

NMR-Spektroskopie an löslichen Proteinkomplexen mit Molekulargewicht im Mega-Dalton-Bereich**

Andi Mainz, Tomasz L. Religa, Remco Sprangers, Rasmus Linser, Lewis E. Kay und Bernd Reif*

Die magnetische Kernresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie) ist eine sehr vielseitige Methode für die Untersuchung der Struktur und Dynamik von Biomolekülen in Lösung.^[1,2] Allerdings kommt es mit zunehmendem Molekulargewicht zu einer erheblichen Verbreiterung der Signallinien und damit zu erheblichen Einbußen bei Empfindlichkeit und Auflösung. Die Linienverbreiterung ist zurückzuführen auf lange Rotationskorrelationszeiten τ_c , die eine effiziente transversale Relaxation begünstigen.^[3] Diese nachteiligen Relaxationseffekte können teilweise durch die Anwendung der transverse relaxation-optimized spectroscopy (TROSY) vermieden werden. Die Methode beruht auf einer gegenseitigen Auslöschung verschiedener Relaxationsmechanismen und ermöglicht die Selektion von langsam relaxierenden Multiplett Komponenten.^[4,5] TROSY-Methoden haben es so ermöglicht, supramolekulare Komplexe wie GroEL-GroES,^[6] p53/Hsp90,^[7] den ATPase-Motor SecA,^[8] ClpP^[9] oder das 20S-Proteasom^[10,11] zu charakterisieren. Dennoch ist die Anwendbarkeit der Lösungs-NMR-Spektroskopie selbst unter Verwendung sehr starker Magnetfelder durch die sehr langsame rotatorische Diffusion großer Moleküle streng limitiert. Dies gilt besonders für die Signalzuordnung des Proteinrückgrats für Komplexe jenseits der 80 kDa. Typischerweise werden daher Methylgruppen-basierte Experimente für sehr große Systeme durchgeführt, da der Einfluss der langsamen Molekularbewegung durch die schnelle Rotation der Methylgruppen teilweise aufgehoben wird.^[5]

Bei der Festkörper-NMR-Spektroskopie mit Probenrotation im magischen Winkel (magic-angle spinning, MAS) lässt man immobilisierte Proben mit hoher Geschwindigkeit

rotieren. Die Probe befindet sich dabei in einem zylindrischen Rotor, der um den magischen Winkel Θ_{MA} von 54.74° relativ zum äußeren Magnetfeld des NMR-Spektrometers geneigt ist.^[12] Durch MAS werden kohärente anisotrope Wechselwirkungen wie die dipolare Kopplung oder die chemische Verschiebungsanisotropie refokussiert und somit schmale Signallinien erzielt. Ein wichtiger Aspekt hierbei ist, dass die Linienbreite in der MAS-Festkörper-NMR-Spektroskopie unabhängig vom Molekulargewicht des betrachteten Proteins ist. Allerdings sind, wie der Name bereits impliziert, rigide Festkörper für den Erfolg des Experiments unabdingbar, und aufwendige Kristallisations- und Präzipitationsprozeduren für Biomoleküle unter potenziell nicht-nativen Bedingungen sind demnach erforderlich. Wir konnten bereits zeigen, dass große Proteinkomplexe, die in gelöster Form in den MAS-Rotor gefüllt werden, mithilfe von MAS-NMR-Spektroskopie untersucht werden können.^[13,14] Wir bezeichneten diesen Ansatz als FROSTY-MAS-NMR-Spektroskopie (FROSTY = freezing rotational diffusion of protein solutions at low temperature and high viscosity). Dies sollte verdeutlichen, dass die rotatorische Reorientierung des Proteinkomplexes während des MAS-Experiments unterdrückt ist.^[13] Wir spekulierten, dass die hohe Proteinkonzentration möglicherweise zu molecular crowding führen und somit Festkörper-NMR-spektroskopische Techniken erleichtern könnte.^[13] Bertini et al. konnten daraufhin zeigen, dass die starken Zentrifugalkräfte während des MAS-Experiments eine reversible Proteinsedimentation induzieren (SedNMR).^[15] Die dichte Packung der Proteinmoleküle an der Innenwand des MAS-Rotors beeinträchtigt demnach die rotatorische Molekularbewegung. Letztere findet ohne MAS-Bedingungen auf

[*] Dr. A. Mainz, Prof. Dr. B. Reif
Munich Center for Integrated Protein Science (CIPS-M) am-
Department Chemie, Technische Universität München
Lichtenbergstraße 4, 85747 Garching (Deutschland)
E-Mail: reif@tum.de

Dr. A. Mainz, Prof. Dr. B. Reif
Helmholtz-Zentrum München (HMGU)
Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt
Neuherberg (Deutschland)

Dr. A. Mainz, Prof. Dr. B. Reif
Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP)
Berlin (Deutschland)

Dr. T. L. Religa, Prof. Dr. L. E. Kay
University of Toronto, Department of Medical Genetics and
Microbiology (Kanada)

Prof. Dr. L. E. Kay
Program in Molecular Structure and Function
Hospital for Sick Children, Toronto (Kanada)

Dr. R. Sprangers
MPI für Entwicklungsbiologie, Tübingen (Deutschland)

Dr. R. Linser
Harvard Medical School, Department of Biological Chemistry and
Molecular Pharmacology, Boston (USA)

Dr. R. Linser
School of Chemistry, UNSW, Sydney (Australien)

[**] Diese Arbeit wurde von der DFG (SFB-1035/Projekt B07) ermög-
licht. Dank gilt auch der Leibniz-Gemeinschaft, der Helmholtz-Ge-
meinschaft, der DFG (Re1435) sowie dem CIPS-M (A.M., B.R.) für
finanzielle Unterstützung. Diese Arbeit wurde von der Max-Planck-
Gesellschaft (R.S.) und den Canadian Institutes of Health Research
(T.L.R., L.E.K.) gefördert. R.L. wurde durch einen Australian Rese-
arch Council Discovery Early Career Research Award unterstützt.

einer Zeitskala von wenigen Mikrosekunden statt.^[16] Hier demonstrieren wir, dass der FROSTY-MAS-Ansatz die konventionelle Probenpräparation für die Festkörper-NMR-Spektroskopie stark vereinfacht und dass er Protonen-detektierte, Proteinrückgrat-basierte NMR-spektroskopische Experimente für sehr große Proteinkomplexe unter nativen Bedingungen ermöglicht. Damit wird die Molekulargewichtsgrenze der traditionellen Lösungs-NMR-Spektroskopie überwunden.

