

# Festkörper-NMR-Spektroskopie zeigt: Die Einschlusskörperchen von HET-s(218–289) in *E. coli* sind Amyloide\*\*

Christian Wasmer, Laura Benkemoun, Raimon Sabaté, Michel O. Steinmetz, Bénédicte Couлары-Salin, Lei Wang, Roland Riek, Sven J. Saupe und Beat H. Meier\*

In vielen Bereichen der Biologie ist die heterologe Expression von Proteinen in *E. coli* von außerordentlicher Bedeutung, da sie die Herstellung ausreichender Mengen an Proben für physikalische und chemische Untersuchungen ermöglicht.<sup>[1]</sup> In vielen Fällen jedoch bilden derartig exprimierte Proteine Aggregate, so genannte Einschlusskörperchen (inclusion bodies, IB),<sup>[2]</sup> die in Form dichter intrazellulärer Ablagerungen mit bis zu 1  $\mu\text{m}^3$  Volumen und amorphem Erscheinungsbild auftreten.<sup>[3]</sup> Dies wird häufig als Hindernis angesehen, das die Isolierung nativer heterologer Proteine aus *E.-coli*-Zellen verhindert, kann für einige Anwendungen aber auch von Vorteil sein, da es die Gewinnung großer Mengen reinen Proteins ermöglicht. Außerdem ist die Proteinaggregation in IBs in der Strukturbiochemie bedeutsam, da sie eng mit der Bildung von amyloiden Ablagerungen, wie sie im Rahmen bestimmter Krankheiten auftreten, verwandt sein könnte.<sup>[4]</sup> Früher wurden IBs häufig als unspezifische Aggregate betrachtet, im Unterschied zu den Amyloidfibrillen mit geordneter Struktur. Mittlerweile ist man jedoch mehr und mehr der Auffassung, dass die Bildung von IBs wie auch die von Fibrillen durch Keimbildung initiiert wird und im Anschluss, durch sequenzspezifische Wechselwirkungen geleitet, zur Bildung  $\beta$ -Faltblatt-reicher Aggregate führt. Die enge Verwandtschaft von IBs und Amyloiden wurde kürzlich in einigen Studien postuliert, die sich auf Wasserstoff/Deuterium(H/D)-Austausch (detektiert mit NMR-Spektroskopie), Faserdiffraktion, Mikroskopie, Infrarotspektroskopie und Mutageneseexperimente stützen;<sup>[5–7]</sup> ein Strukturvergleich beider Formen eines Proteins mit einer hoch auflösenden Methode war bisher jedoch nicht verfügbar.

In Prionen ist die Aggregation des Proteins in vivo selbstkatalysierend, was als grundlegender Prozess für die

Infektiosität gilt. [Het-s], ein Prion des Fadenpilzes *Podospora anserina*, ist an einem Körper-eigenen/körperfremd-Erkennungsmechanismus beteiligt.<sup>[8]</sup> Der C-terminale Teil von HET-s, der die Aminosäurereste 218–289 umfasst, wurde bereits vor einigen Jahren als die prionbildende Domäne identifiziert.<sup>[9,10]</sup> In der infektiösen Amyloidform bildet HET-s(218–289) einen  $\beta$ -Solenoiden, in dem zwei Lagen der  $\beta$ -Faltblätter um den dreieckigen hydrophoben Kern jeweils von einem HET-s(218–289)-Molekül gebildet werden.<sup>[11]</sup> Die in vitro hergestellten HET-s-Fibrillen sind infektiös im Sinne eines Prions,<sup>[12,13]</sup> eine Eigenschaft, die mit der bekannten Struktur verbunden zu sein scheint, die bei pH 7 gebildet wird, da die davon abweichenden Aggregationsformen von HET-s (einschließlich Amyloiden), die sich bei niedrigem pH-Wert bilden, keine Prioneninfektiosität<sup>[12,14]</sup> im Sinne von Lit. [15] zeigen.

Hier beschreiben wir die strukturelle und funktionelle Charakterisierung der HET-s(218–289)-IBs aus *E. coli* mithilfe von Elektronenmikroskopie (EM), NMR-spektroskopisch detektiertem H/D-Austausch, Festkörper-NMR-Spektroskopie und Bestimmung der In-vivo-Prioneninfektiosität im Sinne von Lit. [16].

