

5 NMR-Komplexstruktur der *hGas7* WW-Domäne mit dem prolinreichen Liganden LIPPPPPL

5.1 Resonanzzuordnung des Komplexes der *hGas7* WW-Domäne mit dem Peptid LIPPPPPL

Die ^1H -Resonanzen kleiner Proteine (<10kD) können durch die kombinierte Auswertung von 2D TOCSY, ROESY und NOESY ^1H - ^1H -Korrelationsspektren zugeordnet werden (Wüthrich, 1986). Im hier vorgestellten Fall wurden zunächst die ^1H -Resonanzen für den freien prolinreichen Liganden und anschließend die des WW-Domänen-Ligand-Komplexes bestimmt. Für die Resonanzzuordnung wurden unmarkierte synthetisch hergestellte Peptide des Liganden und der WW-Domäne verwendet. Für die Bestimmung spezifischer intermolekularer NOE-Signale zur Charakterisierung der Bindung und Orientierung wurden die Aminosäuren P4' und P6' des Liganden uniform ^{13}C -markiert. Anschließend erfolgte die Berechnung und Evaluierung der Strukturen des Komplexes mit dem Programm ARIA/CNS (Linge et al., 2003).

Zunächst erfolgte die Zuordnung der Resonanzsignale des freien, unmarkierten prolinreichen Liganden auf Grundlage von 2D-ROESY/-TOCSY Experimenten. Die Zuordnung des freien Liganden war vollständig möglich. Dann erfolgte die sequenzspezifische Zuordnung des WW-Domänen-Ligand-Komplexes. Tabelle 5.1 gibt einen Überblick über die dabei verwendeten Experimente und der aus ihnen gewonnenen Informationen.

Die Zuordnung der Resonanzsignale für den WW-Domänen-Ligand-Komplex war nicht vollständig möglich. Insbesondere die N- (L13, P14, P15) und C-terminalen Reste (E40, R41), sowie Reste aus Loop 2 (T33, T34, N35) der *hGas7* WW-Domäne konnten nicht zugeordnet werden. Dieser Umstand hatte aber keinen nachteiligen Einfluß auf die Strukturrechnungen, da diese Reste nicht Teil des β -Faltblattes sind, sondern sich in den flexiblen Termini bzw. in einem Loop der Domäne befinden. Für die Identifikation von intermolekularen NOEs wurden die 2D-NOESY Spektren mit und ohne Ligand ausgewertet. Zusätzlich wurde der Ligand an Position P4' und P6' uniform ^{13}C -markiert. Die Auswertung des 3D ^{13}C -HMQC-NOESY (200ms) ergab die folgenden intermolekularen NOE-Kreuzsignale: P4' $\text{H}\alpha$ -V30 $\text{H}\gamma$ 2; P4' $\text{H}\beta$ 1-V30 $\text{H}\gamma$ 2; P6' $\text{H}\alpha$ -T37 $\text{H}\gamma$ 2 und P6'- $\text{H}\beta$ 1-T37 $\text{H}\gamma$ 2. Das Ergebnis der Resonanzzuordnung ist im Anhang A.1.2 aufgeführt.

Tabelle 5.1: Übersicht der durchgeführten Experimente, daraus zugeordneter Signale und den erhaltenen Informationen für die Strukturrechnung.

