

# Enzymatische, sequenzspezifische Alkinfunktionalisierung von Proteinmethyltransferasesubstraten für die Markierung mittels Klickchemie\*\*

Wibke Peters, Sophie Willnow, Mike Duisken, Henning Kleine, Thomas Macherey, Kelly E. Duncan, David W. Litchfield, Bernhard Lüscher und Elmar Weinhold\*

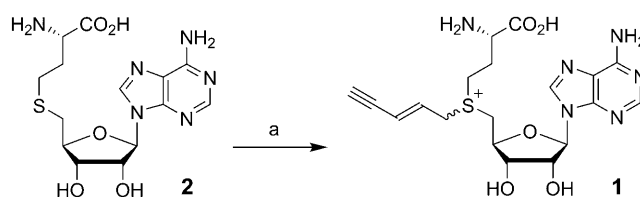
Posttranslationale Modifikationen von Proteinen spielen bei fast allen regulatorischen Prozessen der Zelle eine Schlüsselrolle. Viele verschiedene Modifikationen, unter anderem auch die Methylierung, wurden für Histone, die Proteinbestandteile der Nucleosomen, beschrieben. Dabei werden insbesondere die N-Termini der Histone modifiziert, wodurch die Wechselwirkung mit Proteinen, die die Chromatinstruktur und die Gentranskription regulieren, kontrolliert wird.<sup>[1–4]</sup> Neueste Studien zeigen, dass die Methylierung der Seitenketten von Lysin- und Argininresten der Histone mit spezifischen funktionellen Zuständen der Promotoren korreliert. Während die Methylierung von Lysin 9 in Histon H3 (H3K9) mit der Repression der Gentranskription assoziiert ist,<sup>[1,2]</sup> markiert die Trimethylierung von Lysin 4 in Histon H3 (H3K4) Promotoren transkribierter Gene.<sup>[3,5]</sup> Die Methylierung von H3K4 ist mit anderen Histonmodifikationen gekoppelt und korreliert negativ mit der Dimethylierung von Arginin 2 in Histon H3 (H3R2), einer Modifikation, die bei reprimierten Promotoren zu finden ist.<sup>[6,7]</sup>

Proteinmethyltransferasen (MTasen) übertragen die aktivierte Methylgruppe des Cofaktors *S*-Adenosyl-L-methio-

nin (AdoMet oder SAM) hauptsächlich auf Lysin- und Argininreste ihrer Substrate. Die Enzyme sind oft sequenzspezifisch, wie z. B. der „mixed-lineage leukaemia (MLL)“-Histon-MTase-Komplex, der H3K4 trimethyliert.<sup>[8]</sup> Die Methylierung von Lysinresten ist eine dynamische und reversible Modifikation, die MTasen und Demethylasen einbezieht.<sup>[9]</sup> Die meisten bekannten Substrate von Protein-MTasen sind Histone und einige andere Proteine, die mit der Gentranskription verbunden sind.<sup>[10]</sup> Zurzeit fehlen umfassende Analysen von MTase-Substraten, da die Methylgruppe ein sehr schlechter Reporter ist und Antikörper methylierte Aminosäuren typischerweise nur im Kontext der zugrunde liegenden Peptidsequenz erkennen. Daher wurde hier eine alternative Methode entwickelt, um MTase-Substrate zu identifizieren.

Vor kurzem berichteten wir über synthetische, doppelt aktivierte AdoMet-Analoga, bei denen die Methylgruppe durch allylische und propargylische Gruppen ersetzt ist.<sup>[11,12]</sup> Derartige Analoga können für die sequenzspezifische DNA-Modifizierung durch DNA-MTasen eingesetzt werden und fungieren als Cofaktoren für MTasen, die die Methylgruppe auf kleine Moleküle übertragen.<sup>[13]</sup> Gegenüber Aziridinumbasierten AdoMet-Analoga<sup>[14]</sup> haben die doppelt aktivierten Cofaktoren den Vorteil, dass während der MTase-Reaktion keine starken Produktinhibitoren gebildet werden. Eine Verlängerung der Propargylgruppe mit einer Aminofunktion ermöglichte in einem zweiten Schritt das Kuppeln von *N*-Hydroxysuccinimid(NHS)-aktivierten Reportergruppen an die modifizierte DNA.<sup>[15]</sup>

