

# Bildung von Proteinaggregaten durch Metallkoordination\*\*

Kagan Kerman und Heinz-Bernhard Kraatz\*

Bioanorganische Chemie · De-novo-Design · Metallkoordination · Protein-Protein-Wechselwirkungen · Proteinstrukturen

Die Tatsache, dass die Aminosäuresequenz eines Proteins dessen einzigartige Struktur vorgibt, fasziniert Wissenschaftler schon lange. Das wachsende Wissen über Proteine hat das Design und die Konstruktion bestimmter Proteinstrukturen ermöglicht. Die Kombinationen nichtkovalerter Wechselwirkungen in einem bestimmten Protein sind in dessen Aminosäuresequenz (der Primärstruktur) codiert. Da diese nichtkovalenlen Wechselwirkungen (Wasserstoffbrücken, elektrostatische und Van-der-Waals-Wechselwirkungen) in physikochemischer Hinsicht mittlerweile gut verstanden werden, ist es möglich, durch Wahl der geeigneten Aminosäuresequenzen nichtnatürliche Polymere/Oligomere mit kompakten, wohldefinierten dreidimensionalen Strukturen zu entwerfen und zu synthetisieren.

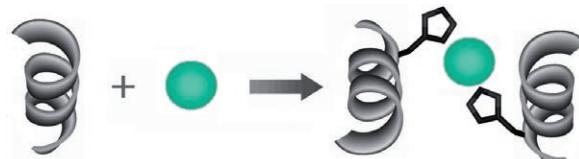
Diese Idee führte schließlich zum De-novo-Design künstlicher Proteine am Reißbrett.<sup>[1]</sup> Diese De-novo-Moleküle oder Foldameren<sup>[2]</sup> können abiotische Bausteine, z.B. aromatische Ringe mit redox- oder photoaktiven Gruppen, aufweisen, die ihnen spezielle Funktionen verleihen. Zu den Entwicklungen auf dem Foldamerengebiet zählen die Untersuchung der Sequenzspezifität verschiedener Sekundärstrukturen, die Stabilisierung der Sekundärstrukturen in Wasser und die Herstellung von Tertiärstrukturen wie helicalen Bündeln, fassartigen Aggregaten und stabilen helicalen Foldameren.<sup>[2,3]</sup> Die Forschung an abiotischen Foldameren hat sich im Wesentlichen auf das Design der Monomerometrie konzentriert, um so die Homooligomerstruktur zu verändern. Ein Schwerpunkt ist mittlerweile die Herstellung von Foldameren mit speziellen chemischen Funktionen (Erkennung, Bindung und Selektion). Emil T. Kaiser, ein Pionier auf diesem Gebiet, formulierte die Grundregeln für das De-novo-Proteindesign.<sup>[1c]</sup> DeGrado und Mitarbeiter<sup>[1f]</sup> beschrieben kürzlich verschiedene Aspekte des Foldameredesigns und fassten die Verwendung von Foldameren als vielseitige Systeme zur Generierung von Funktion zusammen.

[\*] Dr. K. Kerman, Prof. H.-B. Kraatz  
Department of Chemistry  
The University of Western Ontario  
1151 Richmond Street, London, N6A 5B7, Ontario (Kanada)  
Fax: (+1) 519-661-3022  
E-Mail: hkraatz@uwo.ca

[\*\*] Diese Arbeit wurde vom NSERC sowie vom Ontario Ministry of Research and Innovation unterstützt.

Schueler-Furman et al.<sup>[1e]</sup> beschrieben aktuelle Entwicklungen bei der Modellierung von Proteinstrukturen und -wechselwirkungen.

Viele Forschungsgruppen nutzten die Koordinationschemie zur Herstellung wohldefinierter Peptidaggregate.<sup>[4]</sup> Das Wechselspiel zwischen dem Donorsubstituenten des Peptidfoldamers und dem Metallion bestimmt dessen Koordinationsumgebung und treibt die Zusammenlagerung der Peptide voran (Abbildung 1). Dieser Ansatz wurde zur Untersuchung

