

Biochemie und Molekularbiologie 2006

Methoden zur Herstellung synthetischer und semisynthetischer Proteine mit fast beliebigen chemischen Modifikationen sind unentbehrlich, wenn es um die Klärung von Fragen zur Proteinfunktion geht. Die Strukturaufklärung des Hammerhead-Ribozyms hilft, katalytisch aktive RNA zu verstehen. Immer häufiger werden auch komplexere RNA-Schalter entdeckt. Es gelang der Blick auf die atomaren Details der Wechselwirkung zwischen mRNA und tRNA.

Abb. 1.

Wege zum Knüpfen nativer Peptidbindungen zwischen zwei Peptiden oder Proteinen A und B. (A) Native Chemical Ligation (NCL) und Expressed Protein Ligation (EPL). (B) Spurlose Staudinger-Ligation. (C) Kondensation von α -Ketocarbonsäuren mit Hydroxylaminen. (D) Proteinspleißen *in trans*, durch ein gespaltenes Intein auf zwei getrennten Polypeptidketten (X = S oder O).

Semisynthese von Proteinen

◆ Proteine sind an allen biologischen Prozessen maßgeblich beteiligt. Ihre funktionelle und strukturelle Vielfalt basiert zum einen auf den nahezu unbegrenzten Kombinationsmöglichkeiten der 20 proteinogenen Aminosäuren innerhalb der Sequenz der Polypeptidkette. Zum anderen tragen posttranslationale Modifikationen (PTMs) und Prozessierungen zur Erweiterung der chemischen Komplexität von Proteinen bei. Sie dienen oftmals als entscheidende Elemente für deren Aktivität oder Regulation.

Nach der Aufklärung des menschlichen Genoms rückt die

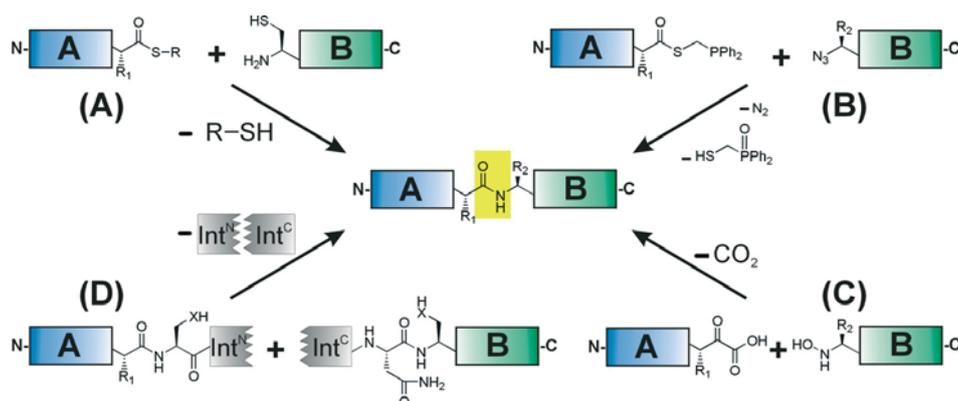
Frage nach der genauen Funktion der Genprodukte ins Zentrum des Interesses. Moderne Analysemethoden, wie die immer leistungsfähiger werdende Massenspektrometrie, führten in den letzten Jahren zur Identifizierung von PTMs bei vielen Proteinen. Zum Verständnis der Struktur-Funktions-Beziehung dieser chemischen Veränderungen werden mit Hochdruck neue Methoden entwickelt, welche die chemische Totalsynthese oder die Semisynthese von Proteinen ermöglichen. Dies ist für eine genaue Entschlüsselung oft unerlässlich, da die meisten PTMs sich nicht oder nicht definiert mit genetischen Methoden der rekombinanten Proteinexpression einführen lassen. Beispielsweise kann Phosphoserin nicht bei der Expres-

sion eines Proteins in *Escherichia coli* eingebaut werden.

Die chemische Synthese von Proteinen bietet darüber hinaus auch die Möglichkeit, durch Einführung künstlicher Gruppen Fragen zum „inneren Leben“ von Proteinen zu untersuchen. So können z.B. biophysikalische Sonden zum Studium von Konformationsänderungen und Faltungsprozessen eingeführt werden. Unnatürliche Aminosäuren mit veränderten sterischen und elektronischen Eigenschaften sind für mechanistische Studien wertvoll. Schließlich wird mit diesen Methoden der Weg zu künstlichen Proteinen mit maßgeschneiderten Eigenschaften eröffnet.

