

VOLKER DÖTSCH, INSTITUT FÜR BIOPHYSIKALISCHE CHEMIE

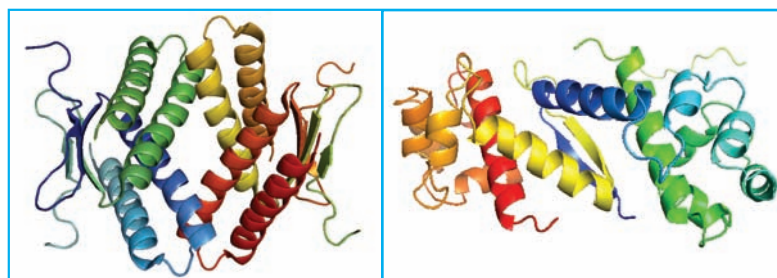
Strukturelle Untersuchungen biologisch wichtiger Proteine und Komplexe mittels NMR Spektroskopie:

Unsere Arbeitsgruppe benutzt NMR Spektroskopie sowie andere biophysikalische und biochemische Methoden, um die Struktur und die Funktionsweise interessanter Protein und Komplexe aufzuklären. Im folgenden sind drei wichtige Teilbereiche vorgestellt:

P63

Das Protein p63 ist dem Protein p53 in seiner Sequenz sehr ähnlich. Bei p53 handelt es sich um das wichtigste Kontrollprotein des menschlichen Körpers, das die Entstehung von Krebs unterdrückt. Seine Bedeutung wird durch die Tatsache verdeutlicht, dass mehr als 50% aller Tumore inaktivierende Mutationen in diesem Protein aufweisen. Trotz seiner sehr ähnlichen Sequenz ist p63 kein Tumorsuppressor, sondern spielt zum einen als Stammzellfaktor für Epithelzellen eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung der Haut und zum anderen als Qualitätskontrollfaktor bei der Überprüfung der genetischen Stabilität von Eizellen. Neben p63 gibt es im Menschen mit p73 ein weiteres Protein, das zur selben Proteinfamilie gehört. Darüber hinaus existieren in anderen Lebewesen weitere Formen dieses enorm wichtigen Proteins. Eine Besonderheit dieser Proteinfamilie ist es, dass sie als Tetramere vorliegen. Funktionelle und strukturelle Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe haben allerdings gezeigt, dass diese Proteine nicht immer als Tetramere existieren, sondern, dass ihr oligomerer Zustand zur Regulierung ihrer Aktivität eingesetzt wird.

*Bild 1: Struktur der Oligomerisierungsdomäne der p53 Proteine aus den beiden wichtigen genetischen Modelorganismen Fruchtfliege *Drosophila* (links) und Fadenwurm *C. elegans* (rechts). Das *C. elegans* Protein ist das erste nur als Dimer vorliegende Mitglied dieser Proteinfamilie.*



*Figure 1: Structure of the oligomerization domains of the p53 homologs of the two important model organisms *Drosophila melanogaster* (left) and *C. elegans* (right). The *C. elegans* protein is the first member of this protein family that exists only as a dimer.*

NICHT-RIBOSOMALE PEPTIDSYNTHEASEN

Einen Vielzahl hochwirksamer meist zyklischer Peptide, die unter anderem als Antibiotika, Immunsuppressiva und Anti-Tumormittel eingesetzt werden, wird von speziellen Enzymkomplexen im Zytoplasma gewisser Bakterien und Pilzen hergestellt. Diese riesigen Enzymkomplexe sind modular aufgebaut, indem jedes Modul für den Einbau stets eines Bausteins (Aminosäure) in das Endprodukt verantwortlich ist. Dieser modulare Aufbau ermöglicht – wenigstens im Prinzip – die Herstellung neuer, potenziell interessanter Peptide durch die Kombination verschiedener Module. Um eine ausreichende Ausbeute der neuen Peptide zu erlan-

VOLKER DÖTSCH, INSTITUTE OF BIOPHYSICAL CHEMISTRY

Structural Investigation of biologically important proteins and complexes by liquid state NMR spectroscopy

Our research group uses liquid state NMR spectroscopy in combination with other biophysical and biochemical methods to investigate the structure and function of important proteins and complexes. Three individual projects are described in more detail below:

P63

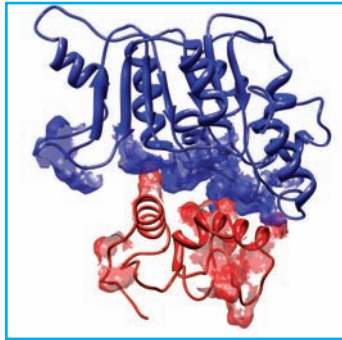
The protein p63 shows high sequence identity to the protein p53. P53 is a tumor suppressor and one of the most important proteins with respect to human health. Its importance can be seen from the fact that more than 50% of all human tumors contain inactivating mutations of p53. Despite its high sequence identity to p53, p63 is not a tumor suppressor but plays an important role for the maintenance of epithelial stem cells and therefore for the development of the skin. In addition it is involved in the surveillance of the genetic stability of female oocytes. In addition to p63 there is a third protein in humans, called p73, that shows high sequence identity to p53 as well. Furthermore, other organisms have additional family members of this very important protein family. One specialty of this family is that its members exist as tetramers. Functional and structural investigations of our research group have revealed that the oligomeric state of the protein is used to regulate its transcriptional activity.

