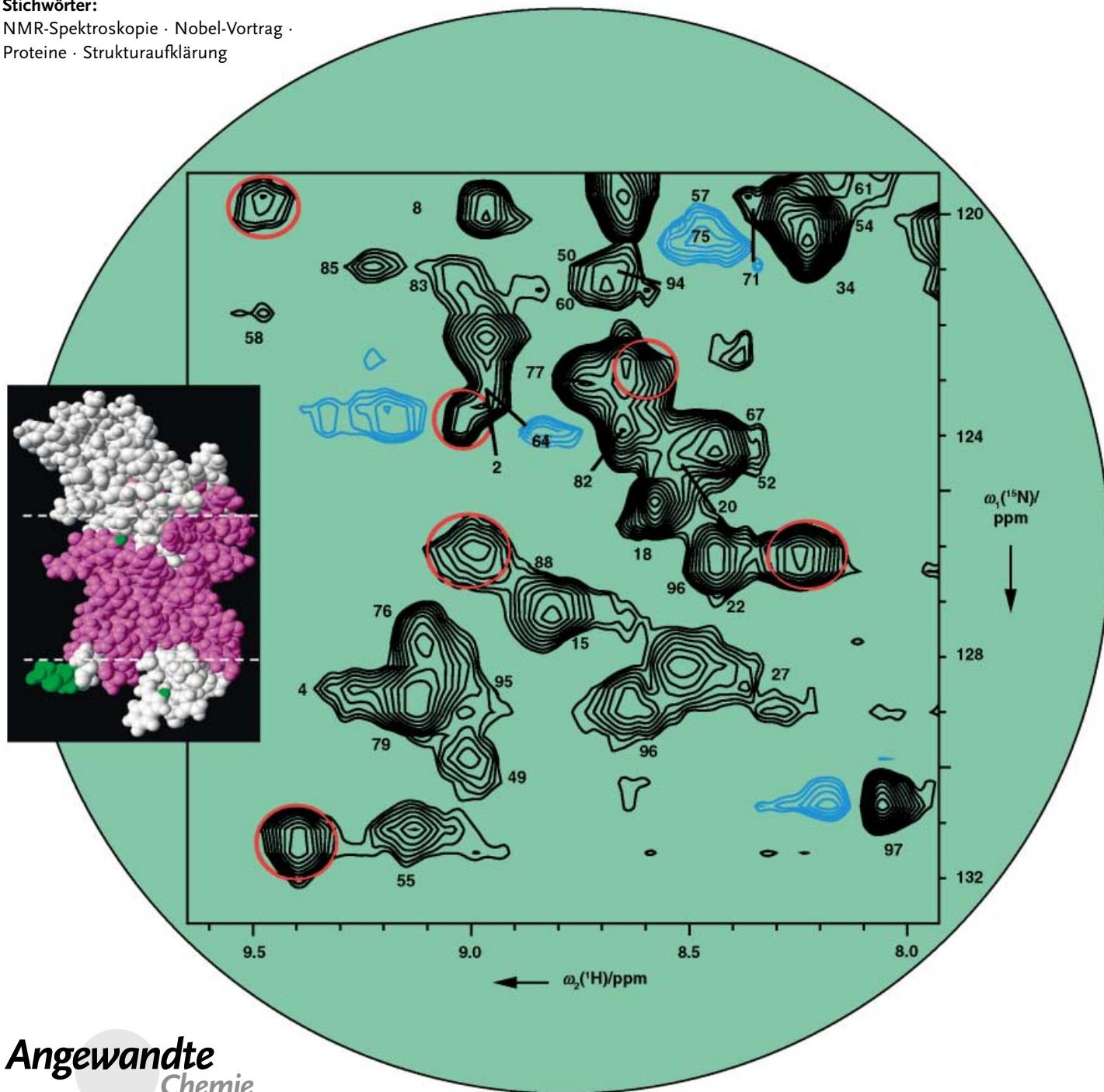


NMR von Biomakromolekülen**NMR-Untersuchungen von Struktur und Funktion biologischer Makromoleküle (Nobel-Vortrag)******Kurt Wüthrich*****Stichwörter:**

NMR-Spektroskopie · Nobel-Vortrag ·

Proteine · Strukturaufklärung

**Angewandte
Chemie**

Aus dem Inhalt

1. Einführung	3463
2. NMR-Spektren von Proteinen in Lösung	3470
3. Der Weg zur NMR-spektroskopischen Bestimmung von Proteinstrukturen	3473
4. NMR-Spektroskopie in der Strukturbioologie	3479
5. Ausblick auf NMR-Anwendungen in der Struktur- und Funktionsproteomik	3482

Biographische Notizen

Ich wurde am 4. Oktober 1938 in Aarberg in der Schweiz geboren und verbrachte meine Kindheit in dem kleinen Städtchen Lyss im Berner Seeland. Damals war das eine ländliche Gegend, geprägt durch Landwirtschaft, Wälder und Flüsse. Die Wurzeln der Familie



Wüthrich liegen in einer noch abgelegenen, gebirgigen Gegend, dem Bauerndorf Trub im Emmental in der Nähe von Bern. Der Familie meiner Mutter gehörten das Restaurant „Bären“ und eine Bäckerei in Lyss. Mein Großvater, Otto Kuchen, jagte und fischte gerne, und sein Hasenpfeffer war zur Herbstzeit eine wohlbekannte Spezialität im „Bären“. Meine Interessen waren damals weitgehend durch unser Leben in dem alten Bauernhaus geprägt, in dem mein anderer Großvater, Jakob Wüthrich, eine Landwirtschaft betrieb.

Obwohl mein Vater, Herrmann Wüthrich, Buchhalter wurde, blieb er doch seiner Herkunft eng verbunden, und unsere Familie produzierte eine breite Palette an landwirtschaftlichen Erzeugnissen. Meine Mutter, Gertrud Wüthrich-Kuchen, war der wahre Mittelpunkt unserer Familie. Neben der Erziehung von mir und meinen zwei jüngeren Schwestern, Elisabeth und Ruth, vollbrachte sie wahre Wunder in der Küche, kümmerte sich um unseren großen Garten, züchtete Geflügel und beteiligte sich an vielen Gemeindeaktivitäten.

Mein intensiver Kontakt mit den Pflanzen und Tieren unserer ländlichen Umgebung weckte in mir schon früh das Interesse an den Naturwissenschaften. Vor allem erwarb ich eine solide Kenntnis vom Verhalten aller Arten von Wasserlebewesen, im Wesentlichen durch Beobachtungen während der verschiedensten Arbeiten und



Im Garten unseres Hauses in Lyss in der Schweiz, zusammen mit meinen Eltern, Herrmann and Gertrud Wüthrich-Kuchen, und meinen zwei Geschwistern Elisabeth und Ruth, 1944.



Im Mercury Bay Game Fishing Club in Whitianga, Neuseeland, 1987.

[*] Prof. Dr. K. Wüthrich
Institut für Molekularbiologie
Eidgenössische Technische Hochschule Zürich
8093 Zürich (Schweiz)
Fax: (+41) 1 633 11 51
E-mail: kurt.wuthrich@mol.biol.ethz.ch
und
The Scripps Research Institute
10550 N. Torrey Pines Rd., La Jolla, CA 92037 (USA)

[**] Copyright© The Nobel Foundation 2002. – Wir danken der Nobel-Stiftung, Stockholm, für die Genehmigung zum Druck einer deutschen Fassung des Vortrags.

Vergnügungen, die an einem privaten Forellengewässer anfallen. Heute finde ich nur noch selten Zeit zum Fischen, aber ich bin Mitglied im Mercury Bay Game Fishing Club in Whitianga, Neuseeland, genauso wie einst Ernest Hemingway und Zane Grey. Als Beruf hatte ich mir damals Förster in den Kopf gesetzt. Obwohl ich in dieser Beziehung meine Meinung später geändert habe, kümmere ich mich immer noch gerne um den Familienwald, in dem mittlerweile Bäume stehen, die von drei Generationen unserer Familie gepflanzt wurden.

Meine Schullaufbahn hin zu einem akademischen Beruf begann 1952, als ich von der Dorfschule in Lyss auf das Gymnasium in der nahen zweisprachigen Stadt Biel/Bienne wechselte. Auf dem Gymnasium erweiterten sich meine Interessen über Waldwirtschaft und Fischen hinaus. Wir hatten das Glück, dass unsere Lehrer für die Naturwissenschaften und Sprachen entweder ehemalige Universitätsprofessoren waren, die ihre akademische Stellung irgendwo in Europa während des Zweiten Weltkriegs verlassen und Zuflucht in Biel gefunden hatten, oder wie damals üblich den Lehrauftrag am Gymnasium als Vorstufe für eine akademische Laufbahn nutzten. Im Alter von 14 bis 18 waren wir eine Gruppe von sieben Schülern, die sich auf „Naturwissenschaften“ spezialisierten und somit eine Mathematik- und Physikausbildung auf Universitätsniveau bekamen, eine Herausforderung, die ich dankbar annahm. Meiner Mutter zufolge gewöhnte ich mir damals an, die Nächte durchzuarbeiten. Ein weiterer Schwerpunkt waren die französische Sprache, französische Literatur, französisches Theater und französische Filme, weitgehend motiviert durch die Tatsache, dass die Zusammensetzung sowohl unserer Klasse als auch unseres Lehrkörpers den zweisprachigen Charakter von Biel/Bienne widerspiegelte. Das Gymnasium von Biel besaß Verbindungen zur Eidgenössischen Sportschule im nahen Magglingen, sodass mein Interesse am Wettkampfsport erwachte. Alle drei Gebiete spielen bis heute eine große Rolle in meinem Leben. Physik und Mathematik nehmen eine Schlüsselposition in meinem Berufsleben ein, dienstliche Aufenthalte in Paris und in der französischen Provinz nutzte ich zum Genuss von französischem Essen, französischem Wein und französischer Kultur, und ich habe nicht nur das Eidgenössische Turn- und Sportlehrerdiplom als einen meiner Universitätsabschlüsse erworben, sondern auch bis über das Alter von 50 hinaus wettkampfmäßig Fußball gespielt.

Mittlerweile kann ich auf 40 Jahre intensiver Beschäftigung mit als magnetische Resonanzspektroskopie bezeichneten Techniken zurückblicken. Während meiner Studienzeit war es ab 1962 zunächst die paramagnetische Elektronenresonanz (electron paramagnetic resonance, EPR), die in meiner Postdoc-Zeit von 1965 bis 1967 durch die kernmagnetische Resonanz (nuclear magnetic resonance, NMR), angewendet in physikalisch-chemischen Projekten, ergänzt wurde, und seit Herbst 1967 habe ich dann die NMR-Technik für Untersuchungen an biologischen Makromolekülen genutzt. Von dort war es ein gewundener Pfad, auf dem ich schließlich 1984 zur NMR-spektroskopischen Proteinstrukturbestimmung in Lösung gelangte. Unsere Ergebnisse stießen gelegentlich auf Zweifel und Ungläubigkeit, sodass es zu manchen Zeiten auch erheblicher Standhaftigkeit und Beharrlichkeit bedurfte.

Während meiner Studienjahre von 1957 bis 1962 wurde die NMR-Spektroskopie gerade als analytische Methode in der Chemie eingeführt, Molekularbiologie existierte noch nicht als eigenständige Disziplin, und die ersten mit atomarer Auflösung bestimmten dreidimensionalen Protein-Kristallstrukturen tauchten gerade erst auf. Meine Ausbildung an der Universität Bern konnte daher unmöglich das Gebiet unserer derzeitigen Forschung umfassen. Der Lehrkörper und die Studentenjahrgänge in Bern waren zahlenmäßig gering – 1957 begannen drei Studenten das Physik- und sieben das Chemiestudium. Von meinen Lehrveranstaltungen in Chemie, Physik und Mathematik blieben mir besonders die intensive Beschäftigung mit linearer Algebra, klassischer Mechanik, chemischer Thermodynamik, der physikalischen Chemie von syntheti-



Als Postdoc in Berkeley, 1966.

schen Polymeren und der präparativen Biochemie von Proteinen und Nucleinsäuren in Erinnerung. Diese Kombination erwies sich als ein exzellentes Fundament für meine späteren wissenschaftlichen Aktivitäten. Die letzten beiden Studienjahre, von 1962 bis 1964, verbrachte ich an der Universität Basel, wo ich einen Abschluss in Sport und meinen Doktor in Chemie machte. Das Sportstudium umfasste ungefähr 25 Wochenstunden intensiven körperlichen Trainings und vormedizinische Kurse in der Anatomie und Physiologie des Menschen. Zusammen mit den Beobachtungen, die ich an mir selbst im Wettkampfsport gemacht hatte, war dies ein weiterer wichtiger Aspekt meiner Ausbildung. Das Thema meiner Doktorarbeit in Anorganischer Chemie bei Professor Silvio Fallab war die katalytische Aktivität von Kupferverbindungen in Autoxidationsreaktionen, und für dieses Projekt war die Verfügbarkeit eines modernen EPR-Spektrometers am Institut für Physik eine großartige Rahmenbedingung.

Das Studium der Naturwissenschaften hatte mir immer viel Spaß gemacht, trotzdem hatte ich mir fest vorgenommen, eine Laufbahn als Gymnasiallehrer mit Schwerpunkt Sport einzuschlagen. Parallel zu meinen Studien der Naturwissenschaften habe ich mich deshalb intensiv dem gewidmet, was ich für meine Berufung hielt. So verbrachte ich in den Jahren 1957–1962 jeden Winter zum Teil als Skilehrer in Schweizer Wintersportorten. Außerdem unterrichtete ich von 1959 bis 1965 in Teilzeit an Gymnasien, erst Physik an der Kantonsschule Solothurn, danach Chemie am Gymnasium in Biel und schließlich Gymnastik am Mädchengymnasium in Basel. Diese Lehrtätigkeiten hatten auch einen großen Einfluss auf mein Privatleben: Im Jahr 1961 lernte ich während meiner Tätigkeit als Skilehrer im Ferienort Saanenmöser im Berner Oberland meine Frau, Marianne Briner, kennen, die damals Grundschullehrerin war. Wir heirateten 1963, und Marianne studierte anschließend zusammen mit mir Sport an der Universität Basel, erwarb ihr Eidgenössisches Turn- und Sportlehrerdiplom und spezialisierte sich auf modernen Tanz. Nach den Studien- und Postdoc-Jahren gründeten wir eine Familie: Unser Sohn Bernhard Andrew wurde 1968 in Berkeley Heights, New Jersey geboren, und unsere Tochter Karin Lynn kam 1970 in Greifensee bei Zürich dazu.

Nach Abschluss meines Studiums verbrachte ich ein weiteres Jahr in Basel, in dem ich mich auf EPR-Untersuchungen an Metallkomplexen in Lösung konzentrierte. Im Frühjahr 1965 zogen wir in die USA, wo ich als Postdoc bei Professor Robert E. Connick an der University of California in Berkeley anfing. Wir nutzten NMR-Spinrelaxationsmessungen an ^{17}O , ^{2}H und ^{1}H zusätzlich zu EPR-Messungen für die Untersuchung der Hydratation von Metallionen und Metallkomplexen. In meiner Zeit in Berkeley beschäftigte ich mich intensiv mit der Theorie der Kernspinrelaxation, der Grup-



Zusammen mit meiner Frau Marianne, meinem Sohn Bernhard und meiner Tochter Karin vor unserer Wohnung in Greifensee in der Schweiz, 1972.



Zusammen mit (von links nach rechts) Karin, Marianne und Bernhard in der Wüste nahe Tucson, Arizona, 1984.



Zu Besuch an der University of California, Berkeley, 1997. Dudley Herschbach war zufällig am gleichen Tag zu Besuch. Unser Mittagessen bei „Chez Panisse“ hatte sich in die Länge gezogen, daher nahm unser Gastgeber Alex Pines den Nachtisch mit zum Seminarraum.



Professor Robert E. Connick in meinem Büro an der ETH Zürich, 1981.

pentheorie und der Quantenmechanik, motiviert durch Professor Connicks wöchentliches Gruppenseminar, eine Spezialvorlesung über „Gruppentheorie und Quantenmechanik“ von Professor Michael Tinkham und die intensive Zusammenarbeit mit einem anderen Schweizer Postdoc, Alex von Zelewsky, der bald darauf den Lehrstuhl für Anorganische Chemie an der Universität Fribourg in der Schweiz übernahm. Marianne und ich sind seither regelmäßig nach Berkeley zurückgekehrt, um die Freundschaften aus den sechziger Jahren und schöne Erinnerungen aufzufrischen.

Im Oktober 1967 schloss ich mich der Biophysik-Abteilung von Dr. Robert G. Shulman bei den Bell Telephone Laboratories in Murray Hill, New Jersey an. Dort war ich für die Wartung eines der ersten supraleitenden Hochauflösungs-NMR-Spektrometer, das bei

einer Protonenresonanzfrequenz von 220 MHz arbeitete, verantwortlich und hatte ansonsten jede Freiheit, dieses Instrument für Untersuchungen zur Struktur und Funktion von Proteinen zu nutzen. Aufgrund meiner Vorbildung war ich mehr an Metallzentren als an Polypeptidketten interessiert, und anfänglich hatten alle meine Hochauflösungs-NMR-Projekte mit Hämproteinen zu tun. Aus dem aus meinem Arm im Erste-Hilfe-Raum entnommenen Blut präparierte Dr. Tetsuo Yamane, ein japanischer Kollege bei den Bell Telephone Laboratories, das „Hämoglobin (KW)“ und innerhalb weniger Monate fanden wir völlig neue Zugänge zu Informationen über Struktur-Funktions-Beziehungen aus den NMR-Spektren von Hämoglobin und anderen Hämproteinen. Diese Projekte waren ein Glückstreffer: Angesichts der begrenzten Empfindlichkeit und spektralen Auflösung der 1968 verfügbaren Instrumente waren die speziellen spektralen Eigenschaften der Hämproteine von großer Bedeutung für erfolgreiche NMR-Anwendungen. Diese einmaligen Eigenschaften waren viele Jahre später bei zahlreichen Aspekten der Entwicklung des NMR-Verfahrens zur Bestimmung dreidimensionaler Proteinstrukturen von zentraler Bedeutung.

Im Oktober 1969 wechselte ich an die ETH Zürich. Von Anbeginn war ich genauso gut mit NMR- und EPR-Geräten

ausgerüstet wie vorher bei den Bell Telephone Laboratories, und während der nächsten 32 Jahre hat uns die ETH in regelmäßigen Abständen die Beschaffung der jeweils modernsten NMR-Ausrüstung ermöglicht. Bis 1975 arbeitete ich mit einer kleinen Gruppe von Studenten, einem Chemieingenieur, Rudolf Baumann, der all die Jahre hindurch bei mir geblieben ist, und einer Postdoktorandin, Regula Keller, die ihren Doktor in Physik über Festkörper-EPR-Spektroskopie gemacht hatte und von 1970 bis 1982 höchst erfolgreich die Forschung an Hämproteinen übernahm. 1973 entschied sich Gerhard Wagner, bei mir zu promovieren. Gerhard blieb schließlich bis 1987 bei der Gruppe und schlug die klassische europäische Universitätslaufbahn mit Habilitation ein, bevor er schließlich als Professor an die Harvard Medical School ging. Die Möglichkeit, herausragende junge Wissenschaftler als Mitarbeiter über längere Zeit zu halten, war ein spezielles Privileg, das Professoren im traditionellen europäischen Hochschulsystem genossen, und die kontinuierliche Anwesenheit von Rudolf, Regula und Gerhard während eines Großteils meiner ersten 15 Jahre in Zürich war ein entscheidender Beitrag zum Erfolg unseres Forschungsprogramms.

