

## Ein Protein mit Schlüsselbund

Neue Entwicklungen in der kernmagnetischen Resonanzspektroskopie ermöglichen die Beobachtung von Proteinfluktuationen im Bereich von Pikosekunden bis Millisekunden.

1) Für die Entwicklung dieser Methode erhielt K. Wüthrich den Nobelpreis für Chemie 2002.

Proteine sind faszinierende biologische Makromoleküle, die an praktisch allen Lebensprozessen beteiligt sind. Die Proteinstrukturanalyse mittels Röntgenbeugung an Einkristallen liefert statische Strukturmodelle von großer Ästhetik, aus denen sich wichtige Hinweise zum Verständnis der spezifischen Funktion gewinnen lassen. Diese Modelle geben aber auch Anlass zu Missverständnissen, suggerieren sie doch, dass das gefaltete Protein *eine* wohldefinierte Struktur einnimmt! Proteine sind jedoch minimal stabilisierte, mesoskopische Systeme, die unter physiologischen Bedingungen zwischen einer Vielzahl von Konformationszuständen um die mittlere Struktur herum fluktuieren [1, 2]. Diese Subzustände lassen sich durch lokale Minima in einer hochdimensionalen Energiehyperfläche, der sog. Konformationsenergie-landschaft, beschreiben. Eine Hierarchie unterschiedlich hoher Barrieren zwischen den Subzuständen bewirkt, dass Strukturfluktuationen bei physiologischen Temperaturen auf Zeitskalen von Pikosekunden bis Sekunden ablaufen.

Die mittlere Struktur im thermodynamischen Grundzustand zu kennen, reicht im Allgemeinen

nicht aus, um die Proteinfunktion zu verstehen. Selten eingenommene, kurzlebige Zustände spielen vielfach eine Schlüsselrolle, z. B. bei einer enzymatischen Katalyse. Um die räumliche Struktur in ihrer zeitlichen Entwicklung zu bestimmen, kommen unterschiedlichste experimentelle Methoden und Computersimulationen zum Einsatz, die sich insbesondere hinsichtlich der Zeitauflösung gegenseitig ergänzen [3, 4].

Da die Anordnung der kovalenten Bindungen eines Proteins durch die im genetischen Code gespeicherte Aminosäuresequenz festgelegt ist, geht es bei der Protein-Strukturbestimmung darum, wie die kovalente Anordnung der Atome räumlich aufgefaltet ist. Die kernmagnetische Resonanzspektroskopie (*Nuclear Magnetic Resonance*, NMR) an Proteinen in Lösung ist dabei besonders leistungsfähig, da sie Struktur und Dynamik mit atomarer Auflösung erfassen kann.<sup>1)</sup> Göttinger Wissenschaftler um C. Griesinger, H. Grubmüller und B. de Groot haben diese Methode kürzlich zusammen mit computergestützten Analysen der Messdaten eingesetzt, um die Struktur- und Dynamik

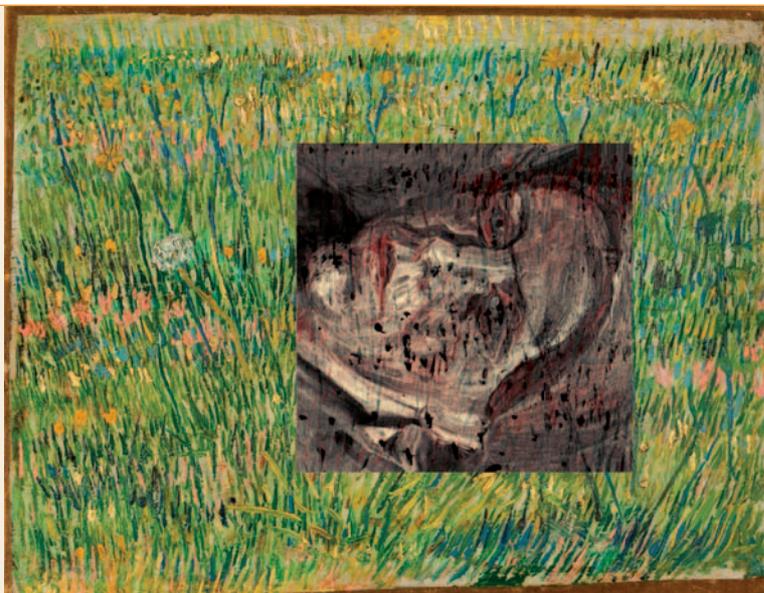
eines kleinen Proteins, des Ubiquitins, zu untersuchen [5]. Dieses spielt eine Schlüsselrolle beim Proteinabbau in der Zelle und muss dazu mit zahlreichen anderen Proteinen in sehr unterschiedlicher Art und Weise spezifisch wechselwirken. Der Vergleich von 46 Kristallstrukturen des Ubiquitins, zum Großteil im Komplex mit anderen Proteinen, zeigt eine beeindruckende Strukturvariabilität. Daher stellt sich die Frage, ob Ubiquitin durch Wechselwirkungen mit dem Bindungspartner in eine bestimmte Struktur gezwungen wird oder ob die Energielandschaft bereits so geformt ist, dass das Protein auch ohne Bindungspartner thermisch zwischen diesen Zuständen fluktuiert.