Zuordnung von	Zielstellung	NMR-Spektrum	Signale ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$)
Ligand LIPPPPPL (unmarkiert)	sequenzspezifische Zuordnung	2D-TOCSY (21 ms)	$\text{H}^{\text{ali}}(\text{i})$
		2D-ROESY (150 ms)	$\text{H}^{\text{N}}(\text{i}-1)-\text{H}^{\text{ali}}(\text{i})$ $^1\text{H}-^1\text{H}-\text{NOE}$
WW-Domäne <i>hGas7</i> (unmarkiert)	sequenzspezifische Zuordnung	2D-TOCSY (35, 70, 105 ms)	$\text{H}^{\text{ali}}(\text{i}) / \text{H}^{\text{aro}}(\text{i})$
		2D-NOESY (50, 100, 150 ms)	$\text{H}^{\text{N}}(\text{i}-1)-\text{H}^{\text{ali}}(\text{i})$ $^1\text{H}-^1\text{H}-\text{NOE}$
WW-Domäne <i>hGas7</i> / LIPPPPPL (unmarkiert)	sequenzspezifische Zuordnung	2D-TOCSY (35, 70, 105 ms)	$\text{H}^{\text{ali}}(\text{i}) / \text{H}^{\text{aro}}(\text{i})$
	Identifikation von intermolekularen NOE	2D-NOESY (100, 150, 200, 300 ms)	$\text{H}^{\text{N}}(\text{i}-1)-\text{H}^{\text{ali}}(\text{i})$ $^1\text{H}-^1\text{H}$ NOE
WW-Domäne <i>hGas7</i> / LIPPPPPL (^{13}C-markiert: Position P4'/P6')	Zuordnung: P4'/P6'	2D $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ - HMQC	C^{ali} (P4', P6')
	Orientierung des Liganden	3D ^{13}C -HMQC- NOESY (200ms)	$^1\text{H}-^1\text{H}-\text{NOE}$ P4' - WW-Domäne P6' - WW-Domäne
Strukturrechnung			
Komplex	Gewinnung der Abstandsinformationen für die Strukturermittlung	2D-NOESY (100 ms) 3D ^{13}C -HMQC- NOESY (200 ms)	$^1\text{H}-^1\text{H}-\text{NOE}$

5.2 ARIA/CNS-Strukturrechnung für den Komplex der *hGas7* WW-Domäne und dem Liganden LIPPPPPL

Prolinreiche Peptidsequenzen bilden überwiegend eine Helix aus, die als Polyprolin Typ II (PPII-Helix) bezeichnet wird. Unter der Annahme der Ausbildung dieser PPII-Helix wurden die Strukturrechnungen mit den Winkeleinschränkungen für die ψ - und ϕ -Torsionswinkel mit den Standardwerten von $+149^\circ$ und -78° durchgeführt. Aus den manuell zugeordneten Signalmustern des β -Faltblatts und der Kenntnis der typischen β -Faltblatt-Topologie bisher strukturell bestimmter WW-Domänen wurden 11 intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen verwendet. Diese Strukturrechnungen ergaben die typische charakteristische Faltung einer WW-Domäne mit dem dreisträngigen β -Faltblatt. Der Ligand nahm dabei eine Position in der „NC“ oder „+“ Orientierung ein (Zarrinpar & Lim, 2000). In weiteren Verfeinerungsschritten wurden eine (W39- H^{Ne1}/P7'-Carbonyl) und zwei weitere (W39-H^{Ne1}/P4'-Carbonyl; W39- H^{Ne1}/P7'-Carbonyl) intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Liganden und der WW-Domäne in den Strukturrechnungen verwendet. Diese Strukturrechnungen zeigten nur minimale Änderungen.

Insgesamt wurden in der finalen Strukturrechnung mit ARIA/CNS 421 eindeutige NOEs für den Komplex zugeordnet. Diese setzen sich aus 188 intraresidualen, 70 sequentiellen, 14 mittellangen und 126 weitreichenden Distanzlimits für die WW-Domäne zusammen. Weiterhin konnte ARIA, 14 zusätzliche intermolekulare NOE-Abstandsrandbedingungen zuordnen. Die Interaktion zwischen dem prolinreichen Liganden LIPPPPPL und der *hGas7* WW-Domäne ist durch insgesamt 23 spezifische NOE-Kontakte definiert, darunter 9 manuell zugeordnete NOE-Signale.

