

# Vorhersage der Rotationskorrelationszeit in dynamischen Mehrdomänenproteinen und supramolekularen Komplexen\*\*

Nasrollah Rezaei-Ghaleh,\* Frederik Klama, Francesca Munari und Markus Zweckstetter\*

Proteinbewegung spielt in grundlegenden zellulären Prozessen, wie Signalübertragung, molekularer Erkennung, Zellzykluskontrolle, Replikation und Transkription, eine wichtige Rolle.<sup>[1]</sup> Vor allem in höheren Lebensformen enthalten viele Proteine lange, flexible Enden und ungeordnete Verbindungsstücke zwischen gefalteten Domänen.<sup>[2]</sup> Die Beweglichkeit zwischen den Domänen ist wichtig für die Wechselwirkung mit verschiedenen Partnern, da sie eine Anpassung des relativen Abstands und der Orientierung, die für die Bindung nötig sind, ermöglicht.<sup>[3]</sup> Außerdem induzieren posttranskriptionale Modifikationen, Ligandenbindung, Protein-Protein- und Protein-Nukleinsäure-Interaktionen Übergänge der flexiblen Regionen in geordnete Zustände, wodurch Proteine zwischen verschiedenen funktionalen Modi umgeschaltet werden können.<sup>[3,4]</sup> Kontakte zwischen Domänen und das Ordnen von ungeordneten Verbindungsstücken induzieren eine Korrelation der Drehbewegungen der Proteindomänen und verändern die Diffusionseigenschaften, vor allem die Rotationskorrelationszeit ( $\tau_c$ ). Daher kann die Messung der Rotationskorrelationszeit mithilfe von NMR-Spinrelaxation, elektrischer Doppelbrechung, Fluoreszenzdepolarisation und dielektrischer Relaxation Einblicke in die Funktion von Biomolekülen geben.<sup>[5]</sup> Darüber hinaus wurden mehrere NMR-spektroskopische Methoden zur Darstellung der strukturellen Heterogenität flexibler Mehrdomänenproteine entwickelt.<sup>[6]</sup>

Eine Interpretation der in Experimenten beobachteten Rotationskorrelationszeiten – in Bezug auf Proteininteraktionen und Übergänge von ungeordneten in geordnete Zustände – hängt von der Fähigkeit ab,  $\tau_c$  anhand von bekannten dreidimensionalen Strukturen vorherzusagen. Im Falle von starren Molekülen kann  $\tau_c$  mithilfe von Kugel- und Randelement-hydrodynamischen Modellen berechnet werden.<sup>[7]</sup> Zusätzlich kann die Gegenwart von kurzen ungeordneten

Segmenten mithilfe von Ensemblemethoden berücksichtigt werden.<sup>[7]</sup> Anders als bei starren Molekülen sind bei flexiblen Mehrdomänenproteinen und Komplexen die Rotationsbeweglichkeit, die Interdomänenmobilität und die lokale Dynamik gekoppelt.<sup>[8]</sup> In diesen Fällen kann Interdomänenodynamik zu drastischen Änderungen in der Form des Biomoleküls und damit auch seiner Rotationsbewegung führen. Wenn zusätzlich die globalen und die Interdomänenbewegungen auf vergleichbaren Zeitskalen ablaufen, tritt eine hydrodynamische Kopplung auf, und das Proteindiffusionsmodell wird zeitabhängig.<sup>[8b]</sup> Da das erweiterte modellfreie Verfahren auf der Annahme basiert, dass die schnellen und langsamen Bewegungen voneinander und von der gesamten Rotationsbewegung entkoppelt sind,<sup>[9]</sup> ist es in diesen Fällen nicht mehr anwendbar. Ferner kann die relative Bewegung von Domänen nur dann als Sprünge zwischen zwei verschiedenen Konformationszuständen behandelt werden,<sup>[8a]</sup> wenn der Diffusionstensor der beiden Zustände sehr ähnlich und die Kopplung zwischen der Gesamt- und Interdomänenbewegung gering sind. Zudem gilt zu bedenken, dass die Bewegung von starren Domänen, die durch ein flexibles Verbindungsglied verbunden werden, äußerst komplex ist. Daher haben Parameter, deren Orientierungskorrelationsfunktion als eine Summe von Exponentialfunktionen beschrieben wird, nicht dieselbe physikalische Interpretation wie im modellfreien Verfahren.<sup>[8b]</sup>

Hier beschreiben wir eine Methode mit dem Namen HYCUD (HYdrodynamic CoUpling of Domains), welche die Berechnung der Rotationskorrelationszeit von beweglichen, modularen Biomolekülen ermöglicht. Wir haben das neue Verfahren auf das homodimere Heterochromatin Protein 1 (HP1), auf die aus zwei und drei Domänen bestehenden Konstrukte des Morbus Wilson Proteins (ATP7B) und verschiedene Zwei-Domänen-GB1-Varianten angewendet. Unsere Untersuchungen zeigen, dass HYCUD die Rotationskorrelationszeit von komplexen Mehrdomänenproteinen mit hoher Genauigkeit berechnen kann. Ein Vergleich der Korrelationszeiten, die von HYCUD für den 300-kDa-HP1-Nukleosom-Komplex vorhergesagt werden, mit experimentellen Werten belegt ferner, dass HYCUD auch auf große und dynamische Komplexe anwendbar ist.

