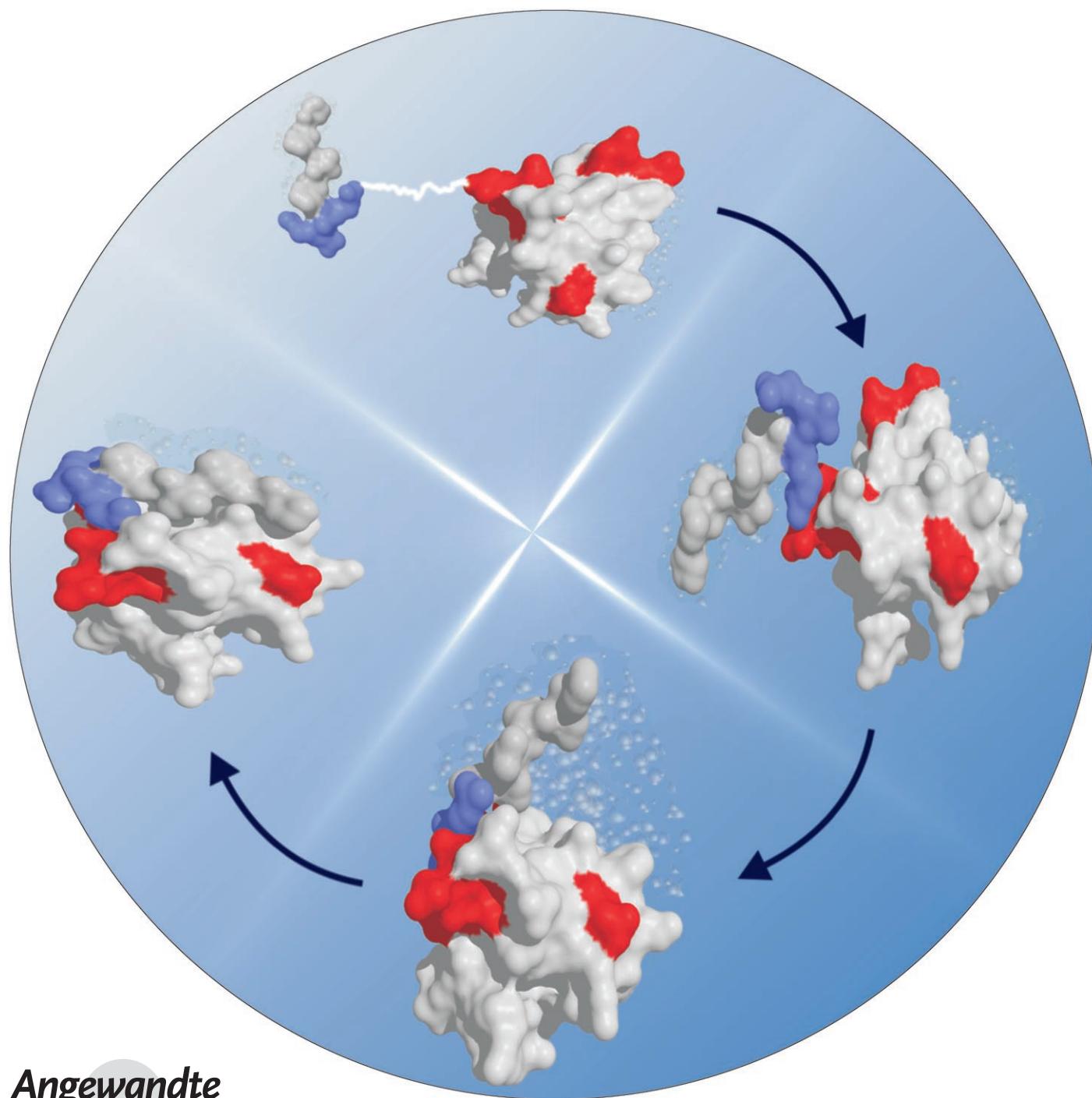


Mechanismus der schnellen Peptiderkennung durch SH3-Domänen**

Mazen Ahmad, Wei Gu und Volkhard Helms*



Die Protein-Protein- und Protein-Peptid-Erkennung spielen eine zentrale Rolle in der Regulierung zellulärer Prozesse. Um die mechanistischen Einzelheiten dieser Prozesse zu enträtseln, wurde in den letzten Jahrzehnten ein großer Aufwand betrieben.^[1–4] Zum besseren Verständnis des „Bindungsvorgangs“ sind jedoch noch genauere experimentelle Informationen notwendig. Außerdem werden leistungsfähigere Computer benötigt, um durch dynamische Simulationen über längere Zeiträume der Dauer dieser Vorgänge gerecht zu werden. Gewöhnlich nimmt man an, dass die Bildung von Protein-Protein-Komplexen einem Pfad von einer Diffusionsphase über eine oder mehrere Zwischenstufen zum endgültigen, stereospezifischen Komplex folgt.^[5] Experimentelle Untersuchungen durch ortsgerechtete Mutagenese^[1,2] und Rechnungen mit Brownschen Dynamiksimulationen^[3,4] zeigten die Bedeutung langreichweiter elektrostatischer Wechselwirkungen während der Diffusion auf. Mithilfe der NMR-PRE-Methode (NMR paramagnetic relaxation enhancement) konnten Clore und Mitarbeiter für einen schwach gebundenen Protein-Protein-Komplex vor kurzem die Verteilung eines Ensembles von transienten, unspezifischen Begegnungskomplexen belegen.