

Überresponsive Peptid-basierte Sensoren von Signalproteinen**

Vyas Sharma und David S. Lawrence*

Biosensoren · Fluoreszenzsonden · Peptide · Signalübertragung

Ein kompliziertes Netz von biochemischen Reaktionswegen bildet die Grundlage für die bemerkenswerte Anpassungsfähigkeit des Lebens. Signalwege ermöglichen es den Zellen, die zum Leben notwendigen intrazellulären Bedingungen aufrechtzuerhalten, indem sie Veränderungen der Umgebung wahrnehmen und darauf reagieren. Diese Reaktionswege können allerdings auch auf Konfrontationskurs gehen und sich gegen den Wirtorganismus richten – Krebszellen teilen sich zur unpassenden Zeit und an unpassenden Orten und entwickeln, wie ihre bakteriellen Gegenstücke, raffinierte biochemische Mechanismen, um therapeutische Wirkstoffe auszuschalten. Die Biochemie beschäftigte sich im 20. Jahrhundert in erster Linie mit der Isolierung von Proteinen und ihrer anschließenden Charakterisierung *in vitro*. Ein tieferes Verständnis der Beziehung zwischen Proteinwirkung und Zellverhalten ist jedoch am besten durch die Untersuchung des fraglichen Proteins in seiner natürlichen Umgebung zu erlangen. Die Biochemie der Zelle – im Unterschied zur Biochemie des Reagenzglases – steuert deren Anpassung an Umweltveränderungen, seien diese natürlicher oder künstlicher Art. Unser Verständnis der zellulären Biochemie wurde in hohem Maße von – insbesondere technologischen und molekularbiologischen – Fortschritten im Bereich der Fluoreszenz vorangebracht. Aktuelle Ergebnisse auf einem dritten Gebiet – der chemischen Synthese – geben nun einen ersten Eindruck von den zukünftigen Entwicklungen auf dem Gebiet der Zellbiologie.

Das grün fluoreszierende Protein (GFP) und seine zahlreichen gentechnisch veränderten Varianten haben die Zellbiologie revolutioniert.^[1] Das Anbringen von GFP an den N- oder C-Terminus eines Proteins ist unkompliziert, ebenso wie die Expression der neu konstruierten Spezies in lebenden

Zellen. Verändert ein Protein seine Position in Abhängigkeit vom Zellteilungszyklus? Wie schnell wird es abgebaut, und wie hoch ist seine Diffusionsgeschwindigkeit in der Zelle? GFPs wurden auch verwendet, um dynamische chemische Veränderungen des angeknüpften Proteins nachzuweisen. Beispielsweise wurden Konstrukte entwickelt, die FRET-gepaarte GFP-Analoga enthalten (typischerweise cyan fluoreszierendes und gelb fluoreszierendes Protein; FRET = fluoreszenter Resonanzenergietransfer) und als Sensoren für eine Vielzahl bioaktiver Agentien fungieren, darunter cAMP,^[2] Ca^{2+} ,^[3] und Proteinkinasen.^[4] Obwohl man die Bedeutung der Fluoreszenzproteine nicht hoch genug einschätzen kann, haben GFPs jedoch auch ihre Einschränkungen. So sind GFPs groß und können daher das biologische Verhalten des Proteins verändern, mit dem sie verknüpft sind (Abbildung 1). Ihre erhebliche Größe schließt zudem die Lokalisierung der Fluoreszenz an einer spezifischen Subdomäne (z.B. in Nachbarschaft zu einem aktiven Zentrum) des zu untersuchenden Proteins aus. Darüber hinaus reagieren GFPs, mit Ausnahme einer Proteolyse oder einiger weiterer Abbauarten, im Allgemeinen nicht auf Veränderungen in ihrer direkten Umgebung. Tatsächlich betragen sogar FRET-Änderungen bei doppelt markierten Konstrukten typischerweise weniger als 50%. Kleine Fluorophore stören die biologische Aktivität hingegen wahrscheinlich weniger, lassen sich genauer platzieren und ausrichten und können bemerkenswert empfindlich auf die Umgebung reagieren.

