

Ein Konzept zur schnellen Bestimmung von Proteinstrukturen durch Festkörper-NMR-Spektroskopie**

Adam Lange, Stefan Becker,* Karsten Seidel,
Karin Giller, Olaf Pongs und Marc Baldus*

Trotz ihrer enormen pharmakologischen Bedeutung gibt es gegenwärtig kein allgemeines Konzept zur Untersuchung dreidimensionaler (3D) biomolekularer Strukturen und ihren Wechselwirkungen in nichtkristallinen und unlöslichen Systemen. Dazu gehören z. B. Liganden, die mit hoher Affinität an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren oder Ionenkanäle binden, Proteinfibrillen und Biopolymere. In diesen Fällen kann sich die Anwendung der beiden wichtigsten experimentellen Methoden zur Bestimmung von 3D-Strukturen, der Röntgenbeugung und der Flüssig-NMR-Spektroskopie, als problematisch erweisen. Alternativ können spezielle NMR-Techniken verwendet werden, die zur Bestimmung struktureller und dynamischer Eigenschaften in nichtmobilen, z. B. membrangebundenen Systemen („Festkörper-NMR-Spektroskopie“) entwickelt wurden (siehe z. B. Lit. [1, 2]).

Molekulare 3D-Strukturen von kleinen Peptiden wurden mit Festkörper-NMR-Methoden untersucht, die auf der Messung von spezifischen (^{13}C , ^{13}C)- oder (^{13}C , ^{15}N)-Abständen beruhen.^[3,4] Diese Techniken erfordern allerdings eine hohe spektrale Auflösung und die Aufnahme einer großen Zahl von NMR-Spektren. Eine Erweiterung solcher Methoden hin zur Untersuchung größerer Polypeptide könnte sich daher als schwierig herausstellen. Neuere Methoden basieren auf der Spektralanalyse von mehreren Polypeptidvarianten, die an wohldefinierten atomaren Positionen oder Aminosäuretypen^[5–7] isotonenmarkiert sind. Solche Ansätze waren erfolgreich bei membrangebundenen Proteinen,^[1,5] die makroskopisch auf Glasplatten orientiert waren, sowie bei Peptiden,^[4] Amyloidfibrillen^[6] und einem Protein fester Phase,^[7] die unter Rotation um den Magischen Winkel (MAS)^[8] unter-

[*] A. Lange, Dr. S. Becker, K. Seidel, K. Giller, Dr. M. Baldus
Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie
Abteilung für NMR-basierte Strukturbiologie
37077 Göttingen (Deutschland)
Fax: (+49) 551-201-2202
E-mail: sabe@nmr.mpibpc.mpg.de
maba@mpibpc.mpg.de

Prof. Dr. O. Pongs
Institut für Neuronale Signalverarbeitung
Zentrum für Molekulare Neurobiologie der Universität Hamburg
20246 Hamburg (Deutschland)

[**] Präsentiert auf der EENC/AMPERE-Konferenz in Lille (Frankreich), 6.–11. September 2004. Wir danken C. Legros für den KTX-Klon und C. Griesinger für wissenschaftliche Diskussionen und kontinuierliche Unterstützung dieses Projekts. A.L. dankt dem Fonds der Chemischen Industrie für ein Promotionsstipendium.



Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

sucht wurden. Da diese Methoden die Synthese mehrerer isotoptenmarkierter Proteinvarianten erfordern, sind ihre Anwendungsmöglichkeiten begrenzt, wenn eine schnelle Bestimmung von 3D-Strukturen erwünscht ist. Weiterhin kann ihre Anwendung durch Schwierigkeiten bei der Herstellung adäquater Mengen isotoptenmarkierter Proteins oder eines (möglicherweise nichtpeptidischen) Liganden erschwert sein.