Wie werden Proteine chemisch synthetisiert?

◆ Die Größe von Proteinen reicht von wenigen Dutzend bis zu mehreren tausend Aminosäuren (AS), wobei die meisten Proteine deutlich über 100 AS liegen. Die maximale Kettenlänge von durch Festphasensynthese gewonnenen Peptiden liegt für Routineanwendungen jedoch bei lediglich ca. 50 AS. Deshalb wurden chemische Ligationmethoden entwickelt, die das Zusammensetzen eines größeren Proteins aus zwei oder



mehreren einzelnen Peptiden erlauben. Für die Präparation naturgetreuer Proteine ist dabei von entscheidender Bedeutung, dass an der Verknüpfungsstelle eine native Peptidbindung erzeugt wird. Bei der Nativen Chemischen Ligation (NCL) wird die chemoselektive Reaktion eines carboxyterminalen Thioesters mit einem aminoterminalen Cysteinrest zu einer nativen Peptidbindung ausgenutzt (Abbildung 1A). Diese Reaktion verläuft in wässrigem Puffer bei neutralem pH-Wert mit vollständig geschützten Seitenketten beider Peptide.¹⁾ Durch die Einführung von orthogonal entfernbaren Schutzgruppen für das N-terminale Cystein lässt sich schrittweise auch ein Protein aus mehreren Segmenten aufbauen, wie es für das von der Niere produzierte Hormon Erythropoietin (EPO, 166AS) in einer polymermodifizierten Form gezeigt worden ist.²⁾

Der Kopplung von mehreren Segmenten sind durch Ausbeuteverluste und Reinigungsschritte jedoch Grenzen gesetzt. Deshalb wird die Synthese von Proteinen >200AS in der Regel nicht mehr praktikabel sein. Außerdem müssen sich durch NCL hergestellte Proteine nach der Synthese spontan in ihre richtige Struktur falten. Größere Proteine lassen sich daher besser semisynthetisch darstellen, d.h. ein Teil des Proteins wird durch rekombinante Expression gewonnen, während der andere ein synthetisches Peptid ist, das über nahezu beliebige chemische Modifikationen verfügen kann.

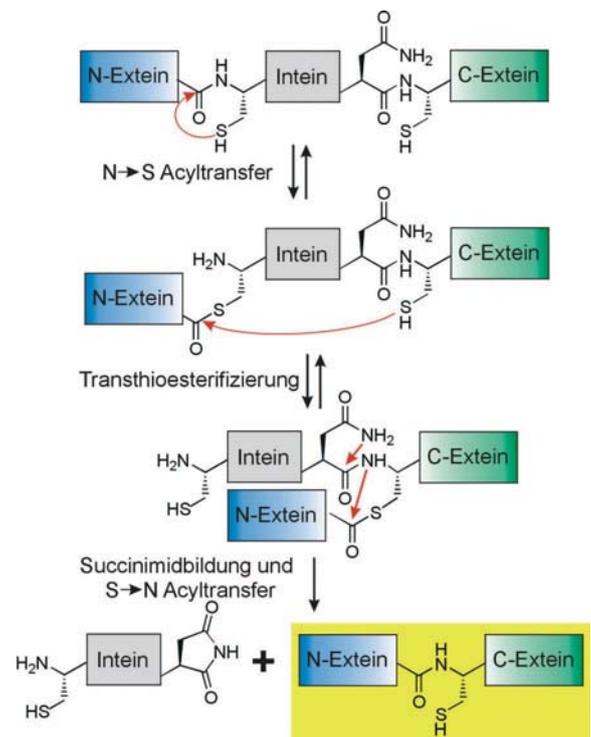
Die zugrundeliegende Reaktion zur Verknüpfung dieser beiden Komponenten ist identisch mit der NCL (Abbildung 1A). Die Generierung eines Proteins mit einem C-terminalen Thioester kann durch Fusion mit einem mutierten Intein erreicht werden. Inteine sind Proteinelemente, die in einem Wirtprotein inseriert synthetisiert werden und sich in einer post-translationalen, autokatalytischen Reaktion, die man als Proteinspleißen bezeichnet, aus diesem Vorläuferprotein herausschneiden. Dabei verknüpfen sie die bei-

den flankierenden Segmente, die N- und C-Exteine, über eine native Peptidbindung (Abbildung 2). Sie sind recht unspezifisch und können mit gentechnischen Methoden auch in andere Proteine verpflanzt werden. Der während des Spleißens durchlaufene Thioester (Abbildung 2) kann durch Zugabe von freien Thiolen wie Thiophenol gespalten werden, wenn der für die weitere Reaktion wichtige Asparaginrest des Inteins zu Alanin mutiert ist. Die Umsetzung des so erhaltenen Protein-Thioesters mit einem synthetischen N-Cys-Peptid ist unter der Bezeichnung Expressed-Protein-Ligation (EPL) oder Intein-mediated Protein-Ligation bekannt und führt zu einem C-terminal modifizierten semisynthetischen Protein.³⁾