HET-s(218–289) wurde in *E.-coli*-Bakterien exprimiert und lag in der Form der typischen, kantigen Einschlüsse mit hoher Elektronendichte und einem Durchmesser von 100 bis 400 nm vor, bevorzugt an den Zellpolen (Abbildungen 1a und S1 in den Hintergrundinformationen). Die IBs wurden teilweise gereinigt (Hintergrundinformationen), woraufhin in weiteren EM-Bildern (Abbildung 1b) bereits fibrilläre Strukturen sichtbar wurden. Das gereinigte Material wurde auch verwendet, um prionenfreie *P.-anserina*-Stämme mithilfe einer Protein-Transfektionsmethode<sup>[16]</sup> zu infizieren. Während unlösliche Extrakte von *E.-coli*-Kontrollstämmen, die nur einen leeren Vektor oder IBs eines anderen Proteins

[\*] C. Wasmer, Dr. L. Wang, Prof. R. Riek, Prof. B. H. Meier  
Laboratorium für Physikalische Chemie, ETH Zürich  
8093 Zürich (Schweiz)

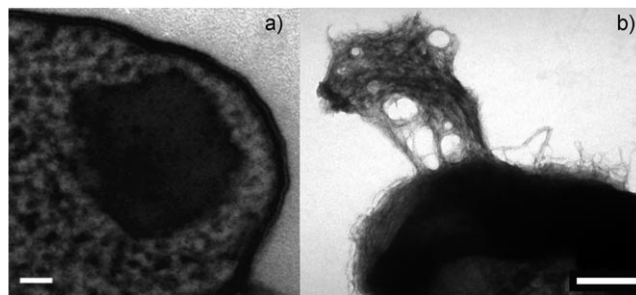
Fax: (+41) 446-321-621  
E-Mail: beme@ethz.ch

Dr. L. Benkemoun, Dr. R. Sabaté, Dr. B. Couлары-Salin,  
Prof. S. J. Saupe  
Laboratoire de Génétique Moléculaire des Champignons, IBGC  
UMR 5095 CNRS, Université de Bordeaux 2, Bordeaux (Frankreich)

Dr. M. O. Steinmetz  
Biomolecular Research, Structural Biology,  
Paul Scherrer Institut, 5232 Villigen (Schweiz)

[\*\*] Wir danken Dr. J. Greenwald, Dr. H. Van Melckebeke, Dr. A. Lange und Dr. M. Ernst für wertvolle Diskussionen. Diese Arbeit wurde vom Schweizerischen Nationalfonds gefördert.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200806100> zu finden.



**Abbildung 1.** a) HET-s(218–289)-IBs aus *E. coli* in einem Kryo-Elektronenmikroskopiebild einer ganzen *E.-coli*-Zelle. b) Negativ gefärbte, gereinigte HET-s(218–289)-IBs, aufgenommen mit einem Transmissions-elektronenmikroskop. Balkenlänge: a) 50 nm, b) 200 nm.

(humane NDP-Kinase) enthielten, kein Auftreten der Prionform [Het-s] auslösten (Tabelle 1), nahmen Stämme, die mit HET-s(218–289)-IBs transfiziert wurden, die Form

**Tabelle 1:** Untersuchungen zur Prioneninfektiosität der HET-s(218–289)-IBs aus *E. coli*.<sup>[a]</sup>

Protein	Menge an transfiziertem Protein [pmol]					
	2000	1000	500	200	100	50
unlösliches <i>E. coli</i> -Extrakt eines <i>E. coli</i> -Stamms mit leerem Vektor	3/138 <sup>[b]</sup>					
NDP-Kinase-IBs	n.d.	n.d.	5/84	n.d.	n.d.	n.d.
HET-s(218–289)-Fibrillen	n.d.	17/24	44/60	31/72	7/24	5/24
HET-s(218–289)-IBs	n.d.	23/24	58/60	34/72	15/24	13/24
HET-s(218–289)-IBs (NMR-Probe, gereinigte IBs)	24/24	n.d.	45/48	n.d.	n.d.	n.d.