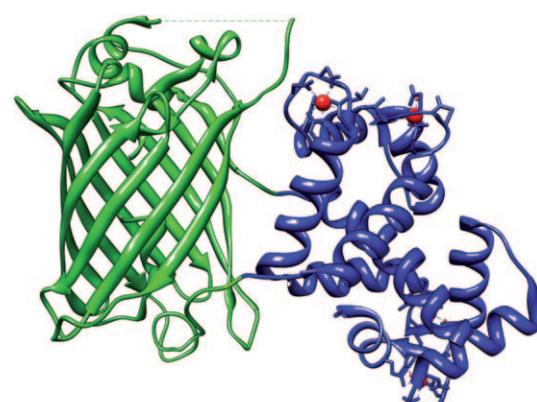


Abbildung 1. Kristallstruktur des genetisch kodierten, GFP-basierten Ca^{2+} -Sensors GCaMP2.^[5] Grün: GFP, blau: Ca^{2+} -bindende Proteinkomponente Calmodulin, rot: Ca^{2+} .

[*] Prof. D. S. Lawrence

Departments of Chemistry, Medicinal Chemistry & Natural Products, and Pharmacology, University of North Carolina Campus Box 3290, Chapel Hill, NC 27599-3290 (USA)

Fax: (+1) 919-962-2388

E-Mail: lawrencd@email.unc.edu

Dr. V. Sharma

Division of Medicinal Chemistry & Natural Products, School of Pharmacy, University of North Carolina Campus Box 7363, Genetic Medicine Building, Chapel Hill, NC 27599-7363 (USA)

[**] Die Arbeit im Labor von DSL wird von den National Institutes of Health unterstützt (NS048406, CA79954).

Eine Reihe von Methoden wurde entwickelt, um Fluorophore direkt mit Proteinen in lebenden Zellen zu verknüpfen.^[6] Die allgemeine Strategie besteht üblicherweise darin, eine kurze Aminosäuresequenz gentechnisch mit dem entsprechenden Protein zu kuppeln, die als Anknüpfungspunkt für ein synthetisches, zellpermeables Fluorophor fungiert. Schultz' Technik der Nonsense-Suppression, mit deren Hilfe ein Fluorophor an spezifischen Aminosäurepositionen eingebaut wird, ermöglicht eine noch höhere räumliche Auflösung.^[7] Dennoch wurden relativ wenige Fluorophore durch diese Verfahren in Proteine eingeführt, da gentechnische und biochemische Methoden nicht in der Lage sind, mit der Vielseitigkeit der organischen Synthese zu konkurrieren. Beispielsweise ist die Zahl nützlicher GFP-Varianten gegenüber der großen Menge an kommerziell erhältlichen synthetischen Fluorophoren gering. Die zellbasierte Synthese künstlicher Proteinkonstrukte bringt außerdem die Gefahr mit sich, die endogene Biochemie der Zelle zu stören.

Der nicht-gentechnische Aufbau von Fluoreszenzsensoren hat den Vorteil, dass dabei die natürliche Biologie der Zelle bis zum Zeitpunkt des Experiments unverändert bleibt. Außerdem lässt sich durch die organische Synthese eine nahezu unbegrenzte Vielfalt an Strukturen herstellen, mit deren Hilfe man den Sensor dermaßen genau einstellen kann, wie es mit gentechnischen Mitteln schlicht unmöglich ist. In einem aktuellen Beispiel beschreiben Imperiali et al. den Aufbau von Peptid-basierten Fluoreszenzsensoren für PDZ-Domänen.^[8] Die Arbeitsgruppe ging folgender Frage nach: Ist es möglich, hochresponsive Peptid-basierte Sensoren zu entwickeln, die zwischen eng verwandten Proteinbindungsstellen unterscheiden? Eine Familie von solvatochromen Dimethylaminophthalimid-Fluorophoren (4-DMAP, 4-DMN und 6-DMN; Schema 1) wurde eingesetzt, um SH2-^[9] und 14-

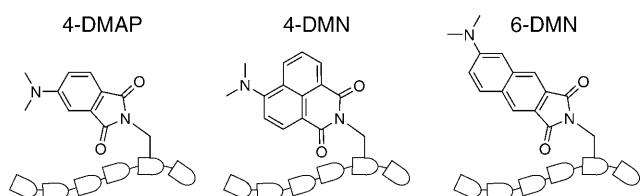
einen solvatochromen Fluorophor auf einem PDZ erkennenden Peptid zu Beginn der Studie unbekannt. Der erste Schritt war die Synthese einer Peptidbibliothek, die auf Sequenzen von C-terminalen Resten des Stargazin beruht, einem Peptid, das bekanntermaßen mit drei verschiedenen PDZ-Domänen in Wechselwirkung tritt. Die Reste an acht Positionen wurden gegen drei verschiedene Kupplungseinheiten (Diaminopropionsäure, Diaminobutansäure und Ornithin) ausgetauscht, die mit 4-DMAP verknüpft wurden. Jedes Peptid wurde mit drei unterschiedlichen PDZ-Domänen durchgemustert, und eine Auswertung der Fluoreszenzänderung ermöglichte es, die ideale Position und Art der Kupplungseinheit für 4-DMAP festzulegen. In einem anschließenden Optimierungsschritt wurden Fluorophor und Kupplungseinheit in Sequenzen eingegliedert, die bekanntermaßen selektiv an spezifische PDZ-Domänen binden. Diese Methode lieferte die gewünschten Peptid-basierten Sensoren, die nicht nur zwischen verschiedenen PDZ-Domänen unterscheiden, sondern sich auch durch >200-fache Fluoreszenzverstärkungen auszeichnen.

