedeutung für eukaryotische Organismen. In diesen ist es in allen Zellen vorhanden und dort an einer Vielzahl von regulatorischen Prozessen, wie zum Beispiel der Zellteilung oder der DNA-Reparatur, beteiligt. Ubiquitin hat eine Molekülmasse von 8.5 kDa und besteht aus 76 Aminosäuren. Die Sequenz verblieb im Laufe der Evolution fast unverändert. So unterscheidet sich die humane Aminosäuresequenz in lediglich drei Aminosäureresten von der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Die humane Ubiquitinsequenz im Einbuchstabenkode lautet:

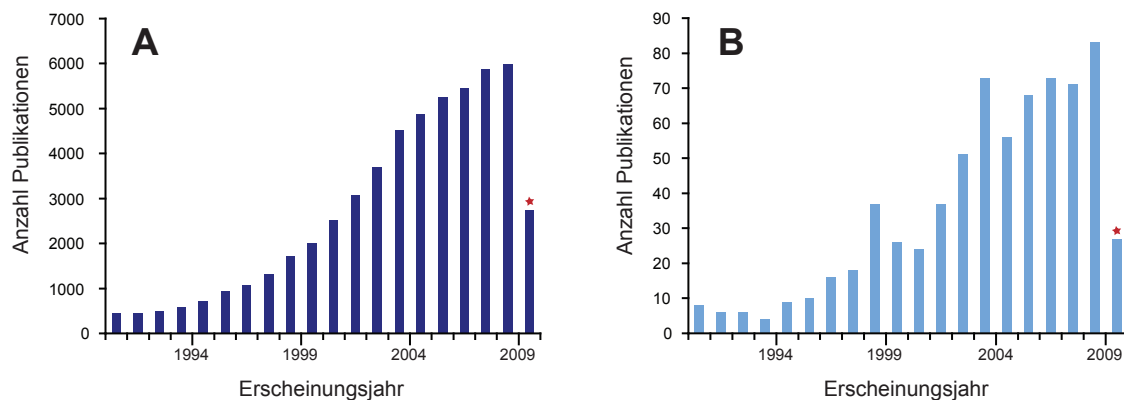
```
MQIFVKTTLTG  KTITILEVEPS  DTIENVKAKI  QDKEGIPPDQ
QRLIFAGKQL   EDGRTLSDYN  IQKESTLHLV  LRLRGG
```

Die Aminosäurereste Threonin 12 und Serin 57 sind farbig markiert, da innerhalb der vorliegenden Arbeit Cystein-Mutanten dieser Reste (T12C und S57C) verwen-

det wurden. In Abbildung 1.1 ist die Ubiquitinstruktur im Bändermodell (A), sowie im Kalottenmodell (B) gezeigt. Ubiquitin weist zwei prägnante Sekundärstrukturelemente auf. Neben der großen  $\alpha$ -Helix (T22–G35) findet sich ein  $\beta$ -Faltblatt bestehend aus vier einzelnen Strängen. Die letzten drei Aminosäuren ragen aus der globulären Form des Proteins heraus. Neben Glycin 76 sind die beiden Lysine 48 und 63 von besonderer Bedeutung für die Funktion des Proteins. Ubiquitin bindet über G76 kovalent an das Zielprotein. Über die Lysine können weitere Ubiquitmoleküle angebunden werden. Ketten bestehend aus mindestens fünf Ubiquitinen, die über K48 miteinander verknüpft sind, fungieren als Erkennungssignal für das Proteasom. Im Proteasom werden Proteine in die einzelnen Aminosäuren zerlegt, weshalb die Markierung durch Ubiquitin plakativ auch als *kiss of death* bezeichnet wird. Für ihre Arbeiten zum Proteinabbau wurden Aaron Ciechanover, Avram Hershko und Irwin Rose mit dem Nobelpreis für Chemie 2004 ausgezeichnet (Hershko et al. (1980); Hershko & Ciechanover (1992, 1998)). Die große wissenschaftliche Bedeutung von Ubiquitin zeigt sich in der Anzahl an Literaturstellen. Eine Datenbanksuche mit SciFinder lieferte über 55000 Treffer (siehe Abbildung 1.2 (A)). Aber auch in der NMR-Spektroskopie ist Ubiquitin häufig Gegenstand der Forschung (siehe Abbildung 1.2 (B)), da es sich aus verschiedenen Gründen hervorragend als Testprotein eignet. Zum einen lässt es sich mit hohen Ausbeuten von etwa  $25 \text{ mg L}^{-1}$  in isotopenmarkiertem Minimalmedium gut exprimieren. Zum anderen ist Ubiquitin



**Abb. 1.1:** Schematische Darstellung von Ubiquitin (PDB-Kode: 1D3Z, Cornilescu et al. (1998)) im Bänder- (A) sowie Kalottenmodell (B). Dabei sind die  $\alpha$ -helicalen Bereiche blau und die  $\beta$ -Faltblätter grün gezeigt.



**Abb. 1.2:** Histogramme der Literaturstellen über Ubiquitin der letzten zwanzig Jahre. Mit dem Suchbegriff „Ubiquitin“ wurden per SciFinder-Suche insgesamt 55084 (A), für „Ubiquitin“ in Kombination mit „NMR“ 729 Einträge in der Literatur gefunden (B). Stand: 28.06.2010.

ausgesprochen stabil und toleriert weite pH- und Temperaturbereiche, sowie diverse Puffersysteme. Darüber hinaus sind in  $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren bei Raumtemperatur die Amidsignale des Proteinrückgrats nahezu perfekt aufgelöst, wodurch sich die Spektren einfach zuordnen lassen. Veränderungen im Spektrum, die durch die Einführung eines paramagnetischen Tags induziert werden, lassen sich ebenfalls gut nachvollziehen.

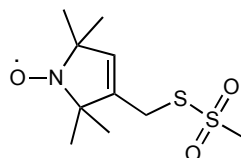
### 1.3 Tagging von Proteinen

Als Tagging wird die kovalente Modifikation eines Biomoleküls bezeichnet. Dabei wird eine Markierung, der so genannte Tag, am zu untersuchenden Molekül angebracht, deren Eigenschaften im Folgenden ausgenutzt werden können. Eine wichtige Anforderung an den angebrachten Tag ist, dass Funktion und Aktivität des Proteins nicht, beziehungsweise nur sehr wenig, beeinflusst werden. Die Funktionalisierung erfolgt dabei in der Regel an ausgewählten Stellen. Verschiedene Tags wurden für die unterschiedlichsten Zwecke entwickelt. Im Folgenden sind einige Beispiele angegeben.

### 1.3.1 Ausgewählte Beispiele

Ein bekanntes Beispiel aus der Zellbiologie ist das *Green Fluorescent Protein* (GFP), welches erstmals aus der Qualle *Aequorea victoria* isoliert wurde (Shimomura et al. (1962); Tsien (1998)). Wird das GFP-Gen mit dem Zielprotein fusioniert, lässt sich anschließend die Expressierung, sowie die räumliche und zeitliche Verteilung des markierten Proteins innerhalb einer Zelle mittels Fluoreszenzspektroskopie verfolgen. Für die Entdeckung und Weiterentwicklung des GFP wurden Osamu Shimomura, Martin Chalfie und Roger Tsien 2008 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet. Ein weiteres bedeutendes Beispiel ist der so genannte His-Tag für die vereinfachte Aufreinigung von Proteinen (Schmitt et al. (1993)). Am C- oder N-Terminus der Aminosäuresequenz werden sechs aufeinander folgende Histidine angefügt. Dieses Hexamotiv weist eine hohe Affinität zu  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen auf. Medien, wie Nickel-NTA Agarose, halten das getaggte Protein mit mikromolarer Affinität zunächst am Säulenmaterial zurück. Durch spätere Elution mit Imidazol wird dann das Protein wieder freigesetzt.

Stabile Radikale, wie der MTSSL-Tag (siehe Abbildung 1.3) finden in der NMR-Spektroskopie Anwendung. Aminosäuren, die sich räumlich nahe am Radikal befinden, sind durch die abstandsabhängige, paramagnetische Verstärkung der Relaxation (PRE, *paramagnetic relaxation enhancement*) nicht mehr, beziehungsweise schwächer, detektierbar, was letztendlich Rückschlüsse auf die Tertiärstruktur des untersuchten Proteins zulässt (Liang et al. (2006); Bayrhuber et al. (2008); Lindfors et al. (2008)). Näheres zur PRE wird im Abschnitt 2.4 beschrieben. Derartige *spin label* werden darüber hinaus auch in der ESR-Spektroskopie (Elektronenspinresonanz-Spektroskopie) verwendet. Da hier nur ungepaarte Elektronen detektiert werden



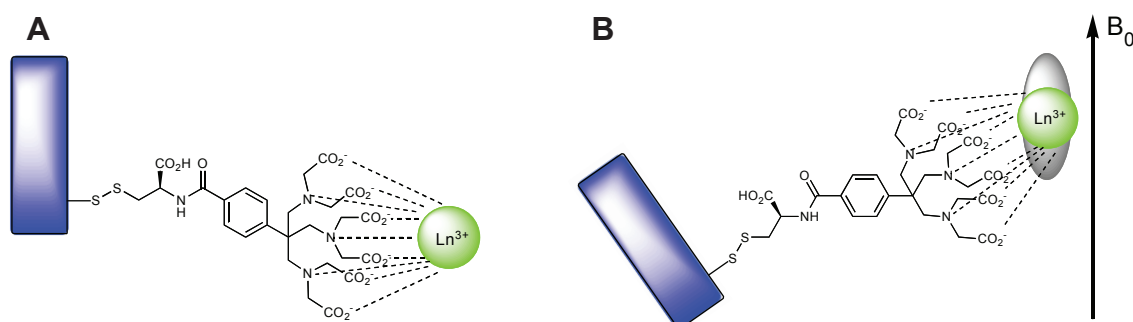
**Abb. 1.3:** MTSSL-Tag zur paramagnetischen Markierung von Proteinen.



können, erweitern diese Tags die Anwendbarkeit der Methode auf Proteine, die keine oder nur eine Metallbindestelle aufweisen.

### 1.3.2 Paramagnetisches Tagging

Bei der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Taggingmethode wird ein Metallchelator kovalent am Protein verankert. Diese Chelatfunktion kann mit einem Lanthanoidion als paramagnetische Quelle beladen werden. Der wichtigste Unterschied zwischen *spin label*-Tags und paramagnetischen Ionen besteht in deren magnetisch anisotroper Suszeptibilität. Die Suszeptibilität beschreibt die Magnetisierbarkeit von Materie in einem externen Magnetfeld. Ist diese anisotrop, so erfolgt eine partielle Orientierung entlang des Feldes. Dieses ist in Abbildung 1.4 schematisch dargestellt. Wenn die Verbindung, der so genannte Linker, zwischen Chelator und Protein hinreichend rigide ist, so erfährt die NMR-Probe in ihrer Gesamtheit eine partielle Ausrichtung. Dipolare Kopplungen, die in isotroper Lösung durch Gleichverteilung, sowie Brown'sche Diffusion herausgemittelt sind, werden messbar. Dies ist für die Strukturaufklärung besonders wertvoll, da dipolare Kopplungen Informationen über Winkel zwischen Interspinvektoren enthalten (Otting (2010); Su & Otting (2010); Pintacuda et al. (2006); Bertini & Luchinat (1999)). Zusätzlich kann mit Hilfe paramagnetischer Lanthanoid-Tags die Dynamik von Proteinen mit mehreren Domänen



**Abb. 1.4:** (A) zeigt schematisch ein paramagnetisch markiertes Protein (blau). Wird dieses in ein externes Magnetfeld eingebracht (B), so erfolgt eine partielle Ausrichtung entlang  $B_0$ , bedingt durch die magnetisch anisotrope Suszeptibilität des Ions (dargestellt durch den grauen Ellipsoiden).

(Rodriguez-Castañeda et al. (2006)) oder auch Protein-Protein-Komplexen (Xu et al. (2009)) untersucht werden. Neben den RDCs werden durch die Anwesenheit des paramagnetischen Ions auch Pseudokontaktverschiebungen (PCSs) induziert. Die Interaktion mit dem ungepaarten Elektron führt zu einer Änderung der chemischen Verschiebung, die auf Grund ihrer Abstands- und Winkelabhängigkeit für die Strukturaufklärung ebenfalls sehr von Nutzen ist. Auf die paramagnetische NMR-Spektroskopie, sowie die Eigenschaften der Lanthanoide wird in Kapitel 2 eingegangen.

Die Verbindung von Tag und Protein erfolgt, wie auch bei den *spin label*-Tags, spezifisch über eine Disulfidbrücke. Demzufolge wird für die selektive Markierung ein einzelnes, Lösungsmittel-exponiertes Cystein benötigt. Die Seitenkette des Cysteins sollte dabei vom Protein weg zeigen und möglichst frei zugänglich sein. Das Cystein wird, sofern nicht natürlich vorhanden, durch Punktmutation einer Aminosäure eingeführt. Für die Entwicklung der *site-directed mutagenesis* wurde 2003 der Nobelpreis für Chemie an Kary B. Mullis und Michael Smith verliehen.

Für paramagnetische Tags gelten einige spezielle Anforderungen. Idealerweise ist der Tag klein gegenüber dem Protein, um Einflüsse auf Struktur und Dynamik zu minimieren. Darüber hinaus muss der Chelator so gestaltet sein, dass er das Lanthanoidion mit hoher Affinität zu binden vermag, ohne gleichzeitig diastereomere Komplexe auszubilden. Dieser wichtige Punkt wird in Kapitel 3 näher behandelt.

## 1.4 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der Arbeit war es, einen neuen paramagnetischen Tag als Werkzeug für die NMR-Spektroskopie zu entwickeln und diesen zu synthetisieren. In der Vergangenheit wurden im Arbeitskreis bereits diverse EDTA-basierte Tags synthetisiert und an verschiedenen Proteinen angebracht. Die erhaltenen RDCs waren jedoch relativ klein und dementsprechend fehlerbehaftet. Zudem wichen selbst die größeren, experimentell bestimmten Werte mitunter stark von den berechneten ab. Dies wurde auf Interaktionen zwischen geladenen Aminosäureresten anderer, beziehungsweise des eigenen Proteinmoleküls mit den freien Koordinationsstellen am Lanthanoidion zurück geführt. Anstelle von EDTA sollte ein neuer Ligand gefunden werden, der die Koordinationsphäre von Lanthanoidionen möglichst vollständig absättigt und diese ungewollten Interaktionen unterbindet (siehe Kapitel 3). Gleichzeitig können größere induzierte Effekte von höher koordinierten Lanthanoidionen erwartet werden. Besonders im Hinblick auf dynamische Untersuchungen sind RDCs größer als 10 Hz von Interesse.

Die Eigenschaften des Tags sollten anhand zweier Ubiquitin-Cysteinmutanten und verschiedenen Lanthanoidionen charakterisiert und die jeweiligen RDCs und PCSs bestimmt werden. Darüber hinaus sollte eine verlässliche Methode gefunden werden, vollständig beladene, getaggte Proben zu erhalten, was bislang nicht reproduzierbar gelang.

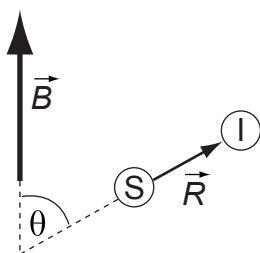
Zuletzt sollten die Tensoren der RDCs und PCSs berechnet und miteinander verglichen werden. Diese wiesen zumeist große Unterschiede zueinander auf, da die Tensoren nicht in gleicher Weise durch Bewegungen des Tags beeinflusst werden. Hier sollte eine Möglichkeit gefunden werden, die Tensoren miteinander vergleichen zu können.

# Kapitel 2

## Paramagnetische NMR-Spektroskopie

### 2.1 Residuale dipolare Kopplungen

Neben der skalaren  $J$ -Kopplung gibt es in Form der dipolaren Kopplung  $D$  eine weitere Interaktion zwischen zwei Kernen. Während  $J$ -Kopplungen über Molekülorbitale übertragen werden, wirken die dipolaren Kopplungen durch den Raum. Die Größe von  $D$  ist unter anderem abhängig vom Abstand der koppelnden Kerne und vom Winkel  $\theta$  des Interspinvektors  $\vec{R}$  zum Magnetfeld  $\vec{B}$  (siehe Abbildung 2.1). Auf Grund dieser Winkelabhängigkeit sind die dipolaren Kopplungen in isotroper Lösung durch die Gleichverteilung über alle Orientierungen zu Null gemittelt. In der Festkörper-NMR sind sie dagegen derart dominant (im Bereich von kHz), dass sie durch Rotieren der Probe im so genannten magischen Winkel von  $\theta = 54.74^\circ$  entfernt werden müssen (MAS, *magic angle spinning*). Wenn die Moleküle in der Probe im zeitlichen Durchschnitt eine leichte Vorzugsorientierung einnehmen, wird die dipolare Kopplung nicht mehr vollständig herausgemittelt und es bleibt eine Restkopplung messbar. Diese wird als residuale dipolare Kopplung (*residual dipolar coupling*, RDC) bezeichnet und ist, abhängig vom Grad der Ausrichtung (Alignment), üblicherweise in der Größenordnung von  $J$ -Kopplungen. Eine partielle Ausrichtung der Probe kann durch externe Orientierungsmedien, wie flüssigkristalline Phasen (Sanders et al. (1994); Bax & Tjandra (1997); Hansen et al. (1998); Ottiger et al. (1998);



**Abb. 2.1:** Definition des Winkels  $\theta$  zwischen dem Interspinvektor  $\vec{R}$  und dem Vektor des statischen Magnetfeldes  $\vec{B}$ .

Prestegard et al. (2000); Peti et al. (2002); Rückert & Otting (2000) und Thiele & Berger (2003)), oder gestreckte beziehungsweise gestauchte Gele erfolgen (Tycko et al. (2000); Haberz et al. (2005); Kobzar et al. (2005); Kummerlöwe et al. (2007)). Abhängig vom Alignmentmedium, werden durch externe Ausrichtung teilweise dipolare Kopplungen von mehreren hundert Hz gemessen. Die Auswertung dieser Spektren ist durch die Dominanz der dipolaren Interaktion, aber auch durch verstärkte Relaxationseffekte erschwert. Deshalb wird versucht, die Größe der RDCs gezielt einzustellen (Sanders & Prestegard (1990); Bax & Tjandra (1997); Hansen et al. (1998); Marx & Thiele (2009)). Am besten eignen sich RDCs in der Größenordnung der skalaren Kopplungskonstante.

Bei dem Ansatz des internen Alignments richten sich die Moleküle auf Grund der magnetisch anisotropen Suszeptibilität gebundener Metallionen im Magnetfeld aus. Eine der ersten RDC-Messungen wurde von Tolman et al. (1995) an eisenhaltigem Cyano-Metmyoglobin durchgeführt. Neben weiteren Untersuchungen an Metalloproteinen (Allegrozzi et al. (2000); Arnesano et al. (2000); Bertini et al. (2003); Xu et al. (2008)) wurden verschiedene paramagnetische Tags entwickelt, um Proteine, die kein Metallzentrum aufweisen, im Magnetfeld ausrichten zu können (siehe Kapitel 3). Der Vorteil des internen Alignments gegenüber externer Ausrichtung liegt darin, dass die relativen Bewegungen von Proteindomänen nicht beeinflusst werden. Die Domärendynamik kann direkt aus der Skalierung des Tensors der ungetaggten im Vergleich zu dem Tensor der getaggten Domäne abgelesen werden (Tüchermann et al. (1998); Bertini et al. (2004); Rodriguez-Castañeda et al. (2006)). Derartige Informationen

sind mit externen Alignmentmedien nicht zugänglich.

Um die gemessenen RDCs auswerten zu können, muss der so genannte Alignment-tensor bekannt sein. [Kramer et al. \(2004\)](#) haben dieses Schlüsselkonzept auf intuitive Weise in graphischer Form dargestellt. Die Ableitung der RDCs lehnt sich im Folgenden an diese Arbeit an. Zunächst wird dabei die dipolare Interaktion im Festkörper beschrieben. Anschließend wird der Alignmenttensor eingeführt und letztendlich die Gleichung der RDCs in ihrer gebräuchlichen Form gezeigt.

Der Vektor zwischen den beiden Spins  $I$  und  $S$  sei gegeben durch

$$\vec{R} = r\vec{r}, \quad (2.1)$$

wobei  $r$  den Abstand beider Kerne und  $\vec{r}$  den Einheitsvektor in Richtung  $\vec{R}$  beschreibt. In gleicher Weise kann der Vektor des statischen Magnetfeldes  $\vec{B}$  durch

$$\vec{B} = B\vec{b} \quad (2.2)$$

ausgedrückt werden. Die Größe des Magnetfeldes wird durch  $B$  gegeben während  $\vec{b}$  den Einheitsvektor in Richtung  $\vec{B}$  angibt. Per Konvention zeigt  $\vec{B}$  im orthogonalen Laborkoordinatensystem  $x^L, y^L, z^L$  in Richtung der  $z^L$ -Achse. Im heteronuklearen Fall, wo die Kopplungen stets schwach sind, wird der sekuläre Teil des Hamiltonoperators der Spins  $I$  und  $S$  durch

$$\hat{H}_D = 2\pi D \hat{I}_{z^L} \hat{S}_{z^L} \quad (2.3)$$

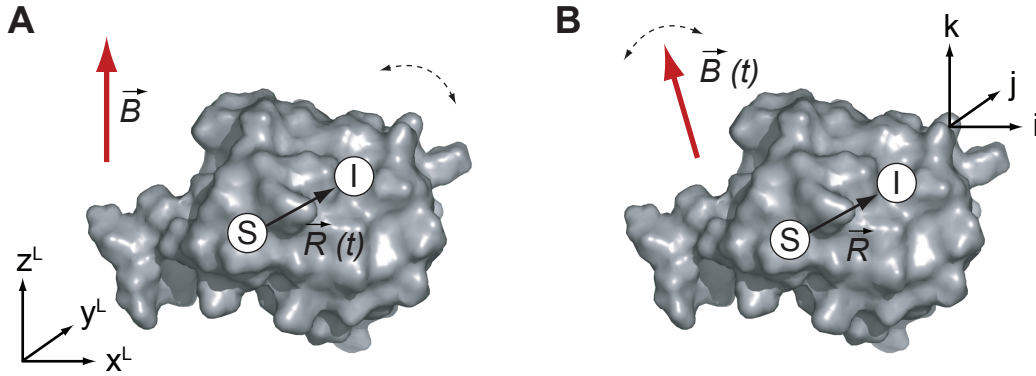
in Einheiten der Kreisfrequenz  $\omega$  gegeben. Die dipolare Kopplungskonstante  $D$  wird wie folgt beschrieben:

$$D = \frac{\kappa}{r^3} \left( \cos^2\theta - \frac{1}{3} \right). \quad (2.4)$$

Der Winkel  $\theta$  ist in [Abbildung 2.1](#) definiert. Der Term

$$\kappa = -\frac{3}{8\pi^2} \gamma_I \gamma_S \mu_0 \hbar \quad (2.5)$$

besteht ausschließlich aus physikalischen Konstanten, wie den gyromagnetischen Verhältnissen  $\gamma_I$  und  $\gamma_S$  der Spins  $I$  und  $S$ , der Permeabilitätskonstante des Vakuums  $\mu_0$  und dem reduzierten Planck'schen Wirkungsquantum  $\hbar = h/2\pi$ . Für das Spinpaar  $^{15}\text{N}-^1\text{H}$  beträgt  $\kappa = 36.5 \text{ kHz } \text{Å}^3$ . Damit ergibt sich im Festkörper eine maximale dipolare Kopplung  $D_{max} = 21.7 \text{ kHz}$  für  $\cos^2\theta = 1$  und einer NH-Bindungslänge von  $r = 1.04 \text{ Å}$  in Einheiten der Frequenz  $\nu$ .



**Abb. 2.2:** Einfluss der molekularen Reorientierung in Lösung. Aus Sicht des Laborkoordinatensystems  $x^L, y^L, z^L$  ergibt sich ein zeitabhängiger Interspinvektor  $\vec{R}(t)$  (A). Durch den Wechsel in das Molekül-fixierte Koordinatensystem  $i, j, k$  wird bei konstantem  $\vec{R}$  der zeitabhängige Magnetfeldvektor  $\vec{B}(t)$  erhalten (B).

Wenn sich das Molekül in Lösung reorientiert, wird der Interspinvektor  $\vec{R}$  zeitabhängig und somit auch der Winkel  $\theta$  zwischen  $\vec{R}$  und dem Laborkoordinatensystem, beziehungsweise  $\vec{B}$ . Dem zufolge ändert sich auch der  $\cos^2\theta$ -Term und letztendlich die dipolare Kopplung  $D$  in Abhängigkeit von der Zeit (siehe Abbildung 2.2 A). Die zeitlich gemittelte Konstante der dipolaren Kopplung  $\overline{D_{RDC}}$  wird als residuale dipolare Kopplung bezeichnet:

$$\overline{D_{RDC}} = \frac{\kappa}{r^3} \left( \overline{\cos^2\theta} - \frac{1}{3} \right). \quad (2.6)$$

Die Größe ist abhängig von der Stärke des Alignments. Die gemessene dipolare Kopplung wird über das Teilchenensemble gemittelt. Da die Bevorzugung bestimmter Orientierungen gegenüber anderen nur im Promillebereich stattfindet, wird die dipolare Kopplung aus dem kHz-Bereich bis auf wenige Hz herunter skaliert.

Für die Ableitung des Alignmenttensors  $\mathbf{A}$  wird das Bezugssystem vom Laborkoordinatensystem hin zu einem beliebigen orthogonalen Molekülkoordinatensystem  $i, j, k$  gewechselt. Unter der Annahme, dass das Molekül keine interne Dynamik aufweist, bleibt  $\vec{R}$  in diesem Koordinatensystem konstant. Stattdessen ergibt sich, wie in Abbildung 2.2 B gezeigt, ein zeitabhängiger Magnetfeldvektor

$$\vec{B}(t) = B\vec{b}(t). \quad (2.7)$$

Innerhalb des Molekülkoordinatensystems lässt sich die Verteilung für  $\vec{B}(t)$  graphisch in Form eines Ellipsoiden darstellen (Abbildung 2.3 A). Der Wahrscheinlichkeitstensor

$$\mathbf{P} = \begin{pmatrix} \overline{b_i^2(t)} & \overline{b_i(t)b_j(t)} & \overline{b_i(t)b_k(t)} \\ \overline{b_j(t)b_i(t)} & \overline{b_j^2(t)} & \overline{b_j(t)b_k(t)} \\ \overline{b_k(t)b_i(t)} & \overline{b_k(t)b_j(t)} & \overline{b_k^2(t)} \end{pmatrix} \quad (2.8)$$

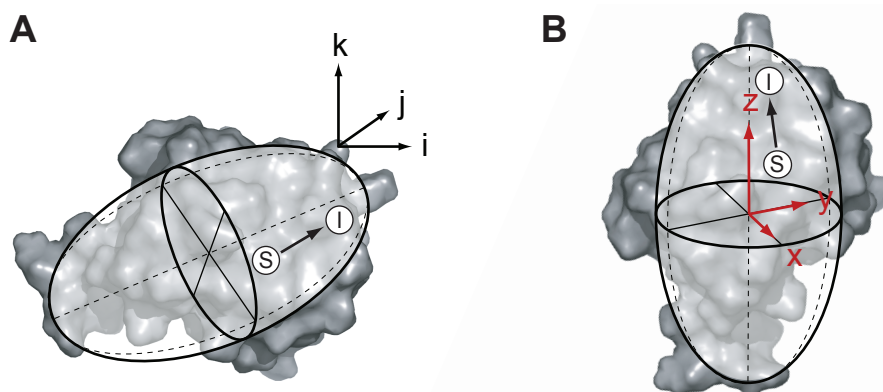
ist eine reale, symmetrische  $3 \times 3$  Matrix mit einer Spur von 1.  $\mathbf{P}$  gibt die Häufigkeit an, mit der ein Magnetfeldvektor in einer bestimmten Orientierung anzutreffen ist. Durch eine weitere Rotation des Koordinatensystems in das Hauptachsensystem von  $\mathbf{P}$  kann die Matrix diagonalisiert werden (Abbildung 2.3 B). Innerhalb dieses besonderen molekülfixierten Koordinatensystems lassen sich die RDCs einfacher berechnen. Die diagonalisierte Matrix

$$\mathbf{P} = \begin{pmatrix} P_x & 0 & 0 \\ 0 & P_y & 0 \\ 0 & 0 & P_z \end{pmatrix} \quad (2.9)$$

hat eine Spur von 1, wobei gilt:

$$P_x \leq P_y \leq P_z. \quad (2.10)$$





**Abb. 2.3:** Graphische Darstellung des Wahrscheinlichkeitstensors  $\mathbf{P}$  (graues Ellipsoid) im Molekülkoordinatensystem (A). Durch die Rotation in das Hauptachsensystem  $x, y, z$  von  $\mathbf{P}$  (B), lassen sich die RDCs einfacher berechnen.

Für einen beliebigen internuklearen Vektor, dessen kartesische Komponenten  $r_x, r_y$  und  $r_z$  in diesem Koordinatensystem bekannt sind, kann der Term  $\overline{\cos^2\theta}$  wie folgt ausgedrückt werden:

$$\overline{\cos^2\theta} = P_x r_x^2 + P_y r_y^2 + P_z r_z^2. \quad (2.11)$$

Wird dieser Ausdruck in die Gleichung 2.6 eingesetzt, können bereits RDCs berechnet werden. In der Literatur wird allerdings in der Regel an Stelle des Wahrscheinlichkeitstensors der bereits erwähnte Alignmenttensor  $\mathbf{A}$  verwendet. Dieser wird durch die Differenz von  $\mathbf{P}$  mit der Einheitskugel gegeben:

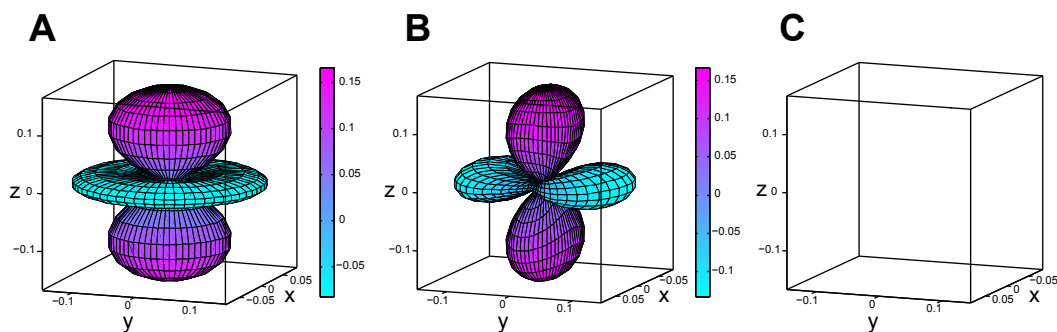
$$\mathbf{A} = \mathbf{P} - \frac{1}{3}\mathbf{1}. \quad (2.12)$$

Da die Hauptachsen identisch sind, lassen sich die Komponenten folgendermaßen darstellen:

$$A_x = P_x - \frac{1}{3}, \quad A_y = P_y - \frac{1}{3}, \quad A_z = P_z - \frac{1}{3}. \quad (2.13)$$

Umgeformt und in Gleichung 2.11 eingesetzt ergibt sich daraus

$$\left(\overline{\cos^2\theta} - \frac{1}{3}\right) = A_x r_x^2 + A_y r_y^2 + A_z r_z^2. \quad (2.14)$$

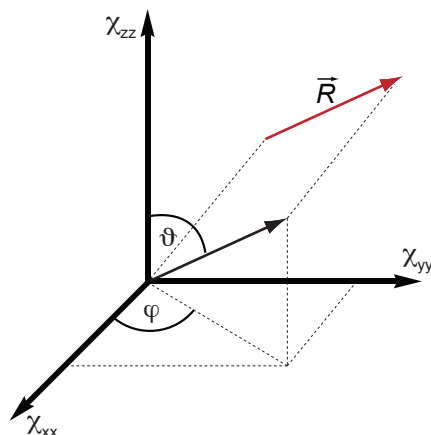


**Abb. 2.4:** Graphische Darstellung verschiedener Alignmenttensoren. (A) korrespondiert zu einem axialsymmetrischen Wahrscheinlichkeitstensor mit  $P_x = P_y = 0.25$  und  $P_z = 0.5$ , während (B) sich auf einen rhombischen Ellipsoiden zurückführen lässt mit  $P_x = 0.2$ ,  $P_y = 0.3$  und  $P_z = 0.5$ . Im Fall (C) liegt ein isotroper Wahrscheinlichkeitstensor mit  $P_x = P_y = P_z = 1/3$  zu Grunde und **A** mittelt sich zu Null.

Zusammen mit Gleichung 2.6 werden die RDCs

$$\overline{D_{RDC}} = \frac{\kappa}{r^3} (A_x r_x^2 + A_y r_y^2 + A_z r_z^2) \quad (2.15)$$

erhalten. Da der Alignmenttensor **A** im Gegensatz zu **P** spurlos ist, kann dieser nicht durch einen Ellipsoiden dargestellt werden. Allerdings sind die Orientierungswahrscheinlichkeiten durch eine Linearkombination des Polarteils der  $d$ -Funktionen darzustellen. In Abbildung 2.4 sind repräsentativ verschiedene Alignmenttensoren gezeigt, die zu einem axialsymmetrischen (A), rhombischen (B), beziehungsweise sphärischen (C) Wahrscheinlichkeitstensor korrespondieren. Aus dem Alignmenttensor lassen sich Größe und Vorzeichen der RDCs entnehmen. In der Literatur finden sich diverse äquivalente Beschreibungen der Gleichung für die dipolaren Kopplungen, die über entsprechende Faktoren ineinander umgerechnet werden können. Bertini et al. (2002) haben diese verschiedenen Gleichungen zusammengestellt. Bei der Orientierung der Probe mittels paramagnetischer Ionen besteht eine quadratische Abhängigkeit der RDCs vom externen Magnetfeld  $B_0$ , die über den **D**-Tensor eingeführt wird. Darüber hinaus wird der Zusammenhang zur so genannten Saupe-Matrix (Saupe (1968); Losonczi et al. (1999)) gegeben. Diese verbindet die Tensorkoordinaten mit dem externen Magnetfeld. Letztendlich wird die RDC-Gleichung



**Abb. 2.5:** Definition der Polarwinkel  $\vartheta$  und  $\varphi$  für einen beliebigen internuklearen Vektor  $\vec{R}$  im Koordinatensystem des  $\chi$ -Tensors.

in ihrer gebräuchlichsten Form in Abhängigkeit von  $\chi$ , dem Tensor der magnetisch anisotropen Suszeptibilität, in Verbindung mit den Polarkoordinaten  $\vartheta$  und  $\varphi$  angegeben (siehe Abbildung 2.5). In dieser Form ähnelt sie stark der Gleichung für die PCSs.

Im Folgenden wird die Umwandlung von Gleichung 2.15 gezeigt. Die Komponenten des Einheitsvektors  $\vec{r}$  lassen sich in Polarkoordinaten in folgender Form ausdrücken:

$$\vec{r} = \begin{pmatrix} r_x \\ r_y \\ r_z \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \sin \vartheta \cos \varphi \\ \sin \vartheta \sin \varphi \\ \cos \vartheta \end{pmatrix} \quad (2.16)$$

Eingesetzt in Gleichung 2.14 ergibt sich unter Ausnutzung der trigonometrischen Identitäten  $\cos^2 \varphi = (1 + \cos 2\varphi)/2$  und  $\sin^2 \varphi = (1 - \cos 2\varphi)/2$ :

$$\begin{aligned} \left( \overline{\cos^2 \theta} - \frac{1}{3} \right) &= \frac{A_x}{2} \sin^2 \vartheta + \frac{A_x}{2} \sin^2 \vartheta \cos 2\varphi \\ &+ \frac{A_y}{2} \sin^2 \vartheta - \frac{A_y}{2} \sin^2 \vartheta \cos 2\varphi \\ &+ \frac{A_z}{2} \cos^2 \vartheta. \end{aligned} \quad (2.17)$$

Da  $\mathbf{A}$  spurlos ist, gilt  $A_x + A_y = -A_z$  und zusammen mit  $\sin^2\vartheta = 1 - \cos^2\vartheta$  lässt sich die Gleichung umformen zu:

$$\left(\overline{\cos^2\vartheta} - \frac{1}{3}\right) = \frac{A_z}{2}(3\cos^2\vartheta - 1) + \frac{A_x - A_y}{2}\sin^2\vartheta \cos 2\varphi, \quad (2.18)$$

wobei die Terme  $A_z/2$  und  $(A_x - A_y)/2$  die axiale, beziehungsweise rhombische Komponente des Alignmenttensors beschreiben. Die Saupematrix  $\mathbf{S}$  steht mit dem Alignmenttensor in folgendem Zusammenhang:

$$\mathbf{S} = \frac{3}{2} \mathbf{A}. \quad (2.19)$$

Über die Beziehungen

$$D_{ax} = \frac{1}{3} \left( S_{zz} - \frac{S_{xx} + S_{yy}}{2} \right) = \frac{S_{zz}}{2} \quad (2.20)$$

und

$$D_{rh} = \frac{S_{xx} - S_{yy}}{3} \quad (2.21)$$

ergeben sich zusammen mit

$$D_{ax} = \frac{1}{2} \frac{B_0^2}{15 \mu_0 kT} \Delta\chi_{ax}, \quad D_{rh} = \frac{1}{2} \frac{B_0^2}{15 \mu_0 kT} \Delta\chi_{rh} \quad (2.22)$$

(Bertini et al. (2002)) und Gleichung 2.18 eingesetzt in Gleichung 2.6 die RDCs in Abhängigkeit vom  $\chi$ -Tensor:

$$\overline{D_{RDC}} = -\frac{B_0^2 \gamma_I \gamma_S \hbar}{8\pi^2 r^3 15 kT} \left[ \Delta\chi_{ax}(3\cos^2\vartheta - 1) + \frac{3}{2} \Delta\chi_{rh} \sin^2\vartheta \cos 2\varphi \right]. \quad (2.23)$$

$\Delta\chi_{ax}$  und  $\Delta\chi_{rh}$  bezeichnen die axiale, beziehungsweise rhombische Komponente des symmetrischen  $\chi$ -Tensors der magnetischen Suszeptibilität des Metallions. Sie werden durch die folgenden Definitionen gegeben:

$$\Delta\chi_{ax} = \chi_{zz} - \frac{\chi_{xx} + \chi_{yy}}{2} = \frac{3}{2} \chi_{zz} \quad (2.24)$$

und

$$\Delta\chi_{rh} = \chi_{xx} - \chi_{yy}. \quad (2.25)$$

Die Gleichung 2.23 gibt die RDCs in ihrer gebräuchlichsten Form an. Alternative Beschreibungen und Herleitungen finden sich in der Literatur (Bax et al. (2001); Prestegard et al. (2000) sowie Bertini et al. (2002)). Da  $\mathbf{A}$ ,  $\mathbf{S}$  und  $\boldsymbol{\chi}$  spurlose, symmetrische Matrizen sind, reichen für deren eindeutige Beschreibung theoretisch fünf RDCs aus, so lange deren korrespondierende internukleare Vektoren eine hinreichende Winkelstreuung, genauer Orthogonalität, im fünfdimensionalen Raum aufweisen. In der Praxis werden allerdings deutlich mehr Werte für eine ausreichend genaue Bestimmung des Tensors benötigt.

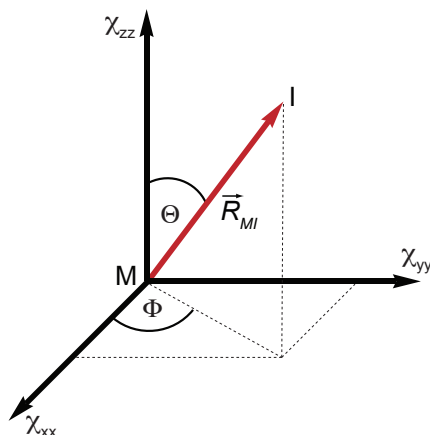
## 2.2 Pseudokontaktverschiebungen

Wenn sich ein paramagnetisches Metallion in der Nähe eines Kerns aufhält, so wird die chemische Verschiebung des Kerns durch eine dipolare, durch den Raum vermittelte Interaktion mit dem Spin des ungepaarten Elektrons beeinflusst. Die dipolare Kopplung zwischen dem Kern und dem Elektron führt zu einer Dublettaufspaltung des Signals. Auf Grund der schnellen longitudinalen Relaxationszeit des Elektrons (meist im ps-Bereich oder noch schneller), ist jedoch nur der Mittelwert dieser Kopplung zu sehen. Im Fall des Elektrons ist der  $\beta$ -Zustand auf Grund des großen gyromagnetischen Verhältnisses des Elektrons deutlich stärker populiert als der  $\alpha$ -Zustand, so dass sich, bedingt durch die Mittelung der Kopplung, insgesamt eine Verschiebung der Resonanzfrequenz des Kerns ergibt. Diese Verschiebung ist proportional zur dipolaren Kopplung zwischen Kern und Elektron, sowie zu der Besetzungsdifferenz des  $\alpha$ - und  $\beta$ -Niveaus des Elektrons. Die Differenz der chemischen Verschiebungen, bezogen auf eine isotrope Referenzprobe, wird als Pseudokontaktverschiebung (*pseudocontact shift*, PCS) bezeichnet. Abhängig vom Abstand zum Ion ergeben sich deutliche PCSs in den Spektren in einer Größenordnung von bis zu mehreren ppm. Die PCSs werden durch folgende Gleichung beschrieben:

$$\delta^{PCS} = \frac{1}{12\pi r_{MI}^3} \left[ \Delta\chi_{ax}(3\cos^2\Theta - 1) + \frac{3}{2}\Delta\chi_{rh}\sin^2\Theta\cos 2\Phi \right], \quad (2.26)$$

wobei  $\Theta$  und  $\Phi$  die Polarwinkel im  $\chi$ -Tensor zum Abstand  $r_{MI}$  beschreiben (siehe Abbildung 2.6). Ein wichtiger Unterschied zu den RDCs liegt darin, dass im Fall der PCS  $r_{MI}$  den Abstand zwischen dem Metallion und dem betrachteten Kern angibt. Näherungsweise wird hierbei ein metallzentrierter Punktdipol angenommen, da zum einen die Verteilung der Spindichte über den Raum in der Regel nicht bekannt ist und zum anderen bei Metallionen davon ausgegangen werden kann, dass sich ungepaarte Elektronen nahe des Kerns aufhalten (McConnell & Robertson (1958); Bleaney (1972); Bertini et al. (2002)).

Für das Auftreten der PCSs ist keine partielle Ausrichtung der Probe erforderlich. Zusätzlich zum Suszeptibilitätstensor geht der Abstand zwischen dem Elektron und



**Abb. 2.6:** Definition der Polarwinkel  $\Theta$  und  $\Phi$  im Koordinatensystem des  $\chi$ -Tensors.

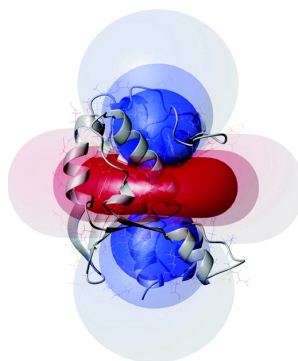
Der Vektor  $\vec{R}_{MI} = r_{MI}\vec{r}$  zeigt vom Metallion zum betrachteten Kern, wobei  $r_{MI}$  den Abstand angibt.

dem Kern mit  $r_{MI}^{-3}$  in die Größe der Pseudokontaktverschiebungen ein. Graphisch lässt sich dieser Zusammenhang in Form von PCS-Isoflächen darstellen (siehe Abbildung 2.7, Pintacuda et al. (2004, 2007)). Kerne, die auf der Isofläche liegen, weisen eine bestimmte PCS auf. Je näher diese Kerne am Metall liegen, desto größer wird dessen Einfluss auf die chemische Verschiebung. Die Kerne, die im sogenannten magischen Winkel liegen ( $\Theta = 54.74^\circ$ ), werden nicht beeinflusst.

In der Literatur werden, wie auch in dieser Arbeit, die PCSs in der Regel gemäß Gleichung 2.26 ausgewertet. Allerdings soll an dieser Stelle erwähnt werden, dass für die Einfachheit der Gleichung einige Näherungen in Kauf genommen werden. Bedingt durch die magnetische Anisotropie und die resultierende partielle Ausrichtung der Probe, wird die Gleichung um einen, vom Magnetfeld abhängigen, Term erweitert. Für einen axialsymmetrischen Suszeptibilitätstensor ergibt sich:

$$\delta_{ax}^{PCS,or} = \frac{1}{12\pi r_{MI}^3} \Delta\chi_{ax} (3\cos^2\Theta - 1) \left[ 1 + \Delta\chi_{ax} \frac{B_0^2}{15\mu_0 kT} \right]. \quad (2.27)$$

Da aber, wie bei der Einführung der RDCs erwähnt, nur etwa jedes tausendste bis zehntausendste Molekül ausgerichtet ist (Alignmenttensoren sind im Promillebereich), ist dieser Einfluss zu vernachlässigen.



**Abb. 2.7:** Darstellung der Isoflächen gleicher PCSs. Die Abbildung wurde aus [Pintacuda et al. \(2007\)](#) entnommen. Gezeigt sind die Dysprosium-induzierten Isoflächen für  $\pm 3$ ,  $\pm 1.5$  und  $\pm 0.5$  ppm, zusammen mit der Proteinstruktur von  $\epsilon 186$ . Bereiche mit positiven PCSs sind blau, die mit negativen rot dargestellt.

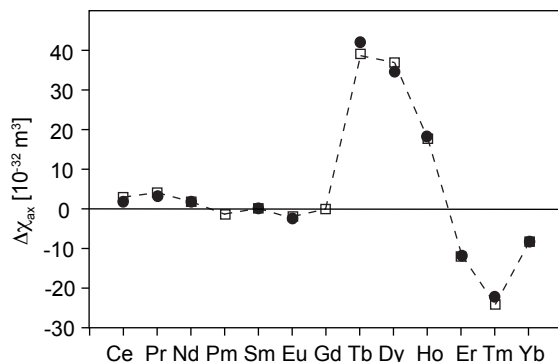
Die Pseudokontaktverschiebungen hängen, wie gezeigt, von der Anisotropie der magnetischen Suszeptibilität und somit gemäß des Curie-Gesetzes reziprok von der Temperatur ab. Im Fall von Lanthanoidionen müssen für die exakte Beschreibung der PCSs, auf Grund der starken Spin-Bahn-Kopplung, durch Reihenentwicklung noch weitere Terme von  $T^{-n}$  mit einbezogen werden ([Bleaney \(1972\)](#); [McGarvey \(1979\)](#)). Unter der Annahme, dass sich die Molekülgeometrie in Lösung nicht mit der Temperatur oder der Anzahl an Elektronen im  $4f$ -Orbital ändert, weisen die PCSs näherungsweise eine Temperaturabhängigkeit von  $T^{-2}$  auf.

Ein zweiter paramagnetischer Effekt auf die chemische Verschiebung wird durch die so genannte Fermi-Kontaktwechselwirkung oder Kontaktverschiebung beschrieben ([Kurland & McGarvey \(1970\)](#)). Diese entsteht durch das ungepaarte Elektron, dessen Anwesenheit die Spindichte und somit die Resonanzfrequenz benachbarter Kerne ändert. Die Kontaktverschiebung ist über einige Bindungen von Relevanz, hat jedoch bei der Verwendung paramagnetischer Tags keinen Einfluss mehr auf das Protein, da zu viele Bindungen zwischen dem Ion und den beobachteten Kernen liegen.



## 2.3 Lanthanoide

Als Lanthanoide (Ln) oder Seltenerden werden im Periodensystem die  $f$ -Block Elemente von Lanthan bis Lutetium bezeichnet. Der Begriff Seltenerden ist dabei etwas irreführend, da zum Beispiel Cer häufiger natürlich auftritt als Blei oder Arsen. Ihr Anteil an der Erdkruste beträgt insgesamt 0.02%. Streng genommen ist Lanthan als Element des  $d$ -Blocks kein Lanthanoid, wird aber allgemein, auf Grund dessen Eigenschaften, hinzu gezählt. Die Lanthanoide haben eine Elektronenkonfiguration von  $[\text{Xe}]6s^24f^n$  und sind alle in der Oxidationsstufe +III stabil. Die frühen Elemente der Periode bevorzugen in Lösung eine neunfache Koordination ( $[\text{Ln}(\text{H}_2\text{O})_9]^{3+}$ ). Der Wechsel auf eine achtfache Koordination  $[\text{Ln}(\text{H}_2\text{O})_8]^{3+}$  erfolgt bei Samarium (Djanashvili et al. (2008)).



**Abb. 2.8:** Experimenteller (gefüllte Kreise) und berechneter (Quadrate) Verlauf der  $\Delta\chi_{ax}$ -Werte für die Reihe der Lanthanoide, gemessen an Calbindin  $D_{9k}$ . Die Abbildung wurde aus Bertini et al. (2001) entnommen und auf Grund der mangelhaften Auflösung nachbearbeitet.

Bei den Lanthanoiden wird mit den  $4f$ -Orbitalen nur die drittäußerste Schale aufgefüllt. Die freien Elektronen werden durch die weiter außen liegenden  $4d$ - und  $5p$ -Orbitale abgeschirmt, so dass die paramagnetische Relaxationsverstärkung deutlich geringer ist, als bei den Übergangsmetallen. Die  $f$ -Orbitale selbst sind stark anisotrop, was besonders bei  $\text{Tb}^{3+}$  und  $\text{Dy}^{3+}$  zu großen axialen Komponenten der magnetischen Suszeptibilität und einer großen Ausrichtung im Magnetfeld führt (siehe Abbildung 2.8). Eine weitere Eigenschaft der Lanthanoide ist ihr äußerst ähnliches chemisches Verhalten. Somit können die Ergebnisse, wenn ein paramagnetischer Tag

mit verschiedenen Lanthanoidionen beladen wurde, direkt miteinander verglichen werden. Auf Grund dieser Eigenschaften sind diese Elemente für die paramagnetische NMR-Spektroskopie von besonderem Interesse und werden seit mehr als 40 Jahren eingesetzt (Sanders & Williams (1970); Barry et al. (1971); Bleaney (1972)). Eine Übersicht der aktuellen Literatur findet sich in Otting (2010, 2008).

## 2.4 Paramagnetische Relaxationsverstärkung

Das gyromagnetische Verhältnis freier Elektronen  $\gamma_e$  ist 658-fach größer als das von Protonen. Da die transversale Magnetisierung unter anderem über Spin-Spin-Wechselwirkungen in Richtung des Gleichgewichtszustands abgebaut wird, haben ungepaarte Elektronen einen erheblichen Einfluss auf die transversale Relaxationszeit  $T_2$ . Dieses Phänomen wird als paramagnetische Relaxationsverstärkung (PRE, *paramagnetic relaxation enhancement*) bezeichnet. Die verkürzte transversale Relaxation resultiert in einer Verbreiterung der Peaks, wobei  $\Delta\nu_{1/2}$  die Linienbreite auf halber Höhe angibt:

$$\frac{1}{T_2} = \pi\Delta\nu_{1/2}. \quad (2.28)$$

Wenn die rotatorische Korrelationszeit  $\tau_c$  deutlich größer, als die Elektronenrelaxationszeit  $\tau_e$  ist, wird die Relaxation hauptsächlich durch die Curie-Spin-Relaxation beeinflusst (Guéron (1975)). Die longitudinale Elektronenrelaxationszeit aller Ln<sup>3+</sup>-Ionen ist im Bereich von 10<sup>-13</sup> s (Pintacuda et al. (2007); Alsaadi et al. (1980)). Eine Ausnahme ist das Gd<sup>3+</sup>-Ion, bei dem jedes der sieben *f*-Orbitale mit einem ungepaarten Elektron besetzt ist. Die deutlich längere  $\tau_e$  von 10<sup>-7</sup> s erklärt sich dadurch, dass die Symmetrie erst durch Lösungsmittelleffekte gebrochen werden muss (Hudson & Lewis (1970)). Die Kernrelaxation, induziert durch die Wechselwirkung des magnetischen Moments des Elektrons und des Kernspins bei der Rotation des Moleküls im Magnetfeld, wird als Curie-Spin-Relaxation bezeichnet. Es gilt folgende Proportionalität (Otting (2008)):

$$R_{2,C}^{PRE} \propto \frac{\gamma^2 B_0^2 [g_e S_e (S_e + 1)]^2 \tau_c}{r^6 T^2}, \quad (2.29)$$

wobei  $g_e$  und  $S_e$  den  $g$ -Faktor, beziehungsweise den Spin des Elektrons angeben. Es lassen sich einige Rückschlüsse aus Gleichung 2.29 ziehen. Der PRE-Effekt ist abstandsabhängig mit  $r^{-6}$  und enthält somit strukturelle Informationen. Darüber hinaus ist die Relaxationsverstärkung für  $^{13}\text{C}$  und  $^{15}\text{N}$  geringer als für  $^1\text{H}$  auf Grund der quadratischen Proportionalität zum gyromagnetischen Verhältnis.

Resonanzen der Kerne, die nahe des paramagnetischen Ions liegen, werden so stark verbreitert, dass sie nicht mehr detektierbar sind. Dies wird in der Literatur als *bleaching area* bezeichnet und erklärt, weshalb die Spektren paramagnetischer Proben stets weniger Signale enthalten. Deshalb überwiegen die negativen Aspekte in Form von Signalverbreiterung und -verlust in der Regel den zusätzlichen Informationsgehalt. Daher ist es ein Parameter bei den Tags, die Ionen möglichst weit entfernt vom Protein zu positionieren, so dass die PRE gering ist, aber dennoch PCSs beobachtet werden. Für die paramagnetisch induzierten RDCs ist dies nicht entscheidend, da hier keine Abstandsabhängigkeit zum Metall besteht. Weitere Effekte, wie die Curie-dipolare kreuzkorrelierte Relaxation (Hus et al. (2000)), wurden in dieser Arbeit nicht betrachtet und werden daher nicht diskutiert.

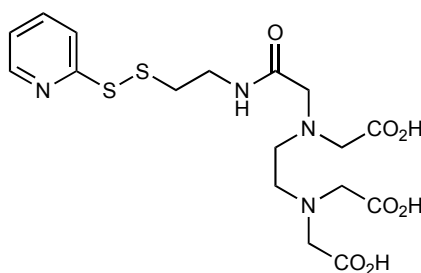
# Kapitel 3

## Paramagnetische Tags

### 3.1 Übersicht publizierter Tags

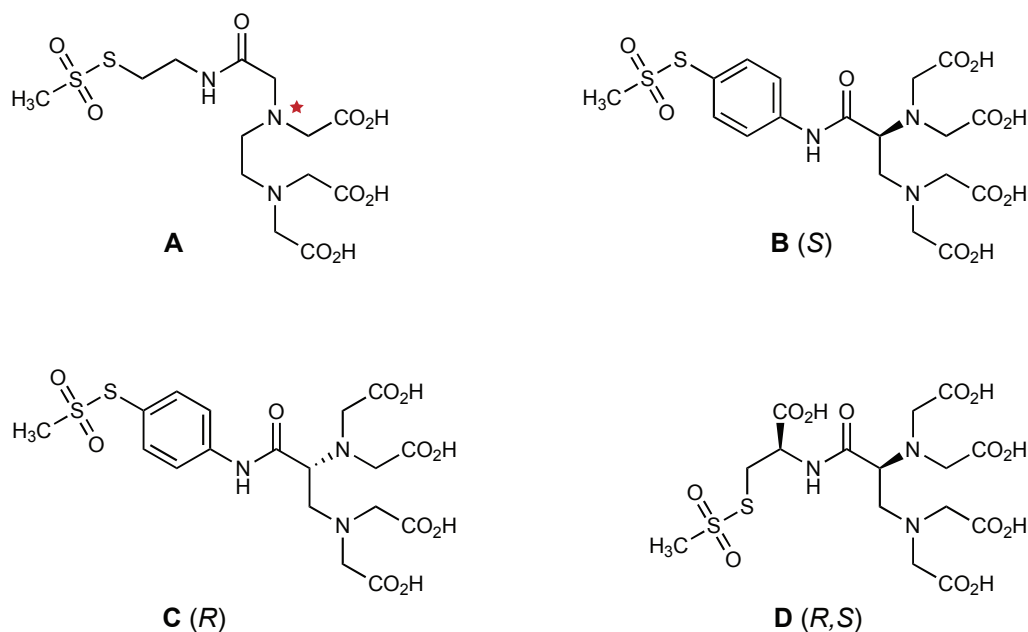
#### 3.1.1 EDTA-basierte Tags

In der Literatur wurden bereits einige Tags auf der Basis von EDTA beschrieben. Diese dienten zunächst allerdings nicht der Messung paramagnetischer NMR-Effekte. Vielmehr wurden die mit Eisen(II) beladenen Tags zur ortsspezifischen Hydrolyse von Peptiden oder RNA eingesetzt. Durch Zugabe von Wasserstoffperoxid bilden sich eisenkatalysiert Hydroxylradikale in der Nähe des Eisenzentrums (Fenton-Reaktion). Aus den erhaltenen Fragmenten können Rückschlüsse auf Strukturen und Interaktionsflächen von Protein-Protein- beziehungsweise Protein-Oligonukleotid-Komplexen gezogen werden (Ebright et al. (1992); Ermacora et al. (1992); Datwyler & Meares (2000)). Mit *S*-(2-Pyridylthio)cysteaminyl-EDTA (siehe Abbildung 3.1) wur-



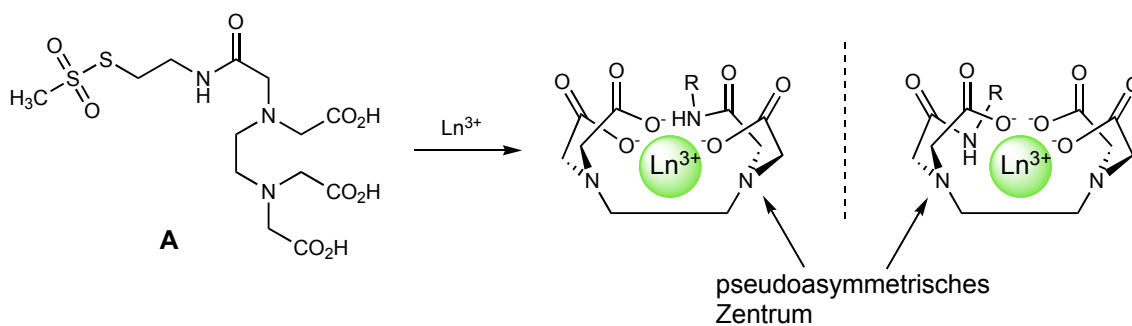
**Abb. 3.1:** *S*-(2-Pyridylthio)cysteaminyl-EDTA, kommerziell erhältlich bei *Toronto Research Chemicals*.

den erstmals Proteine mittels eines chelatisierenden Tags ausgerichtet (Tüchelmann et al. (1998); Gaponenko et al. (2002); Dvoretzky et al. (2002)). Zur Ausrichtung entlang des Magnetfeldes wurden hier allerdings die Übergangsmetalle Cobalt(II) und Mangan(II) verwendet. Die erhaltenen PCSs (bis zu 0.3 ppm) und RDCs (bis zu 4 Hz) sind relativ klein, allerdings wurde gezeigt, dass das Konzept des internen Alignments mittels Tags funktioniert.



**Abb. 3.2:** Übersicht der EDTA-basierten Tags. Der Stern in Struktur (A) markiert das pseudoasymmetrische Stickstoffatom. Um chirale Komplexe zu vermeiden, wurden (B)–(C) enantiomerenrein hergestellt. Der Tag (D) wurde ebenfalls in (*R*)-Konfiguration am Chelator synthetisiert.

Im Arbeitskreis wurden EDTA-Tags mit Lanthanoidionen beladen. Diese Chelatfunktion wurde ausgewählt, da die EDTA-Lanthanoidkomplexe mit einer Dissoziationskonstante von etwa  $10^{-18} \text{ mol L}^{-1}$  äußerst stabil sind (Sigl & Sigl (2003); Evans (1990)). Eine Übersicht der publizierten Tags ist in Abbildung 3.2 gegeben. Der Tag (A) wurde erhalten, indem eine der vier Carboxylfunktionen mit dem Linker über eine Amidbindung verbunden wurde. Zwar konnten mit diesem Tag wie gewünscht dipolare Kopplungen und Pseudokontaktverschiebungen induziert werden, jedoch wurden zwei Datensätze zweier unabhängiger Alignmenttensoren erhalten (Ikegami et al. (2004); Pintacuda et al. (2004)). Der Grund dafür liegt in der Komplexbildung.



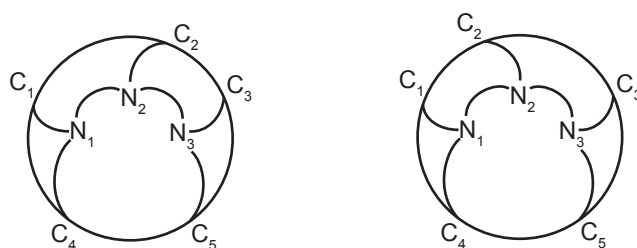
**Abb. 3.3:** Schematische Darstellung der diastereomeren Komplexbildung, ausgehend vom achiralen EDTA-Derivat **A** (Ikegami et al. (2004); Leonov et al. (2005)).

Obwohl das EDTA-Derivat selbst achiral ist, weist es dennoch ein pseudoasymmetrisches Zentrum am Stickstoff auf. Aus diesem Grund werden zwei diastereomere Komplexe geformt, was letztendlich in der Verdopplung der NMR-Signale resultiert. Eine schematische Darstellung ist in Abbildung 3.3 gezeigt.

Um stereochemisch uniforme Metallkomplexe zu erhalten, wurden die Tags (B)–(D) entwickelt, bei denen der Chelator mit definierter Konfiguration am Linker angebracht ist (Ikegami et al. (2004); Leonov et al. (2005); Haberz et al. (2006)). Ursprünglich wurde der Chelator racemisch dargestellt und anschließend per HPLC getrennt. Mittlerweile ist das Ausgangsmaterial für die Tags (B)–(D) (2,3-Diaminopropionsäure) enantiomerenrein erhältlich. Mit diesen EDTA-Tags wurden an apo-Calmodulin RDCs von bis zu 8 Hz gemessen.

### 3.1.2 DTPA- und DOTA-basierte Tags

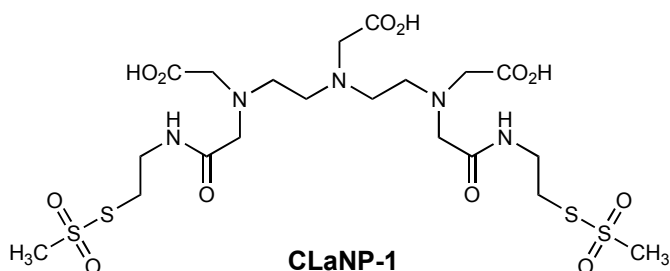
Neben EDTA sind einige weitere Liganden bekannt, die äußerst stabile Lanthanoidkomplexe ausbilden. DTPA oder DOTA sind achtzählige Liganden, die das gebundene Metall nicht mehr freisetzen ( $K_D < 10^{-20} \text{ mol L}^{-1}$ ). In deren Lanthanoidkomplexen ist die neunte Koordinationstelle von Wasser besetzt. Dieses befindet sich in schnellem Austausch mit dem Wasser des Lösungsmittels. So werden beispielsweise in der Kernspintomographie Gadoliniumkomplexe als Kontrastmittel eingesetzt, was zu einer erheblichen Relaxationssteigerung des Wassers führt. Die hohen Komplexstabilitätskonstanten verbunden mit der hohen Absättigung der



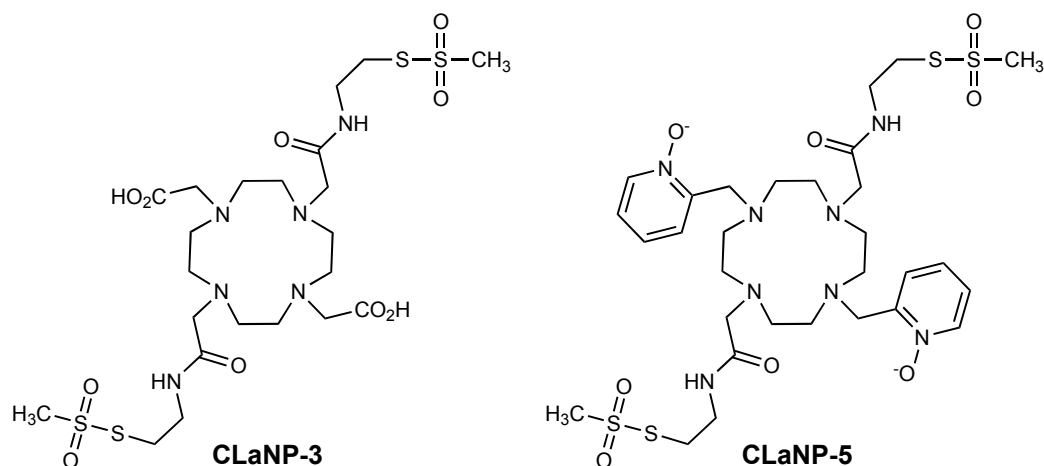
**Abb. 3.4:** *Points-on-a-sphere*-Modell der beiden enantiomeren DTPA-Konformationen im Lanthanoidkomplex (Franklin & Raymond (1994)).