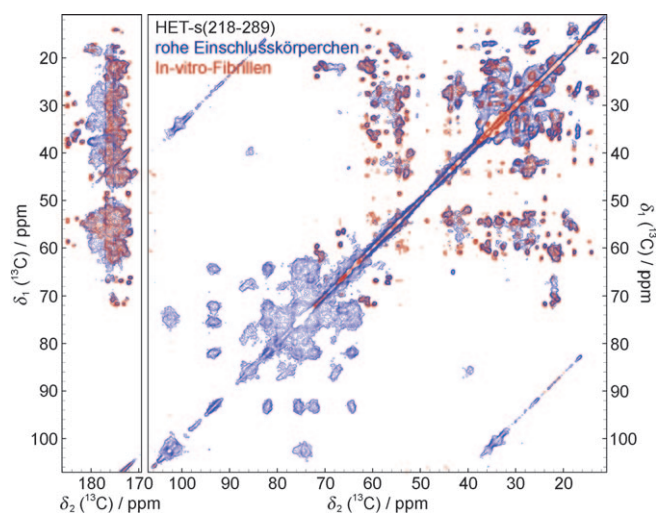
[a] Es ist jeweils die Zahl der prioneninfizierten Stämme durch die Zahl der insgesamt getesteten Stämme angegeben; n.d.: nicht bestimmt.

[b] Die Menge an unlöslichem *E. coli*-Extrakt wurde aus der Menge an Zellen gewonnen, die etwa 0.5 nmol HET-s(218–289)-IBs ergeben.

[Het-s] an, und das in einem vergleichbaren oder höheren Maße als bei der Infektion mit In-vitro-HET-s(218–289)-Amyloiden. Aus diesen Resultaten schließen wir, dass die HET-s(218–289)-IBs [Het-s]-Prioneninfektiosität aufweisen, was darauf schließen lässt, dass sich das Protein in *E. coli*-IBs in eine infektiöse Form faltet.

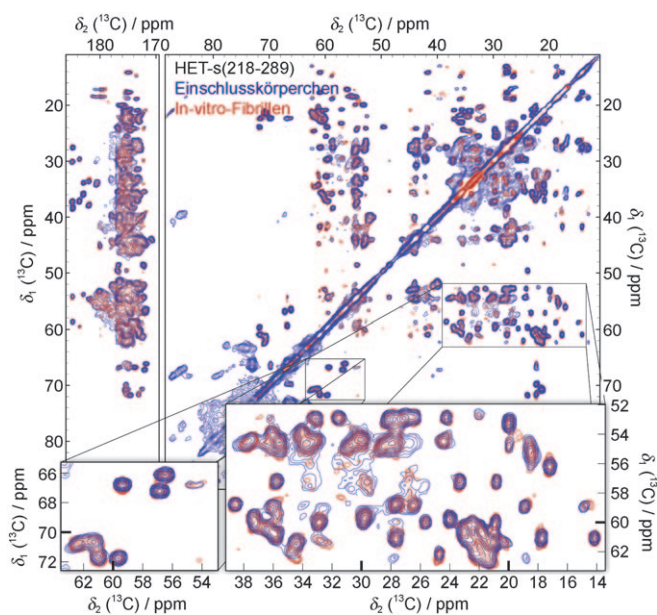
Zum Vergleich der Eigenschaften von Het-s-IBs und -Amyloidfibrillen wurden zusätzliche Experimente durchgeführt. Dabei wurde gefunden, dass ein 8 kDa schwerer Proteinase-K-resistenter Kern, der für HET-s(1–289) (Volllänge-HET-s) und HET-s(157–289) bereits bekannt ist, auch für die IBs dieser Proteine existiert.<sup>[9,17]</sup> Außerdem verhalten sich die HET-s(218–289)-IBs und -Amyloide bei chemischer Denaturierung ähnlich: Beide sind im neutralen pH-Bereich, jedoch nicht bei pH 2 resistent gegen Denaturierung durch Harnstoff (Abbildung S2B, Hintergrundinformationen). Des Weiteren machten wir die Beobachtung, dass HET-s(218–289)-IBs, ähnlich wie die entsprechenden Amyloide,<sup>[12]</sup> als Keime für eine In-vitro-HET-s(218–289)-Fibrillenbildung wirken (Abbildung S3, Hintergrundinformationen). Weiterhin ist bemerkenswert, dass durch Mutationen in der Region 218–289, die die Bildung der amyloiden Prionform verhindern,<sup>[10,18]</sup> auch das Entstehen von IBs in *E. coli* unterbunden wird (Tabelle S1, Hintergrundinformationen). Diese Resultate untermauern die Ähnlichkeit der HET-s(218–289)-IBs und der HET-s(218–289)-Amyloidfibrillen.

