

NMR-Methoden

DOI: 10.1002/ange.200602317

**Ladungsinduzierte molekulare Ausrichtung von
intrinsisch ungeordneten Proteinen****

*Lukasz Skora, Min-Kyu Cho, Hai-Young Kim,
Stefan Becker, Claudio O. Fernandez, Martin Blackledge
und Markus Zweckstetter**

Intrinsisch ungeordnete Proteine oder unstrukturierte Proteine (IUPs) spielen eine wichtige Rolle bei einer Vielzahl normaler und pathogener biochemischer Prozesse. Wegen

[*] L. Skora, M.-K. Cho, H.-Y. Kim, S. Becker, Dr. M. Zweckstetter
NMR-basierte Strukturbioologie
Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie
Am Fassberg 11, 37077 Göttingen (Deutschland)
Fax: (+49) 551-201-2202
E-Mail: mzwecks@gwdg.de
Homepage: <http://www.mpibpc.gwdg.de/abteilungen/030/zweckstetter>

Dr. C. O. Fernandez
Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas
Universidad Nacional de Rosario
Suipacha 531, S2002LRK Rosario (Argentinien)

Dr. M. Blackledge
Institute de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel
CNRS-CEA-UJF
41 rue Jules Horowitz, 38027-Grenoble Cedex (Frankreich)

[**] L.S. erhält ein Marie-Curie-Stipendium (MEST-CT-2004-504193),
M.-K.C. ein Stipendium des DFG-Graduiertenkollegs und M.Z. ein
Emmy Noether-Stipendium (ZW 71/1-5). Diese Arbeit wurde vom
Zentrum für Molekulärphysiologie des Gehirns, Göttingen, und
durch das UPMAN-Projekt der Europäischen Union unterstützt. Wir
danken Christophe Fares für seine Hilfe mit dem CPCI-Medium und
Prof. Dr. Christian Griesinger für anregende Diskussionen.

ihrer hohen Beweglichkeit entziehen sich IUPs jedoch weitgehend den klassischen Methoden der Strukturbioologie. Einerseits sind Messungen globaler Parameter in Übereinstimmung mit einer Beschreibung von IUPs als statistisches Knäuel,^[1] andererseits wurden aber durch NMR-Spektroskopie beträchtliche Mengen lokaler Struktur in denaturierten und ungefalteten Zuständen nachgewiesen. Kürzlich wurden diese beiden konträren Befunde in Einklang gebracht, als gezeigt wurde, dass IUPs mit einem einfachen Modell beschrieben werden können, das auf aminosäurespezifischen ϕ/ψ -Verteilungen basiert.^[2,3] Insbesondere konnten dipolare Restkopplungen (residual dipolar couplings, RDCs), die in Proteinen gemessen werden können, die in verdünnten flüssigkristallinen Phasen gelöst wurden, auf Grundlage dieses Modells vorhergesagt werden. Hierfür wurde angenommen, dass die anisotropen Flüssigkristallteilchen dem Protein nur über die sterische Wechselwirkung eine Vorzugsrichtung geben. Darüber hinaus zeigten wir, dass RDCs eine hohe Nachweisempfindlichkeit für langreichweitige Wechselwirkungen in IUPs haben.^[4,5]

Hier weisen wir nach, dass die Annahme einer rein sterischen Wechselwirkung zwischen intrinsisch ungeordneten Proteinen und verdünnten flüssigkristallinen Phasen nur zutrifft, wenn die Flüssigkristallteilchen vorwiegend ungeladen sind. Weisen die Flüssigkristallteilchen Oberflächenladungen auf, so wird die Ausrichtung von IUPs in diesen Medien stark von elektrostatischen Wechselwirkungen beeinflusst und skaliert mit der Salzkonzentration der Lösung. In diesem Fall können RDCs auf der Basis eines einfachen elektrostatischen Modells vorhergesagt werden.^[6]

Für unsere Untersuchungen verwendeten wir α -Synuclein (α S), ein natürlich unstrukturiertes, aus 140 Aminosäuren bestehendes Protein, dem eine bedeutende Rolle in der Entwicklung der Parkinson-Krankheit zugeschrieben wird. α S wurde in den zwei unterschiedlich geladenen Ausrichtungsmedien Pf1-Bakteriophagen^[7] und Cetylpyridiniumchlorid/Hexanol/NaCl (CPCl)^[8] untersucht.