Hier stellen wir einen Ansatz vor, der die schnelle Bestimmung einer 3D-Molekülstruktur mit Festkörper-NMR-Methoden ermöglicht und nur eine einzelne, gleichförmig isotoptenmarkierte Probe erfordert. Bei vergleichbaren Flüssig-NMR-Untersuchungen ist die Detektion kleiner Proton-Proton-Abstände von entscheidender Bedeutung, da diese sehr wichtige Informationen über die 3D-Faltung des Proteins enthalten.^[9] Wegen der geringen spektralen Auflösung sind zweidimensionale (2D) Proton-Proton-Korrelationsmethoden für Festkörper-NMR-Untersuchungen allerdings nur eingeschränkt geeignet. Stattdessen bedienen wir uns im Folgenden der indirekten Detektion und strukturellen Analyse von Proton-Proton-Wechselwirkungen mithilfe von ($^{13}\text{C},^{13}\text{C}$)-Korrelationsspektroskopie.^[10] Kombiniert mit Torsionswinkelschränkungen, die von konformationsabhängigen chemischen Verschiebungen abgeleitet werden können, wird die Charakterisierung der molekularen 3D-Struktur mit nur einer einzigen Proteinprobe möglich. Wir demonstrieren unseren Ansatz am Beispiel des Kalitoxins (KTX), eines 38-Reste-Peptids, das im Gift des Skorpions *Androctonus mauretanicus mauretanicus* vorkommt.^[11] Es wurde gezeigt, dass KTX spannungsabhängige eukaryotische Kaliumkanäle (z.B. *Shaker* und *Kv1.3*) mit hoher Affinität und mit einer 1:1-Stöchiometrie blockiert.^[12]

Zunächst wurde eine Reihe zweidimensionaler ($^{13}\text{C},^{13}\text{C}$)- und ($^{15}\text{N},^{13}\text{C}$)-Korrelationsexperimente an einer gleichförmig [$^{13}\text{C},^{15}\text{N}$]-isotoptenmarkierten KTX-Probe unter MAS durchgeführt, um sequentielle $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -Resonanzzuordnungen zu erhalten. In Abbildung 1 ist als Beispiel ein ($^{13}\text{C},^{13}\text{C}$)-Spindiffusionsexperiment^[13] (grün) dargestellt, das eine Reihe von intraresidualen Seitenkettenkorrelationen mit ^{13}C -Linienbreiten deutlich unter 1 ppm enthält. Die Kombination von (N,C)- und (C,C)-2D-Korrelationsmethoden resultierte in De-novo- $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -Resonanzzuordnungen für 87 % aller Peptidreste (hinterlegt in der BioMagResBank unter dem Eintrag 6351). Spektrale Zuordnungen von MAS-Festkörper-NMR-Experimenten können bei selektiv^[14] oder gleichförmig^[15,16] isotoptenmarkierten Polypeptiden im Hinblick auf die Konformation des Rückgrats analysiert werden, wobei

