



Proteindynamik Hot Paper

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2023**, *62*, e202219314

Internationale Ausgabe: doi.org/10.1002/anie.202219314

Deutsche Ausgabe: doi.org/10.1002/ange.202219314

Der starre Kern und die flexible Oberfläche von Amyloidfibrillen – Magic-Angle-Spinning NMR Spektroskopie von aromatischen Resten

Lea Marie Becker, Mélanie Berbon, Alicia Vallet, Axelle Grelard, Estelle Morvan, Benjamin Bardiaux, Roman Lichtenecker, Matthias Ernst, Antoine Loquet,* und Paul Schanda*

Robert Konrat zum 60. Geburtstag gewidmet

Abstract: Aromatische Seitenketten sind wichtige Indikatoren für die Plastizität von Proteinen und bilden oft entscheidende Kontakte bei Protein-Protein-Wechselwirkungen. Wir untersuchten aromatische Reste in den beiden strukturell homologen cross- β Amyloidfibrillen HET-s und HELLF mit Hilfe eines spezifischen Ansatzes zur Isotopenmarkierung und Festkörper NMR mit Drehung am magischen Winkel. Das dynamische Verhalten der aromatischen Reste Phe und Tyr deutet darauf hin, dass der hydrophobe Amyloidkern starr ist und keine Anzeichen von “atmenden Bewegungen” auf einer Zeitskala von Hunderten von Millisekunden zeigt. Aromatische Reste, die exponiert an der Fibrilloberfläche sitzen, haben zwar eine starre Ringachse, weisen aber Ringflips auf verschiedenen Zeitskalen von Nanosekunden bis Mikrosekunden auf. Unser Ansatz bietet einen direkten Einblick in die Bewegungen des hydrophoben Kerns und ermöglicht eine bessere Bewertung der Konformationsheterogenität, die aus einem NMR-Strukturensemble einer solchen Cross- β -Amyloidstruktur hervorgeht.

Einleitung

Aromatische Seitenketten spielen eine wichtige Rolle für die Stabilität und Funktion von Proteinen: Sie befinden sich häufig in aktiven Zentren oder Eintrittsstellen von Enzymen oder Membrankanälen^[1] und sind überrepräsentiert an Protein-Protein-Schnittstellen,^[2] so dass aromatische Gruppen direkt an Bindungen oder enzymatischen Umsätzen beteiligt sind. Darüber hinaus stabilisieren sie Proteinstrukturen, indem sie π - π ,^[3,4] CH- π ,^[5,6] oder Kation- π ^[7]-Wechselwirkungen bilden und die Selbstorganisation von Amyloidprotei-

nen fördern.^[8] Durch die sperrige Natur von Phenylalaninen (Phe), Tyrosinen (Tyr) und Tryptophanen (Trp) hat ihre Dynamik einen interessanten Aspekt: Ringflips um 180°, die zur Umwandlung ununterscheidbarer Zustände (für Phe und Tyr) führen, sind mit erheblichen Energiebarrieren verbunden. Ringflips wurden bereits in den 1970er Jahren durch Kernspinresonanz (NMR; engl.: nuclear magnetic resonance) in Lösung beobachtet.^[9-11] Man geht davon aus, dass sie “atmende Bewegungen” erfordern, d. h. vorübergehende konformationell angeregte Zustände des Proteins, die das Hohlvolumen zum Drehen des Ringes schaffen. Die

[*] L. M. Becker, P. Schanda
Institute of Science and Technology Austria, Am Campus 1, 3400 Klosterneuburg (Österreich)
E-mail: paul.schanda@ista.ac.at

M. Berbon, A. Grelard, A. Loquet
Univ. Bordeaux, CNRS, Bordeaux INP, CBMN, UMR 5248, IECB, Pessac (Frankreich)
E-mail: a.loquet@iecb.u-bordeaux.fr

A. Vallet
Institut de Biologie Structurale, 41, avenue des martyrs, Grenoble (Frankreich)

E. Morvan
Institut Européen de Chimie et Biologie UAR3033 CNRS, University of Bordeaux, INSERM US01, Pessac (Frankreich)

B. Bardiaux
Bacterial Transmembrane Systems Unit, Institut Pasteur, Université Paris Cité, CNRS UMR 3528, 75015 Paris (Frankreich)

und
Structural Bioinformatics Unit, Institut Pasteur, Université Paris Cité, CNRS UMR 3528, 75015 Paris (Frankreich)

R. Lichtenecker
Institute of Organic Chemistry, University of Vienna, Währinger Str. 38, 1090 Wien (Österreich)

M. Ernst
Physical Chemistry, ETH Zürich, Vladimir Prelog Weg 2, CH-8093 Zürich (Schweiz)

© 2023 Die Autoren. Angewandte Chemie veröffentlicht von Wiley-VCH GmbH. Dieser Open Access Beitrag steht unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution Non-Commercial License, die eine Nutzung, Verbreitung und Vervielfältigung in allen Medien gestattet, sofern der ursprüngliche Beitrag ordnungsgemäß zitiert und nicht für kommerzielle Zwecke genutzt wird.

