

Protein-Engineering: ein Metalloprotein als bioanorganisches Struktur- und Funktionsmodell

Takafumi Ueno*

Bioanorganische Chemie · Häm-Proteine · Metallkoordination · Protein-Engineering · Proteinstrukturen

Trotz rascher Fortschritte in der Strukturbiologie und in der Computerchemie bleibt eine der ganz großen Herausforderungen des Protein-Engineering das rationale Design von funktionalen Proteinstrukturen, zu dem das Design von synthetischen Modellverbindungen und De-novo-Peptiden gehört.^[1] Das Modellieren des aktiven Zentrums ist bei Metalloenzymen schwieriger als bei Nicht-Metalloenzymen, denn um die gewünschte Funktion beizubehalten, müssen die individuellen Metall-Koordinationsgeometrien und -Oxidationsstufen berücksichtigt werden.^[2] Kürzlich wurden elegante De-novo-Synthesen von Häm- und Nichthäm-Proteinen mit symmetrisch koordiniertem aktivem Zentrum beschrieben.^[3,4] Dagegen wurden Metalloenzyme mit asymmetrischem Koordinationszentrum noch kaum nachgeahmt, auch nicht durch den Einsatz von Modellverbindungen. Nun jedoch haben Lu und Mitarbeiter über das wohlgedachte Design eines Metallzentrums mit den strukturellen und funktionellen Eigenschaften eines nativen Metalloenzym berichtet.^[5] Ein Metalloprotein als Molekültemplat für mechanistische Untersuchungen von Reaktionen zu nehmen, die von anderen Metalloenzymen katalysiert werden, ist in der bioanorganischen Chemie ein vielversprechender Ansatz.

Ihr Zielprotein NOR (Stickstoffmonoxid-Reduktase) katalysiert im bakteriellen Denitrifizierungssystem die Zweielektronenreduktion von NO zu N₂O.^[6] Die dreidimensionale NOR-Struktur ist zwar noch unbekannt, spektroskopische und genetische Untersuchungen an nativen NORs ergaben aber, dass die NOR strukturell stark den Häm-Kupfer-Oxidase (HCOs) ähnelt. Allerdings trägt die NOR im aktiven Zentrum nicht das bei den HCOs übliche Cu(His)₃-Zentrum, sondern einen einzigartigen Fe(His)₃-Nichthäm-Komplex.^[6,7] Durch frühere genetische Untersuchungen an NORs ist bekannt, dass deren aktives Zentrum einen invarianten Glutamatrest aufweist, der bei HCOs nicht vorkommt^[8,9] und der für die Enzymaktivität entscheidend ist. Allerdings konnte aus NOR-Modellkomplexen^[10,11] noch keine besondere und spezifische Funktion dieses Glutamat-

rests abgeleitet werden, weil die Modellierung der asymmetrischen Koordinationsphäre ein komplizierteres Design erfordert. Das Modellieren der NOR ist somit schwieriger als das der aktiven Metallzentren von typischen Häm- und Nichthäm-Proteinen. Lu und Mitarbeiter wählten dafür einen halbsynthetischen Ansatz mit Myoglobin (Mb).

Der distale Histidinrest im aktiven Zentrum von Mb (His64) ist über eine H-Brücken-Wechselwirkung am Einfangen von O₂ beteiligt^[12] und war bereits als Kandidat für einen Liganden in einem Nichthäm-Eisenzentrum-Modell identifiziert worden. Aus dem Vergleich der Strukturen von Mb und der Cytochrom-c-Oxidase (eine HOC) wurde gefolgert, dass die His64 benachbarten Reste Leu29 und Phe43 durch Histidinreste ersetzt werden könnten, um so zu einem Fe(His)₃-Zentrum zu gelangen (Abbildung 1). In dieser Minimalstruktur wurde an Position 68 ein Glutamatrest eingefügt. Die daraus folgende Dreifachmutante L29H/F43H/V68E-Mb (Fe_BMb) repräsentierte das Modellgerüst für die NOR. Aus Eisen(II)-Titrationsexperimenten und der hochaufgelösten Kristallstruktur von Fe_BMb mit gebundenem Fe^{II} (Fe^{II}-Fe_BMb) wurde dann abgeleitet, dass der konservierte Glutamatrest wahrscheinlich durch eine einzählige Ligation die Bindung des Eisenatoms an das aktive Zentrum stabilisiert (Abbildung 2a). In den EPR- und elektrochemischen Eigenschaften ist Fe^{II}-Fe_BMb nahezu identisch mit nativer NOR. Gaschromatographie/Massenspektrometrie bestätigte die Aktivität von Fe^{II}-Fe_BMb in der NO-Reduktion. Allerdings wurde nur sehr wenig N₂O produziert. Der Mechanismus der Reaktion wurde durch Vergleichen mit anderen Mb-Kompositen (z. B. Wildtyp- und Glu-freie Fe_BMbs) untersucht. Aus den Studien ging hervor, dass der Glutamatrest und die drei Histidinreste sowohl für die Eisenbindung als auch für die NO-Reduktion entscheidend sind.