11 Wasserstoffbrückenbindungen, 24 Torsionswinkel für die WW-Domäne (abgeleitet aus der Dystrophin-Kristallstruktur), 13 Torsionswinkel für den Liganden mit den Idealwerten für eine PPII-Helix wurden als Nebeneinschränkungen verwendet. Das Ergebnis der finalen Strukturrechnung mit ARIA/CNS gibt Tabelle 5.2 wieder.

5.3 Die Struktur des Komplexes aus der *hGas7* WW-Domäne mit dem prolinreichen Liganden LIPPPPPL

Die isolierte *hGas7* WW-Domäne faltet sich zu einem dreisträngigen, antiparallelen β -Faltblatt. β_1 ist durch die Reste (G16-S22) definiert und wird durch die Reste (P23-G25) des Loops β_1 - β_2 mit β_2 (R26-T32) verbunden. Die Reste (T33, T34) des Loops β_2 - β_3 verbinden β_2 mit β_3 (N35-W39). Auf der Unterseite der WW-Domäne bilden die

hydrophoben Reste (W17, Y29 und P42) über hydrophobe Kontakte einen stabilisierenden Cluster. In der Abbildung 5.1 ist das NMR-Ensemble der 10 energie-niedrigsten Strukturen des Komplexes als Stereodarstellung gezeigt.

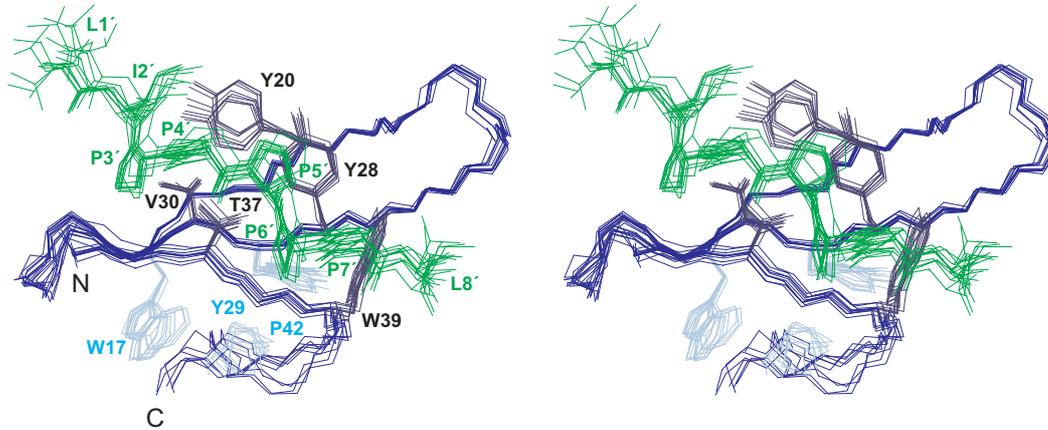


Abbildung 5.1: Stereodarstellung der 10 energieniedrigsten Strukturen des berechneten Ensembles. WW-Domäne (blau) und Ligand LIPPPPPL (grün). Die spezifitätsvermittelnden Reste Y20, Y28, V30 und W39 (grau) binden den Liganden in der NC- bzw. „+“ Orientierung die Domäne. Die Reste W17, Y29 und P42 (hellblau) bilden ein hydrophobes Cluster.

Dabei zeigt sich, dass an der Oberseite der WW-Domäne die konservierten Reste Y28, T37 und W39 eine hydrophobe Tasche ausbilden. Durch die exponierten konservierten Reste V30 und Y20 ergeben sich weitere hydrophobe Kontaktmöglichkeiten zur Bindung hydrophober Liganden. Der Ligand LIPPPPPL bindet entlang dieser hydrophoben Bereiche über spezifische Kontakte die *hGas7* WW-Domäne in einer PPII-Helix-Konformation (Abbildung 5.2). Die Orientierung des Liganden entspricht einer „NC“ oder „+“ Orientierung (Zarrinpar & Lim, 2000). Diese wird bestimmt durch die ermittelten Kontakte zwischen den Seitenketten von P4'-V30, P5'-(Y28;T37;W39), P6'-(T37;W39) und L8'-W39. Die Ligandreste P6', P7' und L8' umschließen dabei klammerartig die hydrophobe exponierte indolische Seitenkette des W39 (Abbildung 5.1).

