

Lichtgesteuerte Proteinbindung einer biologisch relevanten β -Faltblattstruktur**

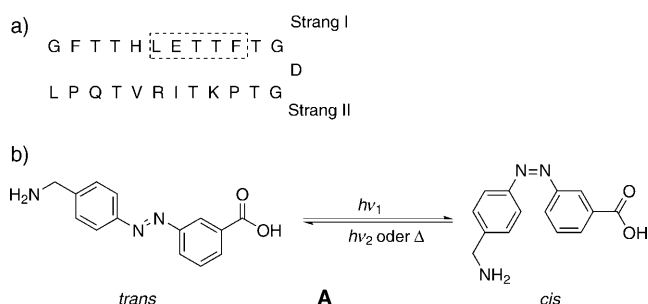
Christian Hoppmann, Sabine Seedorff, Anja Richter, Heinz Fabian, Peter Schmieder, Karola Rück-Braun* und Michael Beyermann*

An Protein-Protein-Wechselwirkungen, die wichtige Vorgänge in Zellen steuern, sind häufig Haarnadel- β -Faltblattstrukturen beteiligt, die deshalb interessante Angriffspunkte für eine Beeinflussung dieser Prozesse sind. Peptide, die solche Haarnadelmotive bilden und somit die Proteinwechselwirkung inhibieren, sind wertvolle Hilfsmittel zum Studium biologischer Prozesse. Der Einbau von Photoschaltern in ein solches β -Faltblattpeptid könnte darüber hinaus die Möglichkeit eröffnen, durch Lichtsteuerung Proteinwechselwirkungen in Zellen zu erforschen. Bisher wurden β -Haarnadelmotive selten untersucht, weil nur wenige stabile Peptidmodelle entwickelt werden konnten. Diese Situation ist der Tatsache geschuldet, dass solche Modelle drei Bedingungen erfüllen müssen: 1) Das β -Haarnadelmotiv muss als Monomer ausreichend stabil sein, ohne zu aggregieren, 2) der eingebaute Photoschalter soll die biologisch aktive Peptidkonformation stabilisieren und 3) die Störung der Proteinbindungsstelle durch die lichtinduzierte Isomerisierung des Photoschalters darf weder zu einer intermolekularen Assoziation noch zur Bildung unlöslicher Fibrillen führen.^[1] Wir berichten hier über das erste Peptidmodell einer biologisch relevanten Proteindomäne, die ein β -Haarnadelmotiv bildet, die in Abhängigkeit vom Isomerisierungszustand des eingebauten Photoschalters ganz unterschiedliche Affinität gegenüber dem biologischen Zielprotein zeigt.

PDZ-Domänen vermitteln die Bildung einer Vielzahl von Multiproteinkomplexen in der Zelle.^[2] Außer C-terminale Proteinabschnitte können PDZ-Domänen auch interne Peptidmotive erkennen, die in dieselbe Bindungstasche binden wie C-terminale Motive. Das beste Beispiel für eine solche interne Ligandenerkennung wird für die erweiterte PDZ-Domäne der neuronalen Stickstoffmonoxid-Synthase

(nNOS) gefunden, die an die PDZ-Domäne von α -1-Syntrophin oder die zweite PDZ-Domäne von PSD95 bindet.^[3] Die Bildung des Heterodimers aus zwei unterschiedlichen PDZ-Domänen erfolgt über die β -Fingerstruktur von nNOS (30 Aminosäurereste), die an die PDZ-Domäne von Syntrophin bindet und dadurch die Membranassoziation von nNOS in der Skelettmuskulatur und die Induktion der Produktion von Stickstoffmonoxid als sekundären Botenstoff für die Muskelkontraktion bewirkt.^[4]

Für diese Bindung ist das interne Erkennungsmotiv -LETTF- der erweiterten PDZ-Domäne von nNOS wichtig, das im ersten Strang des Haarnadelmotivs lokalisiert ist (Schema 1) und eine stabile Konformation aus zwei antiparallelen Strängen bildet, die über eine Schleife verbunden



Schema 1. a) Primärstruktur des β -Fingerpeptids von nNOS; die gekennzeichneten Aminosäurereste markieren das interne Erkennungsmotiv; b) Struktur des Photoschalters A.

