

Allosterie über eine ein intermolekulares dynamisches Netzwerk beherbergende Protein-Protein-Grenzfläche

Sara Medina Gomez, Tye I. Gonzalez, Suresh K. Vasa, und Rasmus Linser*

Zusatzinformationen zu diesem Artikel finden Sie über einen Link am Ende des Dokuments.

Abstract: Die Bewegungseigenschaften von Proteinen bestimmen Erkennung, Katalyse und Regulation. Die Dynamik interagierender Aminosäurereste kann intramolekulare dynamische Netzwerke bilden – gegenseitige Abhängigkeiten, die von der Evolution fein abgestimmt wurden, um diversen funktionellen Aspekten zu dienen. Die konstruktive Interaktion von Resten aus *verschiedenen* Proteinen zum Aufbau *intermolekularer* dynamischer Netzwerke ist ähnlich wahrscheinlich, jedoch aufgrund der interferierenden Assoziations-/Dissoziationsdynamik experimentell deutlich schwieriger zugänglich. Hier verwenden wir Festkörper-NMR-Spektroskopie bei schneller Rotation um den magischen Winkel, insbesondere ^{15}N $R_{1\rho}$ NMR-Relaxationsdispersion, in Kombination mit Molekulardynamiksimulationen zur mechanistischen Erfassung der Hierarchie einzelner Bewegungen an einem Kristall-Kristall-Kontakt, d.h. ohne Translationsbewegung, auf der μs -Zeitskala. Im Gegensatz zum Monomer, bei dem bestimmte Mutationen lediglich lokale Veränderungen zur Folge haben, koppeln spezifische intermolekulare Wechselwirkungen hier die Bewegungseigenschaften entfernter Reste desselben Proteins. Die aus dieser rein konzeptionellen Arbeit gewonnenen mechanistischen Erkenntnisse könnten unser Verständnis dafür verbessern, wie intramolekulare Allosterie durch intermolekulare Wechselwirkungen, d.h. über den Aufbau dynamischer Netzwerke aus zuvor isolierten Elementen, gebildet werden kann.

Neben der Struktur und den ortsspezifischen chemischen Eigenschaften stellt die Bewegung eine der wichtigsten Säulen der Proteinfunktionalität dar. Neben der Translationsbewegung und Assoziations-/Dissoziationsereignissen

ermöglicht *interne* Dynamik Übergänge zwischen verschiedenen Konformationen mit sehr unterschiedlichen Eigenschaften. Darüber hinaus sind kleinere lokale Fluktuationen ebenso wichtig für die thermodynamische Günstigkeit solcher Konformationen, Übergänge, Bindungsaffinitäten und chemischer Umwandlungen.^[1] Diese Dynamik ist in komplexer Art und Weise von internen und externen Parametern abhängig. Daher ermöglichen sie die effektive Modulierung von Proteinfunktionalität in Abhängigkeit von externen Regulatoren, Rückkopplungsmechanismen und anderen Bedingungen.^[2]

Intramolekulare dynamische Netzwerke zwischen Resten mit voneinander abhängigen Bewegungseigenschaften ermöglichen allosterische Kommunikation zwischen räumlich entfernten Positionen,^[3] ein von der Evolution fein abgestimmtes Regulationssinstrument, das die verschiedenen Aspekte der Proteinfunktion optimal orchestriert.^[4] Orthosterische Interaktionspartner können, wie in der aktiven Tasche bindende kleine Liganden, Interaktionsstellen einfach lokal blockieren. Im Gegensatz dazu ermöglichen dynamische Netzwerke einen Informationsfluss von weiter entfernten allosterischen Angriffspunkten zur Regulation der lokalen Funktionalität. Dies ermöglicht Selektivität, obwohl z.B. aktive Taschen innerhalb ganzer Enzymfamilien häufig fast identisch sind.^[1,5] Dieser Effekt lässt sich aus globalen Verschiebungen in Konformationsensembles ableiten, z.B. der Stabilisierung einzelner Konformationen innerhalb einer heterogeneren Energielandschaft, wenn der Inhibitor an Stellen bindet, die vom aktiven Zentrum räumlich weit entfernt sind.^[6] Daher können bindungs-(in)kompetente oder katalytisch (un)produktive Konformationen angereichert werden.^[7] Während in einigen Fällen diskrete Konformationen erfasst werden können, sind andere Fälle nicht mit nennenswerten strukturellen Unterschieden im Vergleich zum Apoprotein verbunden. Hier wird ein Einfluss speziell auf die erforderliche Proteindynamik angenommen.^[8]

Es wird angenommen, dass die Wechselwirkungen, die bei der Assoziation zweier oder mehr interagierender Proteine entstehen, neue, intermolekulare dynamische Netzwerke bilden, die in der Lage sind, Informationen zwischen den einzelnen Proteinen zu übermitteln.^[9] Diese Bewegungabhängigkeiten, insbesondere hinsichtlich des konformationellen Austausches auf der μs -Zeitskala, sind mit den heutigen strukturellen Techniken nur schwer zu erfassen. Daher hält sich ihr mechanistisches Verständnis durch kombinierte Simulation und experimentelle Verifizierung bei der großen Bandbreite regulatorischer Protein-Protein-

[*] Dr. S. Medina Gomez, T. I. Gonzalez, Dr. S. K. Vasa, Prof. Dr. R. Linser
Fakultät für Chemie und Chemische Biologie
Technische Universität Dortmund
Otto-Hahn-Str. 4a, 44227 Dortmund, Deutschland
E-mail: rasmus.linser@tu-dortmund.de

© 2024 Die Autoren. Angewandte Chemie veröffentlicht von Wiley-VCH GmbH. Dieser Open Access Beitrag steht unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution License, die jede Nutzung des Beitrages in allen Medien gestattet, sofern der ursprüngliche Beitrag ordnungsgemäß zitiert wird.

