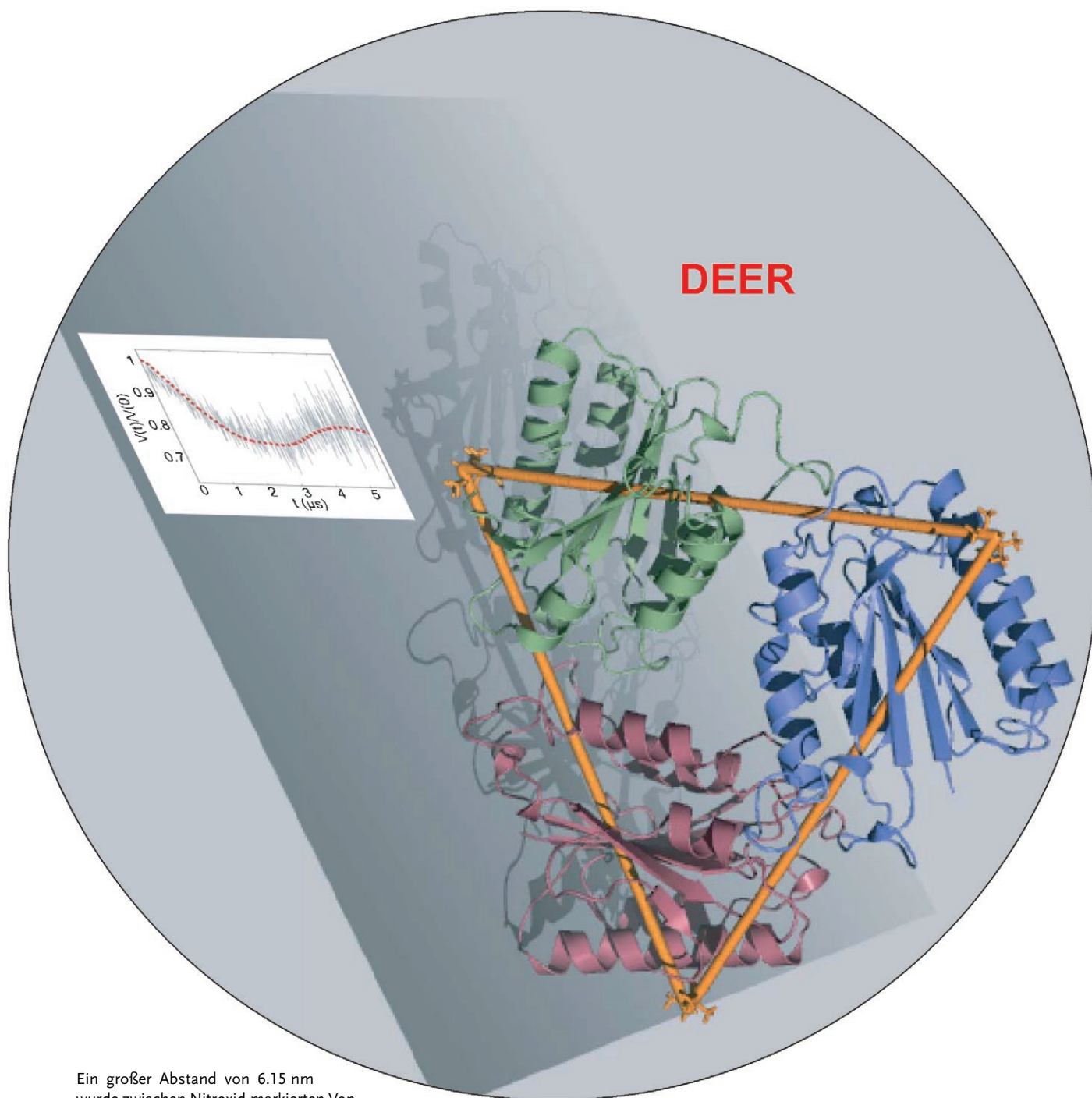


# Zuschriften



Ein großer Abstand von 6.15 nm wurde zwischen Nitroxid-markierten Von-Willebrand-Faktor-A-Domänen mithilfe der Doppel-Elektronen-Resonanz (DEER) bestimmt. Das Bild zeigt den Kurvenverlauf für eine DEER-Messung sowie die Trimerstruktur des Proteins, die aus den so erhaltenen Daten abgeleitet wurde. Mehr dazu findet sich in der Zuschrift von G. Jeschke et al. auf den folgenden Seiten.