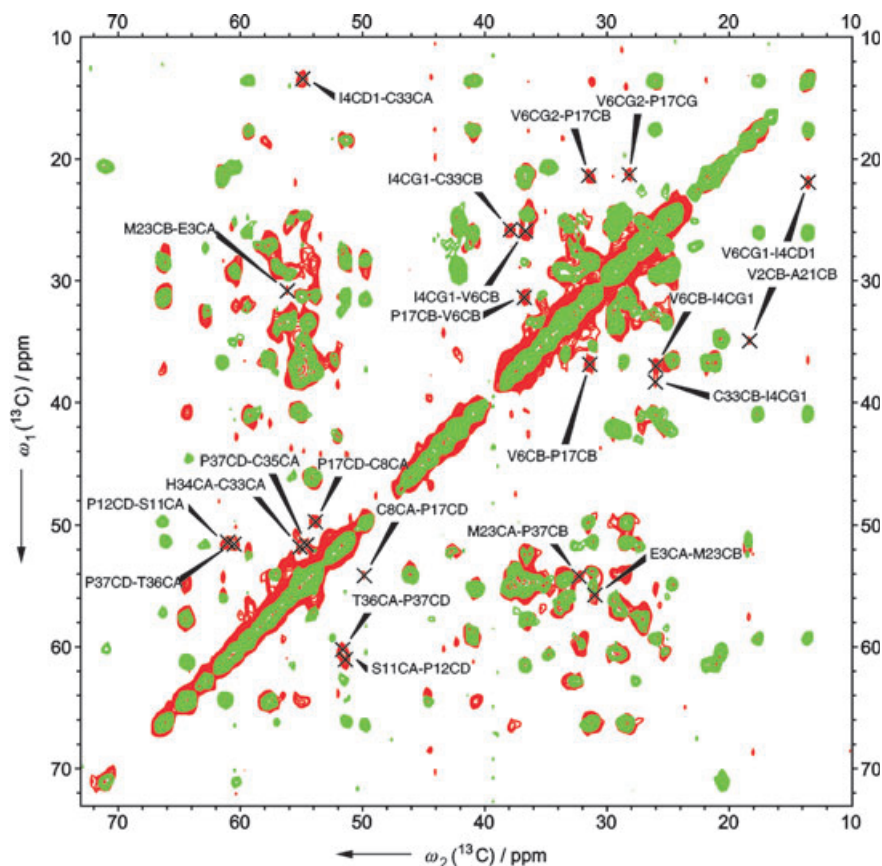


Abbildung 1. Vergleich eines (C,C)-Spindiffusionspektrums (grün, Mischzeit: 50 ms) und eines CHHC-Spektrums (rot, ($^1\text{H},^1\text{H}$)-Mischzeit: 250 μs) von gleichförmig [$^{13}\text{C},^{15}\text{N}$]-isotoptenmarkiertem KTX auf einem 800-MHz-NMR-Instrument (Bruker Biospin). Zugeordnete Korrelationen spiegeln interresiduale CHHC-Einschränkungen wider.

Flüssig-NMR-Daten als Referenz verwendet werden. Die $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -Resonanzzuordnungen für KTX dienten daher als Eingabeinformationen für das Programm TALOS^[17] und resultierten in insgesamt 2×27 Einschränkungen an die Rückgrat-Torsionswinkel. Wie in Abbildung 2 (oben) dargestellt ist, weisen die erhaltenen Parameter auf β -Faltblattanordnungen hin, die die Reste 2–9, 24, 28, 29 und 32–37 umfassen, sowie auf eine α -Helix bestehend aus den Resten 11–21.

Sequentielle, mittel- und langreichweitige ($^1\text{H},^1\text{H}$)-Abstandseinschränkungen wurden nachfolgend aus der Analyse dreier ($^{13}\text{C},^{13}\text{C}$)-codierter Experimente mit einer ($^1\text{H},^1\text{H}$)-Mischzeit (CHHC)^[18,19] erhalten. Bei Mischzeiten von 250–400 μs und einer MAS-Frequenz von 12.5 kHz ($B_0 = 18.8\text{ T}$) werden die Spektren in einer gleichförmig [^{13}C]-isotoptenmarkierten Probe von Proton-Proton-Wechselwirkungen entsprechend Abständen von 1.8–3.5 Å^[19] dominiert. Als Beispiel ist in Abbildung 1 ein CHHC-Spektrum für eine Proton-Proton-Mischzeit von 250 μs dargestellt (rot). Darin spiegeln ($^{13}\text{C},^{13}\text{C}$)-Kreuzkorrelationsintensitäten ($^1\text{H},^1\text{H}$)-Wechselwirkungen wider. Die in Abbildung 1 zugeordneten Korrelationen umfassen langreichweitige Kontakte entlang der Polypeptidkette und verbinden Proteinsegmente unterschiedlicher Sekundärstruktur (Abbildung 2, unten). Zusätzliche Abstandseinschränkungen wurden durch die Analyse von

