

Protein-Engineering

Nicht-kanonische Aminosäuren in der Synthetischen Biologie

MICHAEL HÖSL, NEDILJKO BUDISA

MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR BIOCHEMIE, BIOFUTURE FORSCHUNGSGRUPPE
„MOLEKULARE BIOTECHNOLOGIE“, MARTINSRIED

Nicht-kanonische Aminosäuren finden immer mehr Anwendung im Protein-Engineering und in der Synthetischen Biologie. Durch sie können bereits vorhandene Eigenschaften stark verbessert werden oder neue biologische Funktionen entstehen.

Noncanonical amino acids are increasingly used in protein engineering and synthetic biology. Thereby, already existing protein properties can be highly enhanced or novel biological features might emerge.

Die Synthetische Biologie

■ Derzeit werden enorme Fortschritte im Bereich der Synthetischen Biologie gemacht. Diese beschäftigt sich unter anderem mit Design und Konstruktion von biologischen Komponenten, Bauteilen und Systemen. Ihr Ziel ist nichts weniger als die „Erschaffung“ neuer Lebewesen.

Die Synthetische Biologie bewegt sich jedoch weitgehend noch auf dem Niveau der Neuzusammensetzung von bereits in der Natur vorhandenen Teilen. Um eine wirklich synthetische Lebensform zu erzeugen, muss noch ein tieferes Verständnis davon erreicht werden, wie nicht natürliche Komponenten existierende biologische Systeme beeinflussen und wie man mit deren Hilfe Eigenschaften erzeugen kann, die es in der Natur so noch nicht gibt.

Einbau nicht-kanonischer Aminosäuren als Teilgebiet der Synthetischen Biologie

Unsere Arbeitsgruppe beschäftigt sich seit Jahren mit der detaillierten Aufklärung der Auswirkungen des Einbaus von nicht-kanonischen Aminosäuren in Proteine. Darauf aufbauend versuchen wir mit den errungenen Erkenntnissen gezielt Proteine mit neuen und verbesserten Eigenschaften zu entwickeln. Weiterhin können wir mit diesem Ansatz akademische Fragestellungen beantworten, die im Kanon der 20 proteinogenen Aminosäu-

ren nur schwer zugänglich sind. Es gibt verschiedene Methoden zum Einbau nicht-kanonischer Aminosäuren. Auf deren Beschreibung soll allerdings hier verzichtet werden, da ein früherer Artikel an dieser Stelle die methodologischen Ansätze bereits vorstellte [1].

Hier sollen zwei aktuelle Beispiele herausgestellt werden, wie wir mithilfe von nicht-kanonischen Aminosäuren zwei verschiedene Fragestellungen beantworten konnten. Zum einen konnten wir mit der gezielten Fluorierung des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) dessen Faltungseigenschaften und Stabilität stark verbessern. Zum anderen konnten durch den Einsatz von strukturell sehr ähnlichen, aber in ihrem chemischen Verhalten sehr unterschiedlichen Methioninanaloga ein Beitrag zur modellhaften Aufklärung der Entstehung von Prionenkrankheiten geleistet werden.

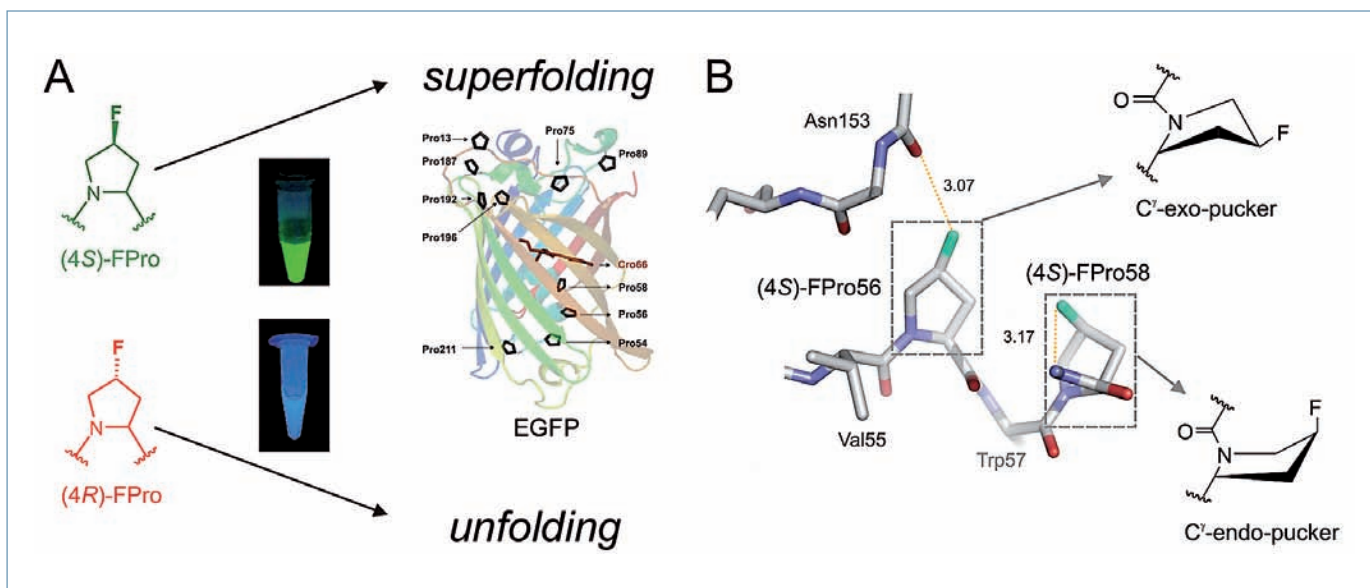
Superfolder-GFP durch Einbau von Fluoroprolinen

