

Die native Konformation des N-Terminus des humanen spannungs-abhängigen Anionenkanals VDAC1**

Robert Schneider, Manuel Etzkorn, Karin Giller, Venita Daebel, Jörg Eisfeld, Markus Zweckstetter, Christian Griesinger, Stefan Becker und Adam Lange*

Der spannungsabhängige Anionenkanal (VDAC) ist ein Protein der äußeren Mitochondrienmembran und stellt dort den wichtigsten Transportweg für ADP, ATP und andere Metaboliten dar. Zudem wird ihm eine bedeutende Rolle bei der mitochondrialen Apoptose zugeschrieben.^[1,2] Vor kurzem wurde die dreidimensionale Struktur der Isoform VDAC1 von drei Forschungsgruppen unabhängig voneinander durch verschiedene experimentelle Ansätze aufgeklärt.^[3-5] Alle drei Strukturen zeigen eine zuvor unbekannte, 19-strängige β -Fass-Architektur mit einer N-terminalen α -Helix, die sich horizontal innerhalb der Pore befindet. Während sich die drei Strukturen im Bereich des β -Fasses stark ähneln, weisen sie deutliche Unterschiede in der funktionell wichtigen N-terminalen Region auf (Abbildung 1a). Im Allgemeinen wird davon ausgegangen, dass der N-Terminus am spannungsabhängigen Öffnen und Schließen des Kanals beteiligt ist und in Abhängigkeit von äußeren Faktoren verschiedene Konformationen annehmen kann.^[1]

Auf Grundlage dieser Strukturdaten wurden verschiedene Modelle für das spannungsabhängige Schalten des Kanals vorgeschlagen. Ujwal et al. deuten an, dass sich die komplette Helix in die Mitte der Pore bewegen und somit den Kanal schließen könnte.^[3] Da die Aminosäurereste 11–20 in Lösungs-NMR-Experimenten schwierig zu beobachten sind,^[4] schlagen Hiller und Wagner andererseits vor, dass in diesem Bereich Konformationsaustausch vorliegen könnte. Bewegungen in diesem Teil des N-Terminus allein sollen daher möglicherweise das Schaltverhalten des Kanals erklären

können.^[6] Alternativ dazu wurde das spannungsabhängige Schalten auf der Basis von elektronenmikroskopischen und elektrophysiologischen Daten als größere Konformationsänderung beschrieben, die auch im Bereich des β -Fasses stattfindet.^[7-9]

Zudem widersprechen einige der bisherigen biophysikalischen Befunde allen drei publizierten Strukturen, weshalb die Frage aufgeworfen wurde, ob diese tatsächlich die native Konformation in einer natürlichen Membranumgebung darstellen.^[7] Besonders die Entdeckung, dass N-terminal verkürzte VDAC1-Mutanten niedrigere Leitfähigkeiten aufweisen als der vollständige Kanal,^[10-12] wurde dahingehend interpretiert, dass sich die N-terminalen Helix nicht innerhalb der Pore befinden, sondern einen Teil der Wand des β -Fasses bilden könnte.^[7]

Festkörper-NMR-Spektroskopie hat sich als eine sehr nützliche Methode für Strukturuntersuchungen von Membranproteinen in einer natürlichen Lipidumgebung erwiesen (ein aktueller Übersichtsartikel findet sich in Lit. [13]). Wir haben daher funktionellen humanen VDAC1 in Lipiddoppelschichten mithilfe von Festkörper-NMR-Spektroskopie untersucht, wobei wir uns auf die Konformation des N-Terminus konzentriert haben. Die Funktionalität unserer hVDAC1-Präparation wurde durch elektrophysiologische Messungen in Lipiddoppelschichten bestätigt (siehe Abbildung S1 in den Hintergrundinformationen). Abbildung 1b zeigt ein protonengetriebenes ^{13}C - ^{13}C -Spindiffusions-Korrelationsspektrum (PDSD) von uniform [^{13}C , ^{15}N]-isotopenmarkiertem, in Dimyristoylphosphatidylcholin(DMPC)-Liposomen rekonstituiertem hVDAC1. Es weist ausgezeichnete Auflösung und Empfindlichkeit auf. Eine Vorhersage der Ca -C β -Region dieses Spektrums auf Basis der Kristallstruktur von murinem VDAC1 (Abbildung S2 in den Hintergrundinformationen) stimmt sehr gut mit dem Spektrum überein und lässt darauf schließen, dass das 19-strängige β -Fass in Liposomen erhalten bleibt.

