

Steuerung der α -Synuclein-Aggregation durch Bindung einer β -Haarnadel**

Ewa A. Mirecka, Hamed Shaykhalishahi, Aziz Gauhar, Serife Akgül, Justin Lecher, Dieter Willbold, Matthias Stoldt und Wolfgang Hoyer*

Abstract: Fehlfaltung, Aggregation und Amyloidfibrillenbildung des Proteins α -Synuclein (α -syn) sind an der Pathogenese der Parkinson-Krankheit und weiterer Synucleinopathien beteiligt. Die Entwicklung der Amyloid-Toxizität steht in Zusammenhang mit der Bildung partiell gefalteter Aggregationsintermediate. Hier beschreiben wir die Entwicklung einer Klasse gegen α -syn gerichteter Bindeproteine, die wir als β -Wrapine (β -Wrap-Proteine) bezeichnen. Die NMR-Struktur eines α -syn: β -Wrapin-Komplexes zeigt eine β -Haarnadel-Konformation von α -syn im Sequenzbereich α -syn(37–54). Substanzbiometrische Mengen des Bindeproteins inhibieren die α -syn-Aggregation und -Toxizität, das β -Wrapin greift folglich in die Bildung der Aggregationskeime ein.

Die Ablagerung spezifischer Peptide und Proteine in Amyloid-Fibrillen liegt einer Vielzahl neurodegenerativer Erkrankungen zugrunde. Monomere und oligomere Fehlfaltungsintermediate sind wichtige Komponenten des Aggregationsmechanismus.^[1] Die Stabilisierung partiell gefalteter Zustände amyloidogener Proteine könnte ein Ansatzpunkt für die Arzneimittelentwicklung sein.^[1d]

Das Protein α -Synuclein (α -syn) ist der hauptsächliche Bestandteil der intrazellulären neuronalen Ablagerungen, die Parkinson und weitere Synucleinopathien pathologisch kennzeichnen.^[2] Genetische Studien zeigen einen Zusammenhang zwischen krankheitsassoziierten Mutation oder Multiplikation des für α -syn codierenden Gens und verstärkter Aggregationsneigung und weisen somit auf eine Rolle der α -syn-Aggregation in der Pathogenese hin. Das α -syn-Protein zeichnet sich durch eine hohe konformative Fle-

xibilität aus. Freies monomeres α -syn ist intrinsisch ungeordnet, jedoch gehen einige Regionen des Proteins intramolekulare langreichweitige Wechselwirkungen ein.^[3] An synthetische oder biologische Membranen gebunden nimmt α -syn α -helikale Konformation an.^[4] In fibrillären Aggregaten bildet die zentrale Sequenzregion mehrere β -Stränge, die sich zu intermolekularen parallelen β -Faltblättern organisieren, während die N-terminalen und C-terminalen Regionen entfaltet bleiben.^[5] Im Unterschied zur parallelen Anordnung der β -Stränge in Fibrillen^[5b,6] wurde eine antiparallele β -Faltblatt-Struktur in Oligomeren nachgewiesen.^[7]

