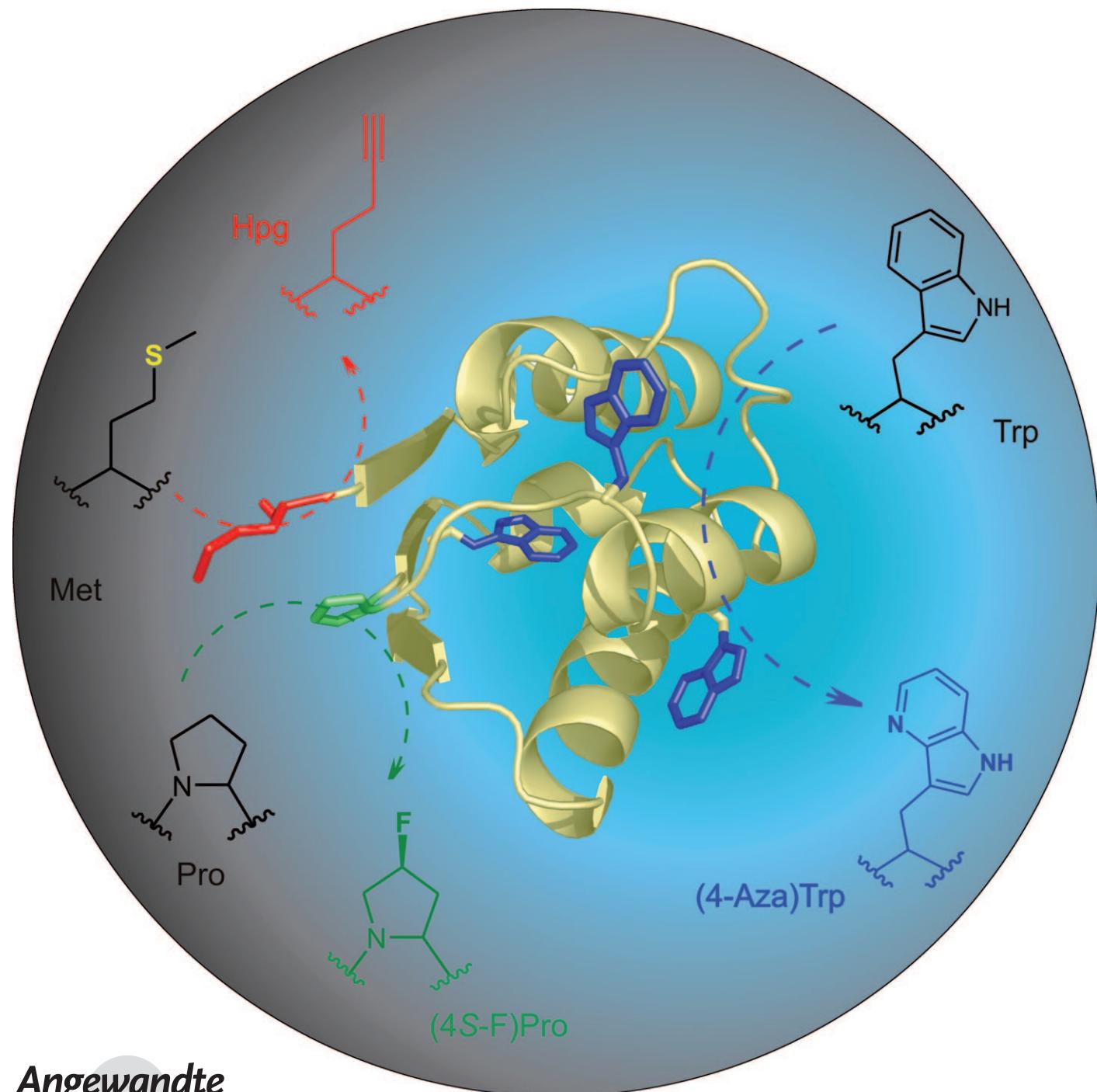


# Doppelte und dreifache In-vivo-Funktionalisierung von Proteinen mit synthetischen Aminosäuren\*\*

Sandra Lepthien, Lars Merkel und Nediljko Budisa\*



Die Eigenschaften von synthetischen Aminosäuren unterscheiden sich deutlich von denen der kanonischen Aminosäuren, und ihr Einbau in Proteine oder Peptide verleiht diesen in der Regel neue strukturelle und funktionelle Charakteristika.<sup>[1,2]</sup> Im Prinzip gibt es nur wenige Methoden für den In-vivo-Einbau von synthetischen Aminosäuren in Zielproteine unter Verwendung rekombinanter DNA. So basiert das Engineering des genetischen Codes auf der Umwidmung von kodierenden Basentriplets<sup>[3,4]</sup> mithilfe der Supplementation-Einbaumethode (supplementation incorporation method; SPI).<sup>[5]</sup> Durch Nutzen der großen Substrattoleranz der zellulären Aufnahmesysteme sowie des endogenen Translationsapparates konnten bereits viele synthetische Aminosäuren während der Expression in Proteine eingebaut werden. Dabei erfolgt der Aminosäurerest-spezifische Austausch einer bestimmten Aminosäure an jeder ihrer Positionen in der Proteinsequenz, ohne dass DNA-Mutagenese erforderlich wäre. Diese Austausche sind deshalb so interessant, da die meisten strukturellen und biologischen Eigenschaften von Proteinen,<sup>[6]</sup> z. B. die konformative Stabilität oder die Faltungseigenschaften, auf synergistischen Effekten von verschiedenen Aminosäuren in unterschiedlichen Positionen in der Proteinsequenz beruhen, wie kürzlich gezeigt wurde.<sup>[7,8]</sup>

Im Gegensatz dazu beruhen Methoden, die auf einem erweiterten genetischen Code aufbauen, auf der Verwendung der Stop-Codons, z. B. des Amber-Stop-Codons, oder auf Quadruplets als Ansatzpunkte für die Erweiterung des zellulären Codes.