Komplexe, einschließlich sehr unterschiedlicher Lebensdauern, bisher eher in Grenzen. Im Gegensatz zu einem rigidisierenden Effekt von *kleinen* Liganden,^[10] einschließlich allosterischer Modulatoren,^[6d,11] ist es denkbar, dass die Assoziation eines *Proteinbindungspartners* ein Netzwerk erweitern kann, indem eine dynamische Kopplung von ansonsten entkoppelten Regionen innerhalb eines Proteins auf *konstruktive* Weise eingeführt wird. Eine solche Modulation (Bildung) von dynamischen Netzwerken könnte den intramolekularen Informationsfluss effektiv modulieren, anstatt nur die Dynamik durch zusätzliche sterische Anforderungen zu unterbinden. Dies würde die thermodynamischen Eigenschaften des Ensembles (z.B. Affinitäten zu zusätzlichen Bindungspartnern) selbst bei kurzen Lebensdauern der einzelnen Komplexe, die sich innerhalb eines dynamischen Gleichgewichts bilden, wirksam verändern.

Um die (hypothetische) Möglichkeit zu prüfen, ob solche Protein-Protein-Wechselwirkungen ehemals entkoppelte Stellen miteinander verbinden können, untersuchen wir hier die Bewegungsabhängigkeiten zwischen zwei gegenüberliegenden Stellen einer SH3-Domäne. Die „zangenartige“ Struktur dient im biologischen Kontext dem Einfangen prolinreicher Peptidliganden in einer Vielzahl regulatorischer Kaskaden (siehe eine Visualisierung der Kavität in Abbildung S1) und ist in der Vergangenheit vielfältig erforscht worden.^[12] Die Erfassung der internen Bewegungseigenschaften von Interesse würde üblicherweise durch interferierende Assoziations-/Dissoziationsdynamik zwischen Protein und Peptid beeinträchtigt. Aus diesem Grund wird die Tasche hier, die Reste eines anderen SH3-Monomers bindend, innerhalb eines Kristall-Kristall-Kontakts untersucht, der allerdings die biologische Bindung von Zielpeptiden nachahmt.^[12b] Auf der Grundlage unserer bisherigen Arbeit^[13] erwarteten wir, dass dieses Interface ein μ s-Zeitskalen-dynamisches Netzwerk beherbergt. Durch die Einführung lokaler Perturbationen und das Auslesen der sich ergebenden Veränderungen in der Umgebung gelingt es uns, eine Hierarchie einzelner μ s-Zeitskalen-Dynamiken für den konformationellen Austausch des Proteinerückgrats zu identifizieren, die zwei Stellen, welche im monomeren Protein keine Verbindung haben, effektiv miteinander verbindet.

Der *RT*-Loop in der monomeren SH3-Domäne des Hühner- α -Spektrins zeigt in Lösung ein breites Spektrum intrinsischer Flexibilität.^[13b,14] In früheren Arbeiten haben wir gezeigt, dass im Zusammenhang mit einem Kristallgitter einige seiner Bewegungsmodi bis in den μ s-Bereich verlangsamte sind, wodurch es auf $R_{1\rho}$ NERD Experimente anspricht. (Diese Experimente im Rahmen von Fast-Magic-Angle-Spinning und Protonendetektion ermöglichen ein selektives Auslesen von Bewegungen speziell auf der Zeitskala um 10 μ s.^[15]) Ein Vergleich von experimentellen mit simulierten Daten für einen konformationellen Austausch mit verschiedenen potenziellen Konformationen für den angeregten Zustand deutete damals auf eine Verdrehung im Rückgrat als statistisch gerechtfertigte Erklärung für den Rest R21 an der Spitze des *RT*-Loops hin.^[13b] Die Tasche, die es mit dem *n*-*Src*-Loop bildet, ist im Apo-Monomer gut zugänglich

(Abbildung S1). Interessanterweise bildet der Rest 21 des *RT*-Loops im Falle eines kristallinen Gitters intermolekulare Wechselwirkungen mit dem C- und dem N-Terminus eines zweiten Monomers aus, die auch den *n*-*Src*-Loop, insbesondere N38, des ersten Monomers kontaktieren. Abbildung 1A zeigt die Einbettung des zentralen Restes R21 an der Protein-Protein-Grenzfläche. Aus Neugier bzgl. des möglichen Zusammenspiels von Bewegungsereignissen in dieser besonderen Sandwich-Architektur haben wir spezifische lokale Störungen generiert, indem wir den Rest R21 mutierten, alles andere aber identisch beließen. Im monomeren Protein in Lösung bestätigte sich, dass eine Mutation zu Alanin das erwartete Verhalten einer *lokalen* Störung ergibt und nur an der Mutationsstelle selbst größere chemische Verschiebungsänderungen (CSPs) entstehen (Abbildung 1B, C und F). Dasselbe gilt für den Austausch von R21 durch Aspartat, was zu ähnlichen CSPs wie R21A führt. (Siehe SI, Abbildung S2, für die HSQCs und CSPs der R21E-Mutante in Lösung.) Im Kontext des Kristalls (mit