sind.^[5] Mimetika des nNOS- β -Fingers (Schema 2a; Peptid 1) wurden in früheren Untersuchungen auf der Basis cyclischer Peptide entwickelt. Strukturrechnungen ergaben für Peptid 1 eine gute Übereinstimmung mit der Struktur des originalen β -Fingers. Bindungsuntersuchungen bestätigten eine Bindung an derselben Stelle des Proteins.^[6] Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde eine photoschaltbare ω -Aminosäure in das cyclische Fingerpeptid 1 an Stelle des D-Pro-Gly-Schleifenelementes und der beide Seiten flankierenden Aminosäurereste eingebaut (Schema 2b). Photoschaltbare ω -Aminosäuren auf der Basis von Azobenzol^[7] oder Hemithioindigo^[8] sind geeignete Kandidaten zur Modulation von Peptidkonformationen,^[9] da ihre Photoisomerisierung äußerst schnell verläuft,^[10] was ein Verfolgen der Konformationsübergänge im Bereich von Pico- bis zu Femtosekunden ermöglicht.^[11] Für biologische Anwendungen^[12] hat sich Azobenzol als sehr effektiv erwiesen, weil es eine $cis \rightleftharpoons trans$ -Isomerisierung um die zentrale N=N-Bindung mit hohen Isomerisierungsausbeuten und beträchtlichen Strukturänderungen

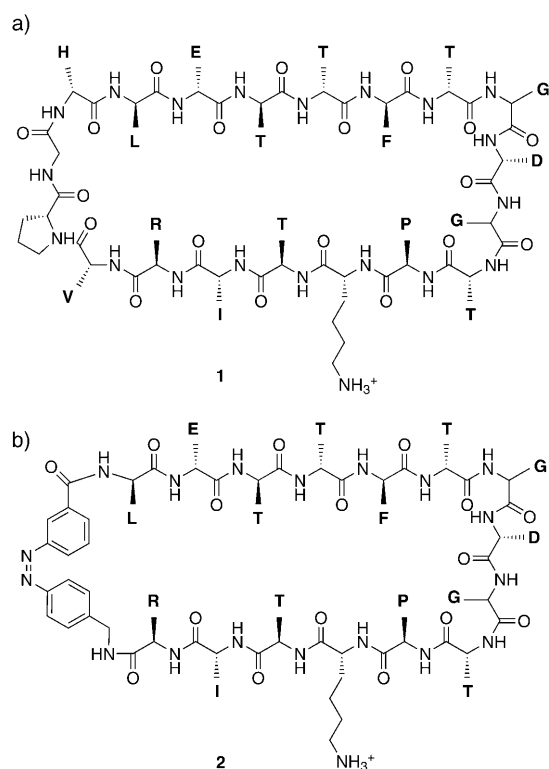
[*] C. Hoppmann, S. Seedorff, A. Richter, Prof. Dr. K. Rück-Braun
Institut für Chemie, Technische Universität Berlin
Straße des 17. Juni 135, 10623 Berlin (Deutschland)
E-Mail: krueck@chem.tu-berlin.de

C. Hoppmann, S. Seedorff, Dr. P. Schmieder, Dr. M. Beyermann
Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie
Robert-Rössle-Straße 10, 13125 Berlin (Deutschland)
Fax: (+49) 30-9479-3159
http://www.fmp-berlin.de
E-Mail: beyermann@fmp-berlin.de

Dr. H. Fabian
Robert-Koch-Institut
Nordufer 20, 13353 Berlin (Deutschland)

[**] Diese Arbeit wurde von der Volkswagen-Stiftung finanziell unterstützt.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200901933> zu finden.



Schema 2. Strukturen der cyclischen Peptidliganden **1** und **2**, abgeleitet von der Sequenz des β -Fingerpeptids von nNOS: a) mit dem -Val- α -Pro-Gly-His-Motiv für die nicht schaltbare Struktur (**1**) und b) mit **A** als Photoschalter (**2**). Die Lysinseitenkette wurde zur Kupplung an Biacore-Chips verwendet.

gen ermöglicht. Im Unterschied zu vorherigen Beispielen lichtschaltbarer β -Haarnadelmotive^[9d,e] bauten wir als Photoschalter wegen der hohen thermischen Stabilität ihrer *cis*-Form die Azobenzol- ω -Aminosäure 3-((4'-Aminomethyl)phenylazo)benzoesäure (**A**) ein (Schema 1b).^[7c] Wir nahmen dabei an, dass die gestreckte Form des *trans*-Azobenzols zu einer Störung der Proteinbindungsstelle im Peptid führen würde.

