

# Festkörper-NMR-Spektroskopie mit Protonendetektion an fibrillären Proteinen und Membranproteinen\*\*

Rasmus Linser, Muralidhar Dasari, Matthias Hiller, Victoria Higman, Uwe Fink, Juan-Miguel Lopez del Amo, Stefan Markovic, Liselotte Handel, Brigitte Kessler, Peter Schmieder, Dieter Oesterhelt, Hartmut Oschkinat\* und Bernd Reif\*

Strukturinformationen sind der Schlüssel zum Verständnis von biologischen Prozessen. unlösliche Proteine wie Membranproteine und Amyloidfibrillen bilden eine große Klasse von Proteinen, die in der Proteindatenbank (PDB) unterrepräsentiert ist. Momentan beziehen sich lediglich 7 % aller Einträge der PDB (Gesamtzahl aller Einträge: 66161; <http://www.rcsb.org>, November 2010) auf entweder ein Membranprotein (4994 Einträge) oder eine Amyloidfibrillenstruktur (67 Einträge). Dadurch, dass viele Medikamente an Membranproteinen angreifen, die z. B. eine Rolle bei der Signaltransduktion spielen,<sup>[1]</sup> sind Strukturinformationen äußerst wichtig, um ein besseres Verständnis der zugrundeliegenden biochemischen Mechanismen zu erlangen. Im Unterschied zur Röntgenkristallographie und zur Lösungs-NMR-Spektroskopie bietet die Festkörper-NMR-Spektroskopie die Möglichkeit einer Betrachtung von Membranproteinen in ihrer nativen Umgebung. Es ist offensichtlich, dass die Li-

pidumgebung einen Einfluss auf ihre Funktion und Struktur haben kann.<sup>[2]</sup> Jedoch werden röntgenkristallographische Strukturen in kubischen Lipidphasen nicht ohne Weiteres erhalten.<sup>[3]</sup> Die Elektronenmikroskopie ist in der Lage, Bilder in nativer Umgebung zu liefern, dabei wird aber nur eine vergleichsweise niedrige Auflösung erreicht. Auch wenn „Nano-disc“-Präparationen die Aufnahme von Lösungs-NMR-Spektren in einem nativ-ähnlichen Kontext ermöglichen,<sup>[4,5]</sup> ist das Molekulargewicht der resultierenden Komplexe bereits im kritischen Bereich für herkömmliche Zuordnungsexperimente.

Durch Festkörper-NMR-Experimente mit Rotation im magischen Winkel (magic angle spinning, MAS) konnten bisher nur wenige isotopenmarkierte Membranproteine charakterisiert werden, so z. B. Proteorhodopsin,<sup>[6]</sup> VDAC<sup>[7]</sup> und Phospholamban.<sup>[8,9]</sup> Fibrilläre Proteine, die eine entscheidende Rolle bei vielen neurologischen Krankheiten wie der Parkinson- oder Alzheimer-Krankheit spielen, sind für herkömmliche Methoden zur Strukturbestimmung nicht zugänglich und konnten bislang nur indirekt analysiert werden, z. B. durch Lösungs-NMR-Spektroskopie unter Verwendung von H-D-Austausch.<sup>[10]</sup> Vor kurzem ist die Struktur der Priondonäne von HET-s gelöst worden.<sup>[11,12]</sup> Interessanterweise ist, obwohl hoch aufgelöste Spektren bestimmter Systeme wie HET-s und des humanen Prionproteins<sup>[13]</sup> zugänglich sind, die spektrale Auflösung im Fall von Amyloidfibrillen aus dem Alzheimer-β-Amyloid-Peptid<sup>[14,15]</sup> und α-Synuklein<sup>[16,17]</sup> begrenzt.

Im Unterschied zur Lösungs-NMR-Spektroskopie sind die Lebensdauern der Kohärenzen im Festzustand nicht von der molekularen Taumelbewegung abhängig, weshalb die Technik theoretisch bei Proteinen mit höherem Molekulargewicht anwendbar ist. Ganz offensichtlich können breite NMR-Resonanzen auf eine Probenheterogenität zurückgehen. Doch die Präparation von biologischen Proben wird zunehmend zur Routine und ist, nach gründlicher Optimierung, nicht der Hauptfaktor, der letztlich die Spektrenqualität bestimmt. Zusätzliche Beiträge zur Resonanzlinienbreite ergeben sich aus den anwendbaren Heterokern-Entkopplungsfeldern und Temperaturschwankungen innerhalb des Probenvolumens oder im Lauf des Experiments. Durch Entkopplung induzierte Wärme ist signifikant für protonierte Proben, selbst dann, wenn Probenköpfe verwendet werden, mit denen elektrische Felder im Probenvolumen ausgeschlossen werden sollen.<sup>[18]</sup> Erhitzung kann zudem die Stabilität der Probe und dadurch die spektrale Auflösung beeinträchtigen. Diese Schwierigkeiten können umgangen werden,

