

Infektiöse und nichtinfektiöse Amyloide des HET-s(218-289)-Prions haben unterschiedliche NMR-Spektren^{**}

Christian Wasmer, Alice Soragni, Raimon Sabaté, Adam Lange, Roland Riek und Beat H. Meier*

Die prionbildende Domäne des Pilzprions HET-s (Aminosäurereste 218–289) bildet, wie kürzlich gezeigt wurde, bei tiefem pH *in vitro* nicht- oder nur schwach infektiöse Amyloidfibrillen.^[1] Da ein Strukturmodell für die infektiöse pH-7-Form vorliegt,^[2] bietet das Studium der nichtinfektiösen Fibrillen die Möglichkeit, die Unterschiede zwischen infektiösen und nichtinfektiösen Polymorphen auf molekularer Ebene zu untersuchen. Es ist bekannt, dass Amyloide, und speziell Prionen, in verschiedenen polymorphen Formen existieren können. Die Bildung eines bestimmten Polymorphs kann *in vitro* über den pH-Wert oder durch Röhren der Lösung teilweise gesteuert werden können.^[3,4] Polymorphe können auch vererbbar sein. Dieses Phänomen ist eng verknüpft mit dem Bestehen verschiedener Stämme in Prionenerkrankungen. In Hefe sind Prionenstämme mit deutlich variierender biologischer Aktivität bekannt,^[5–7] aber für das HET-s-Prion des Fadenpilzes *Podospora anserina* gibt es keinerlei Anzeichen von Polymorphie bei physiologischem pH-Wert.^[1] Dies spiegelt sich in den Festkörper-NMR-Spektren der prionbildenden C-terminalen Domäne von HET-s, des Fragments HET-s(218–289), wider, deren ¹³C- und ¹⁵N-NMR-Resonanzen als schmale Linien ohne Anzeichen für Peak-Verdopplungen erscheinen.^[8] Außerdem wurde für verschiedene Probenpräparationen immer dieselbe chemische Verschiebung gefunden. Für pH-3-Fibrillen, deren NMR-Spektren hier diskutiert werden, ergaben elektronenmikroskopische Aufnahmen jedoch Hinweise auf koexistierende Polymorphe, die sich allesamt von der pH-7-Form unterscheiden.^[1]

Das C-terminale Fragment 218–289, das den Proteinase-K-resistenten Teil der Fibrillen ausmacht,^[9] hat die Aminosäuresequenz KIDAIIVGRNSAKDIRTEERARVQLGN–VVTAAALHGGIRISDQTTNSVETVVGKGESRVLIGN–

EYGGKGFWDN. Dieses Fragment ist notwendig und hinreichend um Infektiosität zu beobachten^[10] und bildet *in vitro* bei pH 7 infektiöse Amyloid-Fibrillen.^[9] Die gut aufgelösten NMR-Spektren der pH-7-Fibrillen aus HET-s(218–289) ermöglichen eine fast vollständige Zuordnung der NMR-Resonanzen zu allen Resten in den starren Bereichen der Fibrillen.^[11] Auf der Grundlage der chemischen Verschiebungen und zusätzlicher biophysikalischer Daten wurde ein Strukturmodell mit den vier β -Strängen β_1 – β_4 vorgeschlagen. Diese vier Stränge bilden ein β -Solenoid mit zwei sich wiederholenden β -Faltblatt-Schleife- β -Faltblatt-Motiven (β_1 – β_2 und β_3 – β_4), die zusammen zwei Windungen des Solenoids aufbauen. Das Modell wird durch Elektronenmikroskopiedaten gestützt, aus denen ein mit zwei Lagen an β -Strängen pro HET-s(218–289)-Molekül kompatibles Masse/Länge-Verhältnis hervorgeht.^[12]

M-HET-s(218–289)-H₆ wurde nach einer bekannten Methode rekombinant exprimiert und gereinigt^[9,11] und anschließend bei pH 3 fibrillisiert (siehe auch die Hintergrundinformationen). Wie sich im Verlauf der Experimente herausstellte, waren bei pH 3 fibrillisierte Proben stabiler als bei pH 2 fibrillisierte, mit denen die Experimente in Lit. [1] größtenteils ausgeführt wurden. pH-2- und pH-3-Fibrillen verhalten sich jedoch sehr ähnlich (beide haben fast identische Aggregationskinetiken, induzieren die Fluoreszenz von Thioflavin T und zeigen die gleiche Morphologie in elektronenmikroskopischen Aufnahmen), und es wurde bestätigt, dass die pH-3-Form nicht infektiös ist.^[22]