<sup>[9]</sup> Synthetische Aminosäuren werden hierbei in einzelne rekombinante Proteine durch „Nonsense“- oder Frameshift(=Leserasterverschiebungs)-Suppression eingebaut, und zwar mithilfe genetisch optimierter Komponenten der Translationsmaschinerie, z. B. Aminoacyl-tRNA-Synthetasen, tRNAs oder Ribosomen.<sup>[10]</sup> Obwohl diese Methoden im akademischen Umfeld große Beachtung finden, ist ihre praktische Anwendbarkeit aus mehreren Gründen immer noch begrenzt. Dazu gehören eine geringe Proteinausbeute aufgrund zellulärer Toxizität,<sup>[11]</sup> kontextabhängige Effekte und die Konkurrenz mit der durch die Evolution hochspezialisierten Terminationsmaschinerie.<sup>[12]</sup> Außerdem erweist sich die experimentelle Reproduktion mitunter als schwierig.<sup>[13]</sup> Erst kürzlich wurden aber verbesserte Systeme für einen zweifachen Aminosäureaustausch durch normale und mutierte Ribosomen im Rahmen eines erweiterten geneti-

schen Codes veröffentlicht.<sup>[9,14]</sup> Obgleich weiterer Fortschritt auf diesem Forschungsgebiet erwartet werden darf, scheint es unausweichlich, dass eine weitere Erhöhung der Zahl der Stop- oder Nichttriplett-Codons innerhalb einer kodierenden Nucleinsäuresequenz die Translationseffizienz signifikant herabsetzen wird. Aus diesem Grund ist die Nonsense- oder Frameshift-Suppression noch weit davon entfernt, optimal für einen effizienten multiplen In-vivo-Einbau von Aminosäuren in ein Protein zu sein.<sup>[15]</sup> Eine vielversprechende Alternative ist daher sicherlich die „Expressed Protein Ligation“, die erfolgreich natürliches Intein-vermitteltes Protein-Selbstsplicing mit der Peptidligation kombiniert und so die Generierung von semisynthetischen Proteinen mit einer nahezu unendlichen Zahl von nichtkanonischen Aminosäuren erlaubt.<sup>[16]</sup> Der größte Nachteil dieser Methode jedoch ist, dass synthetische Aminosäuren nur in den Peptidteil des ligierten Proteinmoleküls eingeführt werden können.