In Zürich setzten wir unsere Forschung an Hämproteinen mit den Mitteln der NMR- und EPR-Spektroskopie fort, wobei die biochemischen Arbeiten meistens von Gruppen außerhalb der ETH im Rahmen von gemeinsamen Projekten durchgeführt wurden, die spektroskopischen Arbeiten dagegen von Regula Keller, mir selbst und einer Reihe von Doktoranden. Zusätzlich begannen wir mit systematischen Untersuchungen über die Anwendung von NMR-Techniken auf Polypeptide und kleine Proteine. Die Stimmung wurde hoch gehalten durch erfolgreiche Untersuchungen an zyklischen Peptiden, die wir gemeinsam mit dem Leiter des Instituts für Molekularbiologie und Biophysik, Professor Robert Schwyzer, durchführten, durch die Beobachtung von unerwartet gut aufgelösten und langlebigen NMR-Linien von Amidprotonen in dem kleinen Protein BPTI (Rinderpankreas-Trypsin-Inhibitor) und durch die Entdeckung von Ring-Flip-Vorgängen in BPTI. Auf meinem Hauptforschungsgebiet jedoch, der Entwicklung einer Methode zur Bestimmung von Proteinstrukturen in Lösung, gab es kaum Fortschritte. Als Versuch einer Bestandsaufnahme auf dem Feld der NMR-Spektroskopie von biologischen Makromolekülen schrieb ich 1975 die Monographie *NMR in Biological Research: Peptides and Proteins*. Aus diesem Projekt ergaben sich zwei wesentliche Schlussfolgerungen, die die Fortsetzung unserer Arbeit stark beeinflussen sollten. Zum einen erkannte ich nochmals ganz klar, dass wir mit der Wahl der Hämproteine als Fokus unserer frühen Bemühungen mit der NMR-Technik wirklich einen wahren Glücksschlag getan hatten. Zum anderen wurde klar, dass die Versuche der frühen siebziger Jahre, dreidimensionale Proteinstrukturen de novo aus konformationsabhängigen Protonenverschiebungen abzuleiten, nicht erfolgsversprechend waren, egal ob diese chemischen Verschiebungen von intrinsischen oder extrinsischen, diamagnetischen oder paramagnetischen Quellen stammten. Wir mussten daher nach neuen Wegen zur NMR-spektroskopischen Strukturbestimmung suchen, wobei die Hämproteine mit ihren einmaligen NMR-spektroskopischen Eigenschaften wiederum als ideales Testgelände für neue Ideen dienen konnten.

Kurz nachdem ich meine Lektion aus der Verfassung der Monographie von 1976 gelernt hatte, änderten sich meine Arbeitsbedingungen entscheidend. Nach mehr als fünf Jahren des Arbeitens mit einer kleinen Gruppe von Studenten und Mitarbeitern aus der Umgebung von Zürich und der Möglichkeit, viele Stunden selbst am Labortisch und an den NMR-Spektrometern zu verbringen, fand ich mich plötzlich von mehr als zwanzig Postdocs und Studenten aus der ganzen Welt umringt. Ungefähr zur selben Zeit begann ich eine umfangreiche Reisetätigkeit in alle Teile der Welt, mit einem ersten Besuch in Indien Ende 1974 und einer ersten „Weltreise“ mit Stops in den USA und Japan im Herbst 1975. Die Reisen nach Indien und Japan führten zu neuen, dauerhaften Freundschaften mit örtlichen

Kollegen und auch dazu, dass eine ganze Anzahl höchst talentierter Postdocs nach Zürich kam. Seitdem sind Dienstreisen ein wichtiger Teil meiner Aktivitäten. Über die Jahre gehörten dazu auch Gastprofessuren an der University of California, Berkeley, der Cornell University in Ithaca, New York, der Johns Hopkins University in Baltimore, Maryland, dem California Institute of Technology in Pasadena, Kalifornien, dem Scripps Research Institute in La Jolla, Kalifornien, dem RIKEN in Tokio und der University of Edinburgh in Großbritannien. Der Erfahrungsaustausch an diesen hervorragenden Forschungsinstitutionen hat nicht nur mein Leben erheblich bereichert, sondern auch viel zum Fortschritt unserer Forschung in Zürich beigetragen.

Der internationale Aspekt meiner Aktivitäten nahm 1975 stark zu, als ich – völlig unerwartet – zum Mitglied des Rats der International Union of Pure and Applied Biophysics, IUPAB, gewählt wurde. Mit dieser Ernennung war zunächst nur wenig Arbeit verbunden, aber 1978 wurde ich als Generalsekretär der IUPAB und damit auch zum Mitglied des Generalkomitees des International Council of Scientific Unions, ICSU, und des ständigen ICSU-Komitees für die Bewegungsfreiheit von Wissenschaftlern gewählt. Der Zeitaufwand während meiner sechsjährigen Amtsperiode als Generalsekretär war dann erheblich. Zum Glück erklärte sich Marianne bereit, das IUPAB-Büro zu übernehmen. Das machte vieles einfacher, da sie so mit mir zusammen reisen und wir die IUPAB-Angelegenheiten in provisorischen Büros in Hotelzimmern überall auf der Welt erledigen konnten. Die angenehme Seite war, dass ich viele prominente Wissenschaftler kennenlernte, deren Namen ich vorher meist nur aus Lehrbüchern gekannt hatte. So war die Strukturbiologie im IUPAB-Rat von 1978 bis 1981 durch Britton Chance, Henryk Eisenberg, David Phillips, Frederic Richards und Akiyoshi Wada vertreten, ein wahrhaftiges „Center of Excellence“! Sowohl in den Geschäftssitzungen als auch beim gesellschaftlichen Beisammensein verbrachten wir viel Zeit mit der Diskussion der neuesten Fortschritte in der Forschung, lange bevor sie gedruckt erschienen. Besonders eng war die Zusammenarbeit mit den während meiner Zeit als Generalsekretär amtierenden IUPAB-Präsidenten, Professor Setsuro Ebashi und Professor Richard Keynes. Richard Keynes ist ein Urenkel von Charles Darwin. Während gemeinsamer Reisen für die IUPAB in Europa und Fernost in den Jahren 1982 und 1983 hörte ich mit wachsendem Vergnügen die schier endlosen Wiederholungen seiner „Darwin Lecture“ anlässlich des 100. Todestages von Darwin; im Gegenzug überstand Richard eine Überdosis an biomolekularer NMR-Spektroskopie.



Präsident und Generalsekretär der IUPAB mit ihren Ehefrauen während einer diplomatischen Mission in China, 1983. Präsident Professor Richard Keynes und Ann Keynes stehen links bzw. rechts außen.



Beim Abendessen während eines Treffens des ICSU-Generalkomitees in München, 1985. Zu meiner Linken sitzt Professor Jorge Allende aus Chile, zu meiner Rechten Professor Raymundo Villegas aus Venezuela.

Durch meine Tätigkeit für den ICSU und die IUPAB wurde ich auch mit vollkommen neuen Aufgaben konfrontiert. Besonders bemerkenswert sind im Rückblick die Verhandlungen zwischen 1980 und 1983 über die gemeinsame Mitgliedschaft von China und Taiwan in internationalen wissenschaftlichen Organisationen. Wir fanden schließlich Bedingungen, die sowohl der „Biophysical Society of China, located in Beijing, China“ als auch der „Chinese Biophysical Society, located in Taipei, China“ die Mitgliedschaft in der IUPAB ermöglichen. Dazu waren sowohl umfangreiche, höchst formelle Briefwechsel als auch Besuche und persönliche Verhandlungen mit Regierungs- und Akademie-Vertretern in beiden Ländern erforderlich. Ich habe auch an den IUPAB- und ICSU-Programmen zur Unterstützung von Wissenschaftlern in Entwicklungsländern teilgenommen und Ferienakademien und Symposien in Afrika, Fernost und Lateinamerika organisiert. All dies hat meine Wahrnehmung der Welt stark beeinflusst. Obwohl mich die IUPAB-Aktivitäten und meine Reisen in Zusammenhang mit unserer Forschung jedes Jahr etliche Monate vom Labor fern hielten, hatten sie doch insgesamt einen höchst positiven Einfluss auf unsere Forschung. Ich lernte, wie man eine Forschungsgruppe aus der Ferne leitet, und meine jüngeren Mitarbeiter konnten während meiner Abwesenheit Eigeninitiative entwickeln.

Mit all den ab 1976 in unserer Gruppe versammelten Talenten machten wir uns an die Entwicklung neuer NMR-Experimente und neuer Algorithmen zur Gewinnung von Strukturinformationen aus NMR-Daten, was schließlich zu einem Verfahren der NMR-spektroskopischen Proteinstrukturbestimmung führte. Dazu gehörte die Erkenntnis, dass der Kern-Overhauser-Effekt, NOE, ein NMR-Parameter ist, der auf eindeutige Weise mit der dreidimensionalen Struktur von Makromolekülen verknüpft werden kann. Wir nutzten die hervorragende Auflösung in Teilbereichen der NMR-Spektren von Hämproteinen zur Eichung der NOE-Abstandsmessungen mit den damals möglichen eindimensionalen (1D) NMR-Techniken. Neben Regula Keller leistete Sidney Gordon, ein Gast auf Freisemester, mit dem 1D-Transienten-NOE-Experiment einen entscheidenden Beitrag. In der Folge bekam der NOE eine Schlüsselrolle in dem Verfahren, mit dem die



Eröffnungsansprache bei einer von IUPAB, ICSU und UNESCO unterstützten „Winter School on Magnetic Resonance in Biology and Medicine“ in Kairo, 1986. Zu meiner Linken sitzt Professor I. El Gohari, der viele Jahre als Vertreter Ägyptens in zahlreichen Funktionen der IUPAB fungierte.



Zusammen mit Professor Chen-Lu Tsou beim Genießen der herrlichen Landschaft von Wuxi, China, während einer von IUPAB und ICSU unterstützten Ferienakademie über Biophysik, 1992.

vielen hundert bis einige tausend NMR-Linien eines Proteins sequenzspezifisch zugeordnet wurden. Die „Strategie der sequenziellen Zuordnung“ wurde ursprünglich von Gerhard Wagner und einem Diplomanden, Andreas Dubs, entwickelt, die 1D-NOE- und Spinentkopplungsexperimente nutzten. Parallel zu den Untersuchungen über NOEs und die Signalzuordnung hatte 1976 die Entwicklung von zweidimensionalen (2D) NMR-Techniken zur Untersuchung von Makromolekülen als Gemeinschaftsprojekt mit Prof. Richard R. Ernst (Nobel-Preis für Chemie 1991) begonnen. 1977 wurde das erste 2D-NMR-Spektrum eines Proteins aufgenommen und bis 1980 hatten wir vier 2D-NMR-Experimente zusammengestellt, die für Proteinstrukturbestimmungen geeignet waren: COSY (2D-Korrelationsspektroskopie), SECSY (2D-Spin-echo-Korrelationsspektroskopie), FOCSY (2D-Korrelationsspektroskopie mit korrigierter Faltung) und NOESY (2D-Kern-Overhauser-Effekt-Spektroskopie). Es machte damals viel Spaß, sich diese Abkürzungen auszudenken! Bald begann meine Gruppe, 2D-NMR-Experimente routinemäßig zu nutzen, und die Erfahrung aus mehr als einem Jahrzehnt 1D-NMR-Spektroskopie an Proteinen verband sich auf glückliche und nützliche Weise mit den neuen Möglichkeiten der 2D-NMR-Spektroskopie.

Bis 1982 hatten wir komplett sequenzspezifische Signalzuordnungen für das kleine Protein BPTI und das Peptidhormon Glucagon, gebunden an Lipidmicellen, erhalten. Diese Ergebnisse wurden in vier Artikeln 1982 veröffentlicht. Obwohl die erste dieser Veröffentlichungen bereits das heute gebräuchliche Vorgehen zur NMR-spektroskopischen Proteinstrukturbestimmung skizziert, brauchte es noch zwei Jahre intensiver Arbeit an Distanzgeometrie-Algorithmen mit metrischer Matrix und ihrer Einbindung in effiziente Programm pakete, bis die erste NMR-spektroskopische Bestimmung der Struktur eines globulären Proteins, des Stiersperma-Protease-Inhibitors (BUSI), abgeschlossen werden konnte. Eine große Anzahl brillanter junger Wissenschaftler, die von 1976 bis 1985 in meiner Gruppe arbeiteten, haben direkt oder indirekt zu diesen Ergebnissen beigetragen: Gerhard Wagner war an jedem Teilschritt des Projekts beteiligt; Kuniaki Nagayama und Peter Bachmann entwickelten die erste Generation von 2D-NMR-Experimenten für die Untersuchung biologischer Makromoleküle und schrieben die Programme, die zur Bewältigung der Daten mit der damals verfügbaren begrenzten Rechnerleistung nötig waren; Anil Kumar nahm die ersten 2D-NOESY-Spektren eines Proteins auf; Gerhard Wider lieferte entscheidende Beiträge zur 2D-NMR-Spektroskopie und zur Methode der sequenziellen Zuordnung; Werner Braun, Martin Billeter und Timothy Havel begründeten in meinem Labor die Tradition theoretischer Arbeiten zur Extraktion von Strukturinformationen aus NOE-Daten; Peter Strop präparierte BUSI und arbeitete an der Zuordnung von dessen Signalen; Michael Williamson und Timothy Havel schließlich haben die Struktur von BUSI gelöst. Sie alle und dazu viele weitere Studenten und Postdocs aus den „heldenhaften Zeiten“ 1976–1985 haben inzwischen eigene, höchst erfolgreiche unabhängige Forschungslaufbahnen eingeschlagen.

Die erste NMR-spektroskopische Bestimmung einer Proteinstruktur stellte uns vor neue, unerwartete Herausforderungen. Als



Tim Havel und Mike Williamson vor einem Computerbildschirm mit der gerade gelösten dreidimensionalen Struktur des Proteins BUSI, 1984.

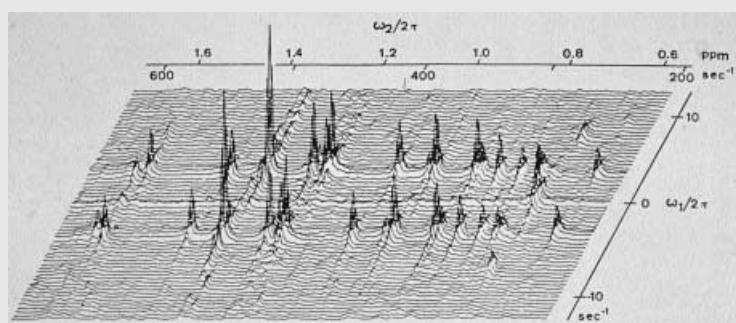
ich die Struktur von BUSI in einigen Vorträgen im Frühjahr 1984 vorstelle, bestand die Reaktion aus Ungläubigkeit und der Annahme, dass unsere Struktur der röntgenographisch ermittelten Struktur eines homologen Proteins nachmodelliert sein müsse. Offenbar hatten sich die Strukturobiologen an die Rolle der NMR-Spektroskopie als einer Methode gewöhnt, die zwar einige exotische zusätzliche Informationen beisteuern kann, aber nicht für die De-novo-Strukturbestimmung mit atomarer Auflösung geeignet ist. Die geäußerte Kritik hatte vor allem zwei Konsequenzen. Die erste ergab sich aus einer Diskussion mit Robert Huber (Nobel-Preis in Chemie, 1988) nach einem Seminar in München am 14. Mai 1984.

Robert schlug vor, die Sache durch die unabhängige Bestimmung einer neuen Proteinstruktur einmal in seinem Labor mit Röntgenbeugung und einmal in meinem Labor mithilfe der NMR-Spektroskopie zu klären. Für diesen Zweck erhielt jeder von uns eine größere Menge des α -Amylase-Inhibitors Tendamistat von der Hoechst AG. Die mit den beiden Methoden erhaltenen dreidimensionalen Strukturen von Tendamistat waren nahezu identisch, womit ein für allemal für Klarheit gesorgt war. Dies war besonders beruhigend angesichts der Tatsache, dass die anschließend NMR-spektroskopisch ermittelte Struktur von Metallothionein vollkommen anders war als die unabhängig davon röntgenographisch bestimmte. (Erst nach sechs Jahren wurde die Kristallstruktur erneut analysiert und dabei ergab sich eine Übereinstimmung mit der NMR-spektroskopisch ermittelten Struktur!)

Die zweite Konsequenz war, dass ich um ein Freisemester bat, das ich dann in Wengen verbrachte, einem hübschen Ferienort im Berner Oberland. Das war möglich, weil auch meine sechsjährige Amtszeit als Generalsekretär der IUPAC im Sommer 1984 endete. Angesichts der kritischen Reaktionen auf die ersten NMR-spektroskopischen Strukturbestimmungen hielt ich es für wichtig, unsere Arbeit vollständig und detailliert zu dokumentieren. Das war ein guter Grund, meinen Verpflichtungen zu einer Monographie über die Baker-Lectures-Vortragsreihe nachzukommen, die ich 1983 an der Cornell University gehalten hatte. Da ich die meiste Zeit in Wengen allein verbrachte – meine Familie besuchte mich nur an den Wochenenden und in den Ferien –, ging die Arbeit rasch voran. Das Buch *NMR of Proteins and Nucleic Acids* umfasst in erster Linie die Arbeiten in meiner Forschungsgruppe im Zeitraum von



Festliches Abendessen während eines Besuches bei Professor Setsuro Ebsahi (zweiter von rechts) in Okasaki, Japan, 1996. Frau Ebsahi steht neben Marianne, und Kuniaki Nagayama, der als Postdoc bei Richard Ernst und mir in den späten Siebziger Jahren mit der 2D-NMR-Spektroskopie von Proteinen begonnen hatte, befindet sich links außen.



Das erste zweidimensionale ^1H -NMR-Spektrum eines Proteins – ein „2D-aufgelöstes Spektrum“ –, aufgenommen von Kuniaki Nagayama, 1977.



Blick aus meinem Arbeitszimmer in unserem Haus in Wengen in der Schweiz während meines allerersten Freisemesters, 1984–1986.

Es stellte sich auch heraus, dass die Leitung meiner Forschungsgruppe aus der Ferne überraschend erfolgreich war, und da die Manuskripte in Zürich von meinen handschriftlichen Notizen abgetippt wurden, war es hilfreich, dass selbst normale Post innerhalb der Schweiz zuverlässig innerhalb eines Tages zugestellt wurde. Daher fiel mir die Entscheidung leicht, meinen Aufenthalt in Wengen von den ursprünglich geplanten 6 Monaten auf 18 Monate auszudehnen. Neben der Schreibtischarbeit waren meine wichtigsten Beschäftigungen Skifahren im Winter und Jogging und Bergsteigen im Sommer. Nach meinen Tagebuchaufzeichnungen verging kein einziger Tag vom 1. Dezember 1984 bis zum 10. April 1985 ohne Skifahren. Das entzäudigte mich dafür, dass ich während der 14 Jahre von 1971 bis 1984 wegen meiner anderen beruflichen Aktivitäten den Skihängen ferngeblieben war. Ich kehrte auch für eine dringend nötige Auffrischung meiner Ski-Technik an die Außenstelle der Eidgenössischen Sportschule in Mürren zurück und nahm an der Organisation des berühmten Lauberhorn-Skirennens in Wengen teil.

Im Frühjahr 1986, nach meinem zweiten Skiwinter in Wengen, hatte ich den Rückstau an unpubliziertem Material gründlich abgearbeitet und gleichzeitig die Arbeit an der Monographie über die Baker Lectures abgeschlossen. Die NMR-spektroskopische Proteinstrukturbestimmung hatte mittlerweile ihre Anhänger gefunden, was daran zu sehen war, dass die erste Auflage meines neuen Buches innerhalb weniger Wochen ausverkauft war. Für uns war es an der Zeit, ein neues Kapitel aufzuschlagen, und wir suchten den Kontakt zu Biochemikern und Molekularbiologen, um die NMR-Technik in Anwendungen auf biologisch interessante Systeme

einem wirklichen Test zu unterziehen. 1990 war die in Zusammenarbeit mit Professor Walter Gehring vom Biozentrum der Universität Basel durchgeführte Aufklärung der Struktur der *Antennapedia*-Homöodomäne und ihres Komplexes mit der Operator-DNA erfolgreich abgeschlossen. Mit dieser Struktur als Grundlage lieferten zusätzliche NMR-Experimente vollkommen neue Einblicke in die Rolle von Hydratwasser bei der spezifischen DNA-Erkennung. Als gemeinsames Projekt mit Hans Senn und Hans Widmer, zwei früheren Doktoranden, und ihrer Forschungsgruppe bei der Sandoz AG wurde die NMR-spektroskopische Bestimmung der Struktur des Komplexes aus Cyclophilin A und Cyclosporin A in Angriff genommen. Dieses Projekt hatte unmittelbare praktische Bedeutung, da sich die Struktur des gebundenen Immunsuppressivums als vollkommen verschieden von den anderen zu jener Zeit zugänglichen Strukturinformationen erwies, d. h. von der Kristallstruktur und der NMR-spektroskopisch ermittelten Struktur von freiem Cyclosporin A. Für alle Beteiligten war das ein unerwartetes und aus vielerlei Gründen überraschendes Ergebnis!

Eine weitere aufregende Zusammenarbeit – mit Professor Rudi Glockshuber an der ETH Zürich – führte im April 1996 zur Struktur der C-terminalen Hälfte des Mäuse-Prionproteins, gerade mal zehn Tage nach dem Beginn der BSE-Krise in Großbritannien. Wegen dieses zeitlichen Zusammentreffens fand die Prionproteinstruktur selbst in den nichtwissenschaftlichen Medien große Beachtung. 1997 konnten wir die Struktur des intakten Prionproteins charakterisieren und fanden, dass seine N-terminale Hälfte einen sehr beweglichen, gestreckten Schwanz bildet. Damit lieferte dieses Prionprotein eine weitere überzeugende Illustration der einzigartigen Möglichkeiten der NMR-Technik, auch teilweise unstrukturierte Polypeptidketten zu charakterisieren. Andere der mehr als 70 in meinem Labor vollendeten Proteinstrukturbestimmungen stehen in Beziehung zu Enzymologie, Toxikologie, Proteinfaltung mithilfe von Chaperonen und interzellulärer Signalweiterleitung.

