

## Zur Funktion und Struktur synthetisch modifizierter Porine \*\*

Simon Reitz, Menekse Cebi, Philipp Reiß, Gregor Studnik, Uwe Linne, Ulrich Koert\* und Lars-Oliver Essen\*

Die Anknüpfung synthetischer Modulatoren an biologische Ionenkanäle ist vielversprechend für Anwendungen in der Neurobiologie und bei der Moleküldetektion.<sup>[1]</sup> Bei Kanälen mit einem engen Durchtrittsweg für Ionen wurden bereits einige Fortschritte erzielt,<sup>[2]</sup> dagegen ist die Verwendung größerer Poren zur Konstruktion von Ionenkanälen bisher im Wesentlichen auf Hämolyisin begrenzt.<sup>[1a,3]</sup> Porine verfügen über eine Vielfalt an  $\beta$ -Fass-Strukturen mit unterschiedlichen Durchmessern, was sie zu vielversprechenden Kandidaten für die Anknüpfung synthetischer Modulatoren macht.<sup>[4]</sup> Im Unterschied zum oligomeren Hämolyisin sind Porine aus einer einzigen Polypeptidkette aufgebaut, was synthetische Modifikationen innerhalb der Pore erleichtert. Hier präsentieren wir Funktions- und Strukturuntersuchungen zum Einbau synthetischer Modulatoren in das trimere Porin OmpF.

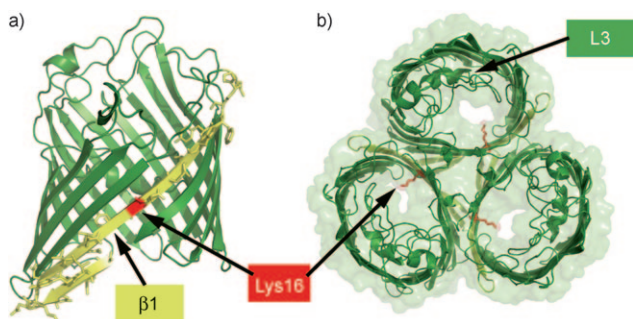
Das 340 Aminosäuren lange OmpF-Porin aus *Escherichia coli* hat eine 16-strängige antiparallele  $\beta$ -Fass-Struktur (Abbildung 1 a).<sup>[5]</sup> Jeweils drei OmpF-Moleküle lagern sich in der Membran zu einem Trimer zusammen (Abbildung 1 b). Die Pore wird verengt, indem sich die Schleifenregion L3 in die Pore hinein faltet. Die OmpF-Pore ist an dieser Engstelle auf

einen maximalen elliptischen Querschnitt von  $7 \times 11 \text{ \AA}^2$  begrenzt und ermöglicht so den Durchtritt von Molekülen bis 600 Da mit geringer Ionenspezifität. Der N-terminale Bereich bestehend aus den  $\beta$ -Strängen 1 und 16 wurde für synthetische Modifikationen ausgewählt. In diesem Bereich befindet sich die Aminosäure Lys16, deren Seitenkette auf Höhe der Engstelle in die Pore ragt und daher als passender Anknüpfungspunkt für synthetische Modulatoren ausgewählt wurde (Abbildung 1 a).

Die kovalente Anknüpfung von Modulatoren im Kanal erfolgte über zwei Routen (Schema 1): Route A beruht auf einer mit Azid/Alkin-Klickreaktionen gekoppelten Proteinsemisynthese und Route B auf der Einführung eines Cysteinrestes durch Mutation mit anschließender S-Alkylierung.