Das HYCUD-Verfahren beginnt mit der Konstruktion eines Strukturenensembles für das zu untersuchende System (Abbildung S1 der Hintergrundinformationen (SI)). Hierzu wird ein Modell des Proteins/Proteinkomplexes anhand bekannter hochauflöster Strukturen der einzelnen Domänen sowie beliebiger Konformere für die flexiblen Segmente generiert. Anschließend wird mit dem Flexible-Meccano-Verfahren, das in der Ensemble-Optimierungsmethode implementiert ist,<sup>[10]</sup> ein großes Strukturenensemble (bis zu 5000

[\*] Dr. N. Rezaei-Ghaleh, Dr. F. Munari, Prof. Dr. M. Zweckstetter  
Deutsches Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen (DZNE)  
Am Faßberg 11, 37077 Göttingen (Deutschland)  
Dr. N. Rezaei-Ghaleh, F. Klama, Dr. F. Munari,  
Prof. Dr. M. Zweckstetter  
Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie  
Am Faßberg 11, 37077 Göttingen (Deutschland)  
E-Mail: nare@nmr.mpibpc.mpg.de  
markus.zweckstetter@dzne.de

[\*\*] Diese Studie wurde durch den SFB860 (Projekt B2; M.Z.) und die DFG-Forschergruppe FOR934 (M.Z.) unterstützt.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag (weitere Informationen zur Probenherstellung, den NMR-spektroskopischen Experimenten, der Erzeugung der Strukturenensembles und den HYCUD-Rechnungen) sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201305094> zu finden.

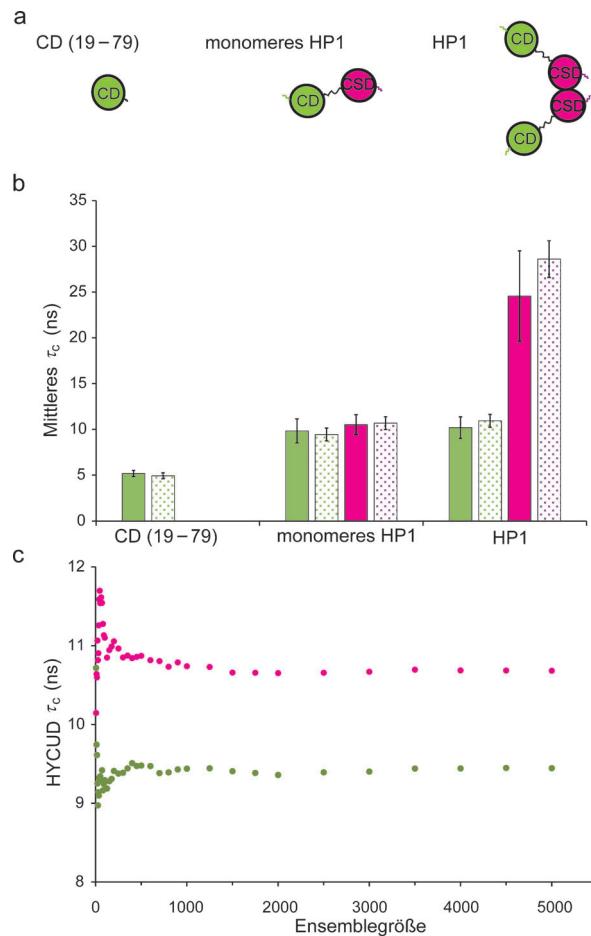
Strukturen) unter Ausschluss von Kollisionen erzeugt. Gefaltete Domänen werden hierbei als starre Körper behandelt, während das  $\text{Ca}$ -Rückgrat flexibler Segmente auf Basis einer empirischen Datenbank von Torsionswinkeln<sup>[11]</sup> generiert wird. Die Grenzen zwischen gefalteten und ungeordneten Teilen werden anhand von experimentellen Daten, z.B. NMR-Relaxationsdaten, definiert. Alternativ können für die Definition von Domänenengrenzen auch Algorithmen zur Vorhersage von Proteinunordnung genutzt werden.<sup>[12]</sup> Anschließend werden Rückgrat- und Seitenkettenkonformationen anhand der  $\text{Ca}$ -Koordinaten mithilfe von REMO<sup>[13]</sup> gebaut. Zudem werden die Rotationskorrelationszeit  $\tau_{\text{c}0}$  und die intrinsische Viskosität  $[\eta]$  mithilfe eines in HYDROPRO10<sup>[14]</sup> implementierten atomaren Schalenmodells berechnet. Dazu werden alle Proteinatome mit Ausnahme der Wasserstoffatome durch Kugeln mit demselben effektiven Atomradius (AER) ersetzt. Bei den hier beschriebenen HYCUD-Rechnungen wurde der Parameter AER der globulären Domänen auf einen Wert gesetzt, der die beste Übereinstimmung mit den experimentell bestimmten  $\tau_{\text{c}}$ -Werten der isolierten Domänen ergab. Für ungeordnete Verbindungsstücke und Endstücke wurde ein AER von 3.0 Å verwendet. Ungeordnete Segmente, die länger als 14 Reste waren, wurden zudem in nicht überlappende Fragmente von etwa 14 Resten aufgeteilt, entsprechend der doppelten Persistenzlänge von ungeordneten Polypeptidketten.<sup>[15]</sup> Nach dieser Prozedur sind Rotationskorrelationszeiten und intrinsische Viskositätswerte für jede Domäne und jedes ungeordnete Segment des Strukturensembles des Proteins verfügbar.

