

Studien der räumlichen Struktur von Proteinmolekülen mit magnetischer Kernresonanzspektroskopie*

Von KURT WÜTHRICH

Institut für Molekularbiologie und Biophysik, Eidgenössische Technische Hochschule, Zürich

Abstract

A survey is presented of some recent high resolution nuclear magnetic resonance studies on the three-dimensional molecular structures in proteins. The first part of the paper deals with the basic properties of the proton NMR spectra of diamagnetic and paramagnetic protein molecules. This is followed by the description of several selected experiments, including studies of the thermal denaturation of lysozyme, the reaction of ribonuclease A with inhibitor molecules, and the coordination of the heme iron in cytochrome c.

Einleitung

Die Untersuchung der Zusammenhänge zwischen molekularer Struktur und biologischer Funktion von Peptiden und Proteinen ist eine der Hauptarbeitsrichtungen der Molekularbiologie und Biophysik. Der Entwicklung von Methoden zur Strukturaufklärung kommt dabei besondere Bedeutung zu. Große Fortschritte wurden im Verlaufe der vergangenen fünfzehn Jahre in der Aminosäuresequenzanalyse gemacht, so daß wir heute die Primärstrukturen einer größeren Zahl von Peptiden und Proteinen kennen¹. Die spezifische Wirkungsweise der in Transportvorgängen und in enzymatischen Prozessen aktiven Proteinmoleküle wird aber nicht nur durch die Primärstruktur, sondern vor allem durch die räumliche Anordnung der Polypeptidketten bestimmt. Obschon sich aus den von PAULING und COREY² aus kristallographischen Untersuchungen an Aminosäuren und kleinen Peptiden abgeleiteten strukturellen Prinzipien gewisse Einschränkungen über die bei einer vorgegebenen Aminosäuresequenz möglichen Konformationen ergeben³, ist es im allgemeinen nicht möglich, aus der Primärstruktur die unter physiologischen Bedingungen stabile Konformation herzuleiten. Somit muß wenigstens vorläufig auch die räumliche Struktur an jedem Molekül durch experimentelle Methoden ermittelt werden. Derartige Studien sind sehr aufwendig, so daß bisher nur für eine relativ kleine Zahl von Peptiden und Proteinen zuverlässige Daten erhalten werden konnten. Es ist deshalb heute eine der dringendsten Aufgaben, experimentelle Methoden zur Strukturaufklärung

weiterzuentwickeln und ihre Anwendung rationeller zu gestalten.

Die bisher vielleicht spektakulärsten Ergebnisse der experimentellen Strukturuntersuchungen wurden durch Röntgenstrukturanalysen an Protein-Einkristallen erzielt. Man kann wohl ohne Übertreibung sagen, daß mit der Ermittlung der räumlichen Molekülstrukturen von Myoglobin und Hämoglobin durch KENDREW⁴ und PERUTZ⁵ vor ziemlich genau zehn Jahren eine neue Ebene des Verständnisses von Proteinkonformationen erreicht wurde. In der Zwischenzeit sind von verschiedenen Arbeitsgruppen in Europa, Japan und den USA mehr oder weniger detaillierte Ergebnisse von röntgenkristallographischen Studien an etwa dreißig Proteinen beschrieben worden⁶. Es ergeben sich aber auch gewisse Einschränkungen der Anwendung von Röntgenmethoden. In vielen Fällen ist es schwierig, geeignete Einkristalle zu züchten. Zudem stellt sich immer wieder die Frage, in welchem Ausmaß die in Einkristallen beobachteten strukturellen Eigenheiten auch unter physiologischen Verhältnissen vorliegen. Es ist deshalb von Interesse, die Röntgenuntersuchungen durch Methoden zu ergänzen, mit denen gewisse Aspekte der Molekülkonformationen in Lösung gemessen werden können. Die magnetische Kernresonanzspektroskopie (NMR) ist eine besonders attraktive Methode für derartige Untersuchungen.

Die erste Untersuchung eines Proteins mit hochauflösender NMR-Spektroskopie wurde vor fast fünfzehn Jahren von SAUNDERS, WISHNIA und KIRKWOOD⁷ beschrieben. In den folgenden Jahren wurden von verschiedenen Forschern weitere Experimente durchgeführt^{8–10}. Obwohl diese frühen Versuche ganz klar auf die großen potentiellen Möglichkeiten der NMR-Spektro-

³ G. N. RAMACHANDRAN und V. SASIKHARAN, *Advances Protein Chem.* 23 (1968) 283.

⁴ J. C. KENDREW, *Science* 139 (1963) 1259.

⁵ M. F. PERUTZ, *Science* 140 (1963) 863.

⁶ R. E. DICKERSON und I. GEIS, *The Structure and Action of Proteins*, Harper & Row, New York 1969.

⁷ M. SAUNDERS, A. WISHNIA und J. G. KIRKWOOD, *J. Amer. Chem. Soc.* 79 (1957) 3289.

⁸ A. WISHNIA und M. SAUNDERS, *J. Amer. Chem. Soc.* 84 (1962) 4235.

⁹ A. KOWALSKY, *J. Biol. Chem.* 237 (1962) 1807; *Biochem.* 4 (1965) 2382.

¹⁰ M. MANDEL, *Proc. Nat. Acad. Sci. US* 52 (1964) 736; *J. Biol. Chem.* 240 (1965) 1586.

* Vorgetragen am Symposium über Biopolymere des Schweizerischen Chemiker-Verbandes in Bern, 26. bis 28. August 1970.

¹ M. O. DAYHOFF (ed.), *Atlas of Protein Sequence and Structure 1969*, Vol. 4, National Biomedical Research Foundation, Silver Spring (Md) 1969.

² L. PAULING und R. B. COREY, *Proc. Nat. Acad. Sci. US* 37 (1951) 729.

skopie von Proteinen hinwies, blieb der Informationsgehalt der Spektren wegen mangelnder Auflösung und Sensitivität der damals zur Verfügung stehenden Spektrometer recht gering. Die instrumentelle Weiterentwicklung, speziell die Einführung von supraleitenden Spulen zur Erzeugung des polarisierenden Magnetfeldes¹¹, hat dann seit etwa 1966 den NMR-Untersuchungen von Biopolymeren großen Auftrieb gegeben. Obschon auch andere spezialisierte NMR-Methoden erfolgreich zum Studium von Proteinen angewendet wurden¹²⁻¹⁴, wird die Diskussion in der vorliegenden Arbeit auf die hochauflösende NMR-Spektroskopie beschränkt. Zuerst werden einige allgemeine Eigenschaften der NMR-Spektren von Proteinen beschrieben und anschließend verschiedene Anwendungen der Methode mit ausgewählten Beispielen illustriert.

Magnetische Kernresonanzspektroskopie von Proteinen

Die Resonanzbedingung. In einem NMR-Experiment wird die zu untersuchende Substanz einem starken Magnetfeld ausgesetzt, und man beobachtet dann die Übergänge zwischen den Zeeman-Niveaus der Kerne. Obschon zahlreiche Atomkerne prinzipiell für NMR-Studien geeignet sind, wurden bisher vor allem die Protonenresonanzspektren von organischen Verbindungen untersucht¹⁵. Die Resonanzbedingung für ein einzelnes Proton ist gegeben durch

$$h\nu = \gamma \hbar H_0(1 - \sigma), \quad (1)$$

wobei h die Plancksche Konstante, ν die Resonanzfrequenz in Hertz, γ das gyromagnetische Verhältnis für Protonen, $\hbar = h/2\pi$ und H_0 das von außen angelegte Magnetfeld ist. Die Abschirmungskonstante σ , welche die Unterschiede zwischen den Resonanzbedingungen von chemisch nicht äquivalenten Protonen beschreibt, ist eine kleine Zahl von der Größenordnung 10^{-6} . Deshalb sind sämtliche Protonenresonanzen von diamagnetischen organischen Molekülen in einem engen Spektralbereich, der sich über etwa 10 ppm (Parts per Million) des angelegten Magnetfeldes erstreckt, zu beobachten. Es ist üblich, die Resonanzpositionen durch «chemische Verschiebungen» in ppm relativ zu einer Standard-Referenzsubstanz anzugeben. In wässriger Lösung wird häufig DSS (2,2-Dimethyl-2-Silapentan-5-Sulfonat) als Referenz verwendet. Jede der durch die chemischen Verschiebungen separierten Resonanzen kann durch Kopplung zwischen den verschiedenen Protonen in mehrere

Linien aufgespalten werden. Bei den hier zu besprechenden Spektren sind aber diese Multipllettstrukturen im allgemeinen nicht aufgelöst. In den im folgenden beschriebenen Messungen wurde entweder das Magnetfeld H_0 bei konstanter Frequenz ν oder die Frequenz ν bei konstantem H_0 kontinuierlich verändert. In einem Experiment bei konstanter Radiofrequenz entsprechen die negativen Zahlen in Abb. 1 einer Veränderung von H_0 zu kleineren Feldwerten.