Die während der letzten 16 Jahre mit der NMR-Technik angegangenen biologischen und biomedizinischen Projekte haben mein Berufsleben erheblich bereichert – und tun es immer noch. Die doch ziemlich extreme Spezialisierung, die für das Aufrechterhalten eines hohen Niveaus in der Strukturbestimmung unentbehrlich ist, wird in diesen Unternehmungen durchbrochen, indem ich eine immer größere Breite biologischer Systeme und biomedizinischer Probleme kennenlernen. Ich bin sehr glücklich darüber, dass mir mein Spezialgebiet so zu einer Ausbildung in Biologie durch hervorragende Experten verhilft, die mich manchmal sogar für einen der ihnen zu halten scheinen.

1. Einführung

Die NMR-Spektroskopie nimmt unter den Methoden zur Aufklärung der dreidimensionalen Struktur von Proteinen und Nucleinsäuren eine einzigartige Stellung ein, da mit ihr atomar aufgelöste Strukturen in Lösung ermittelt werden können. Bedenkt man, dass Körperflüssigkeiten wie Blut, Magenflüssigkeit oder Speichel Proteinlösungen sind, so wird deutlich, wie wichtig die Kenntnis der Strukturen solcher Verbindungen in Lösung ist. Temperatur, pH-Wert und Salzkonzentration können im NMR-Experiment so eingestellt werden, dass sie die physiologischen Verhältnisse weitgehend nachahmen. Zugleich aber können z.B. für Studien der Proteindenaturierung die Bedingungen in Lösung auch bis zu extrem nichtphysiologischen Verhältnissen variiert werden. Des Weiteren ist die NMR-Spektroskopie nicht auf die Proteinstrukturbestimmung beschränkt,

sondern schließt die Untersuchung dynamischer Prozesse von Molekülstrukturen ebenso ein wie die struktureller, thermodynamischer und kinetischer Aspekte der Wechselwirkung zwischen Proteinen und anderen Komponenten einer Lösung. Dabei kann es sich um andere Makromoleküle handeln, aber auch um Liganden mit niedrigem Molekulargewicht. Auch für diese Zusatzinformationen ist es wichtig, dass die Messungen direkt in Lösung durchgeführt werden können.

Die NMR-spektroskopisch ermittelte Struktur der *Antennapedia*-Homöodomäne (Abbildung 1) ist ein schönes Beispiel für die aufregenden Möglichkeiten, die Strukturuntersuchungen in Lösung bieten. Die Polypeptidkette dieses Proteins weist nur eine partielle Faltung mit ausgeprägter Unordnung beider Kettenenden auf.^[1] Im Komplex mit der Operator-DNA bindet der N-Terminus der Kette in der kleinen Furche der DNA, wo er eine wohldefinierte Struktur annimmt (Abbildung 2).^[2] Diese Art der intermolekularen

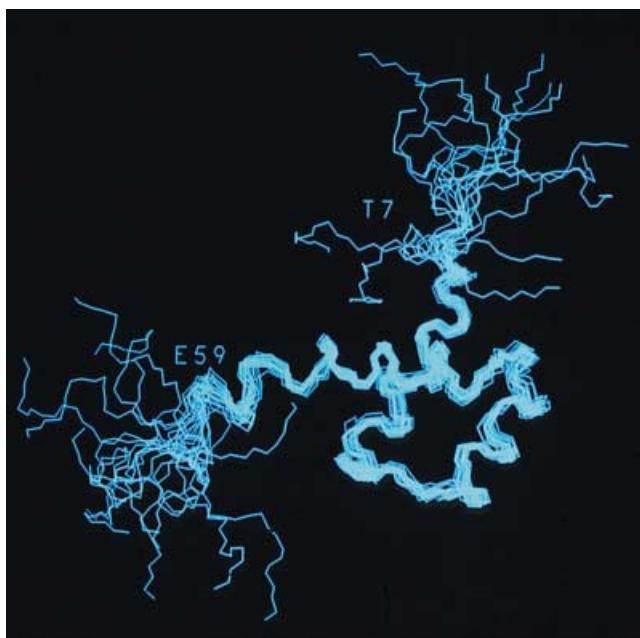


Abbildung 1. NMR-spektroskopisch bestimmte Struktur der *Antennapedia*-Homöodomäne. Ein Ensemble aus zwanzig überlagerten Konformatiomenen repräsentiert das Polypeptidrückgrat. Die gute Übereinstimmung der Konformiere im Polypeptidsegment 7–59 belegt, dass die Struktur hier wohldefiniert ist, während die beiden Enden ungeordnet sind.

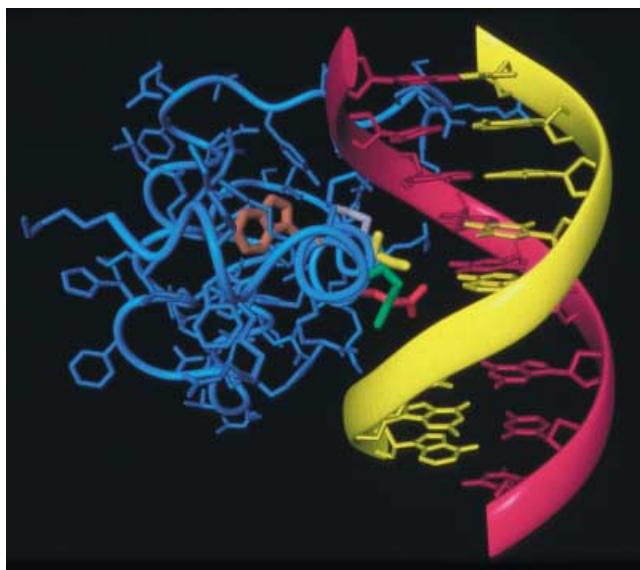


Abbildung 2. NMR-spektroskopisch ermittelte Struktur des Komplexes der *Antennapedia*-Homöodomäne (blau, mit funktionell wichtigen Resten in Rot, Gelb, Grün und Braun) mit ihrer Operator-DNA (gelb und rot).^[2]

Erkennung veranschaulicht, wie wichtig teilweise unstrukturierte Polypeptidketten für die Peptidfunktion sein können. Ein noch eindrucksvoller Beispiels für partiell gefaltete Polypeptide sind die Prionproteine der Säugetiere, da die Struktur der gutartigen zellulären Form (PrP^{C}) durch einen flexiblen, rund hundert Aminosäuren langen ungeordneten

Schwanz am N-Terminus der globulären Domäne gekennzeichnet ist (Abbildung 3).^[3] Angesichts der Tatsache, dass der Mechanismus der Transformation von PrP^{C} in die aggregierte, mit der Krankheit in Verbindung stehende Form der Säugetier-Prionproteine noch im Dunkeln liegt, ist die Beobachtung dieses flexiblen Schwanzes äußerst interessant.

Normalerweise sind partiell gefaltete Polypeptidketten schwierig zu kristallisieren. Und selbst wenn ein Kristall erhalten werden kann, werden die Kettenabschnitte, die in Lösung ungeordnet vorliegen, entweder durch intermolekulare Kontakte im Kristallgitter geordnet, oder sie bleiben in den Beugungsverfahren unsichtbar. Infolgedessen war die NMR-Spektroskopie in vielen Fällen die einzige Methode, die Informationen über die Struktur partiell gefalteter Polypeptidketten liefern konnte. Obwohl das Standardverfahren zur NMR-spektroskopischen Strukturbestimmung nur ein statisches Bild unstrukturierter Bereiche liefert (siehe Abbildungen 1 und 3),^[4] können mit ergänzenden NMR-Experimenten Informationen über die Geschwindigkeitskonstanten der Übergänge zwischen diskreten Zuständen des Moleküls im durch das Ensemble der statischen Konformere aufgespannten Konformationsraum (siehe Abbildungen 1 und 3) erhalten werden.^[5,6]

Die Tatsache, dass es mit NMR-Techniken möglich ist, makromolekulare Strukturen und ihre intermolekularen Wechselwirkungen mit hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung zu charakterisieren, hat diesem Verfahren schon seit langem großes Interesse verschafft. Im Folgenden wird über Erfahrungen berichtet, die in meinem Labor während der letzten 35 Jahre mit NMR-Studien an Proteinen gemacht wurden.^[7]

2. NMR-Spektren von Proteinen in Lösung

Als ich mich 1967 dem Gebiet der NMR-Spektroskopie von Biomakromolekülen zuwandte, waren wichtige qualitative NMR-spektroskopische Eigenschaften von Aminosäuren und Proteinen bereits bekannt, und man hatte auch schon versucht, sie zu verstehen.^[8–12] Am wichtigsten war die Erkenntnis, dass das Spektrum eines globalen Proteins weitaus komplexer ist als die Summe der NMR-Signale der in der Polypeptidkette enthaltenen Aminosäurereste (Abbildung 4a), und die Unterschiede in den ${}^1\text{H}$ -NMR-Spektren von gefalteten und ungefalteten (Random-Coil(rc)-)Formen der Polypeptidketten wurden ansatzweise durch unterschiedliche Wechselwirkungen mit dem Lösungsmittel erklärt (Abbildung 4b). Im Zentrum der Spektrenanalyse stand die Position der einzelnen Signale im ${}^1\text{H}$ -NMR-Spektrum, die durch die chemische Verschiebung δ in ppm (parts per million) relativ zu einer Referenzsubstanz angegeben wird (Abbildung 4a). Wenngleich die chemische Verschiebung in erster Linie durch die kovalente Struktur des Aminosäurerestes bestimmt ist, kann sie doch auch signifikant durch Wechselwirkungen mit dem Lösungsmittel beeinflusst werden. Daher kann der Ausschluss des Wassers aus dem Innern eines globalen Proteins (Abbildung 4b) einen Unterschied in den chemischen Verschiebungen zwischen

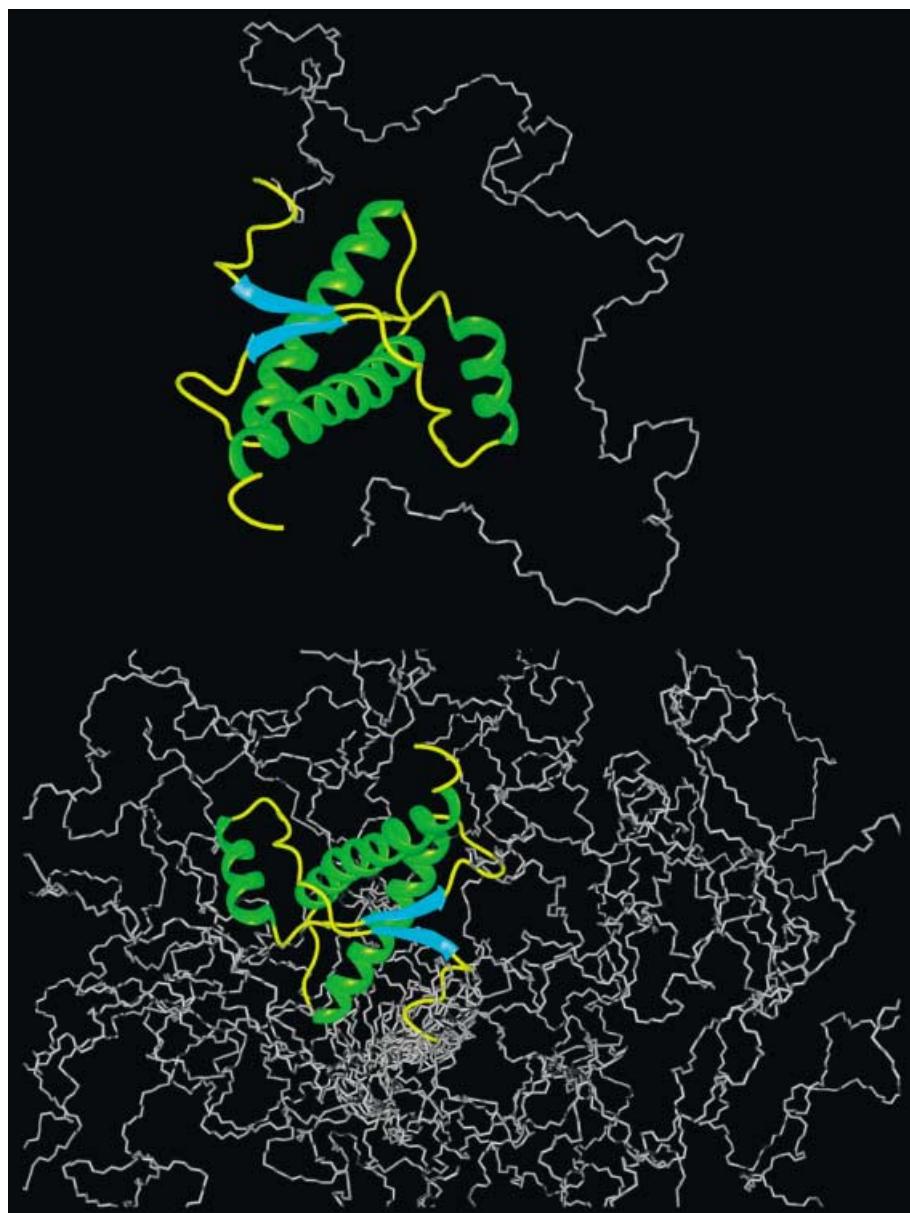


Abbildung 3. Oben: NMR-spektroskopisch ermittelte Struktur des Rinder-Prionproteins. In seiner C-terminalen globulären Domäne (Reste 126–230) sind α -Helices grün, das antiparallele β -Faltblatt blau und irreguläre Sekundärstrukturelemente gelb wiedergegeben, der unstrukturierte N-terminale Schwanz (Reste 23–125) ist weiß. Unten: Veränderung der Proteinstruktur über einen Zeitraum von ungefähr 1 ns illustriert durch Überlagerung von zwanzig Momentaufnahmen; die globuläre Domäne behält ihre Form bei, wogegen der Schwanz starken Veränderungen unterliegt.

den Aminosäureresten im Innern und denen in der dem Wasser zugänglichen Proteinoberfläche erzeugen. So können selbst NMR-Signale, die von verschiedenen Resten des gleichen Aminosäuretyps stammen, unterscheidbar werden. Man erkannte, dass diese konformationsabhängige Dispersion der chemischen Verschiebung ausreichend groß ist, um ^1H -NMR-Studien zur Denaturierung von Proteinen zu ermöglichen (Abbildung 5).^[12] Dies führte zu der aufregenden Aussicht, die NMR-Spektroskopie für detaillierte Studien zur Proteinfaltung einzusetzen, speziell um zwischen Faltungs- und Entfaltungsprozessen mit definierten Zwischenzuständen und solchen ohne derartige Zwischenzu-

stände zu unterscheiden. Ich schloss aus den durch die Abbildungen 4 und 5 verdeutlichten Beobachtungen und Ideen auch, dass man die Fähigkeit zur Auflösung und Auswertung hochkomplexer NMR-Spektren (obere Spur in Abbildung 4a) benötigen würde, um Informationen über physiologisch aktive, gefaltete Proteine zu erhalten. Dies war ein wohldefiniertes Problem und eine groß genug scheinende Herausforderung, um für meine eigene Forschungsarbeit attraktiv zu sein.

Ein Versuch, die Beobachtungen in den Abbildungen 4a und 5 genauer zu erklären, war der Vorschlag, dass von Ringströmen in den Seitenketten aromatischer Aminosäuren (Abbildung 6) generierte lokale Magnetfelder zu außerordentlich großen konformationsabhängigen chemischen Verschiebungen bei Wasserstoffatomen führen, die in der dreidimensionalen Struktur des Proteins in räumlicher Nähe zu solch einem Ring liegen. Dies wurde qualitativ bestätigt durch den Vergleich der größten beobachteten Abweichungen von den δ_{C} -Verschiebungen^[4] in Hühnereiweiß-Lysozym (Abbildung 5) mit den auf der Grundlage der damals verfügbaren niedrig aufgelösten Kristallstruktur dieses Proteins berechneten Ringstromverschiebungen.^[12] Auch war darauf hingewiesen worden, dass man bei Häm-Proteinen besonders große Ringstromverschiebungen für Wasserstoffatome in der Nähe der Häm-Gruppe erwarten kann (Abbildung 7).^[10,11]

Große Häm-Ringstromverschiebungen schienen mir für meinen Einstieg in das Gebiet der NMR-Spektroskopie von Proteinen eine attraktive Eigenschaft von Häm-Proteinen zu sein. Zudem wirkte die Anwesenheit des Häm-Eisenatoms (Abbildung 7) unter dem Gesichtspunkt meiner Ausbildung in Anorganischer Chemie sehr anziehend auf mich. Ein weiterer Vorteil war, dass 1967 bereits niedrig aufgelöste Kristallstrukturen von mehreren Häm-Proteinen verfügbar waren. Es ergab sich, dass über mehrere Jahre nahezu alle meine Forschungsprojekte um das Häm-Eisen und seine koordinierten Liganden kreisten, mit Einbeziehung der nichtkovalenten Wechselwirkungen der Häm-Gruppen mit ihrer unmittelbaren Umgebung in den Häm-Proteinen. Wie erwartet führte das starke

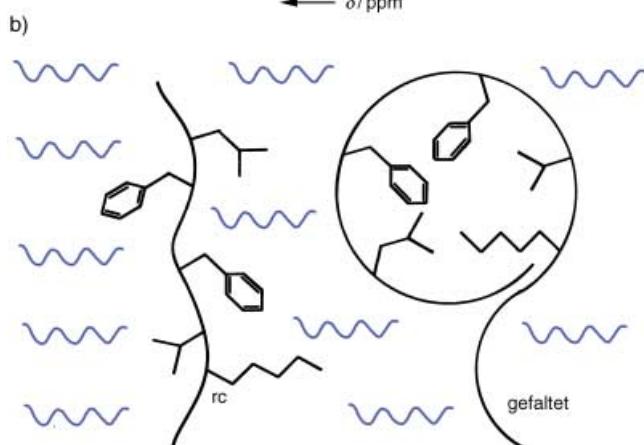
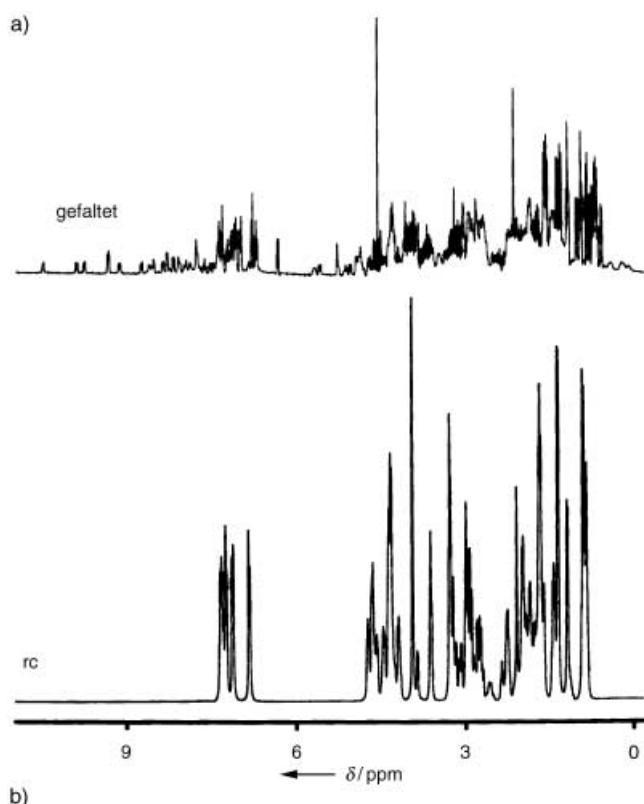


Abbildung 4. a) 1D- ^1H -NMR-Spektren des kleinen Proteins BPTI ($M \approx 6000$). Oben: experimentelles Spektrum von gefaltetem, aktivem BPTI in frisch angesetzter $^2\text{H}_2\text{O}$ -Lösung; unten: simuliertes Spektrum der ungefalteten rc-Form der BPTI-Polypeptidkette. b) Das Lösungsmittel (blau) hat freien Zugang zu allen Teilen einer ungefalteten rc-Peptidkette, während es vom Innern eines gefalteten, globulären Proteins ausgeschlossen ist.