Mit einer Länge von 283 Aminosäuren ist VDAC1 eine Herausforderung für die Festkörper-NMR-Spektroskopie. Zur Identifizierung der N-terminalen Reste haben wir zusätzlich zur vollständig isotopenmarkierten Probe zwei verschiedene Isotopenmarkierungsmuster verwendet, eine (Lys, Trp, Tyr, Val)-revers markierte^[14] und eine (Ala, Asp, Leu, Val)-vorwärts markierte Proteinvariante. Des Weiteren haben wir eine N-terminalen hVDAC1-Deletionsmutante ($\Delta(1-20)$ -hVDAC1) untersucht. Abbildung 1c zeigt, wie eine Kombination der Befunde der unterschiedlichen Proben für die Signalzuordnung genutzt wurde.

Mit zahlreichen homo- und heteronuklearen Spektren der verschiedenen Proteinvarianten (siehe z. B. Abbildung S3 in

[*] Dr. R. Schneider, K. Giller, V. Daebel, Prof. Dr. M. Zweckstetter, Prof. Dr. C. Griesinger, Dr. S. Becker, Dr. A. Lange
Abteilung für NMR-basierte Strukturbioologie
Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie
Am Fassberg 11, 37077 Göttingen (Deutschland)
Fax: (+49) 551-201-2202
E-Mail: adla@nmr.mpibpc.mpg.de
Homepage: <http://www.mpibpc.mpg.de/research/ags/lange/>

Dr. M. Etzkorn
Department of Biological Chemistry and Molecular Pharmacology,
Harvard Medical School
240 Longwood Avenue, Boston, MA 02115 (USA)

Dr. J. Eisfeld
Inovation GmbH
Westerbreite 7, 49084 Osnabrück (Deutschland)

[**] Wir danken Gitta Angerstein für technische Unterstützung, Saskia Villinger für Diskussionen und Jean-Philippe Demers für Unterstützung bei Experimenten. Diese Arbeit wurde von der DFG (SFB 803, Projekt A4) und der Max-Planck-Gesellschaft gefördert. M.Z. wird durch ein Heisenberg-Stipendium gefördert (ZW 71/2-1, 3-1).

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200906241> zu finden.