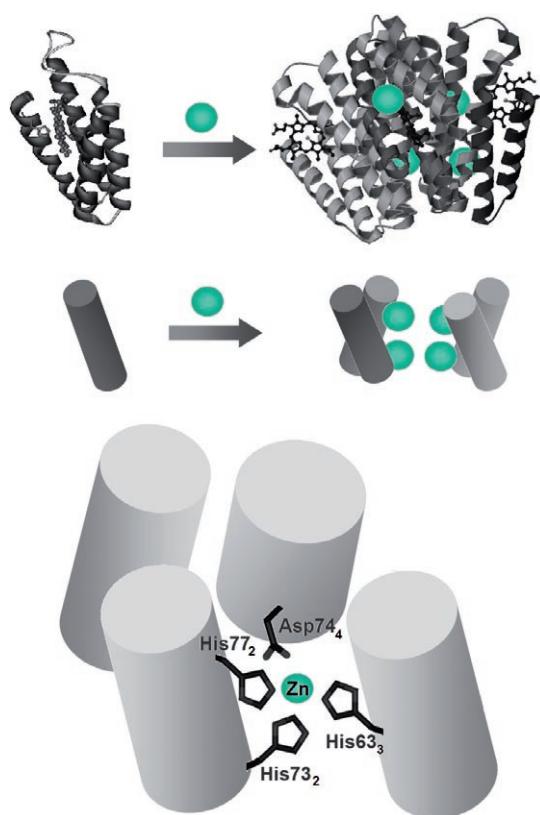


**Abbildung 1.** Metall-Ligand-Wechselwirkungen wurden zur Konstruktion von De-novo-Metalloproteinen genutzt, die häufig einige der Eigenschaften natürlicher Metalloproteine nachahmen. Strukturelle Einschränkungen durch die Metall-Ligand-Wechselwirkungen und die Wechselwirkungen der Substituenten am Peptid bestimmen die Tertiärstruktur des Aggregats.

von Peptid-Peptid-Wechselwirkungen und (erst kürzlich) Peptid-Protein-Wechselwirkungen genutzt. Ogawa und Mitarbeiter beschrieben das De-novo-Design eines Metalloproteins aus kleineren Peptidvorstufen.<sup>[4b-i]</sup> Metallkoordination wurde genutzt, um den Ablauf der Oligomerisation einer  $\alpha$ -helicalen Coiled-coil-Struktur zu verändern, um so bereits während der Coiled-coil-Bildung eine Elektronentransferfunktion einzuführen. Das erhaltene De-novo-Metalloprotein zeigt einen kontrollierten Elektronentransfer und wurde als Sonde zur Untersuchung der Konfigurationsdynamik von Peptid-Protein-Komplexen eingesetzt.<sup>[4d]</sup>

Das Design von Proteinaggregaten ermöglichte die Entwicklung von experimentellen sowie Bioinformatik-Methoden zur Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen,<sup>[5]</sup> die für viele Zellfunktionen eine besondere Rolle spielen. Zwar wurden ausgereifte Computer-Methoden zur Vorhersage dieser Wechselwirkungen entwickelt,<sup>[6]</sup> es fehlen jedoch wohldefinierte Modellsysteme. Eine signifikante Menge solcher Systeme ist aber nötig, um adäquate vergleichende Bewertungen theoretischer Vorhersagen vornehmen

zu können. Weiterhin sind Hochdurchsatzmethoden erforderlich, um ausreichend viele biophysikalisch gut charakterisierte Proteinkomplexe herzustellen. Auch hier leistet die Koordinationschemie einen signifikanten Beitrag. Tezcan und Mitarbeiter<sup>[7]</sup> beschrieben kürzlich einen Ansatz zur Herstellung vieler wohldefinierter Proteinkomplexe durch Nutzung der Metall-Ligand-Koordination. Dabei fungieren die Seitenketten einiger Aminosäuren als Metall-Liganden, die die Zusammenlagerung der Proteinbausteine vorantreiben. Vier Kopien des gut charakterisierten kleinen Proteins Cytochrome  $b_{562}$  (Cyt  $b_{562}$ ) wurden über die Imidazolseitenketten von Histidinresten sowie über die Carboxylatseitenkette eines Asparaginrestes um  $Zn^{2+}$ -Ionen angeordnet (Abbildung 2). Dieser Proteinkomplex mit einer tetraedrischen



**Abbildung 2.** Vier Cyt  $b_{562}$ -Bausteine werden durch Koordination von His-Imidazol- und Asp-Carboxy-Seitenketten an  $Zn^{2+}$ -Ionen miteinander verbunden. Die Stärke, Direktonalität und Selektivität der Metall-Protein-Wechselwirkungen liefern die Basis zur Steuerung der Protein-Protein-Wechselwirkungen. Es werden also keine ausgedehnten bindenden Oberflächen benötigt, um eine hohe Spezifität und Affinität beim Aufbau von Proteinaggregaten zu erreichen.