Durch Bestrahlung der thermodynamisch stabileren *trans*-Form von **2** in wässriger Pufferlösung (pH 7.5) bei 330 nm wurden hohe Isomerisierungsausbeuten im photo-stationären Zustand (pss) für die *cis*-Form (90% *cis*-Gehalt) erreicht (Abbildung 1). Die thermische *cis* \rightarrow *trans*-Isomerisierung von **2** in wässriger Lösung erfolgte sehr langsam ($t_{1/2}$ = 25 Tage). Die wiederholte photochemische Umwandlung der beiden Isomere ineinander verlief ohne Peptidassoziation, Niederschlagsbildung oder Ausbleichen.

Unsere Ergebnisse chromatographischer Gelfiltrationsuntersuchungen unter physiologischen Bedingungen (pH 7.5) verdeutlichen, dass weder die Photoisomerisierung (bis zu 10 Photozyklen) noch die zweiwöchige Aufbewahrung bei 50 °C unter Lichtausschluss zu Assoziation oder zur Bildung von Aggregaten des photoschaltbaren Peptids **2** geführt haben, das quantitativ in der ursprünglichen, monomeren *trans*-Form wiedergefunden wurde. Die Trennbarkeit der beiden monomeren Photoisomere im pss durch Gelfiltration verdeutlicht ihre unterschiedlichen hydrodynamischen Volumina als Er-

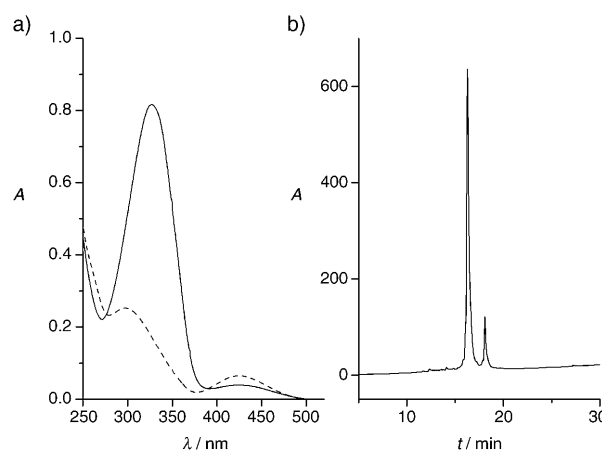


Abbildung 1. a) UV/Vis-Spektren von **2** in wässrigem Puffer (pH 7.5) in der reinen *trans*-Form (—) und in der *cis*-Form im pss (----); Maxima der π - π^* - und n - π^* -Übergänge liegen bei 327 bzw. 424 nm; b) RP-HPLC-Profil (220 nm) der *cis*-Form im pss (90% *cis*-Gehalt).

gebnis der globalen Änderungen ihrer Konformationen (Abbildung 2). Damit bietet sich die Gelfiltration als alternative Methode zur Umkehrphasen(RP)-HPLC für die Bestimmung von *cis/trans*-Verhältnissen an, da hierbei ionische oder hydrophobe Matrixeffekte ausgeschlossen werden können. Der *cis*-Gehalt im photostationären Zustand wurde mit Gelfiltration zu ca. 75 % bestimmt.

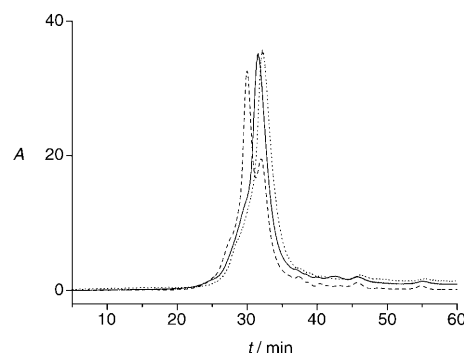


Abbildung 2. Chromatographische Gelfiltration von **2** in wässrigem Puffer bei pH 7.5 (220 nm): *trans*-Form nach 10 Photozyklen und 2 Wochen bei 50 °C (—), *cis/trans*-Mischung (----) und unbehandelte, reine *trans*-Form (— · — · —).