Koordinationsphäre machen diese Chelatoren grundsätzlich auch für die paramagnetische NMR-Spektroskopie interessant. Im Gegensatz zu ETDA treten allerdings schon bei den unmodifizierten Ligandkomplexen Stereoisomere auf. Die auftretende Chiralität bei DTPA-Komplexen lässt sich durch ein *points-on-a-sphere*-Modell erklären, welches in Abbildung 3.4 gezeigt ist. Die Lanthanoidbindung resultiert in einem Enantiomerenpaar des Komplexes, da das zentrale Stickstoffatom  $N_2$  durch die unterschiedliche Koordination der Carboxylgruppe  $C_2$  chiral wird.

Durch die Immobilisierung des DTPA-basierten CLaNP-1-Tags über zwei Linker am Protein (siehe Abbildung 3.5) wurden weitere Stereoisomere induziert, da hier neben dem Stereozentrum am zentralen Stickstoffatom noch zwei weitere Stereozentren an den anderen beiden Stickstoffatomen erzeugt wurden. Der Austausch zwischen den einzelnen Isomeren verläuft langsam auf der NMR-Zeitskala, so dass letztendlich fünf unterscheidbare Datensätze mit verschiedenen Tensoren erhalten wurden (Prudêncio et al. (2004)).



**Abb. 3.5:** Der DTPA-basierte CLaNP-1-Tag (Caged Lanthanide NMR Probe).

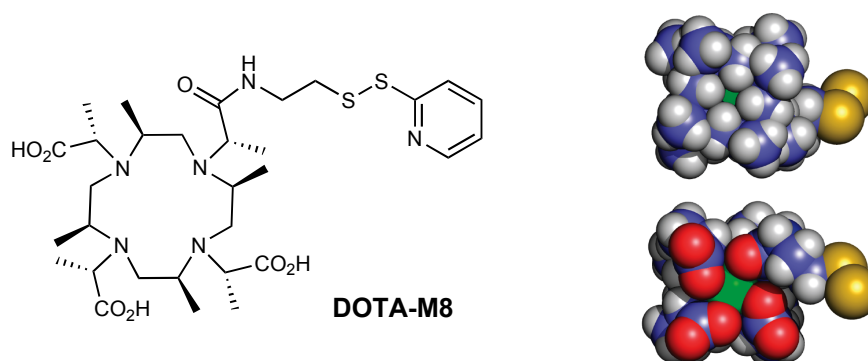


**Abb. 3.6:** Die DOTA-basierten Tags CLaNP-3 und CLaNP-5.

Bei DOTA erklären sich die unterschiedlichen Konformere durch das Auftreten helikaler Chiralität. Sowohl die vier Ethyleneinheiten im Ring, als auch die Acetatarme bilden eine Helix aus, deren Gang gemäß den IUPAC-Regeln mit  $\Lambda/\Delta$  für die Anordnung der Carboxylgruppen und  $(\lambda\lambda\lambda\lambda)/(\delta\delta\delta\delta)$  für den Ring bezeichnet werden. Somit ergeben sich zwei enantiomere Paare von Diastereomeren, die sich bei Raumtemperatur im langsamen Austausch zueinander befinden. Dieser Austausch der vier Isomere wird zusätzlich von einer Umwandlung der Konformation in Verbindung mit einer Änderung der Koordinationsphäre überlagert. Obwohl nicht alle Isomere gleich populiert sind, verkompliziert es die Analyse der NMR-Spektren weiter (Aime et al. (1997)). Für den DOTA-basierten CLaNP-3 wurden vier unterscheidbare Datensätze durch verschiedene Alignmenttensoren gefunden, wobei zwei eine deutlich höhere Population als die anderen beiden aufwiesen (Vlasie et al. (2007)). Wenn die Resonanzen zweier unabhängiger Tensoren sehr ähnlich populiert sind, so ergeben sich Probleme bei der eindeutigen Zuweisung zum jeweiligen Datensatz.

Durch Substitution zweier Carboxymethyleinheiten am DOTA-Ring gegen [(Pyridin-*N*-oxid)-2-yl]methyl (Polasek et al. (2004)) nimmt der Komplex nur noch eine Konformation ein. Dementsprechend wurden bei CLaNP-5-getaggtten Proteinen keine Verdopplungen der Resonanzen mehr beobachtet (siehe Abbildung 3.6). Durch die Verknüpfung des mit Thulium beladenen Tags mit dem Protein über zwei Arme konnten bereits bei relativ niedrigem Feld (600 MHz) große RDCs von bis zu 25 Hz

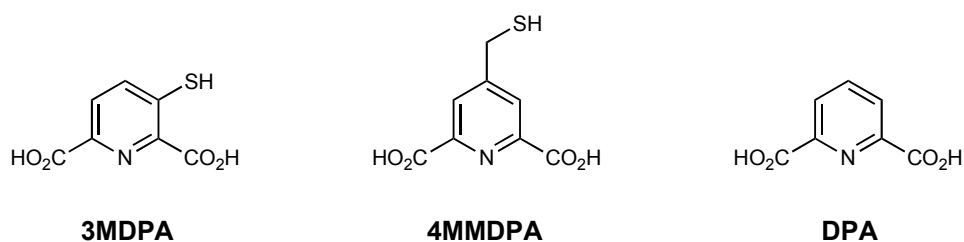




**Abb. 3.7:** Der DOTA-basierte DOTA-M8-Tag. Alle Stereozentren sind (*S*)-konfiguriert. Auf der rechten Seite ist eine schematische Darstellung des beladenen Komplexes im Kalottenmodell ( $\Delta/\delta\delta\delta\delta$ ) gezeigt.

gemessen werden (Keizers et al. (2007, 2008)). Eingeschränkt wird die praktische Anwendung jedoch durch die Tatsache, dass die Proteinstruktur bereits in hohem Maße bekannt sein muss. Zur Herstellung der erforderlichen Cystein-Doppelmutante werden zwei Lösungsmittel-exponierte Seitenketten gleicher Orientierung in geeignetem Abstand benötigt. Darüber hinaus treten bei der Taggingreaktion Tag-verbrückte Dimere auf, die anschließend abgetrennt werden müssen.

Durch die stereoselektive Einführung von Methylsubstituenten am Ring, sowie an den Carboxymethyleinheiten, entsteht ein sterisch äußerst anspruchsvoller Chelatligand. In Abhängigkeit von der Konfiguration der acht eingeführten Stereozentren weisen sowohl der Ring, als auch die substituierten Carboxymethylarme nur noch eine helicale Gangrichtung auf (Ranganathan et al. (2002)). Dieses methylsubstituierte Gerüst war die Grundlage des DOTA-M8-Tags (Häussinger et al. (2009), siehe Abbildung 3.7). Im Gegensatz zu den zuvor erwähnten Tags auf DOTA-Basis erfolgt die Verknüpfung zum Protein nur über eine Disulfidbrücke. Dennoch werden durch diesen Tag große RDCs (mit Dysprosium bis zu 20 Hz bei 800 MHz) induziert. Dies unterstreicht den sterischen Anspruch des Tags. Im Tag sind die Lanthanoidionen derart fest gebunden, dass DOTA-M8 acht Stunden bei 75 °C mit dem entsprechenden Metallsalz inkubiert werden muss, um den Tag beladen zu können. Der so vorbeladene Tag kann anschließend per HPLC aufgereinigt werden. Neben dem gewünschten, paramagnetisch verschobenen Signalsatz tritt eine weitere Spezies auf.

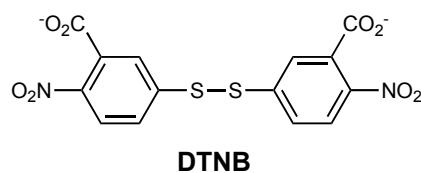


**Abb. 3.8:** Übersicht über die DPA-basierten Tags. Der trimere DPA-Lanthanoidkomplex ( $[\text{Ln}(\text{DPA})_3]^{3-}$ ) wird als Verschiebungsreagenz verwendet.

Bei 298 K liegt deren Beitrag bei 15–20%, steigt jedoch temperaturabhängig auf 50% bei 323 K. Dieser Effekt ist durch Abkühlen in einer Größenordnung von mehreren Stunden vollständig reversibel. Als mögliche Erklärung wird im Artikel die *cis-trans* Isomerisierung der Peptidbindung des Linkers genannt. Die Synthese von DOTA-M8 ist darüber hinaus mühsam, da bereits die Ausbeute bei der Darstellung des zu Grunde liegenden, vierfach methylysubstituierten DOTA-Rings von etwa 2% sehr gering ist (Ranganathan et al. (2002)).

### 3.1.3 DPA-basierte Tags

Ein ganz anderer Ansatz wird in der Gruppe von Gottfried Otting verfolgt. Hier werden sehr kleine und rigide Tags auf der Basis von Dpicolinsäure (DPA) verwendet, um Lanthanoidionen zu immobilisieren. DPA ist ein dreizähliger Ligand, der eine nanomolare Affinität zu Lanthanoiden aufweist. Zur Stabilisierung des Komplexes werden jedoch zusätzlich Proteinseitenketten, wie Glutamate, in der direkten Nachbarschaft benötigt, die als Anker fungieren. In Abbildung 3.8 sind zwei dieser Tags gezeigt. 4MMDPA weist noch eine flexible Methyleneinheit auf (Su et al. (2008)), die bei 3MDPA entfernt wurde (Man et al. (2010)). Beide Tags wurden nicht mit einer aktivierenden Gruppe am Schwefel versehen. Die Knüpfung der Disulfidbindung erfolgte hier durch Verwendung des Ellman's Reagenz DTNB (siehe Abbildung 3.9, Ellman (1959); Su et al. (2006)). Dabei wird DTNB vom freien Cysteinthiol angegriffen und gespalten. Auf diese Weise wird das Protein aktiviert und kann im nächsten Schritt mit dem Tag reagieren. Mit diesen Tags wurden PCSs von bis zu 2 ppm gemessen. RDCs ließen sich ebenfalls messen, jedoch waren diese mit bis zu 9 Hz



**Abb. 3.9:** Ellman's Reagenz DTNB (5,5'-Dithiobis(2,2'-nitrobenzoesäure)) zur Verknüpfung thiolhaltiger Verbindungen mit Cysteinseitenketten.

für Terbium bei einem Feld von 800 MHz kleiner als die der anderen vorgestellten Tags. Auch die Übereinstimmung mit den zurück gerechneten Daten war geringer als bei den zuvor gezeigten Tags. Eine weitere Vereinfachung der DPA-Tags stellt  $[\text{Ln}(\text{DPA})_3]^{3-}$  dar. Dieser Komplex ist im eigentlichen Sinne kein Tag mehr, sondern vielmehr ein paramagnetisches Verschiebungsreagenz (Su et al. (2009)). Lanthanoide bilden mit drei Äquivalenten DPA einen  $C_3$ -symmetrischen Komplex aus. Vorsichtig zum Protein titriert, so wird es beschrieben, setzt sich dieser mit millimolarer Affinität an eine bevorzugte Position auf der Proteinoberfläche. Die Verwendung von zwei Äquivalenten des Komplexes führt dabei in der Regel nicht zur Bindung an eine zweite Stelle auf der Oberfläche.

### 3.1.4 Metall-bindende Proteinsequenzen

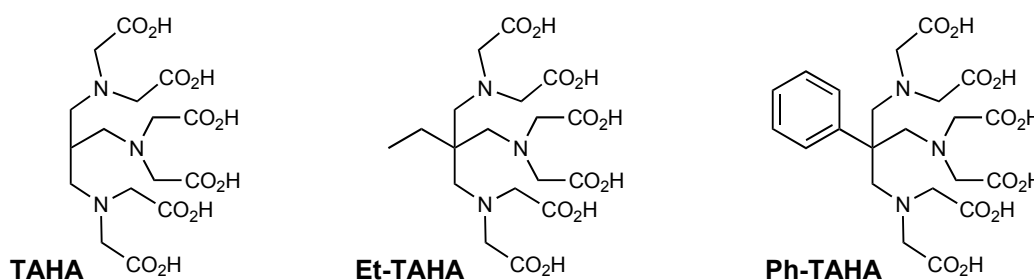
In der Literatur wurden neben Tags auf der Grundlage organischer Chelatoren auch spezifische Proteinsequenzen zur Metallfixierung beschrieben. Diese werden an den C- oder N-Terminus des zu untersuchenden Proteins fusioniert, allerdings muss darauf geachtet werden, dass die Struktur des Proteins nicht beeinflusst wird. In einem der ersten Ansätze wurde das Zinkfingermotiv verwendet und dieses mit Cobalt(II) beladen (Gaponenko et al. (2000)). Später wurden Sequenzen mit weniger als zwanzig Aminosäuren entwickelt, die selektiv Lanthanoidionen mit nanomolarer Affinität fixieren (Franz et al. (2003); Nitz et al. (2003); Wöhnert et al. (2003); Nitz et al. (2004)). Durch die Verwendung eines doppelten Lanthanoid-bindenden Tags, wobei jeweils eine Sequenz an den C- und N-Terminus gekoppelt wurde, konnten für Ubiquitin RDCs von bis zu -18 Hz gemessen werden. Dies entspricht einer Verdreifachung der RDCs, bezogen auf das einfach getaggte Protein (Martin et al. (2007)).

Durch die Einführung eines Cysteins innerhalb der Lanthanoid-bindenden Peptidsequenz können diese, in Analogie zu den organometallischen Tags, an freie Cysteine geknüpft werden, wodurch die Limitierung auf den C- und N-Terminus des Proteins wegfällt (Su et al. (2008)).

Ein sehr elegantes, Lanthanoid-bindendes Konstrukt ist die N60D Calmodulinmutante (Bertini et al. (2003)). Hier wird eine weitere negative Ladung in eine der vier Calciumbindestellen eingeführt, wodurch bevorzugt Lanthanoidionen gebunden werden. Auf diese Weise wird ein internes Alignment erhalten, ohne die Struktur oder die Gesamtmasse des Proteins signifikant zu ändern. Mit dieser Mutante wurde die Dynamik des aus zwei Domänen bestehenden Calmodulins untersucht (Bertini et al. (2004)).

## 3.2 Entwicklung des TAHA-basierten Tags

Bei der Verwendung der EDTA-Tags ergaben sich in der Vergangenheit diverse Probleme. Die erhaltenen RDCs von maximal 8 Hz waren im Mittel relativ klein und dazu häufig mit großen Fehlern behaftet. Das langfristige Ziel des Projekts, nämlich ein Werkzeug für die NMR-Spektroskopie zu entwickeln, mit dem die Dynamik von Proteindomänen untersucht werden kann, konnte mit diesen Tags noch nicht erfüllt werden, da die dynamisch reduzierten Alignmenttensoren und damit auch die RDCs sehr klein wurden. Darüber hinaus waren die Signale negativ geladener Aminosäuren, wie Glutamate, in der Nähe des Tags zum Teil stärker verbreitert als die anderer Aminosäuren. Das legt nahe, dass diese Reste mit dem Tag entweder intramolekular oder sogar intermolekular interagiert haben. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die EDTA-basierten Tags lediglich sechs Koordinationsstellen aufweisen und somit nicht in der Lage sind, die Koordinationssphäre von Lanthanoidionen vollständig auszufüllen (Djanashvili et al. (2008)). Um diese ungewollten Wechselwirkungen zu unterbinden, muss ein neuer Tag mit mehr als sechs Koordinationsstellen entworfen werden. Bei den vorgestellten Tags ist tendenziell ein Zusammenhang zwischen der Anzahl der Chelatarme und der Stärke des Alignments festzustellen. Inwieweit die-



**Abb. 3.10:** Struktur der TAHA-Liganden.

ser Effekt rein sterischer Natur ist, da ein erhöhter Raumbedarf die Mobilität des Tags einschränkt, kann an dieser Stelle nicht geklärt werden.

Das wichtigste Kriterium für einen neuartigen Liganden ist jedoch die Vermeidung diastereomerer Komplexe. Um dies zu verhindern, muss der Chelator selbst hochsymmetrisch sein und zusätzlich so wenig flexible Fragmente wie möglich aufweisen. Auf Grund der zuvor diskutierten stereochemischen Probleme wurde der Tag nicht von DOTA oder DTPA abgeleitet. Als Chelatligand für den neuen Tag wurde TAHA (Triaminohexaacetat, siehe Abbildung 3.10) ausgewählt. Dieser neunzählige Ligand erfüllt durch die  $C_3$ -symmetrische Achse die genannten Anforderungen, da keine Stereozentren an den Stickstoffatomen entstehen können.

Der Chelator wurde in der Literatur bislang nur wenige Male beschrieben. Erstmals wurden im Jahr 2001 Et-TAHA und Ph-TAHA im Rahmen einer Studie veröffentlicht, in der neuartige, mehrzählige Liganden für Komplexe der Seltenerden synthetisiert und analysiert wurden (Viguiet et al. (2001)). Für eine Reihe von Lanthanoid-(III)-Ionen wurden die Komplexstabilitätskonstanten gemessen. Bei den frühen Elementen der Periode betragen sie  $10^{12}$ , für  $\text{Dy}^{3+}$  bereits  $10^{15}$ . Damit sind die TAHA-Komplexe zwar um etwa drei Größenordnungen instabiler als die entsprechenden EDTA-Komplexe, aber immer noch hinreichend stabil, sodass die Komplexbildung durch den Chelator nicht in Konkurrenz mit Bindung an der Proteinoberfläche tritt. In einer weiteren Veröffentlichung über Komplexbildner für die Radioimmunotherapie wurde gezeigt, dass Galliumkomplexe des Liganden (hier als TAME-Hex bezeichnet) auch in Gegenwart eines tausendfachen Überschusses an DTPA stabil sind (Arslantas et al. (2004)). Auch wenn kein direkter Rückschluss auf Lanthanoidkom-

**Tab. 3.1:** Wassermoleküle in der inneren Koordinationssphäre des TAHA Liganden (Viguier et al. (2001)). Die Werte für pH 7 und 8 waren nicht angegeben.

	pH	Anzahl H <sub>2</sub> O
Ph-TAHA	1	4.4
	2	4.2
	3	3.4
	4	1.7
	5	1.5
	6	1.4
	9	1.1

plexe gezogen werden kann, so unterstreicht dieses Ergebnis dennoch die Qualität des Chelatliganden. Darüber hinaus haben Viguier et al. die Absättigung der Koordinationssphäre für Ph-TAHA mittels DIS (*dysprosium induced shift*, Alpoim et al. (1992)) bestimmt. Bei der Methode wird die Dysprosium-induzierte Änderung der <sup>17</sup>O-Resonanzfrequenz des Wassers gemessen (die natürliche Häufigkeit von <sup>17</sup>O beträgt 0.0373%). Durch Variation der Konzentration an Dysprosium-Metall-Komplex können Rückschlüsse auf die Koordinationssphäre gezogen werden. Die Ergebnisse der Messungen sind in Tabelle 3.1 gezeigt. Demnach sind bei dem beabsichtigten pH-Wert von 6.8 für die NMR-Messungen weniger als 1.4 Wassermoleküle in der inneren Koordinationssphäre gebunden, was deren hohe Absättigung durch den TAHA-Liganden verdeutlicht, obgleich der Komplex, bedingt durch die sechs Säurefunktionen, dreifach negativ geladen ist. Durch die Stabilität der Metallkomplexe, verbunden mit der Anzahl an Koordinationsstellen und der hohen Symmetrie, ist der TAHA-Ligand ideal für die Verwendung als Chelatfunktion eines paramagnetischen Tags.

Zur Verknüpfung mit dem Protein wird noch ein Verbindungsstück, der so genannte Linker, benötigt. Dieser sollte möglichst klein und rigide sein, um das Alignment des Tags größtmöglich auf das Protein zu übertragen. Gleichzeitig darf der Abstand zwischen Protein und Tag nicht zu kurz sein, damit die Taggingreaktion durch den

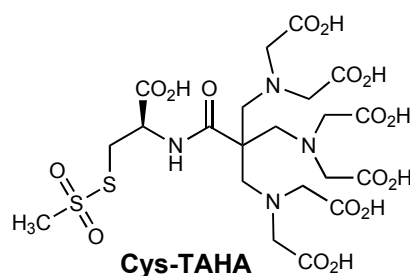
voluminösen Metallkomplex sterisch nicht gehindert wird. Für den Linker wurde (*S*)-Methylcystein (Weidner & Block (1972); Hart (1985)) ausgewählt, um eine Vergleichbarkeit mit den EDTA-Tags zu gewährleisten, beziehungsweise Unterschiede in der Ausrichtung der Probe ausschließlich auf den neuartigen Chelator zurückführen zu können.

# Kapitel 4

## Synthese

### 4.1 Darstellung von Cys-TAHA

Wie in Kapitel 3.2 beschrieben, war es ein Ziel der vorliegenden Arbeit, einen neuen Tag zur paramagnetischen Markierung von Proteinen auf Basis des TAHA-Liganden zu synthetisieren. Bei der Syntheseplanung musste eine funktionelle Gruppe für die spätere Verknüpfung mit dem Protein an der  $C_3$ -Achse eingeführt werden. In Analogie zu den EDTA-basierten Tags wurde hierzu eine Carboxylfunktion gewählt, da der Tag auf diese Weise über eine Amidbindung mit verschiedenen Linkern verbunden und somit flexibel eingesetzt werden kann. Beispielsweise wurde im Arbeitskreis die Modifikation von Oligonukleotiden mittels Clickchemie (Wöltjen (2009)) demonstriert, was eine Azidfunktion im Linker erfordert. Um den Abstand zwischen Protein und Metallion möglichst kurz zu halten, wurde Cys-TAHA (Cysteiny-TAHA) als Zielmolekül ausgewählt (siehe Abbildung 4.1). Die verschiedenen Säurefunktionen



**Abb. 4.1:** Zielmolekül der ersten Synthesen: Cys-TAHA.



des Zielmoleküls Cys-TAHA erforderten eine orthogonale Schutzgruppenstrategie. Die Carboxylfunktion, über die die spätere Verbindung mit dem Biomolekül erfolgt, sollte als Benzylester geschützt werden. Benzylester lassen sich durch Palladiumvermittelte Hydrogenolyse (Chiu et al. (1995)) effektiv entfernen. Die übrigen sechs Carboxylfunktionen sollten als säurelabile *tert*-Butylester dargestellt werden.

#### 4.1.1 Erster Syntheseansatz

Kommerziell sind keine geeigneten Triamine mit einer zusätzlichen funktionellen Gruppe erhältlich. Dementsprechend musste dieses Grundgerüst neu aufgebaut werden. Für den ersten Syntheseansatz (siehe Abbildung 4.2) wurde Pentaerythrit **1** als günstiges Edukt gewählt. Zunächst wurde eine der vier Hydroxylgruppen selektiv mit *tert*-Butyldiphenylsilylchlorid geschützt (Hanessian & Lavalley (1975)). Diese Schutzgruppe wurde aus zwei Gründen ausgewählt. Zum einen ließ sich **2**, trotz der drei Hydroxylfunktionen, durch die eingeführten unpolaren Reste säulenchromatographisch aufreinigen. Zum anderen wurden durch die Phenylringe Chromophore erhalten, die eine Kontrolle des Reaktionsverlaufs erleichterten. Die Differenzierung der vier Alkoholfunktionen wurde durch Zugabe eines fünffachen Überschusses an Pentaerythrit, beziehungsweise zwanzigfachen Überschusses bezogen auf die Hydroxylfunktionen, erzielt. Die Hydroxylgruppen von **2** wurden im Folgenden mittels Tosylchlorid in Pyridin zu **3** umgesetzt. Nukleophile Substitution mit Natriumazid in Dimethylformamid führte zu Verbindung **4**, welche anschließend mittels einer Staudinger-Reduktion in das Triamin **5** umgewandelt wurde (Staudinger & Meyer (1919)). Die Aminfunktionen wurden bei Raumtemperatur in Ethanol durch Umsetzung mit Di-*tert*-butyldicarbonat geschützt, um bei der späteren Oxidation der Hydroxylgruppe eine gleichzeitige Oxidation der Amine zum *N*-Oxid zu verhindern. Die Silyletherschutzgruppe an **6** erwies sich jedoch im Folgenden als äußerst stabil, da selbst durch mehrtägiges Rühren in 1M Tetra-*N*-butylammoniumfluoridlösung die Hydroxylfunktion von **7** nicht freigesetzt werden konnte. Dies ließ sich, wie sich im weiteren Verlauf der Arbeit zeigte, auf den sterischen Anspruch der Boc-Gruppen zurückführen (siehe Abbildungen 4.4 und 4.5).

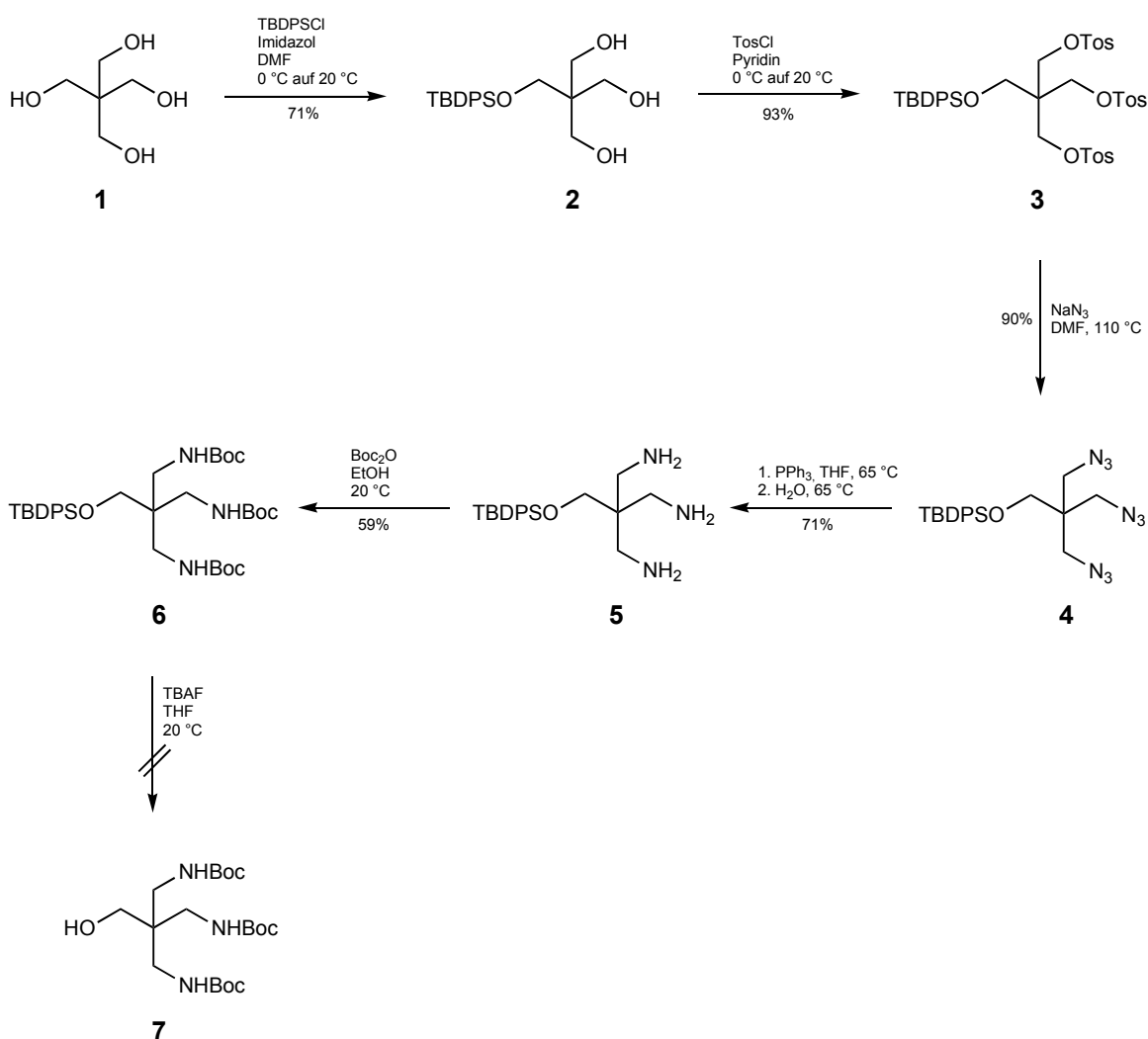


Abb. 4.2: Syntheseansatz ausgehend von Pentaerythrit.

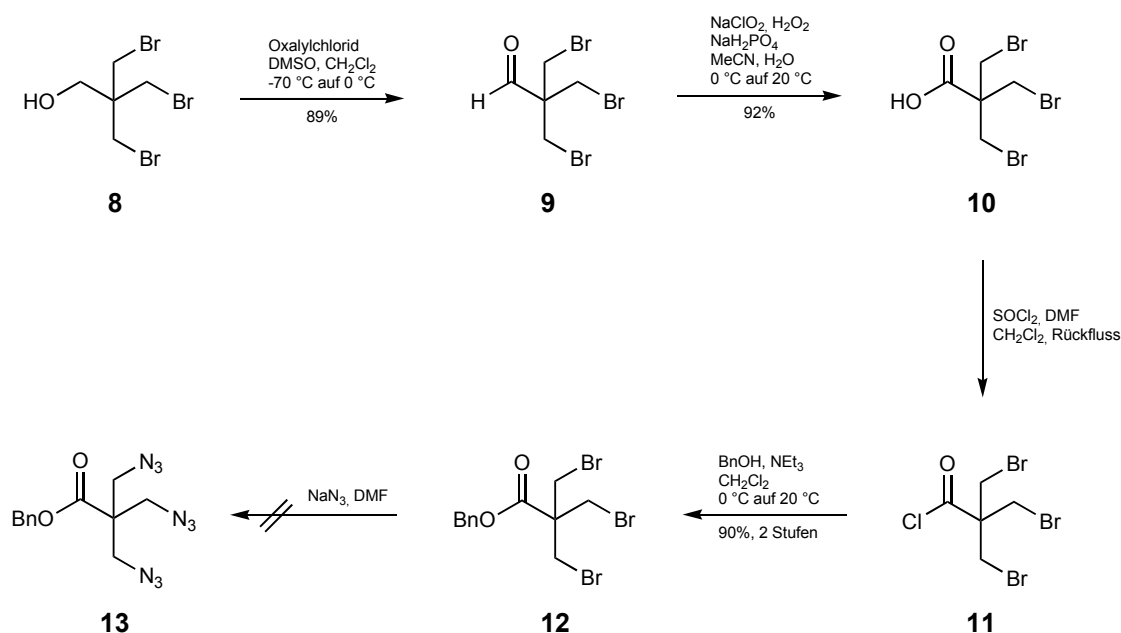
#### 4.1.2 Weitere Syntheseansätze

Da sich die Entschützung der Silylschutzgruppe problematisch zeigte, wurde für die weitere Synthese des Tags auf das deutlich teurere Pentaerythritol-tribromid als Edukt zurückgegriffen (siehe Abbildung 4.3). Ein deutlicher Vorteil von **8** liegt darin, dass die Differenzierung der Funktionen bereits vorhanden ist. Es erschien günstig, zunächst den Alkohol zu oxidieren und anschließend das Triamin aufzubauen, da auf diesem Weg die schwierige Oxidation in Gegenwart geschützter Aminfunktionen und die Gefahr der gleichzeitigen *N*-Oxidbildung umgangen werden konnten.

Die Alkoholfunktion wurde, um die Bromatome nicht abzuspalten, möglichst schonend in zwei Stufen zur Carbonsäure oxidiert. Durch Swern-Oxidation ([Mancuso](#)

et al. (1978)) wurde der Aldehyd **9** erhalten. Die Weiteroxidation erfolgte durch Natriumchlorit in einem Gemisch aus Wasser und Acetonitril bei pH 4. Das in der Reaktion entstandene, aggressivere Hypochlorit wurde durch Zugabe von Wasserstoffperoxid abgefangen (Raach & Reiser (2000); Dalcanale & Montanari (1986)). Die Carbonsäure **10** wurde im Anschluss in zwei Schritten durch Aktivierung mit Thionylchlorid und Dimethylformamid und Umsetzung mit Benzylalkohol als Benzylester **12** geschützt. Die nachfolgende Substitution der Bromide durch Azide gelang jedoch bei höheren Temperaturen nicht ohne die gleichzeitige Substitution des Benzylesters. Unter mildereren Bedingungen (Rye & Withers (2002)) erfolgte keine Reaktion und auch die Zugabe katalytischer Mengen an Kaliumiodid führte nicht zur Bildung des Triazids **13**. Letztendlich wurden keine Bedingungen gefunden, unter denen der nukleophile Angriff ausschließlich am Brom erfolgte, weshalb dieser Reaktionspfad aufgegeben wurde.

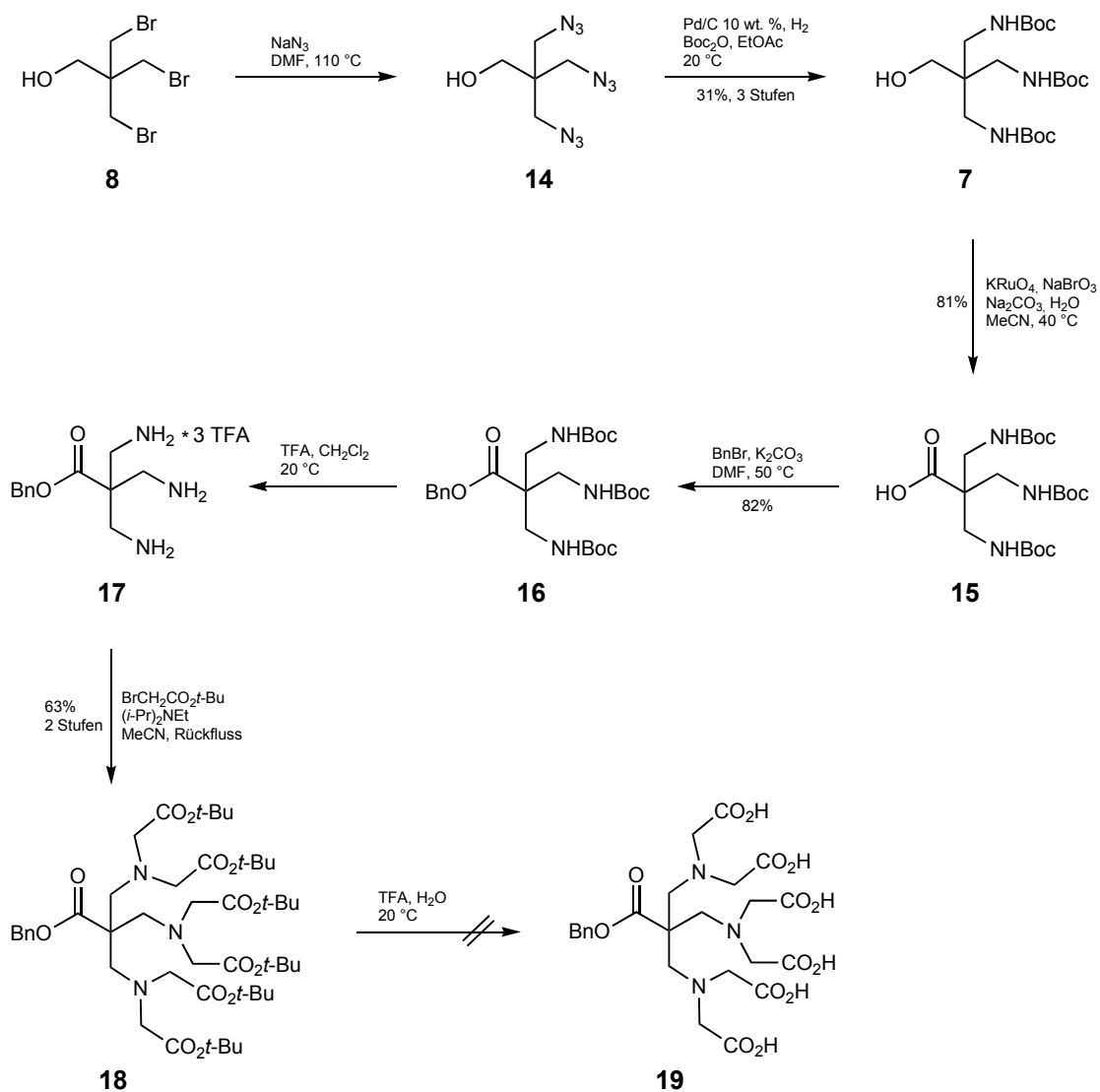
Die Reihenfolge der Oxidation und des Aufbaus der Aminfunktionen musste folglich vertauscht werden (siehe Abbildung 4.4). Ausgehend von **8** wurde das *N*-tert-



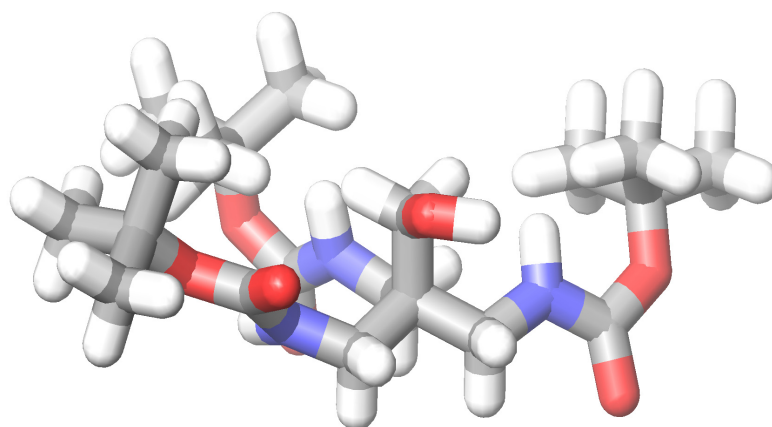
**Abb. 4.3:** Erster Syntheseanatz ausgehend von Pentaerythritol-tribromid. Zunächst wurde die Hydroxylfunktion in zwei Schritten oxidiert, um anschließend Brom gegen Azid zu substituieren.

butoxycarbonyl-geschützte Triamin **7** zunächst in einer Eintopfsynthese in *N*-Methylpyrrolidon dargestellt (Saito et al. (1989); Pihko et al. (2001)). Dabei wurde als erstes Bromid gegen Azid substituiert, gefolgt von einer Palladium-vermittelten Hydrogenolyse und anschließender Umsetzung mit Di-*tert*-butyldicarbonat. Die Ausbeute bei dieser Reaktionsführung war mit 5% allerdings sehr gering. Durch einen Wechsel des Lösungsmittels konnte die Ausbeute auf über 30% deutlich verbessert werden. Die nukleophile Substitution wurde dabei in Dimethylformamid durchgeführt. Anschließend wurde das Lösungsmittel für die Hydrogenolyse und Schützung der Amine gegen Ethylacetat ausgetauscht, ohne das potentiell explosive Triazid **14** zu isolieren. Die Möglichkeiten zur Oxidation der Hydroxylgruppe waren durch die Säurelabilität der Boc-Gruppen eingeschränkt. Die Reaktionsführung unter Swern-Bedingungen brachte keinen Umsatz (Yokoyama et al. (2007)). Ein unter basischen Bedingungen arbeitendes Oxidationsmittel ist das Perruthenat, welches im Bereich von pH 8–12 stabil ist (Bailey et al. (1993)). Die Oxidation zur Carbonsäure **15** erfolgte in zwei Stufen. Im ersten Schritt wurde die Hydroxylgruppe zum Aldehyd oxidiert. Dieser konnte jedoch nicht direkt weiter oxidiert werden. Erst durch die Anlagerung von Wasser zum entsprechenden Aldehydhydrat wurde der zweite Oxidationsschritt möglich, weshalb stets in Gegenwart von Wasser gearbeitet wurde. Perruthenat wurde dabei katalytisch im Bereich von 5–10 mol% unter Zusatz von Kooxidationsmitteln wie *N*-Methylmorpholin-*N*-oxid (NMO) verwendet (Lenz & Ley (1997); Ley et al. (1994)). Tetra-*N*-propylammoniumperruthenat (TPAP) ist auf Grund des unpolaren Gegenions in organischen Solventien wie Acetonitril oder Dichlormethan löslich. Die Reaktionen verliefen allerdings auch bei Temperaturen von 50 °C äußerst langsam (nach 144 Stunden waren jeweils nur 5–15% der Zielverbindung zu isolieren). Der geringe Umsatz lässt sich an Hand einer 3D-Strukturvorhersage von **7** mit dem Programm MacroModel erklären (siehe Abbildung 4.5). Hier ist deutlich zu sehen, dass die Hydroxylfunktion von den drei Boc-Schutzgruppen teilweise umschlossen und somit stark abgeschirmt wird. Lediglich eine Seite verbleibt zugänglich.

Folglich wurde das sterisch ebenfalls anspruchsvolle Tetra-*N*-propylammoniumkation durch Kalium ersetzt, wodurch allerdings die Löslichkeit im organischen Solvens ver-



**Abb. 4.4:** Zweiter Syntheseansatz ausgehend von Pentaerythritol-tribromid. Die Reihenfolge von Oxidation und Aufbau der Aminfunktion wurde vertauscht. Bei der Entschützung der Carboxylfunktionen wurde jedoch nicht das Zielmolekül **19** erhalten.



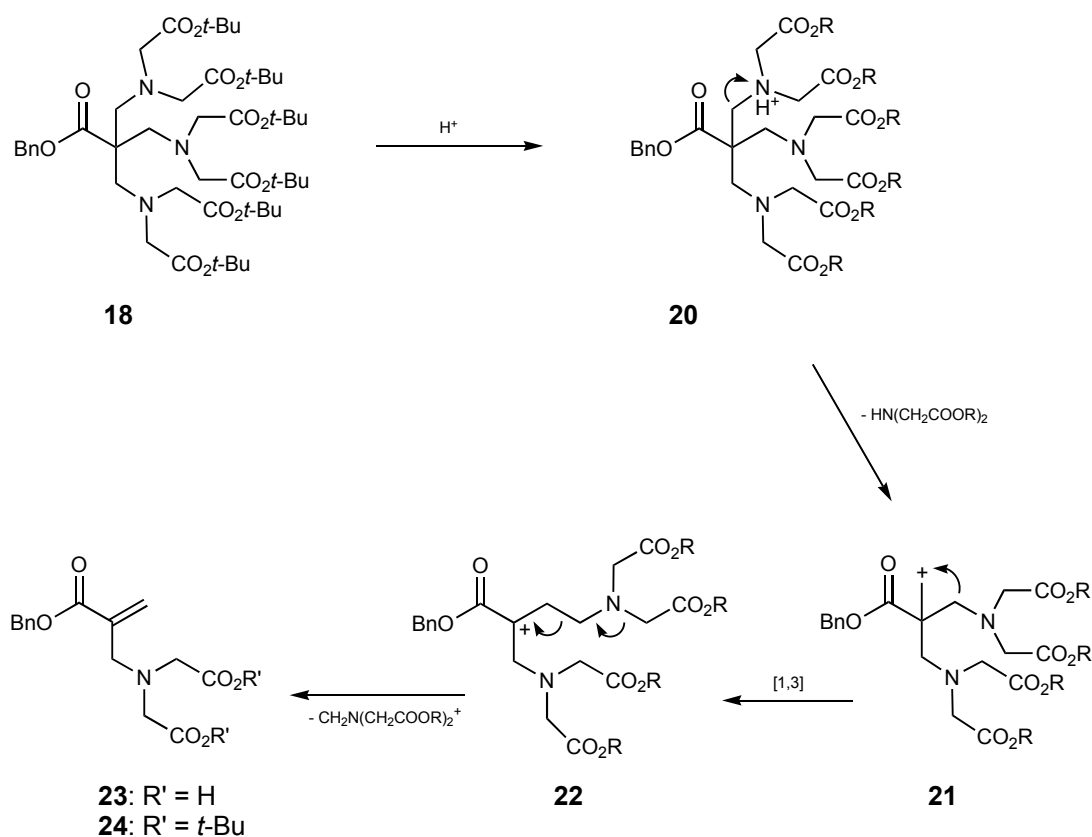
**Abb. 4.5:** Strukturvorhersage von **7**. Die Farben sind wie folgt zugeordnet: Kohlenstoff: grau, Wasserstoff: weiß, Sauerstoff: rot, Stickstoff: blau.

loren ging. Bailey et al. haben Oxidationsreaktionen durch Kaliumper Ruthenat in einer 1M wässrigen Lösung von Natriumbromat und Natriumcarbonat beschrieben. Mit Acetonitril als organischem Solvens wurde **7** phasentransferkatalytisch oxidiert. Nach 192 Stunden war mittels LC-MS Analyse kein Edukt mehr nachweisbar. Durch Optimierung der Salzkonzentrationen wurde ein homogenes Reaktionsgemisch erhalten. Im Zuge der gleichzeitigen Temperaturerhöhung auf 40 °C konnte die Reaktionszeit auf unter 20 Stunden reduziert werden. Im Anschluss wurde die freie Säurefunktion als Benzylester **16** geschützt und durch Abspaltung der Boc-Gruppen in Trifluoressigsäure die Aminogruppen von **17** freigesetzt. Diese wurden durch Refluieren in Acetonitril in Gegenwart einer Base mit Bromessigsäure-*tert*-butylester zur Verbindung **18** *N*-alkyliert. Anschließend sollten die sechs Carboxylgruppen des Tags testweise zu Verbindung **19** entschützt werden. Dafür mussten die *tert*-Butylester mit Trifluoressigsäure gespalten werden. Dies führte jedoch neben der Esterhydrolyse gleichzeitig zu einer, mit einer Fragmentierung verbundenen Umlagerung, welche vermutlich über den in Abbildung 4.6 vorgeschlagenen Mechanismus abläuft.

Die Protonierung eines Stickstoffs in **20** und folgende Abspaltung eines sekundären Amins führt zu dem primären Carbokation **21**, welches sich anschließend durch eine [1,3]-Umlagerung zu dem tertiären Carbokation **22** stabilisiert. Eine weitere Fragmentierung führt zum Acrylat **23**, welches bei der Verwendung von 95 %iger

Trifluoressigsäure quantitativ erhalten wurde. Die Triebkraft der Reaktion beruht dabei auf der Ausbildung eines Michael-Systems. In der Folge wurde versucht, die *tert*-Butylester unter milderen Bedingungen zu entschützen. Allerdings war diese Zersetzung auch bei der Reaktion mit unterschiedlich konzentrierter Ameisensäure, einer deutlich schwächeren Säure im Vergleich zu Trifluoressigsäure, zu beobachten ( $\text{p}K_a$  (Ameisensäure) = 3.75,  $\text{p}K_a$  (Trifluoressigsäure) = 0.77). Nach 1.5 Stunden Reaktionszeit in 85 %iger Ameisensäure waren bei der Reaktionskontrolle mittels ESI-MS neben der Masse von **23** sowohl Signale unvollständig entschützter Zwischenstufen, als auch die Masse von **24** nachweisbar. Dies indiziert, dass die Umlagerung mit einer ähnlichen Geschwindigkeit wie die Entschützung abläuft.

Aufgrund der Säurelabilität des Molekülgerüsts wurde die Schutzgruppenstrategie verändert und der Chelator als Trimethylsilylethanoylester (TMSE-Ester) geschützt (Sieber (1977)). Dies ist in Abbildung 4.7 dargestellt. Die Carboxylfunktionen können



**Abb. 4.6:** Mechanismus der Fragmentierung von **18** zum Acrylat. Dabei steht R in den Strukturen **20–22** für H oder *t*-Bu, R' für H (**23**) bzw. für *t*-Bu (**24**).

hierbei durch Fluoridionen unter Abspaltung von Ethen freigesetzt werden. Hierzu wurde zunächst das neue Alkylierungsmittel **26** aus Bromessigsäurebromid **25** synthetisiert und anschließend mit **17** zu **27** umgesetzt. Die Entschützung der TMSE-Ester erfolgte in 1M TBAF-Lösung in Tetrahydrofuran. Zwar konnte das Zielmolekül **19** in Spuren isoliert werden, jedoch war **23** erneut das Hauptprodukt der Reaktion. Dass diese Fragmentierung selbst in schwach acidem Medium abläuft, verdeutlichte erneut die enorme Triebkraft der Acrylatbildung. Diese hohe Säureempfindlichkeit in Kombination mit der geringen Ausbeute an **19** machte an dieser Stelle einen komplett neuen Ansatz notwendig. Um die Ausbildung des Michael-Systems zu unterbinden, musste zwischen die Carbonylfunktion und das quaternäre Kohlenstoffatom ein Abstandshalter eingefügt werden. Um zusätzliche Rotationsfreiheitsgrade zu vermeiden, musste dieses Verbindungstück axialsymmetrisch sein. Die Wahl fiel dabei auf einen 1,4-disubstituierten Phenylring, da dieser chemisch leichter zu modifizieren ist, als beispielsweise ein Ethinderivat. Zwar wäre, bei analoger Fragmentierungsreakti-

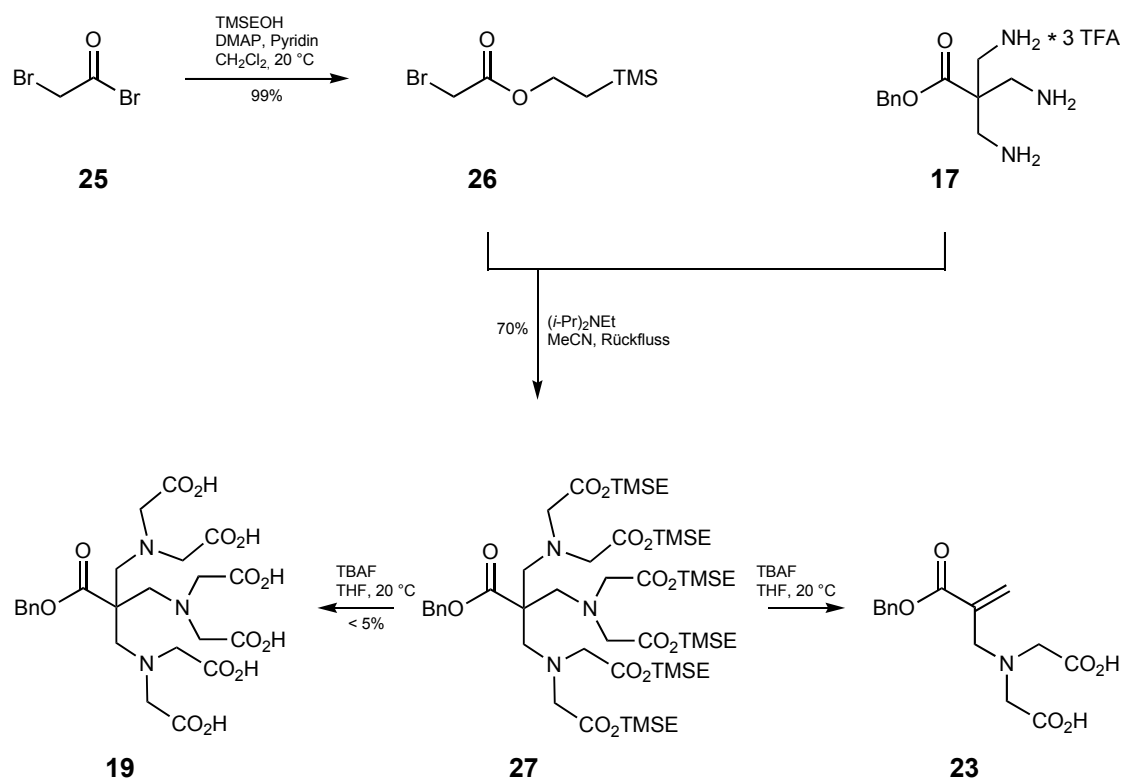


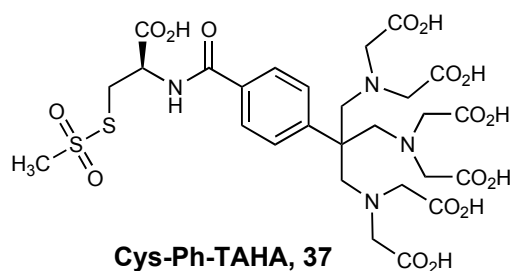
Abb. 4.7: Dritter Syntheseansatz ausgehend von Pentaerythritol-tribromid. Die Carboxylfunktionen wurden als fluordlabile TMSE-Ester geschützt.



on, auch hier die Ausbildung eines konjugierten Systems in Form eines Styrolderivats möglich, allerdings sollte die Triebkraft deutlich geringer sein (siehe Abbildung 4.8).

## 4.2 Synthese von Cys-Ph-TAHA

Die finale Synthese des Cys-Ph-TAHA-Tags (Cysteiny-Phenyl-TAHA) ist in Abbildung 4.9 gezeigt. Ausgehend von 2-(4-Bromphenyl)ethanol **28** wurde die Hydroxylfunktion zunächst mit dem Dess-Martin Periodinan in Dichlormethan zum entsprechenden Aldehyd **29** oxidiert (Dess & Martin (1983)). Im folgenden Reaktionsschritt wurde die  $C_3$ -Achse aufgebaut. Paraformaldehyd diente hierbei einerseits als  $C_1$ -Einheit, andererseits als Reduktionsmittel (Hellmann et al. (1995)). Trotz der drei Hydroxylfunktionen ließ sich **30** säulenchromatographisch leicht in Form eines farblosen Öls isolieren. Die anschließende Umwandlung der Alkohol- in Aminfunktionen erfolgte analog zu den zuvor beschriebenen Reaktionen. Die Aktivierung der Hydroxylgruppen mit Tosylchlorid ergab **31**, nukleophile Substitution mit Natriumazid in Dimethylformamid führte zu **32**. An dieser Stelle wurde das dreifache Azid auf Grund der potentiellen Explosivität organischer Azide nicht isoliert, sondern stets in Lösung behalten. Das Lösungsmittel wurde gewechselt, indem die Reaktionslösung der Azidsubstitution auf Wasser gegossen wurde, **32** daraus mit Dichlormethan extrahiert und anschließend, unter Ausnutzung der unterschiedlichen Siedepunkte, in eine Tetrahydrofuranlösung überführt wurde. Die Reduktion



**Abb. 4.8:** Neues Zielmolekül Cys-Ph-TAHA: Zwischen die  $C_3$ -Achse und die Carbonylfunktion, an der der Linker angebracht ist, wurde als Abstandshalter ein Phenylring eingefügt.

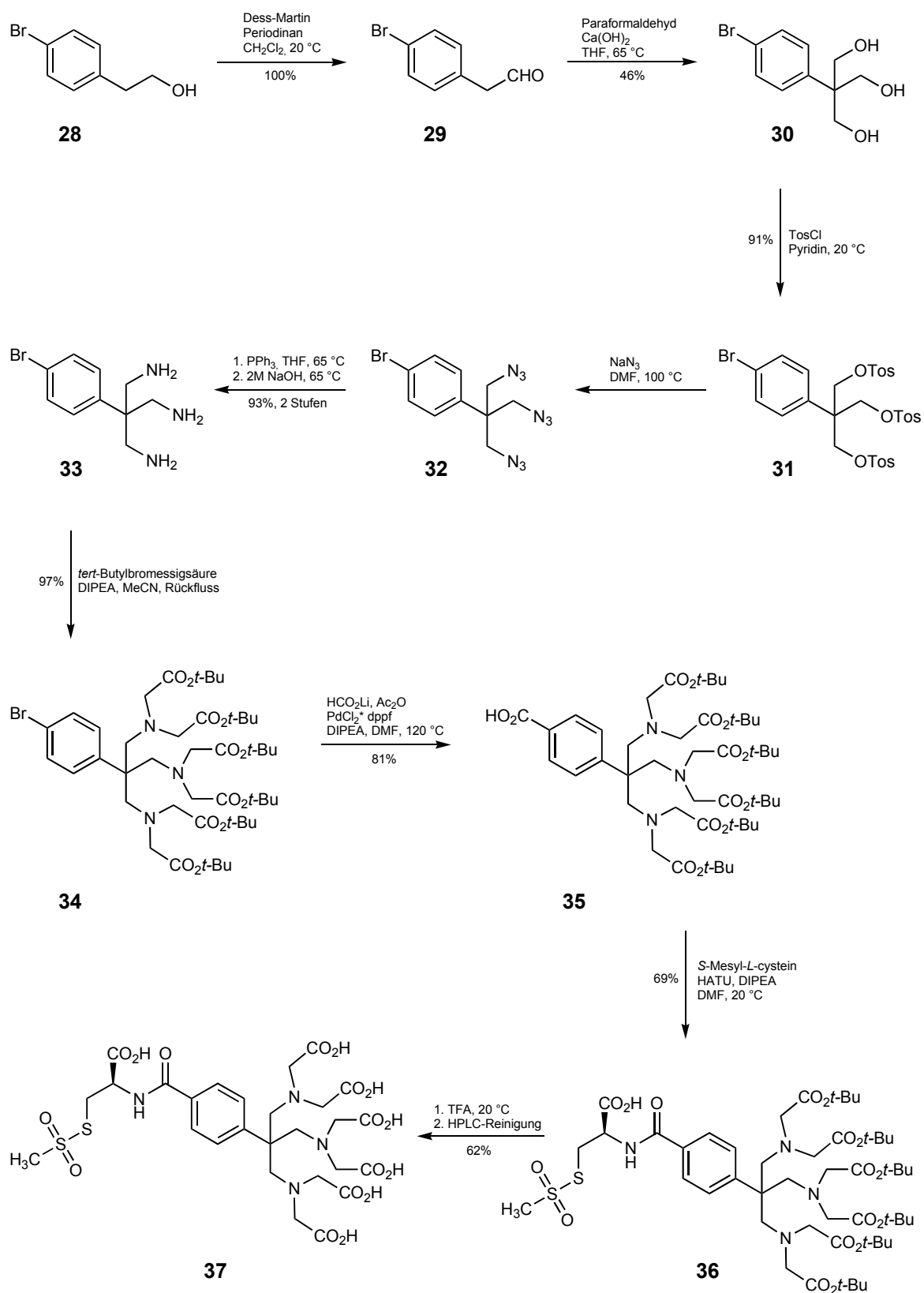
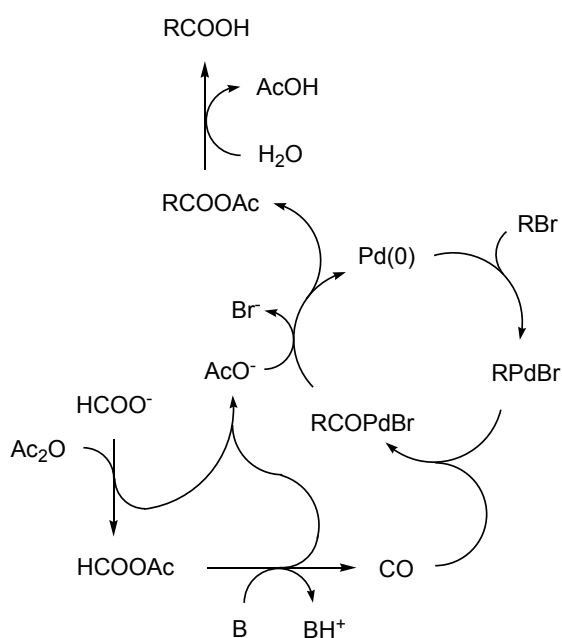
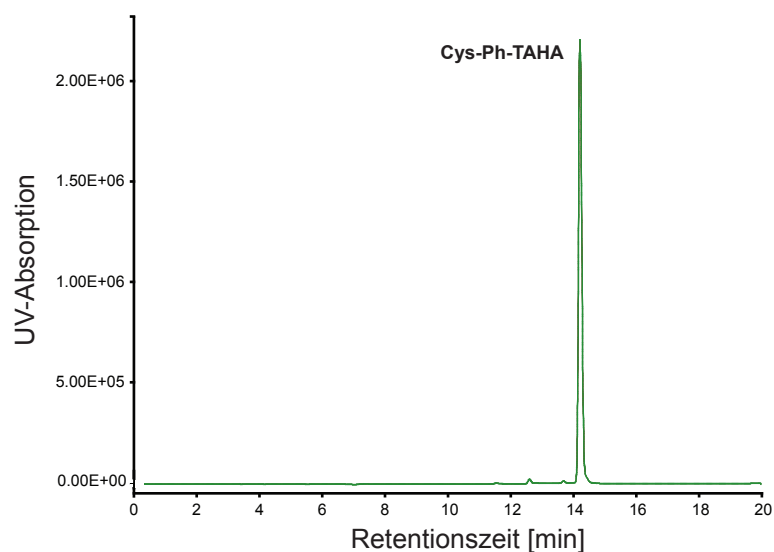


Abb. 4.9: Syntheschema von Cys-Ph-TAHA.



**Abb. 4.10:** Reaktionsschema der Hydroxycarbonylierung. Kohlenmonoxid wird *in situ* aus Lithiumformiat und Essigsäureanhydrid gebildet und inseriert anschließend in die Kohlenstoff-Palladiumbindung. Durch reduktive Eliminierung und Hydrolyse wird schließlich die Carbonsäure freigesetzt.

der Azide erfolgte unter Staudingerbedingungen, da eine Hydrogenolyse zum Verlust des Broms am Phenylring geführt hätte (Bunnage et al. (2003); Staudinger & Meyer (1919)). Im nächsten Schritt wurde **33** mit Bromessigsäure-*tert*-butylester *N*-alkyliert. Der Reaktionsverlauf wurde dabei per HPLC kontrolliert. Nachdem der Chelator synthetisiert war, musste noch das Verbindungsstück aufgebaut werden, über das der Tag mit dem Protein verbunden werden kann. Hierzu wurde das arylische Brom von **34** mittels einer Palladium-katalysierten Hydroxycarbonylierung in eine Carbonsäure überführt. Als Ligand wurde 1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocen, kurz dppf, verwendet. Bei der Reaktion bildet sich zunächst ein gemischtes Anhydrid aus dem Formiat und Essigsäureanhydrid. Basenvermittelt, sowie durch die erhöhte Temperatur, zerfällt dieses und setzt *in situ* Kohlenmonoxid frei, welches in die Bindung zwischen Phenylring und Palladium inseriert. Der Reaktionsmechanismus ist in Abbildung 4.10 schematisch dargestellt (Berger et al. (2006); Cacchi et al. (2003); Kubota et al. (1994)). Die erhaltene Carbonsäure **35** wurde mit *S*-Mesyl-*L*-cystein (Weidner & Block (1972); Hart (1985)) durch Aktivierung mit HATU in



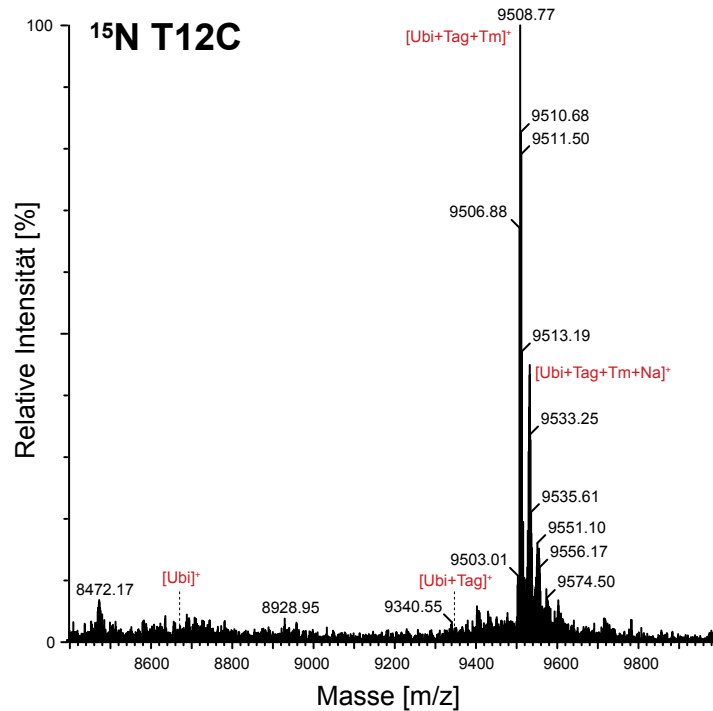
**Abb. 4.11:** Chromatogramm von HPLC-gereinigtem Cys-Ph-TAHA. Der Peak hat eine Reinheit von  $> 97\%$  bei einer Retentionszeit von 14.2 min. Gradient: 0–30% in 15 min ( $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{MeCN}$  mit jeweils 0.1% TFA).