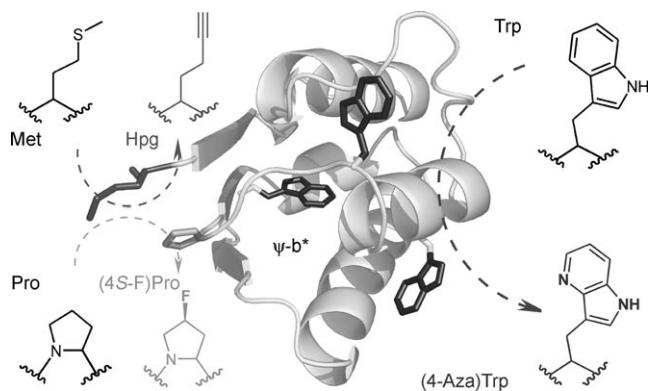
Im Gegensatz dazu ist SPI als Modifizierung exprimierter Proteine eine einfache und effiziente Methode, die weder vorangehende genetische Veränderungen noch extensive Systemoptimierungen benötigt. Mit diesem methodischen Ansatz wurden bereits Proteine mit neuartigen spektroskopischen Eigenschaften,<sup>[18]</sup> einer veränderten pH-Empfindlichkeit,<sup>[19]</sup> einer verbesserten Stabilität<sup>[8]</sup> oder einer veränderten enzymatischen Aktivität<sup>[20]</sup> in Mengen produziert, die denen des natürlichen Proteins ähneln. Bis jetzt war SPI auf eindimensionale Verbesserungen durch den Einbau nur eines Typs von synthetischen Aminosäuren pro Protein beschränkt. Auf diese Weise wurden entweder die biophysikalischen Eigenschaften eines bestimmten Proteins verändert, z. B. die Fluoreszenz<sup>[21]</sup> und die Faltungseigenschaften,<sup>[7]</sup> oder es wurde eine bioorthogonale reaktive Gruppe für nachfolgende Proteinmodifikationen in das Protein eingeführt.<sup>[22]</sup> Es ist allerdings äußerst wünschenswert, diese Eigenschaften in einer einzigen Proteinvariante kombinieren zu können.

Um dieses Ziel zu erreichen, veränderten wir ein Modellprotein mittels multiplen Einbaus von zwei oder drei chemisch unterschiedlichen Aminosäuren in jeweils einem einzigen Expressionsexperiment wie in Abbildung 1 dargestellt. Als Zielprotein wurde cysteinfreies „Pseudo-Wildtyp-Barstar“ ( $\psi$ -b\*; Mutationen P28A/C41A/C83A)<sup>[17]</sup> aus *Bacillus amyloliquefaciens* gewählt.  $\psi$ -b\* ist ein 10 kDa großes Protein, das einen Methionin- (Met), drei Tryptophan- (Trp) und einen Prolinrest (Pro) enthält. In unseren früheren Studien verwenden wir  $\psi$ -b\* für individuelle Modifikationen durch Kupfer(I)-katalysierte Azid-Alkin-Huisgen-Cycloadditionen (CuAAC, „Klick-Chemie“)<sup>[23,24]</sup> mit Azid/Alkin enthaltenden Liganden. Insbesondere die Iodinierung<sup>[25]</sup> und die Glycosylierung<sup>[26]</sup> von Homopropargylglycin (Hpg) oder Azidohomoalanin (Aha) enthaltendem  $\psi$ -b\* waren erfolgreich. Generell könnte die Anwendbarkeit von solchen Konjugaten in Zellsystemen jedoch deutlich verbessert werden, wenn sie auf nichtinvasive Weise mit intrinsischer Fluoreszenz ausgestattet werden könnten. Vor kurzem haben wir gezeigt, dass das isostere Trp-Analogon 4-Azatryptophan ((4-Aza)Trp) nach Anregung mit UV-Licht eine stark rot-verschobene Fluoreszenz aufweist ( $\lambda_{\text{max,em}} > 415 \text{ nm}$ )<sup>[27]</sup> und daher ein großes Potenzial für den Einsatz in Bildgebungsverfahren, z. B. in der Einzelmolekülspektroskopie, hat.