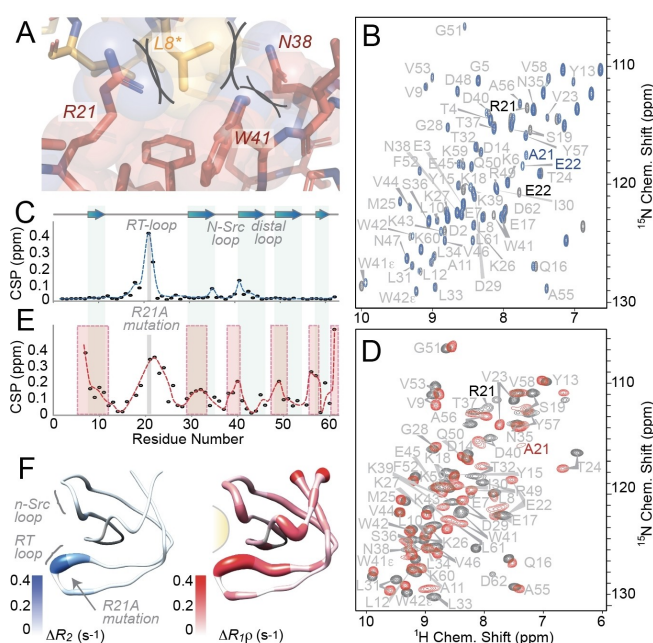


Abbildung 1. Sterischer Kontext der SH3-Peptidbindungstasche im kristallinen Zustand und Auswirkungen ihrer Mutation. **A)** Visualisierung der intermolekularen Wechselwirkungen in der Tasche für SH3-Kristalle (PDB-Struktur 2NUZ). R21 und N38, mit einem Abstand von ~ 12 Å, sowie verbrückende Reste, die sich berühren, sind namentlich bezeichnet. Rote und gelbe Strukturen kennzeichnen ein erstes bzw. ein zweites Monomer. Die Van-der-Waals-Radien der Schweratome sind halbtransparent dargestellt. Das Sternchen für L8 kennzeichnet es als zum oberen Monomer gehörend. **B)** Überlagerung von HSQC-Spektren für wt (grau) und mutiertes (blau) SH3 in Lösung. **C)** Änderung der chemischen Verschiebungen (CSPs) durch R21A-Mutation in Lösung. **D)** Überlagerung von Festkörper-NMR-H/N-Korrelationen für wt (grau) und mutiertes (rot) SH3. **E)** Änderung der chemischen Verschiebungen durch die R21A-Mutation im Kristall. Die Regionen, die über den lokalen Effekt (graue Linie) hinaus betroffen sind, sind durch rote Kästen gekennzeichnet. **F)** Darstellung der CSPs in Lösung (links) und im Festkörper (rechts) auf der SH3-Struktur. Der gelbe Halbkreis deutet die intermolekularen Wechselwirkungen der Tasche an.

gleichem Gitter wie für den wt, siehe Abbildung S3^[13b,14] dagegen führt die R21A-Mutation zu CSPs in *diversen* Bereichen der Primärsequenz (Abbildung 1D, E und F). Naiv betrachtet könnten diese Veränderungen einfach auf veränderte elektrostatische Effekte zurückzuführen sein, die sich in *mehreren* in der Nähe liegenden Resten an der Monomer-Monomer-Grenzfläche zeigen, auch wenn diese überraschend weit gestreut wären.

Um das System genauer zu untersuchen, haben wir uns die *Proteindynamik* und ihre Veränderungen bei Mutationen genau angesehen. Zunächst nahmen wir in wt und R21A Mutante eine Reihe von Redfield-Relaxationsdaten (R_1 , R_2 und heteronuklearer Steady-State-NOE) für ^{15}N in Lösung auf und errechneten die spektrale Dichte für bestimmte Frequenzen (Abbildungen S4 und S5). Abbildung 2A vergleicht die R_2 -Raten von wt und Mutante als ein Parameter, der die Beiträge sowohl von schnellen als auch langsamen Bewegungen am besten abbildet. Angesichts des lokalen Charakters der Perturbation ergeben sich für die gegenüberliegende Seite der Bindungstasche (Rest N38) keine Änderungen. Bei Vorhandensein intermolekularer Wechselwirkungen durch das Kristallgitter sind die Bewegungseigenschaften dagegen nicht nur an der Mutationsstelle verändert. Abbildung 2B zeigt, dass zum einen die $R_{1\rho}$ Rate der Position 21 bei 20 kHz Spin-Lock-Feldstärke leicht

von etwa 10,7 auf 12,7 s^{-1} ansteigt. Interessanterweise scheint die Dynamik hier auch am N- und C-Terminus, an der Seitenkette von W41 und insbesondere an N38 beeinträchtigt zu sein. $R_{1\rho}$ Raten für diese Reste bei 20 kHz Spin-Lock-Feldstärke steigen für L61, W41 ϵ und N38 von 0,9 auf 4,9, von 6,1 auf 8,8 bzw. von 5,6 auf 12,0 s^{-1} an (Abbildung 2B und C). In Übereinstimmung mit unseren Beobachtungen war die Dynamik von N38 im wt-Kristall bereits zuvor als überraschend vom Lösungszustand abweichend beschrieben worden.^[13a] D62 und E7 zeigen bereits im wt-Kristall sehr hohe $R_{1\rho}$ Raten (7,7 bzw. 16,3 s^{-1}). Diese Reste sind im Kristall der Mutante aufgrund eines stark reduzierten Signal-zu-Rausch-Verhältnisses gar nicht mehr sichtbar/zu fitten. Dies deutet auf ein noch größeres Ausmaß an Bewegung in der Mutante hin, die sich den dipolaren Magnetisierungs-transfers nun noch stärker entzieht als der wt. Insgesamt scheint eine Flexibilisierung genau für die Reste stattzufinden, die an der in Abbildung 1A gezeigten Schnittstelle beteiligt sind.