Das ¹³C-¹³C-Spektrum mit protonengetriebener Spindifusion (PDSD) der pH-3-Fibrillen ist in Abbildung 1 mit einem entsprechenden Spektrum für pH-7-Fibrillen verglichen. Nach der Produktion der pH-3-Fibrillen wurden diese mit reinem Wasser gewaschen. Obwohl direkte Fibrillisation im neutralen Bereich die pH-7-Fibrillen ergeben sollte,^[1] konnten diese in unseren Experimenten nie nachgewiesen werden, da die pH-3-Form bei höheren pH-Werten stabil bleibt. Die Spektren der pH-3-Fibrillen unterscheiden sich eindeutig von jenen der pH-7-Form, was zeigt, dass sie eine andere molekulare Struktur haben. Die schlechtere Auflösung der Spektren wiederum deutet auf eine größere Unordnung hin: Die Linienbreiten der pH-3-Fibrillen liegen typischerweise zwischen 128 und 202 Hz, während für die pH-7-Fibrillen weniger als 100 Hz gemessen wurden (nur aufgelöste Peaks wurden berücksichtigt). Durch die reduzierte Auflösung ist die Zuordnung der Resonanzen erschwert. Mithilfe einer Kombination aus PDSD- und HETCOR-Spektren (Abbildung 1) und ¹³C-¹³C-TOBSY-Spektroskopie^[13,14] (Abbildung 2) waren wir dennoch in der Lage, 22 Spinsysteme zu identifizieren und jeweils einem Aminosäurerest zuzuordnen. Die 22 in den starren Teilen der Fibrillen

[*] C. Wasmer, A. Soragni, Dr. A. Lange, Prof. R. Riek, Prof. B. H. Meier
Laboratorium für Physikalische Chemie
ETH Zürich, 8093 Zürich (Schweiz)
Fax: (+ 41) 446-321-621
E-Mail: beme@ethz.ch

Dr. R. Sabaté
Laboratoire de Génétique Moléculaire des Champignons
IBGC UMR CNRS 5095, Université de Bordeaux 2
Bordeaux (Frankreich)

[**] Wir danken S. J. Saupe, H. Van Melckebeke, A. Siemer und M. Ernst für hilfreiche Diskussionen. Diese Arbeit wurde vom Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung und der ETH Zürich durch das TH-grant-System unterstützt.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

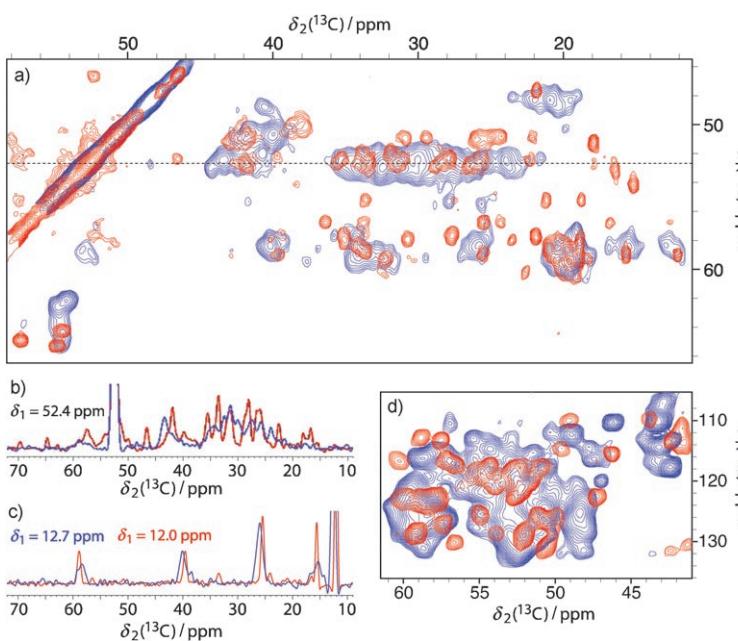


Abbildung 1. PDSD-Spektren von HET-s(218–289)-Fibrillen, die bei pH 3 (blau) und bei pH 7 (rot) gebildet wurden. (Die vollständigen Spektren werden in den Hintergrundinformationen gezeigt.) a) Ausschnitt aus der aliphatischen Region. b,c) Schnitt durch einen Bereich der C^α-Region und bei einer Isoleucin-C^{δ1}-Resonanz zur Verdeutlichung der unterschiedlichen Linienbreiten. d) Ausschnitt aus dem ¹⁵N-¹³C-HETCOR-Spektrum. Alle Spektren wurden mit einer Mischzeit von 50 ms und 90-kHz-SPINAL-64-¹H-Entkopplung während t_1 und t_2 bei einem statischen Magnetfeld von 14.09 T aufgenommen.