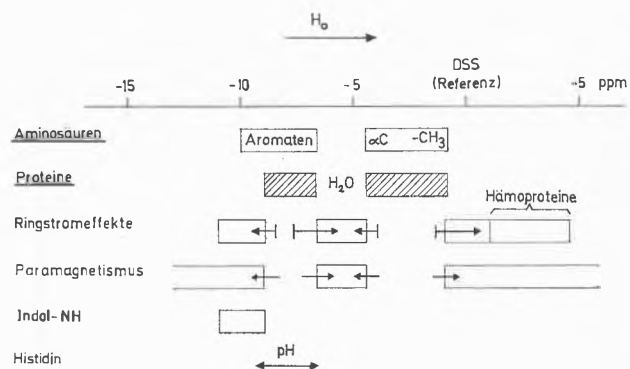


Abb. 1. Schema der Protonen-NMR-Spektren von Aminosäuren und Peptiden. Die Resonanzpositionen werden in ppm (Parts per Million) des angelegten Magnetfeldes, relativ zu DSS, angegeben. Negative Zahlen entsprechen Verschiebungen zu tieferem Feld bei konstanter Frequenz. Die Resonanzen der individuellen Aminosäuren werden in den Spektralbereichen von $-0,9$ bis $-4,5$ und $-6,7$ bis $-10,0$ ppm beobachtet. In Proteinen enthalten diese Bereiche deshalb eine große Zahl von sich gegenseitig überlagernden Resonanzen. Andererseits können in nativen Proteinen die Resonanzen einzelner Aminosäurereste durch Ringstromeffekte oder Wechselwirkungen mit paramagnetischen Zentren beträchtlich verschoben werden. Die Beobachtung der resultierenden ungewöhnlichen Resonanzpositionen kann zwischen $-4,5$ und $-6,5$ ppm durch das Auftreten der Wasserresonanz erschwert sein, aber außerhalb des Bereiches von etwa $-0,5$ bis $-9,0$ ppm werden für viele Proteine eine Anzahl von gut aufgelösten Linien beobachtet. Weiter können in günstigen Fällen die Indol-NH-Protonen der Tryptophanylreste auf Grund ihrer Resonanzpositionen und gewisse Protonen der Histidylreste auf Grund ihrer pH-Abhängigkeit genau identifiziert werden.

Experimentelles. Die chemische Verschiebung in Hertz ist proportional dem angelegten Feld H_0 (Gl. 1), und entsprechend verbessert sich im allgemeinen mit zunehmendem Magnetfeld die spektrale Auflösung. Dies ist für Studien an Biopolymeren, die eine sehr große Zahl von Protonen pro Molekül enthalten, besonders wichtig. Für biologische Anwendungen sind deshalb in den letzten Jahren vor allem Spektrometer verwendet worden, in denen durch eine supraleitende Spule ein der Protonenresonanzfrequenz von 220 Megahertz entsprechendes Magnetfeld erzeugt wird¹¹. Die spektrale Auflösung wird auch durch die Linienbreite der Resonanzen stark beeinflusst. Diese ist abhängig von der Geschwindigkeit der Brownschen Bewegungen der beobachteten Moleküle und nimmt mit steigendem Molekulargewicht stark zu. Währendem für kleine organische Moleküle Linienbreiten von weniger als 1 Hertz typisch sind, werden die Resonanzen in einem Protein mit Molekulargewicht von 20000 etwa 20 bis 40 Hertz breit, was bei 220 Megahertz 0,1 bis 0,2 ppm entspricht.

¹¹ F. A. NELSON und H. E. WEAVER, *Science* 146 (1964) 223.

¹² M. COHN, in *Magnetic Resonance in Biological Systems* (ed. A. EHRENBERG, B. G. MALMSTRÖM und T. VÄNNGÄRD), Pergamon Press, London 1967, S. 101.

¹³ S. H. KOENIG und W. E. SCHILLINGER, *J. Biol. Chem.* 244 (1969) 3283, 6520.

¹⁴ K. WÜTHRICH, *Structure and Bonding*, Vol. VIII, Springer, Berlin 1970.

¹⁵ Siehe z. B. F. A. BOVEY, *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, Academic Press, New York 1969.

Die Bedingungen, bei denen NMR-Messungen an biologischen Substanzen durchgeführt werden, können der physiologischen Umgebung der Moleküle sehr ähnlich sein. Für die Untersuchung von Proteinen werden meistens Lösungen in H_2O oder D_2O verwendet, und die Temperatur kann zwischen 0 und $80^\circ C$ variiert werden. Die Sensitivität der NMR-Methode nimmt wegen der größeren effektiven Magnetisierung bei höherem Feld H_0 zu, und das Verhältnis von Signal zu Rauschen kann durch Aufsummieren der Spektren in einem Kleincomputer (CAT) weiter verbessert werden. Deshalb ist es mit einigem Zeitaufwand möglich, biologische Substanzen mit einem 220-Megahertz-Spektrometer auch bei relativ geringen Konzentrationen zu untersuchen. Die Grenze dürfte heute bei etwa 0,0005 molaren Lösungen liegen.

Die Protonenresonanzen in Aminosäuren und Proteinen. Im Protonenresonanzspektrum eines Proteins liegen die meisten Resonanzen in den Spektralbereichen von etwa $-0,9$ bis $-4,5$ ppm und $-6,7$ bis $-10,0$ ppm, wo auch sämtliche Linien der individuellen Aminosäuren beob-

achtet werden (Abb.1)^{16,17}. Wegen der großen Zahl von Protonenresonanzen und den dem hohen Molekulargewicht entsprechend großen Linienbreiten sind die Spektren der Proteine in diesen Bereichen im allgemeinen auch bei 220 Megahertz nicht vollständig aufgelöst (Abb.2). Die Interpretation blieb deshalb meistens auf eine qualitative Zuordnung einzelner Absorptionsbereiche beschränkt^{9,10,19}. So weiß man, daß die Resonanzen zwischen $-0,9$ und $-1,5$ ppm vor allem den Methylgruppen der aliphatischen Aminosäurereste zuzuordnen sind. Zwischen $-1,5$ und $-3,5$ ppm werden die übrigen Protonen der aliphatischen Seitenketten beobachtet, wobei die ϵ -Methylenresonanzen der Lysylgruppen meistens bei etwa $-3,0$ ppm deutlich erkennbar sind (Abb.2). Von $-3,5$ bis $-4,5$ ppm haben wir die den Protonen am α -Kohlenstoffatom entsprechenden Absorptionsbanden, die sich zum Teil mit der bei etwa $-4,8$ ppm auftretenden Linie des Wassers und ihren Seitenbändern überlagern (Abb.2). Im Bereich von $-6,7$ bis etwa $-9,0$ ppm treten die CH-Resonanzen der aromatischen Aminosäurereste und die Amidprotonen der Peptidbindungen auf. Letztere sind im allgemeinen nur in Lösungen in H_2O zu beobachten, da sie in D_2O durch Deuterium ersetzt werden. In günstigen Fällen kann der Verlauf dieser Austauschreaktion im NMR-Spektrum verfolgt werden.

Oft werden in den NMR-Spektren von Proteinen außerhalb der von den individuellen Aminosäuren beanspruchten Spektralbereiche einzelne gut aufgelöste Resonanzen beobachtet (Abb.2). Aus Studien dieser ungewöhnlichen Resonanzpositionen lassen sich besonders detaillierte strukturelle Informationen ableiten. In Abb.1 sind schematisch vier NMR-spektroskopische Besonderheiten angegeben, die für die im folgenden diskutierten Anwendungsbeispiele von Bedeutung sind.