DOI: 10.1002/ange.200503720

**Charakterisierung schwacher Protein-Protein-Wechselwirkungen: Detektion der Trimerisierung einer Von-Willebrand-Faktor-A-Domäne in Lösung durch DEER\*\****Janet E. Banham, Christiane R. Timmel,  
Rachel J. M. Abbott, Susan M. Lea und  
Gunnar Jeschke\**

Nichtkovalente („schwache“) Wechselwirkungen zwischen biologischen oder synthetischen Makromolekülen sind mit etablierten Techniken in Lösung schwer nachzuweisen. Zunehmend setzt sich die Erkenntnis durch, dass nichtkovalente Protein-Protein-Wechselwirkungen die Grundlage vieler Zellfunktionen bilden;<sup>[1]</sup> darüber hinaus sind solche Wechselwirkungen auch die Basis der Selbstorganisation synthetischer Makromoleküle.<sup>[2]</sup> Hier präsentieren wir eine Erweiterung des Methodenrepertoires für die Untersuchung schwach wechselwirkender Makromoleküle in verdünnten Lösungen in Form der Doppel-Elektronen-Elektronen-Resonanz-Technik (DEER), eines Experiments aus der gepulsten EPR-Spektroskopie. Bisher basieren solche Untersuchungen weitgehend auf dem resonanten Fluoreszenzenergietransfer (FRET),<sup>[3]</sup> und DEER kann als eine dazu komplementäre Technik betrachtet werden. Beide Methoden verfolgen eine ähnliche Strategie in Form einer positionsspezifischen Markierung der Zielmoleküle (FRET: Fluoreszenzmarker, DEER: paramagnetische Marker). Während FRET jedoch zwei unterschiedliche, relativ große Chromophore erfordert, deren Kombination im Hinblick auf den erwarteten Abstandsbereich auszuwählen ist, können Abstandsmessungen

mittels DEER zwischen zwei strukturidentischen und viel kleineren Nitroxidmarkern durchgeführt werden und erfassen einen breiteren Abstandsbereich mit hoher Genauigkeit.<sup>[4,5]</sup> Allerdings sind EPR-Messungen weniger empfindlich als solche mittels optischer Spektroskopie. Die geringere Empfindlichkeit kann zu einer Begrenzung auf kürzere Abstände führen, weil lange Abstände schwächeren Kopplungen entsprechen. Daher sind auch bisher mit EPR-Techniken in der Regel kleinere Abstände als mit FRET-Techniken erfasst worden. Hier präsentieren wir nun die Messung eines Abstands von etwa 6.15 nm zwischen Nitroxid-markierten menschlichen Von-Willebrand-Faktor-A-Domänen (vWF-A) aus der Komplementärkomponente Faktor B. Dieser Abstand ist der größte bisher mit einer EPR-Methode an Proteinen gemessene, und er ist in Einklang mit einer Trimerisierung des isolierten Faktor-B-vWF-A in verdünnter Lösung, wie sie auch in Kristallen dieses Proteins beobachtet wird.<sup>[6]</sup>

Das DEER-Experiment misst die dipolare Kopplung zwischen paramagnetischen Zentren über eine Modulation des Elektronenspincho-Zerfalls.<sup>[7]</sup> Sofern die paramagnetischen Zentren näherungsweise als Punkt-Dipole betrachtet werden können, wie dies für Nitroxid-Radikale der Fall ist, lässt sich ihr Abstand  $r$  aus der Modulationsfrequenz  $\nu$  des Signals über Gleichung (1) erhalten.<sup>[4]</sup>

$$r \text{ [nm]} = \left[ \frac{52.04}{\nu \text{ [MHz]}} \right]^{1/3} \quad (1)$$

