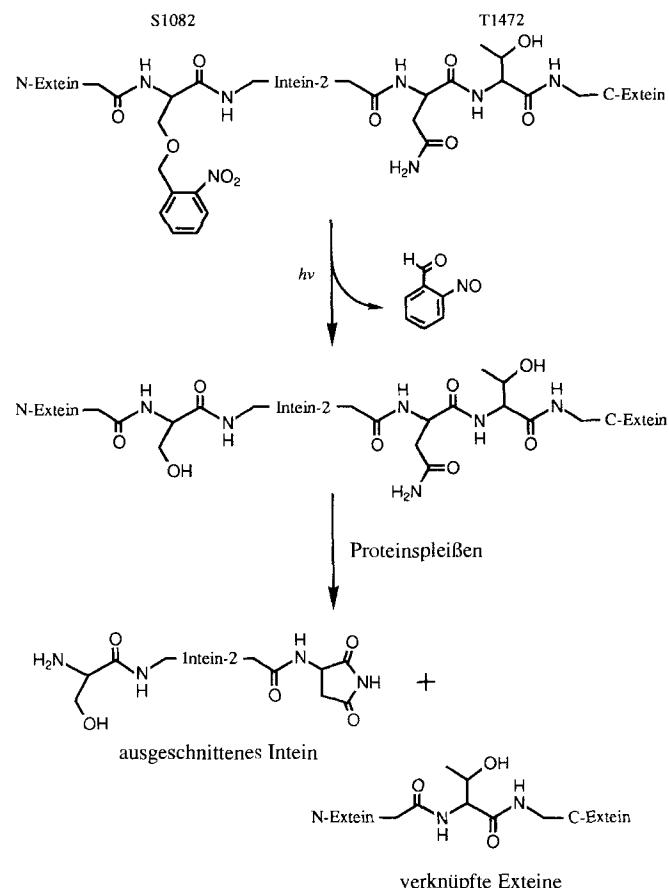


Photochemisch induziertes Proteinspleißen**

Sandra N. Cook, William E. Jack, Xiaofeng Xiong, Lora E. Danley, Jonathan A. Ellman, Peter G. Schultz und Christopher J. Noren*

Beim Proteinspleißen handelt es sich um einen posttranskriptionalen Vorgang, bei dem ein internes Polypeptidsegment (Intein)^[1] aus einem primären Translationsprodukt herausgeschnitten wird und die angrenzenden Polypeptide (Exteine) miteinander verknüpft werden^[2]. Bei diesem Vorgang entstehen aus einem einzigen Vorläuferpolypeptid zwei Proteinprodukte: das Intein (oft eine Homing-Endonuclease, von der man vermutet, daß sie die laterale Übertragung der Intein-codierenden Sequenz einleitet)^[3] und die durch Ligation verknüpften Exteine. An einem gut gereinigten Vorläuferprotein wurde gezeigt, daß dieses in vitro spleißt, ein Hinweis auf die autokatalytische Natur des Proteinspleißens^[4]. Wie die Expression von Intein-codierenden Sequenzen in fremden genetischen Umgebungen gezeigt hat, befinden sich mit Ausnahme der ersten Aminosäure des C-Extein alle Aminosäurereste, die für das Spleißen benötigt werden, im Intein^[4–6]. Der Vergleich von sieben selbstspleißenden Proteinen ergab mehrere konservierte Merkmale, einschließlich dem Vorhandensein kleiner nucleophiler Aminosäurereste (Cys, Ser oder Thr) unmittelbar hinter beiden Spleißstellen und dem der Sequenz His-Asn direkt vor der stromabwärts gelegenen Spleißstelle^[2]. Eine Substitution der Ser-, Cys- oder Thr-Reste an den beiden Spleißstellen verhindert das Spleißen^[2e, i, 5–7]. Deshalb wurde ein Spleißmechanismus vorgeschlagen, bei dem einer oder beide dieser Reste eine Rolle spielt, die mit den Nucleophilen der aktiven Zentren von Serin- und Cysteinproteasen vergleichbar ist^[2e, h, i, 4, 8]. Wir haben damit begonnen, den Mechanismus dieser neuartigen biochemischen Reaktion zu untersuchen, indem wir Aminosäuren gegen künstliche Aminosäuren austauschen, und berichten über die Herbeiführung und Charakterisierung einer photochemisch induzierten Selbstspleißeung.