Die hier gezeigten Daten wurden für den Proteasomkomplex erhalten, der für die Aufrechterhaltung der Proteinomöostase und der zellulären Viabilität essenziell ist.^[17] Das 20S-Proteasom von *Thermoplasma acidophilum* und sein modularer Aufbau eignen sich hervorragend, um das FROSTY-Konzept zu demonstrieren. Die α -Untereinheit (26 kDa) des Proteasoms bildet in Lösung heptamere Ringstrukturen, die sich zu Doppelringen zusammenfügen ($\alpha_7\alpha_7$, 360 kDa; Abbildung 1). Das Vorhandensein der β -Untereinheit induziert die Bildung des nativen Proteasompartikels $\alpha_7\beta_7\alpha_7$ (670 kDa) mit einer fassförmigen Struktur aus vier Ringen (Abbildung 1).^[18,19] Der 11S- $\alpha_7\beta_7\alpha_7$ -11S-Komplex (1.1 MDa) wird durch die Interaktion mit zwei heptameren 11S-Aktivatoren von *Trypanosoma brucei* gebildet, die beide Seiten der $\alpha_7\beta_7\alpha_7$ -Tonne deckelartig verschließen (Abbildung 1).^[18,19] Es sollte erwähnt werden, dass in unseren NMR-spektroskopischen Experimenten lediglich die α -Unterein-

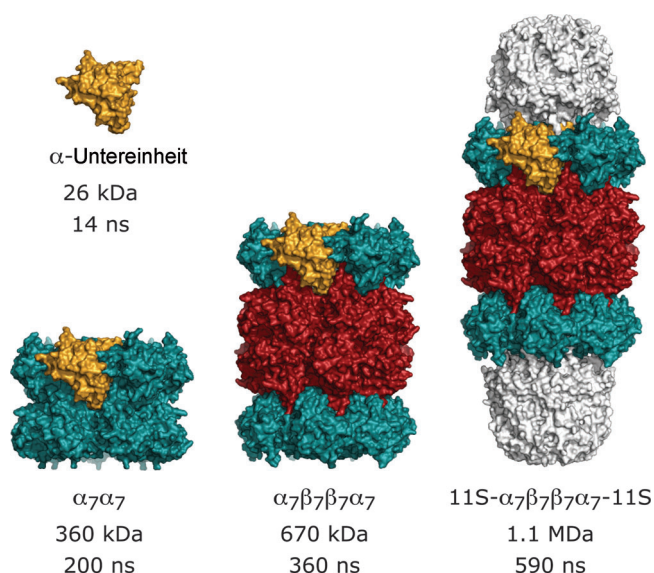


Abbildung 1. Die modulare Architektur des archaischen 20S-Proteasoms. Seitenansicht von verschiedenen Proteasomspezies von *Thermoplasma acidophilum*^[18] und *Trypanosoma brucei*^[19] mit der Angabe ihres Molekulargewichts und der Rotationskorrelationszeit τ_c (berechnet für 30 °C). Die heptameren Ringe der α -, β - und 11S-Untereinheiten sind in Grün, Rot und Weiß dargestellt. Eine der α -Untereinheiten ist jeweils orange hervorgehoben. In den NMR-spektroskopischen Experimenten lag lediglich die α -Untereinheit isotopenmarkiert vor.

