

¹H-HR-MAS-NMR-Spektroskopie zur Untersuchung eines Ras-Lipopeptides in Lipidmembranen**

Daniel Huster, Karsten Kuhn, Dieter Kadereit,
Herbert Waldmann und Klaus Arnold*

Die Membranbindung ist eine Hauptvoraussetzung für die Funktion verschiedener Proteine, die an der biologischen Signaltransduktion beteiligt sind, wie heterotrimere G-Proteine oder das Oncogen *Ras*. Diese Enzyme weisen die Gemeinsamkeit auf, dass die Membranverankerung durch co- oder posttranskriptionale Lipidmodifizierung von Aminosäuren im N- oder C-Terminus des Proteins erreicht wird.^[1] Durch die kovalente Anbindung von Myristin- oder Palmitinsäuren sowie Prenylketten erhalten die Proteine einen hydrophoben Membrananker, der ihnen eine erhöhte Membranaffinität verleiht.

Strukturdaten über membrangebundene lipidmodifizierte Peptide stehen gegenwärtig nicht zur Verfügung. Das liegt daran, dass einerseits Standardmethoden bei der Strukturaufklärung von Membranproteinen versagen und andererseits Synthesewege für entsprechende Modellsubstanzen fehlen. Vor wenigen Jahren gelang jedoch die enzymatische Synthese von lipidmodifizierten Peptiden,^[2] die nicht nur ausgezeichnete Modellsysteme für Strukturuntersuchungen sind, sondern auch einen neuen effizienten Zugang zu lipidmodifizierten Enzymen eröffnen, die eine nahezu ebenso hohe Aktivität aufweisen wie das Wildtyp-Protein.^[3]

Für lösliche Peptide ist die ¹H-NMR-Spektroskopie eine Standardmethode, mit der hochauflöste molekulare Strukturen erhalten werden. Jedoch versagt diese Methode bei membrangebundenen Peptiden, da diese keine schnelle isotrope Rotationsdiffusion auf der NMR-Zeitskala aufweisen. Demzufolge sind die ¹H-NMR-Linien durch stark anisotrope ¹H-¹H-Dipol-Kopplungen (typischerweise einige kHz) homogen verbreitert. Diese anisotropen Wechselwirkungen führen zu breiten, strukturlosen Linienformen.

Für reine Lipidmembranen werden jedoch nahezu hochauflöste ¹H-NMR-Spektren erhalten, wenn die Probe schnell um eine Achse rotiert, die im Winkel von 54.7° (dem „magischen Winkel“) zum externen Magnetfeld orientiert ist („magic angle spinning“, MAS), selbst wenn die Rotations-

geschwindigkeit nicht die effektiven Dipol-Kopplungen übersteigt. Die Ursache für diese Verbesserung der spektralen Auflösung ist die schnelle axialsymmetrische Rotationsdiffusion der Lipide in der Membran um ihre Längsachse.^[4] Membrangebundene Peptide dagegen führen nur langsame Bewegungen aus, wodurch die NMR-Linien verbreitert sind und die Auflösung verschlechtert wird. Durch hochauflöste (HR) ¹H-HR-MAS-NMR-Untersuchungen an membrangebundenen Peptiden bei sehr hoher Rotationsfrequenz (ca. 15 kHz) wurde gezeigt, dass diese Beschränkungen teilweise überwunden werden können.^[4b, 5] Jedoch sind zur Beobachtung hochauflöster ¹H-MAS-NMR-Spektren an Lipiden wie auch Peptiden in solchen geordneten Systemen wie Modell- oder Biomembranen schnelle axialsymmetrische molekulare Bewegungen unbedingt notwendig.^[4b]