Um partiell gefaltetes α -syn zu stabilisieren, haben wir Bindeproteine hergestellt, die ZA β ₃, ein Bindeprotein für das β -Amyloid-Peptid (A β), als Grundgerüst nutzen. ZA β ₃ ist ein Disulfid-verbrücktes Homodimer, das von der Z-Domäne von Protein A abgeleitet wurde.^[8] Gemäß isothermer Titrationsskalorimetrie (ITC) bindet ZA β ₃ mit einer Dissoziationskonstanten von 20 nm an A β , zeigt aber keine Affinität für α -syn (Abbildung S1 (S für Hintergrundinformationen)). Um Affinität für α -syn zu generieren, wurde durch Zufallsmutationen des für ZA β ₃ codierenden Gens eine neue Phagen-Display-Bibliothek hergestellt. Aus dieser Bibliothek selektierte Bindeproteine bezeichnen wir als β -Wrapine (β -Wrap-Proteine). Für das β -Wrapin AS69 mit den vier Aminosäuresubsstitutionen G13D, V17F, I31F und L34V in beiden Untereinheiten wurde eine Bindung an α -syn mit einer Dissoziationskonstanten von 240 nm nachgewiesen (Abbildung S1). Die A β -Affinität von AS69 war 400-fach gegenüber der von ZA β ₃ verringert. ITC zeigte eine 1:1-Stöchiometrie der AS69: α -syn-Interaktion. ¹H,¹⁵N-HSQC-NMR-Spektroskopie bestätigte die Bindung von AS69 an α -syn. Freies [U-¹⁵N]- α -syn zeigte bei 30°C nur wenige, dem C-Terminus zuzuordnende Resonanzsignale, wohingegen Signale aus der N-terminalen und zentralen Region aufgrund mittleren Austauschs nicht detektiert wurden.^[9] Nach Zugabe von [NA]-AS69 erschienen jedoch mehrere, gut verteilte Resonanzsignale, die auf partielle Faltung des α -syn hinweisen (Abbildung 1a). Die neuen Signale wurden der Region α -syn(35–56) zugeordnet.

Zur Ermittlung der Konformation von α -syn(35–56) wurde die Vollängenstruktur von α -syn im Komplex mit β -Wrapin AS69 mithilfe hochauflösender NMR-Spektroskopie in Lösung bestimmt (Abbildung 1b,d, Tabellen S1 und S2). α -syn(35–56) bildet eine β -Haarnadel mit den β -Strängen ³⁷VLYVGSK⁴³ (β 1) und ⁴⁸VVHGVT⁵⁴ (β 2), die durch die β -Schleife ⁴⁴TKEG⁴⁷ verbunden sind (Abbildung 1b). Die aromatischen Aminosäuren Tyr-39 und His-50 befinden sich im Zentrum einer Seitenfläche der β -Haarnadel. Ihre Seitenketten sind über eine Wasserstoffbrücke zwischen dem Hydroxyproton von Tyr-39 und dem N⁸-Stickstoffatom von His-

[*] Dr. E. A. Mirecka,^[+] H. Shaykhalishahi,^[+] A. Gauhar, S. Akgül, Dr. J. Lecher, Prof. Dr. D. Willbold, Dr. M. Stoldt, Dr. W. Hoyer
Institut für Physikalische Biologie
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
40204 Düsseldorf (Deutschland)
E-Mail: Wolfgang.Hoyer@uni-duesseldorf.de
Dr. J. Lecher, Prof. Dr. D. Willbold, Dr. M. Stoldt, Dr. W. Hoyer
Strukturbiochemie (ICS-6), Forschungszentrum Jülich
52425 Jülich (Deutschland)

[†] Die Autoren trugen gleichermaßen zu dieser Arbeit bei.

[**] Wir danken Torleif Härd und Stephen F. Marino für Diskussionen. Diese Arbeit wurde vom Ministerium für Innovation, Wissenschaft und Forschung des Landes Nordrhein-Westfalen gefördert. Die Struktur des α -syn:AS69-Komplexes wurde in der Protein Data Bank als Eintrag 4BXL hinterlegt. Die chemischen Verschiebungen des α -syn:AS69-Komplexes wurden in der Biological Magnetic Resonance Bank als Eintrag 19353 hinterlegt.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201309001> zu finden.

