

HARALD SCHWALBE, INSTITUT FÜR ORGANISCHE CHEMIE
UND CHEMISCHE BIOLOGIE

NMR Spektroskopie zur Untersuchung der Struktur, Dynamik und Funktion von Proteinen, DNA und RNA

Die Gruppe Schwalbe beschäftigt sich mit der Bestimmung von Struktur, Dynamik und Funktion von Biomakromolekülen mittels NMR-Spektroskopie. Im Zusammenhang mit NMR-basierter Wirkstoffentwicklung werden biologisch aktive Verbindungen synthetisiert; neue NMR-Methoden werden entwickelt, insbesondere im Bereich der RNA-Strukturbestimmung und zeitaufgelöster NMR.

Im Interesse sind sowohl natürliche wie nicht-natürliche Biomakromoleküle: lösliche und Membranproteine im gefalteten und entfalteten Zustand, Oligonucleotide wie RNA und DNA und deren Komplexe. Während in vielen Projekten neue NMR-Methoden entwickelt werden, stützen sich alle Projekte auf die chemische und biochemische Synthese von Proteinen, RNA und DNA. Bei vielen Projekten arbeiten wir mit anderen Gruppen aus dem Akademischen und Industriellen zusammen.

NMR AN RNA

NMR ist eine leistungsfähige Methode zur Untersuchung von Struktur und Dynamik von RNAs in Lösung. Bis dato wurden nahezu die Hälfte aller RNA-Strukturen mittels NMR gelöst. Für RNAs bis zu einer Größe von 100 Nucleotiden kann eine Vielzahl von Information aus NMR-Spektren abgeleitet werden:

1. Basenpaarung und -dynamik
2. Das Gleichgewicht von Hairpins und Duplex
3. Struktur und Dynamik von RNA
4. Beschreibung der Wechselwirkungen von RNA mit kleinen Liganden, mit RNA oder Proteinen

Die Einführung von Methoden zur Herstellung von Milligrammengen RNA in isopenmarkierter Form (^{13}C , ^{15}N) ist eine Voraussetzung für detaillierte NMR-Untersuchungen.

Zum Beispiel haben wir den Bindungsmodus von Purinriboswitchen bestimmt: RNA-Riboswitch sind strukturierte RNA-Elemente im 5'-untranslatierten Bereich von mRNAs, die die Expression bakterieller Gene durch Bindung von kleinen Metaboliten wie Thiaminpyrophosphat, FMN, Glycin und die Purinnucleobasen Adenin und Guanin regulieren. Die Riboswitch-RNA erkennt die Purinliganden durch ein Watson-Crick-Basenpaar und durch eine bisher unbekanntes Bindung an der N3/N9-Seite der Purinliganden (s. Abb. 1).

HARALD SCHWALBE, INSTITUTE OF ORGANIC CHEMISTRY
AND CHEMICAL BIOLOGY

NMR spectroscopy to Study Structure, Dynamics, and Function of Proteins, DNA and RNA

The Schwalbe group is interested in the determination of structure, dynamics and function of a variety of molecules of chemical and biological interest using NMR spectroscopy, in the organic synthesis of biologically relevant compounds and in the methods development of solution state nmr spectroscopy.

This includes natural and nonnatural biomacromolecules: Proteins in their folded and unfolded state, oligonucleotides like RNA and DNA and their complexes. While many of our projects involve the use and development of new methods in high resolution NMR-spectroscopy of liquids as a major technique, our group is engaged in the chemical and biochemical synthesis of proteins, RNA and DNA as well as photolabile cage compounds. Many of the research projects are collaborative in nature, and we have a wide range of interactions with other academic research groups.

NMR OF RNA

NMR is a powerful tool for the study of structure and dynamics of RNAs in solution. Up to now, nearly half of all three dimensional structures of nucleic acids have been solved by NMR spectroscopy. For RNAs of about 100 nucleotides, there is a plethora of information that can be derived from NMR spectroscopic studies:

1. Base pairing pattern and -dynamics
2. Hairpin and duplex equilibria
3. Structure and dynamics of RNA
4. Mapping of interaction surfaces of RNA with small ligands, other RNAs or proteins

The introduction of methods for the preparation of milligram quantities of RNA in an isotope (^{13}C , ^{15}N) labeled form has been a prerequisite for all of these NMR studies.