Prolin (Pro) ist die einzige Iminosäure im genetischen Code und spielt in Proteinfaltungsprozessen eine sehr wichtige Rolle, da aufgrund seiner zyklischen Natur die Energiebarriere bei der *cis/trans*-Isomerisierung der Peptidbindung sehr hoch ist. Bei globulären Proteinen sind Faltungskurven oft zweiphasig. In der schnellen, ersten Phase faltet sich der Proteinanteil, dessen Prolinreste sich

bereits in der richtigen Konformation befinden, während die langsame, zweite Phase durch die Isomerisierung der Proline in falscher Konformation gekennzeichnet ist (unterstützt durch das Enzym Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase).

Prolinreste haben aufgrund ihrer speziellen chemischen Eigenschaften hohe strukturelle Bedeutung und können daher in Mutationsstudien oft nicht durch andere kanonische Aminosäuren ersetzt werden, ohne die Struktur zu zerstören. Hier können jedoch isostere, nicht-kanonische Aminosäuren als Untersuchungsinstrument dienen, da sie chemisch unterschiedlich, jedoch sterisch im Bereich des Tolerierbaren liegen. Studien an Peptiden und dem Modellprotein Barstar haben gezeigt, dass das Einbringen von zusätzlichen chemischen Gruppen an der richtigen Stelle im Prolinring die bevorzugte Konformation des Prolins beeinflussen kann. (4*S*)-Fluoroprolin, (4*S*)-FPro, stabilisiert die *cis*-Konformation, während (4*R*)-Fluoroprolin, (4*R*)-FPro, die *trans*-Konformation destabilisiert [2].

Beim Versuch, diese Eigenschaften auf ein komplexeres Protein zu übertragen, fanden wir jedoch die entgegengesetzte Situation (**Abb. 1A**, [3]). Das Modellprotein EGFP enthält zehn Proline, wovon neun in *trans*- und eines in *cis*-Konformation vorliegen. Theoretisch müsste also (4*R*)-FPro EGFP stabilisieren und (4*S*)-FPro destabilisieren. Es zeigte sich jedoch, dass genau das Gegenteil der Fall ist. Während der (4*S*)-FPro-Einbau in EGFP *superfolding*-Eigenschaften hervorrief, führte der Einbau von (4*R*)-FPro zu einem weitgehend ungefalteten Protein. *Superfolding*-Eigenschaften sind einerseits eine schnellere Rückfaltung und andererseits eine stark erhöhte Rückfaltungsquote von 95 bis 100 Prozent im Vergleich zu 60 Prozent beim Wildtyp-Protein. Die auf den ersten Blick gegenteilige Beobachtung, dass (4*S*)-FPro entgegen den Erwartungen stabilisierend wirkt, ließ sich nach genauer Strukturanalyse auf eine weitere Eigenschaft des Prolins zurückführen.