^[6] Trotz dieser Fortschritte ist unser Bild des Übergangs von solchen Begegnungskomplexen in die endgültigen, stereospezifischen Komplexe immer noch lückenhaft. Mit Sicherheit sind Lösungsmittelleffekte und die Zeitskala der Bindungsvorgänge zwei wesentliche Faktoren für die Modellierung von Proteinbindungsprozessen.

Hier werden Ergebnisse für den Mechanismus der Erkennung von prolinreichen Motiven (PRMs) durch SH3-Domänen vorgestellt.^[7,8] Die SH3-Domänen zählen zu den verbreitetsten Proteinwechselwirkungsdomänen (das menschliche Genom kodiert mindestens 182 SH3-Domänen^[9]), und sie haben sehr unterschiedliche biologische Funktionen. Man weiß, dass SH3-Domänen Proteine über ein kurzes PRM erkennen.^[7,8] Die kanonische Peptidbindungstasche der SH3-Domänen besteht aus einem hydrophoben Abschnitt der Oberfläche mit zwei Furchen, die die Px- und xP-Aminosäuren des Peptids aufnehmen (Abbildung 1A). Die flankierenden positiv geladenen Argininreste des Peptids bilden üblicherweise Kontakte mit den negativ geladenen Resten in den RT- und n-sCr-Schleifen der SH3-Domäne. In der Kristallstruktur des Komplexes nimmt das Peptid eine Polyprolin-Typ-II-Helix (PPII) ein. Dies ist die bekannte Konformation für an SH3-Domänen und andere Prolinerkennungsdomänen gebundene prolinreiche Motive.^[7,8]