[\*] Dr. R. Linser,<sup>[+]</sup> M. Dasari, Dr. M. Hiller, Dr. V. Higman,<sup>[#]</sup> U. Fink, Dr. J.-M. Lopez del Amo, S. Markovic, L. Handel, Dr. P. Schmieder, Prof. Dr. H. Oschkinat, Prof. Dr. B. Reif

Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP)  
Robert-Rössle-Straße 10, 13125 Berlin-Buch (Deutschland)  
E-Mail: oschkinat@fmp-berlin.de

reif@tum.de

M. Dasari, Dr. J.-M. Lopez del Amo, Prof. Dr. B. Reif  
Munich Center for Integrated Protein Science (CIPSM)  
am Department Chemie, Technische Universität München (TUM)  
Lichtenbergstraße 4, 85747 Garching (Deutschland)

M. Dasari, Dr. J.-M. Lopez del Amo, Prof. Dr. B. Reif  
Helmholtz-Zentrum München (HMGU)  
Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt  
Ingolstädter Landstraße 1, 85764 Neuherberg (Deutschland)

B. Kessler, Prof. Dr. D. Oesterhelt  
Max-Planck-Institut für Biochemie  
Am Klopferspitz 18, 82152 Martinsried (Deutschland)

[+] Aktuelle Adresse:  
University of New South Wales (UNSW), Analytical Centre  
Chemical Sciences Building, NSW 2052 (Australien)

[#] Aktuelle Adresse:  
Biomembrane Structure Unit, Department of Biochemistry  
University of Oxford, Oxford OX1 3QU (Großbritannien)

[\*\*] Wir danken Clemens Glaubitz, Frankfurt/Main, für Messzeit am 850-MHz-Spektrometer. Dieses Projekt wurde durch die Leibniz-Gemeinschaft und die DFG (Re1435, SFB449, SFB740) unterstützt. R.L. ist als Kekulé-Stipendiat vom Verband der Chemischen Industrie (VCI) finanziell unterstützt worden.

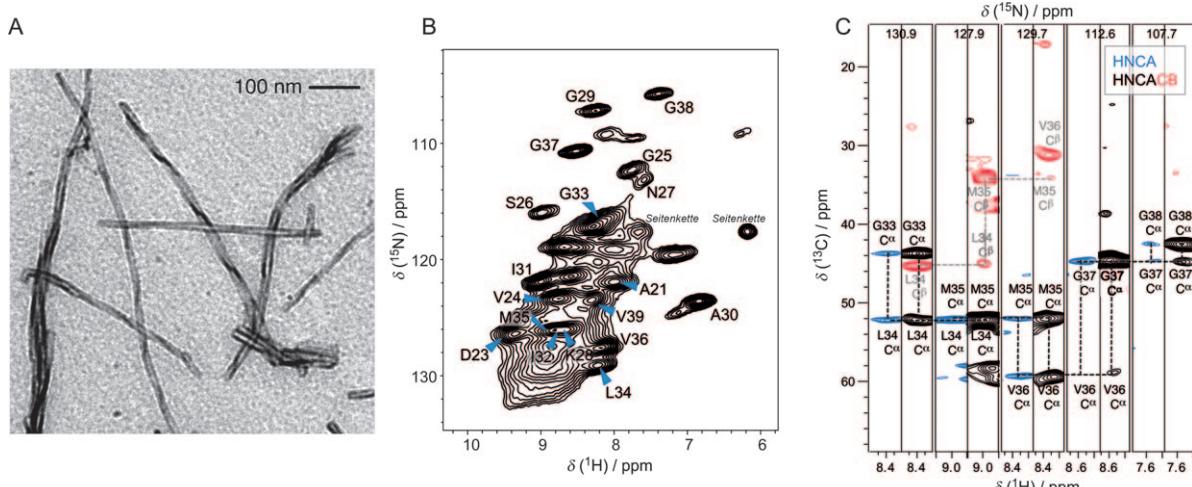
 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201008244> zu finden.

wenn vollständig deuterierte Proteine verwendet werden.<sup>[19–21]</sup> Die Eliminierung eines Großteils der starken  $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -Dipolwechselwirkungen erhält nur die schwachen, gewollten Kopplungen. Einer potenziellen Linienverbreiterung durch Mobilität auf der ns- bis  $\mu$ -Zeitskala kann durch Verwendung von TROSY-artigen Experimenten im Festkörper entgegengewirkt werden.<sup>[22]</sup> Die Verfügbarkeit eines zusätzlichen Kerns für die Dispersion chemischer Verschiebungen erhöht die Verlässlichkeit der Resonanzzuordnung<sup>[23]</sup> und ermöglicht die Bestimmung von weiten Distanzen zwischen schwach gekoppelten Spins, was wiederum nützliche Randbedingungen für die Strukturrechnung erbringt.<sup>[21,24,25]</sup> Da für deuterierte Proben keine starke Protonenentkopplung erforderlich ist, kann eine paramagnetische Relaxationsverstärkung (paramagnetic relaxation enhancement, PRE) verwendet werden, die extrem hohe Wiederholungsraten für das Experiment ermöglicht.<sup>[18,26]</sup> Bislang sind hoch aufgelöste Spektren mit  $^1\text{H}$ -Detektion im Festkörper nur für mikrokristalline Proteine präsentiert worden.<sup>[19,27]</sup> Hier zeigen wir, dass nichtkristalline deuterierte Membranproteine und Amyloidfibrillen hoch aufgelöste Protonenspektren ergeben, die bezüglich ihrer Qualität mit denjenigen mikrokristalliner Proteine vergleichbar sind. Für die Experimente wurden Proben des fibrillären Alzheimer- $\beta$ -Amyloidpeptids  $\text{A}\beta^{1–40}$ , des  $\alpha$ -helikalen Membranproteins Bakteriorhodopsin und des  $\beta$ -Fädes des äußeren Membranproteins G (outer membrane protein G, OmpG) verwendet.