Zur NMR-Strukturbestimmung des Ubiquitins ist es notwendig, viele tausend spektroskopische Signale verschiedener Kerne ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ) den zugehörigen Proteinatomen strukturell eindeutig zuzuordnen. Dies funktioniert, da jeder Atomkern seine individuelle chemische Umgebung hat, die sein lokales B-Feld und damit seine Resonanzfrequenz bestimmt. Außerdem lassen sich magnetische Kopplungen zu den Nachbarker-

### PORTRÄT UNTER GRAS

Im Schaffensrausch und aus Geldmangel übermalte Vincent van Gogh oft kurzerhand verworfene Bilder. Eine neuartige Methode erlaubt es jetzt, versteckte Werke mit bislang unerreichter Qualität sichtbar zu machen. Statt nur die Absorption von Röntgenstrahlen zu messen, untersuchten Forscher das van Gogh-Gemälde „Grasgrund“ (1887) anhand der Fluoreszenz der verschiedenen Elemente in den Farbpigmenten. Dafür wurde ein 17,5 x 17,5 cm<sup>2</sup> großer Ausschnitt zwei Tage lang am Hamburger DESY mit einem scharfen Röntgenstrahl punktwise abgerastert. Durch Analyse der Fluoreszenz gelang es, die Farbbestandteile der beiden Schichten zu identifizieren und das versteckte Porträt zu rekonstruieren.

J. Dik et al., *Anal. Chem.* **80**, 6436 (2008)



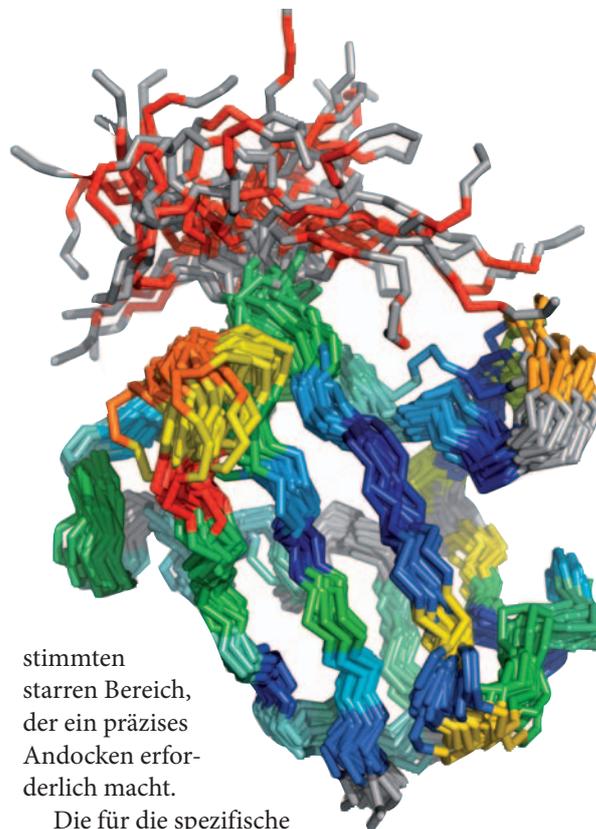
TU Delft/DESY

nen, skalare Kopplungen über chemische Bindungen sowie Dipol-Dipol-Kopplungen über den Raum detektieren. Aus den Kopplungsstärken ergeben sich Abstände und Bindungswinkel von Kernen im Abstand kleiner als 5 Å. Dipolare Kopplungen hängen vom Winkel zwischen dem starken äußeren Magnetfeld ( $B_0$ ) und dem Verbindungsvektor der beiden Kerne sowie vom Abstand zwischen den Kernen ab. In Lösungen, in denen das Protein als Ganzes eine isotrope Brownsche Rotationsdiffusion mit einer Rotationskorrelationszeit von typisch einigen Nanosekunden ausführt, mitteln sich diese jedoch heraus. Ein anisotropes Medium (hochverdünnter Flüssigkristall oder poröses Gel), in dem das eingebrachte Protein nicht mehr ungehindert alle Orientierungen einnehmen kann, prägt hingegen eine minimale Vorzugsorientierung auf. Dann geschieht die Mittelung der dipolaren Kopplung nur mehr fast vollständig, und im Spektrum beider Kerne erscheint eine Linienaufspaltung, die vom Winkel zwischen dem Verbindungsvektor der beiden Kerne und  $B_0$  abhängt. Diese residuellen dipolaren Kopplungen (*Residual Dipolar Couplings*, RDCs) haben die Göttinger Wissenschaftler für eine Vielzahl von internuklearen Vektoren am Ubiquitin gemessen. Sie liefern die Orientierung der Kern-Verbindungsvektoren bezüglich des angelegten  $B_0$ -Feldes und sind für die Strukturbestimmung extrem wertvoll.

