

Engineering des genetischen Codes: Molekularbiologie und Organische Chemie kombiniert

Jan H. van Maarseveen* und Jaap Willem Back

Stichwörter:

Aminosäuren · Biosynthese · Protein-Engineering · Proteinmodifikationen · tRNA

Beim Einbau nichtproteinogener Aminosäuren während der Proteinbiosynthese wurden in den letzten Jahren etliche Durchbrüche verzeichnet.^[1] Insbesondere die Arbeitsgruppen von Schultz,^[2] Yokoyama^[3] und Tirrell^[4] haben gezeigt, dass unter Nutzung des natürlichen Synthesapparats die Diversität von Proteinen über die 20 proteinogenen Aminosäuren hinaus vergrößert werden kann. Beispiele sind der Einbau von Aminosäuren mit funktionellen Gruppen (die als photoaktivierbare Vernetzungsstellen, Spin-Marker, Fluoreszenz-Marker oder Chelatbildner für Metalle dienen), glycosylierten Aminosäuren und einer biotinylierten Aminosäure zur Affinitätsmarkierung.^[5] Hier richten wir das Augenmerk auf Aminosäuren mit biologisch inerten, aber chemisch reaktiven (bioorthogonalen) funktionellen Gruppen in der Seitenkette, die die selektive posttranslationale kovalente Modifikation von Proteinen ermöglichen (Schema 1). Der Einbau solcher Aminosäuren in Proteine bringt die Molekularbiologie mit der Organischen Chemie zusammen und bietet ein interessantes Forschungsgebiet mit einer Vielzahl von Anwendungsmöglichkeiten.

[*] Dr. J. H. van Maarseveen
Institute of Molecular Chemistry
University of Amsterdam
Nieuwe Achtergracht 129
1018 WS Amsterdam (Niederlande)
Fax: (+31) 20-525-5670
E-mail: jvm@science.uva.nl

Dr. J. W. Back
Swammerdam Institute for Life Sciences
Mass Spectrometry Group
University of Amsterdam
Nieuwe Achtergracht 166
1018 WV Amsterdam (Niederlande)

Der Einbau nichtproteinogener Aminosäuren in Proteine gelang mit einer Vielzahl von In-vitro- und In-vivo-Systemen (Abbildung 1). tRNA kann innerhalb oder außerhalb der Zelle mit einer Aminosäure beladen werden, entweder durch eine stöchiometrische chemische Ligation oder katalytisch. In Anbetracht der Vielzahl unterschiedlicher Optionen und Vorgaben existiert bislang keine allgemein anwendbare Methode zum Einbau von Aminosäuren, wobei aktuelle Forschungen auf selbsterhaltende Systeme im lebenden Modell zielen. Eindrucksvolle Beispiele wurden bei Studien zum Acetylcholin-Rezeptor in *Xenopus*-Oocyten^[6] und zu kultivierten menschlichen Neuronen erarbeitet.^[7]

tRNAs können extrazellulär mit beliebigen nichtproteinogenen Aminosäuren chemisch ligiert werden. Einzige Voraussetzung ist, dass die Ribosomen die gebildete Aminoacyl-tRNA (aa-tRNA) bei der Translation verwerten können. Die absoluten Mengen der so erhältlichen Proteine sind im Allgemeinen gering, da jede einzelne tRNA stöchiometrisch ligiert und dann in die Zellen eingebracht werden muss. Katalytisch hergestellte aa-tRNAs sind in größeren Mengen verfügbar, machen aber andere Überlegungen notwendig. Durch Ausschöpfen der Substrattoleranz nativer aa-tRNA-Synthasen (aaRSs) kann die intrazelluläre Acylierung in einer proteomweiten Expression modifizierter Proteine resultieren. Ein Beispiel ist Met-aaRS, die die Beladung sowohl mit Selenomethionin als auch mit Aminosäuren mit chemisch stärker abweichenden Seitenketten ermöglicht.^[8]