Route A – Proteinsemisynthese durch native chemische Ligation (NCL) – erfordert einen Thioester am N-terminalen Fragment sowie einen N-terminalen Cysteinrest am C-terminalen Fragment. Das N-terminale Fragment **1**, bei dem Lys16 in einen Propargyltyrosinether II umgewandelt wurde (K16II), wurde durch 9-Fluorenylmethoxycarbonyl(Fmoc)-Festphasensynthese hergestellt. Eine Cu<sup>I</sup>-katalysierte Cycloaddition des Alkins **1** mit dem als Reportergruppe fungierenden Dansylazid **2** ergab das Peptid **3**. Das C-terminale OmpF-Fragment **4**, bei dem die ersten 26 Aminosäuren deletiert wurden und in das die N27C-Mutation eingeführt wurde, ließ sich in Form von Einschlusskörperchen (inclusion bodies) bei Verwendung eines Porin-defizienten *E. coli*-Stammes erhalten. Die Ligation des Thioesters **3** mit dem N-terminalen Cysteinrest von **4** unter denaturierenden Bedingungen ergab das OmpF-Hybrid **5**. Die Ausbeute (50 %) ähnelte der bei der Ligation mit dem nativen Analogon von **4** (Lysin an Position 16; 60 %) und wurde durch Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) bestimmt. Als Startpunkt für Route B wurde die OmpF-Mutante **6** gewählt, bei der Lys16 durch einen Cysteinrest ersetzt ist (OmpF-K16C). Die S-Alkylierung mit dem Iodacetamid-aktivierten Dansylderivat **7** ergab das OmpF-Hybrid **8** nahezu quantitativ (> 90 %).

Die Hybridprodukte **5** und **8** wurden durch Insertion in Vesikel, die aus einem 1:1-Verhältnis von 1,2-Dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin und *n*-Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid bestanden, nach einem für unmodifiziertes OmpF entwickelten Verfahren zurückgefaltet.<sup>[5]</sup> Trotz Gegenwart der voluminösen Dansylgruppe innerhalb der Pore war die Ausbeute der Rückfaltung ähnlich zu jener bei unmodifiziertem OmpF (bis zu 70 %; bestimmt durch das Auftreten von SDS-resistenten OmpF-Trimeren in der SDS-PAGE<sup>[6]</sup>). Die Hybride **5** und **8** konnten, ebenso wie das unmodifizierte OmpF, von ungefaltetem Protein durch Trypsinverdau gereinigt werden, da OmpF-Trimere sehr stabil gegen proteolytischen Abbau sind.