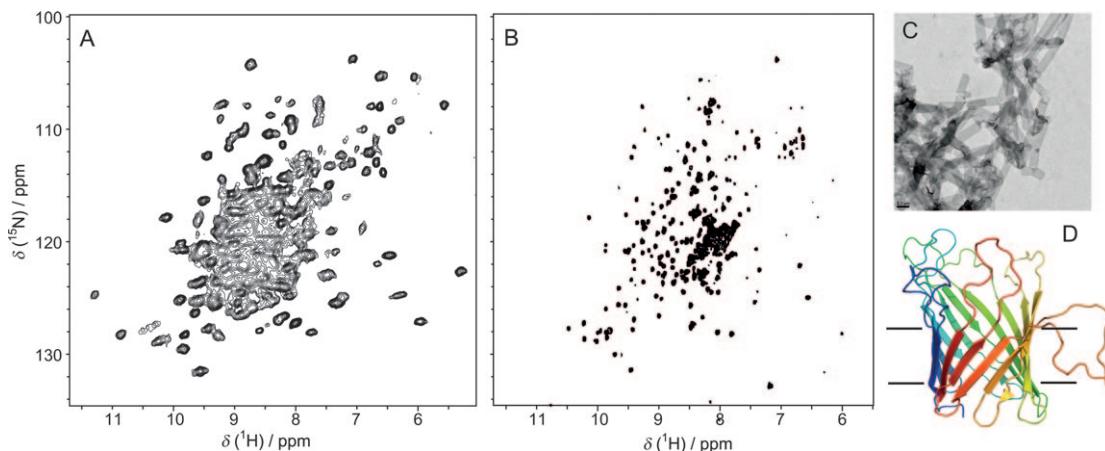
Amyloidogene fibrilläre Proteine stellen die größte Herausforderung für die Spektroskopie dar, da die Probe eine große Zahl verschiedener Strukturpolymorphe enthalten kann.<sup>[14,15,28]</sup> Konformationsunterschiede werden beobachtet, sogar wenn Fibrillisationskeime eingebracht werden und die Pufferbedingungen optimiert werden (pH, Salzgehalt, Temperatur).<sup>[28]</sup> Folglich können Resonanzen inhomogen verbreitet sein, was der Empfindlichkeit abträglich ist. Um zu zeigen, dass der Deuterierungsansatz erfolgreich für nichtkristalline Systeme verwendet werden kann, haben wir Am-

loydfibrillen aus dreifach isotopenmarkiertem Alzheimer- $\beta$ -Amyloidpeptid  $\text{A}\beta^{1–40}$  gebildet.<sup>[29]</sup> Die Strukturen wurden auf der Basis von Fibrillisationskeimen in mehreren Iterationen gezüchtet (siehe Details in den Hintergrundinformationen). Während der Präparation wurde die Probe kontinuierlich in Bewegung gehalten, um das Fibrillenwachstum zu beschleunigen. Die Fibrillen, die auf diese Art und Weise erhalten wurden, sind sehr homogen (gemäß ihres Erscheinungsbilds unter dem Elektronenmikroskop) und bestehen zumeist aus spiralförmig gedrehten Fibrillen mit ca.  $(130 \pm 20)$  nm Ganghöhe (Abbildung 1A). Eine repräsentative 2D- $\text{H}, \text{N}$ -Korrelation ist in Abbildung 1B gezeigt. Typische Linienbreiten sind in der Größenordnung von 90–220 Hz für  $^1\text{H}^N$  und von 30–50 Hz für  $^{15}\text{N}$ . Obwohl das  $\text{H}, \text{N}$ -Korrelationspektrum deutlich überlappende Signale zeigt, sind die entsprechenden  $^{13}\text{C}$ -editierten 3D-Experimente gut aufgelöst (Abbildung S3). Die Auflösung in der  $^{15}\text{N}, ^{13}\text{C}$ -Ebene erscheint im Vergleich zu der Auflösung, die in der  $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -Projektion erreicht wird, günstiger. Sequenzielle Zuordnungen wurden über HNCO/HNCACO-<sup>[30]</sup> und optimierte HNCACB/HNCA-Experimente<sup>[23]</sup> mit Protonendetektion erhalten (Abbildung 1C; die entsprechenden Pulsschemata sind in den Hintergrundinformationen aufgeführt). Mit diesem Ansatz waren wir in der Lage, die Reste A21–V39 in  $\text{A}\beta^{1–40}$  zuzuordnen. Den N-Terminus des Peptids (Reste 1–10) betreffend ist eine signifikante Linienverbreiterung beschrieben worden.<sup>[31]</sup> Außerdem sind die  $^{13}\text{C}$ -Linienbreiten für die Reste 10–20 systematisch höher (um ca. 25 %) als für die C-terminalen Reste, was die Zuordnung dieser Reste schwierig macht.