Recently, we have determined the principal binding mode of purine riboswitches: riboswitches are highly structured RNA elements in the 5' untranslated region of mRNAs that control the expression of many bacterial genes by binding directly to small metabolite molecules such as thiamine pyrophosphate, FMN, glycine and the purine nucleobases adenine and guanine. The riboswitch-RNA recognize their purine ligands by Watson-Crick pair and in addition by a yet-unknown binding to the N3/N9 edge of the purine ligands (see Fig. 1).



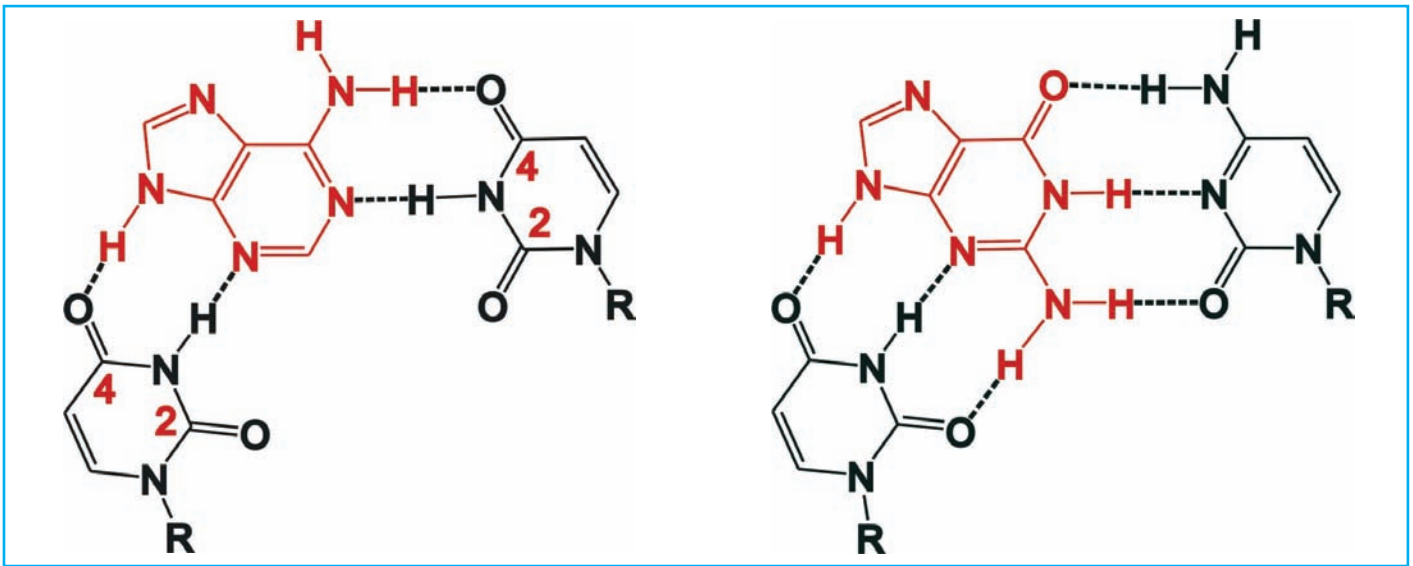


Abb.: 1: Molekulare Erkennung des Adenins durch die A-Switch RNA. (links)
Fig. 1: Molecular recognition of adenin in A-switch RNA. (left)

Molekulare Erkennung des Guanins durch die G-Switch RNA. (rechts)
Binding pocket of guanine in G-switch RNA. (right)

ENTFALTETE PROTEINE

Um eine biologische Funktion auszuüben, muss die Polypeptidkette in ihre korrekte 3D Konformation falten. Bei Proteinfehlfaltung können sich hoch-organisierte Aggregate hohen Molekulargewichts ausbilden, die innerhalb und außerhalb der Zelle abgelagert werden. Solche Fehlfaltung kann zu einer Reihe von neurologischen und systemischen Krankheiten wie z.B Alzheimer, Parkinson und Diabetes Typ II führen.

Wir interessieren uns für die Entwicklung neuer NMR-Methoden zur Untersuchungen derjenigen Zustände von Proteinen, die für das Verständnis von Proteinfehlfaltung und Aggregation wichtig sind. Dazu gehören sehr flexibel entfaltete Monomere, lösliche Oligomere und fibrillare Aggregate. Dadurch versuchen wir die Mechanismen der Prozesse zu verstehen, durch die lösliche Proteine fehlfalten können und so Proteinfaltungskrankheiten auslösen.

