

# Ortsaufgelöste Festkörper-NMR-Studien am „Trigger-Faktor“ im Komplex mit der großen ribosomalen 50S-Untereinheit\*\*

Emeline Barbet-Massin, Chih-Ting Huang, Venita Daebel, Shang-Te Danny Hsu und Bernd Reif\*

**Abstract:** Verschiedene Aspekte der Funktionsweise des Ribosomes sind trotz der Verfügbarkeit hochauflöster Röntgenstrukturen bislang nicht gut verstanden. Wir zeigen erste Festkörper-NMR-Daten, die an einem prokaryotischen Ribosomkomplex aufgenommen wurden. Wir beobachten definierte Veränderungen der chemischen Verschiebung und Linienverbreiterungen von Rückgratamid-Resonanzen in den Bereichen von „Trigger-Faktor“, die an der Bindung beteiligt sind. Die Kombination von Protonendetektion und hohen MAS-Frequenzen (60 kHz) macht die Untersuchung dieses großen asymmetrischen Proteinkomplexes (1.4 MDa) möglich. Die gezeigten Ergebnisse eröffnen neue Perspektiven für die Untersuchung des Funktionsmechanismus großer molekularer Maschinen.

Kernspinresonanz(NMR)-Spektroskopie hat sich in den vergangenen Jahren zu einer Schlüsselmethode in der Strukturbioologie entwickelt, die komplementäre Daten zu Röntgenkristallographie und Elektronenmikroskopie (EM) liefert. In der Tat ist NMR-Spektroskopie die einzige Methode, die Informationen über strukturelle und dynamische Aspekte von Biomolekülen *in vitro* und *in vivo* auf atomarer Ebene liefern kann. Neben der Lösungs-NMR-Spektroskopie<sup>[1]</sup> hat

sich Festkörper-NMR-Spektroskopie in jüngerer Zeit zu einer leistungsfähigen Alternative entwickelt, um biologische Systeme wie Amyloidfibrillen,<sup>[2]</sup> membranassoziierte Proteine<sup>[3]</sup> oder virale Kapside<sup>[4]</sup> zu charakterisieren, die anderweitig nicht mit atomarer Auflösung untersucht werden können. Insbesondere haben ultraschnelle Drehung um den magischen Winkel („magic angle spinning“, MAS) und Protonendetektion die biologische Festkörper-NMR-Spektroskopie vorangebracht und Zuordnungsprozeduren sowie Strukturanalysen vereinfacht.<sup>[5]</sup> Gleichzeitig ermöglicht die direkte Sedimentation großer biomolekularer Systeme in einen Festkörper-NMR-Rotor mittels einer Zentrifuge die Präparation hydratisierter Proben von sehr hoher Konzentration, ohne dass dafür eine Kristallisation oder Präzipitation notwendig wäre.<sup>[6]</sup> Die Kombination von ultraschneller MAS-Probenrotation, Protonendetektion und Sedimentation stellt somit einen Ansatz dar, um größere und komplexere Proteinsysteme mittels Festkörper-NMR-Spektroskopie mit hoher Auflösung strukturell zu untersuchen.

Das Ribosom ist eine komplexe biologische Maschinerie, die für die Proteinbiosynthese verantwortlich ist. In der Vergangenheit konnten die Strukturen von prokaryotischen und eukaryotischen Ribosomen mittels EM und Röntgenkristallographie gelöst werden.<sup>[7]</sup> Weiterhin wurden Strukturen in Gegenwart von mRNA, tRNA und anderen Faktoren, die an das Ribosom assoziiert sind, bestimmt, und haben damit zu einem besseren Verständnis dieser komplizierten molekularen Maschine geführt.<sup>[8]</sup> Die Details der zugrundeliegenden Wechselwirkungen sind allerdings bis heute nicht gut verstanden. NMR-Spektroskopie erscheint als die Methode der Wahl, um diesen Fragen auf atomarer Ebene nachzugehen und die strukturellen und dynamischen Änderungen im Verlauf der Proteinbiosynthese und ihrer Regulierung zu untersuchen.

