

NMR-Spektroskopie biologischer Makromoleküle

◆ Gerade bei der Untersuchung der Dynamik biologischer Makromoleküle auf praktisch allen Zeitskalen und von Interaktionsprozessen (z.B. beim NusE/NusG-Komplex)¹⁾ zeigt die NMR-Spektroskopie ihre Stärken. Die Bestimmung hochaufgelöster 3D-Strukturen mit NMR-Spektroskopie ist bei großen Systemen (>40 kDa) und Membranproteinen allerdings noch immer schwierig. Weiterentwicklungen der Geräte, z.B. Höchstfeld-Magnete, kryogene Messsonden oder Isotopenmarkierungsstrategien konnten aber in den letzten Jahren die Leistungsfähigkeit deutlich steigern.

Proteindynamik in atomarer Auflösung

◆ Die Funktion eines Proteins erfordert in aller Regel, dass seine Struktur nicht starr ist. Nicht nur Enzyme benötigen für Substratbindung, Stabilisierung des Übergangszustands, Ausschluss von Wasser aus dem aktiven Zentrum und Produktfreigabe ein Mindestmaß an konformationeller Flexibilität. Auch zur Bindung von Liganden muss durch Dynamik ein größerer Konformationsraum abgedeckt werden. Extreme Beispiele dafür sind intrinsisch unstrukturierte Proteinbereiche (IUPs). Das Verständnis dynamischer Prozesse wie Proteinfaltung und -assemblierung, Ligandenbindung, Enzymkatalyse, Aktivierung von Ionenkanälen und Transportproteinen, erfordert die Kenntnis der beteiligten Konformationen sowie der Kinetik und Thermodynamik des Austauschs zwischen ihnen.

NMR-spektroskopische Parameter bestimmen nicht nur hochaufgelöst statische Proteinstrukturen, sondern geben auch auf allen wichtigen Zeitskalen von Picosekunden bis zur Echtzeit Auskunft über die Proteindynamik.

Kombiniert mit Röntgenkleinwinkelstreuung (small angle X-ray

scattering, SAXS), Neutronenkleinwinkelstreuung (small angle neutron scattering SANS) und Elektronenmikroskopie (EM) gelang es mit NMR-Spektroskopie, die für die Transkription und Replikation des Masernvirus essenzielle C-terminale Region des Virus-Nukleoproteins strukturell und dynamisch zu charakterisieren. Dabei zeigte sich, dass diese Region intrinsisch unstrukturiert ist und durch eine Kombination dreier unterschiedlicher dynamischer Prozesse ihrer Teilsegmente – einschließlich des molekularen Erkennungsmotivs – die RNA-Polymerase effizient zur Transkription rekrutiert.²⁾

Die Faltung intrinsisch ungeordneter Erkennungsmotive mit der

Bindung des Zielmoleküls zu koppeln, bietet kinetische und thermodynamische Vorteile. So sagen theoretische Studien voraus, dass der größere Einfangradius eines IUP die Assoziationsrate erhöht. Dieser als Fliegenfischen bezeichnete Mechanismus wurde kürzlich anhand von NMR-Titrations- und ¹⁵N-Relaxationsdispersionsexperimenten für die Bindung der pKI-Domäne des Transkriptionsfaktors CREB an die KIX-Domäne experimentell bestätigt.³⁾ Auch für polyvalente Liganden, z.B. Proteinregionen mit mehreren für sich genommen niedrigaffinen Phosphorylierungsstellen, kann eine hohe Flexibilität bei einer gewissen Kompaktheit vorteilhaft sein, da sie