UNFOLDED PROTEINS

To gain biological function, polypeptide chains generally need to fold into specific three-dimensional structures - their native states. Aberrant folding of proteins can lead to development of highly organised and high-molecular weight aggregates that are deposited inside or outside cells. Such misfolding events are at the origins of a range of neurological and systemic diseases such as Alzheimer, Parkinson, Diabetes Typ II to name a few.

Research in our group focusses on the development of novel NMR methods to study the structural states of proteins that are particularly relevant to understand protein misfolding and aggregation. The species involved range from highly flexible unfolded monomers to soluble oligomers and precursors of fibrillar aggregates. By doing so, we aim at providing a basis for the understanding the mechanisms by which

normally soluble proteins can sporadically misfold as origin of a wide range or disorders.

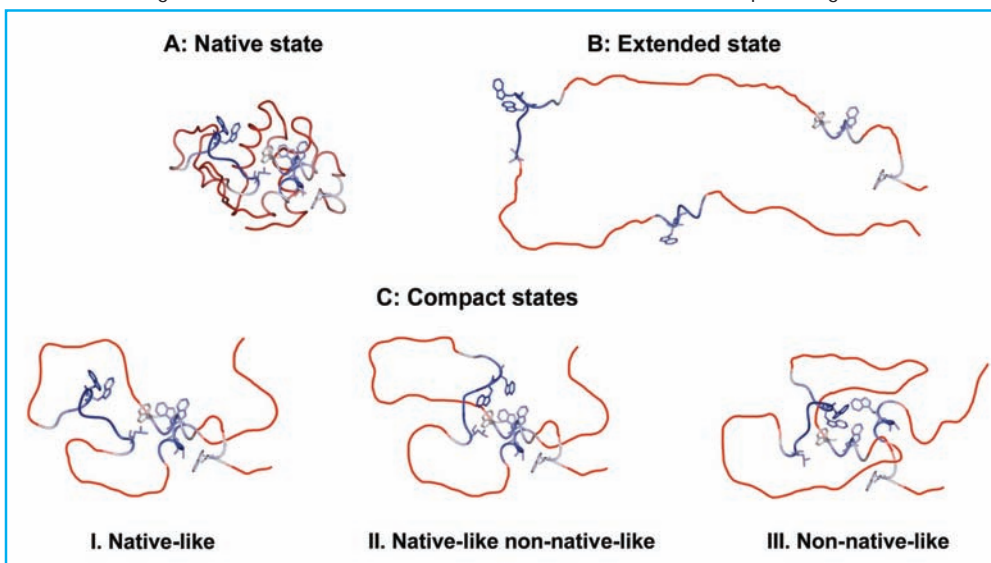


Abb.: 2: Entfaltete Proteine können eine Reihe unterschiedlicher Konformationen einnehmen. Mittels NMR-Untersuchungen kann man zeigen, dass neben sehr expandierten Zuständen auch solche Konformationen vorliegen, die durch langreichweitige hydrophobe Wechselwirkungen stabilisiert werden.

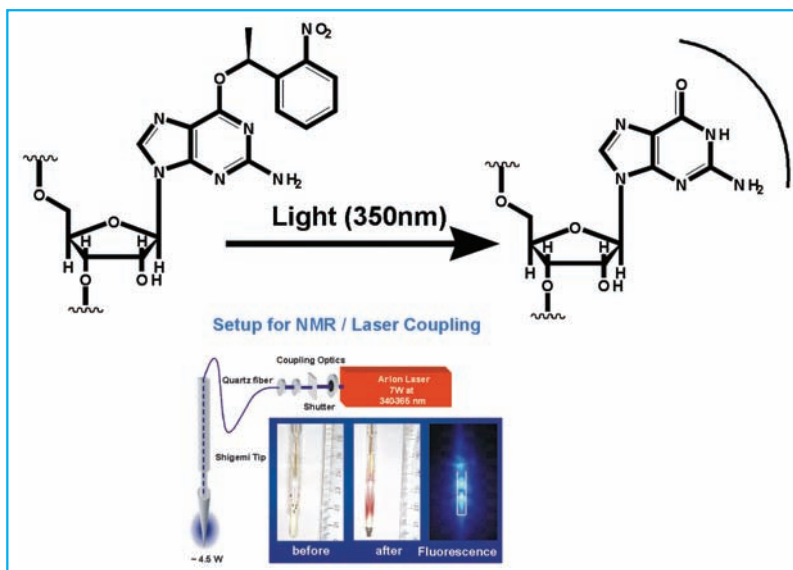
Fig.: 2: Unfolded proteins have to be described as an ensemble that rapidly interconverts. With NMR, we could show that in addition to expanded states also more compact states are populated that are stabilized by long-range hydrophobic interactions.