Um den Einfluss der Mutation auf die anderen Spins in der Nachbarschaft genauer zu charakterisieren, führten wir für wt und R21A-Mutante ^{15}N -NERRD-Experimente durch, von denen ein Teil der Daten in Abbildung 3A zu sehen ist. ^{15}N NERRD erfasst in $R_{1\rho}$ Experimenten mit schnellem MAS über eine teilweise Rückkopplung anisotroper Wechselwirkungen in der Nähe der Rotor-Resonanz-Bedingung ausschließlich die H–N-Bindungsvektorfuktuationen im μs -Bereich.^[15] Für Position 21 wird bereits im wt-Protein eine ausgeprägte Dynamik auf der μs -Zeitskala beobachtet.^[13b,16] In der Mutante wird die erwartete zusätzliche Beschleunigung der Fluktuation des Amidbindungsvektors deutlich, die vermutlich durch Verkürzung und „Entladen“ der R21-Seitenkette verursacht wird. Wenn die Temperatur der Messung gesenkt wird, entzieht sich der Rest einer quantitativen Charakterisierung vollständig, was vermutlich auf eine Kombination aus der geringen CP-Transfereffizienz und einer Austauschverbreiterung zurückzuführen ist (Abbildung S6). In jedem Fall ist eine weitere Zunahme der Dynamik für A21 im Vergleich zu R21 im Wildtyp offensichtlich. Noch wichtiger ist, dass wir in Übereinstimmung mit dem oben Beschriebenen die gleiche Mobilisierung auch für den Rest N38 sehen, der ebenfalls von einem gut zu fittenden Profil in eine ähnliche Situation wie A21 übergeht. L8 und L61 sind die äußersten Reste des N- bzw. C-Terminus, die in beiden Konstrukten noch zugänglich sind. Für diese, wie auch W41 ϵ (verglichen in Abbildung S7), wird eine starke Initiierung von Bewegung auf der μs -Zeitskala beobachtet. Eine Zusammenstellung aller NERRD-Profile findet sich in Abbildungen S9 und 10. Darüber hinaus zeigt Abbildung S8 R_1 Daten, in denen N38, L8 und W41 ϵ erneut erhöht sind, wobei sich N38 um mehr als den Faktor zwei ändert, d.h. von 0,07 auf 0,18 s^{-1} . Abbildung 3B zeigt die Order Parameter aus den NERRD Fits der einzelnen Reste als Funktion der Sequenz. Man beachte, dass diese nur den Beitrag auf der μs -Zeitskala widerspiegeln und damit Werte aufweisen, die z.B. im Vergleich zu S^2 über Redfield-Ansätze in Lösung klein sind. Zusätzlich zu der NERRD-basierten Flexibilität ($1-\text{S}^2$) für das wt-Protein vor der Mutation, in Abbildung 3C auf der Struktur repräsentiert,

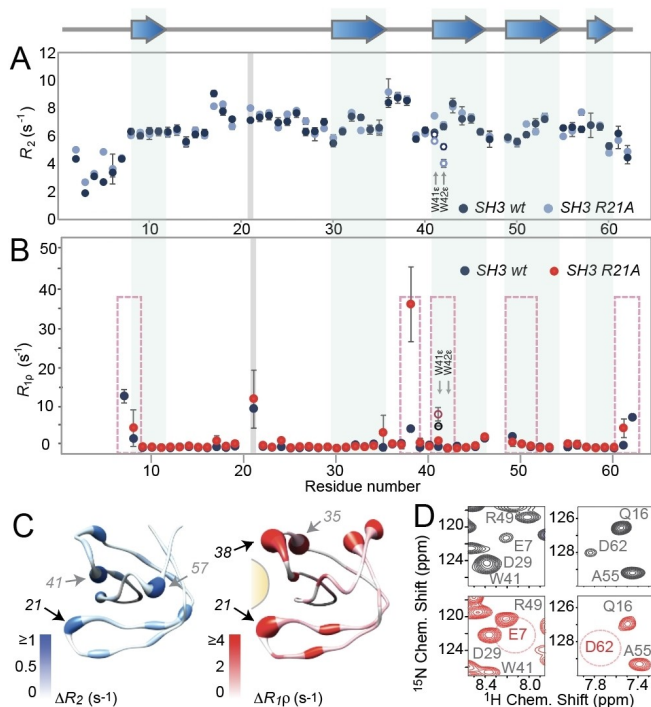


Abbildung 2. Lokale vs. globale Veränderungen der Proteindynamik. **A)** Lösungs-NMR ^{15}N R_2 Raten als Funktion der Sequenz. R21A-Daten, korrigiert um eine geringfügige globale Abnahme von R_2 um $\sim 0,5 \text{ s}^{-1}$ (vgl. Abbildung S4), die wahrscheinlich auf leicht verringerte Taumelkorrelationszeiten/Stokes-Radius zurückzuführen ist. **B)** Festkörper-NMR ^{15}N $R_{1\rho}$ -Raten bei 20 kHz Spin-Lock-Feldstärke. **C)** ^{15}N R_2 (links) und $R_{1\rho}$ Daten (rechts) aus Feldern A) bzw. B), auf der Struktur repräsentiert. **D)** Abschwächung der E7- und D62-Signale bei wt- und mutiertem Protein in hNH-Experimenten.