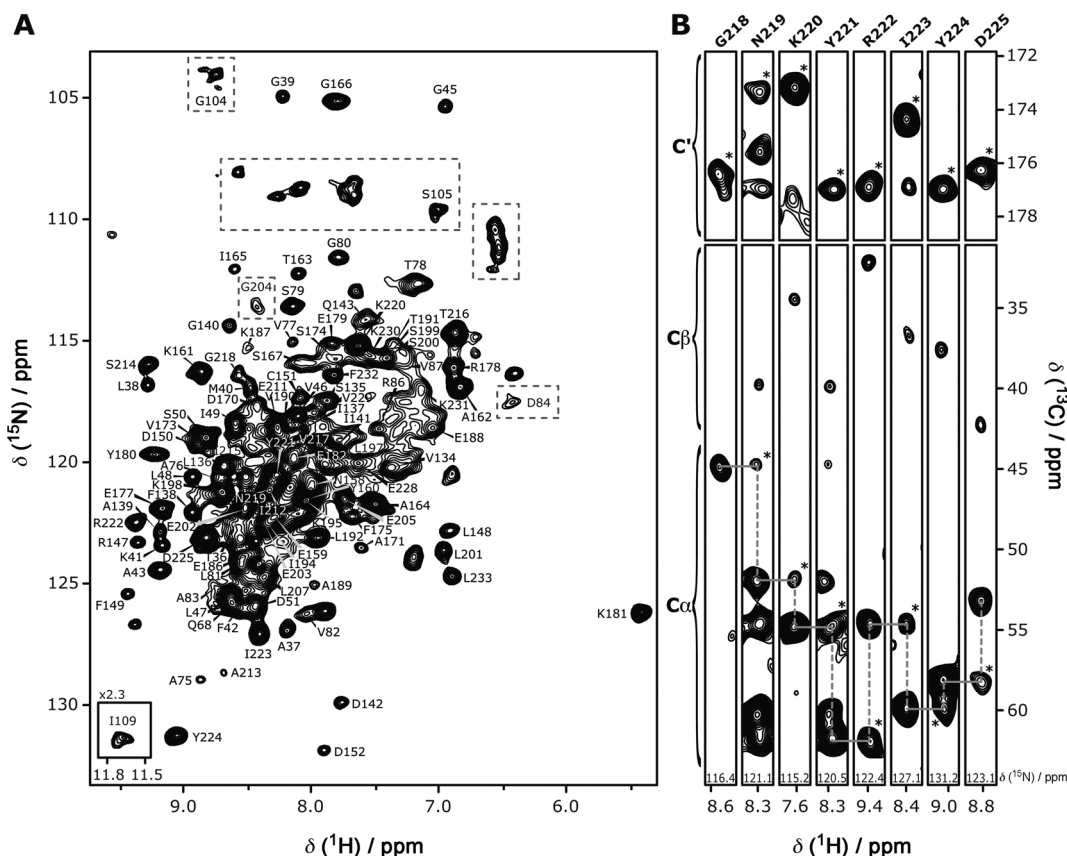


Abbildung 2. Signalzuordnung der Proteasom- α -Untereinheit im 1.1-MDa-11S- $\alpha_7\beta_7\alpha_7$ -11S-Komplex durch FROSTY-MAS-NMR-Spektroskopie. A) 2D- ^1H - ^{15}N -Korrelationsspektrum mit Signalzuordnungen.^[30] Zur besseren Darstellung sind die Signale innerhalb der Kästchen bei niedrigeren Konturen dargestellt (2.3-fach). Der Signalbereich von I109 ist zusätzlich eingefügt (Kästchen links unten). B) 2D-Projektionen aus den 3D-hCOhNH- und 3D-hCAhNH-Spektren (Pulssequenz adaptiert von Lit. [24], siehe Abbildung S5 der Hintergrundinformationen). Sie zeigen die $\text{C}\alpha$ -, $\text{C}\beta$ - und Carbonylsignale für die Reste G218–D225. Interresiduale Kontakte zum vorhergehenden Rest sind durch Sterne markiert.

heit mit ^{13}C und ^{15}N isotonenmarkiert vorlag. Während also ausschließlich die α -Untereinheit beobachtet wurde, konnte das Molekulargewicht des Proteasomkomplexes durch die Zugabe der NMR-inaktiven β -Untereinheit und des 11S-Aktivators sukzessive erhöht werden.

Für die MAS-NMR-spektroskopischen Experimente wurden hochkonzentrierte Proteinlösungen ohne weitere Behandlung direkt verwendet. Trotz seines hohen Molekulargewichts von 1.1 MDa wurden vom 11S- $\alpha_7\beta_7\alpha_7$ -11S-Komplex hochaufgelöste 2D- ^1H - ^{15}N -Korrelationsspektren erhalten (Abbildung 2A). Die Linienbreiten bewegen sich dabei um die 40 Hz (^1H) und 20 Hz (^{15}N), was durchaus mit der Auflösung von kristallinen Modellsystemen vergleichbar ist.^[20] Es wurden Protonen-detektierte Experimente durchgeführt, da die Empfindlichkeit der NMR-Spektroskopie proportional zu $\gamma^{3/2}$ ist, wobei γ das gyromagnetische Verhältnis des beobachteten Kerns darstellt ($\gamma_{^1\text{H}} \approx 4 \gamma_{^{13}\text{C}} \approx 10 \gamma_{^{15}\text{N}}$). Zu diesem Zweck wurden Proteasomproben verwendet, die,

bei vollständiger Deuterierung der nicht austauschbaren Gruppen, lediglich einen Amidprotonierungsgrad von ca. 20 % aufwiesen.^[20] In der Lösungs-NMR-Spektroskopie wird die Deuterierung genutzt, um unerwünschte Relaxationsmechanismen zu unterdrücken.^[21] Im Festkörper reduziert die Deuterierung das starke dipolare ^1H - ^1H -Kopplungsnetzwerk und vereinfacht die MAS-induzierte Verschmälerung von Signallinien. Des Weiteren wurde die paramagnetische Substanz Cu^{II} -EDTA eingesetzt,^[22,23] um die Datenakquirierung um einen Faktor > 10 zu beschleunigen (siehe Hintergrundinformationen).

Wir konnten eine signifikante Verbesserung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses mit zunehmendem Molekulargewicht des Proteasomkomplexes beobachten (Abbildung 3). Wir weisen darauf hin, dass bei einer MAS-Rate von 22 kHz eine vollständige Sedimentation ($> 97\%$) für alle drei betrachteten Proteasomkomplexe zu erwarten ist (siehe Hintergrundinformationen). Der Empfindlichkeitsanstieg kann

