

## 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  $^1\text{H}$ -Resonanzen kleiner Proteine (<10kD) können durch die kombinierte Auswertung von 2D TOCSY, ROESY und NOESY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -Korrelationsspektren zugeordnet werden (Wüthrich, 1986). Im hier vorgestellten Fall wurden zunächst die  $^1\text{H}$ -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  $^{13}\text{C}$ -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  $\beta$ -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  $^{13}\text{C}$ -markiert. Die Auswertung des 3D  $^{13}\text{C}$ -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 ( $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ )
<b>Ligand LIPPPPPL (unmarkiert)</b>	sequenzspezifische Zuordnung	2D-TOCSY (21 ms)	$\text{H}^{\text{ali}}(\text{i})$
		2D-ROESY (150 ms)	$\text{H}^{\text{N}}(\text{i}-1)-\text{H}^{\text{ali}}(\text{i})$ $^1\text{H}-^1\text{H}-\text{NOE}$
<b>WW-Domäne <i>hGas7</i> (unmarkiert)</b>	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)	$\text{H}^{\text{N}}(\text{i}-1)-\text{H}^{\text{ali}}(\text{i})$ $^1\text{H}-^1\text{H}-\text{NOE}$
<b>WW-Domäne <i>hGas7</i> / LIPPPPPL (unmarkiert)</b>	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
<b>WW-Domäne <i>hGas7</i> / LIPPPPPL (<math>^{13}\text{C}</math>-markiert: Position P4'/P6')</b>	Zuordnung: P4'/P6'	2D $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ - HMQC	$\text{C}^{\text{ali}}$ (P4', P6')
	Orientierung des Liganden	3D $^{13}\text{C}$ -HMQC-NOESY (200ms)	$^1\text{H}-^1\text{H}-\text{NOE}$ P4' - WW-Domäne P6' - WW-Domäne
<b>Strukturrechnung</b>			
<b>Komplex</b>	Gewinnung der Abstandsinformationen für die Strukturermittlung	2D-NOESY (100 ms) 3D $^{13}\text{C}$ -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  $\psi$ - und  $\phi$ -Torsionswinkel mit den Standardwerten von  $+149^\circ$  und  $-78^\circ$  durchgeführt. Aus den manuell zugeordneten Signalmustern des  $\beta$ -Faltblatts und der Kenntnis der typischen  $\beta$ -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  $\beta$ -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.

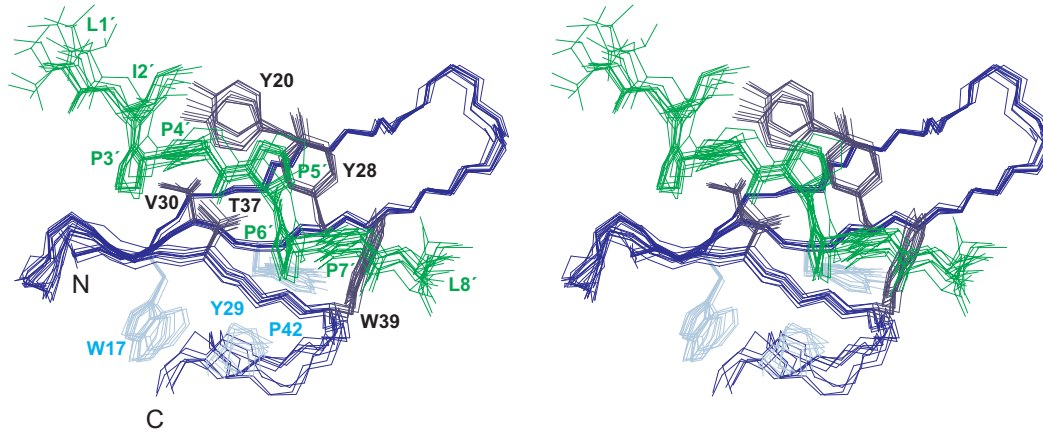
Insgesamt wurden in der finalen Strukturrechnung mit ARIA/CNS 421 eindeutige NOEs für den Komplex zugeordnet. Diese setzen sich aus 188 intraresidualen, 70 sequentiellen, 14 mittellangen und 126 weitreichenden Distanzlimits für die WW-Domäne zusammen. Weiterhin konnte ARIA, 14 zusätzliche intermolekulare 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

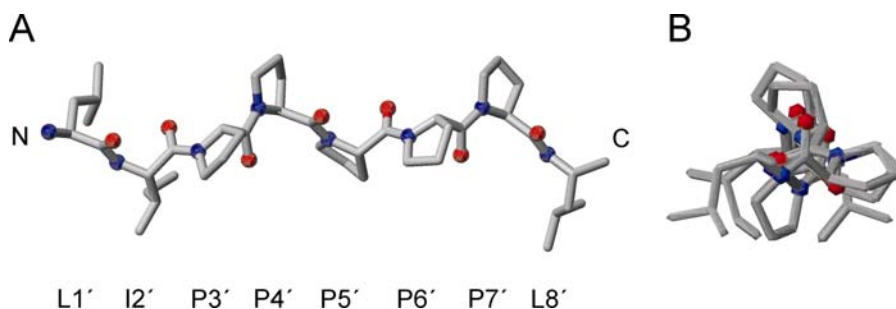
Die isolierte *hGas7* WW-Domäne faltet sich zu einem dreisträngigen, antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt.  $\beta_1$  ist durch die Reste (G16-S22) definiert und wird durch die Reste (P23-G25) des Loops  $\beta_1$ - $\beta_2$  mit  $\beta_2$  (R26-T32) verbunden. Die Reste (T33, T34) des Loops  $\beta_2$ - $\beta_3$  verbinden  $\beta_2$  mit  $\beta_3$  (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.