Für einführende Untersuchungen wählten wir das Intein-2 der DNA-Polymerase von *Thermococcus litoralis* (*Tli pol*, Vent-Polymerase) aus. Dieses Protein weist an der stromaufwärts gelegenen Spleißstelle einen Serin- und an der stromabwärts gelegenen Spleißstelle einen Threoninrest auf^[2d]. Um das ungespleißte Vorläuferprotein fassen zu können, wurde die konservierte Ser1082-Einheit an der stromaufwärts gelegenen Spleißstelle durch den (2-Nitrobenzyl)ether von Serin ersetzt (Schema 1)^[9]. Bestrahlt man 2-Nitrobenzylether mit Licht der Wellenlänge 300–350 nm, so gehen sie rasch in den entsprechenden freien Alkohol und 2-Nitrosobenzaldehyd^[10] über, d. h. bei der Photolyse sollte die Wildtyp-Sequenz wiederhergestellt und das Spleißen normal ablaufen. Der Einbau des maskierten Serin-Analogon *O*-(2-Nitrobenzyl)serin wurde durch In-vitro-Suppression der entsprechenden Amber-Nonsensemutation mit einer chemisch aminoacylierten Suppressor-tRNA erreicht^[11, 12]. Um die Analyse der Spleißprodukte zu erleichtern,



Schema 1. Das Spleißen von verkürzter DNA-Polymerase aus *Thermococcus litoralis* lässt sich einleiten durch die Photolyse der 2-Nitrobenzylether an der stromaufwärts gelegenen Spleißstelle.

wurde die Ser1082 → Amber(Ser1082am)-Mutation in ein verkürztes Konstrukt (pANY5) eingebaut, bei dem das 45.3 kDa schwere Intein-2 von *Tli pol* von lediglich 2.2 kDa des N-Extein und 8.3 kDa des C-Extein umgeben ist^[13].

Bei der Expression in einem *E. coli*-abhängigen Transkriptions-/Translationssystem^[11, 14] (Abb. 1) lieferte das Wildtyp-Konstrukt pANY5 den erwarteten Vorläufer mit 55.8 kDa und das herausgeschnittene Intein mit 45.3 kDa (die Endonuclease PI-*TliI*), die über Western-Blotting mit Hilfe eines anti-PI-*TliI*-Antikörpers nachgewiesen wurden^[15]. Das gespleißte Produkt wurde in einer Ausbeute von etwa 70% erhalten, was in Einklang mit veröffentlichten Ergebnissen für Archaea-Inteine ist, die ebenfalls in *E. coli* exprimiert wurden^[2e, 4]. Dies ist vermutlich auf Subpopulation von Vorläufermolekülen zurückzuführen, die aufgrund der geringeren Wachstumstemperatur in *E. coli* nicht korrekt gefaltet sind. Die Expression der stromaufwärts Amber-Mutante pAOD1 (S1082am) in Abwesenheit von Suppressor-tRNA lieferte ein 53-kDa-Produkt, das mit einem Neubeginn der Translation nach dem Amber-Codon in Übereinstimmung steht. Wie erwartet verminderte sich die Intensität dieser Bande in Gegenwart aminoacylierter Suppressor-tRNA. Ein Überlesen des Amber-Codons durch endogene Aminoacyl-tRNA (was zum vollständigen Vorläuferprotein mit 56 kDa führt) war unter den Versuchsbedingungen ohne Bedeutung.

Das Dinucleotid pdCpA wurde mit *N*-Biphenylisopropyl-oxy carbonyl(BPOC)-geschütztem *O*-(2-Nitrobenzyl)serin (*O*-NB-Ser) acyliert und mit Hilfe der T4-RNA-Ligase^[11d, 12a] an die verkürzte tRNA_{CUA}(-CA)^[11c] gebunden. Die In-vitro-Transkription/Translation der Ser1082-Amber-Mutante pAOD1 in

* Dr. C. J. Noren, S. N. Cook, Dr. W. E. Jack, Dr. X. Xiong
New England Biolabs
32 Tozer Road, Beverly, MA 01915 (USA)
L. E. Danley, Prof. J. A. Ellman, Prof. P. G. Schultz
College of Chemistry, University of California
Berkeley, CA (USA)