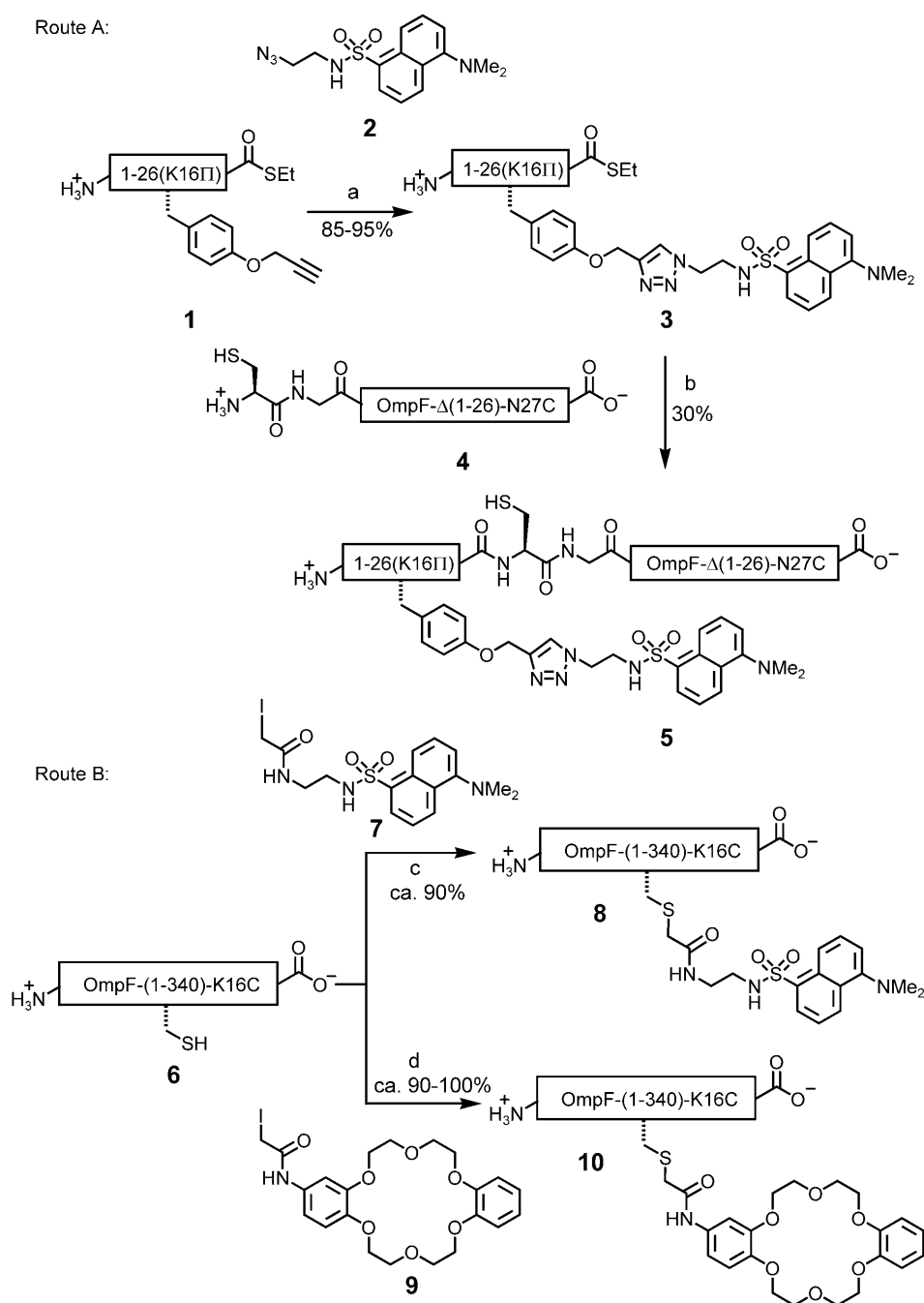


**Abbildung 1.** Struktur von OmpF. a) Seitenansicht auf das OmpF-Monomer. Der für die NCL verwendete Peptidstrang ( $\beta 1$ ) ist in Gelb dargestellt, die Anlagerungsstelle für synthetische Modulatoren (Lys16) in Rot. b) Aufsicht auf das OmpF-Trimer mit der Schleifenregion L3.

[\*] S. Reitz, M. Cebi, P. Reiß, G. Studnik, U. Linne, Prof. Dr. U. Koert, Prof. Dr. L.-O. Essen  
Fachbereich Chemie, Philipps-Universität Marburg  
Hans-Meerwein-Straße, 35032 Marburg (Deutschland)  
Fax: (+49) 6421-282-5677  
E-Mail: koert@chemie.uni-marburg.de  
essen@chemie.uni-marburg.de

[\*\*] Wir danken der Volkswagen-Stiftung und der Deutschen Forschungsgemeinschaft für finanzielle Unterstützung.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200900457> zu finden.