Untersuchung der Ringflips in Abhängigkeit von Temperatur^[12,13] oder Druck^[14,15] kann folglich Aufschluss über die Aktivierungsenergien der zugrundeliegenden strukturellen Übergänge geben. In einer vor Kurzem veröffentlichten Studie wurden Ringflips eines Tyr in einer SH3-Domäne untersucht; zusätzlich zu den Ringflips wurde ein angeregter Zustand, der auf "atmende Bewegungen" zurückzuführen ist, strukturell charakterisiert.^[16] Die kontinuierliche Weiterentwicklung der NMR-Methodik in Lösung hat die Untersuchung der Ringdynamik in löslichen Proteinen mittlerer Größe mit zunehmender Genauigkeit ermöglicht,^[17] insbesondere mit Relaxationsdispersionsmethoden^[18–20] und spezifischer Isotopenmarkierung.^[21,22] Große Proteinkomplexe und unlösliche Proteine können stattdessen mittels Festkörper NMR mit Drehung am magischen Winkel (MAS NMR; engl.: magic-angle-spinning) untersucht werden. Da es hier keine globale Drehbewegung der Moleküle gibt, konzentriert sich die Untersuchung der Proteindynamik durch MAS NMR auf interne Bewegung durch Beobachtung teilweise gemittelter anisotroper Wechselwirkungen (dipolare Kopplung, Anisotropie der chemischen Verschiebung) und durch Spinrelaxation.^[23] Jüngste Studien haben die Dynamik aromatischer Ringe in kleinen kristallinen Proteinen,^[24–26] Membranproteinen in Lipiddoppelschichten^[27] sowie Bewegungen in großen Proteinverbänden untersucht, einschließlich Experimenten bei Temperaturen bis zu 100 K.^[28]

Amyloidfibrillen setzen sich zu einer Cross- β -Architektur aus Grundbausteinen zusammen und bilden quasi-unendlich lange β -Faltblattstrukturen mit einem starren, wasserausschließenden Kern.^[29,30] Die Dynamik von Amyloidfibrillen ist weit weniger erforscht als die von globulären Proteinen, und es ist nicht klar, ob der Kern solcher Fibrillen "atmende Bewegungen" ausführt oder ob diese durch die kollektive Natur der dicht gepackten β -Faltblattstrukturen unterdrückt werden. Die Dynamik des Rückgrates von HET-s wurde mittels MAS NMR untersucht^[31] und deutet auf einen weitgehend starren Kern hin, solche Daten können allerdings keine seltenen Ereignisse wie Ringflips und "atmende Bewegungen" erfassen. Aromatische Reste an der Oberfläche von Amyloiden, die durch das HET-s(218–289) Protein gebildet werden, haben sich als wichtig für die Fibrillenausbreitung erwiesen,^[32] was darauf hindeutet, dass aromatische Seitenketten für die Bildung von Kontakten zwischen den Untereinheiten wichtig sein könnten. Dies wirft die Frage auf, wie flexibel die exponierten Reste an der Oberfläche sind.

Wir untersuchen in dieser Arbeit die Dynamik der aromatischen Reste Phe und Tyr in einem Paar strukturell homologer und funktioneller Amyloidfibrillen aus Pilzen, HET-s(218–289) und HELLF (209–277) (im Folgenden HET-s und HELLF genannt). Die dreidimensionalen Strukturen der Fibrillen, die aus MAS NMR Daten gewonnen wurden,^[33,34] zeigen einen β -solenoiden Kern, der aus zwei langen Repeats, die etwa 30 Reste lang sind, (r1 und r2) besteht. Diese wiederum bilden zwei Schichten von β -Strängen, die zu einem dreieckigen Kern angeordnet sind. Die seitlich angrenzenden Bereiche und der Loop, der die beiden Schichten miteinander verbindet, sind unstrukturiert,

hochgradig beweglich und durch Kreuzpolarisation in ^{13}C MAS NMR^[35] nicht sichtbar. In den NMR-Strukturen nehmen die aromatischen Reste eine Reihe von Konformationen an (Abbildung 1A und B). In HELLF befinden sich zwei Phe Reste im starren Amyloidkern: Phe223 und Phe250 gehören zu den r1 bzw. r2 Repeats und befinden sich übereinander, in Richtung des hydrophoben Kerns zeigend. Die genaue Art ihrer Wechselwirkung blieb im NMR-Strukturensemble unklar, und die beiden aromatischen Ringe nehmen verschiedene χ_1 - und χ_2 -Winkel ein (Abbildung 1A). Dies deutet entweder auf eine erheblich Flexibilität der Seitenketten innerhalb des hydrophoben Kerns oder auf eine unzureichend definierte Struktur hin, die möglicherweise auf das Fehlen von Abstandsbeschränkungen zurückzuführen ist. Auch wenn man argumentieren könnte, dass die genaue Lage dieser Seitenketten ein Detail ist, so hat sie doch wichtige Auswirkungen: Ob diese