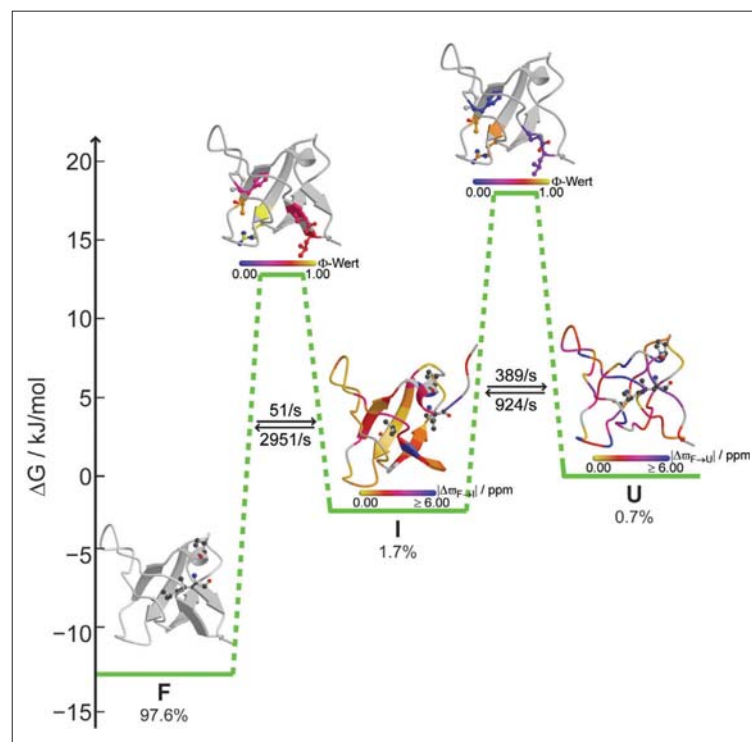


Abb. 1. Kinetik, Profil der freien Energie ΔG und Entwicklung der dreidimensionalen Struktur entlang des Faltungswegs der Fyn SH3 A39V/N53P/V55L bei 35 °C aus NMR-RD-Experimenten.^{7,11)} Die SH3-Domäne faltet ausgehend von einem nahezu vollständig unstrukturierten ungefalteten Zustand U, indem sich im Rahmen des ersten Übergangszustands ein 3-strängiges β -Faltblatt, über ein metastabiles 4-strängiges Faltungsintermediat I (PDB 2L2P) in ihre aus Röntgenkristall- und konventionellen NMR-Strukturuntersuchungen (PDB 1SHF, 1NYG, 3CQT) bekannte native 5-strängige β -Sandwich-Struktur F, den direkt sichtbaren Grundzustand des Systems ausbildet. Dieses unvollständig gefaltete und zur Aggregation neigende Intermediat I stabilisiert ein nicht-nativer hydrophober Kern, der im zweiten Übergangszustand wieder aufgebrochen werden muss. Zur Farbkodierung der Strukturen siehe Neudecker et al.^{7,11)}

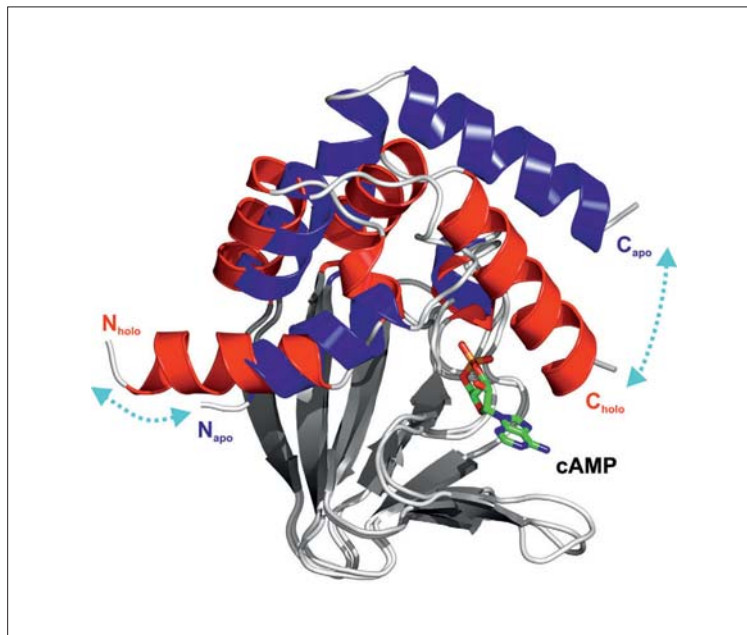


Abb. 2. Vergleich der NMR-Lösungsstrukturen der cAMP-Bindungsdomäne eines zyklisch Nucleotid-gesteuerten Ionenkanals in An- und Abwesenheit des sekundären Botenstoffs cAMP (PDB 2K0G,¹⁹ 2KXL¹⁸). Die helikalen Bereiche der cAMP-gebundenen (holo) und cAMP-freien (apo) Bindungsdomäne sind rot und blau, die restlichen Regionen (grau) eingefärbt. Das cAMP-Molekül ist als Stäbchen dargestellt.

