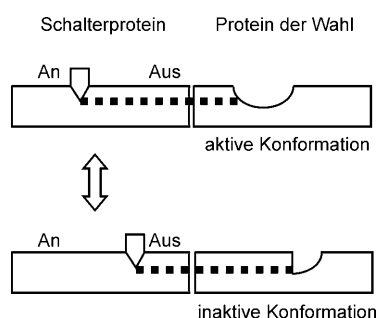


Allosterische Schalter: Fernsteuerungen für Proteine**

Thorsten Berg*

Allosterie · Biologische Aktivität · Enzyme ·
Photochemische Schalter · Proteindesign

Eines der zahlreichen Ziele der chemischen Biologie ist die Identifizierung niedermolekularer Modulatoren für einzelne Funktionen möglichst vieler menschlicher Proteine.^[1] Um dieses Ziel zu erreichen, werden zurzeit verschiedene Ansätze entwickelt, die auf die Schaffung eines Repertoires an niedermolekularen Agentien für chemische Biologen hinauslaufen.^[2–4] Bei diesem mühsamen Unterfangen sind Abkürzungen gerne gesehen. Eine solche Abkürzung könnte darin bestehen, die Aktivität beliebiger ausgewählter Proteine durch deren Fusion mit einem „Schalterprotein“ zu kontrollieren, für das ein experimenteller Steuerungsmechanismus existiert (Schema 1). Die Kontrolle über das ausge-



Schema 1. Funktionsprinzip von Fusionsproteinen, bei denen die Aktivität eines Proteins allosterisch über ein Schalterprotein reguliert wird. Der allosterische Pfad wird durch die gestrichelte Linie symbolisiert.

wählte Protein würde in diesem Fall über allosterische Mechanismen ausgeübt werden. Allosterie kann als das Phänomen bezeichnet werden, durch das eine Strukturänderung an einer Stelle des Proteins zu einer Veränderung der Struktur, und damit auch der Funktion, des Proteins an einer anderen Stelle führt.^[5] Über diesen Mechanismus können wichtige

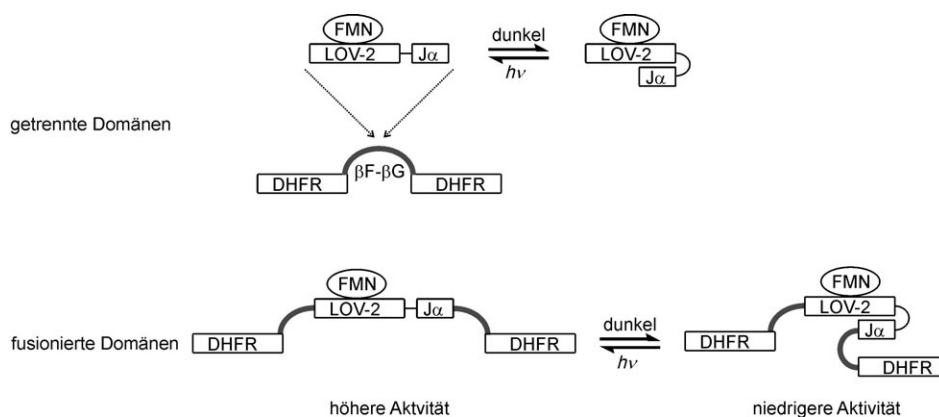
funktionelle Domänen eines Proteins, z.B. das aktive Zentrum eines Enzyms, mit entfernten, exponierten Stellen an der Proteinoberfläche wechselwirken. In der hier vorgestellten Publikation postulieren Ranganathan et al., dass durch Verknüpfung zweier Proteine über solche exponierten Stellen die Aktivität des einen Proteins über die Aktivität des anderen Proteins gesteuert werden kann.^[6]