Ringstromverschiebungen. Die diamagnetische Anisotropie von aromatischen Molekülen¹⁸ wirkt sich durch die sogenannten Ringstromeffekte auf die NMR-Spektren aus. Durch das von außen angelegte Magnetfeld H_0 wird in den aromatischen Ringen ein lokales Magnetfeld induziert, das in der Ringebene parallel, über und unter der Ringebene entgegengesetzt zu H_0 ist (Abb.3). In einem Proteinmolekül sind die Protonen in der Umgebung der aromatischen Aminosäurereste zusätzlich zu H_0 diesen lokalen Ringstromfeldern ausgesetzt, was ihre Resonanzpositionen beträchtlich verschieben kann^{9,19}. So können die durch Phenylalanin bewirkten Ringstromverschiebungen bis zu 2 ppm betragen²⁰. Dies kann die Methylresonanzen eines Leucylrestes, die normaler-

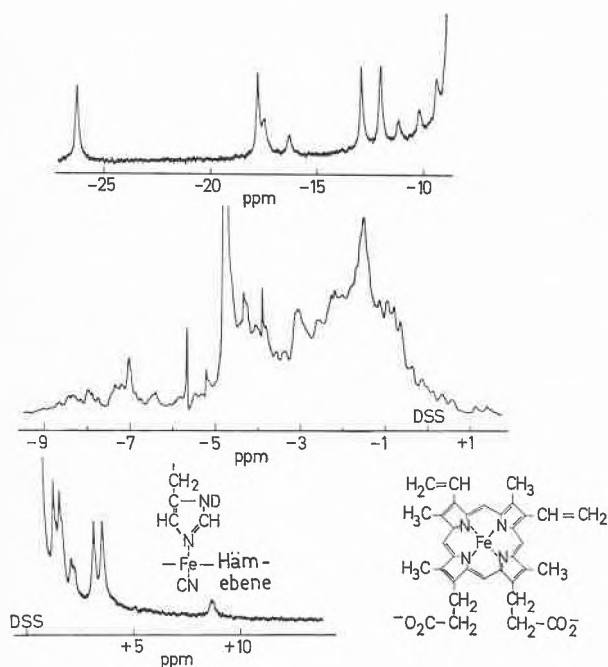


Abb.2. NMR-Spektrum von Delphin-Cyanoferrimyoglobin bei 220 Megahertz. Das Spektrum wurde in einem Durchgang an einer etwa 0,01-M Lösung in deuteriertem Phosphatpuffer, $pD = 7,0$, bei $35^\circ C$ aufgenommen. Die drei Spektralbereiche sind mit verschiedenen horizontalen und vertikalen Maßstäben wiedergegeben. Die Resonanzen zwischen DSS und -9 ppm entsprechen etwa 1000 Protonen der Polypeptidkette. Die scharfen Linien zwischen $-3,8$ und $-5,8$ ppm entsprechen der HDO-Resonanz und den durch die Probenrotation erzeugten Seitenbändern dieser starken Linie. Die Intensitäten der einzelnen Resonanzen zwischen -10 und -27 ppm und zwischen DSS und $+10$ ppm entsprechen einem, zwei oder drei Protonen. Einige dieser gut aufgelösten Resonanzen konnten den Protonen der Hämgruppe und des axialen Histidins (in der Abbildung unten rechts) zugeordnet werden (Referenz²³).

¹⁶ G. C. K. ROBERTS und O. JARDETZKY, *Adv. Protein Chem.* 24 (1970) 447.

¹⁷ C. C. McDONALD und W. D. PHILLIPS, *J. Amer. Chem. Soc.* 91 (1969) 1513.

¹⁸ L. PAULING, *J. Chem. Physics* 4 (1936) 673.

¹⁹ C. C. McDONALD und W. D. PHILLIPS, *J. Amer. Chem. Soc.* 89 (1967) 6332.

²⁰ C. E. JOHNSON und F. A. BOVEY, *J. Chem. Physics* 29 (1958) 1012.

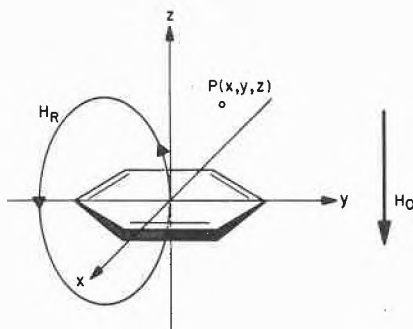


Abb. 3. Das lokale Ringstromfeld H_R eines aromatischen Moleküls. H_0 ist das angelegte Magnetfeld. Die Ringstromverschiebung für die Protonen P wird durch ihre Position relativ zum Ring und durch die Größe des aromatischen Ringes bestimmt

weise bei etwa $-0,9$ ppm auftreten, so weit zu höherem Feld verschieben, daß sie als gut aufgelöste Linien erscheinen (Abb. 1). In der Nähe der Hämgruppen in Hämoproteinen können Ringstromverschiebungen von 4 bis 5 ppm auftreten. Ist die Größe des Ringes gegeben, werden Variationen der Ringstromverschiebungen im wesentlichen nur durch Veränderung der Positionen der beobachteten Protonen relativ zum aromatischen Ring hervorgerufen. Da die Ringstromverschiebungen mit zunehmender Distanz vom aromatischen Ring sehr rasch abnehmen²⁰, ist die Beobachtung der Ringstromeffekte eine empfindliche Methode zum Nachweis von Veränderungen der Proteinkonformation.

Paramagnetische Effekte. Wechselwirkungen mit den ungepaarten Elektronen eines paramagnetischen Zentrums können zu großen Verschiebungen der Protonenresonanzen führen. Im Spektrum von Cyanoferrimyoglobin (Abb. 2) sind sämtliche der gut aufgelösten Resonanzen zwischen -10 und -30 ppm und die Mehrzahl der Linien zwischen 1 und 10 ppm durch den Paramagnetismus der Hämgruppe zu erklären²¹. Durch Studien dieser «Hyperfeinverschiebungen» können Informationen über die Proteinkonformation und über die elektronischen Zustände des paramagnetischen Zentrums erhalten werden^{14, 21}.

Ringstromverschiebungen und paramagnetische Effekte erzeugen natürlich nicht nur aufgelöste Resonanzen in ungewöhnlichen Positionen, sondern beeinflussen auch den Spektralbereich -1 bis -9 ppm. Entsprechend wird auch diese Region des Spektrums durch Veränderungen der Proteinkonformation beeinflusst. Es ist aber wegen der beschränkten spektralen Auflösung im allgemeinen nicht möglich, diese Veränderungen spezifischen Molekülregionen zuzuordnen.

Indol-N-H-Resonanz. Die Resonanzen der am Indolstickstoff gebundenen Protonen der Tryptophanylreste treten bei sehr tiefem Feld auf (Abb. 1) und sind in den NMR-Spektren von Proteinen oft als gut aufgelöste

Linien zu beobachten. Die Zuordnung dieser Resonanzen wird dadurch erleichtert, daß die N-H-Protonen in D_2O durch Deuterium ausgetauscht werden können.

Histidylgruppen. Die Resonanzen der am C_2 -Kohlenstoffatom des Imidazolringes gebundenen Protonen der Histidylreste werden zwischen $-8,0$ und $-9,2$ ppm beobachtet. Nach vollständigem Austausch der Amidprotonen durch Deuterium treten in diesem Bereich im allgemeinen keine anderen Resonanzen auf. Für die Zuordnung ist weiter von Bedeutung, daß die Resonanzpositionen der Imidazolprotonen stark abhängig sind von der Protonenaktivität im pH-Bereich 5 bis 8¹⁶.

Die NMR-Methode wird dadurch besonders attraktiv, daß viele der ungewöhnlichen Resonanzpositionen den Molekülbereichen zuzuordnen sind, die für die biologische Aktivität der Proteine eine hervorragende Rolle spielen. So sind Histidyl- und Tryptophanylreste besonders häufig im aktiven Bereich von Enzymen nachgewiesen oder postuliert worden, und in Hämoproteinen bilden die Hämgruppen ausnahmslos einen wichtigen Teil des aktiven Zentrums.

Untersuchung der Denaturierung von Proteinen

Als Voraussetzung für NMR-Studien an Proteinen ist es wichtig, daß man die durch die Primärstruktur bedingten spektralen Eigenschaften von den durch die Sekundär- und Tertiärstrukturen bedingten Eigenheiten unterscheiden kann. Experimentell ist diese Differenzierung möglich, indem man die Spektren der individuellen Aminosäuren, des Proteins in der Random-Coil-Form und des nativen Proteins vergleicht. Aus derartigen Untersuchungen ergeben sich charakteristische Beziehungen zwischen NMR-Spektrum und Proteinkonformation, die die Grundlage bilden für Studien über den Verlauf der Denaturierung bei einzelnen Proteinen.