eine genau kontrollierte Regulierung bei gleichzeitig hoher Affinität erlaubt. Dies zeigen NMR-spektroskopischen Untersuchungen an der Bindung von Sic1 an Cdc4.⁴⁾

Als Hilfsmittel für die Untersuchung von intrinsisch ungeordneten wie auch strukturierten Proteinen wurden paramagnetische Son-

den etabliert.⁵⁾ Diese beschleunigen die Relaxation langreichweitig (PRE, paramagnetic relaxation enhancement) und ändern die chemischen Verschiebungen (pseudocontact shifts), welche Abstandsinformation liefern und den Nachweis transientser Strukturen erlauben. Bei der Bindung von Enzym I an HPr im bakteriellen Phosphotransferasesystem fiel auf, dass die vorher bekannte statische Struktur des spezifischen Komplexes die experimentellen PREs nicht vollständig erklären konnte. Die zusätzlichen Effekte resultieren aus der transienten Bildung unspezifischer Begegnungskomplexe. Deren grundsätzliche Existenz ist aus der Analyse von Protein-Protein-Wechselwirkungskinetiken seit langem bekannt und wurde jetzt erstmals strukturell untersucht.⁶⁾

Bewegungen von Sekundärstrukturelementen oder Domänen in strukturierten Proteinen sind deutlich langsamer als die Dynamik von IUPs. Viele biochemische Prozesse, von Ligandenbindung über Enzymkatalyse, Schaltung von Ionenkanälen bis hin zur Proteinbiosynthese und -faltung, spie-

len sich typischerweise auf der Mikrosekunden- bis Sekunden-Zeitskala ab. Austausch zwischen verschiedenen Zuständen auf der μ s- bis ms-Zeitskala verursacht NMR-Linienverbreiterung, die sich in Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG)- oder $T_{1\rho}$ -basierten NMR-Relaxationsdispersions (NMR-RD)-Experimenten quantifizieren lässt, um die Kinetik und Thermodynamik des Austauschs zu messen sowie die NMR-Spektren der beteiligten Zustände zu rekonstruieren. Oft sind diese Zustände im Gleichgewicht nach Boltzmann ungleich besetzt, es gibt also einen dominierenden (Grund-)Zustand mit einem oder mehreren gering besetzten (angeregten) Zuständen, die jedoch für die Funktion des Proteins entscheidend sein können. In diesem Fall beobachtet man in den NMR-Spektren lediglich die Resonanzen des Grundzustands, deren Linienverbreiterung Auskunft über die NMR-Spektren der unsichtbaren angeregten Zustände gibt.

Im letzten Jahrzehnt ist es durch verbesserte Pulsprogramme und neue Verfahren zur selektiven Isotopenanreicherung endlich gelungen, robuste NMR-RD-Experimente für Proteine zu entwickeln und damit das ms-Zeitfenster zugänglich zu machen. So ließ sich die vollständige Kinetik und Thermodynamik des Austauschs zwischen drei Zuständen einer SH3-Domäne zuverlässig bestimmen, obwohl die angeregten Zustände nur zu etwa 0,5% besetzt sind.⁷⁾ Die aus der Linienverbreiterung rekonstruierten chemischen Verschiebungen und residualen anisotropen Wechselwirkungen ermöglichten es, sogar die 3D-Struktur dieser unsichtbaren angeregten Zustände in atomarer Auflösung zu bestimmen, zunächst von der bekannten Struktur eines Modellsystems (PDB 2K3B)⁸⁾ und später von drei unbekanntem Strukturen (PDB 2KZG;⁹⁾ PDB 2LCB;¹⁰⁾ PDB 2L2P). Da auf der Grundlage von NMR-RD mit einer als Φ -Wert-Analyse bezeichneten Strategie auch die Struktur der ratenlimitierenden Übergangszustän-