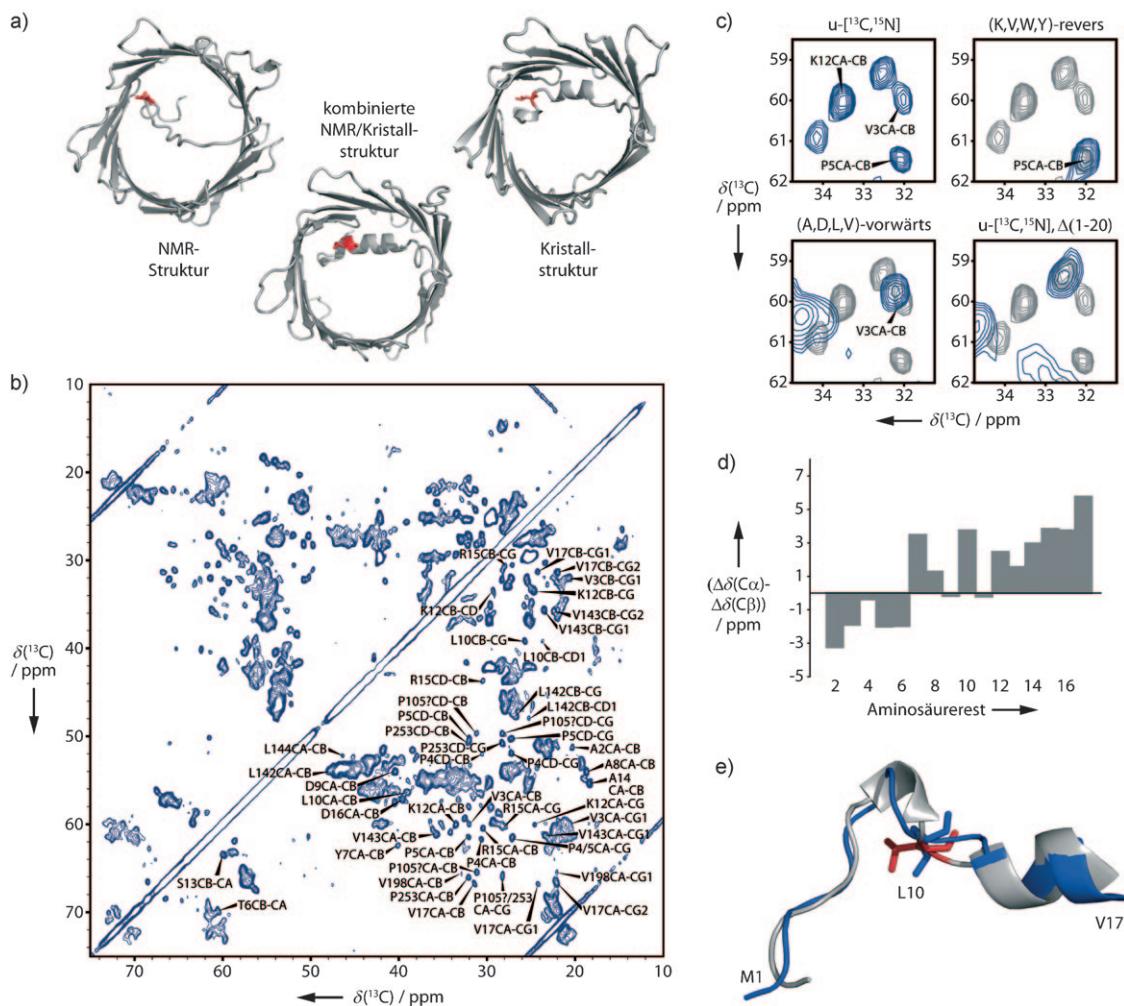


Abbildung 1. Zuordnung und Konformation des N-Terminus von hVDAC1 in Lipiddoppelschichten. a) Die drei bekannten VDAC1-Strukturen mit Leu10 (rot) in stabförmiger Darstellung veranschaulichen die unterschiedlichen Konformationen der N-terminalen Helix. Links: hVDAC1-NMR-Struktur (PDB: 2K4T); Mitte: kombinierte hVDAC1-NMR/Kristall-Struktur (PDB: 2J4K); rechts: mVDAC1-Kristallstruktur (PDB: 3EMN). b) ^{13}C - ^{13}C -PDSD-Spektrum (15 ms Mischzeit) von uniform ^{13}C , ^{15}N -markiertem hVDAC1 in Lipiddoppelschichten, aufgenommen an einem 850-MHz-Spektrometer, mit De-novo-Signalzuordnungen. c) Ausschnitte aus ^{13}C - ^{13}C -PDSD-Spektren von hVDAC1-Varianten mit verschiedenen Längen und Markierungsmustern (siehe Beschriftung oberhalb der Ausschnitte). Zum Vergleich sind die Signale der u -[^{13}C , ^{15}N]-hVDAC1-Variante in den anderen Ausschnitten grau abgebildet. Bei den letzten Präparationsschritten der in den unteren Ausschnitten abgebildeten hVDAC1-Varianten kamen höhere Zentrifugationsgeschwindigkeiten zur Anwendung. Dies führt zu Linienverbreiterung und einigen zusätzlichen Signalen aus Schleifenregionen des Proteins. d) ($\Delta\delta(\text{C}\alpha) - \Delta\delta(\text{C}\beta)$) / ppm für Reste 2–17. e) Aus Festkörper-NMRspektroskopischen Daten abgeleitetes Modell des N-Terminus von hVDAC1 (blau, Details siehe Hintergrundinformationen), überlagert mit der Kristallstruktur von mVDAC1 (PDB: 3EMN, grau/rot). Leu10 ist stabförmig dargestellt.

den Hintergrundinformationen) waren wir in der Lage, die Signale der Reste Ala2–Val17 *de novo* eindeutig sequenziell zuzuordnen (Abbildung S4 und Tabelle S1 in den Hintergrundinformationen). Bei Probentemperaturen zwischen +5 und +25 °C zeigen alle diese Reste in Spektren, die auf dipolarem Transfer beruhen, ausgeprägte, gut aufgelöste Kreuzsignale (Abbildungen S5 und S6 in den Hintergrundinformationen). Dies demonstriert, dass der N-Terminus von hVDAC1 in Liposomen eine wohldefinierte Konformation einnimmt und keine nennenswerte Dynamik auf der sub-ms-Zeitskala aufweist. Weder Verbreiterung noch Doppelung von Signalen aufgrund von Dynamik auf langsameren Zeitskalen wurden beobachtet. Zwar könnten andere, hoch-

