

Proteinstruktur

Entspannte Moleküle: NMR-Oberflächendaten zur Strukturbestimmung

CHRISTOPH GÖBL¹, TOBIAS MADL²

¹ PRINCESS MARGARET CANCER CENTRE, TORONTO, KANADA

² GOTTFRIED SCHATZ RESEARCH CENTER, MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT GRAZ, ÖSTERREICH

Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy is a well suited method for the analysis of biomolecules in solution and provides unique insights into their structure, dynamics and function. Recent work has provided new approaches to determine surface-accessibility of biomolecules through the addition of freely soluble paramagnetic agents. This pushes the current limits towards more accurate and reliable structures, faster data acquisition and the detailed analysis of dynamic processes.

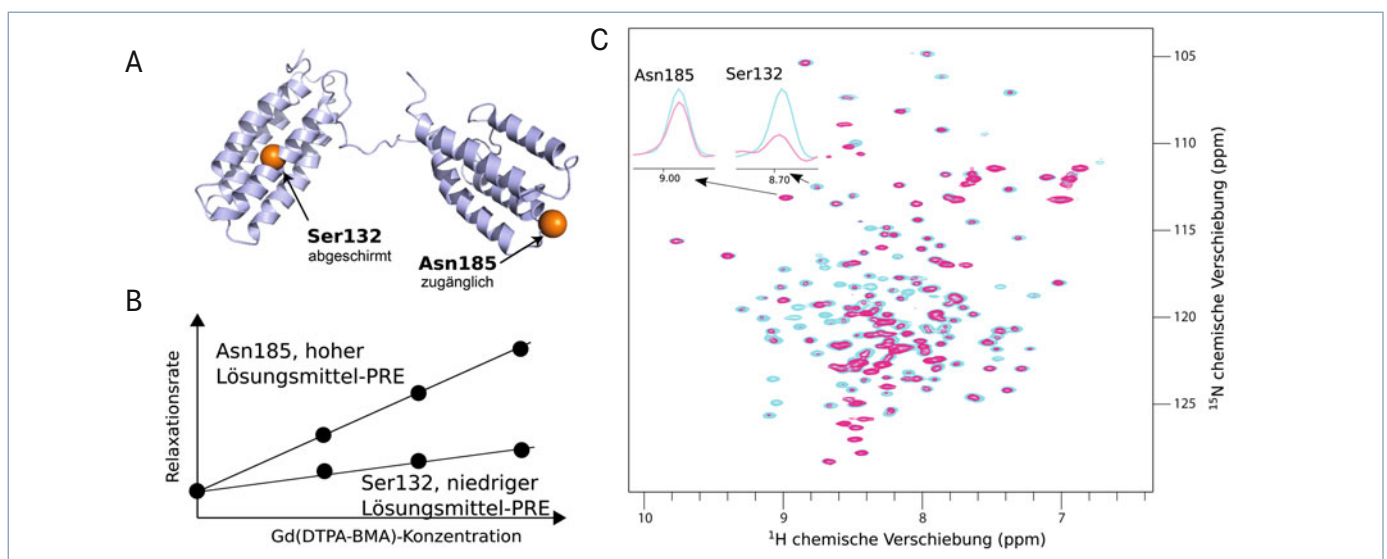
DOI: 10.1007/s12268-018-0898-5
© Die Autoren 2018

Die Kernspinresonanz(NMR)-Spektroskopie ist hervorragend zur Analyse von Biomolekülen in Lösung geeignet und liefert einzigartige Einblicke in deren Struktur, Dynamik und Funktion. Die Basis für die Ermittlung von molekularen Strukturen mittels NMR-Spektroskopie bildeten lange Zeit distanzbasierte Daten, sogenannte NOEs (*nuclear Overhauser effect*). Da diese Daten mit