Zur Charakterisierung der HET-s(218–289)-IBs auf molekularer Ebene wurden Festkörper-NMR-Spektren aufgenommen und mit den bereits zugeordneten Spektren der In-vitro-Amyloidfibrillen<sup>[19]</sup> bekannter Struktur<sup>[11]</sup> verglichen. So genannte rohe IBs, die der lediglich in Wasser gewaschenen, unlöslichen Fraktion der lysierten Bakterienzellen entsprechen, ergeben das <sup>13</sup>C-<sup>13</sup>C-protonengetriebene Spindiffusionsspektrum (PDSD)<sup>[20,21]</sup> in Abbildung 2 (blaue Konturlinien), in dem alle Kreuzsignale, die für In-vitro-HET-s(218–289)-Fibrillen auftreten (rote Konturlinien), ebenfalls sicht-



**Abbildung 2.** <sup>13</sup>C-<sup>13</sup>C-Festkörper-NMR-Korrelationsspektrum (PDSD mit einer 50-ms-Mischzeit) von rohen HET-s(218–289)-IBs (blau) im Vergleich mit einem Spektrum des reinen, in vitro fibrillierten HET-s(218–289) (rot), aufgenommen mit identischen experimentellen Parametern. Alle in den Fibrillen zugeordneten Signale erscheinen auch im Spektrum der IBs. Beide Spektren wurden bei einer <sup>1</sup>H-Frequenz von 600 MHz (statisches Magnetfeld  $B_0 = 14.9$  T), 10 kHz MAS (MAS: Rotation im magischen Winkel) und ca. 3 °C aufgenommen; sie werden einzeln in Abbildung S4 (Hintergrundinformationen) gezeigt.

bar sind. Die beiden Spektren werden in Abbildung S5 (Hintergrundinformationen) getrennt gezeigt. In verschiedenen Bereichen des IB-Spektrums gibt es zusätzliche Signale, die nicht zu HET-s(218–289) gehören, sich aber vermutlich Phospholipiden der *E. coli*-Membran [bei ca. 34 (CH<sub>2</sub>-Gruppen der hydrophoben Enden), 60 und 100 ppm], anderen Proteinen und eventuell Ribonucleinsäuren zuordnen lassen. Die zahlreichen Carbonylkohlenstoffsignale mit chemischen Verschiebungen zwischen 180 und 176 ppm (einem Bereich, in dem sich nur wenige HET-s(218–289)-Signale befinden) sprechen für das Vorhandensein von Proteinen, höchstwahrscheinlich Membranproteinen mit vorrangig  $\alpha$ -helicaler Sekundärstruktur.<sup>[22]</sup> Die typischen HET-s(218–289)-Kreuzsignale sind schon nach sehr kurzen Expressionszeiten von 1 h sichtbar (Abbildung S7, Hintergrundinformationen). Nach einem weiteren Reinigungsschritt (Hintergrundinformationen) sind, wie aus Abbildung 3 ersichtlich, weiterhin alle HET-s(218–289)-Signale im PDSD-Spektrum sichtbar, während die Intensität der zusätzlichen Signale signifikant abnimmt. Besonders die  $\alpha$ -helicalen Proteine werden durch die zusätzliche Reinigung augenscheinlich fast vollständig aus der Probe entfernt (siehe Carbonylkohlenstoffatombereich). Da die chemischen Verschiebungen eines Polypeptids stark von seiner Konformation abhängen, sind die identischen Verschiebungen für HET-s(218–289) in IBs und In-vitro-Fibrillen ein sehr klarer Beleg dafür, dass diese auf molekularer Ebene praktisch identische Strukturen aufweisen. Zusätzlich ergab die Analyse isolierter Peaks in den 2D-NMR-Spektren (Abbildung 3 und Abbildung S6, Hintergrundinformationen), dass auch die spektralen Linienbreiten der beiden Proben ununterscheidbar sind, was auf eine hoch geordnete lokale IB-Struktur schließen lässt.<sup>[19]</sup> Es gibt des weiteren keinerlei Hinweise auf das Auftreten von moleku-