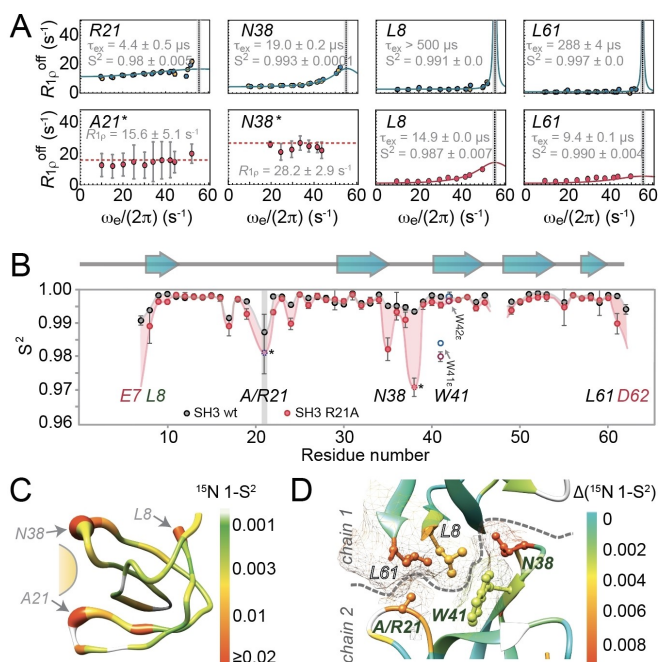


Abbildung 3. ^{15}N $R_{1\rho}$ NERD-Daten und Lokalisierung der Auswirkungen der R21-Mutation auf die Bewegung. **A)** NERD-Profil für die Reste 21, 38, 8 und 61 im wt-Protein (oben) und in der Mutante (unten). Die flache Linie mit einem hohen y-Achsenabschnitt, die als bester Fit für A21 und N38 in der Mutante erhalten wurde, zeigt eine Bewegung auf, die das für NERD zugängliche Zeitfenster überschreitet. **B)** NERD-basierte Order Parameter (bezogen nur auf den konformationellen Austausch auf der μs -Zeitskala) als Funktion der Sequenz. Für A21 und N38 im Falle der Mutante (Sternchen und gestrichelte Datenpunkte) werden NERD-Fits gezeigt, obwohl ihre schnelle Bewegung das auf χ^2 basierende Signifikanzkriterium im Vergleich zu einer flachen Linie ($p < 0,05$) verletzt. Die Trendlinie für die Endpunkte der Mutante ist willkürlich extrapoliert, um widerzuspiegeln, dass weiter reduzierte dipolare Magnetisierungsübertragungseffizienzen eine nochmalige Zunahme der Bewegung aufzeigen. **C)** NERD-basierte $1-S^2$ Werte für SH3 R21A dargestellt auf der Röntgenstruktur (2NUZ), welche die μs -Mobilität, lokalisiert in der Tasche und dem N-Terminus, sowohl als Banddicke als auch über den gezeigten Farbcode repräsentiert. **D)** $\Delta(1-S^2)$ zwischen wt und Mutante, äquivalent zum roten Bereich in B), für den Bereich des Bindungsinterfaces (zwischen Tasche und Termini). Röntgenstruktur der R21A-Mutante: PDB 2F2W; der W41-Wert entspricht dem für N₆, der aussagekräftiger ist, aber fast identisch mit dem für das Backbone, siehe B. Die Grenze zwischen den Monomeren (Monomer 1 oben, Monomer 2 unten) ist durch eine gestrichelte Linie dargestellt. Fett gedruckte Beschriftungen (für A/R21, W41 und N38) bezeichnen Reste, die zum unteren Monomer gehören, gerahmte Schrift (L61 und L8) bezeichnet Reste, die zum oberen Monomer gehören. E7 und D62, in der Mutante sehr flexibel, sind nicht dargestellt. Siehe Abbildung S11 für Abbildungsteile C und D unter Verwendung eines *einfarbigen Farbverlaufs*.

zeigt Abbildung 3D die Differenzen zwischen R21A und wt im Bereich des Interfaces. Dieser Zuwachs der Rückgratbewegung auf der μs -Zeitskala durch Mutation ist auch in Abbildung 3B als rote Schattierung dargestellt.

Eine Zunahme der Flexibilität in der Umgebung einer Mutation (zusätzlich zur Flexibilisierung an der Mutationsstelle selbst) könnte sich einfach aus der generellen Änderung (Abnahme) sterischer Einschränkungen ergeben. Im

Gegensatz dazu sind dynamische Netze dafür bekannt, dass sie die Bewegungseigenschaften eines Restes mit den Bewegungseigenschaften eines anderen Restes verbinden. Es ist wichtig, sich vor Augen zu halten, dass Kopplung auf der atomaren Skala keine einfache Impulsübertragung von einem Objekt auf ein anderes bedeutet, wie in gekoppelten makroskopischen Systemen. Stattdessen geht es um die bedingten Wahrscheinlichkeiten von stochastischen, entropiegetriebenen Ereignissen, definiert durch ihre freien Aktivierungsenthalpien, die von der Umgebung abhängen, einschließlich der konformationellen Zustände, die vorübergehend von benachbarten Resten eingenommen werden.^[17]

Um die mechanistischen Grundlagen zu erfassen, die die Annahme gekoppelter Dynamik für die Reihe der im Interface miteinander verketteten Aminosäuren validieren würden, haben wir die gegenseitigen Abhängigkeiten der konformationellen Zustände mittels MD-Simulationen untersucht. Obwohl für die μs Dynamik im Fokus ein unzureichendes Sampling der Ereignisse erwartet werden muss, kann so zumindest eine qualitative Perspektive bzgl. der Mechanismen erhalten werden. Eine Simulation des monomeren Proteins (mit reduzierten sterischen Einschränkungen für R21 im Vergleich zum Kristall) liefert tatsächlich den erwarteten Peptidflip, der in früheren NMR-Studien proklamiert wurde^[13b] und mit gemischten kristallographischen Grundzustandsstrukturen für die R21G-Mutation^[14] konsistent ist (dunkelblaue Linie in Abbildung 4A). Im Gegensatz dazu ist der Flip bei der Simulation des Proteins im Kristallgitter nicht zu sehen (siehe Details zu den Simulationen in der SI). Auch dies ist angesichts der langsamen Zeitskala des Prozesses, wie sie sich in den Festkörper-NMR-Experimenten darstellt, zu erwarten. (Abbildung S12 zeigt, dass ein länger andauernder Flip bei der Verwendung von „Gaussian-accelerated“ Simulationen zu beobachten ist). Die Mutation von R21 zu Alanin hingegen beschleunigt den Flip so, dass die Simulation das Ereignis sogar bei Standard-MD insgesamt 16-mal erfasst (Abbildung 3B), was weitere Untersuchung ermöglicht. Für N38, dessen μs -Bewegung noch immer als zu langsam erwartet werden kann (fünffach langsames NERD-Profil als R21 im wt), ist noch immer keine besondere Bewegung erkennbar (Abbildung S13). Simulationen allerdings mit einem System, das so vorbereitet wurde, dass A21 im peptidgeflippten (angeregten) Zustand beginnt – was das Zeitfenster für die Untersuchung der Konsequenzen des angeregten Zustands von A21 effektiv vergrößert – sind in Abbildung 4C dargestellt. Es ist interessant zu sehen, dass, während Position 21 sich im geflippten Zustand befindet (und nur dann), N38 in derselben Kette selbst Peptidflips erfahren kann (siehe Abbildung 4D, Teil der Trajektorie für Kette C): Vier vollständige Übergänge und zwei Abschnitte mit teilweiser Drehung sind während derjenigen $0,81 \mu\text{s}$ zu sehen, in denen A21 gedreht vorliegt. Andernfalls, über insgesamt $3,29 \mu\text{s}$ in vier Ketten, kommt es für N38 zu keinerlei Verdrehung des Proteinrückgrats, nicht einmal teilweise. (Vgl. auch Abbildung S13.) Die gewählte Abhängigkeit (die Modulation der Übergangswahrscheinlichkeit für einen zweiten Rest durch den Zustand eines ersten)