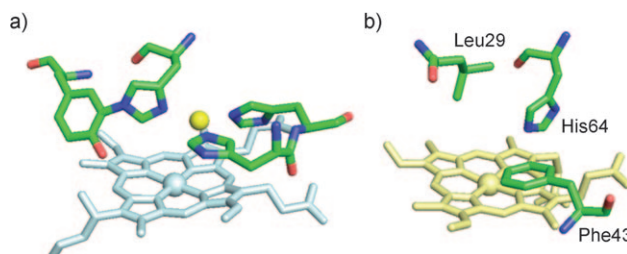


Abbildung 1. a) Das Häm-Kupfer-Zentrum der Cytochrom-c-Oxidase.^[7] b) Die für die Konstruktion des Nichthäm-Zentrums einer NOR auszutauschenden Reste im aktiven Zentrum von Wildtyp-Mb (PDB ID: 2MBW).

[*] Prof. T. Ueno

Institute for Integrated Cell-Material Sciences (iCeMS) and
Funai Center, Kyoto University
Katsura, Nishikyo-ku, Kyoto 615-8510 (Japan)
Fax: (+81) 75-383-2812
E-Mail: taka@icems.kyoto-u.ac.jp
Homepage: <http://www.kitagawa.icems.kyoto-u.ac.jp/index.html>

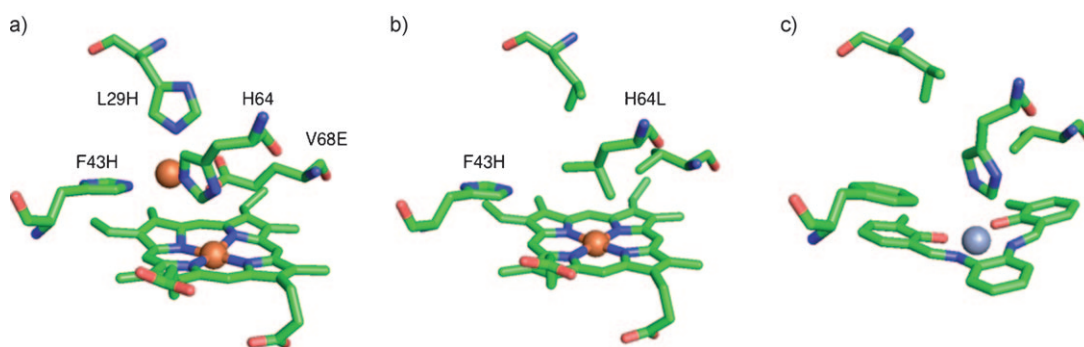


Abbildung 2. Vergleich von a) $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-Fe}_8\text{Mb}$, b) F43H/H64L Mb und c) Chrom(II)-(N,N'-bis(3-methylsalicyliden)-1,2-phenylendiamin)-apo-(A71G Mb). Die jeweiligen Kristallstrukturen stammen von den PDB IDs 3K9Z, 1OFK bzw. 1J3F.

Dieses Beispiel eines rationalen Proteindesigns unterstreicht die große Bedeutung von ortsspezifischer Mutagenese kombiniert mit Computertechniken. Ein anderer Aspekt der Arbeit war die Auslotung von Mb als Gerüstprotein und den damit verbundenen Vorteilen. Wildtyp-Mb und Mb-Mutanten können mit dem *Escherichia coli*-Expressionssystem in hohen Ausbeuten hergestellt werden. Seit 1958 mit der ersten dreidimensionalen Struktur von Mb zum ersten Mal überhaupt die Struktur eines Metalloproteins gelöst worden ist, wurden mehr als 300 unter verschiedenen Bedingungen ermittelte Mb- und Mb-Mutantenstrukturen beschrieben.^[13,14] Das Mb-Gerüst toleriert unterschiedliche Strukturen im aktiven Zentrum und verschiedene Cofaktoren. So ersetzten Watanabe et al. die normale Mb-Funktion als Sauerstoffträger durch die Funktionen anderer Hämproteine, zum Beispiel die der Peroxidase oder Peroxygenase. Dafür wurde die Position von His64 verändert.^[15] Anhand von Kristallstrukturen der Mutanten (Abbildung 2b) wurden die jeweiligen Reaktionsmechanismen diskutiert. Die Bildung von Verbindung I ließ sich bei den Mb-Mutanten sogar spektroskopisch beobachten.^[16] Auch der Häm-Cofaktor von Mb wurde durch synthetische Cofaktoren ersetzt, zum Beispiel durch Schiff-Base-Komplexe unterschiedlicher Metallionen (Abbildung 2c).^[17,18] Die Kristallstrukturen zeigen nur sehr geringe Abweichungen von der Wildtyp-Mb-Gesamtstruktur. Daher ist das Mb-Gerüst perfekt für den Einbau einer zusätzlichen Metallbindungsstelle direkt über dem Häm geeignet. Metallliganden mit komplexen Strukturen können somit für dieses System synthetisiert und leicht eingebaut werden. Durch Protein-Engineering stellten Lu und Mitarbeiter auch ein kupferhaltiges, dem Zentrum der Cytochrom-c-Oxidase ähnliches aktives Zentrum von Mb her.^[19]