NCL und EPL sind heute Standardmethoden für den Einbau synthetischer Peptide in Proteine und finden immer größere Verbreitung. Gleichzeitig gibt es Bestrebungen, weitere methodische Verbesserungen dieser Reaktionen zu erzielen und alternative chemische oder chemoenzymatische Ligationsstrategien zu entwickeln, die generelle Anwendbarkeit oder spezifische Vorteile bieten. Eine Limitierung von NCL und EPL besteht z.B. darin, dass zwingend ein Cysteinrest an der Ligationstelle im Produkt verbleibt. Dies kann zu unerwünschten Veränderungen führen.

Mit dem Ziel der Cystein-freien Ligation wurde eine Reihe von Auxiliärragentien eingeführt, die eine Thiolgruppen-vermittelte Ligation mit dem Thioester ermöglichen und nach der Reaktion abgespalten werden können.⁴⁾ Zum gleichen Ergebnis kommen zwei weitere alternative chemoselektive Reaktionen: Die Staudinger-Ligation (Abbildung 1B), die auch bereits zur Proteinsynthese angewendet wurde,⁵⁾ und eine kürzlich beschriebene decarboxylierende Peptidligation zwischen einer α -Ketosäure und einem N-Alkylhydroxylamin (Abbildung 1C), deren Potential zur Proteinsynthese noch gezeigt werden muss.⁶⁾

Ein weiterer eleganter Ansatz mit Potential zur Verknüpfung eines re-



kombinanten Proteins mit einem synthetischen Peptid liegt in der Ausnutzung einer speziellen Form des Proteinspleißens. Bei gespaltenen Inteinen ist die Polypeptidkette innerhalb der Intein-domäne unterbrochen, so dass sich die N- und C-terminalen Inteinfragmente auf getrennten Molekülen befinden (Proteinspleißen in trans, Abbildung 1D). Wird eines dieser beiden Proteine synthetisch hergestellt, kann durch Proteinspleißen mit dem komplementären, rekombinanten Protein ebenfalls ein semisynthetisches Protein erzeugt werden. Üblicherweise ist nur das Intein-C-Fragment mit einer Größe von ca. 40 AS auf diese Art und Weise synthetisch zugänglich (das Intein-N-Fragment ist typischerweise ca. 100 AS lang).⁷⁾ Unsere Arbeitsgruppe hat jedoch kürzlich ein gespaltenes Intein entwickelt, dessen Intein-N-Fragment nur 11 AS lang ist. Es kann also leicht durch Peptidsynthese mit einer gewünschten Sequenz erzeugt und zur N-terminalen Modifikation von rekombinanten Proteinen verwendet werden.⁸⁾ Weitere vielversprechende chemoenzymatische Methoden beruhen auf der reversen Proteolyse und der Sortase-vermittelten Ligation.^{9,10)} →

Abb. 2. Der Reaktionsmechanismus des Intein-katalysierten Proteinspleißens. Spaltung in cis: das Intein befindet sich auf einer Polypeptidkette.

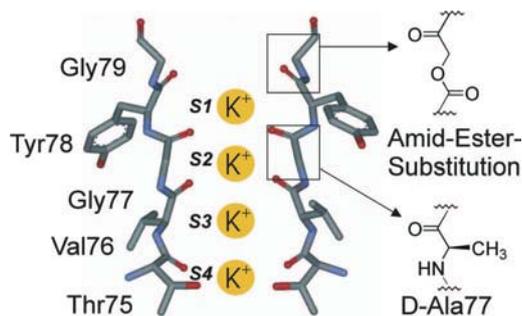


Abb. 3. Die leitende Konformation des Selektivitätsfilters des Kaliumkanals KcsA mit seinen vier K⁺-Bindungsstellen (S1–S4). Es sind nur zwei der vier Peptidketten des KcsA-Tetramers dargestellt.

Neben den Arbeiten zur methodischen Optimierung von NCL und EPL sind in den letzten Jahren bereits zahlreiche Studien publiziert worden, in denen diese Techniken für die Beantwortung der jeweiligen biologischen Fragen unverzichtbar waren.