Proteinbewegungen lassen sich mit der NMR über Relaxationsmessungen erfassen. Der zeitliche Zerfall der Magnetisierung, die durch Radiofrequenzpulse eingepreßt wird, reflektiert nämlich die Zeitskalen der lokalen B-Feld-Fluktuationen aufgrund von internen Bewegungen im Protein. Allerdings ist der Bereich von einigen Nanosekunden bis etwa 50  $\mu$ s für Relaxationsmessungen nicht zugänglich. Diese Lücke schließen Messungen von RDCs, sodass sich Fluktuationen der Kernverbindungsvektoren im gesamten Zeitbereich zwischen Pikosekunden und Millisekunden erfassen lassen.

Die NMR-Strukturbestimmung liefert nicht eine einzelne Struktur, sondern ein ganzes Ensemble. Dazu wird eine Molekulardynamiksimulation durchgeführt, die auf der Lösung der Newtonschen Bewegungsgleichungen beruht. Eine Energiefunktion, die die üblichen Terme für die wohlbekanntesten Bindungslängen und -winkel, van der Waals-Abstände und elektrostatischen Wechselwirkungen enthält, bestimmt dabei die Kraft. Die aus den NMR-Spektren erhaltenen magnetischen Kopplungen werden als zusätzliche Zwangsbedingungen (*restraints*) eingeführt, indem man die Energiefunktion um einen „Pseudoenergieterm“ erweitert. Dieser lässt die Energie stark ansteigen, sofern das Proteinensemble die gemessenen NMR-Parameter nicht einhält. Als Ergebnis entsteht also ein Ensemble von Strukturen, das die durch die NMR-Spektroskopie bestimmten *restraints* einhält und dessen einzelne Strukturen darüber hinaus die *a priori* bekannten, generellen Struktureigenschaften des Proteins erfüllen.

Das von der Physik her wesentliche Ergebnis dieser NMR-Analyse besteht darin, dass das unter Einschluss der RDC-Daten ermittelte Strukturensemble des Ubiquitins in Lösung dasjenige Ensemble vollständig einschließt, das die Röntgenbeugung an Einkristallen von 46 Komplexen des Ubiquitins mit anderen Proteinen ergibt. Wenn man nur die schnelle Relaxationsdynamik im Piko- bis Nanosekundenbereich berücksichtigt, ist dies jedoch nicht der Fall. Gerade die Bewegungen auf Nano- bis Mikrosekunden-Zeitskalen, die sich mit der NMR-Relaxation nicht beobachten lassen, tragen demnach wesentlich zur Strukturheterogenität bei. Mithilfe einer sog. Hauptkomponentenanalyse gelang es zu zeigen, dass eine kollektive Mode, die man als eine Zangenbewegung beschreiben kann, die Kontaktfläche zu anderen Proteinen moduliert. Um trotz hoher struktureller Plastizität eine hinreichende Spezifität für Partnerproteine zu erzielen, gibt es in der Wechselwirkungsfläche des Ubiquitins einen be-



O. F. Lange, MPI bpc

stimmten starren Bereich, der ein präzises Andocken erforderlich macht.

Die für die spezifische Bindung von Partnerproteinen notwendigen Konformationszustände sind also bereits in der Energielandschaft des Ubiquitins vorgeformt, und so ist die Selektion durch das wechselwirkende Protein möglich und sogar wahrscheinlich. Statt eines Schlüssels, der zu einem bestimmten Schloss passt, ist Ubiquitin demnach eher mit einem ganzen Schlüsselbund zu vergleichen. Sollte dies generell für Proteine gelten, ist im genetischen Code in Form der linearen Aminosäuresequenz eben nicht nur die räumliche Struktur des Proteins, sondern darüber hinaus auch seine funktionsrelevante Dynamik gespeichert.

Gerd Ulrich Nienhaus

- [1] H. Frauenfelder et al., *Science* **254**, 1598 (1991)
- [2] G. U. Nienhaus, *Physik Journal*, April 2004, S. 37
- [3] K. Henzler-Wildman und D. Kern, *Nature* **450**, 964 (2007)
- [4] G. U. Nienhaus und R. D. Young, in: *Encyclopedia of Applied Physics*, Vol. **15**, hrsg. von G. L. Trigg, Wiley-VCH, Weinheim (1996), S. 163
- [5] O. F. Lange, N.A. Lakomek et al., *Science* **320**, 1471 (2008)

Die Energielandschaft des Ubiquitins ist so beschaffen, dass das Protein zwischen vielen Konformationszuständen (farbige Ketten) fluktuiert und dadurch mit verschiedensten Bindungspartnern spezifisch interagieren kann.

Prof. Dr. Gerd Ulrich Nienhaus, Institut für Biophysik, Universität Ulm, 89069 Ulm