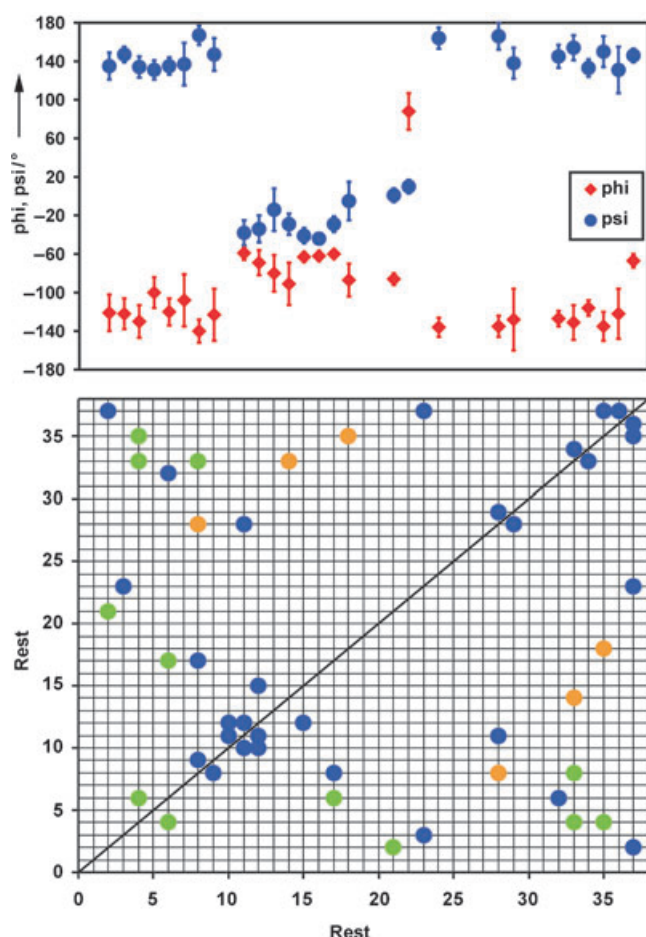


Abbildung 2. Oben: Torsionswinkelschränkungen, die aus De-novo- $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -Resonanzzuordnungen mit TALOS abgeleitet wurden. Unten: Interresiduale Abstandseinschränkungen, basierend auf eindeutigen (grün) und mehrdeutigen (blau) CHHC-Wechselwirkungen. Disulfidbrücken sind in Orange wiedergegeben.

CHHC-Spektren mit Mischzeiten von 325 μs und 400 μs erhalten (siehe auch Tabelle 1 in den Hintergrundinformationen).

Um ein 3D-Strukturmodell von KTX zu erstellen, wurden Methoden aus der Flüssig-NMR-Spektroskopie^[20] wie folgt verwendet: In der ersten Runde einer auf Molekulardynamik basierenden Strukturrechnung in CNS^[21] verwendeten wir Torsionswinkelschränkungen, wie sie in Abbildung 2 (oben) dargestellt sind, sowie Informationen über die kovalente Struktur (drei Disulfidbrücken) und acht eindeutig zugeordnete CHHC-Einschränkungen (siehe Tabelle 1a in den Hintergrundinformationen). Da Proton-Proton-Wechselwirkungen indirekt über direkt gebundene ^{13}C -Spins detektiert werden, bleibt die Zuordnung von Methylen- und Methylprotonen mehrdeutig. Einem Ansatz aus der Flüssig-NMR-Spektroskopie folgend^[22] wurde dieser Aspekt durch eine r^{-6} -Summierung über alle beteiligten Proton-Proton-Kontakte berücksichtigt (siehe auch Lit. [19]). Im Prinzip können falsche oder fehlende Zuordnungen und intermolekulare Wechselwirkungen die Verlässlichkeit der CHHC-Einschränkungen vermindern. Eine systematische Analyse zeigt, dass solche Einflüsse für eine der CHHC-detektierten

Abstandseinschränkungen charakteristisch sind, was zu einer signifikanten Erhöhung der Gesamtenergie in der Strukturrechnung führt. Diese Einschränkung wurde daher in den weiteren Phasen der Strukturverfeinerung weggelassen. Bemerkenswerterweise war diese CHHC-Korrelation auch nicht in einer gleichförmig [^{13}C , ^{15}N]-isotopenmarkierten Probe zu beobachten, die in unmarkiertem KTX verdünnt war (Daten nicht gezeigt).