Mit ihrer neuen Strategie gelang Lu und Mitarbeitern die Herstellung von Modellen natürlicher Metalloproteine, die nur schwer in hoher Ausbeute zu gewinnen sind und deren Kristallstruktur noch nicht aufgeklärt ist. Diese Methode ist höchst vielversprechend, um komplizierte funktionale Metallzentren zu erhalten, die durch chemische Synthese schwierig herzustellen sind. Nicht nur aus der Notwendigkeit heraus, Enzymreaktion von nativen Metalloenzymen grundlegend verstehen zu lernen, sondern auch im Hinblick auf neue biokatalytische Anwendungen finden die Ergebnisse bereits ein großes Interesse. Sie eröffnen der bioanorganischen Chemie neue, spannende Möglichkeiten.

Eingegangen am 20. Januar 2010

Online veröffentlicht am 30. April 2010

- [1] D. N. Bolon, C. A. Voigt, S. L. Mayo, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, 6, 125.
- [2] Y. Lu, S. M. Berry, T. D. Pfister, *Chem. Rev.* **2001**, 101, 3047.
- [3] M. Faiella, C. Andreozzi, R. T. M. de Rosales, V. Pavone, O. Maglio, F. Natri, W. F. DeGrado, A. Lombardi, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, 5, 882.
- [4] R. L. Koder, J. L. R. Anderson, L. A. Solomon, K. S. Reddy, C. C. Moser, P. L. Dutton, *Nature* **2009**, 458, 305.
- [5] N. Yeung, Y. W. Lin, Y. G. Gao, X. Zhao, B. S. Russell, L. Y. Lei, K. D. Miner, H. Robinson, Y. Lu, *Nature* **2009**, 462, 1079.
- [6] I. M. Wasser, S. de Vries, P. Moenne-Loccoz, I. Schroder, K. D. Karlin, *Chem. Rev.* **2002**, 102, 1201.
- [7] S. Yoshikawa, K. Shinzawa-Itoh, R. Nakashima, R. Yaono, E. Yamashita, N. Inoue, M. Yao, M. J. Fei, C. P. Libeu, T. Mizushima, H. Yamaguchi, T. Tomizaki, T. Tsukihara, *Science* **1998**, 280, 1723.
- [8] J. Hendriks, U. Gohlke, M. Saraste, *J. Bioenerg. Biomembr.* **1998**, 30, 15.
- [9] N. J. Watmough, G. Butland, M. R. Cheesman, J. W. B. Moir, D. J. Richardson, S. Spiro, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **1999**, 1411, 456.
- [10] J. P. Collman, Y. Yang, A. Dey, R. A. Decreau, S. Ghosh, T. Ohta, E. I. Solomon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, 105, 15660.
- [11] I. M. Wasser, H. W. Huang, P. Moenne-Loccoz, K. D. Karlin, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 3310.
- [12] G. B. Jameson, J. A. Ibers in *Biological Inorganic Chemistry – Structure & Reactivity* (Eds.: I. Bertini, H. B. Gray, E. I. Stiefel, J. S. Valentine), University Science Books, Herndon, VA, **2007**, S. 354–388.
- [13] J. C. Kendrew, G. Bodo, H. M. Dintzis, R. G. Parrish, H. Wyckoff, D. C. Phillips, *Nature* **1958**, 181, 662.
- [14] See: <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>.
- [15] Y. Watanabe, H. Nakajima, T. Ueno, *Acc. Chem. Res.* **2007**, 40, 554.
- [16] T. Matsui, S. Ozaki, E. Liong, G. N. Phillips, Y. Watanabe, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 2838.
- [17] T. Ueno, T. Koshiyama, M. Ohashi, K. Kondo, M. Kono, A. Suzuki, T. Yamane, Y. Watanabe, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 6556.
- [18] T. Ueno, T. Koshiyama, S. Abe, N. Yokoi, M. Ohashi, H. Nakajima, Y. Watanabe, *J. Organomet. Chem.* **2007**, 692, 142.
- [19] J. A. Sigman, B. C. Kwok, Y. Lu, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 8192.