GDCh-Kurs
Praktische 2D-NMR-Spektroskopie
für technische Mitarbeiter (351/12)
5. – 9. März 2012, Leipzig
Leitung: Prof. Dr. Stefan Berger

Highlights:
 Grundlagen, Parameter, Kalibrierung
 H,H-COSY-Experimente
 H,C-COSY-Experimente
 NOESY-, ROESY- und TOCSY-Experimente
 C,C-Korrelation mit INADEQUATE und ADEQUATE

Anmeldung/Information:
 Gesellschaft Deutscher Chemiker e.V.
 Fortbildung
 Tel.: 069/7917-291, Fax: 069/7917-475
 fb@gdch.de, www.gdch.de/fortbildung

de zwischen den austauschenden Zuständen charakterisiert werden kann,¹¹⁾ lassen sich komplexe Proteinfaltungswege direkt im Gleichgewicht unter nativen Bedingungen in atomarer Auflösung verfolgen (Abbildung 1). Eine Kombination von residualen Kopplungen in verschiedenen Orientierungsmedien liefert ebenfalls detaillierte Strukturinformationen über miteinander austauschende konformationelle Ensembles,¹²⁾ auch bei IUPs.¹³⁾

Langsamere dynamische Prozesse lassen sich anhand longitudinaler Austauschexperimente, H/D-Amidprotonenaustausch und Echtzeit-NMR untersuchen. Ein klassisches Beispiel dafür ist die Prolin-cis/trans-Isomerisierung, die als molekulare Zeitschaltuhr dienen kann.¹⁴⁾ Durch methodische Weiterentwicklungen (z. B. band-selective optimized flip-angle short-transient SOFAST) können diese Prozesse mittlerweile auch in mehrdimensionalen NMR-Experimenten in Echtzeit mit einer Zeitauflösung von wenigen Sekunden verfolgt werden,^{15,16)} dies gelang sogar bei der 468 kDa großen Aminopeptidase TET2.¹⁷⁾

Ein Beispiel, in dem große ligandeninduzierte Bewegungen von Helixbündeln durch Bestimmung und Vergleich der ligandengebundenen und -freien Lösungsstrukturen identifiziert wurden, ist die cAMP-Bindungsdomäne eines zyklisch nukleotidgesteuerten Ionenkanals in An- und Abwesenheit des sekundären Botenstoffs cAMP.^{18,19)} Durch die Bindung von cAMP an die Bindungsdomäne verschiebt sich die Position der N-terminalen Helix (Abbildung 2), die im Kanal direkt mit dem letzten Transmembransegment verbunden ist. In allen bekannten Kristallstrukturen, die den entsprechenden Lösungsstrukturen ansonsten ähnlich sind, wurde jedoch eine dimere Anordnung der Bindungsdomänen zueinander postuliert. Im Gegensatz dazu liegt die Bindungsdomäne in Lösung monomer vor, was ¹⁵N-Relaxationsexperimente bestätigten.