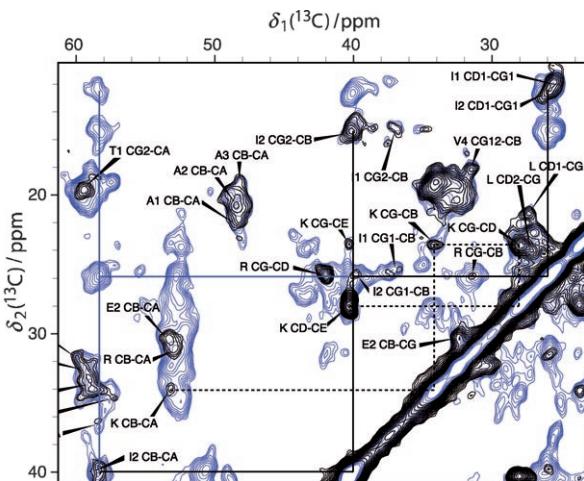


Abbildung 2. Ausschnitt aus dem ¹³C-¹³C-TOBSY- (schwarz) und 50-ms-PDSD-Spektrum (blau) der pH-3-Fibrillen. Die durchgehenden schwarzen und blauen Linien verbinden jeweils Kreuzsignale im TOBSY- und PDSD-Spektrum, die zu I₂ gehören; Die gestrichelte schwarze Linie folgt den Kreuzsignalen des K-Spinsystems. Die Zuordnungen beruhen auf der Auswertung der TOBSY-, PDSD- und N-C-HETCOR-Spektren. Die Spinsysteme sind willkürlich nummeriert. Die gezeigten Spektren wurden bei 13-kHz-MAS mit 90-kHz-SPINAL-64-¹H-Entkopplung während t_1 und t_2 aufgenommen. Die Mischzeiten waren 5 ms im TOBSY- und 50 ms im PDSD-Spektrum.

gefundenen Spinsysteme bestehen aus 3 A, 1 D (oder N), 2 E, 2 G, 1 H, 2 I, 1 K, 1 L, 1 R, 2 S, 2 T und 4 V (siehe die Hintergrundinformationen für das vollständige TOBSY-

Spektrum und die zugeordneten chemischen Verschiebungen). Für 16 dieser Spinsysteme sind sowohl die chemischen Verschiebungen der C^α- als auch der C^β-Atome bestimmt worden, und die Differenzen ihrer sekundären chemischen Verschiebungen, $\delta_{C^\alpha} - \delta_{C^\beta}$, sind in Abbildung 3 dargestellt. Für alle 16 Spinsysteme wurden negative Werte gefunden, was – im Einklang mit FT-IR-spektroskopischen Daten für pH-2-Fibrillen^[1] – auf eine β-Faltblatt-Struktur hinweist.^[15]

Um die pH-3-Fibrillen auf bewegliche Aminosäurereste zu untersuchen, wurden ¹³C-detektierte refokussierte ¹H-¹³C-INEPT- und ¹H-¹³C-¹³C-INEPT-TOBSY^[16]-Experimente ausgeführt (Abbildung 4), die lediglich die beweglichen Teile der Fibrillen erfassen.^[17] Anhand der TOBSY-Kreuzsignale wurden zwei Histidinreste und eine Lysinseitenkette identifiziert. Im Unterschied zu den pH-7-Fibrillen konnten keine Anzeichen einer hoch flexiblen Schlaufe gefunden werden.^[17,18]

Aus den beschriebenen NMR-Spektren folgern wir, dass pH-3-Fibrillen von HET-s(218–289) aus starren β-Faltblattstrukturen bestehen und, abgesehen von der H₆-Markierung, keine hoch flexiblen Abschnitte enthalten, wie sie in der pH-7-Form auftreten. Weitere signifikante Unterschiede in den Spektren deuten darauf hin, dass die Strukturen der pH-3- und der pH-7-Fibrillen im Detail stark