Feld des Häm-Ringstroms in den Spektren von diamagnetischen Häm-Proteinen zu einer kleinen Zahl klar separierter Hochfeld-Resonanzsignale (Abbildung 8). Die paramagnetischen Formen der Häm-Proteine liefern weitere gut separierte Signale durch die Wechselwirkung mit den ungepaarten Elektronen des Häm-Eisenkerns. Obwohl diese gut aufgelösten Signale weniger als 3% der Wasserstoffatome irgend eines Häm-Proteins repräsentierten, waren sie von entscheidender Wichtigkeit, da in sie bei 1D- ^1H -NMR-Experimenten selektiv eingestrahlten werden konnte. Beispielsweise konnte durch einige einfache Ligandenaustausch- und Redoxreak-

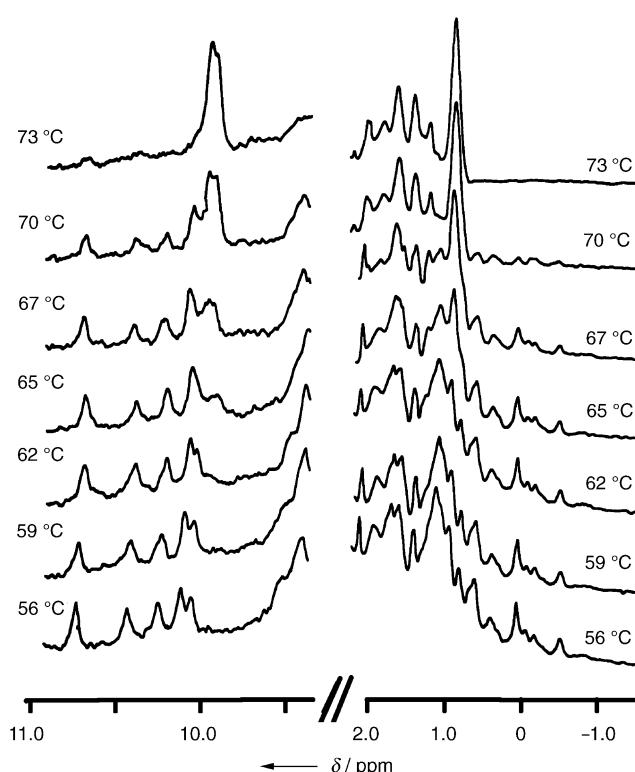


Abbildung 5. Die Tieffeld- und Hochfeld-Bereiche der 1D- ^1H -NMR-Spektren des Proteins Lysozym bei verschiedenen Temperaturen zeigen den Übergang vom gefalteten Zustand der Polypeptidkette bei 56°C zum ungefalteten Zustand bei 73°C (220 MHz, Lösungsmittel H_2O).^[12]

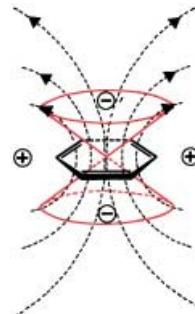


Abbildung 6. Das lokale Ringstromfeld um aromatische Ringe in Lösung, das durch das externe statische Magnetfeld induziert wird. Der rote Doppelkegel und die gestrichelten Magnetfeldlinien geben die Form des Ringstromfeldes wieder. Das Minuszeichen bedeutet, dass (in der dreidimensionalen Proteinstruktur) im Innern des Kegels gelegene Wasserstoffatome zu hohem Feld (also nach rechts in Abbildung 4a) verschoben werden, während für Atome außerhalb des Kegels die Verschiebung zu tiefem Feld erfolgt.

tionen mit Cytochrome *c* einer der axialen Liganden des Häm-Eisenatoms identifiziert werden, der in der 1969 verfügbaren niedrig aufgelösten Kristallstruktur nicht sichtbar gewesen war (Abbildung 9).

Die Experimente von Abbildung 9a^[13] begannen mit der oxidierten Form von Cytochrome *c*. Wie sich herausstellte (siehe unten), enthält Cytochrome *c* eine Methionin-Seiten-

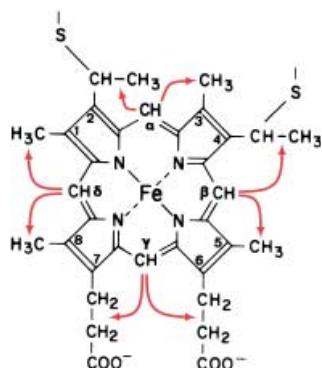


Abbildung 7. Strukturformel von Häm c, der prothetischen Gruppe in Cytochrom-c-Proteinen. Die roten Pfeile verbinden Gruppen von Wasserstoffatomen in der Häm-c-Struktur, deren Abstand kurz genug für das Auftreten von NOEs ist.

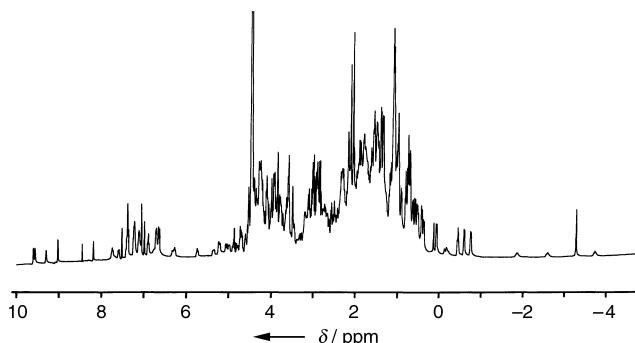


Abbildung 8. 1D- ^1H -NMR-Spektrum (360 MHz, 52°C, Lösungsmittel $^2\text{H}_2\text{O}$) von Pferde-Ferrocytochrom-*c* ($M \approx 12\,000$).

kette an einer der axialen Koordinationsstellen des Häm-Eisenatoms. Bei Zugabe von KCN zur Lösung von Ferricytochrom *c* wird diese Methionin-Seitenkette durch ein Cyanid-Ion ersetzt und bewegt sich deshalb aus dem Feld des Häm-Ringstroms heraus. Die Vollständigkeit der Umsetzung kann leicht verfolgt werden, da in den $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von Ferricytochrom *c* und seinem Cyanid-Komplex unterschiedliche Muster von gut aufgelösten Resonanzlinien vorhanden sind. Nach Reduktion des Häm-Eisenzentrums zum zweiwertigen Zustand ist der Cyanid-Komplex thermodynamisch weniger stabil als das natürliche Cytochrom *c*, und das Cyanid-Ion an der axialen Fe-Koordinationsstelle wird in einer langsamen Reaktion wieder durch den natürlichen Methioninliganden ersetzt. Die Rückkehr des axialen Methioninliganden in das Häm-Ringstromfeld wurde in Echtzeit (Abbildung 9b) anhand des Auftretens seiner charakteristischen Hochfeldlinien im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum verfolgt (vgl. Abbildung 8). Dieses Experiment führte zur Identifizierung dieses axialen Liganden in der nativen, aktiven Form von Cytochrom *c* und erbrachte zusätzlich Informationen über die relative thermodynamische Stabilität der vier verschiedenen Strukturen in Abbildung 9a.

Die Abbildungen 8 und 9b veranschaulichen auch den Einfluss experimenteller Faktoren auf das Erscheinungsbild von NMR-Spektren. Für das Spektrum in Abbildung 8, das um 1980 mit der Fourier-Transformationstechnik aufgenommen wurde, wurden eine höhere Resonanzfrequenz und eine hohe Temperatur verwendet. Dies führte zu schmaleren und besser getrennten Linien im Bereich von 0 bis –5 ppm als bei

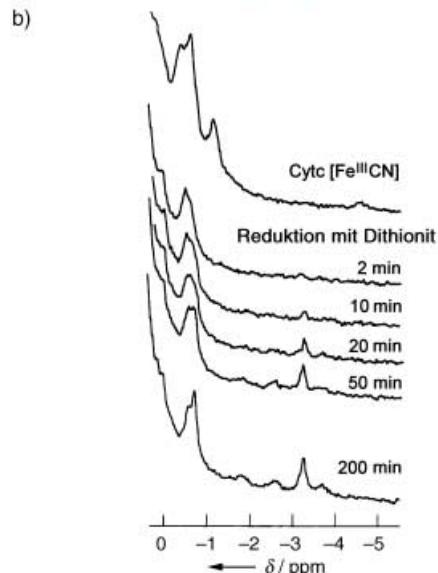
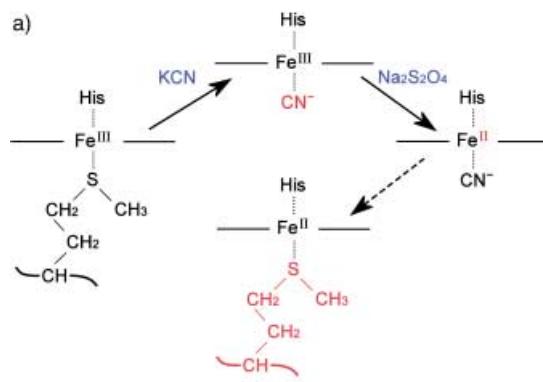


Abbildung 9. a) Drei chemische Reaktionen von Cytochrom c, die zur Identifizierung von Methionin als einem der axialen Liganden des Häm-Eisenatoms dienten (His = Histidin).^[13] Die durchgezogenen Pfeile zeigen rasche und die gestrichelten langsame Reaktionsschritte an. Schwarz: Häm-Eisen (Fe) und Liganden, wobei die waagerechte Linie durch Fe eine Seitenansicht des Häm-c-Rings (siehe Abbildung 7) symbolisiert; blau: der Proteinlösung zugesetzte Reagentien; rot: aus der vorhergehenden Reaktion folgende neue Strukturmerkmale. b) Zeitliche Veränderung des ^{1}H -NMR-Spektrums von Cytochrom c nach der Reduktion des Ferricytochrom-c-Cyanid-Komplexes mit Dithionit (220 MHz, 9 °C, Lösungsmittel $^{2}\text{H}_2\text{O}$).

dem in Abbildung 9b wiedergegebenen Spektrum, das 1968 mit Continuous-Wave(CW)-NMR-Spektroskopie bei niedriger Temperatur aufgenommen worden war.

Andere frühe Experimente, die sich auf die Beobachtung von gut separierten ^1H -NMR-Signalen gründeten, ermöglichen die Charakterisierung von Konformationsänderungen während der Oxidation von Myoglobin und Hämoglobin^[14,15] und eine genauere Beschreibung der elektronischen Struktur der Häm-Gruppen in verschiedenen Klassen von Häm-Proteinen.^[16-18]

3. Der Weg zur NMR-spektroskopischen Bestimmung von Proteinstrukturen

Um 1970 herrschte sowohl in meinem Labor als auch anderswo großer Enthusiasmus angesichts des Erfolgs von

Experimenten, wie sie in den Abbildungen 4–9 dargestellt sind. Während der folgenden Jahre gab es allerdings nur geringe Fortschritte auf dem Weg zu einer NMR-Methode für die De-novo-Proteinstrukturbestimmung. Im Rückblick kann dies leicht erklärt werden: Die frühen erfolgreichen strukturbezogenen Interpretationen von NMR-Daten haben ausnahmslos eine vorher bekannte, niedrig aufgelöste Kristallstruktur desselben Proteins ergänzt. Trotz der hohen Symmetrie der Ringstromfelder (siehe Abbildung 6) und anderer Quellen von lokalen konformationsabhängigen chemischen Verschiebungen, z. B. natürliche paramagnetische Zentren und extrinsische paramagnetische Verschiebungsreaktionen,^[17,19] konnten die beobachteten chemischen Verschiebungen somit in einigen Fällen aufregende neue Informationen liefern. In einer De-novo-Proteinstrukturbestimmung musste die hohe Symmetrie der lokalen Magnetfelder jedoch zu Mehrdeutigkeiten bei der strukturbezogenen Interpretation der chemischen Verschiebungen führen. Andere Ansätze waren folglich erforderlich, und schließlich konnte ein NMR-Verfahren zur Bestimmung von Proteinstrukturen entwickelt werden, das auf den in den folgenden Abschnitten vorgestellten vier elementaren Prinzipien beruht.

3.1. Bestimmung von NOE-Abstandsobergrenzen als konformativ Einschränkung

NOEs beruhen auf Dipol-Dipol-Wechselwirkungen zwischen Kernen. Ihre Intensität korreliert mit dem Produkt aus der inversen sechsten Potenz des Kern-Kern-Abstands und einer Korrelationsfunktion $f(\tau_c)$, die die Modulation der Dipol-Dipol-Kopplung durch stochastische Prozesse mit einer effektiven Korrelationszeit τ_c beschreibt [Gl. (1)].

$$\text{NOE} \propto \frac{1}{(r)^6} f(\tau_c) \quad (1)$$

Obwohl der NOE ein weit verbreitetes Phänomen für alle Kombinationen räumlich eng benachbarter Kernspins ist, sind für Strukturstudien in erster Linie NOEs zwischen Paaren von Wasserstoffatomen interessant. Ein ^1H - ^1H -NOE hängt vom Abstand zwischen einem Paar von Protonen ab, die entweder überhaupt nicht über kovalente Bindungen verknüpft sind (intermolekularer NOE) oder die in der Aminosäuresequenz einer Polypeptidkette weit auseinander liegen können. ^1H - ^1H -NOEs können in 1D-Doppelresonanz-NMR-Experimenten als die relative Intensitätsänderung eines NMR-Signals beobachtet werden, die durch die vorherige Einstrahlung auf eine andere Resonanzfrequenz verursacht wird (Abbildung 10). Obwohl NOE-Abstandsmessungen bereits erfolgreich in Untersuchungen an kleinen organischen Molekülen^[20] einschließlich Oligopeptiden^[21] angewendet und über die Beobachtung von NOEs in Proteinen ebenfalls berichtet worden war,^[22,23] war noch unklar, ob die erwünschte Abstandsinformation tatsächlich aus Proteinspektren erhalten werden konnte.^[20,24,25] Diese Unsicherheit entstand, da die Brownsche Bewegung großer Strukturen in Lösung langsam ist, mit entsprechend langen effektiven Korrelationszeiten τ_c für diesen stochastischen Prozess, und

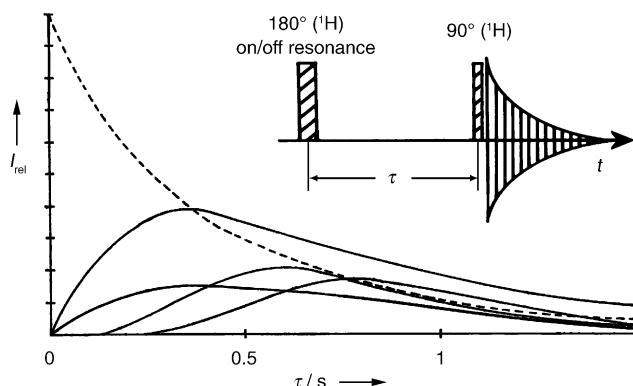


Abbildung 10. NOE-Aufbaukurven aus 1D- ^1H , ^1H -Transienten-NOE-Messungen.^[26] Die relativen Intensitäten I_{rel} des vorbestrahlten Resonanzsignals (gestrichelte Kurve) und der einen NOE zeigenden Signale (durchgezogene Kurven) sind als Funktion der Mischzeit τ aufgetragen. Das zur Aufnahme der Transienten-NOE-Spektren verwendete Experiment (Einschub oben rechts) enthält einen selektiven 180° -Radiofrequenzpuls auf das vorbestrahlte ^1H -NMR-Signal sowie einen unselektiven 90° -Puls auf das gesamte ^1H -NMR-Spektrum. Zwischen den zwei Pulsen liegt die Mischzeit τ , danach folgt die Signaldetektion. Im Falle von Proteinspektren mit ihren eng beieinander liegenden Signalen misst man die Differenz zwischen zwei Spektren, die mit dem 180° -Puls auf und neben einem Signal („on/off resonance“) aufgenommen werden.

da Proteine zudem ein dichtes Netzwerk von Wasserstoffatomen enthalten. Man nahm an, dass durch das Zusammenwirken dieser beiden Tatsachen Spindiffusion die auf ^1H - ^1H -NOE-Experimenten beruhenden Abstandsmessungen teilweise oder vollständig unbrauchbar machen könnte.^[24–28]

In den hier diskutierten NMR-Experimenten in Lösung entsteht Spindiffusion aus der Abhängigkeit des NOE von der inversen sechsten Potenz des Kern-Kern-Abstands, da der Magnetisierungstransfer zwischen zwei Spins über mehrere kurze Schritte möglicherweise effizienter ist als der Transfer in einem Schritt über den längeren, direkten Abstand (Abbildung 11). Wir verwendeten 1D-Transiente-NOE-Differenz-Experimente (Einschub in Abbildung 10)^[26] und 1D-Truncated-driven-NOE(TOE)-Differenz-Experimente (also solche mit kurzen Einstrahlzeiten),^[27] um NOE-Aufbaukurven (Abbildung 10) zu erhalten, die dann eine Grundlage für

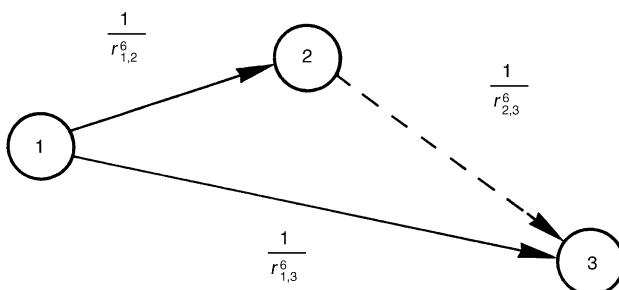


Abbildung 11. Spindiffusion: Der Magnetisierungstransfer zwischen den beiden Wasserstoffatomen 1 und 3 erfolgt – in Anwesenheit weiterer Wasserstoffatome – auf zwei konkurrierenden Wegen: als direkter NOE über den Abstand $r_{1,3}$ und als Zwei- oder Mehrschritt-Spindiffusion über dazwischenliegende Wasserstoffatome.

^1H - ^1H -Abstandsmessungen in Makromolekülen bildeten. Dabei stellte sich heraus, dass die Bedingungen für NOE-Abstandsmessungen in Makromolekülen, die lange effektive Korrelationszeiten für die Modulation der Dipol-Dipol-Kopplungen haben, sogar besser sind als in Verbindungen mit niedrigem Molekulargewicht, die den Bedingungen des „extreme motional narrowing“ unterliegen (d.h. scharfe Resonanzsignale aufgrund rascher Molekülbewegung aufweisen).

Die Auswertung von ^1H - ^1H -NOE-Aufbaukurven, die mit 1D-Transienten-NOE-Experimenten erhalten wurden, gründet auf der Überlegung, dass während der frühen Phase der Mischperiode der direkte Magnetisierungstransfer von Spin 1 zu Spin 3 (Abbildung 11) zu einem linearen Anstieg der Magnetisierung von Spin 3 mit der Mischzeit führt. Im Gegensatz dazu wird der Transfer auf Atom 3 mit einem Zwischenschritt über Atom 2 erst verzögert einsetzen, auch wenn bei langen Mischzeiten τ für einzelne Paare von Wasserstoffatomen das Ausmaß des Magnetisierungstransfers durch eine derartige Spindiffusion das des direkten Transfers überschreiten mag (Abbildung 10). Entsprechende Überlegungen gelten auch für die Auswertung von NOE-Aufbaukurven aus TOE-Experimenten.^[27] Somit kann man durch sorgfältige Wahl der Mischzeit hochselektive ^1H - ^1H -NOEs zwischen bestimmten Paaren von Protein-Wasserstoffatomen (oder von Gruppen von Wasserstoffatomen mit identischer chemischer Verschiebung) in Lösung messen.