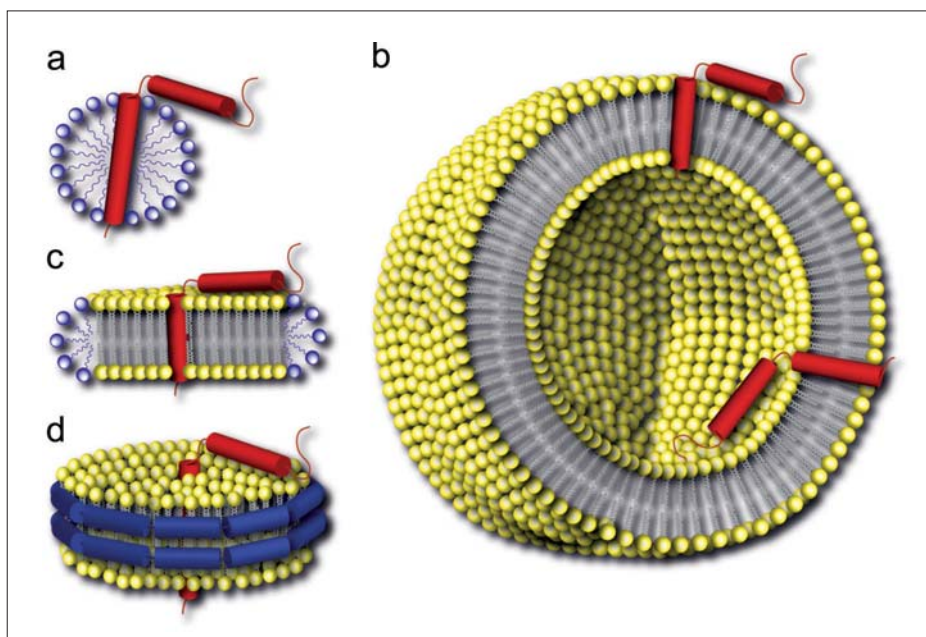


Abb. 3. Unterschiedliche Modellmembranen zur Solubilisierung integraler Membranproteine: Detergens-Mizelle (a), Liposom (b), Bizelle (c) und Nanodic (d). Das integrale Membranprotein ist rot, Detergenzmoleküle sind hellblau, Lipidmoleküle gelb und das Apolipoprotein dunkelblau dargestellt.

Supramolekulare Strukturen

◆ NMR-Spektroskopie an Biomakromolekülen in Lösung ist begrenzt durch deren langsame Rotationsdiffusion, welche die transversale Relaxation der Kernspins beschleunigt und so zu Signalverlust sowie Linienverbreiterung und Resonanzüberlagerung führt. Um dieses Problem zu reduzieren, wird die negative Interferenz zwischen verschiedenen Relaxationsmechanismen eines Spinsystems genutzt, um Pulssequenzen mit möglichst niedrigen transversalen Relaxationsverlusten zu entwickeln (transverse relaxation optimized spectroscopy, TROSY). Damit lassen sich auch bei sehr großen Proteinen ¹H-¹⁵N-Korrelationspektren der Amidgruppen mit ausgezeichneter Empfindlichkeit und Linienform aufnehmen, insbesondere für perdeuterierte Biomoleküle. Noch höhere Empfindlichkeit bieten jedoch Methylgruppen aufgrund der negativen Relaxationsinterferenz zwischen ¹H-¹³C- und ¹H-¹H-Dipol-Dipol-Wechselwirkung. Dazu wurden in den letzten Jahren Verfahren entwickelt, um mit kommerziell verfügbaren biosynthetischen Vorläufern selektiv isotoptenmarkierte Methyl-

gruppen in perdeuterierte Proteine einzubauen. So gelang beispielsweise die sequenzspezifische Resonanzzuordnung sowie die Bestimmung der globalen Faltung des 82 kDa großen Proteins MSG.²⁰⁾ Ortsaufgelöste Untersuchungen von Dynamik oder Ligandenbindung sind selbst für Proteinkomplexe mit einem Molekulargewicht von mehreren hundert Kilodalton noch möglich. So wurde anhand der Methylgruppenresonanzen die Bildung des 1,1-MDa-Komplexes der 670-kDa-20S-Kerneinheit des Proteasoms mit dem 11S-Aktivator verfolgt.²¹⁾

Die kovalente Bindung dreier Modellsysteme an ein Cystein zeigte, dass der Proteasom-Vorhof seine Substrate im ungefalteten Zustand für die Proteolyse bereitstellt.²²⁾

Ebenfalls auf der Grundlage von Methyl-TROSY- in Kombination mit PRE-Experimenten gelang es, die Bindungsstelle des Signalpeptids an den 204 kDa großen ATPase-Motor der Sec-Translokase, dessen Röntgenkristallstruktur bekannt war, zu lokalisieren und ein hochaufgelöstes Strukturmodell des Komplexes zu berechnen.²³⁾



Membranproteine

◆ Eine medizinisch besonders bedeutsame, in der Strukturdatenbank aber leider unterrepräsentierte Klasse von Proteinen sind die Membranproteine. Entscheidend ist die Wahl eines Modellmembransystems zur funktionellen Rekonstitution in Lösung. Seit längerer Zeit werden für die NMR-Spektroskopie von Membranproteinen Detergens-Mizellen, Detergens/Lipid-Bizellen und Liposomen eingesetzt (Abbildung 3). Letztere sind aufgrund ihrer Größe eher für Festkörper-NMR interessant.