Gegenwart von Hünig-Base gekuppelt. *S*-Mesityl-*L*-cystein wurde bereits bei früheren Tags als Verbindungsstück verwendet (Leonov et al. (2005); Haberz et al. (2006)). Somit sollte gewährleistet werden, dass sich Unterschiede im Alignmenttensor auf die unterschiedlichen Chelatoren zurückführen lassen. **36** wurde bei Raumtemperatur in konzentrierter Trifluoressigsäure entschützt und Cys-Ph-TAHA **37** erhalten. Der Tag war unter diesen harschen Bedingungen vollständig stabil und zeigte, wie erwartet, keine Fragmentierung, da durch die Einführung des Phenylrings als Abstandhalter zur Carbonylfunktion die Triebkraft der Umlagerung entscheidend herabgesetzt wurde. Abschließend wurde Cys-Ph-TAHA per HPLC gereinigt und lyophilisiert. Das Chromatogramm ist in Abbildung 4.11 gezeigt.

### 4.3 Herstellung der NMR-Proben

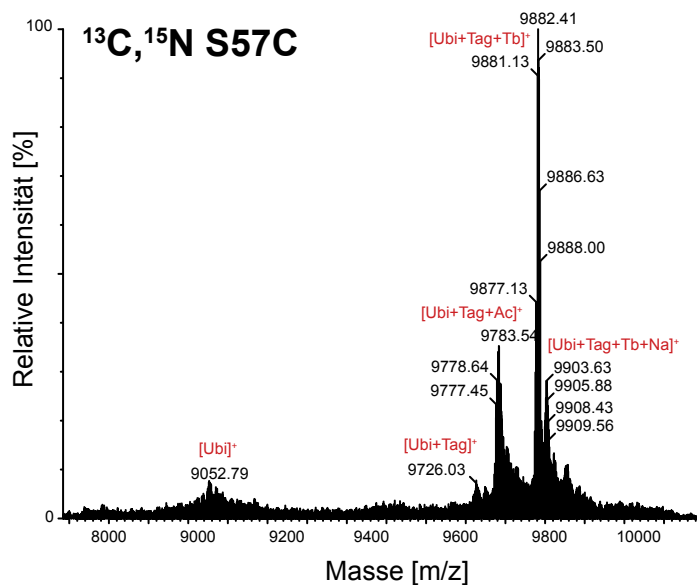
Für die Taggingreaktion muss das Protein im reduzierten Zustand, also mit freier Thiolfunktion, vorliegen. Nach der Aufreinigung wurden den Ubiquitinproben TCEP zur Stabilisierung zugesetzt und diese anschließend gefriergetrocknet. Dieses nicht

flüchtige Reduktionsmittel verhindert die Ausbildung von Disulfidbrücken und muss vor der Taggingreaktion entfernt werden, damit die Bindung von Protein und Tag nicht sofort wieder gebrochen wird. Im Falle von Ubiquitin kann TCEP einfach durch Dialyse entfernt werden, da die Dimerisierung relativ langsam verläuft. Vier Stunden nach Beendigung der Dialyse war mittels Massenspektrometrie nur ein geringes Dimerensignal zu sehen, die vollständige Dimerisierung der Probe war erst nach Tagen zu beobachten. Die Reaktion wurde in MOPS Puffer (50 mM, Natriumchlorid 50 mM, pH 6.8) bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels Massenspektrometrie. Dazu wurde ein kleiner Teil der getaggen Proteinelösung gegen den flüchtigen Ammoniumacetatpuffer dialysiert. Auch wenn auf diese Weise keine absoluten Aussagen über die Reaktionsausbeute getroffen werden konnten, war zumindest direkt ersichtlich, ob noch ungetaggt Protein vorliegt. In diesem Fall wurde die Taggingreaktion wiederholt. Insgesamt waren drei Äquivalente an Tag ausreichend, um das Protein quantitativ zu markieren. Anschließend wurde der Chelator für die Messungen der RDCs und PCSs mit Lanthanoidionen beladen. Zunächst wurde eine Probe der T12C-Mutante vorsichtig mit Terbiumchloridlösung titriert. Im  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum zeigten sich Pseudokontaktverschiebungen, die isotropen Peaks nahmen allerdings ab einem Verhältnis von 1:1 zum verschobenen Peak mit zunehmender Konzentration an Terbium nicht weiter ab. Auch die Reaktion mit einem zwanzigfachen Überschuss an Terbiumchlorid mit anschließender Dialyse gegen den Messpuffer lieferte eine Probe mit einer Beladung von nur etwa 50%. Die Dialyse selbst konnte als Ursache ausgeschlossen werden, da die Beladung durch mehrtägiges Dialysieren nicht weiter abnahm. Um das Problem der unvollständigen, nachträglichen Beladung zu umgehen, wurde Cys-Ph-TAHA im Folgenden vor der Taggingreaktion beladen. Hierzu wurde der Tag mit einem zweifachen Überschuss an Lanthanoidsalz in reinem Wasser für zwei Stunden inkubiert. Durch die Carboxylfunktionen des Tags und das Metallion hat die Lösung etwa pH 4, was die Beladung des Chelators begünstigt. Das Protein wurde parallel gegen MOPS-Puffer mit pH 8.0 dialysiert. Dies hatte zwei Gründe. Zum einen wird die Reaktivität des Cysteins erhöht, zum anderen fällt der Überschuss an Lanthanoidionen instantan aus, sobald die Proteinelösung zu der ungepufferten, vorbeladenen Taglösung pipettiert wird.



**Abb. 4.12:** Massenspektrum von  $^{15}\text{N}$ -markiertem, Cys-Ph-TAHA-getagtem T12C, beladen mit  $\text{Tm}^{3+}$ . Die Massen des ungetaggtten, beziehungsweise unbeladenen Proteins sind mit gestrichelten Linien markiert.

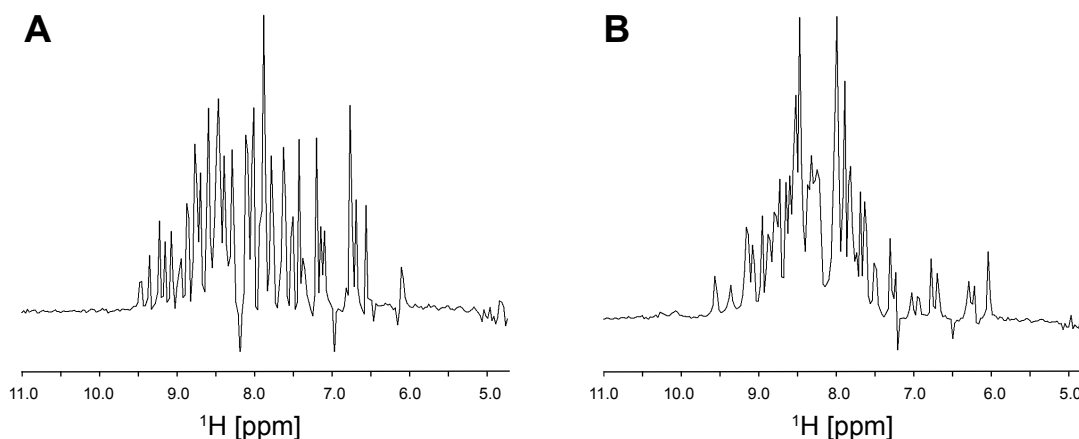
Im Anschluss an die Taggingreaktion wurde der überschüssige Metall-bindende Tag durch mehrfaches Waschen mit dem Messpuffer in einem Zentrifugationskonzentrator entfernt. Ein allgemeines Taggingprotokoll ist im experimentellen Teil unter 6.5 gegeben. Im Gegensatz zum unbeladenen Tag waren für einen vollständigen Umsatz fünf Äquivalente des beladenen Tags von Nöten. Zur Bestimmung der Beladung wurden die Peakintensitäten verschiedener Aminosäurereste, deren anisotrope und isotrope Signale im HSQC-Spektrum hinreichend aufgelöst waren, miteinander verglichen (siehe Anhang 7.6). Mit der Methode der Vorbeladung wurden Beladungen von 98% für T12C erreicht. In Abbildung 4.12 ist ein Massenspektrum von  $^{15}\text{N}$ -markiertem T12C, beladen mit Thulium, gezeigt. Es ist kein signifikanter Peak des ungetaggtten Proteins zu sehen. Inwieweit das Signal des getaggtten aber unbeladenen Ubiquitins zu sehen ist, kann quantitativ nicht als Merkmal der Beladung herangezogen werden, da die Metallionen häufig durch die Ionisierung verloren gehen. In Proben der S57C Mutante betrug der Anteil der anisotropen Komponente



**Abb. 4.13:** Massenspektrum von  $^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ -markiertem, Cys-Ph-TAHA-getagtem S57C, beladen mit  $\text{Tb}^{3+}$ .

stets etwa 90% und war damit geringer als für T12C. Wie das beispielhafte Massenspektrum von  $^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ -markiertem S57C, beladen mit Terbium, in Abbildung 4.13 zeigt, ist die Ursache hierfür eine unvollständige Taggingreaktion. Aber auch durch erneuten Umsatz oder Reaktion mit mehr Äquivalenten an vorbeladenem Cys-Ph-TAHA wurden die Ausbeuten nicht weiter gesteigert, sondern vielmehr die zuvor beschriebenen 90% reproduziert. Eine mögliche Erklärung war die Dimerisierung des Proteins. Mittels Massenspektrometrie konnten allerdings keine S57C Dimere nachgewiesen werden. Eine Fragmentierung im Zuge der Ionisierung schied ebenso aus, da Ubiquitindimere bei den angelegten Ionisierungsenergien nicht auseinander brechen. Warum letztendlich etwa 10% an S57C inaktiviert, beziehungsweise für den Tag unzugänglich waren, konnte nicht bestimmt werden.

Insgesamt wurde durch die Vorbeladung des Cys-Ph-TAHA Tags und die anschließende Reaktion eine effektive und reproduzierbare Methode gefunden, Ubiquitin in hoher Ausbeute paramagnetisch zu markieren. Durch sorgfältiges Entfernen der überschüssigen Lanthanoidionen aus den Proben wurden Spektren von hoher Qualität erhalten. In Abbildung 4.14 sind beispielhaft  $^1\text{H}$ -Spektren von Cys-Ph-TAHA-getagtem T12C gezeigt. Es ist zu sehen, dass die Linien durch die Beladung mit



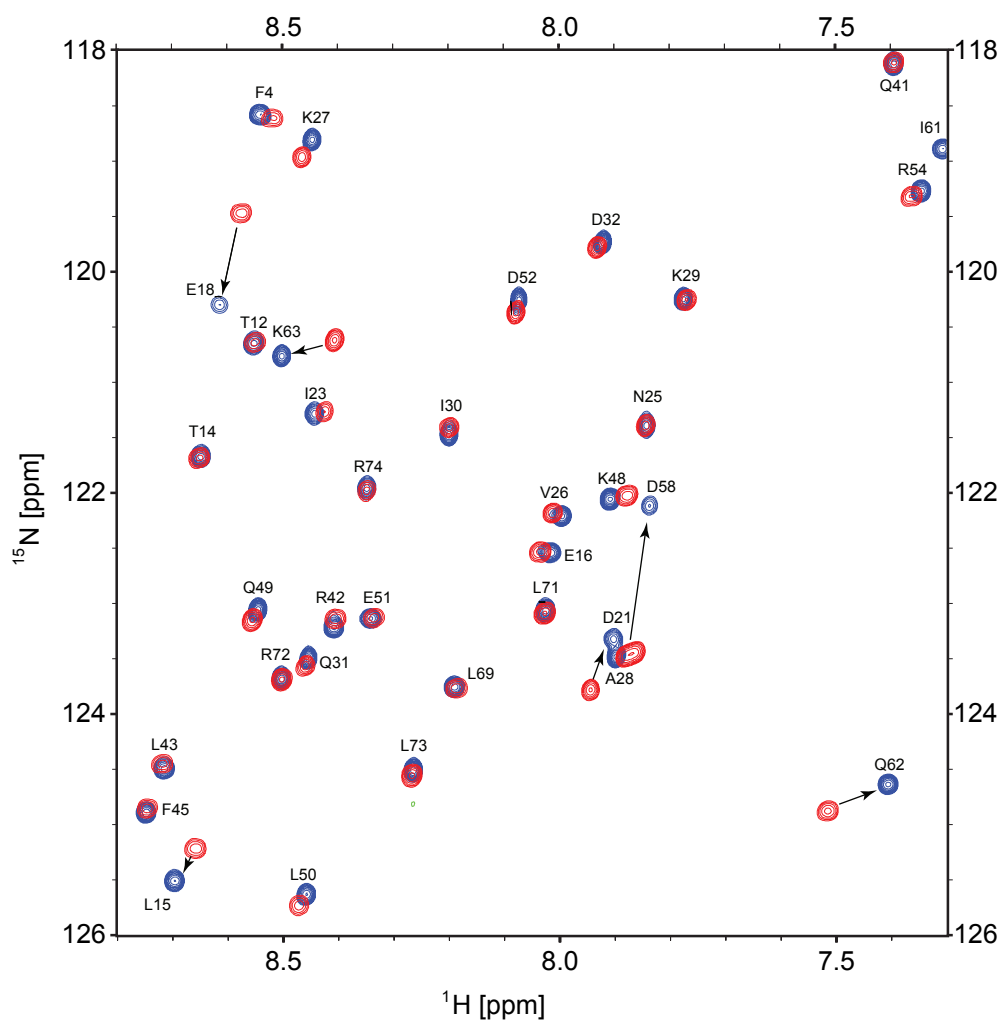
**Abb. 4.14:** Ausschnitte aus den  $^1\text{H}$ -Spektren der Amidregion von Cys-Ph-TAHA getaggetem Ubiquitin. Die Proben wurden mit diamagnetischem  $\text{Lu}^{3+}$  (A) bzw. paramagnetischem  $\text{Tm}^{3+}$  (B) beladen und unter identischen Bedingungen vermessen.

Thulium im Vergleich zu diamagnetischem Lutetium nur wenig verbreitert waren. Beide Spektren wurden mit den gleichen Parametern aufgenommen.

Innerhalb dieser Arbeit wurden verschiedene Proben hergestellt. Für die letztendliche Datenauswertung wurden acht Proben mit einer jeweiligen Konzentration von etwa 1.5 mM verwendet. Dabei wurden die beiden zur Verfügung stehenden Ubiquitinmutanten (T12C und S57C) jeweils mit  $\text{Tb}^{3+}$ ,  $\text{Tm}^{3+}$  und  $\text{Lu}^{3+}$  vorbeladenem Cys-Ph-TAHA getaggt. Im Folgenden werden diese Proben durch die Mutante in Kombination mit dem verwendeten Metall angegeben (beispielsweise T12C Tm). Zusätzlich wurde für beide Mutanten eine getaggte aber unbeladene Probe hergestellt. Diese wurden als isotrope Referenzproben für die RDC-Messungen verwendet.

Für die PCS-Messungen wurden als Referenz T12C Lu und S57C Lu vermessen, da das diamagnetische  $\text{Lu}^{3+}$  im Vergleich zu den Lanthanoidionen eine ähnliche Ionengröße und Elektronenkonfiguration aufweist. In Abbildung 4.15 ist ein Ausschnitt aus den überlagerten  $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren von S57C Lu und ungetaggetem S57C gezeigt. Einige Aminosäurereste, wie E18 oder D58, die sich in der Struktur nahe am Tag befinden, wurden stark beeinflusst durch die Anwesenheit des Tag-gebundenen Metalls. Die unterschiedlichen chemischen Verschiebungen beruhen aber vor allem





**Abb. 4.15:** Überlagerung der  $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC Spektren von ungetaggttem Ubiquitin S57C (rot) und Cys-Ph-TAHA getaggttem Ubiquitin-S57C, beladen mit  $\text{Lu}^{3+}$  (blau).

auf Ladungsveränderungen rund um den Tag. Die Einflüsse des Tags auf die Struktur sind hingegen gering, wie die im folgenden Kapitel vorgestellten Ergebnisse belegen.

# Kapitel 5

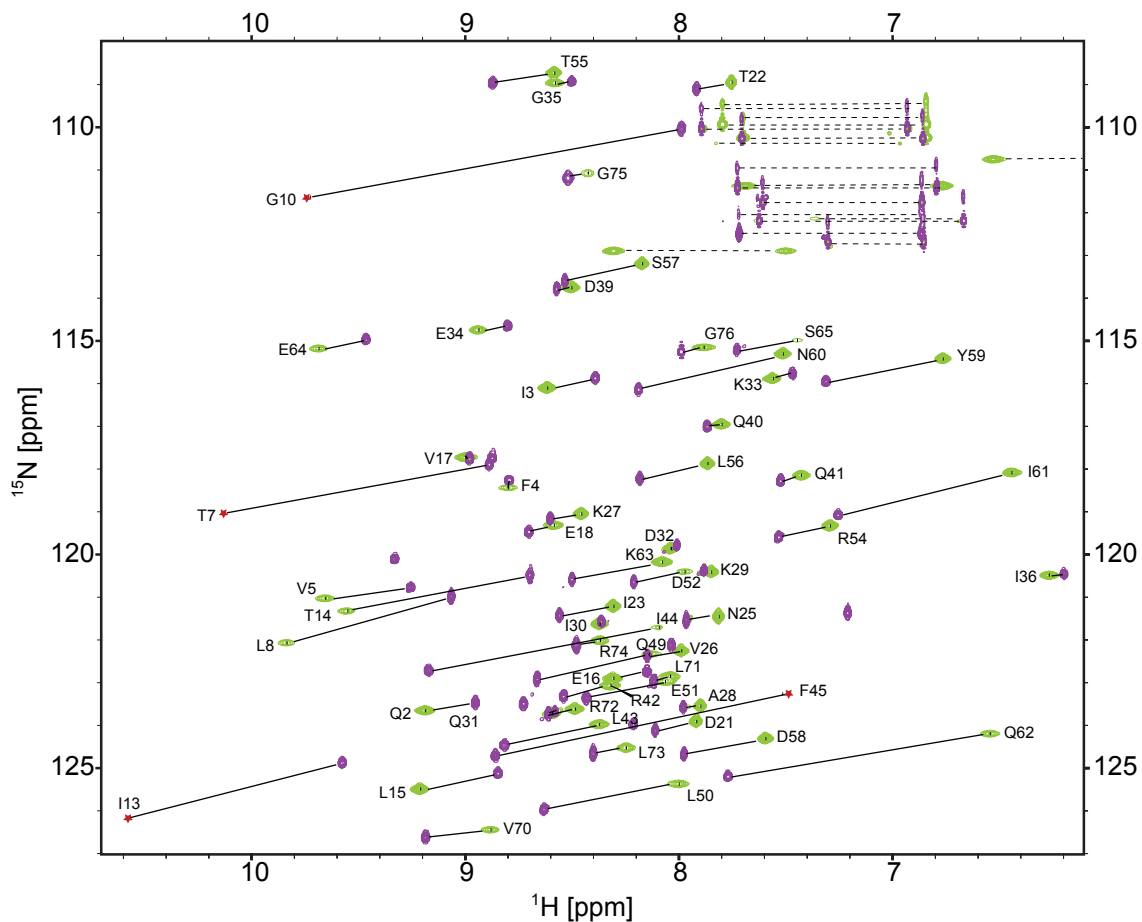
## Ergebnisse und Diskussion

### 5.1 Pseudokontaktverschiebungen

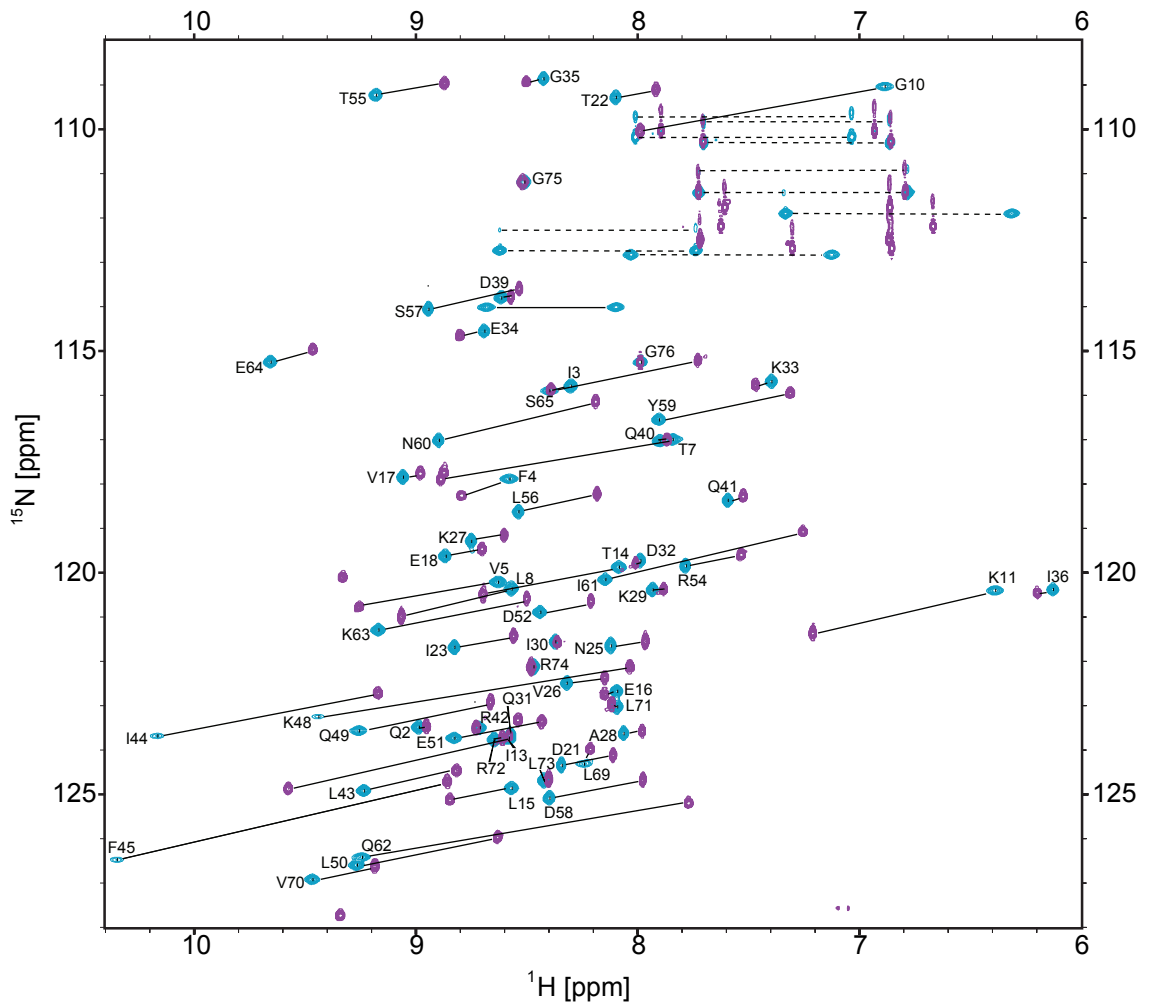
Als Pseudokontaktverschiebung (PCS) wird die Änderung der chemischen Verschiebung eines Kerns im Vergleich zum isotropen Spektrum bezeichnet, die durch die abstandsabhängige Interaktion mit einem magnetisch anisotropen Metallion entsteht (siehe Kapitel 2.2). Um die PCSs des Proteinrückgrats zu bestimmen, wurden  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren einer anisotropen und einer isotropen Referenzprobe aufgenommen.

In den Abbildungen 5.1 und 5.2 sind die HSQC-Spektren von T12C Tb und T12C Tm, mit jeweils T12C Lu überlagert, gezeigt. Aus Gründen der Übersicht wurden negative Signale, die durch Faltung während der Acquisition entstanden sind, ausgeblendet. Im Anhang in den Tabellen 7.2 und 7.3 sind die vollständigen chemischen Verschiebungen und die resultierenden PCSs angegeben. Die erhaltenen Pseudokontaktverschiebungen sind mit durchgezogenen Linien eingezeichnet. Für T12C Tm konnten insgesamt 65 PCSs extrahiert werden. Somit wurden im Vergleich zur isotropen Probe lediglich fünf Signale durch die paramagnetische Relaxationsverstärkung verloren. Mit T12C Tb wurden 59 PCSs erhalten. Im HSQC-Spektrum waren die gleichen Aminosäurereste, wie für T12C Tm nicht sichtbar. Darüber hinaus fehlten weitere Signale in der unmittelbaren Umgebung dieser Reste, beziehungsweise waren nur noch schwach nachweisbar (T7, G10, I13 und F45). Dies deutet bereits auf eine sehr ähnliche Metallposition in beiden Proben hin. Der zusätzliche Signalverlust

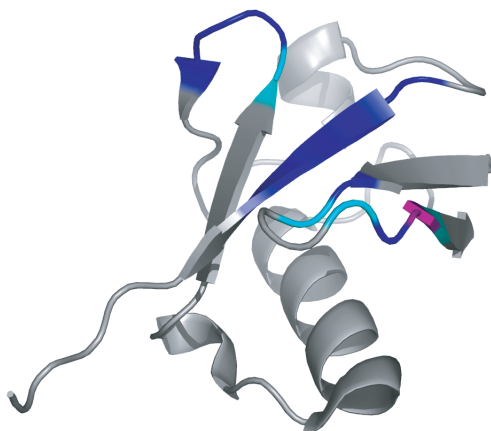
im Vergleich von Terbium zu Thulium lässt sich durch die stärkeren PRE-Effekte von Terbiumionen erklären (Pintacuda et al. (2007)). In Abbildung 5.3 sind diese Aminosäurereste in der Ubiquitinstruktur (PDB-Kode: 1D3Z) farbig markiert. Erwartungsgemäß befinden sie sich auf derselben Seite des Proteins. Reste, die auch im isotropen Spektrum keinen Peak zeigten, wurden nicht mit berücksichtigt.



**Abb. 5.1:** T12C Tb: Überlagerung der  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren von Cys-Ph-TAHA getagtem Ubiquitin-T12C, beladen mit  $\text{Tb}^{3+}$  (grün) und  $\text{Lu}^{3+}$  (violett). PCSs sind mit durchgezogenen Linien eingezeichnet, Signale von Seitenketten sind durch unterbrochene Linien angezeigt. Die gefalteten Signale (States-TPPI) der Aminosäurereste T9 und S20 sind ausgeblendet. Die Peaks von T7, G10, I13 und F45 sind schwach und mit einem Stern (rot) markiert. Eine vollständige Liste der chemischen Verschiebungen der insgesamt 59 PCSs ist im Anhang in Tabelle 7.2 gegeben.



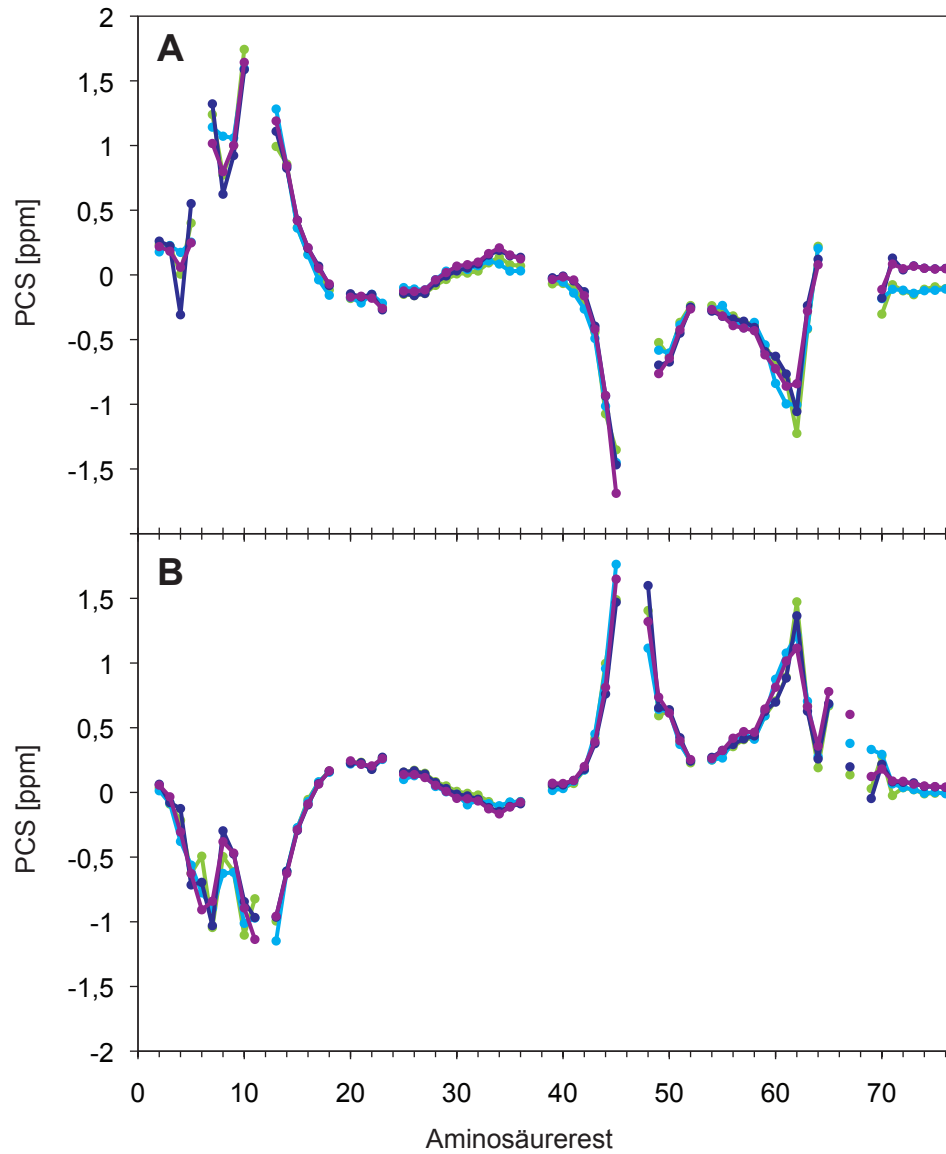
**Abb. 5.2:** T12C Tm: Überlagerung der  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren von Cys-Ph-TAHA getagtem Ubiquitin-T12C, beladen mit  $\text{Tm}^{3+}$  (hellblau) und  $\text{Lu}^{3+}$  (violett). PCSs sind mit durchgezogenen Linien eingezeichnet, Signale von Seitenketten sind durch unterbrochene Linien angezeigt. Die gefalteten Signale (States-TPPI) der Aminosäurereste K6, T9 und S20 sind ausgeblendet. Eine vollständige Liste der chemischen Verschiebungen der insgesamt 65 PCSs ist im Anhang in Tabelle 7.3 gegeben.



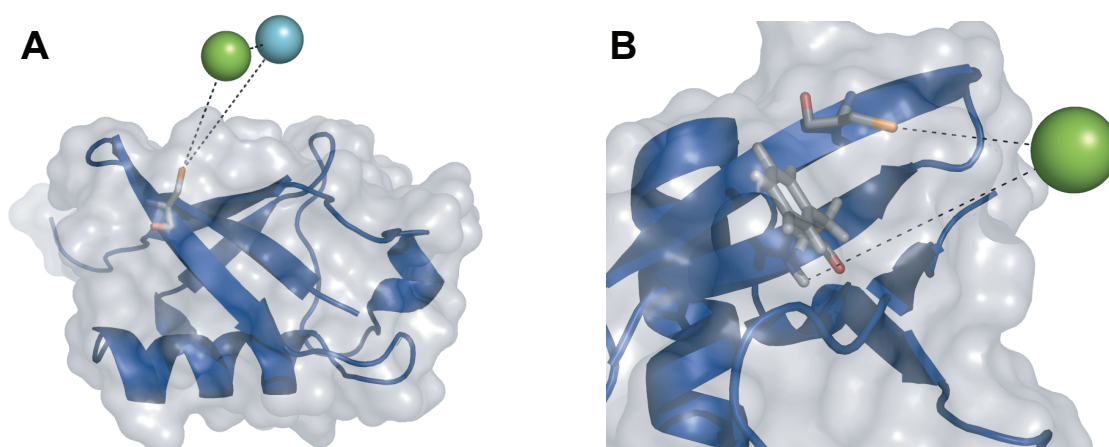
**Abb. 5.3:** Schematische Darstellung der Aminosäurereste, deren Signale bei T12C Tb durch PRE nicht mehr detektierbar waren (dunkelblau). Zusätzlich sind die angrenzenden Reste (T7, G10, I13 und F45), die schwache Signale zeigten, markiert (cyan). C12 (magenta) ist Teil des  $\beta$ -Faltblatts.

Die PCSs wurden mit einem MATLAB Skript von Dr. Mitcheell Maestre Martinez ausgewertet. Mit diesem Skript wurde die Position des Lanthanoidions, sowie der Alignmenttensor bestimmt und daraus die PCSs zurück berechnet. Dafür wurde in der Rechnung ein Raster über die Struktur gelegt und das Metallion entlang dieses Gitters bewegt (*grid search*). Für jede Position wurden für die experimentellen PCSs nach der Methode der kleinsten Quadrate (*least square fit*) jeweils der Tensor und der  $Q$ -Faktor ermittelt und auf diese Weise nach dem kleinsten  $Q$ -Faktor gesucht. Aus den zehn Strukturen der NMR-Struktur (1D3Z) wurde ein gemittelter Tensor bestimmt.

Die Auftragungen der experimentellen und berechneten  $^1\text{H}$ - und  $^{15}\text{N}$ -PCSs gegen die Aminosäurereste sind für die T12C-Mutante in Abbildung 5.4 gezeigt. Die Kurvenverläufe sind, sowohl für die experimentellen Daten in Bezug auf die zurück berechneten, als auch die der PCSs von  $^1\text{H}$  und  $^{15}\text{N}$  zueinander, nahezu identisch. Die gute Qualität der Daten wird auch durch die kleinen  $Q$ -Faktoren von 0.19 für T12C Tb, sowie 0.15 für T12C Tm deutlich (siehe Tabelle 5.1). Die größten Abweichungen in beiden Auftragungen weisen die Aminosäurereste F4–K11 und Q62–L69 auf. Diese befinden sich allesamt in der Nähe der berechneten Ionenposition, welche in Abbil-



**Abb. 5.4:** Auftragungen der experimentellen und berechneten PCSs der T12C Mutante, beladen mit Tb<sup>3+</sup> (A) und Tm<sup>3+</sup> (B), gegen die Aminosäurereste. Die diamagnetische Referenzprobe war T12C Lu. Die Daten sind wie folgt gekennzeichnet: <sup>1</sup>H (exp): grün, <sup>1</sup>H (ber): dunkelblau, <sup>15</sup>N (exp): hellblau, <sup>15</sup>N (ber): violett. Die vollständigen Daten sind im Anhang in den Tabellen 7.2 und 7.3 angegeben.

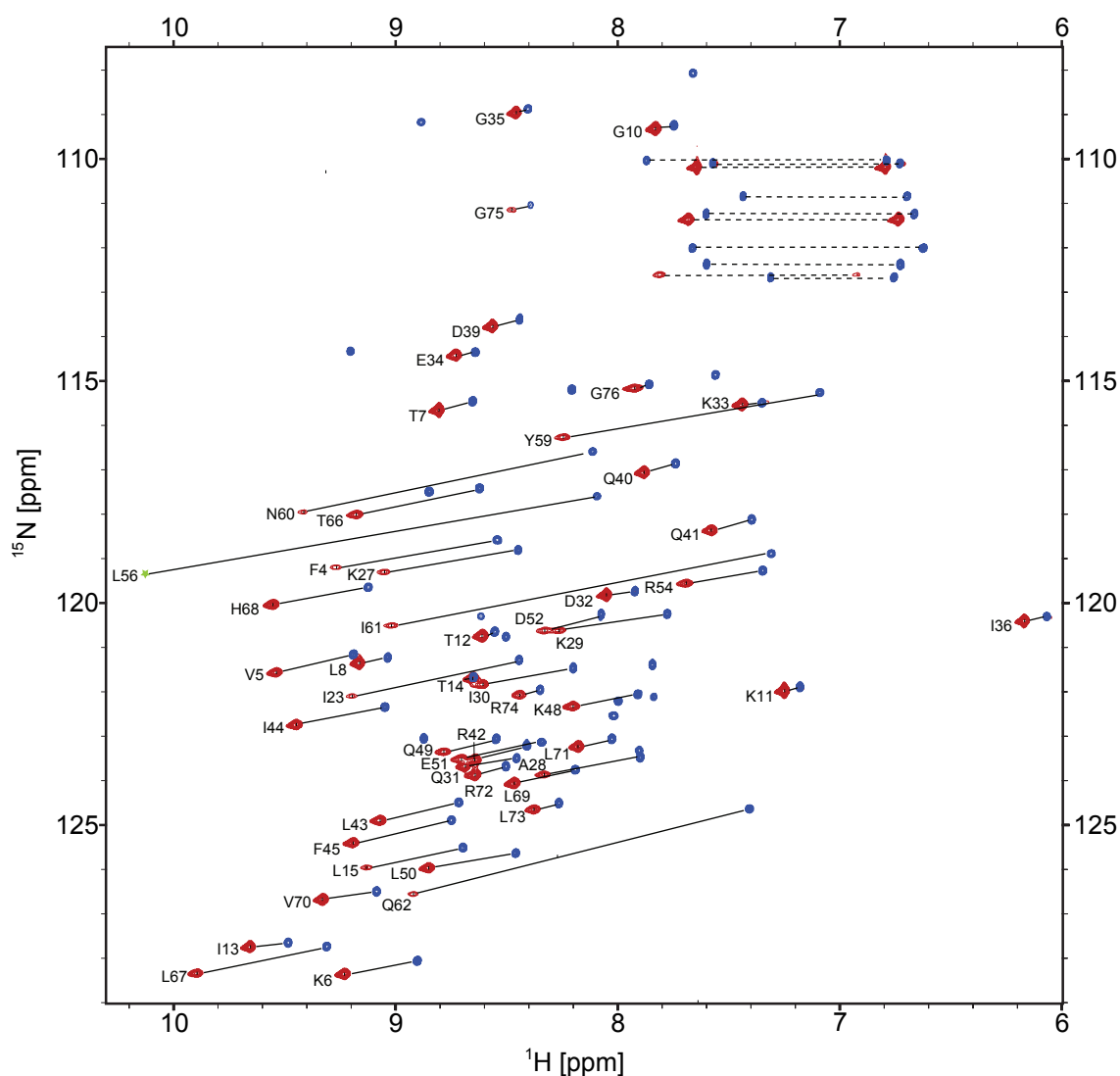


**Abb. 5.5:** Darstellung von T12C mit den berechneten Metallpositionen auf Basis der NMR-Struktur 1D3Z. A: Die Metallabstände vom Schwefel des C12 betragen  $8.8 \text{ \AA}$  für  $\text{Tb}^{3+}$  (grün) und  $12.8 \text{ \AA}$  für  $\text{Tm}^{3+}$  (hellblau). Die berechneten Ionenpositionen liegen  $5.5 \text{ \AA}$  von einander entfernt. B: Vergrößerung aus T12C Tb. Der Abstand vom F4-Amidproton zum  $\text{Tb}^{3+}$  beträgt  $13.0 \text{ \AA}$ .

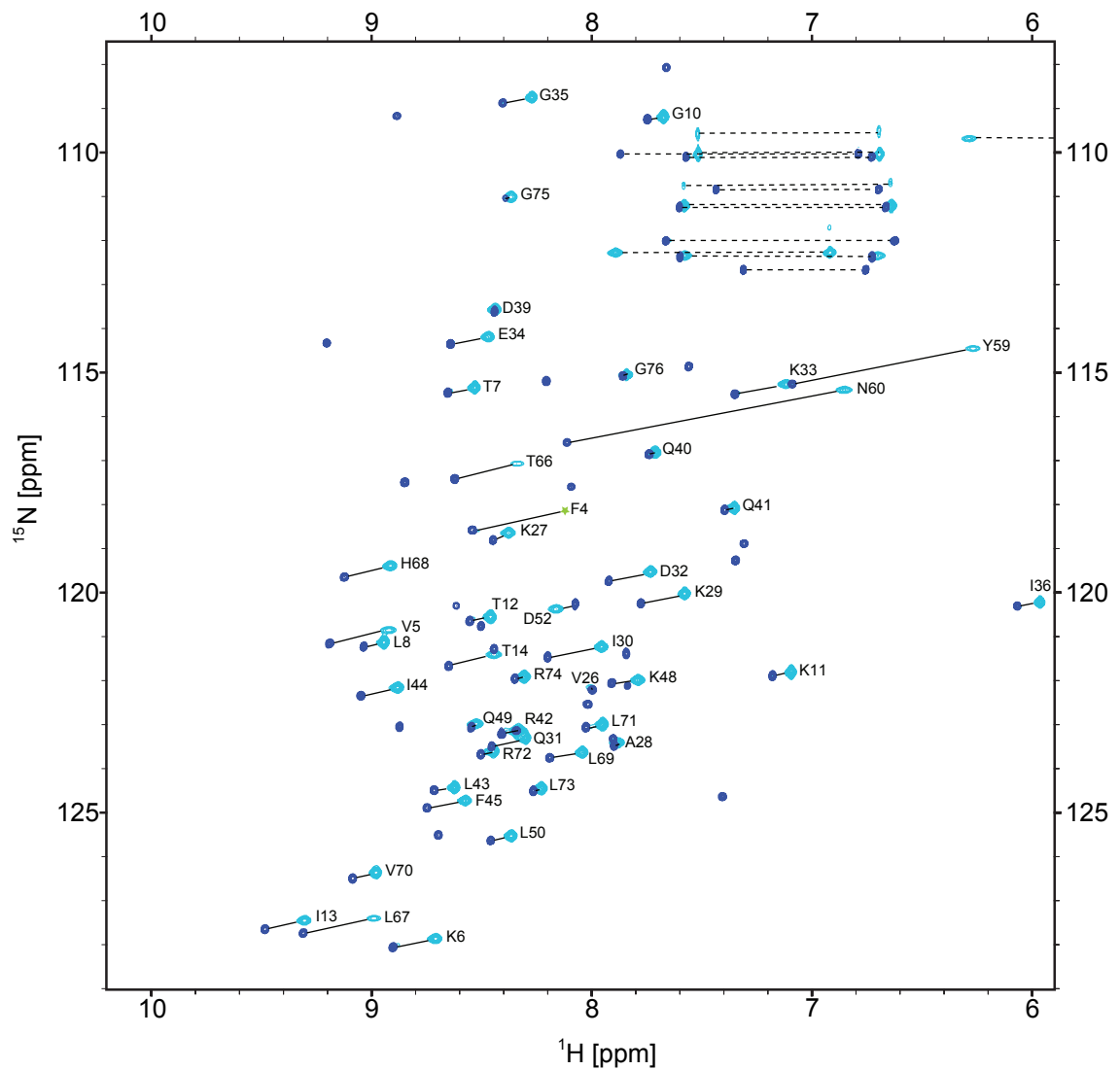
dung 5.5 (A) gezeigt ist. In den HSQC-Spektren (Abbildungen 5.1 und 5.2) sind einige Reste zu sehen, wie beispielsweise F4 in T12C Tb oder L69 in T12C Tm, die starke Unterschiede der PCSs in  $^1\text{H}$  und  $^{15}\text{N}$  aufweisen. Beispielhaft ist F4 in einer vergrößerten Darstellung in Abbildung 5.5 (B) gezeigt. Zwar zeigt der NH-Vektor nicht direkt in Richtung des Ions, was unterschiedliche PCSs in beiden Dimensionen erklären könnte, jedoch beträgt der Abstand vom Amidproton zum Terbiumion lediglich  $13.0 \text{ \AA}$ . Metallnahe Aminosäurereste reagieren verstärkt auf Bewegungen des Tags und einer damit verbundenen Änderung der PCSs-Isoflächen. Darüber hinaus ist auch nicht auszuschließen, dass durch den Tag kleine lokale Veränderungen in der Struktur verursacht werden und somit die zurück berechneten PCSs fehlerbehaftet sind. Die Daten zeigen jedoch, dass ein solcher Effekt, sofern vorhanden, auf die unmittelbare Umgebung beschränkt wäre, da keine global induzierten Strukturänderungen auszumachen waren. Auffällig waren für T12C Tb auch die C-terminalen Reste L71–G76. Obwohl für beide Kerne die Werte der experimentellen PCSs in sehr guter Übereinstimmung waren, so waren sie laut der berechneten PCSs jeweils zwischen  $0.16\text{--}0.21 \text{ ppm}$  zu klein. Erhöhte Beweglichkeit führt zu einer dynamisch bedingten Reduktion der Pseudokontaktverschiebungen. Allerdings scheinen für die-

sen Erklärungsansatz die Effekte bei T12C Tb zu groß zu sein. Laut Literatur ragen lediglich die letzten drei Aminosäurereste aus der Struktur heraus, während L71 noch zum  $\beta$ -Faltblatt gehört. Somit wären größere Auswirkungen auf G76 als auf L71 zu erwarten. Mit der T12C Tm Probe waren am C-Terminus keine derartigen Abweichungen der experimentellen PCSs von den berechneten auszumachen. Auch S57C Tb und S57C Tm (im Folgenden vorgestellt) zeigten keine derartigen Unterschiede.



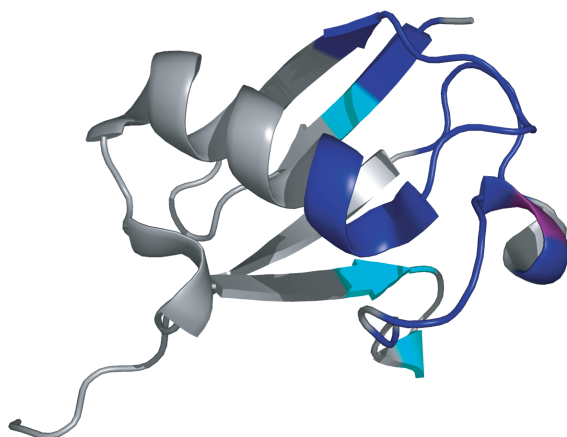


**Abb. 5.6:** S57C Tb: Überlagerung der  $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren von Cys-Ph-TAHA getagtem Ubiquitin-S57C, beladen mit  $\text{Tb}^{3+}$  (rot) und  $\text{Lu}^{3+}$  (dunkelblau). PCSs sind mit durchgezogenen Linien eingezeichnet, Signale von Seitenketten sind durch unterbrochene Linien angezeigt. Die gefalteten Signale (States-TPPI) der Aminosäurereste T9, A46 und G47 sind ausgeblendet. Der Peak von L56 ist schwach und mit einem Stern (grün) markiert. Eine vollständige Liste der chemischen Verschiebungen der insgesamt 54 PCSs ist im Anhang in der Tabelle 7.4 gegeben.

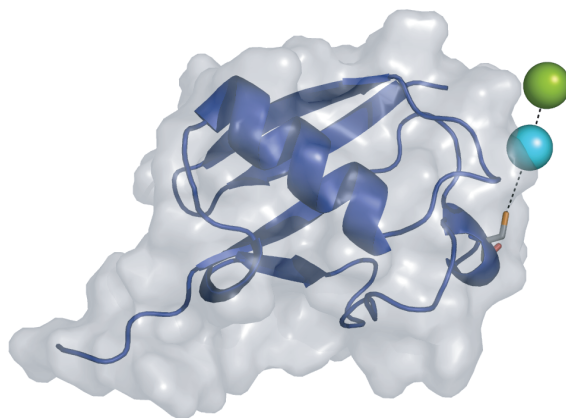


**Abb. 5.7:** S57C Tm: Überlagerung der  $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren von Cys-Ph-TAHA getagtem Ubiquitin-S57C, beladen mit  $\text{Tm}^{3+}$  (hellblau) und  $\text{Lu}^{3+}$  (dunkelblau). PCSs sind mit durchgezogenen Linien eingezeichnet, Signale von Seitenketten sind durch unterbrochene Linien angezeigt. Die gefalteten Signale (States-TPPI) der Aminosäurereste T9, A46 und G47 sind ausgeblendet. Der Peak von F4 ist schwach und mit einem Stern (grün) markiert. Eine vollständige Liste der chemischen Verschiebungen der insgesamt 48 PCSs ist im Anhang in der Tabelle 7.5 gegeben.

Die Untersuchungen wurden mit einer zweiten Ubiquitinmutante (S57C) wiederholt. C57 befindet sich in dem kleinen  $\alpha$ -helicalen Bereich, der sich von L56–N60 erstreckt und von zwei Random Coils flankiert wird. Als diamagnetische Referenzprobe wurde S57C Lu verwendet. In den Abbildungen 5.6 und 5.7 sind die überlagerten HSQC-Spektren mit S57C Tb und S57C Tm gezeigt. Die vollständigen chemischen Verschiebungen, sowie die resultierenden PCSs sind in den Tabellen 7.4 und 7.5 im Anhang angegeben. In den beiden anisotropen Proben waren insgesamt weniger Signale detektierbar, als bei den entsprechenden T12C Proben. Für S57C Tb wurden 54 PCSs gefunden, während bei S57C Tm sogar nur 48 PCSs messbar waren. Die Reste, die in S57C Tm durch PRE ausgelöscht waren, sind in Abbildung 5.8 blau dargestellt. Darüber hinaus sind die Aminosäurereste, deren Peaks bereits deutlich verbreitert und dementsprechend schwach waren (F4, I44, F45 und K48), hellblau markiert. Bemerkenswert ist die Tatsache, dass entgegen der Erwartung mit der Terbium-markierten Probe mehr Signale erhalten wurden, als mit Thulium. Dies lässt sich jedoch anhand der berechneten Metallpositionen erklären (siehe Abbildung 5.9). Beide Ionen sind sehr nahe an der Proteinoberfläche lokalisiert, was in guter Übereinstimmung mit der reduzierten Signalanzahl im Vergleich zu T12C ist. Während die Terbiumposition noch vollständig außerhalb des Proteins liegt, befindet sich das Thuliumion in direktem Kontakt mit der Oberfläche. Der Abstand vom



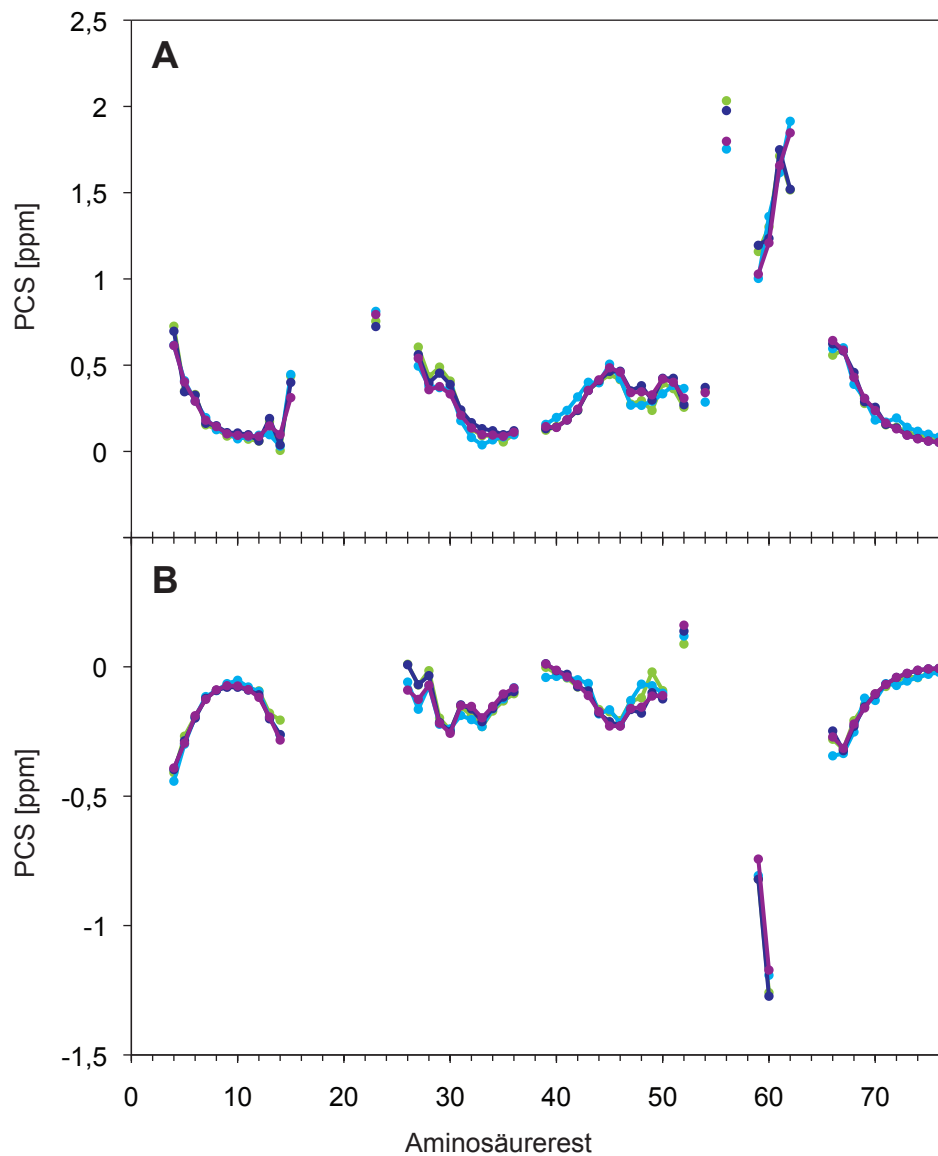
**Abb. 5.8:** Schematische Darstellung der Aminosäurereste, deren Signale bei S57C Tm durch PRE nicht mehr detektierbar waren (dunkelblau). Die angrenzenden Reste mit schwachen Signalen sind hellblau gezeigt, C57 ist magenta markiert.



**Abb. 5.9:** Darstellung der berechneten Metallpositionen. Der Abstand vom Schwefel des C57 beträgt 5.8 Å für  $\text{Tm}^{3+}$  (hellblau) und 11.0 Å für  $\text{Tb}^{3+}$  (grün). Beide berechneten Ionenpositionen liegen sehr nahe an der Proteinoberfläche, auch wenn RDCs mit in die Berechnungen einbezogen werden (siehe Abschnitt 5.4).

Thuliumion zum Schwefel des C57 beträgt lediglich 5.8 Å, während das Terbiumion beinahe in direkter Verlängerung weitere 5.8 Å entfernt liegt. Besonders die Distanz zum Thuliumion scheint deutlich zu kurz für den Cys-Ph-TAHA-Tag zu sein. Obwohl dieser über einige flexible Bindungen verfügt, wäre doch eine massive Biegung des Tags von Nöten. Die Ubiquitinoberfläche weist an dieser Stelle eine negative Ladung auf (E18). Da Cys-Ph-TAHA durch die sechs Carboxylfunktionen formal dreifach negativ geladen ist, ist eine elektrostatische Interaktion unwahrscheinlich. Darüber hinaus würde sich eine derartige Stabilisierung der Metallposition in großen RDCs zeigen. Dies ist für S57C jedoch nicht der Fall (vergleiche Abschnitt 5.3). Eine mögliche Erklärung für die berechneten Positionen wäre, dass die Mittelung über einen abgeflachten Kegel erfolgte, wodurch die berechnete Metallposition sehr nahe an das Protein kommen würde. Dies wäre ebenfalls im Einklang mit der reduzierten Signalanzahl, da durch einen vergrößerten Bewegungsradius des Tags mehr Kerne in den Einflussbereich des paramagnetischen Ions geraten und so die  $r^{-6}$  abhängige PRE überbetont wird.

Für S57C wurden ebenfalls die experimentellen und zurück berechneten  $^1\text{H}$ - und  $^{15}\text{N}$ -PCSs gegen die Aminosäurereste aufgetragen (Abbildung 5.10). In beiden Proben stimmten die experimentellen Werte hervorragend mit den berechneten über-



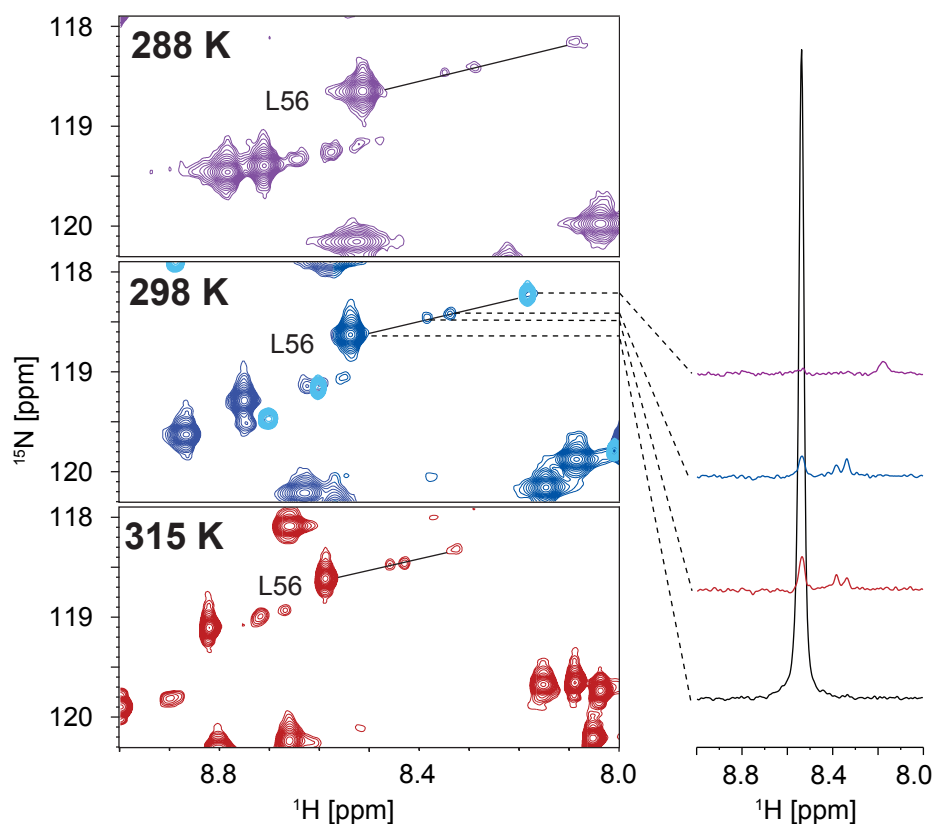
**Abb. 5.10:** Auftragungen der experimentellen und berechneten PCSs der S57C Mutante, beladen mit  $\text{Tb}^{3+}$  (A) und  $\text{Tm}^{3+}$  (B), gegen die Aminosäurereste. Die diamagnetische Referenzprobe war S57C Lu. Die Daten sind wie folgt gekennzeichnet:  $^1\text{H}$  (exp): grün,  $^1\text{H}$  (ber): dunkelblau,  $^{15}\text{N}$  (exp): hellblau,  $^{15}\text{N}$  (ber): violett. Die vollständigen Daten sind im Anhang in den Tabellen 7.4 und 7.5 angegeben.

**Tab. 5.1:** Zusammenfassung der Ergebnisse der PCS Analysen. N gibt die Anzahl der PCSs an,  $Q$  den  $Q$ -Faktor und R den Korrelationsfaktor.  $\Delta\chi_{ax}$  und  $\Delta\chi_{rh}$  sind die axiale bzw. rhombische Komponente des magnetischen Suszeptibilitätstensors [ $10^{-32}$  m<sup>3</sup>]. Die Eulerwinkel  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  [°] beschreiben die Rotation des Tensors in das Hauptkoordinatensystem des Proteins. Zusätzlich sind die jeweils größten experimentell bestimmten PCSs aufgeführt.

Probe	N	$Q$	$R^2$	größte PCSs [ppm]		$\Delta\chi_{ax}$	$\Delta\chi_{rh}$	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$
				neg.	pos.					
T12C Tb	59	0.19	0.97	-1.352	1.743	-14.68	-1.82	141.34	90.73	-22.89
T12C Tm	65	0.15	0.98	-1.103	1.490	-13.17	-3.99	5.63	72.33	100.30
S57C Tb	54	0.07	0.99	-	2.033	-12.66	-8.25	-19.92	82.18	-21.96
S57C Tm	48	0.11	0.98	-1.259	0.088	8.44	1.21	-139.51	47.95	-12.45

ein, was sich in den sehr kleinen  $Q$ -Faktoren von 0.07 für S57C Tb und 0.11 für S57C Tm ausdrückt. Wie auch schon bei der T12C-Mutante zu sehen war, verlaufen auch die Auftragungen von S57C annähernd spiegelbildlich zueinander. Auffällig ist, dass für S57C Tb ausschließlich positive PCSs von bis zu 2 ppm gemessen wurden, während für S57C Tm fast alle Werte negativ waren (siehe Tabelle 5.1). Die axialen Komponenten  $\Delta\chi_{ax}$  der beiden Proben von S57C waren jeweils kleiner, als die der korrespondierenden T12C-Proben. Es zeigt, dass der Tag an C57 gebunden mehr Freiheitsgrade aufweist, als an C12.

## 5.2 Temperaturverhalten von T12C Tm



**Abb. 5.11:** T12C Tm: Ausschnitte aus den  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren der T12C-Mutante, beladen mit  $\text{Tm}^{3+}$ , bei verschiedenen Temperaturen. Die Spektren sind auf einem niedrigen Contourlevel abgebildet, so dass die zwei zusätzlichen, anisotropen Signalsätze zu sehen sind. Die Farben sind wie folgt zugeordnet: 288 K: violett, 298 K: dunkelblau, 315 K: rot. Das Spektrum bei 298 K ist mit der isotropen Referenzprobe (hellblau) überlagert. Die PCS ist für den Aminosäurerest L56 eingezeichnet. Zur Verdeutlichung der relativen Peakintensitäten sind die 1D-Spuren von L56 bei 298 K gezeigt.

Neben den zuvor diskutierten, paramagnetisch verschobenen Signalen, waren in den HSQC-Spektren von T12C Tb und T12C Tm für einige Aminosäurereste Peaks zweier zusätzlicher, anisotroper Datensätze zu sehen. Diese waren, wie weiter unten quantifiziert, mit jeweils etwa 2% relativ schwach und nur bei sehr niedrigem Contourlevel auszumachen. In den meisten Fällen lagen diese in gerader Linie zwischen dem isotropen Peak und dem anisotropen Hauptpeak. Für den DOTA-M8-Tag

wurde ebenfalls ein zweiter Signalsatz beschrieben, dessen Beitrag von 15–20% bei 298 K auf 50% bei 323 K zunahm (Häussinger et al. (2009)). Es wurde deshalb untersucht, ob auch bei Cys-Ph-TAHA-getaggtten Proben eine Temperaturabhängigkeit der relativen Peakintensitäten vorliegt. Dazu wurden fünf  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren im Bereich von 278–315 K aufgenommen (Die Temperatur von 323 K war mit dem verwendeten Cryoprobenkopf nicht zu erreichen). In Abbildung 5.11 sind Ausschnitte der Spektren gezeigt. Beispielhaft wurde für den Aminosäurerest L56 die PCS eingezeichnet. Das Spektrum bei 298 K ist mit dem Spektrum von T12C Lu überlagert, wodurch die isotropen Restsignale identifiziert werden konnten. Um die Anteile der zusätzlichen Signale zu quantifizieren, wurden zehn Aminosäurereste ausgewählt, deren Peaks zwischen 288 K und 315 K hinreichend aufgelöst waren. Das bei 278 K aufgenommene HSQC wurde nicht mit berücksichtigt, da die zusätzlichen Signalsätze zu stark verbreitert waren. Aus dem Verhältnis der Peakintensitäten wurden die prozentualen Anteile bestimmt. In Tabelle 5.2 sind die Ergebnisse zusammengefasst. Es ist zu sehen, dass in dem beschriebenen Bereich keine temperaturabhängige Änderung der Peakintensitäten erfolgte. Die Anteile der zusätzlichen Signalsätze blieben, ebenso wie die der isotropen Peaks, bei etwa 2%, während der Hauptpeak stets zu etwa 94% vertreten war. Das relative Intensitätsverhältnis vom

**Tab. 5.2:** T12C Tm: Bestimmung der prozentualen Verteilungen der Peakintensitäten bei verschiedenen Temperaturen [K]. Neben dem Hauptpeak sind in der Probe isotrope Restsignale und Peaks von zwei zusätzlichen, anisotropen Signalsätzen zu sehen. Die zugrunde liegenden vollständigen Berechnungen sind in den Tabellen 7.6 und 7.7 im Anhang zu finden.