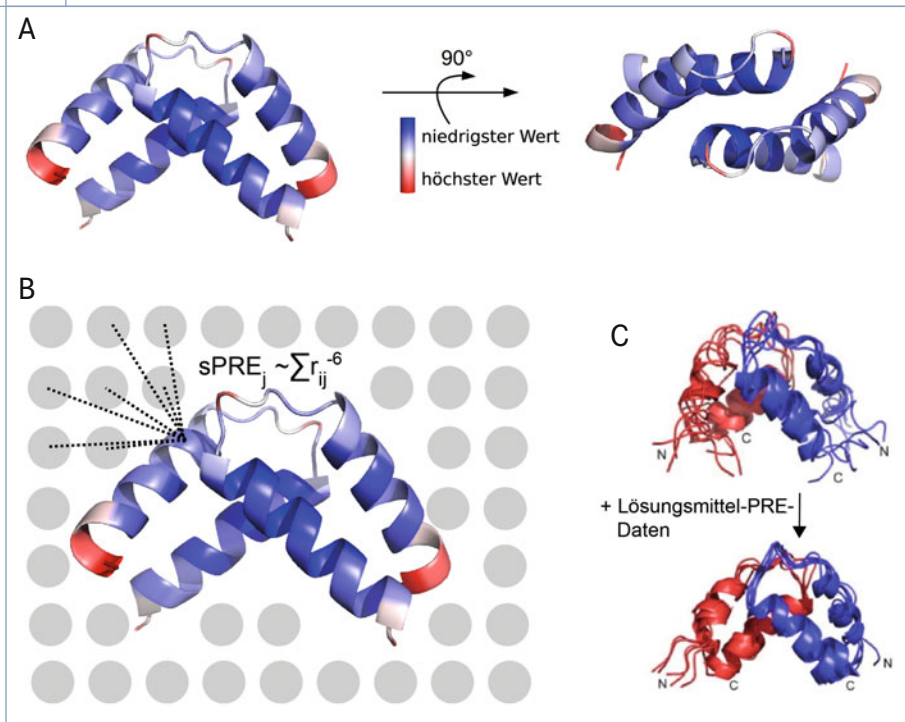
zunehmender Molekülgröße schwer in ausreichender Anzahl ermittelbar sind, wurden in mehreren bahnbrechenden Arbeiten komplementäre Ansätze erarbeitet. Trotzdem erreichen all diese Methoden bei größeren Molekülen ihre Limits, da diese schwächere NMR-Signale liefern und es zu Problemen durch Überlagerungen der Signale kommt. Ein neuer Ansatz zeigt eine Möglichkeit auf,

wie die gegenwärtigen Limits der konventionellen Strukturaufklärung von Biomolekülen und biomolekularen Komplexen teilweise überwunden werden können.

Dieser Ansatz hat als Grundlage die Bestimmung der Relaxationsratenerhöhung nach Zugabe von paramagnetischen Molekülen (Lösungsmittel-PRE, *paramagnetic relaxation enhancement*), was in einer distanzabhängigen Veränderung der Relaxationseigenschaften der vermessenen Biomoleküle resultiert. Dies äußert sich zum Beispiel in der Verringerung der Signalintensität oder dem schnelleren Rückkehren der Magnetisierung in den Gleichgewichtszustand. Die Effekte sind am stärksten für kurze Abstände zum zugegebenen paramagnetischen Molekül, wie etwa von Kernspins an der Oberfläche von Biomolekülen, und nehmen mit zunehmendem Abstand im Inneren rapide ab (**Abb. 1**). Die Anwendung kann somit als „Oberflächen-Scan“ genutzt werden und ermöglicht die nahezu uneingeschränkte Vermessung von Molekülen, wie Proteinen, DNAs, RNAs, kleineren organischen Verbindungen oder deren Komplexen. Praktischerweise ist diese Methode



▲ **Abb. 1:** **A**, Struktur des Graspollenproteins Phl p 5a, hervorgehoben sind die Aminosäurepositionen von Serin-132 und Asparagin-185 in Orange. **B**, Die Ermittlung des Lösungsmittel-PREs (*paramagnetic relaxation enhancement*) erfolgt durch die Messung von Relaxationsraten in Gegenwart von unterschiedlichen Gd(DTPA-BMA)-Konzentrationen. **C**, ¹H/¹⁵N-HSQC-Spektrum des Proteins Phl p 5a in Cyan und nach Zugabe von 4 mM Gd(DTPA-BMA) in Pink.