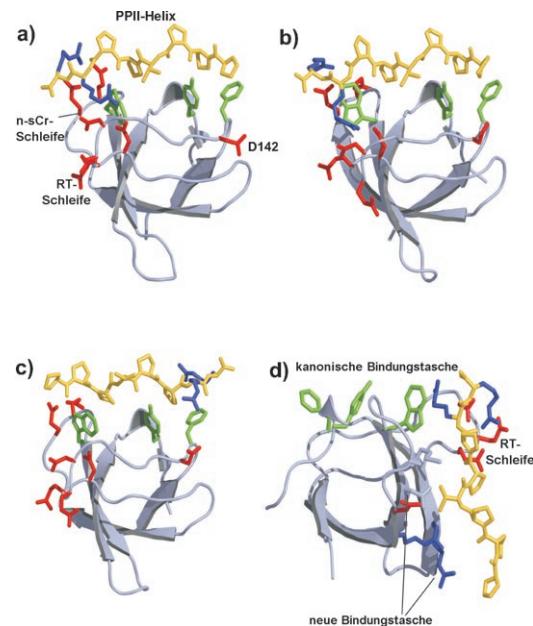


Abbildung 1. Bindungsmodi in der untersuchten SH3-Domäne: a) Kristallstruktur der Domäne mit dem Bindungsmotiv (PDB 1ckb). Die Seitenketten der negativ geladenen Reste sind rot, die hydrophobe Tasche der Domäne ist grün, die PPII-Helix ist gelb und die Argininreste sind blau markiert. b) MD-Schnapschuss nach 130 ns, in dem der Bindungsmodus der Kristallstruktur erreicht wurde. c) Bindungsmodus des Peptids in umgekehrter Richtung zur Kristallstruktur. d) Bindungsmodus in der neuen Tasche. Die Abbildung wurde mit PYMOL^[29] erstellt.

Unsere MD-Simulationen gehen von verschiedenen ungebundenen Konformationen für die N-terminale C-CRK-SH3-Domäne aus, von deren Komplex mit einem PRM eine Kristallstruktur verfügbar ist.^[10] In allen Simulationen beobachteten wir eine relativ kurze Diffusionsphase (Abbildung S3) vor der Bildung von unspezifischen Begegnungskomplexen (Abbildung 2A), die durch Kontakte zwischen entgegengesetzt geladenen Resten der Domäne und des Peptids stabilisiert wurden. In sechs von dreizehn Simulationen führte der Begegnungskomplex anschließend zu stabilen stereospezifischen Komplexen in drei verschiedenen Bindungspositionen (1–3). Auf der Grundlage eines Vergleichs mit den experimentell bestimmten Strukturen für Komplexe von SH3-Domänen definierten wir die Verhältnisse in diesen Komplexen als stereospezifische Bindungsmodi. Der entscheidende Schritt für diese Modi war die Bildung eines transienten Komplexes, in dem die Argininreste des Peptids elektrostatische Wechselwirkungen mit den negativ geladenen Resten in der RT- oder der n-sCr-Schleife eingingen. Von diesem transienten Komplex aus gelangte das System entweder zum Bindungsmodus der Kristallstruktur oder zur Bindung in einer neuen Tasche. Salzbrücken mit dem Rest D142 führten dagegen zur Bindung des Peptids in entgegengesetzter Orientierung:

- 1) Bindungsmodus der Kristallstruktur (Abbildung 1B): Eine Simulation konvergierte zu einer Konformation, die der Kristallstruktur sehr ähnlich ist. Bereits während der ersten 50 ns der Simulation bildete sich eine beträchtliche

[*] M. Ahmad, Dr. W. Gu, Prof. Dr. V. Helms
Zentrum für Bioinformatik, Universität des Saarlandes
66041 Saarbrücken (Deutschland)
Fax: (+49) 681-302-64180
E-Mail: volkhard.helms@bioinformatik.uni-saarland.de
Homepage: <http://gepard.bioinformatik.uni-saarland.de>

[**] M.A. dankt der Tishreen-Universität (Syrien) für ein Promotionsstipendium. Dieses Projekt wurde teilweise durch die Volkswagenstiftung gefördert (Projekt I/80469).

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200801856> zu finden.