„Trigger-Faktor“ (TF) ist ein 48 kDa großes Chaperon, das an das Ribosom mittels seiner N-terminalen Ribosom-bindedomäne (TF-RBD, Aminosäurereste 1–118) in der Nähe der Polypeptidaustrittstunnels der großen Untereinheit des bakteriellen Ribosoms (50S) bindet.<sup>[9]</sup> TF stabilisiert wachsende Polypeptidketten (NCs), die aus dem ribosomalen Tunnel hevorkommen, und spielt eine wesentliche Rolle in der kootranslationalen Proteinfaltung. Die Röntgenstruktur von TF-RBD aus *D. radiodurans*, deren Struktur im Komplex mit der großen Untereinheit in einem homologen Komplex bestimmt wurde, zeigt, dass sich die zweite  $\alpha$ -Helix von TF-RBD bei der Bindung an 50S in ihrer Konformation verändert und dabei einen hydrophoben Kanal bildet, in dem die wachsende Polypeptidkette potenziell binden kann.<sup>[10]</sup> Diese Konformationsänderung ist allerdings umstritten, da Kris-

[\*] Dr. E. Barbet-Massin, Prof. B. Reif

Department Chemie, Technische Universität München  
Lichtenbergstraße 4, 85747 Garching (Deutschland)  
E-Mail: reif@tum.de

C.-T. Huang, Dr. S.-T. D. Hsu  
Institute of Biological Chemistry, Academia Sinica  
128, Academia Road Sec. 2, Nankang, Taipei 115 (Taiwan)

Dr. V. Daebel  
Bruker BioSpin GmbH  
Silberstreifen 4, 76287 Rheinstetten (Deutschland)

[\*\*] Diese Arbeit wurde im Rahmen des SFB-1035/Teilprojekt B07 (Deutsche Forschungsgemeinschaft, DFG) durchgeführt. Wir danken der Helmholtz-Gemeinschaft und der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Grants Re1435), sowie der Europäischen Kommission (Access to Research Infrastructures in the 7th Framework Program of the EC, BioNMR-00234) für ihre Unterstützung. Wir danken weiterhin dem Center for Integrated Protein Science Munich (CIPS-M) für finanzielle Unterstützung. Die deuterierte ribosomale 50S-Untereinheit wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Knud Nierhaus, Max-Planck-Institut für Molekulargenetik, Berlin (Germany), zur Verfügung gestellt. S.-T.D.H. wurde mit dem Career Development Award (CDA – 00025/2010-C) des Human Frontier Science Programme ausgezeichnet und wird vom National Science Council (102-2113M-001-017-MY2) und der Academia Sinica, Taiwan, finanziell unterstützt.

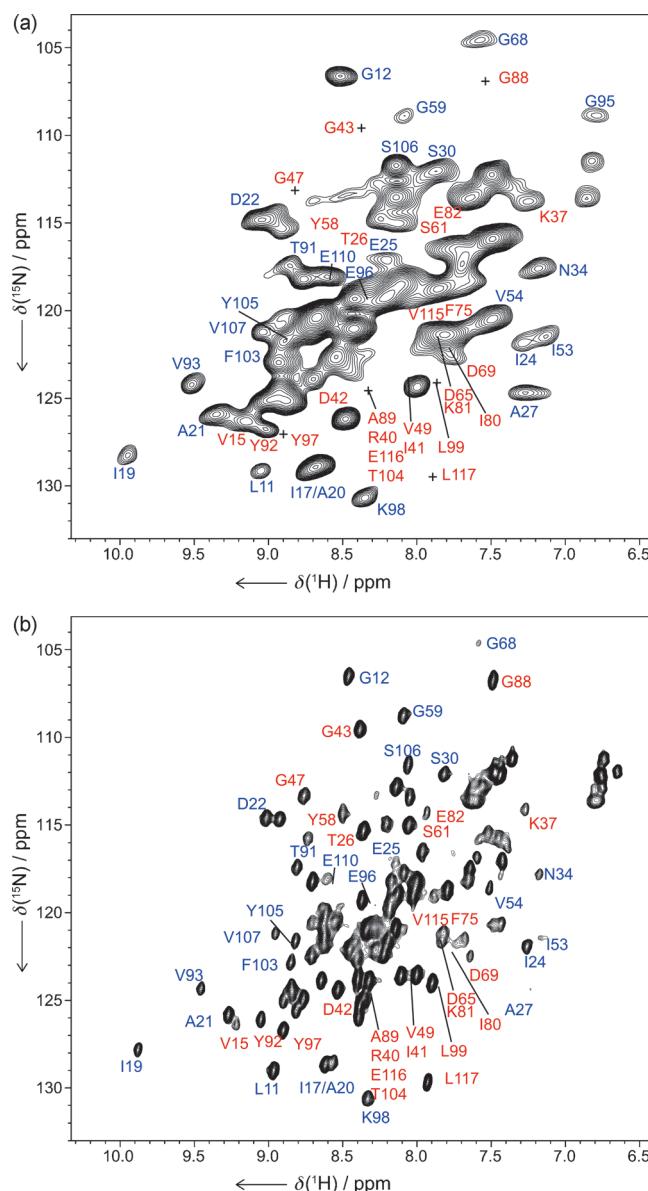
 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201409393> zu finden.