In kurzen Peptidketten wird im allgemeinen in wäßriger Lösung keine stabile räumliche Struktur beobachtet. Lineare Oligopeptide sind deshalb geeignete Modellverbindungen zur Untersuchung der durch die Primärstruktur beeinflussten spektralen Eigenschaften. Systematische Studien zeigten, daß in Lösungen in D_2O , wo die Amidprotonen durch Deuterium ersetzt sind, nur die Resonanzpositionen der am α -Kohlenstoff gebundenen Protonen durch die benachbarten Aminosäurereste merklich beeinflusst werden²². Die Resonanzpositionen der Aminosäureseitenketten sind in den individuellen Aminosäuren und in den Peptiden praktisch identisch.

MCDONALD und PHILLIPS^{17, 19, 23} untersuchten die NMR-Spektren von Lysozym und weiteren Proteinen in der nativen Form und der Random-Coil-Konfigura-

²¹ K. WÜTHRICH, R. G. SHULMAN und J. PEISACH, *Proc. Nat. Acad. Sci. US* 60 (1968) 373.

²² A. NAKAMURA und O. JARDETZKY, *Biochemistry* 7 (1968) 1226.

²³ C. C. McDONALD und W. D. PHILLIPS, in *Biological Macromolecules* (eds. G. O. FASMAN und S. N. TIMASHEFF), Dekker, New York 1970 (im Druck).

tion. Lysozym aus «Hühnereiweiß» (HEW) besteht aus einer Polypeptidkette von 129 Aminosäureresten, die vier Disulfidbrücken als Querverbindungen zwischen den Aminosäureresten enthält. In den Spektralbereichen, in denen die Aminosäureseitenketten beobachtet werden, entspricht das NMR-Spektrum des denaturierten Lysozyms weitgehend der Summe der Resonanzen der konstituierenden Aminosäuren (Abb. 4, A und B). Dies wird verständlich, wenn man bedenkt, daß die Umgebung der Aminosäuren in der Random-Coil-Konfiguration des Proteins im wesentlichen durch das Lösungsmittel bestimmt ist. Beträchtliche spektroskopische Unterschiede ergeben sich zwischen der denaturierten und der nativen Form von Lysozym (Abb. 4, B und C). Die für ein diamagnetisches Molekül zum Teil recht ungewöhnlichen Resonanzpositionen in der nativen Konformation sind darauf zurückzuführen, daß die Umgebung der im Molekülinnern lokalisierten Aminosäuren von den räumlich benachbarten Aminosäuregruppen mitbestimmt wird. Besonders illustrativ ist der in Abb. 5 wiedergegebene Bereich des Lysozym-Spektrums, der die Indol-NH-Resonanzen der Tryptophanylreste enthält. HEW-Lysozym enthält sechs Tryptophanylreste in den Positionen 28, 62, 63, 108, 111 und 123 der Polypeptidkette. Obschon sie in bezug auf die Primärstruktur chemisch nicht äquivalent sind, treten die 6 Indol-NH-Resonanzen im denaturierten Protein als eine einzige, gut aufgelöste Linie bei -10 ppm auf (Abb. 5C). In der

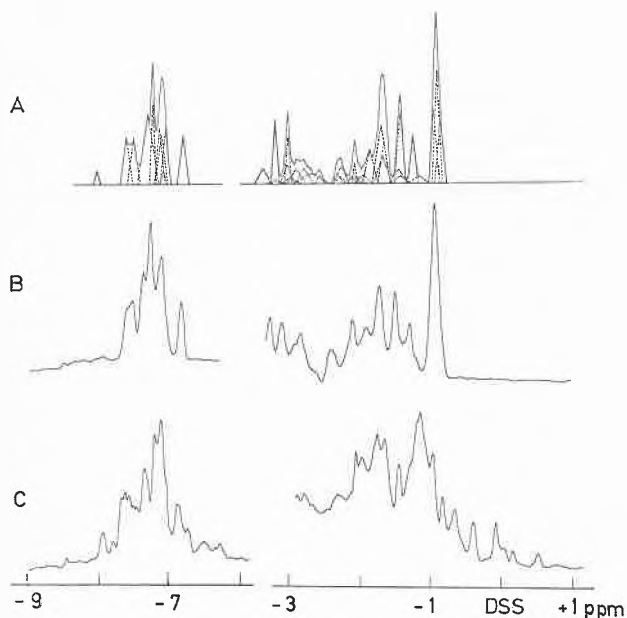


Abb. 4. NMR-Spektren von Lysozym bei 220 Megahertz. A: Summe der Resonanzen der im HEW-Lysozym enthaltenen Aminosäuren. Dieses Spektrum wurde unter Annahme einer schematischen Linienform und mit Berücksichtigung der für das Protein beobachteten Linienbreiten aus der Aminosäuresequenz und den Spektren der individuellen Aminosäuren berechnet. B: Lysozym in der Random-Coil-Konfiguration bei 80°C . C: Natives Lysozym bei 65°C . Die Spektren B und C wurden an 10prozentigen Lösungen in D_2O bei $p\text{D} = 5,0$ gemessen. Der aromatische Spektralbereich ist in A und B vierfach, in C 2,3fach verstärkt dargestellt (Referenz²³)

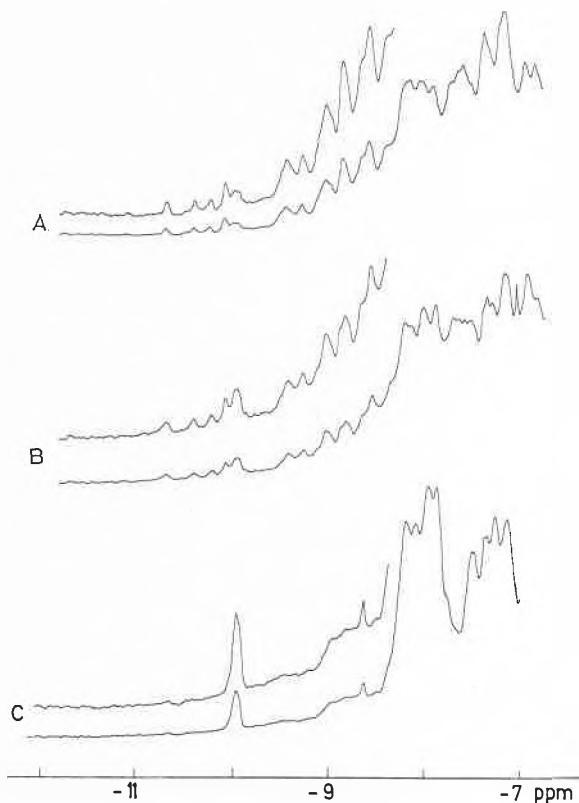


Abb. 5. NMR-Spektren von HEW-Lysozym zwischen -7 und -12 ppm, wo die aromatischen CH-Protonen und die Amidprotonen auftreten. A: Native Konformation bei 65°C . B: Teilweise denaturiert bei 67°C . C: Random-Coil-Konformation bei 71°C . Die Spektren wurden an 15prozentigen Lösungen in H_2O , $p\text{H} = 3,3$, bei 220 Megahertz aufgenommen. Zwischen -8 und -12 ppm sind die Spektren mit zwei verschiedenen Verstärkungsfaktoren wiedergegeben. Die Indol-NH-Resonanzen der Tryptophanylreste sind im Bereich von etwa $-9,7$ bis $-11,0$ ppm zu beobachten (Referenz²³)

nativen Konformation sind die Umgebungen der einzelnen Tryptophanylreste etwas verschieden, so daß diese auch magnetisch nicht mehr äquivalent sind. Man kann zwischen -10 und -11 ppm fünf Resonanzen unterscheiden, von denen jede einem Indol-NH-Proton entspricht (Abb. 5A). Die sechste Indol-NH-Resonanz wurde wahrscheinlich in die Region der übrigen Amidprotonen bei höherem Feld verschoben und konnte noch nicht mit Sicherheit identifiziert werden²³.

