

Hochaufgelöste Festkörper-NMR-Spektren einer sedimentierten, nichtkristallinen Dodekameren Helicase (59 kDa)**

Carole Gardiennet, Anne K. Schütz, Andreas Hunkeler, Britta Kunert, Laurent Terradot, Anja Böckmann* und Beat H. Meier*

Die Festkörper-NMR-Spektroskopie hat sich zu einer nützlichen Methode zur Bestimmung von Proteinstrukturen entwickelt. Im Unterschied zu Streumethoden benötigt die NMR-Spektroskopie keine Proben mit langreichweiter Ordnung, und neben Mikrokristallen^[1] sind Viren,^[2] Fibrillen,^[3] Membranproteine^[4] und große Proteinkomplexe^[5] untersucht worden. Trotzdem ist die Probenvorbereitung von entscheidender Bedeutung, um hochauflöste Spektren zu erhalten, und sowohl Auflösung als auch Empfindlichkeit bleiben ein zentrales Thema. Wir zeigen hier, dass das Sediment eines großen Biomoleküls (12×59 kDa), das direkt in einen NMR-Rotor zentrifugiert wurde, hochauflöste Spektren mit gutem Signal-Rausch-Verhältnis ergibt, welche der Spektrenqualität sorgfältig kristallisierter Präparationen nahekommen. Bertini und Mitarbeiter^[6] zeigten kürzlich, dass der NMR-Rotor als Ultrazentrifuge genutzt werden kann und dass sich Lösungen großer Proteine bei genügend hohen Rotorfrequenzen wie Festkörper verhalten, allerdings ist bei dieser Art von Experiment die Empfindlichkeit durch die Löslichkeit des Proteins begrenzt^[6a] und bleibt niedrig. Wir demonstrieren hier, dass das Problem des Signal-Rausch-Verhältnisses gelöst werden kann, indem man eine Proteinlösung mit einer Ultrazentrifuge mit speziell adaptierter Füllvorrichtung direkt in den NMR-Rotor sedimentiert und dabei Proteindichten erhält, die vergleichbar sind mit mikrokristallinen Proben. Direktes Zentrifugieren in NMR-Rotoren wurde schon früher angewendet, um die Konzentration von kristallinen und fibrillären Proben zu erhöhen.^[7] Hier sedimentieren wir lösliche Proteine mit einer ähnlichen

Methode und öffnen damit einen Zugang zur Erforschung von Proben, die schwer kristallisierbar sind oder schwer mit Füllungsmitteln wie PEG (Polyethylenglycol) ausgefällt werden können. Der Ansatz liefert eine ausreichende Empfindlichkeit für die Untersuchung von großen Proteinen, wie am Beispiel der 59 kDa große DnaB-Helicase gezeigt wird.

DnaB-Helicases sind bakterielle ATP-getriebene Enzyme, die doppelsträngige DNA während der DNA-Replikation entwinden. DnaBs sind im Allgemeinen hexamer und bilden ringförmige Aggregate, welche die einsträngige DNA umschließen. In unserer Studie untersuchten wir DnaB aus *Helicobacter pylori* mit einer monomeren Atommasse von 59 kDa (57 kDa plus Aufreinigungs-Tag). Die Kristallstruktur der N-terminalen Domäne wurde in früheren Studien gelöst (Lit. [8], PDB-Code 3GXV), wie auch kürzlich diejenige der C-terminalen Domäne des Proteins.^[9] Biochemische und elektronenmikroskopische Untersuchungen des Volllängenproteins zeigten, dass es – im Unterschied zu den anderen DnaBs – Dodekamere bildet, die aus Paaren hexamerer Ringe zusammengesetzt sind.^[9] Die Kristallstruktur des Volllängenproteins ist nicht verfügbar. Die von DnaB erhaltenen Kristalle sind bisher für Röntgenkristallographie ungeeignet, liefern aber Festkörper-NMR-Spektren hoher Qualität (siehe unten). Das DnaB-Dodekamer hat eine Atommasse von 708 kDa. Alternative Präparationen des Proteins sind von Interesse, um die Konformation in Gegenwart von DNA oder anderen Wechselwirkungspartnern zu untersuchen, bei deren Vorhandensein die Kristallisierung nicht erfolgreich war.