Für eine vollständige Aufklärung hat unter anderem unsere Arbeitsgruppe^[13] verwandte Strategien beschrieben, um ebenfalls Peptid-basierte Sensoren für eine Anordnung von Signalmolekülen zu erhalten. Die organische und die Festphasenpeptidsynthese in Kombination mit einem Screening lieferten ein Repertoire eindrucksvoller Sensoren und Sonden, die für den In-vitro-Einsatz geeignet sind. Was ist jedoch mit intrazellulären Anwendungen? Anders als GFPs haben relativ wenige dieser Reagenzien Verwendung bei Zellexperimenten gefunden. Für die offenkundige Einschränkung Peptid-basierter Sonden gibt es eine Reihe von Gründen:

Erstens sind die strukturellen Möglichkeiten der Systeme von Imperiali et al. immens, was sowohl Segen als auch Fluch ist. Für Erstellung der Molekülbibliothek in der Anfangsphase dieser Untersuchungen sind einfach zu synthetisierende Fluorophore erforderlich, die jedoch nicht notwendigerweise ideale photophysikalische Eigenschaften für den intrazellulären Einsatz aufweisen.

Zweitens müssen Fluorophor-verknüpfte Peptide – anders als GFP-modifizierte Proteine, die nach Transfektion mit dem zugehörigen Gen innerhalb der Zelle synthetisiert werden – nach ihrer Laborsynthese in die Zelle eingeführt werden. Peptide sind gewöhnlich nicht zellgängig, und die Methoden zur intrazellulären Aufnahme sind entweder anspruchsvoll (z.B. Mikroinjektion) oder von fraglichem Nutzen. Im letzteren Fall gelten „zellgängige Peptide“ als besonders kontrovers, da diese Reagenzien ihre Fracht mithilfe eines endosomal vermittelten Mechanismus einbringen könnten oder auch nicht.^[14] Dieser Aspekt ist möglicherweise bedeutsam, weil Peptide, die über Endosome in die Zelle gelangen, in diesen kleinen Vesikeln gefangen bleiben und damit nicht dem Cytoplasma ausgesetzt sind. Darüber hinaus werden in Endosomen eingebettete Peptide und Proteine normalerweise proteolytisch abgebaut.

Drittens ist unklar, wie stabil ein bestimmtes Peptid im intrazellulären Milieu ist. Dementsprechend sind allgemeine Verfahren notwendig, um die Strukturintegrität Peptid-basierter Sonden festzustellen, darunter die Messung ihrer Lebensdauer in der Zelle. Letztlich entscheiden Biologen dar-



Schema 1. Die solvatochromen Fluorophore 4-DMAP, 4-DMN und 6-DMN, angefügt an ein Peptidgerüst.

3-3-Domänen^[10] sowie Calmodulin^[11] und Klasse-II-MHC-Proteine zu untersuchen.^[12] Struktur- und Konsensussequenz-Informationen wurden herangezogen, um die Schlüsselstellen der Wechselwirkung zwischen einem Peptid und seiner Zielproteindomäne zu identifizieren. Besonders ein hydrophober aromatischer Rest auf einem Peptid, der innerhalb einer lipophilen Tasche eingebettet wird, sobald er mit seinem Protein bindenden Partner wechselwirkt, ist ein idealer Kandidat für den Austausch gegen einen solvatochromen Fluorophor. Diese Strategie führt zu großen (10- bis 2000-fachen) Fluoreszenzverstärkungen.