tallstrukturen aus anderen Organismen ein etwas unterschiedliches Modell für die Struktur der Ribosom-assoziierten TF-RBD gezeigt haben.<sup>[9]</sup> Weiterhin wurde die Struktur von an Ribsomen gebundenem Volllängen-TF in Gegenwart von wachsenden Polypeptidketten mittels Kryo-EM-Rekonstruktion bestimmt, jedoch nur mit einer Auflösung von 19 Å.<sup>[11]</sup>

Wir zeigen hier, dass ein Komplex aus TF-RBD und 50S-Ribosom von *E. coli* mittels protondetektiert ultraschneller MAS-Festkörper-NMR-Spektroskopie untersucht werden kann. Ein Vergleich von Lösungs-NMR-Spektren von ungebundenem TF-RBD und den erhaltenen Festkörper-NMR-Spektren ermöglicht die Identifizierung der Aminosäurereste, deren Signale durch Bindung an die 50S-Untereinheit beeinflusst werden. Wir zeigen, dass die durch das Ribosom induzierten Konformationsänderungen von TF-RBD im Einklang mit der Kristallstruktur des homologen Komplexes von TF-RBD-50S von *D. radiodurans* sind.<sup>[10a]</sup> Zur Vorbereitung der Festkörper-NMR-Probe wurden die austauschenden Deuteronen in der einheitlich [<sup>2</sup>H,<sup>13</sup>C,<sup>15</sup>N]-markiertem TF-RBD-Proteinprobe wieder vollständig protoniert. Anschließend wurde TF-RBD mit einer hochdeutrierten (ca. 80 %) 50S-Untereinheit von *E. coli* titriert. Der entstandene Komplex wurde in einen 1.3-mm-MAS-Rotor sedimentiert. Abbildung 1 zeigt das Festkörper-NMR-<sup>15</sup>N-<sup>1</sup>H-CP-HSQC-Spektrum, das bei einer MAS-Frequenz von 60 kHz erhalten wurde, zusammen mit dem entsprechenden Lösungs-NMR-Spektrum von ungebundenem TF-RBD.

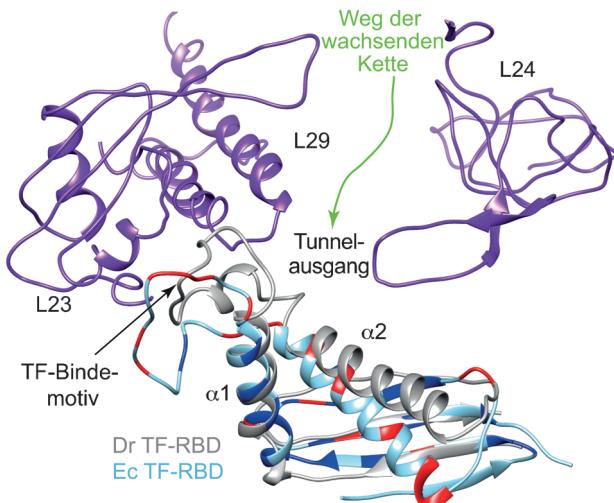
Das Festkörper-NMR-Spektrum zeigt eine sehr gute Empfindlichkeit (Signal-zu-Rauschverhältnis ca. 3-5:1 bei 8.5 h Aufnahmezeit). Wir weisen darauf hin, dass TF-RBD lediglich ca. 1% des gesamten Probenvolumens ausmacht. Diese hohe Empfindlichkeit ist nur durch die Kombination von ultraschneller MAS-Probenrotation und Protonendetektion möglich. Gleichzeitig werden in diesen Experimenten die Grenzen des experimentell Machbaren erreicht. Eine weitere Empfindlichkeitssteigerung ist im Prinzip mittels dynamischer Kernpolarisation („dynamic nuclear polarization“, DNP) möglich.<sup>[12]</sup> Allerdings vergrößern die Tieftemperaturbedingungen, die für DNP notwendig sind, im allgemeinen die Probenheterogenität und verschlechtern dadurch die spektrale Auflösung. Die hier verwendeten Bedingungen liefern gut aufgelöste Spektren mit Halbwertslinienbreiten von 100 Hz in der <sup>1</sup>H-Dimension und 60 Hz in der <sup>15</sup>N-Dimension. In den nichtüberlagerten Bereichen des Spektrums kann die Zuordnung der Resonanzen leicht aus dem Lösung-NMR-Spektrum von ungebundenem TF-RBD<sup>[13]</sup> übertragen werden. Ein Vergleich von Lösungs- und Festkörper-NMR Spektren zeigt eindeutig Verschiebungen/Verschwinden von Signalen, die auf die Bindung zurückgeführt werden kann. Diese Verschiebungen resultieren nicht aus Temperierungsunterschieden (siehe Abbildung S3 in den Hintergrundinformationen), sondern sind eine Folge der Bindung an das Ribosom und der dadurch veränderten lokalen chemischen Umgebung/Dynamik.