Da die Einführung von Aminogruppen für die Analyse von Proteinen ungeeignet ist, haben wir den neuen Cofaktor AdoEnIn (**1**) (Schema 1) entworfen, bei dem die Methylgruppe durch einen Pent-2-en-4-ynyl-Rest ersetzt ist. Die Doppelbindung in  $\beta$ -Position zum Sulfoniumzentrum wirkt ungünstigen sterischen Effekten im  $S_N2$ -ähnlichen Übergangszustand durch konjugative Stabilisierung entgegen.<sup>[11]</sup>



**Schema 1.** Synthese von AdoEnIn (**1**). Bedingungen: a) (*E*)-Pent-2-en-4-ynyl-methansulfonat,  $\text{HCO}_2\text{H}$ ,  $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ , RT, 14 h, 50%.

[\*] Dr. W. Peters, S. Willnow, T. Macherey, Prof. Dr. E. Weinhold  
Institut für Organische Chemie, RWTH Aachen University  
Landoltweg 1, 52056 Aachen (Deutschland)  
Fax: (+49) 241-80-92528  
E-Mail: elmar.weinhold@oc.rwth-aachen.de  
Homepage: <http://www.weinholdgroup.rwth-aachen.de>

Dr. W. Peters, Dr. H. Kleine, Prof. Dr. B. Lüscher  
Institut für Biochemie und Molekularbiologie  
Uniklinikum der RWTH Aachen University  
Pauwelsstraße 30, 52074 Aachen (Deutschland)

Dr. M. Duisken  
Leco Instruments GmbH, Mönchengladbach (Deutschland)

Dr. K. E. Duncan, Prof. Dr. D. W. Litchfield  
Department of Biochemistry  
Schulich School of Medicine and Dentistry  
University of Western Ontario, London, ON (Kanada)

[\*\*] Wir danken Xiaodong Cheng für das zur Verfügung gestellte Dim-5-Expressionsplasmid und Kerstin Glensk für die technische Unterstützung bei der Herstellung des Cofaktor-Analogons AdoEnIn. Diese Arbeit wurde unterstützt durch ein Graduiertenstipendium der RWTH Aachen University an W.P., durch die Canadian Institutes of Health Research (MOP 37854) an D.W.L., durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (LU 466/13-1) an B.L. und (WE 1453/4-1 und 4-2) an E.W. sowie durch die Exzellenzinitiative des Bundes und der Länder.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201001240> zu finden.

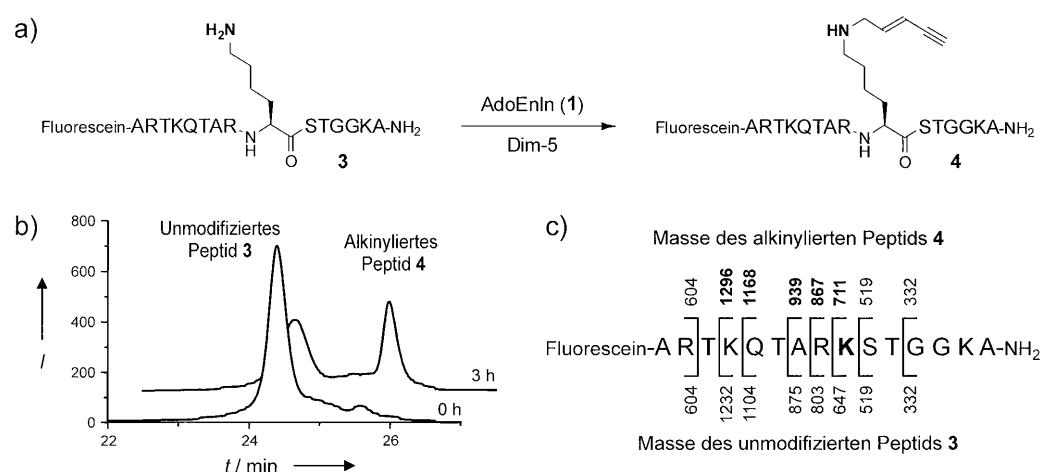
und das terminale Alkin dient als bioorthogonale funktionelle Gruppe für weitere chemische Proteinmodifikationen. Dieser Entwurf war notwendig, da ein entsprechendes AdoMet-Analogon mit einem Prop-2-ynyl-Rest insbesondere unter basischen Bedingungen instabil war. AdoEnIn (**1**) wurde in einer einstufigen Synthese aus *S*-Adenosyl-L-homocystein (AdoHcy, **2**) und dem entsprechenden aktivierten Alkohol hergestellt (experimentelle Einzelheiten finden sich in den Hintergrundinformationen). Bei dieser nucleophilen Substitution sind keine Schutzgruppen notwendig, da unter den sauren Bedingungen alle nucleophilen Positionen bis auf das Schwefelatom protoniert und somit vorübergehend geschützt vorliegen.