Die obere Grenze der Abstandsmessung mithilfe von DEER oder anderen Puls-EPR-Techniken (z. B. Double-Quantum-Coherence(DQC)-Techniken)<sup>[8]</sup> wird durch die maximale Zeit für die dipolare Evolution festgelegt, zu der noch ein Echosignal detektiert werden kann. Diese Zeit ist wiederum proportional zur Phasengedächtniszeit  $T_m$  der Elektronenspins. Die bisher größten mit EPR-Techniken gemessenen Abstände betragen 7.5 nm mittels DEER an einem synthetischen Biradikal mit starrem Molekülrückgrat<sup>[5]</sup> und 7.0 nm mittels DQC an einer ebenfalls formtreuen RNA.<sup>[5,9]</sup> Diese Experimente sind an Modellsystemen bekannter Struktur durchgeführt worden, um die Reichweite der jeweiligen Technik zu testen. In anderen DEER-Arbeiten an Biomakromolekülen wurden Abstände von bis zu 5.25 nm an DNA-Modellsystemen gemessen,<sup>[10]</sup> und es wurde ein Abstand von etwa 6.1 nm in einem Trimer einer einfach spinmarkierten Mutante des pflanzlichen Lichtsammelkomplexes IIb abgeschätzt.<sup>[11]</sup> Im Falle von LHCIb (LHC = light harvesting complex) konnte kein genauer Abstand angegeben werden, weil  $T_m$  für die Beobachtung einer vollständigen dipolaren Oszillation zu kurz war. Bei hinreichend niedrigen Temperaturen wird die Relaxation durch Protonenspindiffusion dominiert, sodass  $T_m$  und damit die maximale Zeit für die dipolare Evolution durch vollständige Deuterierung des Lösungsmittels und der Probe um das bis zu Siebenfache verlängert werden können.<sup>[5]</sup>

Viele extrazelluläre und Zelloberflächenproteine nutzen vWF-A-Domänen zur Vermittlung von Protein-Protein-Wechselwirkungen. Derartige Wechselwirkungen der vWF-A-Domäne von Faktor B sind für die Regulierung des angeborenen Immunsystems von Bedeutung. Wir haben deshalb

[\*] Dr. G. Jeschke  
Max-Planck-Institut für Polymerforschung  
Postfach 3148, 55021 Mainz (Deutschland)  
Fax: (+49) 6131-379-100  
E-mail: jeschke@mpip-mainz.mpg.de

R. J. M. Abbott, Dr. S. M. Lea  
Laboratory of Molecular Biophysics  
Department of Biochemistry  
University of Oxford  
Oxford, OX1 3QU (Großbritannien)

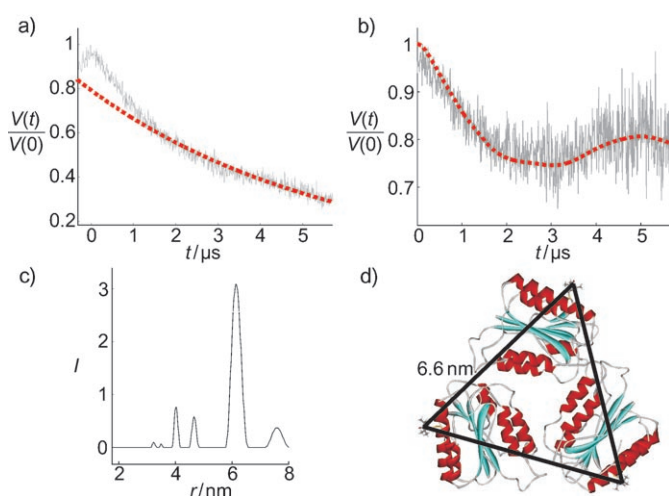
Dr. C. R. Timmel  
Inorganic Chemistry Laboratory  
University of Oxford  
Oxford, OX1 3QR (Großbritannien)

J. E. Banham  
Physical and Theoretical Chemistry Laboratory  
University of Oxford  
Oxford, OX1 3QZ (Großbritannien)

[\*\*] J.E.B. wurde durch ein Stipendium des Engineering and Physical Science Research Council und R.J.M.A. durch ein Stipendium des Medical Research Council unterstützt. C.R.T. dankt der Royal Society für ein University Research Fellowship. Wir danken C. Bauer für technische Unterstützung. DEER = Doppel-Elektronen-Elektronen-Resonanz.