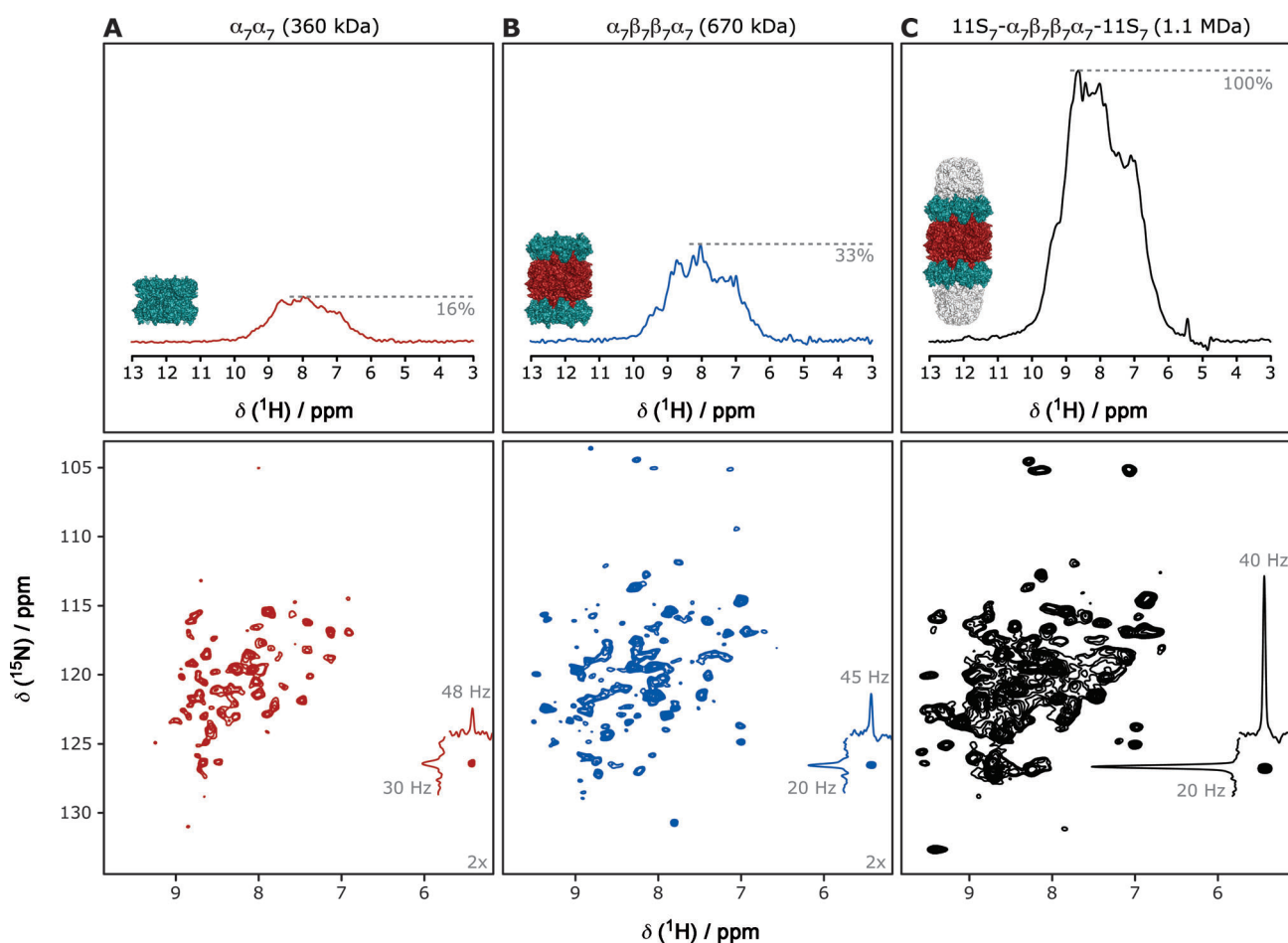


Abbildung 3. Protonen-detektierte MAS-Experimente und der Einfluss des Molekulargewichts. Abgebildet sind 2D- ^1H - ^{15}N -Korrelationsspektren (unten) basierend auf Kreuzpolarisation (CP) und die dazugehörigen 1D-Versionen (oben) von dem 360-kDa- $\alpha_7\alpha_7$ (A), dem 670-kDa- $\alpha_7\beta_7\alpha_7$ (B) und dem 1.1-MDa-11S- $\alpha_7\beta_7\alpha_7$ -11S-Komplex (C). Die Spektren wurden aufgenommen bei 0 °C und 22 kHz MAS. Akquisitions- und Prozessierungsparameter sind identisch. Die verwendete Konzentration der NMR-aktiven α -Untereinheit betrug 3.3 mM ($\alpha_7\alpha_7$), 1.9 mM ($\alpha_7\beta_7\alpha_7$) und 3.0 mM (11S- $\alpha_7\beta_7\alpha_7$ -11S). Die Signalintensitäten der ^{15}N -gefilterten ^1H -1D-Spektren wurden normiert, um die verschiedenen Konzentrationen der α -Untereinheit zu berücksichtigen. Die Konturen der 2D-Spektren wurden bei 8σ (A, B) und 16σ (C) mit Bezug auf das Rauschniveau gezeichnet. 1D-Projektionen des K181-Kreuzsignals sowie die entsprechenden ^1H - und ^{15}N -Linienbreiten bei halber Höhe sind angegeben (rechts unten). Die durchschnittlichen ^1H - und ^{15}N -Linienbreiten (zehn repräsentative Kreuzsignale) betragen (68 ± 18) Hz und (35 ± 7) Hz ($\alpha_7\alpha_7$), (54 ± 11) Hz und (24 ± 4) Hz ($\alpha_7\beta_7\alpha_7$) sowie (48 ± 8) Hz und (22 ± 1) Hz (11S- $\alpha_7\beta_7\alpha_7$ -11S).

daher offenbar auf eine eingeschränkte rotatorische Mobilität der größeren Komplexe im Sediment, möglicherweise wegen eines Self-Crowding-Effekts, zurückgeführt werden. Dies ist vermutlich auch der Grund für die verbesserte Auflösung in den ^1H - und ^{15}N -Dimensionen bei höherem Molekulargewicht (Abbildung 3). Die Beobachtungen implizieren demzufolge, dass ein hohes Molekulargewicht in FROSTY-MAS-Experimenten mit einer Verbesserung der spektralen Auflösung und Empfindlichkeit einhergeht. Ein möglicher Einfluss durch differentielle interne Dynamik der drei Komplexe kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