Wir stellen hier eine ¹H-HR-MAS-NMR-Studie eines lipidmodifizierten, membrangebundenen Heptapeptides vor, das dem C-Terminus des menschlichen N-Ras-Proteins entspricht. Diese Methode ermöglicht erstmalig Strukturuntersuchungen an lipidmodifizierten, membrangebundenen Peptiden. Die Membranbindung wird durch eine kovalent gebundene Palmitin-Fettsäurekette und einen Hexadecylthioether erreicht, die in die Membran eingebaut werden. Dieses Bindungsmotiv verleiht dem Peptid Bewegungsfreiheit für axialsymmetrische Umorientierungen in der Doppelschicht, wodurch die NMR-Linienbreite signifikant verringert wird. Die Aminosäuresequenz des untersuchten Peptides ist H-Gly-Cys(Pal)-Met-Gly-Leu-Pro-Cys(HD)-OMe (Pal = Palmitinsäure, HD = Hexadecyl). Dieses Peptid wurde in multilamellare Vesikel aus deuteriertem 1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholin ($[D_{67}]DMPC$) eingelagert und mit ¹H-HR-MAS-NMR untersucht.

In Abbildung 1 ist das ¹H-MAS-NMR-Spektrum der Lipid/Peptid-Dispersion dargestellt. Neben dem intensiven Signal des Wassers bei $\delta = 4.55$ zeigt das Spektrum starke Signale der

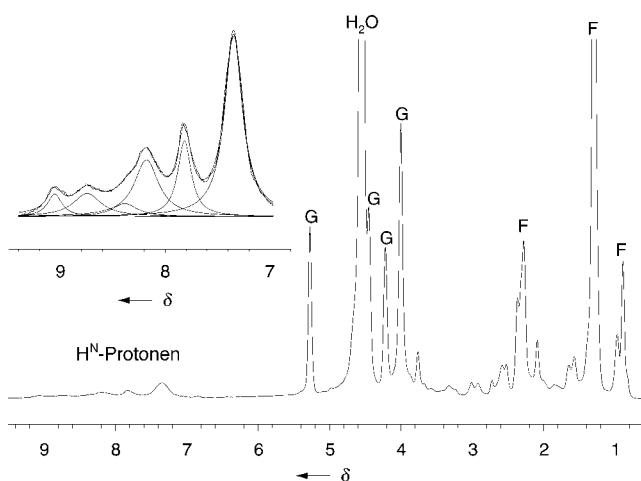


Abbildung 1. ¹H-HR-MAS-NMR-Spektrum des Ras-Peptids in multilamellaren $[D_{67}]DMPC$ -Liposomen (30 Gew.-% H_2O) bei einer Rotationsfrequenz von 12 kHz und einer Temperatur von 37 °C. Mit G sind Glycerin-Signale der Phospholipide bezeichnet, die in $[D_{67}]DMPC$ nicht deuteriert sind.^[6] Fettsäuresignale (F) der Peptidacylketten und eine große Zahl gut aufgelöster aliphatischer Peptidsignale sind in der Hochfeldregion des Spektrums zu sehen. Die Amidregion des Spektrums ist im Einschub vergrößert dargestellt; die Linienform der Amidsignale konnte mit sechs Lorentz-Linien angepasst werden.

[*] Prof. Dr. K. Arnold, Dr. D. Huster^[+]

Universität Leipzig
Institut für Medizinische Physik und Biophysik
Liebigstraße 27, 04103 Leipzig (Deutschland)
Fax: (+49) 341-97-15700/15709
E-mail: arnold@medizin.uni-leipzig.de

Dr. K. Kuhn, Dipl.-Chem. D. Kadereit, Prof. Dr. H. Waldmann
Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie
Otto-Hahn-Straße 11, 44227 Dortmund (Deutschland)

[+] Gegenwärtige Adresse:

Department of Chemistry, Gilman Hall 1605, Iowa State University Ames IA 50011 (USA)

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 197 und Innovationskolleg „Chemisches Signal und biologische Antwort“) gefördert. D.H. dankt für ein BASF-Stipendium durch die Studienstiftung des deutschen Volkes. Die Autoren danken Herrn Dr. A. Pampel für die technische Unterstützung am DRX600-Spektrometer.