▲ **Abb. 2:** **A,** Die Proteinstruktur der Dimerisierungsdomäne von Sam68 zeigt die Lösungsmittel-PREs als Farbgradient. **B,** Die numerische Berechnung erfolgt z. B. durch Integration über den zugänglichen Raum. **C,** Darstellung der Verbesserung der Qualität der Struktur nach der Einbeziehung der Lösungsmittel-PRE-Daten in die Strukturberechnung (mit freundlicher Genehmigung von Nico Tjandra, PhD).

einfach umzusetzen, da keine zusätzlichen chemischen Reaktionen für die kovalente Bindung spezifischer Gruppen notwendig sind. Lösungsmittel-PREs zeichnen sich außerdem durch ihre generelle Anwendbarkeit aus. So sind sie für praktisch alle Spin-1/2-Kerne, wie z. B. ^1H , ^{13}C , ^{15}N und ^{31}P , messbar, und der Effekt kann einfach durch die Konzentration des zugegebenen paramagnetischen Komplexes moduliert werden.

An der Methodik der Lösungsmittel-PREs wurde bereits seit mehreren Jahrzehnten geforscht, jedoch wiesen die meisten Additive, wie etwa anorganische paramagnetische Salze oder organische paramagnetische Verbindungen, keine idealen Eigenschaften für deren Einsatz auf [1]. Die Grundlagen heutiger Messungen wurden in der Magnetresonanztomographie (MRT) gelegt, für welche der gängigste Lanthanoidkomplex Gd(DTPA-BMA) entwickelt wurde. Obwohl er heute in seiner klinischen Anwendung umstritten ist, stellt die Verwendung dieses Komplexes den Durchbruch für die *in vitro*-Forschung dar, da er alle notwendigen Kriterien, wie etwa gute Wasserlöslichkeit, unspezifische Wechselwirkung mit Biomolekülen, hohe Stabilität und einen starken, isotropen Paramagnetismus, erfüllt. Somit ist es möglich, für gut separierte NMR-Signale und das damit assoziierte Atom die Oberflächenzugänglichkeit zu bestimmen.

Strukturelle Untersuchung von Biomolekülen mittels Lösungsmittel-PREs

Eine breite Anwendung für Lösungsmittel-PREs konnte bereits früh für membrangebundene Proteine gefunden werden. Aufgrund der hohen Wasserlöslichkeit kann Gd(DTPA-BMA) nicht in Membranen oder Membranmimetika eindringen und ermöglicht somit die Bestimmung der Proteinorientierung in einer Micelllösung [2].

Für die Strukturaufklärung von Proteinen liefert die Lösungsmittel-PRE-Methode eine entscheidende Verbesserung, da die Information der Oberflächenzugänglichkeit einzelner Atome direkt in die Strukturberechnungen eingebaut werden kann. Basierend auf ersten Arbeiten an den Modellproteinen Ubiquitin und Maltose-bindendes Protein (MBP) [3] können Lösungsmittel-PREs heute standardmäßig in Strukturberechnungen von Proteinen in Softwarepaketen wie XPLOR-NIH und CS-Rosetta verwendet werden [4]. Vor Kurzem wurde die Methode auch auf die für NMR-Spektroskopie besonders schwierigen Strukturberechnungen von RNAs erweitert [5].