Ein auffälliger Unterschied zwischen den Spektren des nativen und des denaturierten Lysozyms ist bei $-0,9$ ppm zu beobachten. Die intensive Absorptionsbande in der Random-Coil-Form (Abb. 4 B) entspricht den Methylresonanzen der aliphatischen Aminosäureseitenketten, die magnetisch annähernd äquivalent sind. Im nativen Lysozym ist die Resonanzintensität in dieser Position wesentlich geringer, und es treten neue Linien bei höherem und tieferem Feld auf. Dies wurde dadurch erklärt, daß sich die Methylgruppen zum Teil in der Nähe von aromatischen Aminosäuren befinden und ihre Resonanzen durch Ringstromeffekte beträchtlich verschoben werden (vgl. Abbildungen 1 und 3). Verschiedene Proteine unterscheiden sich gerade durch die spek-

tralen Eigenschaften in dieser Region besonders deutlich. So entspricht im Lysozym die Intensität der durch Ringstromeffekte in den Spektralbereich $-0,9$ bis $+1,0$ ppm verschobenen Resonanzen etwa 65 Protonen, währenddem im Spektrum von Ribonuklease, die eine mit Lysozym vergleichbare Zahl von aromatischen Ringen und aliphatischen Methylgruppen aufweist, überhaupt keine Resonanzen deutlich in diesen Bereich verschoben sind. Wechselwirkungen zwischen aliphatischen und aromatischen Aminosäureseitenketten scheinen demnach in verschiedenen Proteinmolekülen von recht unterschiedlicher Bedeutung zu sein.

Interessante Resultate wurden durch Messungen an teilweise denaturierten Lösungen von Lysozym erhalten. Zwischen 65 und 75°C wird Lysozym reversibel denaturiert, wobei in der Random-Coil-Konfiguration die vier Disulfidbrücken erhalten bleiben. Während der Denaturierung wurden immer nur Resonanzen von zwei Proteinkonformationen beobachtet. So sind in einer teilweise denaturierten Lysozym-Lösung die Indol-NH-Resonanzen der nativen Konformation neben der Resonanz des denaturierten Proteins zu beobachten (Abb. 5 B). Da die Positionen entsprechender Resonanzen in den Spektren A und B (Abb. 5) nicht variieren, scheint es unwahrscheinlich, daß eine oder mehrere «Übergangsstrukturen» in schnellem Austausch mit den zwei beobachteten Konformationen vorliegen*. McDONALD und PHILLIPS schlagen für die Interpretation dieser Daten ein Modell für die Denaturierung von Lysozym vor, in dem die native Form und die Random-Coil-Konformation in einem kooperativen Gleichgewicht vorliegen²³. Die mittlere Lebensdauer in den zwei Zuständen wäre dann etwa 10 Millisekunden. Sie kann nicht kürzer sein, weil sonst in den teilweise denaturierten Lösungen an Stelle der Resonanzen der nativen Form und der Random-Coil-Konformation nur ein ausgemitteltetes Spektrum auftreten würde*. Weitere Beobachtungen scheinen darauf hinzuweisen, daß die Lebensdauer auch nicht wesentlich länger sein kann als diese untere Grenze.

In den vorgehend beschriebenen Versuchen wurden vor allem Verschiebungen der Positionen einer relativ kleinen Zahl von aufgelösten Resonanzen ausgewertet. Da die diesen Linien entsprechenden Protonen in bezug auf die Aminosäuresequenz und die räumliche Struktur über das ganze Protein verteilt sind, dürften diese Beobachtungen das Verhalten des Moleküls als Ganzes gut wiedergeben. Eine etwas allgemeinere Methode hat COHEN ADDAD²⁴ zur Untersuchung der Denaturierung von Ribonuklease entwickelt. Er hat einen von der Linienbreite der individuellen Resonanzen unabhängigen Parameter Ω aus dem ersten Moment des aromatischen Bereiches des NMR-Spektrums abgeleitet und gezeigt, daß die Denaturierung durch Messung dieser Größe ver-

folgt werden kann, auch wenn die einzelnen Resonanzen im NMR-Spektrum nicht gut aufgelöst sind.

Experimente mit Ribonuklease

Die bei der Denaturierung von Proteinen beobachteten spektralen Änderungen entsprechen drastischen Veränderungen der Molekülkonformation. Die NMR-Methode ist aber auch geeignet zum Nachweis von subtilen strukturellen Modifikationen, wie sie durch Veränderung der Ionenstärke und der Protonenaktivität oder durch Wechselwirkungen mit einem Substrat oder Regulator hervorgerufen werden. Dies soll mit einigen Messungen an Ribonuklease A illustriert werden.

Ribonuklease A vom Rind besteht aus einer Polypeptidkette von 124 Aminosäureresten, die in den Positionen 12, 48, 105 und 119 vier Histidylreste enthält. Die Histidylgruppen 12 und 119 bilden einen Teil des aktiven Zentrums im Molekül^{25, 26}. Es ist auch bekannt, daß die enzymatische Aktivität der Ribonuklease durch gewisse Mononukleotide inhibiert werden kann.

Im NMR-Spektrum von Ribonuklease wurden die Resonanzen der vier Histidylreste besonders eingehend untersucht. Die Resonanzen der C_2 -Protonen der Imidazolringe werden als gut aufgelöste Linien zwischen $-8,5$

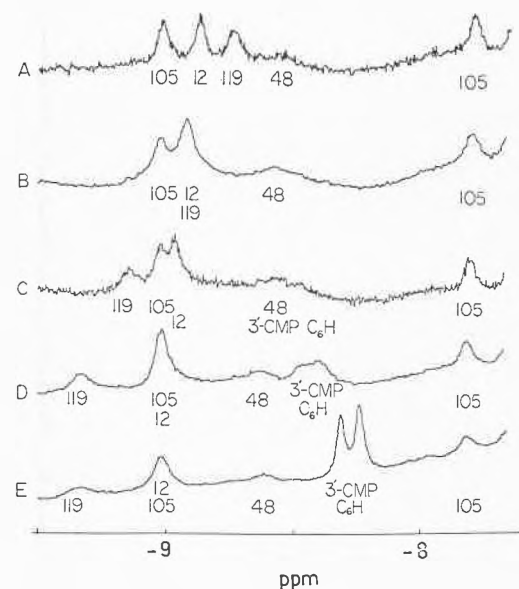


Abb. 6. NMR-Spektren von Ribonuklease A zwischen $-7,5$ und $-9,5$ ppm bei 100 Megahertz. Die Spektren wurden bei 32°C an Lösungen von $0,0065\text{-M}$ Ribonuklease A und $0,2\text{-M}$ NaCl in D_2O , $pD = 5,9$, nach Zugabe der folgenden Konzentrationen des Inhibitors Cytidin-3'-Monophosphat ($3'\text{-CMP}$) gemessen: A = kein $3'\text{-CMP}$, B = $0,002\text{-M}$, C = $0,005\text{-M}$, D = $0,010\text{-M}$ und E = $0,030\text{-M}$. Das Verhältnis von Signal zu Rauschen wurde durch Aufsummieren der Spektren in einem Kleincomputer (CAT) verbessert. Die Resonanz 105 bei $-7,8$ ppm entspricht dem C_4 -Proton am Imidazolring des Histidins in Position 105. Die mit 48, 119, 12 und 105 bezeichneten Linien zwischen $-8,5$ und $-9,1$ ppm entsprechen den C_2 -Imidazolprotonen dieser Histidylreste (Referenz²⁷)

* Eine Diskussion der Ermittlung von kinetischen Parametern mit NMR-Messungen kann z. B. in Referenz¹⁵, Seiten 183–210, gefunden werden.

²⁴ J. P. COHEN ADDAD, *J. Mol. Biol.* 50 (1970) 595.

²⁵ A. M. CRESTFIELD, W. H. STEIN und S. MOORE, *J. Biol. Chem.* 238 (1963) 2413.

²⁶ G. KARTHA, J. BELLO und D. HARKER, *Nature* 213 (1967) 862.

und $-9,2$ ppm beobachtet, und eine der C_4 -Imidazolresonanzen tritt bei $-7,8$ ppm auf (Abb. 6A). Durch geschickte Kombination von NMR-Messungen und chemischen Untersuchungen konnten MEADOWS und JARDETZKY²⁷ die einzelnen Linien den verschiedenen Histidylresten zuordnen (Abb. 6). Damit wurde es möglich, die pK -Werte der individuellen Histidylgruppen zu bestimmen und die Wechselwirkungen der Ribonuklease mit verschiedenen Inhibitormolekülen im Detail zu untersuchen.

Die Resonanzpositionen der Imidazolprotonen sind stark abhängig davon, ob der Imidazolring protoniert oder unprotoniert vorliegt. Deshalb kann die Titration der Histidylreste im pH-Bereich 5–8 durch NMR-Messungen verfolgt werden (Abb. 7)²⁸. Die unterschiedliche Umgebung der vier Histidylreste im nativen Protein beeinflusst die Positionen der Imidazolresonanzen über den ganzen untersuchten pH-Bereich, so daß vier individuelle pK -Werte ermittelt werden konnten. Die ungewöhnliche Resonanzposition von Histidin-48 im sauren Bereich wurde dadurch erklärt, daß dieser Histidylrest im Innern des Moleküls begraben ist, während die übrigen drei Histidylgruppen relativ nahe der Moleküloberfläche lokalisiert sind²⁶. Diese Anwendung der NMR-Methode dürfte von allgemeinem Interesse sein, denn es ist kaum zu erwarten, daß man in naher Zukunft mit einer anderen Technik die pK -Werte von spezifischen Aminosäureresten in nativen Proteinen mit vergleichbarer Genauigkeit bestimmen kann.