Um zu überprüfen, ob der neue Cofaktor AdoEnIn (**1**) durch Protein-MTasen umgesetzt werden kann, wurde das Enzym Dim-5 aus *Neurospora crassa* ausgewählt, das mit

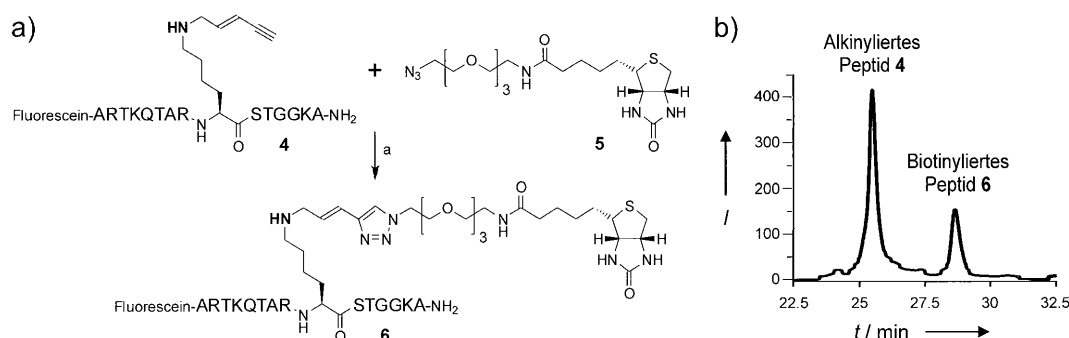
seiner SET-Domäne spezifisch H3K9 trimethyliert.<sup>[16]</sup> Als Substrat diente Peptid **3**, das den ersten 15 Aminosäuren des Histons H3 entspricht und über ein N-terminal gekoppeltes Fluorescein zum Nachweis des Peptids verfügt (Abbildung 1 a). Das modifizierte Peptid **4** mit dem unpolaren Pent-2-en-4-ynyl-Rest zeigte eine erhöhte Retentionszeit in der Umkehrphasen-HPLC (Abbildung 1 b). Die Produktanalyse durch hochauflösende LC-ESI-TOF- und MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometrie bestätigte, dass das Peptid **4** mit genau einem Pent-2-en-4-ynyl-Rest (Abbildung S4 in den Hintergrundinformationen) sequenzspezifisch an Lysin 9 modifiziert worden war (Abbildung 1 c).

Durch die Übertragung des Pent-2-en-4-ynyl-Rests wird ein terminales Alkin in das Substratpeptid eingeführt, das für weitere Modifikationen durch bioorthogonale CuAAC-Klickreaktionen (CuAAC = Cu<sup>I</sup>-katalysierte 1,3-dipolare Azid-Alkin-Cycloaddition) genutzt werden kann.<sup>[17]</sup> Die Reaktion zwischen dem Alkin-modifizierten Peptid **4** und Azid-derivatisierten Biotin **5** (Abbildung 2 a) wurde durch Umkehrphasen-HPLC und MS bestätigt. Das biotinylierte Peptid **6** zeigte eine erhöhte Retentionszeit, und seine Masse (hochauflösendes LC-ESI-TOF-MS) war in guter Übereinstimmung mit der erwarteten Struktur (Abbildung S5).