Abbildung 1 zeigt die NMR-Spektren einer kristallinen Zubereitung von DnaB aus einem optimierten Kristallisierungspuffer sowie die Spektren einer Probe, die aus einer Proteinlösung von 49 mg mL^{-1} in einen Bruker-Rotor von 3.2 mm Außendurchmesser bei 200 000 g sedimentiert wurde. Die Gesamterscheinung der beiden Spektren ist bemerkenswert ähnlich. Eine Überlagerung der vollständigen Spektren ist in der Hintergrundinformation gegeben. Dieser Gesamtindruck wird durch eine detaillierte Untersuchung von isolierten, einfach identifizierbaren Resonanzen bestätigt. Als Beispiel ist in Abbildung 2a, der Alanin-Ca/Cβ-Bereich dargestellt. Zusätzlich zu zahlreichen überlappenden α -helicalen Resonanzen (um 18/55 ppm) sind weitere Alanin-Resonanzen sichtbar. DnaB enthält sechs β -Faltblatt-Alanine (im C-terminalen Teil),^[9] für welche die SHIFTX-Voraussagen^[10] in Abbildung 2a gegeben sind. Diese gut aufgelösten Resonanzen sind identisch für beide Zubereitungen. Diese Beobachtungen werden weiter bestätigt, wenn man 1D-Ausschnitte betrachtet, z. B. eine Spur bei $\delta_1 = 71.9$ ppm (Abbildung 2b).

[*] Dr. C. Gardiennet, Dr. B. Kunert, Dr. L. Terradot, A. Böckmann

Institut de Biologie et Chimie des Protéines

UMR 5086 CNRS/Université de Lyon 1

7 passage du Vercors, 69367 Lyon (Frankreich)

E-Mail: a.bockmann@ibcp.fr

A. K. Schütz, A. Hunkeler, Prof. Dr. B. H. Meier

Physical Chemistry, ETH Zürich

Wolfgang-Pauli-Strasse 10, 8093 Zürich (Schweiz)

E-Mail: berne@ethz.ch

[**] Die Autoren danken Dr. Guido Capitani und Dr. Vincent Olieric vom PSI/Swiss Light Source für die Aufzeichnung der Streudaten, Luc Bousset für hilfreiche Diskussionen und Christel Böckmann für die deutsche Übersetzung. Diese Arbeit wurde von der Agence Nationale de la Recherche (ANR-PCV08 321323), der ETH Zürich, dem Schweizerischen Nationalfonds (Grant 200020_124611), dem Centre National de la Recherche Scientifique dem Partenariat Hubert Curien Germaine de Staél und der Europäischen Kommission unter dem Seventh Framework Program (FP7; Bio-NMR 261863) unterstützt.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201200779> zu finden.