[\*] Dr. S. Lepthien, Dr. L. Merkel, Prof. Dr. N. Budisa  
Max-Planck-Institut für Biochemie, Molekulare Biotechnologie  
Am Klopferspitz 18, 82152 Martinsried (Deutschland)  
Fax: (+49) 89-8578-3557  
E-Mail: budisa@biochem.mpg.de  
Homepage: <http://www.biochem.mpg.de/budisa>

[\*\*] Prof. Luis Moroder danken wir für hilfreiche Diskussionen und seinen Rat, Elisabeth Weyher-Stingl und der Microchemistry Core Facility für exzellente Unterstützung in der Analytik und Waltraud Wenger für hervorragende technische Assistenz. Dem National BioResource Project (Japan) verdanken wir die Bereitstellung der Bakterienstämme. Diese Arbeit wurde durch das BioFuture-Programm des Bundesministeriums für Bildung und Forschung finanziert.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201000439> zu finden.

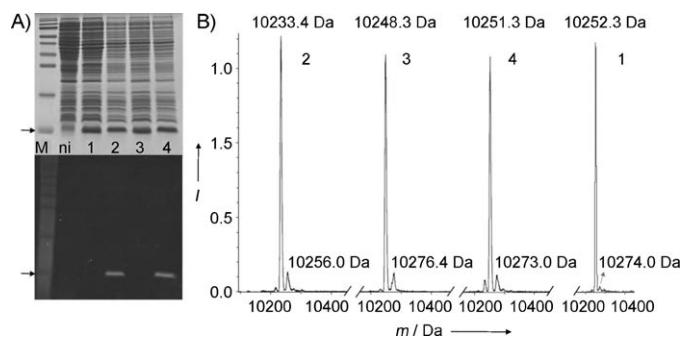


**Abbildung 1.** Generelles Konzept der simultanen multiplen In-vivo-Funktionalisierung eines Proteins in einem einzigen Expressionsexperiment. In der Struktur von  $\psi$ -b\* sind die Aminosäurereste Met1, Trp39, Trp45 und Trp54 sowie Pro48 und die zugehörigen Analoga Hpg, (4-Aza)Trp bzw. (4S-F)Pro dargestellt.

Um bioorthogonale Chemie und intrinsische Fluoreszenz kombinieren zu können, ist es erforderlich (4-Aza)Trp und Hpg simultan in  $\psi$ -b\* einzubauen. Problematisch dabei ist jedoch, dass dieses spezielle Trp-Analogon hydrophiler ist als Trp selbst, sodass erwartet werden kann, dass dessen Einbau in das Proteininnere zu einer Reduzierung der Proteinstabilität führt, wie es bereits im Falle von Aminotryptophanen beobachtet wurde.<sup>[28]</sup> Zur Kompensation dieses Verlustes an Proteinstabilität wurde daher eine dritte synthetische Aminosäure in  $\psi$ -b\* eingebaut. Für das Prolin-Analogon *cis*-4-Fluorprolin (4S-F)Pro wurde bereits gezeigt, dass es einen thermodynamisch stabilisierenden Einfluss auf  $\psi$ -b\* hat.<sup>[29]</sup> Die verbesserte thermische Stabilität wurde der Erhöhung der konformativen Stabilität durch die 4S-Fluorierung zugeschrieben, die die C'-endo-Puckerkonformation von (4S-F)Pro in der  $\psi$ -b\*-Struktur stabilisiert.<sup>[30]</sup> Die rationale Anwendung solcher stereoelektronischen Effekte ermöglichte uns bereits eine wesentliche Verbesserung der Faltungseigenschaften des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) durch den Einbau von (4S-F)Pro.<sup>[7]</sup>