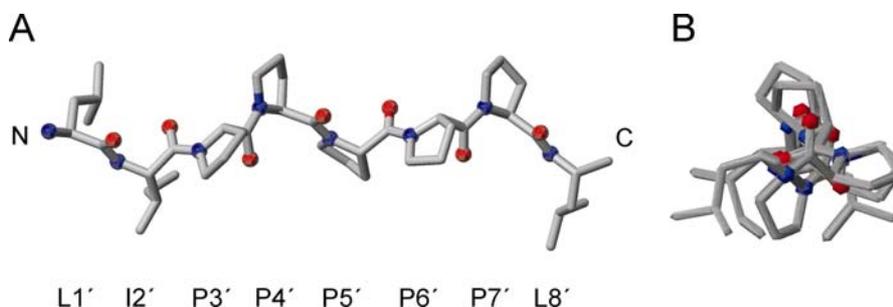


Abbildung 5.2: Eingenommene PP-II-Helix Konformation des Liganden LIPPPPPL im Komplex mit der *hGas7* WW-Domäne (nicht gezeigt). (A) Längssicht (B) Draufsicht

Abbildung 5.3 zeigt den Komplex aus der *hGas7* WW-Domäne und dem Liganden LIPPPPPL unter Berücksichtigung der Oberflächen. Auf der Oberfläche der WW-Domäne sind hydrophobe (braun) und hydrophile Bereiche (grün/blau) gekennzeichnet.

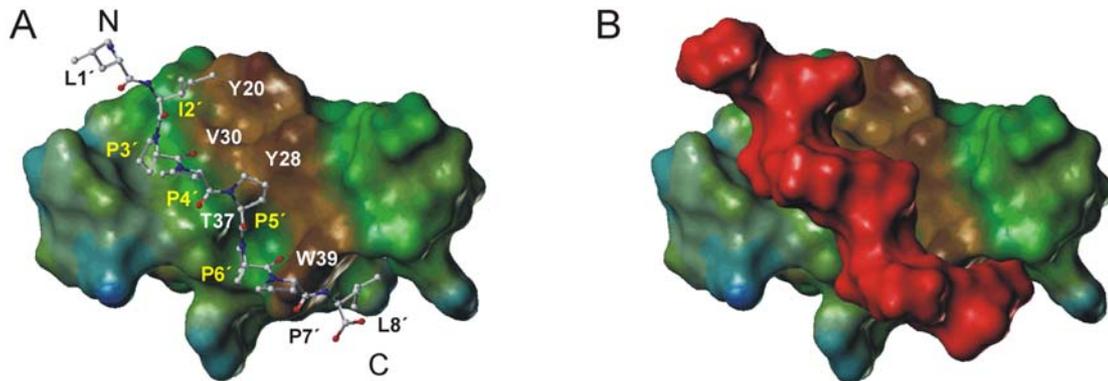


Abbildung 5.3: Oberflächenrepräsentationen des WW-Domänenkomplexes *hGas7*/LIPPPPPL. In (A) gezeigt ist die NC-Orientierung des Liganden in Bezug auf die WW-Domäne. Die hydrophoben Reste Y20, Y28, V30 und W39 sowie T37 bilden zusammenhängend die Interaktionsfläche der Domäne mit dem Liganden. Die Ligandreste P5' und P6' binden in eine hydrophobe Tasche, die aus den Resten Y28, T37 und W39 gebildet wird. Der Domänenrest W39 wird durch die Ligandenreste P6', P7' und L8' umklammert. I2' bindet in die Nähe von V30 und Y20, die eine zweite hydrophobe Fläche ausbilden. Die Oberflächen der Domäne sind hydrophob (braun), hydrophil (grün/blau) und für den Ligand in (B) (rot) dargestellt. (A) und (B) sind jeweils in der gleichen Orientierung abgebildet.