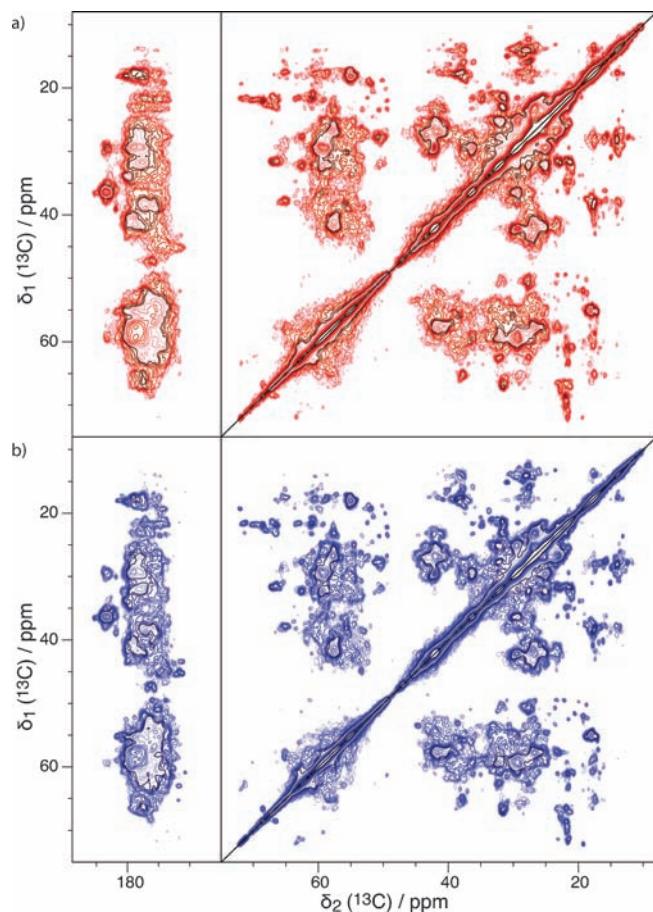


Abbildung 1. Zweidimensionale DARR-Spektren (50 ms Mischzeit, 18 kHz MAS) des aus 521 Aminosäuren bestehenden Proteins DnaB (molekulare Masse 59 kDa): a) sedimentiert (rot) und b) mikrokristallin (blau). Beide Spektren weisen ein ähnliches Signal-Rausch-Verhältnis auf; Spektrum (a) wurde mit 5.5-mal mehr Scans erhalten, nämlich mit 22. In der indirekten Dimension wurden 2000 Inkremente gemessen, bei Gesamtmesszeiten von 7 h (a) bzw. 37 h (b).

Das Signal-Rausch-Verhältnis der Spektren von kristallinen und sedimentierten Proben ist ungefähr gleich (siehe Abbildung 1 und 2b), wobei das Spektrum der sedimentierten Probe mit 5.5-mal mehr Scans aufgezeichnet wurde. Dies weist darauf hin, dass der Rotor mit der sedimentierten Probe ungefähr halb so viel Material wie der Rotor mit der mikrokristallinen Probe enthält, in Übereinstimmung mit den Schätzungen aus der Menge der eingesetzten Materialien. Die geschätzte Endkonzentration im Rotor mit dem sedimentierten Protein ist 200 mg mL^{-1} ; zum Vergleich enthält die konzentrierte Lösung von DnaB 49 mg mL^{-1} . Die Proteinmenge im Rotor kann durch Optimieren der Probenvorbereitung wahrscheinlich weiter verbessert werden – wir merken aber an, dass die ersten Versuche bereits zu einer Menge geführt haben, die beinahe der Hälfte der mikrokristallinen Probe entspricht; dies entspricht auch der vierfachen Menge einer Probe, die aus einer im Rotor rotierenden Proteinlösung sedimentiert werden könnte.^[6b] Wichtig ist hierbei, dass eine vierfach höhere Probenmenge zu einer sechzehnfachen Verminderung der Messzeit führt. Dieser Zeitgewinn kann den Unterschied ausmachen, ob man 3D-

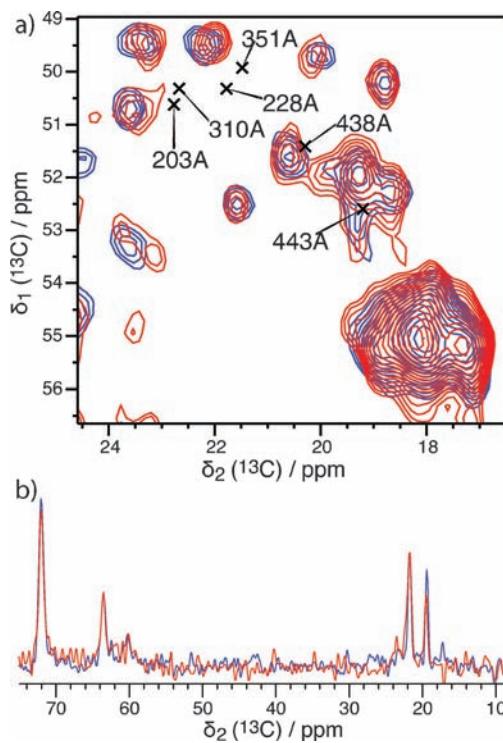


Abbildung 2. a) Alanin-Bereich der 2D-DARR-Spektren aus Abbildung 1 (sedimentierte Probe rot; mikrokristalline Probe blau). Die Kreuze markieren die SHIFTX-Voraussagen (siehe Text). b) Eindimensionale Spuren durch diese Spektren bei $\delta_1 = 71.9 \text{ ppm}$.