▲ **Abb. 1:** Superfolding gegen unfolding. **A,** Während der Einbau von (4*R*)-Fluoroprolin ((4*R*)-FPro) zu ungefaltetem EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) führt, resultieren aus dem Einbau von (4*S*)-Fluoroprolin ((4*S*)-FPro) *superfolding*-Eigenschaften. **B,** Ausschnitt aus der 3D-Struktur des (4*S*)-FPro-EGFP (PDB: 2Q6P). Es sind beispielhaft zwei neue, durch den Einbau von (4*S*)-FPro entstandene Interaktionen gezeigt. Neun der zehn EGFP-Fluoroprolin weisen $C\gamma$ -endo-Konformation auf, wodurch stabilisierende Wechselwirkungen zwischen dem Fluoratom und anderen Resten entstehen (analog dem gezeigten (4*S*)-FPro58). Nur ein FPro nimmt $C\gamma$ -exo-Konformation ein, was eine negative Wechselwirkung verursacht ((4*S*)-FPro56). Diese wird jedoch durch die neun stabilisierenden Wechselwirkungen überkompensiert, was in der Summe das *superfolding* des (4*S*)-FPro-EGFP bewirkt. Weitere Erklärungen im Text.

Proline können nämlich aufgrund ihrer zyklischen Natur nicht nur *cis*- und *trans*-Konformation bezüglich des Proteinrückgrats einnehmen, sondern auch eine endo- und exo-pucker genannte Konformation der $C\gamma$ -Position bezüglich des Rings (**Abb. 1B**). Neun von zehn Prolinen im EGFP liegen in endo-Konformation vor. Diese wird durch die (4*S*)-Fluorierung stabilisiert, wodurch es während der Faltung zu einer „Vororganisation“ der Pyrrolidinringe der Proline kommen kann. Dies kann die verbesserten Faltungscharakteristika des (4*S*)-FPro-EGFP erklären. Im Detail betrachtet bilden die Fluoratome der *endo*-

positionierten Proline stabilisierende Interaktionen mit den Wasserstoffatomen von benachbarten Aminosäureseitenketten des Proteinrückgrats aus. Das eine in *exo*-Konformation vorliegende Fluoratom im Pro56 macht als einziges eine negative Wechselwirkung mit einem Carbonyl-Sauerstoffatom (**Abb. 1B**). Diese wird aber anscheinend durch die neun positiven Interaktionen überkompensiert.

Dieses Ergebnis zeigt, dass strukturell verträgliche, globale Fluorierungen von Proteinen einen generellen Ansatz zu deren Stabilisierung bieten können. Wir sind überzeugt,

dass dieser Ansatz zukünftig eine wichtige Rolle bei der Produktion von biotechnologisch und pharmakologisch relevanten Proteinen spielen wird, zumal Fluorierungen in der Wirkstoffentwicklung bereits weitreichende Anwendung bei der Verbesserung der Bioverfügbarkeit und Aktivität haben.

Methioninanaloga beleuchten die Entstehung des pathogenen Prionproteins

Die posttranslationale Umwandlung vom zellulären Prionprotein (Prp^C) in seine pathogene Form (Prp^{Sc}) ist ein Hauptgrund für die Entstehung von transmissiblen spongiformen Enzephalopathien wie der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit. In einem Teil der Fälle ist die Tendenz zur Umwandlung in die pathogene Form erblich bedingt oder kommt durch Infektion mit dem pathogenen Prp^{Sc} zustande. In ca. 85 Prozent der Fälle jedoch tritt die Krankheit spontan auf.

Prp^C besteht mehrheitlich aus α -Helices, Prp^{Sc} aus β -Faltblattstrukturen. Die Konversion der zellulären in die pathogene Form kommt also durch eine weitreichende Konformationsänderung in der Prionenstruktur zustande. Die β -Faltblattstruktur ist zudem für die Aggregation des Prp^{Sc} verantwortlich. Bisher war jedoch die molekulare Grundlage dieser Konformationsänderung weitgehend unklar.

Methioninoxidation und alterungsbedingte Erkrankungen

■ Aus mehreren Forschungsarbeiten gibt es starke Anzeichen für eine Rolle der Methioninoxidation bei Alterung und altersbedingten Krankheiten [5]. Zwar sind in der Zelle alle Aminosäuren oxidativen Modifikationen durch sogenannte reaktive Sauerstoffspezies (ROS, z. B. Peroxidation (O_2^-) oder Hydroxylradikal ($OH\cdot$)) ausgesetzt, es existieren jedoch nur zelluläre „Reparaturmechanismen“ für Cystein und Methionin. Im Falle von Methionin erledigt das Enzym Methionin-Sulfoxidreduktase (Msr) diese Reparaturen. Bei Ratten konnte gezeigt