Fettsäuren des Peptides sowie der Glyceringruppen der Phospholipide infolge unvollständiger Deuterierung in $[D_{67}]DMPC$.^[6] Die typische Linienbreite dieser Phospholipid-Signale beträgt 0.05–0.06 ppm (etwa 30 Hz am 600-MHz-Instrument). Darüber hinaus ist im Spektrum eine große Zahl gut aufgelöster aliphatischer Peptidsignale zu sehen. Die Linienbreite dieser Seitenketten-Signale ist nur geringfügig höher als die der Lipide (0.07–0.1 ppm). In der Tieffeldregion des Spektrums sind die sechs Amidprotonen des Peptides aufgelöst (Prolin weist kein Amidproton auf). Dieser Teil des Spektrums konnte mit sechs Lorentz-Linien angepasst werden, wobei die verwendete Linienbreite zwischen 0.16 und 0.32 ppm lag (Einschub in Abbildung 1). Die H^N -Protonen-Signale sind durch Lösungsmittelaustausch sowie die skalare Relaxation durch die benachbarten ^{14}N -Kerne verbreitert. Das Peptidrückgrat ist die starrste Region des Peptides, und Linienverbreiterungen durch nicht gemittelte Dipol-Kopplungen sind besonders effektiv. Die unterschiedlichen Intensitäten für die H^N -Protonen könnten auf die unterschiedliche Mobilität der Amidbindungen im Proteinrückgrat zurückzuführen sein, da beweglichere Strukturen aufgrund schwächerer Dipol-Kopplungen mehr Zentralband- und weniger Seitenbandintensität aufweisen. Rigidere Strukturen unterliegen dagegen stärkeren Dipol-Kopplungen und geben folglich eine größere Seitenband- und eine kleinere Zentralbandintensität.^[6]

Aufgrund der guten Auflösung und langen Spin-Gitter-Relaxationszeiten können 2D-Nuclear-Overhauser-Effekt-Spektren (NOESY) aufgenommen werden. In diesem Experiment wird der Magnetisierungstransfer über Abstände von bis zu 5 Å aufgezeichnet.^[7] Für HR-MAS-Studien kann dieselbe Pulssequenz wie in der hochauflösten NMR verwendet werden. Der Magnetisierungstransfer wird durch nichtdiagonale Korrelationspeaks im 2D-NOESY-Spektrum aufgezeigt. Abbildung 2 zeigt die aliphatische und die H^N -Region des 1H -HR-MAS-NOESY-Spektrums bei einer Mischzeit von 200 ms. Typischerweise werden drei Arten von Korrelationspeaks beobachtet: a) Intramolekulare Korrelationspeaks zeigen einen Magnetisierungstransfer innerhalb des Peptides an. Dieser Magnetisierungstransfer ist durch die Bewegung des gesamten Moleküls an der Membranoberfläche moduliert. Aus den Kreuzpeakvolumina können die Proton-Proton-Abstände zur Strukturberechnung erhalten werden. b) Die intermolekulare Kreuzrelaxation zwischen Lipid und Peptid wird durch die Variation der internuclearen Abstände durch Bewegungen der gesamten Moleküle moduliert. Da die intermolekularen Abstände in flüssigkristallinen Substanzen signifikante Schwankungen unterliegen, können die Kreuzrelaxationsgeschwindigkeiten nicht in feste Abstände umgewandelt werden, sondern geben ein Maß für die Kontaktwahrscheinlichkeit zwischen Molekülsegmenten.^[6, 8] Mit Hilfe dieser Korrelationspeaks kann die Lage und Verteilung bestimmter Molekülgruppen in der Membran bestimmt werden.^[9] c) Der chemische Austausch zwischen labilen H^N -Protonen und Wasser führt zu Korrelationspeaks, die Auskunft über die Wasserzugänglichkeit von Aminosäuren in der Membran geben.^[10]

In den NOESY-Spektren membrangebundener Ras-Peptide werden alle drei Typen von Korrelationspeaks beobachtet.