$2\text{D-}^1\text{H-}^{13}\text{C}$ -Korrelationsspektren von deuteriertem $\alpha_7\alpha_7$ mit spezifisch protonierten Methylgruppen von Isoleucinen, Leucinen und Valinen (siehe Hintergrundinformationen) zeigen ein vergleichbares Signalmuster zu Lösungs-NMR-Spektroskopiedaten, weisen jedoch eine geringere Auflösung auf (Abbildung S1 der Hintergrundinformationen). Resonanzen des Proteinerückgrats sind durch die MAS-Methode stärker begünstigt als die der schnell rotierenden Methylgruppen, die moderate transversale Relaxationsraten in der Lösungs-NMR-Spektroskopie aufweisen.^[5]

Der positive Einfluss des Molekulargewichts auf die spektrale Auflösung und Empfindlichkeit manifestiert sich besonders deutlich in ^{13}C -detektierten Experimenten. Trotz der geringeren Konzentration von $\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$ (2.3 mM α -Untereinheit) gegenüber der des $\alpha_7\alpha_7$ -Doppelrings (3.5 mM α -Untereinheit) zeigt das $2\text{D-}^{13}\text{C-}^{13}\text{C}$ -Korrelationsspektrum von $\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$ weitaus mehr Resonanzsignale bei besserer Auflösung (Abbildung 4 A,B).

Unterschiede in den Aufbaukurven der Kreuzpolarisation (CP)^[25,26] deuten auf eine erhöhte Austauschdynamik für den kleineren $\alpha_7\alpha_7$ -Komplex hin (Abbildung 4C). Außer auf interne dynamische Prozesse könnte dies auch auf residuale Rotationsbewegungen des $\alpha_7\alpha_7$ -Partikels im MAS-induzierten Sediment zurückzuführen sein. Die Empfindlichkeit wie auch die Auflösung der Spektren werden demzufolge beeinträchtigt. Um dem molekulargewichtsabhängigen Anstieg der FROSTY-Signalintensitäten durch mögliche Proteinbewegungen im Nano- bis Mikrosekundenbereich nachzugehen, wurden TROSY-basierte $^1\text{H-}^{15}\text{N}$ -Korrelationsspektren für das deuterierte 11S- $\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$ -11S aufgenommen. Es wurde bereits für Festkörperproben gezeigt, dass dieses Experiment bessere Transfereigenschaften hat, wenn Proteinregionen auf einer solchen Zeitskala Bewegungen vollführen.^[27] Für 11S- $\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$ -11S konnte jedoch keine Qualitätsverbesserung der FROSTY-Spektren erzielt werden (Abbildung S2 B,C der Hintergrundinformationen). Des Weiteren wurden in Experimenten, die auf skalarer Kopplung beruhen, nur sechs zusätzliche Kreuzsignale beobachtet (Abbildung S2 A der Hintergrundinformationen). Wir können daher einen wesentlichen Einfluss von schnellen/intermediären Proteinbewegungen für die gezeigten Experimente ausschließen.

Der Vergleich des CP-basierten $^1\text{H-}^{15}\text{N}$ -Korrelationsspektrums von 11S- $\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$ -11S mit dem Lösungs-NMR- $^1\text{H-}$