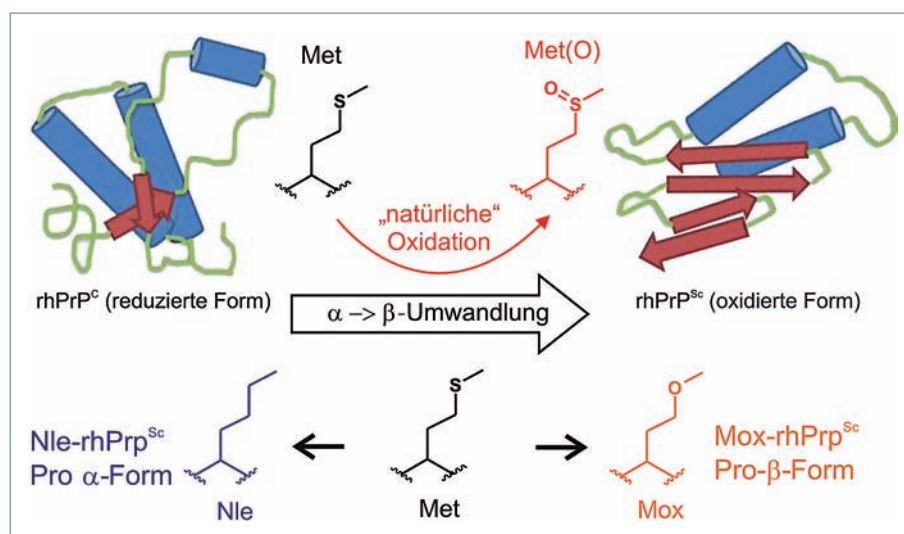
werden, dass der Msr-Spiegel mit fortschreitendem Alter sinkt. Ein Knock-out der Msr führte zu einer um 40 Prozent reduzierten Lebenserwartung, und in Fliegen konnte durch Überexpression der Msr die Lebenszeit fast verdoppelt werden [6]. All diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass der Methioninoxidation eine entscheidende Rolle im Alterungsprozess zukommt. Nach Schätzungen könnten bei einem 80-Jährigen bis zu 50 Prozent der Proteine oxidiert sein. ■

Es gab aber Hinweise aus einer Untersuchung mit synthetischen Peptiden, die eine ebensolche α -Helix-zu- β -Faltblatt-Umwandlung vollzogen, nachdem die hydrophoben Methioninreste (Met) durch Oxidation in das stark hydrophile Methioninsulfoxid (Met(O)) überführt worden waren. Das Prionprotein enthält insgesamt neun Methionine, wobei sechs an der Proteinoberfläche und drei im hydrophoben Inneren lokalisiert sind. Der Oxidationszustand der Methioninreste könnte daher auch beim Prionprotein verantwortlich für die zwei unterschiedlichen Konformationen sein, zumal oxidativer Stress in Zellen auch mit anderen Erkrankungen und Alterungsprozessen in Verbindung steht (siehe **Kasten**).

Der direkte Test der Hypothese ist jedoch schwierig, da andere Aminosäuren wie Tryptophan und Histidin auch oxidationsanfällig sind und deshalb eine spezifische *in vitro*-Oxidierung der Methioninreste im Prionprotein nicht möglich ist. Durch direkten kointegrationalen Einbau von Methioninsulfoxid könnte die Struktur der entstandenen Prionvariante mit der des Methionin enthaltenden Prions verglichen werden. Dies ist jedoch schwierig, da Zellen das Enzym Methionin-Sulfoxidreduktase (Msr) besitzen, das spezifisch Methioninsulfoxid wieder zu Methionin reduzieren kann.

Die Lösung war die Anwendung der nicht-kanonischen, nicht oxidationsanfälligen Aminosäuren Norleucin (Nle) und Methoxinin (Mox) (**Abb. 2**, [4]). Beide sind dem Methionin sterisch sehr ähnlich. Chemisch spiegeln sie jedoch zwei völlig unterschiedliche Bedingungen wider, da Norleucin noch weitaus hydrophober als Methionin ist, während Methoxinin strikt hydrophil ist. Unsere Einbauexperimente bestätigten die dargestellte Theorie. Während sich die Norleucin-Variante des Prionproteins durch einen hohen α -Helix-Anteil, höhere Stabilität und ein sehr geringes Aggregationspotenzial auszeichnete, bewirkte der Einbau von hydrophilem Methoxinin das genaue Gegenteil (**Abb. 2**). Der α -Helix-Anteil sank um ca. 50 Prozent zugunsten des β -Faltblatt-Anteils. Darüber hinaus konnte bei der Methoxinin-Variante eine starke Aggregationsanfälligkeit nachgewiesen werden. Zusätzliche Hydrophobie an Methionin-Stellen im Prp führt demnach zu einer Anti-Aggregationsvariante, während das Einbringen von Hydrophilie ein Pro-Aggregationsverhalten bewirkt.