Es gibt ein weiteres Kriterium, das erfüllt sein muss, um selektive NOEs mit 1D-NMR-Experimenten zu erhalten: Mindestens eines der beiden Signale, die über den NOE verknüpft werden, muss ausreichend gut aufgelöst (d.h. von allen anderen Signalen im Spektrum getrennt) sein, um eine selektive Radiofrequenz-Einstrahlung zu ermöglichen (Einschub in Abbildung 10). Die vorher diskutierten gut aufgelösten Signale im ^1H -NMR-Spektrum von Ferrocyanochrom *c* (Abbildung 8) spielten folglich eine wichtige Rolle, da sie es uns ermöglichten, sowohl die Spinphysik im Innern dieses globulären Proteins mit 1D- ^1H -NMR-Experimenten zu analysieren als auch neue Strukturinformation zu erhalten. Abbildung 12 zeigt eine Reihe hochselektiver 1D-TOE-Messungen, die verwendet wurden, um die ^1H -NMR-Signale der Häm-Gruppe eines Cytochroms vom *c*-Typ (siehe Abbildung 7) zuzuordnen.^[29]

3.2. Sequenzspezifische Signalzuordnung

Ähnlich wie in den Häm-Gruppen (Abbildung 7) gibt es zwischen benachbarten Aminosäureresten in einer Polypeptidkette räumlich eng zusammenliegende Paare von Wasserstoffatomen. Diese können über die Beobachtung sequenzieller NOEs verknüpft werden. Abbildung 13 veranschaulicht, dass die NOE-basierte Zuordnung der ^1H -NMR-Signale einer Polypeptidkette prinzipiell als zweistufiger Prozess betrachtet werden kann. Jeder Aminosäurerest repräsentiert ein Spinsystem,^[4] d.h., er besteht aus einer Anordnung von Wasserstoffatomen – einem Amidproton (H^N), einem α -Proton (H^α) und den Seitenkettenprotonen –, die über drei oder weniger kovalente Bindungen anhand skalarer (bin-

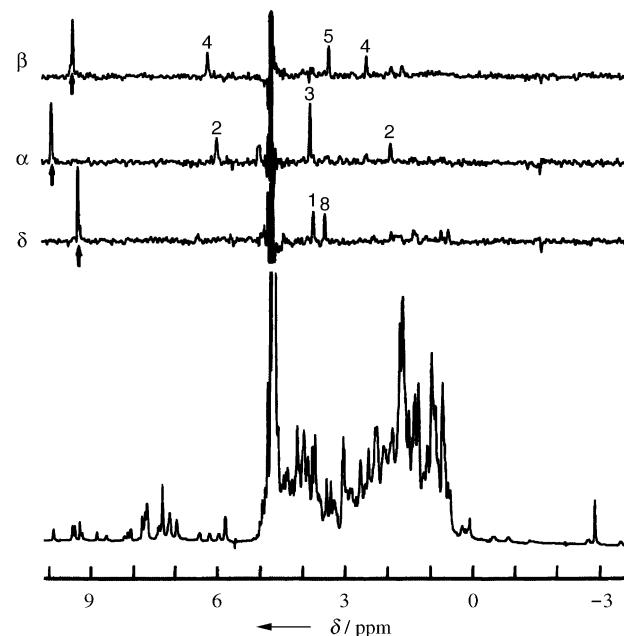


Abbildung 12. ^1H -NMR-Zuordnung für die Häm-Gruppe eines Cytochroms der *c*-Klasse mittels ^1H - ^1H -NOE-Messungen. Untere Spur: 1D- ^1H -NMR-Spektrum von Ferrocyanochrom *c*-551 aus *Pseudomonas aeruginosa* ($M \approx 12000$). Obere Spuren: drei 1D-NOE-Differenzspektren, erhalten durch selektive Einstrahlung (angedeutet durch die Pfeile) auf die Signale der Wasserstoffatome β , α bzw. δ (360 MHz, 35 °C, Lösungsmittel $^2\text{H}_2\text{O}$). Die NOE-Signale in den drei TOE-Differenzspektren entsprechen den Häm-Substituenten an den in Abbildung 7 mit Zahlen identifizierten Ringkohlenstoffatomen.

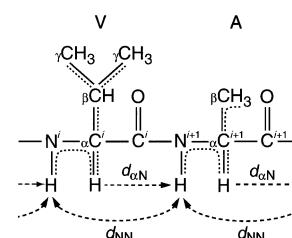


Abbildung 13. Sequenzielle Zuordnung der ^1H -NMR-Signale von Proteinen. Die gepunkteten Linien in der Strukturformel eines Valin(V)-Alanin(A)-Dipeptidsegments in einer Polypeptidkette verbinden Gruppen von Wasserstoffatomen, die durch maximal drei Bindungen getrennt sind und daher über skalare Spin-Spin-Kopplungen verknüpft werden können. Die gestrichelten Pfeile verbinden Paare von Wasserstoffatomen in benachbarten Aminosäureresten mit kurzen räumlichen Distanzen $d_{\alpha\text{N}}$ und d_{NN} , die deshalb durch sequenzielle NOEs verknüpft werden können.

dungsvermittelter) Spin-Spin-Kopplungen verknüpft werden können (siehe Lit. [4] für die von Prolin und den aromatischen Seitenketten gebildeten Ausnahmen). Im Gegensatz dazu sind Wasserstoffatome von in der Proteineinsequenz benachbarten Aminosäureresten durch wenigstens vier kovalente Bindungen getrennt. Sie können also nur durch NOEs verknüpft werden, die einen geringen räumlichen Abstand belegen, wie $d_{\alpha\text{N}}$ und d_{NN} . Passende Kombinationen von intraresidualen ^1H - ^1H -Verknüpfungen, die sich aus skalaren Spin-Spin-Kopplungen ergeben, und interresidualen Verknüpfungen, die aus sequenziellen NOEs stammen, ermög-

lichen eine schrittweise Zuordnung der Signale, während man am „Peptidrückgrat entlangwandert“.

Mit anderen Worten: die Spinsysteme zweier benachbarter Aminosäurereste können durch die dazwischenliegenden sequenziellen H^{α} - H^N - oder H^N - H^N -NOEs verknüpft werden (Abbildung 13). So führten 1D-Doppelresonanzexperimente mit selektiver Einstrahlung auf die wohlauflösten Resonanzsignale der Amidprotonen zwischen 8 und 10 ppm (Abbildung 4a) zur Zuordnung der meisten Reste innerhalb der regulären Sekundärstrukturelemente von gefaltetem BPTI (Abbildung 14).^[30] Eine weitergehende Zuordnung war nicht möglich, da die Resonanzsignale der verbleibenden Aminosäurereste nicht ausreichend aufgelöst waren für eine selektive Einstrahlung in 1D-NMR-Experimenten.

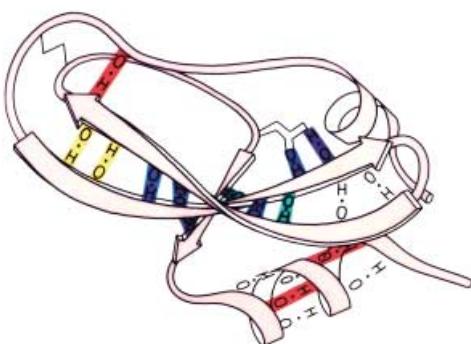


Abbildung 14. Sequenzspezifische Signalzuordnungen für BPTI aus 1D- ^1H -NMR-Experimenten.^[30] Abgebildet ist das Polypeptidrückgrat, und die zugeordneten Reste sind durch die eingezeichneten Wasserstoffbrücken ihrer Amidprotonen symbolisiert (unterschiedliche Farben stehen für unterschiedliche Geschwindigkeiten des Austauschs der Amidprotonen mit dem Lösungsmittel; Zeichnung von Jane Richardson, 1980).

3.3. 2D-NMR-Spektroskopie

Mit der Einführung von 2D-NMR-Experimenten, und anschließend auch 3D- und 4D-NMR-Experimenten, entwickelten sich NMR-spektroskopische Untersuchungen biologischer Makromoleküle von intellektuell anregender Wissenschaft hin zu einer praktisch einsetzbaren Methode der Bestimmung von Proteinstrukturen. Die Grundlagen der mehrdimensionalen NMR-Spektroskopie sind im Nobel-Vortrag von Richard R. Ernst vorgestellt worden.^[31] Hier möchte ich nur auf zwei entscheidende Konsequenzen mehrdimensionaler NMR-Spektroskopie für Untersuchungen an Proteinen eingehen. Erstens ermöglicht die 2D- ^1H -NMR-Spektroskopie die Detektion selektiver Interaktionen zwischen Paaren von Wasserstoffatomen (oder zwischen Gruppen von Wasserstoffatomen mit identischer chemischer Verschiebung) ohne selektive Einstrahlung auf einzelne Resonanzsignale. Daher ist eine detaillierte Analyse des gesamten ^1H -NMR-Spektrums eines Proteins möglich, während man sich bei der 1D-NMR-Spektroskopie auf die Verwendung einer kleinen Zahl separierter Signale am Rande des Spektrums beschränken musste. Zweitens wird durch die Verteilung der Signale in einer zweidimensionalen Frequenzebene die Trennung der Signale sehr stark verbessert. So

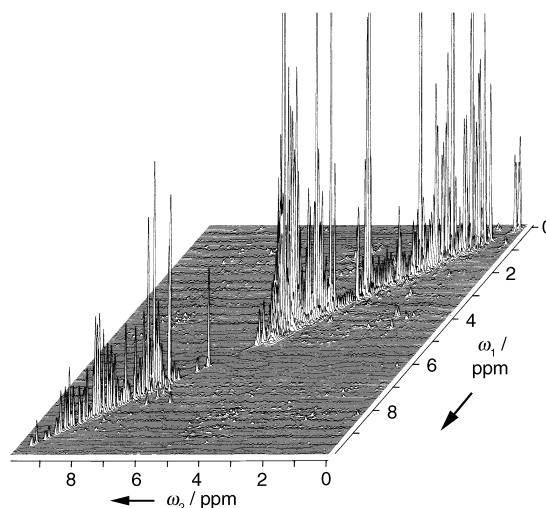


Abbildung 15. Gestaffelte Darstellung eines Spektrums des Stiersperma-Protease-Inhibitors IIA (BUSI IIA, $M \approx 6000$; 500 MHz, 45 °C, Lösungsmittel H_2O) als Beispiel für ein 2D- $[^1\text{H}, ^1\text{H}]$ -NOESY-Spektrum ($[^1\text{H}, ^1\text{H}]$ -NOESY-Experiment).

entsprechen in Abbildung 15 die intensiven Signale auf der Diagonale von links unten nach rechts oben dem 1D-NMR-Spektrum, die schwachen Kreuzsignale in der Ebene außerhalb der Diagonale dagegen selektiven NOEs zwischen Paaren von Wasserstoffatomen, denen im NMR-Spektrum verschiedene (wenn auch nicht notwendigerweise sauber aufgelöste) chemische Verschiebungen entlang der Diagonale entsprechen.

Die viel bessere Auflösung von Kreuzsignalen wird in Höhenliniendarstellungen von 2D-NMR-Spektren am deutlichsten (Abbildung 16), der gebräuchlichen Darstellungsform für die genaue Auswertung. Die 1D-Entkopplungsexperimente zur Identifizierung skalarer Spin-Spin-Kopplungen wurden somit durch 2D-Korrelationsexperimente wie COSY, SECSY und FOCSY ersetzt, und eindimensionale NOE-Differenz-Experimente wichen 2D- $[^1\text{H}, ^1\text{H}]$ -NOESY-Experimenten, die ähnliche NOE-Aufbaukurven für jedes Kreuzsignal ergaben (Abbildung 17) wie die 1D-Transienten-NOE-Technik (Abbildung 10).^[4,32,33] Mithilfe dieser 2D- ^1H -NMR-Experimente gelang für das Protein BPTI die vollständige sequenzspezifische Signalzuordnung (Abbildung 18).^[34]

Das NOESY-COSY-Konnektivitätsdiagramm in Abbildung 19^[4,35] beruht auf der Tatsache, dass die üblichen 2D- $[^1\text{H}, ^1\text{H}]$ -COSY- und 2D- $[^1\text{H}, ^1\text{H}]$ -NOESY-Spektren bezüglich der Diagonalsignale symmetrisch sind. Die Kombination der linken oberen Hälfte eines NOESY-Spektrums mit der rechten unteren Hälfte eines COSY-Spektrums ermöglicht somit eine direkte Veranschaulichung der Zuordnungen durch eine Abfolge von Verknüpfungen sequenzieller $d_{\alpha N}$ -NOEs und intraresidualer skalarer H^N - H^{α} -Kopplungen. Die Daten stammen von einer frisch hergestellten BPTI-Lösung in $^2\text{H}_2\text{O}$, sodass nur die Signale der langsam austauschenden Amidprotonen sichtbar sind.^[35] Die Zuordnung beginnt bei dem durch ein schwarzes Quadrat gekennzeichneten COSY-Kreuzpeak und geht, wie durch die Pfeile angedeutet, im Uhrzeigersinn zum in der Sequenz vorhergehenden Isoleu-

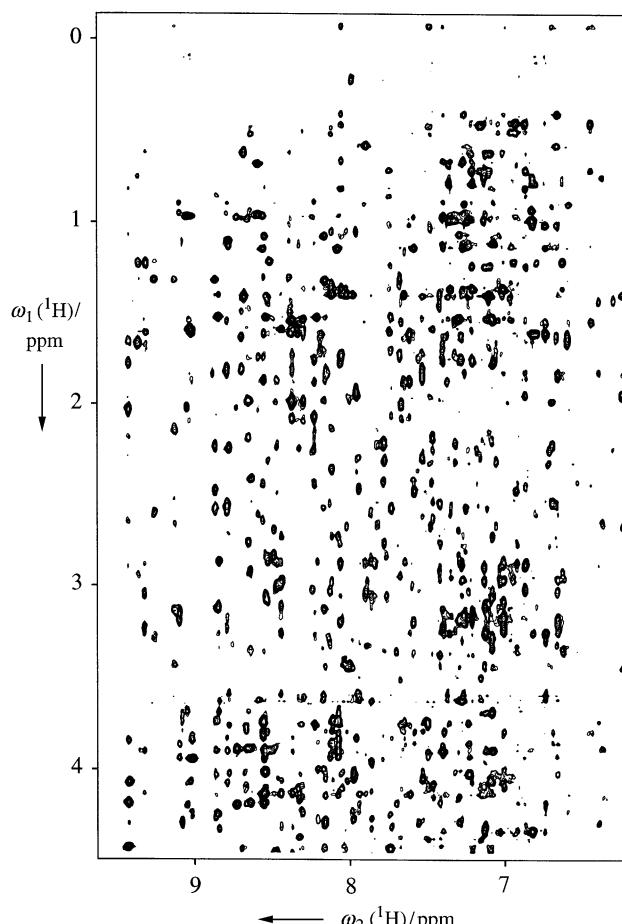


Abbildung 16. 2D- $^1\text{H},^1\text{H}$ -NOESY-Spektrum des Proteins P14A ($M \approx 15000$), das in der Pflanzenpathogenese eine Rolle spielt, in Höhenliniendarstellung für den Bereich $\omega_1(^1\text{H}) = 0\text{--}4.3$, $\omega_2(^1\text{H}) = 6.3\text{--}9.5$ ppm (750 MHz, 30 °C, Lösungsmittel H_2O).

cinrest sowie gegen den Uhrzeigersinn zu einer Reihe von vier Aminosäureresten. Es ist üblich, die Daten, die zur Zuordnung der ^1H -NMR-Signale eines Proteins führen, in einem Diagramm gegen die Aminosäuresequenz aufzutragen (Abbildung 20). Man sieht, dass die meisten der Nachbarschaften in der Sequenz durch zwei oder drei verschiedene sequenzielle NOEs belegt sind^[4,36] und dass eventuell verbliebene Lücken in der Zuordnung auf diese Art leicht zu erkennen sind.

3.4. Ableitung von Strukturinformationen aus NOE-Abstandsdaten

Eine Polypeptidkette aus 100 Aminosäureresten hat eine Länge von ca. 400 Å, während mit NOEs nur Abstände unter ungefähr 5 Å gemessen werden können. Die Beobachtung eines NOE zwischen einem Paar von in der linearen Polypeptidkette nicht unmittelbar benachbarten Wasserstoffatomen mit bekannter chemischer Verschiebung erzwingt somit die Bildung einer ringähnlichen Struktur, die diese beiden Wasserstoffatome in räumliche Nähe zueinander bringt (Abbildung 21). Eine erfolgreiche Strukturbestimmung lie-

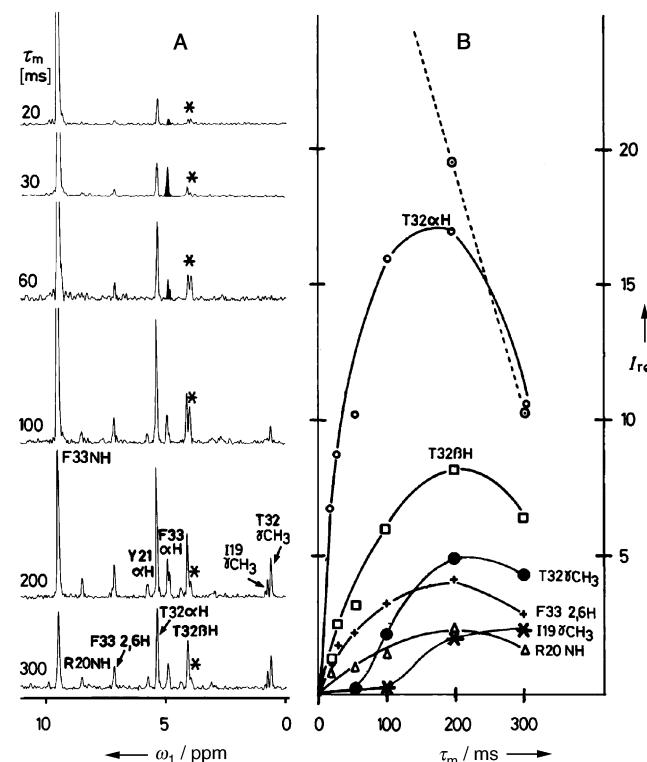


Abbildung 17. Messung von NOE-Aufbaukurven mit 2D- $^1\text{H},^1\text{H}$ -NOESY-Experimenten. A) Sechs NOESY-Spektren von BPTI, aufgenommen mit verschiedenen Mischzeiten τ_m . Es ist jeweils der 1D-Schnitt entlang der ω_1 -Frequenzachse durch das Diagonalsignal des Amidprotons von Phe33 dargestellt. B) NOE-Aufbaukurven aus der Analyse der Daten aus (A); gleiche Darstellung wie in Abbildung 10 mit den relativen Intensitäten der NOESY-Kreuzsignale als Funktion der Mischzeit τ_m ; die gestrichelte Linie repräsentiert die Abnahme der Magnetisierung auf dem Diagonalsignal des Amidprotons von Phe33.

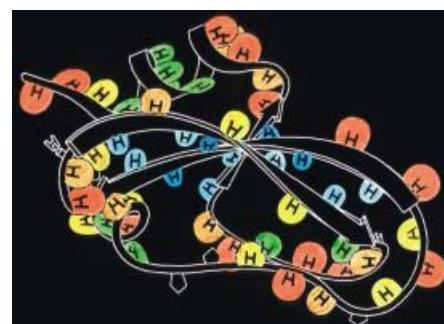


Abbildung 18. Vollständige sequenzspezifische Signalzuordnung für BPTI aus 2D- ^1H -NMR-Experimenten;^[34] die zugeordneten Aminosäurereste sind durch farbige Kreise um die Amidprotonen gekennzeichnet (siehe auch die Legende zu Abbildung 14; Zeichnung von Jane Richardson, 1982).

fert somit eine dreidimensionale Anordnung der Polypeptidkette, die gleichzeitig all die großen und kleinen Ringstrukturen enthält, die ihr durch die Summe aller NOESY-Kreuzsignale aufgezwungen werden.

Partielle Strukturbestimmungen wurden durch ein empirisches Verfahren zur Identifizierung regulärer Sekundärstrukturelemente in Polypeptidketten möglich, das auf der

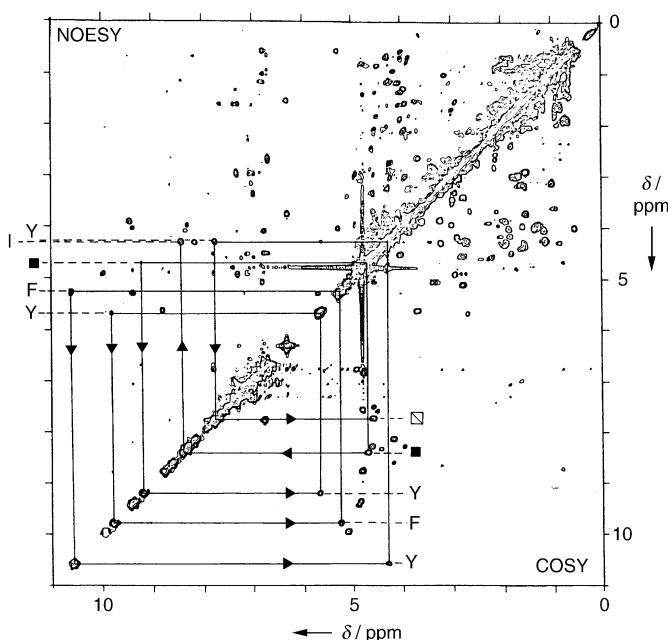


Abbildung 19. NOESY-COSY-Konnektivitätsdiagramm für die sequenzielle Zuordnung von ^1H -NMR-Signalen mithilfe der sequenziellen d_{AN} NOEs. Die Daten stammen von BPTI und wurden in $^2\text{H}_2\text{O}$ als Lösungsmittel aufgenommen (vgl. Text).