Ein zweites System, das wir verwendet haben, um die Methode zu validieren, ist das äußere Membranprotein G (OmpG), das eine Rolle für die Aufnahme von großen Oligosacchariden in Gram-negative Bakterien spielt.<sup>[32]</sup> Im Unterschied zu Präparationen von  $\text{A}\beta^{1–40}$ -Fibrillen, deren strukturelle Homogenität schwer zu kontrollieren ist, können 2D-Kristalle von in nativer Lipidumgebung rekonstituiertem



**Abbildung 1.** MAS-Festkörper-NMR-Experimente mit einer perdeuterierten Fibrillenprobe des Alzheimer-Peptids  $\text{A}\beta^{1–40}$ . A) Repräsentatives EM-Bild der Fibrillen, die für die NMR-Experimente verwendet wurden. B) 2D- $\text{H}, \text{N}$ -Korrelation der  $\text{A}\beta^{1–40}$ -Fibrillen. C) Strip-Plots eines HNCA- (blau) und HNCACB-Experiments mit Protonendetektion, die die sequenzielle Zuordnung zwischen den Resten L34 und G38 zeigen (schwarz und rot für positive bzw. negative Konturlinien). Alle Experimente wurden bei etwa 25 °C und einem Magnetfeld von 14.1 T mit 20 kHz MAS aufgenommen.



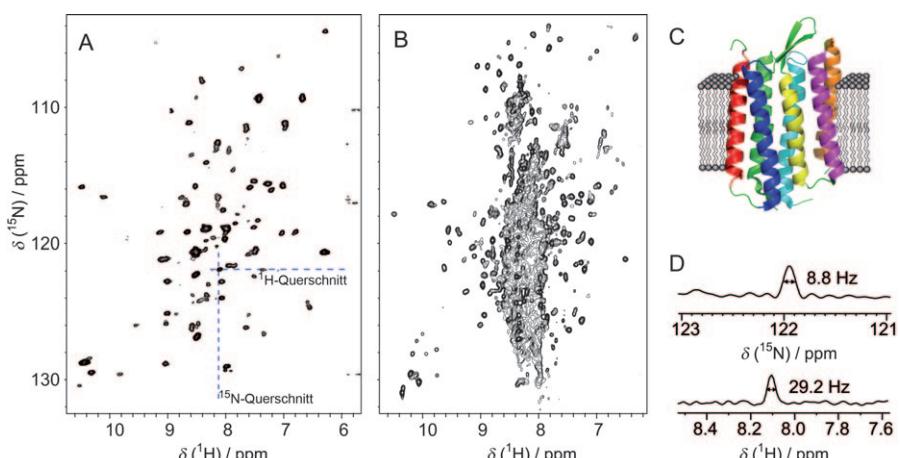
**Abbildung 2.** Das  $\beta$ -Faß-Porin OmpG. Vergleich von 2D-H,N-Korrelationen einer perdeuterierten, partiell mit Protonen rückgetauschten Probe, die mithilfe von deuterierten Lipiden im festen Zustand mit einem Magnetfeld von 19.97 T bei einer effektiven Temperatur von 25 °C erhalten wurden (A) und einem Lösungs-NMR-TROSY-Spektrum (B, für 21.14 T und 27 °C). Für die Lösungs-NMR-Probe werden  $^1\text{H}^{\text{N}}$ -Linienbreiten von 15–20 Hz beobachtet (50–80 Hz im Festkörperspektrum). Lösungs-NMR-Spektren wurden mit OmpG aufgenommen, das durch Dodecyl- $\beta$ -D-Maltosid stabilisiert war. C) EM-Bild von 2D-Kristallen aus in Lipiddoppelschichten rekonstituiertem OmpG. D) Struktur von OmpG in Tensidmicellen (PDB: 2JQY).<sup>[35]</sup>

OmpG mit hohem Ordnungsgrad erhalten werden. Das wird deutlich in der Elektronenmikroskopie (EM)-Projektionsstruktur<sup>[33]</sup> sowie in den  $^{13}\text{C}$ , $^{15}\text{N}$ -Korrelationsspektren,<sup>[34]</sup> die hervorragende Qualität aufweisen und vergleichbar sind mit den Spektren einer mikrokristallinen Proteinpräparation (siehe die Hintergrundinformationen).