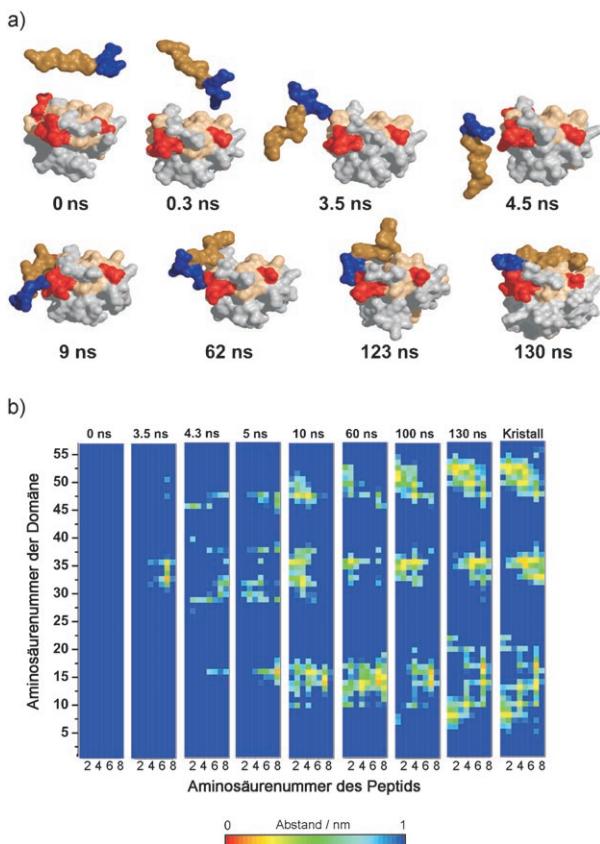


Abbildung 2. Konformationsschnappschüsse entlang des Bindungspfads, der zum Komplex mit der Ausrichtung der Kristallstruktur führt. a) Schnappschüsse zu verschiedenen Simulationszeiten zeigen den Übergang von der Startstruktur über transiente Begegnungskomplexe zum endgültigen Komplex. Lösungsmittelmoleküle sind nicht gezeigt. b) Kartierung der Kontakte zwischen der Domäne und dem Peptid in verschiedenen Schnappschüssen und in der nativen Kristallstruktur. Ein Film ist in den Hintergrundinformationen verfügbar.

- Anzahl an nativen Kontakten. Diese Simulation wurde bis 150 ns fortgesetzt und kam nach 130 ns bereits sehr an die Kristallstruktur heran (Abbildung 1B). Die Wurzel aus dem mittleren Verschiebungsquadrat (RMSD) für das gesamte Rückgrat des Komplexes von der Kristallstruktur betrug über die letzten 20 ns der Simulation gemittelt $(1.3 \pm 0.2) \text{ \AA}$. Die Konformation enthielt die bekannten nativen Kontakte der Kristallstruktur (Abbildung 2B), und das Peptid nahm eine Polyprolin-Typ-II-Helix ein.
- 2) Bindungsmodus in der entgegengesetzten Richtung: Drei Simulationen konvergierten innerhalb von 20–30 ns Simulationszeit zu einer Konformation, in der das Peptid in derselben kanonischen Tasche wie in der Kristallstruktur gebunden war, allerdings in der entgegengesetzten Richtung (Abbildung 1C). Wiederum liegt das Peptid in PPII-Helix-Konformation vor und ist symmetrisch (entgegengesetzte Richtung) zu derjenigen der Kristallstruktur. Einer der Argininreste des Peptids bildete während der Begegnungsphase eine Salzbrücke mit dem Rest D142 der Domäne, allerdings war dieser Kontakt im endgültigen Komplex nur zeitweise vorhanden. Von Interesse ist, dass Asparaginsäurereste häufig an dieser Position in SH3-

Domänen vorkommen. Diese Komplexe waren während der anschließenden Simulationszeit stabil (bis 50 ns). Die Möglichkeit für SH3-Domänen, die PRMs in zwei entgegengesetzten Richtungen zu binden, wurde schon für etliche andere Prolinerkennungsdomänen beschrieben.^[7,8] Die strukturelle Grundlage hierfür ist die Symmetrie der PPII-Helix, die sich daher in zwei verschiedenen Orientierungen in dieselbe Bindungstasche zwängen kann. Diese neue Bindungsart für die C-CRK-SH3-Domäne zeigt die Möglichkeit auf, dass ein und dasselbe Peptid in zwei verschiedenen Richtungen an dieselbe SH3-Domäne binden könnte. Unseres Wissens wurde dies experimentell bisher nicht beobachtet, und es ist uns nicht möglich, die Besetzung der beiden Ausrichtungen desselben Peptids sicher zu beurteilen.

- 3) Bindung in einer neuen Tasche: In zwei unserer Simulationen band das Peptid innerhalb von 30 ns Simulationszeit in einer unterschiedlichen Tasche der SH3-Domäne (Abbildung 1D). Diese Komplexe waren ebenfalls stabil während der verbleibenden 20 ns Simulationszeit. Die Rolle dieser Tasche für die Peptidbindung durch SH3-Domänen wurde kürzlich erstmals durch eine Kristallstruktur gezeigt (PDB 2p4r),^[12] in der die SH3-Domäne ein Peptid mit zwei PRMs binden konnte. Das erste Motiv band in der kanonischen Tasche, und das andere Motiv band auf dieser Seite der Domäne. Darüber hinaus wurde die Tasche vor kurzem ebenfalls in einer weiteren Strukturanalyse (PDB 2drm) beobachtet.