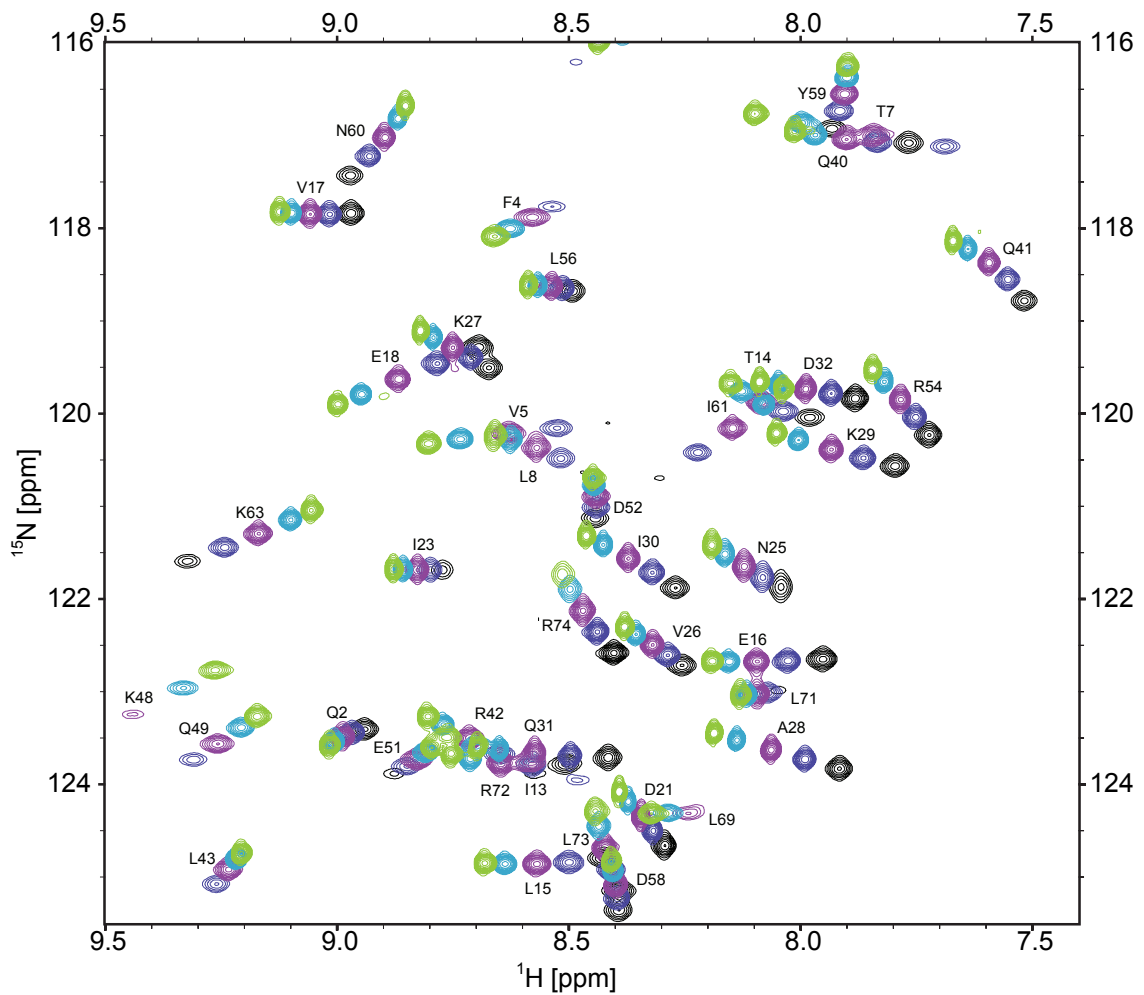
T	Hauptpeak	isotrop	zusätzliche Signale	
			anisotrop 2	anisotrop 3
288	93.79	2.48	1.78	1.95
298	93.90	2.31	1.84	1.95
308	94.19	2.11	2.01	1.69
315	93.87	2.15	1.97	2.01



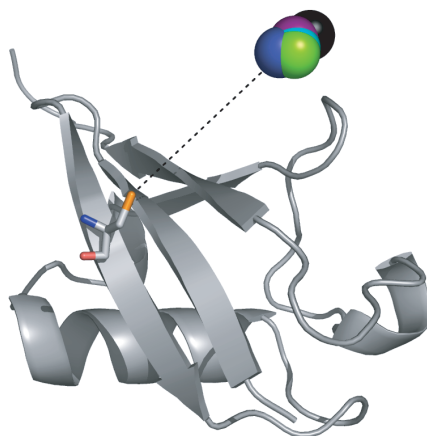
Hauptpeak zu den kleinen Signalen beträgt somit jeweils lediglich 49:1, weshalb der Einfluss der zusätzlichen Peaksätze auf den Hauptpeak zu vernachlässigen war.

Wie bereits in Kapitel 2.2 erwähnt, sind die PCSs abhängig von der Temperatur. Für die Zuordnung wurden die fünf  $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren von 278–315 K überlagert. Die einzelnen Aminosäurereste zeigten jeweils eine nahezu lineare Signalverschiebung (siehe Abbildung 5.12), wodurch der Verlauf einfach zu verfolgen war. Von der isotropen Referenz T12C Lu wurden ebenfalls HSQC-Spektren von 278–315 K aufgenommen. Mit diesen Daten wurden dann die PCSs in Abhängigkeit von der Temperatur bestimmt. Die experimentellen  $^1\text{H}$ - und  $^{15}\text{N}$ -PCSs wurden gegen die Aminosäurereste aufgetragen (siehe Abbildung 5.14). Insbesondere die Reste, die in der Struktur nahe am Lanthanoidion liegen, zeigten deutliche Effekte. Beispielfhaft seien die Unterschiede der  $^1\text{H}$ -PCS von Q62 genannt, die sich von 1.1 auf 2.0 ppm beinahe verdoppelten. Alle zugehörigen Werte sind im Anhang in den Tabellen 7.8–7.10 angegeben. Mit dem MATLAB Skript von Dr. Mitcheell Maestre Martinez wurden wiederum die Metallpositionen ermittelt. Für alle Temperaturen wurden sehr ähnliche Positionen gefunden. Diese sind zusammen mit der NMR-Struktur (PDB-Kode 1D3Z) in Abbildung 5.13 gezeigt. Dieses Ergebnis unterstreicht die Anwendbarkeit von Cys-Ph-TAHA über einen weiten Temperaturbereich.

Die Größe der PCSs nimmt mit sinkender Temperatur zu. Gleichzeitig werden allerdings auch die Linien breiter, so dass für die PCS-Messungen ein Kompromiss zwischen Linienschärfe und Größe des Effekts gefunden werden muss. Der Temperaturbereich zwischen von 288 und 298 K scheint für Ubiquitin ideal zu sein. Bei der Anwendung des Tags auf größere Proteine und der damit verbundenen stärkeren spektralen Überlappung, empfehlen sich jedoch Messungen bei höherer Temperatur zu Gunsten einer höheren Empfindlichkeit. Wie bereits erwähnt, traten die zuvor beschriebenen, zusätzlichen Signalsätze auch in der T12C Tb Probe in ähnlichen prozentualen Anteilen auf, während keine weiteren anisotropen Signale für S57C Tb oder S57C Tm zu sehen waren. Für S57C Tm wurden ebenfalls HSQC-Spektren zwischen 278 K und 315 K aufgenommen. Auch hier traten keine Veränderungen der relativen Peakintensitäten auf. Was die Ursache der zusätzlichen Peaks in den T12C-Proben war, konnte nicht aufgeklärt werden. Da das Auftreten jedoch abhängig von

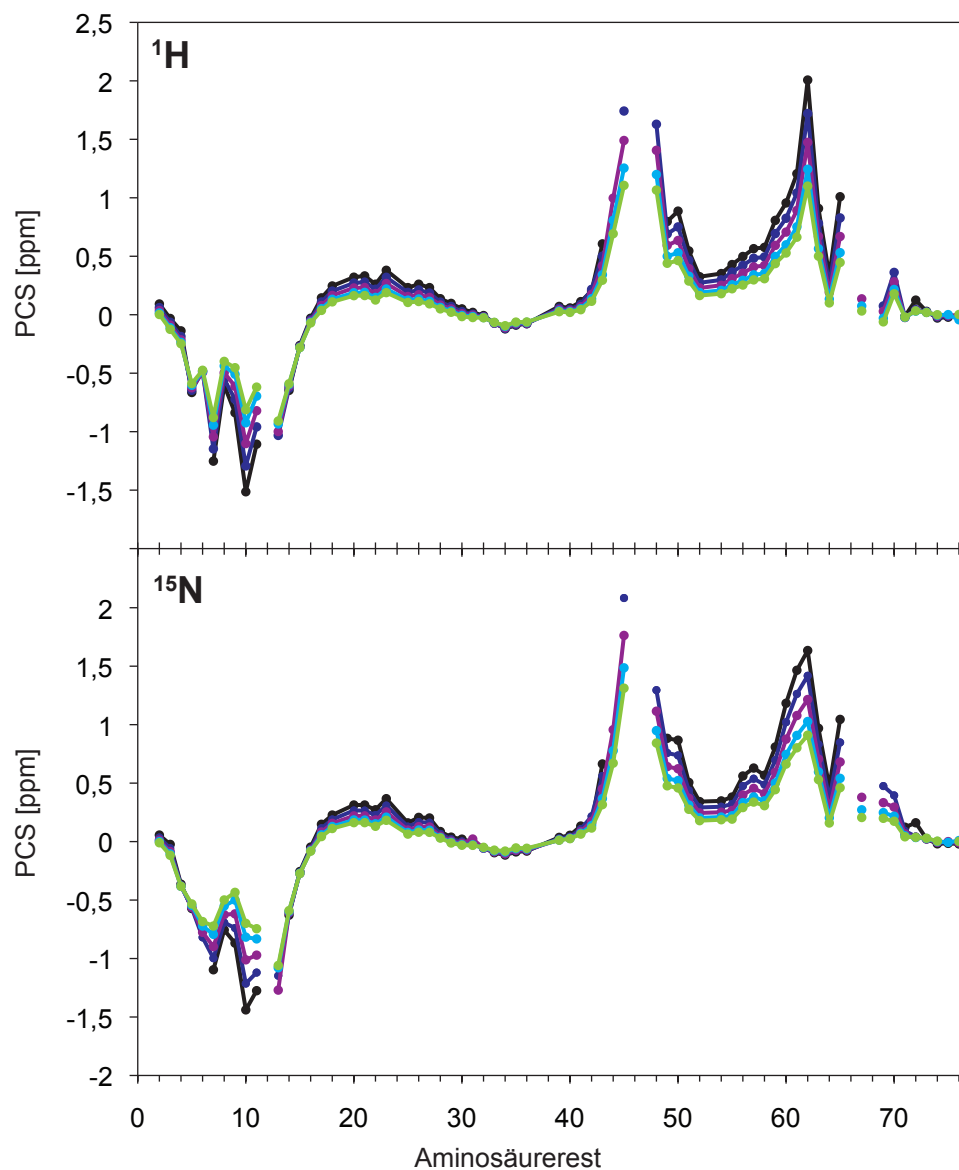


**Abb. 5.12:** T12C Tm: Ausschnitt aus den überlagerten  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren bei verschiedenen Temperaturen. Die Farben sind folgend zugeordnet: 278 K: schwarz, 288 K: dunkelblau, 298 K: violett, 308 K: hellblau, 315 K: grün. Eine vollständige Liste der chemischen Verschiebungen ist im Anhang in der Tabelle 7.9 gegeben.



**Abb. 5.13:** Berechnete Metallpositionen in T12C Tm bei unterschiedlichen Temperaturen auf Basis der NMR-Struktur (1D3Z). Die Farben sind folgend zugeordnet: 278 K: schwarz, 288 K: dunkelblau, 298 K: violett, 308 K: hellblau, 315 K: grün.

der Ubiquitinmutante war, lässt sich schlussfolgern, dass nicht diastereomere Lanthanoidkomplexe von Cys-Ph-TAHA die Ursache waren, sondern Interaktionen mit dem Protein. Da die Anteile von 2% sehr gering waren und die Zusatzpeaks somit die Spektren nicht bedeutend beeinflusst haben, wurden sie im Folgenden ignoriert.

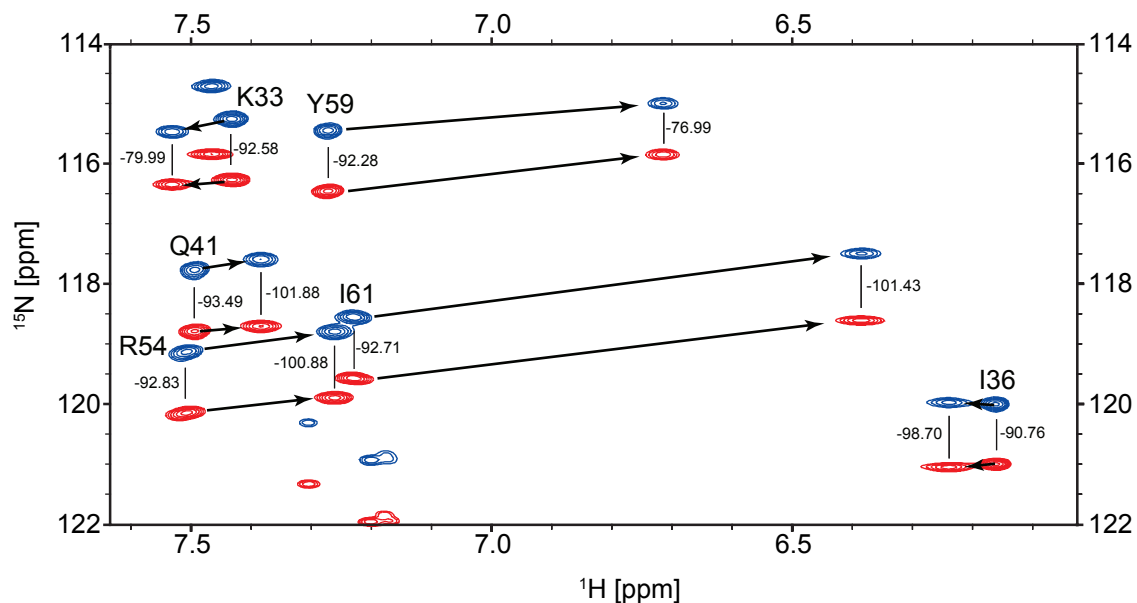


**Abb. 5.14:** Auftragungen der experimentellen PCSs ( $^1\text{H}$ : oben,  $^{15}\text{N}$ : unten) von T12C Tm gegen die Aminosäurereste bei verschiedenen Temperaturen. Die diamagnetische Referenzprobe war T12C Lu. Die Farben sind folgend zugeordnet: 278 K: schwarz, 288 K: dunkelblau, 298 K: violett, 308 K: hellblau, 315 K: grün. Vollständige Listen der chemischen Verschiebungen bei den jeweiligen Temperaturen für T12C Lu und T12C Tm sind im Anhang in den Tabellen 7.8 und 7.9 gegeben. Die resultierenden PCSs finden sich in der Tabelle 7.10.

### 5.3 Residuale dipolare Kopplungen

Die RDCs wurden auf Grund ihrer quadratischen Abhängigkeit vom Magnetfeld mit dem stärksten zur Verfügung stehenden Magneten bei 21.1 T gemessen. Um Überlappungen der Signale zu minimieren, wurde die IPAP-HSQC-Sequenz verwendet (*in-phase-antiphase-HSQC*, Ottiger et al. (1998)). Mit dieser Pulssequenz können die heteronuklearen  $^1J$ -NH Kopplungen in der indirekten Dimension gemessen werden, ohne dass eine Verdopplung der Signale auftritt (siehe Abschnitt 6.3).

Wie bereits in Kapitel 2.1 beschrieben, wird die Differenz der Kopplungen einer orientierten Probe und einer isotropen Referenz als residuale dipolare Kopplung bezeichnet. Ein Ausschnitt aus den beiden IPAP-Spektren ist in Abbildung 5.15 beispielhaft gezeigt. Die Probe der T12C-Mutante war zu 50% mit Terbium beladen. Das Spektrum verdeutlicht, dass grundsätzlich bereits eine halbbeladene Probe ausreicht, um RDCs extrahieren zu können. Um spektrale Überlappungen zu minimieren, wurden jedoch möglichst die vollständig beladenen anisotropen Proben, sowie die isotrope Referenzprobe einzeln gemessen. Als Referenz wurde getaggetes,



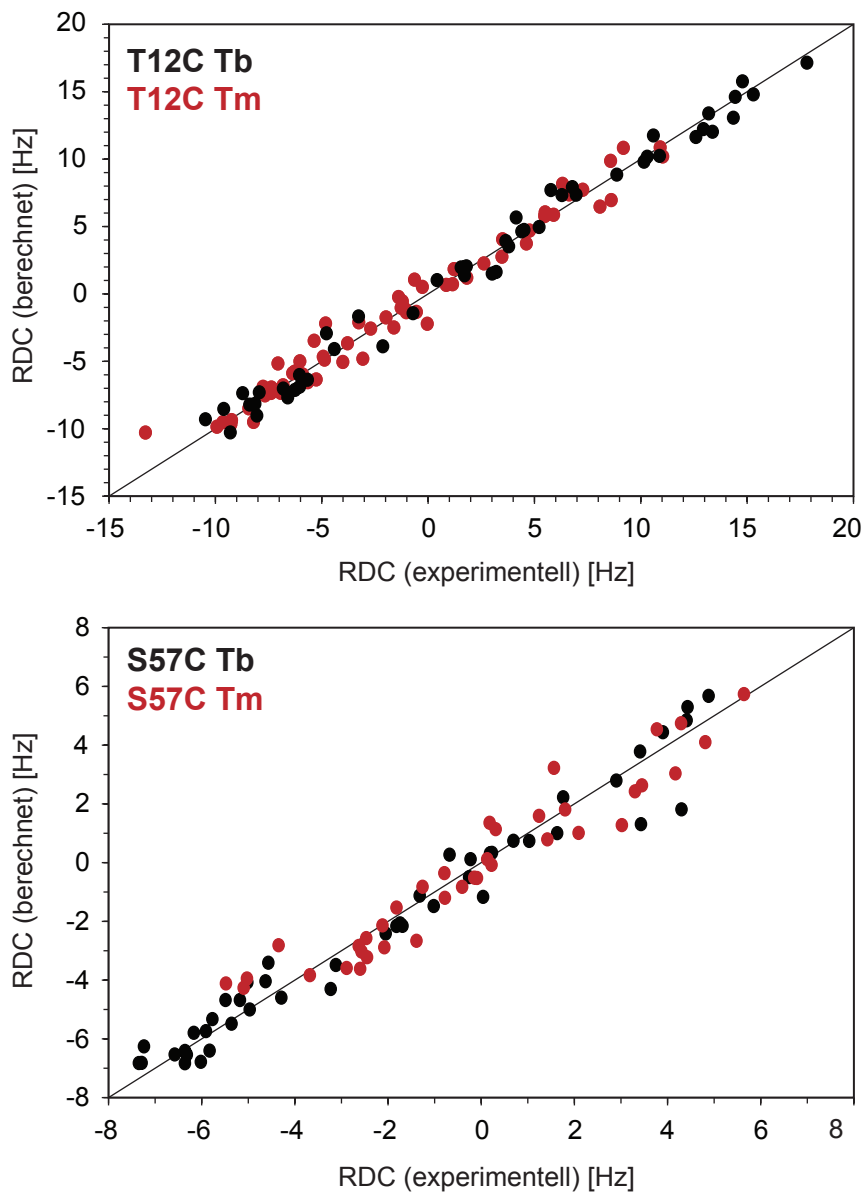
**Abb. 5.15:** T12C Tb: Ausschnitt aus einer Überlagerung der beiden IPAP-HSQC-Spektren (Summe und Differenz). Die Probe war zu 50% mit Terbium beladen. Für die markierten Reste sind die PCSs und die jeweiligen Amidkopplungen des orientierten und nicht-orientierten Ubiquitins gezeigt.

aber unbeladenes Ubiquitin verwendet. Aus den extrahierten RDCs wurden mit dem Programm PALES (Zweckstetter & Bax (2000); Zweckstetter (2008)) der jeweilige Alignmentstensor bestimmt und die RDCs zurück berechnet. Das Programm benötigt zur Berechnung als Eingabedatei eine PDB-Struktur. Hier wurde der erste von zehn Einträgen der NMR-Struktur (1D3Z, Cornilescu et al. (1998)) verwendet. In Abbildung 5.16 sind Auftragungen der experimentell ermittelten RDCs der vier anisotropen Proben gegen die zurück berechneten Werte gezeigt. Die flexiblen Reste R74–G76 wurden dabei nicht mit in die Berechnungen einbezogen. Darüber hinaus wurden Aminosäuren ausgeschlossen, deren exakte Peakposition durch Überlappung mit anderen Peaks nicht ermittelt werden konnte. Allgemein wurden die Positionen der Signale ausschließlich automatisch ohne manuelle Korrekturen bestimmt, um systematische Fehler zu minimieren. RDCs sind auf Grund der geringen Messgröße von wenigen Hz viel anfälliger für Fehler, als PCSs (für Stickstoff entspricht 1 ppm etwa 90 Hz bei 21.1 T). Bereits geringe Abweichungen in der chemischen Verschiebung bewirken eine große Änderung der RDCs. Die Auftragungen zeigen eine hohe Korrelation der experimentellen RDCs mit den berechneten, was sich auch in den niedrigen  $Q$ -Faktoren widerspiegelt (siehe Tabelle 5.3). Hervorzuheben sind die Ergebnisse der T12C-Mutante. Zum einen wurden hier mit Terbium sehr große RDCs von bis zu 17.8 Hz gemessen, zum anderen wurden mit Thulium insgesamt 61 RDCs erhalten, die in den Rechnungen verwendet werden konnten. Die größten RDCs von S57C Tb und S57C Tm betragen, verglichen mit den entsprechenden T12C Proben, weniger als 50%, was auf eine vermehrte Dynamik hindeutet. Wie zuvor erwähnt, befindet sich C57 in einem  $\alpha$ -helicalen Bereich von fünf Aminosäureresten, der von zwei Random Coils flankiert wird. Entgegen der Erwartung weist das Proteinrückgrat innerhalb dieser Helix jedoch weniger Dynamik auf, als C12 in dem  $\beta$ -Faltblatt. Dies zeigte sich anhand der RDC-basierten Orderparameter  $S_{rdc}^2$  (Lakomek et al. (2008)). Somit beruht die erhöhte Flexibilität nicht auf intrinsischer Proteinbewegung, sondern vielmehr auf einer größeren Beweglichkeit des Tags oder der Seitenkette selbst. Bei der Diskussion der PCS-Analysen wurde bereits spekuliert, dass sich der Tag, an C57 gebunden, auf einer abgeflachten Kegelbahn bewegt, wodurch die RDCs und PCSs einer stärkeren Mittelung unterliegen. Der Vergleich der RDCs von T12C und

**Tab. 5.3:** Zusammenfassung der Ergebnisse der RDC Analysen. N gibt die Anzahl der RDCs an,  $Q$  den  $Q$ -Faktor, R den Korrelationsfaktor,  $Da_{NH}$  die axiale Komponente des Alignmenttensors [Hz] und Rh die Rhombizität des Tensors. Die Eulerwinkel  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  [°] beschreiben die Rotation des Tensors in das Hauptkoordinatensystem des Proteins. Zusätzlich sind die jeweils größten gemessenen RDCs aufgeführt. Die Werte wurden mit PALES jeweils für den ersten Eintrag der NMR-Struktur (1D3Z) berechnet.

Probe	N	$Q$	$R^2$	größte RDCs [Hz]		$Da_{NH}$	Rh	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$
				neg.	pos.					
T12C Tb	49	0.08	0.99	-10.47	17.81	8.75	0.12	45.1	80.0	108.9
T12C Tm	61	0.13	0.99	-13.29	11.03	5.66	0.56	167.1	82.1	196.7
S57C Tb	46	0.14	0.98	-7.35	4.88	3.57	0.65	13.7	117.1	72.1
S57C Tm	38	0.18	0.96	-5.41	5.67	3.47	0.22	122.6	122.4	161.2

S57C legt diesen Schluss ebenfalls nahe. Die Ergebnisse der RDC-Analysen sind in Tabelle 5.3 zusammengefasst. Die RDCs von S57C Tb und S57C Tm weisen dennoch  $Q$ -Faktoren von unter 0.20 bei Korrelationsfaktoren  $\geq 0.96$  auf, was auch die Qualität dieser Daten zeigt. Herauszuheben ist jedoch T12C Tb, da mit dieser Probe viele große RDCs von bis zu 17.8 Hz bei einem äußerst niedrigen  $Q$ -Faktor erhalten wurden. Die gemessenen RDCs waren demnach etwa doppelt so groß, wie die der EDTA-basierten Tags (Habertz et al. (2006)). Die vollständigen RDCs aller Proben finden sich im Anhang in den Tabellen 7.11 und 7.12.



**Abb. 5.16:** Auftragung der experimentellen RDCs beider Cys-Ph-TAHA getaggten Ubiquitinmutanten (T12C: oben, S57C: unten) gegen die berechneten RDCs. Die Werte für Terbium sind schwarz, die für Thulium rot dargestellt. Die zu Grunde liegenden Kopplungskonstanten und RDCs sind in den Tabellen 7.11 und 7.12 im Anhang angegeben.

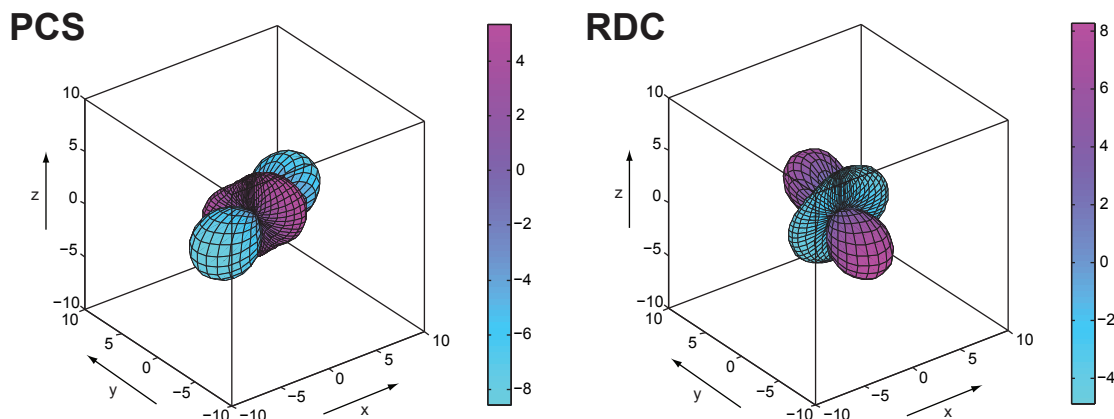


## 5.4 Vergleich der PCS- und RDC-Tensoren

Um die mit Cys-Ph-TAHA erhaltenen RDC- und PCS-Tensoren miteinander vergleichen zu können, wurden die RDCs ebenfalls mit dem Skript von Dr. Mitcheell Maestre Martinez berechnet. Für die einzelnen Strukturen waren die Ergebnisse identisch mit den von PALES berechneten. Für die weiteren Untersuchungen wurde allerdings, analog zur PCS-Auswertung, jeweils ein gemittelter Tensor aus allen zehn Strukturen (1D3Z) verwendet.

Grundsätzlich sollten die aus den RDC- und PCS-Analysen berechneten Tensoren einander gleich sein. Es zeigte sich in der Vergangenheit jedoch, dass die erhaltenen Tensoren zum Teil deutliche Unterschiede aufweisen. Die RDC-abgeleiteten Tensoren sind in der Regel kleiner, als die der PCSs. Dies wurde sowohl für die EDTA-basierten Tags, als auch für CLaNP-5 (Keizers *et al.* (2008)) und DOTA-M8 (Häussinger *et al.* (2009)) berichtet. Der Grund hierfür liegt in der unterschiedlichen Sensitivität der PCSs und RDCs auf Mittelung durch Bewegung. Da CLaNP-5 über zwei Disulfidbrücken am Protein verankert wird, sind dort die Differenzen etwas geringer, als bei einfach gebundenen Tags, dennoch sind die PCS-Tensoren etwa 20% größer. Um den Einfluss der intrinsischen Proteinbewegungen zu reduzieren, wurden die RDC-Rechnungen zusätzlich mit dem EROS-Ensemble (Lange *et al.* (2008)) an Stelle von 1D3Z durchgeführt. Dieses Ensemble beschreibt den konformationellen Raum von Ubiquitin. Im Durchschnitt vergrößerten sich die axialen Tensorkomponenten der vier Proben um etwa 10%. Die verbleibende Differenz beruht vermutlich auf von der Proteindynamik entkoppelten Bewegungen des Tags.

Die Ergebnisse der Berechnungen sind in Tabelle 5.4 zusammengefasst. Auffällig waren die unterschiedlichen Vorzeichen der axialen Komponenten  $\Delta\chi_{ax}$  in drei der vier Proben. Wie den Darstellungen der Tensoren zu entnehmen ist (siehe Abbildung 7.4–7.7 im Anhang), weisen die positiven und negativen Bereiche der Tensoren in der Regel jedoch ähnliche Orientierungen auf. Die unterschiedlichen Vorzeichen beruhen somit auf den Definitionen von  $\Delta\chi_{ax}$  und  $\Delta\chi_{rh}$ . Die PCS- und RDC-abgeleiteten Tensoren von T12C Tb hingegen weisen stärkere Abweichungen voneinander auf (siehe Abbildung 5.17).



**Abb. 5.17:** T12C Tb: Vergleich der PCS- und RDC-abgeleiteten Tensoren [ $10^{-4}$ ]. Diese weisen unterschiedliche Orientierungen und Vorzeichen auf. Die jeweiligen Elemente der Saupematrix sind im Anhang in der Tabelle 7.16 angegeben.

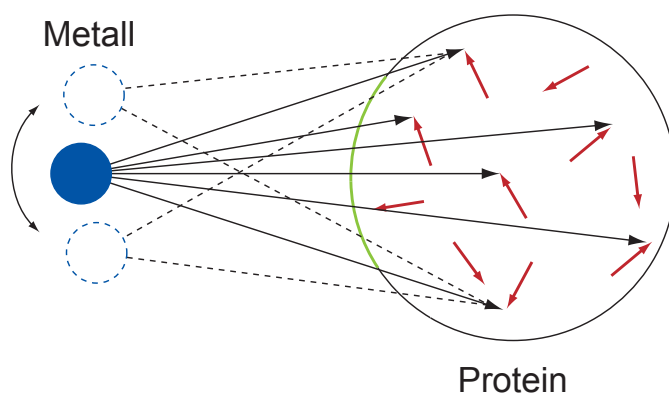
**Tab. 5.4:** Übersicht über die berechneten Tensoren aus den PCSs und RDCs der vier anisotropen Proben. Gegeben sind die axialen und rhombischen Komponenten des jeweiligen  $\chi$ -Tensors  $\Delta\chi_{ax}$  und  $\Delta\chi_{rh}$  [ $10^{-32}$  m<sup>3</sup>], sowie die Eulerwinkel  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  [°]. Die Daten wurden auf der Grundlage der 1D3Z-NMR-Strukturen sowie des EROS-Ensembles berechnet [ $10^{-32}$  m<sup>3</sup>]. Zusätzlich sind die jeweiligen  $Q$ -Faktoren und Korrelationsfaktoren  $R$  gegeben.

Probe	Daten	$\Delta\chi_{ax}$	$\Delta\chi_{rh}$	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$	$Q$	$R^2$
T12C Tb	PCS 1D3Z	-14.68	-1.82	141.34	90.73	-22.89	0.19	0.97
	RDC 1D3Z	14.38	1.64	133.98	94.15	-74.36	0.12	0.99
	RDC EROS	15.59	1.47	-	-	-	0.09	0.99
T12C Tm	PCS 1D3Z	-13.17	-3.99	5.63	72.33	100.30	0.15	0.98
	RDC 1D3Z	9.27	5.34	6.84	98.28	12.90	0.13	0.99
	RDC EROS	10.29	5.44	-	-	-	0.15	0.98
S57C Tb	PCS 1D3Z	-12.66	-8.25	-19.92	82.18	-21.96	0.07	0.99
	RDC 1D3Z	5.91	3.75	-10.39	59.00	-112.54	0.17	0.97
	RDC EROS	6.49	4.14	-	-	-	0.14	0.98
S57C Tm	PCS 1D3Z	8.44	1.21	-139.51	47.95	-12.45	0.11	0.98
	RDC 1D3Z	5.69	1.23	-133.94	54.18	-18.05	0.26	0.93
	RDC EROS	6.81	1.66	-	-	-	0.30	0.91

Für die deutlichen Abweichungen der RDC- und PCS-Tensoren voneinander gibt es mehrere mögliche Erklärungen. Zum einen nehmen die NH-Vektoren im Protein unterschiedliche Orientierungen ein. Dadurch wird der dreidimensionale Raum gut erfasst, was in einer zuverlässigen Beschreibung des RDC-Tensors resultiert. Im Falle des Alignments durch paramagnetische Tags liegt das Metallion außerhalb des Proteins und die Metall-Kern-Vektoren werden nur auf einem kleinen Teil der Kugeloberfläche rund um das Metall erhalten. Dies kann zu einer gewissen Unsicherheit des PCS-Tensors führen. Dies ist in Abbildung 5.18 schematisch dargestellt.

Eine weitere potentielle Ursache für die unterschiedlichen Tensoren liegt in der Tensorberechnung selbst, da gleichzeitig auch noch die Metallposition bestimmt wird. Während der Minimierung können Verletzungen des Tensors durch leichte Veränderung der Position kompensiert werden. Wenn, wie im Fall von S57C Tb und S57C Tm, alle PCSs das gleiche Vorzeichen haben, ist dies besonders einfach möglich. Dies trägt dazu bei, dass für beide Proben die  $Q$ -Faktoren deutlich niedriger, als die der RDCs waren (siehe Tabelle 5.1).

Obwohl die Tensoren, wie in Tabelle 5.4 und Abbildung 5.17 gezeigt verschieden waren, konnten die PCSs im jeweiligen RDC-Tensor zurück berechnet werden. Diese Werte wurden in einem Korrelationsdiagramm gegen die experimentellen PCSs auf-



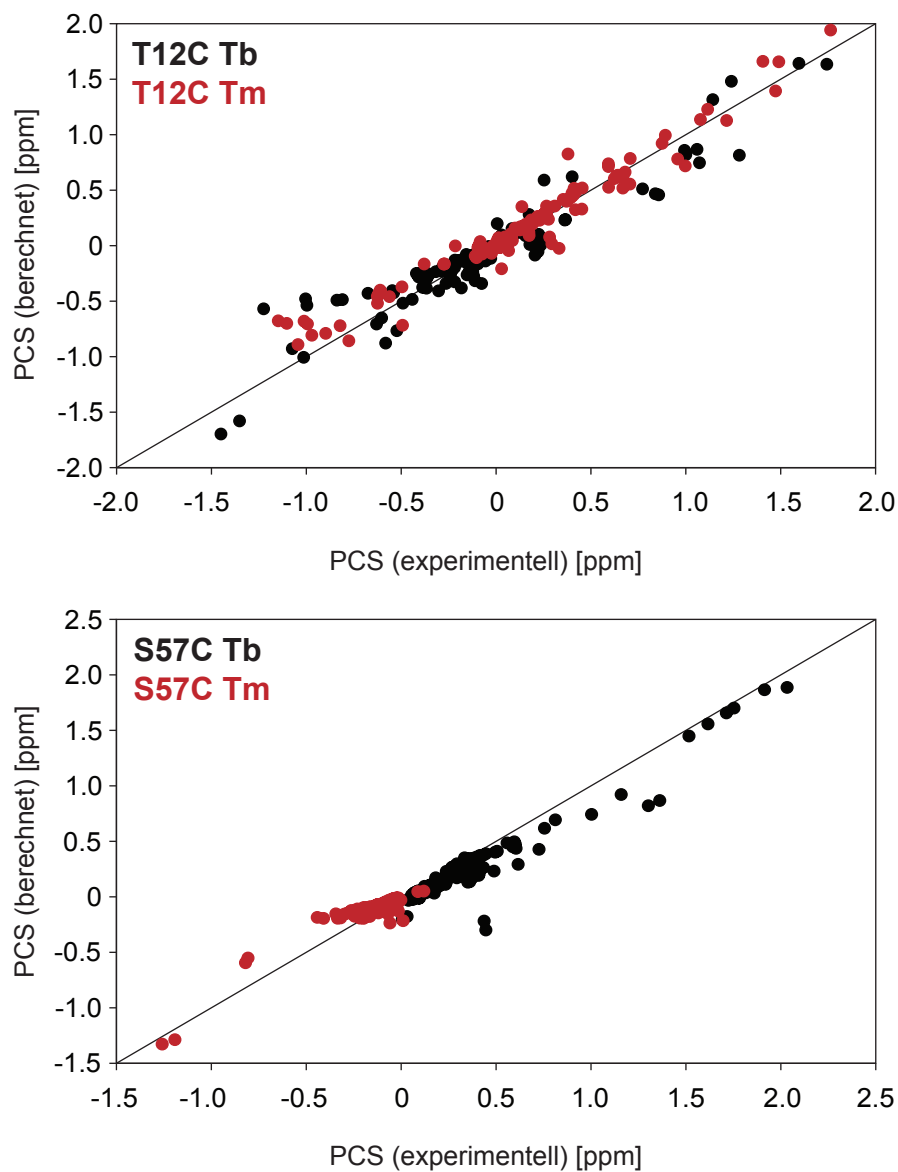
**Abb. 5.18:** Schematischer Vergleich zwischen PCSs und RDCs. Die Interspinvektoren (rot) beschreiben im Protein alle möglichen Raumrichtungen, wodurch der RDC-Tensor zuverlässig wird. Dagegen erfassen die Metall-Kern-Vektoren (schwarz) bei Tag-gebundenen Metallionen nur einen kleinen Winkelbereich der Kugeloberfläche (grün), wodurch sie fehleranfällig werden.

**Tab. 5.5:** Ergebnisse der Kreuzberechnungen. Aufgeführt sind jeweils  $Q$ -Faktor und Korrelationsfaktor der Berechnungen der PCSs im RDC-Tensor, sowie der Berechnung der RDCs im PCS-Tensor.

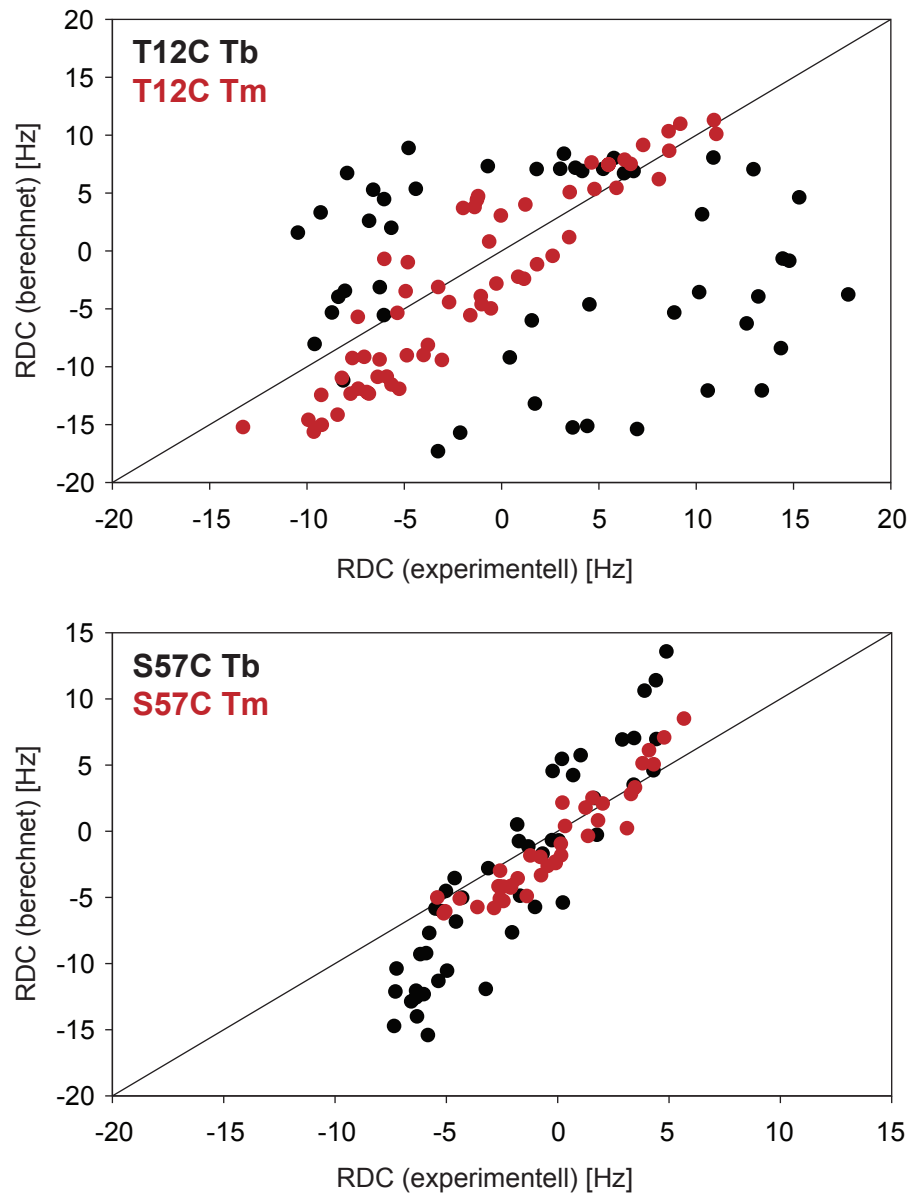
Probe	PCSs im RDC-Tensor		RDCs im PCS-Tensor	
	$Q$	$R^2$	$Q$	$R^2$
T12C Tb	0.32	0.90	1.43	0.00
T12C Tm	0.24	0.95	0.63	0.84
S57C Tb	0.28	0.92	1.05	0.84
S57C Tm	0.32	0.87	0.62	0.89

getragen (siehe Abbildung 5.19). In weiten Teilen stimmen die, im RDC-Tensor berechneten PCSs mit den experimentellen gut überein, was sich auch in den  $Q$ -Faktoren von 0.24–0.32 ausdrückt (siehe Tabelle 5.5). Für S57C Tb und S57C Tm sind die berechneten Werte tendenziell unterschätzt und somit kleiner, als die experimentellen. Dies erklärt sich durch die deutlich geringere Größe der RDC-Tensoren im Vergleich zu den PCS-Tensoren. Für T12C Tb und T12C Tm zeigen die Datenpunkte eine Streuung um die Korrelationsgerade. Im Falle von T12C Tm waren der PCS- und der RDC-Tensor einander sehr ähnlich, weshalb sich die PCSs im RDC-Tensor zurück berechnen lassen. Bei T12C Tb hingegen wurde die gute Korrelation durch eine Verschiebung der Metallposition im Zuge der Minimierung erreicht. Eine Änderung der Metallposition um wenige Ångström kann zu einem Vorzeichenwechsel des PCS-Tensors führen, ohne dass die zurück berechneten PCSs große Abweichungen von den experimentellen Werten aufweisen.

Zum Vergleich wurde das umgekehrte Experiment durchgeführt und die RDCs im PCS-Tensor zurück berechnet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.20 gegen die experimentellen Werte aufgetragen. Es ist zu sehen, dass die experimentellen Werte deutliche Unterschiede zu den im PCS-Tensor zurück berechneten RDCs aufweisen. Im Fall von T12C Tb besteht überhaupt keine Korrelation der Daten mehr, da die unterschiedlichen Orientierungen der PCS- und RDC-Tensoren bei der Zurückberechnung der RDCs im PCS-Tensor nicht kompensiert werden können. Für die anderen Proben sind die experimentellen Werte erwartungsgemäß überschätzt.



**Abb. 5.19:** Korrelationsdiagramm der experimentellen  $^1\text{H}$ - und  $^{15}\text{N}$ -PCSs beider Cys-Ph-TAHA-getaggten Ubiquitinmutanten (T12C: oben, S57C: unten), aufgetragen gegen die im RDC-Tensor zurück berechneten Werte. Die Daten für Terbium sind schwarz, die für Thulium rot dargestellt. Die zu Grunde liegenden Daten sind im Anhang in den Tabellen 7.13 und 7.14 gegeben.



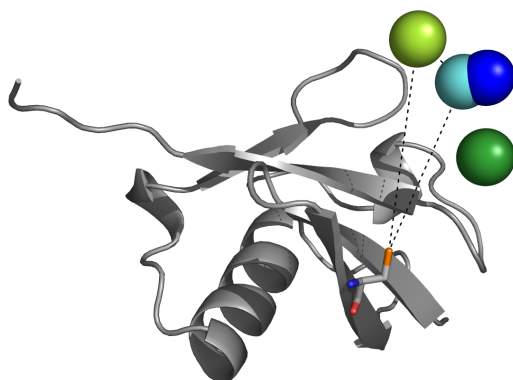
**Abb. 5.20:** Korrelationsdiagramm der experimentellen RDCs beider Cys-Ph-TAHA-getagten Ubiquitinmutanten (T12C: oben, S57C: unten), aufgetragen gegen die im PCS-Tensor zurück berechneten Werte. Die Daten für Terbium sind schwarz, die für Thulium rot dargestellt. Die zu Grunde liegenden Daten sind im Anhang in den Tabellen 7.11, 7.12 und 7.15 gegeben.

Ein Problem bei der Minimierung der PCSs und der Metallposition liegt darin, dass die Energiehyperfläche kein ausgeprägtes Minimum aufzuweisen scheint. Abweichungen von den experimentellen PCSs können dann ohne schwerwiegende Auswirkungen auf den  $Q$ -Faktor oder den Korrelationsfaktor durch leichte Verschiebungen der Metallposition kompensiert werden. Um dies zu unterbinden, sollte der PCS-Tensor von RDC-Daten unterstützt berechnet werden. Es wurden zwei Verfahren getestet. In dem ersten Ansatz wurden die RDCs und PCSs gleichzeitig minimiert und somit ein gemeinsamer Tensor bestimmt. Bei dem zweiten Ansatz wurde, basierend auf dem RDC-abgeleiteten Tensor, die Position des Metalls berechnet und anschließend die PCSs um diese Position herum minimiert. Die Ergebnisse aller Berechnungen sind in der Tabelle 5.6 zusammengefasst. Die Abweichungen der PCS-Tensoren (A) im Vergleich zu den in Tabelle 5.1 gegebenen beruhen darauf, dass die Reste R74–G76 für die finalen Berechnungen, wie auch für die RDC-Berechnungen (B), ausgeschlossen wurden.

**Tab. 5.6:** Übersicht über die erhaltenen Tensoren. Gegeben sind die berechneten Metallkoordinaten im Molekülkoordinatensystem [ $\text{\AA}$ ],  $\Delta\chi_{ax}$  und  $\Delta\chi_{rh}$  [ $10^{-32} \text{ m}^3$ ] und die Eulerwinkel [ $^\circ$ ]. Es sind die gemittelten Tensoren aller Strukturen (1D3Z) gezeigt. Die Tensoren sind wie folgt zugeordnet: PCS-Tensor (A); RDC-Tensor (B); PCSs im RDC-Tensor (C); PCSs und RDCs zusammen minimiert: PCSs (D), RDCs (E); Metallposition bestimmt auf der Basis des RDC-Tensors mit anschließender Minimierung der PCSs (F).

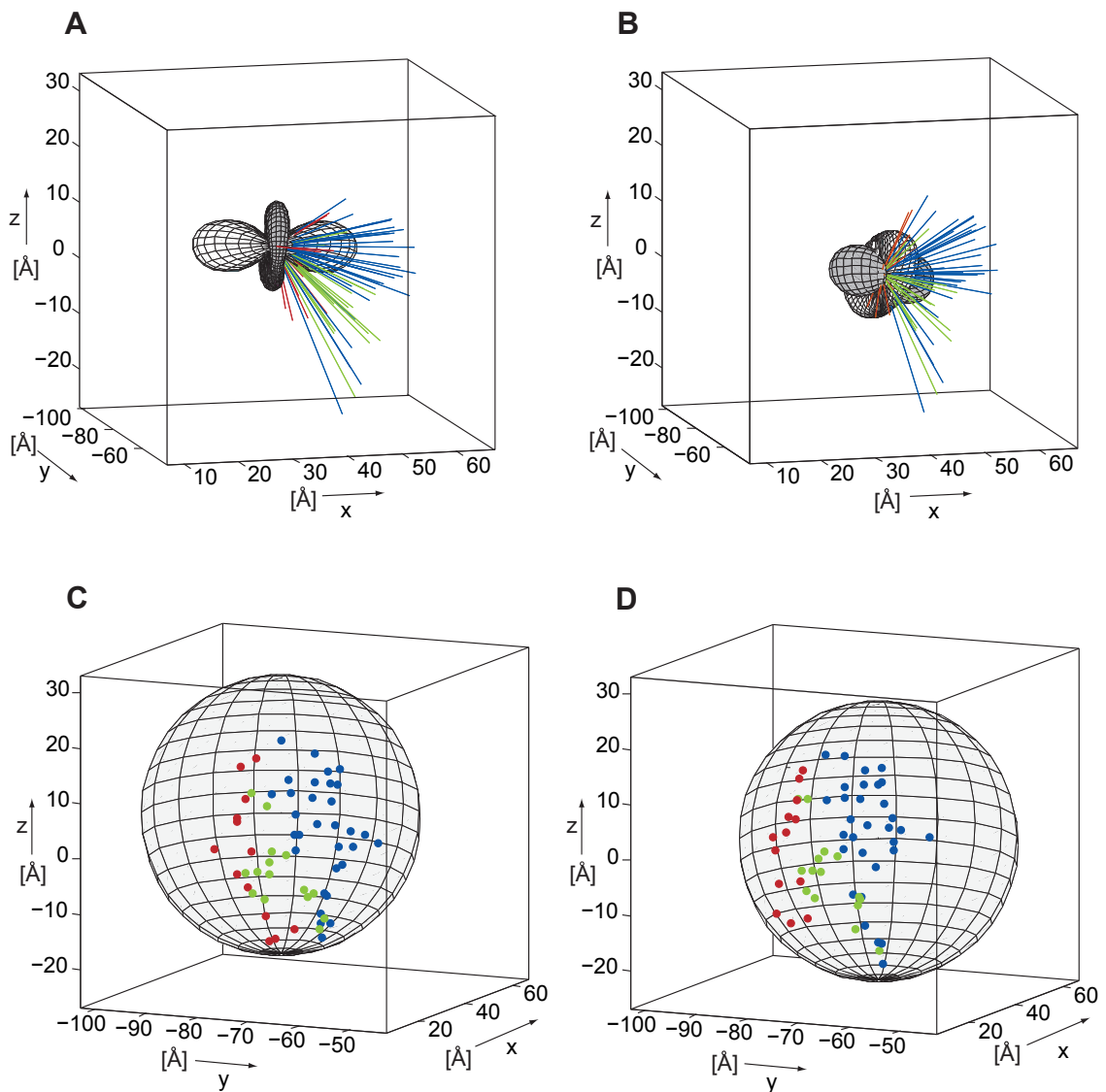
Probe	Daten	$Q$	$R^2$	x	y	z	$\Delta\chi_{ax}$	$\Delta\chi_{rh}$	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$	
T12C Tb	<b>A</b>	1D3Z	0.18	0.97	35.75	-77.04	5.01	-14.83	-2.51	141.82	92.73	-22.96
	<b>B</b>	1D3Z	0.12	0.99	-	-	-	14.38	1.64	133.98	94.15	-74.36
	<b>C</b>	1D3Z	0.32	0.90	38.27	-68.83	1.00	14.38	1.64	133.98	94.15	-74.36
	<b>D</b>	1D3Z	0.28	0.92	38.31	-69.41	1.68	14.46	3.34	135.56	95.70	-74.10
	<b>E</b>	1D3Z	0.15	0.98	38.31	-69.41	1.68	14.46	3.34	135.56	95.70	-74.10
	<b>F</b>	1D3Z	0.26	0.93	38.27	-68.83	1.00	16.76	6.76	131.73	89.73	-71.32
T12C Tm	<b>A</b>	1D3Z	0.15	0.98	38.18	-71.92	6.27	-13.42	-3.84	7.22	72.81	100.82
	<b>B</b>	1D3Z	0.18	0.97	-	-	-	9.27	5.34	6.84	98.28	12.90
	<b>C</b>	1D3Z	0.24	0.95	39.53	-71.68	5.37	9.27	5.34	6.84	98.28	12.90
	<b>D</b>	1D3Z	0.20	0.96	39.14	-72.08	5.08	-8.99	-5.87	9.76	81.04	100.09
	<b>E</b>	1D3Z	0.20	0.96	39.14	-72.08	5.08	-8.99	-5.87	9.76	81.04	100.09
	<b>F</b>	1D3Z	0.16	0.97	39.53	-71.68	5.37	-11.28	-2.84	15.24	75.51	106.17
S57C Tb	<b>A</b>	1D3Z	0.07	0.99	59.72	-91.74	12.04	-12.71	-8.28	19.42	98.09	158.25
	<b>B</b>	1D3Z	0.17	0.96	-	-	-	5.91	3.75	-10.39	59.00	-112.54
	<b>C</b>	1D3Z	0.27	0.92	57.41	-88.62	10.62	5.91	3.75	-10.39	59.00	-112.54
	<b>D</b>	1D3Z	0.19	0.96	57.52	-88.99	10.92	6.75	3.34	-6.63	57.39	-113.30
	<b>E</b>	1D3Z	0.19	0.96	57.52	-88.99	10.92	6.75	3.34	-6.63	57.39	-113.30
	<b>F</b>	1D3Z	0.12	0.97	57.41	-88.62	10.62	7.13	4.27	20.08	54.14	-114.52
S57C Tm	<b>A</b>	1D3Z	0.11	0.98	59.73	-86.67	11.07	8.47	1.22	-139.37	47.76	-12.71
	<b>B</b>	1D3Z	0.26	0.93	-	-	-	5.69	1.23	-133.94	54.18	-18.05
	<b>C</b>	1D3Z	0.33	0.84	60.07	-83.71	11.68	5.69	1.23	-133.94	54.18	-18.05
	<b>D</b>	1D3Z	0.15	0.96	58.29	-86.14	9.62	6.00	0.80	-142.19	53.00	-16.36
	<b>E</b>	1D3Z	0.27	0.93	58.29	-86.14	9.62	6.00	0.80	-142.19	53.00	-16.36
	<b>F</b>	1D3Z	0.14	0.97	60.07	-83.71	11.68	6.50	1.75	-124.16	43.60	2.02





**Abb. 5.21:** Darstellung der Metallpositionen, berechnet aus den PCSs für T12C Tb (dunkelgrün) und T12C Tm (dunkelblau), sowie aus der gleichzeitigen Minimierung von PCSs und RDCs: T12C Tb (hellgrün), T12C Tm (hellblau).

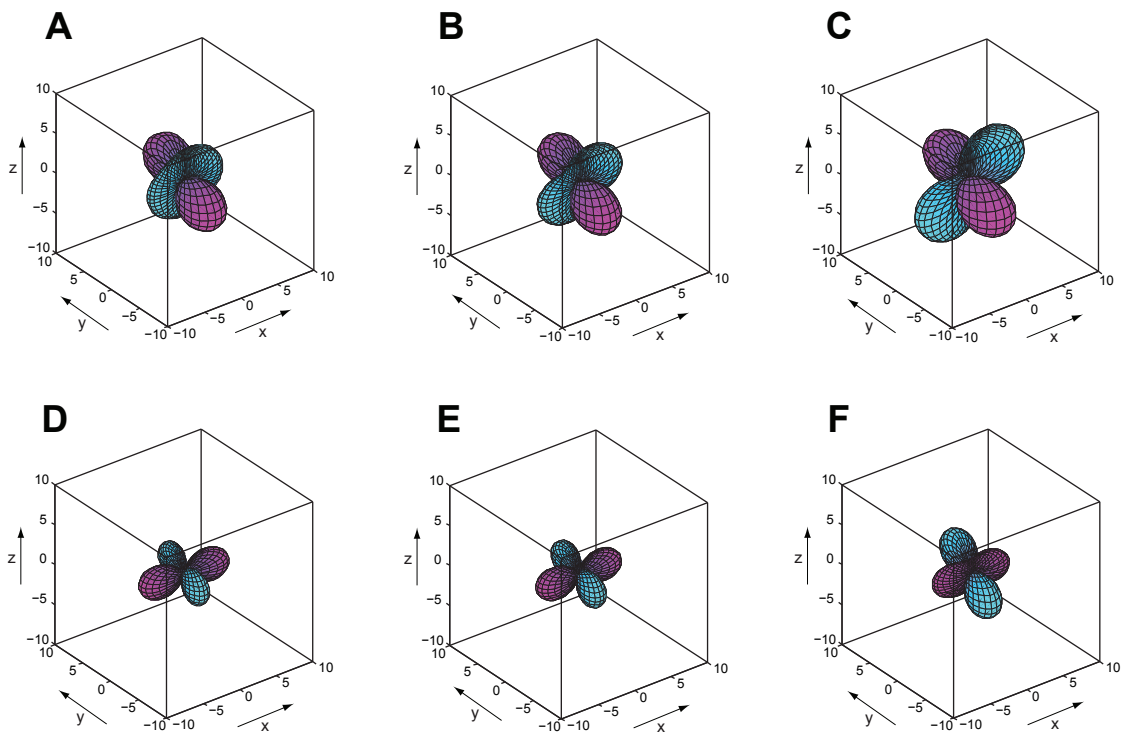
Wie aus Tabelle 5.6 hervorgeht, lieferten für T12C Tb und T12C Tm sowohl die gleichzeitige Minimierung von RDCs und PCSs (D), als auch die PCS-Minimierung der RDC-abgeleiteten Position (F) beinahe identische Metallkoordinaten. In Abbildung 5.21 sind die Metallpositionen, die aus den PCS-Tensoren (A), beziehungsweise aus den Tensoren der gleichzeitigen Minimierung von PCSs und RDCs (D) erhalten wurden, zusammen mit der Ubiquitinstruktur gezeigt. Die entsprechende Darstellung für S57C befindet sich im Anhang (Abbildung 7.3). Während sich die Thuliumposition nur wenig ändert, ist die neue Terbiumlage  $8.7 \text{ \AA}$  von der aus (A) bestimmten Position entfernt, was den Wechsel des Vorzeichens erklärt. Dies wird auch durch Abbildung 5.22 illustriert. Die Vektorscharen (A) und (B) geben die Länge der Metall-Kern-Vektoren in Ångstrom wieder. Die Projektionen der jeweiligen Vektorscharen auf einer Kugeloberfläche (Abbildung 5.22 (C) und (D)) verdeutlichen, wie bereits in Abbildung 5.18 schematisch gezeigt, dass sich trotz einer Verschiebung der Metallposition von über  $8 \text{ \AA}$  die Verteilung der Metall-Kern-Vektoren auf der Kugeloberfläche relativ ähnlich bleibt. Die neue Lage wird in erster Linie durch Veränderungen der Tensorform und -orientierung kompensiert, ohne dass die zurück berechneten PCSs stark von den experimentellen Werten abweichen. So wurde für keine Pseudokontaktverschiebung  $\geq \pm 0.1 \text{ ppm}$  ein anderes Vorzeichen, als das gemessene, zurück berechnet, obwohl den PCSs der RDC-Tensor zu Grunde liegt.



**Abb. 5.22:** T12C Tb: Darstellung der Metall-Kern-Vektoren der PCSs als Vektorschar [Å] für den PCS-Tensor (A). Die Tensoren sind nicht maßstabsgetreu abgebildet. Negative PCSs sind blau, positive rot und PCSs einer Größe von  $0 \pm 0.1$  ppm grün dargestellt. (C) zeigt die Verteilungen der Vektorschar aus (A) auf der Kugeloberfläche, wobei der Kubus um  $60^\circ$  gedreht wurde. (B) und (D) liegen die, im RDC-Tensor berechneten PCSs zu Grunde. Die unterschiedlichen zu Grunde liegenden Metallpositionen werden durch die Verschiebung der Sphären im Kubus angedeutet.

In Abbildung 5.23 sind die, auf die beschriebene Weise neu berechneten PCS-Tensoren für beide anisotropen T12C-Proben im Vergleich zu den initialen RDC-Tensoren gezeigt. Die axialen Komponenten beider Proben weisen nun, durch die RDC-gestützte Berechnung, das selbe Vorzeichen auf.