Mithilfe der Oberflächen-Plasmonen-Resonanzspektroskopie (SPR) untersuchten wir, welchen Einfluss die Photoisomerisierung von **2** auf dessen Bindung an das Zielprotein Syntrophin hat, und verglichen die Bindung mit dem nicht schaltbaren **1**. Da wir wussten, dass das interne Erkennungsmotiv für das Syntrophin im Strang I des β -Haarnadelmotive lokalisiert ist, immobilisierten wir die Liganden auf CM5-Sensorchips über die Aminogruppe der Lysinseitenkette im Strang II. Für die reine *trans*-Form von **2** wurde nahezu keine Bindung beobachtet (durchgezogene Linie in Abbildung 3). Nach Photoisomerisierung wurde eine deutliche Bindung von Syntrophin (K_D = 10.6 μ M) gefunden, die

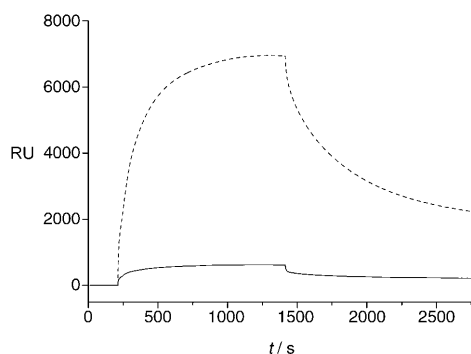


Abbildung 3. SPR-Sensorgramm für die Bindung von Syntrophin-PDZ ($c = 7.74 \mu\text{M}$) an immobilisiertes **2** in der *trans*-Form (—) und der *cis*-Form im pss (-----). RU = Resonanzanheiten.

vergleichbar zu jener des Modellpeptids **1** ($K_D = 5.4 \mu\text{M}$) war. Um einen möglichen Einfluss der Trägermatrix in der SPR auf die Bindung von Syntrophin ausschließen zu können, wurden die stark unterschiedlichen Bindungseigenschaften der beiden Isomere von **2** durch isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) bestätigt (siehe Hintergrundinformationen). Wiederum wurde für die *trans*-Form keine Bindung beobachtet, während die *cis*-Form von **2** eine deutliche Affinität zeigte. Das Modellpeptid **1** nimmt in wässriger Lösung eine antiparallele β -Faltblattstruktur an.^[6] Die Übereinstimmung der Affinitäten von **2** in der *cis*-Form im pss und **1** lässt ähnliche Struktureigenschaften an der Proteinbindungsstelle vermuten. Das IR-Spektrum der *trans*-Form von **2** (durchgezogene Linie in Abbildung 4a) ist durch eine breite und strukturlose Amid-I-Bande bei ca. 1645 cm^{-1} charakterisiert, die typisch für eine ungeordnete Peptidstruktur ist.^[13] Die Photoisomerisierung zum *cis*-Azobenzol induziert die Bildung einer Sekundärstruktur, die durch eine Bande bei ca. 1615 cm^{-1} charakterisiert ist (gestrichelte Linie in Abbildung 4a). Die starke Bande bei 1613 cm^{-1} und die schwache Bande bei 1677 cm^{-1} im IR-Differenzspektrum (Abbildung 4b) lassen auf eine Einbeziehung einiger amidischer C=O-Gruppen in eine antiparallele β -Struktur schließen,^[13,14] die

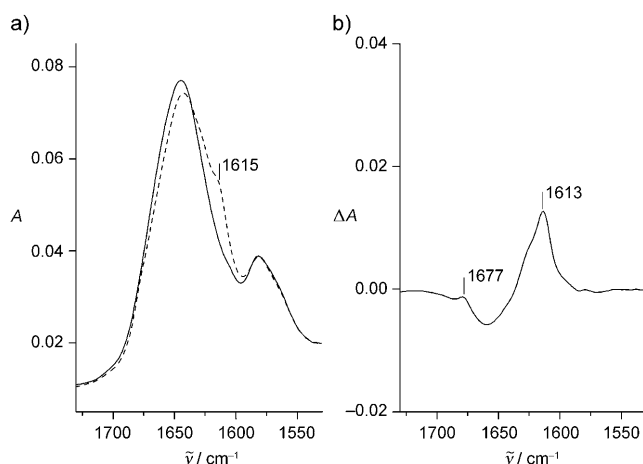


Abbildung 4. FT-IR-Spektren von **2** in D_2O -Puffer (pH 7.5); a) die reine *trans*-Form (—) und die *cis*-Form im pss (-----); b) das *cis-trans*-Differenzspektrum.

durch die *trans*→*cis*-Photoisomerisierung des Photoschalters im Peptid erzeugt wird.