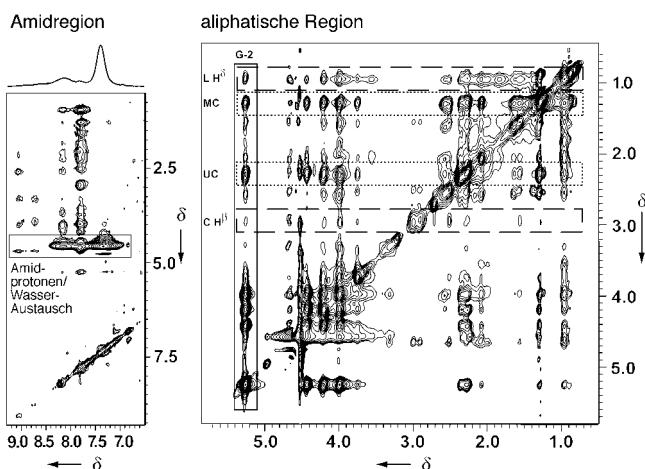


Abbildung 2. 1H -HR-MAS-NOESY-Spektrum des Ras-Peptides in multilamellaren $[D_{67}]DMPC$ -Liposomen bei einer Mischzeit von 200 ms. Die aliphatische Region zeigt Korrelationspeaks von Glycerineinheiten (G-2) mit verschiedenen Peptid- und Lipid-Signalen (durchgezogener Rahmen). Im gestrichelten Rahmen sind Korrelationspeaks der β -Protonen der Cys-Reste (CH^β) und der δ -Protonen von Leucin (LH^β) hervorgehoben. Korrelationspeaks der oberen (UC) und mittleren (MC) Ketten-Signale des Peptides liegen im gepunkteten Rahmen. In der Amidprotonen-Region wurden die Korrelationspeaks durch den Austausch labiler Protonen mit dem Lösungsmittel hervorgehoben. Eine Schnitt durch das 2D-Spektrums bei der Verschiebung des Wassersignals ($\delta = 4.55$) ist ebenfalls dargestellt. Alle Amidprotonen nehmen am Wasseraustausch teil.

Es geht über das Ziel dieser Kurzmitteilung hinaus, eine vollständige Zuordnung und Diskussion aller vorkommenden Korrelationspeaks zu geben, jedoch sollen einige interessante Korrelationen hervorgehoben werden. Unsere vorläufige Signalzuordnung basiert auf der Signalzuordnung des Peptides in $CDCl_3$.^[2] Die H^δ -Protonen von Leu bei $\delta = 0.95$ weisen sehr intensive Korrelationspeaks mit der Glycerinregion sowie den Protonen der oberen Region der Fettsäureketten der Phospholipide auf. In ähnlicher Weise geben die H^β -Protonen der beiden Cys-Reste ($\delta = 3.01$ und 2.92) Korrelationspeaks mit Glycerin und der oberen Kettenregion der Lipide. Jedoch werden keine Kontakte zwischen den Cys- H^β -Protonen und den Methyl- und Methylensegmenten der unteren Region der Lipidketten des Peptides registriert, wodurch auf eine mittlere Lage der Leu- und Cys-Seitenketten in der Glycerin- und der oberen Kettenregion der Membran geschlossen werden kann. Dies ist in Einklang mit der Annahme, dass durch die Insertion der Lipidketten des Peptides in die Membran die Cys-Seitenketten tiefer in die unpolare Region der Membran eintauchen, wo es zu energetisch günstigen Wechselwirkungen mit den hydrophoben Lipidkettensegmenten kommt. Nach der experimentellen Hydrophobieskala von Wimley und White^[11] beträgt die gesamte Freie Energie des Transfers des Peptides aus der wässrigen Phase in die Membran $-0.8 \text{ kcal mol}^{-1}$. Dadurch wird die hohe Affinität des Peptides zur Membran auch ohne Lipidmodifikationen deutlich.