Experimente ausführen kann oder nicht, welche man für die sequentielle Zuordnung und darauf basierend eine Konformationsanalyse des Proteins benötigt. Wir beobachten, dass nach der Ultrazentrifugation die Proteinsedimente im Rotor das Aussehen eines Gels annehmen; dieses kann dem Rotor entnommen und wieder verdünnt werden. Eine SDS-PAGE-Analyse zeigt keine Proteolyse.

Um Proteine aus der Lösung direkt in den NMR-Rotor zu sedimentieren, haben wir eine spezielle Füllvorrichtung entwickelt, die Zentrifugalkräfte bis zu 210 000 g widersteht und ein ausreichend großes Reservoir (1 mL) enthält, um das gelöste Protein aufzunehmen und eine beachtenswerte Aufkonzentration in einem Arbeitsschritt zu ermöglichen. Das Volumenverhältnis zwischen Reservoir und Rotor von ca. 30 erlaubt etwa 30-mal höhere Konzentrationen im Rotor als durch Pipettierung von Lösung in den Rotor erreichbar wäre.

Die Zentrifugationswerkzeuge wurden aus kohlenstofffaserverstärktem Plastik (Sutter Kunststoffe AG) gefertigt, damit sie den Zentrifugalkräften widerstehen können. Die Vorrichtung enthält einen Trichter, der direkt an die Spitze des MAS-Rotors aufgesetzt wird. Der untere Teil besteht aus einem im Strangziehverfahren hergestellten Harz mit der Faserrichtung entlang zur Achse. Der Trichter besteht aus einer Röhre aus gewundener Kohlenstofffaser mit der Faserrichtung senkrecht zur Achse. Das Gewicht des leeren Werkzeugs betrug 4 g und erfüllt somit die Vorschriften für die Ultrazentrifuge. In das Werkzeug passt ein 3.2-mm-Bruker-Rotor (Abbildung 3). Die Vorrichtung kann Proteine mit einer Masse des Proteins oder Proteinmultimers von

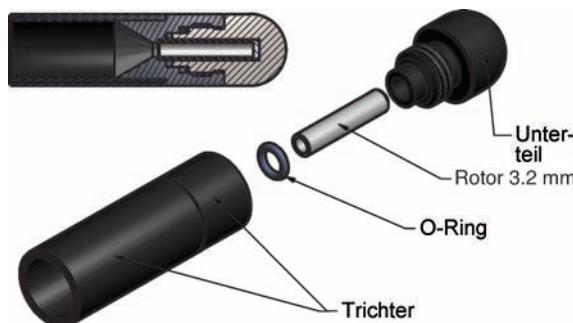


Abbildung 3. Rotorfüllvorrichtung für die Protein sedimentierung mittels Ultrazentrifuge. Der NMR-Rotor wird in den unteren Einsatz platziert, der aus kohlenstofffaserverstärktem Kunststoffmaterial (CFRP) hergestellt ist; auf die Spitze wird der Trichter montiert. Das hier gezeigte Werkzeug passt in die Halterungen eines schwingenden Rotors (Beckman SW 60 Ti) und wurde in eine präparative Ultrazentrifuge vom Typ Beckman Optima LE-80K eingesetzt. In das Werkzeug passt ein Bruker-Rotor mit 3.2 mm Innendurchmesser.

100 kDa bei 200 000 g (und potentiell von 25 kDa bei 500 000 g) sedimentieren. Unter diesen Bedingungen kann ein Rotor vollständig gefüllt werden, vorausgesetzt, dass die Anfangskonzentration im oben beschriebenen Bereich liegt.

