

NMR-spektroskopische Messungen an einem Megadalton-Proteinkomplex

Burkhard Luy*

Stichwörter:

Biomakromoleküle · Moleküldynamik · NMR-Spektroskopie · Proteinstrukturen · Strukturbioologie

Vor einem Jahrzehnt wurde die maximale Größe der mit NMR-Spektroskopie zugänglichen biologischen Makromoleküle mit etwa 30 kDa angegeben, eine Größenbeschränkung, die seitdem dank vielzähliger Innovationen stetig zu höheren Werten verschoben wurde. Vor kurzem nun stellten Sprangers und Kay quantitative NMR-Relaxationsstudien an einem 670 kDa schweren 20S-Komplex des Proteasoms vor, bei dem sie auch dessen Bindungsstelle im 1.1-MDa-Komplex mit dem 11S-Aktivatorprotein identifizierten.^[1] Damit beschrieben sie nicht nur den größten je mithilfe hochauflösender NMR-Spektroskopie vermessenen Komplex, sondern erhielten auch Hinweise auf die Funktion der zentralen molekularen Maschinen, die für die Entsorgung von fehlerhaften und falsch gefalteten Proteinen zuständig sind: Eine Vielzahl von Aminosäureresten an der Außenseite des Komplexes zwischen einzelnen α -Untereinheiten zeigt eine sehr schnelle Dynamik, und auf der Innenseite des α -Rings konnte eine langsame, anscheinend konzertierte Bewegung festgestellt werden, die wahrscheinlich den Transport der beschädigten Proteine ins Komplexzentrum erleichtert (Abbildung 1).^[1] Zum Gelingen dieser Arbeit trug die Anwendung einer ganzen Reihe

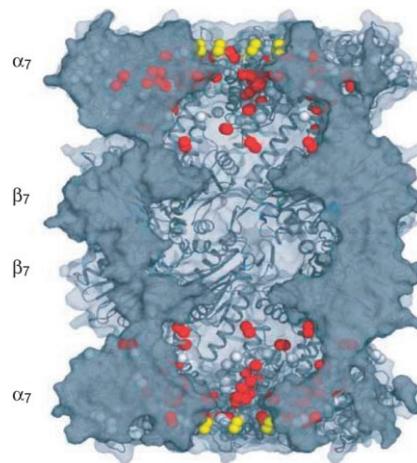


Abbildung 1. Struktur des 20S-Komplexes des Proteasoms. Methylgruppen mit langsamer Dynamik sind in Rot dargestellt, Gelb kennzeichnet Methylgruppen am hoch flexiblen N-Terminus, der wahrscheinlich als primitiver Abschluss für den Innenraum dient.

von relativ neuen Techniken bei, die hier kurz beschrieben werden sollen.

Abgesehen von der stetigen Verbesserung der NMR-Spektrometer bilden vier Eckpunkte die Basis für das Aminosäure-spezifische Studium makromolekularer Komplexe: 1) die Anwendung von Methyl-TROSY-Pulssequenz-Techniken, 2) die auf diese Experimente abgestimmten Isotopenmarkierungen, 3) eine schrittweise Strategie zur Zuordnung der Methylgruppen sowie 4) zuverlässige Methoden zur Messung von Relaxationsgeschwindigkeiten, die schließlich die Moleküldynamik charakterisieren.

Die entscheidende Technik, die die Aufnahme von NMR-Spektren an sehr großen Molekülen ermöglicht hat, ist das von Pervushin et al. entwickelte

TROSY (Transverse Relaxation Optimized Spectroscopy).^[2] TROSY basiert auf dem Effekt, dass sich durch kreuzkorrelierte Relaxation in bestimmten Spianordnungen einzelne Relaxationsanteile gegenseitig aufheben, woraus sich relativ scharfe Signale ergeben. Auf diesem Weg lässt sich für große Makromoleküle das Problem der geringen Signalintensität sowie der starken Überlagerung einzelner Signale, die sonst die Interpretation von NMR-Spektren verhindern, weitestgehend lösen. TROSY wurde ursprünglich zur Detektion von Amidprotonen in Proteinen entwickelt^[2] und hat so bereits die Identifizierung konformativer Veränderungen des freien Chaperonins GroES im Vergleich zu GroES im 870-kDa-Komplex mit GroEL ermöglicht.^[3] In der Zwischenzeit sind mehrere auf dem TROSY-Prinzip beruhende Pulssequenzen mit noch höherer Signalintensität entwickelt worden, wie etwa CRIFT,^[4] CRINEPT,^[5] CROP^[6] und PC-SPI.^[7]