Der polyauxotrophe *Escherichia coli*-Stamm JE 7345 (*ileS*, *ara*, *proC*, *galK*, *trp*, *his*, *argG*, *xyl*, *mtl*, *meta* oder *B*; National BioResource Project, Japan) wurde für den Dopeleinbau verwendet und der Stamm JE 5630 (*dacA1191*, *dacB12*, *metA* oder *B*, *thi*, *ile*, *mtl*, *xyl*, *str*, *his*, *trp*, *gal*, *tsx*, *proC*, *lacY*; National BioResource Project, Japan) für den Dreifacheinbau. Für die Expression der rekombinanten Proteine wurden die Zellen mit dem Ampicillinresistenz vermittelnden Plasmid pQE-80L transformiert (Qiagen, Hilden, Deutschland). Dieses enthielt außerdem das Gen für  $\psi$ -b\* unter der Kontrolle eines T5-Promotors. Die transformierten Zellen wurden in neuem Minimalmedium (New Minimal Medium; NMM)<sup>[31]</sup> mit  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  Ampicillin,  $4 \mu\text{M}$  Trp und  $30 \mu\text{M}$  Met als kanonischen Aminosäuresubstraten für den Dopeleinbau und mit  $6 \mu\text{M}$  Trp,  $35 \mu\text{M}$  Met und  $58 \mu\text{M}$  Pro für den Dreifacheinbau bei  $37^\circ\text{C}$  und 220 Upm (Umdrehungen pro Minute) bis zum vollständigen Verbrauch von Met, Trp und Pro angezüchtet. Definierte Konzentrationen dieser kanonischen Aminosäuren ermöglichen die Produktion von Zell-

masse bis zu einem  $\text{OD}_{600}$ -Wert von 0.6–0.8. Für den Dopeleinbau wurde die Zellsuspension anschließend mit 100 mg D,L-Hpg und 100 mg vorbehandeltem 4-Azaindol in 1 L NMM versetzt, gefolgt von einer Zugabe von 1 mM Isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosid (IPTG) nach 30 min, um die Expression des Zielproteins zu induzieren. Für den Dreifacheinbau wurde die Zellsuspension zusätzlich mit 100 mg (4S-F)Pro pro Liter NMM versetzt. Die Proteinexpression wurde 6 h bei  $27^\circ\text{C}$  und 220 Upm durchgeführt und überprüft, indem 0.3  $\text{OD}_{600}$  des Zelllysats auf ein 20-proz. SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen wurden. Fluoreszierende Banden bei etwa 10 kDa waren deutlich auf den ungefärbten Gelen unter UV-Licht sichtbar und damit ein erster qualitativer Hinweis auf den erfolgreichen Einbau von (4-Aza)Trp in  $\psi$ -b\* (Abbildung 2A). Erwartungsgemäß stimmten die UV-Banden mit denen von  $\psi$ -b\* nach der Coomassie-Färbung überein.