Eine weitere Einsatzmöglichkeit zeigt sich in der Strukturbestimmung von biomolekularen Komplexen. Sie stellen eine Herausforderung für die NMR-Spektroskopie dar, da mit herkömmlichen Methoden die Wechsel-

wirkungsstellen oft nicht eindeutig identifizierbar sind. Lösungsmittel-PREs geben durch Verdrängung des paramagnetischen Agens an der Grenzfläche Auskunft über die Kontaktstellen in biomolekularen Komplexen. Dies wurde beispielsweise am Protein Sam68 gezeigt, welches eine ungewöhnliche Homodimerisierungsdomäne aufweist [6]. Die Bestimmung von Lösungsmittel-PREs unterstützte die Strukturaufklärung, und die Grenzfläche des Homodimers konnte genauestens bestimmt werden (**Abb. 2**).

In einer ähnlichen Anwendung konnten Lösungsmittel-PREs zeigen, dass es sich bei dem Graspollenprotein Phl p 5a, einem der stärksten bekannten Allergene, um zwei flexible, miteinander verbundene Vier-Helix-Domänen handelt, wohingegen mit herkömmlichen Methoden ein Modell einer kompakten Acht-Helix-Struktur vorhergesagt wurde [7]. Die hohe Mobilität der Domänen führt letztendlich zu einer verstärkten Bindung zu Antikörpern und erklärt in weiterer Folge die starke allergische Reaktion bei betroffenen Patienten.

Untersuchung der biomolekularen Dynamik mittels Lösungsmittel-PREs

Lösungsmittel-PREs ermöglichen zudem die Untersuchung von dynamischen Prozessen in Biomolekülen und deren Komplexen. Diese Dynamiken sind essenziell für verschiedenste biologische Prozesse, einschließlich der Enzymkatalyse und allosterischen Steuerung zellulärer Signaltransduktion. Einzelne Konformationen können dabei durch Lösungsmittel-PREs direkt aufgespürt werden.

Mit dem Ziel, strukturelle Protein-Ensembles zu visualisieren und Populationen der Konformationszustände quantitativ zu bestimmen, haben Z. Gong und Kollegen die dynamischen Modellproteine Enzym I und Adenylatkinase aus *Escherichia coli* untersucht [8]. Beide Proteine wechseln dynamisch zwischen zwei Konformationszuständen, und es konnte für beide Proteine gezeigt werden, dass die Unterschiede zwischen den experimentellen und den berechneten Lösungsmittel-PRE-Profilen in Regionen liegen, in denen zuvor bestimmt wurde, dass sie ihre Zugänglichkeit für das Lösungsmittel bei Konformationsumlagerungen ändern [8].

Eine kürzlich veröffentlichte Arbeit zeigt erstmalig die Möglichkeit auf, strukturelle Daten basierend auf Lösungsmittel-PREs in der Festkörper-NMR-Spektroskopie zu erschließen. Dabei liegen Proteine nicht in Lösung vor, sondern sind in einem aggreg-

gierten – und dennoch strukturierten – Zustand, welcher die Messung von beispielsweise Membranproteinen oder besonders großen biomolekularen Komplexen erlaubt. In der Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch Lösungsmittel-PRES auch in diesem Zustand die Grenzflächen von Proteinkomplexen bestimmbar sind. Dies erlaubt eine breite Anwendung für besonders herausfordernde Systeme, wie etwa große Protein- und/oder DNA- bzw. RNA-Komplexe oder Membranproteine in komplexen Lipidanordnungen [9].

Zusammenfassung

Die Relaxationsverstärkung durch die Zugabe von löslichen, paramagnetischen Molekülen ist ein leistungsfähiges und flexibles Werkzeug für eine breite Palette von Anwendungen, insbesondere für die strukturelle und dynamische Charakterisierung von Biomolekülen und biomolekularen Komplexen [10]. Die Implementierung von Lösungsmittel-PRE-Messungen ist unkompliziert und liefert zuverlässige und quantitative Daten. Durch die Vermessung von Distanz-zu-Oberfläche-Informationen liefern Lösungsmittel-PRES Daten, die zu herkömmlichen NMR-Ansätzen und anderen strukturbiologischen Techniken komplementär sind. Damit wird die Strukturbestimmung von Biomolekülen und biomolekularen Komplexen erleichtert, zusätzlich können auch dynamische Prozesse erkannt und charakterisiert werden. Anwendungen paramagnetischer Lösungsmittel-PRES liefern daher einen einzigartigen und quantitativen Einblick in die biomolekulare Struktur, deren Dynamik und Wechselwirkungen.