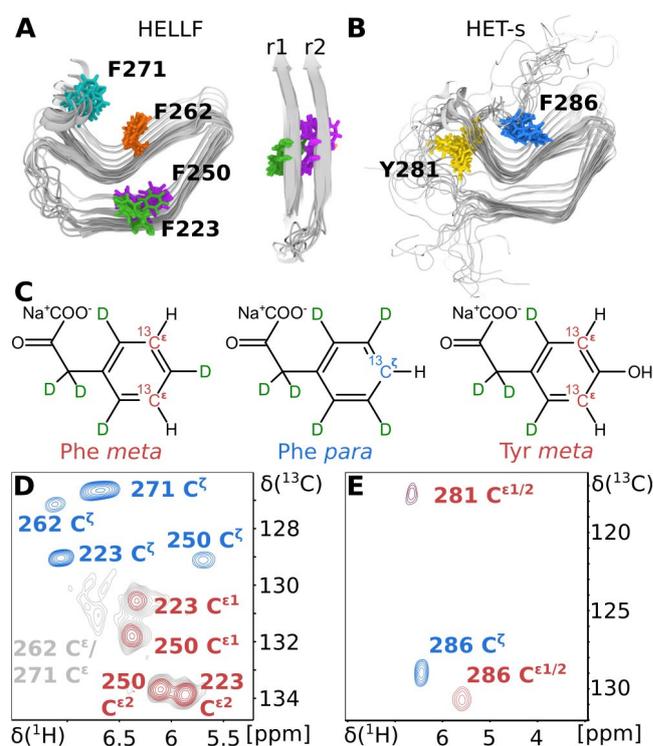


Abbildung 1. MAS NMR aromatischer Seitenketten in HELLF (A, D) und HET-s (B, E) Amyloidfibrillen. (A, B) Structurensemble (die zehn Strukturen mit der geringsten Energie von HELLF, PDB: 6EKA,^[33] und HET-s, PDB: 2KJ3.^[34]). Rechts in (A) ist der Blick auf die Seite von HELLF mit den sich wiederholenden β -Faltblattstrukturen (Repeats) r1 und r2 gezeigt. Dargestellt ist nur eine Untereinheit der Amyloidfibrille. (C) In dieser Arbeit genutzte α -Ketosäurevorläufer,^[22] die entweder ein isoliertes ^1H - ^{13}C Paar an der ζ -Position von Phe (mitte) oder zwei ^1H - ^{13}C Paare an den ϵ -Positionen (links, rechts) ergeben. (D, E) ^1H - ^{13}C Korrelationspektren, basierend auf dipolaren Kopplungen, von *meta*-Phe (rot) und *para*-Phe (blau) gelabeltem HELLF (D) und *meta*-Phe (rot), *para*-Phe (blau) und *meta*-Tyr (rot) gelabeltem HET-s (E) mit Resonanzzuordnung (55 kHz MAS; 14.1 T Feldstärke; siehe Hintergrundinformationen für Details). Das graue Spektrum in (D) ist das gleiche wie das Rote, allerdings mit niedrigeren Konturlinien dargestellt. Es zeigt den verbreiterten Peak, der vermutlich zum *meta*-CH von Phe262 oder Phe271 gehört.

aromatischen Ringe mehrere Konformationen annehmen oder nicht, gibt direkten Aufschluss über die Plastizität des hydrophoben Kerns und damit über die "atmende Bewegung" in Amyloidfibrillen im Allgemeinen. Zwei weitere aromatische Reste sind Phe262, der sich in r2 befindet aber dessen aromatischer Ring aus dem Amyloidkern heraus zeigt, und Phe271, der nicht im Amyloidkern, sondern in der C-terminalen, seitlich angrenzenden Region liegt. HET-s hat einen Tyrosin- und einen Phenylalaninrest (Tyr281, Phe286). Für Tyr281, das sich ganz am Ende des letzten β -Stranges von r2 befindet, wurde eine erhöhte $^{13}\text{C}^\alpha$ $R_{1\rho}$ Relaxation nachgewiesen. Seine Seitenkette zeigt in Richtung der mutmaßlichen C-terminalen semi-hydrophoben Tasche,^[32] während Phe286 nicht am Amyloidkern beteiligt ist und sich in der C-terminalen, seitlich angrenzenden Region befindet.

Ergebnisse und Diskussion

Um selektiv aromatische Reste zu beobachten, haben wir einen spezifischen Ansatz zur Isotopenmarkierung verwendet (Abbildung 1C), der darin besteht, isolierte ^1H - ^{13}C -Paare entweder an den ϵ -Positionen von Phe oder Tyr oder an der ξ -Position in Phe in einen ansonsten deuterierten und natürlich vorkommenden Kohlenstoffhintergrund^[22] einzubringen. Dieser Ansatz ermöglicht eine empfindliche ^1H -Detektion bei hoher Auflösung, und die Einfachheit des Spinsystems reduziert zusätzliche Spinrelaxationsmechanismen und erlaubt eine unkomplizierte Interpretation der Relaxationsdaten. Die Dynamik des Spinpaares an der ξ -Position (im Folgenden als *para*-CH bezeichnet) berichtet ausschließlich über die Bewegung der Ringachse, ist aber unempfindlich gegenüber Ringflips, während die ϵ -Spinpaare (*meta*-CH) durch Ringflips neu ausgerichtet werden und somit Aufschluss über Flips geben. Wenn es keine Neuorientierung oder Neuorientierung auf Zeitskalen von mehreren zehn Millisekunden (ms) gibt, sind zwei Gruppen von *meta*-CH-Peaks zu erwarten, die den beiden ϵ -Stellen entsprechen, welche sich in unterschiedlichen Umgebungen befinden. Sehr schnelle Ringflips würden zu einem einzigen, gemittelten Peak führen, während Flips auf einer Zeitskala von Hunderten von ns bis circa einer ms zu einer sehr schnellen Spinrelaxation führen, die die Resonanzpeaks stark verbreitert (Abbildung S2). Die Abbildungen 1D und 1E zeigen die hochauflösenden ^1H -detektierten MAS NMR-Spektren von HELLF bzw. HET-s, die entweder mit *meta*-CH (rot) oder *para*-CH (blau) Spinpaaren in ansonsten deuterierten Proben in H_2O -basiertem Puffer markiert sind. Wir haben dreidimensionale ^1H - ^1H -($^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$)-Spektren (zeitlich geteilte $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -Dimension) verwendet, in denen Magnetisierung durch den freien Raum übertragen wird, um alle beobachteten Kreuzpeaks über die räumliche Nähe zu den Rückgratamiden zuzuordnen (Abbildung S3 und S4). Für alle *para*-CH-Paare ist erwartungsgemäß ein einzelner Kreuzpeak zu beobachten. In den *meta*-CH-Spektren lässt sich jedoch eine interessante Vielfalt von Beobachtungen machen: (i) Tyr281 und Phe286, die sich am C-Terminus von HET-s befinden (letzter Strang und angrenzender Terminus), zeigen einen einzelnen Kreuzpeak, der auf schnelle Ringflips hinweist (Abbildung 1E). (ii) Phe223 und Phe250 im Kern von HELLF zeigen im Gegensatz dazu getrennte Kreuzpeaks für die $^1\text{H}^{\epsilon 1}$ - $^{13}\text{C}^{\epsilon 1}$ - und $^1\text{H}^{\epsilon 2}$ - $^{13}\text{C}^{\epsilon 2}$ -Positionen, was das Vorhandensein schneller Ringflips ausschließt (Abbildung 1D). (iii) Die Signale von Phe262 und Phe271 konnten nicht eindeutig zugeordnet werden. Ein breites Signal, das in mehreren unabhängigen Proben bei ca. 6,6 ppm/131 ppm entdeckt wurde, wird vorläufig den *meta*-CH-Stellen eines oder beider Phe-Ringe zugeschrieben (Abbildung 1D, graues Spektrum). In jedem Fall ist es offensichtlich, dass die *meta*-CH-Signale von Phe262 und Phe271 stark verbreitert sind, während ihre *para*-CH-Resonanzen scharfe Linien ergeben; diese Beobachtungen deuten stark darauf hin, dass Phe262 und Phe271 Ringflips auf einer Zeitskala durchlaufen, die zu einer maximalen Verbreiterung führt (Hunderte von ns bis Hunderte von μs ; Abbildung S2, weiter unten diskutiert; Abbildung S8).