**Abbildung 2.** Expressionsgel und Massenspektren von Wildtyp- $\psi$ -b\* und seinen Varianten. A) Zelllysate nach Coomassie-Färbung (oben) und unter UV-Licht (unten); die Pfeile kennzeichnen das Molekulargewicht von etwa 10 kDa. M: Molekulargewichtsstandard, ni: nichtinduziertes Zelllysat, 1:  $\psi$ -b\* (Wildtyp-Protein), 2:  $\psi$ -b\*[Hpg]/[(4-Aza)Trp], 3:  $\psi$ -b\*[Hpg]/[(4S-F)Pro], 4:  $\psi$ -b\*[Hpg]/[(4-Aza)Trp]/[(4S-F)Pro] (dreifach funktionalisiertes  $\psi$ -b\*). Die fluoreszierenden Banden von (4-Aza)Trp enthaltendem  $\psi$ -b\* sind leicht detektierbar (Banden bei 2 und 4 im unteren Bild). B) Die Massenspektren belegen eine gute Übereinstimmung von berechneten und gemessenen Massen und damit den quantitativen Einbau. Die berechneten Massen sind 10252.6 für das Wildtyp-Protein (1), 10233.6 für das doppelt funktionalisierte, fluoreszierende  $\psi$ -b\*[Hpg]/[(4-Aza)Trp] (2), 10248.3 für das doppelt funktionalisierte, nichtfluoreszierende  $\psi$ -b\*[Hpg]/[(4S-F)Pro] (3) und 10251.5 Da für das dreifach funktionalisierte, fluoreszierende  $\psi$ -b\*[Hpg]/[(4-Aza)Trp]/[(4S-F)Pro] (4). Die kleineren Nebenpeaks (ca. + 22 Da) stammen vermutlich von Natriumaddukten.

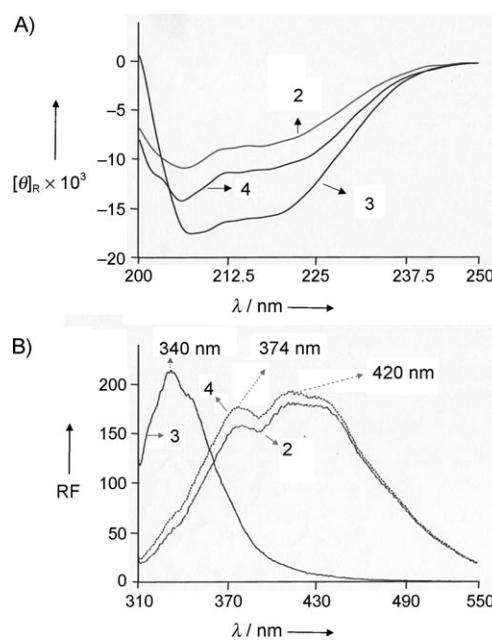
$\psi$ -b\* und dessen Varianten wurden in Einschlusskörpern exprimiert und anschließend wie bereits beschrieben gereinigt und rückgefaltet.<sup>[28]</sup> Die ersten Experimente ergaben interessanterweise eine unvollständige Deformylierung des N-terminalen Formyl-Hpg-Rests<sup>[32]</sup> sowohl beim Doppel- als auch beim Dreifacheinbau. Um möglichst homogene Proteinfractionen zu erhalten, wurde das Expressionsprotokoll optimiert und ein Medienwechsel eingeführt. Dabei wurden die Zellen zunächst im Luria-Bertani(LB)-Medium bis zu  $\text{OD}_{600} \approx 0.5$  angezüchtet, abzentrifugiert, gewaschen und dann in 0.5 L NMM resuspendiert. Nach ungefähr 30 min Inkubation ohne kanonische Aminosäuren wurden die Aminosäureanaloga und das IPTG wie oben angegeben zur Sus-