dynamische Konformationen, die dipolar-basierten Experimenten nicht zugänglich sind, im Gleichgewicht vorliegen, allerdings sprechen unsere Daten klar gegen einen flexiblen N-Terminus, wie er von Hiller und Wagner^[6] postuliert wird. Des Weiteren zeigen vergleichende Untersuchungen für in DMPC-, DOPE- und DOPC-Liposomen (DOPE = Dioleoylphosphatidylethanolamin; DOPC = Dioleoylphosphatidylcholin) rekonstituierten hVDAC1, dass der N-Terminus in Abwesenheit eines Membranpotentials nicht von den resultierenden Veränderungen in Membrandicke und Lateraldruck beeinflusst wird (Abbildung S7 in den Hintergrundinformationen).

Sekundäre chemische Verschiebungen, die über die Sekundärstruktur Aufschluss geben,^[15] sind für hVDAC1 in Liposomen in Abbildung 1 d gezeigt. In Übereinstimmung mit den durch das Programm TALOS^[16] aus unseren Signalzuordnungen vorhergesagten Torsionswinkel des Peptidrückgrats belegen diese Verschiebungen, dass die Reste 7–8 und 12–17 eine helicale Konformation einnehmen, während Asp9, Leu10 und Gly11 einen Knick bilden und die Reste 2–6 in gestreckter Konformation vorliegen. Diese Befunde stimmen gut mit der Struktur von mVDAC1 im Kristall überein (PDB: 3EMN; Abbildung 1 e; Hintergrundinformationen: Tabellen S2, S3 und Methoden).

Trotz erheblicher Überlappung der Resonanzsignale in den Spektren war es uns möglich, Signale weiterer Reste in β -Strang- und Schleifen-Sekundärstrukturbereichen zuzuordnen (Tabelle S1 in den Hintergrundinformationen). Insbesondere konnten wir die Reste Leu142, Val143 und Leu144 im β -Strang 9 eindeutig zuordnen, da sie die einzigen sequenziellen Leu-Val-Paare in hVDAC1 bilden (Abbildung S8 in den Hintergrundinformationen). Bemerkenswerterweise bilden Val143 und Leu150 eine hydrophobe Region im Inneren des β -Fasses. Langreichweitige Korrelationen konnten identifiziert werden, die konsistent mit einem Kontakt zwischen dem Leu-Val-Leu-Motiv und der N-terminalen Helix sind (Leu10–Val143, Abbildung 2a). Ähnliche Kontakte wurden auch in der früheren NMR-Spektroskopiestudie beobachtet^[4] und sind in Einklang mit der Struktur von mVDAC1 im Kristall.

Signale, die dem Leu-Val-Leu-Motiv in β -Strang 9 zugeordnet wurden, werden stark vom Verkürzen des N-Terminus beeinflusst, wie Spektren von $\Delta(1-20)$ -hVDAC1 zeigen (Abbildung 2b). Dies bestätigt zusätzlich den Kontakt zwischen N-Terminus und β -Strang 9. Zudem lässt es darauf schließen, dass die Helix eine Rolle dabei spielt, das β -Fass intakt zu halten. Unsere Daten legen nahe, dass die Signale aus dem neunten β -Strang nicht ihre Position ändern, sondern verschwinden (Abbildung S8 in den Hintergrundinformationen). Dies wiederum lässt darauf schließen, dass eine Entfernung des N-Terminus zu einer deutlichen Zunahme der lokalen Plastizität des Moleküls führt.

Wir haben gezeigt, dass der N-Terminus von funktionellem hVDAC1 in einer Lipidumgebung eine wohldefinierte, rigide Konformation einnimmt, die mit der Struktur von mVDAC1 im Kristall in Einklang ist. Änderungen im β -Fass, wie wir sie bei fehlendem N-Terminus beobachtet haben, könnten erklären, weshalb die N-terminale Deletionsmutante von hVDAC1 eine geringere Leitfähigkeit aufweist als der vollständige Kanal.^[10–12] Weitere Experimente werden vonnöten sein, um die dabei auftretende Konformationsänderung genau zu charakterisieren. Da der N-Terminus aber eine Rolle bei der Stabilisierung des β -Fasses zu spielen scheint, könnte sein Fehlen zu einem verringerten Porendurchmesser führen. Die Vermutung liegt nahe, dass solche Konformationsänderungen auch beim spannungsinduzierten Schalten von VDAC1 eine Rolle spielen könnten, wie es frühere Modelle postuliert haben.^[7–9] Unsere Daten erbringen zum ersten Mal den strukturellen Nachweis, dass die Konformation des β -Fasses in der Tat vom N-Terminus beeinflusst werden kann.