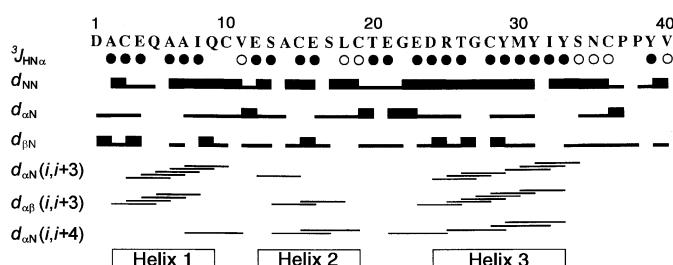


Abbildung 20. Gebräuchliche Darstellung der ^1H -NMR-Daten, aus denen sich die sequenzspezifische Signalzuordnung und die Identifizierung der regulären Sekundärstrukturelemente in Proteinen ergeben. Abgebildet sind die experimentellen Daten des Pheromon-Proteins Er-1 aus *Euplotes raikovii* ($M \approx 4500$), aufgetragen gegen dessen Aminosäuresequenz. $J_{\text{HN}\alpha}$ sind die skalaren Spin-Spin-Kopplungskonstanten, wobei die gefüllten Kreise kleinen und die leeren großen Werten entsprechen. d_{NN} , $d_{\alpha N}$ und $d_{\beta N}$ sind aus sequenziellen NOEs erhaltene Abstände, wobei starke und schwache sequenzielle NOEs durch dicke bzw. dünne Linien angezeigt werden. Kleine Werte für die Abstände $d_{\alpha N}(i, i+3)$, $d_{\alpha \beta}(i, i+3)$ und $d_{\alpha N}(i, i+4)$ ergeben sich aus NOEs mittlerer Reichweite zwischen den angegebenen Atomtypen in Aminosäureresten, die in der Sequenz entsprechend den Angaben in Klammern und den kurzen horizontalen Linien auseinander liegen. Die Lage von drei α -Helices ist unten angedeutet.

Erkennung bestimmter NOE-Muster beruht.^[4,37] So lassen sich aus den Daten in Abbildung 20 – eine Abfolge starker sequenzieller d_{NN} -NOEs in Verbindung mit NOEs mittlerer Reichweite im gleichen Polypeptidsegment – drei α -helicale Strukturen ableiten, die unabhängig davon auch durch Abfolgen kleiner Werte für die skalare $^3J_{H_{N\alpha}}$ -Spin-Spin-Kopplung angedeutet werden.^[4,38]

Es war von Beginn an klar, dass quantitative NOE-Abstandswerte als Ausgangspunkt für die Berechnung einer

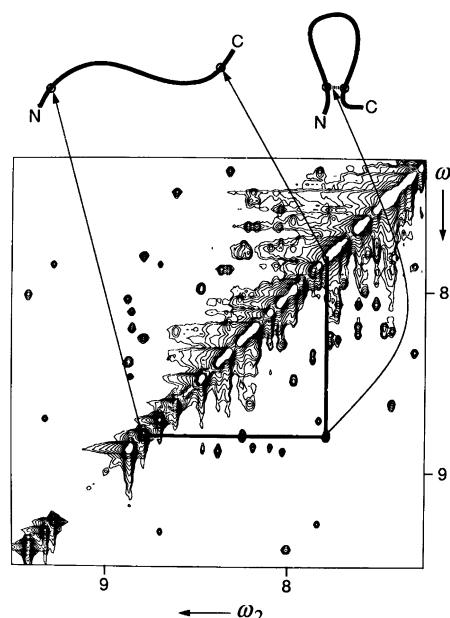


Abbildung 21. Illustration zur Ableitung von Strukturinformationen aus NOE-Abstandsinformationen. Die schematisch gezeichnete Polypeptidkette mit den durch N und C markierten Enden liefert das abgebildete 2D-[¹H,¹H]-NOESY-Spektrum, in dem die Signale der beiden durch kleine Kreise markierten Wasserstoffatome und das sie verknüpfende NOESY-Kreuzsignal durch eine horizontale und eine vertikale Linie verbunden sind (siehe Text).

vollständigen dreidimensionalen Proteinstruktur aus NMR-Daten^[39] schwierig zu bekommen sein würden. Die beobachteten NOEs hängen nicht nur vom Proton-Proton-Abstand r ab, sondern auch von den effektiven Rotationskorrelationszeiten τ_c [siehe Gl. (1)]. Für jedes Paar von Wasserstoffatomen wird der effektive τ_c -Wert nicht nur durch die Rotation des gesamten Moleküls (Brownsche Bewegung) bestimmt, die ihrerseits von Größe und Form des Proteins sowie von der Viskosität des Lösungsmittels abhängt, sondern kann auch durch intramolekulare Bewegungen beeinflusst werden; daher kann $f(\tau_c)$ für verschiedene Paare von Wasserstoffatomen in einem Proteinmolekül unterschiedlich sein. Zusätzliche Mehrdeutigkeiten können durch die partielle Auslöschung einzelner ^1H - ^1H -NOEs durch konkurrierende Spinrelaxationsprozesse auftreten, z.B. durch Spindiffusion (Abbildung 11), chemischen oder konformativen Austausch und Wechselwirkungen mit anderen Kern- oder Elektronenspins. Des Weiteren kann als Ergebnis rascher intramolekularer Bewegung ein gemessener NOE durch Mittelung über einen größeren Bereich von Abständen zwischen den betrachteten Wasserstoffatomen zustande kommen.^[40]

In Anbetracht dieser intrinsischen Beschränkungen für eine quantitative Abstandsbestimmung aus NOE-Daten beschlossen wir, für alle ^1H - ^1H -Kombinationen eines Proteins den gleichen Wert für die Korrelationsfunktion $f(\tau_c)$ [Gl. (1)] anzunehmen und aus den NOE-Messungen nur Obergrenzen für die Kern-Kern-Abstände abzuleiten. In der Praxis bedeutet dies, dass die Daten für eine Strukturberechnung aus erlaubten Abstandsbereichen bestehen, die durch einen oberen Wert von 3.0–5.0 Å (je nach Stärke des NOE) und einen unteren Wert von 2.0 Å begrenzt sind, wobei letzterer

der Summe der Van-der-Waals-Radien zweier NOE-verknüpfter Wasserstoffatome entspricht. Obwohl so jeder einzelne Eintrag in den Ausgangsdaten nur von begrenzter Genauigkeit ist, ist dieses Verfahren doch robust und berücksichtigt auch das Ausmaß intramolekularer Beweglichkeit, das üblicherweise in den strukturierten Bereichen globulärer Proteine zu erwarten ist.

Zur ersten Bestimmung der Struktur eines globulären Proteins aus NMR-Daten (Abbildung 22) verwendeten wir einen Distanzgeometrie-Algorithmus mit metrischer Matrix,

dagegen große Abweichungen zwischen den einzelnen Ensemble-Strukturen auf, wie das bei den beiden Kettenenden der *Antennapedia*-Homöodomäne in Abbildung 1 der Fall ist. Beim Fehlen von Abstandsvorgaben durch Weitbereichs-NOEs wird ein korrekt funktionierender Algorithmus zur Strukturberechnung im Wesentlichen den gesamten Konformationsraum abdecken, der mit der gegebenen Länge der Polypeptidkette zugänglich ist, wie dies beispielhaft der unstrukturierte Schwanz des Rinder-Prionproteins in Abbildung 3 unten verdeutlicht.

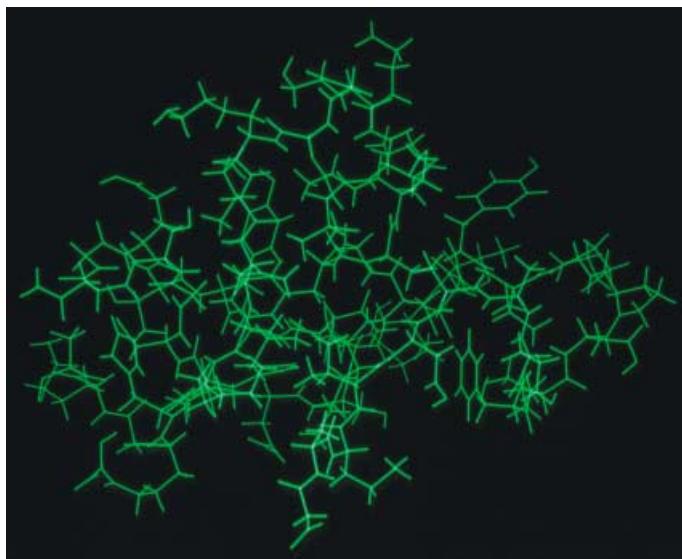


Abbildung 22. NMR-spektroskopisch bestimmte Struktur von BUSI IIA.^[43]

um nach Molekülgeometrien zu suchen, die mit dem Ensemble aller NOE-Abstandsvorgaben konsistent waren.^[41–43] Jede derartige Rechnung endet mit der Minimierung einer Fehlerfunktion. Der Endwert der Fehlerfunktion ist ein direktes Maß für den Erfolg, eine Molekülgeometrie gefunden zu haben, die mit den experimentellen Daten in Einklang ist. Angesichts der zuvor angesprochenen Tatsache, dass es sich bei den Eingabedaten um Abstandsbereiche handelt, ist es von großer Wichtigkeit, die Eindeutigkeit der berechneten Struktur abschätzen zu können. Zu diesem Zweck wird die Strukturberechnung mit den gleichen Eingabedaten, aber anderen Randbedingungen wiederholt, und die Eindeutigkeit der Struktur wird dann aus der Ähnlichkeit der Strukturen des erhaltenen Konformeren-Ensembles beurteilt. Üblicherweise werden etwa 100 Konformere berechnet, und eine Untergruppe, bestehend aus den 20 Konformeren mit den geringsten End-Werten der Fehlerfunktion, wird ausgewählt, um die NMR-spektroskopisch ermittelte Struktur des Proteins zu repräsentieren. Der Mittelwert der für diese Gruppe von Konformeren (siehe Abbildung 1) berechneten paarweisen Standardabweichungen (root-mean-square distances, RMSD) der Atomkoordinaten wird als Maß für die Genaugkeit der Strukturbestimmung genommen. Anschaulich zeigt eine gute Übereinstimmung innerhalb dieses Ensembles von Strukturen Bereiche an, in denen die Struktur durch die NMR-Daten mit hoher Präzision definiert ist. Strukturell ungeordnete Bereiche des Polypeptids weisen

4. NMR-Spektroskopie in der Strukturbioologie

4.1. Das Standardverfahren zur NMR-spektroskopischen Bestimmung der Struktur biologischer Makromoleküle

Die Verfahren zur NMR-spektroskopischen Strukturbestimmung umfassen die Herstellung einer homogenen Proteinlösung, die Aufnahme und Bearbeitung von NMR-Datensätzen und die strukturbezogene Interpretation der erhaltenen Daten (Tabelle 1). Die 1984 verwendeten Techniken zur Bestimmung der Struktur des Stiersperma-Protease-Inhibitors IIA sind in Tabelle 1 ebenfalls aufgelistet; die vier Einzelschritte der Auswertung der strukturrelevanten Daten (III in Tabelle 1) wurden separat durchgeführt, obwohl das Resultat der ersten Runde aus Sammlung konformationsrelevanter Daten und Strukturberechnung im Folgenden zur weiteren Überprüfung sowohl der sequenzspezifischen Signalzuordnung als auch der gesammelten Strukturdaten verwendet wurde. Der in Tabelle 1 skizzierte Ablauf wurde seit 1984 in der NMR-spektroskopischen Bestimmung der Strukturen von über 3000 Proteinen und Nucleinsäuren verwendet. Dabei wurde das generelle Schema durch das Einbeziehen einer Vielfalt neuer experimenteller Methoden erweitert.

Tabelle 1: Standardvorgehen zur NMR-spektroskopischen Bestimmung von Proteinstrukturen.

Schritt ^[a]	BUSI IIA ^[b]
I	Probenzubereitung
II	NMR-Spektroskopie
IIIa	Signalzuordnung
IIIb	konformationsrelevante Parameter
IIIc	Strukturberechnung
IIId	Strukturverfeinerung

[a] Die Aufteilung von Schritt III in vier Teilschritte ist etwas willkürlich; in der Praxis geht man durch mehrere Runden des Sammelns von konformationsrelevanten Parametern (IIIb) und der Strukturberechnung (IIIc); auch die Vervollständigung der sequenzspezifischen Signalzuordnung (IIIa) und die Strukturverfeinerung (IIId) können in dieses iterative Vorgehen einbezogen sein. [b] Hier sind die Techniken beschrieben, die für die erste Strukturbestimmung an einem globulären Protein 1984 genutzt wurden.^[43]

Große Fortschritte bei den experimentellen Techniken zur NMR-spektroskopischen Strukturbestimmung wurden durch die Einführung von Methoden zur Herstellung rekombinanter Proteine möglich, die mit stabilen Isotopen – speziell ^{13}C , ^{15}N und ^2H – markiert sind.^[44,45] Beispielsweise eröffnete dies den Weg zur effizienten Nutzung heteronuclearer NMR-Techniken bei Proteinen, wie der 3D-[$^1\text{H}, ^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$]-Tripelresonanzexperimente, der ^{13}C - oder ^{15}N -aufgelösten 3D-[$^1\text{H}, ^1\text{H}$]-NOESY-Experimente (Abbildung 23)^[46,47] und der

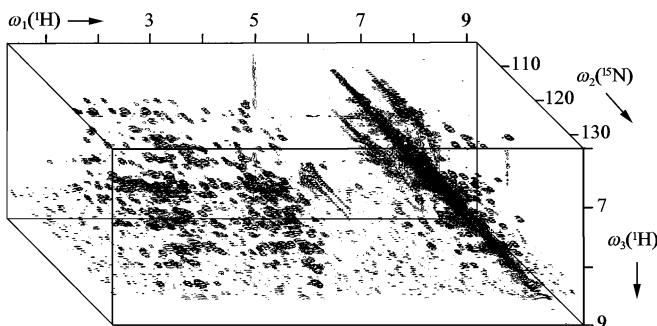


Abbildung 23. ^{15}N -aufgelöstes 3D-[$^1\text{H}, ^1\text{H}$]-NOESY-Spektrum (600 MHz, 28 °C, Lösungsmittel H_2O) der DNA-Bindungsdomäne des P22-c2-Repressors ($M \approx 10000$, durchgängig ^{15}N -markiert).

Verwendung heteronuclearer Filter.^[48] Wichtige Fortschritte wurden auch bei den Methoden der Strukturberechnung erzielt, sodass die Prozessorzeit, die zur Berechnung einer kleinen Proteinstruktur benötigt wird, von ungefähr einem Tag im Jahr 1984^[41,42] auf wenige Sekunden verringert werden konnte.^[49] Derzeit wird intensiv an der Automatisierung und kombinierten Durchführung der einzelnen Schritte zur strukturbezogenen Interpretation NMR-spektroskopischer Daten gearbeitet.^[50,51] In diesem Beitrag kann nicht auf die ganze Bandbreite an eleganten experimentellen Methoden eingegangen werden, die in den letzten 15 Jahren von den NMR-Spektroskopikern, die sich mit Makromolekülen beschäftigen, entwickelt wurden und die nun Untersuchungen an immer komplexeren Systemen ermöglichen (Abbildungen 1–3).

4.2. Die Struktur globulärer Proteine in Lösung

Das statische Bild eines Proteinmoleküls, wie es mit dem Standardverfahren zur Strukturbestimmung (Tabelle 1) erhalten wird, zeigt typischerweise eine über die Polypeptidkette variierende Präzision der Strukturbestimmung. Dies offenbart sich in unterschiedlich guter Übereinstimmung der einzelnen Strukturen des Konformeren-Ensembles, das zur Darstellung der NMR-spektroskopisch ermittelten Struktur verwendet wird (siehe Abbildung 1). Selbst in Proteinen, bei denen die gesamte Polypeptidkette zum strukturierten Bereich gehört, kann man an der Peripherie der Oberflächenseitenketten eine erhöhte Unordnung beobachten (Abbildung 24). Diese ausgeprägte Unordnung an der Oberfläche, die im Allgemeinen auch die Enden der Polypeptidkette einschließt, ist oft der einzige signifikante Unterschied zwischen den Strukturen eines globulären Proteins im Ein-

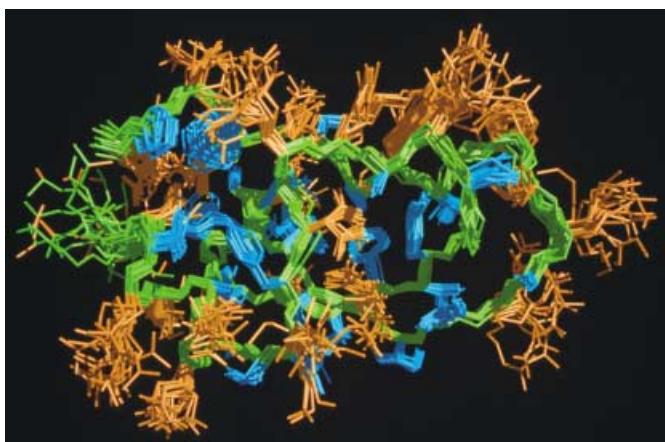


Abbildung 24. NMR-spektroskopisch ermittelte Struktur von BPTI, repräsentiert durch ein Ensemble aus 20 Konformeren, die entsprechend der besten Übereinstimmung des Polypeptidrückgrats (grün) übereinander gelegt sind. Die Seitenketten im Innern sind blau und die dem Lösungsmittel zugänglichen Seitenketten auf der Oberfläche rot dargestellt.

kristall und in Lösung.^[5] Teilweise beruht diese Unordnung auf den hier – anders als im Proteinkern – fehlenden Einschränkungen durch die dichte Packung und einem damit einhergehenden Mangel an NOE-Abstandsinformationen. Durch zusätzliche NMR-spektroskopische Spinrelaxationsmessungen^[24,28,33,52] kann man zwischen statischer Unordnung, die vermutlich durch einen Mangel an experimentellen Strukturparametern zustande kommt, und dynamischer Unordnung durch intramolekulare Bewegung im Nano- und Subnanosekundenbereich unterscheiden. Unabhängig von solchen Dynamikaspekten liefert die Beobachtung partiell gefalteter Polypeptidketten in Lösung (Abbildungen 1, 3 unten und 24) wichtige Zusatzinformationen zu den Daten aus Untersuchungen an Kristallen. Dies ist auch der Hauptgrund, warum die Qualität einer NMR-spektroskopischen Strukturbestimmung normalerweise nicht durch einen einzigen globalen Parameter charakterisiert wird.^[4–6]

Eine wichtige Erweiterung der Charakterisierung von Proteinen in Lösung war die Untersuchung der Protein-Hydratisierung mithilfe hochauflöster NMR-Spektren. Dabei wird die Position von Hydratwasser aus dem Auftreten von NOEs zwischen Wasserprotonen und Protonen der Polypeptidkette abgeleitet.^[53] Wegen der Abhängigkeit des NOE von der inversen sechsten Potenz des $^1\text{H}-^1\text{H}$ -Abstands kann man nur eine Schicht von Wassermolekülen beobachten (Abbildung 25). In den Hydratisierungsstudien spielt die Abhängigkeit der NOE-Intensität von der Korrelationsfunktion, die die stochastische Modulation der Dipol-Dipol-Kopplung zwischen den wechselwirkenden Protonen beschreibt [siehe Gl. (1)], eine Schlüsselrolle. Der Wert von $f(\tau_c)$ wird entweder durch die Brownsche Rotationsbewegung des hydratisierten Proteinmoleküls bestimmt oder durch die Unterbrechung der Dipol-Dipol-Wechselwirkung durch translationale Diffusion der Wassermoleküle relativ zur Proteinoberfläche, je nachdem was schneller ist. Auf dieser Grundlage konnte ermittelt werden, dass die Oberflächenhydratisierung von Peptiden und Proteinen durch sehr kurze

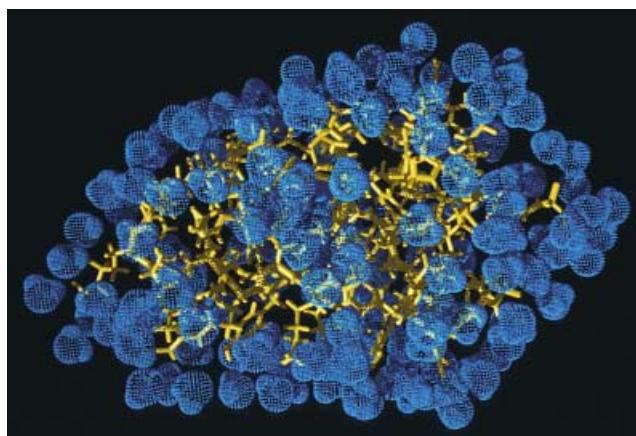


Abbildung 25. Molekülmodell von hydratisiertem BPTI in Wasser. Es sind alle Schweratome eines der Konformere aus Abbildung 24 (gelb) überzogen mit einer Hydrathülle aus Wassermolekülen (gepunktete blaue Kugeln) dargestellt.