Semisynthese von Proteine – aktuelle Beispiele

◆ Kaliumkanäle leiten K⁺-Ionen mit hoher Selektivität über biologische Membranen. Die Gruppe um Mac Kinnon zeigte, dass der Kaliumkanal KcsA ein tetrameres Membranprotein ist, in dessen Zentrum der Selektivitätsfilter lokalisiert ist. Dieser bildet eine ca. 12 Å lange Pore, die aus jeweils vier Aminosäuren (Thr75-Val76-Gly77-Tyr78) besteht (Abbildung 3). Diese Aminosäuren der vier identischen Untereinheiten sind so ausgerichtet, dass die Carbonylsauerstoffatome der Peptidbindungen in das Innere der Pore zeigen und zusammen mit der Hydroxygruppe des Thr75 jeweils vier Bindungsstellen für K⁺-Ionen bilden (S1 bis S4, Abbildung 3).

Diese ungewöhnliche Konformation der Peptidkette des Selektivitätsfilters ist in der Regel nur bei einer Anordnung alternierender L- und D-Aminosäuren begünstigt. Das flexible achirale Glycin kann als einzige der proteinogenen Aminosäuren Bindungswinkel annehmen, die denen von D-Aminosäuren ähneln.

Der Austausch von Gly77 zu Alanin ergab ein inaktives KcsA. Diese Beobachtungen stützen die Hypothese, dass Gly77 als Stellvertreter für eine D-Aminosäure an dieser Position genutzt wird. Zur Überprüfung der Hypothese stellte die Gruppe von Muir mit EPL eine semisynthetische Variante von KcsA her, in der Gly77 durch D-Alanin ersetzt ist (dies wäre mit konventionellen molekularbiologischen Methoden nicht möglich gewesen). Elektrophysiologische Messungen zeigten, dass KcsA(D-Ala77) tatsächlich K⁺-Ionen transportierte. Damit wurde die Hypothese bestätigt, dass Gly77 ein natürlicher Ersatz für eine D-Aminosäure sein kann.¹¹⁾

Weiterhin konnten durch Charakterisierung des semisynthetischen KcsA(D-Ala77) Einblicke in die Funktionsweise des Selektivitätsfilters gewonnen werden. Bei hohen K⁺-Konzentration nimmt der Selektivitätsfilter des nativen Kanals eine aktive leitende Konformation ein, wie sie in Abbildung 3 gezeigt ist. Bei sehr geringen K⁺- und vergleichsweise hohen Na⁺-Konzentrationen kollabiert der Selektivitätsfilter jedoch in eine inaktive, nichtleitende Konformation (nicht gezeigt). Im Falle des KcsA(D-Ala77)-Kanals verhinderte die zusätzliche Methylgruppe des D-Alanins aus sterischen Gründen den Kollaps. Das so künstlich in der aktiven Konformation gehaltene Protein war immer noch in der Lage, bevorzugt K⁺-Ionen zu leiten und konnte sogar im Gegensatz zum Wildtyp in Abwesenheit von K⁺-Ionen auch Na⁺-Ionen leiten. Dies zeigte, dass die Ionenselektivität des KcsA-Kaliumkanals auf einer Kombination aus der Selektivität des Filters und einem Kollabieren der Pore bei niedrigen K⁺-Konzentrationen beruht.¹²⁾

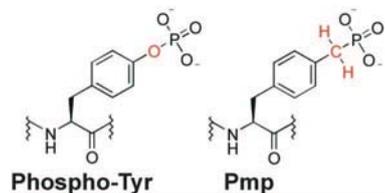
Eine weitere Arbeit in diesem Zusammenhang beschäftigte sich mit der Rolle der Carbonylgruppen der Peptidbindungen, welche die Bindungsstellen für die K⁺-Ionen bilden. Da diese durch klassische ortsgerichtete Mutagenese nicht veränderbar sind, wurde mit Proteinsemisynthese die Amidbindung zwi-

schen Tyr78 und Gly79 durch eine Esterbindung ersetzt (Abbildung 3). Die resultierende Verringerung der negativen Partialladung des Sauerstoffatoms der Ester-Carbonylgruppe beeinträchtigte wie erwartet die K⁺-Bindung in der S1-Position. Dies äußerte sich in einer verringerten Leitfähigkeit.¹³⁾