Zum ortsspezifischen Einbau einer nichtproteinogenen Aminosäure wird

eine aaRS benötigt, die eine spezifische tRNA acyliert, die vom Expressionssystem nicht mit proteinogenen Aminosäuren beladen werden kann. Diese orthogonalen tRNA-aaRS-Paare müssen dann zusammen mit einem Plasmid, das für das gewünschte Protein codiert, in die Wirtszelle transfiziert werden. Es wurden bereits mehrere solcher Paare beschrieben, die den Einbau der gewünschten Aminosäure an der vorbestimmten Position durch Acylierung von Suppressor-tRNAs vermitteln, sodass entweder das Amber-Codon überlesen (Weg A, Abbildung 1)^[9] oder eine spezifische Watson-Crick-Basenpaarung an der dritten Codonposition („Wobble-Base“) eingegangen werden kann (Weg B, Abbildung 1).^[4] Im zweiten Fall wird jedoch die nichtnatürliche Aminosäure auch in andere Zellproteine eingebaut, in denen das redundante Codon für die „erwartete“ natürliche Aminosäure codiert. Alternativ wurden auch Vierbasen-Codons in *E. coli* genutzt, wobei nichtnatürliche Aminosäuren durch die kognaten aa-tRNAs mit Vierbasen-Anticodon in einen Dreibasen-Codierungsrahmen eingebaut werden (Weg C, Abbildung 1).^[10] Eine weitere Möglichkeit ist die Acylierung der tRNA mit Ribozymen,^[11] was gegenwärtig allerdings nur außerhalb der Zelle möglich ist. Ribozyme können vermutlich noch ungewöhnlichere Seitenketten tolerieren als modifizierte aaRSs, weshalb ihre In-vivo-Anwendung auf ein großes Interesse stoßen dürfte.

Wie erwartet, stellten sich mit dem weniger komplexen und besser dokumentierten Translationssystem der Prokaryoten schnellere Fortschritte ein als mit Eukaryoten. Es gelang sogar, die