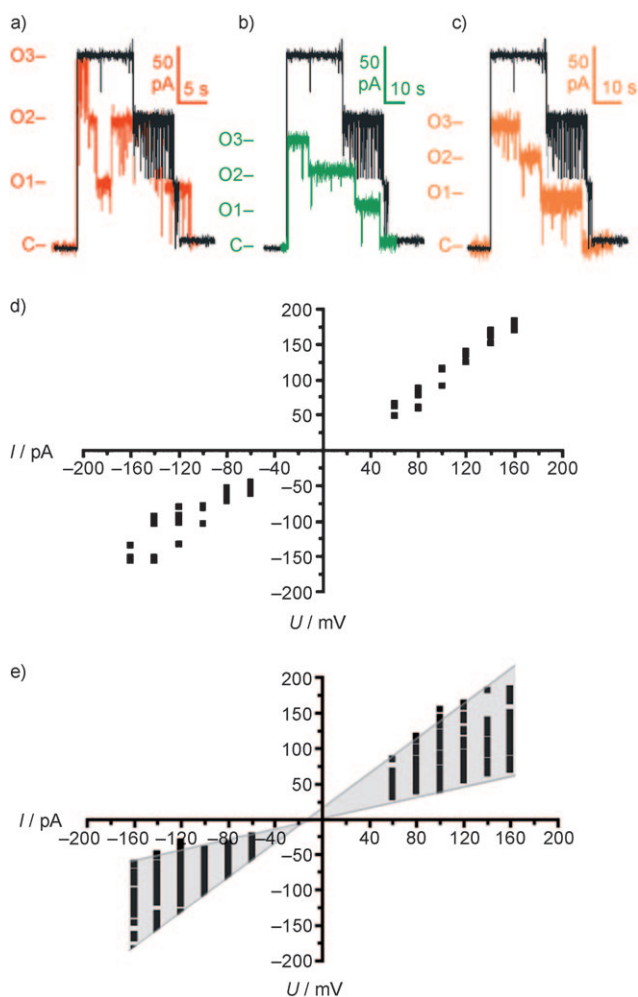
**Schema 1.** Synthese der OmpF-Derivate mit kovalent verknüpften Modulatoren an Position 16. Route A: a) Cu<sup>I</sup>-katalysierte [3+2]-Klickreaktion; b) native chemische Ligation unter denaturierenden Bedingungen in 8 M Harnstoff. Route B: S-Alkylierung von OmpF-K16C mit c) Dansyliodacetamid **7** und d) Dibenzotriphenylmethan-Derivat **9** unter denaturierenden Bedingungen in 6 M Harnstoff (experimentelle Details siehe Hintergrundinformationen).

Die Auswirkungen der Modifikationen auf die Porinfunktion wurden durch Leitfähigkeitsmessungen bei hoher Salzkonzentration bestimmt, um ausschließlich die Blockadeffizienz zu messen und nicht Effekte, die von den leicht veränderten elektrostatischen Bedingungen herrühren.<sup>[7]</sup> Unter Verwendung der Black-Lipid-Membrane (BLM)-Technik wurden Messungen am Trimer bei einer Spannung von +140 mV durchgeführt, bei der individuelle Schließere-

ignisse einzelner Monomere eines OmpF-Trimers detektiert werden konnten (Abbildung 2).<sup>[8]</sup> Zusätzlich wurden //U-Kurven aufgenommen und analysiert (−160 bis +160 mV). Für das Dansyltriaxolderivat **5** wurde keine signifikante Veränderung der Trimerleitfähigkeit beobachtet [**5**: (51.5 ± 6.0) pA; OmpF: (51.2 ± 3.0) pA; Abbildung 2a]. Die //U-Kurven für das rekombinante Vollängen-OmpF, den durch NCL generierten OmpF-Wildtyp und das OmpF-Hybrid **5** wiesen keine signifikanten Differenzen auf. Dies zeigt, dass 1) NCL in der Tat eine zuverlässige Methode ist, um das OmpF-Polypeptid in einer nativähnlichen Form herzustellen, und dass 2) die Einführung eines Leitfähigkeitsmodulators mit einem Molekulargewicht von 319 Da nahe der Engstelle der Pore per se nicht ausreicht, um eine Funktionsänderung zu bewirken.

Dagegen zeigte das über den Cysteinrest verknüpfte Dansyl-OmpF-Hybrid **8** eine ungewöhnliche Verteilung der Trimerleitfähigkeiten (siehe Hintergrundinformationen), die nicht für den rückgefalteten OmpF-Wildtyp (Abbildung 2d), die Mutanten oder das Hybrid **5** zu beobachten war. Dies lässt auf eine konformative Mobilität und/oder Heterogenität des synthetischen Modulators innerhalb der Pore von **8** schließen. Die Analyse der //U-Kurve ergab einen um 15% ((0.78 ± 0.02) nS) verminderten Durchschnittswert der Leitfähigkeit des Hybrids **8** verglichen mit jenem von unmodifiziertem OmpF **6** ((0.92 ± 0.02) nS). Die Analyse einzel-

ner Trimerschließereignisse bezeugte in gleicher Weise die Verringerung der Leitfähigkeit von **8** (Abbildung 2b). Zusammen mit dem Fehlen einer signifikanten Leitfähigkeitsänderung bei **5** weist dies darauf hin, dass die Art der chemischen Verknüpfung eine entscheidende Rolle für die Funktion hybrider Ionenkanäle spielt. Die Größe der beiden Modulatoren von **5** und **8** (451 bzw. 377 Da) unterscheidet sich nicht genügend, um diesen Befund durch den Größen-