Wir haben quantitative Informationen über die Bewegung der Ringachse und Ringflips erhalten, indem wir Messungen der ^1H - ^{13}C dipolaren Kopplung und ^{13}C Spinrelaxation durchgeführt haben.^[23] Die Tensoren der dipolaren Kopplung geben Aufschluss über die durchschnittliche Neuorientierung der H-C-Bindung auf Zeitskalen, die kürzer als einige zehn ns sind, was auch als Ordnungsparameter S ausgedrückt wird ($S \in [0;1]$, wobei $S=1$ eine starre Bindung bedeutet). Diese Daten zeigen, dass die Ringachsen aller Phe in HELLF und HET-s nur Bewegungen mit geringer Amplitude erfahren (S ca. 0,9; Abbildung 2A und B; Tab. S2 und S3). Relaxationsmessungen hingegen, sind neben den Amplituden auch empfindlich gegenüber den Zeitskalen der Bewegung. Wir haben sowohl die longitudinale ^{13}C -Relaxation (R_1) als auch die ^{13}C -Relaxation im rotierenden Koordinatensystem ($R_{1\rho}$) gemessen, um Einblicke in die Zeitskalen der Bewegungen zu gewinnen (Abbildung S5, S6, S7; Tab. S4 und S5). R_1 ist hauptsächlich empfindlich für Bewegungen im Bereich von Hunderten von ps bis zu zehn ns, während $R_{1\rho}$ Bewegungen auf Zeitskalen von Hunderten von ns bis zu Hunderten von μs erfasst, abhängig von der Stärke des angelegten Spinlockfeldes (v_{RF}). Mit $R_{1\rho}$ Ratenkonstanten, die bei variierendem Spinlockradiofrequenzfeld gemessen werden, kann man Bewegungen im ns-ms Bereich messen;^[36,37] insbesondere geben Messungen der Relaxationsdispersion (RD) nahe der Rotationsresonanzbedingung (NERRD; engl.: NEar-rotary Resonance Relaxation-Dispersion) Aufschluss über Dynamik im μs -ms Bereich.^[38]

Wir haben den DETECTORS-Ansatz^[39] für eine gemeinsame Analyse der Relaxationsdaten und dipolaren Ordnungsparameter verwendet (Abbildung 2C-E). Dieser Ansatz bildet die Amplituden der Bewegung, die in verschiedenen Zeitfenstern auftreten, mit sogenannte Antworten ab ($\rho_0, \rho_1, \rho_2, \rho_3$; Abbildung 2C), wobei berücksichtigt wird, dass verschiedene Relaxationsparameter unterschiedlich empfindlich auf verschiedene Zeitskalen reagieren. ρ_1, ρ_2 und ρ_3 werden aus den Relaxationsdaten abgeleitet, während ρ_0 die Restamplitude widerspiegelt, d.h. die Differenz zum von der dipolaren Kopplung abgeleiteten quadratischen Ordnungsparameter S^2 . Die Ergebnisse aus computerbasierten Molekulardynamik-Rechnungen lassen

uns, zeigen einen einzelnen Kreuzpeak, der auf schnelle Ringflips hinweist (Abbildung 1E). (ii) Phe223 und Phe250 im Kern von HELLF zeigen im Gegensatz dazu getrennte Kreuzpeaks für die $^1\text{H}^{\epsilon 1}$ - $^{13}\text{C}^{\epsilon 1}$ - und $^1\text{H}^{\epsilon 2}$ - $^{13}\text{C}^{\epsilon 2}$ -Positionen, was das Vorhandensein schneller Ringflips ausschließt (Abbildung 1D). (iii) Die Signale von Phe262 und Phe271 konnten nicht eindeutig zugeordnet werden. Ein breites Signal, das in mehreren unabhängigen Proben bei ca. 6,6 ppm/131 ppm entdeckt wurde, wird vorläufig den *meta*-CH-Stellen eines oder beider Phe-Ringe zugeschrieben (Abbildung 1D, graues Spektrum). In jedem Fall ist es offensichtlich, dass die *meta*-CH-Signale von Phe262 und Phe271 stark verbreitert sind, während ihre *para*-CH-Resonanzen scharfe Linien ergeben; diese Beobachtungen deuten stark darauf hin, dass Phe262 und Phe271 Ringflips auf einer Zeitskala durchlaufen, die zu einer maximalen Verbreiterung führt (Hunderte von ns bis Hunderte von μs ; Abbildung S2, weiter unten diskutiert; Abbildung S8).