Zur weiteren Evaluierung dieser zweistufigen Markierungsmethode wurde vollständiges Histon H3 als Substrat eingesetzt. Histon H3 wurde mit

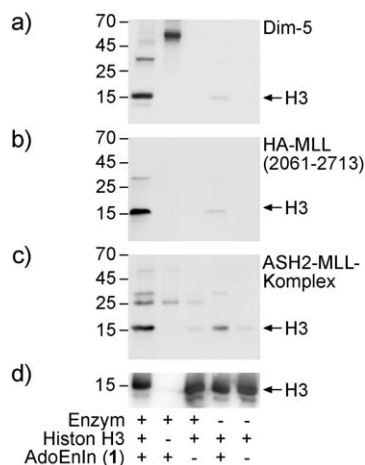


**Abbildung 1.** Enzymatische Übertragung des Pent-2-en-4-ynyl-Restes vom AdoMet-basierten Cofaktor AdoEnIn (**1**) auf ein Testpeptid. a) Modifikation des Histon-H3-Peptids (Aminosäuren 1–15) mit einer N-terminal verknüpften Fluorescingruppe **3** mit dem Cofaktor-Analogon AdoEnIn (**1**) und der Histon-MTase Dim-5 an Lysin 9. b) Analyse der enzymatischen Reaktion durch Umkehrphasen-HPLC. Peptide wurden durch Fluoreszenzdetektion beobachtet, und Fluoreszenzintensitäten (*I*) wurden bei  $\lambda^{\text{Ex}} = 440$  nm und  $\lambda^{\text{Em}} = 510$  nm gemessen. Der Umsatz der Reaktion betrug 55 %, und die vollständigen Chromatogramme sind in Abbildung S3 gezeigt. c) MALDI-TOF/TOF-MS-Sequenzierungsergebnisse des modifizierten Peptids **4** (obere Massen) und des unmodifizierten Peptids **3** (untere Massen). Klammern kennzeichnen beobachtete Fragmente, wobei diejenigen Fragmente, die Lysin 9 enthalten, eine Massedifferenz von 64 in Übereinstimmung mit der Pent-2-en-4-ynyl-Modifikation zeigen.



**Abbildung 2.** Markierung des alkylierten Histon-H3-Peptids **4** mit Biotinazid **5** durch CuAAC-Klickchemie. a) Bildung des biotinylierten Peptids **6**. Bedingungen: a) CuSO<sub>4</sub>, Natriumascorbat, L-Prolin, 30 °C, über Nacht. b) Analyse der chemischen Markierungsreaktion durch Umkehrphasen-HPLC. Peptide wurden mittels Fluoreszenzdetektion beobachtet, und Fluoreszenzintensitäten (*I*) wurden bei  $\lambda^{\text{Ex}} = 440$  nm und  $\lambda^{\text{Em}} = 510$  nm gemessen. Der Umsatz der Reaktion betrug etwa 30 %, und die vollständigen Chromatogramme sind in Abbildung S3 gezeigt.

Dim-5 und AdoEnIn (1) modifiziert und anschließend mit Biotinazid 5 markiert. Nach SDS-PAGE und Western Blot erfolgte der Nachweis des biotinylierten Proteins mittels Peroxidase-konjugiertem Avidin. Dabei konnte ein spezifisches Signal für das markierte Histon H3 detektiert werden. Die Kontrollen zeigten vernachlässigbare Signale, die wahrscheinlich auf eine langsame, nicht-enzymatische Übertragungsreaktion zurückzuführen sind (Abbildung 3a). Dim-5



**Abbildung 3.** Histon H3 wurde enzymatisch mit AdoEnIn (1) durch a) Dim-5, b) immunopräzipitiertes HA-MLL (2061–2713), exprimiert in HEK293T-Zellen, oder c) den humanen ASH2-MLL-Komplex von HEK293T-Zellen, aufgereinigt durch Tandem-Affinitätschromatographie, modifiziert. Die modifizierten Proteine wurden mit Azid-derivatisiertem Biotin 5 gekuppelt und nach SDS-PAGE und Western Blot mit Peroxidase-konjugiertem Avidin nachgewiesen. d) Nachweis von Histon H3 mit einem spezifischen Antikörper als Kontrolle.

wurde unter diesen Bedingungen automodifiziert, was in Anwesenheit von Histon H3 drastisch reduziert wurde und somit darauf hindeutet, dass Histon H3 ein besseres Substrat als Dim-5 selbst ist. Diese Ergebnisse zeigen, dass AdoEnIn (1) als Cofaktor für Dim-5 dienen kann und Lysin 9 sowohl in einem Peptid als auch im vollständigen Histon H3 sequenzspezifisch modifiziert wird. Schließlich kann das übertragene terminale Alkin in einer CuAAC-Klickreaktion markiert werden, was eine spezifische Detektion von MTase-Substraten ermöglicht.