Um zu untersuchen, ob das Sediment aus Mikro- oder Nanokristallen besteht, die sich während der Zentrifugation bei allmählich ansteigender Konzentration bilden könnten, haben wir Röntgenstreuungsexperimente am Sediment durchgeführt (siehe Hintergrundinformationen). Wir beobachteten keine kristalline Ordnung.

Mit einem für NMR-spektroskopische Verhältnisse sehr großen Protein, nämlich einem Dodekamer von 708 kDa (12×59 kDa), dessen Röntgenstruktur nicht gelöst ist, konnten wir demonstrieren, dass durch Ultrazentrifugation der Proteinlösung in einen NMR-Rotor eine Festkörper-NMR-Probe hoher Qualität erhalten wird, die sowohl eine hohe Auflösung als auch ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis aufweist. Während von einem sedimentierten kleineren 20-kDa-Protein schon früher Spektren mit hoher Auflösung beobachtet werden konnten,^[6] zeigen wir nun, dass auch die für große Proteine notwendige Empfindlichkeit erzielt werden kann. Die Gel-artige Probe von DnaB weist ein nahezu identisches Spektrum auf wie die mikrokristalline Probe. Kleinere Abweichungen in einigen Peakpositionen können möglicherweise durch unterschiedliche „Kristall“-kontakte erklärt werden. Die Linienbreiten beider Proben sind typisch für gut geordnete Proteine.

Die sedimentierte DnaB-Probe war über mehrere Wochen stabil, und ein Spektrum des Sediments, das einen Monat bei 4 °C aufbewahrt wurde, war identisch mit dem in Abbildung 1 gezeigten Spektrum. Für DnaB eröffnet dies die Möglichkeit, dieses Protein in nicht-kristallinen Formen zu untersuchen (z.B. an DNA gebunden), wenn es in seinem natürlichen Kontext auf die Replikationsgabel geladen ist. Ebenso könnte man diese Art Probenvorbereitung auch für andere Proteine und große Proteinkomplexe einsetzen, z.B. Membranproteine oder Komplexe hiervon in Lipiden oder Tensiden, Viruskapside, Protein/DNA-Komplexe und prä-

fibrilläre Aggregate. Dies eröffnet völlig neue Möglichkeiten für die Protein-NMR-Spektroskopie.

Experimentelles

Probenvorbereitung: Einheitlich [^{13}C , ^{15}N]-isotopenmarkierte DnaB aus *Helicobacter pylori* mit N-terminalem His-tag wurde in *E. coli* überexprimiert. Einheitlich ^{13}C -markierte Glucose und ^{15}N -markiertes Ammoniumchlorid (2 g L⁻¹) in Minimalmedium Typ M9 wurden als einzige Kohlenstoff- bzw. Stickstoffquellen verwendet. Das Protein wurde mit Affinitätschromatographie gereinigt (5 mL Hi Trap HP von GE Healthcare), gefolgt von Anionenaustauschchromatographie (5 mL Hi Trap Q HP von GE Healthcare).

Für die darauffolgende Kristallisierung wurde DnaB auf 16 mg mL⁻¹ eingeengt (Millipore Concentrator, 30-kDa-Cutoff). Kristallisiert wurde, indem gleiche Volumina aus Präzipitationslösung (25 % PEG 2k MME, 0.2 M Magnesiumacetat) und Protein in einer Mikrotiterplatte mit neun Vertiefungen mit 25 mL Präzipitationslösung im Reservoir gemischt wurden. Nach einer Woche bei 20 °C wurden Präzipitat und hexamere Kristalle erhalten. Die Mikrokristalle wurden in den NMR-Rotor zentrifugiert (65 000 g, 16 h, 4 °C).

An der sedimentierten Proteinprobe wurde kein Anionenaustauschschnitt ausgeführt, und das Protein wurde in 250 mM NaCl, pH 8.0, 5 % Glycerol auf 49 mg mL⁻¹ eingeengt. Die Proteinlösung wurde direkt in einen 3.2-mm-Bruker-Rotor ultrazentrifugiert (200 000 g über Nacht 4 °C, Beckman-Rotor SW60.Ti).