RDCs, die in mit Pf1-Bakteriophagen ausgerichtetem α S gemessen wurden, sind in Abbildung 1 gezeigt. Bei 300 mm und 500 mm NaCl ähnelt das RDC-Muster dem Muster, das wir zuvor in einem ungeladenen Ausrichtungsmedium beobachtet hatten.^[4] Alle RDCs sind positiv, und Bereiche mit relativ großen RDCs wechseln sich ab mit Aminosäuren, für

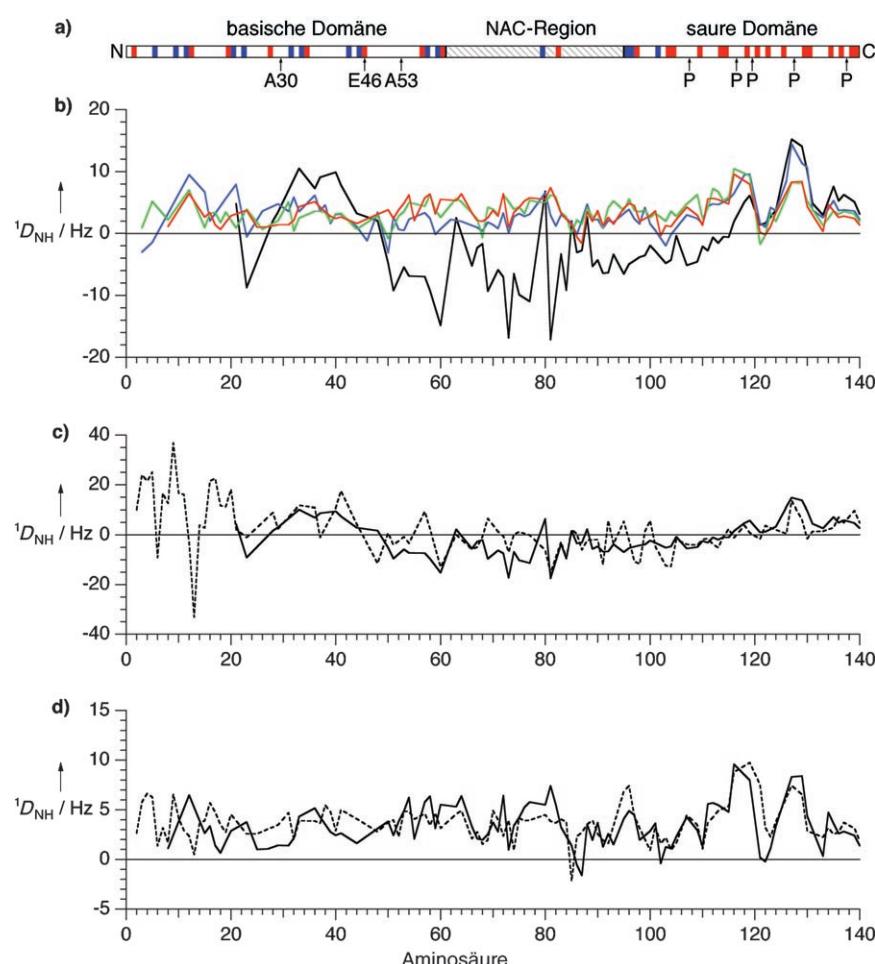


Abbildung 1. a) Verteilung der Oberflächenladungen in α S. Positiv und negativ geladene Reste sind in Blau bzw. Rot hervorgehoben. Mit der Parkinson-Krankheit zusammenhängende Mutationstellen und Proline sind mit Pfeilen markiert. b) $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -RDCs in Pf1-Phagen bei 50 mM (schwarz), 100 mM (blau), 300 mM (grün) und 500 mM NaCl (rot), skaliert an der Aufspaltung des ^2H -Signals bei 50 mM NaCl. Alle Spektren wurden mit einem Bruker-DRX600-NMR-Spektrometer an 0.2 mM α S in 20 mM Tris-HCl, pH 7.4 bei 288 K aufgenommen. c, d) Vergleich der experimentellen (durchgezogene Linien) und simulierten $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -RDCs in 15 mg mL⁻¹ Pf1-Phagen und 50 mM NaCl (c) oder 500 mM NaCl (d). Unterhalb von 200 mM NaCl hängen die simulierten und die experimentelle RDC-Größe stark von der genauen Ionenstärke und der verwendeten Pf1-Charge ab.