Im Unterschied zu der fungalen, monomeren Protein-MTase Dim-5 sind menschliche Protein-MTasen oft mit weiteren Untereinheiten komplexiert, die wichtig für die enzymatische Aktivität sind. MLL-MTase-Komplexe sind von erheblichem Interesse, da die Regulation und/oder die Expression einiger Untereinheiten bei Krebs gestört ist. Insbesondere sind hier der Tumorsuppressor Menin und das Onkoprotein ASH2 zu erwähnen, die mit der Tumorentstehung in Verbindung gebracht worden sind.<sup>[8,18]</sup> Daher haben wir MLL-MTasen mit AdoEnIn (1) getestet. Ein C-terminales Fragment von MLL4 (Aminosäuren 2061–2713, inklusive der katalytischen SET-Domäne) mit N-terminaler HA-Markierung wurde in HEK293T-Zellen unter der Annahme exprimiert, dass es mit endogenen Untereinheiten komplexieren würde.<sup>[19]</sup> In der Tat war dieser Komplex mit [Methyl-<sup>3</sup>H]-

AdoMet aktiv (Daten nicht gezeigt) und in der Lage, AdoEnIn (1) für die Modifikation von Histon H3 zu nutzen (Abbildung 3b). Zusätzlich war ein aufgereinigter ASH2-MLL-Komplex, der Lysin 4 in Histon H3 trimethyliert,<sup>[6]</sup> imstande, den Pent-2-en-4-ynyl-Rest vom synthetischen Cofaktor AdoEnIn (1) auf Histon H3 zu übertragen (Abbildung 3c). Somit können unterschiedliche Protein-MTasen AdoEnIn (1) als Cofaktor nutzen. Dies ermöglicht den spezifischen Transfer einer chemisch modifizierbaren Alkingruppe auf Substratproteine, die dann durch CuAAC-Klickchemie mit Azid-derivatisierten Reportergruppen unter milden Bedingungen markiert werden können.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass alternative Cofaktoren für Protein-MTasen entworfen und synthetisiert werden können. Bemerkenswert ist, dass AdoEnIn (1) auch durch den Säugerkomplex ASH2-MLL, der aus mehreren Untereinheiten besteht, genutzt werden kann. Da einige Untereinheiten des Komplexes mit der Tumorgenese verknüpft sind,<sup>[8,18]</sup> ist eine wichtige Frage, ob die onkogenen Eigenschaften des ASH2-MLL-Komplexes ausschließlich von seiner Fähigkeit zur Trimethylierung von H3K4 bestimmt werden, oder ob es noch andere Substrate gibt, die kritisch für die Tumorentwicklung sind. Das Fehlen effizienter Methoden hat bis jetzt eine umfassende Analyse von ASH2-MLL-Substraten verhindert. Gleiches gilt für andere Protein-MTasen. Neuere Studien mit Peptidarrays deuten darauf hin, dass sich Konsensussequenzen für MTase-Substrate ableiten lassen.<sup>[20]</sup> Mit solchen Sequenzen können mögliche Substrate in Computerstudien identifiziert werden, müssen aber dann experimentell aufwändig bestätigt werden. Mit den hier vorgestellten Methoden und Verbindungen können nun Screening-Verfahren entwickelt werden, um neue MTase-Substrate direkt zu identifizieren. Darüber hinaus könnte der Ansatz in Verbindung mit Proteinarrays umfassende Studien zur Definition des methylierten Proteoms ermöglichen.