Der Schlüsselschritt der HYCUD-Methode ist die Berechnung eines Skalierungsfaktors, der die „relative Viskosität“, die jede Domäne oder jedes ungeordnete Segment *i* des Proteins erfährt, beschreibt. Dafür wird die effektive Konzentration der Domäne/des Segments *j* in der Nachbarschaft der Domäne *i* anhand des Abstands  $r_{ij}$  zwischen den Massenschwerpunkten der beiden Domänen/Segmente berechnet: Die effektive Konzentration der Domäne *j* wird als diejenige Konzentration definiert, bei welcher der erwartete Wert, die Domäne *j* in der Distanz  $r_{ij}$  zu finden, 1.0 beträgt (siehe SI). Die effektive relative Viskosität  $(\eta/\eta_0)$  wird dann durch eine Näherung erster Ordnung erhalten [Gl. 1]. Die Rotationskorrelationszeit  $\tau_{\text{c}}$  der Domäne *i*,  $\tau_{\text{ci}}$ , wird schließlich gemäß Gleichung (2) berechnet. Zum Schluss wird der  $\tau_{\text{ci}}$ -Wert einer Domäne innerhalb des Proteins/Proteinkomplexes berechnet, indem der Durchschnitt über alle Werte des Strukturensembles genommen wird.

$$\frac{\eta_i}{\eta_0} = 1 + \sum_{j \neq i} [\eta_j] c_j \quad (1)$$

$$\frac{\tau_{\text{ci}}}{\tau_{\text{coi}}} = \frac{\eta_i}{\eta_0} \quad (2)$$

HP1 ist ein wichtiger Regulator der Chromatinstruktur und besteht aus zwei globulären Domänen, der Chromodomäne (CD) und der Chromoschattendomäne (CSD). Die beiden Domänen werden durch eine aus 37 Resten bestehende Sequenz verbunden. Zusätzlich finden sich in HP1 zwei flexible Enden (Abbildung 1a und S2 (SI)).<sup>[16]</sup> Die CSD ist



**Abbildung 1.** Berechnung der Rotationskorrelationszeit in flexiblen Mehrdomänenproteinen mithilfe von HYCUD. a) Cartoon der HP1-Varianten, welche die Chromo- (CD) und Chromoschattendomänen (CSD) enthalten. b) Effektive Rotationskorrelationszeit ( $\tau_{\text{c}}$ ) von CD (grün) und CSD (magenta) in drei Zuständen: CD(19–79), monomeres HP1 und natives HP1-Dimer. Experimentelle  $\tau_{\text{c}}$ -Werte sind als gefüllte und von HYCUD berechnete Werte als gepunktete Balken dargestellt. c) Einfluss der Ensemblegröße auf die von HYCUD berechneten  $\tau_{\text{c}}$ -Werte für CD (grün) und CSD (magenta) in monomerem HP1.