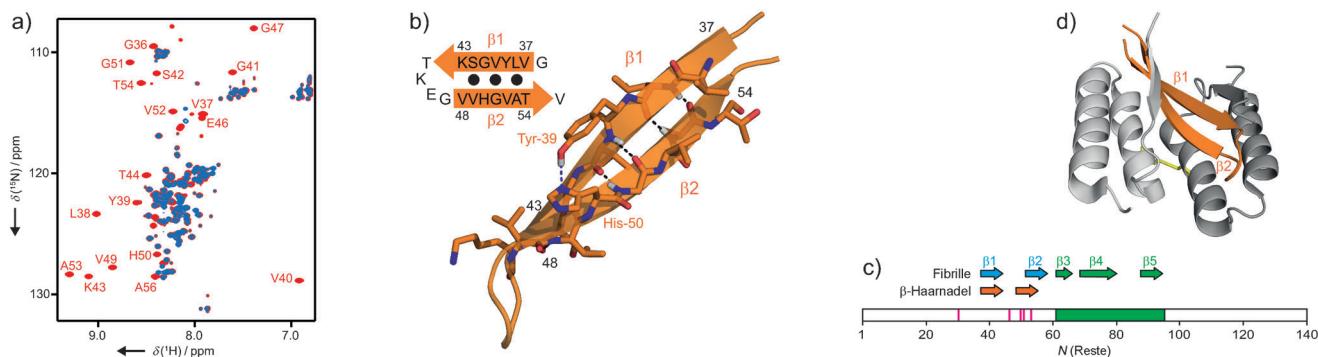


Abbildung 1. β-Haarnadel-Struktur von α-syn im Komplex mit β-Wrapin AS69. a) $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren von $[\text{U}^{15}\text{N}]\text{-}\alpha\text{-syn}$ bei 30°C vor Zugabe (blau) und nach Zugabe (rot) eines Überschusses von [NA]-AS69. Die Zuordnungen der nach Komplexbildung auftauchenden Resonanzsignale sind angegeben. b) Bändermodell der β-Haarnadel von α-syn (orange). Die Aminosäuren der β1- und β2-Stränge sind im Stabmodell dargestellt. Die Wasserstoffbrücke zwischen dem Hydroxyproton von Tyr-39 und dem N^{δ} -Stickstoffatom von His-50 ist als gestrichelte blaue Linie gezeigt. Die Aminosäuresequenz ist angegeben; schwarze Punkte entsprechen Wasserstoffbrücken zwischen den β-Strängen. c) Merkmale der α-syn-Primärstruktur. Die zentrale NAC-Region ist grün hervorgehoben, die Positionen der krankheitsassoziierten Mutationen magenta. Die ungefähren Positionen der β-Stränge in α-syn-Fibrillen, bestimmt mit EPR- und Festkörper-NMR-Spektroskopie,^[5] sind als blaue und grüne Pfeile angegeben. Die Positionen der β-Stränge in der β-Haarnadel sind als orangefarbene Pfeile angegeben. d) Bändermodell des α-syn:AS69-Komplexes. Die Aminosäuren 13–58 beider AS69-Untereinheiten sind hell- bzw. dunkelgrau dargestellt und mit AS69 bzw. AS69' bezeichnet. Die Disulfidbrücke ist gelb hervorgehoben. Die β-Haarnadel ist orange dargestellt.

50 verbunden (Abbildung 1). H^{η} von Tyr-39 und $\text{H}^{\varepsilon 2}$ von His-50 sind in den NMR-Spektren sichtbar und folglich gegen den Austausch mit dem Lösungsmittel abgeschirmt.

Die Lage der β-Stränge in der Aminosäuresequenz entspricht annähernd jener der β1- und β2-Stränge (bezeichnet wie bei Vilar et al.^[5d]) in fibrillärem α-syn (Abbildung 1c). Fernwechselwirkungen zwischen den Seitenketten von Tyr-39 in β1 und His-50 in β2 wurden zuvor auch in α-syn-Amyloidfibrillen nachgewiesen.^[5d] Die NAC-Region, die die β-Stränge β3–β5 der Amyloidfibrillen umfasst, einschließlich der α-syn-Sequenzabschnitte mit der größten Hydrophobie und der stärksten Neigung, eine β-Struktur zu bilden,^[10] ist durch die AS69-Bindung nicht beeinträchtigt (Abbildung S2). Dies verdeutlicht die Spezifität der Interaktion von AS69 mit der β1-β2-Region.