**Abbildung 2.** Ionenkanalleitfähigkeiten von OmpF-Hybriden. a–c) Stromspuren eines OmpF-Trimers (schwarz) sowie des a) Dansylhybrids **5** (rot), b) des Dansylhybrids **8** (grün) und c) des Kronenether-modifizierten Hybrids **10**. Die BLM-Messungen wurden in 150 mM KCl bei +140 mV durchgeführt. Die Zahlen an der linken Seite verweisen auf die Zahl der offenen Monomere (c = geschlossen, o = offen). I/U-Kurven für d) OmpF und e) das Hybrid **10**.

unterschied zu erklären. Offensichtlich kann der Modulator von **5** die zentrale Engstelle von OmpF nicht besetzen und haftet höchstwahrscheinlich an der inneren Porenwand an, während in **8** die Engstelle der Pore zumindest partiell blockiert ist.

Um diese Theorie zu prüfen, wurde ein weiteres Hybrid synthetisiert: das OmpF-Hybrid **10**, bei dem das Dibenzo-[18]krone-6-Derivat **9** über Route B an die OmpF-K16C-Mutante **6** geknüpft wurde. Gemäß der I/U-Kurve hat **10** sehr ähnliche Eigenschaften wie **8**, einschließlich einer Verringerung der Leitfähigkeit um 18 % ( $(0.75 \pm 0.01)$  nS) sowie der Verteilung der Trimerschließereignisse mit Grenzwerten der Leitfähigkeit von 0.42 und 1.14 nS (Abbildung 2e). Die Analyse einzelner Trimerschließereignisse bestätigte die reduzierte Leitfähigkeit von **10** analog (Abbildung 2c).

Für **10** konnten die strukturellen Folgen der Modifikation röntgenographisch untersucht werden. Es wurden zwei trigonale Kristallformen erhalten, die beide ein Molekül pro

asymmetrische Einheit enthielten. Kristallform I zeigte Röntgenbeugung bis zu einer Auflösung von 3.2 Å und entsprach der bereits bekannten Kristallform von OmpF,<sup>[5c]</sup> es wurde jedoch keine Elektronendichte für den synthetischen Modulator gefunden.