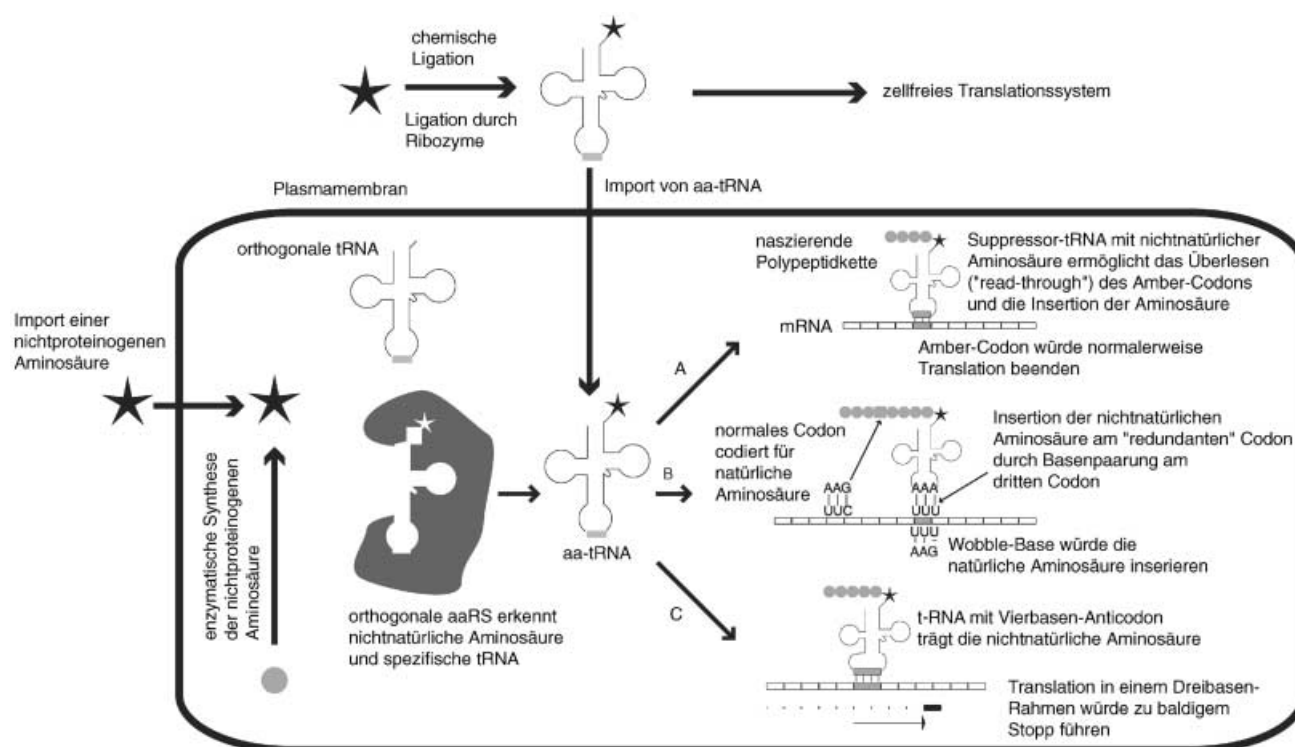


Abbildung 1. Biochemische Strategien zum Einbau nichtproteinogener Aminosäuren in Proteine.

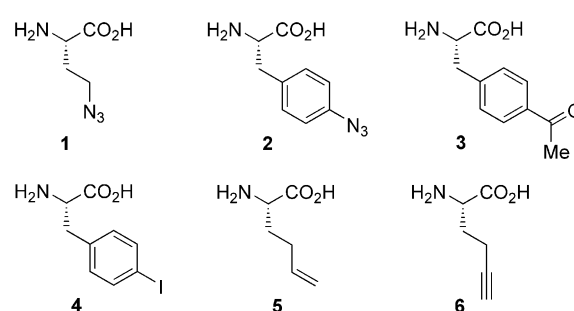
Enzyme für den vollständigen Biosyntheseweg zum *p*-Aminophenylalanin (pAF) einem *E. coli*-Stamm beizufügen, der mit einem für diese Aminosäure spezifischen tRNA-aaRS-Paar transfiguriert worden war;^[12] Ergebnis war ein autonomes System, das zum Proteinaufbau auf ein Repertoire von 21 Aminosäuren zurückgreift.

Allerdings kann im Zusammenhang mit posttranslationalen Modifikationen oder Proteinfaltung ein eukaryotisches Expressionssystem erforderlich sein. Entsprechende Zelllinien können mit einem prokaryotischen orthogonalen tRNA-aaRS-Paar supplementiert werden. Das Funktionieren dieses Ansatzes konnte in zellfreien Systemen gezeigt werden,^[13] deren Verwendung vor allem dann sinnvoll ist, wenn eine Toxizität der Aminosäure oder die Beteiligung chemisch ligierter aa-tRNAs die Verwendung lebender Zellen ausschließt. Jüngste Entwicklungen betreffen die Einführung orthogonaler tRNA-aaRS-Paare in lebende eukaryotische Zellen, z. B. in Hefezellen^[1] und kultivierte humane Zelllinien.^[3,14]

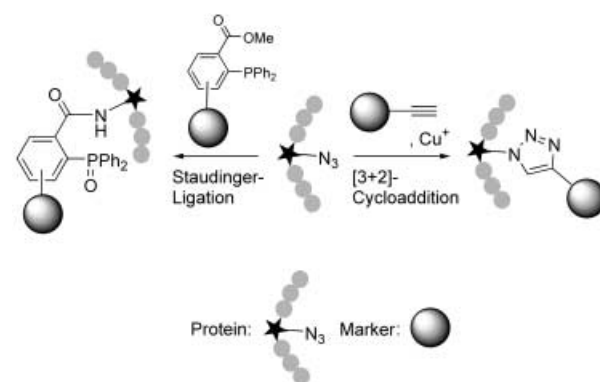
Bislang wurden mehr als 100 nichtproteinogene Aminosäuren biosynthe-