**Abbildung 3.**  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$ -Festkörper-NMR-Korrelationsspektrum (PDSD mit einer 50-ms-Mischzeit) von gereinigten HET-s(218–289)-IBs (blau) im Vergleich mit einem Spektrum des reinen, in vitro fibrillierten HET-s(218–289) (rot), aufgenommen mit identischen experimentellen Parametern. Alle in den Fibrillen zugeordneten Signale erscheinen auch im Spektrum der IBs. Die Einschübe zeigen, dass keine signifikanten Veränderungen der chemischen Verschiebungen auftreten und dass die Linienbreiten ähnlich sind. Beide Spektren wurden bei einer  $^1\text{H}$ -Frequenz von 600 MHz (statisches Magnetfeld  $B_0 = 14.9\text{ T}$ ), 10 kHz MAS und ca.  $3^\circ\text{C}$  aufgenommen und werden einzeln in Abbildung S4 (Hintergrundinformationen) gezeigt. Abbildung S5 (Hintergrundinformationen) enthält eindimensionale Schnitte der Spektren.

larer Polymorphie. Die gereinigte NMR-Probe zeigte Prioninfektiosität in den Transfektionsuntersuchungen (Tabelle 1).

Zusätzlich zur Festkörper-NMR-Spektroskopie wurde ein H/D-Austauschexperiment durchgeführt, das in ähnlicher Form bereits zur Untersuchung der HET-s(218–289)-Amyloidfibrillen genutzt worden war.<sup>[10,23]</sup> Das resultierende H/D-Austauschmuster der gereinigten IBs ist jenem der In-vitro-HET-s(218–289)-Fibrillen sehr ähnlich (Abbildung S8, Hintergrundinformationen), was bestätigt, dass diese beiden Aggregate auf molekularer Ebene praktisch identisch sind.

Unsere Befunde zeigen, dass sich das hoch geordnete HET-s(218–289)-Amyloid auch im konzentrierten Milieu einer *E.-coli*-Zelle, in Gegenwart von Faltungsmodulatoren, Chaperonen und großen Mengen anderer Proteine, bilden kann. Die Tatsache, dass sich die bis jetzt nur in vitro bestimmte Struktur auch in einer lebenden Zelle bilden kann, ist besonders im Rahmen der Strukturbilogie von Prionen von Bedeutung. Außerdem zeigt dieser Befund, dass Einschlusskörperchen hoch geordnet sein können, auch wenn ihr Erscheinungsbild in elektronenmikroskopischen Aufnahmen meist eher amorph ist. Die Festkörper-NMR-Spektren belegen, dass HET-s(218–289) in IBs die praktisch identische Struktur wie in In-vitro-Fibrillen hat – d.h., die IBs sind Amyloide, was auch durch sorgfältige Auswertung der Elektronenmikroskopiebilder bestätigt werden konnte, in denen die fibrilläre Struktur der IBs sichtbar wird. Es bleibt aller-

dings noch zu klären, ob HET-s(218–289) eine Ausnahme ist oder ob auch die IBs anderer Proteine eine geordnete und funktionelle Amyloidstruktur aufweisen. Für HET-s jedoch ist klar, dass die Bildung von Amyloiden und IBs bemerkenswert ähnlich ablaufen kann und dass auch die IBs infektiös und auf molekularer Ebene hoch geordnet sind. Für IBs des Alzheimer-Peptids A $\beta$ (1–42)<sup>[6]</sup> und einiger anderer Proteine<sup>[7]</sup> gibt es ebenfalls bereits Anzeichen amyloiden Verhaltens, und unsere detaillierte Untersuchung auf atomarer Ebene für HET-s stützt die Hypothese, dass die Amyloidbildung ein universeller Vorgang in lebenden Organismen ist und bei der biotechnologischen Herstellung von Proteinen in Betracht gezogen werden muss.