Mechanistisch gesehen fand der Prozess der Komplexbildung in drei Phasen statt. Eine kurze Diffusionsphase führte zur Bildung unterschiedlicher elektrostatisch stabilisierter, intermediärer Komplexe, von denen manche zur Bindung im stereospezifischen, stabil gebundenen Komplex führten. Hierbei definieren wir die Diffusionsphase als den Zeitraum, in dem die beiden bindenden Ketten diffundieren, bevor sie kurzreichweitige Kontakte ausbilden. Obwohl die Diffusionsphase meist ziemlich kurz war, zeigten die Simulationen wenig Abhängigkeit von der Startstruktur des Peptids. Oft änderte das Peptid während der Diffusionsphase vollständig seine Richtung. Wie erwartet, spielten die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den entgegengesetzten geladenen Resten beider Proteine eine entscheidende Rolle. Sie leiten und beschleunigen die Diffusion zur Bildung eines nichtspezifischen Komplexes, der durch Salzbrücken zwischen den Seitenketten der Argininreste des Peptids und den negativ geladenen Resten der Domäne (RT- und n-sCr-Schleifen sowie D142) stabilisiert wird. In Kontrollsimulationen bildete ein mutiertes Peptid mit zwei R → A-Austauschen keine stabilen Kontakte innerhalb von 20 ns (siehe die Hintergrundinformationen).

Experimente zeigten, dass die elektrostatisch beschleunigte Assoziation von Proteinen sehr schnell abläuft.^[1] Insbesondere erhöht die elektrostatische Beschleunigung die Assoziationsgeschwindigkeit (k_{on}) und damit die Bindungskonstante, ohne jedoch die Dissoziationsgeschwindigkeit (k_{off}) zu beeinflussen.^[2] Solch eine beschleunigte Diffusion kann wichtig für Protein-Protein-Assoziationsprozesse sein, in denen Diffusionsphänomene dominierend sind.^[13] Das Vor-

liegen vieler negativ geladener Reste auf der Oberfläche der Domäne erzeugt daher ein Ensemble an transienten Komplexen sowie Bindungsprozesse entlang von mehreren Pfaden. Diese Beobachtungen stimmen mit dem Bild von Begegnungskomplexen überein, das sich aus experimentellen Daten herauskristallisiert.^[6,14] Die elektrostatische Beschaffenheit der Zwischenzustände bei der Protein-Protein-Assoziation wurde zuvor bereits in zyklischen Doppelmutantenexperimenten beschrieben.^[15] Darüber hinaus wurde mit NMR-PRE-Experimenten ein Zusammenhang zwischen der räumlichen Verteilung der unspezifischen Begegnungskomplexe und den Isoflächen des elektrostatischen Potentials beobachtet.^[6] Der Besetzungsgrad der unspezifischen Begegnungskomplexe wurde durch die Ionenstärke deutlich stärker beeinflusst als die Besetzung des stereospezifischen Komplexes, was den Einfluss elektrostatischer Wechselwirkungen auf die Bildung des Ensembles von unspezifischen Begegnungskomplexen hervorhebt.^[16] Diejenigen Salzbrücken in den transienten Begegnungskomplexen, die zum stereospezifischen Komplex führten, waren nah benachbart oder gehörten sogar zu den Kontaktten des endgültigen Komplexes. Somit standen diesen Begegnungskomplexen weniger Freiheitsgrade offen, wodurch sich eine „verringerte Dimensionalität“ für die Suche nach dem endgültigen, stereospezifischen Komplex ergibt.^[3] Der Einfluss der elektrostatischen Wechselwirkungen während der Diffusion und Stabilisierung der transienten Begegnungskomplexe erklärt die Bedeutung der geladenen Reste in den Bindungsmotiven für SH3-Domänen. Die positiv geladenen Reste in den Bindungsmotiven (R, K) sind für die Bindung entscheidend – die Konsensussequenz (PxxPxR/K) für Motive der Klasse II und (R/KxxPxxP) für Motive der Klasse I.^[7,8]