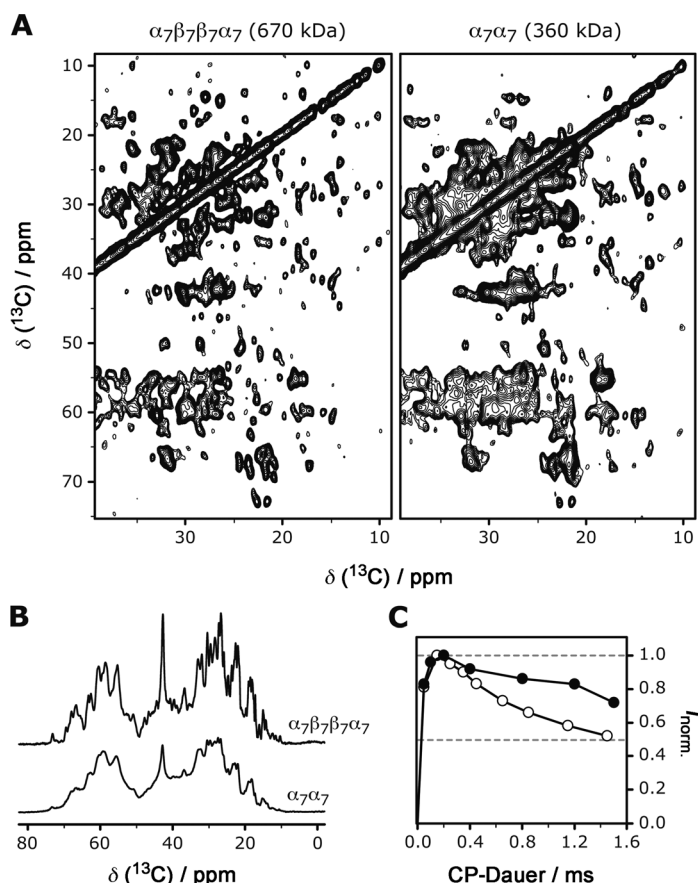


Abbildung 4. Verbesserung der spektralen Auflösung und Empfindlichkeit mit steigendem Molekulargewicht, demonstriert für die Proteasomkomplexe $\alpha_7\alpha_7$ (360 kDa) und $\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$ (670 kDa). A) Aliphatische Region der $2\text{D-}^{13}\text{C-}^{13}\text{C}$ -Korrelationsspektren unter nahezu identischen experimentellen Bedingungen, mit der Ausnahme, dass das Spektrum von $\alpha_7\alpha_7$ doppelt so lang akkumuliert wurde. Die Monomerkonzentration der α -Untereinheit betrug 3.5 mM ($\alpha_7\alpha_7$) und 2.3 mM ($\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$). Zum besseren Vergleich sind beide Spektren bei 4 σ mit Bezug auf das Rauschniveau dargestellt. B) Aliphatische Region von $1\text{D-}^{13}\text{C}$ -Spektren, wobei die korrigierten Signalintensitäten bereits die verschiedenen Konzentrationen berücksichtigen. Die Spektren wurden mit identischen Akquisitions- und Prozessierungsparametern ausgewertet. C) CP-Aufbaukurven für die gesamte aliphatische Region der $1\text{D-}^{13}\text{C}$ -Spektren von $\alpha_7\alpha_7$ (\circ) und $\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$ (\bullet).

^{15}N -TROSY-Spektrum des heptameren Konstrukts α_7 (180 kDa)^[11] zeigt eine hohe Ähnlichkeit der Signalmuster für die beiden Probenpräparationen (Abbildung S3 der Hintergrundinformationen). Für den 11S- $\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$ -11S-Komplex konnten 130 Kreuzsignale detektiert werden, wobei die Sequenz der α -Untereinheit 233 Aminosäuren umfasst. Allerdings konnten auch für das α_7 -Konstrukt lediglich 145 Amidsignale beobachtet und zugeordnet werden.^[11] In beiden Fällen können demnach viele Signale aufgrund von Linienverbreiterung durch chemische Austauschprozesse nicht detektiert werden. Eine Temperaturerhöhung von 0 auf 30 °C führt zu einer signifikanten Linienverschmälerung mehrerer Signale (z. B. I109, G166, Y224) von 11S- $\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$ -11S (Abbildung S4 der Hintergrundinformationen). Dies widerspricht dem allgemeinen Trend, dass die Signalintensität in dipolaren FROSTY-MAS-Experimenten mit einer Temperaturverringern steigt.

Für die Signalzuordnung der α -Untereinheit im Kontext des 11S- $\alpha_7\beta_7\alpha_7$ -11S-Komplexes wurden weitreichende CP-Kontakte genutzt, um die initiale ^1H -Magnetisierung direkt auf benachbarte ^{13}C -Kerne, also C α und C', zu übertragen (Abbildung S5 der Hintergrundinformationen). Repräsentative 2D-Projektionen aus den 3D-hCAhNH- und 3D-hCOhNH-Spektren sind in Abbildung 2B dargestellt (siehe Abbildung S5C der Hintergrundinformationen für Signalzu-Rausch-Verhältnisse). Diese Experimente stellen die dipolaren Analoga zu den Lösungs-NMR-spektroskopischen Experimenten HNCA und HNCOC dar. Die Auswertung der 3D-Spektren lieferte Proteinrückgrat-Signalzuordnungen für 108 von 227 Nicht-Prolin-Resten (Abbildung 2A).^[30] Interresiduale Kontakte wurden hauptsächlich im hCAhNH-Spektrum beobachtet und ermöglichten eine sequenzielle Zuordnung des Proteinrückgrats (Abbildung 2B). Weiterhin konnte das Vorhandensein von intraresidualen C β -Korrelationen im hCAhNH-Spektrum zur Validierung der identifizierten Reste genutzt werden (Abbildung 2B). In zukünftigen Studien kann die Verwendung von ^{13}C - ^{13}C -Mischsequenzen zusätzliche Seitenketteninformationen liefern. Die Signalzuordnung wurde durch den Vergleich mit Lösungs-NMR-Spektroskopiedaten des α_7 -Konstrukts gestützt und verifiziert.^[11]

Die Mehrheit der nichtdetektierten Reste befindet sich in den Regionen M1–S35, K52–V74, L88–Y103 und E110–G133 (Abbildung 5A). Diese Bereiche umfassen den N-Terminus und den so genannten α -Annulus, die den Eingang in das Lumen des Proteasoms blockieren, sowie die Interaktionsfläche mit der β -Untereinheit (Abbildung 5B). Auch in den Lösungs-NMR-spektroskopischen Studien am isolierten α_7 -Ring waren diese Regionen aufgrund von interner Dynamik im Millisekundenregime nicht detektierbar.^[10,11] Trotz dieser chemischen Austauschprozesse war es dennoch in einzelnen Fällen möglich, die Interaktionen der Untereinheiten durch chemische Verschiebungsänderungen zu verfolgen. Beispielsweise induziert die Anbindung des 11S-Aktivators an $\alpha_7\beta_7\alpha_7$ chemische Verschiebungsänderungen insbesondere