Das kleinste und einfachste System sind Mizellen, deren starke Krümmung jedoch die Proteinstruktur und -funktion beeinträchtigen kann. Die Lipiddoppelschicht von Bizellen aus einer Kombination von Lipid- und Detergensmolekülen ist weniger gekrümmt als die von Mizellen; Bizellen sind jedoch relativ groß, häufig inhomogen und schwer zu kontrollieren.

Ein relativ neues Modellmembransystem, Nanodiscs, bietet nun eine elegante Möglichkeit, diesen Nachteil zu umgehen. Bei diesen wird ein Fragment der Lipiddoppelschicht von zwei Kopien des amphipatischen Gerüstproteins MSP (membrane scaffold protein, eine Variante des humanen Apolipoproteins A-I) umschlossen. Größe und Lipidzusammensetzung von Nanodiscs sind variabel, z. B. 150 kDa bei einem Nanodisc-Durchmesser von zirka 10 nm.²⁴⁾ Nanodiscs vereinen den Vorteil geringer Größe mit dem von detergensfreien und flachen Lipiddoppelschichten. Anders als bei Liposomen ist das darin rekonstituierte Membranprotein auf beiden Seiten der Membran zugänglich.

Das Beispiel eines Polypeptids aus der Transmembran- und zyttoplasmatischen Domäne des humanen CD4-Rezeptors zeigt, dass es möglich ist, integrale Membranproteinen in Nanodiscs mit NMR-Spektroskopie in Lösung zu untersuchen.²⁵⁾ Auch der deuterierte und ¹⁵N-markierte humane spannungsabhängige Anionenkanal VDAC-1²⁶⁾ und lipidisiertes GABARAP ließen

sich funktionell in Nanodiscs rekonstituieren²⁷⁾ und mit BNMR-Spektroskopie untersuchen. Dass auch Detergens- und Lipid-Mizellen zum Erfolg führen können, zeigten die Lösungsstrukturen von VDAC-1,²⁸⁾ des Transmembranrezeptors Sensorrhodopsin II²⁹⁾ und von Proteorhodopsin,³⁰⁾ deren Bestimmung im Wesentlichen auf NOE-Abstandsbeschränkungen basieren, zum Teil mit PRE-Abstands- sowie RDC-Beschränkungen und niedrig aufgelösten röntgenkristallographischen Daten kombiniert.

Die NMR-Spektroskopie von Membranproteinen und großen Systemen, insbesondere die Untersuchungen der Proteindynamik sind Bereiche, deren Bedeutung in naher Zukunft weiter zunehmen dürfte.

Sven Schünke, Jahrgang 1978, studierte Biologie in Düsseldorf und promovierte im Jahr 2010 bei Dieter Willbold am Lehrstuhl für Physikalische Biologie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf und dem Institut für Strukturbiologie (ICS-6) im Forschungszentrum Jülich über NMR-Strukturanalyse. Als Postdoc beschäftigt er sich mit der funktionellen und strukturellen Charakterisierung neuronaler und viraler Proteine.



Philipp Neudecker, Jahrgang 1974, studierte Physik in Bayreuth und Albany. Nach der Promotion Ende 2003 bei Paul Rösch in Bayreuth in der NMR-Strukturbiologie von Allergenen arbeitete er als Postdoc bei Lewis Kay in Toronto an der Entwicklung von NMR-RD und ihrer Anwendung auf Proteinfaltung, Missfaltung und Aggregation. Seit kurzem ist er Akademischer Rat auf Zeit am Institut für Physikalische Biologie in Düsseldorf und beschäftigt sich mit der NMR-Untersuchung der Struktur und Dynamik von Proteinen.



Dieter Willbold, Jahrgang 1965, studierte Biochemie in Tübingen, Bayreuth und Boulder, USA. Er promovierte im Jahr 1994 bei Paul Rösch am Lehrstuhl für Biopolymere in Bayreuth. Er habilitierte sich 1998 und wechselte im selben Jahr zum Institut für Molekulare Biotechnologie in Jena. Im Jahr 2001 nahm er einen Ruf nach Düsseldorf an, wo er seit 2006 das Institut für Physikalische Biologie leitet. Seit 2005 ist er ebenfalls Direktor am Institut für Strukturbiologie (ICS-6) im Forschungszentrum Jülich. Seine Forschungsschwerpunkte sind Struktur, Funktion und Manipulation neuronaler und viraler Proteine.