Koordination an jedem Metallzentrum liefert eines der ersten Beispiele für Protein-Protein-Wechselwirkungen, die durch die Koordination an Metallzentren bedingt werden. Die Vorteile der auf Koordinationschemie basierenden Ansätze sind klar: Während Protein-Protein-Wechselwirkungen im Wesentlichen auf die Überlagerung nichtkovalenter Kräfte zurückgehen, die über große Oberflächen verteilt sind und das Design entsprechender Proteinmodelle schwierig ma-

chen, sind Metall-Ligand-Wechselwirkungen stark gerichtet und unterliegen in vielen Fällen thermodynamischer Kontrolle. Das De-novo-Proteindesign ist ein vielversprechender Ansatz zur Untersuchung der Struktur- und Funktionsmerkmale von Metalloproteinen und wird deshalb zweifellos sehr zum Verständnis der Funktion vieler Metalloenzyme und -proteine beitragen.<sup>[1,4]</sup>

Die Wahl von Cyt  $b_{562}$  als Testprotein ist interessant. Cyt  $b_{562}$  ist ein Häm-Protein, das im Periplasma des gram-negativen Bakteriums *E. coli* exprimiert wird, und ist bereits intensiv erforscht, sodass es ein idealer Testkandidat für die Herstellung von Proteinaggregaten durch Metallkoordination ist. Cyt  $b_{562}$  weist vier antiparallele  $\alpha$ -Helices auf, die sich zu einem linksgängigen Bündel anordnen. Die Häm-Gruppe wird in das Helixbündel inseriert und von Met7 und His102 fixiert, die die axialen Koordinationsstellen am Häm-Eisenzentrum einnehmen. Da sich dieses Protein leicht in *E. coli* überexprimieren lässt und zudem Strukturen der Apo-Form sowie der oxidierten Holoproteine bekannt sind, wurde es intensiv erforscht. Die Struktur von Cyt  $b_{562}$  wurde zunächst 1979 bei einer Auflösung von 2.5 Å<sup>[8]</sup> und später bei einer Auflösung von 1.4 Å bestimmt.<sup>[9]</sup> Die Struktur von oxidiertem Cyt  $b_{562}$  in Lösung wurde von Arnesano et al. beschrieben.<sup>[10]</sup> Das Protein zeichnet sich durch eine wohldefinierte und schnelle Faltungskinetik im Submillisekunden-Bereich aus, wogegen andere Häm-Proteine wie Cyt c zehn Sekunden oder länger für das vollständige Zurückfalten benötigen.<sup>[10]</sup> Eine schnelle Kinetik liegt allerdings nur beim Holoprotein vor, und eine Häm-Dissoziation behindert die Faltungsdynamik erheblich. Tatsächlich erhöht eine kovalente Verknüpfung zwischen der Häm-Einheit und der Polypeptidkette in einer Variante von Cyt  $b_{562}$  die Stabilität und die Faltungsgeschwindigkeit des Proteins.<sup>[11]</sup>

Tezcan und Mitarbeiter verwendeten vier Kopien von Cyt  $b_{562}$  als Bausteine zur Konstruktion eines 16-Helix-Bündels durch Koordination der Bausteine an vier  $Zn^{2+}$ -Ionen (Abbildung 2).<sup>[7]</sup> Der resultierende Metall-Protein-Komplex kristallisierte, und die Strukturanalyse (PDB-Code: 2QLA) wurde bei einer Auflösung von 2.9 Å durchgeführt. Aus Sicht der Koordinationschemie ist diese Struktur eines der komplexesten biologischen Ligandsysteme, die strukturell charakterisiert wurden. Die individuellen Proteinbausteine sind parallel in einer V-Form angeordnet, wobei zwei Cyt  $b_{562}$ -Bausteine über eine zweizählige Symmetriechse miteinander in Beziehung stehen (Protein-Protein-Winkel ca. 37°). Die zwei V-förmigen Substrukturen sind auf antiparallele Weise ineinander verkeilt. Die Koordination an das Zinkion ist sowohl für die Bildung der V-förmigen Substrukturen als auch für deren Verschränkung verantwortlich. Jedes Zinkion befindet sich in einer identischen, verzerrt tetraedrischen  $Zn(His)_3(Asp)$ -Koordinationsumgebung, an der Aminosäureseitenketten von drei Proteinbausteinen beteiligt sind. Demnach bildet sich dieses Aggregat mit wenig oder keiner thermodynamischen Beeinflussung durch spezifische Protein-Protein-Wechselwirkungen.

Die Arbeiten von Tezcan und Mitarbeitern demonstrieren, dass Proteinbausteine mit nicht wechselwirkenden Oberflächen durch Koordination an Metallzentren zu Superstrukturen zusammengelagert werden können. Die Wahl

des Metallzentrums und der ligierenden Stelle im Protein sind von entscheidender Bedeutung, wenn man die Möglichkeiten dieser Methode zur Herstellung vielfältiger Proteinkomplexe mit wohldefinierten Strukturen ausschöpfen will. Es ist zu hoffen, dass dieser Ansatz in Kombination mit detaillierten Bioinformatik-Untersuchungen ein wichtiges Hilfsmittel für die Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen bei einer Reihe verwandter, gut charakterisierter Proteinaggregate werden wird.