** Diese Arbeit (P.G.S.) wurde vom Office of Energy Research, Division of Materials Sciences and Division of Energy Biosciences sowie vom Office of General Life Sciences, Structural Biology Division, des U.S. Department of Energy (DE-AC03-76SF00098) gefördert. Wir danken Huimin Kong und Sharon Cload für technische Unterstützung sowie Francine Perler, Ming Xu, Paul Evans, Virginia Cornish und Don Comb für hilfreiche Diskussionen.

der Gegenwart von ungeschützter *O*-NB-Seryl-tRNA_{CUA} lieferte das 55.8 kDa schwere Vorläuferprotein (Abb. 1). Das 45.3 kDa schwere Produkt, das dem herausgeschnittenen Intein entspricht, wurde nicht beobachtet, was darauf hindeutet, daß die 2-Nitrobenzyl-Gruppe an der Hydroxy-Gruppe des Serins die Spleißreaktion quantitativ blockiert hat. Eine kurze Bestrahlung des blockierten Vorläufers mit nachfolgender Inkubation

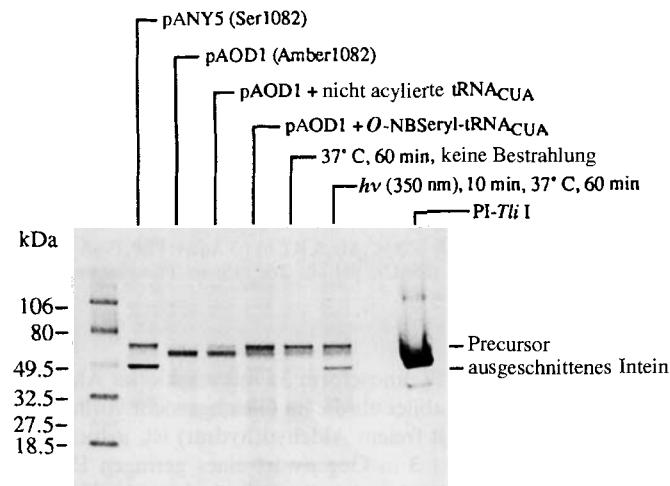


Abb. 1. Western-Blot-Analyse nach In-vitro-Suppression und photochemisch ausgelöstem Spleißen. Für die In-vitro-Transkriptions-/Translationsreaktionen (30 μ L) [14] wurden 3 μ g des Expressionsvektors pANY5 (2.2 kDa-N-Extein/45.3-kDa-Intein/8.3-kDa-C-Extein) oder die beschriebene, an der stromauwärts gelegenen Spleißstelle modifizierte Amber-Mutante pAO1 (S1082am) eingesetzt. Hierzu wurden 8.5 μ L des S-30-Extraktes aus *E. coli* D-10, 450 Einheiten T7-RNA-Polymerase, 3 μ g Rifampicin und, wo angegeben, 4 μ g nicht acylierte tRNA_{CUA} [11c] oder 10 μ g *O*-NB-Seryl-tRNA_{CUA} [11b] hinzugefügt. Die Reaktionsmischungen wurden über 30 min bei 37 °C im Dunkeln unter Schütteln inkubiert. Von jeder Mischung wurden 5 μ L abgezogen und für die spätere Gelanalyse mit Aceton gefällt. Bei den *O*-NB-Ser-supprimierten Reaktionen wurde die Translation mit RNAse A (0.3 mg mL^{-1}) gestoppt und das Spleißen des Proteins photochemisch eingeleitet, indem jeweils die Hälfte jeder Reaktionsmischung auf Eis 10 min aus 20 cm Entfernung mit einer 275-W-Wolframlampe bestrahlt wurde, die mit einem UV-Filter (GE, Modell-Nr. RSK6B) ausgestattet war; die andere Hälfte wurde zur Kontrolle im Dunkeln belassen. Beide Teile wurden anschließend im Dunkeln für 60 min bei 37 °C inkubiert, um die Spleißreaktion zu ermöglichen. Danach wurden jeweils 5 μ L für die Gelanalyse mit Aceton gefällt. Alle Proben wurden denaturiert und auf einem 10–20%-Gradienten von SDS-Tricin-Gel (NOVEX) elektrophoresiert. Im folgenden wurden sie auf Nitrocellulose-Membran überführt und mit anti-PI-Tli I-Antikörpern (polyklonales Serum aus Mäusen, C. Carlow) [2d] getestet. Die Blots wurden mit einem Konjugat von alkalischer Phosphatase und Ziegen-Antimaus-IgG unter Verwendung von NBT/BCIP als colorimetrisches Substrat entwickelt [15]. Gereinigtes Intein-2 (PI-Tli I, NEB) diente als Standard für den Western-Blot.