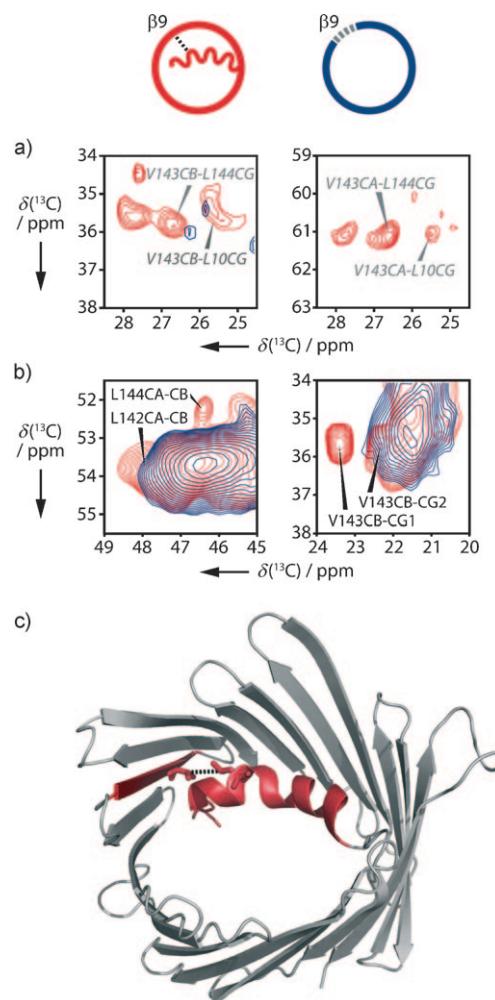


Abbildung 2. Vergleich von Spektren von Wildtyp (wt)-hVDAC1 (rot) und $\Delta(1-20)$ -hVDAC1 (blau). a) Überlagerte Ausschnitte aus ^{13}C - ^{13}C -PDSD-Spektren mit 300 ms Mischzeit von (Ala, Asp, Leu, Val)-vorwärts markierten Proben. Korrelationen, die für sequenzielle und langreichweitige Kontakte von Val143 sprechen, sind nur in wt-hVDAC1 sichtbar. Beschriftungen in grauen Kursivbuchstaben weisen auf mehrdeutige Zuordnungen hin. b) Überlagerte Ausschnitte aus ^{13}C - ^{13}C -DREAM- (links) und ^{13}C - ^{13}C -PDSD-Spektren (rechts, 15 ms Mischzeit) von uniform ^{13}C , ^{15}N -markierten Proben. Gezeigt sind Korrelationen innerhalb einzelner Aminosäurereste aus der hydrophoben Region um Val143, die in $\Delta(1-20)$ -hVDAC1-Spektren verschwinden. c) mVDAC1-Kristallstruktur (PDB: 3EMN). N-Terminus und β -Strang 9 sind rot dargestellt. Der hydrophobe Kontakt zwischen den Resten Leu10 und Val143 (stabförmig dargestellt) wird durch eine gepunktete Linie angedeutet.

Experimentelles

hVDAC1 wurde gemäß dem in Lit. [17] beschriebenen Verfahren exprimiert, rückgefaltet und aufgereinigt. Für Festkörper-NMRspektroskopische Messungen wurde das Protein in DMPC-, DOPC- oder DOPE-Liposomen in einem Protein/Lipid-Verhältnis von 1:50 (mol/mol) rekonstituiert. Festkörper-NMR-Experimente wurden an 3.2-mm- oder 4-mm-Triple-Resonanz- $(^{1}\text{H}, ^{13}\text{C}, ^{15}\text{N})$ -Probenköpfen für Rotation im magischen Winkel (MAS) bei statischen Magnetfeldern von 18.8 und 20.0 T durchgeführt (Bruker Biospin). Die Proben temperatur betrug bei ^{13}C - ^{13}C -Korrelationsexperimenten +5 °C sowie für ^{15}N - ^{13}C -Spektren +5 °C oder –15 °C. Die Dauer der ersten Kreuzpolarisation (CP) wurde bei ^{1}H - ^{13}C -Transfer auf 600 μs und bei ^{1}H - ^{15}N -Transfer auf 400 μs festgesetzt. Die Radiofrequenz-Feldstärke auf dem Protonenkanal betrug für 90°-Pulse und SPINAL64-Ent-