Der genaue Verlauf des Übergangs von den transienten Komplexen zum spezifischen Komplex, der die Entfernung von Lösungsmittel und das Docking der Schnittstellen umfasst, war weiterhin unbekannt. Um die mögliche Rolle von Entnetzungsphänomenen an hydrophoben Schnittstellen im Vorfeld des Bindungsprozesses zu untersuchen, berechneten wir daher für sechs Schnappschüsse aus der transienten Phase derjenigen Simulation, die nahe zur Kristallstruktur führte, die Wasserdichte im Zwischenraum zwischen den beiden Molekülen. Interessanterweise fand sich dort eine stark verringerte Wasserdichte (siehe die Hintergrundinformationen), was ein deutlicher Hinweis auf eine teilweise Entnetzung der Schnittstellen vor der Bindung ist. Um die Abstandsabhängigkeit dieses Effekts zu beschreiben, führten wir 10 weitere ähnliche Simulationen durch. Hierbei wurde das Peptid bezüglich der Kristallstruktur um 2.5–9.0 Å entlang der Verbindungsgerade der Massenzentren des Peptids und der Domäne verschoben (Abbildung 3) und jeweils durch harmonische Zwangsbedingungen festgehalten. Zum Vergleich führten wir auch zwei Simulationen für das Peptid allein (und für die Domäne allein) durch und berechneten die Wasserdichte in dem virtuellen Zwischenraum mit gleicher Form und Volumen wie im Komplex. Bereits die hydrophoben Taschen der Domäne und der Bereich um die PP-II-Helix des Peptids herum wiesen eine verringerte Wasserdichte an den hydrophoben Oberflächen auf. Deutlich ausgeprägter war dieser Effekt allerdings in den Komplexen: Für alle Komplexe mit

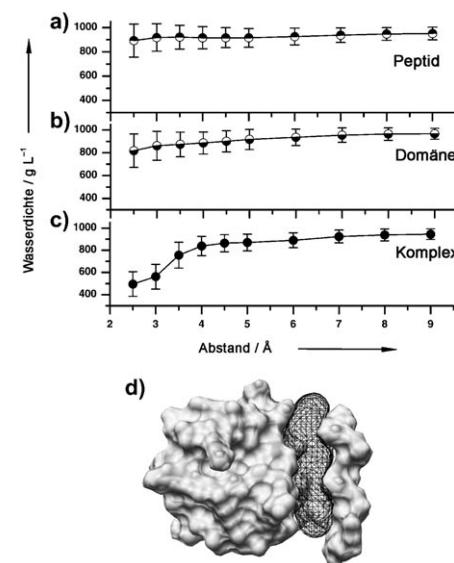


Abbildung 3. Wasserdichte im hydrophoben Zwischenraum an der Schnittstelle mit dem Peptid in festen Abständen. a) Wasserdichte im Zwischenraum für das freie Peptid, b) für die freie Domäne, c) für den Komplex. Die Wasserdichte wurde jeweils über die letzten 1.7 ns jeder 2 ns langen MD-Simulation bei festgehaltenen Abständen gemittelt. Die Volumina des Zwischenraums für das freie Peptid und die freie Domäne wurden durch Überlagerung des entsprechenden Teils aus der Simulation des Komplexes auf alle Schnappschüsse des Protein-Wasser-Systems definiert. d) Darstellung des definierten Zwischenraums zwischen der PPII-Helix und der hydrophoben Tasche der Domäne bei einem Abstand der Schnittstellen von 4 Å.