Als nächstes berechneten wir ein Ensemble von Strukturen, das zur Zuordnung mehrdeutiger CHHC-Korrelationen diene (siehe Tabelle 1b in den Hintergrundinformationen und Lit. [20]). Schließlich wurden 54 Torsionswinkel- und 28 Abstandseinschränkungen (6 sequentielle, 7 mittelreichweitige und 15 langreichweitige) dazu verwendet, 200 Strukturen zu berechnen. Wie in der Modellstudie in Lit. [19], umfassten die Proton-Proton-Kontakte (Tabelle 1a,b in den Hintergrundinformationen) auch Methyl-Methyl-Wechselwirkungen. Die zehn Konformere mit der niedrigsten Energie (Abbildung 3; PDB-Eintrag: 1XSW) zeigen eine gute kova-



Abbildung 3. Bänderdarstellung der zehn mit Festkörper-MAS-NMR-Spektroskopie bestimmten Konformere mit der niedrigsten Gesamtenergie (PDB-Eintrag: 1XSW). Die Konformere wurden entlang des Rückgrats mit MOLMOL^[28] ausgerichtet.

lente Geometrie und eine konvergente Faltung mit einem durchschnittlichen Rückgrat-RMSD zur mittleren Struktur von 0.81 Å (Tabelle 2 in den Hintergrundinformationen). Strukturen mit einer anderen Faltung weisen signifikant höhere Gesamtenergien auf (Hintergrundinformationen).

Der Rückgrat-RMSD (Reste 4–38) zwischen mittleren Festkörper- und Flüssigkeitsstrukturen (PDB-Eintrag: 2KTX, basierend auf ^1H -NMR-Spektroskopie)^[23] beträgt 1.9 Å. Festkörper- und Flüssigkeits-NMR-Strukturen werden durch die gleiche charakteristische α/β -Faltung beschrieben. Weitere Indizien für die Richtigkeit der ermittelten Festkörper-NMR-Struktur kommen von einer PRO-CHECK-NMR-Analyse (siehe Tabelle 2 in den Hintergrundinformationen), die 81 % aller Reste in bevorzugten Berei-

chen der Ramachandran-Auflastung ausweist. Außerdem wurden CHHC- und zusätzlich aufgenommene NHHC-2D-Spektren,^[19] die nicht nur tertiäre Kontakte liefern, sondern auch die Rückgratkonformation widerspiegeln,^[18,19] zurückgerechnet. Diese Resultate demonstrieren die allgemeine Gültigkeit unseres vorgeschlagenen Konzepts.

Die Bestimmung der 3D-Struktur von voll oder teilweise unbeweglichen Biomolekülen wie Proteinfibrillen, Membranproteinen und ihren Liganden kann eine erhebliche Herausforderung für konventionelle biophysikalische Methoden sein. Anders als bei etablierten Flüssig-NMR-Methoden wird die direkte Detektion (ähnlich zu NOESY)^[9] von Proton-Proton-Kontakten im Festkörper normalerweise durch die spektrale Dispersion und Linienbreite verhindert. Aus diesem Grunde muss für hochauflösende Festkörper-NMR-Anwendungen im Allgemeinen (¹³C,¹⁵N)-Korrelationspektroskopie verwendet werden, und die Sammlung einer ausreichenden Zahl von langreichweitigen Einschränkungen erforderte bisher eine hohe spektrale Auflösung oder die Untersuchung unterschiedlich isotope markierter Proben. Wir haben gezeigt, dass es möglich ist, eine 3D-Molekülstruktur mit einer einzigen, gleichförmig isotope markierten Probe in der festen Phase zu bestimmen. Unser Ansatz beruht auf dem Codieren von kleinen (¹H,¹H)-Abständen in hochaufgelösten (¹³C,¹⁵N)-Evolutions- und Detektionsdimensionen und nutzt die hohe Empfindlichkeit von Festkörper-NMR-spektroskopisch detektierten chemischen Verschiebungen auf die Proteinrückgratkonformation.