Ein repräsentatives H,N-Korrelationsspektrum für eine Probe mit perdeuteriertem OmpG, das in perdeuterierten *E. coli*-Lipiddoppelschichten in einem Puffer mit 70%  $\text{D}_2\text{O}$  und 30%  $\text{H}_2\text{O}$  rekonstituiert wurde, ist in Abbildung 2A gezeigt. Der Rücktausch von Protonen wurde während Rückfaltung aus einer Harnstoff-denaturierten Proteinpräparation bewirkt (siehe die Hintergrundinformationen). Es ist offensichtlich, dass H,N-Korrelationen empfindlicher auf leichte Konformationsunterschiede und Dynamik ansprechen, da die Auflösung in den 2D- $^{13}\text{C}$ , $^{15}\text{N}$ -Korrelationsspektren durch die skalaren  $^{13}\text{C}$ , $^{15}\text{N}$ -Kopplungen bestimmt ist. Das Korrelationsspektrum lässt sich gut mit in Tensidmicellen gemessenen Lösungs-NMR-Spektren<sup>[35]</sup> überlagern (siehe die Hintergrundinformationen). Die Ähnlichkeit der isotropen chemischen Verschiebungen ist ein erster Hinweis darauf, dass die Strukturen von OmpG im micellengebundenen Zustand und in der Lipidumgebung höchst vergleichbar sind.

Das dritte Beispiel, das wir herangezogen haben, um den Deuterierungsansatz zu demonstrieren, bezieht sich auf das  $\alpha$ -helikale Membranprotein Bakteriorhodopsin

(bR).<sup>[36]</sup> bR ist eine bakterielle Protonenpumpe, ursprünglich gefunden in den Purpurnembranen von *H. salinarium*, die im Dunkeln die beiden Konformationszustände  $\text{bR}_{555}$  und  $\text{bR}_{568}$  annimmt (im Verhältnis 60:40).<sup>[37]</sup> Im Fall von bR finden wir signifikant besser aufgelöste Spektren im festen Zustand (Abbildung 3). Die  $^1\text{H}$ , $^{15}\text{N}$ -Linienbreiten sind vergleichbar mit denen für mikrokristalline Proteinpräparationen (SH3-Domäne von  $\alpha$ -Spektrin). Querschnitte entlang der  $^{15}\text{N}$ - und  $^1\text{H}$ -Dimension für ein repräsentatives Signal sind in Abbildung 3D gezeigt. Statt der erwarteten  $2 \times 250$  Resonanzen beobachten wir jedoch nur ca. 100 Kreuzsignale. Wir vermuten, dass vor allem Resonanzen von Resten in dem für



**Abbildung 3.** Bakteriorhodopsin (bR) aus der Purpurnembran von *H. salinarium*. A) Festkörper-NMR-H,N-Korrelation von perdeuteriertem bR in Purpurnembran nach Rücktausch von 10% Protonen an austauschbaren Stellen. Das Spektrum wurde über 6 h bei 16.44 T und ca. 25 °C aufgenommen. B) Lösungs-NMR-TROSY-Korrelation von tensidsolubilisiertem bR.<sup>[38]</sup> Lösungs-NMR-Spektren wurden unter Verwendung von bR aufgenommen, das durch Dodecyl- $\beta$ -D-Maltosid stabilisiert war. C) Struktur von bR in der Lipiddoppelschicht (PDB: 1C3W).<sup>[39]</sup> D) Querschnitte aus (A) an den mit gestrichelten Linien markierten Stellen. Die Linien im Festkörperspektrum können in der  $^{15}\text{N}$ - und der  $^1\text{H}$ -Dimension bis zu 9 bzw. 30 Hz schmal sein.

Wasser zugänglichen Kanal beobachtbar sind. Resonanzen von Resten in flexiblen Schleifen werden vermutlich nicht beobachtet, da Experimente mit dipolarem und skalarem Polarisationstransfer vergleichbare Spektren ergeben. Im Unterschied zu OmpG wurden austauschbare Deuteronen hier durch Inkubation bei pH 10 über einen Zeitraum von 3–4 Wochen rückgetauscht. Diese Bedingungen scheinen nicht ausreichend zu sein, um alle austauschbaren Protonen im Kern der Proteinstruktur zu tauschen. In Zukunft wird dieser präparative Engpass durch Markierungsmuster umgangen werden, bei denen Protonen zufällig an nichtaustauschbaren Stellen verteilt sind.<sup>[21]</sup>

Das Lösungs-NMR-Spektrum des tensidsolubilisierten bR (Abbildung 2B) enthält fehlgefaltetes Protein, das Signale für  $H^N$ -Protonen bei ca.  $\delta = 8.4$  ppm zeigt. Diese Resonanzen erscheinen im Fall der Festkörper-NMR-Probe nicht, was die Bedeutung einer nativen Lipidumgebung für die Charakterisierung von Membranproteinen unterstreicht.