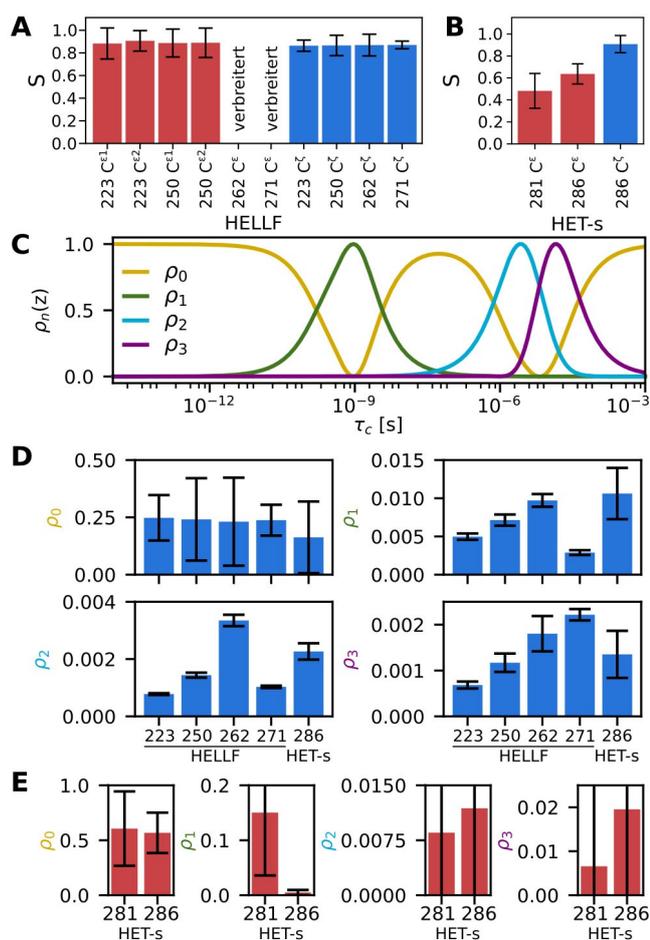


Abbildung 2. Dynamikmessungen von dipolaren ^{13}C - ^1H Ordnungsparametern und ^{13}C Relaxationsdaten von *para*-CH (blau) und *meta*-CH (rot) Positionen in Phe und Tyr. (A, B) Aus REDOR Experimenten gewonnene dipolare Ordnungsparameter. (C–E) Fits mit dem DETECTORS-Ansatz. (C) Sensitivitäten der Detektoren, die die Zeitskalen zeigen, auf denen die verschiedenen Detektoren sensitiv sind, τ_c ist die Korrelationszeit der Bewegung. Es ist zu beachten, dass ρ_0 , welches durch die Differenz von ρ_1 – ρ_3 und dem Ordnungsparameter gegeben ist, primär sub- μs Bewegung widerspiegelt, da dipolare Kopplungen einzig über Bewegung bis zu ca. $10 \mu\text{s}$ Aufschluss geben. (D, E) Positionsabhängige Reaktion auf die Detektoren, die die Amplituden der Bewegung widerspiegeln.

vermuten, dass die ρ_0 -Bewegungen für das Rückgrat meist schnellen Bewegungen (sub- μs) entsprechen.^[31]

Die *para*-CH-Stellen, die die Bewegungen der Ringachse erfassen, zeigen überwiegend schnelle Bewegungen: der größte Teil der Bewegungsamplitude wird von ρ_0 und (weniger) von ρ_1 abgedeckt; es scheint in der Tat plausibel, dass die Librationsbewegungen mit kleiner Amplitude auf kurzen Zeitskalen (ps–ns) auftreten. Die DETECTORS-Analyse der *meta*-CH-Stellen von Tyr281 zeigt, dass Ringflips vorwiegend auf kurzen Zeitskalen auftreten (meist ρ_0 und ρ_1 – ns); da Tyr281 in Richtung eines losen Hohlraumes hinweist, der von einem hochflexiblen^[31] Loop gebildet wird, erscheint dieses Ergebnis plausibel. Phe286 (HET-s) unterscheidet sich von Tyr281, da es im Wesentlichen keine ρ_1 (ns)-Reaktion, dafür aber mehr Beiträge von langsameren

Bewegungen (ρ_2 , ρ_3) zeigt. Obwohl Phe286 zur Außenseite der Fibrille zeigt, führen wir die Verlangsamung seiner Ringflips auf Kontakte mit der Oberfläche zurück, mit einer möglichen CH- π Wechselwirkung zu H ^{β} von Gln240. Diese Beobachtung steht im Einklang mit der verringerten Priorenaktivität der Mutanten F286A und Q240A,^[32] die auf ihre räumliche Nähe und ihre mutmaßliche Rolle bei der strukturellen Aufrechterhaltung der C-terminalen Taschenregion zurückzuführen ist. Für Phe262 und Phe271 (HELLF) werden keine scharfen Korrelationspeaks beobachtet und nur ein breiter Peak wird vorläufig diesen Stellen zugeordnet. Diese Verbreiterung ist vermutlich auf Bewegungen auf Zeitskalen von Hunderten von ns bis zu einer ms zurückzuführen (Abbildung S2). Temperaturabhängige Spektren zeigen, dass die Intensität dieses breiten Peaks mit der Temperatur zunimmt (Abbildung S8), was darauf hindeutet, dass eine Beschleunigung der Bewegungen zu niedrigeren Relaxationsratenkonstanten führt und somit die Bewegung auf einer Zeitskala kleiner einer μs stattfindet. Beachtenswert ist, dass die Ringachsen von Phe262 und Phe271 keine umfangreichen μs -Bewegungen erfahren, wie man an ihren hohen Ordnungsparametern erkennen kann (Abbildung 2A). Ein geringer NERRD-Effekt deutet auf das Vorhandensein von μs -Bewegungen mit kleiner Amplitude hin (Abbildung S7E). Zusammengenommen scheinen die oberflächenexponierten Seitenketten von Phe262 und Phe271 ns–s-Dynamik zu erfahren.