tisch in Proteine eingebaut.^[5] Um das Potenzial derart modifizierter Proteine zu verdeutlichen, sei exemplarisch auf den Einbau von Azidohomoalanin (**1**) hingewiesen (Schema 1). Die inerte und biokompatible Azidogruppe in **1** erwies sich in posttranslationalen bioorthogonalen (abiotischen) chemischen Transformationen als ausgesprochen vielseitig. Die Arbeitsgruppen von Bertozzi und Tirrell substituierten die acht Methioninreste in der Dihydrofolatreduktase der Maus (mDHFR) durch **1** und markierten dieses Reporterprotein selektiv mit antigenen FLAG-Peptiden^[15] bzw. fluorophoren Cumarinfarbstoffen^[16] in einer Staudinger-Ligation in rohem Zelllysate (Schema 2).

Eine andere bemerkenswerte Reaktion zur Proteinfunktionalisierung ist die als „Click-Reaktion“^[17] bezeichnete Kupfer(I)-katalysierte dipolare [3+2]-Azid-Alkin-Cycloaddition (Schema 2). Link



Schema 1. Nichtnatürliche Aminosäuren mit bioorthogonaler, chemisch modifizierter Seitenkette.



Schema 2. Kovalente Funktionalisierung eines azidmarkierten Proteins durch bioorthogonale Reaktionen.

und Tirrell beschrieben den Einbau von **1** in das Membranprotein C mit nachfolgender Umsetzung der Azidgruppen mit einem biotinylierten Alkinreagens.^[18] Die Reaktion konnte durch Anfärben mit fluoreszierendem Avidin verfolgt werden. In einer anderen Studie wurde *p*-Acetyl-L-phenylalanin (**3**), das allerdings wegen der vielen endogenen Ketogruppen in lebenden Zellen, z.B. bei Zuckern, nicht streng bioorthogonal ist, mit exogenen Hydrazidreagentien in vivo umgesetzt.^[19]

Wir möchten dieses Highlight mit einem kurzen Ausblick auf künftige Entwicklungen beschließen. Eine zentrale Aufgabe an die Synthesechemie betrifft die Erweiterung des Sortiments an bioorthogonalen Reaktionen. Anbieten würde sich z.B. die milde, Übergangsmetall-katalysierte Suzuki-Kreuzkupplung zwischen dem pseudoproteinogenen *p*-Iod-L-Phenylalanin (**4**) und einer exogenen Aryl- oder Alkylboronsäure.^[20] Die pseudoproteinogenen Aminosäuren Homoallylglycin (**5**) und Homopropargylglycin (**6**) könnten als Substrate in posttranslationalen chemischen Modifikationen mithilfe der ausgesprochen milden Alken-, Alkin- oder Enin-Metathese-Reaktionen eingesetzt werden.^[21] Durch intramolekulare Metathese-Reaktionen in einem Homoallylglycin-modifizierten Protein würden sich Links erzeugen lassen, die als sehr stabile Isostere von Disulfidbrücken dienen könnten. Ein alternativer Ansatz zu solchen Verknüpfungen wäre eine [3+2]-Cycloaddition zwischen den Azidoaminosäuren **1** oder **2** und der Alkinylaminosäure **6**. Ein erster Eindruck von der erhöhten Stabilität von Proteinen mit nichtnatürlichen Aminosäuren konnte durch den Einbau von Trifluorleucin anstelle von Leucin in Leucin-Zipper-Proteine gewonnen werden, denn die so modifizierten Proteine wie-

sen eine verbesserte Toleranz gegen hohe Temperaturen und denaturierende Reagentien auf.^[22]

Zusammengefasst machen die jüngst entdeckten und entwickelten biotechnologischen Methoden zum Einbau nichtproteinogener Aminosäuren maßgeschneiderte Proteine für ein breites Spektrum von Anwendungen verfügbar. Die bisherigen Resultate machen neugierig auf weitere Entwicklungen, die sicher einen großen Einfluss auf unterschiedliche Wissenschaftsbereiche wie Proteomics, Biomaterialien, die biomedizinische Forschung, Biokatalyse und Synthese haben werden.