und skaliert mit der Salzkonzentration der Lösung. In diesem Fall können RDCs auf der Basis eines einfachen elektrostatischen Modells vorhergesagt werden.^[6]

die die RDCs nahezu null sind. Im C-Terminus treten die größten RDCs auf. Bei 100 mM NaCl wechseln die RDCs der Reste 23, 46, 50, 59, 86 und 103–104 das Vorzeichen und werden schwach negativ. Ferner vergrößern sich die RDCs der Reste 15–21 und 124–131, wobei sich letztere fast verdoppeln. Bei noch geringeren Salzkonzentrationen erhöhen sich die RDCs im N-Terminus nochmals stark, sodass die Signale einiger Reste aufgrund großer dipolarer $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -Kopplungen nicht mehr detektierbar waren. Im mittleren Bereich von α S wurden alle RDCs negativ. Dieses Verhalten ist im Einklang mit den elektrostatischen Eigenschaften des Systems. Die Pf1-Flüssigkristallteilchen haben eine hohe negative Oberflächenladung,^[9] sodass bei niedrigen Salzkonzentrationen der positiv geladene N-Terminus von α S stark angezogen wird (Abbildung 1a). Gleichzeitig wird der negativ geladene C-Terminus von der Oberfläche der Pf1-Teilchen abgestoßen.

Wir vergleichen nun experimentell beobachtete RDCs mit Werten, die durch das Simulationsprogramm PALES vorhergesagt wurden. Hierzu wurde ein aus 50000 Strukturen bestehendes Ensemble mithilfe des Flexible-Meccano-Algorithmus erzeugt.^[3] In Flexible-Meccano wird die Peptidkette schrittweise aufgebaut, indem in zufälliger Weise ϕ/ψ -Winkel aus einer Datenbank aminosäurespezifischer Konformationen ausgewählt werden. Die verwendeten Konformationen stammen aus Bereichen nichtregulärer Sekundärstrukturelemente in hochauflösten Kristallstrukturen. Auf der Basis dieser 50000 Strukturen (30000–50000 Strukturen waren für die Konvergenz der Simulationen erforderlich) wurden RDCs mit einem einfachen Modell der elektrostatischen Ausrichtung simuliert, das nur die Wechselwirkung der geladenen Seitenketten mit dem von den Flüssigkristallteilchen erzeugten elektrostatischen Feld des Proteins berücksichtigt.^[6] Hierfür wurden für den Pf1-Flüssigkristall folgende Parameter verwendet: gemittelte Oberflächenladung -0.47 e nm^{-2} , Ordnungsparameter 0.9, Konzentration 15 mg mL^{-1} . CPCl wurde als eine 26.8 \AA dicke, einheitlich geladene Wand modelliert (Oberflächenladung $+0.08 \text{ e nm}^{-2}$, Ordnungsparameter 0.8, Konzentration 5% (w/v)).^[10]

Bei allen Bedingungen wurde eine gute Übereinstimmung zwischen den mithilfe von Pf1-Phagen gemessenen und den mit PALES simulierten RDCs gefunden (Abbildung 1c,d und Hintergrundinformationen). Die Vorhersage der genauen Größe der RDCs mit PALES hängt jedoch von der Ionenstärke der Lösung ab. Wie wir in früheren Untersuchungen zeigten,^[6] sind PALES-Simulationen am zuverlässigsten bei mittleren Salzkonzentrationen, wohingegen bei höheren Salzkonzentrationen die Stärke der Ausrichtung unterschätzt wird. In Übereinstimmung hiermit mussten die für 100 mm und 500 mm NaCl simulierten RDCs um das 2.5- bzw. 4-fache hochskaliert werden. Bei 50 mm NaCl passte die Größe der simulierten RDCs gut zu den experimentellen Werten, sodass keine nachträgliche Skalierung erforderlich war.