ZEITAUFGELÖSTE NMR

Mittels NMR kann auch die Dynamik bis hin zur Faltung von Biomakromolekülen mit atomarer Auflösung untersucht werden. Mittels Laserbeschuss zerfallen Käfigverbindungen im NMR Spektrometer und induzieren dadurch die Faltung. So durch können wir die Faltung z.B. von RNA-Haarnadel oder Proteinen im NMR verfolgen.

Abb. 3: Photolyse eines G-Nucleotids mit "caged" Wasserstoffbrückenpotential setzt ein ungeschütztes G-Nucleotid frei. Diese Freisetzung induziert RNA-Rückfaltung, die mit atomarer Auflösung durch Echtzeit-NMR charakterisiert wird.



This release induces RNA refolding events which are monitored by real-time NMR at atomic resolution.

TIME-RESOLVED NMR

By NMR, we investigate dynamics and folding of biomacromolecules at atomic resolution. We synthesize caged compounds that can release folding initiators upon irradiation by light in the NMR spectrometer. Thereby, we can follow the folding of RNA hairpins and proteins in real-time.

Fig. 3: Photolysis of a G-nucleotide with caged hydrogen bonding potential releases a G-nucleotide.

NMR AN PHARMAKOLOGISCH WICHTIGEN PROTEINKLASSEN WIE KINASEN, PHOSPHATASEN UND MEMBRANPROTEINEN

Die Großzahl zellulärer Funktion hängt von Phosphorylierung durch Kinasen und Dephosphorylierung durch Phosphatasen ab. Eukaryoten kodieren ~ 500 Proteinkinasen und 100 -Phosphatasen, 3% des gesamten Genoms. Membranproteine, insbesondere GPCRs, stellen die wichtigste Targetklasse für neue Wirkstoffe dar. In Industrierzusammenarbeiten entwickeln wir NMR-Methoden für die drei Rezeptorklassen für ein struktur-basiertes Wirkstoffdesign.

NMR OF PHARMACOLOGICAL IMPORTANT DRUG TARGETS SUCH AS KINASES, PHOSPHATASES AND MEMBRAN PROTEINS

The majority of cellular functions depend on phosphorylation by kinases and de-phosphorylation by phosphatasen. Eukaryotes encode approximately 500 protein kinase and 100 protein phosphatase, corresponding to 3% of their genome. Membrane proteins, especially GPCR, are the most important class of receptors for novel drugs. In collaboration with industrial partners, we develop NMR-methods for these three classes of drug targets for a structure-driven drug design.

LITERATUR / REFERENCES

- J. Klein-Seetharaman et al. "Long-range interactions within a non-native protein", *Science* 265, 1917-1921 (2002).
 Venter et al. "Kinetic investigation of photoinduced RNA refolding by realtime NMR spectroscopy", *Angew. Chemie* 117, 2656-2659 (2005).
 J. Noeske et al. "An intermolecular base triple as the basis of ligand specificity and affinity in the guanine and adenine sensing riboswitch RNAs" *PNAS*, 104, 1372-1377 (2005).
 M. Vogtherr et al. "NMR Charakterization of kinase p38 dynamics in free and ligand bound form" *Angew. Chemie Intl. Edit.* 45, 993-997 (2006).
 J. Buck et al. "Time-resolved NMR Methods Resolving Ligand-Induced RNA Folding at Atomic Resolution", *PNAS*, 104, 15699-15704 (2007).

KONTAKT / CONTACT:

Prof. Dr. Harald Schwalbe

Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie
 Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie
 Max-von-Laue-Str. 7
 D-60438 Frankfurt am Main

Tel.: ++49 (0)69 798-29737
 Fax: ++49 (0)69 798-29515
 E-Mail: schwalbe@nmr.uni-frankfurt.de
<http://schwalbe.org.chemie.uni-frankfurt.de/>