NON-RIBOSOMAL PEPTIDE SYNTHETASES

A large variety of medically important cyclic peptides such as antibiotics, immunosuppressiva and anti-tumor drugs, is synthesized by very large and highly specialized enzymatic complexes in the cytoplasm of bacteria and fungi. These complexes show a modular design with each module being responsible for the incorporation of one building block (amino acid) into the final product. This modular design enables – at least in principle – the production of new and potentially medically active peptides through the combination of individual modules from different enzymatic complexes. To obtain sufficient quantities of such new

gen, ist allerdings eine Feinjustierung der Wechselwirkungen der einzelnen Komponenten wichtig. Die strukturelle Untersuchung der Wechselwirkung verschiedener Komponenten dieser Nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen hat ergeben, dass die Dynamik einen wesentlichen Beitrag zu dieser Feinjustierung beiträgt.

Bild 2: Struktur des Komplexes einer Thioesterase II (blau) mit einer PCP Domäne (rot), zweier wichtiger Komponenten Nicht-ribosomaler Peptidsynthetasen.



peptides, however, a fine tuning of the interaction between the different components is essential. The structural investigation of the interaction between different components of these non-ribosomal peptide synthetases has revealed that the dynamics plays a major role for the specificity of these interactions.

Figure 2: Structure of a complex of a thioesterase II (blue) with a PCP domain (red), representing two important components of non-ribosomal peptide synthetases.

STRUKTURELLE UND FUNKTIONELLE UNTERSUCHUNGEN VON MEMBRANPROTEINEN

Eines der großen Probleme bei der strukturellen Untersuchung von Membranproteinen, ist die Herstellung ausreichend großer Mengen. In den letzten Jahren hat unsere Arbeitsgruppe ein zellfreies Produktionssystem etabliert, mit dessen Hilfe die benötigten Mengen an Protein hergestellt werden können. Zudem bietet die zellfreie Synthese gewaltige Vorteile durch die gezielte Inkorporation stabiler, NMR aktiver Isotope für die NMR-basierte Strukturanalyse. Durch die Entwicklung auch neuer NMR Methoden ist es gelungen, die Struktur mehrerer Membranproteine zu untersuchen.

Bild 3: Strukturmodell des bakteriellen Transporters TehA



STRUCTURAL AND FUNCTIONAL INVESTIGATION OF MEMBRANE PROTEINS

One of the biggest challenges for the structural characterization of membrane proteins is the production of sufficient material. Recently, our research group has established a cell free expression system that can be used to produce the large amounts of protein necessary for structural investigations. In addition, this system provides further advantages for the NMR-based structure determination of membrane proteins since it allows for amino-acid type selective labeling of these proteins with NMR-active isotopes. We have developed several new labeling schemes that have allowed us to investigate the structure of several membrane proteins.

Figure 3: Structural model of the bacterial transporter TehA.

LITERATUR / REFERENCES

- Ou HD, Löhr F, Vogel V, Mäntele W, Dötsch V. (2007) Structural evolution of C-terminal domains in the p53 family. *EMBO J.* 26, 3463-73.
- Koglin A, Mofid MR, Löhr F, Schäfer B, Rogov VV, Blum MM, Mittag T, Marahiel MA, Bernhard F, Dötsch V. (2006) Conformational Switches Modulate Protein Interactions in Peptide Antibiotic Synthetases. *Science* 312, 273-276.
- Koglin A, Löhr F, Bernhard F, Rogov VR, Frueh DP, Strieter ER, Mofid MR, Güntert P, Wagner G, Walsh CT, Marahiel MA, Dötsch V. (2008) Structural basis for the selectivity of the external thioesterase of the surfactin synthetase. *Nature* 454, 907-11.
- Klammt, C, Löhr, F, Schäfer, B, Haase, W, Rüterjans, H, Dötsch, V, Glaubitz, C, Bernhard, F (2004) High level cell-free expression and specific labelling of integral membrane proteins. *Eur J Biochem* 271, 568-580.
- Reckel S, Sobhanifar S, Schneider B, Junge F, Schwarz D, Durst F, Löhr F, Güntert P, Bernhard F, Dötsch V. (2008) Transmembrane segment enhanced labeling as a tool for the backbone assignment of α -helical membrane proteins. *PNAS* 105, 8262-7

KONTAKT / CONTACT:

Prof. Dr. Volker Dötsch

Fachbereich Biochemie, Chemie, Pharmazie
Institut für Biophysikalische Chemie
Max-von-Laue-Str. 9
D-60438 Frankfurt am Main

Tel: ++49 (0)69 798 29631
Fax: ++49 (0)69 798 29632
E-Mail: vdoetsch@em.uni-frankfurt.de
http://www.uni-frankfurt.de/fb/fb14/BiochemieH/BPC/AK_Doetsch/