Tabelle 1 zeigt die experimentellen  $T_2$ -Relaxationszeiten für  $^1H^N$ ,  $^{15}N$  und  $^{13}CO$  für eine Probe von fibrillärem  $A\beta^{1-40}$  im Vergleich zu denen für eine mikrokristalline Probe der SH3-Domäne von  $\alpha$ -Spektrin bei gleicher Temperatur. Die durchschnittlichen  $T_2$ -Zeiten in  $A\beta^{1-40}$  sind um ca. 30 % kürzer. Obwohl der hohe  $\beta$ -Faltblatt-Anteil prinzipiell eine hohe Dispersion der chemischen Verschiebungen bewirken sollte, ist die effektive Auflösung in den 2D- $H,N$ -Korrelationsspektren von OmpG (280 Aminosäuren) im Festkörper begrenzt. Dies ist durch die experimentelle Linienbreite in der Größenordnung von  $(101 \pm 31)$  Hz für  $^1H$  und  $(53 \pm 23)$  Hz für  $^{15}N$  bedingt. Wir stellen für OmpG-Proben, die in deuterierten und protonierten Lipiden rekonstituiert wurden, keine großen Unterschiede in der Auflösung fest. Zum Vergleich dazu sind die Linienbreiten einer mikrokristallinen Präparation der  $\alpha$ -Spektrin SH3-Domäne in der Größenordnung von 25 Hz für  $^1H$  und 15 Hz für  $^{15}N$ .<sup>[40]</sup> Die experimentellen homogenen Linienbreiten für OmpG sind in der Größenordnung von 30 Hz sowohl für  $^1H$  als auch für  $^{15}N$

(Tabelle 1). Unter diesen Umständen sind dipolare  $H,N$ -Magnetisierungstransfers im Vergleich zu skalaren Transfers deutlich effektiver. Auf der anderen Seite deutet eine geringere homogene Linienbreite im Vergleich zur experimentellen Linienbreite auf einen gewissen Grad an konformativer Heterogenität hin. Da die Protonendichte vergleichbar mit der in der SH3-Präparation ist, vermuten wir, dass der Unterschied zwischen den homogenen Linienbreiten für OmpG und  $\alpha$ -Spektrin SH3 durch Unterschiede in der Moleküldynamik zu erklären ist. Die  $^1H,^{15}N$ -Restlinienbreite im Fall von OmpG wird demnach durch eine langsame Rotation um eine Achse in der Lipiddoppelschicht bestimmt. Hier könnte eine rotatorische Korrelationszeit auf der  $\mu$ s-Zeitskala zu erwarten sein.<sup>[41,42]</sup>

Ähnlich wie für OmpG finden wir für  $A\beta^{1-40}$ , dass die transversalen Relaxationszeiten  $T_2$  in einem Echo-Experiment systematisch länger sind, als auf Grundlage der beobachteten Linienbreiten zu erwarten wäre (Tabelle 1). Der größere Teil dieser Diskrepanz geht hier auf Probenheterogenität zurück. Interessanterweise scheint die erhaltene Auflösung in den Heterokern-Dimensionen wie  $^{13}CO$  und  $^{15}N$  besser zu sein als in der  $^1H$ -Dimension (Abbildung S3). Dies könnte am größeren gyromagnetischen Verhältnis von Protonen liegen und an der Tatsache, dass diese auf strukturelle Heterogenität mit höherer Empfindlichkeit ansprechen. Zudem sind die Echo- $T_2$ -Zeiten kürzer als für die  $\alpha$ -Spektrin-SH3-Domäne. Führt man sich die vergleichbare Protonendichte der zwei Proben vor Augen, ist anzunehmen, dass die kürzere  $T_2$ -Zeit teilweise auf dynamische Prozesse zurückgeht. Wir finden keine differentielle Relaxation für die Spinzustände  $^{15}N-H\alpha$  und  $^{15}N-H\beta$  (Abbildung S5) in  $A\beta^{1-40}$ -Fibrillen bei 20 °C. Dies lässt darauf schließen, dass Prozesse auf der ns- bis  $\mu$ s-Zeitskala bei dieser Temperatur nicht die Ursache der beobachteten Linienverbreiterung sind. Ein dynamischer Austausch zwischen löslichen und nichtlöslichen Aggregationszuständen ist jedoch in der Vergangenheit beobachtet worden.<sup>[43-45]</sup>

Daher vermuten wir, dass die Unterschiede zwischen transversaler Relaxation von  $A\beta^{1-40}$ -Fibrillen und mikrokristallinen Proteinen auf einen chemischen Austausch zurückgehen.