Um zu überprüfen, ob der Amyloidkern Atmungsbewegungen zulässt oder nicht, haben wir untersucht, ob die beiden Phe-Reste im Kern von HELLF, Phe223 und Phe250, Ringflips ausführen. Die Tatsache, dass einzelne Kreuzpeaks für die $^1\text{H}^{\text{e}1}\text{-}^{13}\text{C}^{\text{e}1}$ und $^1\text{H}^{\text{e}2}\text{-}^{13}\text{C}^{\text{e}2}$ detektierbar sind, zeigt, dass es entweder keine oder sehr langsame Flips gibt (mindestens zehn bis hundert ms). Wir haben longitudinale Austauschexperimente durchgeführt, bei denen die Detektion der indirekten chemischen Verschiebung von ^{13}C und die ^1H Detektion durch eine C_z -Mischphase getrennt sind. Während dieser Phase können zwei Prozesse ablaufen: (i) im Falle von Ringflips ist die ^{13}C -Frequenz einer ϵ -Seite mit der ^1H -Frequenz der anderen ϵ -Seite korreliert; (ii) in Abwesenheit von Ringflips tauschen die beiden ^{13}C -Kerne im Ring ihre Magnetisierung durch (protonengetriebene) Spindiffusion aus. Das Ergebnis wäre identisch, d.h. es würden $^{13}\text{C}^{\text{e}1}\text{-}^1\text{H}^{\text{e}2}$ - und $^{13}\text{C}^{\text{e}2}\text{-}^1\text{H}^{\text{e}1}$ -Kreuzpeaks beobachtet werden. Eine Reihe von Messungen mit zunehmender Mischzeit zeigt tatsächlich Kreuzpeaks (Abbildung 3A), deren Intensität mit einer Ratenkonstante von ca. 100 ms ansteigt (Abbildung 3B und C und S9; Tab. S6). Die beiden Prozesse, Ringflips und Spindiffusion, können voneinander getrennt werden, da ersterer zwar temperaturabhängig, aber nicht MAS-frequenzabhängig ist, während die Spindiffusion stark MAS-frequenzabhängig ist.^[40] Experimente bei niedrigeren MAS-Frequenzen zeigen einen stark beschleunigten Intensitätsanstieg der Kreuzpeaks (Abbildung 3C, rechts), was eindeutig beweist, dass die beobachteten Kreuzpeaks auf Spindiffusion und nicht auf Ringflips zurückgeführt werden können. Darüber hinaus haben die Kreuzpeaks zwischen Phe223 und Phe250 eine ähnliche Aufbauratenkonstante, und diese Signale können nur auf Magnetisie-

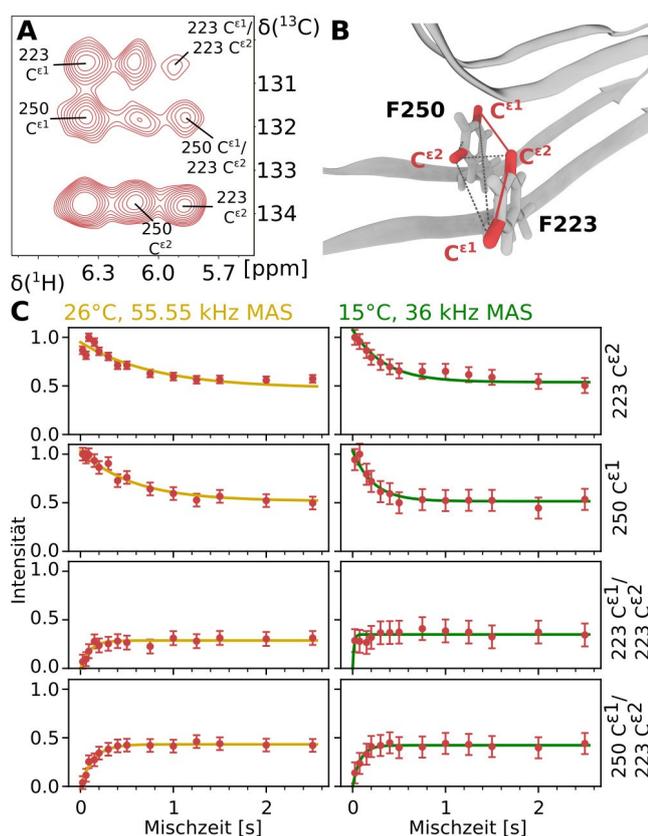


Abbildung 3. ^{13}C Experiment mit longitudinaler Mischphase (Spindiffusion/Austauschspektroskopie, EXSY; engl: EXchange Spectroscopy) der *meta*-CH-Stellen von Phe223 und Phe250 (HELLF). (A) Austauschspektrum mit einer Mischzeit von 2500 ms. (B) Position der zwei aromatischen Ringe in einer der Strukturen von PDB 6EKA.^[33] (C). Zeitliche Evolution der Peakintensitäten als Funktion der longitudinalen Mischzeit.

rungsaustausch und nicht auf Ringflips zurückzuführen sein. Zur Unterstützung dieser Ansicht zeigen Spindynamiksimulationen einen Transfer auf einer Zeitskala von einigen zehn ms (Abbildung S10). Diese Daten lassen den Schluss zu, dass die Phe-Ringe (Phe223 und Phe250) im hydrophoben Kern zumindest auf Zeitskalen von Hunderten von Millisekunden keine Umkehrungen erfahren, was das Fehlen von "atmenden Bewegungen" der Fibrille auf dieser Zeitskala belegt.