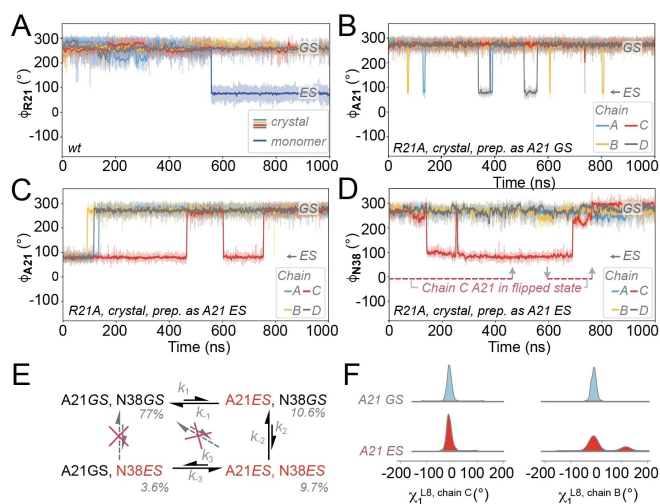


Abbildung 4. Aufklärung von mechanistischen Abhängigkeiten durch MD Simulationen. **A)** R21 ϕ Winkel im wt-Protein in monomerer (dunkelblau) und kristalliner Form (hellblau, rot, gelb und grau, keine beobachteten Flips) über 1 μ s. **B)** Beschleunigung des Peptidflips im Kristall (vier einzelne Monomere verknüpft über periodische Randbedingungen, Details siehe SI) durch die Mutation R21A. Die Monomere A, B, C und D sind durch blaue, rote, gelbe bzw. graue Linien dargestellt. **C)** und **D)** Simulation ausgehend vom A21-Peptid-geflippten Zustand, wobei in C) der A21 bzw. in D) der N38 ϕ Winkel repräsentiert ist. **E)** Abgeleitete Hierarchie des konformationellen Austauschs des Rückgrats, mit den Übergängen und relativen Verweilzeiten, welche in der Simulation über alle vier Ketten beobachtet wurden, wenn mit geflipptem A21 begonnen wird. Es ist zu beachten, dass in den Simulationen Ereignisse auf der μ s Zeitskala nicht so häufig gesammelt können, als dass eine statistisch fundierte Quantifizierung zu erhalten wäre, und die Interpretationen entsprechend auf qualitativer Ebene verbleiben müssen. **F)** Verteilung des L8 χ_1 Winkels nur über solche Frames mit A21 im GS (blau) bzw. nur über diejenigen mit A21 im ES (rot).

führt zu einer Hierarchie von Bewegungsereignissen, die die N38-Rückgratdynamik (ihre bedingte Wahrscheinlichkeit) effektiv mit der Rückgratdynamik von Position 21 koppelt. Selbst bei einem relativ kleinen periodischen System sind die verfügbaren Simulationszeiten nicht lang genug, um die Dynamik auf der μ s-Zeitskala genau zu erfassen. Es ist also zu erwarten, dass auch Flipvorgänge, die gegen diese Regel verstoßen, bei längerem Simulieren sporadisch auftreten. Aber bereits eine *asymmetrische* Wahrscheinlichkeitsverteilung, d.h. *weniger* N38-Flips im angeregten Zustand von A21 (A21 ES) als im Grundzustand (A21 GS), würde ausreichen, um eine Auswirkung des Zustands des ersten Restes auf nachgeschaltete Stellen zu folgern. Diese Konklusion scheint eine vernünftige, qualitative Interpretation im Rahmen der technischen Möglichkeiten zu sein. Um diese Kette von Ereignissen weiter zu untersuchen, haben wir uns den vermittelnden Rest L8 genauer angesehen. Insbesondere haben wir diejenigen MD-Frames, die den Rest 21 im GS enthalten, von denen mit 21 im ES separiert. Wenn sich das System im Zustand A21 GS befindet, ist der Torsionswinkel der L8-Seitenkette χ_1 auf eine einzige Konformation beschränkt. Im Gegensatz dazu ergibt sich bei A21 ES eine bimodale Verteilung, die mit den gelockerten

sterischen Einschränkungen für diese Situation übereinstimmt (Abbildungen 4F und S14). Da die einzelnen L8-Seitenketten-Rotationszustände interessanterweise auf einer viel schnelleren Zeitskala wechseln, scheint diese Übertragung auf der Grundlage von Ensemble-Eigenschaften zu erfolgen (effektiver Mittelwert der L8-Zustände bzgl. der schnellen Zeitskala), die vom Zustand der Rückgratkonformation des Restes 21 abhängen. Leider sind *experimentelle* Daten zur genauen Bestimmung von χ_1 Flips unter MAS bisher durch technische Hürden limitiert. Das Experiment zeigt auch, dass die Rückgratanteile anderer Reste für die Mutante eine beschleunigte Dynamik aufweisen, insbesondere L8, N61 und W41, die nun die μ s-Zeitskala erreichen. Leider können spezifische Bewegungsmechanismen nicht mit MD erfasst werden, da die Bewegungen des Rückgrats für die Simulationen noch immer zu langsam sind. Auch die Frage, welche angeregten Zustände sie abbilden, bleibt schwer zu beantworten. Eine ähnliche spezifische Abhängigkeit vom Zustand (der Dynamik, nicht der durchschnittlichen Eigenschaften) von Rest 21, wie sie für N38 gefunden wurde, ist wiederum möglich. Alternativ könnte aber auch eine einfache Verringerung der räumlichen Einschränkungen aufgrund der *Mutation im Allgemeinen* (unabhängig vom Zustand) zutreffen.