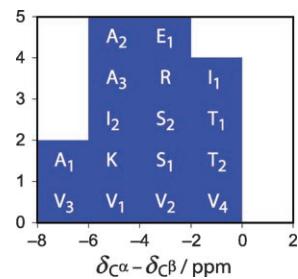


Abbildung 3. Histogramm der beobachteten Differenzen zwischen den sekundären chemischen Verschiebungen von C^α und C^β. Negative Werte deuten auf eine β-Faltblattstruktur hin.^[15] Die Spinsysteme sind wie in Abbildung 2 nummeriert.

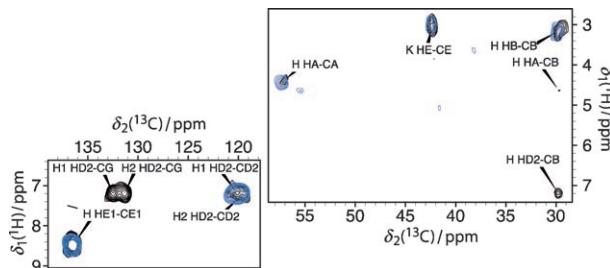


Abbildung 4. Aliphatische und aromatische Region des HC-INEPT- (blau) und HCC-INEPT-TOBSY-Spektrums (schwarz) mit Zuordnungen auf der Grundlage von TOBSY-Kreuzsignalen und chemischen Verschiebungen in der Zufallsknäuel-Konformation. Die Spinsysteme sind willkürlich nummeriert. Beide Spektren wurden bei 13-kHz-MAS mit 70-kHz-SPINAL-64-¹H-Entkopplung während t_2 aufgenommen. Die Mischzeit des TOBSY-Spektrums betrug 4 ms.

voneinander abweichen. Wie aus Abbildung 1 ersichtlich, besteht beispielsweise die Alanin- C^{α} - C^{β} -Region der pH-7-Fibrillen aus vier starken Peaks, die A228 (47.4, 21.6 ppm), A237 (51.1, 17.7), A247 (54.1, 14.8) und A248 (53.0, 16.1) zuzuordnen sind. Lediglich A228 weist die für β -Faltblattstrukturen übliche chemische Verschiebung auf. Für die pH-3-Fibrillen gibt es jedoch keine Alaninresonanz außerhalb der β -Faltblattregion, und wir vermuten, dass mehrere Alaninreste zu dem teilweise aufgelösten Signalsatz (48.3, 21.3 ppm) beitragen. Weitere offensichtliche Unterschiede gibt es in der Serin- C^{α} - C^{β} -Region und für Valin (z. B. C^{α} - C^{β} und C^{α} - C^{γ} für V264, siehe auch die Hintergrundinformationen). Des Weiteren unterscheiden sich die CP/MAS-Spektren der beiden Fibrillenarten auch qualitativ. Die breiteren Signale der pH-3-Fibrillen (Abbildung 1b, c) lassen darauf schließen, dass diese weniger gut geordnet sind als die pH-7-Fibrillen des gleichen Peptids. Die variierenden mesoskopischen Strukturen, die in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen beobachtet werden, könnten eine Erklärung für diese Unordnung bieten, da jedes Polymorph unterschiedliche Signale ergeben kann. Zusätzlich kann eine lokale Unordnung die Signale einzelner polymorphen Formen verbreitern. Ähnliche Liniendurchmesser wie für die pH-3-Fibrillen wurden auch bei anderen Amyloiden beobachtet.^[19–21]

Wir schließen, dass die bei pH 3 gebildeten, nichtprionischen Amyloide von HET-s(218–289) einen fast ausschließlich in β -Faltblatt-Konformation befindlichen starren Teil haben, aber, anders als die pH-7-Form, nicht über hoch flexible Teile verfügen. Außerdem scheint die Struktur der einzelnen HET-s(218–289)-Moleküle in den Fibrillen der nichtprionischen Form deutlich von derjenigen in der Prion-Form abzuweichen, während der Durchmesser elementarer Fibrillen und das Masse/Länge-Verhältnis keine Unterschiede aufweisen.^[1,12] Die fehlende Infektiosität der pH-3-Fibrillen hängt also damit zusammen, dass sich ihre molekulare Struktur wesentlich von derjenigen der bei physiologischem pH-Wert entstehenden Fibrillen unterscheidet. Im Einklang damit ist die Tatsache, dass bei niedrigem pH-Wert gebildete Fibrillen schlechte Vorlagen für die Fibrillenbildung bei pH 7 sind.^[1]