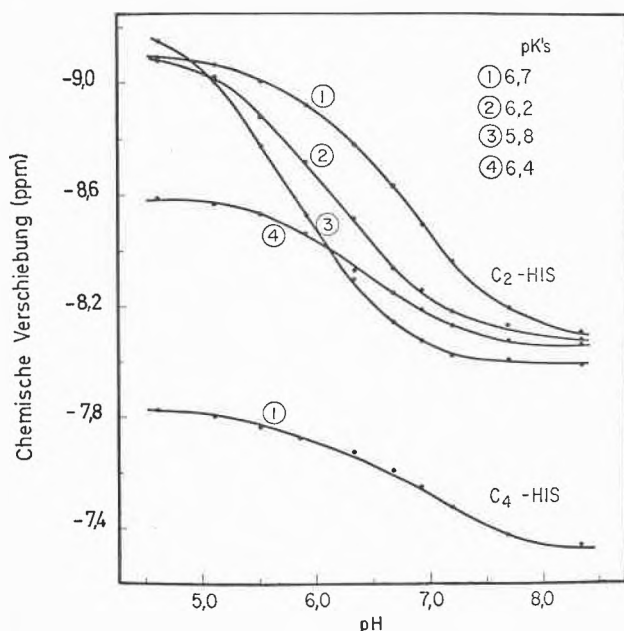


Abb. 7. Titrationskurven für die vier Histidylreste der Ribonuklease A in 0,2-M Natriumacetat bei 32°C. Die Resonanzpositionen sind gegen den pH-Wert (pH-Meter-Ablesung in D_2O) aufgetragen. Die pK -Werte wurden wie folgt zugeordnet: 1 = His - 105, 2 = His - 12, 3 = His - 119 und 4 = His - 48 (Referenz²⁸)

²⁷ D. H. MEADOWS und O. JARDETZKY, *Proc. Nat. Acad. Sci. US* 61 (1968) 406.

²⁸ D. H. MEADOWS, O. JARDETZKY, R. M. EPAND, H. H. RÜTERJANS und H. A. SCHERAGA, *Proc. Nat. Acad. Sci. US* 60 (1968) 766.

Das Spektrum der Histidylresonanzen der Ribonuklease wird auch verändert, wenn man das Enzym mit verschiedenen Inhibitoren reagieren läßt. Zum Beispiel werden die Resonanzen der Histidylgruppen 12 und 119 durch Zugabe von Cytidin-3'-Monophosphat (3'-CMP) stark verschoben, während die übrigen Linien praktisch nicht beeinflusst werden (Abb. 6, B bis E). Da die Gruppen 12 und 119 im aktiven Zentrum des Enzyms lokalisiert sind^{25, 26}, ergibt diese Beobachtung einen weiteren Hinweis darauf, daß der Inhibitor direkt mit dem aktiven Zentrum in Wechselwirkung tritt. Auf Grund der Spektren in Abb. 6 und entsprechenden Messungen mit anderen Inhibitormolekülen haben JARDETZKY und seine Mitarbeiter detaillierte Modelle für die Ribonuklease-Inhibitorkomplexe entwickelt¹⁶, die auch mit den durch röntgenographische Untersuchungen gefundenen Strukturen kompatibel sind.

Strukturelle Studien an Hämoproteinen

Wie der Name andeutet, bestehen Hämoproteine aus Polypeptidketten und Hämgruppen. Sie versehen als Transportproteine und Enzyme eine Reihe von wichtigen biologischen Funktionen. Die Protonenresonanzspektren von Hämoproteinen sind unter gewissen Bedingungen besonders gut aufgelöst, was NMR-Untersuchungen auch an relativ großen Molekülen (z. B. Hämoglobin mit einem Molekulargewicht von 65 000^{29, 30}) ermöglicht. Das Auftreten von ungewöhnlichen Resonanzpositionen ist einerseits auf die Ringstromeffekte der Hämgruppen und andererseits auf die ungepaarten Elektronen des Hämeisens zurückzuführen (Abb. 1). Die durch paramagnetische Effekte bewirkten «Hyperfeinverschiebungen» können im allgemeinen auf Grund ihrer Temperaturabhängigkeit identifiziert werden²¹.

Cyanoferrimyoglobin wurde besonders eingehend untersucht. Es zeigte sich, daß viele der durch paramagnetische Effekte verschobenen Resonanzen der Hämgruppe und dem axialen Histidylrest (Abb. 2) zuzuordnen sind. Durch Vergleich mit Eisen(III)-Porphyrinkomplexen³¹ und mit chemisch modifizierten Myoglobinderivaten^{32, 33} konnten diese Linien bestimmten Protonen zugeordnet werden. Zum Beispiel entsprechen die vier Resonanzen bei $-26,1$, $-17,7$, $-13,1$ und $-12,1$ ppm den vier Methylgruppen von Protohäm IX (Abb. 2). Da der Kontaktanteil der Hyperfeinverschiebungen der Spindichte auf den den beobachteten Protonen benachbarten Ringkohlenstoffatomen proportional ist, kann man auf Grund der NMR-Messungen das Ausmaß der Elektro-

²⁹ K. WÜTHRICH, R. G. SHULMAN und T. YAMANE, *Proc. Nat. Acad. Sci. US* 61 (1968) 1199.

³⁰ R. J. KURLAND, D. G. DAVIS und C. HO, *J. Amer. Chem. Soc.* 90 (1968) 2700.

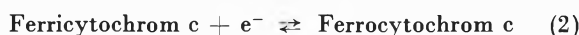
³¹ K. WÜTHRICH, R. G. SHULMAN, B. J. WYLUDA und W. S. CAUGHEY, *Proc. Nat. Acad. Sci. US* 62 (1969) 636.

³² R. G. SHULMAN, K. WÜTHRICH, T. YAMANE, E. ANTONINI und M. BRUNORI, *Proc. Nat. Acad. Sci. US* 63 (1969) 623.

³³ K. WÜTHRICH, R. G. SHULMAN, T. YAMANE, B. J. WYLUDA, T. E. HUGLI und F. R. N. GURD, *J. Biol. Chem.* 245 (1970) 1947.

nenspinlokalisation vom Eisen in den Porphyrinring und die Symmetrie der elektronischen Wellenfunktionen in der Hämgruppe berechnen¹⁴. Diese Größen können durch die Umgebung des Häms stark beeinflusst werden und sind deshalb unter gewissen Bedingungen geeignet zum Nachweis von Veränderungen der Proteinkonformation.

Die großen Ringstromeffekte und der Paramagnetismus der Hämgruppe bilden die Grundlage der im folgenden beschriebenen Studien von Cytochrom c, einem Protein der Atmungskette, das als elektronenübertragender Oxydations-Reduktions-Träger wirkt. Cytochrom c besteht aus einer Polypeptidkette von 104 bis 112 Aminosäureresten (1) und einer Hämgruppe (Abb. 8), die durch zwei kovalente Bindungen mit der Peptidkette verbunden ist³⁴. Die axialen Liganden des Hämeisens scheinen von besonderer Bedeutung zu sein für die biologische Funktion, die eng mit dem Wechsel zwischen der zwei- und der dreiwertigen Oxydationsstufe des Hämeisens zusammenhängt:



Es war seit langem bekannt, daß die axialen Positionen durch zwei Aminosäurereste der Polypeptidkette belegt sind, die sich durch ein Stickstoff- oder Schwefelatom mit dem Eisen verbinden³⁴.