Nach unserer Meinung spiegeln diese Ergebnisse klar wider, dass die Methionin-



▲ **Abb. 2:** Die strukturelle Umwandlung des rekombinanten humanen Prionproteins (rhPrp^C) in seine pathogene Form (rhPrp^{Sc}) geht mit einer α -Helix-zu- β -Faltblatt-Umwandlung einher. Die pathogene Form ist stark anfällig für Aggregation. Ein Modell erklärt die Umwandlung durch Oxidation von hydrophoben Methioninresten (Met) zu weitaus hydrophileren Methioninsulfoxiden (Met(O)). Experimentell konnten die beiden Formen des Prions durch Einbau der nicht-kanonischen Aminosäuren Norleucin (Nle, stark hydrophob) und Methoxinin (Mox, stark hydrophil) „fixiert“ werden. Die Nle-Variante zeichnet sich durch einen stabilisierten α -helikalen Kern aus und besitzt kaum Aggregationspotenzial. Im Gegensatz dazu zeigt die Mox-Variante β -Faltblattstruktur und eine hohe Anfälligkeit für Aggregation.

oxidation, wenn auch nicht alleinige Ursache, zumindest einen Anteil an der Konversion des Prp^C zum Prp^{Sc} hat. Durch die Nutzung von nicht-kanonischen Aminosäuren konnte also ein schlüssiges Modell für die Strukturänderung des Prp^C zum pathogenen Prp^{Sc} geliefert werden.

Ausblick

Wie die Beispiele zeigen, sind die Auswirkungen des Einbaus nicht natürlicher Aminosäuren auf Proteine schon jetzt teilweise planbar. Allerdings ist dafür ein tiefes Verständnis der Proteinchemie, -struktur und -faltung einerseits und der Chemie der entsprechenden Aminosäuren andererseits nötig. Die beschriebenen Arbeiten zeigen, wie die synthetische Biologie der nicht-kanonischen Aminosäuren akademische Fragestellungen beantworten kann, die im Kanon der 20 proteinogenen Aminosäuren nur schwer zugänglich sind. Darüber hinaus stellen sie dar, dass nicht-kanonische Aminosäuren in der Zukunft großen Nutzen für die industrielle Anwendung haben können. Fluoroproline könnten zur Stabilisierung von Proteinen genutzt werden, während Norleucin das oxidationsanfällige Methionin ersetzen und so die Haltbarkeit von industriell relevanten Proteinen entscheidend erhöhen könnte. ■

Literatur

- [1] Merkel L, Budisa N (2006) Veränderung des genetischen Codes. BIOSpektrum 1:41–43
- [2] Renner C, Alefelder S, Bae JH et al. (2001) Fluoroproline als tools for protein design and engineering. Angew Chem Int Ed 40:923–925
- [3] Steiner T, Hess P, Bae JH et al. (2008) Synthetic biology of proteins: tuning GFPs folding and stability with fluoroproline. PLoS One 3:e1680
- [4] Wolschner C, Giese A, Kretschmar HA et al. (2009) Design of anti- and pro-aggregation variants to assess the effects of methionine oxidation in human prion protein. Proc Natl Acad Sci USA 106:7756–7761
- [5] Berlett BS, Stadtman ER (1997) Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. J Biol Chem 272:20313–20316
- [6] Ruan H, Tang XD, Chen ML et al. (2002) High-quality life extension by the enzyme peptide methionine sulfoxide reductase. Proc Natl Acad Sci USA 99:2748–2753



Korrespondenzadresse:

Michael Hösl¹
 Dr. Nediljko Budisa²
 Max-Planck-Institut für Biochemie
 BioFuture Forschungsgruppe „Molekulare Biotechnologie“
 Am Klopferspitz 18
 D-82152 Martinsried
 Tel.: 089-8578-2344
 Fax: 089-8578-3577
 budisa@biochem.mpg.de
 www.biochem.mpg.de/budisa