Um die Lage des Peptidrückgrates in der Membran näher zu charakterisieren, wurde der Austausch der Amidprotonen mit Wasser analysiert. In der H^N -Region des NOESY-Spektrums treten intramolekulare Korrelationspeaks zwischen Amidprotonen und Seitenketten sowie intermolekulare Korrelationspeaks mit Glycerin und den oberen Acylketten-

signalen auf (Abbildung 2). Zusätzlich weist das Spektrum drei starke Korrelationspeaks auf, die auf den chemischen Austausch der H^N-Protonen mit H₂O zurückzuführen sind, die anderen Amidprotonen dagegen zeigen nur schwachen Wasseraustausch. Es kann jedoch durch die Auswertung des Schnitts durch des 2D-Spektrums bei $\delta = 4.55$ gezeigt werden, dass alle H^N-Protonen am Wasseraustausch teilnehmen. Dagegen sind Amidprotonen, die sich in Strukturen im hydrophoben Kern der Membran befinden, vom Wasseraustausch ausgeschlossen, während Aminosäuren, die in der Lipid-Wasser-Grenzschicht lokalisiert sind, austauschen.^[12] Im Ras-Peptid sind alle Amidprotonen an Wasseraustauschprozessen beteiligt, weshalb angenommen werden kann, dass das Peptid sich im wasserzugänglichen Teil der Membran befindet, d.h. in der Lipid-Wasser-Grenzschicht, die durch die Kopfgruppen, die Glycerineinheiten und die obere Kettenregion definiert ist.^[13]

Es konnte gezeigt werden, dass die ¹H-HR-MAS-NMR-Spektren eines membrangebundenen Lipopeptides eine ausgezeichnete spektrale Auflösung für die strukturellen Untersuchungen dieser Modellsysteme aufweisen. Das Ras-Peptid wurde in der Lipid-Wasser-Grenzschicht der Membran lokalisiert, während die Peptidacylketten ins Innere der Membran ragen (Abbildung 3). Die Lipid-Wasser-Grenzschicht der

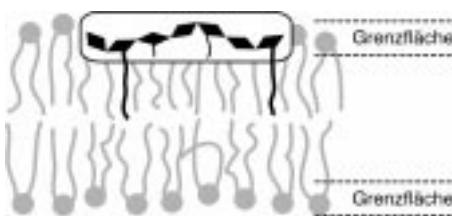


Abbildung 3. Illustration der Lage des Ras-Peptids in der Lipid-Wasser-Grenzschicht der Membran (Kopfgruppen-, Glycerin- und obere Kettenregion). Die Acylketten und die hydrophoben Seitenketten des Peptids dringen tiefer in den hydrophoben Bereich der Membran ein.

Membran repräsentiert eine breite Zone aus ungeordneten Kopfgruppen, Glycerineinheiten und oberen Kettensegmenten, die Wassermolekülen leicht zugänglich ist.^[13] Die hydrophoben Peptid-Seitenketten ragen in die hydrophobere Region der Membran, wo es zu hydrophoben Wechselwirkungen kommt. Das polare Peptidrückgrat wechselt intensiv mit der wässrigen Phase. Für das hier untersuchte Peptid/Lipid-System erscheint die vollständige Zuordnung der NMR-Signale sowie eine quantitative Analyse der Lokalisation sowie der membrangebundenen Struktur des Peptides durch den Einsatz der HR-MAS-NMR-Spektroskopie möglich. Damit werden neue Strukturdetails dieses wichtigen Mechanismus zur Membranbindung und Proteininsertion zugänglich.

Experimentelles

[D₆₇]1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholin ([D₆₇]DMPC) wurde ohne weitere Reinigung verwendet. Das lipidmodifizierte N-Ras-Peptid wurde enzymatisch synthetisiert.^[2] Für die Präparation der NMR-Proben wurden Phospholipid und Peptid im Molverhältnis 10:1 in Methanol gemischt, unter Stickstoff getrocknet, anschließend in Cyclohexan gelöst und lyophilisiert. Die Proben wurden bis zu einem Gehalt von 30 Gew.-%