Die konzentrierte Proteinlösung für die Kristallisation und die Sedimentierung wurde durch SEC-MALLS-Messungen charakterisiert. Es wurde festgestellt, dass die Lösung sowohl aus Dodekameren (hauptsächlich) als auch aus Aggregaten hiervon besteht. Detaillierte Ergebnisse bei niedrigeren Konzentrationen sind in Lit. [9] dokumentiert, zusammen mit elektronenmikroskopischen Bildern. Die SEC-MALLS-Daten (Hintergrundinformationen) belegen, dass die Massenverteilung nach der Ultrazentrifugation identisch (und ähnlich derjenigen bei niedrigerer Konzentration) war und keine Anzeichen von Zersetzung auftraten.

Festkörper-NMR-Experimente: NMR-Experimente wurden auf einem Bruker-Biospin AVANCE II +-Spektrometer mit 850-MHz-¹H-Frequenz und einem 3.2-mm-Dreifachresonanz(¹H, ¹³C, ¹⁵N)-LLC-Probenkopf (Bruker Biospin) durchgeführt. Die Probentemperatur wurde anhand der chemischen Verschiebung des überstehenden Wassers^[7e] ermittelt und auf 281 K gesetzt. Alle Experimente wurden bei 18 kHz MAS-Frequenz durchgeführt; 90 kHz SPINAL64-Protonenentkopplung wurde eingesetzt.^[11] Für die DARR-Experimente^[12] wurde die Protoneneinstrahlung auf 18 kHz gesetzt. Die Stärke des Protonen- und Kohlenstofffeldes während des ¹H-¹³C-Kreuzpolarisationstransfers war ungefähr 70 bzw. 55 kHz. Die Spektren für die kristalline Probe wurden mit 4 und 22 Scans erhalten, mit 2000 Inkrementen in t_1 . Mit einer Wartezeit zwischen Transienten von 3 s führte dies zu Gesamtaufnahmzeiten von 6.7, bzw. 36.7 h. Die Spektren wurden mit NMRPipe^[13] prozessiert und mit CCPNmr-Analysis^[14] ausgewertet und dargestellt.

Eingegangen am 28. Januar 2012,
veränderte Fassung am 10. April 2012
Online veröffentlicht am 27. Juni 2012

Stichwörter: DnaB · Festkörper-NMR-Spektroskopie · Probenvorbereitung · Proteine · Zentrifugation

[1] a) F. Castellani, B. van Rossum, A. Diehl, M. Schubert, K. Rehbein, H. Oschkinat, *Nature* **2002**, *420*, 98; b) A. Loquet, B. Bardiaux, C. Gardiennet, C. Blanchet, M. Baldus, M. Nilges, T. Malliavin, A. Böckmann, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 3579;