In (B) ist die Oberfläche des Liganden zusätzlich in rot dargestellt. Die Seitenkette von P7' liegt dabei exponiert an der Helix-Oberfläche vor, während sich die von P6' parallel in Bezug zur W39 Seitenkette in die hydrophobe Tasche der WW-Domäne vergräbt. Ähnlich wie P6' liegt P5' parallel zum aromatischen Ring von Y28 in dieser Tasche. P4' befindet sich in einer Furche zwischen T37 und V30 und bildet spezifische hydrophobe Kontakte zwischen der V30- γ -Methylgruppe und seiner Seitenkette aus. Die I2'-Seitenkette erstreckt sich über die hydrophobe Region der WW-Domäne, die gebildet wird durch die beiden aromatischen Reste Y28 und Y20 flankiert durch die V30 Seitenkette.

Tabelle 5.2: Statistik des berechneten NMR-Ensembles (10 Strukturen)

ARIA-Zuordnung für Abstandsbedingungen (NOE restraints)		
insgesamt gefundene eindeutige Zuordnungen		421
intraresidual	(i)	188
sequentiell	(<i>sequentiel</i>) (i, i+1)	70
mittellang	(<i>medium-range</i>) (i, i+4)	14
weitreichende	(<i>long-range</i>) (i, i>4)	126
intermolekulare Zuordnungen		23
mehrdeutige Zuordnungen		159
weitere verwendete Strukturbedingungen		
Wasserstoffbrückenbindungen (WW-Domäne/intermolekular)		11/2
Torsionswinkel (WW-Domäne/Ligand))		24/13
Strukturverletzungen		
Abstände > 0.3 Å		0
Torsionswinkel > 5°		0
Mittlere Abweichung (RMSD) von experimentellen Strukturbedingungen		
NOE (Å)		0,03
Torsionswinkel (°)		0,4
CNS Potentialenergien (kcal/mol)		
E _{total}		296 ± 15
E _{bonds}		5 ± 1
E _{angles}		34 ± 2
E _{impropers}		7 ± 1
E _{dihedral}		174 ± 5
E _{vdW}		50 ± 7
E _{NOE}		16 ± 1
E _{cdih}		10 ± 1
Mittlere Abweichung (RMSD¹) NMR-Komplex-Ensemble zu gemittelter Struktur (Å) ^A WW Domäne (G16-P42) ^B Ligand LIPPPPPL		
Peptidrückgrat (N; C α ; C \prime)	^A 0,58 ± 0,15	^B 0,33 ± 0,12
Schweratome	^A 1,81 ± 0,53	^B 0,54 ± 0,22
Ramachandran-Plot ² (%) für den Strukturkomplex		
favorisierte Bereiche	(<i>most favoured regions</i>)	84,6
zusätzlich erlaubte Bereiche	(<i>additionally allowed regions</i>)	10,8
erlaubte Bereiche	(<i>generously allowed regions</i>)	3,3
unerlaubte Bereiche	(<i>disallowed regions</i>)	1,3

¹ Die RMS-Abweichung des Ensembles wurde bestimmt mit dem Programm Molmol² Die Ramachandran-Plot Analyse erfolgte mit dem Programm Procheck-NMR