Eingegangen am 22. Oktober 2007,
veränderte Fassung am 4. März 2008
Online veröffentlicht am 11. Juni 2008

Stichwörter: Amyloide · Fibrillen · NMR-Spektroskopie · Proteinstrukturen · Strukturbioologie

- [1] R. Sabate, U. Baxa, L. Benkemoun, N. Sanchez de Groot, B. Coulary-Salin, M. Maddelein, L. Malato, S. Ventura, A. Steven, S. Saupe, *J. Mol. Biol.* **2007**, *370*, 768–783.
- [2] C. Ritter, M.-L. Maddelein, A. B. Siemer, T. Luhrs, M. Ernst, B. H. Meier, S. J. Saupe, R. Riek, *Nature* **2005**, *435*, 844–848.
- [3] A. T. Petkova, R. D. Leapman, Z. Guo, W.-M. Yau, M. P. Mattson, R. Tycko, *Science* **2005**, *307*, 262–265.
- [4] A. K. Paravastu, A. T. Petkova, R. Tycko, *Biophys. J.* **2006**, *90*, 4618–4629.
- [5] U. Baxa, T. Cassese, A. V. Kajava, A. C. Steven, *Adv. Protein Chem.* **2006**, *73*, 125–180.
- [6] R. Diaz-Avalos, C.-Y. King, J. Wall, M. Simon, D. L. D. Caspar, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 10165–10170.
- [7] B. H. Toyama, M. J. S. Kelly, J. D. Gross, J. S. Weissman, *Nature* **2007**, *449*, 233–237.
- [8] A. B. Siemer, C. Ritter, M. Ernst, R. Riek, B. H. Meier, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 2494–2497; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2441–2444.
- [9] A. Balguerie, S. Dos Reis, C. Ritter, S. Chaignepain, B. Coulary-Salin, V. Forge, K. Bathany, I. Lascau, J.-M. Schmitter, R. Riek, S. J. Saupe, *EMBO J.* **2003**, *22*, 2071–2081.
- [10] M.-L. Maddelein, S. Dos Reis, S. Duvezin-Caubet, B. Coulary-Salin, S. J. Saupe, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 7402–7407.
- [11] A. B. Siemer, C. Ritter, M. O. Steinmetz, M. Ernst, R. Riek, B. H. Meier, *J. Biomol. NMR* **2006**, *34*, 75–87.
- [12] A. Sen, U. Baxa, M. N. Simon, J. S. Wall, R. Sabate, S. J. Saupe, A. C. Steven, *J. Biol. Chem.* **2006**, *282*, 5545–5550.
- [13] M. Baldus, B. H. Meier, *J. Magn. Reson. Ser. A* **1996**, *121*, 65–69.
- [14] E. H. Hardy, A. Detken, B. H. Meier, *J. Magn. Reson.* **2003**, *165*, 208–218.
- [15] S. Spera, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 5490–5492.
- [16] O. C. Andronesi, S. Becker, K. Seidel, H. Heise, H. S. Young, M. Baldus, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12965–12974.
- [17] A. B. Siemer, A. A. Arnold, C. Ritter, T. Westfeld, M. Ernst, R. Riek, B. H. Meier, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 13224–13228.
- [18] A. Lange, B. H. Meier, *C. R. Chim.* **2008**, *11*, 332–339.
- [19] A. T. Petkova, Y. Ishii, J. J. Balbach, O. N. Antzutkin, R. D. Leapman, F. Delaglio, R. Tycko, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 16742–16747.
- [20] J. C. C. Chan, N. A. Oyler, W.-M. Yau, R. Tycko, *Biochemistry* **2005**, *44*, 10669–10680.
- [21] D. D. Laws, H. M. Bitter, K. Liu, H. L. Ball, K. Kaneko, H. Wille, F. E. Cohen, S. B. Prusiner, A. Pines, D. E. Wemmer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 11686–11690.
- [22] Persönliche Mitteilung von S. Saupe.