Um die Umsetzbarkeit ihrer Idee zu demonstrieren, schufen Ranganathan et al. Fusionsproteine, in denen die enzymatische Aktivität der Dihydrofolat-Reduktase (DHFR) durch die LOV2-Domäne von pflanzlichem Phototropin als „Schalterprotein“ reguliert werden sollte.^[6] LOV-Domänen (aus dem Englischen: light, oxygen, and voltage) sind Photosensoren, die an Flavin-Chromophore binden. Aus detaillierten experimentellen Studien ist bekannt, dass die Lichtabsorption durch ein an die LOV2-Domäne gebundenes Flavinmononucleotid eine Konformationsänderung der helicalen Verlängerungen sowohl am N-Terminus als auch am C-Terminus (an der „Ja-Helix“) der LOV2-Domäne auslöst. Dadurch wird die Bindung zwischen der LOV2-Domäne und der Ja-Helix geschwächt (Schema 2).^[7–9] DHFR weist die vom aktiven Zentrum des Enzyms entfernte „βF-βG-Schleife“ auf, deren Dynamik die enzymatische Aktivität bestimmt.^[10] Damit haben beide Proteine exponierte Stellen an ihrer Oberfläche, die von den jeweiligen wichtigen funktionellen Domänen (der Phototropin-Ligandenbindungsstelle bzw. dem aktiven Zentrum von DHFR) zwar räumlich entfernt sind, mit diesen jedoch funktionell verbunden sind. Sie dienen als Kontaktpunkte innerhalb von Fusionsproteinen, bei denen die LOV2-Domäne mitsamt ihrer helicalen Verlängerungen in die βF-βG-Schleife eingefügt wurde (Schema 2).

Falls die Hypothese der Autoren stimmt, sollte die durch Belichtung des Flavinmononucleotid-gebundenen Fusionsmoleküls bewirkte Konformationsänderung im Bereich der LOV2-Domäne die enzymatische Aktivität von DHFR in irgendeiner Weise verändern. Tatsächlich beobachteten sie eine Verdoppelung der enzymatischen Aktivität in einem der Fusionsmoleküle unter Lichteinfluss bei 17°C und einen Anstieg um den Faktor 1.6 bei 25°C. In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen wurde die geschwindigkeitsbestimmende Freisetzung des Produkts Tetrahydrofolat aus der enzymatischen Reaktion unter Lichteinfluss etwa um den Faktor 1.3 erhöht. Durch Untersuchungen mit mutierten Proteinen wurde nachgewiesen, dass die – wenngleich relativ kleinen – Effekte auf bekannten Signalübertragungswegen innerhalb der beiden Proteine beruhen, wodurch die Vor-

[*] Priv.-Doz. Dr. T. Berg
Abteilung für Molekularbiologie, Max-Planck-Institut für Biochemie und Cluster for Integrated Protein Science Munich (CIPSM)
Am Klopferspitz 18, 82152 Martinsried (Deutschland)
Fax: (+49) 89-8578-2454
E-Mail: berg@biochem.mpg.de
Homepage: http://www.biochem.mpg.de/ullrich/junior_groups/thorsten_berg/index.html

[**] Die Arbeit meiner Forschungsgruppe wird durch die Abteilung für Molekularbiologie (Direktor: Prof. Dr. Axel Ullrich) des Max-Planck-Instituts für Biochemie und die Deutsche Krebshilfe unterstützt.



Schema 2. Design des DHFR-LOV2-J α -Fusionsproteins. Die LOV2-Domäne von pflanzlichem Phototropin und ihre C-terminale Verlängerung, die J α -Helix, erfahren eine allosterische Konformationsänderung durch die Lichtabsorption eines gebundenen Flavinmononucleotids (FMN). Die β F- β G-Schleife der Dihydrofolat-Reduktase liegt zwar entfernt vom aktiven Zentrum, ist aber mit diesem funktionell über allosterische Effekte verknüpft. Im Fusionsprotein ist die LOV2-Domäne mitsamt ihrer N-terminalen Verlängerung und der C-terminalen Verlängerung in die β F- β G-Schleife von DHFR eingefügt. Unter Lichteinfluss erhöht sich die enzymatische Aktivität des Fusionsproteins.

stellung eines allosterischen Schalters im Fusionsmolekül gestützt wird.