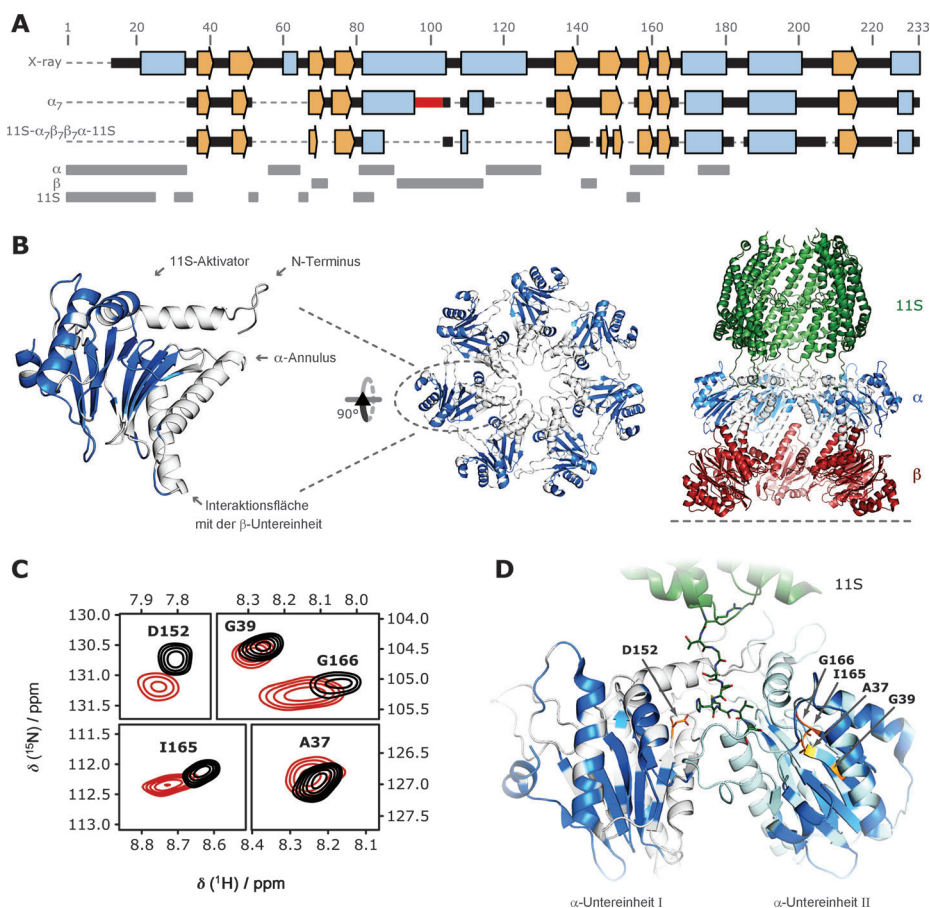


Abbildung 5. Intermolekulare Kontakte im Proteasomkomplex. A) Die Sekundärstruktur der Proteasom- α -Untereinheit aus Röntgenstrukturuntersuchungen (oben).^[19] Die Ergebnisse der ^{13}C -chemischen Verschiebungsanalyse von TROSY- sowie FROSTY-beobachteten Resten des α_7 -^[11] bzw. 11S- $\alpha_7\beta_7\alpha_7$ -11S-Komplexes sind darunter abgebildet. Sekundärstrukturelemente sind dargestellt in Blau (α -Helix), Orange (β -Strang) oder Schwarz (andere). Gestrichelte Linien repräsentieren nicht zugeordnete Reste (ca. 20 Kreuzsignale) oder nicht beobachtbare Reste. Die entfernte Sequenz im α_7 -Konstrukt, die die Assoziation zweier heptamerer Ringe verhindert, ist rot hervorgehoben.^[11] Regionen innerhalb der α -Untereinheit, die an der Interaktion zwischen den α -Untereinheiten selbst sowie mit der β -Untereinheit und dem 11S-Aktivator beteiligt sind, wurden durch graue Balken markiert (unten). B) Reste der α -Untereinheit, die im Kontext des 11S- $\alpha_7\beta_7\alpha_7$ -11S-Komplexes mithilfe von FROSTY-MAS-NMR-Spektroskopie zugeordnet wurden, sind hervorgehoben (blau). Der N-Terminus und der α -Annulus sowie die Interaktionsflächen mit der β -Untereinheit (rot) und dem 11S-Aktivator (grün) sind gekennzeichnet. Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist die Vorderseite des Komplexes nicht gezeigt (rechts). C) Ausschnitte aus den 2D- ^1H - ^{15}N -Korrelationspektren von $\alpha_7\beta_7\alpha_7$ (schwarz) und 11S- $\alpha_7\beta_7\alpha_7$ -11S (rot), die die chemischen Verschiebungsänderungen bei Anbindung des 11S-Aktivators veranschaulichen. Die betroffenen Signale sind beschriftet und entsprechend in Orange hervorgehoben (D). Die Interaktionsfläche zwischen dem 11S-Aktivator (grün) und zwei α -Untereinheiten (weiß und türkis) ist dargestellt.^[19]

für die Reste D152, I165 und G166, die sich in unmittelbarer Nähe zur Bindungsstelle des 11S-Aktivators befinden (Abbildung 5C,D). Darüber hinaus ermöglichte die Analyse der ^{13}C -chemischen Verschiebungen eine Vorhersage von Sekundärstrukturelementen der α -Untereinheit. Abbildung 5A illustriert die erhaltenen Sekundärstrukturelemente für α_7 ^[11] und 11S- $\alpha_7\beta_7\alpha_7$ -11S. Die beiden Prognosen sind kongruent und zudem in sehr guter Übereinstimmung mit der Röntgenstruktur.^[19]

Der FROSTY-MAS-Ansatz in Kombination mit Proteindeuterierung, Protonendetektion und paramagnetischer Relaxationsverstärkung hat es uns ermöglicht, Rückgratsi-

gnale innerhalb des 11S- $\alpha_7\beta_7\alpha_7$ -11S-Proteasomkomplexes mit einem Molekulargewicht von 1.1 MDa zu detektieren und zuzuordnen. Sequenzielle Signalzuordnungen können demnach für große Proteinkomplexe erhalten werden, die sonst wegen ihrer sehr langsamen rotatorischen Diffusion nicht zugänglich für die traditionelle Lösungs-NMR-Spektroskopie sind. Des Weiteren konnten wir konsistente Sekundärstrukturinformationen extrahieren sowie die Interaktionen zwischen den Untereinheiten verfolgen. Im Unterschied zu konventioneller Lösungs-NMR-Spektroskopie beobachten wir eine Verbesserung der Spektrenqualität mit zunehmendem Molekulargewicht. Die für die MAS-Festkörper-NMR-Spektroskopie zwingend erforderliche Proteinimmobilisierung wird durch die MAS-Methode selbst gewährleistet, wodurch jegliche Probenmanipulation umgangen wird.^[13,15] Wie bereits gezeigt wurde, kann die Empfindlichkeit durch direkte Ultrazentrifugation in den MAS-Rotor drastisch verbessert werden.^[28,29] Die hier beschriebene Methode kann problemlos auf andere Komponenten des Proteasoms sowie generell auf große Proteinkomplexe übertragen werden und schafft so die Voraussetzung für Struktur- und Dynamikuntersuchungen von supramolekularen Maschinen auf atomarer Ebene.