5.4 Diskussion

Die Strukturaufklärung von Komplexen aus WW-Domänen mit ihren spezifischen Liganden trägt entscheidend zum Verständnis der molekularen Ursachen ihrer Bindungsspezifität bei. Bisher sind in diesem Kontext 4-6 Bindungsklassen beschrieben worden, die in der Literatur unterschiedlich diskutiert werden. Abbildung 5.4 führt in einem Sequenzalignment einzelne Vertreter der Klassen I-IV auf. Unbestritten ist die Einteilung der Klassen I und IV. Klasse I erkennt das Motiv PPxY und wurde strukturell durch die Komplexstruktur von NEDD4 (Kanelis et al., 2001), Dystrophin (Huang et al., 2000) und YAP65 (Pires et al., 2001) beschrieben. Klasse IV erkennt spezifisch die Sequenz (poS/poT)P, eine Struktur ist ebenfalls bekannt (Verdecia et al., 2000). Für die Klasse III existieren bis heute noch keine Komplexstrukturen. Bisher wurden die NMR-Strukturen für die WW-Domänen alleine aus FBP28 und PRP40 beschrieben. Die experimentellen Arbeiten von Otte (2003) lassen eine Unterteilung der Klasse III in die R_a und R_b-Gruppe für sinnvoll erscheinen (Otte, 2003). Diese Unterteilung läßt sich erst durch die Strukturaufklärung von Komplexen dieser Vertreter sicher abgrenzen.

		15	20	25	30	35	40
Klasse I	Rn NEDD4-3	PPG	WEERTHTD.	GRV	FFINHNID	KKTQW	EDPRM
	Hs Dystrophin	QGF	WERAI SPN.	KVP	YYINHET	QTTCW	DHPKM
	Hs YAP65	PAG	WEMAKTSS.	GQR	YFLNHID	QTTTW	QDPRK
Klasse II	Hs FBP11-1	KSM	WTEHKSPD.	GRT	YYINTET	KQSTW	EKPDD
	Mm FBP28	VSE	WTEYKTAD.	GKT	YYNNRTLE	STW	EKPQE
	Hs FE65	PAG	WMRVQDTS.	G.	YYWHIPT	GTTQW	EPPGR
	Hs GAS7	PPG	WQSYLSPQ.	GRR	YYVNTTT	NETTW	ERPSS
Klasse III	Hs FBP21-1	KGR	WVEGITS	E.	GYHYYDLIS	GASQW	EKP
	Hs FBP21-2	KT	WVEGLS	E	D.	GFTYYINTET	GESRWEK
	Hs HYP109-1	MGD	WQEVWD	ENTGSY	YYWNTQT	NEVTW	ELPQY
Klasse IV	Hs PIN1	PPG	WEK	RMSR	SSGRV	YYFNHIT	NASQWER
	Sc ESS1	PT	WTVRYS	KSKKRE	YFNF	NETKHSQ	WEEPEG

β 1 β 2 β 3

Abbildung 5.4: repräsentative Auswahl von WW-Domänensequenzen geordnet nach ihren Bindungspartnern. Klasse I: PpxY-Motiv (blau); Klasse II: PPLPp-Motiv (magenta) und Poly-Prolin-Motiv: Gas7 (schwarz); Klasse III: PPR-Motiv (orange); Klasse IV: poS/poTP-Motiv (grün). Konservierte Reste sind in schwarz und spezifitäts-vermittelnde Aminosäurereste sind farbig hervorgehoben. Exponierte Reste oberhalb des β-Faltblattes, die Teil der potentiellen Interaktionsfläche zwischen Ligand und WW-Domäne darstellen, sind grau unterlegt. Schwarz eingerahmt sind die β-Stränge. Rn (*Rattus norvegicus*), Hs (*Homo sapiens*), Mm (*Mus musculus*), Sc (*Saccharomyces cerevisiae*). SwissProt-Zugangsnummern von oben: P46934, P11532, P46937, O75400, Q8CGF7, O00213, O60861, O75554, Q9NT61, Q13526 und P226696.

Klasse II wird durch die Bindungsmotive PPPLP und PPPPP charakterisiert, die nach der Klassifizierung von (Otte et al., 2003) jeweils eine eigene Klasse bilden. Kürzlich wurde der NMR-Komplex von FBP11-WW1 mit dem Liganden APPTPPPLP strukturell aufgeklärt

(Pires et al., 2005). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Komplexstruktur der *hGas7* WW-Domäne mit dem Liganden LIPPPPPL bestimmt. Dadurch ist es möglich, die unterschiedliche Bindungsspezifität der WW-Domänen aus FBP11 und *Gas7* innerhalb der Klasse II zu vergleichen und zu Vertretern der Klassen I und IV abzugrenzen.