Kontakte zwischen β1 und β2 gehören nach Untersuchungen mit paramagnetischer Relaxationsverstärkung zu den häufigsten transienten Tertiärwechselwirkungen in monomerem α-syn.^[3c] Außerdem wurde in der β1-β2-Region von monomerem α-syn eine naszierende β-Struktur detektiert.^[1c] Diese Beobachtungen legen nahe, dass Strukturmerkmale der AS69-gebundenen β-Haarnadel auch in einer Teilmenge des Konformationsensembles von freiem α-syn gebildet sind. Dies ist in Einklang mit der Beobachtung, dass der Bindemechanismus intrinsisch ungeordneter Proteine gewöhnlich nicht einem reinen „induced fit“-Modell entspricht, sondern auch einen „conformational selection“-Anteil enthält.^[11]

Ein Vergleich der Struktur des α-syn:AS69-Komplexes mit jener des Aβ:ZAβ₃-Komplexes zeigte, dass die selektierten Mutationen den Aufbau des gebundenen β-Wrapin-Gerüsts nicht beeinflussten. AS69 ist ein Dimer aus zwei identischen Untereinheiten, die über eine Disulfidbrücke zwischen den Cys-28-Resten kovalent verknüpft sind. Die Falungstopologie von AS69 umfasst zwei β-Stränge und vier α-Helices, die gemeinsam einen großen, hydrophoben, tunnelförmigen Hohlraum bilden, in dem die β-Haarnadel des α-syn

eingeschlossen wird (Abbildung 1d). Die meisten der ausgetauschten Aminosäuren sind der β-Haarnadel direkt benachbart (Abbildung S3). Beispielsweise gehen die Phe-31-Reste beider AS69-Untereinheiten aromatische Wechselwirkungen mit Tyr-39 und His-50 von α-syn ein.

Die Fähigkeit von AS69, die α-syn-Aggregation zu inhibieren, wurde mit einem Thioflavin-T-Fluoreszenzassay überprüft. Ohne AS69-Zugabe aggregierte eine $35\ \mu\text{M}$ α-syn-Lösung nach einer ca. zehnständigen Verzögerungsphase. In Gegenwart einer stöchiometrischen Menge von AS69 hingegen war die α-syn-Aggregation für die gesamte Assay-Dauer von acht Tagen unterbunden (Abbildung 2a). Zeitverzögerte äquimolare Zugabe von AS69 zu α-syn-Aggregationsreaktionen blockierte weitere Aggregation (Abbildung 2b). Diese Beobachtungen zeigen, dass monomeres α-syn durch die Bindung der β-Haarnadel in einen Aggregations-inkompetenten Zustand versetzt wird. Darüber hinaus inhibierte AS69 die Fibrillenbildung auch bei substöchiometrischen Konzentrationen. Durch Zugabe von AS69 in den Molverhältnissen 1:10, 1:100 oder 1:1000 verlängerte sich die Verzögerungsphase der α-syn-Aggregation um den Faktor 9, 6 bzw. 2 (Abbildungen 2d und S4). Größenausschluss-Chromatographie bestätigte, dass die Bindung von β-Wrapin AS69 an α-syn die Fibrillenbildung auch bei substöchiometrischer Konzentration verzögerte, und zeigte ferner, dass während der Verzögerungsphase der Aggregation keine stabilen Oligomere gebildet wurden (Abbildung 2c). Die substöchiometrische Aggregationshemmung ist nicht alleine mit Beschlagsnahme des monomeren α-syn zu erklären. Es muss also ein weiterer inhibitorischer Mechanismus wirksam sein, der die Bildung von Aggregationskeimen behindert. Dieser Mechanismus könnte auf einer Bindung von AS69 an die β1-β2-Region von α-syn innerhalb von früh gebildeten Aggregaten beruhen. Es könnten allerdings auch andere α-syn-Epitope für die substöchiometrische Aggregationshemmung entscheidend sein. In diesem Zusammenhang ist erwähnenswert,