Zusammengefasst haben wir gezeigt, dass Perdeuterierung und partieller Rücktausch von austauschbaren Protonen erfolgreich zur Untersuchung von Membranproteinen und Amyloidfibrillen im festen Zustand eingesetzt werden können. Das vorgestellte Isotopenmarkierungsmuster trägt zu hoher Empfindlichkeit bei und ermöglicht Protonendetektion und Korrelationsexperimente unter Berücksichtigung von  $^1H$ -,  $^{15}N$ - und  $^{13}C$ -Resonanzen. Die Miteinbeziehung von  $^1H$ -Verschiebungen ergibt eine zuverlässiger Zuordnung von Proteinerückgrat-Resonanzen und führt

**Tabelle 1:**  $^1H,^{15}N$ - $T_2$ -Relaxationszeiten, theoretische und experimentelle Linienbreite für eine Probe von perdeuterierten  $A\beta^{1-40}$ -Fibrillen, das äußere  $\beta$ -Fass-Membranprotein OmpG und mikrokristallines  $\alpha$ -Spektrin SH3.<sup>[a]</sup>

	$^1H^N$ $T_2$		$^1H$ LB		$^{15}N$ $T_2$		$^{15}N$ LB	
	[ms]	ber. [Hz]	exp. [Hz]	ber. [Hz]	exp. [Hz]	ber. [Hz]	exp. [Hz]	ber. [Hz]
<b>OmpG in</b>								
protonierten Lipiden <sup>[b]</sup>	6.8 ± 0.5	46.8 ± 3.4	121 ± 42	10.0 ± 1.0	31.8 ± 3.2	60 ± 34		
deuterierten Lipiden <sup>[b]</sup>	9.2 ± 1.0	34.6 ± 3.8	101 ± 31	11.1 ± 2.3	28.7 ± 6.2	53 ± 23		
$A\beta^{1-40}$ <sup>[c]</sup>	8.2 ± 0.2	38.8 ± 1.0	170 ± 47	13.5 ± 0.2	23.6 ± 0.3	38 ± 10		
$\alpha$ -Spektrin SH3 <sup>[c]</sup>	12.4 ± 0.9	25.7 ± 1.8	25 ± 5	21.8 ± 3.3	14.6 ± 2.2	15 ± 3		

[a]  $T_2$  wurde durch ein Echo-Experiment für die Amidresonanzen mit einem 180°-Puls in der Mitte des inkrementierten Delays erhalten. Die SH3-Domäne ebenso wie die  $A\beta^{1-40}$ -Fibrillenprobe wurden in Gegenwart von 75 mM [Cu(edta)] präpariert, die OmpG-Präparation mit 30 % Protonen an austauschbaren Stellen enthielt dagegen keinen Metallchelatkomplex. Alle Relaxationswerte wurden für eine effektive Temperatur von 25 °C bestimmt. [b] Relaxationszeiten für OmpG-Proben wurden ohne [Cu(edta)] bestimmt. Wie bereits gezeigt,<sup>[18]</sup> beeinflusst eine paramagnetische Relaxationsverstärkung (PRE) nur die longitudinale Relaxation, lässt jedoch die transversale Relaxation und die Linienbreiten weitgehend unberührt. [c] Relaxationszeiten für  $A\beta^{1-40}$  und  $\alpha$ -Spektrin SH3 beziehen sich auf einen Protonierungsgrad von 25 % an austauschbaren Stellen. Diese Proben wurden in Gegenwart von 75 mM [Cu(edta)] fibrillisiert.

zu einer signifikant größeren Vielfalt von anwendbaren Experimenten zur Charakterisierung von Proteinstruktur und -dynamik für eine Vielzahl von pharmakologisch wichtigen Zielmolekülen.

Eingegangen am 29. Dezember 2010  
Online veröffentlicht am 14. April 2011

**Stichwörter:** Amyloidfibrillen · Äußeres Membranprotein G · Festkörper-NMR-Spektroskopie · Lipidmembranen · Membranproteine