Nachdem wir gezeigt hatten, dass die aromatischen Ringe im Kern von HELLF starr sind – im Gegensatz zu dem zuvor ermittelten Strukturensamble – führten wir neue Strukturberechnungen durch: Wir ergänzten die zuvor verwendeten Abstandsbeschränkungen durch neun zusätzliche, die in dieser Arbeit ermittelt wurden und die Phe223 und Phe 250 einbeziehen (Details finden sich in der Bildunterschrift von Abbildung S11). Das daraus resultierende NMR-Konformationsensamble (Abbildung S11) zeigt eine besser definierte, übereinanderliegende Position von Phe 223 und Phe 250, wodurch die Dynamikdaten mit dem strukturellen Ensemble in Einklang gebracht werden.

Zusammenfassung

Zusammenfassend haben wir gezeigt, dass spezifische $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^2\text{H}$ -Markierung mit empfindlicher ^1H -MAS NMR einen detaillierten Einblick in die Ringdynamik in Amyloidfibrillen ermöglicht. Wir finden eine Vielfalt an dynamischen Szenarien, wobei Ringflips auf Zeitskalen von einigen Nanosekunden bis zu (mindestens) vielen hundert Millisekunden auftreten. Interessant ist, dass die Phe-Ringe an der Außenseite der Fibrille (Phe262, Phe271, Phe286) alle langsame Ringflips durchlaufen (Hunderte von ns bis μs). Dies steht im Gegensatz zu z.B. Phe-Ringen an der Oberfläche des globulären mikrokristallinen Ubiquitins (ca. 10 ns)^[41] und deutet darauf hin, dass aromatische Ringflips durch mögliche transiente Seitenketten-Seitenketten-Kontakte an der Fibrilloberfläche verlangsamt werden könnten, möglicherweise durch CH- π -Wechselwirkungen. Alternativ oder zusätzlich könnten die Ringe, die in den HET-s- und HELLF-Strukturen exponiert liegen, in Kontakt mit benachbarten Protofibrillen stehen. Tatsächlich zeigte eine niedrig aufgelöste Elektronenmikroskopiestruktur von HET-s,^[42] das bei pH 3 assembliert wurde, enge seitliche Kontakte zwischen benachbarten Fibrillen. Die in der vorliegenden Studie verwendeten Fibrillen, die bei neutralem pH-Wert assembliert wurden, unterscheiden sich jedoch deutlich von denen unter sauren Bedingungen assemblierten Fibrillen.^[43] Frühere NMR-Daten deuten darauf hin, dass es in MAS NMR-Studien von HELLF^[33] und HETS^[34] keine stabilen, definierten Kontakte zwischen den Protofilamenten gibt, und NMR-Daten zur Zugänglichkeit von Lösungsmitteln lassen außerdem vermuten, dass das Protofilament von Wasser umgeben ist.^[29] Masse-pro-Länge-Messungen (engl.: mass-per-length) bestätigen, dass sowohl HET-s als auch HELLF unter den für die NMR-Spektroskopie verwendeten Bedingungen als ein einziges Filament vorliegen.^[33,44] Hervorzuheben ist, dass unsere Ergebnisse darauf hindeuten, dass die strukturelle Heterogenität, die auf der Ebene der aromatischen Seitenketten im MAS NMR-Strukturensamble der Amyloidfibrillen beobachtet wird (hier: Phe223 und Phe 250, die in der hinterlegten MAS NMR-Struktur ungeordnet sind), nicht die tatsächliche Dynamik widerspiegelt. Diese Studie unterstreicht die Fähigkeit der MAS NMR, die Bestimmung von Abstandsbeschränkungen und spezifische Dynamikmessungen zu kombinieren, um eine konformationelles Bild der Cross- β -Amyloidarchitektur zu erstellen.

Danksagung

Wir danken Albert A. Smith (Leipzig) für aufschlussreiche Diskussionen. Diese Arbeit wurde mit Mitteln des Europäischen Forschungsrats (StG-2012-311318 an P.S.) unterstützt und nutzte die Plattformen des Grenoble Instruct-ERIC Center (ISBG; UMS 3518 CNRS-CEA-UJF-EMBL) im Rahmen der Grenoble Partnership for Structural Biology (PSB) sowie die Einrichtungen und das Fachwissen der Biophysical and Structural Chemistry Platform (BPCS) am IECB, CNRS UAR3033, INSERM US001 und der Universität Bordeaux.

Interessenkonflikt

Die Autoren erklären, dass keine Interessenkonflikte vorliegen.

Erklärung zur Datenverfügbarkeit

Die Daten, die die Ergebnisse dieser Studie unterstützen, sind im *ISTA research explorer* unter <http://doi.org/10.15479/AT:ISTA:12497> frei zugänglich.

Stichwörter: Aromatische Seitenketten · Isotopenmarkierung · Proteindynamik · Ringflips · Spinrelaxation