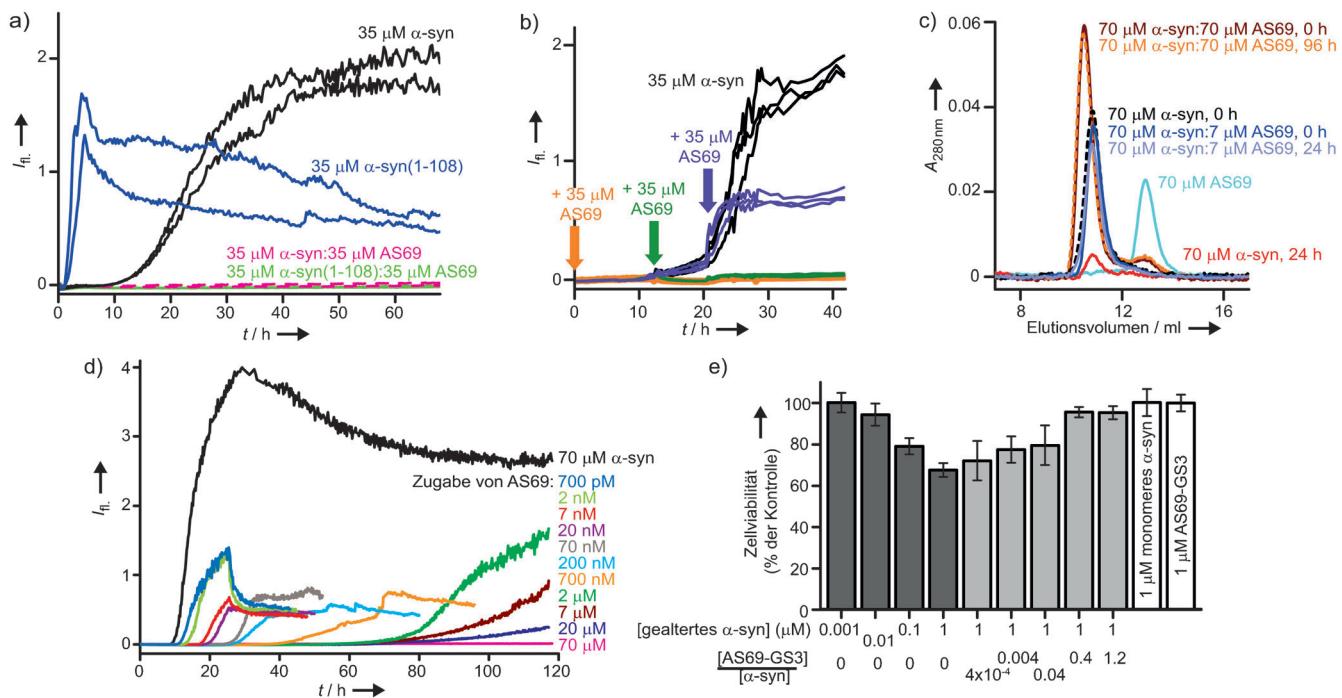


Abbildung 2. Inhibition der α -syn-Aggregation und -Toxizität durch β -Haarnadel-Bindung. a) Thioflavin-T(THT)-Zeitverlauf der Fibrillenbildung von Volllängen- α -syn und von aggregationsfreudigem, C-terminal verkürztem α -syn(1–108), mit und ohne Zugabe stöchiometrischer Mengen von AS69 (Zweifachmessungen). Die Fortsetzung des Experiments für insgesamt acht Tage führte zu keinem Fluoreszenzanstieg bei den AS69 enthaltenden Proben. b) THT-Fibrillenbildungskinetik bei Zugabe stöchiometrischer Mengen AS69 zu verschiedenen, mit Pfeilen markierten Zeitpunkten (Dreifachmessungen). c) Größenausschluss-Chromatographie von α -syn-Aggregationsreaktionen in An- und Abwesenheit von AS69. Proteinproben der angegebenen Konzentrationen wurden für die genannte Zeit einem Aggregations-Assay unterzogen und anschließend auf eine Superdex-75-10/300-GL-Säule (Hohlraumvolumen ca. 8 mL) geladen. Nach 24-stündiger Aggregation in Abwesenheit von AS69 war der α -syn-Elutionspeak stark verkleinert, weil die gebildeten Amyloid-Fibrillen nicht in das Säulenbett eindringen. d) THT-Fibrillenbildungskinetik in Abhängigkeit von der AS69-Konzentration. Für jede untersuchte AS69-Konzentration ist ein beispielhafter Zeitverlauf gezeigt. Die durchschnittliche Verzögerungszeit einer Dreifachmessung ist in Abbildung S4 gezeigt. e) MTT-Toxizitätstest nach Zugabe von α -syn-Lösungen, die in Abwesenheit (dunkelgraue Balken) oder Gegenwart (hellgraue Balken) von AS69-GS3 gealtert wurden, zu SH-SY5Y-Zellen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von zwölf Messungen, durchgeführt in je vier Testkammern für drei unabhängige Messungen.