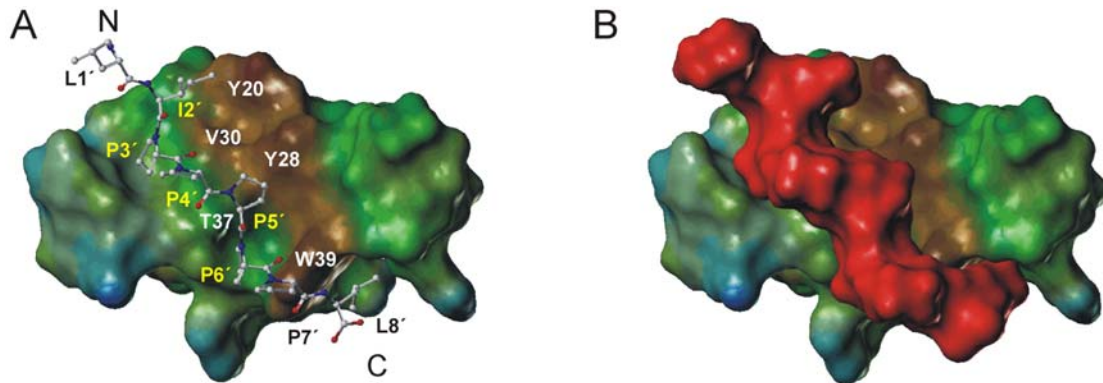
**Abbildung 5.1:** Stereodarstellung der 10 energieniedrigsten Strukturen des berechneten Ensembles. WW-Domäne (blau) und Ligand LIPPPPPL (grün). Die spezifitätsvermittelnden Reste Y20, Y28, V30 und W39 (grau) binden den Liganden in der NC- bzw. „+“ Orientierung die Domäne. Die Reste W17, Y29 und P42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

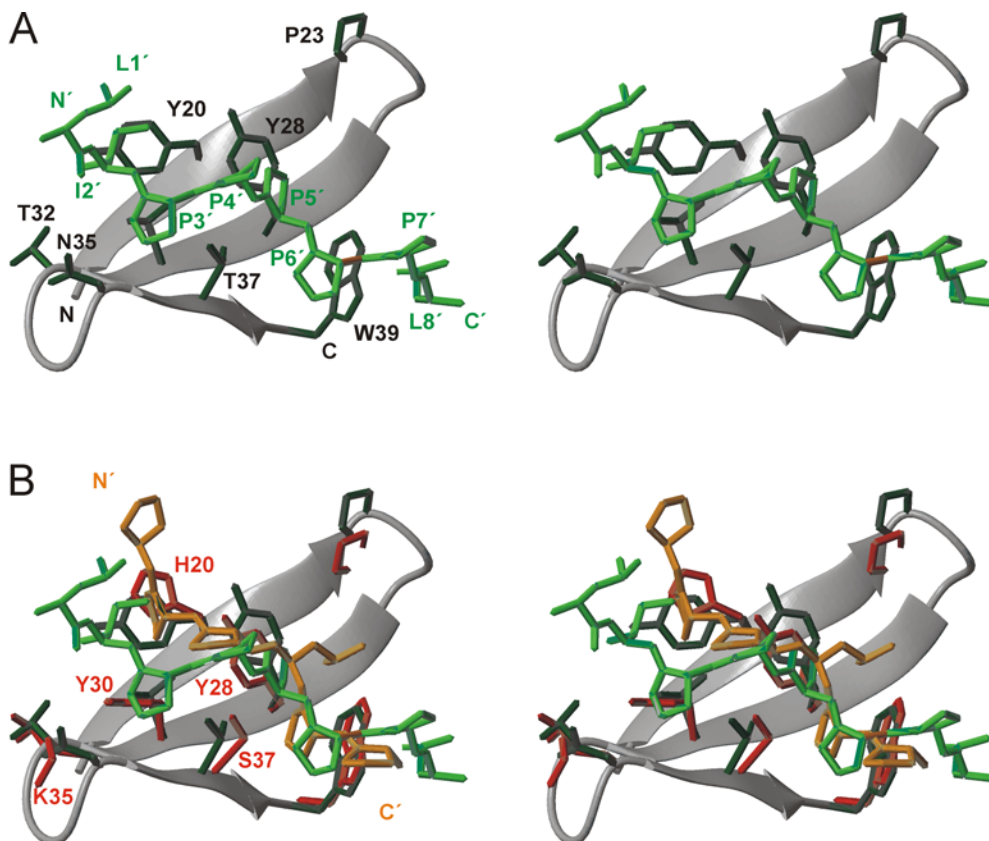
<b>ARIA-Zuordnung für Abstandsbedingungen (NOE restraints)</b>		
insgesamt gefundene eindeutige Zuordnungen		421
intraresidual	(i)	188
sequentiell	( <i>sequentiel</i> ) (i, i+1)	70
mittellang	( <i>medium-range</i> ) (i, i+4)	14
weitreichende	( <i>long-range</i> ) (i, i>4)	126
intermolekulare Zuordnungen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

<sup>1</sup> Die RMS-Abweichung des Ensembles wurde bestimmt mit dem Programm Molmol<sup>2</sup> Die Ramachandran-Plot Analyse erfolgte mit dem Programm Procheck-NMR



(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  $\beta$ -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