für die Dimerisierung von HP1 verantwortlich.<sup>[17]</sup> Wir haben vor kurzem mithilfe der NMR-Spektroskopie gezeigt, dass keine stabilen Domäne-Domäne- oder Domäne-Verbindungsstück-Kontakte auftreten und dass Bereiche außerhalb der CD und CSD ungeordnet sind.<sup>[18]</sup> Um den Einfluss verschiedener modularer HP1-Anordnungen auf die Rotationskorrelationszeit der CD-Domäne zu untersuchen, verglichen wir experimentelle  $\tau_{\text{c}}$ -Werte der CD in verschiedenen Varianten: die CD im gesamten HP1,<sup>[18]</sup> die isolierte CD-Domäne mit einem kurzem Endstück (Reste 19–79) und die monomere HP1-Variante hHP1 $\beta$ I161A (Abbildung 1a).<sup>[17b, 19]</sup> Bei 25 °C war der durchschnittliche  $\tau_{\text{c}}$ -Wert von CD(19–79) ( $5.2 \pm 0.3$ ) ns. Dieser Wert stieg auf ( $9.8 \pm 1.3$ ) ns in monomerem HP1, und ein ähnlicher  $\tau_{\text{c}}$ -Wert wurde auch für die CD in nativem, also dimerem HP1 ( $\tau_{\text{c}} = (10.2 \pm 1.2)$  ns) gemessen.<sup>[18]</sup> Entsprechende Werte für die CSD-Domäne waren ( $10.5 \pm 1.1$ ) ns für monomeres (Abbildung S3 (SI)) und ( $24.6 \pm 5.0$ ) ns für dimeres HP1.<sup>[18]</sup> Die Ähnlichkeit der  $\tau_{\text{c}}$ -Werte der

CD-Domäne in monomerem und dimerem HP1 lässt darauf schließen, dass der Anstieg des  $\tau_c$ -Werts der CD-Domäne vorwiegend durch das N-terminale Endstück und die CD-CSD-Verbindungsregion hervorgerufen werden.

Die  $\tau_c$ -Werte der CD- und CSD-Domäne wurden nun mit HYCUD berechnet. Der berechnete  $\tau_c$ -Wert von CD(19–79) stimmte am besten mit dem experimentellen Wert überein, wenn ein AER von  $(3.3 \pm 0.2)$  Å gewählt wurde. Mit demselben AER, jedoch ohne das C-terminale Endstück, ergab sich ein um etwa 20 % reduzierter  $\tau_c$ -Wert von  $(4.1 \pm 0.3)$  ns. In monomerem HP1 berechnete HYCUD für die CD-Domäne  $\tau_c = (9.4 \pm 0.7)$  ns und für die CSD-Domäne  $\tau_c = (10.7 \pm 0.7)$  ns, in guter Übereinstimmung mit den experimentellen Werten (Abbildung 1b). Bei dimerem HP1 wurden  $\tau_c$ -Werte von  $(10.9 \pm 0.7)$  ns für die CD-Domäne und  $(28.6 \pm 2.0)$  ns für die CSD-Domäne berechnet. Demnach konnte HYCUD die nicht-triviale Ähnlichkeit der Rotationskorrelationszeit der CD-Domäne in monomerem und dimerem HP1 reproduzieren.

Wie hängen die HYCUD-Ergebnisse von Parametern wie Ensemblegröße, AER und Länge der ungeordneten Segmente ab? Abbildung 1c zeigt, dass die HYCUD-Rechnungen nach 500–1000 Konformeren konvergieren. Außerdem zeigte sich, dass die HYCUD-Rechnungen nur leicht variieren, wenn der AER im Bereich von 2.75 bis 3.25 Å liegt (Abbildung S4a (SI)). Dies war ein wichtiges Ergebnis, da es kaum experimentelle Grundlagen für die Wahl des AER für ungeordnete Polypeptide gibt, während es bei den globulären Proteindomänen möglich ist, den AER anhand von experimentell bestimmtem  $\tau_c$ -Werten zu wählen. Letztlich hat eine Variation der Fragmentgröße ungeordneter Segmente im Bereich von 6 bis 18 Resten kaum zu Veränderungen in den HYCUD-Vorhersagen geführt (Abbildung S4b (SI)). Zusammengefasst zeigen die Daten, dass die HYCUD-Methode sehr robust bezüglich der Wahl der flexiblen Parameter ist.

Das Morbus Wilson Protein (ATP7B) ist ein Membranprotein, das eine Schlüsselrolle bei der Kupferhomöostase spielt.<sup>[20]</sup> Die aus zwei Domänen (WLN56) und drei Domänen (WLN4–6) bestehenden Konstrukte dieses Proteins wurden mithilfe der NMR-Spektroskopie untersucht.<sup>[21]</sup> Im Falle von WLN4–6 ist Domäne 4 (bestehend aus 72 Resten) mit Domäne 5 (bestehend aus 72 Resten) durch eine 58 Reste lange, flexible Sequenz verbunden, und eine 8 Reste kurze Verbindung befindet sich zwischen den Domänen 5 und 6 (bestehend aus 69 Resten; Abbildung S5 (SI)).<sup>[21c]</sup> Eine NMR-spektroskopische Studie zeigte, dass die isolierte Domäne 6 bei 25 °C mit einem  $\tau_c$ -Wert von  $(4.5 \pm 0.3)$  ns taumelt, während sich das Zwei-Domänen-Konstrukt (WLN56: Domänen 5 und 6) in Lösung als ein hantelförmiges Molekül mit  $\tau_c = (9.1 \pm 0.6)$  ns bewegt.<sup>[21b]</sup> Im Unterschied dazu folgen die Domänen 4, 5 und 6 in WLN4–6 bei 35 °C Rotationsbewegungen mit Korrelationszeiten von  $(6.3 \pm 0.1)$ ,  $(9.7 \pm 0.1)$  und  $(8.2 \pm 0.1)$  ns.<sup>[21c]</sup> Der Unterschied im  $\tau_c$ -Wert der Domänen 5 und 6 lässt darauf schließen, dass das 8 Reste lange Verbindungsstück zwischen diesen beiden Domänen zumindest teilweise beweglich ist.<sup>[21c]</sup>