- [1] Ein maßgeblicher Übersichtsartikel hierzu: V. W. Cornish, D. Mendel, P. G. Schultz, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 677–690; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 621–633.
- [2] J. W. Chin, T. A. Cropp, J. C. Anderson, M. Mukherji, Z. Zhang, P. G. Schultz, *Science* **2003**, *301*, 964–967.
- [3] K. Sakamoto, A. Hayashi, A. Sakamoto, D. Kiga, H. Nakayama, A. Soma, T. Kobayashi, M. Kitabatake, K. Takio, K. Saito, M. Shirouzu, I. Hirao, S. Yokoyama, *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 4692–4699.
- [4] I. Kwon, K. Kirshenbaum, D. A. Tirrell, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 7512–7513.
- [5] L. Wang, P. G. Schultz, *Chem. Commun.* **2002**, 1–11.
- [6] M. W. Nowak, J. P. Gallivan, S. K. Silverman, C. G. Labarca, D. A. Dougherty, H. A. Lester, *Methods Enzymol.* **1998**, *293*, 504–529.
- [7] S. L. Monahan, H. A. Lester, D. A. Dougherty, *Chem. Biol.* **2003**, *10*, 573–580.
- [8] a) D. B. Cowie, G. N. B. Cohen, *Biochim. Biophys. Acta* **1957**, *26*, 252–261; b) J. C. M. van Hest, K. L. Kiick, D. A. Tirrell, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 1282–1288; c) K. L. Kiick, J. C. M. van Hest, D. A. Tirrell, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 2232–2236; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 2148–2152.
- [9] a) D. R. Liu, T. J. Magliery, M. Pasternak, P. G. Schultz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 10092–10097; b) L. Wang, A. Brock, B. Herberich, P. G. Schultz, *Science* **2001**, *292*, 498–500.
- [10] T. Hoshika, Y. Ashizuka, H. Taira, H. Murakami, M. Sisido, *Biochemistry* **2001**, *40*, 11060–11064.
- [11] H. Murakami, H. Saito, H. Suga, *Chem. Biol.* **2003**, *10*, 655–662.
- [12] R. A. Mehl, J. C. Anderson, S. W. Santoro, L. Wang, A. B. Martin, D. S. King, D. M. Horn, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 935–939.
- [13] D. Kiga, K. Sakamoto, K. Kodama, T. Kigawa, T. Matsuda, T. Yabuki, M. Shirouzu, Y. Harada, H. Nakayama, K. Takio, Y. Hasegawa, Y. Endo, I. Hirao, S. Yokoyama, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 9715–9720.
- [14] C. Kohrer, L. Xie, S. Kellerer, U. Varshney, U. L. Rajbhandary, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 14310–14315.
- [15] K. L. Kiick, E. Saxon, D. A. Tirrell, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 19–24.
- [16] G. A. Lemieux, C. L. de Graffenried, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4708–4709.
- [17] a) H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 2056–2075; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004–2021; b) V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 2708–2711; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596–2599.
- [18] A. J. Link, D. A. Tirrell, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11164–11165.
- [19] Z. Zhang, B. A. C. Smith, L. Wang, A. Brock, C. Cho, P. G. Schultz, *Biochemistry* **2003**, *42*, 6735–6746.
- [20] A. Suzuki, *J. Organomet. Chem.* **1999**, *576*, 147–168.
- [21] T. M. Trnka, R. H. Grubbs, *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 18–29.
- [22] Y. Tang, G. Ghirlanda, W. A. Petka, T. Nakajima, W. F. DeGrado, D. A. Tirrell, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 1542–1544; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 1494–1496.