Eingegangen am 11. Februar 2013,
veränderte Fassung am 30. April 2013
Online veröffentlicht am 19. Juli 2013

Stichwörter: Magischer Winkel · Molekulargewichtsgrenze · NMR-Spektroskopie · Proteine · Sedimentation

- [1] K. Wüthrich, *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, Wiley, New York, **1986**.
- [2] A. G. Palmer, J. Williams, A. McDermott, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 13293–13310.
- [3] J. Cavanagh, W. J. Fairbrother, A. G. Palmer III, N. J. Skelton, M. Rance, *Protein NMR Spectroscopy, Principles and Practice*, 2. Aufl., Academic Press, Burlington, **2006**.
- [4] K. Pervushin, R. Riek, G. Wider, K. Wüthrich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 12366–12371.
- [5] V. Tugarinov, P. M. Hwang, J. E. Ollerenshaw, L. E. Kay, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 10420–10428.
- [6] J. Fiaux, E. B. Bertelsen, A. L. Horwich, K. Wüthrich, *Nature* **2002**, *418*, 207–211.
- [7] S. Rudiger, S. M. V. Freund, D. B. Veprintsev, A. R. Fersht, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 11085–11090.
- [8] I. Gelis, A. M. J. J. Bonvin, D. Keramisanou, M. Koukaki, G. Gouridis, S. Karamanou, A. Economou, C. G. Kalodimos, *Cell* **2007**, *131*, 756–769.
- [9] R. Sprangers, A. Gribun, P. M. Hwang, W. A. Houry, L. E. Kay, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 16678–16683.
- [10] R. Sprangers, L. E. Kay, *Nature* **2007**, *445*, 618–622.
- [11] R. Sprangers, X. Li, X. Mao, J. L. Rubinstein, A. D. Schimmer, L. E. Kay, *Biochemistry* **2008**, *47*, 6727–6734.
- [12] E. R. Andrew, A. Bradbury, R. G. Eades, *Nature* **1958**, *182*, 1659.
- [13] A. Mainz, S. Jehle, B. J. van Rossum, H. Oschkinat, B. Reif, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 15968–15969.
- [14] A. Mainz, B. Bardiaux, F. Kuppler, G. Multhaupt, I. C. Felli, R. Pierattelli, B. Reif, *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 1128–1138.
- [15] I. Bertini, C. Luchinat, G. Parigi, E. Ravera, B. Reif, P. Turano, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 10396–10399.
- [16] E. Ravera, G. Parigi, A. Mainz, T. L. Religa, B. Reif, C. Luchinat, *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117*, 3548–3553.
- [17] W. Baumeister, J. Walz, F. Zühl, E. Seemüller, *Cell* **1998**, *92*, 367–380.
- [18] J. Löwe, D. Stock, B. Jap, P. Zwickl, W. Baumeister, R. Huber, *Science* **1995**, *268*, 533–539.
- [19] A. Förster, E. I. Masters, F. G. Whitby, H. Robinson, C. P. Hill, *Mol. Cell* **2005**, *18*, 589–599.
- [20] V. Chevelkov, K. Rehbein, A. Diehl, B. Reif, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 3963–3966; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 3878–3881.
- [21] D. Nietlispach, R. T. Clowes, R. W. Broadhurst, Y. Ito, J. Keeler, M. Kelly, J. Ashurst, H. Oschkinat, P. J. Dommelle, E. D. Laue, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 407–415.
- [22] R. Linser, V. Chevelkov, A. Diehl, B. Reif, *J. Magn. Reson.* **2007**, *189*, 209–216.
- [23] N. P. Wickramasinghe, S. Parthasarathy, C. R. Jones, C. Bhardwaj, F. Long, M. Kotecha, S. Mehboob, L. W.-M. Fung, J. Past, A. Samoson, Y. Ishii, *Nat. Methods* **2009**, *6*, 215–218.
- [24] R. Linser, *J. Biomol. NMR* **2012**, *52*, 151–158.
- [25] S. R. Hartmann, E. L. Hahn, *Phys. Rev.* **1962**, *128*, 2042–2053.
- [26] A. Pines, M. G. Gibby, J. S. Waugh, *J. Chem. Phys.* **1973**, *59*, 569–590.
- [27] R. Linser, U. Fink, B. Reif, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 8891–8893.
- [28] I. Bertini, F. Engelke, C. Luchinat, G. Parigi, E. Ravera, C. Rosa, P. Turano, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 439–447.
- [29] C. Gardiennet, A. K. Schütz, A. Hunkeler, B. Kunert, L. Terra-dot, A. Böckmann, B. H. Meier, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 7977–7980; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 7855–7858.
- [30] Die chemischen Verschiebungen und Signalzuordnungen der α -Untereinheit im 11S- $\alpha_7\beta_7\alpha_7$ -11S-Komplex wurden in der BMRB unter dem Zugangscode 19194 hinterlegt.