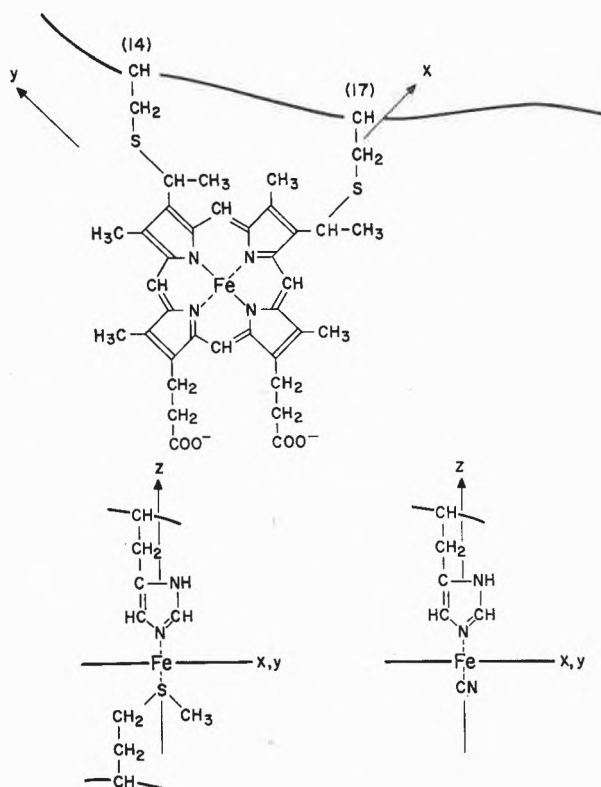


Abb. 8. Hämgruppe des Cytochroms c, die durch kovalente Bindungen mit den Cyteinyllgruppen 14 und 17 der Polypeptidkette verbunden ist. Die im unteren Teil abgebildeten axialen Liganden des Hämeisens im nativen Cytochrom c und in den Cyanidkomplexen wurden durch die im Text beschriebenen Versuche identifiziert

³⁴ E. MARCOLIASH und A. SCHEJTER, *Advances Protein Chem.* 21 (1966) 113.

Eine genaue Identifizierung dieser Aminosäuren war mit chemischen Methoden jedoch bisher nicht möglich³⁴. Röntgenkristallographische Untersuchungen bei 4 Å Auflösung hatten gezeigt, daß in Einkristallen von Ferricytochrom c eine axiale Position durch Histidin-18 besetzt ist, währenddem der zweite axiale Ligand nicht mit Sicherheit identifiziert werden konnte³⁵. Es wurde auch vorgeschlagen, daß die axialen Liganden im oxidierten und reduzierten Cytochrom c verschieden sein könnten^{19, 34}. Wir haben deshalb versucht, die axialen Liganden in den Lösungsstrukturen von Ferrocyclochrom c und Ferricytochrom c mit NMR-Messungen zu identifizieren.

Das NMR-Spektrum des paramagnetischen Ferricytochroms c enthält außerhalb des Spektralbereiches von 0 bis -10 ppm, der die für ein Protein charakteristischen Merkmale aufweist, eine größere Zahl von gut aufgelösten Linien mit Intensitäten von einem, zwei oder drei Protonen (Abb. 9)³⁶. Auf Grund der Temperaturabhängigkeit des Spektrums konnte gezeigt werden, daß Resonanzen bei -34,0, -31,4, -10,3, 0,2, 2,1, 2,5 und 23,2 ppm, deren Intensitäten je drei Protonen entsprechen (Abb. 9), durch Kopplung mit dem ungepaarten Elektron verschoben werden. Demnach treten wenigstens fünf der sechs Methylgruppen des Häms (Abb. 8) zwischen -34 und +2,5 ppm auf. Auf Grund der Symmetrieeigenschaften der elektronischen Wellenfunktionen in der Hämgruppe kann dann gezeigt werden, daß die Resonanz bei +23,2 ppm nicht von Protonen des Häms herrühren kann und deshalb einem der axialen Liganden zuzuschreiben ist. Dieser axiale Ligand muß Methionin sein, das als einzige Aminosäure eine schwefel- oder stickstoffhaltige Seitenkette aufweist, die auch eine Methylgruppe enthält³⁶.

Im Spektrum des diamagnetischen Ferrocyclochroms c sind vier Methylresonanzen bei 3,3, 0,7, 0,6 und 0,6 ppm, eine Resonanz von zwei Protonen bei -0,1 ppm und einzelne Protonen bei 3,7, 2,7, 1,9, 0,2 und -0,2 ppm zu beobachten (Abb. 9). Alle diese ungewöhnlichen Resonanzpositionen sind auf Ringstromverschiebungen zurückzuführen, wobei die Verschiebungen für die Resonanzen zwischen 1,9 und 3,7 ppm wenigstens 4 bis 5 ppm betragen¹⁹. Derart große Effekte sind denkbar für Protonen der axialen Liganden des Hämeisens oder für Protonen, die gleichzeitig den Ringstromfeldern mehrerer aromatischer Aminosäuren ausgesetzt wären. Eine Reihe von Experimenten mit den Cyanidkomplexen des Cytochroms c ermöglichte eine eindeutige Zuordnung dieser Resonanzen.

Im NMR-Spektrum des paramagnetischen Cyano-ferricytochroms c sind die Positionen der durch das ungepaarte Elektron verschobenen Resonanzen deutlich verschieden von den entsprechenden Resonanzpositionen

³⁵ R. E. DICKERSON, M. L. KOPKA, J. E. WEINZIERL, J. C. VARNUM, D. EISENBERG und E. MARGOLASH, *J. Biol. Chem.* 242 (1967) 3015.

³⁶ K. WÜTHRICH, *Proc. Nat. Acad. Sci. US* 63 (1969) 1071.

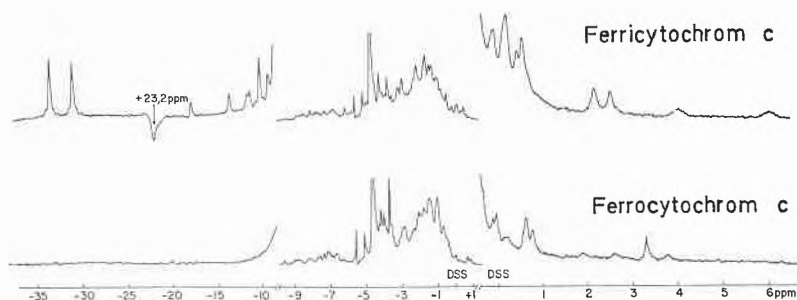


Abb.9. NMR-Spektren von Guanaco-Ferricytochrome c und -Ferrocyclochrom c bei 220 Megahertz. Die Spektren wurden an 0,01-M Lösungen in deuteriertem Phosphatpuffer, $pD = 7,0$, bei $35^{\circ}C$ aufgenommen. Die drei Spektralbereiche sind mit verschiedenen horizontalen und vertikalen Maßstäben wiedergegeben (vgl. Abb.2). Aus technischen Gründen wurde die $+23,2$ -ppm-Resonanz mit negativem Vorzeichen bei tiefem Feld beobachtet (Referenz³⁶)

im Ferricytochrom c³⁶. Deshalb kann die Komplexbildungsreaktion



im NMR-Spektrum verfolgt werden³⁷. Nach Zugabe einer geringen Menge KCN zu einer Ferricytochrom-c-Lösung weist das NMR-Spektrum neben den Ferricytochromresonanzen einige neue Linien auf (Abb.10). Wenn ein Äquivalent KCN zugefügt wird, ist nur noch das neue Spektrum zu beobachten (Abb.10), das sich bei weiterer Cyanidzugabe nicht mehr verändert. Dies zeigt, daß ein 1:1-Komplex gebildet wird, in dem offenbar einer der axialen Aminosäurereste durch Cyanid ersetzt ist. Entsprechen nun die im reduzierten Cytochrom c zwischen 1,9 und 3,7 ppm beobachteten Linien dieser

Aminosäure, wird das diamagnetische Cyanoferricytochrom c dort keine Linien aufweisen (die Protonen der Aminosäure sind nicht mehr im Zentrum des Ringstromfeldes der Hämgruppe, Abb.3 und 8). Nach der Reduktion des Cyanoferricytochroms c

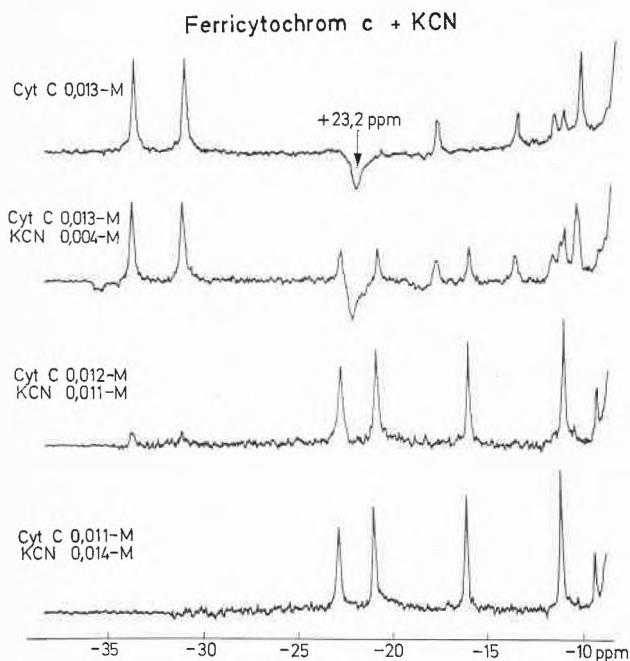
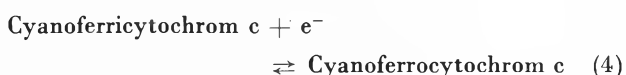