zur Ermöglichung der Spleißreaktion führte zur Herausspaltung des 45.3-kDa-Inteins in einem Ausmaß, das mit demjenigen beim Wildtyp-Konstrukt vergleichbar ist (ca. 50%). Bei der Kontrollreaktion ohne Belichtung wurde kein Herausschneiden beobachtet, d. h. der Spleißvorgang ist vollständig von der Belichtung abhängig. Das 10-kDa-Verknüpfungsprodukt konnte nicht nachgewiesen werden, was möglicherweise auf die proteolytische Empfindlichkeit der *T. litoralis*-DNA-Polymerase in *E. coli* zurückzuführen ist^[2e]. Da jedoch die Aminosäuresequenz des Wildtyps bei der Photolyse freigesetzt wird, wissen wir aus vorhergehenden Untersuchungen, daß die Excision des Inteins mit der Ligation der Exteine einhergeht^[2e, 4].

Wie diese Ergebnisse zeigen, unterdrückt die *O*-NB-Ser-tRNA_{CUA} wirksam die Ser1082-Amber-Mutante und führt zu einem Vorläuferprotein mit voller Länge, dessen Spleißen durch eine kurze Photolyse in Gang gesetzt werden kann. Diese Expe-

ri mente sollten eine Reihe von zeitaufgelösten Untersuchungen zur Aufklärung des Mechanismus der Spleißreaktion von Proteinen ermöglichen.

Eingegangen am 2. März 1995 [Z 7757]