Anders als die Bindungseigenschaften der SH2- oder 14-3-3-Domänen sind diejenigen der PDZ-Domänen jedoch nicht eindeutig definiert; daher war die optimale Position für

über, ob bestimmte Reagentien, Sonden oder Sensoren brauchbar sind. Gegenwärtig sind GFPs einfach anzuwenden, da ein Großteil der benötigten Chemie (ortsgerechte Mutagenese zur Herstellung einer Anordnung fluoreszierender Varianten) schon zur Verfügung steht. Dagegen müssen die Vorschriften für das Design nichtgenetisch kodierter Sonden noch ausgearbeitet werden.

Unabhängig davon, ob ein Sensor oder eine Sonde durch Ribosomen in einer Zelle oder durch Wissenschaftler im Labor synthetisiert wird, wird er/sie möglicherweise letztlich durch die zelluläre Variante des Beobachtereffekts beeinträchtigt. Dieses Prinzip kommt auf so unterschiedlichen Gebieten wie der Physik und der Psychologie zur Geltung und besagt, dass bereits der bloße Vorgang der Beobachtung das untersuchte Phänomen beeinflussen kann. Angesichts der außerordentlichen Fähigkeit der zellulären Biochemie zur Anpassung an Umweltveränderungen sollte zu erwarten sein, dass eine Sonde, sei sie groß (ein GFP-Fusionsprotein; Abbildung 1) oder klein (ein Fluorophor-verknüpftes Peptid; Schema 1), unbeabsichtigte Wirkungen hervorruft. Prüft man einen wassergefüllten Ballon mit dem Finger, zeigen sich die physikalischen Auswirkungen sowohl an der Stelle der Sonde (lokal) als auch am ganzen Ballon (global). In analoger Weise könnte der Vorgang des Nachweises der Verfügbarkeit einer PDZ-Domäne in einer Zelle gleichermaßen lokale und globale Auswirkungen haben: Ist die Sonde an die PDZ-Domäne gebunden, ist folglich das endogene Protein, das gebunden sein sollte, verdrängt worden. Die Zelle könnte sehr wohl sowohl lokal wie auch global auf diese Störung der biochemischen Homöostase reagieren. Glücklicherweise muss dies kein ein Alles-oder-nichts-Szenario sein. Ist der Sensor „überresponsiv“, muss nur ein kleiner Anteil der zu untersuchenden PDZ-Domänenmoleküle geprüft werden, um eine messbare Reaktion zu erhalten. Der zellweite Ein-

fluss des Sensors und somit des Beobachtereffekts könnten folglich auf ein Minimum gesenkt werden. Dies ist die Perspektive, die nicht genetisch kodierte Agentien bieten. Dennoch müssen noch zahlreiche Herausforderungen bewältigt werden, bevor diese Reagentien allgemeine Anwendung finden können.

Eingegangen am 7. Juli 2009

Online veröffentlicht am 8. September 2009

-
- [1] R. Y. Tsien, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 5721–5736; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 5612–5626.
 - [2] M. Berrera, G. Dodoni, S. Monterisi, V. Pertegato, I. Zamparo, M. Zoccolo, *Handb. Exp. Pharmacol.* **2008**, *186*, 285–298.
 - [3] A. E. Palmer, R. Y. Tsien, *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 1057–1065.
 - [4] Q. Ni, D. V. Titov, J. Zhang, *Methods* **2006**, *40*, 279–286.
 - [5] Q. Qang, B. Shui, M. I. Kotlikoff, H. Sondermann, *Structure* **2008**, *16*, 1817–1827.
 - [6] M. Z. Lin, L. Wang, *Physiology* **2008**, *23*, 131–141.
 - [7] L. Wang, J. Xie, P. G. Schultz, *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2006**, *35*, 225–249.
 - [8] M. Sainlos, W. S. Iskenderian, B. Imperiali, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 6680–6682.
 - [9] M. E. Vázquez, J. B. Blanco, B. Imperiali, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 1300–1306.
 - [10] M. E. Vázquez, M. Nitz, J. Stehn, M. B. Yaffe, B. Imperiali, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 10150–10151.
 - [11] G. Loving, B. Imperiali, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13630–13638.
 - [12] P. Venkatraman, T. T. Nguyen, M. Sainlos, O. Bilsel, S. Chitta, B. Imperiali, L. J. Stern, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 222–228.
 - [13] V. Sharma, Q. Wang, D. S. Lawrence, *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteomics* **2008**, *1784*, 94–99.
 - [14] R. Fischer, M. Fotin-Mleczek, H. Hufnagel, R. Brock, *Chem.-BioChem.* **2005**, *6*, 2126–2142.