Eine große Hürde für das Design künstlicher allosterischer Schalter scheint in der Identifizierung geeigneter Verknüpfungspunkte zwischen den beiden Proteindomänen zu bestehen. Diese sollten weit entfernt vom „Zentrum des Geschehens“ in einem Protein (also vom aktiven Zentrum eines Enzyms oder von der Ligandenbindungstasche eines anderen Proteins) liegen, aber immer noch physikalisch mit diesem durch miteinander wechselwirkende Aminosäuren verknüpft sein, die einen allosterischen Pfad durch das Protein definieren. Zwar wählten Ranganathan et al. zwei Proteindomänen aus, deren allosterische Eigenschaften bereits intensiv experimentell charakterisiert worden waren, allerdings konnten die hier gewählten Verknüpfungsstellen nun zusätzlich mithilfe eines computerchemischen Ansatzes identifiziert werden, den dieselbe Arbeitsgruppe bereits vor ungefähr einem Jahrzehnt entwickelt hatte. Diese „statistische Kopplungsanalyse“ (statistical coupling analysis, SCA)^[11] untersucht das Auftreten von Covariationen von Aminosäuren in evolutionär konservierten Proteinfamilien und unterstellt ihnen eine funktionelle Bedeutung für allosterische Effekte. Der Ansatz beruht auf zwei Annahmen: Erstens wird die Evolution als das Ergebnis eines großangelegten Mutagenese-Experiments angesehen, bei dem die gebildeten Proteine aufgrund ihrer Funktionalität selektiert wurden. Demnach sind innerhalb einer Proteinfamilie konservierte Aminosäuren wahrscheinlich von funktioneller Bedeutung. Zweitens wird eine Abweichung von der Verteilung der Aminosäuren an einer Position innerhalb einer Untergruppe aller analysierten Proteine mit einer Veränderung der Aminosäureverteilung an einer anderen Position korrelieren, falls die beiden Aminosäuren energetisch gekoppelt sind. Die statistische Analyse aller energetisch gekoppelten Aminosäuren innerhalb einer ganzen Proteinfamilie kann zur Aufklärung eines allosterischen Pfads durch das Protein herangezogen werden, der eine wichtige Position wie das aktive Zentrum eines Enzyms mit einer entfernten Position an der Proteinoberfläche verbindet.

Die Eignung der statistischen Kopplungsanalyse zur Vorhersage physikalisch verknüpfter Netzwerke von Aminosäuren, die voneinander entfernte Positionen im Protein miteinander verbinden, wurde bereits für zahlreiche Proteinfamilien demonstriert.^[12–15] Ihre Anwendung auf die Per/Arnt/Sim (PAS)-Domänen, welche die LOV2-Domäne von pflanzlichem Phototropin umfasst, und auf die Familie der Dihydrofolat-Reduktasen identifizierte korrekterweise die aus experimentellen Untersuchungen bekannten Positionen.^[6] Daher sollte die statistische Kopplungsanalyse auch für Proteindomänen geeignet sein, für die noch keine experimentellen Daten bezüglich ihrer allosterischen Wirkung existieren. Zusätzliche Methoden zur Identifizierung allosterischer intramolekularer Signalübertragungswege sind beispielsweise Moleküldynamiksimulationen der Proteindynamik und -allosterie^[16] sowie die anisotrope thermische Diffusion.^[17] Die NMR-spektroskopische Analyse der Proteindynamik einer PDZ-Domäne konnte zur Aufklärung ligandenabhängiger Seitenkettendynamik, und damit intramolekularer Signalübertragung, verwendet werden.^[18] Prinzipiell sollten sich diese Methoden ebenfalls zur Identifizierung geeigneter Verknüpfungspstellen in allosterischen Fusionsproteinen eignen.

Im hier vorgestellten Fall wurde die allosterische Regulierung einer Proteindomäne durch ein fusioniertes „Schalterprotein“ für ein künstliches System demonstriert. Das gleiche Prinzip findet sich aber auch in der Natur: Beispielsweise kann die enzymatische Aktivität von Proteinkinasen allosterisch durch die Bindung eines Liganden an die benachbarte Src-Homologie(SH)-2-Domäne verstärkt und somit die enzymatische Aktivierung an die Erkennung eines Substrats gekoppelt werden.^[19,20] In der Natur findet man eine allosterische Regulierung sogar über Grenzflächen zwischen Proteinen hinweg. So wird die Affinität der PDZ-Domäne des für die Zellpolarität wichtigen Proteins Par6 für ihre Liganden über die Bindung von Par6 an das Guaninnucleotidbindende Protein Cdc42 reguliert.^[21,22] Die hier vorgestellte statistische Kopplungsanalyse war in der Lage, ein zusammenhängendes Netzwerk von Aminosäuren aufzuzeigen,

welche die Nucleotidbindungstasche von Cdc42 mit der PDZ-Domäne von Par6 über die Protein-Protein-Grenzfläche hinweg verbindet.^[6] Diese Erkenntnis deutet auf die Möglichkeit hin, künstliche Systeme zu entwerfen, die auf der Übertragung allosterischer Effekte über die Grenzflächen zwischen Proteinen – oder sogar zwischen verschiedenen Arten von Biopolymeren – hinweg beruhen.