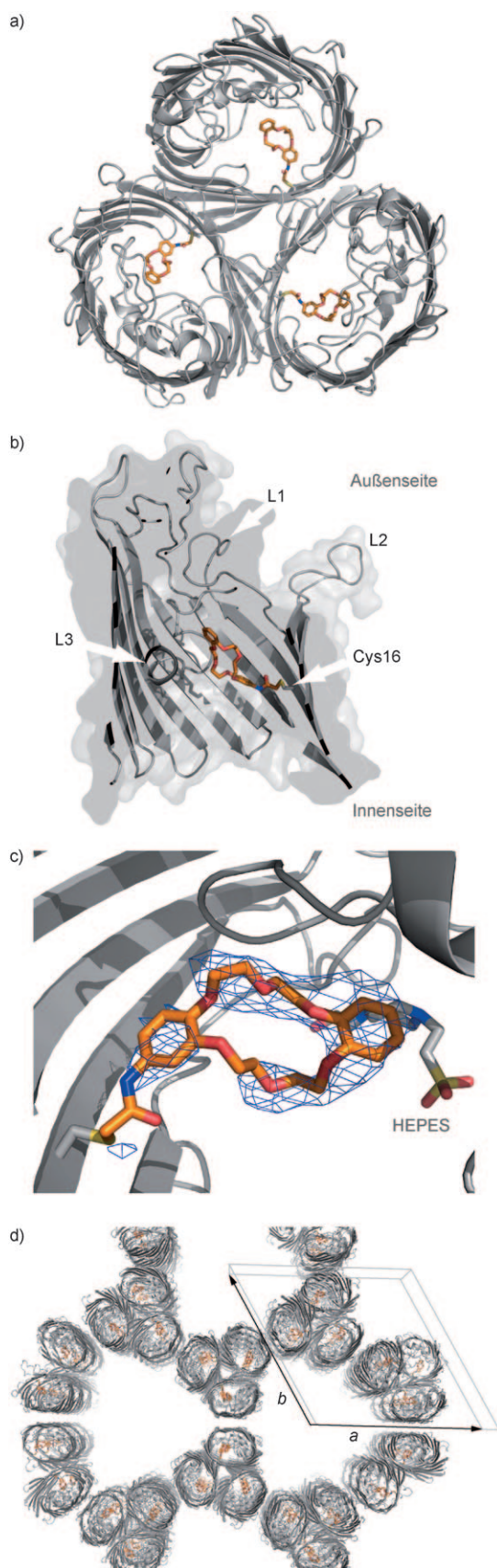
Form-II-Kristalle wurden von derselben Proteincharge erhalten und konnten bis zu einer Auflösung von 3.4 Å vermessen werden. Diese Kristallform, die zuvor nicht für OmpF beobachtet worden war,<sup>[5c,9]</sup> konnte durch molekularen Ersatz (molecular replacement) gelöst werden (PDB-Code 3FYX). Dies ist die erste Struktur für eine Pore, die partiell mit einem synthetischen Modulator blockiert ist. Wie in Kristallform I ordnen sich hier die OmpF-Trimere aufgrund von Schleifen-Schleifen-Wechselwirkungen säulenartig entlang der *c*-Achse an (Abbildung 3d).

Die Konformationen der Proteine in beiden Kristallformen unterscheiden sich nicht, allerdings enthält Kristallform II eine signifikante Differenzelektronendichte im Durchtrittsweg für Ionen innerhalb des OmpF-Kanals. Die Dichte entspricht einem Großteil des Dibenzo-[18]krone-6-Moleküls, das von Cys16 aus in die Engstelle von OmpF hineinragt (Abbildung 3a–c). Ein weiterer Teil der Elektronendichte wurde einem HEPES-Puffermolekül zugeordnet, das aus der Kristallisationslösung stammt und elektrostatische Wechselwirkungen zwischen seiner Sulfonatgruppe und den basischen Resten des Poreninneren (Lys80, Arg132, Arg167, Arg168) eingeht. Die Konformation des recht flexiblen Kronenethers ist schmetterlingsartig,<sup>[10]</sup> im Bereich der Engstelle von **10** aber deutlich verzerrt (Abbildung 3c). Ein Teil des Polyoxyethylenrings geht über dessen Sauerstoffatome Wechselwirkungen mit den basischen Seitenketten der Reste Arg42, Arg82 und Arg132 der Porennenseite ein, und der andere Teil befindet sich nahe den sauren Seitenketten der auf der Schleife L3 lokalisierten Reste Asp113 und Glu117 (Abbildung 4a). Die distale Arylgruppe des Dibenzo-kronenethers geht mehrere Van-der-Waals-Wechselwirkungen mit den Seitenketten der Reste Tyr102, Tyr106, Asp113, Ala123 und Arg132 der Schleife L3 ein und rückt somit in direkte Nachbarschaft zum HEPES-Molekül.