Eingegangen am 1. März 2010

Online veröffentlicht am 22. Juni 2010

**Stichwörter:** Cofaktoren · Epigenetik · Klickchemie · Proteine · Transferasen

- [1] S. L. Berger, *Nature* **2007**, 447, 407–412.
- [2] T. Kouzarides, *Cell* **2007**, 128, 693–705.
- [3] A. Shilatifard, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2008**, 20, 341–348.
- [4] R. J. Sims, D. Reinberg, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, 9, 815–820.
- [5] a) T. A. Milne, S. D. Briggs, H. W. Brock, M. E. Martin, D. Gibbs, C. D. Allis, J. L. Hess, *Mol. Cell* **2002**, 10, 1107–1117; b) R. Schneider, A. J. Bannister, F. A. Myers, A. W. Thorne, C. Crane-Robinson, T. Kouzarides, *Nat. Cell Biol.* **2004**, 6, 73–77; c) A. Yokoyama, Z. Wang, J. Wysocka, M. Sanyal, D. J. Aufiero, I. Kitabayashi, W. Herr, M. L. Cleary, *Mol. Cell Biol.* **2004**, 24, 5639–5649.
- [6] E. Guccione, C. Bassi, F. Casadio, F. Martinato, M. Cesaroni, H. Schuchlantz, B. Lüscher, B. Amati, *Nature* **2007**, 449, 933–937.
- [7] a) D. Hyllus, C. Stein, K. Schnabel, E. Schiltz, A. Imhof, Y. Dou, J. Hsieh, U.-M. Bauer, *Genes Dev.* **2007**, 21, 3369–3380; b) A. Kirmizis, H. Santos-Rosa, C. J. Penkett, M. A. Singer, M.

- Vermeulen, M. Mann, J. Bähler, R. D. Green, T. Kouzarides, *Nature* **2007**, 449, 928–932.
- [8] A. V. Krivtsov, S. A. Armstrong, *Nat. Rev. Cancer* **2007**, 7, 823–833.
- [9] R. J. Klose, Y. Zhang, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, 8, 307–318.
- [10] J. Huang, S. L. Berger, *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2008**, 18, 152–158.
- [11] C. Dalhoff, G. Lukinavicius, S. Klimasauskas, E. Weinhold, *Nat. Chem. Biol.* **2006**, 2, 31–32.
- [12] C. Dalhoff, G. Lukinavicius, S. Klimasauskas, E. Weinhold, *Nat. Protoc.* **2006**, 1, 1879–1886.
- [13] a) H. Stecher, M. Teng, B. J. Ueberbacher, P. Remler, H. Schwab, H. Griengl, M. Gruber-Khadjawi, *Angew. Chem.* **2009**, 121, 9710–9712; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 9546–9548; b) B. W. K. Lee, H. G. Sun, T. Zang, B. J. Kim, J. F. Alfaro, Z. S. Zhou, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 3642–3643.
- [14] T. Osborne, R. L. Weller Roska, S. R. Rajski, P. R. Thompson, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 4574–4575.
- [15] G. Lukinavičius, V. Lapiene, Z. Stasevskij, C. Dalhoff, E. Weinhold, S. Klimasauskas, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 2758–2759.
- [16] X. Zhang, H. Tamaru, S. I. Khan, J. R. Horton, L. J. Keefe, E. U. Selker, X. Cheng, *Cell* **2002**, 111, 117–127.
- [17] a) V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 2708–2711; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 2596–2599; b) C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 3057–3064; c) R. Breinbauer, M. Köhn, *ChemBioChem* **2003**, 4, 1147–1149.
- [18] a) A. Yokoyama, T. C. P. Somervaille, K. S. Smith, O. Rozenblatt-Rosen, M. Meyerson, M. L. Cleary, *Cell* **2005**, 123, 207–218; b) J. Lüscher-Firzlaff, I. Gawlista, J. Vervoorts, K. Kapelle, T. Braunschweig, G. Walsemann, C. Rodgarkia-Schamberger, H. Schuchlutz, S. Dreschers, E. Kremmer, R. Lilischkis, C. Cerni, A. Wellmann, B. Lüscher, *Cancer Res.* **2008**, 68, 749–758.
- [19] M. M. Steward, J.-S. Lee, A. O'Donovan, M. Wyatt, B. E. Bernstein, A. Shilatifard, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2006**, 13, 852–854.
- [20] a) P. Rathert, A. Dhayalan, M. Murakami, X. Zhang, R. Tamas, R. Jurkowska, Y. Komatsu, Y. Shinkai, X. Cheng, A. Jeltsch, *Nat. Chem. Biol.* **2008**, 4, 344–346; b) P. Rathert, X. Zhang, C. Freund, X. Cheng, A. Jeltsch, *Chem. Biol.* **2008**, 15, 5–11.