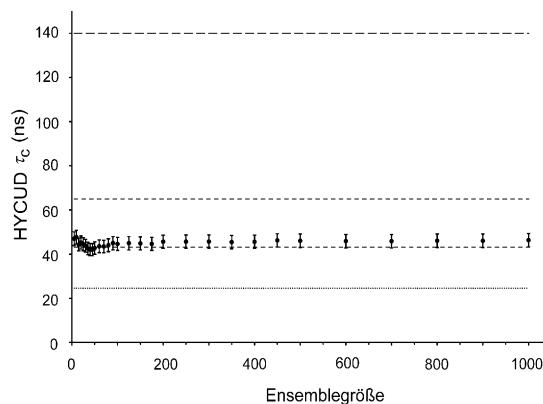
Wir haben HYCUD verwendet, um einen Einblick in das Rotationsverhalten der ATP7B-Domänen zu erhalten. Unter der Annahme, dass das 8 Reste lange Verbindungsstück

zwischen den Domänen 5 und 6 komplett flexibel ist, werden für WLN56  $\tau_c$ -Werte von  $(8.1 \pm 0.5)$  ns für Domäne 5 und  $(7.6 \pm 0.5)$  ns für Domäne 6 vorhergesagt (Abbildung S6 (SI)). Wenn hingegen das Verbindungsstück komplett rigide wäre, sodass sich die Domänen 5 und 6 zusammen wie ein starrer Körper bewegen würden (PDB-Code: 2EW9), wäre ein  $\tau_c$ -Wert von  $(10.9 \pm 0.7)$  ns zu erwarten. Der experimentell beobachtete  $\tau_c$ -Wert liegt zwischen diesen beiden Grenzen. Dies weist darauf hin, dass die Bewegung der zwei Domänen teilweise gekoppelt ist. In Übereinstimmung hierzu wurden  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -heteronukleare NOE-Werte größer null für das Verbindungsstück gemessen (NOE = Kern-Overhauser-Effekt).<sup>[21b]</sup> Wenn beide Interdomänen-Verbindungen als flexibel betrachtet werden, sagt HYCUD für das Drei-Domänen-Konstrukt WLN4–6 bei 35 °C  $\tau_c$ -Werte von  $(6.6 \pm 0.4)$ ,  $(8.9 \pm 0.6)$  und  $(7.0 \pm 0.5)$  ns für die Domänen 4–6 vorher (Abbildung S5 (SI)). Der vorhergesagte Wert für Domäne 4 stimmt sehr gut mit den experimentellen Daten überein, während die vorausgesagten Werte für die Domänen 5 und 6 etwas unterhalb der experimentellen Korrelationszeiten sind. Die Rechnungen wurden daher unter der Annahme, dass das Verbindungsstück zwischen den Domänen 5 und 6 starr ist, wiederholt. Die resultierenden  $\tau_c$ -Werte waren  $(6.7 \pm 0.4)$  ns für Domäne 4, was keine signifikante Änderung zur vorhergehenden Rechnung darstellt, und  $(13.8 \pm 0.9)$  ns für die kombinierten Domänen 5 und 6. Der letztgenannte Wert unterscheidet sich deutlich von den experimentellen Werten. Dies zeigt, dass das Verbindungsstück zwischen den Domänen 5 und 6 sehr flexibel sein muss. Eine teilweise Korrelation der Rotationsbewegung von globulären Domänen kann auch von kurzen Interdomänen-Verbindungsstücken kommen, wie im Beispieldfall GB1, in dem die Domänen durch 3 oder 6 Reste lange Sequenzen verbunden sind (siehe SI und Abbildung S7 (SI)).