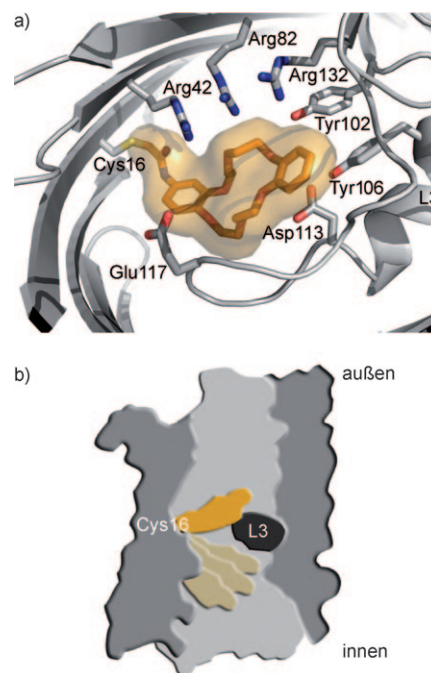
Im Ganzen zeigt die Kristallstruktur des OmpF-Hybrids **10**, dass ein weitporeiger Kanal wie OmpF nach Modifizierung durch synthetische Modulatoren einen einheitlichen geschlossenen Zustand aufweisen kann, auch wenn einzelne Trimere des Hybrids unterschiedliche Leitfähigkeiten haben. Aus dem Fehlen von Elektronendichte für den Kronenether in Kristallform I lässt sich folgern, dass die von **10** erhaltene Kristallform II einer kristallographischen Momentaufnahme entspricht, die durch die gewählten Kristallisationsbedingungen stabilisiert wurde.

Ein schematischer Blick auf den Querschnitt von **10** (Abbildung 4b) zeigt, dass eine blockierte Konformation der Pore eine gestreckte, nach innen orientierte Konformation des Kronenethers erfordert, durch die eine partielle Anlagerung an die L3-Schleife zustande kommt (blockierte Konformation). Eine alternative Konformation, bei der der Kronenether von der Engstelle der Pore wegzeigt, ergäbe zwar eine größere Konformationsfreiheit für den synthetischen Modulator (lockere Konformation), würde aber die Blockade der Pore aufheben.





**Abbildung 3.** Struktur des OmpF-Hybrids **10** im Kristall. a) Aufsicht auf das Trimer **10** mit Dibenzo-[18]krone-6 (orange). b) Seitenansicht auf den Querschnitt von **10**. c) SIGMAA-gewichtete  $F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ -Differenzdichte.



**Abbildung 4.** Blick auf die Engstelle im OmpF-Hybrid **10**. a) Oberflächendarstellung für das Dibenzo-[18]krone-6-Molekül, das zwischen der Schleife L3 und den basischen Aminosäuren lokalisiert ist. b) Schematische Darstellung der blockierten (orange) und lockeren (hellgelb) Konformation für den synthetischen Modulator **10** in der OmpF-Pore.

Der Wechsel zwischen der blockierten und der lockeren Konformation, z.B. durch sterische Interferenz mit der Schleife L3, würde die beobachtete Heterogenität der Leitfähigkeit erklären. Die Art der Brücke zwischen dem Kronenether und Position 16 auf  $\beta$ -Strang 1 hat einen starken Einfluss, da z.B. das OmpF-Hybrid **5** wegen der längeren und steiferen Triazolbrücke nur eine nach außen gerichtete Konformation des synthetischen Modulators einnehmen kann und somit im offenen Zustand arretiert wäre. Bisher wurde angenommen, dass konformative Heterogenität von hybriden Ionenkanälen ausschließlich durch die intrinsischen Eigenschaften des verwendeten Proteintemplats hervorgerufen wird<sup>[11]</sup> – wie wir nun aber zeigen konnten, ist das Zusammenspiel zwischen synthetischem Modulator und verwendetem Protein entscheidend für die konformative Heterogenität des Hybrids. Daher kann angenommen werden, dass Ein-Punkt-Anknüpfungen synthetischer Moleküle in großen Poren per se nicht ausreichen, um eine Änderung der elektrophysiologischen Eigenschaften zu bewirken; vielmehr sind zusätzliche nichtkovalente Wechselwirkungen oder Zwei-Punkt-Anknüpfungen nötig, um eine effiziente Blockade der Pore zu erreichen. Die hier vorgestellten Befunde zur Modulation von OmpF sollten von allgemeinem Nutzen für zu-

te, berechnet bei einer Auflösung von 3.4 Å für Dibenzo-[18]krone-6 (Konturierungsniveau 2.7  $\sigma$ ). Im Hintergrund befindet sich das 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethansulfonat (HEPES)-Molekül. d) Kristallpackung der neuen OmpF-Kristallform mit der Andeutung der quasi-kontinuierlichen Anordnung der OmpF-Trimere entlang der c-Achse.

künftige Entwicklungen von synthetischen Ionenkanälen mithilfe  $\beta$ -Fass-artiger Porine sein.