Abb.10. Spektralbereich von -10 bis -35 ppm der NMR-Spektren in Lösungen von Ferricytochrom c und KCN bei 220 Megahertz. $pD = 7,0$, $T = 35^{\circ}C$. Auf Grund der relativen Intensitäten der Resonanzen von Ferricytochrom c (oberstes Spektrum) und Cyanoferricytochrom c (unterstes Spektrum) kann der Verlauf der Komplexbildung während der schrittweisen Zugabe von KCN verfolgt werden (Referenz³⁷)

³⁷ K. WÜTHRICH, *Proceedings of the Fourth Johnson Research Foundation Colloquium, April 19-21, 1969*, Academic Press, New York (im Druck).

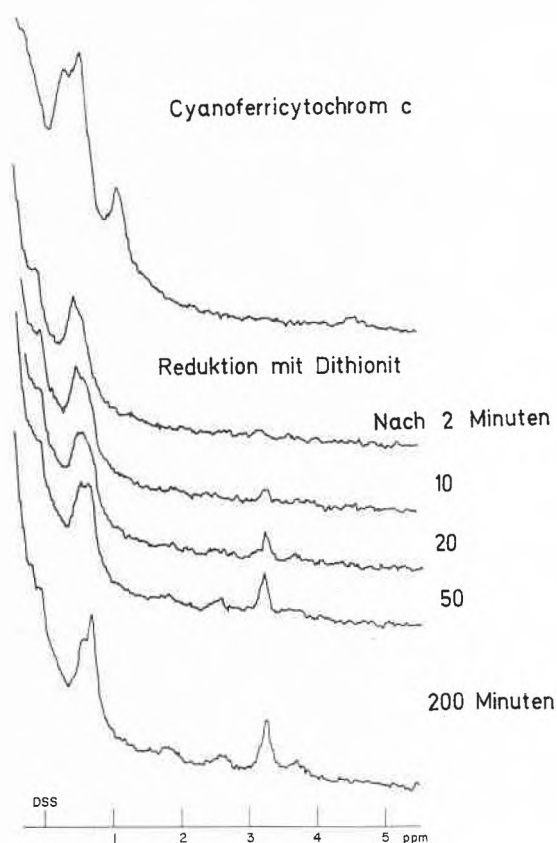


Abb.11. Spektralbereich von 0 bis $+5$ ppm in den NMR-Spektren von Cyanoferricytochrom c und den nach Zugabe von Dithionit entstehenden Reduktionsprodukten. Das als Primärprodukt auftretende Cyanoferricytochrom c ist nicht stabil und zerfällt in einer langsamen Reaktion unter Bildung von Ferrocyclochrom c und Cyanidionen. $pD = 7,0$, $T = 9^{\circ}C$ (Referenz³⁶)

wurden wirklich keine Resonanzen bei höherem Feld als $+0,7$ ppm beobachtet (Abb.11). Cyanoferricytochrom c ist jedoch nicht stabil und zerfällt in einer langsamen Reaktion³⁸, in deren Verlauf die durch Cyanid

³⁸ P. GEORGE und A. SCHEITER, *J. Biol. Chem.* 239 (1964) 1504.

besetzte axiale Position wieder von dem im nativen Cytochrom c gebundenen Liganden eingenommen wird.

Cyanoferrytochrom c \rightleftharpoons Ferrytochrom c + CN⁻ (5)

Das Auftreten einer Methylresonanz bei 3,3 ppm im Verlaufe der Komplexdissoziation (5) (Abb. 11) weist darauf hin, daß dieser axiale Ligand ein Methionylrest ist.

Ausgehend von der wohl berechtigten Annahme, daß die in Einkristallen beobachtete Histidylkoordination am Hämeisen³⁵ auch in der Lösungsstruktur von Ferrytochrom c vorliegt, zeigten diese NMR-Daten, daß die axialen Positionen des Hämeisens im oxydierten und reduzierten Cytochrom c durch Histidin und Methionin eingenommen werden, da ja nur Methionin durch Cyanidionen aus der Bindung mit dem Hämeisen verdrängt wird (Abb. 8). Durch Weiterführung der NMR-Studien mit chemisch modifizierten Cytochromen c konnten in der Folge Zusammenhänge zwischen der Proteinkonformation und der biologischen Aktivität im Detail untersucht werden³⁹. Es wurden in der Zwischenzeit auch Kernspinrelaxationsstudien durchgeführt, die ebenfalls zeigen, daß Methionin in beiden Oxydationsstufen gebunden ist^{14, 40}. Neue Röntgenanalysen bei 2,8 Å Auflösung ergaben, daß die zweite axiale Position des Hämeisens in Einkristallen von Ferrytochrom c durch den Methionylrest in der Position 80 eingenommen wird⁴¹, was bereits auf Grund von NMR-Studien an Cytochromen c von verschiedenen Spezies vorgeschlagen worden war^{37, 42}.

³⁹ K. WÜTHRICH, I. AVIRAM und A. SCHEJTER, vorgetragen am 4th International Congress on Magnetic Resonance in Biological Systems, Oxford (England), 26. August bis 2. September 1970.

⁴⁰ R. K. GUPTA und A. G. REDFIELD, *Science* (im Druck). Private Mitteilung.

⁴¹ R. E. DICKERSON, T. TAKANO, D. E. EISENBERG, O. B. KALLAI, L. SAMSON, A. COOPER und E. MARGOLASH, *J. Biol. Chem.* (im Druck). Private Mitteilung von Dr. DICKERSON.

⁴² C. C. McDONALD, W. D. PHILLIPS und S. N. VINOGRADOV, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 36 (1969) 442.

Zukunftsaussichten

Es ist vorauszusehen, daß die Anwendung der NMR-Spektroskopie auf Probleme der Biochemie und der Molekularbiologie in nächster Zukunft weiter an Bedeutung gewinnen wird. Dazu dürften Fortschritte in der Apparatetechnik und in der Chemie der Biopolymeren zu etwa gleichen Teilen beitragen.

Apparatetechnische Fortschritte (Vergrößerung des Probenvolumens, Einführung des Fourier-Transformationsverfahrens⁴³) werden die Sensitivität der neuen Spektrometer um wenigstens eine, unter Umständen mehrere Größenordnungen verbessern. Dies wird die Aufnahmezeiten für Protonenresonanzspektren verkürzen und eine breitere Anwendung der Spektroskopie mit anderen Kernen, z. B. ¹³C und ¹⁵N, ermöglichen. Mit diesen Kernen dürfte die spektrale Auflösung keine besonderen Probleme mehr stellen. Es ist auch bekannt, daß die Resonanzen von ¹³C (und anderen Kernen) wesentlich empfindlicher sind auf gewisse Veränderungen der Molekülstruktur als die Protonenresonanzen¹⁵. Die spektrale Auflösung könnte aber vor allem durch chemische Modifikationen der Proteine verbessert werden. Zum Beispiel kann ein Teil der Aminosäuren deuteriert werden, um die Auflösung der Protonenresonanzspektren zu verbessern⁴⁴. Die Fortschritte in der Synthese von Peptiden und Proteinen dürften auch ermöglichen, in genau definierten Positionen fluorierte oder mit ¹³C oder ¹⁵N angereicherte Aminosäuren einzubauen, die dann ohne Überlappung mit den Protonenresonanzen für NMR-Messungen zugänglich wären. Mit dem Einbau solcher Markierungen in funktionell wichtigen Positionen werden sich eine Vielzahl neuer Möglichkeiten für NMR-Studien in biologischen Systemen ergeben.

⁴³ R. ERNST, *Advances in Magnetic Resonance* (ed. J. S. WAUGH), Vol. 2, S. 1, Academic Press, New York 1966.

⁴⁴ J. L. MARKLEY, I. PUTTER und O. JARDETZKY, *Science* 161 (1968) 1249.