CPCl ist positiv geladen und zieht stark den negativ geladenen C-Terminus von α S an, sodass es zu erheblichen Linienvorbreiterungen und zum Verschwinden der Signale im C-Terminus kommt (Hintergrundinformationen). Entsprechend sagt PALES eine achtfache Erhöhung der RDC-Stärke für die Reste 110–140 vorher. Darüber hinaus wurde das Ausrichtungsverhalten des CPCl-Mediums durch das Einbringen von α S verändert. Nach Zugabe von α S reduzierte sich die Aufspaltung des ^2H -Signals bei 150 mm NaCl (15 Hz) um das Sechsfache. Daher kann – obwohl keine signifikanten Änderungen in den chemischen Verschiebungen der beobachtbaren NMR-Signale auftraten – derzeit nicht ausgeschlossen werden, dass die CPCl-Phase das Konformationsensemble von α S ändert. Außerhalb der C-terminalen Domäne traten keine erhöhten RDCs auf, und die simulierten RDCs passen gut zur PALES-Simulation. Dies deutet darauf hin, dass sich die einzelnen α S-Domänen unabhängig voneinander ausrichten.

Um einen genaueren Einblick in die Vorzeichenumkehr der RDCs in der mittleren Region von α S bei 50 mm NaCl (Abbildung 1b) zu gewinnen, erzeugten wir für ein zehn Aminosäuren langes Polyalaninfragment ein aus 30000 Strukturen bestehendes Ensemble. An die Enden der Polyalaninketten wurden Ladungen von $+5e$ und $-5e$ gesetzt, und RDCs wurden mit den Modellen der sterischen^[11] und der elektrostatischen Ausrichtung^[6] vorhergesagt (Abbildung 2a). Im sterischen Fall waren alle RDCs positiv, und das

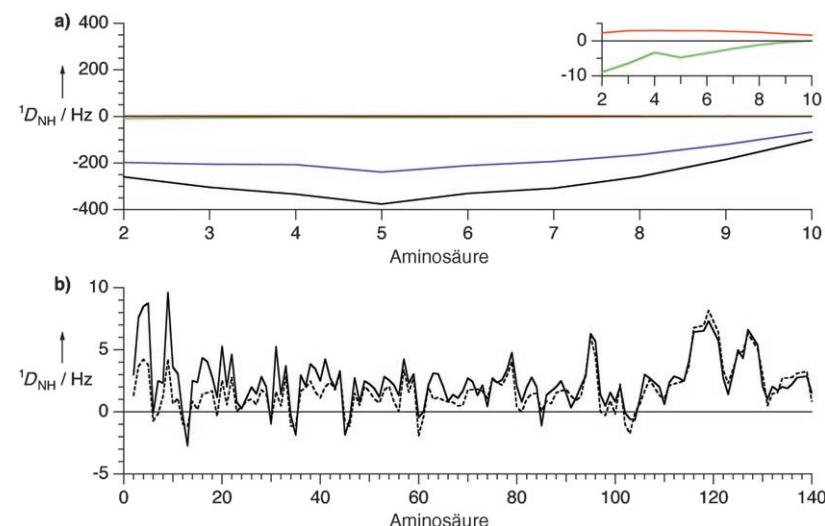


Abbildung 2. a) Simulierte $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -RDCs in einem zehn Aminosäuren langen Polyalaninfragment unter Annahme rein sterischer Wechselwirkung (rot) und unter Berücksichtigung elektrostatischer Wechselwirkungen bei 50 mm (schwarz), 100 mm (blau) und 500 mm NaCl (grün) sowie Ladungen von $+5e$ und $-5e$ am N- bzw. C-Terminus. Einschub: vergrößerter Ausschnitt. b) Simulierte $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -RDCs in 15 mg mL^{-1} Pf1-Phagen bei 100 mm NaCl mit (gestrichelte Linie) und ohne langreichweite Wechselwirkung (durchgezogene Linie) zwischen den Resten 1–20 und 120–140.

RDC-Muster hatte die charakteristische, glatte Glockenform.^[12] Bei Berücksichtigung elektrostatischer Wechselwirkungen waren die gemittelten RDC-Werte hingegen negativ. Dies ist in Übereinstimmung mit einer Ausrichtung vorwiegend senkrecht zum magnetischen Feld und einem Dipolähnlichen Verhalten des Polyalaninfragments. Zudem zeigten Simulationen bei unterschiedlichen Ionenstärken, dass Ladungsabschirmung zu einer verstärkt sterischen Ausrichtung führt.