Die Wechselwirkung zwischen HP1 und Nukleosomen, die an Lysin 9 in Histon 3 (H3K9me3) methyliert sind, ist für den Zusammenbau von Heterochromatin wichtig.<sup>[22]</sup> Wir konnten vor kurzem zeigen, dass die CD-Domäne von hHP1β, die an das H3-Ende im Kontext des Mononukleosom-Partikels gebunden ist, der einzige Ankerpunkt des hHP1β-H3K9me3-Nukleosom-Komplexes ist.<sup>[19]</sup> Trotz des fehlenden direkten Kontakts zwischen der dimeren CSD und dem Mononukleosom (Abbildung S8 (SI)) war jedoch die Rotationsbewegung der CSD-Domäne im hHP1β-H3K9me3-Nukleosom-Komplex deutlich reduziert.<sup>[19]</sup> Die gemessene Kreuzkorrelation zwischen der Anisotropie der  $^{15}\text{N}$ -chemischen Verschiebung und dem  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$ -Dipol-Dipol-Kopplungsrelaxationsmechanismus zeigt, dass der  $\tau_c$ -Wert der CSD im Komplex etwa 2.2-mal größer ist als in freiem HP1.<sup>[19]</sup> Der durchschnittliche  $\tau_c$ -Wert der CSD in freiem hHP1β beträgt  $(24.6 \pm 5.0)$  ns,<sup>[18]</sup> sodass der  $\tau_c$ -Wert im Komplex auf  $(54.1 \pm 10.9)$  ns geschätzt wird.

Um herauszufinden, ob die Erhöhung des  $\tau_c$ -Werts der CSD im hHP1β-Nukleosom-Komplex durch hydrodynamische Kopplung erklärt werden kann, führten wir HYCUD-Rechnungen für dieses System durch. Hierfür behandelten wir den Kern des Nukleosoms (Histonoktamer + DNA wie in 3LZ1.pdb),<sup>[23]</sup> zwei CDs mit modifizierten H3-Enden, die im Mononukleosom vorkommen (PDB-Code: 1GUW)<sup>[24]</sup> und

das CSD-Dimer (Ketten A und B von 2FMM.pdb)<sup>[25]</sup> als starre Körper. Die beiden Gelenkregionen zwischen CD und CSD wie auch die zwei H3-Enden (Reste 18–38) wurden mit beliebigen Konfigurationen modelliert (Abbildung S8 (SI)). Anhand von Fluoreszenzanisotropie-Zerfallsdaten wurde gezeigt, dass das Nukleosomkernpartikel mit  $\tau_c \approx 140$  ns (in H<sub>2</sub>O, 25 °C) taumelt.<sup>[26]</sup> Dieser Wert wurde genutzt, um den AER des Mononukleosoms zu kalibrieren. Der mit diesem AER berechnete Translationsdiffusionskoeffizient für das Nukleosom stimmt gut mit dem experimentellen Wert überein.<sup>[27]</sup> Für die CSD im hHP1β-Nukleosom-Komplex sagte HYCUD einen  $\tau_c$ -Wert von (46.3 ± 3.0) ns vorher (Abbildung 2).



**Abbildung 2.** Berechnung der Rotationskorrelationszeit der CSD im HP1-Nukleosom-Komplex als Funktion der Größe des Strukturenensembles. Gezeigt sind der experimentelle  $\tau_c$ -Wert der CSD in dimerem HP1<sup>[18]</sup> (gepunktete Linie), der durchschnittliche ( $\pm$  Standardabweichung)  $\tau_c$ -Wert der CSD in Nukleosom-gebundenem HP1<sup>[19]</sup> (kurze gestrichelte Linie) und der  $\tau_c$ -Wert für das Nukleosomkernstück, das mithilfe von Fluoreszenzanisotropie bei 25 °C in H<sub>2</sub>O<sup>[26]</sup> (lang gestrichelte Linie) gemessen wurde.

Interessanterweise wird in einem Alternativszenario, genannt „bridging model“, in dem eine CD von HP1 mit dem H3-Ende von einem Mononukleosom und die zweite CD mit einem anderen Mononukleosom bindet,<sup>[19,28]</sup> ein ähnlicher  $\tau_c$ -Wert von (50.9 ± 3.3) ns für die CSD vorhergesagt. Beide vorausgesagten Werte stimmen gut mit den experimentellen Daten überein, wenn man den großen experimentellen Fehler in der  $\tau_c$ -Bestimmung eines so großen Systems mithilfe von NMR-Spektroskopie berücksichtigt. Die Untersuchungen belegen, dass HYCUD die Rotationskorrelationszeit von Proteindomänen innerhalb hochmolekularer Komplexe vorhersagen kann.