In Abbildung 5.5 ist der direkte Vergleich der beiden Klasse II Vertreter FBP11 und *Gas7* als Stereoabbildung gezeigt. (A) zeigt den ermittelten *hGas7* WW-Domänen-Ligand-Komplex. Dabei sind in schwarz, die an der Oberfläche exponierten konservierten Reste Y20, P23, Y28, V30, T32, N35, T37, W39 der Domäne in dunkelgrau und die Ligandenreste L1', I2', P3', P4', P5', P6', P7', L8' hellgrün hervorgehoben. In der Abbildung (B) sind die spezifischen Bindungsreste der FBP11 WW-Domäne in rot und der Ligand PPPLPP in orange dargestellt.

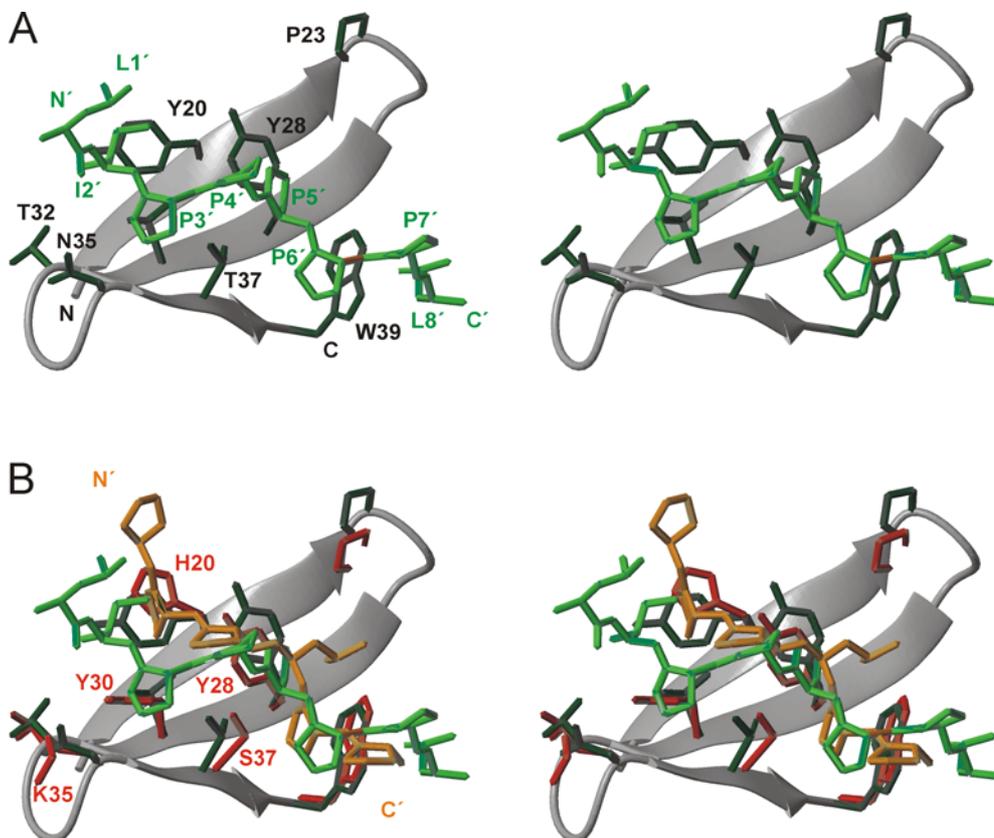


Abbildung 5.5: Stereovergleich der WW-Domänen-Ligand-Komplexe aus Klasse II. (A) *hGas7*/LIPPPPPL. (B) *hGas7*/LIPPPPPL und FBP11/PPPLPP. Die β -Faltblatttopologie (grau) der *hGas7* WW-Domäne, deren spezifischen Bindungsreste (schwarz) und der Ligand (grün) sind in der gleichen Orientierung abgebildet. Die spezifischen Bindungsreste der WW-Domäne FBP11 sind in rot und der Ligand in gelb gezeigt. (PDB Accession code (B) 1YWI).