Verweilzeiten der Wassermoleküle auf den Hydratisierungsplätzen charakterisiert ist – bei 10 °C liegen sie im Bereich von 20 bis 300 ps. Dieser Befund liefert eine anschauliche Begründung für die im Allgemeinen beobachtete dynamische Unordnung der Struktur der Proteinoberfläche (Abbildung 24) und weist darauf hin, dass die Dehydratisierung der Polypeptidoberfläche kaum jemals der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist, sei es bei der Proteininfaltung oder bei intermolekularen Wechselwirkungen mit Proteinen.

In der BPTI-Kristallstruktur liegen vier innere Hydratwassermoleküle vor, die ein integraler Bestandteil der Molekülarhitektur sind und in einem starren Modell der dreidimensionalen Struktur dem Lösungsmittel nicht zugänglich sind (Abbildung 26). Die für diese vier Wassermoleküle aufgrund der Überlegungen in den Abbildungen 4–6 vorhergesagte Dispersion der chemischen Verschiebungen wurde nicht beobachtet. Diese Entartung der chemischen Verschiebungen von gebundenem und freiem Wasser konnte auf den schnellen Wechsel von Wassermolekülen in das Proteinmolekül hinein und wieder aus ihm heraus zurückgeführt werden, mit einer Obergrenze für die Lebensdauer von etwa 1 ms^[53] (wie in Abbildung 26 durch die Zahl in Klammern gezeigt, kann die tatsächliche Lebensdauer für einzelne Wassermoleküle deutlich kürzer sein). Schneller Austausch innerer Hydratwassermoleküle scheint eine gängige Eigenschaft globulärer Proteine zu sein und wurde auch bei Wassermolekülen an DNA-Protein-Kontaktflächen beobachtet, so im DNA-Komplex der *Antennapedia*-Homöodomäne (Abbildung 2).

Eine weitere faszinierende Beobachtung innerer Proteinbeweglichkeit mithilfe der NMR-Spektroskopie sind die 180°-Ring-Flips von Phenylalanin und Tyrosin.^[54] Die Beobachtung dieses Umklappens der Ringe auf einer Milli- bis Mikrosekundenzeitskala (Abbildung 26) war aus folgenden Gründen eine echte Überraschung: In der verfeinerten röntgenographisch bestimmten Struktur von BPTI aus dem Jahre 1975 zählen die aromatischen Ringe von Phenylalanin und Tyrosin zu den am besten definierten Seitenketten mit den kleinsten Temperaturfaktoren; in jedem Ring nehmen

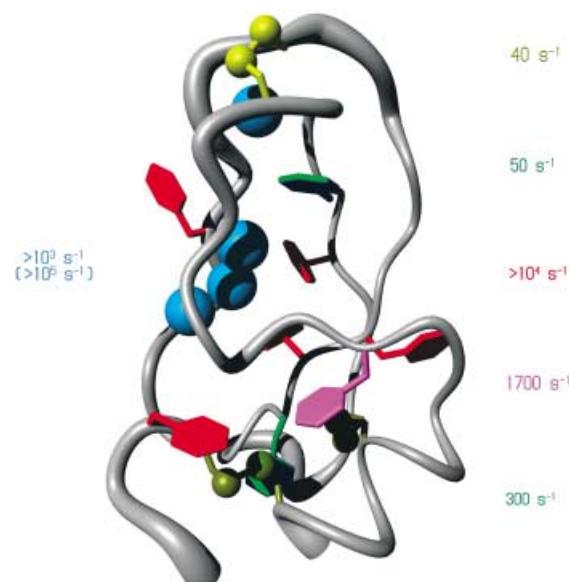


Abbildung 26. Intramolekulare Dynamik in BPTI: Die graue, durch die Positionen der α -Kohlenstoffatome gelegte Spline-Kurve repräsentiert das Polypeptidrückgrat, ihre Dicke gibt die Streuung innerhalb des Ensembles aus den 20 Konformeren in Abbildung 24 an. Für die dynamischen Prozesse und ihre Geschwindigkeitskonstanten gilt folgender Farbcode: grün, violett und rot: Ring-Flips von Phenylalanin und Tyrosin; gelb: Austausch zwischen den chiralen R- und S-Formen der Disulfidbrücke (oben); hellblau: innere Hydratwassermoleküle mit Angabe der Geschwindigkeit des Austauschs mit dem Lösungsmittel.

die relativen Temperaturfaktoren der Atome nach außen hin zu, sodass das ζ -Kohlenstoffatom, das auf der durch die $C^\beta-C^\gamma$ -Bindung definierten Symmetriechse liegt, die größte Positionsunsicherheit zeigt und nicht die vier δ - und ε -Ringkohlenstoffatome, die bei einem Ring-Flip die größte Bewegung durchführen. Theoretische Untersuchungen haben schließlich diesen scheinbaren Widerspruch gelöst: Die kristallographischen Temperaturfaktoren sind eine Mittelung über verschiedene Konformationen bezüglich der Rotation um die $C^\alpha-C^\beta$ -Bindung, beschreiben aber nicht die Ring-Flips selbst, weil die Populationen der Nichtgleichgewichtskonformationen bezüglich der Rotation um die $C^\beta-C^\gamma$ -Bindung verschwindend klein sind. Obwohl das Umklappen um die $C^\beta-C^\gamma$ -Bindung nur mit niedriger Frequenz stattfindet (siehe Abbildung 26), ist es doch eine sehr schnelle 180°-Drehung, die die beiden ununterscheidbaren Gleichgewichts-Orientierungen des Rings ineinander überführt.

Ähnlich wie der Austausch von innerem Hydratwasser ist das Umklappen der Ringe eine generelle Eigenschaft von globulären Proteinen, mit Aktivierungsenergien von 60 bis 100 kJ mol⁻¹, Amplituden über 1 Å, Aktivierungsvolumina von ca. 50 Å³ und der konzentrierten Verlagerung zahlreicher Atomgruppen. In Verbindung mit der sequenzspezifischen Zuordnung von NMR-Signalen liefern diese Experimente eine hohe räumlich-zeitliche Auflösung zur Beschreibung solcher dynamischer Prozesse in Proteinen. Dies ist in Abbildung 26 anhand der Zuordnung der Frequenzen für Ring-Flips und Wasseraustausch zur NMR-spektroskopisch bestimmten Struktur von BPTI gezeigt.

Zusätzlich zu den Angaben über Ring-Flips und den Austausch innerer Hydratwassermoleküle enthält Abbildung 26 Daten zum Austausch zwischen den chiralen *R*- und *S*-Formen einer Disulfidbindung. Im Gegensatz zu den beiden anderen Prozessen verknüpft dieser Vorgang zwei unterschiedliche Molekülstrukturen.

Obwohl die Daten aus Abbildung 26 bereits seit mehr als einem Jahrzehnt bekannt sind, manche sogar seit fast drei Jahrzehnten, gibt es noch keine allgemein akzeptierte Interpretation hinsichtlich der Bedeutung dieser niederfrequenten Bewegungsprozesse für die Proteinfunktion. Das Gleiche gilt für die Konformationsgleichgewichte, die sich in den Schutzfaktoren niederschlagen, die die Austauschgeschwindigkeiten von Amidprotonen in gefalteten Proteinen bestimmen (siehe Abbildungen 14 und 18). Es ist durchaus möglich, dass diese NMR-Messungen ihrer Zeit voraus und eine Quelle für künftige neuartige Einblicke in die Struktur-Wirkungs-Beziehungen von Proteinen sind.

5. Ausblick auf NMR-Anwendungen in der Struktur- und Funktionsproteomik

Die Verfügbarkeit von immer mehr komplett sequenzierten Genomen bedeutet neue Herausforderungen für die Methoden zur Bestimmung dreidimensionaler Strukturen. Auf der einen Seite konzentrieren sich „Structural-Genomics“-Initiativen in mehreren führenden Forschungszentren auf die Entwicklung von Verfahren für Hochdurchsatz-Strukturbestimmungen, um einen umfassenden Atlas von Proteinfaltungen zu erstellen, sodass verbliebene Lücken durch Methoden der Strukturvorhersage geschlossen werden können. Es ist unstrittig, dass noch viel zur weiteren Steigerung der Effizienz eines jeden Einzelschrittes in der Prozedur der NMR-spektroskopischen Strukturbestimmung (Tabelle 1) getan werden kann. Auf der anderen Seite stehen wir vor der Situation, dass neu aufgeklärte Proteinstrukturen es ermöglichen sollten, neuartige Funktionen vorherzusagen, wogegen es in der klassischen Strukturobiologie eher darum geht, bekannte Funktionen auf der Basis dreidimensionaler Strukturen zu verstehen. Dieser Abschnitt beschreibt einige neuere Arbeiten in unserer Gruppe, die vielleicht einmal zu künftigen Strategien beitragen, mit deren Hilfe ausgehend von Molekülstrukturen neue physiologische Funktionen entdeckt werden.

Es ist allgemein akzeptiert, dass die Kombination von Informationen aus der Bestimmung neuer Proteinfaltungen mit solchen über intermolekulare Wechselwirkungen ein Schlüssel zur Identifizierung unbekannter Genfunktionen sein könnte. Die effiziente Anwendung von konventioneller NMR-Spektroskopie in Lösung war auf Systeme mit Molekulargewichten bis ca. 30000 Da begrenzt (Abbildung 27, links). Die Tatsache, dass die auf einer Wechselwirkung zwischen zwei oder mehr Proteinen oder anderen makromolekularen Komponenten basierenden supramolekularen Strukturen üblicherweise hohe Molekulargewichte haben, war daher eine neue Herausforderung für Lösungs-NMR-Techniken. Obwohl die 30 000-Da-Obergrenze die Arbeit mit einer großen Auswahl physiologisch interessanter Proteine

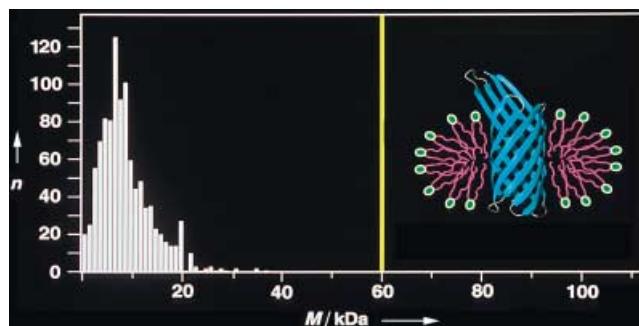


Abbildung 27. NMR-spektroskopische Strukturbestimmung und Molekulargewicht: Die Abszisse überstreckt einen Molekulargewichtsbereich von 0–110 000 Da. Links ist die Molekulargewichtsverteilung der Proteine aus der Protein-Datenbank gezeigt, deren Strukturen NMR-spektroskopisch bestimmt wurden (Stand Dezember 2000). Die rechts abgebildete Struktur des Proteins OmpX aus *E. coli* ($M \approx 18\,000$) in DHPC-Micellen ($M \approx 70\,000$ für die gemischten Micellen) markiert auf der Abszisse ungefähr den Molekulargewichtsbereich, der mit den NMR-Techniken aus den Abbildungen 28–30 derzeit für NMR-spektroskopische Strukturbestimmungen an Membranproteinen in gemischten Micellen zugänglich ist.

ermöglichte, war sie kaum vereinbar mit einer breiten Anwendung von NMR-Techniken zur Untersuchung solcher supramolekulärer Strukturen. So würde dieses Größenlimit beispielsweise die Zahl der für die NMR-spektroskopische Untersuchung zugänglichen potenziellen Rezeptorsysteme in der Wirkstoff-Forschung erheblich einschränken,^[55,56] die Untersuchungen an Protein-Nucleinsäure-Komplexen (vgl. Abbildung 2) auf eine kleine Zahl an Systemen mittlerer Größe begrenzen und die Lösungs-NMR-spektroskopische Untersuchung von Membranproteinen verhindern, da diese mit Tensiden oder Lipiden in Micellen rekonstituiert und löslich gemacht werden müssen (Abbildung 27, rechts).

Vor einigen Jahren gelang es, diese Einschränkung zu überwinden, indem der Größenbereich für die Anwendung von Lösungs-NMR-Techniken durch die Einführung der Spektroskopie mit optimierter transversaler Relaxation (TROSY) erheblich erweitert werden konnte.^[57] Das als Beispiel gezeigte $[^{15}\text{N}, ^1\text{H}]$ -TROSY-Spektrum eines in Tensid-Micellen rekonstituierten Membranproteins (Abbildung 28) belegt, dass man mit dieser Technik trotz der erheblichen Größe der Micellen scharfe, gut aufgelöste Signale erhält. Mithilfe des TROSY-Prinzips können auch die für eine Strukturbestimmung an $[^2\text{H}, ^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}]$ -markierten Proteinen erforderlichen komplexeren NMR-Experimente mit hoher Qualität durchgeführt werden,^[58] sodass die Lösungs-NMR-Spektroskopie nunmehr für die De-novo-Bestimmung von Membranproteinstrukturen genutzt werden kann.^[59]

Die höhere Qualität von NMR-Spektren großer Strukturen, die mit der TROSY-Technik erreicht wurde, kann man sich wie folgt qualitativ verständlich machen. Wie in der Diskussion über NOEs bereits angedeutet [Abschnitt 3.1, Gl. (1)], hängt das Aussehen eines Lösungs-NMR-Spektrums eng mit der effektiven Korrelationszeit τ_c zusammen, die die thermische Bewegung des betrachteten Moleküls charakterisiert. Der Anstieg der τ_c -Werte in größeren Strukturen führt zu einer Linienverbreiterung aufgrund schneller transversaler Spinrelaxation. Wäre das Spektrum in Abbildung 28 mit

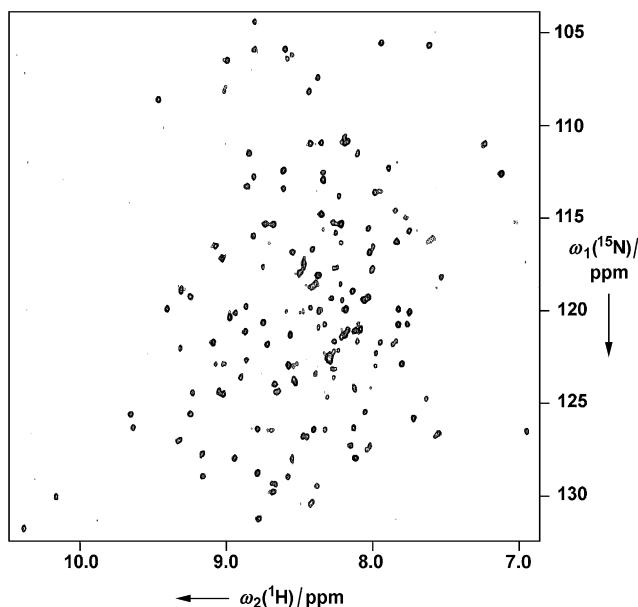


Abbildung 28. [$^{15}\text{N}, ^1\text{H}$]-TROSY-Spektrum von einheitlich ^2H - und ^{15}N -markiertem Membranprotein OmpX, rekonstituiert in DPHC-Micellen (750 MHz, 30°C, Lösungsmittel H_2O).

konventionellen NMR-Techniken aufgenommen worden, so wären die meisten Signale aufgrund der starken Linienvverbreiterung gar nicht mehr separiert, was einen erheblichen Empfindlichkeitsverlust bedeutet. Der Empfindlichkeitsunterschied folgt aus dem unterschiedlichen freien Induktionszerfall (FID) in der Zeitdomäne (Abbildung 29), d.h., der rasche Verlust an Magnetisierung in einem konventionellen NMR-Experiment mit einer großen Struktur kann durch die Verwendung von TROSY gebremst werden, was einer Verringerung der Linienbreite in der Frequenzdomäne (also dem Spektrum) entspricht.

Die TROSY-Pulsfolge ist in Abbildung 30 für ein 2D- $[^{15}\text{N}, ^1\text{H}]$ -Korrelationsexperiment gezeigt, das zwei Perioden für den Magnetisierungstransfer sowie die Evolutions- und die Detektionsperiode enthält. Während Evolution und Detektion erfährt das System keine äußeren Störungen, und die Geschwindigkeit des Magnetisierungsverlusts wird durch

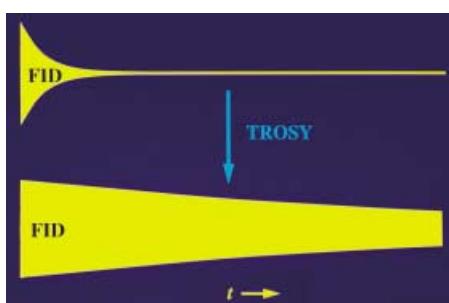


Abbildung 29. Schematische Darstellung des FID eines großen Proteins mit und ohne Anwendung von TROSY. Die abgedeckte Zeit beträgt etwa 100 ms. Der FID entspricht den unmittelbar aufgenommenen NMR-Daten in der Zeitdomäne, aus denen das Spektrum in der Frequenzdomäne (z.B. Abbildungen 15, 16 und 28) durch Fourier-Transformation hervorgeht (siehe Lit. [31, 33]).

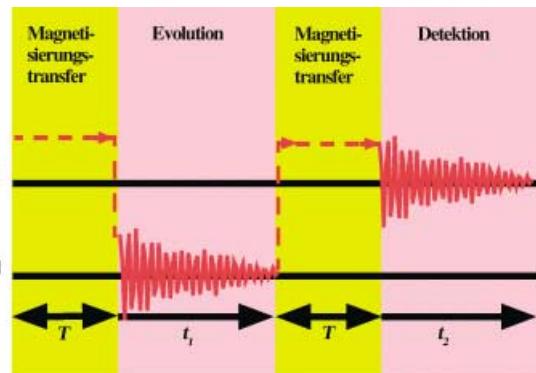


Abbildung 30. Grundelemente eines 2D- $[^{15}\text{N}, ^1\text{H}]$ -TROSY-Experiments. ^1H und ^{15}N kennzeichnen die Radiofrequenzkanäle zur Anregung dieser Isotope. Die gelbe Schattierung markiert die Magnetisierungstransferschritte $^1\text{H} \rightarrow ^{15}\text{N}$ bzw. $^{15}\text{N} \rightarrow ^1\text{H}$ während der Transferperioden T , die rosafarbene Schattierung die Evolutions- und Detektionsperioden t_1 bzw. t_2 . Der FID während t_1 und t_2 ist schematisch angedeutet. Die Gesamtdauer des Experiments, $2T+t_1+t_2$, kann im Bereich von 10 bis 1000 ms liegen, abhängig von der Größe der untersuchten Struktur und dem genauen Zweck der Messung.

die transversale Relaxationszeit bestimmt. Es ist offensichtlich, dass ein rascher Verlust an Magnetisierung in einem konventionellen NMR-Experiment (obere Spur in Abbildung 29) zu niedrigen oder sogar verschwindenden Signalintensitäten am Ende der Evolutionsperiode führt; entsprechend stark sinkt auch die Empfindlichkeit für die Signaldetection während der Detektionsperiode. Dagegen liefert die TROSY-Pulsfolge eine viel höhere Empfindlichkeit, da viel Signalintensität am Ende der Evolutionsperiode erhalten bleibt (untere Spur in Abbildung 29) und das Signal während eines Großteils der Detektionsperiode mit hohem Signal-Rausch-Verhältnis detektiert werden kann. Aufgrund solcher Überlegungen zur Minimierung des Verlusts an Magnetisierung während aller vier in Abbildung 30 angegebenen Zeitperioden und zusätzlicher Optimierung der Techniken des Magnetisierungstransfers^[60] konnten mittlerweile Lösung-NMR-Spektren von makromolekularen Systemen mit Molekulargewichten bis 870000 aufgenommen werden. Im Spektrum des Co-Chaperonins GroES im Komplex mit dem Chaperonin GroEL (Abbildung 31) sind die Resonanzsignale, die neue Informationen über die stрукturellen und dynamischen Eigenschaften der GroES-GroEL-Kontaktfläche liefern, rot und blau hervorgehoben.^[61]

Die wesentlichen Beiträge zur Geschwindigkeit der transversalen Spinrelaxation kommen von zwei Arten von Wechselwirkungen: der Dipol-Dipol-Kopplung des beobachteten Spins mit anderen räumlich benachbarten Spins und der Anisotropie der chemischen Verschiebung (CSA).^[28] Diese Wechselwirkungen werden in Lösung durch die statistische Rotationsbewegung moduliert, sodass als Konsequenz die Geschwindigkeit der transversalen Relaxation bei großen Strukturen mit langsamerer Brownscher Bewegung zunimmt. TROSY beruht auf konstruktiver Interferenz zwischen den beiden Relaxationsmechanismen und nutzt die CSA-Relaxation bei hohen Feldern zur Kompensation der dipolaren Relaxation.^[57] Im Endeffekt wird so das Aussehen des Spektrums von der Brownschen Bewegung entkoppelt und

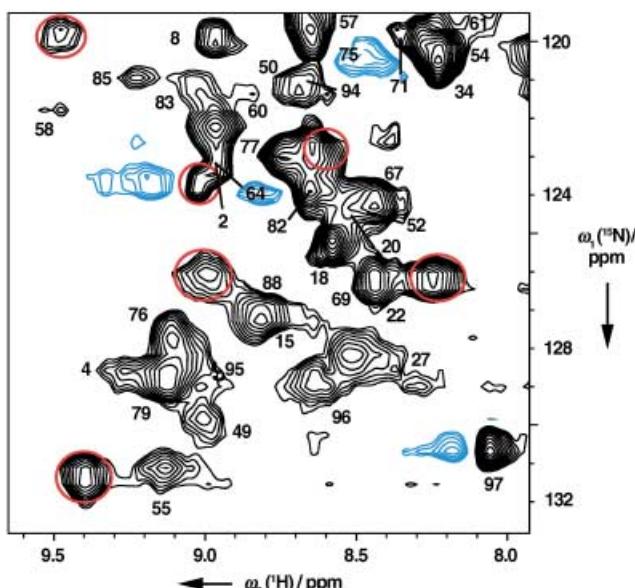


Abbildung 31. $[^{15}\text{N}, ^1\text{H}]$ -Korrelationsspektrum des Co-Chaperonins GroES ($M \approx 70000$) im Komplex mit dem Chaperonin GroEL ($M \approx 800000$). Das Spektrum wurde mit einem $[^{15}\text{N}, ^1\text{H}]$ -CRIFT-TROSY-Experiment aufgenommen.^[60, 61] Die roten und blauen Markierungen sind im Text erklärt.

die Aufnahme von Lösungs-NMR-Spektren großer Strukturen möglich.