Online veröffentlicht am 24. Juli 2008

- [1] a) D. H. Busch, *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 847–860; b) W. F. DeGrado, Z. R. Wasserman, J. D. Lear, *Science* **1989**, *243*, 622–628; c) E. T. Kaiser, *Acc. Chem. Res.* **1989**, *22*, 47–54; d) T. Sasaki, E. T. Kaiser, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 380–381; e) O. Schueler-Furman, C. Wang, P. Bradley, K. Misura, D. Baker, *Science* **2005**, *310*, 638–642; f) C. M. Goodman, S. Choi, S. Shandler, W. F. DeGrado, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 252–262.
- [2] a) M. Costas, M. P. Mehn, M. P. Jensen, L. Que, Jr., *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 939–986; b) J.-U. Rohde, M. R. Bulowski, L. Que, Jr., *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 674–682; c) K. S. Akerfeldt, J. D. Lear, Z. R. Wasserman, L. A. Chung, W. F. DeGrado, *Acc. Chem. Res.* **1993**, *26*, 191–197; d) K. W. Hahn, W. A. Klis, J. M. Stewart, *Science* **1990**, *248*, 1544–1547; e) A. Grove, M. Mutter, J. E. Rivier, M. Montal, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 5919–5924; f) M. R. Ghadiri, J. R. Granja, L. K. Buehler, *Nature* **1994**, *369*, 301–304.
- [3] a) M. Mutter, S. Vuilleumier, *Angew. Chem.* **1989**, *101*, 551–571; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1989**, *28*, 535–554; b) M. Mutter, G. G. Tuchscherer, C. Miller, K.-H. Altman, R. I. Carey, D. F. Wyss, A. M. Labhardt, J. E. Rivier, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 1463–1470; c) R. Mimna, M.-S. Camus, A. Schmid, G. Tuchscherer, H. A. Lashuel, M. Mutter, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 2735–2738; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 2681–2684; d) H.-B. Kraatz, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 2143–2144; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 2055–2056; e) S. K. Dey, H.-B. Kraatz, *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 84–89; f) S. Chowdhury, G. Schatte, H.-B. Kraatz, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 7036–7038; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 6882–6884; g) S. Chowdhury, D. A. R. Sanders, G. Schatte, H.-B. Kraatz, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 765–768; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 751–754.
- [4] a) M. R. Ghadiri, M. A. Case, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 1663–1670; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 1594–1597; b) M. V. Tsurkan, M. Y. Ogawa, *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 6849–6851; c) J. Hong, O. A. Kharenko, M. Y. Ogawa, *Inorg. Chem.* **2006**, *45*, 9974–9984; d) O. A. Kharenko, M. Y. Ogawa, *J. Inorg. Biochem.* **2004**, *98*, 1971–1974; e) M. V. Tsurkan, M. Y. Ogawa, *Chem. Commun.* **2004**, 2092–2093; f) L. Liu, J. Hong, M. Y. Ogawa, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 50–51; g) A. Fedorova, A. Chaudhari, M. Y. Ogawa, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 357–362; h) A. Fedorova, M. Y. Ogawa, *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 150–154; i) M. V. Tsurkan, M. Y. Ogawa, *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 3908–3913.
- [5] a) V. Collura, G. Biossy, *Subcell. Biochem.* **2007**, *43*, 135–183; b) M. E. Cusick, N. Klitgord, M. Vidal, D. E. Hill, *Hum. Mol. Genet.* **2005**, *14*, R171–R181; c) E. Ho, R. Webber, M. R. Wilkins, *J. Proteome Res.* **2008**, *7*, 104–112.
- [6] a) C. L. Vizcarra, S. L. Mayo, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9*, 622–626; b) T. Kortemme, D. Baker, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 91–97; c) R. J. P. van Berlo, L. F. A. Wessels, D. de Ridder, M. J. T. Reinders, *J. Bioinf. Comput. Biol.* **2007**, *5*, 839–864.
- [7] E. N. Saldago, J. Faraone-Mennella, F. A. Tezcan, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 13374–13375.
- [8] F. S. Mathews, P. H. Bethge, E. W. Czerwinski, *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 1699–1706.
- [9] K. Hamada, P. H. Bethge, F. S. Mathews, *J. Mol. Biol.* **1995**, *247*, 947–962.
- [10] F. Arnesano, L. Banci, I. Bertini, J. Faraone-Mennella, A. Rosato, *Biochemistry* **1999**, *38*, 8657–8670.
- [11] J. Faraone-Mennella, F. A. Tezcan, H. B. Gray, J. R. Winkler, *Biochemistry* **2006**, *45*, 10504–10511.