Literatur

- 1) B. M. Burmann, K. Schweimer, X. Luo, M. C. Wahl, B. L. Stitt, M. E. Gottesman, P. Rösch, *Science* 2010, 328, 501.
- 2) M. R. Jensen, G. Communie, E. A. Ribeiro, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2011, 108, 9839.
- 3) K. Sugase, H. J. Dyson, P. E. Wright, *Nature* 2007, 447, 1021.
- 4) T. Mittag, S. Orlicky, W.-Y. Choy et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2008, 105, 17772.
- 5) G. Otting, *Annu. Rev. Biophys.* 2010, 39, 387.
- 6) C. Tang, J. Iwahara, G. M. Clore, *Nature* 2006, 444, 383.
- 7) P. Neudecker, A. Zarrine-Afsar, W.-Y. Choy, D. R. Muhandiram, A. R. Davidson, L. E. Kay, *J. Mol. Biol.* 2006, 363, 958.
- 8) P. Vallurupalli, D. F. Hansen, L. E. Kay, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2008, 105, 11766.
- 9) D. M. Korzhnev, T. L. Religa, W. Banachewicz, A. R. Fersht, L. E. Kay, *Science* 2010, 329, 1312.
- 10) G. Bouvignies, P. Vallurupalli, D. F. Hansen et al., *Nature* 2011, 477, 111.
- 11) P. Neudecker, A. Zarrine-Afsar, A. R. Davidson, L. E. Kay, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2007, 104, 15717.
- 12) O. F. Lange, N.-A. Lakomek, C. Farès et al., *Science* 2008, 320, 1471.
- 13) M. R. Jensen, P. R. L. Markwick, S. Meier, *Structure* 2009, 17, 1169.
- 14) U. Weininger, R. P. Jakob, B. Eckert et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2009, 106, 12335.
- 15) P. Schanda, B. Brutscher, R. Konrat, M. Tollinger, *J. Mol. Biol.* 2008, 380, 726.
- 16) P. Schanda, V. Forge, B. Brutscher, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2007, 104, 11257.
- 17) C. Amero, P. Schanda, M. A. n. Durai et al. *J. Am. Chem. Soc.* 2009, 131, 3448.
- 18) S. Schünke, M. Stoldt, J. Lecher, U. B. Kaupp, D. Willbold, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2011, 108, 6121.
- 19) S. Schünke, M. Stoldt, K. Novak, U. B. Kaupp, D. Willbold, *EMBO Rep.* 2009, 10, 729.
- 20) V. Tugarinov, W.-Y. Choy, V. Y. Orekhov, L. E. Kay, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005, 102, 622.
- 21) R. Sprangers, L. E. Kay, *Nature* 2007, 445, 618.
- 22) A. M. Ruschak, T. L. Religa, S. Breuer, S. Witt, L. E. Kay, *Nature* 2010, 467, 868.
- 23) I. Gelis, A. M. J. J. Bonvin, D. Keramisanou et al., *Cell* 2007, 131, 756.
- 24) T. H. Bayburt, S. G. Sligar, *FEBS Letters* 2010, 584, 1721.
- 25) J. M. Glück, M. Wittlich, S. Feuerstein et al. *J. Am. Chem. Soc.* 2009, 131, 12060.
- 26) T. Raschle, S. Hiller, T.-Y. Yu et al., *J. Am. Chem. Soc.* 2009, 131, 17777.
- 27) P. Ma, J. Mohrlüder, M. Schwarten et al., *ChemBioChem* 2010, 11, 1967.
- 28) M. Bayrhuber, T. Meins, M. Habeck et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2008, 105, 15370.
- 29) A. Gautier, H. R. Mott, M. J. Bostock, J. P. Kirkpatrick, D. Nietlispach, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2010, 17, 768.
- 30) S. Reckel, D. Gottstein, J. Stehle et al., *Angew. Chem.* 2011, 50, 11942.