Vor kurzem hatten wir gezeigt, dass die erhöhten RDC-Werte im C-Terminus von α S durch langreichweite Wechselwirkungen hervorgerufen werden.^[4] Bei Annahme ausschließlich sterischer Wechselwirkungen führt die zwangsweise Einführung einer langreichweiten Wechselwirkung zwischen den Resten 1–20 und 120–140 in das von Flexible-Meccano erzeugte Strukturenensemble zu einer Erhöhung der RDC-Werte in den Aminosäurebereichen 2–30 und 110–140. Im Falle elektrostatischer Wechselwirkungen wird das Ausrichtungsverhalten komplizierter (Abbildung 2b). Obwohl durch die Einführung dieser langreichweitigen Wechselwirkungen RDCs für die Reste 116–121 leicht erhöht wurden, kam es zu einer starken Erniedrigung der RDCs im Bereich des N-Terminus. Tatsächlich muss man zwei einander entge-

genwirkende Effekte berücksichtigen: Wegen der langreichweiten Wechselwirkung versteift sich das Proteinrückgrat, und die RDC-Werte erhöhen sich, gleichzeitig wird aber der negative geladene C-Terminus in die Nähe des positiv geladenen N-Terminus gebracht, und es kommt zu teilweiser Ladungskompensation. Letzteres wiederum erniedrigt die RDC-Werte.

Wir haben hier nachgewiesen, dass die molekulare Ausrichtung von intrinsisch unstrukturierten und anderen ungeordneten Proteinen in geladenen nematischen Phasen stark durch elektrostatische Wechselwirkungen beeinflusst wird. Ein einfaches Modell der elektrostatischen Ausrichtung kann jedoch dipolare Restkopplungen zuverlässig unter verschiedenen Bedingungen vorhersagen. Elektrostatische Wechselwirkungen müssen bei der Interpretation von Struktureigenschaften in ungeordneten Proteinen auf der Basis von RDCs berücksichtigt werden. Gleichzeitig kann aber eine Modulation der Ausrichtung durch elektrostatische Wechselwirkungen eine verbesserte strukturelle Charakterisierung dieser flexiblen Systeme ermöglichen. Unsere Ergebnisse haben daher bedeutende Auswirkungen für die RDC-basierte Interpretation der Struktur und Dynamik entfalteter Zustände.

Eingegangen am 9. Juni 2006

Online veröffentlicht am 28. September 2006

Stichwörter: Dipolare Restkopplungen · Molekulare Ausrichtung · NMR-Spektroskopie · Proteinstrukturen

- [1] C. Tanford, K. Kawahara, S. Lapanje, *J. Biol. Chem.* **1966**, *241*, 1921–1923.
- [2] A. K. Jha, A. Colubri, K. F. Freed, T. R. Sosnick, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 13099–13104.
- [3] P. Bernado, L. Blanchard, P. Timmins, D. Marion, R. W. Ruigrok, M. Blackledge, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 17002–17007.
- [4] C. W. Bertoncini, Y. S. Jung, C. O. Fernandez, W. Hoyer, C. Griesinger, T. M. Jovin, M. Zweckstetter, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 1430–1435.
- [5] P. Bernado, C. W. Bertoncini, C. Griesinger, M. Zweckstetter, M. Blackledge, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17968–17969.
- [6] M. Zweckstetter, G. Hummer, A. Bax, *Biophys. J.* **2004**, *86*, 3444–3460.
- [7] M. R. Hansen, L. Mueller, A. Pardi, *Nat. Struct. Biol.* **1998**, *5*, 1065–1074.
- [8] R. S. Prosser, J. A. Losonczi, I. V. Shiyanovskaya, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 11010–11011.
- [9] K. Zimmermann, H. Hagedorn, C. C. Heuck, M. Hinrichsen, H. Ludwig, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 1653–1655.
- [10] M. Zweckstetter, *Eur. Biophys. J.* **2006**, *35*, 170–180.
- [11] M. Zweckstetter, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 3791–3792.
- [12] M. Louhivuori, K. Paakkonen, K. Fredriksson, P. Permi, J. Luunila, A. Annila, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 15647–15650.