Beide Domänen binden ihre spezifischen Liganden in der gleichen Orientierung. Zwischen den beiden Bindungskonformationen existieren geringe Unterschiede in der Position der

jeweiligen Liganden. FBP11 bindet seinen Liganden über zwei hydrophobe Taschen. Tasche 1 repräsentiert durch die Reste W39, T37(S37) und Y28 bindet die Liganden beider Domänen in gleicher Weise. Tasche 2 gebildet durch die Reste Y20 (H20), Y28 und V30 (Y30) zeigt unterschiedliche Bindungseigenschaften. Hier bedingt das Vorhandensein des größeren aromatischen Restes Y30 in der FBP11 WW-Domäne im Gegensatz zu V30 (*hGas7*) eine größere Verlagerung des Liganden in die zweite spezifische Tasche. Im Unterschied zu FBP11 bindet die *hGas7* WW-Domäne den Prolinrest P3' oberhalb des konservierten aliphatischen Restes V30. I2' erstreckt sich in die Nähe der zweiten Tasche. Aus der Substitutionsanalyse (Kapitel 1.2.2, Seite 8) wird ersichtlich, dass dieser Rest ohne Verlust der Bindung durch Reste mit langen aliphatischen Seitenketten (K, R, V, L) und hydrophoben Aromaten (F) ersetzt werden kann. Insgesamt zeigen die beiden Komplexe sehr ähnliche Bindemodi auf.

5.5 Referenzen

- Huang, X., Poy, F., Zhang, R., Joachimiak, A., Sudol, M. & Eck, M. J. (2000) Structure of a WW domain containing fragment of dystrophin in complex with beta-dystroglycan. *Nat Struct Biol* 7, 634-638
- Kanelis, V., Rotin, D. & Forman-Kay, J. D. (2001) Solution structure of a Nedd4 WW domain-ENaC peptide complex. *Nat Struct Biol* 8, 407-412
- Linge, J. P., Habeck, M., Rieping, W. & Nilges, M. (2003) ARIA: automated NOE assignment and NMR structure calculation. *Bioinformatics* 19, 315-316
- Otte, L. (2003) Charakterisierung von WW-Domänen-Ligand-Wechselwirkungen mit Hilfe von synthetischer Protein- und Peptidbibliotheken. In Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I, Fach Biologie, Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin
- Otte, L., Wiedemann, U., et al. (2003) WW domain sequence activity relationships identified using ligand recognition propensities of 42 WW domains. *Protein Sci* 12, 491-500
- Pires, J. R., Parthier, C., et al. (2005) Structural basis for APPTPPPLPP peptide recognition by the FBP11WW1 domain. *J Mol Biol* 348, 399-408
- Pires, J. R., Taha-Nejad, F., et al. (2001) Solution structures of the YAP65 WW domain and the variant L30 K in complex with the peptides GTPPPPYTVG, N-(n-octyl)-GPPPY and PLPPY and the application of peptide libraries reveal a minimal binding epitope. *J Mol Biol* 314, 1147-1156

Verdecia, M. A., Bowman, M. E., Lu, K. P., Hunter, T. & Noel, J. P. (2000) Structural basis for phosphoserine-proline recognition by group IV WW domains. *Nat Struct Biol* 7, 639-643

Wüthrich, K. (1986) *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, John Wiley & Sons, New York

Zarrinpar, A. & Lim, W. A. (2000) Converging on proline: the mechanism of WW domain peptide recognition. *Nat Struct Biol* 7, 611-613