Eingegangen am 23. Januar 2009

Online veröffentlicht am 25. März 2009

**Stichwörter:** Ionenkanäle · Kronenverbindungen · Native chemische Ligation · Porinstrukturen · Ionentransportmodulatoren

- 
- [1] a) H. Bayley, L. Jayasinghe, *Mol. Membr. Biol.* **2004**, *21*, 209–220; b) M. R. Banghart, M. Volgraf, D. Trauner, *Biochemistry* **2006**, *45*, 15129–15141; L.-O. Essen, U. Koert, *Ann. Rep. RSC* **2008**, *104*, 165–188.
- [2] a) F. Valiyaveetil, M. Sekedat, T. W. Muir, R. MacKinnon, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 2558–2561; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 2504–2507; b) F. Valiyaveetil, M. Sekedat, T. W. Muir, R. MacKinnon, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 11591–11599; c) A. Koçer, M. Walko, W. Meijberg, B. L. Feringa, *Science* **2005**, *309*, 755–758; d) A. Koçer, M. Walko, E. Bulten, E. Halza, B. L. Feringa, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 3198–3202; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 3126–3130; e) M. Banghart, K. Borges, E. Isacoff, D. Trauner, R. H. Kramer, *Nat. Neurosci.* **2004**, *7*, 1381–1386.
- [3] a) L. Q. Gu., O. Braha, S. Conlan, H. Bayley, *Nature* **1999**, *398*, 686–690; b) H. C. Wu, Y. Astier, G. Maglia, E. Mikhailova, H. Bayley, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 16142–16148.
- [4] *Bacterial and Eucaryotic Porins* (Hrsg.: R. Benz), Wiley-VCH, Weinheim, **2004**.
- [5] a) R. M. Garavito, J. P. Rosenbusch, *J. Cell Biol.* **1980**, *86*, 327–329; b) A. Engel, A. Massalski, H. Schindler, D. L. Dorset, J. P. Rosenbusch, *Nature* **1985**, *317*, 643–645; c) S. W. Cowan, T. Schirmer, G. Rummel, M. Steiert, R. Gosh, R. A. Paupit, J. N. Jansonius, J. P. Rosenbusch, *Nature* **1992**, *358*, 727–733.
- [6] a) T. Surrey, F. Jähnig, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 7457–7461; b) T. Surrey, A. Schmid, F. Jähnig, *Biochemistry* **1996**, *35*, 2283–2288.
- [7] A. Alcaraz, E. M. Nestorovich, M. Aguilera-Arzo, V. M. Aguilera, S. M. Bezrukov, *Biophys. J.* **2004**, *87*, 943–957.
- [8] A. Engel, A. Massalski, H. Schindler, D. L. Dorset, J. P. Rosenbusch, *Nature* **1985**, *317*, 643–645.
- [9] E. Yamashita, M. V. Zhaltina, S. D. Zakharov, O. Sharma, W. A. Cramer, *EMBO J.* **2008**, *27*, 2171–2180.
- [10] a) R. Hilgenfeld, W. Saenger, *Angew. Chem.* **1981**, *93*, 1082–1085; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1981**, *20*, 1045–1046; b) A. N. Chekhlov, *Russ. J. Coord. Chem.* **2000**, *27*, 771–775; c) J. W. Steed, *Coord. Chem. Rev.* **2001**, *215*, 171–221.
- [11] M. Chen, S. Khalid, M. S. P. Sansom, H. Bayley, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 6272–6277.
-