vWF-A von Faktor B exprimiert und mit einem Methaniosulfonat-Nitroxid-Radikal (MTSSL) markiert. Dieses thiol-spezifisch funktionalisierte Nitroxid reagiert mit Cystein 267, sodass ein einzelner Spinmarker pro Molekül gebunden wird. Das markierte Protein wurde in eine Mischung von 60 % D<sub>2</sub>O [mit 50 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)] und 40 % deuteriertem Glycerin überführt, wodurch  $T_m$  im Vergleich zur Phasengedächtniszeit eines protonierten Puffers verdoppelt und eine maximale Zeit für die dipolare Evolution von 6  $\mu$ s erreicht werden konnte. Diese Zeit ist lang genug für die Beobachtung einer vollständigen dipolaren Oszillation für Abstände von bis zu 6.8 nm. Die Proteinkonzentration wurde zwischen 45 und 180  $\mu$ M variiert, und die Messungen wurden nach Zugabe von 250 bzw. 500 mM NaCl zum Puffer wiederholt.

Ein typischer Datensatz eines DEER-Experiments ist in Abbildung 1 a dargestellt. Eine Modulation des Echos ist klar



**Abbildung 1.** DEER-Messung (180  $\mu$ M Protein in deuteriertem Wasser und Glycerin wie im Text beschrieben), Datenanalyse und Strukturvorschlag für vWF-A in Lösung. a) Experimentelle Daten (grau) und exponentiell abfallender Hintergrund aufgrund entfernter Spins aus einer Anpassung mit dem Programm DeerAnalysis 2004 (rot). b) Hintergrundkorrigierte experimentelle Daten (grau) und Anpassung mittels Tikhonov-Regularisierung (rot). c) Abstandsverteilung. d) Trimerstruktur mit Spinmarkern. Der gezeigte Abstand ist nur ein Beitrag zu einer erwarteten Verteilung, da von einer beträchtlichen Flexibilität der Marker-Seitengruppe und des Proteins auszugehen ist.

ersichtlich, sodass sicher auf eine Aggregation von vWF-A geschlossen werden kann. Abstandsverteilungen wurden aus allen gemessenen Datensätzen mit dem selbstgeschriebenen Programm DeerAnalysis 2004<sup>[12]</sup> berechnet, wobei auf die Tikhonov-Regularisierung im Abstandsbereich zurückgegriffen und ein fester Regularisierungsparameter von 10 vorgegeben wurde. Bei allen Protein- und Salzkonzentrationen finden wir den gleichen dominierenden Abstand von  $(6.15 \pm 0.14)$  nm, unabhängig davon, ob das DEER-Experiment mit konstanter oder variabler Länge der Pulssequenz durchgeführt wird.<sup>[5,13]</sup> Die hintergrundkorrigierten Daten und die Abstandsverteilung für den Beispieldatensatz sind in Abbildung 1 b und Abbildung 1 c dargestellt. Kleine Beiträge zur Abstandsverteilung bei kleineren und größeren Abstän-

den sind durch das Rauschen oder Abweichungen in der Hintergrundkorrektur bedingt und unterscheiden sich in den verschiedenen Datensätzen.