- c) T. Manolikas, T. Herrmann, B. H. Meier, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 3959.
- [2] Y. Han, J. Ahn, J. Concel, I.-J. L. Byeon, A. M. Gronenborn, J. Yang, T. Polenova, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 1976.
- [3] a) C. Wasmer, A. Lange, H. van Melckebeke, A. B. Siemer, R. Riek, B. H. Meier, *Science* **2008**, *319*, 1523; b) H. van Melckebeke, C. Wasmer, A. Lange, E. Ab, A. Loquet, A. Böckmann, B. H. Meier, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 13765; c) A. Petkova, Y. Ishii, J. Balbach, O. Antzutkin, R. Leapman, F. Delaglio, R. Tycko, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 16742–16747; d) A. K. Schütz, A. Soragni, S. Hornemann, A. Aguzzi, M. Ernst, A. Böckmann, B. H. Meier, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 6078; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 5956; e) B. Habenstein, C. Wasmer, L. Bousset, Y. Sourigues, A. Schütz, A. Loquet, B. H. Meier, R. Melki, A. Böckmann, *J. Biomol. NMR* **2011**, *51*, 235; f) C. Wasmer, A. Schütz, A. Loquet, C. Buhtz, J. Greenwald, R. Riek, A. Böckmann, B. H. Meier, *J. Mol. Biol.* **2009**, *394*, 119; g) A. Loquet, L. Bousset, C. Gardiennet, Y. Sourigues, C. Wasmer, B. Habenstein, A. Schütz, B. H. Meier, R. Melki, A. Böckmann, *J. Mol. Biol.* **2009**, *394*, 108.
- [4] S. D. Cady, K. Schmidt-Rohr, J. Wang, C. S. Soto, W. F. Degrado, M. Hong, *Nature* **2010**, *463*, 689.
- [5] a) S. Jehle, M. Falb, J. P. Kirkpatrick, H. Oschkinat, B.-J. van Rossum, G. Althoff, T. Carlomagno, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 3842; b) A. Mainz, S. Jehle, B. J. van Rossum, H. Oschkinat, B. Reif, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 15968.
- [6] a) I. Bertini, F. Engelke, C. Luchinat, G. Parigi, E. Ravera, C. Rosa, P. Turano, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 439; b) I. Bertini, C. Luchinat, G. Parigi, E. Ravera, B. Reif, P. Turano, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 10396.
- [7] a) A. Böckmann, A. Lange, A. Galinier, S. Luca, N. Giraud, M. Juy, H. Heise, R. Montserret, F. Penin, M. Baldus, *J. Biomol. NMR* **2003**, *27*, 323; b) M. Ernst, A. Detken, A. Böckmann, B. H. Meier, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 15807; c) A. Siemer, C. Ritter, M. Steinmetz, M. Ernst, R. Riek, B. H. Meier, *J. Biomol. NMR* **2006**, *34*, 75; d) C. Ritter, M. Maddelein, A. Siemer, T. Luhrs, M. Ernst, B. H. Meier, S. Saupe, R. Riek, *Nature* **2005**, *435*, 844; e) A. Böckmann, C. Gardiennet, R. Verel, A. Hunekeler, A. Loquet, G. Pintacuda, L. Emsley, B. H. Meier, A. Lesage, *J. Biomol. NMR* **2009**, *45*, 319; f) D. Lalli, P. Schanda, A. Chowdhury, J. Retel, M. Hiller, V. A. Higman, L. Handel, V. Agarwal, B. Reif, B. Rossum, U. Akbey, H. Oschkinat, *J. Biomol. NMR* **2011**, *51*, 477.
- [8] T. Kashav, R. Nitharwal, S. A. Abdulrehman, A. Gabdoukhakov, W. Saenger, S. K. Dhar, S. Gourinath, *PLoS ONE* **2009**, *4*.
- [9] M. Stelter, I. Gutsche, U. Kapp, A. Bazin, G. Bajic, G. Goret, M. Jamin, J. Timmins, L. Terradot, *Structure* **2012**, *20*, 554.
- [10] S. Neal, A. M. Nip, H. Zhang, D. S. Wishart, *J. Biomol. NMR* **2003**, *26*, 215.
- [11] B. Fung, A. Khitrik, K. Ermolaev, *J. Magn. Reson.* **2000**, *142*, 97.
- [12] K. Takegoshi, S. Nakamura, T. Terao, *Chem. Phys. Lett.* **2001**, *344*, 631.
- [13] F. Delaglio, S. Grzesiek, G. Vuister, G. Zhu, J. Pfeifer, A. Bax, *J. Biomol. NMR* **1995**, *6*, 277.
- [14] a) W. Vranken, W. Boucher, T. Stevens, R. Fogh, A. Pajon, P. Llinas, E. Ulrich, J. Markley, J. Ionides, E. Laue, *Proteins Struct. Funct. Genet.* **2005**, *59*, 687; b) T. J. Stevens, R. H. Fogh, W. Boucher, V. A. Higman, F. Eisenmenger, B. Bardiaux, B.-J. van Rossum, H. Oschkinat, E. D. Laue, *J. Biomol. NMR* **2011**, *51*, 437.