Proteinsemisynthese wurde auch in der Strukturbiologie genutzt. Hier stellt sich oftmals das Problem, dass Proteine mit PTMs durch heterologe Expression nicht in vollständig und einheitlich modifizierter Form gewonnen werden können. Ein Beispiel sind die Ras-verwandten GTPasen der Rab-Familie, die an der Regulation des vesikulären Transports beteiligt sind. Ihre Membranlokalisierung verläuft über eine zweifache Prenylierung in der Nähe des C-Terminus. Ein wichtiger Interaktionspartner der Rab-Proteine ist der Rab-GDP-Dissoziationsinhibitor (GDI), der mit prenylierten Rab-Proteinen assoziiert und am Ende eines Funktionszyklus inaktives Rab an der Membran regeneriert. Die Strukturen von Komplexen mit homogenem mono- und diprenyliertem Rab, die mit der EPL-Strategie synthetisiert worden waren, konnten aufgeklärt und so die Rab/GDI-Interaktion verstanden werden. Dadurch gelang es den beteiligten Gruppen am MPI für molekulare Physiologie in Dortmund, ein allgemeines Modell der Membranbindung und Extraktion prenylierter Rab-Proteine zu entwickeln.^{14,15)}

Die wohl häufigste posttranslationale Modifikation von Proteinen ist die Phosphorylierung von Serin-, Threonin- oder Tyrosinseitenketten. Schätzungen zufolge werden etwa 1/3 aller menschlichen Proteine phosphoryliert. Diese Modifikationen, die von Kinasen unter ATP-Hydrolyse eingeführt und von Phosphatasen wieder entfernt werden, haben Schlüsselfunktionen in der Regulation einer Vielzahl enzymatischer Prozesse und Signalkaskaden. Die Gruppe von Cole untersucht die Phosphorylierung von Proteinphosphatasen, deren Fähigkeit zur Autodephosphorylierung nicht trivi-

Abb. 4. Phospho-Tyrosin und das nicht hydrolysierbare Analogon Pmp (Phosphonomethylen-phenylalanin).



al ist. Dabei wurde mit EPL Phosphonomethylenphenylalanin (Pmp, Abbildung 4) als nichthydrolysierbares Analogon von Phosphotyrosin in die Protein-Tyrosin-Phosphatase LMW-PTP an den zwei bekannten Phosphorylierungsstellen inkorporiert. Die biochemische Charakterisierung der semisynthetischen Proteine ergab, entgegen ursprünglichen Annahmen, dass die Phosphorylierung an diesen Positionen zu einer Herabregulation der enzymatischen Aktivität führt.¹⁶⁾

Neben der Phosphorylierung kommen auch Acetylierung und Methylierung als PTMs von Histonen vor. Diese DNA-bindenden Proteine spielen eine große Rolle bei der Regulation der Genaktivität. Die definierte Darstellung modifizierter Histone in homogener Form durch Proteinsemisynthese gewinnt für die Entschlüsselung dieser Regulation immer größere Bedeutung.¹⁷⁾

Methoden zur Darstellung synthetischer und semisynthetischer Proteine sind zur Klärung vieler

Fragen rund um die Proteinfunktion auf molekularer Ebene unentbehrlich. Es steht zu erwarten, dass ihre Anwendung durch technische Weiterentwicklungen sowie durch neue Erkenntnisse und Aufgaben der Proteomforschung weiter zunehmen wird.

Dirk Schwarzer, Henning D. Mootz
Universität Dortmund
Fachbereich Chemie –
Chemische Biologie
Henning.Mootz@uni-dortmund.de