Die Gruppe um Kay schließlich hat die Methode zum so genannten Methyl-TROSY erweitert, bei dem die vorteilhaften Eigenschaften von Methylgruppen in HMQC-Experimenten genutzt werden.^[8] Die Signalintensität der drei chemisch äquivalenten Methylprotonen ist natürlich dreimal so groß wie die Intensität von Amidprotonen, und ihre schnelle Rotation zusammen mit kreuzkorrelierten Relaxationseffekten der Methyl-Kohlenstoffkerne führen zu derart schmalen Linienbreiten, dass qualitativ hochwertige Spektren am 20S-Proteasom-Komplex innerhalb von 90 Minuten aufgenommen werden können (Abbildung 2a).^[1]

[*] Dr. B. Luy

Department Chemie, LS OC II
Technische Universität München
Lichtenbergstraße 4
85747 Garching (Deutschland)
Fax: (+49) 89-2891-3210
E-Mail: burkhard.luy@ch.tum.de
Homepage: <http://www.org.ch.tum.de/people/bulu>

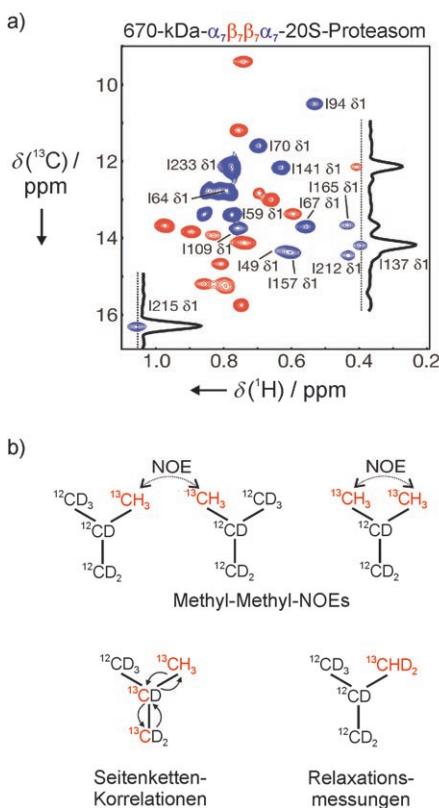


Abbildung 2. a) HMQC-basierte Methyl-TROSY-Experimente des 670-kDa-20S-Proteasom-Komplexes resultieren in Spektren mit guter Qualität (Kreuzsignale für die α -Untereinheit in Blau, für die β -Untereinheit in Rot). b) Hochspezifische Isotopenmarkierung hydrophober Aminosäurereste wie Leucin spielen eine wichtige Rolle in ^{13}C - ^{13}C -Korrelationsexperimenten, intra- und interresidualen NOE-SY- und ^{13}C - oder Deuterium-basierten Relaxationsexperimenten; NOE: Kern-Overhauser-Effekt.

Der Erfolg des Methyl-TROSY ist eng mit der Anwendung hochspezialisierter Isotopenmarkierungstechniken verknüpft.^[9] Mit Ausnahme von ausgewählten nichtdeuterierten und ^{13}C -markierten Methylgruppen wurde der Proteasom-Komplex in allen Proben vollständig deuteriert. Die Kohlenstoffkerne der Seitenketten von Leucin, Isoleucin und Valin wurden abhängig vom geplanten Experiment entweder ebenfalls ^{13}C -markiert oder in natürlicher Isotopenhäufigkeit belassen (Abbildung 2 b). Weiterhin wurden zur Messung von Abständen über NOE-Korrelationen Proben hergestellt, bei denen sowohl beide als auch nur einzelne Methylgruppen der hydrophoben Aminosäuren nichtdeuteriert und ^{13}C -markiert vorliegen. Zur Messung von Deuterium-