Durch symmetrische Erweiterung der Einheitszelle der veröffentlichten Kristallstruktur von Faktor-B-vWF-A (1Q0P.pdb) wird ersichtlich, dass der Kristall durch Stapelung von Protein-Trimeren gebildet wird.<sup>[6]</sup> Diese Kristallstruktur wurde aus der Mutante Cys267Ser erhalten, um die Bildung intermolekularer Disulfidbrücken zu vermeiden. Der Abstand der C $\alpha$ -Atome der von uns markierten Aminosäurereste beträgt 5.77 nm. Mittels Deep View - spdbv3.7 wurde in diesem Strukturmodell Ser durch Cys ersetzt und dieses durch MTSSL modifiziert.<sup>[14]</sup> Der optimale Diederwinkel um die C $\beta$ -S-Bindung wurde anschließend durch Minimierung der Wechselwirkungen der Markerseitengruppe mit dem Protein gefunden. Dadurch ergab sich ein erwarteter Abstand von 6.6 nm zwischen den N-O-Bindungsmitten der Nitroxide (Abbildung 1 d). Die Spinsonde ist etwas flexibel, und das C $\beta$ -Atom der Ser267-Seitengruppe weist bereits in der Kristallstruktur einen großen Temperaturfaktor von 51 Å<sup>2</sup> auf; daher widerspricht die Größe der Abweichung zwischen dieser Voraussage und unserem Messwert noch nicht der Annahme, dass sich auch in Lösung die gleiche Art von Trimer bildet wie in der Kristallstruktur. Da allerdings ein Gleichgewicht zwischen Monomeren und Oligomeren vorliegt, kann auf der Basis der Modulationstiefe der DEER-Daten nicht nachgewiesen werden, dass es sich um ein Trimer und nicht um ein Dimer handelt.

Durch das Vierpuls-DEER-Experiment lässt sich sowohl in der Version mit konstanter als auch in der Version mit variabler Länge der Pulssequenz ein Abstand von  $(6.15 \pm 0.14)$  nm in gefrorener Lösung von Faktor-B-vWF-A messen. Dabei handelt es sich um den größten bisher mit EPR-Techniken an einem Protein gemessenen Abstand und zugleich um die erste Charakterisierung eines zuvor in Lösung unbekannten, nichtkovalent gebundenen Protein-Protein-Komplexes mit einer solchen Technik. Das Messergebnis ist in Einklang mit der Vorstellung, dass in Lösung die gleichen vWF-A-Trimeren auftreten wie im Kristall. Obwohl damit nun diese Wechselwirkung in verdünnter Lösung nachgewiesen werden konnte, gibt es bisher keinen Hinweis darauf, dass die Trimerisierung dieser Domäne irgendeine physiologische Bedeutung hat (vermutlich können die Domänen in intaktem Faktor B nicht in dieser Weise miteinander assoziieren). Auch die Trimerisierung der isolierten Domäne in Lösung war zuvor nicht beobachtet worden. Wir erwarten, dass die hier demonstrierte Technik für die Bestimmung intermolekularer Wechselwirkungen vielfältig anwendbar sein wird – sowohl auf Proteinkomplexe als auch auf selbstorganisierte Assoziate synthetischer Makromoleküle in Lösung.

### Experimentelles

**Protein-Präparation:** Rekombinante vWF-A-Domäne des menschlichen Faktors B wurde in *E. coli* als Fusionsprotein mit Glutathion-S-Transferase nach einer publizierten Methode exprimiert.<sup>[15]</sup> Die Reinigungsprozedur wurde so modifiziert, dass das Protein spinmarkiert werden konnte; so wurde z. B. ein Zell-Lyse-Puffer ohne Iodacetamid verwendet, um den Cystein-Rest für die Reaktion mit dem

Nitroxidmarker zugänglich zu erhalten. Das Protein wurde bei Raumtemperatur 2 h mit dem Methanthiosulfonat-Spinmarker (Toronto Research Chemicals) umgesetzt, bevor 400 U menschliches Thrombin in 5 mL PBS (phosphate buffered saline; Phosphatpuffer) zugesetzt wurden. Nach der Umsetzung für weitere 16 h wurden überschüssiger Spinmarker und unerwünschte Proteine durch GStop- und HiTrap-Benzamidin-FF-Säulen entfernt, wobei eine wässrige Waschlösung mit 20 mM Natriumphosphat und 0.15 M NaCl bei pH 7.5 verwendet wurde. In einem zweiten Waschschriff wurde ein Puffer mit hohem Salzgehalt verwendet (20 mM Natriumphosphat, 1.0 M NaCl, pH 7.5). Die gesammelten vWF-A-Fractionen wurden aufkonzentriert und durch Gelfiltration an einer S75-Säule (Amersham Biosciences) weiter aufgereinigt.