Die allgemeine Anwendbarkeit des hier diskutierten Konzepts und die Genauigkeit der bestimmten Strukturen ist – in Analogie zu NOESY-Experimenten an löslichen Molekülen – im Wesentlichen durch die spektrale Auflösung bestimmt. Da Proton-Proton-Korrelationen indirekt detektiert werden, ist die Sensitivität der N/CHHC-Experimente niedriger als die von herkömmlichen (¹³C,¹⁵N)-Korrelationsexperimenten. Falls dynamische oder statische Unordnung es nicht verhindert, kann die Genauigkeit der abgeleiteten Strukturen durch Verwendung intraresidualer Einschränkungen, durch Anwendung dreidimensionaler NMR-Spektroskopie^[24] oder durch Erhöhung der strukturellen Homogenität der Probe verbessert werden. Im Falle von KTX könnten solche Bedingungen durch die Präparation von Mikrokristallen oder durch Komplexbildung mit dem KcsA-Kv1.3-Kaliumkanal^[27] erreicht werden.

Das Beschränken der Mischzeit in den N/CHHC-Experimenten auf das Anfangsregime erhöht nicht nur die Verlässlichkeit der detektierten Abstandseinschränkungen, sondern vermindert auch spektrale Überlappung. NMR-Daten, die mit längeren Mischzeiten erhalten wurden, können in die strukturelle Analyse eingebunden werden und die Zahl der Proton-Proton-Abstandseinschränkungen erhöhen, wenn auch mit verminderter Genauigkeit. Im Falle von KTX war zweidimensionale Spektroskopie ausreichend, um die 3D-Konformation mithilfe von Torsionswinkelschränkungen, Proton-Proton-Abstandseinschränkungen und drei Disulfidbrücken zu bestimmen. Zusätzliche Strukturrechnungen (ohne Einbeziehung der Disulfidbrücken) zeigen, dass letztere Parameter nicht notwendig für die allgemeine Anwendbarkeit des hier diskutierten Konzepts sind.

Der vorgestellte Ansatz eignet sich auch zur Untersuchung nichtpeptidischer Biomoleküle. Hier könnte, ebenfalls in einer einzigen gleichförmig isotope markierten Probe, eine Kombination aus (¹H,¹H)- und selektiven (¹³C,¹³C)-Abstandseinschränkungen gemessen werden. Wie bei KTX, das Kv-Kanäle mit hoher Affinität blockiert, ist es auch möglich, Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen, die von großer pharmakologischer Bedeutung sind, direkt zu untersuchen. Darüber hinaus kann die Methode zur strukturellen Untersuchung von Membranproteinen und Proteinfibrillen verwendet werden. Je nach untersuchtem Molekül lässt sich der Ansatz mit anderen Festkörper-NMR-Methoden kombinieren. Bei Membranproteinen könnte man z.B. zusätzliche strukturelle Einschränkungen durch makroskopisch orientierte Proben erlangen. Eine Anwendung bei größeren (Membran-)Proteinen würde durch blockartige^[7,25] oder modulare^[26] Isotopenmarkierungen vereinfacht werden.

Eingegangen am 4. November 2004,
veränderte Fassung am 20. Dezember 2004
Online veröffentlicht am 2. März 2005

Stichwörter: Isotopenmarkierung · Kalitoxin · Magischer Winkel · NMR-Spektroskopie · Proteinstrukturen