Abbildung 2 zeigt eine Überlagerung der Kristallstrukturen von TF-RBD in Komplex mit der großen 50S-Untereinheit von *D. radiodurans* (pdb: 2d3o) und der Kristallstruktur von *E. coli*-TF-RBD (pdb: 1w26). Die Aminosäure-



**Abbildung 1.** a) 2D-Festkörper-NMR-<sup>15</sup>N-<sup>1</sup>H-Korrelationsspektrum von [ $^1\text{H}$ -<sup>15</sup>N, <sup>2</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N]-markiertem *E. coli*-TF-RBD im Komplex mit der großen ribosomalen 50S-Untereinheit von *E. coli*. Das Experiment wurde mit einem 850-MHz-Spektrometer bei einer MAS-Frequenz von 60 kHz aufgenommen. b) 2D-Lösungs-NMR-<sup>15</sup>N-<sup>1</sup>H-Korrelationsspektrum von ungebundenem monomerem [ $^1\text{H}$ -<sup>15</sup>N, <sup>2</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N]-markiertem TF-RBD, aufgenommen an einem 500-MHz-Spektrometer. Zuordnungen der Kreuzsignale im aufgelösten Teil des Festkörper-NMR-Spektrums sind in den beiden Abbildungen angegeben: Blau zeigt Kreuzsignale an, deren chemische Verschiebung sich bei Zugabe von 50S nicht ändert. Rot markiert Resonanzen, die sich entweder verschieben oder die sich aufgrund von Bindung an das Ribosom verbreitern. Weitere experimentelle Details finden sich in den Hintergrundinformationen.

rreste, für die veränderte chemische Verschiebungen beobachtet werden, sind farblich hervorgehoben. Wie erwartet konzentrieren sich die meisten Reste, deren Resonanzen betroffen sind, in der Nähe der Bindestelle, während nicht-betroffene Reste weiter von der Bindungsstelle entfernt sind. Interessanterweise zeigen sowohl die Resonanzen der zweiten  $\alpha$ -Helix als auch das TF-Bindemotiv (XGFRxGxxP in der



**Abbildung 2.** Veränderungen der chemischen Verschiebungen bei Bindung von TF-RBD an 50S. Es ist eine Überlagerung der Kristallstrukturen von TF-RBD in Komplex mit der großen 50S-Untereinheit von *D. radiodurans* (pdb: 2d30) und der Kristallstruktur von *E. coli*-TF-RBD (pdb: 1w26) dargestellt. Die ribosomalen Proteine L23, L29 und L24, die sich am Ende des Polypeptid-Tunnels in der Nähe der TF-Bindestelle befinden, sind lila eingefärbt. Aminosäurereste, deren Resonanzen sich nicht in Gegenwart des Ribosoms verändern, sind blau dargestellt, die Reste, die veränderte chemische Verschiebungen oder Linienverbreiterungen zeigen, sind rot abgebildet. Reste, die aufgrund von Signalüberlappung nicht zugeordnet werden konnten, sind grau dargestellt.

Schleife L1 zwischen den  $\alpha$ -Helices 1 und 2) große Veränderungen bei der Bindung. Diese Beobachtung ist konsistent mit früheren biochemischen<sup>[14]</sup> und kristallographischen<sup>[10]</sup> Untersuchungen. Unsere Festkörper-NMR-Untersuchungen stützen damit die Hypothese, dass die zweite  $\alpha$ -Helix in Gegenwart von 50S eine Konformationsänderung erfährt.