und ^{13}C -Relaxationsgeschwindigkeiten wurden schließlich einzelne $^{13}\text{CHD}_2$ -Gruppen eingeführt. Die spezifischen Markierungen wurden dabei jeweils biochemisch durch die Fütterung von *E. coli* mit dem entsprechend isotopenmarkierten α -Ketobutyrat (für Ile) und α -Ketoisovalerat (für Leu, Val) in ansonsten voll deuterierten Wachstumsmedien erreicht. Der hohe Deuterierungsgrad ist unverzichtbar bei NMRspektroskopischen Messungen an sehr großen Molekülen, weil so die dipolare Relaxation als Hauptursache für die starke Linienverbreiterung entscheidend reduziert wird. Da zudem Spin-diffusion zwischen den Methylgruppen als einziger Protonenquelle quasi vollständig vernachlässigt werden kann, ermöglicht dies sogar die NOE-Messung von Methyl-Methyl-Abständen bis zu 8 Å. Hochspezialisierte und optimierte Isotopenmarkierungsmuster mit einem hohen Deuterierungsgrad sind nicht auf hydrophobe Aminosäuren beschränkt, wie kürzlich Kainosho et al. mit der Stereo-Array-Isotope-Labeling(SAIL)-Strategie nachwiesen.^[10]

Trotz Methyl-TROSY-Experimenten und der Möglichkeit zur Messung von Methyl-Methyl-Abständen bleibt die Zuordnung von Kreuzsignalen zu spezifischen Aminosäureresten anspruchsvoll. Für die erfolgreiche Zuordnung des 670-kDa-Komplexes waren drei Voraussetzungen erforderlich: seine hohe Symmetrie, die die Aufteilung in kleinere Untereinheiten ermöglichte, das Vorhandensein einer Kristallstruktur des Komplexes^[11] und die Identifizierung einzelner Aminosäuren durch Punktmutationen.

Der 20S-Proteasom-Komplex besteht aus je 14 identischen α - und β -Untereinheiten, die jeweils in Ringen mit siebenfacher Symmetrie zu einem $\alpha_7\beta_7\alpha_7$ -System angeordnet sind. Dieser Komplex wurde zunächst in den 360 kDa schweren Doppelring $\alpha_7\alpha_7$ zerlegt, der in Abwesenheit von β -Untereinheiten automatisch entsteht. Dieser Komplex wurde durch Sequenzmutationen weiter auf eine monomere α -Untereinheit mit einem Gewicht von 21 kDa heruntergebrochen, von der mithilfe von Standard-NMR-Tripelresonanzexperimenten eine hochaufgelöste dreidimensionale Struktur bestimmt werden konnte. Mit der eindeu-

tigen Identifikation aller Methylgruppen in der monomeren α -Untereinheit und den aus der Kristallstruktur abgeleiteten Methyl-Methyl-Abständen konnten Sprangers und Kay zunächst die Zuordnung auf den $\alpha_7\alpha_7$ - und schließlich auf den $\alpha_7\beta_7\alpha_7$ -Komplex übertragen. Isolierte Methylgruppen ohne messbare NOE-Kontakte wurden in einem letzten Schritt durch Punktmutationen einzelner hydrophober Reste zugeordnet. Auf diesem Weg konnten 89 % der beinahe 100 Methylgruppen eindeutig identifiziert werden.

Die Zuordnung der Methylgruppen ermöglichte schließlich die Bestimmung sehr schneller (auf der Picosekunden-Zeitskala) und relativ langsamer (im Millisekunden-Bereich) Dynamiken im Komplex durch Relaxationsmessungen. ^{13}C - und Deuterium-Relaxationsgeschwindigkeiten, die charakteristisch für schnelle Bewegungen sind, wurden in ebenfalls in der Gruppe um Kay entwickelten Experimenten gemessen.^[12] Die gute Korrelation zwischen den beiden unabhängig voneinander abgeleiteten