DEER-Experimente: Vierpuls-DEER-Experimente wurden mit der Pulssequenz  $\pi/2(\nu_{\text{beob.}})-\tau_1-\pi(\nu_{\text{beob.}})-t'-\pi(\nu_{\text{pump.}})-(\tau_1+\tau_2-t')-\pi(\nu_{\text{beob.}})-\tau_2$ -echo bei X-Band-Frequenzen (ca. 9.5 GHz) und einer Temperatur von 50 K durchgeführt, wobei Beobachterpulsängen von 32 ns und eine Pumppulslänge von 12 ns verwendet wurden.<sup>[13]</sup> Die Frequenz des Pumppulses war 65 MHz niedriger als diejenige der Beobachterpuls. Der Resonator wurde überkoppelt ( $Q \approx 100$ ) und der Pumpuls im Zentrum der Mikrowellenmode sowie auf dem Maximum des Nitroxid-Spektrums eingestrahlt. Protonen- und Deuteriummodulationen wurden durch Addition von acht Datensätzen mit variablem Pulsabstand  $\tau_1$  minimiert, der Startwert war 400 ns, und das Inkrement betrug  $\Delta\tau_1 = 16$  ns. Der Pulsabstand  $\tau_2$  zwischen dem ersten Hahn-Echo und dem letzten Beobachterpuls betrug 6  $\mu$ s. Es wurden Sätze von 755 Datenpunkten mit einem Zeitinkrement von  $\Delta t = 8$  ns aufgenommen. Die Messzeit für den in Abbildung 1a gezeigten Datensatz betrug etwa 12 h. In der Berechnung der Abstandsverteilungen mit dem selbstgeschriebenen Programm Deer-Analysis 2004 wurde eine exponentielle Hintergrundkorrektur verwendet.<sup>[16]</sup>

Eingegangen am 20. Oktober 2005

Online veröffentlicht am 10. Januar 2006

**Stichwörter:** DEER · EPR-Spektroskopie · Nichtkovalente Wechselwirkungen · Proteine · Strukturaufklärung

- [1] S. J. Davis, S. Ikemizu, E. J. Evans, L. Fugger, T. Bakker, A. P. van der Merwe, *Nat. Immunol.* **2003**, 4, 217.
- [2] H. M. Keizer, R. P. Sijbesma, *Chem. Soc. Rev.* **2005**, 34, 226.
- [3] Y. Yan, G. Marriott, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, 7, 635.
- [4] G. Jeschke, *ChemPhysChem* **2002**, 3, 927.
- [5] G. Jeschke, A. Bender, H. Paulsen, H. Zimmermann, A. Godt, *J. Magn. Reson.* **2004**, 169, 1.
- [6] A. A. Bhattacharya, M. L. Luper, D. E. Staunton, R. C. Liddington, *Structure* **2004**, 12, 371.
- [7] A. D. Milov, K. M. Salikhov, M. D. Shirov, *Fiz. Tverd. Tela* **1981**, 23, 975.
- [8] P. P. Borbat, J. H. Freed, *Chem. Phys. Lett.* **1999**, 313, 145.
- [9] P. P. Borbat, J. H. Davis, S. E. Butcher, J. H. Freed, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 7746.
- [10] O. Schiemann, N. Piton, Y. Mu, G. Stock, J. W. Engels, T. F. Prisner, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 5724.
- [11] G. Jeschke, A. Bender, T. Schweikardt, G. Panek, H. Decker, H. Paulsen, *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 18623.
- [12] G. Jeschke, G. Panek, A. Godt, A. Bender, H. Paulsen, *Appl. Magn. Reson.* **2004**, 26, 223.
- [13] M. Pannier, S. Veit, A. Godt, G. Jeschke, H. W. Spiess, *J. Magn. Reson.* **2000**, 142, 331.
- [14] N. Guex, M. C. Peitsch, *Electrophoresis* **1997**, 18, 2714.
- [15] S. C. Williams, J. Hinshelwood, S. J. Perkins, R. B. Sim, *Biochem. J.* **1999**, 342, 625.
- [16] Verfügbar unter: <http://www.mpip-mainz.mpg.de/~jeschke/distance.html>.