Zukünftige Studien müssen zeigen, welche Proteindomänen sich zur Verknüpfung über exponierte allosterische Stellen an der Oberfläche eignen, und ob bidirektionale Systeme entworfen werden können, bei denen jede Domäne zur Regulierung der jeweils anderen Domäne eingesetzt werden kann. Weiterhin wäre es von Interesse, ob sich größere allosterische Effekte erzielen lassen, beispielsweise durch Optimierung der Position und Länge der Fusionspartner. Komplexere allosterische Netzwerke könnten durch lineare oder zirkuläre Kopplung von drei oder mehr Proteindomänen aufgebaut werden. Zur Erstellung nützlicher künstlicher allosterischer Systeme bedarf es noch erheblicher Fortschritte, aber ein wichtiger Schritt ist gemacht.

Online veröffentlicht am 11. März 2009

[1] S. L. Schreiber, *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 64–66.

[2] M. Famulok, J. S. Hartig, G. Mayer, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 3715–3743.

[3] T. U. Mayer, *Trends Cell Biol.* **2003**, *13*, 270–277.

[4] T. Berg, *Curr. Opin. Drug Discovery Dev.* **2008**, *11*, 666–674.

[5] J. F. Swain, L. M. Gierasch, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2006**, *16*, 102–108.

[6] J. Lee, M. Natarajan, V. C. Nashine, M. Socolich, T. Vo, W. P. Russ, S. J. Benkovic, R. Ranganathan, *Science* **2008**, *322*, 438–442.

[7] X. Yao, M. K. Rosen, K. H. Gardner, *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4*, 491–497.

[8] A. S. Halavaty, K. Moffat, *Biochemistry* **2007**, *46*, 14001–14009.

[9] S. M. Harper, L. C. Neil, K. H. Gardner, *Science* **2003**, *301*, 1541–1544.

[10] C. E. Cameron, S. J. Benkovic, *Biochemistry* **1997**, *36*, 15792–15800.

[11] S. W. Lockless, R. Ranganathan, *Science* **1999**, *286*, 295–299.

[12] A. D. Ferguson, C. A. Amezcua, N. M. Halabi, Y. Chelliah, M. K. Rosen, R. Ranganathan, J. Deisenhofer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 513–518.

[13] M. E. Hatley, S. W. Lockless, S. K. Gibson, A. G. Gilman, R. Ranganathan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 14445–14450.

[14] A. I. Shulman, C. Larson, D. J. Mangelsdorf, R. Ranganathan, *Cell* **2004**, *116*, 417–429.

[15] G. M. Süel, S. W. Lockless, M. A. Wall, R. Ranganathan, *Nat. Struct. Biol.* **2003**, *10*, 59–69.

[16] F. Rousseau, J. Schymkowitz, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2005**, *15*, 23–30.

[17] N. Ota, D. A. Agard, *J. Mol. Biol.* **2005**, *351*, 345–354.

[18] E. J. Fuentes, C. J. Der, A. L. Lee, *J. Mol. Biol.* **2004**, *335*, 1105–1115.

[19] P. Filippakopoulos, M. Kofler, O. Hantschel, G. D. Gish, F. Grebien, E. Salah, P. Neudecker, L. E. Kay, B. E. Turk, G. Superti-Furga, T. Pawson, S. Knapp, *Cell* **2008**, *134*, 793–803.

[20] Z. Shi, K. A. Resing, N. G. Ahn, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2006**, *16*, 686–692.

[21] S. M. Garrard, C. T. Capaldo, L. Gao, M. K. Rosen, I. G. Macara, D. R. Tomchick, *EMBO J.* **2003**, *22*, 1125–1133.

[22] F. C. Peterson, R. R. Penkert, B. F. Volkman, K. E. Prehoda, *Mol. Cell* **2004**, *13*, 665–676.