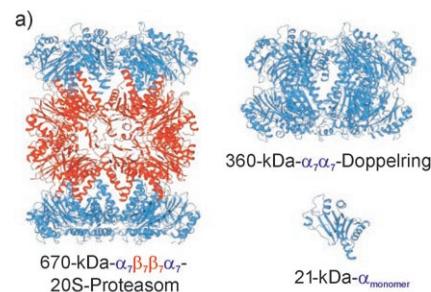


Abbildung 3. a) Die Zuordnung der Methylgruppen der α -Untereinheit des 670-kDa-Komplexes gelang durch Zerlegung in kleinere Substrukturen, ermöglicht durch die hochsymmetrische Anordnung des Komplexes. b) Die gute Korrelation der S^2 -Ordnungsparameter aus ^{13}C - und Deuterium-Relaxationsexperimenten demonstriert, mit welcher Genauigkeit quantitative Messungen bei diesem hohen Molekulargewicht möglich sind.

S^2 -Ordnungsparametern belegt eindrucksvoll, wie genau diese Dynamiken bestimmt werden können (Abbildung 3). Interessanterweise zeigen als hochdynamisch identifizierte Aminosäurereste auch erhöhte Temperaturfaktoren in den publizierten kristallographischen Daten, wobei jedoch nur eine sehr geringe Korrelation zwischen den B-Faktoren und den entsprechenden S^2 -Werten besteht.^[1] Mithilfe von Relaxations-Dispersions-Experimenten zur Messung von ^1H , ^{13}C -Multiquantens-Dispersionsprofilen^[13] konnten schließlich auch langsame Bewegungen identifiziert werden; diese Daten konnten mit einem einfachen Zwei-Zustände-Modell simuliert werden, demzufolge ein einzelner globaler Prozess als Ursache für die gemessene Bewegung sehr wahrscheinlich ist (Abbildung 1).

Mit den im vergangenen Jahrzehnt entwickelten NMR-Techniken und der Verfügbarkeit der jeweiligen Kristall-

strukturen sollte die aminosäurespezifische Messung von Dynamiken an makromolekularen Komplexen nahezu beliebiger Größe in Lösung möglich sein. Die bereits veröffentlichten wie auch die zukünftigen Befunde werden wichtige Beiträge zum Verständnis der Funktionsweise der komplexen molekularen Maschinen in biologischen Systemen liefern.

-
- [1] R. Sprangers, L. E. Kay, *Nature* **2007**, *445*, 618–622.
 - [2] K. Pervushin, R. Riek, G. Wider, K. Wüthrich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 12366–12371.
 - [3] J. Fiaux, E. B. Bertelsen, A. L. Horwich, K. Wüthrich, *Nature* **2002**, *418*, 207–211.
 - [4] R. Brüschweiler, R. R. Ernst, *Chem. Phys.* **1992**, *96*, 1758–1766.
 - [5] R. Riek, G. Wider, K. Pervushin, K. Wüthrich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 4918–4923.
 - [6] a) N. Khaneja, B. Luy, S. J. Glaser, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 13162–13166; b) N. Khaneja, J. S. Li, C. Kehlet, B. Luy, S. J. Glaser, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 14742–14747.
 - [7] K. Bromek, D. Lee, R. Hauhart, M. Krych-Goldberg, J. P. Atkinson, P. N. Barlow, K. Pervushin, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 405–411.
 - [8] V. Tugarinov, P. M. Hwang, J. E. Ollershaw, L. E. Kay, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 10420–10428.
 - [9] V. Tugarinov, L. E. Kay, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13868–13878.
 - [10] M. Kainoshio, T. Torizawa, Y. Iwashita, T. Terauchi, A. M. Ono, P. Gühtert, *Nature* **2006**, *440*, 52–57.
 - [11] J. Löwe, D. Stock, B. Jap, P. Zwickl, W. Baumeister, R. Huber, *Science* **1995**, *268*, 533–539.
 - [12] a) V. Tugarinov, J. E. Ollershaw, L. E. Kay, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 8214–8255; b) V. Tugarinov, L. E. Kay, *Biochemistry* **2005**, *44*, 15970–15977.
 - [13] D. M. Korzhnev, K. Kloiber, V. Kanelis, V. Tugarinov, L. E. Kay, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 3964–3973.