weniger als 5 Å Abstand zwischen den Schnittstellen wurde eine signifikante Entnetzung beobachtet. Neue Arbeiten haben zu unserem Verständnis des hydrophoben Effekts beigetragen, der einen großen Einfluss auf die Faltung und Stabilisierung von Biomolekülen hat.^[17–22] Beispielsweise wiesen Lum et al.^[23] in Simulationen nach, dass sich um große hydrophobe Oberflächen dampfähnliche Schichten bilden. Mithilfe von MD-Simulation für die Proteinfaltung charakterisierten Zhou et al.^[20] ebenfalls eine Abstandsabhängigkeit der Entnetzungseffekte. In unserem Fall zeigten Kontrollsimulationen (siehe die Hintergrundinformationen), dass die teilweise Entnetzung den Kollaps des Peptids in die Bindungstasche beschleunigt. Dies deutet darauf hin, dass Entnetzungsprozesse, die im Anschluss an die Verringerung der Dimensionalität im transienten Zustand auftreten, die Suche nach dem endgültigen, spezifischen Komplex steuern können. Mithilfe dieser neuen Erkenntnisse können wir nun erklären, weshalb transiente Komplexe in der Nähe des endgültigen Komplexes so schnell konvergieren, dass sie kurzlebig sind und einen geringen Besetzungsgrad haben.^[6]

Am Ende müssen wir uns die Frage stellen, wie wichtig dieses Modell für das allgemeine Verständnis der Protein-Protein-Erkennung ist. Zunächst einmal kommen große aromatische Taschen in vielen Prolinerkennungsdomänen vor. Einerseits machen hydrophobe Aminosäurereste üblicherweise 30–50 % von Protein-Protein-Schnittstellen aus,^[24,25] andererseits ist das Vorliegen von Salzbrücken an solchen Schnittstellen ebenfalls ein allgemeines Kennzeichen, da im Mittel zwei Ionenpaare pro Schnittstelle beschrieben

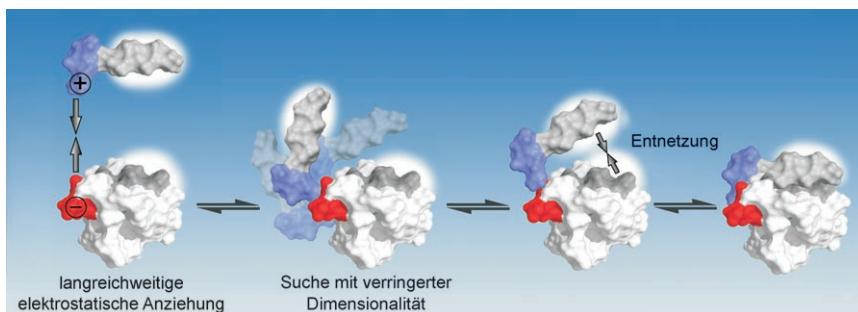


Abbildung 4. Der Mechanismus des Bindungsprozesses. Die positiv und negativ geladenen Reste sind blau bzw. rot, die hydrophoben Schnittstellen sind grau wiedergegeben. Die Entnetzung der hydrophoben Schnittstellen des Peptids und der SH3-Domäne ist durch weiße Wolken um die Schnittstellen angedeutet.

wurden.^[26] Daher ist gut denkbar, dass der Mechanismus, der hier die Assoziation der N-terminalen C-CRK-SH3-Domäne und ihres Peptidbindungsmotivs steuert, ebenfalls auf viele andere Proteinpaare anwendbar ist.

Eine wichtige Erkenntnis aus den Simulationen ist das Zusammenwirken der die Bindung treibenden Kräfte (Abbildung 4). Die langreichweitigen elektrostatischen Effekte spielen die Hauptrolle während der Diffusion und stabilisieren die transienten Komplexe, die durch die geladenen Bestandteile der Schnittstellen zusammengehalten werden. Bei kleinen Abständen kann die teilweise Entnetzung dann verstärkt dafür sorgen, dass der hydrophobe Teil der Schnittstellen kollabiert und das System zum endgültigen spezifischen Komplex konvergiert. Dieses Modell illustriert, wie einfach ein vermeintlich komplexer Prozess wie die Proteinerkennung sein kann.