Die beobachtete Bewegungsabhängigkeit deutet darauf hin, dass intermolekulare Wechselwirkungen in der Lage sind, räumliche und Bewegungs- (zeitabhängige räumliche) Eigenschaften von solchen, entfernten Resten miteinander zu verknüpfen, die ohne den Protein-Protein-Kontakt durch unabhängige Bewegung gekennzeichnet sind. In unserem Fall wird eine Kopplung durch die Protein-Protein-Interaktionen innerhalb eines Kristallgitters herbeigeführt, indem vermittelnde Reste zur Verfügung gestellt werden, die eine Lücke direkter Wechselwirkungen zwischen Resten auf benachbarten Seiten einer Bindungstasche „auffüllen“. Die gegenseitigen dynamischen Abhängigkeiten werden hier rein konzeptionell untersucht, nicht für einen konkreten biologischen Fall. Die Beobachtung lokaler Bewegung als etwas, das von den Konformationszuständen einer Kette benachbarter Reste abhängt, in dieser intermolekularen Sandwich-Anordnung impliziert jedoch eine allgemeine mechanistische Machbarkeit im Rahmen intermolekularer Wechselwirkungen generell. Wir haben eine Methodik verwendet, die sich speziell mit Bewegungen auf der μ s-Zeitskala befasst, in diesem Fall mit dem Umklappen von Rückgratdiederwinkeln, welche mit vergleichsweise hohen Aktivierungsbarrieren verbunden sind. Die beschriebenen kinetischen Abhängigkeiten sollten jedoch auch für andere (schnellere oder langsamere) Zeitskalen, Amplituden und Richtungen gelten. Insbesondere haben wir die anfängliche Hypothese formuliert, dass allosterische Interaktionspartner den Informationsfluss in dynamischen Netzwerken nicht nur destruktiv modulieren könnten, z.B. durch sterisches Blockieren oder Versteifung von Proteinsegmenten. Stattdessen könnte die Modulation auch auf konstruktive Weise erfolgen, nämlich durch das *Hinzufügen* fehlender Konnektivität zwischen einzelnen Resten, wodurch deren hierarchische dynamische Abhängigkeit durch intermolekulare Assoziation erst entsteht. Darauf deuten die hier gesammelten Daten

hin, auch wenn sowohl die Experimente als auch die Simulationen durch die genannten Grenzen limitiert sind. Die Annahme solcher konstruktiver Mechanismen, die die Gesamtenergielandschaft der Konformationsentropie und der Bewegungsabhängigkeiten beeinflussen, könnte dazu beitragen, den Aspekt der dynamischen Allosterie für modulierte Funktionalität oder Initiierung regulatorischer Kaskaden und Rückkopplungsschleifen, die durch Protein-Protein-Wechselwirkungen induziert werden, in zukünftigen Studien besser zu verstehen, wie z.B. für Bindungs-/Selektivitätseigenschaften, enzymatische Aktivität und andere Eigenschaften, deren Regulation bisher nur schwer zu erfassen ist. Technisch gesehen ist der experimentelle Zugang zur intermolekularen Kopplung von Dynamik über die Distanz an Protein-Protein-Grenzflächen in Abwesenheit von Assoziations-/Dissoziationsdynamik durch Festkörper-NMR-Spektroskopie ein attraktiver Ansatz zur Untersuchung biologischer Konglomerate, die für die Erfassung von Relaxations-(dispersions-)studien in Lösung zu kurzlebig sind.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Festkörper-NMR- und MD-Simulationen zum Verständnis von Störungen der internen Dynamik an einer Protein-Protein-Grenzfläche durch Mutation darauf hindeuten, dass intermolekulare dynamische Netzwerke bei der Protein-Protein-Assoziation durch Elemente von verschiedenen Partnerproteinen gebildet werden können. Die eingeführte gegenseitige Abhängigkeit von Bewegungen an ansonsten entkoppelten Abschnitten des Proteins sollte einen Informationsfluss ermöglichen, der in der Apo-Form nicht existiert. Die abgeleiteten physikalischen Prinzipien stellen einen allgemein denkbaren Mechanismus dar, wie in der biologischen Signaltransduktion dynamische Allosterie durch regulatorische Protein-Protein-Interaktionen konstruktiv moduliert werden könnte.

Die Zuordnungen der chemischen Verschiebung der mikrokristallinen R21A-Mutante im festen Zustand wurden in der BMRB unter Zugangscode 52223 hinterlegt.

Danksagung

Wir danken Dr. Petra Rovó (jetzt IST Austria) für ihre engagierte Hilfe beim Aufbau dieses Projektes. Finanziert von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) im Rahmen der deutschen Exzellenzstrategie – EXC 2033-390677874 – RESOLV, und EXC-114-24286268 – CiPS-M. Finanziert von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) – 27112786, 325871075 und dem Emmy-Noether-Programm. Finanziert/mitfinanziert von der Europäischen Union (ERC, 101082494 bypassNMR). Die geäußerten Ansichten und Meinungen sind jedoch ausschließlich die des Autors/der Autoren und spiegeln nicht unbedingt die der Europäischen Union oder des Europäischen Forschungsrats wider. Weder die Europäische Union noch die Bewilligungsbehörde können für sie verantwortlich gemacht werden. Open Access Veröffentlichung ermöglicht und organisiert durch Projekt DEAL.