dass α -syn-Oligomere eine antiparallele β -Struktur aufweisen.^[7] Der Mechanismus der substöchiometrischen Aggregationshemmung wird durch die gegenwärtigen Daten nicht aufgeklärt. Mögliche Mechanismen wären unter anderem: 1) Ein Bruchteil der α -syn-Moleküle innerhalb von Oligomeren bindet AS69 und verhindert die Konformationsumwandlung zu geordneten Amyloid-Fibrillen; 2) AS69 bindet mit hoher Affinität an die Enden der Fibrillen und blockiert dort ihr weiteres Wachstum.

Zur Untersuchung der Auswirkung von AS69 auf die α -syn-Toxizität bestimmten wir die Viabilität humaner SH-SY5Y-Neuroblastomzellen nach Zugabe von α -syn, das zuvor in Abwesenheit oder Gegenwart von AS69 gealtert war. In Abwesenheit von AS69 gealtertes, fibrilläres α -syn verursachte eine konzentrationsabhängige Abnahme der Zellviabilität laut MTT-Toxizitätstest (Abbildung 2e). Im Vergleich dazu bedingte in Gegenwart von AS69 gealtertes α -syn eine geringere Abnahme der Zellviabilität. Bei äquimolarem Verhältnis von AS69 zu α -syn war die Zellviabilität nicht beeinträchtigt.

Wir haben hier gezeigt, dass die Bindung einer β -Haarnadel in der Sequenzregion α -syn(37–54) die α -syn-Aggregation und -Toxizität hemmt. Die Bedeutung der Region α -syn(37–54) für die Pathogenese der Parkinson-Krankheit

wird dadurch unterstrichen, dass sie die Mehrzahl der bekannten krankheitsassoziierten Mutationen enthält (Abbildung 1c). Die Mutationen H50Q, G51D und A53T liegen im β 2-Strang, die Mutation E46K in der β -Schleife. Die Mutationen A53T und E46K begünstigen Oligomerisierung und Fibrillenbildung.^[2a] Aus einer Reihe ladungsverändernder Mutationen beschleunigten insbesondere die der β -Haarnadel benachbarten Mutationen (E35K, E57K) die Bildung von Oligomeren.^[1f] Diese Resultate weisen auf eine Verbindung zwischen der β -Haarnadel-Region, α -syn-Oligomerisierung und Pathogenese hin.

Die hier präsentierten Daten geben einen detaillierten Einblick in die Interaktion von α -syn mit dem Aggregationsinhibitor AS69. α -syn-Aggregation und -Toxizität können durch die Bindung einer β -Haarnadel gesteuert werden, wodurch Perspektiven für den frühzeitigen Eingriff in die Pathogenese der Synucleinopathien aufgezeigt werden.