Wir haben erste Festkörper-NMR-Daten eines ribosomalen Komplexes mit ultraschneller MAS-Festkörper-NMR-Spektroskopie und Protonendetektion aufgenommen. Mit diesen Experimenten konnten die Reste von TF-RBD, die an der Wechselwirkung mit dem Ribosom beteiligt sind, identifiziert werden. Unsere Ergebnisse eröffnen neue Möglichkeiten für die Untersuchung von kotranslationaler Proteinfaltung und die strukturelle Charakterisierung wachsender Polypeptidketten. Im Unterschied zu früheren Untersuchungen<sup>[15]</sup> können nun auch nichtdynamische Bereiche des Ribosoms, die für NMR-spektroskopische „Standard“-Techniken nicht zugänglich sind, sowie Signaltransduktionsprozesse, die von der wachsenden Kette ausgelöst werden, untersucht werden.

**Stichwörter:** Drehung um den magischen Winkel (MAS) · NMR-Spektroskopie · Protein-Protein-Wechselwirkungen · Ribosomaler Proteinkomplex · Trigger-Faktor

**Zitierweise:** *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 4367–4369  
*Angew. Chem.* **2015**, *127*, 4441–4444

[1] a) K. Pervushin, R. Riek, G. Wider, K. Wuthrich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 12366–12371; b) V. Tugarinov, P. M.

Hwang, J. E. Ollerenshaw, L. E. Kay, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 10420–10428; c) R. Rosenzweig, L. E. Kay, *Annu. Rev. Biochem.* **2014**, *83*, 291–315.

- [2] a) C. Wasmer, A. Lange, H. Van Melckebeke, A. B. Siemer, R. Riek, B. H. Meier, *Science* **2008**, *319*, 1523–1526; b) J. T. Nielsen, M. Bjerring, M. D. Jeppesen, R. O. Pedersen, J. M. Pedersen, K. L. Hein, T. Vosegaard, T. Skydstrup, D. E. Otzen, N. C. Nielsen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 2118–2121; *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 2152–2155; c) A. Loquet, N. G. Sgourakis, R. Gupta, K. Giller, D. Riedel, C. Goosmann, C. Griesinger, M. Kolbe, D. Baker, S. Becker, A. Lange, *Nature* **2012**, *486*, 276–279; d) J. X. Lu, W. Qiang, W. M. Yau, C. D. Schwieters, S. C. Meredith, R. Tycko, *Cell* **2013**, *154*, 1257–1268.
- [3] a) A. Lange, K. Giller, S. Hornig, M. F. Martin-Eauclaire, O. Pongs, S. Becker, M. Baldus, *Nature* **2006**, *440*, 959–962; b) S. D. Cady, K. Schmidt-Rohr, J. Wang, C. S. Soto, W. F. Degrado, M. Hong, *Nature* **2010**, *463*, 689–692; c) S. H. Park, B. B. Das, F. Casagrande, Y. Tian, H. J. Nothnagel, M. Chu, H. Kiefer, K. Maier, A. A. De Angelis, F. M. Marassi, S. J. Opella, *Nature* **2012**, *491*, 779–783.
- [4] a) A. Goldbourt, L. A. Day, A. E. McDermott, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 37051–37059; b) Y. Han, J. Ahn, J. Concel, I. J. Byeon, A. M. Gronenborn, J. Yang, T. Polenova, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 1976–1987; c) G. Abramov, O. Morag, A. Goldbourt, *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 9671–9680; d) E. Barbet-Massin, M. Felletti, R. Schneider, S. Jehle, G. Communie, N. Martinez, M. R. Jensen, R. W. H. Ruigrok, L. Emsley, A. Lesage, M. Blackledge, G. Pintacuda, *Biophys. J.* **2014**, *107*, 941–946.
- [5] a) R. Linser, B. Bardiaux, V. Higman, U. Fink, B. Reif, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 5905–5912; b) R. Linser, U. Fink, B. Reif, *J. Magn. Reson.* **2008**, *193*, 89–93; c) V. Chevelkov, K. Rehbein, A. Diehl, B. Reif, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 3878–3881; *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 3963–3966; d) M. J. Knight, A. L. Webber, A. J. Pell, P. Guerry, E. Barbet-Massin, I. Bertini, I. C. Felli, L. Gonnelli, R. Pierattelli, L. Emsley, A. Lesage, T. Herrmann, G. Pintacuda, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 11697–71101; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 11901–11905; e) R. Linser, M. Dasari, M. Hiller, V. Higman, U. Fink, J. M. Lopez del Amo, S. Markovic, L. Handel, B. Kessler, P. Schmieder, D. Oesterhelt, H. Oschkinat, B. Reif, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 4508–4512; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 4601–4605; f) M. J. Knight, A. J. Pell, I. Bertini, I. C. Felli, L. Gonnelli, R. Pierattelli, T. Herrmann, L. Emsley, G. Pintacuda, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 11095–11100; g) A. Marchetti, S. Jehle, M. Felletti, M. J. Knight, Y. Wang, Z. Q. Xu, A. Y. Park, G. Otting, A. Lesage, L. Emsley, N. E. Dixon, G. Pintacuda, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 10756–10759; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 10914–10917; h) E. Barbet-Massin, A. J. Pell, J. S. Retel, L. B. Andreas, K. Jaudzems, W. T. Franks, A. J. Nieuwkoop, M. Hiller, V. Higman, P. Guerry, A. Bertarello, M. J. Knight, M. Felletti, T. Le Marchand, S. Kotelovica, I. Akopjana, K. Tars, M. Stoppini, V. Bellotti, M. Bolognesi, S. Ricagno, J. J. Chou, R. G. Griffin, H. Oschkinat, A. Lesage, L. Emsley, T. Herrmann, G. Pintacuda, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 12489–12497.
- [6] a) A. Mainz, S. Jehle, B. J. van Rossum, H. Oschkinat, B. Reif, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 15968–15969; b) I. Bertini, C. Luchinat, G. Parigi, E. Ravera, B. Reif, P. Turano, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 10396–10399; c) I. Bertini, F. Engelke, C. Luchinat, G. Parigi, E. Ravera, C. Rosa, P. Turano, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 439–447; d) C. Gardiennet, A. K. Schutz, A. Hunkeler, B. Kunert, L. Terradot, A. Bockmann, B. H. Meier, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 7855–7858; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 7977–7980; e) A. Mainz, T. L. Religa, R. Sprangers, R. Linser, L. E. Kay, B. Reif, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 8746–8751; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 8909–8914.