Interessenkonflikt

Die Autoren erklären, dass keine Interessenkonflikte vorliegen.

Erklärung zur Datenverfügbarkeit

Die Daten, die die Ergebnisse dieser Studie unterstützen, sind in den Hintergrundinformationen zu diesem Artikel verfügbar.

Stichwörter: Festkörper-NMR-Spektroskopie · Proteindynamik · Dynamische Netzwerke · Allosterie

- [1] H. van den Bedem, J. S. Fraser, *Nat. Methods* **2015**, *12*, 307–318.
- [2] a) K. Gunasekaran, B. Ma, R. Nussinov, *Proteins Struct. Funct. Bioinf.* **2004**, *57*, 433–443; b) S. Bhattacharya, E. G. Margheritis, K. Takahashi, A. Kulesha, A. D'Souza, I. Kim, J. H. Yoon, J. R. H. Tame, A. N. Volkov, O. V. Makhlynets, I. V. Korendovych, *Nature* **2022**, *610*, 389–393.
- [3] a) J. Kuriyan, D. Eisenberg, *Nature* **2007**, *450*, 983–990; b) Kimberly, A. Reynolds, N. R. McLaughlin, R. Ranganathan, *Cell* **2011**, *147*, 1564–1575; c) H. Singh, C. K. Das, B. Buchmuller, L. V. Schäfer, D. Summerer, R. Linser, *Nucleic Acids Res.* **2023**, *51*, 6495–6506.
- [4] a) H. G. Saavedra, J. O. Wrabl, J. A. Anderson, J. Li, V. J. Hilser, *Nature* **2018**, *558*, 324–328; b) A. Hadzipasic, C. Wilson, V. Nguyen, N. Kern, C. Kim, W. Pitsawong, J. Villali, Y. Zheng, D. Kern, *Science* **2020**, *367*, 912–917.
- [5] a) S. R. Tzeng, C. G. Kalodimos, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2011**, *21*, 62–67; b) M. Vendruscolo, *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 411–412.
- [6] a) J. A. Hardy, J. A. Wells, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2004**, *14*, 706–715; b) J. W. Biddle, R. Martinez-Corral, F. Wong, J. Gunawardena, *eLife* **2021**, *10*, e65498; c) A.-M. Cao, R. B. Quast, F. Fatemi, P. Rondard, J.-P. Pin, E. Margeat, *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 5426; d) A. A. Wylie, J. Schoepfer, W. Jahnke, S. W. Cowan-Jacob, A. Loo, P. Furet, A. L. Marzinzik, X. Pelle, J. Donovan, W. Zhu, S. Buonamici, A. Q. Hassan, F. Lombardo, V. Iyer, M. Palmer, G. Berellini, S. Dodd, S. Thohan, H. Bitter, S. Branford, D. M. Ross, T. P. Hughes, L. Petruzzelli, K. G. Vanasse, M. Warmuth, F. Hofmann, N. J. Keen, W. R. Sellers, *Nature* **2017**, *543*, 733–737.
- [7] T. Xie, T. Saleh, P. Rossi, C. G. Kalodimos, *Science* **2020**, *370*, eabc2754.
- [8] a) A. Cooper, D. T. F. Dryden, *Eur. Biophys. J.* **1984**, *11*, 103–109; b) L. G. Ahuja, S. S. Taylor, A. P. Kornev, *IUBMB Life* **2019**, *71*, 685–696.
- [9] M. A. Maria-Solano, J. Iglesias-Fernández, S. Osuna, *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 13049–13056.
- [10] a) H. Singh, C. K. Das, S. K. Vasa, K. Grohe, L. V. Schäfer, R. Linser, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 22916–22921; b) H. Singh, S. K. Vasa, H. Jangra, P. Rovó, C. Pöslack, C. K. Das, H. Zipse, L. V. Schäfer, R. Linser, *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 19276–19288.
- [11] J. M. Ostrem, U. Peters, M. L. Sos, J. A. Wells, K. M. Shokat, *Nature* **2013**, *503*, 548–551.
- [12] a) S. Feng, J. K. Chen, H. Yu, J. A. Simon, S. L. Schreiber, *Science* **1994**, *266*, 1241–1247; b) A. Cámara-Artigas, M. Andújar-Sánchez, E. Ortiz-Salmerón, C. Cuadri, S. Casares, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2009**, *65*, 1247–1252.

- [13] a) V. Chevelkov, Y. Xue, R. Linser, N. Skrynnikov, B. Reif, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 5015–5017; b) P. Rovó, C. A. Smith, D. Gauto, B. L. de Groot, P. Schanda, R. Linser, *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 858–869.
- [14] S. Casares, O. López-Mayorga, M. C. Vega, A. Cámara-Artigas, F. Conejero-Lara, *Proteins Struct. Funct. Bioinf.* **2007**, *67*, 531–547.
- [15] a) V. Kurauskas, S. A. Izmailov, O. N. Rogacheva, A. Hessel, I. Ayala, J. Woodhouse, A. Shilova, Y. Xue, T. Yuwen, N. Coquelle, J.-P. Colletier, N. R. Skrynnikov, P. Schanda, *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 145; b) T. Zinkevich, V. Chevelkov, B. Reif, K. Saalwächter, A. Krushelnitsky, *J. Biomol. NMR* **2013**, *57*, 219–235; c) P. Schanda, M. Ernst, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2016**, *96*, 1–46.
- [16] P. Rovó, R. Linser, *ChemPhysChem* **2018**, *19*, 34–39.
- [17] H. Kamberaj, A. van der Vaart, *Biophys. J.* **2009**, *97*, 1747–1755.

Manuskript erhalten: 18. Juni 2024

Akzeptierte Fassung online: 19. August 2024

Endgültige Fassung online: 14. Oktober 2024