H₂O hydratisiert und durch Gefrier-Auftau-Cyclen, Röhren und Zentrifugieren homogenisiert. Anschließend wurde die Probe in sphärische Einsätze für 4-mm-MAS-Rotoren überführt. Die NMR-Experimente wurden an einem Bruker-DRX600-Spektrometer bei einer Resonanzfrequenz von 600.13 MHz und 37 °C durchgeführt. Die MAS-Frequenz lag bei 12 kHz. Die Spektren wurden mit einer spektralen Breite von 10.9 kHz und einer 90°-Pulslänge von 6.2 μs aufgenommen. Für phasensensitive NOESY-Experimente bei einer Mischzeit von 200 ms wurden 400 komplexe Datenpunkte in der indirekten Dimension akkumuliert. Dabei wurden 32 Scans pro Inkrement im Abstand von 4 s aufgezeichnet.

Eingegangen am 10. August 2000 [Z15616]

- [1] a) P. J. Casey, *Science* **1995**, *268*, 221–225; b) S. McLaughlin, A. Aderem, *Trends Biochem. Sci.* **1995**, *20*, 272–276.
- [2] a) M. Schelhaas, S. Glomsda, M. Hänsler, H.-D. Jakubke, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 82–85; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 106–109; b) K. Hinterding, D. Alonso-Diaz, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 716–780; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1998**, *37*, 688–749.
- [3] B. Bader, K. Kuhn, D. J. Owen, H. Waldmann, A. Wittinghofer, J. Kuhlmann, *Nature* **2000**, *403*, 223–226.
- [4] a) J. Forbes, C. Husted, E. Oldfield, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 1059–1065; b) J. H. Davis, M. Auger, R. S. Hodges, *Biophys. J.* **1995**, *69*, 1917–1932.
- [5] a) M. Bouchard, J. H. Davis, M. Auger, *Biophys. J.* **1995**, *69*, 1933–1938; b) C. Le Guerneve, M. Seigneuret, *Biophys. J.* **1996**, *71*, 2633–2644.
- [6] D. Huster, K. Arnold, K. Gawrisch, *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 243–251.
- [7] G. Wagner, K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.* **1982**, *155*, 347–366.
- [8] S. E. Feller, D. Huster, K. Gawrisch, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 8963–8964.
- [9] W. M. Yau, W. C. Wimley, K. Gawrisch, S. H. White, *Biochemistry* **1998**, *37*, 14713–14718.
- [10] G. Wagner, *Q. Rev. Biophys.* **1983**, *16*, 1–57.
- [11] W. C. Wimley, S. H. White, *Nat. Struct. Biol.* **1996**, *3*, 842–848.
- [12] M. Cotten, R. Fu, T. A. Cross, *Biophys. J.* **1999**, *76*, 1179–1189.
- [13] M. C. Wiener, S. H. White, *Biophys. J.* **1992**, *61*, 434–447.

Isolierte hexagonale Kanäle aus dreibindigen Ge[−]-Ionen in Hochdruck-LiGe**

Jürgen Evers* und Gilbert Oehlinger

In der homologen Reihe der LiE-Verbindungen (E = Element der IV. Hauptgruppe, Si–Pb) zählen LiSi^[1, 2] und LiGe^[3, 4] bei Normaldruck (ND) zu den Zintl-Phasen,^[5, 6] LiSn^[7] und LiPb^[8, 9] dagegen zu den intermetallischen Phasen. Entsprechend einem Ladungstransfer Li⁺Si[−] und Li⁺Ge[−] sind die Si[−]- und die Ge[−]-Ionen in diesen Zintl-Phasen isovalenz-elektronisch mit den Elementen der V. Hauptgruppe und bilden drei homonucleare Bindungen, und zwar in der Raumnetzstruktur vom MgGa-Typ.^[10] In LiSn^[7] jedoch wei-

[*] Prof. Dr. J. Evers, G. Oehlinger

Department Chemie, Universität München
Butenandtstraße 5–13 (Haus D), 81377 München (Deutschland)
Fax:(+89)2180-7950
E-mail: eve@cup.uni-muenchen.de

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und vom Fonds der Chemischen Industrie gefördert.