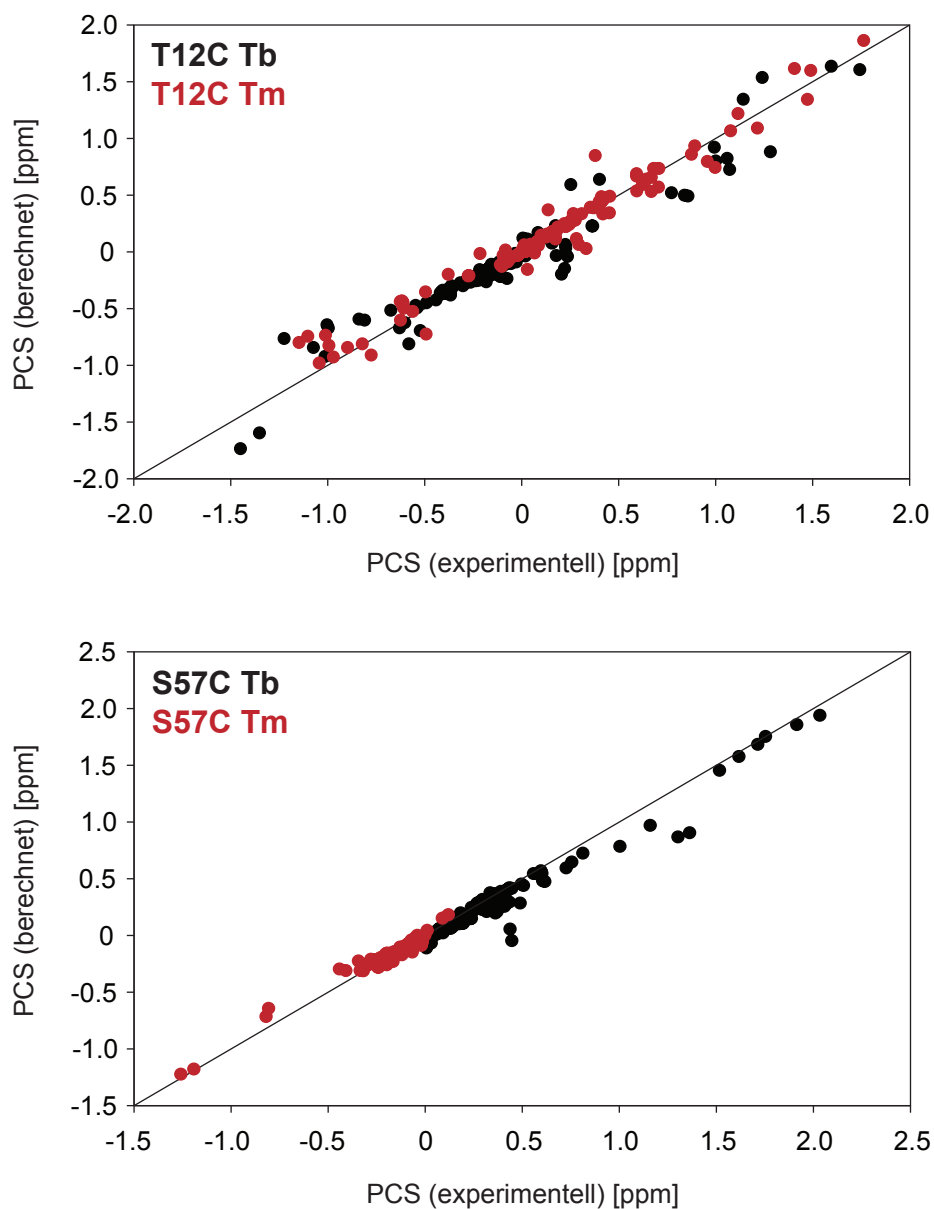
Beide vorgestellten Methoden der PCS-Tensorberechnung liefern vergleichbare Metallpositionen. Wenn der PCS-Tensor auf Basis der RDC-bestimmten Lage mit anschließender Minimierung um diese Position bestimmt werden, so sind wie in Tabelle 5.6 zu sehen, die  $Q$ -Faktoren und R-Werte der PCSs aller vier Proben erwartungsgemäß besser, als bei der gemeinsamen RDC- und PCS-Minimierung im selben Tensor. Die Differenz der  $Q$ -Faktoren zwischen den beiden Berechnungsmethoden beträgt für die PCSs zwischen 0.02 und 0.07. Es besteht hier allerdings die



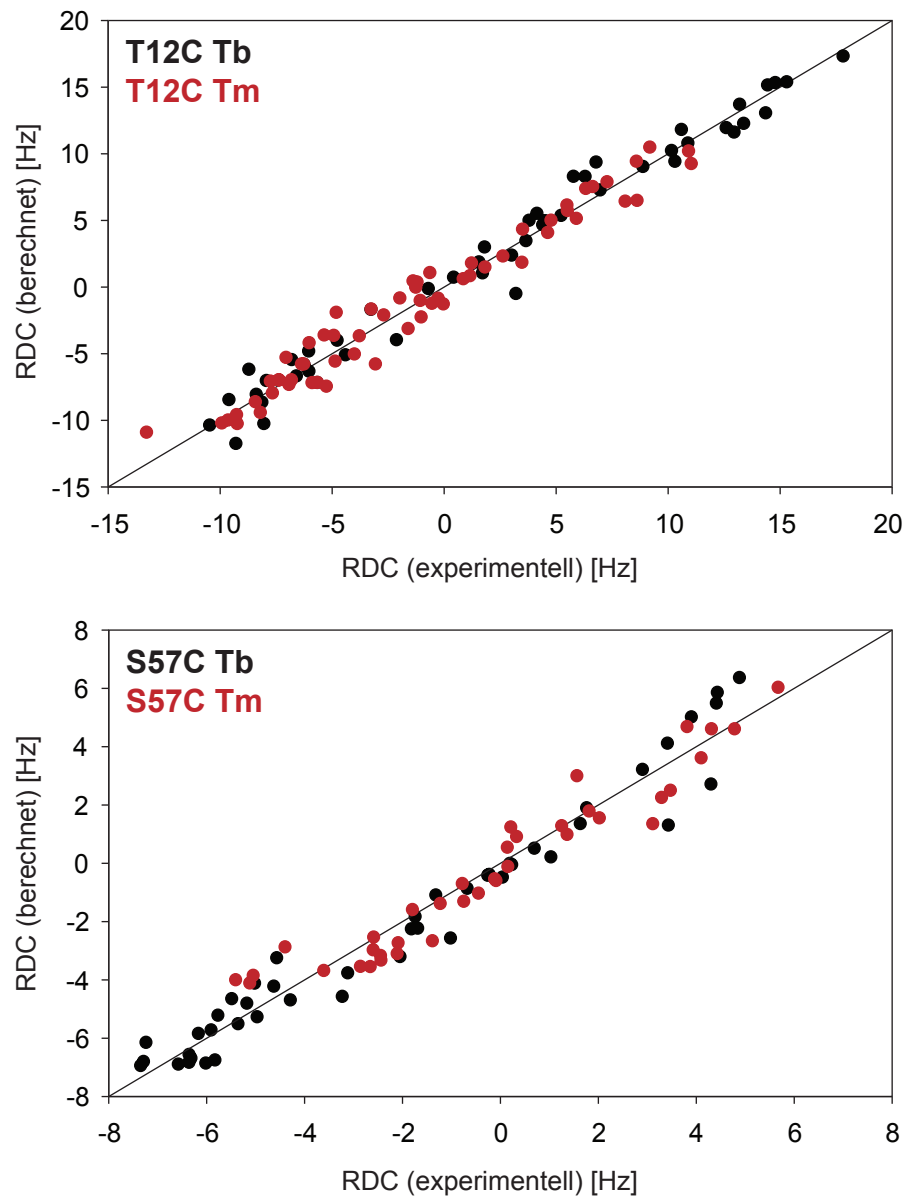
**Abb. 5.23:** Vergleich der RDC-Tensoren (A) und (D) mit den neu berechneten PCS-Tensoren. (A)–(C) zeigen die Tensoren von T12C Tb, (D)–(F) die von T12C Tm. (B) und (E) sind die PCS-Tensoren der gleichzeitigen Minimierung von RDCs und PCSs, (C) und (F) sind die PCS-Tensoren auf Basis der RDC-Tensoren mit anschließender PCS-Minimierung. Die Elemente der Saupematrix [ $10^{-4}$ ] sind im Anhang in der Tabelle 7.16 angegeben.

Möglichkeit, dass sich im Zuge der Minimierung die Position des Metalls und somit auch der Tensor zurück in Richtung des PCS-Tensors bewegt. Dies zeigt sich daran, dass die so erhaltenen Tensoren wieder einen größeren Unterschied in der Orientierung im Vergleich zu den RDC-Tensoren aufweisen (siehe Tabelle 5.6). Die RDCs hingegen werden durch die gleichzeitige Minimierung von RDCs und PCSs nur sehr gering beeinflusst und werden durch den gemeinsamen Tensor sehr gut beschrieben. Die  $Q$ -Faktoren sind zwischen 0.01 und 0.03 höher, als die der unabhängigen Berechnungen der RDC-Tensoren. Somit scheint die Berechnung eines gemeinsamen Tensors, basierend auf PCS- und RDC-Daten, ein guter Ansatz zu sein, um PCSs und RDCs gleichzeitig zu betrachten.

In der Abbildung 5.24 sind die Korrelationsdiagramme der experimentellen  $^1\text{H}$ - und  $^{15}\text{N}$ -PCSs gegen die, im gemeinsamen Tensor zurück berechneten Werte gezeigt. Die Daten von T12C Tb und T12C Tm streuen etwas stärker um die Korrelationsgerade, als die Werte von S57C Tb und S57C Tm, zeigen aber im Gegensatz zu diesen keine Tendenz auf. Beide S57C-Datensätze werden noch immer ein wenig unterschätzt, die Ausmaße sind jedoch geringer als bei der Berechnung der PCSs im RDC-Tensor (siehe Abbildung 5.19). Abbildung 5.25 zeigt die entsprechende Auftragung der RDCs. Für die S57C-Proben weichen die berechneten Werte auch stärker von den experimentellen ab, als für T12C. Dies hat vermutlich mehrere Ursachen. Zum einen waren die gemessenen RDCs bei S57C durch eine erhöhte Flexibilität des Tags deutlich kleiner, wodurch eventuelle Fehler stärker ins Gewicht fallen. Zum anderen wiesen alle PCSs in den jeweiligen Proben das selbe Vorzeichen auf. Für eine eindeutige Tensorbeschreibung ist jedoch ein Vorzeichenwechsel von besonderer Bedeutung.



**Abb. 5.24:** Korrelationsdiagramm der experimentellen  $^1\text{H}$ - und  $^{15}\text{N}$ -PCSs beider Cys-Ph-TAHA-getaggten Ubiquitinmutanten (T12C: oben, S57C: unten), aufgetragen gegen die mit den RDCs zusammen berechneten Werte. Die Daten für Terbium sind schwarz, die für Thulium rot dargestellt. Die zu Grunde liegenden Daten sind im Anhang in den Tabellen 7.17 und 7.18 gegeben.



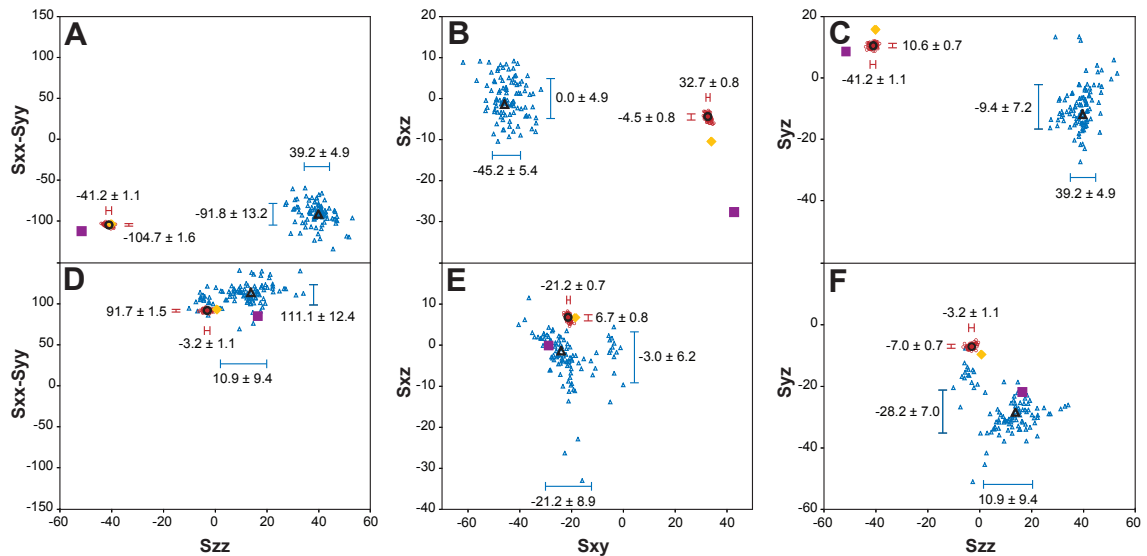
**Abb. 5.25:** Korrelationsdiagramm der experimentellen RDCs beider Cys-Ph-TAHA-getaggten Ubiquitinmutanten (T12C: oben, S57C: unten), aufgetragen gegen die mit den PCSs zusammen berechneten Werte. Die Daten für Terbium sind schwarz, die für Thulium rot dargestellt. Die zu Grunde liegenden Daten sind im Anhang in den Tabellen 7.11, 7.12 und 7.19 gegeben.

**Tab. 5.7:** Übersicht über die Mittelwerte und Standardabweichungen der Saupematrixelemente von T12C Tb und T12C Tm, die aus 100 Berechnungen mit jeweils 80% der Daten erhalten wurden [ $10^{-5}$ ].

Probe	Daten	$S_{zz}$	$S_{xx-yy}$	$S_{xy}$	$S_{xz}$	$S_{yz}$
T12C Tb	PCS	$39.2 \pm 4.9$	$-91.8 \pm 13.2$	$-45.2 \pm 5.4$	$0.0 \pm 4.9$	$-9.4 \pm 7.2$
	RDC	$-41.2 \pm 1.1$	$-104.7 \pm 1.6$	$32.7 \pm 0.8$	$-4.5 \pm 0.8$	$10.6 \pm 0.7$
T12C Tm	PCS	$10.9 \pm 9.4$	$111.1 \pm 12.4$	$-21.2 \pm 8.9$	$-3.0 \pm 6.2$	$-28.2 \pm 7.0$
	RDC	$-3.2 \pm 1.1$	$91.7 \pm 1.5$	$-21.2 \pm 0.7$	$6.7 \pm 0.8$	$-7.0 \pm 0.7$

Um die Fehleranfälligkeit der Tensoren weiter zu untersuchen, wurden 100 Datensätze von Dr. Mitcheell Maestre Martinez erzeugt, aus denen zufällig jeweils 20% der Daten entfernt wurden. Mit diesen reduzierten Datensätzen wurden die jeweiligen PCS- und RDC-Tensoren erneut berechnet. Repräsentativ sind für T12C Tb und T12C Tm in Abbildung 5.26 drei der zehn möglichen Kombinationen der Saupematrixelemente aufgetragen. Während die RDC-Tensoren nur eine geringe Streuung zeigen, wird die große Fehleranfälligkeit der PCS-Tensoren direkt ersichtlich. Darüber hinaus ist gut zu erkennen, dass die Tensoren aus der gemeinsamen Minimierung von PCSs und RDCs den RDC-abgeleiteten Tensoren sehr ähnlich sind. Im Gegensatz dazu ergeben sich durch die PCS-Minimierung rund um die RDC-abgeleitete Metallposition wieder größere Unterschiede zum RDC-Tensor. In Tabelle 5.7 sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Matrixelemente aufgelistet.

Grundsätzlich ist für die Bestimmung eines Tensors eine möglichst hohe Anzahl an Messwerten erstrebenswert. Durch die, in der vorgestellten Methode, gleichzeitige Minimierung von RDCs und PCSs werden zur Tensorbeschreibung deutlich mehr Parameter verwendet, als bei den unabhängigen Berechnungen der jeweiligen Tensoren. Die RDCs haben bei der gemeinsamen Minimierung von RDCs und PCSs einen großen Einfluss auf den späteren Tensor. Somit wirken sich große RDCs besonders positiv auf die Berechnung aus.



**Abb. 5.26:** Auftragungen der Saupematrixelemente [ $10^{-5}$ ] von T12C Tb (A–C) und T12C Tm (D–F), die aus den unterschiedlichen Berechnungen erhalten wurden. Repräsentativ gezeigt sind jeweils drei der zehn möglichen Kombinationen. Die Daten sind wie folgt markiert: PCS-Tensor: schwarzes Dreieck, RDC-Tensor: schwarzer Kreis, Tensor der gemeinsamen Minimierung von PCSs und RDCs: gelbe Raute, Tensor der RDC-basierten Metallposition mit anschließender Minimierung der PCSs: violetter Kasten. Zusätzlich sind jeweils 100 Datenpunkte für die PCSs (blaue Dreiecke) und RDCs (rote Kreise) angegeben, bei deren Berechnung jeweils 20% der Daten zufällig ausgelassen wurden. Die Balken geben die resultierenden Mittelwerte mit den entsprechenden Standardabweichungen an (siehe auch Tabelle 5.7).



## 5.5 Zusammenfassung und Einordnung der Ergebnisse

Mit dem Cys-Ph-TAHA-Tag wurde ein viel versprechendes Werkzeug für die NMR-Spektroskopie entwickelt. Cys-Ph-TAHA ist synthetisch in Maßstäben von mehreren hundert Milligramm leicht zugänglich. Der Tag ist chemisch sehr stabil und zeigte auch nach Monaten der Lagerung keine Dekompositionerscheinungen. Darüber hinaus wurde eine zuverlässige und gleichzeitig sehr einfach auszuführende Methode entwickelt, mit der Metall-vorbeladenes Cys-Ph-TAHA nahezu quantitativ an Proteine gebunden werden kann. Die erhaltenen Spektren waren von hervorragender Qualität, was sich in einer geringen Linienverbreiterung in Bezug auf die isotrope Referenz ausdrückte. Es wurden PCSs und vor allem RDCs von hoher Qualität erhalten. Die Daten zeigten zum einen eine sehr gute Korrelation mit den zurück berechneten Werten, zum anderen wurden große RDCs erhalten. Hervorzuheben ist die Probe T12C Tb, mit der RDCs von bis zu 17.8 Hz gemessen wurden. Im Vergleich zu den EDTA-basierten Tags entspricht das etwa einer Verdopplung der maximalen RDCs. Da der gleiche Linker, wie bei den EDTA-Tags verwendet wurde, lassen sich die Unterschiede direkt auf den Liganden zurückführen. Die Größe der erhaltenen RDCs ermöglicht in der Zukunft die Untersuchung von Proteindynamik.

Die bereits publizierten Tags CLaNP-5 und DOTA-M8 lieferten größere RDCs als Cys-Ph-TAHA (von bis zu 25 Hz bei 600 MHz für CLaNP-5, beziehungsweise bis zu 20 Hz bei 800 MHz für DOTA-M8). Die großen RDCs, die mit CLaNP-5 bereits bei relativ niedrigem Magnetfeld erhalten wurden, beruhen jedoch auf der Verknüpfung des Tags über zwei Disulfidbrücken. Die Verwendung setzt demnach ein hohes Maß an Strukturkenntnis voraus, da zwei Cysteine in geeignetem Abstand voneinander eingeführt werden müssen. Die allgemeine Anwendbarkeit von CLaNP-5 wird somit erheblich eingeschränkt. Ziel dieser Arbeit war es jedoch, ein möglichst breit einsetzbares Werkzeug für die NMR-Spektroskopie zu entwickeln. Der direkte Vergleich muss deshalb eher zu DOTA-M8 gezogen werden.

Mit DOTA-M8 wurde ein zweiter, temperaturabhängiger Datensatz mit einem Beitrag von 15–20% bei 298 K bis hin zu 50% bei 323 K beobachtet. Dies stellt einen nicht zu vernachlässigenden Einfluss auf die Spektren dar. Zwar waren in den HSQC-Spektren von T12C Tb und T12C Tm ebenfalls Signale von zwei zusätzlichen Datensätzen auszumachen, jedoch verblieb deren Beitrag über den gesamten Temperaturbereich von 278–315 K konstant bei ungefähr 2%. Da in den Spektren von S57C keine zusätzlichen Signale beobachtet wurden, lassen sich diastereomere Komplexe als Ursache für die weiteren Signalsätze in T12C ausschließen. Cys-Ph-TAHA kann somit über einen weiten Temperaturbereich eingesetzt werden. Diese Eigenschaft wurde bislang für keinen Tag berichtet und könnte für die Untersuchung thermophiler Proteine von großem Nutzen sein. Im Gegensatz zu Cys-Ph-TAHA bietet DOTA-M8 die Möglichkeit, Messungen unterhalb von pH 4 durchführen zu können, da der käfigartige Ligand komplexierte Lanthanoidionen nicht wieder freisetzt.

Ein bedeutsamer Unterschied liegt in der synthetischen Zugänglichkeit der beiden Tags. Während Cys-Ph-TAHA in leicht großen Maßstäben hergestellt werden kann, ist bereits die Synthese des vierfach methylysubstituierten DOTA-Rings äußerst schwierig. Die größeren RDCs und die Möglichkeit der Messung unter pH 4 mit DOTA-M8 werden kompensiert, da mit Cys-Ph-TAHA über den gesamten untersuchten Temperaturbereich keine bedeutsamen Beiträge zusätzlicher Signalsätze, induziert durch diastereomere Lanthanoidkomplexe, auftreten.

Die reinen PCS- beziehungsweise RDC-abgeleiteten Tensoren weisen häufig deutliche Unterschiede in Größe und Orientierung auf. Innerhalb dieser Arbeit wurden verschiedene Möglichkeiten getestet, diese Tensoren miteinander zu verbinden. Durch die gleichzeitige Minimierung von RDCs und PCSs gegen einen gemeinsamen Tensor, wurde eine sehr gute Beschreibung für beide Datensätze erhalten. Diese neue Methode zur Tensorbestimmung erscheint somit sehr viel versprechend. In der Zukunft soll dieser Ansatz sowohl mit Datensätzen anderer Proteine, als auch durch Verwendung anderer Lanthanoide überprüft werden.

Es konnte gezeigt werden, dass RDCs weniger fehleranfällig als PCSs sind. Bislang fließen beide Parameter in gleichem Maße in die Tensorberechnung ein. Eine

Gewichtung der Daten, die beispielsweise die unterschiedliche Empfindlichkeit auf Bewegungen des Tags berücksichtigt, sollte zu einem noch zuverlässigeren Tensor führen.

Neben weiteren Untersuchungen zu den Eigenschaften der Tensoren, ist ein Nahziel des Projekts die Synthese von weiteren Tags auf Grundlage des TAHA-Liganden, dessen Potential mit dieser Arbeit demonstriert wurde. Die nächste Generation des TAHA-Tags soll über einen axialsymmetrischen Linker verfügen, um die vorhandenen rotatorischen Freiheitsgrade zu reduzieren. Es ist zu erwarten, dass eine derartige Rigidifizierung des Tags in größeren RDCs resultiert.

Cys-Ph-TAHA soll zukünftig in verschiedenen Projekten verwendet werden. Der Tag wurde an mehrere Kooperationspartner verschickt und soll helfen, die jeweiligen Fragestellungen zu beantworten. Darüber hinaus besteht im Arbeitskreis ein großes Interesse an der Untersuchung von Oligonukleotiden. Es ist geplant, Thiolhaltige Nukleobasen in DNA-Sequenzen einzubauen, diese mit Cys-Ph-TAHA zu modifizieren und so die Anwendbarkeit paramagnetischer Tags auf Oligonukleotide zu erweitern.

# Kapitel 6

## Experimenteller Teil

### 6.1 Material und Methoden

#### **Chemikalien:**

Alle Lösungsmittel wurden bei den Firmen *Fluka* oder *Merck* in p.a. Qualität gekauft. Für Reaktionen unter Inertgas wurden absolute und über Molekularsieb gelagerte Lösungsmittel verwendet. Die Chemikalien stammen von den Firmen *Merck*, *Fluka*, *Sigma-Aldrich*, *Acros*, *Lancaster* und *Alfa Aesar*. Als Inertgas wurde Argon verwendet, welches über einen Trockenturm (Phosphorpentoxid/Bimsstein) getrocknet wurde.

#### **Säulenchromatographie:**

Die Säulen wurden mit Kieselgel der Firma *Merck* gefüllt. Bei der Aufreinigung per Flash-Säulenchromatographie wurde eine Korngröße von 15–40  $\mu\text{m}$  verwendet und bei einem Druck von 0.5–1.5 bar eluiert. Im Falle von Schwerkraftsäulen wurde Kieselgel der Korngröße 63–100  $\mu\text{m}$  benutzt. Die Säulen wurden nass mit einem 50–100fachen Überschuss an Kieselgel befüllt und das Substanzgemisch als konzentrierte Lösung im Eluenten aufgetragen.

#### **Dünnschichtchromatographie:**

Reaktionskontrolle erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie. Es wurden vorbeschichtete DC-Platten der Firma *Machery-Nagel* verwendet (0.25 mm Polygram

SIL G/UV<sub>254</sub>). Die Spots wurden durch Eintauchen in ethanolische Phosphormolybdänsäurelösung (10 wt%) und anschließendes Erhitzen auf 200 °C visualisiert.

### Dialyse

Es wurden Slide-A-Lyzer<sup>®</sup> Dialyse-Kassetten (0.1–0.5 mL bzw. 0.5–3.0 mL) von *Thermo scientific* mit 3.500 MWCO (*molecular weight cutoff*) verwendet.

### Probenkonzentration

Zur Reduktion des Probenvolumens wurden Vivaspin 2 Konzentratoren mit PES-Membran (2 mL, 5000 MWCO) von *sartorius stedim biotech* eingesetzt. Die Tischzentrifuge (Centrifuge 5804) stammt von der Firma *Eppendorf*.

## 6.2 Charakterisierung der Substanzen

### NMR-Spektren:

Die NMR-Spektren zur Charakterisierung der synthetischen Verbindungen wurden an einem *Bruker* Avance Ultrashield-Spektrometer (400 MHz) bei einer Temperatur von 298 K aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen  $\delta$  wurden in ppm (*parts per million*) angegeben. Als interner Standard wurde auf die verbliebenen <sup>1</sup>H-Resonanzsignale der deuterierten Lösungsmittel referenziert: CDCl<sub>3</sub>: 7.26 ppm (<sup>1</sup>H-NMR) und 77.0 ppm (<sup>13</sup>C-NMR), MeOH-d<sub>4</sub>: 3.31 ppm (<sup>1</sup>H-NMR) und 49.0 ppm (<sup>13</sup>C-NMR), DMSO-d<sub>6</sub>: 2.49 ppm (<sup>1</sup>H-NMR) und 39.7 ppm (<sup>13</sup>C-NMR), Aceton-d<sub>6</sub>: 2.05 ppm (<sup>1</sup>H-NMR) und 29.8 ppm (CH<sub>3</sub>, <sup>13</sup>C-NMR). Die Signale wurden wie folgt angegeben: chemische Verschiebung  $\delta$  in ppm, Multiplizität (s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multiplett, br = breites Signal), skalare Kopplungskonstante  $J$  in Hertz, Integral und Kern. Die Signale wurden durch <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C-<sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C-HMBC-Spektren, sowie gegebenenfalls COSY-Spektren zugeordnet.

**HPLC-Trennungen:**

Analytische und präparative HPLC-Trennungen wurden an Anlagen der Firma *Jasco* mit DAD-Detektor durchgeführt. Es wurden *reversed phase*-Säulen der Firma *Knauer* (Europher C18) eingesetzt. Bei analytischen Läufen wurden Säulen der Größe  $150 \times 4.6$  mm, bei präparativen Trennungen Säulen von  $250 \times 8$  mm verwendet. Die analytischen Proben wurden bei einer Flussgeschwindigkeit von 1 mL/min, die präparativen mit 3 mL/min eluiert. Die *reversed phase*-Säulen wurden im Gradientenmodus betrieben (100% A  $\rightarrow$  100% B). Als Laufmittel A wurde Wasser verwendet, B war Acetonitril. Beide Laufmittel enthielten jeweils 0.1% Trifluoressigsäure. Der jeweilige Gradient ist in der Versuchsbeschreibung angegeben.

**Massenspektren:**

Die ESI-MS-Spektren wurden an einem Micromass ZQ 4000-Massenspektrometer mit Quadrupol-Detektor der Firma *Waters* aufgenommen. Die Angaben erfolgen in  $m/z$ . Die zu messenden Proben wurden in Methanol, Acetonitril oder Wasser gelöst. Zur Aufnahme von Massenspektren von Proteinen wurden diese gegen Ammoniumacetatpuffer (20 mM) dialysiert.

## 6.3 Protein-NMR

**Ubiquitinproben**

Die Ubiquitinproben wurden hausintern vom Biolabor unter der Leitung von Dr. Stefan Becker angefertigt. Das Protein wurde rekombinant in *E. coli* exprimiert und gemäß etablierter Methoden aufgereinigt (Lazar et al. (1997); You et al. (1999)). Es wurden sowohl einfach ( $^{15}\text{N}$ ), als auch doppelt markierte Proben ( $^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ ) zweier Ubiquitinmutanten (T12C und S57C) hergestellt. Um Dimerisierung durch Disulfidbrücken zu unterbinden, wurden die Proben TCEP-stabilisiert lyophilisiert.

**Spektrenaufnahme:**

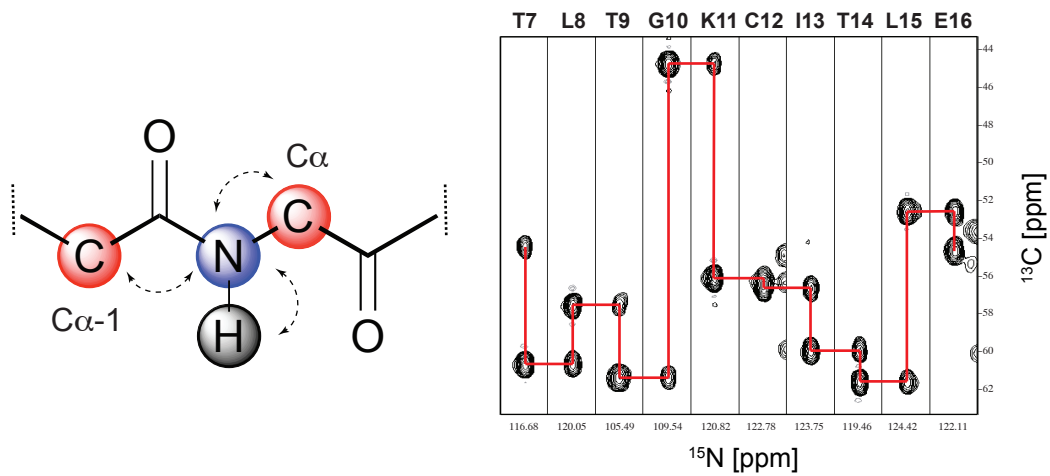
Die  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HSQC Spektren und HNCA-Spektren wurden an einem Avance III Spektrometer (800 MHz, 18.8 T), ausgestattet mit Cryoplattform und CP-TCI Probenkopf mit z-Gradient, der Firma *Bruker Biospin* bei 298 K aufgenommen. IPAP-HSQC- und 3D-HSQC-NOESY-Spektren wurden an einem *Bruker* Avance Spektrometer (900 MHz, 21.1 T), ausgestattet mit CP-TCI Cryoprobenkopf mit z-Gradient, bei 298 K gemessen.

**Prozessierung:**

Die Spektren wurden mit dem Programmpaket NMRPipe prozessiert ([Delaglio et al. \(1995\)](#)). Die IPAP-Spektren wurden mit einem *zero filling* von 16k versehen, was bei einer spektralen Weite von 28 ppm in der indirekten Dimension zu einer digitalen Auflösung von 0.16 Hz führte.

**Auswertung der Ubiquitinspektren:**

Die zweidimensionalen Spektren wurden mit dem Programm Sparky ([Goddard & Kneller \(2008\)](#)) ausgewertet. Für die dreidimensionalen Spektren wurde CARA ([Keller \(2004\)](#)) verwendet. Die sequentiellen Zuordnungen erfolgten hauptsächlich anhand der HNCA-Spektren. Der Magnetisierungstransfer im HNCA und der *sequential walk* durch das Spektrum im *strip scope* ist schematisch in [Abbildung 6.1](#) gezeigt. Für einige Proben wurden zur Verifikation 3D-HSQC-NOESY Spektren hinzugezogen.

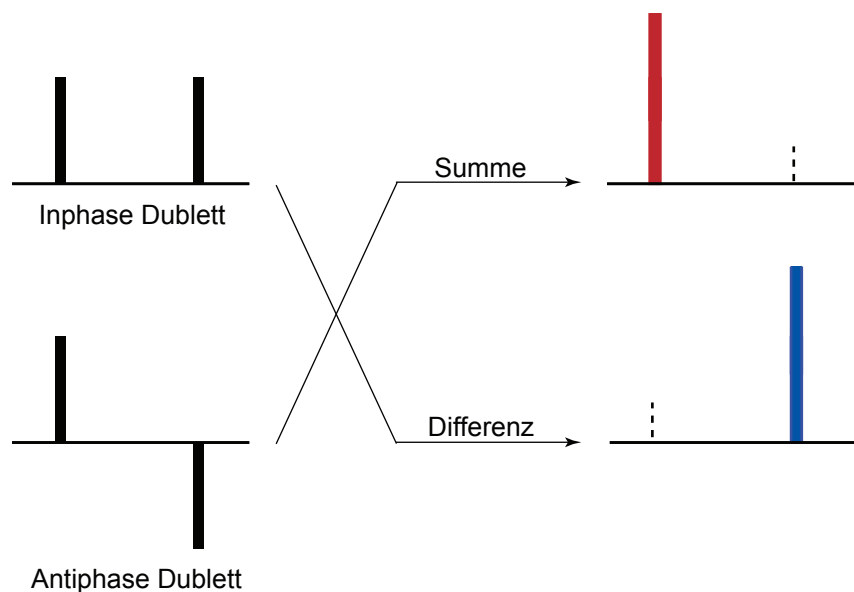


**Abb. 6.1:** Links: Schematische Darstellung der Magnetisierungsübertragungen und der erhaltenen Korrelationen im HNCA. Rechts: Das HNCA in der *strip scope*-Darstellung (CARA). Für einen gegebenen Aminosäurerest sind Korrelationen zwischen dessen Amidsignal und dem C $\alpha$  (stärkerer Peak) zu sehen. Darüber hinaus erscheint das C $\alpha$  der vorausgehenden Aminosäure (C $\alpha$ -1) als schwächerer Peak. Für den beispielhaften Ausschnitt von T7–E16 der T12C Mutante ist der *sequential walk* rot eingezeichnet.



### IPAP-HSQC

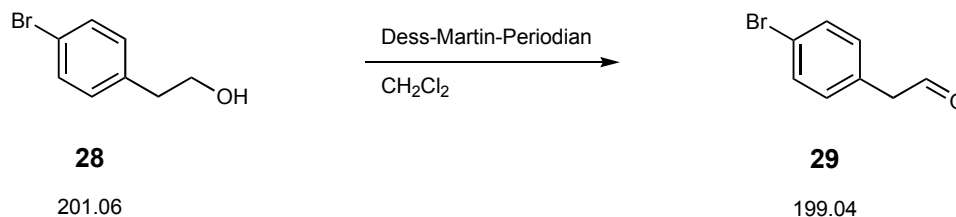
Um Signalüberlappungen zu minimieren, wurden die gekoppelten HSQC-Spektren unter Verwendung der IPAP-HSQC-Pulssequenz aufgenommen (*in-phase-antiphase-HSQC*, Ottiger et al. (1998)). Über den Phasenzyklus selektiert, werden zwei gekoppelte HSQC-Spektren aufgezeichnet, wobei die heteronukleare Kopplung im einen Fall als Inphase-, im anderen Fall als Antiphasedublett detektiert wird. Durch anschließende Addition, beziehungsweise Subtraktion werden HSQC-Spektren erhalten, deren Peaks jeweils um die halbe Kopplungskonstante verschoben sind und somit die gewünschte Information ohne eine Verdopplung des Signalsatzes enthalten. Dies ist in Abbildung 6.2 schematisch dargestellt.



**Abb. 6.2:** Schematische Darstellung der Prozessierung des IPAP-HSQC. Die Signale in den erhaltenen Spektren, dargestellt in rot (Summe) und blau (Differenz), sind jeweils um die halbe Kopplungskonstante tief- bzw. hochfeldverschoben.

## 6.4 Synthesevorschriften

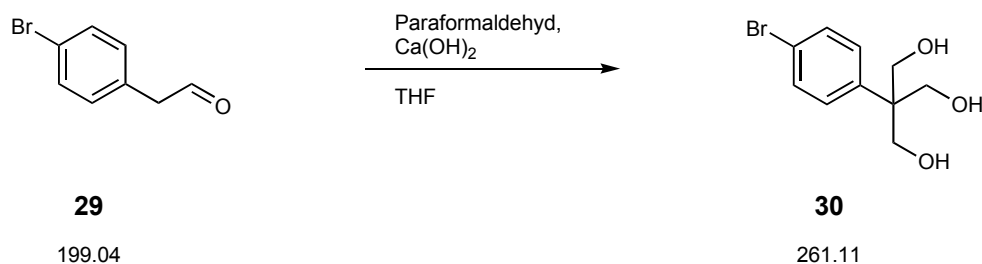
### 6.4.1 Synthese von 2-(4-Bromphenyl)acetaldehyd



2-(4-Bromphenyl)ethanol **28** (2.40 g, 11.94 mmol) wurde in abs. Dichlormethan (80 mL) aufgenommen, mit Dess-Martin-Periodinan (5.46 g, 12.87 mmol, 1.08 Äq.) versetzt und die Suspension unter Argon und Lichtausschluss bei Raumtemperatur für 2.5 h gerührt. Anschließend wurden 100 mL einer gesättigten Natriumhydrogencarbonatlösung und 25 %ige Natriumthiosulfatlösung (30 mL) zugefügt und weitere 15 min gerührt. Die Phasen wurden getrennt, die wässrige Phase mit Dichlormethan extrahiert ( $3 \times 50$  mL), die vereinte organische Phase über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingengt. Das Produkt **29** wurde quantitativ als gelbe Flüssigkeit erhalten, die bei Raumtemperatur erstarrte.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta = 9.60$  (s, 1H, CHO), 7.45 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.05 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H, H-2', H-6'), 3.62 (s, 2H, H-2) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100.6 MHz):  $\delta = 198.5$  (1C, CHO), 132.0 (2C, C-3', C-5'), 131.3 (2C, C-2', C-6'), 130.9 (1C, C-1'), 121.4 (1C, C-4'), 49.5 (1C, C-2) ppm.

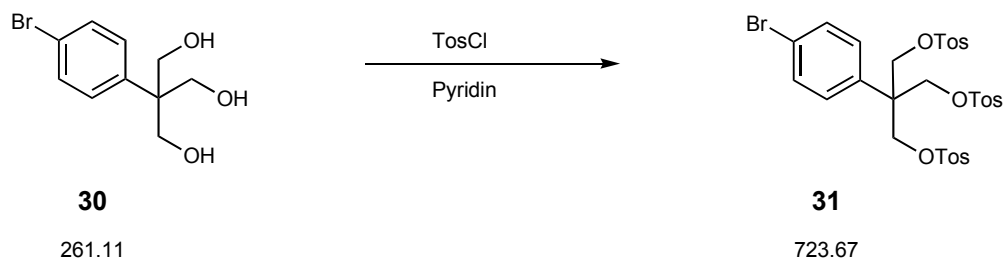
6.4.2 Synthese von 4-Brom- $\alpha,\alpha,\alpha$ -tris(hydroxymethyl)toluol

Unter Argon wurde eine Suspension von Verbindung **29** (2.37 g, 11.91 mmol) mit Paraformaldehyd (3.07 g, 102.23 mmol, 8.6 Äq.) und Calciumhydroxid (10.12 g, 136.59 mmol, 11.5 Äq.) in abs. Tetrahydrofuran (150 mL) bei 65 °C für 90 h gerührt. Die abgekühlte Suspension wurde durch Celite filtriert und mit Tetrahydrofuran gewaschen, bis das Filtrat farblos wurde. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Eluent: Hexan/Aceton 1:1) und **30** (1.44 g, 5.51 mmol, 46%) in Form eines farblosen Öls erhalten.

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 7.49 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 2H, H-3, H-5), 7.26 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 2H, H-2, H-6), 4.09 (s, 6H, 3  $\times$  CH<sub>2</sub>) 2.37 (br s, 3H, 3  $\times$  OH) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100.6 MHz):  $\delta$  = 138.54 (1C, C-1), 132.0 (2C, C-3, C-5), 128.6 (2C, C-2, C-6), 120.9 (1C, C-4), 66.4 (3C, 3  $\times$  CH<sub>2</sub>), 48.6 (1C, C- $\alpha$ ) ppm.

ESI-MS  $m/z$  (Methanol, positive mode): ber. für C<sub>10</sub>H<sub>13</sub><sup>79</sup>BrNaO<sub>3</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 282.99, gef.: 282.88.

6.4.3 Synthese von 4-Brom- $\alpha,\alpha,\alpha$ -tris(tosyloxymethyl)toluol

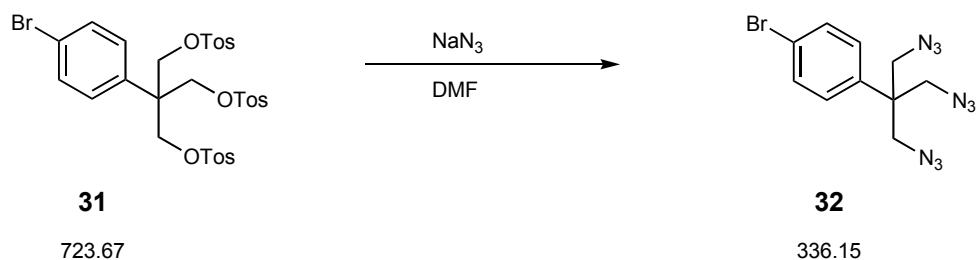
**30** (4.70 g, 18.00 mmol) wurde in 120 mL abs. Pyridin aufgenommen, mit Tosylchlorid (20.60 g, 108.05 mmol, 10.0 Äq.) versetzt und bei Raumtemperatur für 60 h gerührt. Das Pyridiniumchlorid wurde abfiltriert und das Pyridin im Vakuum entfernt. Zum Rückstand wurden Wasser (250 mL) und Dichlormethan (250 mL) gegeben und anschließend die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde mit Dichlormethan extrahiert ( $3 \times 200$  mL), die vereinigte organische Phase über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Die säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel (Eluent: Dichlormethan) lieferte die Zielverbindung **31** (11.85 g, 16.37 mmol, 91%) als weißen Schaum.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta = 7.59$  (d,  $J = 8.2$  Hz, 6H,  $6 \times \text{Tos-Ar}$ ),  $7.30$  (d,  $J = 8.2$  Hz, 6H,  $6 \times \text{Tos-Ar}$ ),  $7.22$  (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H, H-3, H-5),  $6.76$  (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H, H-2, H-6),  $4.14$  (s, 6H,  $3 \times \text{CH}_2$ ),  $2.46$  (s, 9H,  $3 \times \text{CH}_3$ ) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100.6 MHz):  $\delta = 145.4$  (3C,  $3 \times \text{Tos-Ar}$ ),  $133.8$  (1C, C-1),  $131.8$  (2C, C-3, C-5),  $131.5$  (3C,  $3 \times \text{Tos-Ar}$ ),  $130.0$  (6C,  $6 \times \text{Tos-Ar}$ ),  $127.8$  (8C, C-2, C-6,  $6 \times \text{Tos-Ar}$ ),  $122.2$  (1C, C-4),  $68.4$  (3C,  $3 \times \text{CH}_2$ ),  $45.9$  (1C, C- $\alpha$ ),  $21.6$  (3C,  $3 \times \text{CH}_3$ ) ppm.

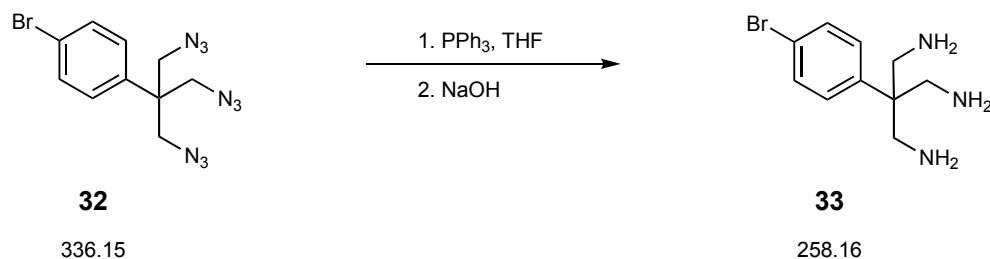
**ESI-MS**  $m/z$  (Methanol, positive mode): ber. für  $\text{C}_{31}\text{H}_{31}^{79}\text{BrNaO}_9\text{S}_3$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 745.02, gef.: 744.94.

#### 6.4.4 Synthese von 4-Brom- $\alpha,\alpha,\alpha$ -tris(azidomethyl)toluol



**31** (11.50 g, 15.89 mmol) wurde in 500 mL abs. Dimethylformamid aufgenommen, mit Natriumazid (6.19 g, 95.23 mmol, 6.0 Äq.) versetzt und bei 100 °C für 18 h gerührt. Anschließend wurden zur abgekühlten Suspension 1400 mL Wasser gegeben und diese mit Dichlormethan extrahiert ( $3 \times 500$  mL). Die vereinte organische Phase wurde mit Wasser gewaschen (500 mL) und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum bis auf einen Rest von 30 mL entfernt, abs. Tetrahydrofuran zugegeben (50 mL) und das Volumen im Vakuum auf einen Rest von 30 mL reduziert. Dies wurde wiederholt ( $2 \times$ ) und die so erhaltene Lösung in die nächste Stufe eingesetzt.

### 6.4.5 Synthese von 4-Brom- $\alpha,\alpha,\alpha$ -tris(aminomethyl)toluol



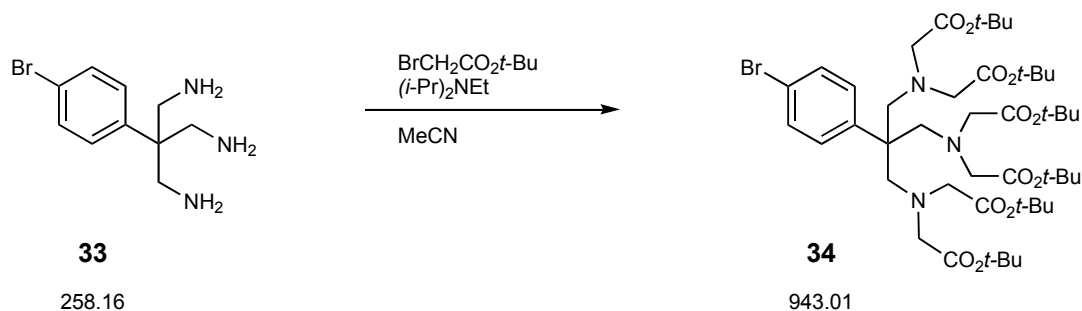
Die Lösung von **32** wurde unter Argon mit Tetrahydrofuran auf 400 mL aufgefüllt, mit Triphenylphosphin (37.53 g, 143.10 mmol, 9.0 Äq.) versetzt und bei 65 °C für 2 h gerührt. Nach Ende der Gasentwicklung wurde Natronlauge (2M, 195 mL) zugefügt und die Lösung für weitere 2 h bei 65 °C gerührt. Im Anschluss wurde die Reaktionslösung mit Salzsäure auf pH 1 angesäuert und die wässrige Phase mit Chloroform gewaschen (3 × 300 mL). Danach wurde die wässrige Phase mit festem Natriumhydroxid auf pH 12 eingestellt und mit Chloroform extrahiert (5 × 300 mL). Die organische Phase wurde vereint, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Das Produkt **33** (3.80 g, 14.72 mmol, 93% über 2 Stufen) wurde als gelbliches Öl erhalten.

<sup>1</sup>H-NMR (MeOH-d<sub>4</sub>, 400 MHz):  $\delta = 7.55$  (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H, H-3, H-5), 7.30 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H, H-2, H-6), 2.90 (s, 6H, 3 × CH<sub>2</sub>) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (MeOH-d<sub>4</sub>, 100.6 MHz):  $\delta = 141.4$  (1C, C-1), 131.4 (2C, C-3, C-5), 128.6 (2C, C-2, C-6), 120.6 (1C, C-4), 48.3 (1C, C- $\alpha$ ), 45.0 (3C, 3 × CH<sub>2</sub>) ppm.

ESI-MS  $m/z$  (Methanol, positive mode): ber. für C<sub>10</sub>H<sub>17</sub><sup>79</sup>BrN<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 258.06, gef.: 257.98.

### 6.4.6 Synthese von 4-Brom- $\alpha,\alpha,\alpha$ -tris[[*N,N*-di(*tert*-butoxycarbonylmethyl)amino]methyl]toluol



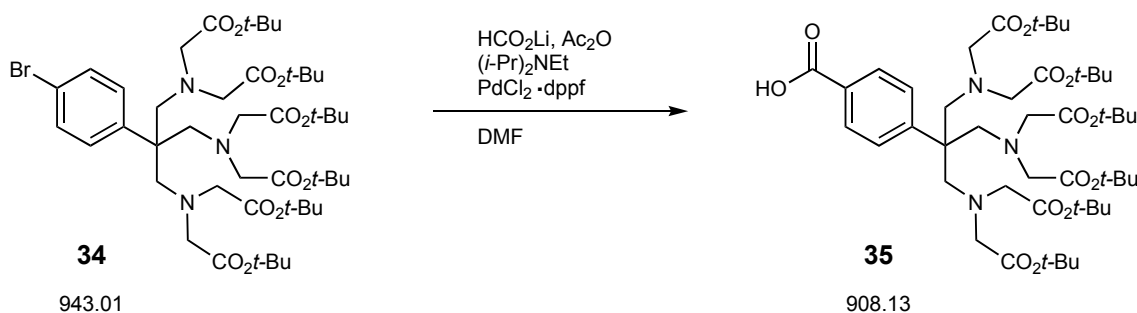
Die Verbindung **33** (3.30 g, 12.78 mmol) wurde unter Argon in abs. Acetonitril (330 mL) gelöst, mit Diisopropylethylamin (26.75 mL, 156.27 mmol, 12.2 Äq.) und Bromessigsäure-*tert*-butylester (17.0 mL, 115.05 mmol, 9.0 Äq.) versetzt und unter Rückfluss für 42 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in Dichlormethan gelöst. Die Lösung wurde mit 5 %iger Zitronensäurelösung (2 × 200 mL) und Wasser (200 mL) gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingengt. Die Reinigung erfolgte säulenchromatographisch an Kieselgel (Eluent: Dichlormethan/Methanol 100:1). Das Produkt **34** wurde als gelber Schaum (11.69 g, 12.40 mmol, 97%) erhalten.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta = 7.31$  (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H, H-3, H-5), 7.25 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H, H-2, H-6), 3.17 (s, 18H, 9 ×  $\text{CH}_2$ ), 1.39 (s, 54H, 6 ×  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100.6 MHz):  $\delta = 170.9$  (6C, 6 ×  $\text{CO}_2t\text{-Bu}$ ), 143.7 (1C, C-1), 131.3 (2C, C-3, C-5), 128.6 (2C, C-2, C-6), 119.8 (1C, C-4), 80.4 (6C, 6 ×  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 59.3 (3C, 3 ×  $\text{C-}\alpha\text{CH}_2$ ), 56.5 (6C, 6 ×  $\text{NCH}_2\text{CO}_2t\text{-Bu}$ ), 48.5 (1C, C- $\alpha$ ), 28.0 (18C, 18 ×  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ) ppm.

**ESI-MS**  $m/z$  (Methanol, positive mode): ber. für  $\text{C}_{46}\text{H}_{77}^{79}\text{BrN}_3\text{O}_{12}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 944.47, gef.: 944.44.

### 6.4.7 Synthese von $\alpha,\alpha,\alpha$ -Tris[[*N,N*-di(*tert*-butoxycarbonyl)methyl)amino]methyl]-*p*-toluolsäure



Die Verbindung **34** (360 mg, 382  $\mu\text{mol}$ ) wurde in einem Druckkolben mit Schraubdeckel in 6.5 mL abs. Dimethylformamid gelöst, mit getrocknetem Lithiumformiat (179 mg, 3.44 mmol, 9.0 Äq.) und  $\text{PdCl}_2 \cdot \text{dppf}$  (28 mg, 36.2  $\mu\text{mol}$ , 10 mol%) versetzt. Es wurde für 20 min Argon durch die Suspension geleitet und anschließend Essigsäureanhydrid (216  $\mu\text{L}$ , 2.29 mmol, 6.0 Äq.) und Diisopropylethylamin (392  $\mu\text{L}$ , 2.29 mmol, 6.0 Äq.) hinzugefügt. Der Kolben wurde unter Argonatmosphäre fest verschlossen und bei 120 °C für 44 h gerührt. Das abgekühlte Reaktionsgemisch wurde auf Essigsäureethylester (80 mL) gegossen und die organische Phase mit Wasser ( $2 \times 50 \text{ mL}$ ) gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingedunstet. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Eluent: Dichlormethan/Methanol 20:1) und das Produkt (282 mg, 311  $\mu\text{mol}$ , 81%) als braunes Öl erhalten.

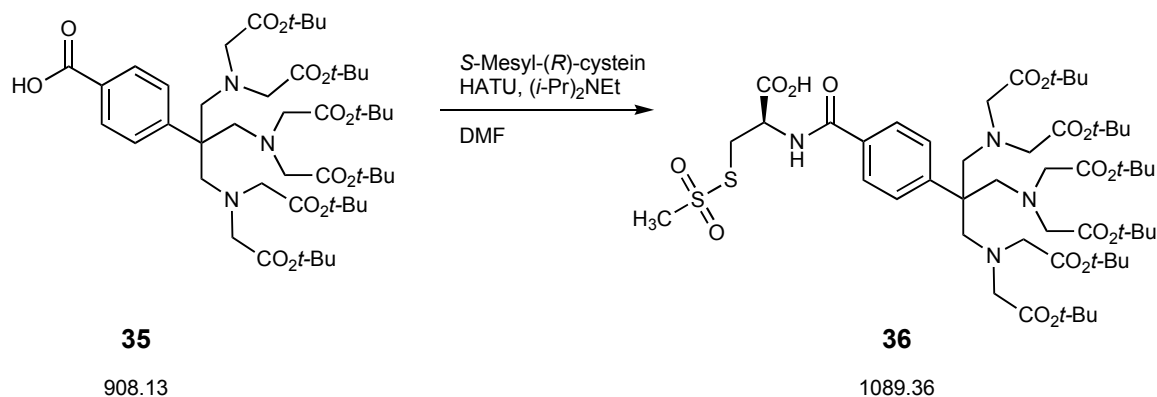
$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta = 7.99$  (d,  $J = 8.2 \text{ Hz}$ , 2H, H-3, H-5), 7.55 (d,  $J = 8.2 \text{ Hz}$ , 2H, H-2, H-6), 3.31 (s, 6H,  $3 \times \text{C-}\alpha\text{CH}_2$ ), 3.22 (s, 12H,  $6 \times \text{CH}_2\text{CO}_2t\text{-Bu}$ ), 1.42 (s, 54H,  $6 \times \text{C}(\text{CH}_3)_3$ ) ppm.



**$^{13}\text{C-NMR}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 100.6 MHz):  $\delta = 170.0$  (7C,  $6 \times \text{CO}_2t\text{-Bu}$ , C-4 $\text{CO}_2\text{H}$ ), 151.3 (1C, C-1), 130.2 (2C, C-3, C-5), 126.9 (2C, C-2, C-6), 127.3 (1C, C-4), 80.6 (6C,  $6 \times \text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 59.5 (3C,  $3 \times \text{C-}\alpha\text{CH}_2$ ), 56.6 (6C,  $6 \times \text{NCH}_2\text{CO}_2t\text{-Bu}$ ), 49.4 (1C, C- $\alpha$ ), 28.1 (18C,  $18 \times \text{C}(\text{CH}_3)_3$ ) ppm.

**ESI-MS**  $m/z$  (Methanol, positive mode): ber. für  $\text{C}_{47}\text{H}_{78}\text{N}_3\text{O}_{14}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 908.55, gef.: 908.57.

### 6.4.8 Synthese von *N*-[4-[ $\alpha,\alpha,\alpha$ -Tris[[*N,N*-di(*tert*-butoxycarbonylmethyl)amino]methyl]methyl]benzoyl]-*S*-mesyl-*(R)*-cystein



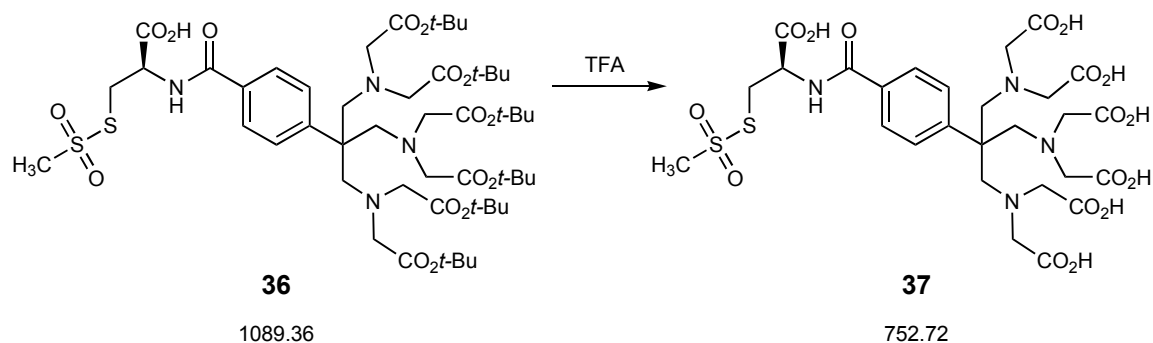
Die Verbindung **35** (178 mg, 196  $\mu\text{mol}$ ) wurde in 10 mL abs. Dimethylformamid aufgenommen, mit HATU (75 mg, 196  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äq.) und Diisopropylethylamin (33.5  $\mu\text{L}$ , 196  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äq.) versetzt und bei 25 °C für 2.5 h gerührt. Anschließend wurde *S*-Mesyl-*(R)*-cystein (39 mg, 196  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äq.) und erneut Diisopropylethylamin (33.5  $\mu\text{L}$ , 196  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äq.) zugegeben und für weitere 20 h bei 25 °C gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und zum Rückstand jeweils 30 mL Wasser und Chloroform gegeben. Die Phasen wurden getrennt, die wässrige Phase mit Chloroform (2  $\times$  20 mL) extrahiert, die vereinte organische Phase über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Eluent: Dichlormethan/Methanol 25:1 auf 8:1) und das Produkt **36** (147 mg, 135  $\mu\text{mol}$ , 69%) als braunes Öl erhalten. Darüber hinaus wurde **35** (31 mg, 34  $\mu\text{mol}$ , 17%) reisoliert.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  = 8.02 (s, 1H, NH), 7.82 (s, 2H, H-3, H-5), 7.52 (s, 2H, H-2, H-6), 4.71–4.89 (m, 1H,  $\text{SCH}_2\text{CH}$ ), 3.60–4.00 (m, 2H,  $\text{SCH}_2$ ), 3.36 (s, 3H,  $\text{SCH}_3$ ), 3.28 (s, 6H, 3  $\times$  C- $\alpha\text{CH}_2$ ), 3.22 (s, 12H, 6  $\times$   $\text{NCH}_2\text{CO}_2t\text{-Bu}$ ), 1.43 (s, 54H, 6  $\times$   $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100.6 MHz):  $\delta = 171.0$  (6C, 6  $\times$  CO<sub>2</sub>*t*-Bu), 167.6 (1C, CO<sub>2</sub>H), 162.9 (1C, NHCO), 149.3 (1C, C-1), 130.6 (1C, C-4), 127.6 (2C, C-3, C-5), 126.9 (2C, C-2, C-6), 80.7 (6C, 6  $\times$  C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 59.6 (3C, 3  $\times$  C- $\alpha$ CH<sub>2</sub>), 56.6 (6C, 6  $\times$  NCH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>*t*-Bu), 54.6 (1C, SCH<sub>2</sub>CH), 50.3 (1C, C- $\alpha$ ), 49.2 (1C, SCH<sub>3</sub>), 34.7 (1C, SCH<sub>2</sub>CH), 28.2 (18C, 18  $\times$  C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm.

ESI-MS *m/z* (Methanol, positive mode): ber. für C<sub>51</sub>H<sub>85</sub>N<sub>4</sub>O<sub>17</sub>S<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 1089.54, gef.: 1089.49.

### 6.4.9 Synthese von *N*-[4-[ $\alpha,\alpha,\alpha$ -Tris[[*N,N*-di(carboxymethyl)-amino]methyl]methyl]benzoyl]-*S*-mesyl-(*R*)-cystein, Cys-Ph-TAHA



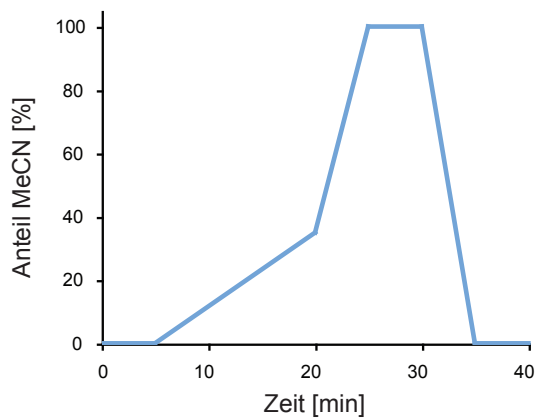
Die Verbindung **36** (209 mg, 192  $\mu\text{mol}$ ) wurde in 20 mL konzentrierter Trifluoressigsäure aufgenommen und bei 25 °C für 18 h gerührt. Anschließend wurde im Vakuum eingengt. Der Rückstand wurde in 16 mL Wasser aufgenommen und die unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugieren abgetrennt. Die Lösung wurde per präparativer HPLC gereinigt. Der verwendete Gradient ist unten angegeben. Die Produktfraktionen (Retentionszeit von 16.5 min) wurden vereint und lyophilisiert. Cys-Ph-TAHA **37** wurde als weißes Pulver (89 mg, 118  $\mu\text{mol}$ , 62%) erhalten.

<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O, 400 MHz):  $\delta$  = 7.81 (d,  $J$  = 7.9 Hz, 2H, H-3, H-5), 7.66 (d,  $J$  = 7.9 Hz, 2H, H-2, H-6), 4.86–4.95 (m, 1H, SCH<sub>2</sub>CH), 3.83 (d,  $J$  = 13.8 Hz, 1H, SCH<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 3.69–3.61 (m, 7H, SCH<sub>a</sub>H<sub>b</sub>, 3  $\times$  C- $\alpha$ CH<sub>2</sub>), 3.56 (s, 12H, 6  $\times$  NCH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H), 3.42 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (D<sub>2</sub>O, 100.6 MHz):  $\delta$  = 172.5 (7C, 7  $\times$  CO<sub>2</sub>H), 169.3 (1C, C-4CO), 143.3 (1C, C-1), 131.9 (1C, C-4), 127.9 (2C, C-3, C-5), 126.8 (2C, C-2, C-6), 60.7 (3C, 3  $\times$  C- $\alpha$ CH<sub>2</sub>), 55.7 (6C, 6  $\times$  NCH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H), 52.6 (1C, SCH<sub>2</sub>CH), 49.4 (1C, CH<sub>3</sub>), 46.1 (1C, C- $\alpha$ ), 36.2 (1C, SCH<sub>2</sub>CH) ppm.

**ESI-MS**  $m/z$  (Wasser, positive mode): ber. für  $C_{27}H_{37}N_4O_{17}S_2$   $[M+H]^+$ : 753.16,  
gef.: 753.08.

**ESI-HRMS**  $m/z$  (Wasser, positive mode): ber. für  $C_{27}H_{37}N_4O_{17}S_2$   $[M+H]^+$ : 753.1590,  
gef.: 753.1588.



**Abb. 6.3:** Gradient der Trennung. Wasser und Acetonitril enthielten jeweils 0.1% TFA.  
Aufgetragen ist der Anteil an Acetonitril gegen die Zeit.

## 6.5 Präparation von getaggttem, beladenem Ubiquitin

Für die Herstellung einer NMR Probe wurden 3 mg des Proteinlyophilisats einer einfach bzw. doppelt markierten Ubiquitinmutante (T12C oder S57C) in 200  $\mu\text{L}$  Puffer (MOPS 50 mM, NaCl 50 mM, pH 8.0) aufgenommen, in eine Dialyse-Kassette (Slide-A-Lyzer<sup>®</sup>, 0.1–0.5 mL, 3500 MWCO) gefüllt und für 4 h gegen 1000 mL des oben genannten Puffers dialysiert, um die Reduktionsmittel in Form von TCEP zu entfernen.

Parallel wurden die wässrigen Stammlösungen des Tags Cys-Ph-TAHA (**37**, 5.0  $\text{\AA}_q$ ,  $c = 10 \text{ mg/mL}$ ) und Lanthanoidtrichlorid (10.0  $\text{\AA}_q$ ,  $c = 10 \text{ mg/mL}$ ) zusammen pipettiert und für 2.5 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die beiden Lösungen vereint. Nach 75 min wurde das ausgefallene Lanthanoidtrihydroxid durch Zentrifugieren entfernt und der Überstand in einen Vivaspin 2 Konzentrator mit PES-Membran (2 mL, 5000 MWCO) gegeben. Dieser wurde mit dem späteren Messpuffer (MOPS 50 mM, NaCl 50 mM, pH 6.8) aufgefüllt und bei 5000 rcf (*relative centrifugal force*) auf ein Volumen von 220  $\mu\text{L}$  reduziert. Dieser Vorgang wurde wiederholt (9  $\times$ ) und so die überschüssigen, komplexierten Lanthanoide entfernt. Die Proteinlösung wurde in ein Shigemi NMR-Röhrchen überführt und mit 30  $\mu\text{L}$   $\text{D}_2\text{O}$  versetzt.

Zur Kontrolle der Taggingreaktion wurde ein kleiner Anteil gegen Ammoniumacetatpuffer (20 mM) dialysiert und per Massenspektrometrie qualitativ ermittelt, ob noch ungetaggttes Protein vorliegt.