Man muss abwarten, wie diese neuen NMR-Techniken in Zukunft am nutzbringendsten eingesetzt werden können. Zu den faszinierenden Möglichkeiten gehört die Anwendung der NMR-Spektroskopie in der Wirkstoff-Forschung mit sehr großen Rezeptoren.^[55, 56] Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass TROSY-basierte NMR-Techniken in Kombination mit geeigneten Strategien der Isotopenmarkierung eine wirkungsvolle Methode zur Untersuchung intermolekularer Wechselwirkungen in supramolekularen Strukturen aus zwei oder mehr makromolekularen Komponenten sind.^[62, 63] Bei diesen Anwendungen wird eine detaillierte strukturbezogene Auswertung der NMR-Daten meist von der Verfügbarkeit bereits unabhängig bestimmter atomar aufgelöster Strukturen für eine oder mehrere Komponenten abhängen, die entweder NMR-spektroskopisch in Lösung oder mit Beugungsmethoden an Einkristallen erhalten wurden. Anwendungen der neuen NMR-Techniken zur De-novo-Bestimmung großer Strukturen dürften besonders attraktiv für Nucleinsäure-Protein-Komplexe und kleine, in Tensid- oder Lipidmicellen rekonstituierte Membranproteine sein, sind aber nicht darauf begrenzt.

Die Charakterisierung von Membranproteinstrukturen ist auch schon auf das Tensid in den gemischten Micellen ausgedehnt worden (Abbildung 32),^[64] da die mit den Tensidmolekülen in Kontakt stehenden Bereiche der Proteinoberfläche durch die Beobachtung intermolekularer NOEs zwischen Protein- und Tensid-Wasserstoffatomen identifiziert werden konnten. Im konkreten Beispiel ist dieser Oberflächenbereich nahezu identisch mit der Proteinoberfläche, die in der biologischen Membran in Kontakt zur Lipidphase steht. Da somit beide Enden der fassartigen β -Barrel-Struktur

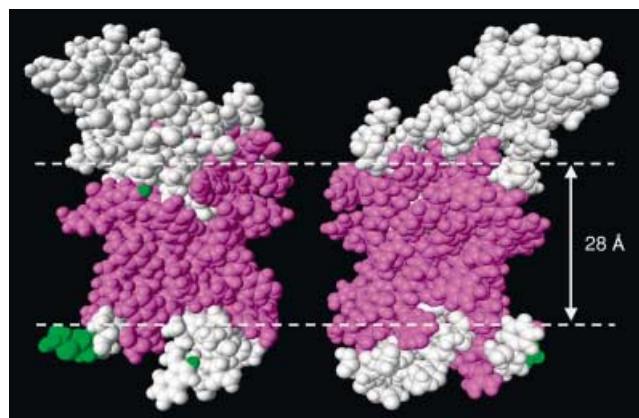


Abbildung 32. NMR-spektroskopisch bestimmte Struktur des Membranproteins OmpX, rekonstituiert in DHPC-Micellen. Gezeigt sind die Vorder- und die Rückansicht eines Kalottenmodells von OmpX; der mit DHPC-Molekülen der gemischten Micellen in Kontakt stehende Teil der Proteinoberfläche ist lila und grün markiert. Die gestrichelten horizontalen Linien geben die Dicke der Lipidschicht in der Zellmembran von *E. coli* an.

von OmpX für das wässrige Solvens frei zugänglich sind, sollte dieses Rekonstituierungssystem auch für die NMR-spektroskopische Untersuchung der Funktion des Membranproteins geeignet sein.

Dieser letzte Teil meiner Präsentation zeigt sicherlich nur einen kleinen Bereich der möglichen künftigen Entwicklungen von Lösungs-NMR-Techniken und ihrer Anwendung in Strukturbioologie und Strukturproteomik. Ich hege große Erwartungen für die künftige Entwicklung dieser erstaunlichen und eleganten Methode, der ich so viele Jahre voll Freude und Begeisterung bei der Erforschung der Moleküle des Lebens verdanke.

Von 1970 bis 2002 haben 229 Studenten, promovierte Forscher, Techniker und administrative Angestellte mit mir an der ETH Zürich gearbeitet. Ich stehe tief in ihrer aller Schuld für ihren Enthusiasmus und ihren großen Einsatz, die zu den hier zusammengefassten Ergebnissen führten. Ihre Namen und ihre individuellen Beiträge können der Literaturliste entnommen werden. Obwohl letztendlich der menschliche Geist hinter jedem wissenschaftlichen Fortschritt steht, hing der Erfolg unserer Forschungsprojekte doch auch von den finanziellen Möglichkeiten ab. Ich möchte der ETH Zürich, dem Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung, der Kommission für Technologie und Innovation (KTI), der Bruker-Biospin AG und dem Scripps Research Institute in La Jolla, USA für ihre Unterstützung danken.

Eingegangen am 19. März 2003 [A595]
Übersetzt von Dr. Gerd Gemmecker, Garching

[1] „The Structure of the *Antennapedia* Homeodomain Determined by NMR Spectroscopy in Solution: Comparison with Prokaryotic Repressors“: Y. Q. Qian, M. Billeter, G. Otting, M. Müller, W. J. Gehring, K. Wüthrich, *Cell* **1989**, 59, 573–580.

[2] „Protein-DNA Contacts in the Structure of a Homeodomain-DNA Complex Determined by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy in Solution“: G. Otting, Y. Q. Qian, M. Billeter, M.

- Müller, M. Affolter, W. J. Gehring, K. Wüthrich, *EMBO J.* **1990**, 9, 3085–3092.
- [3] „NMR Structure of the Bovine Prion Protein“: F. Lopez Garcia, R. Zahn, R. Riek, K. Wüthrich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 8334–8399.
- [4] K. Wüthrich, *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, Wiley, New York, **1986**.
- [5] „NMR—This Other Method for Protein and Nucleic Acid Structure Determination“: K. Wüthrich, *Acta Crystallogr. Sect. D* **1995**, 51, 249–270.
- [6] K. Wüthrich, *NMR in Structural Biology: A Collection of Papers by Kurt Wüthrich*, World Scientific, Singapur, **1995**.
- [7] „The Way to NMR Structures of Proteins“: K. Wüthrich, *Nat. Struct. Biol.* **2001**, 8, 923–925.
- [8] „Nuclear Magnetic Resonance Spectra of Proteins“: M. Saunders, A. Wishnia, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1958**, 70, 870–874.
- [9] „Proton Magnetic Resonance Spectra of Amino Acids“: O. Jardetzky, C. D. Jardetzky, *J. Biol. Chem.* **1958**, 233, 383–387.
- [10] „Nuclear Magnetic Resonance Studies of Proteins“: A. Kowalsky, *J. Biol. Chem.* **1962**, 237, 1807–1819.
- [11] „Proton Magnetic Resonance Spectra of Some Proteins“: M. Mandel, *J. Biol. Chem.* **1965**, 240, 1586–1592.
- [12] „Manifestations of the Tertiary Structures of Proteins in High-Frequency Nuclear Magnetic Resonance“: C. C. McDonald, W. D. Phillips, *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, 89, 6332–6341.
- [13] „High Resolution Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of Cytochrome c“: K. Wüthrich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1969**, 63, 1071–1078.
- [14] „The Absence of “Heme–Heme,” Interactions in Hemoglobin“: R. G. Shulman, S. Ogawa, K. Wüthrich, T. Yamane, J. Peisach, W. E. Blumberg, *Science* **1969**, 165, 251–257.
- [15] „NMR Studies of Hemoglobins VI: Heme Proton Spectra of Human Deoxyhemoglobins and Their Relevance to the Nature of Co-operative Oxygenation of Haemoglobin“: D. G. Davis, T. R. Lindstrom, N. H. Mock, J. J. Baldassare, S. Charache, R. T. Jones, C. Ho, *J. Mol. Biol.* **1971**, 60, 101–111.
- [16] „Paramagnetic Proton NMR Shifts of Metmyoglobin, Methemoglobin, and Hemin Derivatives“: R. J. Kurland, D. G. Davis, C. Ho, *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, 90, 2700–2701.
- [17] „Structural Studies of Hemes and Hemoproteins by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy“: K. Wüthrich, *Struct. Bonding (Berlin)* **1970**, 8, 53–121.
- [18] „Electronic Structure of Cyanide Complexes of Hemes and Heme Proteins“: R. G. Shulman, S. H. Glarum, M. Karplus, *J. Mol. Biol.* **1971**, 57, 93–115.
- [19] K. Wüthrich, *NMR in Biological Research: Peptides and Proteins*, North Holland, Amsterdam, **1976**.
- [20] J. H. Noggle, R. E. Schirmer, *The Nuclear Overhauser Effect*, Academic Press, New York, **1971**.
- [21] „Homonuclear INDOR Spectroscopy as a Means of Simplifying and Analyzing Proton Magnetic Resonance Spectra of Peptides and as a Basis for Determining Secondary and Tertiary Conformations of Complex Peptides“: W. A. Gibbons, H. Alms, R. S. Bockman, H. R. Wyssbrod, *Biochemistry* **1972**, 11, 1721–1725.
- [22] „Double Resonance NMR Observation of Electron Exchange Between Ferri- and Ferricytochrome c“: R. K. Gupta, A. G. Redfield, *Science* **1970**, 169, 1204–1206.
- [23] „Negative Nuclear Overhauser Effects as Probes of Macromolecular Structure“: P. Balaram, A. A. Bothner-By, J. Dadok, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, 94, 4015–4017.
- [24] „Relaxation Processes in a System of Two Spins“: I. Solomon, *Phys. Rev.* **1955**, 99, 559–565..
- [25] „Proton Magnetic Relaxation and Spin Diffusion in Proteins“: A. Kalk, H. J. C. Berendsen, *J. Magn. Reson.* **1976**, 24, 343–366.
- [26] „Transient Proton–Proton Overhauser Effects in Horse Ferri-cytochrome c“: S. L. Gordon, K. Wüthrich, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, 100, 7094–7096.
- [27] „Truncated Driven Nuclear Overhauser Effect (TOE): A New Technique for Studies of Selective ^1H - ^1H Overhauser Effects in the Presence of Spin Diffusion“: G. Wagner, K. Wüthrich, *J. Magn. Reson.* **1979**, 33, 675–680.
- [28] A. Abragam, *Principles of Nuclear Magnetism*, Clarendon Press, Oxford, **1961**.
- [29] „Evolutionary Change of the Heme c Electronic Structure: Ferricytochrome c-551 from *Pseudomonas Aeruginosa* and Horse Heart Ferricytochrome c“: R. M. Keller, K. Wüthrich, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1978**, 83, 1132–1139.
- [30] „Individual Assignments of Amide Proton Resonances in the Proton NMR Spectrum of the Basic Pancreatic Trypsin Inhibitor“: A. Dubs, G. Wagner, K. Wüthrich, *Biochim. Biophys. Acta* **1979**, 577, 177–194.
- [31] „Kernresonanz-Fourier-Transformations-Spektroskopie“: R. R. Ernst, *Angew. Chem.* **1992**, 104, 817–836; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, 31, 805–823.
- [32] „Homonuclear Two-Dimensional ^1H NMR of Proteins: Experimental Procedures“: G. Wider, S. Macura, A. Kumar, R. R. Ernst, K. Wüthrich, *J. Magn. Reson.* **1984**, 56, 207–234.
- [33] R. R. Ernst, G. Bodenhausen, A. Wokaun, *Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions*, Oxford University Press, Oxford, **1987**.
- [34] „Sequential Resonance Assignments in Protein ^1H Nuclear Magnetic Resonance Spectra: Basic Pancreatic Trypsin Inhibitor“: G. Wagner, K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.* **1982**, 155, 347–366.
- [35] „Systematic Application of Two-Dimensional ^1H Nuclear Magnetic Resonance Techniques for Studies of Proteins 2: Combined Use of Correlated Spectroscopy and Nuclear Overhauser Spectroscopy for Sequential Assignments of Backbone Resonances and Elucidation of Polypeptide Secondary Structures“: G. Wagner, Anif-Kumar, K. Wüthrich, *Eur. J. Biochem.* **1981**, 114, 375–384.
- [36] „Sequential Resonance Assignments in Protein ^1H Nuclear Magnetic Resonance Spectra: Computation of Sterically Alloswed Proton–Proton Distances and Statistical Analysis of Proton–Proton Distances in Single Crystal Protein Conformations“: M. Billeter, W. Braun, K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.* **1982**, 155, 321–346.
- [37] „Polypeptide Secondary Structure Determination by Nuclear Magnetic Resonance Observation of Short Proton–Proton Distances“: K. Wüthrich, M. Billeter, W. Braun, *J. Mol. Biol.* **1984**, 180, 715–740.
- [38] „Calibration of the Angular Dependence of the Amide Proton–C α Proton Coupling Constants, $^3J_{\text{HN}\alpha}$, in a Globular Protein: Use of $^3J_{\text{HN}\alpha}$ for Identification of Helical Secondary Structure“: A. Pardi, M. Billeter, K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.* **1984**, 180, 741–751.
- [39] „Sequential Resonance Assignments as a Basis for Determination of Spatial Protein Structures by High Resolution Proton Nuclear Magnetic Resonance“: K. Wüthrich, G. Wider, G. Wagner, W. Braun, *J. Mol. Biol.* **1982**, 155, 311–319.
- [40] „Combined Use of Proton–Proton Overhauser Enhancements and a Distance Geometry Algorithm for Determination of Polypeptide Conformations: Application to Micelle-Bound Glucagon“: W. Braun, C. Bösch, L. R. Brown, N. Gö, K. Wüthrich, *Biochim. Biophys. Acta* **1981**, 667, 377–396.
- [41] „A Distance Geometry Program for Determining the Structures of Small Proteins and Other Macromolecules from Nuclear Magnetic Resonance Measurements of Intramolecular ^1H - ^1H Proximities in Solution“: T. F. Havel, K. Wüthrich, *Bull. Math. Biol.* **1984**, 46, 673–698.
- [42] „An Evaluation of the Combined Use of Nuclear Magnetic Resonance and Distance Geometry for the Determination of

- Protein Conformations in Solution“: T. F. Havel, K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.* **1985**, *182*, 281–294.
- [43] „Solution Conformation of Proteinase Inhibitor IIA from Bull Seminal Plasma by ^1H Nuclear Magnetic Resonance and Distance Geometry“: M. P. Williamson, T. F. Havel, K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.* **1985**, *182*, 295–315.
- [44] „Prospects for NMR of Large Proteins“: G. Wagner, *J. Biomol. NMR* **1993**, *3*, 375–385.
- [45] „Solution NMR Spectroscopy Beyond 25 kDa“: L. E. Kay, K. H. Gardner, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1997**, *7*, 564–570.
- [46] „Methodological Advances in Protein NMR“: A. Bax, S. Grzesiek, *Acc. Chem. Res.* **1993**, *26*, 131–138.
- [47] „Technical Aspects of NMR Spectroscopy with Biological Macromolecules and Studies of Hydration in Solution“: G. Wider, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1998**, *32*, 193–275.
- [48] „Heteronuclear Filters in Two-Dimensional [$^1\text{H}, ^1\text{H}$]-NMR Spectroscopy: Combined Use with Isotope Labelling for Studies of Macromolecular Conformation and Intermolecular Interactions“: G. Otting, K. Wüthrich, *Q. Rev. Biophys.* **1990**, *23*, 39–96.
- [49] „Structure Calculation of Biological Macromolecules from NMR Data“: P. Güntert, *Q. Rev. Biophys.* **1998**, *31*, 145–237.
- [50] „Automated Analysis of NMR Assignments and Structures for Proteins“: H. N. B. Moseley, G. T. Montelione, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1999**, *9*, 635–642.
- [51] „Protein NMR Structure Determination with Automated NOE Identification in the NOESY Spectra Using the New Software ATNOS“: T. Herrmann, P. Güntert, K. Wüthrich, *J. Biomol. NMR* **2002**, *24*, 171–189.
- [52] „Semi-Classical Nuclear Spin Relaxation Theory Revisited for Use with Biological Macromolecules“: P. Lugrinbühl, K. Wüthrich, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectr.* **2002**, *40*, 199–247.
- [53] „Protein Hydration in Aqueous Solution“: G. Otting, E. Liepinsh, K. Wüthrich, *Science* **1991**, *254*, 974–980.
- [54] „NMR Investigations of the Dynamics of the Aromatic Amino Acid Residues in the Basic Pancreatic Trypsin Inhibitor“: K. Wüthrich, G. Wagner, *FEBS Lett.* **1975**, *50*, 265–268.
- [55] „Discovering High-Affinity Ligands for Proteins: SAR by NMR“: S. B. Shuker, P. J. Hajduk, R. P. Meadows, S. W. Fesik, *Science* **1996**, *274*, 1531–1534.
- [56] „NMR in Drug Discovery“: M. Pellecchia, D. S. Sem, K. Wüthrich, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2002**, *1*, 211–219.
- [57] „Attenuated T_2 Relaxation by Mutual Cancellation of Dipole–Dipole Coupling and Chemical Shift Anisotropy Indicates an Avenue to NMR Structures of Very Large Biological Macromolecules in Solution“: K. Pervushin, R. Riek, G. Wider, K. Wüthrich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 12366–12371.
- [58] „TROSY in Triple-Resonance Experiments: New Perspectives for Sequential NMR Assignment of Large Proteins“: M. Salzmann, K. Pervushin, G. Wider, H. Senn, K. Wüthrich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 13585–13590.
- [59] „Solution NMR Studies of the Integral Membrane Proteins OmpX and OmpA from *Escherichia coli*“: C. Fernández, C. Hilty, S. Bonjour, K. Adeishvili, K. Pervushin, K. Wüthrich, *FEBS Lett.* **2001**, *504*, 173–178.
- [60] „Polarization Transfer by Cross-Correlated Relaxation in Solution NMR with Very Large Molecules“: R. Riek, G. Wider, K. Pervushin, K. Wüthrich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 4918–4923.
- [61] „NMR Analysis of a 900 K GroEL–GroES Complex“: J. Fiaux, E. Bertelsen, A. Horwich, K. Wüthrich, *Nature* **2002**, *418*, 207–211.
- [62] „Pilus Chaperone FimC–Adhesin FimH Interactions Mapped by TROSY-NMR“: M. Pellecchia, P. Sebbel, U. Hermanns, K. Wüthrich, R. Glockshuber, *Nat. Struct. Biol.* **1999**, *6*, 336–339.
- [63] „TROSY-NMR Reveals Interaction between ERp57 and the Tip of the Calreticulin P-Domain“: E. M. Frickel, R. Riek, I. Jelesarov, A. Helenius, K. Wüthrich, L. Ellgaard, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 1954–1959.
- [64] „Lipid–Protein Interactions in DHPC Micelles Containing the Integral Membrane Protein OmpX Investigated by NMR Spectroscopy“: C. Fernández, C. Hilty, G. Wider, K. Wüthrich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 13533–13537.