Eingegangen am 16. Oktober 2013,
veränderte Fassung am 2. Dezember 2013
Online veröffentlicht am 12. März 2014

Stichwörter: Aggregation · Amyloid · NMR-Spektroskopie · Protein-Engineering · Proteinfaltung

- [1] a) C. Haass, D. J. Selkoe, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8*, 101–112; b) R. Kayed, E. Head, J. L. Thompson, T. M. McIntire, S. C. Milton, C. W. Cotman, C. G. Glabe, *Science* **2003**, *300*, 486–489; c) H. Y. Kim, H. Heise, C. O. Fernandez, M. Baldus, M. Zweckstetter, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 1671–1674; d) C. E. Munte, M. B. Erlach, W. Kremer, J. Koehler, H. R. Kalbitzter, *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 9111–9116; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 8943–8947; e) F. Sriegat, J. Wirmer-Bartoschek, H. Schwalbe, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 5628–5632; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 5514–5518; f) B. Winner, R. Jappelli, S. K. Maji, P. A. Desplats, L. Boyer, S. Aigner, C. Hetzer, T. Loher, M. Vilar, S. Campioni, C. Tzitzilonis, A. Soragni, S. Jessberger, H. Mira, A. Consiglio, E. Pham, E. Masliah, F. H. Gage, R. Riek, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 4194–4199; g) N. Zijlstra, C. Blum, I. M. Segers-Nolten, M. M. Claessens, V. Subramaniam, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 8951–8954; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 8821–8824.
- [2] a) H. A. Lashuel, C. R. Overk, A. Oueslati, E. Masliah, *Nat. Rev. Neurosci.* **2013**, *14*, 38–48; b) L. Breydo, J. W. Wu, V. N. Uversky, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **2012**, *1822*, 261–285.
- [3] a) 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; b) M. M. Dedmon, K. Lindorff-Larsen, J. Christodoulou, M. Vendruscolo, C. M. Dobson, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 476–477; c) S. Esteban-Martín, J. Silvestre-Ryan, C. W. Bertoncini, X. Salvatella, *Biophys. J.* **2013**, *105*, 1192–1198.
- [4] D. Eliezer, E. Kutluay, R. Bussell, Jr., G. Browne, *J. Mol. Biol.* **2001**, *307*, 1061–1073.
- [5] a) H. Heise, W. Hoyer, S. Becker, O. C. Andronesi, D. Riedel, M. Baldus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 15871–15876; b) M. Chen, M. Margittai, J. Chen, R. Langen, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 24970–24979; c) G. Comellas, L. R. Lemkau, A. J. Nieuwkoop, K. D. Kloepper, D. T. Ladror, R. Ebisu, W. S. Woods, A. S. Lipton, J. M. George, C. M. Rienstra, *J. Mol. Biol.* **2011**, *411*, 881–895; d) M. Vilar, H. T. Chou, T. Luhrs, S. K. Maji, D. Riek-Lohr, R. Verel, G. Manning, H. Stahlberg, R. Riek, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 8637–8642.
- [6] A. Loquet, K. Giller, S. Becker, A. Lange, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 15164–15166.
- [7] M. S. Celej, R. Sarroukh, E. Goormaghtigh, G. D. Fidelio, J. M. Ruyschaert, V. Raussens, *Biochem. J.* **2012**, *443*, 719–726.
- [8] a) C. Grönwall, A. Jonsson, S. Lindstrom, E. Gunnarsson, S. Stahl, N. Herne, *J. Biotechnol.* **2007**, *128*, 162–183; b) W. Hoyer, C. Grönwall, A. Jonsson, S. Ståhl, T. Härd, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 5099–5104.
- [9] B. C. McNulty, A. Tripathy, G. B. Young, L. M. Charlton, J. Orans, G. J. Pielak, *Protein Sci.* **2006**, *15*, 602–608.
- [10] a) B. I. Giasson, I. V. Murray, J. Q. Trojanowski, V. M. Lee, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 2380–2386; b) S. Zibaee, G. Fraser, R. Jakes, D. Owen, L. C. Serpell, R. A. Crowther, M. Goedert, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 38555–38567.
- [11] a) P. Csermely, R. Palotai, R. Nussinov, *Trends Biochem. Sci.* **2010**, *35*, 539–546; b) M. Fuxreiter, I. Simon, P. Friedrich, P. Tompa, *J. Mol. Biol.* **2004**, *338*, 1015–1026.