# Literaturverzeichnis

- Aime, S., M. Botta, M. Fasano, M. P. Marques, C. F. Geraldes, D. Pubanz, & A. E. Merbach (1997). Conformational and coordination equilibria on DOTA complexes of lanthanide metal ions in aqueous solution studied by  $^1\text{H}$ -NMR spectroscopy. *Inorg. Chem.* **36**, 2059–2068.
- Allegrozzi, M., I. Bertini, M. B. L. Janik, G. Lee, Y. M. Liu, & C. Luchinat (2000). Lanthanide-induced pseudocontact shifts for solution structure refinements of macromolecules in shells up to 40 Å from the metal ion. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 4154–4161.
- Alpoim, M. C., A. M. Urbano, C. F. G. C. Geraldes, & J. A. Peters (1992). Determination of the number of inner-sphere water molecules in lanthanide(III) polyaminocarboxylate complexes. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1992**, 463–467.
- Alsaadi, B. M., F. J. C. Rossotti, & R. J. P. Williams (1980). Electron relaxation rates of lanthanide aquo-cations. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **11**, 2147–2150.
- Arnesano, F., L. Banci, I. Bertini, K. Van der Wetering, M. Czisch, & R. Kaptein (2000). The auto-orientation in high magnetic fields of oxidized cytochrome  $b_{562}$  as source of constraints for solution structure determination. *J. Biomol. NMR* **17**, 295–304.
- Arslantas, E., P. M. Smith-Jones, G. Ritter, & R. R. Schmidt (2004). TAME-Hex A - a novel bifunctional chelating agent for radioimmunoimaging. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 3979–3984.



- Bailey, A. J., W. P. Griffith, S. I. Mostafa, & P. A. Sherwood (1993). Studies on transition-metal oxo and nitrido complexes. Perruthenate and ruthenate anions as catalytic organic oxidants. *Inorg. Chem.* **32**, 268–271.
- Ban, N., P. Nissen, J. Hansen, P. B. Moore, & T. A. Steitz (2000). The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science* **289**, 905–20.
- Barry, C. D., A. C. North, J. A. Glasel, R. J. Williams, & A. V. Xavier (1971). Quantitative determination of mononucleotide conformations in solution using lanthanide ion shift and broadening NMR probes. *Nature* **232**, 236–245.
- Bax, A., G. Kontaxis, & N. Tjandra (2001). Dipolar couplings in macromolecular structure determination. *Methods Enzymol.* **339**, 127–174.
- Bax, A. & N. Tjandra (1997). High-resolution heteronuclear NMR of human ubiquitin in an aqueous liquid crystalline medium. *J. Biomol. NMR* **10**, 289–292.
- Bayrhuber, M., T. Meins, M. Habeck, S. Becker, K. Giller, S. Villinger, C. Vonrhein, C. Griesinger, M. Zweckstetter, & K. Zeth (2008). Structure of the human voltage-dependent anion channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 15370–15375.
- Berger, P., A. Bessmerykh, J. C. Caille, & S. Mignonac (2006). Palladium-catalyzed hydroxycarbonylation of aryl and vinyl bromides by mixed acetic formic anhydride. *Synthesis* **18**, 3106–3110.
- Bertini, I., C. Del Bianco, I. Gelis, N. Katsaros, C. Luchinat, G. Parigi, M. Peana, A. Provenzani, & M. A. Zoroddu (2004). Experimentally exploring the conformational space sampled by domain reorientation in calmodulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 6841–6846.
- Bertini, I., I. Gelis, N. Katsaros, C. Luchinat, & A. Provenzani (2003). Tuning the affinity for lanthanides of calcium binding proteins. *Biochemistry* **42**, 8011–8021.
- Bertini, I., M. B. L. Janik, Y. M. Lee, C. Luchinat, & A. Rosato (2001). Magnetic susceptibility tensor anisotropies for a lanthanide ion series in a fixed protein matrix. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 4181–4188.

- Bertini, I. & C. Luchinat (1999). New applications of paramagnetic NMR in chemical biology. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3**, 145–151.
- Bertini, I., C. Luchinat, & G. Parigi (2002). Magnetic susceptibility in paramagnetic NMR. *Prog. Nucl. Magn. Res. Spec.* **40**, 249–273.
- Bleaney, B. (1972). Nuclear magnetic resonance shifts in solution due to lanthanide ions. *J. Magn. Res.* **8**, 91–100.
- Bunnage, M. E., A. J. Burke, S. G. Davies, N. L. Millican, R. L. Nicholson, P. M. Roberts, & A. D. Smith (2003). Asymmetric synthesis of *anti*-(2*S*,3*S*)- and *syn*-(2*R*,3*S*)-diaminobutanoic acid. *Org. Biomol. Chem.* **1**, 3708–3715.
- Cacchi, S., G. Fabrizi, & A. Goggiamani (2003). Palladium-catalyzed hydroxycarbonylation of aryl and vinyl halides or triflates by acetic anhydride and formate anions. *Org. Lett.* **5**, 4269–4272.
- Chiu, F. C. K., R. T. C. Brownlee, K. Mitchell, & D. R. Phillips (1995). 9-Aminoacridine-EDTA conjugates as hydroxy radical footprinting reagents with no intrinsic cutting specificity. *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* **5**, 1689–1694.
- Cornilescu, G., J. L. Marquardt, M. Ottiger, & A. Bax (1998). Validation of protein structure from anisotropic carbonyl chemical shifts in a dilute liquid crystalline phase. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 6836–6837.
- Dalcanale, E. & F. Montanari (1986). Selective oxidation of aldehydes to carboxylic acids with sodium chlorite-hydrogen peroxide. *J. Org. Chem.* **51**, 567–569.
- Datwyler, S. A. & C. F. Meares (2000). Protein-protein interactions mapped by artificial proteases: where sigma factors bind to RNA polymerase. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 408–414.
- Delaglio, F., S. Grzesiek, G. W. Vuister, G. Zhu, J. Pfeifer, & A. Bax (1995). NMR-Pipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J. Biomol. NMR* **6**, 277–293.

- Dess, D. B. & J. C. Martin (1983). Readily accessible 12-I-5 oxidant for the conversion of primary and secondary alcohols to aldehydes and ketones. *J. Org. Chem.* **48**, 4155–4156.
- Djanashvili, K., C. Platas-Iglesias, & J. A. Peters (2008). The structure of the lanthanide aquo ions in solution as studied by  $^{17}\text{O}$  NMR spectroscopy and DFT calculations. *Dalton Trans.* **5**, 602–607.
- Dvoretzky, A., V. Gaponenko, & P. R. Rosevear (2002). Derivation of structural restraints using a thiol-reactive chelator. *FEBS Lett.* **528**, 189–192.
- Ebright, Y. W., Y. Chen, P. S. Pendergrast, & R. H. Ebright (1992). Incorporation of an EDTA-metal complex at a rationally selected site within a protein: application to EDTA-iron DNA affinity cleaving with catabolite gene activator protein (CAP) and Cro. *Biochemistry* **31**, 10664–10670.
- Ellman, G. L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* **82**, 70–77.
- Ermacora, M. R., J. M. Delfino, B. Cuenoud, A. Schepartz, & R. O. Fox (1992). Conformation-dependent cleavage of staphylococcal nuclease with a disulfide-linked iron chelate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **89**, 6383–6387.
- Evans, C. H. (1990). *Biochemistry of the lanthanides*. Plenum Press, New York, 1. Auflage.
- Franklin, S. J. & K. N. Raymond (1994). Solution structure and dynamics of lanthanide complexes of the macrocyclic polyamino carboxylate DTPA-dien. NMR study and crystal structures of the lanthanum(III) and europium(III) complexes. *Inorg. Chem.* **33**, 5794–5804.
- Franz, K. J., M. Nitz, & B. Imperiali (2003). Lanthanide-binding tags as versatile protein coexpression probes. *ChemBioChem.* **4**, 265–271.
- Gaponenko, V., A. S. Altieri, J. Li, & R. A. Byrd (2002). Breaking symmetry in the structure determination of (large) symmetric protein dimers. *J. Biomol. NMR* **24**, 143–148.

- Gaponenko, V., A. Dvoretzky, C. Walsby, B. M. Hoffman, & P. R. Rosevear (2000). Calculation of z-coordinates and orientational restraints using a metal binding tag. *Biochemistry* **39**, 15217–15224.
- Goddard, T. D. & D. G. Kneller (2008). Sparky 3. University of California, San Francisco.
- Griesinger, C., O. W. Sorensen, & R. Ernst (1987). Novel three-dimensional NMR techniques for studies of peptides and biological macromolecules. *J. Am. Chem. Soc.* **109**, 7227–7228.
- Gueron, M. (1975). Nuclear relaxation in macromolecules by paramagnetic ions: a novel mechanism. *J. Magn. Res.* **19**, 58–66.
- Haberz, P., J. Farjon, & C. Griesinger (2005). A DMSO-compatible orienting medium: towards the investigation of the stereochemistry of natural products. *Angew. Chem. Int. Ed.* **44**, 427–429.
- Haberz, P., F. Rodriguez-Castañeda, J. Junker, S. Becker, A. Leonov, & C. Griesinger (2006). Two new chiral EDTA-based metal chelates for weak alignment of proteins in solution. *Org. Lett.* **8**, 1275–1278.
- Hanessian, S. & P. Lavalley (1975). The preparation and synthetic utility of *tert*-butyldiphenylsilyl ethers. *Can. J. Chem.* **53**, 2975–2977.
- Hansen, M. R., L. Mueller, & A. Pardi (1998). Tunable alignment of macromolecules by filamentous phage yields dipolar coupling interactions. *Nat. Struct. Biol.* **5**, 1065–1074.
- Hart, T. W. (1985). Some observations concerning the *S*-nitroso and *S*-phenylsulphonyl derivatives of *L*-cysteine and glutathione. *Tetrahedron Lett.* **26**, 2013–2016.
- Häussinger, D., J. R. Huang, & S. Grzesiek (2009). DOTA-M8: An extremely rigid, high-affinity lanthanide chelating tag for PCS NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 14761–14767.

- Hellmann, K. W., S. Friedrich, L. H. Gade, W. S. Li, & M. McPartlin (1995). Tripodal Triamidostannates as building blocks in the generation of Sn-M-bonded heterobimetallics (M = Fe, Ru). *Chem. Ber.* **128**, 29–34.
- Hershko, A. & A. Ciechanover (1992). The ubiquitin system for protein degradation. *Annu. Rev. Biochem.* **61**, 761–807.
- Hershko, A. & A. Ciechanover (1998). The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 425–479.
- Hershko, A., A. Ciechanover, H. Heller, A. L. Haas, & I. A. Rose (1980). Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 1783–1786.
- Hudson, A. & J. W. E. Lewis (1970). Electron spin relaxation of  $^8S$  ions in solution. *Trans. Faraday Soc.* **66**, 1297–1301.
- Hus, J. C., D. Marion, & M. Blackledge (2000). *De novo* determination of protein structure by NMR using orientational and long-range order restraints. *J. Mol. Biol.* **298**, 927–936.
- Ikegami, T., L. Verdier, P. Sakhaii, S. Grimme, B. Pescatore, K. Saxena, K. M. Fiebig, & C. Griesinger (2004). Novel techniques for weak alignment of proteins in solution using chemical tags coordinating lanthanide ions. *J. Biomol. NMR* **29**, 339–349.
- Ikura, M., L. E. Kay, & A. Bax (1990). A novel approach for sequential assignment of  $^1H$ ,  $^{13}C$ , and  $^{15}N$  spectra of proteins: heteronuclear triple-resonance three-dimensional NMR spectroscopy. Application to calmodulin. *Biochemistry* **29**, 4659–4667.
- Keizers, P. H. J., J. F. Desreux, M. Overhand, & M. Ubbink (2007). Increased paramagnetic effect of a lanthanide protein probe by two-point attachment. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 9292–9293.

- Keizers, P. H. J., A. Saragliadis, Y. Hiruma, M. Overhand, & M. Ubbink (2008). Design, synthesis, and evaluation of a lanthanide chelating protein probe: CLaNP-5 yields predictable paramagnetic effects independent of environment. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 14802–14812.
- Keller, R. L. J. (2004). Optimizing the process of nuclear magnetic resonance spectrum analysis and computer aided resonance assignment. *Dissertation*, Swiss Federal Institute of Technology, Zürich.
- Kobzar, K., H. Kessler, & B. Luy (2005). Stretched gelatin gels as chiral alignment media for the discrimination of enantiomers by NMR spectroscopy. *Angew. Chem. Int. Ed.* **44**, 3145–3147.
- Kramer, F., M. V. Deshmukh, H. Kessler, & S. J. Glaser (2004). Residual dipolar coupling constants: an elementary derivation of key equations. *Concepts Magn. Res. Part A* **21 A**, 10–21.
- Kubota, Y., T. Hanaoka, K. Takeuchi, & Y. Sugi (1994). An efficient synthesis of aryl esters by palladium-catalyzed carbonylation of 4-bromobiphenyl. *Synlett* **7**, 515–517.
- Kummerlöwe, G., J. Auernheimer, A. Lendlein, & B. Luy (2007). Stretched poly(acrylonitrile) as a scalable alignment medium for DMSO. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 6080–6081.
- Kurland, R. J. & B. R. McGarvey (1970). Isotropic NMR shifts in transition metal complexes: the calculation of the fermi contact and pseudocontact terms. *J. Magn. Res.* **2**, 286–301.
- Lakomek, N. A., T. Carlomagno, S. Becker, C. Griesinger, & J. Meiler (2006). A thorough dynamic interpretation of residual dipolar couplings in ubiquitin. *J. Biomol. NMR* **34**, 101–115.
- Lakomek, N. A., O. F. Lange, K. F. A. Walter, C. Farès, D. Egger, P. Lunkenheimer, J. Meiler, H. Grubmüller, S. Becker, B. L. de Groot, & C. Griesinger (2008).

- Residual dipolar couplings as a tool to study molecular recognition of ubiquitin. *Biochem. Soc. Trans.* **36**, 1433–1437.
- Lakomek, N. A., K. F. A. Walter, C. Farès, O. F. Lange, B. L. de Groot, H. Grubmüller, R. Brüschweiler, A. Munk, S. Becker, J. Meiler, & C. Griesinger (2008). Self-consistent residual dipolar coupling based model-free analysis for the robust determination of nanosecond to microsecond protein dynamics. *J. Biomol. NMR* **41**, 139–155.
- Lange, O. F., N. A. Lakomek, C. Farès, G. F. Schröder, K. F. A. Walter, S. Becker, J. Meiler, H. Grubmüller, C. Griesinger, & B. L. de Groot (2008). Recognition dynamics up to microseconds revealed from an RDC-derived ubiquitin ensemble in solution. *Science* **320**, 1471–1475.
- Lazar, G. A., J. R. Desjarlais, & T. M. Handel (1997). De novo design of the hydrophobic core of ubiquitin. *Protein Sci.* **6**, 1167–1178.
- Lenz, R. & S. V. Ley (1997). Tetra-*N*-propylammonium perruthenate (TPAP)-catalysed oxidations of alcohols using molecular oxygen as a co-oxidant. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **18**, 3291–3292.
- Leonov, A., B. Voigt, F. Rodriguez-Castañeda, P. Sakhaii, & C. Griesinger (2005). Convenient synthesis of multifunctional EDTA-based chiral metal chelates substituted with an *S*-mesylcysteine. *Chemistry* **11**, 3342–3348.
- Ley, S. V., J. Norman, W. P. Griffith, & S. P. Marsden (1994). Tetrapropylammonium perruthenate,  $\text{Pr}_4\text{N}^+ \text{RuO}_4^-$ , TPAP: a catalytic oxidant for organic synthesis. *Synthesis* **7**, 639–666.
- Liang, B., J. H. Bushweller, & L. K. Tamm (2006). Site-directed parallel spin-labeling and paramagnetic relaxation enhancement in structure determination of membrane proteins by solution NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 4389–4397.

- Lindfors, H. E., P. E. de Koning, J. W. Drijfhout, B. Venezia, & M. Ubbink (2008). Mobility of TOAC spin-labelled peptides binding to the Src SH3 domain studied by paramagnetic NMR. *J. Biomol. NMR* **41**, 157–167.
- Losonczi, J. A., M. Andrec, M. W. F. Fischer, & J. H. Prestegard (1999). Order matrix analysis of residual dipolar couplings using singular value decomposition. *J. Magn. Reson.* **138**, 334–342.
- Man, B., X. C. Su, H. Liang, S. Simonsen, T. Huber, B. A. Messerle, & G. Otting (2010). 3-Mercapto-2,6-pyridinedicarboxylic acid: a small lanthanide-binding tag for protein studies by NMR spectroscopy. *Chem. Eur. J.* **16**, 3827–3832.
- Mancuso, A. J., S. L. Huang, & D. Swern (1978). Oxidation of long-chain and related alcohols to carbonyls by dimethyl sulfoxide activated by oxalyl chloride. *J. Org. Chem.* **43**, 2480–2482.
- Martin, L. J., M. J. Hähnke, M. Nitz, J. Wöhnert, N. R. Silvaggi, K. N. Allen, H. Schwalbe, & B. Imperiali (2007). Double-lanthanide-binding tags: design, photophysical properties, and NMR applications. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 7106–7113.
- Marx, A. & C. Thiele (2009). Orientational properties of poly-gamma-benzyl-L-glutamate: influence of molecular weight and solvent on order parameters of the solute. *Chemistry* **15**, 254–260.
- McConnell, H. M. & R. E. Robertson (1958). Isotropic nuclear resonance shifts. *J. Chem. Phys.* **29**, 1361–1365.
- McGarvey, B. R. (1979). Temperature dependence of the pseudocontact shift in lanthanide shift reagents. *J. Magn. Res.* **33**, 445–455.
- Meiler, J., W. Peti, & C. Griesinger (2003). Dipolar couplings in multiple alignments suggest  $\alpha$  helical motion in ubiquitin. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 8072–8073.
- Nitz, M., K. J. Franz, R. L. Maglathlin, & B. Imperiali (2003). A powerful combinatorial screen to identify high-affinity terbium(III)-binding peptides. *ChemBioChem.* **4**, 272–276.



- Nitz, M., M. Sherawat, K. J. Franz, E. Peisach, K. N. Allen, & B. Imperiali (2004). Structural origin of the high affinity of a chemically evolved lanthanide-binding peptide. *Angew. Chem. Int. Ed.* **43**, 3682–3685.
- Oschkinat, H., C. Griesinger, P. J. Kraulis, O. W. Sorensen, R. R. Ernst, A. M. Gronenborn, & G. M. Clore (1988). Three-dimensional NMR spectroscopy of a protein in solution. *Nature* **332**, 374–376.
- Ottiger, M., F. Delaglio, & A. Bax (1998). Measurement of  $J$  and dipolar couplings from simplified two-dimensional NMR spectra. *J. Magn. Reson.* **131**, 373–378.
- Ottiger, M., F. Delaglio, J. L. Marquardt, N. Tjandra, & A. Bax (1998). Measurement of dipolar couplings for methylene and methyl sites in weakly oriented macromolecules and their use in structure determination. *J. Magn. Reson.* **134**, 365–369.
- Otting, G. (2008). Prospects for lanthanides in structural biology by NMR. *J. Biomol. NMR* **42**, 1–9.
- Otting, G. (2010). Protein NMR using paramagnetic ions. *Annu. Rev. Biophys.* **39**, 387–405.
- Peti, W., J. Meiler, R. Brüschweiler, & C. Griesinger (2002). Model-free analysis of protein backbone motion from residual dipolar couplings. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 5822–5833.
- Pihko, A. J., K. C. Nicolaou, & A. M. P. Koskinen (2001). An expedient synthesis of D-callipeltose. *Tetrahedron Asym.* **12**, 937–942.
- Pintacuda, G., M. John, X. C. Su, & G. Otting (2007). NMR structure determination of protein-ligand complexes by lanthanide labeling. *Acc. Chem. Res.* **40**, 206–212.
- Pintacuda, G., M. A. Keniry, T. Huber, A. Y. Park, N. E. Dixon, & G. Otting (2004). Fast structure-based assignment of  $^{15}\text{N}$  HSQC spectra of selectively  $^{15}\text{N}$ -labeled paramagnetic proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 2963–2970.

- Pintacuda, G., A. Moshref, A. Leonchiks, A. Sharipo, & G. Otting (2004). Site-specific labelling with a metal chelator for protein-structure refinement. *J. Biomol. NMR* **29**, 351–361.
- Pintacuda, G., A. Y. Park, M. A. Keniry, N. E. Dixon, & G. Otting (2006). Lanthanide labeling offers fast NMR approach to 3D structure determinations of protein-protein complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 3696–3702.
- Polasek, M., J. Rudovsky, P. Hermann, I. Lukes, L. V. Elst, & R. N. Muller (2004). Lanthanide(III) complexes of a pyridine *N*-oxide analogue of DOTA: exclusive *M* isomer formation induced by a six-membered chelate ring. *Chem. Commun.* **22**, 2602–2603.
- Prestegard, J. H., H. M. Al-Hashimi, & J. R. Tolman (2000). NMR structures of biomolecules using field oriented media and residual dipolar couplings. *Q. Rev. Biophys.* **33**, 371–424.
- Prudêncio, M., J. Rohovec, J. A. Peters, E. Tocheva, M. J. Boulanger, M. E. P. Murphy, H. J. Hupkes, W. Kisters, A. Impagliazzo, & M. Ubbink (2004). A caged lanthanide complex as a paramagnetic shift agent for protein NMR. *Chem. Eur. J.* **10**, 3252–3260.
- Raach, A. & O. Reiser (2000). Sodium chlorite-hydrogen peroxide - a mild and selective reagent for the oxidation of aldehydes to carboxylic acids. *J. Prakt. Chem.* **342**, 605–608.
- Ranganathan, R. S., R. K. Pillai, N. Raju, H. Fan, H. Nguyen, M. F. Tweedle, J. F. Desreux, & V. Jacques (2002). Polymethylated DOTA ligands. 1. Synthesis of rigidified ligands and studies on the effects of alkyl substitution on acid-base properties and conformational mobility. *Inorg. Chem.* **41**, 6846–6855.
- Ranganathan, R. S., N. Raju, H. Fan, X. Zhang, M. F. Tweedle, J. F. Desreux, & V. Jacques (2002). Polymethylated DOTA ligands. 2. Synthesis of rigidified lanthanide chelates and studies on the effect of alkyl substitution on conformational mobility and relaxivity. *Inorg. Chem.* **41**, 6856–6866.

- Rodriguez-Castañeda, F., P. Haberz, A. Leonov, & C. Griesinger (2006). Paramagnetic tagging of diamagnetic proteins for solution NMR. *Magn. Reson. Chem.* **44**, 10–16.
- Rückert, M. & G. Otting (2000). Alignment of biological macromolecules in novel nonionic liquid crystalline media for NMR experiments. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 7793–7797.
- Rye, C. S. & S. G. Withers (2002). Synthesis and evaluation of potential inhibitors of chondroitin AC lyase from *flavobacterium heparinum*. *J. Org. Chem.* **67**, 4505–4512.
- Saito, S., H. Nakajima, M. Inaba, & T. Moriwake (1989). One-pot transformation of azido-group to *N*-(*t*-butoxycarbonyl)amino group. *Tetrahedron Lett.* **30**, 837–838.
- Sanders, C. R., B. J. Hare, K. P. Howard, & J. H. Prestegard (1994). Magnetically-oriented phospholipid micelles as a tool for the study of membrane-associated molecules. *Prog. NMR Spect.* **26**, 421–444.
- Sanders, 2nd, C. R. & J. H. Prestegard (1990). Magnetically orientable phospholipid bilayers containing small amounts of a bile salt analogue, CHAPSO. *Biophys. J.* **58**, 447–460.
- Sanders, J. K. M. & D. H. Williams (1970). A shift reagent for use in nuclear magnetic resonance spectroscopy. A first-order spectrum of *n*-hexanol. *Chem. Commun* **7**, 422–423.
- Saupe, A. (1968). Recent results in the field of liquid crystals. *Angew. Chem. Int. Ed.* **7**, 97–112.
- Schmitt, J., H. Hess, & H. G. Stunnenberg (1993). Affinity purification of histidine-tagged proteins. *Mol. Biol. Rep.* **18**, 223–230.
- Shimomura, O., F. H. Johnson, & Y. Saiga (1962). Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J. Cell. Comp. Physiol.* **59**, 223–239.

- Sieber, P. (1977). Der 2-Trimethylsilyläthyl-Rest als selektiv abspaltbare Carboxy-Schutzgruppe. *Helv. Chim. Acta* **60**, 2711–2716.
- Sigl, A. & H. Sigl (2003). *Metal ions in biological systems*. 40, Marcel Dekker, Inc, Basel, 1. Auflage.
- Staudinger, H. & J. Meyer (1919). Über neue organische Phosphorverbindungen III. Phosphinmethylenderivate und Phosphinimine. *J. Helv. Chim. Acta* **2**, 635–646.
- Su, X. C., T. Huber, N. E. Dixon, & G. Otting (2006). Site-specific labelling of proteins with a rigid lanthanide-binding tag. *ChemBioChem*. **7**, 1599–1604.
- Su, X. C., H. Liang, K. V. Loscha, & G. Otting (2009).  $[\text{Ln}(\text{DPA})_3]^{3-}$  is a convenient paramagnetic shift reagent for protein NMR studies. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 10352–10353.
- Su, X. C., B. Man, S. Beeren, H. Liang, S. Simonsen, C. Schmitz, T. Huber, B. A. Messerle, & G. Otting (2008). A dipicolinic acid tag for rigid lanthanide tagging of proteins and paramagnetic NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 10486–10487.
- Su, X. C., K. McAndrew, T. Huber, & G. Otting (2008). Lanthanide-binding peptides for NMR measurements of residual dipolar couplings and paramagnetic effects from multiple angles. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 1681–1687.
- Su, X. C. & G. Otting (2010). Paramagnetic labelling of proteins and oligonucleotides for NMR. *J. Biomol. NMR*. **46**, 101–112.
- Thiele, C. M. & S. Berger (2003). Probing the diastereotopicity of methylene protons in strychnine using residual dipolar couplings. *Org. Lett.* **5**, 705–708.
- Tolman, J. R., J. M. Flanagan, M. A. Kennedy, & J. H. Prestegard (1995). Nuclear magnetic dipole interactions in field-oriented proteins: information for structure determination in solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 9279–9283.
- Tsien, R. Y. (1998). The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 509–544.

- Tüchelmann, A., H. Schwalbe, & C. Griesinger (1998). Third European Conference Oxford, Stable Isotope aided NMR of Biomolecules. *Poster*.
- Tycko, R., F. J. Blanco, & Y. Ishii (2000). Alignment of biopolymers in strained gels: A new way to create detectable dipole-dipole couplings in high-resolution biomolecular NMR. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 9340–9341.
- Viguier, R., G. Serratrice, A. Dupraz, & C. Dupuy (2001). New poly podal polycarboxylic ligands - complexation of rare-earth ions in aqueous solution. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2001**, 1789–1795.
- Vlasie, M. D., C. Comuzzi, A. M. C. H. van den Nieuwendijk, M. Prudêncio, M. Overhand, & M. Ubbink (2007). Long-range-distance NMR effects in a protein labeled with a lanthanide-DOTA chelate. *Chem. Eur. J.* **13**, 1715–1723.
- Weidner, J. P. & S. S. Block (1972). Mixed thiosulfonates and sulfonamides from polyfunctional mercaptans using trifluoromethyl thiosulfonates. *J. Med. Chem.* **15**, 564–567.
- Wöhnert, J., K. J. Franz, M. Nitz, B. Imperiali, & H. Schwalbe (2003). Protein alignment by a coexpressed lanthanide-binding tag for the measurement of residual dipolar couplings. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 13338–13339.
- Wöltjen, E. (2009). *Paramagnetisch markierte Oligonukleotide*. Dissertation, Georg-August-Universität Göttingen.
- Xu, X., P. H. J. Keizers, W. Reinle, F. Hannemann, R. Bernhardt, & M. Ubbink (2009). Intermolecular dynamics studied by paramagnetic tagging. *J. Biomol. NMR* **43**, 247–254.
- Xu, X., W. Reinle, F. Hannemann, P. V. Konarev, D. I. Svergun, R. Bernhardt, & M. Ubbink (2008). Dynamics in a pure encounter complex of two proteins studied by solution scattering and paramagnetic NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 6395–6403.

- Yokoyama, H., H. Ejiri, M. Miyazawa, S. Yamaguchi, & Y. Hirai (2007). Asymmetric synthesis of fagomine. *Tetrahedron Assym.* **18**, 852–856.
- You, J., R. E. Cohen, & C. M. Pickart (1999). Construct for high-level expression and low misincorporation of lysine for arginine during expression of pET-encoded eukaryotic proteins in *Escherichia coli*. *Biotechniques* **27**, 950–954.
- Zweckstetter, M. (2008). NMR: prediction of molecular alignment from structure using the PALES software. *Nat. Protoc.* **3**, 679–690.
- Zweckstetter, M. & A. Bax (2000). Prediction of sterically induced alignment in a dilute liquid crystalline phase: aid to protein structure determination by NMR. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 3791–3792.



# Abbildungsverzeichnis

1	Cys-Ph-TAHA. . . . .	v
1.1	Schematische Darstellung von Ubiquitin . . . . .	3
1.2	Histogramme der Literaturstellen mit dem Thema „Ubiquitin“ . . . . .	4
1.3	MTSSL-Tag zur paramagnetischen Markierung von Proteinen. . . . .	5
1.4	Schematische Darstellung der Ausrichtung paramagnetischer Moleküle entlang des Magnetfeldes . . . . .	6
2.1	Definition des Winkels $\theta$ zwischen dem Interspinvektor $\vec{R}$ und dem Vektor des statischen Magnetfeldes $\vec{B}$ . . . . .	10
2.2	Darstellung der molekularen Reorientierung im Laborkoordinatensystem und im Molekülkoordinatensystem . . . . .	12
2.3	Graphische Darstellung des Wahrscheinlichkeitstensors $\mathbf{P}$ im Molekülkoordinatensystem . . . . .	14
2.4	Graphische Darstellung verschiedener Alignmenttensoren . . . . .	15
2.5	Definition der Polarwinkel $\vartheta$ und $\varphi$ für einen beliebigen internuklearen Vektor $\vec{R}$ im Koordinatensystem des $\chi$ -Tensors. . . . .	16
2.6	Definition der Polarwinkel $\Theta$ und $\Phi$ im Koordinatensystem des $\chi$ -Tensors . . . . .	20
2.7	Darstellung der PCSs-Isoflächen . . . . .	21
2.8	Experimenteller und berechneter Verlauf der $\Delta\chi_{ax}$ -Werte für die Reihe der Lanthanoide . . . . .	22
3.1	<i>S</i> -(2-Pyridylthio)cysteaminyl-EDTA . . . . .	25
3.2	Übersicht der EDTA-basierten Tags . . . . .	26



3.3	Schematische Darstellung der diastereomeren Komplexbildung, ausgehend vom achiralen EDTA-Derivat . . . . .	27
3.4	<i>Points-on-a-sphere</i> -Modell der beiden enantiomeren DTPA-Konformationen im Lanthanoidkomplex . . . . .	28
3.5	Der DTPA-basierte CLaNP-1-Tag . . . . .	28
3.6	Die DOTA-basierten Tags CLaNP-3 und CLaNP-5 . . . . .	29
3.7	Der DOTA-basierte DOTA-M8-Tag . . . . .	30
3.8	Übersicht über die DPA-basierten Tags . . . . .	31
3.9	Ellman's Reagenz DTNB zur Verknüpfung thiolhaltiger Verbindungen an Cysteinseitenketten . . . . .	32
3.10	Struktur der TAHA-Liganden. . . . .	34
4.1	Zielmolekül der ersten Synthesen: Cys-TAHA. . . . .	37
4.2	Syntheseansatz ausgehend von Pentaerythrit. . . . .	39
4.3	Erster Syntheseansatz ausgehend von Pentaerythritol-tribromid . . . . .	40
4.4	Zweiter Syntheseansatz ausgehend von Pentaerythritol-tribromid . . . . .	42
4.5	Strukturvorhersage von <b>7</b> . . . . .	43
4.6	Mechanismus der Fragmentierung von <b>18</b> zum Acrylat . . . . .	44
4.7	Dritter Syntheseansatz ausgehend von Pentaerythritol-tribromid . . . . .	45
4.8	Neues Zielmolekül Cys-Ph-TAHA . . . . .	46
4.9	Syntheschema von Cys-Ph-TAHA . . . . .	47
4.10	Reaktionsschema der Hydroxycarbonylierung . . . . .	48
4.11	Chromatogramm von HPLC-gereinigtem Cys-Ph-TAHA . . . . .	49
4.12	Massenspektrum von <sup>15</sup> N-markiertem T12C Tm . . . . .	51
4.13	Massenspektrum von <sup>13</sup> C, <sup>15</sup> N-markiertem S57C Tb . . . . .	52
4.14	Vergleich der <sup>1</sup> H-Spektren von Cys-Ph-TAHA-getaggttem T12C, beladen mit Lu <sup>3+</sup> und Tm <sup>3+</sup> . . . . .	53
4.15	Überlagerung der <sup>1</sup> H, <sup>15</sup> N-HSQC-Spektren von ungetaggttem S57C und S57C Lu . . . . .	54
5.1	Überlagerung der <sup>1</sup> H, <sup>15</sup> N-HSQC-Spektren von T12C Tb und T12C Lu . . . . .	56
5.2	Überlagerung der <sup>1</sup> H, <sup>15</sup> N-HSQC-Spektren von T12C Tm und T12C Lu . . . . .	57

5.3	Darstellung der Aminosäurereste, deren Signale bei T12C Tb durch PRE nicht mehr detektierbar waren . . . . .	58
5.4	Auftragungen der experimentellen und berechneten PCSs von T12C Tb und T12C Tm gegen die Aminosäurereste . . . . .	59
5.5	Schematische Darstellung der berechneten Metallpositionen von Tb <sup>3+</sup> und Tm <sup>3+</sup> zusammen mit der T12C-Struktur . . . . .	60
5.6	Überlagerung der <sup>1</sup> H, <sup>15</sup> N-HSQC-Spektren von S57C Tb und S57C Lu	62
5.7	Überlagerung der <sup>1</sup> H, <sup>15</sup> N-HSQC-Spektren von S57C Tm und S57C Lu	63
5.8	Darstellung der Aminosäurereste, deren Signale bei S57C Tm durch PRE nicht mehr detektierbar waren . . . . .	64
5.9	Schematische Darstellung der berechneten Metallpositionen von Tb <sup>3+</sup> und Tm <sup>3+</sup> zusammen mit der S57C-Struktur . . . . .	65
5.10	Auftragungen der experimentellen und berechneten PCSs von S57C Tb und S57C Tm gegen die Aminosäurereste . . . . .	66
5.11	Ausschnitte aus den <sup>1</sup> H, <sup>15</sup> N-HSQC-Spektren von T12C Tm bei verschiedenen Temperaturen auf einem niedrigen Contourlevel . . . . .	68
5.12	Ausschnitt aus den überlagerten <sup>1</sup> H, <sup>15</sup> N-HSQC-Spektren von T12C Tm bei verschiedenen Temperaturen (278 K–315 K) . . . . .	71
5.13	Darstellung der berechneten Metallpositionen in T12C Tm bei unterschiedlichen Temperaturen . . . . .	72
5.14	Auftragungen der experimentellen PCSs von T12C Tm gegen die Aminosäurereste bei verschiedenen Temperaturen . . . . .	73
5.15	Ausschnitt des IPAP-HSQC-Spektrums von T12C Tb . . . . .	74
5.16	Auftragung der experimentellen gegen die berechneten RDCs . . . . .	77
5.17	T12C Tb: Vergleich der PCS- und RDC-abgeleiteten Tensoren . . . . .	79
5.18	Schematischer Vergleich zwischen PCSs und RDCs: Vergleich der Metall-Kern-Vektoren und Interspinvektoren . . . . .	80
5.19	Korrelationsdiagramm der experimentellen PCSs, aufgetragen gegen die im RDC-Tensor zurück berechneten Werte . . . . .	82
5.20	Korrelationsdiagramm der experimentellen RDCs, aufgetragen gegen die im PCS-Tensor zurück berechneten Werte . . . . .	83

5.21	Berechnete Metallpositionen aus den PCSs für T12C Tb, T12C Tm, sowie aus der gleichzeitigen Minimierung von PCSs und RDCs . . . . .	86
5.22	T12C Tb: Darstellung der Metall-Kern-Vektoren der PCSs als Vek- torschar, sowie deren Verteilungen auf einer Kugeloberfläche . . . . .	87
5.23	Vergleich der RDC-Tensoren mit den neu berechneten PCS-Tensoren	88
5.24	Korrelationsdiagramm der experimentellen $^1\text{H}$ - und $^{15}\text{N}$ -PCSs beider Cys-Ph-TAHA-getaggtten Ubiquitinmutanten, aufgetragen gegen die mit den RDCs zusammen berechneten Werte . . . . .	90
5.25	Korrelationsdiagramm der experimentellen RDCs beider Cys-Ph-TAHA- getaggtten Ubiquitinmutanten, aufgetragen gegen die mit den PCSs zusammen berechneten Werte . . . . .	91
5.26	Auftragungen der Saupematrixelemente von T12C Tb und T12C Tm, die aus den unterschiedlichen Tensorberechnungen erhalten wurden .	93
6.1	Schematische Darstellung der Korrelationen im HNCA . . . . .	101
6.2	Schematische Darstellung der Prozessierung des IPAP-HSQC . . . . .	102
6.3	Gradient der HPLC-Trennung von Cys-Ph-TAHA . . . . .	114
7.1	$^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum der isotropen Referenzprobe T12C Lu . . . . .	144
7.2	$^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum der isotropen Referenzprobe S57C Lu . . . . .	145
7.3	Berechnete Metallpositionen aus den PCSs für S57C Tb und S57C Tm, sowie aus der gleichzeitigen Minimierung von PCSs und RDCs . . . . .	146
7.4	T12C Tb: Darstellung der erhaltenen Tensoren . . . . .	147
7.5	T12C Tm: Darstellung der erhaltenen Tensoren . . . . .	148
7.6	S57C Tb: Darstellung der erhaltenen Tensoren . . . . .	149
7.7	S57C Tm: Darstellung der erhaltenen Tensoren . . . . .	150

# Tabellenverzeichnis

3.1	Wassermoleküle in der inneren Koordinationssphäre des TAHA Liganden . . . . .	35
5.1	Zusammenfassung der Ergebnisse der PCS Analysen . . . . .	67
5.2	T12C Tm: Bestimmung der prozentualen Verteilungen der Peakintensitäten bei verschiedenen Temperaturen . . . . .	69
5.3	Zusammenfassung der Ergebnisse der RDC Analysen . . . . .	76
5.4	Übersicht über die berechneten Tensoren aus den PCSs und RDCs der vier anisotropen Proben . . . . .	79
5.5	Ergebnisse der Berechnungen der PCSs im RDC-Tensor, sowie der Berechnung der RDCs im PCS-Tensor . . . . .	81
5.6	Übersicht über die erhaltenen Tensoren . . . . .	85
5.7	Übersicht über die Mittelwerte und Standardabweichungen der Saupematrixelemente von T12C Tb und T12C Tm, die aus 100 Berechnungen mit jeweils 80% der Daten erhalten wurden . . . . .	92
7.1	Übersicht der 20 Standardamino-säuren im Drei- und Einbuchstabenkode. . . . .	143
7.2	$^1\text{H}$ - und $^{15}\text{N}$ -PCS von T12C Tb . . . . .	151
7.3	$^1\text{H}$ - und $^{15}\text{N}$ -PCS von T12C Tm . . . . .	153
7.4	$^1\text{H}$ - und $^{15}\text{N}$ -PCS von S57C Tb . . . . .	155
7.5	$^1\text{H}$ - und $^{15}\text{N}$ -PCS von S57C Tm . . . . .	157
7.6	Chemische Verschiebungen in $^1\text{H}$ und $^{15}\text{N}$ der Hauptpeaks und zusätzlichen Signalsätze von zehn Aminosäureresten bei verschiedenen Temperaturen . . . . .	159

7.7	Prozentuale Verteilungen der Hauptpeaks und der zusätzlichen Signalsätze von zehn Aminosäureresten bei verschiedenen Temperaturen	161
7.8	T12C Lu: Chemische Verschiebungen ( $^1\text{H}$ und $^{15}\text{N}$ ) der Amidsignale des Proteinerückgrats bei unterschiedlichen Temperaturen . . . . .	163
7.9	T12C Tm: Chemische Verschiebungen ( $^1\text{H}$ und $^{15}\text{N}$ ) der Amidsignale des Proteinerückgrats bei unterschiedlichen Temperaturen . . . . .	165
7.10	T12C Tm: PCSs ( $^1\text{H}$ und $^{15}\text{N}$ ) der Amidsignale des Proteinerückgrats in Abhängigkeit von der Temperatur . . . . .	167
7.11	T12C: $^1J$ N-H Kopplungen des Proteinerückgrats der isotropen und anisotropen Proben und deren experimentelle und zurück berechnete RDCs . . . . .	169
7.12	S57C: $^1J$ N-H Kopplungen des Proteinerückgrats der isotropen und anisotropen Proben und deren experimentelle und zurück berechnete RDCs . . . . .	171
7.13	$^1\text{H},^{15}\text{N}$ -PCS von T12C Tb und T12C Tm, berechnet im RDC-Tensor und deren Abweichungen $\Delta$ von den experimentellen Werten . . . . .	173
7.14	$^1\text{H},^{15}\text{N}$ -PCS von S57C Tb und S57C Tm, berechnet im RDC-Tensor und deren Abweichungen $\Delta$ von den experimentellen Werten . . . . .	175
7.15	Werte der im jeweiligen PCS-Tensor berechneten RDCs und deren Differenz $\Delta$ zum experimentellen RDC der vier anisotropen Proben .	177
7.16	Übersicht über die Saupe-Matrixelemente der anisotropen Proben . .	179
7.17	$^1\text{H},^{15}\text{N}$ -PCS von T12C Tb und T12C Tm, zusammen mit den RDCs minimiert, sowie deren Abweichungen $\Delta$ von den experimentellen Werten . . . . .	180
7.18	$^1\text{H},^{15}\text{N}$ -PCS von S57C Tb und S57C Tm, zusammen mit den RDCs minimiert, sowie deren Abweichungen $\Delta$ von den experimentellen Werten . . . . .	182
7.19	Werte der berechneten RDCs, zusammen mit den PCSs minimiert, sowie deren Differenz $\Delta$ zu den experimentellen Werten aller vier anisotropen Proben . . . . .	184

# Abkürzungsverzeichnis

3MDPA	3-Mercaptopyridin-2,6-dicarbonsäure
4MMDPA	4-(Mercaptomethyl)pyridin-2,6-dicarbonsäure
abs.	absolut
Äq.	Äquivalente
AS	Aminosäure
ber.	berechnet
Bn	Benzyl
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
br	breit
CLaNP	Caged Lanthanide NMR Probe
COSY	Correlation Spectroscopy
Cys-Ph-TAHA	Cysteinyl-Phenyl-TAHA
Cys-TAHA	Cysteinyl-TAHA
d	Dublett
DNA	2'-Desoxyribonukleinsäure
DC	Dünnschichtchromatographie
DIPEA	Diisopropylethylamin
DIS	Dysprosium Induced Shift
DMAP	4-(Dimethylamino)-pyridin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOTA	1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure
DPA	Dipicolinsäure
dppf	1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocen
DTNB	5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure)
DTPA	Diethylentriaminpentaessigsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

EROS	Ensemble Refinement with Orientational Restraints
ESI-MS	Elektrospray Ionisation Mass Spectrometry
ESR	Elektronenspinresonanz
Et-TAHA	Ethyl-TAHA
exp.	experimentell
gef.	gefunden
GFP	Green Fluorescent Protein
HATU	<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium-Hexafluorophosphat
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
IPAP	In-phase/ Antiphase
LC-MS	Liquid Chromatography-Mass Spectrometry
MAS	Magic Angle Spinning
MOPS	3-( <i>N</i> -Morpholino)propansulfonsäure
MTSSL	(1-Oxyl-2,2,5,5-tetramethyl-1 <i>H</i> -3-pyrrolin-3-methyl)methanthio-sulfonat Spin Label
MWCO	Molecular Weight Cutoff
neg.	negativ
NMO	<i>N</i> -Methylmorpholin- <i>N</i> -oxid
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
NTA	Nitrilotriessigsäure
p.a.	pro analysis
PCS	Pseudocontact Shift
PDB	Protein Data Bank
PES	Polyethersulfon
Ph-TAHA	Phenyl-TAHA
pos.	positiv
PRE	Paramagnetic Relaxation Enhancement

q	Quartett
rcf	Relative Centrifugal Force
RDC	Residual Dipolar Coupling
RNA	Ribonukleinsäure
s	Singulett
S57C	Ubiquitinmutante Serin57 → Cystein57
S57C Lu	S57C getaggt mit Cys-Ph-TAHA, beladen mit Lu <sup>3+</sup>
S57C Tb	S57C getaggt mit Cys-Ph-TAHA, beladen mit Tb <sup>3+</sup>
S57C Tm	S57C getaggt mit Cys-Ph-TAHA, beladen mit Tm <sup>3+</sup>
t	Triplett
T12C	Ubiquitinmutante Threonin12 → Cystein12
T12C Lu	T12C getaggt mit Cys-Ph-TAHA, beladen mit Lu <sup>3+</sup>
T12C Tb	T12C getaggt mit Cys-Ph-TAHA, beladen mit Tb <sup>3+</sup>
T12C Tm	T12C getaggt mit Cys-Ph-TAHA, beladen mit Tm <sup>3+</sup>
TAHA	Triaminohexaacetat
TAME-Hex	Tris(aminomethyl)ethan- <i>N,N,N',N',N'',N''</i> -hexaessigsäure
TBAF	Tetra- <i>N</i> -butylammoniumfluorid
TBDPS-Cl	<i>tert</i> -Butyldiphenylsilylethanol
TCEP	Phosphorsäure-tris(2-chlorethyl)ester
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TMSE	Trimethylsilylethanol
Tos	Tosyl
TPAP	Tetra- <i>N</i> -propylammoniumperruthenat
TPPI	Time Proportional Phase Increment



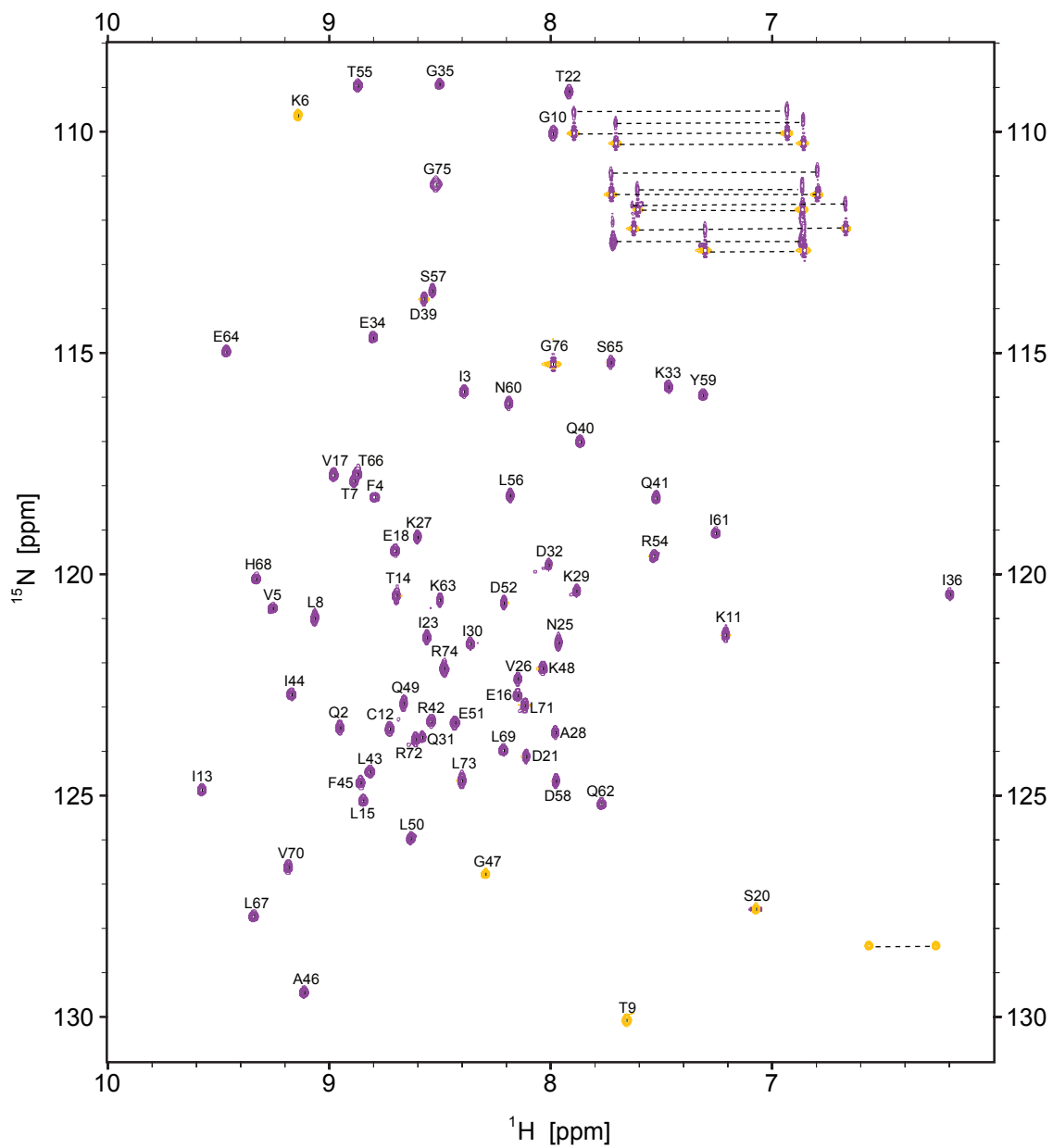


# Kapitel 7

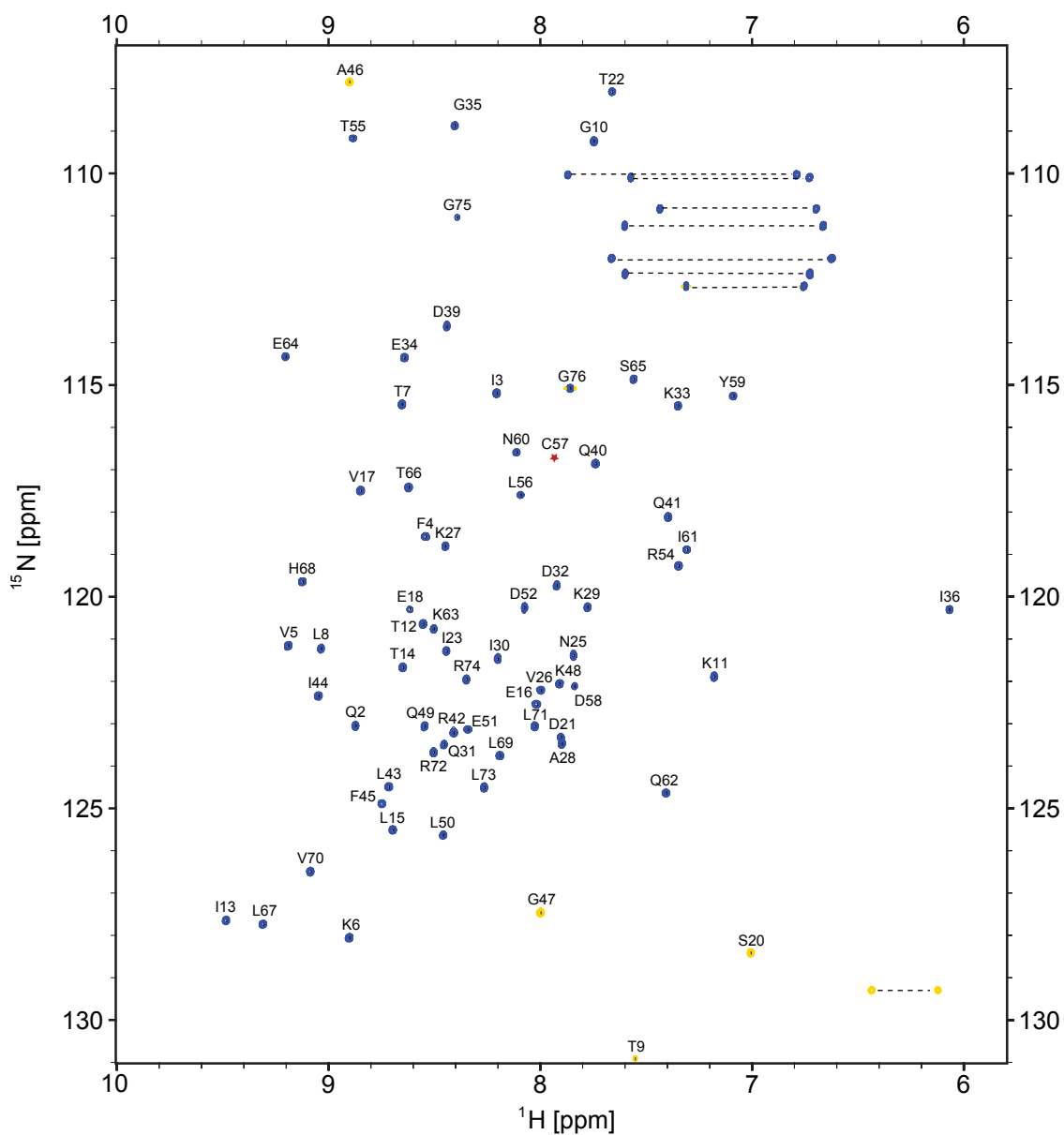
## Anhang

**Tab. 7.1:** Übersicht der 20 Standardamino­säuren im Drei- und Einbuchstaben­kode.

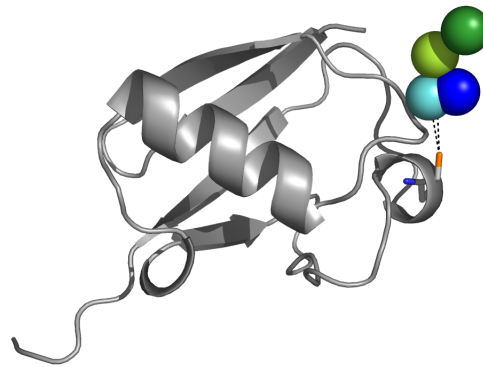
Aminosäure	Dreibuchstaben­kode	Einbuchstaben­kode
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Aspartat	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutamat	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan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



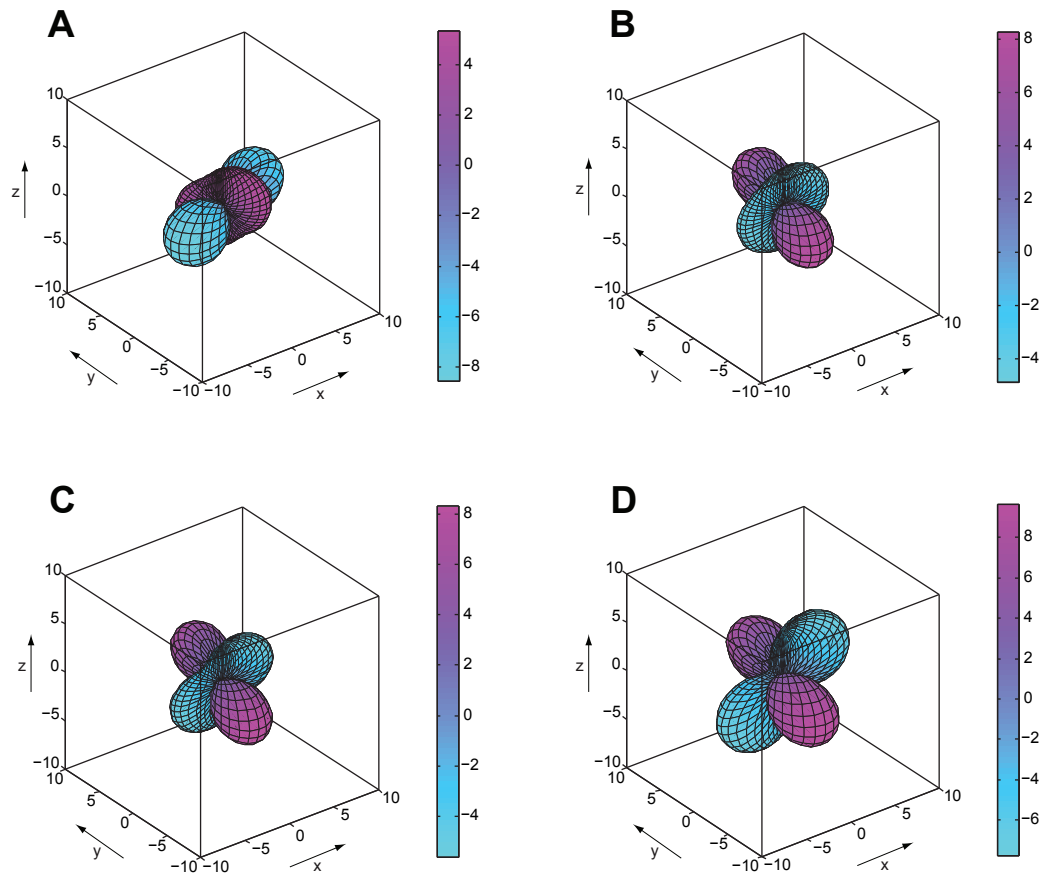
**Abb. 7.1:**  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum der isotropen Referenzprobe der T12C-Mutante, beladen mit  $\text{Lu}^{3+}$  (violett). Gefaltete Peaks (States-TPPI) sind orange dargestellt. Signale von Seitenketten sind durch unterbrochene Linien angezeigt. Eine vollständige Liste der chemischen Verschiebungen ist in der Tabelle 7.2 angegeben.



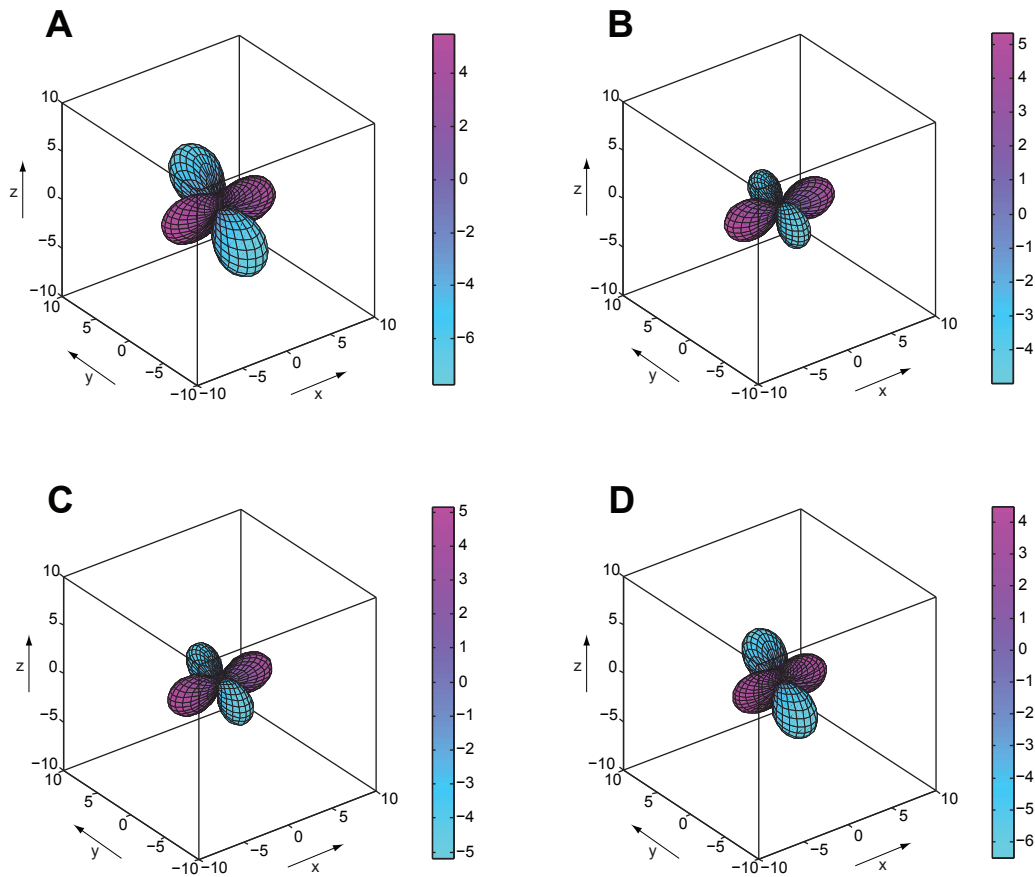
**Abb. 7.2:**  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum der isotropen Referenzprobe der S57C-Mutante, beladen mit  $\text{Lu}^{3+}$  (blau). Gefaltete Peaks (States-TPPI) sind gelb dargestellt. Der Peak von C57 ist schwach und durch einen roten Stern angedeutet. Signale von Seitenketten sind durch unterbrochene Linien angezeigt. Eine vollständige Liste der chemischen Verschiebungen ist in der Tabelle 7.4 angegeben.



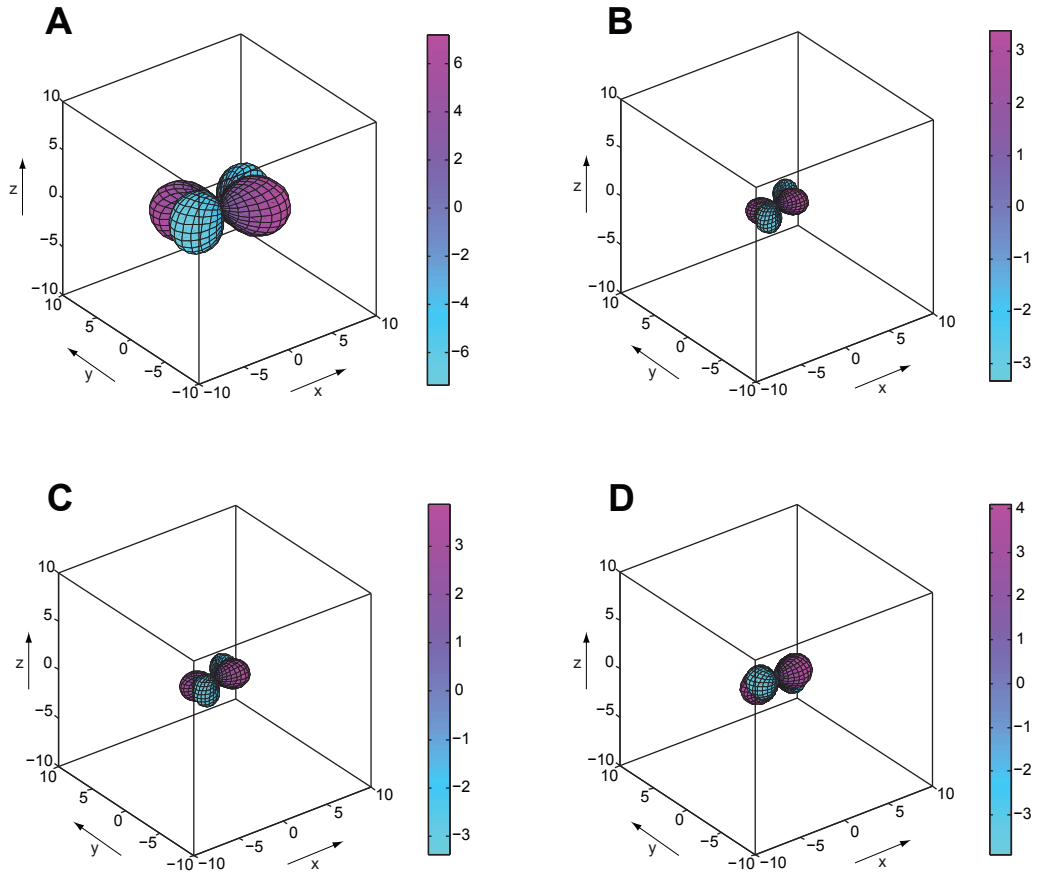
**Abb. 7.3:** Darstellung der Metallpositionen, berechnet aus den PCSs für S57C Tb (dunkelgrün) und S57C Tm (dunkelblau), sowie aus der gleichzeitigen Minimierung von PCSs und RDCs: S57C Tb (hellgrün), S57C Tm (hellblau).



**Abb. 7.4:** T12C Tb: Darstellung der erhaltenen Tensoren [ $10^{-4}$ ]. Die Tensoren sind wie folgt zugeordnet: PCS-Tensor (A), RDC-Tensor (B), Tensor der gleichzeitigen Minimierung von PCSs und RDCs (C), Tensor auf Basis der RDC-abgeleiteten Metallposition mit anschließender Minimierung der PCSs (D). Die zu Grunde liegenden Werte finden sich in den Tabellen 5.6 und 7.16.