- [1] T. A. Cross, S. J. Opella, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1994**, *4*, 574–581.
- [2] R. G. Griffin, *Nat. Struct. Biol.* **1998**, *5*, 508–512.
- [3] K. Nomura, K. Takegoshi, T. Terao, K. Uchida, M. Kainosho, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 4064–4065.
- [4] C. M. Rienstra, L. Tucker-Kellogg, C. P. Jaroniec, M. Hohwy, B. Reif, M. T. McMahon, B. Tidor, T. Lozano-Perez, R. G. Griffin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 10260–10265.
- [5] S. J. Opella, F. M. Marassi, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 3587–3606.
- [6] A. T. Petkova, Y. Ishii, J. J. Balbach, O. N. Antzutkin, R. D. Leapman, F. Delaglio, R. Tycko, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 16742–16747; C. P. Jaroniec, C. E. MacPhee, V. S. Bajaj, M. T. McMahon, C. M. Dobson, R. G. Griffin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 711–716.
- [7] F. Castellani, B. van Rossum, A. Diehl, M. Schubert, K. Rehbein, H. Oschkinat, *Nature* **2002**, *420*, 98–102.
- [8] E. R. Andrew, A. Bradbury, R. G. Eades, *Nature* **1958**, *182*, 1659.
- [9] K. Wüthrich, *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, Wiley Interscience, New York, **1986**.
- [10] X. L. Wu, S. M. Zhang, X. W. Wu, *Phys. Rev. B* **1988**, *37*, 9827–9829.
- [11] M. Crest, G. Jacquet, M. Gola, H. Zerrouk, A. Benslimane, H. Rochat, P. Mansuelle, M. F. Martin-Eauclaire, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 1640–1647.
- [12] S. Grissmer, A. N. Nguyen, J. Aiyar, D. C. Hanson, R. J. Mather, G. A. Gutman, M. J. Karmilowicz, D. D. Auperin, K. G. Chandy, *Mol. Pharmacol.* **1994**, *45*, 1227–1234.
- [13] N. Bloembergen, *Physica* **1949**, *15*, 386–426.
- [14] H. Saito, *Magn. Reson. Chem.* **1986**, *24*, 835–852.
- [15] S. Luca, D. V. Filippov, J. H. van Boom, H. Oschkinat, H. J. M. de Groot, M. Baldus, *J. Biomol. NMR* **2001**, *20*, 325–331.
- [16] S. Luca, J. F. White, A. K. Sohal, D. V. Filippov, J. H. van Boom, R. Grissammer, M. Baldus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 10706–10711.
- [17] G. Cornilescu, F. Delaglio, A. Bax, *J. Biomol. NMR* **1999**, *13*, 289–302.
- [18] A. Lange, S. Luca, M. Baldus, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9704–9705.

- [19] A. Lange, K. Seidel, L. Verdier, S. Luca, M. Baldus, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12640–12648.
- [20] M. Nilges, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1996**, *6*, 617–623.
- [21] A. T. Brunger, P. D. Adams, G. M. Clore, W. L. DeLano, P. Gros, R. W. Grosse-Kunstleve, J. S. Jiang, J. Kuszewski, M. Nilges, N. S. Pannu, R. J. Read, L. M. Rice, T. Simonson, G. L. Warren, *Acta Crystallogr. Sect. D* **1998**, *54*, 905–921.
- [22] C. M. Fletcher, D. N. M. Jones, R. Diamond, D. Neuhaus, *J. Biomol. NMR* **1996**, *8*, 292–310.
- [23] M. Gairi, R. Romi, I. Fernandez, H. Rochat, M. F. Martin-Eauclaire, J. Van Rietschoten, M. Pons, E. Giralt, *J. Pept. Sci.* **1997**, *3*, 314–319.
- [24] H. Heise, K. Seidel, M. Etzkorn, S. Becker, M. Baldus, *J. Magn. Reson.* **2005**, *173*, 64–74.
- [25] D. M. LeMaster, D. M. Kushlan, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9255–9264.
- [26] A. R. Pickford, I. D. Campbell, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 3557–3565.
- [27] C. Legros, V. Pollmann, H. G. Knaus, A. M. Farrell, H. Darbon, P. E. Bougis, M. F. Martin-Eauclaire, O. Pongs, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 16918–16924.
- [28] R. Koradi, M. Billeter, K. Wüthrich, *J. Mol. Graphics* **1996**, *14*, 51–60.