- [1] J. Drews, *Science* **2000**, 287, 1960.
- [2] S. Dracheva, S. Bose, R. W. Hendler, *FEBS Lett.* **1996**, 382, 209.
- [3] E. M. Landau, J. P. Rosenbusch, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 14532.
- [4] J. M. Gluck, M. Wittlich, S. Feuerstein, S. Hoffmann, D. Willbold, B. W. Koenig, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 12060.
- [5] T. Raschle, S. Hiller, T.-Y. Yu, A. J. Rice, T. Walz, G. Wagner, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 17777.
- [6] L. Shi, E. M. R. Lake, M. A. M. Ahmed, L. S. Brown, V. Ladizhansky, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2009**, 1788, 2563–2574.
- [7] R. Schneider, M. Etzkorn, K. Giller, V. Daebel, J. Eisfeld, M. Zweckstetter, C. Griesinger, S. Becker, A. Lange, *Angew. Chem. 2010*, 122, 1926; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 1882.
- [8] K. Seidel, O. C. Andronesi, J. Krebs, C. Griesinger, H. S. Young, S. Becker, M. Baldus, *Biochemistry* **2008**, 47, 4369.
- [9] N. J. Traaseth, L. Shi, R. Verardi, D. G. Mullen, G. Barany, G. Veglia, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, 106, 10165.
- [10] N. A. Whittemore, R. Mishra, I. Kheterpal, A. D. Williams, R. Wetzel, E. H. Serpersu, *Biochemistry* **2005**, 44, 4434.
- [11] C. Wasmer, A. Lange, H. Van Melckebeke, A. B. Siemer, R. Riek, B. H. Meier, *Science* **2008**, 319, 1523.
- [12] H. Van Melckebeke, C. Wasmer, A. Lange, A. B. Eiso, A. Loquet, A. Bockmann, B. H. Meier, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 13765–13775.
- [13] J. J. Helmus, K. Surewicz, P. S. Nadaud, W. K. Surewicz, C. P. Jaroniec, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, 105, 6284–6289.
- [14] A. T. Petkova, R. D. Leapman, Z. H. Guo, W. M. Yau, M. P. Mattson, R. Tycko, *Science* **2005**, 307, 262.
- [15] A. K. Paravastu, R. D. Leapman, W.-M. Yau, R. Tycko, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, 105, 18349.
- [16] H. Heise, W. Hoyer, S. Becker, O. C. Andronesi, D. Riedel, M. Baldus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, 102, 15871.
- [17] K. D. Kloepper, K. L. Hartman, D. T. Ladror, C. M. Rienstra, *J. Phys. Chem. B* **2007**, 111, 13353.
- [18] R. Linser, V. Chevelkov, A. Diehl, B. Reif, *J. Magn. Reson.* **2007**, 189, 209.
- [19] V. Chevelkov, K. Rehbein, A. Diehl, B. Reif, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 3963; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 3878.
- [20] V. Agarwal, B. Reif, *J. Magn. Reson.* **2008**, 194, 16.
- [21] S. Asami, P. Schmieder, B. Reif, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 15133–15135.
- [22] R. Linser, U. Fink, B. Reif, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 8891–8893.
- [23] R. Linser, U. Fink, B. Reif, *J. Magn. Reson.* **2008**, 193, 89–93.
- [24] D. H. Zhou, J. J. Shea, A. J. Nieuwkoop, W. T. Franks, B. J. Wylie, C. Mullen, D. Sandoz, C. M. Rienstra, *Angew. Chem. 2007*, 119, 8532; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 8380.
- [25] R. Linser, B. Bardiaux, V. Higman, U. Fink, B. Reif, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, DOI: 10.1021/ja110222h.
- [26] N. P. Wickramasinghe, M. Kotecha, A. Samoson, J. Past, Y. Ishii, *J. Magn. Reson.* **2007**, 184, 350.
- [27] P. Schanda, M. Huber, R. Verel, M. Ernst, B. H. Meier, *Angew. Chem.* **2009**, 121, 9486; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 9322.
- [28] K. Klement, K. Wielgmann, J. Meinhardt, P. Hortschansky, W. Richter, M. Fandrich, *J. Mol. Biol.* **2007**, 373, 1321.
- [29] M. Dasari, A. Espargaro, R. Sabate, J. M. Lopez del Amo, U. Fink, G. Grelle, J. Bieschke, S. Ventura, B. Reif, *ChemBioChem* **2011**, 12, 407–423.
- [30] R. Linser, U. Fink, B. Reif, *J. Biomol. NMR* **2010**, 47, 1.
- [31] 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.
- [32] D. A. Fajardo, J. Cheung, C. Ito, E. Sugawara, H. Nikaido, R. Misra, *J. Bacteriol.* **1998**, 180, 4452.
- [33] M. Behlau, D. J. Mills, H. Quader, W. Kuhlbrandt, J. Vonck, *J. Mol. Biol.* **2001**, 305, 71.
- [34] M. Hiller, L. Krabben, K. R. Vinothkumar, F. Castellani, B. Van Rossum, W. Kuhlbrandt, H. Oschkinat, *ChemBioChem* **2005**, 6, 1679.
- [35] B. Liang, L. K. Tamm, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, 104, 16140.
- [36] D. Oesterhelt, W. Stoeckenius, *Nature* **1971**, 233, 149.
- [37] M. L. Mak-Jurkauskas, V. S. Bajaj, M. K. Hornstein, M. Belenky, R. G. Griffin, J. Herzfeld, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, 105, 883.
- [38] M. Schubert, M. Kolbe, B. Kessler, D. Oesterhelt, P. Schmieder, *ChemBioChem* **2002**, 3, 1019.
- [39] H. Luecke, B. Schobert, H. T. Richter, J. P. Cartailler, J. K. Lanyi, *J. Mol. Biol.* **1999**, 291, 899.
- [40] Ü. Akbey, S. Lange, T. W. Franks, R. Linser, A. Diehl, B. J. van Rossum, B. Reif, H. Oschkinat, *J. Biomol. NMR* **2010**, 46, 67–73.
- [41] P. G. Saffman, M. Delbrück, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1975**, 72, 3111.
- [42] R. H. Austin, S. S. Chan, T. M. Jovin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1979**, 76, 5650.
- [43] S. Narayanan, B. Reif, *Biochemistry* **2005**, 44, 1444.
- [44] N. Carulla, G. L. Caddy, D. R. Hall, J. Zurdo, M. Gairi, M. Feliz, E. Giralt, C. V. Robinson, C. M. Dobson, *Nature* **2005**, 436, 554.
- [45] J. Bieschke, J. Russ, R. P. Friedrich, D. E. Ehrnhoefer, H. Wobst, K. Neugebauer, E. E. Wanker, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, 107, 7710.