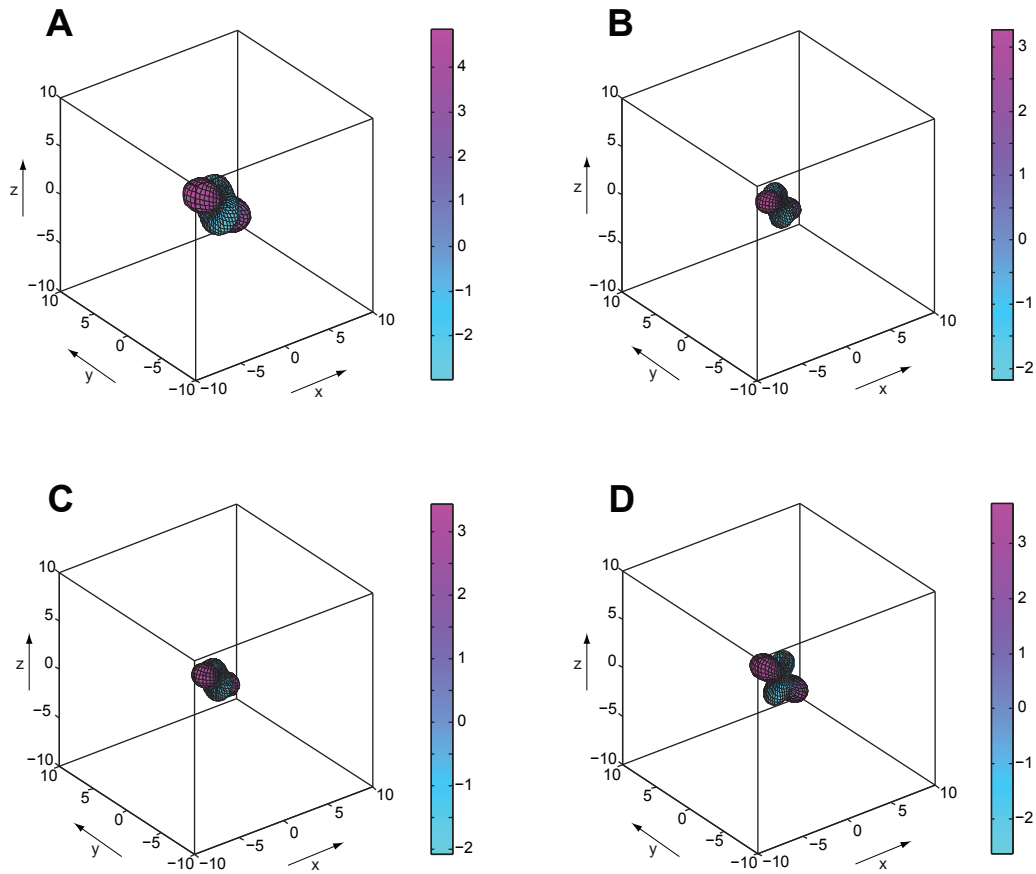


**Abb. 7.5:** T12C Tm: Darstellung der erhaltenen Tensoren [ $10^{-4}$ ]. Die Tensoren sind wie folgt zugeordnet: PCS-Tensor (A), RDC-Tensor (B), Tensor der gleichzeitigen Minimierung von PCSs und RDCs (C), Tensor auf Basis der RDC-abgeleiteten Metallposition mit anschließender Minimierung der PCSs (D). Die zu Grunde liegenden Werte finden sich in den Tabellen 5.6 und 7.16.



**Abb. 7.6:** S57C Tb: Darstellung der erhaltenen Tensoren [ $10^{-4}$ ]. Die Tensoren sind wie folgt zugeordnet: PCS-Tensor (A), RDC-Tensor (B), Tensor der gleichzeitigen Minimierung von PCSs und RDCs (C), Tensor auf Basis der RDC-abgeleiteten Metallposition mit anschließender Minimierung der PCSs (D). Die zu Grunde liegenden Werte finden sich in den Tabellen 5.6 und 7.16.





**Abb. 7.7:** S57C Tm: Darstellung der erhaltenen Tensoren [ $10^{-4}$ ]. Die Tensoren sind wie folgt zugeordnet: PCS-Tensor (A), RDC-Tensor (B), Tensor der gleichzeitigen Minimierung von PCSs und RDCs (C), Tensor auf Basis der RDC-abgeleiteten Metallposition mit anschließender Minimierung der PCSs (D). Die zu Grunde liegenden Werte finden sich in den Tabellen 5.6 und 7.16.

**Tab. 7.2:** 59 Pseudokontaktverschiebungen von T12C Tb [ppm]. Als diamagnetische Referenzprobe wurde T12C Lu verwendet. Gegeben sind die zugrunde liegenden chemischen Verschiebungen, sowie die experimentellen und berechneten PCSs und deren Differenz  $\Delta$  für  $^1\text{H}$  und  $^{15}\text{N}$ . Die Daten wurden bei 298 K aufgenommen.

AS	Terbium		Lutetium		PCS $^1\text{H}$			PCS $^{15}\text{N}$		
	$^1\text{H}$	$^{15}\text{N}$	$^1\text{H}$	$^{15}\text{N}$	exp	ber	$\Delta$	exp	ber	$\Delta$
Q2	9.187	123.653	8.951	123.475	0.236	0.261	-0.025	0.178	0.219	-0.041
I3	8.616	116.103	8.391	115.876	0.225	0.223	0.002	0.227	0.183	0.044
F4	8.799	118.436	8.793	118.262	0.006	-0.308	0.314	0.174	0.059	0.115
V5	9.655	121.027	9.254	120.774	0.401	0.551	-0.150	0.253	0.248	0.005
K6	-	-	9.113	129.453	-	-	-	-	-	-
T7	10.127	119.039	8.887	117.897	1.240	1.322	-0.082	1.142	1.016	0.126
L8	9.837	122.067	9.065	120.995	0.772	0.624	0.148	1.072	0.798	0.274
T9	8.657	107.144	7.657	106.085	1.000	0.923	0.077	1.059	1.001	0.058
G10	9.732	111.644	7.989	110.048	1.743	1.587	0.156	1.596	1.643	-0.047
K11	-	-	7.210	121.375	-	-	-	-	-	-
C12	-	-	8.726	123.497	-	-	-	-	-	-
I13	10.568	126.161	9.575	124.879	0.993	1.110	-0.117	1.282	1.190	0.092
T14	9.553	121.323	8.696	120.484	0.857	0.825	0.032	0.839	0.844	-0.005
L15	9.211	125.494	8.845	125.132	0.366	0.423	-0.057	0.362	0.420	-0.058
E16	8.307	122.902	8.148	122.747	0.159	0.205	-0.046	0.155	0.211	-0.056
V17	8.998	117.728	8.979	117.766	0.019	0.068	-0.049	-0.038	0.051	-0.089
E18	8.585	119.315	8.701	119.472	-0.116	-0.082	-0.034	-0.157	-0.070	-0.087
S20	6.890	103.393	7.072	103.568	-0.182	-0.146	-0.036	-0.175	-0.172	-0.003
D21	7.920	123.907	8.111	124.124	-0.191	-0.170	-0.021	-0.217	-0.165	-0.052
T22	7.754	108.949	7.917	109.099	-0.163	-0.151	-0.012	-0.150	-0.180	0.030
I23	8.307	121.212	8.559	121.431	-0.252	-0.270	0.018	-0.219	-0.259	0.040
N25	7.815	121.453	7.965	121.551	-0.150	-0.144	-0.006	-0.098	-0.124	0.026
V26	7.988	122.258	8.148	122.367	-0.160	-0.160	0.000	-0.109	-0.128	0.019
K27	8.458	119.047	8.602	119.163	-0.144	-0.143	-0.001	-0.116	-0.116	0.000
A28	7.899	123.546	7.980	123.583	-0.081	-0.060	-0.021	-0.037	-0.038	0.001
K29	7.848	120.412	7.883	120.383	-0.035	-0.008	-0.027	0.029	0.018	0.011
I30	8.371	121.629	8.363	121.579	0.008	0.031	-0.023	0.050	0.068	-0.018
Q31	8.594	123.730	8.580	123.688	0.014	0.053	-0.039	0.042	0.079	-0.037
D32	8.039	119.863	8.009	119.792	0.030	0.085	-0.055	0.071	0.099	-0.028
K33	7.561	115.883	7.468	115.775	0.093	0.154	-0.061	0.108	0.165	-0.057
E34	8.939	114.746	8.801	114.662	0.138	0.189	-0.051	0.084	0.209	-0.125
G35	8.580	108.964	8.501	108.935	0.079	0.148	-0.069	0.029	0.154	-0.125
I36	6.268	120.486	6.198	120.455	0.070	0.136	-0.066	0.031	0.124	-0.093
D39	8.503	113.757	8.572	113.785	-0.069	-0.022	-0.047	-0.028	-0.035	0.007
Q40	7.800	116.955	7.866	117.011	-0.066	-0.009	-0.057	-0.056	-0.016	-0.040
Q41	7.428	118.146	7.524	118.286	-0.096	-0.046	-0.050	-0.140	-0.039	-0.101

**Tab. 7.2:** Fortsetzung.

AS	Terbium		Lutetium		PCS $^1\text{H}$			PCS $^{15}\text{N}$		
	$^1\text{H}$	$^{15}\text{N}$	$^1\text{H}$	$^{15}\text{N}$	exp	ber	$\Delta$	exp	ber	$\Delta$
R42	8.321	123.065	8.539	123.329	-0.218	-0.130	-0.088	-0.264	-0.161	-0.103
L43	8.374	123.977	8.816	124.468	-0.442	-0.396	-0.046	-0.491	-0.420	-0.071
I44	8.095	121.711	9.169	122.725	-1.074	-0.937	-0.137	-1.014	-0.931	-0.083
F45	7.507	123.263	8.859	124.713	-1.352	-1.468	0.116	-1.450	-1.688	0.238
A46	-	-	9.142	133.633	-	-	-	-	-	-
G47	-	-	8.295	106.775	-	-	-	-	-	-
K48	-	-	8.034	122.131	-	-	-	-	-	-
Q49	8.141	122.341	8.664	122.923	-0.523	-0.697	0.174	-0.582	-0.763	0.181
L50	8.001	125.369	8.631	125.972	-0.630	-0.673	0.043	-0.603	-0.644	0.041
E51	8.065	122.973	8.432	123.360	-0.367	-0.450	0.083	-0.387	-0.424	0.037
D52	7.974	120.400	8.211	120.650	-0.237	-0.250	0.013	-0.250	-0.263	0.013
R54	7.294	119.331	7.532	119.598	-0.238	-0.280	0.042	-0.267	-0.268	0.001
T55	8.584	108.727	8.870	108.963	-0.286	-0.320	0.034	-0.236	-0.318	0.082
L56	7.866	117.873	8.183	118.229	-0.317	-0.341	0.024	-0.356	-0.392	0.036
S57	8.172	113.197	8.535	113.605	-0.363	-0.358	-0.005	-0.408	-0.411	0.003
D58	7.595	124.312	7.977	124.679	-0.382	-0.406	0.024	-0.367	-0.431	0.064
Y59	6.765	115.420	7.312	115.960	-0.547	-0.592	0.045	-0.540	-0.618	0.078
N60	7.514	115.306	8.189	116.145	-0.675	-0.629	-0.046	-0.839	-0.725	-0.114
I61	6.444	118.083	7.254	119.080	-0.810	-0.766	-0.044	-0.997	-0.860	-0.137
Q62	6.545	124.197	7.770	125.201	-1.225	-1.056	-0.169	-1.004	-0.841	-0.163
K63	8.080	120.178	8.500	120.591	-0.420	-0.237	-0.183	-0.413	-0.280	-0.133
E64	9.686	115.181	9.465	114.976	0.221	0.121	0.100	0.205	0.078	0.127
S65	-	-	7.729	115.217	-	-	-	-	-	-
T66	-	-	8.872	117.747	-	-	-	-	-	-
L67	-	-	9.340	127.737	-	-	-	-	-	-
H68	-	-	9.329	120.108	-	-	-	-	-	-
L69	-	-	8.213	123.981	-	-	-	-	-	-
V70	8.881	126.443	9.184	126.626	-0.303	-0.179	-0.124	-0.183	-0.113	-0.070
L71	8.041	122.853	8.117	122.964	-0.076	0.130	-0.206	-0.111	0.084	-0.195
R72	8.487	123.616	8.610	123.734	-0.123	0.039	-0.162	-0.118	0.048	-0.166
L73	8.248	124.525	8.401	124.667	-0.153	0.070	-0.223	-0.142	0.067	-0.209
R74	8.369	122.011	8.480	122.133	-0.111	0.052	-0.163	-0.122	0.051	-0.173
G75	8.426	111.072	8.518	111.191	-0.092	0.047	-0.139	-0.119	0.045	-0.164
G76	7.883	115.149	7.989	115.258	-0.106	0.050	-0.156	-0.109	0.048	-0.157

**Tab. 7.3:** 65 Pseudokontaktverschiebungen von T12C Tm [ppm]. Als diamagnetische Referenzprobe wurde T12C Lu verwendet. Gegeben sind die zugrunde liegenden chemischen Verschiebungen, sowie die experimentellen und berechneten PCSs und deren Differenz  $\Delta$  für  $^1\text{H}$  und  $^{15}\text{N}$ . Die Daten wurden bei 298 K aufgenommen.

AS	Thulium		Lutetium		PCS $^1\text{H}$			PCS $^{15}\text{N}$		
	$^1\text{H}$	$^{15}\text{N}$	$^1\text{H}$	$^{15}\text{N}$	exp	ber	$\Delta$	exp	ber	$\Delta$
Q2	8.987	123.488	8.951	123.475	0.036	0.063	-0.027	0.013	0.056	-0.043
I3	8.301	115.792	8.391	115.876	-0.090	-0.078	-0.012	-0.084	-0.034	-0.050
F4	8.578	117.883	8.793	118.262	-0.215	-0.125	-0.090	-0.379	-0.306	-0.073
V5	8.629	120.212	9.254	120.774	-0.625	-0.715	0.090	-0.562	-0.627	0.065
K6	8.620	128.677	9.113	129.453	-0.493	-0.695	0.202	-0.776	-0.907	0.131
T7	7.843	116.999	8.887	117.897	-1.044	-1.030	-0.014	-0.898	-0.841	-0.057
L8	8.569	120.369	9.065	120.995	-0.496	-0.297	-0.199	-0.626	-0.381	-0.245
T9	7.045	105.467	7.657	106.085	-0.612	-0.476	-0.136	-0.618	-0.469	-0.149
G10	6.886	109.036	7.989	110.048	-1.103	-0.844	-0.259	-1.012	-0.893	-0.119
K11	6.388	120.404	7.210	121.375	-0.822	-0.967	0.145	-0.971	-1.136	0.165
C12	-	-	8.726	123.497	-	-	-	-	-	-
I13	8.581	123.731	9.575	124.879	-0.994	-0.964	-0.030	-1.148	-0.957	-0.191
T14	8.085	119.876	8.696	120.484	-0.611	-0.609	-0.002	-0.608	-0.626	0.018
L15	8.569	124.860	8.845	125.132	-0.276	-0.294	0.018	-0.272	-0.288	0.016
E16	8.093	122.676	8.148	122.747	-0.055	-0.096	0.041	-0.071	-0.089	0.018
V17	9.058	117.848	8.979	117.766	0.079	0.068	0.011	0.082	0.064	0.018
E18	8.866	119.628	8.701	119.472	0.165	0.164	0.001	0.156	0.167	-0.011
S20	7.301	103.788	7.072	103.568	0.229	0.226	0.003	0.220	0.244	-0.024
D21	8.344	124.345	8.111	124.124	0.233	0.230	0.003	0.221	0.217	0.004
T22	8.098	109.284	7.917	109.099	0.181	0.178	0.003	0.185	0.205	-0.020
I23	8.826	121.686	8.559	121.431	0.267	0.272	-0.005	0.255	0.261	-0.006
N25	8.121	121.651	7.965	121.551	0.156	0.157	-0.001	0.100	0.138	-0.038
V26	8.319	122.496	8.148	122.367	0.171	0.167	0.004	0.129	0.138	-0.009
K27	8.750	119.288	8.602	119.163	0.148	0.142	0.006	0.125	0.115	0.010
A28	8.063	123.629	7.980	123.583	0.083	0.076	0.007	0.046	0.055	-0.009
K29	7.933	120.388	7.883	120.383	0.050	0.030	0.020	0.005	0.008	-0.003
I30	8.371	121.564	8.363	121.579	0.008	-0.014	0.022	-0.015	-0.046	0.031
Q31	8.573	123.592	8.580	123.688	-0.007	-0.027	0.020	-0.096	-0.049	-0.047
D32	7.989	119.734	8.009	119.792	-0.020	-0.053	0.033	-0.058	-0.066	0.008
K33	7.397	115.688	7.468	115.775	-0.071	-0.117	0.046	-0.087	-0.127	0.040
E34	8.691	114.559	8.801	114.662	-0.110	-0.147	0.037	-0.103	-0.166	0.063
G35	8.424	108.861	8.501	108.935	-0.077	-0.109	0.032	-0.074	-0.113	0.039
I36	6.127	120.384	6.198	120.455	-0.071	-0.088	0.017	-0.071	-0.075	0.004
D39	8.615	113.800	8.572	113.785	0.043	0.058	-0.015	0.015	0.071	-0.056
Q40	7.901	117.041	7.866	117.011	0.035	0.058	-0.023	0.030	0.069	-0.039
Q41	7.593	118.372	7.524	118.286	0.069	0.092	-0.023	0.086	0.093	-0.007

**Tab. 7.3:** Fortsetzung.

AS	Thulium		Lutetium		PCS $^1\text{H}$			PCS $^{15}\text{N}$		
	$^1\text{H}$	$^{15}\text{N}$	$^1\text{H}$	$^{15}\text{N}$	exp	ber	$\Delta$	exp	ber	$\Delta$
R42	8.713	123.502	8.539	123.329	0.174	0.179	-0.005	0.173	0.200	-0.027
L43	9.234	124.920	8.816	124.468	0.418	0.377	0.041	0.452	0.392	0.060
I44	10.166	123.682	9.169	122.725	0.997	0.761	0.236	0.957	0.812	0.145
F45	10.349	126.476	8.859	124.713	1.490	1.470	0.020	1.763	1.649	0.114
A46	-	-	9.142	133.633	-	-	-	-	-	-
G47	-	-	8.295	106.775	-	-	-	-	-	-
K48	9.440	123.246	8.034	122.131	1.406	1.599	-0.193	1.115	1.320	-0.205
Q49	9.257	123.565	8.664	122.923	0.593	0.654	-0.061	0.642	0.736	-0.094
L50	9.266	126.595	8.631	125.972	0.635	0.639	-0.004	0.623	0.613	0.010
E51	8.826	123.731	8.432	123.360	0.394	0.423	-0.029	0.371	0.399	-0.028
D52	8.440	120.895	8.211	120.650	0.229	0.242	-0.013	0.245	0.254	-0.009
R54	7.783	119.849	7.532	119.598	0.251	0.271	-0.020	0.251	0.261	-0.010
T55	9.179	109.229	8.870	108.963	0.309	0.325	-0.016	0.266	0.324	-0.058
L56	8.537	118.629	8.183	118.229	0.354	0.370	-0.016	0.400	0.419	-0.019
S57	8.943	114.059	8.535	113.605	0.408	0.414	-0.006	0.454	0.470	-0.016
D58	8.397	125.090	7.977	124.679	0.420	0.437	-0.017	0.411	0.465	-0.054
Y59	7.904	116.552	7.312	115.960	0.592	0.626	-0.034	0.592	0.645	-0.053
N60	8.896	117.020	8.189	116.145	0.707	0.698	0.009	0.875	0.813	0.062
I61	8.146	120.157	7.254	119.080	0.892	0.884	0.008	1.077	1.016	0.061
Q62	9.243	126.416	7.770	125.201	1.473	1.365	0.108	1.215	1.115	0.100
K63	9.168	121.296	8.500	120.591	0.668	0.628	0.040	0.705	0.664	0.041
E64	9.656	115.252	9.465	114.976	0.191	0.259	-0.068	0.276	0.358	-0.082
S65	8.397	115.897	7.729	115.217	0.668	0.686	-0.018	0.680	0.779	-0.099
T66	-	-	8.872	117.747	-	-	-	-	-	-
L67	9.476	128.116	9.340	127.737	0.136	0.198	-0.062	0.379	0.603	-0.224
H68	-	-	9.329	120.108	-	-	-	-	-	-
L69	8.242	124.313	8.213	123.981	0.029	-0.047	0.076	0.332	0.123	0.209
V70	9.466	126.920	9.184	126.626	0.282	0.217	0.065	0.294	0.181	0.113
L71	8.093	123.030	8.117	122.964	-0.024	0.082	-0.106	0.066	0.088	-0.022
R72	8.646	123.772	8.610	123.734	0.036	0.078	-0.042	0.038	0.086	-0.048
L73	8.422	124.689	8.401	124.667	0.021	0.074	-0.053	0.022	0.064	-0.042
R74	8.469	122.127	8.480	122.133	-0.011	0.046	-0.057	-0.006	0.050	-0.056
G75	8.512	111.191	8.518	111.191	-0.006	0.043	-0.049	0.000	0.045	-0.045
G76	7.985	115.248	7.989	115.258	-0.004	0.039	-0.043	-0.010	0.041	-0.051

**Tab. 7.4:** 54 Pseudokontaktverschiebungen von S57C Tb [ppm]. Als diamagnetische Referenzprobe wurde S57C Lu verwendet. Gegeben sind die zugrunde liegenden chemischen Verschiebungen, sowie die experimentellen und berechneten PCSs und deren Differenz  $\Delta$  für  $^1\text{H}$  und  $^{15}\text{N}$ . Die Daten wurden bei 298 K aufgenommen.

AS	Terbium		Lutetium		PCS $^1\text{H}$			PCS $^{15}\text{N}$		
	$^1\text{H}$	$^{15}\text{N}$	$^1\text{H}$	$^{15}\text{N}$	exp	ber	$\Delta$	exp	ber	$\Delta$
Q2	-	-	8.872	123.052	-	-	-	-	-	-
I3	-	-	8.206	115.198	-	-	-	-	-	-
F4	9.268	119.195	8.542	118.579	0.726	0.697	0.029	0.616	0.614	0.002
V5	9.540	121.565	9.189	121.155	0.351	0.346	0.005	0.410	0.403	0.007
K6	9.232	128.356	8.902	128.063	0.330	0.326	0.004	0.293	0.291	0.002
T7	8.807	115.656	8.653	115.460	0.154	0.163	-0.009	0.196	0.181	0.015
L8	9.165	121.353	9.035	121.227	0.130	0.149	-0.019	0.126	0.144	-0.018
T9	7.641	105.982	7.552	105.878	0.089	0.109	-0.020	0.104	0.102	0.002
G10	7.832	109.319	7.747	109.246	0.085	0.107	-0.022	0.073	0.093	-0.020
K11	7.250	121.975	7.179	121.891	0.071	0.097	-0.026	0.084	0.089	-0.005
T12	8.613	120.743	8.553	120.649	0.060	0.061	-0.001	0.094	0.088	0.006
I13	9.657	127.747	9.483	127.650	0.174	0.191	-0.017	0.097	0.148	-0.051
T14	8.655	121.703	8.649	121.672	0.006	0.038	-0.032	0.031	0.098	-0.067
L15	9.133	125.956	8.696	125.510	0.437	0.400	0.037	0.446	0.312	0.134
E16	-	-	8.017	122.542	-	-	-	-	-	-
V17	-	-	8.848	117.494	-	-	-	-	-	-
E18	-	-	8.616	120.298	-	-	-	-	-	-
S20	-	-	7.006	103.385	-	-	-	-	-	-
D21	-	-	7.903	123.324	-	-	-	-	-	-
T22	-	-	7.661	108.069	-	-	-	-	-	-
I23	9.198	122.096	8.443	121.284	0.755	0.724	0.031	0.812	0.794	0.018
N25	-	-	7.843	121.392	-	-	-	-	-	-
V26	-	-	7.996	122.212	-	-	-	-	-	-
K27	9.053	119.302	8.448	118.807	0.605	0.561	0.044	0.495	0.540	-0.045
A28	8.332	123.862	7.899	123.482	0.433	0.397	0.036	0.380	0.358	0.022
K29	8.266	120.618	7.777	120.248	0.489	0.454	0.035	0.370	0.376	-0.006
I30	8.609	121.835	8.201	121.474	0.408	0.388	0.020	0.361	0.333	0.028
Q31	8.688	123.673	8.455	123.495	0.233	0.241	-0.008	0.178	0.210	-0.032
D32	8.052	119.817	7.922	119.736	0.130	0.167	-0.037	0.081	0.136	-0.055
K33	7.441	115.531	7.350	115.493	0.091	0.132	-0.041	0.038	0.097	-0.059
E34	8.731	114.422	8.641	114.355	0.090	0.120	-0.030	0.067	0.095	-0.028
G35	8.459	108.959	8.404	108.875	0.055	0.097	-0.042	0.084	0.088	-0.004
I36	6.169	120.399	6.068	120.303	0.101	0.120	-0.019	0.096	0.111	-0.015
D39	8.565	113.773	8.442	113.616	0.123	0.132	-0.009	0.157	0.144	0.013
Q40	7.883	117.058	7.739	116.861	0.144	0.141	0.003	0.197	0.139	0.058
Q41	7.580	118.362	7.396	118.124	0.184	0.182	0.002	0.238	0.183	0.055

**Tab. 7.4:** Fortsetzung.

AS	Terbium		Lutetium		PCS $^1\text{H}$			PCS $^{15}\text{N}$		
	$^1\text{H}$	$^{15}\text{N}$	$^1\text{H}$	$^{15}\text{N}$	exp	ber	$\Delta$	exp	ber	$\Delta$
R42	8.646	123.533	8.409	123.217	0.237	0.238	-0.001	0.316	0.245	0.071
L43	9.072	124.897	8.715	124.496	0.357	0.353	0.004	0.401	0.354	0.047
I44	9.449	122.742	9.047	122.344	0.402	0.410	-0.008	0.398	0.415	-0.017
F45	9.194	125.401	8.748	124.895	0.446	0.464	-0.018	0.506	0.485	0.021
A46	9.317	133.291	8.901	132.870	0.416	0.465	-0.049	0.421	0.460	-0.039
G47	8.274	102.704	7.999	102.436	0.275	0.351	-0.076	0.268	0.341	-0.073
K48	8.203	122.325	7.909	122.058	0.294	0.381	-0.087	0.267	0.346	-0.079
Q49	8.784	123.349	8.546	123.058	0.238	0.298	-0.060	0.291	0.328	-0.037
L50	8.853	125.966	8.458	125.632	0.395	0.424	-0.029	0.334	0.420	-0.086
E51	8.706	123.519	8.342	123.136	0.364	0.424	-0.060	0.383	0.401	-0.018
D52	8.330	120.620	8.074	120.255	0.256	0.271	-0.015	0.365	0.309	0.056
R54	7.694	119.556	7.346	119.270	0.348	0.371	-0.023	0.286	0.341	-0.055
T55	-	-	8.885	109.171	-	-	-	-	-	-
L56	10.126	119.349	8.093	117.596	2.033	1.976	0.057	1.753	1.798	-0.045
C57	-	-	7.935	116.710	-	-	-	-	-	-
D58	-	-	7.838	122.117	-	-	-	-	-	-
Y59	8.248	116.265	7.089	115.262	1.159	1.195	-0.036	1.003	1.028	-0.025
N60	9.415	117.952	8.113	116.590	1.302	1.235	0.067	1.362	1.209	0.153
I61	9.021	120.505	7.308	118.889	1.713	1.749	-0.036	1.616	1.657	-0.041
Q62	8.922	126.552	7.406	124.638	1.516	1.520	-0.004	1.914	1.847	0.067
K63	-	-	8.503	120.763	-	-	-	-	-	-
E64	-	-	9.203	114.330	-	-	-	-	-	-
S65	-	-	7.560	114.865	-	-	-	-	-	-
T66	9.179	118.011	8.621	117.415	0.558	0.624	-0.066	0.596	0.643	-0.047
L67	9.897	128.337	9.309	127.736	0.588	0.582	0.006	0.601	0.587	0.014
H68	9.555	120.036	9.122	119.647	0.433	0.458	-0.025	0.389	0.430	-0.041
L69	8.468	124.061	8.190	123.755	0.278	0.288	-0.010	0.306	0.308	-0.002
V70	9.331	126.674	9.085	126.492	0.246	0.256	-0.010	0.182	0.237	-0.055
L71	8.180	123.234	8.026	123.064	0.154	0.157	-0.003	0.170	0.164	0.006
R72	8.643	123.873	8.503	123.679	0.140	0.136	0.004	0.194	0.131	0.063
L73	8.379	124.649	8.265	124.509	0.114	0.095	0.019	0.140	0.094	0.046
R74	8.443	122.073	8.349	121.956	0.094	0.075	0.019	0.117	0.073	0.044
G75	8.478	111.140	8.392	111.040	0.086	0.060	0.026	0.100	0.060	0.040
G76	7.926	115.160	7.858	115.077	0.068	0.053	0.015	0.083	0.053	0.030

**Tab. 7.5:** 48 Pseudokontaktverschiebungen von S57C Tm [ppm]. Als diamagnetische Referenzprobe wurde S57C Lu verwendet. Gegeben sind die zugrunde liegenden chemischen Verschiebungen, sowie die experimentellen und berechneten PCSs und deren Differenz  $\Delta$  für  $^1\text{H}$  und  $^{15}\text{N}$ . Die Daten wurden bei 298 K aufgenommen.

AS	Thulium		Lutetium		PCS $^1\text{H}$			PCS $^{15}\text{N}$		
	$^1\text{H}$	$^{15}\text{N}$	$^1\text{H}$	$^{15}\text{N}$	exp	ber	$\Delta$	exp	ber	$\Delta$
Q2	-	-	8.872	123.052	-	-	-	-	-	-
I3	-	-	8.206	115.198	-	-	-	-	-	-
F4	8.133	118.137	8.542	118.579	-0.409	-0.397	-0.012	-0.442	-0.391	-0.051
V5	8.921	120.856	9.189	121.155	-0.268	-0.286	0.018	-0.299	-0.295	-0.004
K6	8.710	127.868	8.902	128.063	-0.192	-0.198	0.006	-0.195	-0.189	-0.006
T7	8.531	115.345	8.653	115.460	-0.122	-0.122	0.000	-0.115	-0.126	0.011
L8	8.944	121.135	9.035	121.227	-0.091	-0.091	0.000	-0.092	-0.089	-0.003
T9	7.482	105.813	7.552	105.878	-0.070	-0.079	0.009	-0.065	-0.073	0.008
G10	7.674	109.194	7.747	109.246	-0.073	-0.079	0.006	-0.052	-0.074	0.022
K11	7.094	121.813	7.179	121.891	-0.085	-0.090	0.005	-0.078	-0.088	0.010
T12	8.460	120.554	8.553	120.649	-0.093	-0.108	0.015	-0.095	-0.118	0.023
I13	9.304	127.454	9.483	127.650	-0.179	-0.201	0.022	-0.196	-0.194	-0.002
T14	8.443	121.409	8.649	121.672	-0.206	-0.262	0.056	-0.263	-0.283	0.020
L15	-	-	8.696	125.510	-	-	-	-	-	-
E16	-	-	8.017	122.542	-	-	-	-	-	-
V17	-	-	8.848	117.494	-	-	-	-	-	-
E18	-	-	8.616	120.298	-	-	-	-	-	-
S20	-	-	7.006	103.385	-	-	-	-	-	-
D21	-	-	7.903	123.324	-	-	-	-	-	-
T22	-	-	7.661	108.069	-	-	-	-	-	-
I23	-	-	8.443	121.284	-	-	-	-	-	-
N25	-	-	7.843	121.392	-	-	-	-	-	-
V26	8.006	122.153	7.996	122.212	0.010	0.008	0.002	-0.059	-0.090	0.031
K27	8.378	118.643	8.448	118.807	-0.070	-0.069	-0.001	-0.164	-0.126	-0.038
A28	7.884	123.409	7.899	123.482	-0.015	-0.034	0.019	-0.073	-0.071	-0.002
K29	7.579	120.026	7.777	120.248	-0.198	-0.215	0.017	-0.222	-0.218	-0.004
I30	7.956	121.234	8.201	121.474	-0.245	-0.250	0.005	-0.240	-0.257	0.017
Q31	8.301	123.307	8.455	123.495	-0.154	-0.147	-0.007	-0.188	-0.150	-0.038
D32	7.734	119.532	7.922	119.736	-0.188	-0.163	-0.025	-0.204	-0.153	-0.051
K33	7.119	115.262	7.350	115.493	-0.231	-0.212	-0.019	-0.231	-0.197	-0.034
E34	8.470	114.193	8.641	114.355	-0.171	-0.161	-0.010	-0.162	-0.153	-0.009
G35	8.272	108.751	8.404	108.875	-0.132	-0.117	-0.015	-0.124	-0.105	-0.019
I36	5.964	120.222	6.068	120.303	-0.104	-0.096	-0.008	-0.081	-0.082	0.001
D39	8.440	113.575	8.442	113.616	-0.002	0.012	-0.014	-0.041	0.011	-0.052
Q40	7.713	116.824	7.739	116.861	-0.026	-0.015	-0.011	-0.037	-0.013	-0.024
Q41	7.353	118.084	7.396	118.124	-0.043	-0.029	-0.014	-0.040	-0.039	-0.001



**Tab. 7.5:** Fortsetzung.

AS	Thulium		Lutetium		PCS $^1\text{H}$			PCS $^{15}\text{N}$		
	$^1\text{H}$	$^{15}\text{N}$	$^1\text{H}$	$^{15}\text{N}$	exp	ber	$\Delta$	exp	ber	$\Delta$
R42	8.331	123.167	8.409	123.217	-0.078	-0.077	-0.001	-0.050	-0.069	0.019
L43	8.623	124.432	8.715	124.496	-0.092	-0.093	0.001	-0.064	-0.111	0.047
I44	8.882	122.162	9.047	122.344	-0.165	-0.179	0.014	-0.182	-0.173	-0.009
F45	8.574	124.729	8.748	124.895	-0.174	-0.212	0.038	-0.166	-0.229	0.063
A46	8.693	132.653	8.901	132.870	-0.208	-0.228	0.020	-0.217	-0.229	0.012
G47	7.866	102.306	7.999	102.436	-0.133	-0.165	0.032	-0.130	-0.161	0.031
K48	7.789	121.991	7.909	122.058	-0.120	-0.179	0.059	-0.067	-0.156	0.089
Q49	8.526	122.985	8.546	123.058	-0.020	-0.100	0.080	-0.073	-0.113	0.040
L50	8.366	125.530	8.458	125.632	-0.092	-0.124	0.032	-0.102	-0.111	0.009
E51	-	-	8.342	123.136	-	-	-	-	-	-
D52	8.162	120.374	8.074	120.255	0.088	0.138	-0.050	0.119	0.161	-0.042
R54	-	-	7.346	119.270	-	-	-	-	-	-
T55	-	-	8.885	109.171	-	-	-	-	-	-
L56	-	-	8.093	117.596	-	-	-	-	-	-
C57	-	-	7.935	116.710	-	-	-	-	-	-
D58	-	-	7.838	122.117	-	-	-	-	-	-
Y59	6.269	114.455	7.089	115.262	-0.820	-0.821	0.001	-0.807	-0.743	-0.064
N60	6.854	115.398	8.113	116.590	-1.259	-1.273	0.014	-1.192	-1.172	-0.020
I61	-	-	7.308	118.889	-	-	-	-	-	-
Q62	-	-	7.406	124.638	-	-	-	-	-	-
K63	-	-	8.503	120.763	-	-	-	-	-	-
E64	-	-	9.203	114.330	-	-	-	-	-	-
S65	-	-	7.560	114.865	-	-	-	-	-	-
T66	8.341	117.071	8.621	117.415	-0.280	-0.248	-0.032	-0.344	-0.271	-0.073
L67	8.990	127.401	9.309	127.736	-0.319	-0.324	0.005	-0.335	-0.315	-0.020
H68	8.914	119.395	9.122	119.647	-0.208	-0.230	0.022	-0.252	-0.221	-0.031
L69	8.043	123.634	8.190	123.755	-0.147	-0.155	0.008	-0.121	-0.159	0.038
V70	8.980	126.362	9.085	126.492	-0.105	-0.107	0.002	-0.130	-0.104	-0.026
L71	7.950	122.999	8.026	123.064	-0.076	-0.068	-0.008	-0.065	-0.068	0.003
R72	8.447	123.607	8.503	123.679	-0.056	-0.041	-0.015	-0.072	-0.041	-0.031
L73	8.229	124.454	8.265	124.509	-0.036	-0.026	-0.010	-0.055	-0.025	-0.030
R74	8.307	121.915	8.349	121.956	-0.042	-0.014	-0.028	-0.041	-0.013	-0.028
G75	8.367	111.011	8.392	111.040	-0.025	-0.008	-0.017	-0.029	-0.008	-0.021
G76	7.844	115.056	7.858	115.077	-0.014	-0.006	-0.008	-0.021	-0.006	-0.015

**Tab. 7.6:** Chemische Verschiebungen in  $^1\text{H}$  und  $^{15}\text{N}$  der Hauptpeaks und der 2. und 3. anisotropen Signalsätze, sowie der isotropen Signale von zehn ausgewählten Aminosäureresten bei verschiedenen Temperaturen [ppm].

T [K]	AS	Hauptpeak		isotrop		anisotrop 2		anisotrop 3	
		$^1\text{H}$	$^{15}\text{N}$	$^1\text{H}$	$^{15}\text{N}$	$^1\text{H}$	$^{15}\text{N}$	$^1\text{H}$	$^{15}\text{N}$
<b>288</b>	E16	8.027	122.667	8.130	122.729	7.861	122.531	7.914	122.557
	I23	8.798	121.687	8.492	121.445	8.589	121.480	8.684	121.573
	K33	7.291	115.727	7.360	115.808	7.180	115.700	7.221	115.692
	D52	8.439	121.012	8.164	120.732	8.236	120.809	8.335	120.927
	R54	7.751	120.039	7.450	119.722	7.576	119.908	7.659	119.959
	T55	9.146	109.250	8.783	108.925	8.968	109.066	9.038	109.122
	L56	8.513	118.649	8.288	118.413	8.349	118.461	8.403	118.544
	D58	8.394	125.231	7.904	124.775	8.200	125.060	8.264	125.129
	Y59	7.915	116.735	7.212	116.031	7.656	116.475	7.752	116.587
	N60	8.930	117.223	8.109	116.212	8.692	116.924	8.773	117.063
<b>298</b>	E16	8.093	122.676	8.144	122.737	7.950	122.555	7.997	122.581
	I23	8.826	121.686	8.560	121.427	8.643	121.512	8.712	121.580
	K33	7.397	115.688	7.467	115.758	7.298	115.683	7.339	115.678
	D52	8.440	120.895	8.208	120.645	8.259	120.731	8.350	120.817
	R54	7.783	119.849	7.526	119.577	7.633	119.742	7.697	119.778
	T55	9.179	109.229	8.867	108.962	9.020	109.067	9.075	109.124
	L56	8.537	118.629	8.183	118.224	8.337	118.425	8.386	118.460
	D58	8.397	125.090	7.978	124.696	8.222	124.929	8.273	124.977
	Y59	7.904	116.552	7.304	115.946	7.665	116.322	7.749	116.402
	N60	8.896	117.020	8.191	116.160	8.673	116.747	8.735	116.836
<b>308</b>	E16	8.154	122.676	8.214	122.752	8.033	122.565	8.069	122.589
	I23	8.857	121.682	8.640	121.485	8.700	121.533	8.752	121.589
	K33	7.503	115.647	7.564	115.681	7.455	115.643	7.470	115.644
	D52	8.444	120.776	8.252	120.566	8.287	120.629	8.362	120.694
	R54	7.819	119.656	7.609	119.445	7.690	119.556	7.736	119.585
	T55	9.212	109.209	8.954	108.986	9.076	109.077	9.117	109.103
	L56	8.567	118.617	8.265	118.286	8.391	118.436	8.425	118.460
	D58	8.404	124.938	8.052	124.611	8.248	124.792	8.284	124.824
	Y59	7.900	116.373	7.393	115.860	7.686	116.165	7.746	116.227
	N60	8.868	116.817	8.269	116.101	8.665	116.562	8.711	116.634
<b>315</b>	E16	8.190	122.671	8.256	122.752	8.075	122.563	8.113	122.599
	I23	8.878	121.680	8.691	121.506	8.737	121.542	8.778	121.593
	K33	7.574	115.618	7.635	115.695	7.459	115.604	7.536	115.624
	D52	8.448	120.696	8.282	120.517	8.306	120.562	8.367	120.638
	R54	7.844	119.525	7.662	119.348	7.728	119.444	7.764	119.460
	T55	9.233	109.196	9.008	108.998	9.110	109.078	9.147	109.106

**Tab. 7.6:** Fortsetzung.

T [K]	AS	Hauptpeak		isotrop		anisotrop 2		anisotrop 3	
		<sup>1</sup> H	<sup>15</sup> N	<sup>1</sup> H	<sup>15</sup> N	<sup>1</sup> H	<sup>15</sup> N	<sup>1</sup> H	<sup>15</sup> N
	L56	8.588	118.614	8.325	118.315	8.430	118.461	8.459	118.474
	D58	8.408	124.830	8.098	124.543	8.266	124.702	8.297	124.736
	Y59	7.899	116.255	7.453	115.800	7.704	116.070	7.751	116.117
	N60	8.852	116.680	8.322	116.028	8.663	116.442	8.702	116.501

**Tab. 7.7:** Datenhöhen [ ] (Sparky) der Hauptpeaks und der 2. und 3. anisotropen Signalsätze, sowie der isotropen Signale von zehn ausgewählten Aminosäureresten bei verschiedenen Temperaturen und die resultierenden prozentualen Verteilungen. Die chemischen Verschiebungen der Reste sind in Tabelle 7.6 angegeben.

T [K]	AS	Datenhöhe [ ]				Verteilung [%]			
		Hauptpeak	isotrop	anisotrop 2	anisotrop 3	Hauptpeak	isotrop	anisotrop 2	anisotrop 3
<b>288</b>	E16	11970307	99826	123050	221937	96.42	0.80	0.99	1.79
	I23	5781384	174003	106341	131833	93.35	2.81	1.72	2.13
	K33	12750358	339880	112913	314216	94.33	2.51	0.84	2.32
	D52	6875856	166036	145524	135447	93.90	2.27	1.99	1.85
	R54	11620404	164739	169097	235163	95.33	1.35	1.39	1.93
	T55	6629228	228928	188035	161583	91.97	3.18	2.61	2.24
	L56	8830404	206205	207730	109437	94.40	2.20	2.22	1.17
	D58	8777918	306550	190810	207023	92.57	3.23	2.01	2.18
	Y59	6629605	304799	147333	157086	91.58	4.21	2.04	2.17
	N60	7899876	187824	169242	145894	94.01	2.24	2.01	1.74
<b>Durchschnitt:</b>						93.79	2.48	1.78	1.95
<b>298</b>	E16	243704784	6890782	2511184	4618226	94.56	2.67	0.97	1.79
	I23	171244848	3813710	3333864	3161000	94.32	2.10	1.84	1.74
	K33	269823584	5618110	907322	5776001	95.64	1.99	0.32	2.05
	D52	169826576	4736590	4278376	3804888	92.98	2.59	2.34	2.08
	R54	263979776	3457340	5394668	4652464	95.13	1.25	1.94	1.68
	T55	147937984	4333326	3538591	3414356	92.91	2.72	2.22	2.14
	L56	211467616	3463481	5534548	4869477	93.85	1.54	2.46	2.16
	D58	198895536	6522027	4758978	4411932	92.69	3.04	2.22	2.06
	Y59	160950960	5863800	4212980	3551424	92.19	3.36	2.41	2.03
	N60	212528144	5038628	4544283	3871153	94.05	2.23	2.01	1.71
<b>Durchschnitt:</b>						93.90	2.31	1.84	1.95
<b>308</b>	E16	17655216	460713	159082	254867	95.28	2.49	0.86	1.38
	I23	15672879	327171	348065	283594	94.23	1.97	2.09	1.71
	K33	19884292	280651	345243	112047	96.42	1.36	1.67	0.54
	D52	13642497	325100	354553	308213	93.25	2.22	2.42	2.11
	R54	20457212	313750	427604	405277	94.69	1.45	1.98	1.88
	T55	10671648	356403	255612	252073	92.51	3.09	2.22	2.19
	L56	17483552	312188	422988	338643	94.21	1.68	2.28	1.82
	D58	15105381	449648	369000	235361	93.48	2.78	2.28	1.46
	Y59	13012360	418051	357033	256372	92.66	2.98	2.54	1.83
	N60	18227082	351899	425796	373197	94.06	1.82	2.20	1.93
<b>Durchschnitt:</b>						94.19	2.11	2.01	1.69

**Tab. 7.7:** Fortsetzung.

T [K]	AS	Hauptpeak	Datenhöhe [ ]			Verteilung [%]			
			isotrop	anisotrop 2	anisotrop 3	Hauptpeak	isotrop	anisotrop 2	anisotrop 3
<b>315</b>	E16	24269074	546393	258939	417786	95.20	2.14	1.02	1.64
	I23	23671842	624612	515546	497488	93.53	2.47	2.04	1.97
	K33	27346108	469525	204966	751034	95.05	1.63	0.71	2.61
	D52	19529354	524935	517418	421367	93.03	2.50	2.46	2.01
	R54	28507434	463230	677240	619030	94.19	1.53	2.24	2.05
	T55	14183552	458137	334234	318923	92.73	3.00	2.19	2.09
	L56	25314620	446752	670003	537650	93.87	1.66	2.48	1.99
	D58	20375628	583321	515003	472987	92.84	2.66	2.35	2.16
	Y59	18592062	575985	490733	382663	92.77	2.87	2.45	1.91
	N60	26231724	544060	579627	537868	94.04	1.95	2.08	1.93
<b>Durchschnitt:</b>						93.87	2.15	1.97	2.01

**Tab. 7.8:** T12C Lu (diamagnetische Referenz). Chemische Verschiebungen ( $^1\text{H}$  und  $^{15}\text{N}$ ) der Amidsignale des Proteinrückgrats bei unterschiedlichen Temperaturen [ppm].

AS	278 K		288 K		298 K		308 K		315 K	
	$^1\text{H}$	$^{15}\text{N}$	$^1\text{H}$	$^{15}\text{N}$	$^1\text{H}$	$^{15}\text{N}$	$^1\text{H}$	$^{15}\text{N}$	$^1\text{H}$	$^{15}\text{N}$
Q2	8.848	123.350	8.905	123.408	8.951	123.475	8.991	123.542	9.014	123.588
I3	8.168	115.633	8.284	115.750	8.391	115.876	8.494	116.006	8.561	116.095
F4	8.646	118.006	8.722	118.137	8.793	118.262	8.862	118.386	8.907	118.470
V5	9.081	120.673	9.171	120.725	9.254	120.774	9.336	120.821	9.390	120.858
K6	8.926	129.493	9.025	129.481	9.113	129.453	9.197	129.402	9.251	129.360
T7	8.780	118.317	8.835	118.115	8.887	117.897	8.941	117.657	8.977	117.488
L8	9.075	121.388	9.069	121.178	9.065	120.995	9.062	120.832	9.059	120.738
T9	7.487	106.165	7.575	106.125	7.657	106.085	7.737	106.039	7.799	106.020
G10	7.839	110.283	7.916	110.166	7.989	110.048	8.061	109.916	8.109	109.825
K11	7.028	121.771	7.121	121.571	7.210	121.375	7.298	121.175	7.357	121.039
C12	8.615	123.824	8.673	123.654	8.726	123.497	8.777	123.340	8.810	123.239
I13	9.448	125.332	9.514	125.102	9.575	124.879	9.633	124.673	9.672	124.553
T14	8.627	120.671	8.665	120.592	8.696	120.484	8.724	120.356	8.742	120.265
L15	8.687	125.051	8.770	125.105	8.845	125.132	8.917	125.131	8.962	125.123
E16	7.981	122.697	8.071	122.728	8.148	122.747	8.218	122.754	8.260	122.753
V17	8.826	117.691	8.907	117.736	8.979	117.766	9.046	117.778	9.087	117.778
E18	8.448	119.056	8.581	119.271	8.701	119.472	8.815	119.663	8.888	119.787
S20	6.899	103.334	6.988	103.449	7.072	103.568	7.157	103.686	7.213	103.769
D21	7.961	124.349	8.039	124.237	8.111	124.124	8.181	124.003	8.227	123.919
T22	7.804	109.273	7.861	109.183	7.917	109.099	7.974	109.011	8.013	108.953
I23	8.392	121.319	8.478	121.379	8.559	121.431	8.637	121.473	8.689	121.498
N25	7.810	121.712	7.890	121.641	7.965	121.551	8.038	121.439	8.086	121.356
V26	7.995	122.509	8.074	122.440	8.148	122.367	8.220	122.283	8.267	122.222
K27	8.440	119.304	8.524	119.234	8.602	119.163	8.677	119.083	8.727	119.027
A28	7.779	123.745	7.882	123.665	7.980	123.583	8.074	123.488	8.137	123.420
K29	7.699	120.528	7.793	120.460	7.883	120.383	7.972	120.292	8.031	120.223
I30	8.220	121.860	8.294	121.715	8.363	121.579	8.432	121.442	8.478	121.349
Q31	8.395	123.715	8.492	123.709	8.580	123.688	8.664	123.655	8.721	123.630
D32	7.889	119.891	7.950	119.840	8.009	119.792	8.072	119.741	8.114	119.706
K33	7.255	115.860	7.364	115.818	7.468	115.775	7.570	115.726	7.639	115.691
E34	8.633	114.595	8.722	114.623	8.801	114.662	8.874	114.699	8.921	114.726
G35	8.351	109.114	8.429	109.026	8.501	108.935	8.572	108.833	8.619	108.762
I36	5.988	120.768	6.096	120.608	6.198	120.455	6.300	120.303	6.369	120.199
D39	8.441	114.061	8.507	113.909	8.572	113.785	8.639	113.667	8.686	113.597
Q40	7.708	117.026	7.790	117.030	7.866	117.011	7.942	116.967	7.993	116.929
Q41	7.405	118.651	7.465	118.445	7.524	118.286	7.586	118.152	7.628	118.073
R42	8.303	123.624	8.431	123.457	8.539	123.329	8.633	123.220	8.689	123.152
L43	8.690	124.629	8.759	124.515	8.816	124.468	8.874	124.437	8.911	124.431
I44	8.984	122.331	9.081	122.567	9.169	122.725	9.254	122.823	9.308	122.864

**Tab. 7.8:** Fortsetzung.

AS	278 K		288 K		298 K		308 K		315 K	
	<sup>1</sup> H	<sup>15</sup> N	<sup>1</sup> H	<sup>15</sup> N	<sup>1</sup> H	<sup>15</sup> N	<sup>1</sup> H	<sup>15</sup> N	<sup>1</sup> H	<sup>15</sup> N
F45	8.669	124.347	8.764	124.540	8.859	124.713	8.946	124.842	9.002	124.917
A46	9.010	134.126	9.082	133.883	9.142	133.633	9.195	133.363	9.228	133.173
G47	8.234	106.910	8.267	106.848	8.295	106.775	8.319	106.686	8.333	106.621
K48	7.828	122.325	7.934	122.234	8.034	122.131	8.132	122.012	8.197	121.925
Q49	8.564	123.006	8.618	122.976	8.664	122.923	8.706	122.848	8.732	122.791
L50	8.467	125.981	8.556	125.988	8.631	125.972	8.699	125.934	8.741	125.899
E51	8.330	123.378	8.384	123.370	8.432	123.360	8.478	123.343	8.507	123.329
D52	8.117	120.786	8.166	120.720	8.211	120.650	8.254	120.573	8.284	120.517
R54	7.370	119.883	7.453	119.741	7.532	119.598	7.611	119.446	7.664	119.338
T55	8.682	108.887	8.781	108.929	8.870	108.963	8.956	108.988	9.011	109.004
L56	7.994	118.117	8.091	118.174	8.183	118.229	8.273	118.284	8.334	118.323
S57	8.422	113.730	8.480	113.670	8.535	113.605	8.588	113.530	8.623	113.476
D58	7.816	124.790	7.900	124.744	7.977	124.679	8.051	124.589	8.100	124.523
Y59	7.125	116.118	7.221	116.039	7.312	115.960	7.402	115.872	7.462	115.811
N60	8.015	116.248	8.105	116.202	8.189	116.145	8.270	116.072	8.324	116.017
I61	7.097	119.230	7.180	119.157	7.254	119.080	7.326	118.995	7.374	118.935
Q62	7.654	125.248	7.716	125.231	7.770	125.201	7.820	125.154	7.851	125.112
K63	8.414	120.625	8.461	120.614	8.500	120.591	8.535	120.548	8.555	120.513
E64	9.352	115.020	9.412	114.995	9.465	114.976	9.514	114.959	9.544	114.955
S65	7.582	115.506	7.657	115.359	7.729	115.217	7.800	115.072	7.848	114.973
T66	8.767	117.667	8.824	117.715	8.872	117.747	8.913	117.762	8.937	117.761
L67	9.161	127.748	9.254	127.749	9.340	127.737	9.422	127.711	9.477	127.689
H68	9.145	119.966	9.245	120.051	9.329	120.108	9.406	120.137	9.453	120.150
L69	8.004	123.832	8.111	123.903	8.213	123.981	8.315	124.061	8.383	124.118
V70	9.026	126.312	9.112	126.555	9.184	126.626	9.249	126.579	9.289	126.506
L71	8.059	122.860	8.091	122.923	8.117	122.964	8.138	122.986	8.150	122.994
R72	8.451	123.728	8.534	123.749	8.610	123.734	8.681	123.685	8.721	123.630
L73	8.361	125.127	8.384	124.900	8.401	124.667	8.415	124.426	8.424	124.263
R74	8.431	122.602	8.458	122.368	8.480	122.133	8.501	121.894	8.514	121.731
G75	8.466	111.595	8.493	111.387	8.518	111.191	8.543	111.010	-	-
G76	7.914	115.319	7.953	115.292	7.989	115.258	8.024	115.216	8.048	115.183

**Tab. 7.9:** T12C Tm: Chemische Verschiebungen ( $^1\text{H}$  und  $^{15}\text{N}$ ) der Amidsignale des Proteinrückgrats bei unterschiedlichen Temperaturen [ppm].

AS	278 K		288 K		298 K		308 K		315 K	
	$^1\text{H}$	$^{15}\text{N}$	$^1\text{H}$	$^{15}\text{N}$	$^1\text{H}$	$^{15}\text{N}$	$^1\text{H}$	$^{15}\text{N}$	$^1\text{H}$	$^{15}\text{N}$
Q2	8.940	123.406	8.966	123.443	8.987	123.488	9.006	123.542	9.016	123.578
I3	8.136	115.609	8.220	115.693	8.302	115.791	8.383	115.901	8.436	115.978
F4	8.508	117.642	8.536	117.765	8.578	117.882	8.626	118.004	8.659	118.088
V5	8.416	120.101	8.525	120.157	8.629	120.213	8.733	120.276	8.802	120.325
K6	-	-	8.543	128.662	8.620	128.677	8.713	128.680	8.776	128.676
T7	7.528	117.221	7.688	117.118	7.843	116.999	7.997	116.864	8.098	116.766
L8	8.471	120.632	8.517	120.485	8.569	120.370	8.624	120.281	8.660	120.239
T9	6.649	105.297	6.852	105.386	7.045	105.467	7.228	105.539	7.346	105.586
G10	6.325	108.844	6.623	108.952	6.887	109.037	7.137	109.099	7.297	109.126
K11	5.921	120.496	6.162	120.451	6.389	120.404	6.602	120.343	6.738	120.294
C12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I13	-	-	8.482	123.955	8.576	123.609	8.699	123.594	8.763	123.494
T14	7.980	120.042	8.037	119.976	8.085	119.877	8.127	119.759	8.152	119.675
L15	8.424	124.795	8.499	124.842	8.569	124.860	8.637	124.860	8.681	124.85
E16	7.951	122.650	8.027	122.667	8.093	122.675	8.154	122.676	8.190	122.671
V17	8.970	117.839	9.016	117.850	9.058	117.848	9.098	117.836	9.124	117.821
E18	8.694	119.283	8.783	119.460	8.866	119.628	8.947	119.792	8.998	119.899
S20	7.220	103.647	7.259	103.715	7.301	103.788	7.345	103.871	7.376	103.931
D21	8.293	124.662	8.318	124.502	8.344	124.344	8.372	124.187	8.391	124.081
T22	8.065	109.545	8.079	109.410	8.098	109.284	8.122	109.163	8.139	109.084
I23	8.772	121.686	8.798	121.687	8.826	121.685	8.857	121.682	8.878	121.68
N25	8.042	121.872	8.081	121.769	8.121	121.650	8.163	121.517	8.191	121.420
V26	8.256	122.716	8.286	122.607	8.319	122.495	8.355	122.382	8.380	122.302
K27	8.672	119.506	8.710	119.396	8.750	119.288	8.792	119.180	8.820	119.106
A28	7.916	123.831	7.990	123.731	8.063	123.629	8.137	123.523	8.187	123.450
K29	7.796	120.566	7.864	120.480	7.933	120.387	8.004	120.286	8.052	120.211
I30	8.270	121.881	8.320	121.716	8.372	121.564	8.426	121.416	8.462	121.318
Q31	8.415	123.711	8.496	123.693	8.576	123.710	8.649	123.627	8.697	123.598
D32	7.882	119.836	7.934	119.784	7.989	119.735	8.048	119.688	8.088	119.657
K33	7.184	115.765	7.291	115.727	7.397	115.688	7.503	115.647	7.574	115.618
E34	8.512	114.480	8.605	114.514	8.691	114.558	8.774	114.610	8.827	114.645
G35	8.262	109.026	8.345	108.945	8.425	108.861	8.504	108.772	8.556	108.708
I36	5.911	120.687	6.020	120.531	6.127	120.384	6.235	120.240	6.307	120.142
D39	8.512	114.097	8.563	113.936	8.616	113.801	8.672	113.681	8.712	113.609
Q40	7.766	117.080	7.835	117.071	7.901	117.041	7.968	116.995	8.013	116.954
Q41	7.517	118.784	7.553	118.552	7.593	118.372	7.639	118.224	7.671	118.137
R42	8.506	123.781	8.648	123.673	8.713	123.502	8.770	123.357	8.804	123.268
L43	9.296	125.293	9.260	125.076	9.234	124.919	9.216	124.805	9.206	124.747
I44	-	-	-	-	10.166	123.682	10.062	123.601	10.001	123.535
F45	-	-	10.506	126.623	10.349	126.476	10.200	126.328	10.108	126.229



**Tab. 7.9:** Fortsetzung.

AS	278 K		288 K		298 K		308 K		315 K	
	<sup>1</sup> H	<sup>15</sup> N	<sup>1</sup> H	<sup>15</sup> N	<sup>1</sup> H	<sup>15</sup> N	<sup>1</sup> H	<sup>15</sup> N	<sup>1</sup> H	<sup>15</sup> N
A46	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K48	-	-	9.563	123.529	9.440	123.246	9.331	122.961	9.263	122.768
Q49	9.361	123.889	9.309	123.734	9.257	123.564	9.206	123.388	9.172	123.268
L50	9.353	126.848	9.307	126.725	9.266	126.595	9.229	126.456	9.204	126.358
E51	8.876	123.884	8.849	123.807	8.827	123.731	8.808	123.656	8.795	123.605
D52	8.442	121.128	8.439	121.012	8.440	120.895	8.444	120.776	8.448	120.696
R54	7.722	120.231	7.751	120.039	7.784	119.849	7.819	119.656	7.844	119.525
T55	9.111	109.268	9.146	109.250	9.179	109.229	9.212	109.209	9.233	109.196
L56	8.492	118.678	8.513	118.649	8.538	118.628	8.567	118.617	8.588	118.614
S57	8.987	114.359	8.963	114.208	8.944	114.060	8.929	113.912	8.921	113.814
D58	8.392	125.358	8.394	125.231	8.398	125.090	8.404	124.938	8.408	124.830
Y59	7.932	116.927	7.915	116.735	7.905	116.553	7.900	116.373	7.899	116.255
N60	8.971	117.431	8.930	117.223	8.896	117.021	8.868	116.817	8.852	116.68
I61	8.303	120.695	8.221	120.420	8.146	120.158	8.078	119.903	8.037	119.737
Q62	9.661	126.882	9.437	126.649	9.244	126.416	9.064	126.181	8.951	126.022
K63	9.323	121.594	9.242	121.445	9.169	121.297	9.100	121.145	9.056	121.043
E64	9.685	115.487	9.669	115.363	9.656	115.252	9.648	115.162	9.645	115.114
S65	8.591	116.551	8.485	116.207	8.398	115.898	8.331	115.613	8.295	115.434
T66	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L67	-	-	-	-	9.476	128.116	9.497	127.983	9.509	127.895
H68	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L69	-	-	8.186	124.378	8.242	124.314	8.285	124.309	8.322	124.317
V70	-	-	9.474	126.950	9.466	126.921	9.465	126.796	9.468	126.68
L71	8.046	122.983	8.070	123.014	8.093	123.030	8.116	123.036	8.130	123.035
R72	8.576	123.889	8.578	123.792	8.646	123.772	8.712	123.720	8.754	123.667
L73	8.390	125.150	8.407	124.922	8.422	124.689	8.435	124.452	8.443	124.292
R74	8.403	122.583	8.439	122.357	8.469	122.128	8.497	121.895	8.514	121.735
G75	8.445	111.580	8.480	111.381	8.512	111.191	8.544	111.003	-	-
G76	7.901	115.299	7.945	115.278	7.985	115.248	7.981	115.225	8.050	115.184

**Tab. 7.10:** T12C Tm: PCSs ( $^1\text{H}$  und  $^{15}\text{N}$ ) der Amidsignale des Proteinerückgrats [ppm] in Abhängigkeit von der Temperatur. Als Referenz diente die diamagnetische Probe T12C Lu. Die zugrunde liegenden chemischen Verschiebungen sind den Tabellen 7.8 und 7.9 zu entnehmen.