Rechenmethoden

Die Startstruktur der Simulation wurde aus der Kristallstruktur eines Komplexes der N-terminalen C-CRK-SH3-Domäne mit einer PRM entnommen (PDB 1ckb).^[10] Ausgehend von verschiedenen ungebundenen Konformationen mit Mindestabständen von 13–20 Å wurden dreizehn unabhängige atomistische Moleküldynamiksimulationen ohne Zwangsbedingungen in expliziter Lösungsmittelumgebung mit dem GROMACS-Simulationsprogramm^[27] über 50–150 ns berechnet. Die gesamte Länge der Simulationen betrug 0,85 μs (Details finden sich in den Hintergrundinformationen). Die intermolekularen Zwischenräume wurden mit dem Programm SURFNET^[28] bestimmt.

Eingegangen am 21. April 2008,
veränderte Fassung am 3. Juli 2008
Online veröffentlicht am 27. August 2008

Stichwörter: Adapterdomänen · Hydrophobe Entnetzung · Moleküldynamiksimulationen · Prolinreiche Motive · Proteine

- [1] G. Schreiber, A. R. Fersht, *Nat. Struct. Biol.* **1996**, 3, 427.
- [2] T. Selzer, S. Albeck, G. Schreiber, *Nat. Struct. Biol.* **2000**, 7, 537.
- [3] S. H. Northrup, J. O. Boles, J. C. Reynolds, *Science* **1988**, 241, 67.
- [4] A. Spaar, C. Dammer, R. R. Gabdouline, R. C. Wade, V. Helms, *Biophys. J.* **2005**, 90, 1913.
- [5] G. Schreiber, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2002**, 12, 41.
- [6] C. Tang, J. Iwahara, G. M. Clore, *Nature* **2006**, 444, 383.
- [7] L. J. Ball, R. Kuhne, J. Schneider-Mergener, H. Oschkinat, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 2912; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 2852.
- [8] A. Zarrinpar, R. P. Bhattacharyya, W. A. Lim, *Sci. STKE* **2003**, 2003, re8.
- [9] J. C. Venter et al., *Science* **2001**, 291, 1304.
- [10] X. Wu, B. Knudsen, S. M. Feller, J. Zheng, A. Sali, D. Cowburn, H. Hanafusa, J. Kuriyan, *Structure* **1995**, 3, 215.
- [11] M. Saraste, A. Musacchio, *Nat. Struct. Biol.* **1994**, 1, 835.
- [12] J. M. Janz, T. P. Sakmar, K. C. Min, *J. Biol. Chem.* **2007**, 282, 28893.
- [13] R. R. Gabdouline, R. C. Wade, *J. Mol. Biol.* **2001**, 306, 1139.
- [14] T. L. Blundell, J. Fernandez-Recio, *Nature* **2006**, 444, 279.
- [15] G. Schreiber, A. R. Fersht, *J. Mol. Biol.* **1995**, 248, 478.
- [16] J. Y. Suh, C. Tang, G. M. Clore, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 12954.
- [17] D. Chandler, *Nature* **2005**, 437, 640.
- [18] P. Ball, *Nature* **2003**, 423, 25.
- [19] P. Liu, X. Huang, R. Zhou, B. J. Berne, *Nature* **2005**, 437, 159.
- [20] R. Zhou, X. Huang, C. J. Margulis, B. J. Berne, *Science* **2004**, 305, 1605.
- [21] N. Choudhury, B. M. Pettitt, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 4847.
- [22] J. Dzubiella, J. M. J. Swanson, J. A. McCammon, *J. Chem. Phys.* **2006**, 124, 084905.
- [23] K. Lum, D. Chandler, J. D. Weeks, *J. Phys. Chem. B* **1999**, 103, 4570.
- [24] L. Lo Conte, C. Chothia, J. Janin, *J. Mol. Biol.* **1999**, 285, 2177.
- [25] S. Ansari, V. Helms, *Proteins Struct. Funct. Genet.* **2005**, 61, 344.
- [26] D. Xu, C. J. Tsai, R. Nussinov, *Protein Eng.* **1997**, 10, 999.
- [27] D. Van Der Spoel, E. Lindahl, B. Hess, G. Groenhof, A. E. Mark, H. J. Berendsen, *J. Comput. Chem.* **2005**, 26, 1701.
- [28] R. A. Laskowski, *J. Mol. Graph.* **1995**, 13, 323.
- [29] W. L. DeLano, DeLano Scientific, San Carlos, CA, **2002**.