In früheren Ansätzen zur Berechnung der Rotationskorrelationszeit von Proteinen mit ungeordneten Segmenten wurde die durch das ungeordnete Ensemble hervorgerufene Verwirbelung des Geschwindigkeitsfelds mithilfe eines exponentiellen Zerfalls auf Basis der Grenzelementmethode modelliert.<sup>[29]</sup> Der exponentielle Zerfall wird dabei durch drei Parameter beschrieben:  $\delta$ , der Abstand zum starren Oberflächenelement,  $\varepsilon$ , ein Modulator für die Zerfallsrate der Geschwindigkeitskorrelation, und  $\gamma$ , eine Abstandsgrenze,

welche die Oberfläche ausdehnt und mögliche Variationen in der Hydratation von starren und ungeordneten Teilen kompensiert. Die beiden Parameter  $\varepsilon$  und  $\gamma$  sind flexibel,  $\delta$  kann in einer von drei Arten definiert werden. Die Vorhersage der Korrelationszeiten in Proteinen mit kurzen, ungeordneten Segmenten ist recht robust bezüglich der Wahl der drei Parameter. Im Unterschied dazu zeigt die Vorhersage für Proteine mit längeren, ungeordneten Verbindungsstücken oder Enden eine starke Abhängigkeit von der Wahl der Parameter. Dies schränkt die Möglichkeit, diese Methoden zur Vorhersage von Rotationskorrelationszeiten zu verwenden, sehr stark ein. Die HYCUD-Methode hat dagegen nur einen flexiblen Parameter, den AER. Dieser kann anhand von experimentell gemessenen  $\tau_c$ -Werten der isolierten Domänen optimiert werden. Alternativ können auch Translationsdiffusionsdaten des gesamten Proteins für die Abschätzung des AER genutzt werden. In diesem Fall sollte die Dicke der Hydratationschicht für die  $\tau_c$ -Vorhersage gegenüber dem Wert, der zu den Translationsdiffusionsdaten passt, um ca. 1 Å reduziert werden.<sup>[30]</sup> Hinzu kommt, dass der Bereich der physikalisch möglichen AER-Werte nach oben begrenzt ist<sup>[30,31]</sup> und theoretische Abwägungen eine untere Grenze für die AER-abhängige, intrinsische Viskosität liefern.<sup>[31]</sup> Zusammengekommen führt dies dazu, dass HYCUD eine sehr robuste Methode ist, um Rotationskorrelationszeiten in flexiblen Mehrdomänenproteinen und biomolekularen Komplexen vorherzusagen (Abbildungen 1 und 2).

Die Funktion molekularer Maschinen wird von ihren Translations- und Rotationsbewegungen als Ganzes und den relativen Bewegungen der einzelnen Teile zueinander beeinflusst. Ein sehr modulares und dynamisches System ist der HP1-Nukleosom-Komplex (Abbildung S8 (SI)). Der Komplex besteht aus mehreren Domänen und flexiblen Segmenten: ein fester Nukleosomkern, flexible Histonenden, die Chromo- und Chromoschattendomänen von HP1, ein flexibles Verbindungsstück zwischen CD und CSD sowie flexible N- und C-terminale Enden von HP1. Zusätzlich dimerisiert die CSD, sodass jedes HP1-Molekül zwei Chromodomänen enthält. Im Brückenmodus des HP1-Nukleosom-Komplexes beträgt das Molekulargewicht des Komplexes mehr als 500 kDa. Der Erfolg von HYCUD beim Reproduzieren des Rotationsverhaltens der CSD im Kontext des HP1-Nukleosom-Komplexes ebnet den Weg für die Analyse funktioneller Bewegungen, Unordnungs-Ordnungs-Übergängen und Interaktionen in diesem und anderen hochmolekularen Komplexen.

Eingegangen am 13. Juni 2013

Online veröffentlicht am 2. September 2013

**Stichwörter:** Hydrodynamische Kopplung · NMR-Spektroskopie · Proteine · Proteinunordnung · Rotationsdiffusion

[1] P. Tompa, *Trends Biochem. Sci.* **2012**, *37*, 509–516.

[2] V. N. Uversky, *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1834*, 932–951.

[3] T. Mittag, L. E. Kay, J. D. Forman-Kay, *J. Mol. Recognit.* **2010**, *23*, 105–116.