Beide Isomere von **2** wurden weiterhin NMR-spektroskopisch untersucht (Abbildung 5). Die Bereiche der Amid-

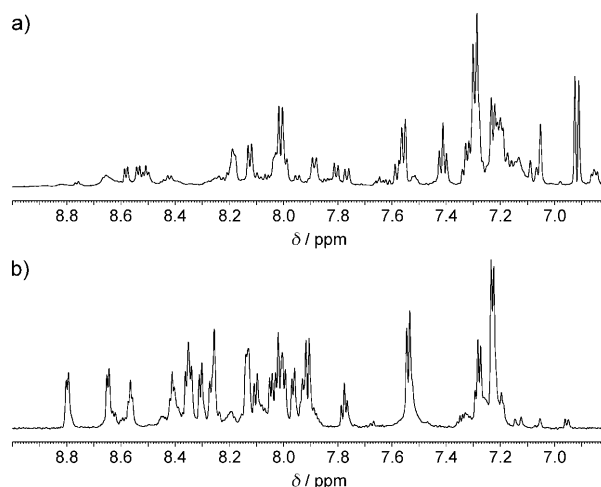


Abbildung 5. ^1H -NMR-Spektren von **2** in $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ (1:9; pH 6), aufgenommen bei 600 MHz; a) die *cis*-Form im pss und b) die *trans*-Form, die sehr wenig *cis*-Form enthält.

protonen und der aromatischen Protonen sind für die *trans*- und die *cis*-Form dargestellt. Bemerkenswert ist die Schärfe der Linien in den Spektren, die bestätigt, dass keine der beiden Formen Aggregate bildet; das bedeutet, dass beide Isomere sogar bei relativ hohen Konzentrationen, wie sie die NMR-Spektroskopie benötigt, als Monomere vorliegen.

Die lichtgesteuerte Modulierung der Bindung eines β -Faltblattpeptides an sein Zielprotein wurde für die Wechselwirkung zwischen α -1-Syntrophin und einem von der PDZ-Bindungsdomäne der neuronalen NO-Synthase abgeleiteten β -Haarnadelmotivs gezeigt. Ein cyclischer, lichtgesteuerter Peptidligand wurde entwickelt, indem eine Azobenzol- ω -Aminosäure als Photoschalter in ein Peptid passender Ringgröße eingebaut wurde. In seiner *trans*-Form zeigt das Modellpeptid keine Bindung, während die *cis*-Form eine ähnliche Bindung wie das entsprechende nicht schaltbare Modellpeptid aufweist, das in wässriger Lösung eine ähnliche Struktur hat wie das β -Haarnadelmotiv im Protein. Die Wechselwirkung eines biologisch interessanten β -Faltblattes mit einer Proteindomäne wurde durch eine lichtinduzierte Konformationsänderung moduliert, ohne das System zu destabilisieren. Dieses Peptid kann somit ein aussichtsreicher Kandidat für eine zelluläre Anwendung eines lichtsteuerbaren β -Faltblattes sein, auch wenn man berücksichtigen muss, dass Peptide bei intrazellulärer Anwendung einer Reduktion^[15] und proteolytischem Abbau widerstehen müssen.

Eingegangen am 9. April 2009,
veränderte Fassung am 25. Mai 2009
Online veröffentlicht am 7. August 2009

Stichwörter: Azoverbindungen · Isomerisierungen · Konformationsänderungen · Photochemie · Protein-Protein-Wechselwirkungen