kopplung^[18] üblicherweise 83 kHz. Als ¹³C-¹³C-Mischsequenz wurde protonengetriebene Spindiffusion (PDSD) mit einer Dauer von 15, 150 oder 300 ms verwendet, um jeweils Korrelationen innerhalb einzelner Aminosäurereste, sequenzielle oder langreichweitige Korrelationen zu erhalten. Bei einem statischen Magnetfeld von 20.0 T wurde eine MAS-Frequenz von 10.6 kHz eingesetzt, außer bei PDSD mit 150 ms Mischzeit, wo die schwache Kopplungsbedingung^[19] (PDSD-WC) durch eine MAS-Frequenz von 13.28 kHz eingestellt wurde. ¹³C-¹³C-DREAM-Korrelationsspektren^[20] wurden bei 18 kHz MAS mit einer tangentialen Variation des Radiofrequenzfeldes von 2.5 ms Dauer aufgenommen. ¹⁵N-¹³C-Korrelationsexperimente enthielten SPECIFIC-CP-Transfers^[21] von 1.5 bis 3.5 ms Dauer. Um ¹³C-¹³C-Seitenkettenkorrelationen zu erhalten, wurde anschließend die homonukleare DARR-Mischsequenz^[22] (20–50 ms Dauer) verwendet.

Eingegangen am 5. November 2009
Online veröffentlicht am 5. Februar 2010

Stichwörter: Ionenkanäle · Membranproteine · NMR-Spektroskopie · Proteinstrukturen

-
- [1] M. Colombini, *Mol. Cell. Biochem.* **2004**, 256, 107.
 [2] S. Abu-Hamad, N. Arbel, D. Calo, L. Arzoine, A. Israelson, N. Keinan, R. Ben-Romano, O. Friedman, V. Shoshan-Barmatz, *J. Cell Sci.* **2009**, 122, 1906.
 [3] R. Ujwal, D. Cascio, J. P. Colletier, S. Faham, J. Zhang, L. Toro, P. P. Ping, J. Abramson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, 105, 17742.
 [4] S. Hiller, R. G. Garces, T. J. Malia, V. Y. Orekhov, M. Colombini, G. Wagner, *Science* **2008**, 321, 1206.
 [5] M. Bayrhuber, T. Meins, M. Habeck, S. Becker, K. Giller, S. Villinger, C. Vonrhein, C. Griesinger, M. Zweckstetter, K. Zeth, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, 105, 15370.
 [6] S. Hiller, G. Wagner, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2009**, 19, 396.
 [7] M. Colombini, *Trends Biochem. Sci.* **2009**, 34, 382.
 [8] J. Zimmerberg, V. A. Parsegian, *Nature* **1986**, 323, 36.
 [9] S. Peng, E. Blachly-Dyson, M. Forte, M. Colombini, *Biophys. J.* **1992**, 62, 123.
 [10] V. De Pinto, S. Reina, F. Guarino, A. Messina, *J. Bioenerg. Biomembr.* **2008**, 40, 139.
 [11] B. Popp, D. A. Court, R. Benz, W. Neupert, R. Lill, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 13593.
 [12] D. A. Koppel, K. W. Kinnally, P. Masters, M. Forte, E. Blachly-Dyson, C. A. Mannella, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 13794.
 [13] A. McDermott, *Annu. Rev. Biophys.* **2009**, 38, 385.
 [14] G. W. Vuister, S. J. Kim, C. Wu, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 9206.
 [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.
 [16] G. Cornilescu, F. Delaglio, A. Bax, *J. Biomol. NMR* **1999**, 13, 289.
 [17] H. Engelhardt, T. Meins, M. Poynor, V. Adams, S. Nussberger, W. Welte, K. Zeth, *J. Membr. Biol.* **2007**, 216, 93.
 [18] B. M. Fung, A. K. Khitri, K. Ermolaev, *J. Magn. Reson.* **2000**, 142, 97.
 [19] K. Seidel, A. Lange, S. Becker, C. E. Hughes, H. Heise, M. Baldus, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2004**, 6, 5090.
 [20] R. Verel, M. Ernst, B. H. Meier, *J. Magn. Reson.* **2001**, 150, 81.
 [21] M. Baldus, A. T. Petkova, J. Herzfeld, R. G. Griffin, *Mol. Phys.* **1998**, 95, 1197.
 [22] K. Takegoshi, S. Nakamura, T. Terao, *Chem. Phys. Lett.* **2001**, 344, 631.
-