Stichworte: Biochemie · Photolysen · Proteine · Spleißen · Suppressor-tRNA

- [1] In Analogie zu den RNA-Introns wurde das herausgeschnittene Proteinsegment als Intein bezeichnet, während die angrenzenden Polypeptide, die nach dem Herausschneiden des Inteins verknüpft werden, Exteine genannt werden. Mit N-Extein und C-Extein sind die stromauwärts beziehungsweise stromabwärts anschließenden Exteine gemeint. F. B. Perler, E. O. Davis, G. E. Dean, F. S. Gimble, W. E. Jack, N. Neff, C. J. Noren, J. Thorner, M. Belfort, *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 1125–127.
- [2] a) P. M. Kane, C. T. Yamashiro, D. F. Wolczyk, N. Neff, M. Goebl, T. H. Stevens, *Science* **1990**, *250*, 651–657; b) R. Hirata, Y. Ohsumi, A. Nakano, H. Kawasaki, K. Suzuki, Y. Anraku, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 6726–6733; c) E. O. Davis, S. G. Sedgwick, M. J. Colston, *J. Bacteriol.* **1991**, *173*, 5653–5662; d) F. B. Perler, D. G. Comb, W. E. Jack, L. S. Moran, R. B. Kucera, J. Benner, B. E. Slatko, S. K. Hempstead, C. K. S. Carlow, H. Jannasch, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 5577–5581; e) R. A. Hodges, F. B. Perler, C. J. Noren, W. E. Jack, *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20*, 6153–6157; f) H. H. Gu, J. Xu, M. Gallagher, G. E. Dean, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 7372–7381; g) E. O. Davis, H. S. Thangaraj, P. C. Brooks, M. J. Colston, *EMBO J.* **1994**, *13*, 699–703; h) C. J. A. Wallace, *Protein Sci.* **1993**, *2*, 697–705; i) Y. Anraku, R. Hirata, *J. Biochem.* **1994**, *115*, 175–178.
- [3] a) F. S. Gimble, J. Thorner, *Nature (London)* **1992**, *357*, 301–306; b) D. A. Shub, H. Goodrich-Blair, *Cell* **1992**, *71*, 183–186; c) R. F. Doolittle, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 5379–5381; d) A. M. Lambowitz, M. Belfort, *Ann. Rev. Biochem.* **1993**, *62*, 587–622.
- [4] M.-Q. Xu, M. W. Southworth, F. B. Mersha, L. J. Hornstra, F. B. Perler, *Cell* **1993**, *75*, 1371–1377.
- [5] E. O. Davis, P. J. Jenner, P. C. Brooks, M. J. Colston, S. G. Sedgwick, *Cell* **1992**, *71*, 201–210.
- [6] A. A. Cooper, Y. J. Chen, M. A. Lindorfer, T. H. Stevens, *EMBO J.* **1993**, *12*, 2575–2583.
- [7] R. Hirata, Y. Anraku, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1992**, *188*, 40–47.
- [8] M.-Q. Xu, D. G. Comb, H. Paulus, C. J. Noren, Y. Shao, F. B. Perler, *Embo J.* **1994**, *13*, 5517–5522.
- [9] Durch eine posttranskriptionale Modifikation wurden Serinproteasen photoversibel mit Cinnamaten inhibiert: a) I. V. Berezin, S. D. Varfolomeyev, K. Martinsek, *FEBS Lett.* **1970**, *8*, 173–175; b) N. A. Porter, J. Bruhnke, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 7616–7618; c) B. L. Stoddard, J. Bruhnke, P. Koenigs, N. Porter, D. Ringe, G. A. Petsko, *Biochemistry* **1990**, *29*, 8042–8051.
- [10] a) T. W. Greene, *Protective Groups in Organic Chemistry*, Wiley, New York, **1981**, *S. 32*; b) U. Zehavi, B. Amit, A. Patchornik, *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 2281–2284; c) U. Zehavi, A. Patchornik, *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 2285.
- [11] a) C. J. Noren, S. J. Anthony-Cahill, M. C. Griffith, P. G. Schultz, *Science* **1989**, *244*, 182–188; b) J. Ellman, D. Mendel, S. Anthony-Cahill, C. J. Noren, P. G. Schultz, *Methods Enzymol.* **1991**, *202*, 301–336; c) C. J. Noren, S. J. Anthony-Cahill, K. A. Noren, M. C. Griffith, P. G. Schultz, *Nucleic Acids Res.* **1990**, *18*, 83–88; d) S. A. Robertson, C. J. Noren, S. J. Anthony-Cahill, M. C. Griffith, P. G. Schultz, *Nucleic Acids Res.* **1989**, *17*, 9649–9660.
- [12] a) D. Mendel, J. A. Ellman, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 2758–2760; b) J. A. Ellman, D. Mendel, P. G. Schultz, *Science* **1992**, *255*, 197–200; c) D. Mendel, J. A. Ellman, Z. Chang, D. L. Veenstra, P. A. Kollman, P. G. Schultz, *Science* **1992**, *256*, 1798–1802; d) H. Chung, D. Benson, P. G. Schultz, *Science* **1993**, *259*, 806–809; e) K. Judice, T. R. Gamble, E. C. Murphy, A. M. de Vos, P. G. Schultz, *Science* **1993**, *261*, 1578–1581; f) V. W. Cornish, D. R. Benson, C. A. Altenbach, K. Hideg, W. L. Hubbell, P. G. Schultz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 2910–2914.
- [13] Das verkürzte Konstrukt pANY5 wurde durch eine PCR-Deletionsmutagenese von pNEB687 [2d] gewonnen, bei dem das *Tli-pol*-Gen (ohne Intein-1) unter der Kontrolle des T7-Promotors steht. Die Amber-Mutation S1082am wurde über eine Oligonukleotid-gerichtete Mutagenese in pANY5 eingeführt, wodurch pAO1 entstand: T. A. Kunkel, K. Bebenek, J. McClary, *Methods Enzymol.* **1991**, *204*, 125–139.
- [14] a) G. Zubay, *Annu. Rev. Genet.* **1973**, *7*, 267–287; b) J. Collins, *Gene* **1979**, *6*, 29–42; c) J. Pratt in *Transcription and Translation: A Practical Approach* (Hrsg.: B. D. Hames, S. J. Higgins), IRL, Oxford, **1984**, S. 179–209.
- [15] J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, **1989**, S. 18.60–18.74.