- [1] I. W. Hamley, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 8274–8295; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 8128–8147.
- [2] B. Z. Harris, W. A. Lim, *J. Cell Sci.* **2001**, *114*, 3219–3231.
- [3] a) B. J. Hillier, K. S. Christopherson, K. E. Prehoda, D. S. Bredt, W. A. Lim, *Science* **1999**, *284*, 812–815; b) H. Tochio, F. Hung, M. Li, D. S. Bredt, M. Zhang, *J. Mol. Biol.* **2000**, *303*, 359–370.
- [4] J. E. Brenman, D. S. Chao, H. Xia, K. Aldape, D. S. Bredt, *Cell* **1995**, *82*, 743–752.
- [5] P. Wang, Q. Zhang, H. Tochio, J.-S. Fan, M. Zhang, *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 3116–3122.
- [6] S. Seedorff, C. Appelt, M. Beyermann, P. Schmieder, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [7] a) L. Ulysse, J. Chmielewski, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, *4*, 2145–2146; b) R. Behrendt, M. Schenk, H.-J. Musiol, L. Moroder, *J. Pept. Sci.* **1999**, *5*, 519–529; c) B. Priewisch, Dissertation, TU Berlin, **2006**; d) B. Priewisch, W. Steinle, K. Rück-Braun in *Peptides 2004* (Hrsg.: M. Flegel, M. Fridkin, C. Gilon, J. Slaninova), Kenes, Genf, **2005**, S. 756–757.
- [8] a) T. Schadendorf, C. Hoppmann, K. Rück-Braun, *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 9044–9047; b) W. Steinle, K. Rück-Braun, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 141–144; c) S. Herre, W. Steinle, K. Rück-Braun, *Synthesis* **2005**, 3297–3300.
- [9] a) L. Ulysse, J. Cubillos, J. Chmielewski, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 8466–8467; b) R. Behrendt, C. Renner, M. Schenk, F. Wang, J. Wachtveitl, D. Oesterheld, L. Morder, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 2941–2943; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 2771–2774; c) C. Renner, L. Moroder, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 868–878; d) S.-L. Dong, M. Löweneck, T. E. Schrader, W. J. Schreier, W. Zinth, L. Moroder, C. Renner, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 1114–1120; e) A. Aemissegger, V. Kräutler, W. F. van Gunsteren, D. Hilvert, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2929–2936; f) S. Jurt, A. Aemissegger, P. Güntert, O. Zerbe, D. Hilvert, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 6445–6448; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 6297–6300.
- [10] a) S. Spörlein, H. Carstens, H. Satzger, C. Renner, R. Behrendt, L. Moroder, P. Tavan, W. Zinth, J. Wachtveitl, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 7998–8002; b) M. Löweneck, A. G. Milbradt, C. Root, H. Satzger, W. Zinth, L. Moroder, C. Renner, *Biophys. J.* **2006**, *90*, 2099–2108; c) T. Cordes, D. Weinrich, S. Kempa, K. Riesselmann, S. Herre, C. Hoppmann, K. Rück-Braun, W. Zinth, *Chem. Phys. Lett.* **2006**, *428*, 167–173; d) T. Cordes, C. Elsner, T. T. Herzog, C. Hoppmann, T. Schadendorf, W. Summerer, K. Rück-Braun, W. Zinth, *Chem. Phys.* **2009**, *358*, 103–110.
- [11] a) T. E. Schrader, W. J. Schreier, T. Cordes, F. O. Koller, G. Baitzki, R. Denschlag, C. Renner, M. Löweneck, S.-L. Dong, L. Moroder, P. Tavan, W. Zinth, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 15729–15734; b) J. Bredenbeck, J. Helbig, A. Sieg, T. Schrader, W. Zinth, J. Wachtveitl, C. Renner, R. Behrendt, L. Moroder, P. Hamm, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 6452–6457.
- [12] a) L. G. Ulysse, Jr., J. Chmielewski, *Chem. Biol. Drug Des.* **2006**, *67*, 127–136; b) A. Cattani-Scholz, C. Renner, C. Cabrele, R. Behrendt, D. Oesterheld, L. Moroder, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 299–302; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 289–292; c) G. Hayashi, M. Hagihara, K. Nakatani, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 424–432; d) M. Volgraf, P. Gorostiza, R. Numan, R. H. Kramer, E. Y. Isacoff, D. Trauner, *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 47–52; e) L. Guerrero, O. S. Smart, C. J. Weston, D. C. Burns, G. A. Woolley, R. K. Allemann, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 7956–7960; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7778–7782.
- [13] a) H. Fabian, W. Mäntele in *Handbook of Vibrational Spectroscopy, Infrared Spectroscopy of Proteins* (Hrsg.: J. M. Chalmers, P. R. Griffiths), Wiley, New York, **2002**, S. 3399–3425; b) A. Barth, C. Zscherp, *Q. Rev. Biophys.* **2002**, *35*, 369–430.
- [14] J. Hilario, J. Kubelka, F. A. Syud, S. H. Gellman, T. A. Keiderling, *Biopolymers* **2002**, *67*, 233–236.
- [15] Zur Reduktion von Azobenzol-Systemen: C. Boulègue, M. Löweneck, C. Renner, L. Moroder, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 591–594.