- [7] D. N. Wilson, K. H. Nierhaus, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 3464–3486; *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 3586–3610.
- [8] a) V. Ramakrishnan, *Cell* **2002**, *108*, 557–572; b) T. M. Schmeing, V. Ramakrishnan, *Nature* **2009**, *461*, 1234–1242.
- [9] A. Hoffmann, B. Bukau, G. Kramer, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **2010**, *1803*, 650–661.
- [10] a) F. Schluenzen, D. N. Wilson, P. Tian, J. M. Harms, S. J. McInnes, H. A. Hansen, R. Albrecht, J. Buerger, S. M. Wilbanks, P. Fucini, *Structure* **2005**, *13*, 1685–1694; b) D. Baram, E. Pyetan, A. Sittner, T. Auerbach-Nevo, A. Bashan, A. Yonath, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 12017–12022.
- [11] F. Merz, D. Boehringer, C. Schaffitzel, S. Preissler, A. Hoffmann, T. Maier, A. Rutkowska, J. Lozza, N. Ban, B. Bukau, E. Deuerling, *EMBO J.* **2008**, *27*, 1622–1632.
- [12] I. Gelis, V. Vitzthum, N. Dhimole, M. A. Caporini, A. Schedlbauer, D. Carnevale, S. R. Connell, P. Fucini, G. Bodenhausen, *J. Biomol. NMR* **2013**, *56*, 85–93.
- [13] S. T. Hsu, C. M. Dobson, *Biomol. NMR Assignments* **2009**, *3*, 17–20.
- [14] G. Kramer, T. Rauch, W. Rist, S. Vorderwulbecke, H. Patzelt, A. Schulze-Specking, N. Ban, E. Deuerling, B. Bukau, *Nature* **2002**, *419*, 171–174.
- [15] a) F. A. Mulder, L. Bouakaz, A. Lundell, M. Venkataramana, A. Liljas, M. Akke, S. Sanyal, *Biochemistry* **2004**, *43*, 5930–5936; b) J. Christodoulou, G. Larsson, P. Fucini, S. R. Connell, T. A. Pertinhez, C. L. Hanson, C. Redfield, K. H. Nierhaus, C. V. Robinson, J. Schleucher, C. M. Dobson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 10949–10954; c) S. T. D. Hsu, L. D. Cabrita, P. Fucini, J. Christodoulou, C. M. Dobson, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 8366–8367; d) S. T. D. Hsu, P. Fucini, L. D. Cabrita, H. Launay, C. M. Dobson, J. Christodoulou, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 16516–16521.

Eingegangen am 23. September 2014,  
veränderte Fassung am 9. Januar 2015  
Online veröffentlicht am 5. Februar 2015