Eingegangen am 15. Dezember 2008,  
veränderte Fassung am 5. März 2009  
Online veröffentlicht am 26. Mai 2009

**Stichwörter:** Einschlusskörperchen · Strukturaufklärung · Proteine · Amyloide · NMR-Spektroskopie

- [1] F. Baneyx, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1999**, *10*, 411.
- [2] F. Baneyx, M. Mujacic, *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 1399.
- [3] G. Georgiou, P. Valax, *Methods Enzymol.* **1999**, *309*, 48.
- [4] M. Carrió, N. González-Montalbán, A. Vera, A. Villaverde, S. Ventura, *J. Mol. Biol.* **2005**, *347*, 1025.
- [5] S. Ventura, A. Villaverde, *Trends Biotechnol.* **2006**, *24*, 179.
- [6] M. Morell, R. Bravo, A. Espargaro, X. Sisquella, F. Aviles, X. Fernandezbusquets, S. Ventura, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **2008**, *11*, 1815.
- [7] L. Wang, S. K. Maji, M. R. Sawaya, D. Eisenberg, R. Riek, *Plos Biol.* **2008**, *6*, e195.
- [8] V. Coustou, C. Deleu, S. J. Saupe, J. Begueret, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 9773.
- [9] A. Balguerie, S. Dos Reis, C. Ritter, S. Chaignepain, B. Coulary-Salin, V. Forge, K. Bathany, I. Lascu, J. Schmitter, R. Riek, S. J. Saupe, *EMBO J.* **2003**, *22*, 2071.
- [10] C. Ritter, M. L. Maddelein, A. B. Siemer, T. Luhrs, M. Ernst, B. H. Meier, S. J. Saupe, R. Riek, *Nature* **2005**, *435*, 844.
- [11] C. Wasmer, A. Lange, H. van Melckebeke, A. B. Siemer, R. Riek, B. H. Meier, *Science* **2008**, *319*, 1523.
- [12] R. Sabaté, U. Baxa, L. Benkemoun, N. Sanchez de Groot, B. Coulary-Salin, M. Maddelein, L. Malato, S. Ventura, A. C. Steven, S. J. Saupe, *J. Mol. Biol.* **2007**, *370*, 768.
- [13] M. L. Maddelein, *Med. Sci.* **2002**, *18*, 1187.
- [14] C. Wasmer, A. Soragni, R. Sabate, A. Lange, R. Riek, B. H. Meier, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 5923; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 5839.
- [15] M. L. Maddelein, S. Dos Reis, S. Duvezin-Caubet, B. Coulary-Salin, S. J. Saupe, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 7402.
- [16] L. Benkemoun, R. Sabate, L. Malato, S. Dos Reis, H. Dalstra, S. J. Saupe, M. Maddelein, *Methods* **2006**, *39*, 61.
- [17] A. Balguerie, S. Dos Reis, B. Coulary-Salin, S. Chaignepain, M. Sabourin, J. M. Schmitter, S. J. Saupe, *J. Cell Sci.* **2004**, *117*, 2599.
- [18] M.-L. Maddelein, *Prion* **2007**, *1*, 44.
- [19] A. B. Siemer, C. Ritter, M. Ernst, R. Riek, B. H. Meier, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 2494; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2441.
- [20] N. M. Szeverenyi, M. J. Sullivan, G. E. Maciel, *J. Magn. Reson.* **1982**, *47*, 462.
- [21] A. Grommek, B. H. Meier, M. Ernst, *Chem. Phys. Lett.* **2006**, *427*, 404.
- [22] Y. Wang, O. Jardetzky, *Protein Sci.* **2002**, *11*, 852.
- [23] M. Hoshino, H. Katou, Y. Hagihara, K. Hasegawa, H. Naiki, Y. Goto, *Nat. Struct. Biol.* **2002**, *9*, 332.