Literatur

- [1] Bernini A, Venditti V, Spiga O et al. (2009) Probing protein surface accessibility with solvent and paramagnetic molecules. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc* 54:278–289
- [2] Respondek M, Madl T, Göbl C et al. (2007) Mapping the orientation of helices in micelle-bound peptides by paramagnetic relaxation waves. *J Am Chem Soc* 129:5228–5234
- [3] Madl T, Berml W, Zangger K (2009) Use of relaxation enhancements in a paramagnetic environment for the structure determination of proteins using NMR spectroscopy. *Angew Chem Int Ed* 48:8259–8262
- [4] Hartmüller C, Göbl C, Madl T (2016) Prediction of protein structure using surface accessibility data. *Angew Chem Int Ed* 55:11970–11974
- [5] Hartmüller C, Günther JC, Wolter AC et al. (2017) RNA structure refinement using NMR solvent accessibility data. *Sci Rep* 7:5393
- [6] Meyer NH, Tripsianes K, Vincendeau M et al. (2010) Structural basis for homodimerization of the Src-associated during mitosis, 68-kDa protein (Sam68) Qua1 domain. *J Biol Chem* 285:28893–28901
- [7] Göbl C, Focke-Tejkl M, Najafi N et al. (2017) Flexible IgE epitope-containing domains of Phl p 5 cause high allergenic activity. *J Allergy Clin Immunol* 140:1187–1191
- [8] Gong Z, Gu XH, Guo DC et al. (2017) Protein structural ensembles visualized by solvent paramagnetic relaxation enhancement. *Angew Chem Int Ed* 56:1002–1006
- [9] Öster C, Kosol S, Hartmüller C et al. (2017) Characterization of protein–protein interfaces in large complexes by solid-state NMR solvent paramagnetic relaxation enhancements. *J Am Chem Soc* 139:12165–12174
- [10] Göbl C, Madl T, Simon B et al. (2014) NMR approaches for structural analysis of multidomain proteins and complexes in solution. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc* 80:26–63

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Tobias Madl
Gottfried Schatz Research Center
Medizinische Universität Graz
Neue Stiftingtalstraße 6/VI
A-8010 Graz
Tel.: +43-(0)316-385-71972
Fax: +43-(0)316-385-79615
tobias.madl@medunigraz.at
<http://mbbc.medunigraz.at>

Open Access:

This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits use, duplication, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made.

Open access funding provided by Medical University of Graz, Austria.

AUTOREN



Christoph Göbl

Jahrgang 1981. Chemiestudium an der Universität Graz, Österreich. 2008 Promotion in Biochemie und Molekularen Biowissenschaften an der Universität Graz, mit Aufenthalt an den National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA. 2012–2016 Postdoc am Helmholtz Zentrum München. Seit 2016 Postdoc am Princess Margaret Cancer Centre in Toronto, Kanada.



Tobias Madl

Jahrgang 1980. Chemie- und Physikstudium (Lehramt) an der Universität Graz, Österreich. 2007 Promotion, 2007–2010 Postdoc an der TU München und am Helmholtz Zentrum München. 2010–2011 Postdoc an der Universität Utrecht, Niederlande. 2012 APART-Stipendiat der Österreichischen Akademie der Wissenschaften. 2012–2016 BioSysNet und Emmy-Noether-Nachwuchsgruppenleiter an der TU München und am Helmholtz Zentrum München. Seit 2015 Assoziierter Professor an der Medizinischen Universität Graz, Österreich.