-
- [1] H.-X. Zhou, J. A. McCammon, *Trends Biochem. Sci.* **2010**, *35*, 179.
- [2] E. Lanzarotti, L. A. Defelipe, M. A. Marti, A. G. Turjanski, *J. Cheminf.* **2020**, *12*, 30.
- [3] S. Burley, G. A. Petsko, *Science* **1985**, *229*, 23.
- [4] G. B. McGaughey, M. Gagné, A. K. Rappé, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 15458.
- [5] T. Steiner, G. Koellner, *J. Mol. Biol.* **2001**, *305*, 535.
- [6] M. F. Perutz, *Philos. Trans. R. Soc. A* **1993**, *345*, 105.
- [7] J. C. Ma, D. A. Dougherty, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1303.
- [8] E. Gazit, *FASEB J.* **2002**, *16*, 77.
- [9] I. D. Campbell, C. M. Dobson, R. J. P. Williams, *Proc. R. Soc. London Ser. B* **1975**, *189*, 503.
- [10] G. Wagner, A. DeMarco, K. Wüthrich, *Biophys. Struct. Mech.* **1976**, *2*, 139.
- [11] K. Wüthrich, G. Wagner, *Trends Biochem. Sci.* **1978**, *3*, 227.
- [12] J. J. Skalicky, J. L. Mills, S. Sharma, T. Szyperski, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 388.
- [13] M. Hattori, H. Li, H. Yamada, K. Akasaka, W. Hengstenberg, W. Gronwald, H. R. Kalbitzer, *Protein Sci.* **2004**, *13*, 3104.
- [14] M. Dreydoppel, B. Dorn, K. Modig, M. Akke, U. Weininger, *JACS Au* **2021**, *1*, 833.
- [15] G. Wagner, *FEBS Lett.* **1980**, *112*, 280.
- [16] L. Mariño Pérez, F. S. Ielasi, L. M. Bessa, D. Maurin, J. Kragelj, M. Blackledge, N. Salvi, G. Bouvignies, A. Palencia, M. R. Jensen, *Nature* **2022**, *602*, 695.
- [17] M. Akke, U. Weininger, *J. Phys. Chem. B* **2023**, *127*, 591.
- [18] U. Weininger, M. Respondek, C. Low, M. Akke, *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117*, 9241.
- [19] U. Weininger, K. Modig, M. Akke, *Biochemistry* **2014**, *53*, 4519.
- [20] H. N. Raum, M. Dreydoppel, U. Weininger, *J. Biomol. NMR* **2018**, *72*, 105.
- [21] V. Kasinath, K. G. Valentine, A. J. Wand, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 9560.
- [22] R. J. Lichtenecker, K. Weinhäupl, W. Schmid, R. Konrat, *J. Biomol. NMR* **2013**, *57*, 327.
- [23] P. Schanda, M. Ernst, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2016**, *96*, 1.
- [24] P. Paluch, T. Pawlak, A. Jeziorna, J. Trébosc, G. Hou, A. Vega, J.-P. Amoureux, M. Dracinsky, T. Polenova, M. J. Potrzebowski, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17*, 28789.
- [25] C. Gall, T. Cross, J. DiVerdi, S. Opella, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1982**, *79*, 101.
- [26] L. Vugmeister, D. Ostrovsky, T. Villafranca, J. Sharp, W. Xu, A. S. Lipton, G. L. Hoatson, R. L. Vold, *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119*, 14892.
- [27] F. Hu, W. Luo, M. Hong, *Science* **2010**, *330*, 505.
- [28] D. F. Gauto, P. Macek, A. Barducci, H. Fraga, A. Hessel, T. Terauchi, D. Gajan, Y. Miyanoiri, J. Boisbouvier, R. Lichtenecker, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 11183.
- [29] H. Van Melckebeke, P. Schanda, J. Gath, C. Wasmer, R. Verel, A. Lange, B. H. Meier, A. Böckmann, *J. Mol. Biol.* **2011**, *405*, 765.
- [30] I. Kheterpal, A. Williams, C. Murphy, B. Bledsoe, R. Wetzel, *Biochemistry* **2001**, *40*, 11757.
- [31] A. A. Smith, E. Testori, R. Cadalbert, B. H. Meier, M. Ernst, *J. Biomol. NMR* **2016**, *65*, 171.
- [32] A. Daskalov, M. Gantner, M. A. Wälti, T. Schmidlin, C. N. Chi, C. Wasmer, A. Schütz, J. Ceschin, C. Clavé, S. Cescau, B. Meier, R. Riek, S. J. Saupe, *PLoS Pathog.* **2014**, *10*, e1004158.
- [33] A. Daskalov, D. Martinez, V. Coustou, N. El Mammeri, M. Berbon, L. B. Andreas, B. Bardiaux, J. Stanek, A. Noubhani, B. Kauffmann, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2021**, *118*, e2014085118.
- [34] H. Van Melckebeke, C. Wasmer, A. Lange, E. Ab, A. Loquet, A. Böckmann, B. H. Meier, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 13765.
- [35] A. B. Siemer, A. A. Arnold, C. Ritter, T. Westfeld, M. Ernst, R. Riek, B. H. Meier, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 13224.
- [36] R. Kurbanov, T. Zinkevich, A. Krushelnitsky, *J. Chem. Phys.* **2011**, *135*, 184104.
- [37] J. R. Lewandowski, H. J. Sass, S. Grzesiek, M. Blackledge, L. Emsley, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 16762.
- [38] V. Kurauskas, S. A. Izmailov, O. N. Rogacheva, A. Hessel, I. Ayala, J. Woodhouse, A. Shilova, Y. Xue, T. Yuwen, N. Coquelle, et al., *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 145.
- [39] A. A. Smith, M. Ernst, B. H. Meier, *J. Chem. Phys.* **2018**, *148*, 045104.
- [40] A. Grommek, B. H. Meier, M. Ernst, *Chem. Phys. Lett.* **2006**, *427*, 404.
- [41] D. F. Gauto, O. O. Lebedenko, L. M. Becker, I. Ayala, R. Lichtenecker, N. R. Skrynnikov, P. Schanda, *J. Struct. Biol. X* **2023**, *7*, 100079.
- [42] N. Mizuno, U. Baxa, A. C. Steven, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 3252.
- [43] R. Sabaté, U. Baxa, L. Benkemoun, N. S. de Groot, B. Coullary-Salin, M.-I. Maddelein, L. Malato, S. Ventura, A. C. Steven, S. J. Saupe, *J. Mol. Biol.* **2007**, *370*, 768.
- [44] B. Chen, K. R. Thurber, F. Shewmaker, R. B. Wickner, R. Tycko, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 14339.

Manuskript erhalten: 30. Dezember 2022

Akzeptierte Fassung online: 4. Februar 2023

Endgültige Fassung online: 27. März 2023