- 1) P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. B. Kent, *Science* 1994, 266, 776.
- 2) G. G. Kochendoerfer et al., *Science* 2003, 299, 884.
- 3) T. W. Muir, D. Sondhi, P. A. Cole, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998, 95, 6705.
- 4) D. Macmillan, *Angew. Chem.* 2006, 118, 7830.
- 5) B. L. Nilsson, R. J. Hondal, M. B. Soellner, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 5268.
- 6) J. W. Bode, R. M. Fox, K. D. Baucom, *Angew. Chem.* 2006, 118, 1270.
- 7) I. Giriat, T. W. Muir, *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 7180.
- 8) C. Ludwig, M. Pfeiff, U. Linne, H. D. Mootz, *Angew. Chem.* 2006, 118, 5343.
- 9) N. Wehofsky, N. Koglin, S. Thust, F. Bordusa, *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 6126.
- 10) H. Mao, S. A. Hart, A. Schink, B. A. Pollok, *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126, 2670.
- 11) F. I. Valiyaveetil, M. Sekedat, R. MacKinnon, T. W. Muir, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004, 101, 17045.
- 12) F. I. Valiyaveetil, M. Leonetti, T. W. Muir, R. MacKinnon, *Science* 2006, 314, 1004.
- 13) F. I. Valiyaveetil, M. Sekedat, R. MacKinnon, T. W. Muir, *J. Am. Chem. Soc.* 2006, 128, 11591.
- 14) A. Rak, O. Pylypenko, T. Durek, A. Watzke, S. Kushnir, L. Brunsfeld, H. Waldmann, R. S. Goody, K. Alexandrov, *Science* 2003, 302, 646.
- 15) O. Pylypenko, A. Rak, T. Durek, S. Kushnir, B. E. Dursina, N. H. Thoma, A. T. Constantinescu, L. Brunsfeld, A. Watzke, H. Waldmann, R. S. Goody, K. Alexandrov, *EMBO J.* 2006, 25, 13.
- 16) D. Schwarzer, Z. Zhang, W. Zheng, P. A. Cole, *J. Am. Chem. Soc.* 2006, 128, 4192.
- 17) M. Shogren-Knaak, H. Ishii, J. M. Sun, M. J. Pazin, J. R. Davie, C. L. Peterson, *Science* 2006, 311, 844.

RNA – Struktur und Funktion

Das Hammerhead-Ribozym

◆ Ribonucleinsäuren üben wichtige Funktionen in biologischen Systemen aus, unter anderem die Katalyse chemischer Reaktionen. RNAs mit derartigen Eigenschaften werden als Ribozyme bezeichnet. Unter ihnen ist das bekannteste und wohl am intensivsten untersuchte das „Hammerhead“-Ribozym, welches die positionsspezifische Spaltung seines Phosphorsäureesterrückgrats durch eine Transesterifizierung katalysiert. Eine neue Kristallstruktur hat nun dazu beigetragen, die langjährige Debatte über den katalytischen Mechanismus zu entscheiden.¹⁾

Das katalytisch aktive minimale Motiv des Hammerhead-Ribozyms ist seit den neunziger Jahren bekannt und umfasst elf konservierte Nucleotide, die von drei Doppelhelices flankiert werden (Abbildung 1a). Erst in Anwesenheit von Magnesiumionen in millimolarer Konzentration wird die aktive Konformation eingenommen, in der die 2'-OH Gruppe des Cytidins in Position 17 den zu spaltenden 5',3'-Phosphorsäureester angreift. Dabei entstehen zwei Spaltungsprodukte: ein Strang mit einem 2',3'-Cyclophosphat und ein Strang mit einem freien 5'-OH-Terminus.

Frühe Experimente belegten, dass die Konfiguration am analogen C17/N1.1-thiophosphatmodifizierten Ribozym invertiert wird. Während der Spaltung durchläuft die RNA einen trigonal-bipyramidalen, pentakoordinierten Übergangszustand.²⁾ Der S_N2-Übergangszustand bedingt die Anordnung der 2'-Hydroxygruppe von Cytidin 17 und der benachbarten P-O5'-Gruppierung (Nucleotid C1.1) auf einer Geraden („In-line“-Angriff). Erste Kristallstrukturen des „Hammerhead“-Ribozyms aus dem Jahr 1998 zeigten allerdings eine starke Abweichung von dieser Struktur, obwohl die Spaltung im Kristall durch Einwirkung von zweiwertigen Metallionen gelang.³⁾ ➔



Dirk Schwarzer (Jahrgang 1972) studierte Chemie in Marburg. 2002 schloss er die Promotion in der Arbeitsgruppe von Mohamed Marahiel ab.

Es folgte ein Postdocaufenthalt in der Arbeitsgruppe von Philip Cole an der Johns Hopkins University. Seit Sommer 2006 ist er Mitarbeiter von Henning Mootz. Sein Forschungsinteresse gilt der Nutzung von Proteinchemie zur Klärung biologischer Fragestellungen



Henning Mootz (Jahrgang 1970) studierte Chemie in Wuppertal und Marburg und promovierte 1999 in der Biochemie bei Mohamed Marahiel.

Nach Aufhalten bei Philippe Marlière am Institut Pasteur und bei Tom Muir an der Rockefeller Universität gründete er 2003 eine Emmy-Noether-Forschungsgruppe in Marburg. Seit 2006 ist er Professor für Chemische Biologie und Biochemie am Fachbereich Chemie der Universität Dortmund und arbeitet an der Struktur- und Funktionskontrolle von Proteinen.