- [4] H. J. Dyson, P. E. Wright, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2002**, *12*, 54–60.
- [5] a) A. Krushelnitsky, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2006**, *8*, 2117–2128; b) P. J. Hagerman, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1996**, *6*, 643–649; c) L. Stryer, *Science* **1968**, *162*, 526–533.
- [6] a) M. W. Fischer, J. A. Losonczi, J. L. Weaver, J. H. Prestegard, *Biochemistry* **1999**, *38*, 9013–9022; b) I. Bertini, A. Giachetti, C. Luchinat, G. Parigi, M. V. Petoukhov, R. Pierattelli, E. Ravera, D. I. Svergun, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 13553–13558; c) N. J. Anthis, M. Doucleff, G. M. Clore, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 18966–18974.
- [7] S. R. Aragon, *Methods* **2011**, *54*, 101–114.
- [8] a) Y. E. Ryabov, D. Fushman, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 3315–3327; b) B. Halle, *J. Chem. Phys.* **2009**, *131*, 224507.
- [9] a) J. L. Baber, A. Szabo, N. Tjandra, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 3953–3959; b) S. L. Chang, A. Szabo, N. Tjandra, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11379–11384.
- [10] P. Bernadó, E. Mylonas, M. V. Petoukhov, M. Blackledge, D. I. Svergun, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 5656–5664.
- [11] P. Bernado, L. Blanchard, P. Timmins, D. Marion, R. W. Ruigrok, M. Blackledge, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 17002–17007.
- [12] Z. Dosztányi, V. Csizmák, P. Tompa, I. Simon, *J. Mol. Biol.* **2005**, *347*, 827–839.
- [13] Y. Li, Y. Zhang, *Proteins* **2009**, *76*, 665–676.
- [14] A. Ortega, D. Amoros, J. Garcia de La Torre, *Biophys. J.* **2011**, *101*, 892–898.
- [15] H. Schwalbe, K. M. Fiebig, M. Buck, J. A. Jones, S. B. Grimshaw, A. Spencer, S. J. Glaser, L. J. Smith, C. M. Dobson, *Biochemistry* **1997**, *36*, 8977–8991.
- [16] G. Lomberk, L. Wallrath, R. Urrutia, *Genome Biol.* **2006**, *7*, 228.
- [17] a) A. L. Nielsen, M. Oulad-Abdelghani, J. A. Ortiz, E. Remboutsika, P. Chambon, R. Losson, *Mol. Cell* **2001**, *7*, 729–739; b) S. V. Brasher, B. O. Smith, R. H. Fogh, D. Nietlispach, A. Thiru, P. R. Nielsen, R. W. Broadhurst, L. J. Ball, N. V. Murzina, E. D. Laue, *EMBO J.* **2000**, *19*, 1587–1597.
- [18] F. Munari, N. Rezaei-Ghaleh, S. Xiang, W. Fischle, M. Zweckstetter, *PLoS One* **2013**, *8*, e60887.
- [19] F. Munari, S. Soeroes, H. M. Zenn, A. Schomburg, N. Kost, S. Schroder, R. Klingberg, N. Rezaei-Ghaleh, A. Stutzer, K. A. Gelato, P. J. Walla, S. Becker, D. Schwarzer, B. Zimmermann, W. Fischle, M. Zweckstetter, *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 33756–33765.
- [20] R. E. Tanzi, K. Petrukhin, I. Chernov, J. L. Pellequer, W. Wasco, B. Ross, D. M. Romano, E. Parano, L. Pavone, L. M. Brzustowicz, M. Devoto, J. Peppercorn, A. I. Bush, I. Sternlieb, M. Pirastu, J. F. Gusella, O. Evgrafov, G. K. Penchaszadeh, B. Honig, I. S. Edelman, M. B. Soares, I. H. Scheinberg, T. C. Gilham, *Nat. Genet.* **1993**, *5*, 344–350.
- [21] a) L. Banci, I. Bertini, F. Cantini, C. T. Chasapis, N. Hadjiliadis, A. Rosato, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 38259–38263; b) D. Achila, L. Banci, I. Bertini, J. Bunce, S. Ciofi-Baffoni, D. L. Huffman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 5729–5734; c) N. Fatemi, D. M. Korzhnev, A. Velyvis, B. Sarkar, J. D. Forman-Kay, *Biochemistry* **2010**, *49*, 8468–8477.
- [22] a) A. Ebert, S. Lein, G. Schotta, G. Reuter, *Chromosome Res.* **2006**, *14*, 377–392; b) W. Fischle, *Epigenomics* **2012**, *4*, 641–653.
- [23] D. Vasudevan, E. Y. Chua, C. A. Davey, *J. Mol. Biol.* **2010**, *403*, 1–10.
- [24] P. R. Nielsen, D. Nietlispach, H. R. Mott, J. Callaghan, A. Bannister, T. Kouzarides, A. G. Murzin, N. V. Murzina, E. D. Laue, *Nature* **2002**, *416*, 103–107.
- [25] Y. Huang, M. P. Myers, R. M. Xu, *Structure* **2006**, *14*, 703–712.
- [26] D. W. Brown, L. J. Libertini, E. W. Small, *Biochemistry* **1991**, *30*, 5293–5303.
- [27] S. Mangenot, S. Keller, J. Radler, *Biophys. J.* **2003**, *85*, 1817–1825.
- [28] A. J. Ruthenburg, H. Li, D. J. Patel, C. D. Allis, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8*, 983–994.
- [29] S. H. Bae, H. J. Dyson, P. E. Wright, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 6814–6821.
- [30] B. Halle, M. Davidovic, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 12135–12140.
- [31] J. Garcia De La Torre, M. L. Huertas, B. Carrasco, *Biophys. J.* **2000**, *78*, 719–730.