AS	278 K		288 K		298 K		308 K		315 K	
	$^1\text{H}$	$^{15}\text{N}$	$^1\text{H}$	$^{15}\text{N}$	$^1\text{H}$	$^{15}\text{N}$	$^1\text{H}$	$^{15}\text{N}$	$^1\text{H}$	$^{15}\text{N}$
Q2	0.092	0.056	0.061	0.035	0.036	0.013	0.015	0.000	0.002	-0.010
I3	-0.032	-0.024	-0.064	-0.057	-0.089	-0.085	-0.111	-0.105	-0.125	-0.117
F4	-0.138	-0.364	-0.186	-0.372	-0.215	-0.380	-0.236	-0.382	-0.248	-0.382
V5	-0.665	-0.572	-0.646	-0.568	-0.625	-0.561	-0.603	-0.545	-0.588	-0.533
K6	-	-	-0.482	-0.819	-0.493	-0.776	-0.484	-0.722	-0.475	-0.684
T7	-1.252	-1.096	-1.147	-0.997	-1.044	-0.898	-0.944	-0.793	-0.879	-0.722
L8	-0.604	-0.756	-0.552	-0.693	-0.496	-0.625	-0.438	-0.551	-0.399	-0.499
T9	-0.838	-0.868	-0.723	-0.739	-0.612	-0.618	-0.509	-0.500	-0.453	-0.434
G10	-1.514	-1.439	-1.293	-1.214	-1.102	-1.011	-0.924	-0.817	-0.812	-0.699
K11	-1.107	-1.275	-0.959	-1.120	-0.821	-0.971	-0.696	-0.832	-0.619	-0.745
C12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I13	-	-	-1.032	-1.147	-0.999	-1.270	-0.934	-1.079	-0.909	-1.059
T14	-0.647	-0.629	-0.628	-0.616	-0.611	-0.607	-0.597	-0.597	-0.590	-0.590
L15	-0.263	-0.256	-0.271	-0.263	-0.276	-0.272	-0.280	-0.271	-0.281	-0.273
E16	-0.030	-0.047	-0.044	-0.061	-0.055	-0.072	-0.064	-0.078	-0.070	-0.082
V17	0.144	0.148	0.109	0.114	0.079	0.082	0.052	0.058	0.037	0.043
E18	0.246	0.227	0.202	0.189	0.165	0.156	0.132	0.129	0.110	0.112
S20	0.321	0.313	0.271	0.266	0.229	0.220	0.188	0.185	0.163	0.162
D21	0.332	0.313	0.279	0.265	0.233	0.220	0.191	0.184	0.164	0.162
T22	0.261	0.272	0.218	0.227	0.181	0.185	0.148	0.152	0.126	0.131
I23	0.380	0.367	0.320	0.308	0.267	0.254	0.220	0.209	0.189	0.182
N25	0.232	0.160	0.191	0.128	0.156	0.099	0.125	0.078	0.105	0.064
V26	0.261	0.207	0.212	0.167	0.171	0.128	0.135	0.099	0.113	0.080
K27	0.232	0.202	0.186	0.162	0.148	0.125	0.115	0.097	0.093	0.079
A28	0.137	0.086	0.108	0.066	0.083	0.046	0.063	0.035	0.050	0.030
K29	0.097	0.038	0.071	0.020	0.050	0.004	0.032	-0.006	0.021	-0.012
I30	0.050	0.021	0.026	0.001	0.009	-0.015	-0.006	-0.026	-0.016	-0.031
Q31	0.020	-0.004	0.004	-0.016	-0.004	0.022	-0.015	-0.028	-0.024	-0.032
D32	-0.007	-0.055	-0.016	-0.056	-0.020	-0.057	-0.024	-0.053	-0.026	-0.049
K33	-0.071	-0.095	-0.073	-0.091	-0.071	-0.087	-0.067	-0.079	-0.065	-0.073
E34	-0.121	-0.115	-0.117	-0.109	-0.110	-0.104	-0.100	-0.089	-0.094	-0.081
G35	-0.089	-0.088	-0.084	-0.081	-0.076	-0.074	-0.068	-0.061	-0.063	-0.054
I36	-0.077	-0.081	-0.076	-0.077	-0.071	-0.071	-0.065	-0.063	-0.062	-0.057
D39	0.071	0.036	0.056	0.027	0.044	0.016	0.033	0.014	0.026	0.012
Q40	0.058	0.054	0.045	0.041	0.035	0.030	0.026	0.028	0.020	0.025
Q41	0.112	0.133	0.088	0.107	0.069	0.086	0.053	0.072	0.043	0.064
R42	0.203	0.157	0.217	0.216	0.174	0.173	0.137	0.137	0.115	0.116

**Tab. 7.10:** Fortsetzung.

AS	278 K		288 K		298 K		308 K		315 K	
	<sup>1</sup> H	<sup>15</sup> N	<sup>1</sup> H	<sup>15</sup> N	<sup>1</sup> H	<sup>15</sup> N	<sup>1</sup> H	<sup>15</sup> N	<sup>1</sup> H	<sup>15</sup> N
L43	0.606	0.664	0.501	0.561	0.418	0.451	0.342	0.368	0.295	0.316
I44	-	-	-	-	0.997	0.957	0.808	0.778	0.693	0.671
F45	-	-	1.742	2.083	1.490	1.763	1.254	1.486	1.106	1.312
A46	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K48	-	-	1.629	1.295	1.406	1.115	1.199	0.949	1.066	0.843
Q49	0.797	0.883	0.691	0.758	0.593	0.641	0.500	0.540	0.440	0.477
L50	0.886	0.867	0.751	0.737	0.635	0.623	0.530	0.522	0.463	0.459
E51	0.546	0.506	0.465	0.437	0.395	0.371	0.330	0.313	0.288	0.276
D52	0.325	0.342	0.273	0.292	0.229	0.245	0.190	0.203	0.164	0.179
R54	0.352	0.348	0.298	0.298	0.252	0.251	0.208	0.210	0.180	0.187
T55	0.429	0.381	0.365	0.321	0.309	0.266	0.256	0.221	0.222	0.192
L56	0.498	0.561	0.422	0.475	0.355	0.399	0.294	0.333	0.254	0.291
S57	0.565	0.629	0.483	0.538	0.409	0.455	0.341	0.382	0.298	0.338
D58	0.576	0.568	0.494	0.487	0.421	0.411	0.353	0.349	0.308	0.307
Y59	0.807	0.809	0.694	0.696	0.593	0.593	0.498	0.501	0.437	0.444
N60	0.956	1.183	0.825	1.021	0.707	0.876	0.598	0.745	0.528	0.663
I61	1.206	1.465	1.041	1.263	0.892	1.078	0.752	0.908	0.663	0.802
Q62	2.007	1.634	1.721	1.418	1.474	1.215	1.244	1.027	1.100	0.910
K63	0.909	0.969	0.781	0.831	0.669	0.706	0.565	0.597	0.501	0.530
E64	0.333	0.467	0.257	0.368	0.191	0.276	0.134	0.203	0.101	0.159
S65	1.009	1.045	0.828	0.848	0.669	0.681	0.531	0.541	0.447	0.461
T66	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L67	-	-	-	-	0.136	0.379	0.075	0.272	0.032	0.206
H68	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L69	-	-	0.075	0.475	0.029	0.333	-0.030	0.248	-0.061	0.199
V70	-	-	0.362	0.395	0.282	0.295	0.216	0.217	0.179	0.174
L71	-0.013	0.123	-0.021	0.091	-0.024	0.066	-0.022	0.050	-0.020	0.041
R72	0.125	0.161	0.044	0.043	0.036	0.038	0.031	0.035	0.033	0.037
L73	0.029	0.023	0.023	0.022	0.021	0.022	0.020	0.026	0.019	0.029
R74	-0.028	-0.019	-0.019	-0.011	-0.011	-0.005	-0.004	0.001	0.000	0.004
G75	-0.021	-0.015	-0.013	-0.006	-0.006	0.000	0.001	-0.007	-	-
G76	-0.013	-0.020	-0.008	-0.014	-0.004	-0.010	-0.043	0.009	0.002	0.001

**Tab. 7.11:** T12C:  $^1J$  N-H Kopplungen des Proteinrückgrats der isotropen und anisotropen Proben und deren experimentelle und zurück berechnete RDCs (PALES), mit den entsprechenden Abweichungen [Hz]. Die grau unterlegten Felder markieren RDCs, die auf Grund von überlappten oder schwachen Signalen, ebenso wie die drei C-terminalen Reste nicht in den Berechnungen berücksichtigt wurden.

AS	Terbium					Thulium			
	isotrop	anisotrop	RDC (exp)	RDC (ber)	$\Delta$ RDC	anisotrop	RDC (exp)	RDC (ber)	$\Delta$ RDC
Q2	-92.83	-99.43	-6.60	-7.67	1.07	-94.22	-1.39	-0.23	-1.16
I3	-92.15	-86.93	5.22	4.97	0.25	-98.42	-6.27	-5.76	-0.51
F4	-93.25	-78.81	14.44	14.62	-0.18	-102.90	-9.65	-9.51	-0.14
V5	-92.15	-74.34	17.81	17.15	0.66	-102.08	-9.93	-9.85	-0.08
K6	-92.95	-	-	-	-	-99.88	-6.93	-7.34	0.41
T7	-94.05	-82.73	11.32	-	-	-98.87	-4.82	-2.19	-2.63
L8	-92.34	-98.60	-6.26	-7.12	0.86	-86.84	5.50	6.05	-0.55
T9	-92.34	-98.01	-5.67	-6.36	0.69	-86.02	6.32	8.16	-1.85
G10	-92.95	-	-	-	-	-89.48	3.47	2.76	0.71
K11	-93.25	-	-	-	-	-95.23	-1.98	-1.74	-0.24
C12	-92.77	-	-	-	-	-	-	-	-
I13	-92.70	-	-	-	-	-101.97	-9.27	-9.66	0.39
T14	-92.46	-79.27	13.19	13.39	-0.20	-100.89	-8.43	-8.48	0.05
L15	-93.49	-87.20	6.29	7.33	-1.04	-99.15	-5.66	-6.54	0.88
E16	-91.79	-92.50	-0.71	-1.43	0.72	-97.15	-5.36	-3.47	-1.89
V17	-93.07	-99.88	-6.81	-7.02	0.21	-91.85	1.22	1.84	-0.62
E18	-91.92	-97.96	-6.04	-6.88	0.84	-93.13	-1.21	-0.55	-0.66
S20	-91.49	-81.19	10.30	10.18	0.12	-98.88	-7.39	-7.35	-0.04
D21	-94.11	-100.16	-6.05	-6.01	-0.04	-89.49	4.62	3.74	0.88
T22	-93.07	-87.30	5.77	7.71	-1.94	-96.14	-3.07	-4.80	1.73
I23	-93.37	-80.00	13.37	12.03	1.34	-100.43	-7.06	-5.16	-1.90
N25	-93.99	-89.48	4.51	4.75	-0.24	-97.78	-3.79	-3.66	-0.13
V26	-93.25	-78.90	14.35	13.07	1.28	-100.62	-7.37	-6.94	-0.43
K27	-93.62	-86.66	6.96	7.36	-0.40	-94.69	-1.07	-1.15	0.08
A28	-93.92	-93.50	0.42	1.03	-0.61	-92.77	1.15	0.72	0.43
K29	-93.61	-83.46	10.15	9.81	0.34	-100.43	-6.82	-6.78	-0.04
I30	-93.32	-82.73	10.59	11.75	-1.16	-97.33	-4.01	-5.04	1.03
Q31	-93.56	-91.85	1.71	1.38	0.33	-90.94	2.62	2.27	0.36
D32	-93.68	-92.13	1.55	1.97	-0.42	-94.23	-0.55	-1.33	0.78
K33	-92.58	-79.99	12.59	11.64	0.95	-100.34	-7.76	-6.89	-0.87
E34	-90.33	-85.93	4.40	4.64	-0.24	-89.48	0.85	0.67	0.18
G35	-93.32	-102.62	-9.30	-10.27	0.97	-87.84	5.48	5.78	-0.30
I36	-90.76	-98.70	-7.94	-7.30	-0.64	-92.03	-1.27	-1.03	-0.24
D39	-93.25	-86.47	6.78	7.93	-1.15	-98.51	-5.26	-6.34	1.08

**Tab. 7.11:** Fortsetzung.

AS	Terbium					Thulium			
	isotrop	anisotrop	RDC (exp)	RDC (ber)	$\Delta$ RDC	anisotrop	RDC (exp)	RDC (ber)	$\Delta$ RDC
Q40	-92.03	-79.09	12.94	12.23	0.71	-99.70	-7.67	-7.52	-0.15
Q41	-93.49	-101.88	-8.39	-8.21	-0.18	-82.46	11.03	10.20	0.83
R42	-93.00	-96.27	-3.27	-1.66	-1.61	-84.92	8.08	6.48	1.60
L43	-92.83	-94.96	-2.13	-3.88	1.75	-85.56	7.27	7.73	-0.46
I44	-91.98	-	-	-	-	-94.68	-2.70	-2.57	-0.13
F45	-92.58	-	-	-	-	-97.51	-4.93	-4.66	-0.27
G47	-92.34	-	-	-	-	-	-	-	-
K48	-92.94	-	-	-	-	-98.97	-6.03	-5.00	-1.03
Q49	-92.77	-77.99	14.78	15.77	-0.99	-100.98	-8.21	-9.49	1.28
L50	-94.04	-90.39	3.65	3.93	-0.28	-92.22	1.82	1.21	0.61
E51	-92.52	-96.51	-3.99	-	-	-95.78	-3.26	-2.10	-1.16
D52	-92.64	-97.42	-4.78	-2.92	-1.86	-92.68	-0.04	-2.21	2.17
R54	-92.83	-100.88	-8.05	-9.02	0.97	-86.20	6.63	7.38	-0.75
T55	-91.97	-83.10	8.87	8.85	0.02	-98.34	-6.37	-5.88	-0.49
L56	-94.16	-83.28	10.88	10.24	0.64	-100.06	-5.90	-5.97	0.07
S57	-93.50	-90.49	3.01	1.51	1.50	-93.77	-0.27	0.52	-0.79
D58	-94.65	-90.86	3.79	3.53	0.26	-99.52	-4.87	-4.87	0.00
Y59	-92.28	-76.99	15.29	14.80	0.49	-101.52	-9.24	-9.36	0.11
N60	-93.56	-103.17	-9.61	-8.53	-1.08	-82.65	10.91	10.87	0.04
I61	-92.71	-101.43	-8.72	-7.36	-1.36	-84.10	8.61	6.96	1.65
Q62	-93.01	-97.42	-4.41	-4.09	-0.32	-87.11	5.90	5.87	0.03
K63	-93.07	-103.54	-10.47	-9.30	-1.17	-88.30	4.77	4.70	0.07
E64	-92.65	-90.85	1.80	2.05	-0.25	-93.68	-1.03	-1.35	0.32
S65	-93.68	-	-	-	-	-	-	-	-
T66	-91.36	-	-	-	-	-	-	-	-
L67	-92.89	-	-	-	-	-106.18	-13.29	-10.28	-3.01
H68	-93.19	-	-	-	-	-	-	-	-
L69	-92.95	-	-	-	-	-89.45	3.50	4.05	-0.55
V70	-93.01	-101.15	-8.14	-8.15	0.01	-83.83	9.18	10.84	-1.66
L71	-92.95	-97.42	-4.47	-	-	-84.37	8.58	9.87	-1.29
R72	-92.77	-89.57	3.20	1.63	1.57	-93.41	-0.64	1.06	-1.70
L73	-93.07	-88.93	4.14	5.67	-1.53	-94.68	-1.61	-2.49	0.88

**Tab. 7.12:** S57C:  $^1J$  N-H Kopplungen des Proteinrückgrats der isotropen und anisotropen Proben und deren experimentelle und die berechnete RDCs (PALES) mit den entsprechenden Abweichungen [Hz]. Die grau unterlegten Felder markieren RDCs, die auf Grund von überlappten oder schwachen Signalen, ebenso wie die drei C-terminalen Reste nicht in den Berechnungen berücksichtigt wurden.

AS	Terbium					Thulium			
	isotrop	anisotrop	RDC (exp)	RDC (ber)	$\Delta$ RDC	anisotrop	RDC (exp)	RDC (ber)	$\Delta$ RDC
Q2	-93.48	-	-	-	-	-	-	-	-
I3	-92.12	-	-	-	-	-	-	-	-
F4	-93.48	-95.30	-1.82	-2.16	0.34	-	-	-	-
V5	-92.82	-94.56	-1.74	-2.07	0.33	-93.13	-0.31	-	-
K6	-93.39	-98.57	-5.18	-4.68	-0.50	-94.78	-1.39	-2.66	1.27
T7	-94.07	-97.30	-3.23	-4.30	1.07	-89.76	4.31	4.76	-0.45
L8	-92.90	-93.92	-1.02	-1.48	0.46	-88.12	4.78	4.09	0.69
T9	-91.99	-89.09	2.90	2.80	0.10	-93.22	-1.23	-0.81	-0.42
G10	-91.68	-99.03	-7.35	-6.82	-0.53	-90.12	1.56	3.23	-1.67
K11	-93.24	-93.01	0.23	0.33	-0.10	-87.57	5.67	5.74	-0.07
T12	-92.23	-97.20	-4.97	-5.00	0.03	-89.12	3.11	1.29	1.82
I13	-92.78	-94.10	-1.32	-1.12	-0.20	-93.23	-0.45	-0.81	0.36
T14	-92.83	-95.95	-3.12	-3.48	0.36	-97.88	-5.05	-3.94	-1.11
L15	-93.51	-93.74	-0.23	0.12	-0.35	-	-	-	-
E16	-93.19	-	-	-	-	-	-	-	-
V17	-93.68	-	-	-	-	-	-	-	-
E18	-91.86	-	-	-	-	-	-	-	-
S20	-92.31	-	-	-	-	-	-	-	-
D21	-93.95	-	-	-	-	-	-	-	-
T22	-93.65	-	-	-	-	-	-	-	-
I23	-93.71	-99.62	-5.91	-5.74	-0.17	-	-	-	-
N25	-94.09	-	-	-	-	-	-	-	-
V26	-93.19	-	-	-	-	-90.67	2.52	-	-
K27	-94.47	-100.49	-6.02	-6.78	0.76	-94.32	0.15	-0.07	0.22
A28	-94.36	-100.13	-5.77	-5.33	-0.44	-96.96	-2.60	-3.03	0.43
K29	-93.58	-98.21	-4.63	-4.04	-0.59	-98.70	-5.12	-4.27	-0.85
I30	-93.21	-99.38	-6.17	-5.79	-0.38	-93.96	-0.75	-1.19	0.44
Q31	-93.52	-100.76	-7.24	-6.26	-0.98	-95.32	-1.80	-1.53	-0.27
D32	-93.72	-99.21	-5.49	-4.68	-0.81	-97.33	-3.61	-3.84	0.23
K33	-93.10	-97.39	-4.29	-4.60	0.31	-95.96	-2.86	-3.59	0.73
E34	-90.94	-97.30	-6.36	-6.83	0.47	-91.03	-0.09	-0.52	0.43
G35	-94.40	-90.10	4.30	1.81	2.48	-96.51	-2.11	-2.88	0.77
I36	-90.94	-89.18	1.76	2.23	-0.47	-86.84	4.10	3.03	1.07
D39	-93.76	-92.73	1.03	0.74	0.29	-96.42	-2.66	-3.62	0.96

Tab. 7.12: Fortsetzung.

AS	Terbium					Thulium			
	isotrop	anisotrop	RDC (exp)	RDC (ber)	$\Delta$ RDC	anisotrop	RDC (exp)	RDC (ber)	$\Delta$ RDC
Q40	-91.59	-87.18	4.41	4.85	-0.44	-93.68	-2.09	-2.11	0.02
Q41	-92.93	-93.19	-0.26	-0.49	0.23	-91.68	1.25	1.59	-0.34
R42	-92.89	-99.21	-6.32	-6.54	0.22	-93.86	-0.97	-	-
L43	-89.61	-99.03	-9.42	-	-	-89.67	-0.06	-	-
I44	-92.67	-99.03	-6.36	-6.41	0.05	-91.31	1.36	0.80	0.56
F45	-95.36	-96.84	-1.48	-	-	-89.21	6.15	-	-
A46	-93.67	-99.03	-5.36	-5.48	0.12	-91.86	1.81	1.82	-0.01
G47	-92.74	-97.76	-5.02	-4.07	-0.95	-97.14	-4.40	-2.81	-1.59
K48	-92.41	-89.00	3.41	3.79	-0.38	-88.94	3.47	2.65	0.82
Q49	-93.27	-91.64	1.63	1.00	0.63	-94.05	-0.78	-0.33	-0.45
L50	-93.38	-100.67	-7.29	-6.82	-0.47	-93.50	-0.12	-0.51	0.39
E51	-91.96	-83.71	8.25	-	-	-	-	-	-
D52	-92.61	-88.18	4.43	5.30	-0.87	-92.40	0.21	1.37	-1.16
R54	-94.15	-94.11	0.04	-1.17	1.21	-	-	-	-
T55	-92.45	-	-	-	-	-	-	-	-
L56	-94.25	-	-	-	-	-	-	-	-
C57	-94.37	-	-	-	-	-	-	-	-
D58	-93.85	-	-	-	-	-	-	-	-
Y59	-93.61	-90.18	3.43	1.31	2.12	-91.67	1.94	-	-
N60	-93.69	-95.38	-1.69	-2.15	0.46	-90.40	3.29	2.43	0.86
I61	-92.97	-95.02	-2.05	-2.41	0.36	-	-	-	-
Q62	-92.99	-89.09	3.90	4.44	-0.54	-	-	-	-
K63	-93.32	-	-	-	-	-	-	-	-
E64	-93.64	-	-	-	-	-	-	-	-
S65	-94.38	-	-	-	-	-	-	-	-
T66	-91.74	-91.55	0.19	0.32	-0.13	-97.15	-5.41	-4.12	-1.29
L67	-93.52	-92.83	0.69	0.75	-0.05	-95.96	-2.44	-3.21	0.77
H68	-92.81	-99.39	-6.58	-6.53	-0.05	-92.67	0.14	0.12	0.02
L69	-93.02	-98.85	-5.83	-6.40	0.57	-89.21	3.81	4.54	-0.73
V70	-93.55	-98.12	-4.57	-3.41	-1.16	-93.22	0.33	1.14	-0.81
L71	-93.33	-94.01	-0.68	0.27	-0.95	-91.31	2.02	1.01	1.01
R72	-93.51	-88.63	4.88	5.68	-0.80	-95.96	-2.45	-2.55	0.10
L73	-92.91	-92.83	0.08	-	-	-95.50	-2.59	-2.83	0.24

**Tab. 7.13:**  $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -PCS von T12C Tb und T12C Tm [ppm], berechnet im RDC-Tensor.  
 Zusätzlich sind die Abweichungen  $\Delta$  von den experimentellen Werten gegeben  
 (siehe Tabellen 7.2 und 7.3).

AS	T12C Tb				T12C Tm			
	$^1\text{H}$ (ber)	$\Delta$ $^1\text{H}$	$^{15}\text{N}$ (ber)	$\Delta$ $^{15}\text{N}$	$^1\text{H}$ (ber)	$\Delta$ $^1\text{H}$	$^{15}\text{N}$ (ber)	$\Delta$ $^{15}\text{N}$
Q2	0.007	-0.229	0.011	-0.167	0.063	0.027	0.072	0.059
I3	0.102	-0.123	0.082	-0.145	0.003	0.093	0.037	0.121
F4	0.199	0.193	0.281	0.107	-0.002	0.213	-0.165	0.214
V5	0.621	0.220	0.591	0.338	-0.519	0.106	-0.459	0.103
K6	-	-	-	-	-0.717	-0.224	-0.857	-0.081
T7	1.481	0.241	1.316	0.174	-0.891	0.153	-0.790	0.108
L8	0.512	-0.260	0.747	-0.325	-0.371	0.125	-0.456	0.170
T9	0.820	-0.180	0.868	-0.191	-0.435	0.177	-0.428	0.190
G10	1.635	-0.108	1.643	0.047	-0.700	0.403	-0.680	0.332
K11	-	-	-	-	-0.721	0.101	-0.807	0.164
C12	-	-	-	-	-	-	-	-
I13	0.859	-0.134	0.815	-0.467	-0.705	0.289	-0.677	0.471
T14	0.458	-0.399	0.468	-0.371	-0.401	0.210	-0.416	0.192
L15	0.236	-0.130	0.231	-0.131	-0.166	0.110	-0.164	0.108
E16	0.094	-0.065	0.090	-0.065	-0.027	0.028	-0.019	0.052
V17	-0.005	-0.024	-0.007	0.031	0.108	0.029	0.106	0.024
E18	-0.080	0.036	-0.079	0.078	0.193	0.028	0.193	0.037
S20	-0.128	0.054	-0.141	0.034	0.242	0.013	0.264	0.044
D21	-0.134	0.057	-0.130	0.087	0.257	0.024	0.242	0.021
T22	-0.120	0.043	-0.138	0.012	0.202	0.021	0.232	0.047
I23	-0.206	0.046	-0.197	0.022	0.300	0.033	0.291	0.036
N25	-0.120	0.030	-0.107	-0.009	0.178	0.022	0.159	0.059
V26	-0.119	0.041	-0.096	0.013	0.200	0.029	0.171	0.042
K27	-0.116	0.028	-0.092	0.024	0.167	0.019	0.142	0.017
A28	-0.063	0.018	-0.048	-0.011	0.097	0.014	0.078	0.032
K29	-0.015	0.020	0.002	-0.027	0.064	0.014	0.043	0.038
I30	0.023	0.015	0.050	0.000	0.027	0.019	0.000	0.015
Q31	0.022	0.008	0.042	0.000	0.003	0.010	-0.017	0.079
D32	0.046	0.016	0.057	-0.014	-0.018	0.002	-0.029	0.029
K33	0.106	0.013	0.114	0.006	-0.064	0.007	-0.073	0.014
E34	0.136	-0.002	0.154	0.070	-0.093	0.017	-0.108	-0.005
G35	0.094	0.015	0.097	0.068	-0.070	0.007	-0.075	-0.001
I36	0.070	0.000	0.052	0.021	-0.063	0.008	-0.055	0.016
D39	-0.097	-0.028	-0.114	-0.086	0.041	-0.002	0.050	0.035
Q40	-0.118	-0.052	-0.138	-0.082	0.030	-0.005	0.034	0.004
Q41	-0.164	-0.068	-0.178	-0.038	0.054	-0.015	0.047	-0.039
R42	-0.326	-0.108	-0.340	-0.076	0.092	-0.082	0.120	-0.053
L43	-0.484	-0.042	-0.518	-0.027	0.324	-0.094	0.330	-0.122
I44	-0.928	0.146	-1.006	0.008	0.719	-0.278	0.781	-0.176



**Tab. 7.13:** Fortsetzung.

AS	T12C Tb				T12C Tm			
	$^1\text{H}$ (ber)	$\Delta$ $^1\text{H}$	$^{15}\text{N}$ (ber)	$\Delta$ $^{15}\text{N}$	$^1\text{H}$ (ber)	$\Delta$ $^1\text{H}$	$^{15}\text{N}$ (ber)	$\Delta$ $^{15}\text{N}$
F45	-1.579	-0.227	-1.697	-0.247	1.657	0.167	1.943	0.180
A46	-	-	-	-	-	-	-	-
G47	-	-	-	-	-	-	-	-
K48	-	-	-	-	1.661	0.255	1.229	0.114
Q49	-0.766	-0.243	-0.878	-0.296	0.526	-0.067	0.635	-0.007
L50	-0.706	-0.076	-0.651	-0.048	0.627	-0.008	0.605	-0.018
E51	-0.383	-0.016	-0.376	0.011	0.433	0.039	0.400	0.029
D52	-0.238	-0.001	-0.241	0.009	0.229	0.000	0.249	0.004
R54	-0.223	0.015	-0.209	0.058	0.284	0.033	0.275	0.024
T55	-0.231	0.055	-0.231	0.005	0.357	0.048	0.357	0.091
L56	-0.234	0.083	-0.267	0.089	0.417	0.063	0.473	0.073
S57	-0.249	0.114	-0.282	0.126	0.456	0.048	0.520	0.066
D58	-0.283	0.099	-0.300	0.067	0.486	0.066	0.517	0.106
Y59	-0.405	0.142	-0.425	0.115	0.713	0.121	0.738	0.146
N60	-0.429	0.246	-0.491	0.348	0.786	0.079	0.922	0.047
I61	-0.486	0.324	-0.537	0.460	0.995	0.103	1.137	0.060
Q62	-0.569	0.656	-0.479	0.525	1.394	-0.079	1.128	-0.087
K63	-0.250	0.170	-0.252	0.161	0.519	-0.149	0.555	-0.150
E64	-0.053	-0.274	-0.085	-0.290	0.194	0.003	0.238	-0.038
S65	-0.193	0.089	-0.198	0.036	0.618	-0.050	0.663	-0.017
T66	-	-	-	-	-	-	-	-
L67	-	-	-	-	0.352	0.216	0.826	0.447
H68	-	-	-	-	-	-	-	-
L69	-	-	-	-	-0.208	-0.237	-0.024	-0.356
V70	-0.407	-0.104	-0.381	-0.198	0.078	-0.204	0.017	-0.277
L71	-0.341	-0.265	-0.316	-0.205	-0.069	-0.045	-0.044	-0.110
R72	-0.237	-0.114	-0.274	-0.156	-0.004	-0.040	-0.008	-0.046
L73	-0.263	-0.110	-0.231	-0.089	-0.016	-0.037	-0.014	-0.036
R74	-0.163	-0.052	-0.171	-0.049	-0.009	0.002	-0.008	-0.002
G75	-0.146	-0.054	-0.148	-0.029	-0.008	-0.002	-0.007	-0.007
G76	-0.143	-0.037	-0.146	-0.037	-0.007	-0.003	-0.006	0.004

**Tab. 7.14:**  $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -PCS von S57C Tb und S57C Tm [ppm], berechnet im RDC-Tensor.  
 Zusätzlich sind die Abweichungen  $\Delta$  von den experimentellen Werten gegeben  
 (siehe Tabellen 7.4 und 7.5).

AS	S57C Tb				S57C Tm			
	$^1\text{H}$ (ber)	$\Delta$ $^1\text{H}$	$^{15}\text{N}$ (ber)	$\Delta$ $^{15}\text{N}$	$^1\text{H}$ (ber)	$\Delta$ $^1\text{H}$	$^{15}\text{N}$ (ber)	$\Delta$ $^{15}\text{N}$
Q2	-	-	-	-	-	-	-	-
I3	-	-	-	-	-	-	-	-
F4	0.428	-0.298	0.293	-0.323	-0.194	0.215	-0.185	0.257
V5	0.132	-0.219	0.206	-0.204	-0.145	0.123	-0.155	0.144
K6	0.210	-0.120	0.171	-0.122	-0.117	0.075	-0.109	0.086
T7	0.077	-0.077	0.096	-0.100	-0.070	0.052	-0.074	0.041
L8	0.087	-0.043	0.083	-0.043	-0.058	0.033	-0.056	0.036
T9	0.054	-0.035	0.051	-0.053	-0.048	0.022	-0.044	0.021
G10	0.049	-0.036	0.039	-0.034	-0.046	0.027	-0.042	0.010
K11	0.033	-0.038	0.023	-0.061	-0.050	0.035	-0.049	0.029
T12	-0.025	-0.085	-0.006	-0.100	-0.054	0.039	-0.060	0.035
I13	0.033	-0.141	-0.010	-0.107	-0.102	0.077	-0.095	0.101
T14	-0.204	-0.210	-0.177	-0.208	-0.112	0.094	-0.123	0.140
L15	-0.218	-0.655	-0.299	-0.745	-	-	-	-
E16	-	-	-	-	-	-	-	-
V17	-	-	-	-	-	-	-	-
E18	-	-	-	-	-	-	-	-
S20	-	-	-	-	-	-	-	-
D21	-	-	-	-	-	-	-	-
T22	-	-	-	-	-	-	-	-
I23	0.618	-0.137	0.694	-0.118	-	-	-	-
N25	-	-	-	-	-	-	-	-
V26	-	-	-	-	-0.215	-0.225	-0.236	-0.177
K27	0.437	-0.168	0.402	-0.093	-0.154	-0.084	-0.167	-0.003
A28	0.264	-0.169	0.224	-0.156	-0.128	-0.113	-0.127	-0.054
K29	0.232	-0.257	0.164	-0.206	-0.194	0.004	-0.179	0.043
I30	0.193	-0.215	0.136	-0.225	-0.175	0.070	-0.166	0.074
Q31	0.112	-0.121	0.087	-0.091	-0.117	0.037	-0.110	0.078
D32	0.036	-0.094	0.019	-0.062	-0.114	0.074	-0.104	0.100
K33	-0.014	-0.105	-0.032	-0.070	-0.119	0.112	-0.109	0.122
E34	0.010	-0.080	-0.005	-0.072	-0.095	0.076	-0.088	0.074
G35	0.016	-0.039	0.016	-0.068	-0.076	0.056	-0.069	0.055
I36	0.047	-0.054	0.047	-0.049	-0.069	0.035	-0.062	0.019
D39	0.095	-0.028	0.106	-0.051	-0.029	-0.027	-0.029	0.012
Q40	0.099	-0.045	0.100	-0.097	-0.035	-0.009	-0.032	0.005
Q41	0.133	-0.051	0.132	-0.106	-0.045	-0.002	-0.047	-0.007
R42	0.178	-0.059	0.187	-0.129	-0.066	0.012	-0.063	-0.013
L43	0.291	-0.066	0.289	-0.112	-0.085	0.007	-0.094	-0.030
I44	0.339	-0.063	0.347	-0.051	-0.132	0.033	-0.130	0.052

**Tab. 7.14:** Fortsetzung.

AS	S57C Tb				S57C Tm			
	$^1\text{H}$ (ber)	$\Delta$ $^1\text{H}$	$^{15}\text{N}$ (ber)	$\Delta$ $^{15}\text{N}$	$^1\text{H}$ (ber)	$\Delta$ $^1\text{H}$	$^{15}\text{N}$ (ber)	$\Delta$ $^{15}\text{N}$
F45	0.389	-0.057	0.411	-0.095	-0.166	0.008	-0.177	-0.011
A46	0.374	-0.042	0.368	-0.053	-0.185	0.023	-0.192	0.025
G47	0.270	-0.005	0.259	-0.009	-0.133	0.000	-0.133	-0.003
K48	0.298	0.004	0.266	-0.001	-0.145	-0.025	-0.123	-0.056
Q49	0.230	-0.008	0.258	-0.033	-0.067	-0.047	-0.080	-0.007
L50	0.358	-0.037	0.352	0.018	-0.100	-0.008	-0.088	0.014
E51	0.346	-0.018	0.332	-0.051	-	-	-	-
D52	0.225	-0.031	0.258	-0.107	0.047	-0.041	0.052	-0.067
R54	0.290	-0.058	0.254	-0.032	-	-	-	-
T55	-	-	-	-	-	-	-	-
L56	1.887	-0.146	1.701	-0.052	-	-	-	-
C57	-	-	-	-	-	-	-	-
D58	-	-	-	-	-	-	-	-
Y59	0.922	-0.237	0.743	-0.260	-0.594	0.226	-0.551	0.256
N60	0.821	-0.481	0.868	-0.494	-1.327	-0.068	-1.287	-0.095
I61	1.657	-0.056	1.558	-0.058	-	-	-	-
Q62	1.449	-0.067	1.866	-0.048	-	-	-	-
K63	-	-	-	-	-	-	-	-
E64	-	-	-	-	-	-	-	-
S65	-	-	-	-	-	-	-	-
T66	0.486	-0.072	0.496	-0.100	-0.145	0.135	-0.153	0.191
L67	0.451	-0.137	0.475	-0.126	-0.190	0.129	-0.193	0.142
H68	0.376	-0.057	0.342	-0.047	-0.158	0.050	-0.147	0.105
L69	0.202	-0.076	0.225	-0.081	-0.101	0.046	-0.106	0.015
V70	0.190	-0.056	0.172	-0.010	-0.079	0.026	-0.075	0.055
L71	0.107	-0.047	0.113	-0.057	-0.050	0.026	-0.051	0.014
R72	0.095	-0.045	0.091	-0.103	-0.038	0.018	-0.036	0.036
L73	0.065	-0.049	0.064	-0.076	-0.024	0.012	-0.024	0.031
R74	0.051	-0.043	0.050	-0.067	-0.017	0.025	-0.016	0.025
G75	0.041	-0.045	0.041	-0.059	-0.012	0.013	-0.011	0.018
G76	0.036	-0.032	0.036	-0.047	-0.010	0.004	-0.010	0.011

**Tab. 7.15:** Werte der im jeweiligen PCS-Tensor berechneten RDCs und deren Differenz  $\Delta$  zum experimentellen RDC (siehe Tabellen 7.11 und 7.12) der vier anisotropen Proben [Hz].

T12C Tb		T12C Tm		S57C Tb		S57C Tm			
AS	RDC (ber)	$\Delta$ RDC	RDC (ber)	$\Delta$ RDC	AS	RDC (ber)	$\Delta$ RDC	RDC (ber)	$\Delta$ RDC
Q2	5.29	-11.89	3.80	-5.19	Q2	-	-	-	-
I3	7.10	-1.88	-9.37	3.10	I3	-	-	-	-
F4	-0.65	15.09	-15.61	5.96	F4	0.52	-2.34	-	-
V5	-3.75	21.56	-14.58	4.65	V5	-0.74	-1.00	-	-
K6	-	-	-12.18	5.25	K6	-6.04	0.86	-4.89	3.50
T7	-	-	-0.97	-3.85	T7	-11.91	8.68	5.06	-0.76
L8	-3.12	-3.14	7.49	-1.99	L8	-5.72	4.70	7.10	-2.32
T9	2.00	-7.67	7.89	-1.57	T9	6.94	-4.04	-1.83	0.60
G10	-	-	1.19	2.28	G10	-14.71	7.36	2.53	-0.97
K11	-	-	3.72	-5.70	K11	-5.38	5.61	8.52	-2.85
C12	-	-	-	-	T12	-10.53	5.56	0.23	2.88
I13	-	-	-12.43	3.16	I13	-1.15	-0.18	-2.62	2.17
T14	-3.93	17.12	-14.14	5.71	T14	-2.79	-0.33	-6.05	1.00
L15	6.72	-0.43	-11.53	5.87	L15	4.56	-4.79	-	-
E16	7.33	-8.04	-5.34	-0.01	E16	-	-	-	-
V17	2.61	-9.42	4.02	-2.80	V17	-	-	-	-
E18	4.48	-10.52	4.74	-5.95	E18	-	-	-	-
S20	3.17	7.13	-5.69	-1.70	S20	-	-	-	-
D21	-5.54	-0.51	7.65	-3.03	D21	-	-	-	-
T22	8.03	-2.26	-9.41	6.34	T22	-	-	-	-
I23	-12.04	25.41	-9.14	2.08	I23	-9.21	3.30	-	-
N25	-4.61	9.12	-8.12	4.33	N25	-	-	-	-
V26	-8.39	22.74	-11.89	4.52	V26	-	-	-	-
K27	-15.38	22.34	-3.90	2.83	K27	-12.31	6.29	-1.82	1.97
A28	-9.19	9.61	-2.40	3.55	A28	-7.68	1.91	-5.09	2.49
K29	-3.55	13.70	-12.32	5.50	K29	-3.54	-1.09	-6.20	1.08
I30	-12.05	22.64	-8.99	4.98	I30	-9.28	3.11	-3.32	2.57
Q31	-13.18	14.89	-0.42	3.04	Q31	-10.37	3.13	-3.55	1.76
D32	-5.99	7.54	-4.96	4.41	D32	-5.84	0.35	-5.73	2.12
K33	-6.26	18.85	-12.32	4.56	K33	-5.01	0.72	-5.80	2.94
E34	-15.11	19.51	-2.23	3.08	E34	-12.05	5.68	-2.40	2.31
G35	3.33	-12.63	7.44	-1.96	G35	4.61	-0.31	-4.25	2.14
I36	6.73	-14.67	4.41	-5.68	I36	-0.26	2.02	6.13	-2.03
D39	6.91	-0.13	-11.90	6.64	D39	5.75	-4.72	-4.15	1.49
Q40	7.06	5.88	-9.25	1.58	Q40	11.41	-7.01	-4.12	2.03
Q41	-3.96	-4.43	10.11	0.92	Q41	-0.67	0.41	1.79	-0.54
R42	-17.29	14.02	6.20	1.88	R42	-13.99	7.67	-	-
L43	-15.69	13.56	9.16	-1.89	L43	-	-	-	-
I44	-	-	-4.42	1.72	I44	-12.55	6.19	-0.35	1.71

**Tab. 7.15:** Fortsetzung.

AS	T12C Tb		T12C Tm		AS	S57C Tb		S57C Tm	
	RDC (ber)	$\Delta$ RDC	RDC (ber)	$\Delta$ RDC		RDC (ber)	$\Delta$ RDC	RDC (ber)	$\Delta$ RDC
F45	-	-	-3.47	-1.46	F45	-	-	-	-
A46	-	-	-	-	A46	-11.31	5.95	0.83	0.99
G47	-	-	-	-	G47	-4.51	-0.51	-5.08	0.68
K48	-	-	-0.68	-5.35	K48	3.52	-0.11	3.32	0.16
Q49	-0.84	15.62	-10.96	2.75	Q49	2.52	-0.89	-1.94	1.16
L50	-15.24	18.89	-1.15	2.97	L50	-12.11	4.82	-2.30	2.18
E51	-	-	-3.11	-0.15	E51	-	-	-	-
D52	8.90	-13.68	3.07	-3.11	D52	6.97	-2.54	2.17	-1.96
R54	-3.44	-4.61	7.52	-0.89	R54	-0.69	0.73	-	-
T55	-5.31	14.18	-10.87	4.50	T55	-	-	-	-
L56	8.07	2.81	-10.85	4.95	L56	-	-	-	-
S57	7.10	-4.09	-2.81	2.54	C57	-	-	-	-
D58	7.19	-3.40	-9.01	4.14	D58	-	-	-	-
Y59	4.64	10.66	-15.01	5.77	Y59	7.05	-3.62	-	-
N60	-8.03	-1.58	11.31	-0.40	N60	-4.87	3.18	2.82	0.47
I61	-5.31	-3.41	8.66	-0.05	I61	-7.64	5.59	-	-
Q62	5.37	-9.78	5.45	0.45	Q62	10.63	-6.73	-	-
K63	1.59	-12.06	5.35	-0.58	K63	-	-	-	-
E64	7.08	-5.28	-4.60	3.57	E64	-	-	-	-
T66	-	-	-	-	T66	5.47	-5.28	-5.00	-0.41
L67	-	-	-15.21	1.92	L67	4.25	-3.55	-5.27	2.83
H68	-	-	-	-	H68	-12.85	6.27	-0.94	1.08
L69	-	-	5.09	-1.59	L69	-15.40	9.57	5.14	-1.33
V70	-11.18	3.04	10.99	-1.81	V70	-6.82	2.25	0.40	-0.07
L71	-	-	10.35	-1.77	L71	-1.69	1.01	2.10	-0.08
R72	8.40	-5.20	0.82	-1.46	R72	13.59	-8.71	-4.18	1.73
L73	6.91	-2.77	-5.55	3.94	L73	-	-	-2.98	0.39

**Tab. 7.16:** Übersicht über die Saupe-Matrixelemente der vier anisotropen Proben [ $10^{-4}$ ]. Die gemittelten Tensoren aller Strukturen (1D3Z) sind wie folgt zugeordnet: PCS-Tensor (A), RDC-Tensor (B), Tensor aus gleichzeitiger PCS- und RDC-Minimierung (C), PCSs: Metallposition bestimmt auf Basis des RDC-Tensors mit anschließender Minimierung der PCSs (D).

Probe	Daten	$S_{zz}$	$S_{xx-yy}$	$S_{xy}$	$S_{xz}$	$S_{yz}$
T12C Tb	<b>A</b>	3.984	-9.149	-4.653	-0.146	-1.200
	<b>B</b>	-4.107	-10.488	3.247	-0.440	1.051
	<b>C</b>	-4.013	-10.383	3.394	-1.045	1.577
	<b>D</b>	-5.156	-11.260	4.279	-2.768	0.860
T12C Tm	<b>A</b>	1.385	11.362	-2.385	-0.143	-2.847
	<b>B</b>	-0.308	9.192	-2.134	0.680	-0.710
	<b>C</b>	0.067	9.323	-1.855	0.677	-0.962
	<b>D</b>	1.646	8.499	-2.878	-0.011	-2.188
S57C Tb	<b>A</b>	0.712	-9.443	-4.914	1.885	-1.637
	<b>B</b>	0.765	-3.587	-2.220	0.152	-1.656
	<b>C</b>	0.747	-3.836	-2.286	0.540	-1.958
	<b>D</b>	0.988	-4.947	-1.786	1.812	-1.652
S57C Tm	<b>A</b>	0.910	4.029	0.570	-3.428	-1.169
	<b>B</b>	0.031	2.958	0.693	-2.095	-1.135
	<b>C</b>	0.204	3.096	0.755	-2.278	-0.948
	<b>D</b>	0.939	2.167	-0.587	-2.961	-0.382

**Tab. 7.17:**  $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -PCS von T12C Tb und T12C Tm [ppm], zusammen mit den RDCs minimiert. Zusätzlich sind die Abweichungen  $\Delta$  von den experimentellen Werten gegeben (siehe Tabellen 7.2 und 7.3).

AS	T12C Tb				T12C Tm			
	$^1\text{H}$ (ber)	$\Delta$ $^1\text{H}$	$^{15}\text{N}$ (ber)	$\Delta$ $^{15}\text{N}$	$^1\text{H}$ (ber)	$\Delta$ $^1\text{H}$	$^{15}\text{N}$ (ber)	$\Delta$ $^{15}\text{N}$
Q2	-0.039	-0.275	-0.032	-0.210	0.058	0.022	0.063	0.050
I3	0.066	-0.159	0.035	-0.192	-0.023	0.067	0.017	0.101
F4	0.122	0.116	0.232	0.058	-0.014	0.201	-0.197	0.182
V5	0.640	0.239	0.594	0.341	-0.601	0.024	-0.524	0.038
K6	-	-	-	-	-0.724	-0.231	-0.909	-0.133
T7	1.538	0.298	1.346	0.204	-0.979	0.065	-0.842	0.056
L8	0.522	-0.250	0.727	-0.345	-0.352	0.144	-0.437	0.189
T9	0.802	-0.198	0.825	-0.234	-0.444	0.168	-0.431	0.187
G10	1.607	-0.136	1.637	0.041	-0.743	0.360	-0.734	0.278
K11	-	-	-	-	-0.810	0.012	-0.926	0.045
C12	-	-	-	-	-	-	-	-
I13	0.923	-0.070	0.883	-0.399	-0.824	0.170	-0.798	0.350
T14	0.493	-0.364	0.500	-0.339	-0.479	0.132	-0.496	0.112
L15	0.229	-0.137	0.229	-0.133	-0.211	0.065	-0.208	0.064
E16	0.086	-0.073	0.078	-0.077	-0.052	0.003	-0.044	0.027
V17	-0.035	-0.054	-0.033	0.005	0.091	0.012	0.089	0.007
E18	-0.108	0.008	-0.109	0.048	0.179	0.014	0.179	0.023
S20	-0.159	0.023	-0.174	0.001	0.230	0.001	0.250	0.030
D21	-0.163	0.028	-0.156	0.061	0.242	0.009	0.228	0.007
T22	-0.134	0.029	-0.154	-0.004	0.190	0.009	0.218	0.033
I23	-0.219	0.033	-0.209	0.010	0.285	0.018	0.276	0.021
N25	-0.125	0.025	-0.110	-0.012	0.167	0.011	0.148	0.048
V26	-0.127	0.033	-0.102	0.007	0.185	0.014	0.157	0.028
K27	-0.113	0.031	-0.088	0.028	0.155	0.007	0.131	0.006
A28	-0.058	0.023	-0.041	-0.004	0.087	0.004	0.068	0.022
K29	-0.013	0.022	0.006	-0.023	0.051	0.001	0.029	0.024
I30	0.031	0.023	0.059	0.009	0.011	0.003	-0.017	-0.002
Q31	0.035	0.021	0.056	0.014	-0.009	-0.002	-0.029	0.067
D32	0.057	0.027	0.068	-0.003	-0.031	-0.011	-0.043	0.015
K33	0.118	0.025	0.126	0.018	-0.082	-0.011	-0.091	-0.004
E34	0.153	0.015	0.171	0.087	-0.112	-0.002	-0.127	-0.024
G35	0.111	0.032	0.114	0.085	-0.083	-0.006	-0.088	-0.014
I36	0.090	0.020	0.073	0.042	-0.072	-0.001	-0.062	0.009
D39	-0.074	-0.005	-0.088	-0.060	0.043	0.000	0.053	0.038
Q40	-0.086	-0.020	-0.103	-0.047	0.035	0.000	0.040	0.010
Q41	-0.124	-0.028	-0.133	0.007	0.061	-0.008	0.057	-0.029
R42	-0.248	-0.030	-0.267	-0.003	0.114	-0.060	0.139	-0.034
L43	-0.423	0.019	-0.448	0.043	0.335	-0.083	0.345	-0.107
I44	-0.842	0.232	-0.921	0.093	0.745	-0.252	0.798	-0.159

**Tab. 7.17:** Fortsetzung.

AS	T12C Tb				T12C Tm			
	$^1\text{H}$ (ber)	$\Delta$ $^1\text{H}$	$^{15}\text{N}$ (ber)	$\Delta$ $^{15}\text{N}$	$^1\text{H}$ (ber)	$\Delta$ $^1\text{H}$	$^{15}\text{N}$ (ber)	$\Delta$ $^{15}\text{N}$
F45	-1.595	-0.243	-1.734	-0.284	1.600	0.110	1.864	0.101
A46	-	-	-	-	-	-	-	-
G47	-	-	-	-	-	-	-	-
K48	-	-	-	-	1.617	0.211	1.220	0.105
Q49	-0.693	-0.170	-0.810	-0.228	0.538	-0.055	0.642	0.000
L50	-0.669	-0.039	-0.623	-0.020	0.621	-0.014	0.595	-0.028
E51	-0.380	-0.013	-0.367	0.020	0.419	0.025	0.389	0.018
D52	-0.224	0.013	-0.230	0.020	0.225	-0.004	0.243	-0.002
R54	-0.227	0.011	-0.215	0.052	0.272	0.021	0.263	0.012
T55	-0.255	0.031	-0.254	-0.018	0.337	0.028	0.338	0.072
L56	-0.272	0.045	-0.310	0.046	0.394	0.040	0.446	0.046
S57	-0.298	0.065	-0.338	0.070	0.432	0.024	0.491	0.037
D58	-0.329	0.053	-0.350	0.017	0.458	0.038	0.487	0.076
Y59	-0.471	0.076	-0.493	0.047	0.669	0.077	0.690	0.098
N60	-0.514	0.161	-0.592	0.247	0.736	0.029	0.861	-0.014
I61	-0.601	0.209	-0.671	0.326	0.935	0.043	1.068	-0.009
Q62	-0.763	0.462	-0.642	0.362	1.345	-0.128	1.092	-0.123
K63	-0.360	0.060	-0.370	0.043	0.533	-0.135	0.572	-0.133
E64	-0.146	-0.367	-0.196	-0.401	0.217	0.026	0.280	0.004
S65	-	-	-	-	0.658	-0.010	0.736	0.056
T66	-	-	-	-	-	-	-	-
L67	-	-	-	-	0.371	0.235	0.850	0.471
H68	-	-	-	-	-	-	-	-
L69	-	-	-	-	-0.154	-0.183	0.030	-0.302
V70	-0.298	0.005	-0.263	-0.080	0.118	-0.164	0.066	-0.228
L71	-0.234	-0.158	-0.217	-0.106	-0.027	-0.003	-0.009	-0.075
R72	-0.172	-0.049	-0.201	-0.083	0.016	-0.020	0.015	-0.023
L73	-0.201	-0.048	-0.175	-0.033	0.006	-0.015	0.005	-0.017



**Tab. 7.18:**  $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -PCS von S57C Tb und S57C Tm [ppm], zusammen mit den RDCs minimiert. Zusätzlich sind die Abweichungen  $\Delta$  von den experimentellen Werten gegeben (siehe Tabellen 7.4 und 7.5).

AS	S57C Tb				S57C Tm			
	$^1\text{H}$ (ber)	$\Delta$ $^1\text{H}$	$^{15}\text{N}$ (ber)	$\Delta$ $^{15}\text{N}$	$^1\text{H}$ (ber)	$\Delta$ $^1\text{H}$	$^{15}\text{N}$ (ber)	$\Delta$ $^{15}\text{N}$
Q2	-	-	-	-	-	-	-	-
I3	-	-	-	-	-	-	-	-
F4	0.596	-0.130	0.476	-0.140	-0.309	0.100	-0.295	0.147
V5	0.239	-0.112	0.310	-0.100	-0.248	0.020	-0.264	0.035
K6	0.268	-0.062	0.229	-0.064	-0.182	0.010	-0.170	0.025
T7	0.114	-0.040	0.133	-0.063	-0.105	0.017	-0.112	0.003
L8	0.113	-0.017	0.108	-0.018	-0.083	0.008	-0.080	0.012
T9	0.076	-0.013	0.071	-0.033	-0.069	0.001	-0.063	0.002
G10	0.072	-0.013	0.060	-0.013	-0.065	0.008	-0.060	-0.008
K11	0.060	-0.011	0.050	-0.034	-0.073	0.012	-0.070	0.008
T12	0.012	-0.048	0.034	-0.060	-0.077	0.016	-0.087	0.008
I13	0.103	-0.071	0.058	-0.039	-0.166	0.013	-0.154	0.042
T14	-0.110	-0.116	-0.066	-0.097	-0.194	0.012	-0.212	0.051
L15	0.057	-0.380	-0.045	-0.491	-	-	-	-
E16	-	-	-	-	-	-	-	-
V17	-	-	-	-	-	-	-	-
E18	-	-	-	-	-	-	-	-
S20	-	-	-	-	-	-	-	-
D21	-	-	-	-	-	-	-	-
T22	-	-	-	-	-	-	-	-
I23	0.648	-0.107	0.726	-0.086	-	-	-	-
N25	-	-	-	-	-	-	-	-
V26	-	-	-	-	0.046	0.036	-0.092	-0.033
K27	0.483	-0.122	0.454	-0.041	-0.076	-0.006	-0.145	0.019
A28	0.295	-0.138	0.256	-0.124	-0.057	-0.042	-0.096	-0.023
K29	0.286	-0.203	0.211	-0.159	-0.258	-0.060	-0.257	-0.035
I30	0.257	-0.151	0.198	-0.163	-0.279	-0.034	-0.280	-0.040
Q31	0.148	-0.085	0.121	-0.057	-0.163	-0.009	-0.162	0.026
D32	0.062	-0.068	0.043	-0.038	-0.176	0.012	-0.162	0.042
K33	0.023	-0.068	-0.001	-0.039	-0.213	0.018	-0.195	0.036
E34	0.042	-0.048	0.025	-0.042	-0.159	0.012	-0.147	0.015
G35	0.037	-0.018	0.035	-0.049	-0.117	0.015	-0.104	0.020
I36	0.069	-0.032	0.066	-0.030	-0.098	0.006	-0.084	-0.003
D39	0.105	-0.018	0.118	-0.039	0.002	0.004	0.002	0.043
Q40	0.113	-0.031	0.113	-0.084	-0.021	0.005	-0.018	0.019
Q41	0.150	-0.034	0.151	-0.087	-0.033	0.010	-0.042	-0.002
R42	0.203	-0.034	0.211	-0.105	-0.077	0.001	-0.069	-0.019
L43	0.319	-0.038	0.319	-0.082	-0.090	0.002	-0.110	-0.046
I44	0.374	-0.028	0.379	-0.019	-0.180	-0.015	-0.173	0.009

**Tab. 7.18:** Fortsetzung.

AS	S57C Tb				S57C Tm			
	$^1\text{H}$ (ber)	$\Delta$ $^1\text{H}$	$^{15}\text{N}$ (ber)	$\Delta$ $^{15}\text{N}$	$^1\text{H}$ (ber)	$\Delta$ $^1\text{H}$	$^{15}\text{N}$ (ber)	$\Delta$ $^{15}\text{N}$
F45	0.416	-0.030	0.441	-0.065	-0.209	-0.035	-0.229	-0.063
A46	0.400	-0.016	0.392	-0.029	-0.226	-0.018	-0.226	-0.009
G47	0.291	0.016	0.278	0.010	-0.158	-0.025	-0.153	-0.023
K48	0.318	0.024	0.285	0.018	-0.170	-0.050	-0.146	-0.079
Q49	0.248	0.010	0.277	-0.014	-0.087	-0.067	-0.101	-0.028
L50	0.384	-0.011	0.377	0.043	-0.112	-0.020	-0.095	0.007
E51	0.369	0.005	0.354	-0.029	-	-	-	-
D52	0.240	-0.016	0.275	-0.090	0.153	0.065	0.184	0.065
R54	0.310	-0.038	0.274	-0.012	-	-	-	-
T55	-	-	-	-	-	-	-	-
L56	1.941	-0.092	1.755	0.002	-	-	-	-
C57	-	-	-	-	-	-	-	-
D58	-	-	-	-	-	-	-	-
Y59	0.971	-0.188	0.786	-0.217	-0.714	0.106	-0.642	0.165
N60	0.869	-0.433	0.906	-0.456	-1.222	0.037	-1.177	0.015
I61	1.685	-0.028	1.578	-0.038	-	-	-	-
Q62	1.456	-0.060	1.859	-0.055	-	-	-	-
K63	-	-	-	-	-	-	-	-
E64	-	-	-	-	-	-	-	-
S65	-	-	-	-	-	-	-	-
T66	0.546	-0.012	0.571	-0.025	-0.209	0.071	-0.224	0.120
L67	0.536	-0.052	0.548	-0.053	-0.311	0.008	-0.308	0.027
H68	0.421	-0.012	0.389	0.000	-0.232	-0.024	-0.220	0.032
L69	0.242	-0.036	0.264	-0.042	-0.149	-0.002	-0.155	-0.034
V70	0.218	-0.028	0.200	0.018	-0.105	0.000	-0.102	0.028
L71	0.126	-0.028	0.132	-0.038	-0.064	0.012	-0.065	0.000
R72	0.110	-0.030	0.106	-0.088	-0.041	0.015	-0.040	0.032
L73	0.075	-0.039	0.075	-0.065	-0.026	0.010	-0.025	0.030

**Tab. 7.19:** Werte der berechneten RDCs [Hz], zusammen minimiert mit den PCSs, sowie deren Differenz  $\Delta$  zu den experimentellen RDCs (siehe Tabellen 7.11 und 7.12) für alle vier anisotropen Proben.

T12C Tb		T12C Tm		S57C Tb		S57C Tm			
AS	RDC (ber)	$\Delta$ RDC	RDC (ber)	$\Delta$ RDC	AS	RDC (ber)	$\Delta$ RDC	RDC (ber)	$\Delta$ RDC
Q2	-6.66	-0.06	0.47	1.86	Q2	-	-	-	-
I3	5.38	0.16	-5.77	0.50	I3	-	-	-	-
F4	15.17	0.73	-9.97	-0.32	F4	-2.25	-0.43	-	-
V5	17.34	-0.47	-10.19	-0.26	V5	-1.82	-0.08	-	-
K6	-	-	-7.30	-0.37	K6	-4.80	0.38	-2.66	-1.27
T7	-	-	-1.89	2.93	T7	-4.56	-1.33	4.62	0.31
L8	-5.80	0.47	5.75	0.25	L8	-2.56	-1.54	4.62	-0.17
T9	-7.16	-1.49	7.41	1.09	T9	3.22	0.32	-1.38	-0.15
G10	-	-	1.87	-1.60	G10	-6.93	0.42	3.01	1.45
K11	-	-	-0.81	1.17	K11	-0.04	-0.27	6.04	0.37
C12	-	-	-	-	T12	-5.26	-0.29	1.36	-1.75
I13	-	-	-9.57	-0.30	I13	-1.08	0.24	-1.02	-0.57
T14	13.72	0.53	-8.60	-0.17	T14	-3.76	-0.64	-3.84	1.21
L15	8.31	2.02	-7.15	-1.49	L15	-0.38	-0.15	-	-
E16	-0.10	0.61	-3.59	1.77	E16	-	-	-	-
V17	-5.44	1.37	1.81	0.59	V17	-	-	-	-
E18	-6.30	-0.26	0.39	1.60	E18	-	-	-	-
S20	9.44	-0.86	-6.95	0.44	S20	-	-	-	-
D21	-4.79	1.26	4.10	-0.52	D21	-	-	-	-
T22	8.32	2.55	-5.76	-2.69	T22	-	-	-	-
I23	12.29	-1.08	-5.27	1.79	I23	-5.71	0.20	-	-
N25	4.98	0.47	-3.65	0.14	N25	-	-	-	-
V26	13.08	-1.27	-6.97	0.41	V26	-	-	-	-
K27	7.29	0.33	-1.00	0.07	K27	-6.85	-0.83	-0.11	-0.26
A28	0.75	0.33	0.86	-0.29	A28	-5.21	0.56	-2.97	-0.37
K29	10.25	0.10	-6.95	-0.13	K29	-4.21	0.42	-4.10	1.02
I30	11.83	1.24	-5.02	-1.01	I30	-5.83	0.34	-1.30	-0.55
Q31	1.07	-0.64	2.34	-0.29	Q31	-6.14	1.10	-1.58	0.21
D32	1.89	0.34	-1.21	-0.66	D32	-4.64	0.85	-3.67	-0.07
K33	11.97	-0.62	-7.05	0.71	K33	-4.68	-0.39	-3.53	-0.67
E34	4.68	0.28	0.63	-0.22	E34	-6.82	-0.46	-0.59	-0.50
G35	-11.73	-2.43	6.16	0.68	G35	2.72	-1.58	-3.09	-0.98
I36	-7.01	0.94	0.00	1.27	I36	1.91	0.15	3.62	-0.48
D39	9.39	2.61	-7.43	-2.17	D39	0.22	-0.81	-3.54	-0.88
Q40	11.63	-1.31	-7.94	-0.27	Q40	5.50	1.09	-2.72	-0.63
Q41	-8.04	0.35	9.27	-1.76	Q41	-0.41	-0.15	1.29	0.04
R42	-1.67	1.60	6.45	-1.63	R42	-6.68	-0.36	-	-
L43	-3.95	-1.82	7.91	0.64	L43	-	-	-	-
I44	-	-	-2.09	0.62	I44	-6.55	-0.19	0.99	-0.37

**Tab. 7.19:** Fortsetzung.

T12C Tb		T12C Tm		S57C Tb		S57C Tm			
AS	RDC (ber)	$\Delta$ RDC	RDC (ber)	$\Delta$ RDC	AS	RDC (ber)	$\Delta$ RDC	RDC (ber)	$\Delta$ RDC
F45	-	-	-3.62	1.31	F45	-	-	-	-
A46	-	-	-	-	A46	-5.50	-0.14	1.80	-0.02
G47	-	-	-	-	G47	-4.11	0.91	-2.87	1.54
K48	-	-	-4.17	1.86	K48	4.12	0.71	2.51	-0.96
Q49	15.35	0.57	-9.40	-1.19	Q49	1.37	-0.27	-0.69	0.09
L50	3.49	-0.16	1.51	-0.31	L50	-6.80	0.50	-0.53	-0.41
E51	-	-	-1.64	1.62	E51	-	-	-	-
D52	-3.98	0.80	-1.26	-1.22	D52	5.87	1.44	1.25	1.04
R54	-10.23	-2.18	7.55	0.92	R54	-0.47	-0.51	-	-
T55	9.05	0.18	-5.76	0.61	T55	-	-	-	-
L56	10.82	-0.06	-7.16	-1.26	L56	-	-	-	-
S57	2.40	-0.61	-0.83	-0.56	C57	-	-	-	-
D58	5.02	1.23	-5.55	-0.68	D58	-	-	-	-
Y59	15.41	0.11	-10.24	-0.99	Y59	1.31	-2.12	-	-
N60	-8.44	1.17	10.22	-0.69	N60	-2.22	-0.53	2.26	-1.03
I61	-6.16	2.56	6.51	-2.10	I61	-3.20	-1.15	-	-
Q62	-5.08	-0.67	5.16	-0.74	Q62	5.02	1.13	-	-
K63	-10.35	0.12	5.02	0.25	K63	-	-	-	-
E64	3.01	1.21	-2.24	-1.21	E64	-	-	-	-
T66	-	-	-	-	T66	0.00	-0.19	-3.99	1.42
L67	-	-	-10.88	2.41	L67	0.52	-0.17	-3.32	-0.88
H68	-	-	-	-	H68	-6.89	-0.31	0.55	0.41
L69	-	-	4.35	0.85	L69	-6.74	-0.91	4.69	0.88
V70	-8.63	-0.49	10.51	1.33	V70	-3.24	1.33	0.92	0.59
L71	-	-	9.45	0.87	L71	-0.86	-0.18	1.56	-0.46
R72	-0.48	-3.68	1.09	1.73	R72	6.37	1.49	-3.16	-0.71
L73	5.54	1.40	-3.11	-1.50	L73	-	-	-2.53	0.06

# Lebenslauf

<b>Name</b>	<b>Fabian Peters</b>
Geburtsdatum	20. Januar 1981
Geburtsort	Oldenburg
Staatsangehörigkeit	Deutsch
<hr/>	
Seit April 2007	Doktorand in der Abteilung für NMR-basierte Strukturbiologie am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen; Titel der Arbeit: <i>Entwicklung von Lanthanoid-Tags für die biomolekulare NMR-Spektroskopie</i>
Januar 2007 – April 2007	Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Abteilung für NMR-basierte Strukturbiologie am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen
November 2006	Diplom in Chemie
Januar 2006 – November 2006	Diplomarbeit in der Abteilung für NMR-basierte Strukturbiologie am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen; Titel der Arbeit: <i>Synthese eines EDTA-basierten Thyminderivats, dessen Einbau in DNA und NMR-spektroskopische Charakterisierung</i>
Oktober 2001 – November 2006	Studium der Chemie an der Georg-August-Universität Göttingen, Vordiplom in Chemie im April 2004
Oktober 2000 – August 2001	Zivildienst im Altenzentrum Bischof Stählin in Oldenburg
Juni 2000	Abitur
September 1993 – Juni 2000	Besuch des Alten Gymnasiums zu Oldenburg