pension gegeben. In früheren Studien haben wir bereits gezeigt, dass  $\psi\text{-b}^*[\text{Hpg}]$  mit einer Proteinausbeute von rund  $8 \text{ mg L}^{-1}$  exprimiert wird.<sup>[22]</sup> Der gleichzeitige Einbau von (4-Aza)Trp reduzierte die Ausbeute um etwa 50%; es wurden ca.  $3.8 \text{ mg L}^{-1}$   $\psi\text{-b}^*[\text{Hpg}]/[(4\text{-Aza})\text{Trp}]$  erhalten. Erwartungsgemäß erhöhte sich die Ausbeute beim Doppelteinbau von Hpg und (4S-F)Pro, und es wurden  $10.8 \text{ mg L}^{-1}$   $\psi\text{-b}^*[\text{Hpg}]/[(4\text{-S-F})\text{Pro}]$  gebildet. Auch der zusätzliche Einbau von (4S-F)Pro beim Dreifacheinbau hatte eine wesentliche Erhöhung der Proteinausbeute zur Folge: Es entstanden rund  $5 \text{ mg L}^{-1}$   $\psi\text{-b}^*[\text{Hpg}]/[(4\text{-Aza})\text{Trp}]/[(4\text{-S-F})\text{Pro}]$ .

Die gereinigten Proteine wurden bei  $+4^\circ\text{C}$  in  $50 \text{ mM}$  Natriumphosphatpuffer (pH 7.4) gelagert und auf ihre Reinheit und Homogenität mittels SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (siehe Hintergrundinformationen) und ESI-Massenspektrometrie (Abbildung 2B) überprüft. Neben der hohen Homogenität der Proben bestätigten die ESI-MS-Spektren, dass in allen untersuchten Proteinen (und für alle Kombinationen an synthetischen Aminosäuren) die kanonischen Aminosäuren quantitativ durch die synthetischen Aminosäuren ersetzt wurden. Darüber hinaus wurde ein hoher Grad an Met  $\rightarrow$  Hpg-Substitution (mindestens 95%) an der Sequenzposition 1 per N-terminaler Sequenzierung bestätigt (siehe Hintergrundinformationen). Den abschließenden Beweis für einen hohen Einbaugrad an allen Positionen der Sequenz brachte der enzymatische Verdau (Glu-C) von allen substituierten Proteinen und die anschließende Orbitrap-MS-Analyse (siehe Hintergrundinformationen).

Im Anschluss an die Massenspektrometrie wurden die Proteinpräparationen spektroskopisch analysiert (Abbildung 3). Die Substitutionen Met1  $\rightarrow$  Hpg1 und Pro48  $\rightarrow$  (4S-F)Pro48 hatten erwartungsgemäß keinen Einfluss auf die UV-Absorption ( $\lambda_{\text{max,UV}} = 280 \text{ nm}$ ; siehe Hintergrundinformationen) und die Fluoreszenzspektren der Proteinvarianten ( $\lambda_{\text{max,em}} = 340 \text{ nm}$ ). Im Gegensatz dazu führte der Ersatz aller drei Trp-Reste in  $\psi\text{-b}^*$  durch (4-Aza)Trp zu deutlich veränderten UV- und Fluoreszenzprofilen wie Abbildung 3B zu entnehmen ist. Sowohl die UV-Absorption ( $\lambda_{\text{max,UV}} = 288 \text{ nm}$ ) als auch das Fluoreszenzmaximum ( $\lambda_{\text{max,em}} = 420 \text{ nm}$ ) waren stark rotverschoben. (4-Aza)Trp in  $\psi\text{-b}^*$  führt zu einer einzigartigen blauen Fluoreszenz, die für spektroskopische Studien in biologischen Systemen geeignet ist.

Die Analyse der Sekundärstruktur der (4-Aza)Trp enthaltenden  $\psi\text{-b}^*$ -Varianten ergab allerdings eine reduzierte strukturelle Stabilität (Abbildung 3A): Das Fern-UV-CD-Spektrum von  $\psi\text{-b}^*[\text{Hpg}]/[(4\text{-S-F})\text{Pro}]$  (3) bei  $20^\circ\text{C}$  in PBS ist identisch zu dem von  $\psi\text{-b}^*$  (nicht gezeigt). Das CD-Profil weist zwei Minima bei 222 und 208 nm auf, die typisch für überwiegend  $\alpha$ -helicale Proteine sind. Die CD-Eigenschaften von  $\psi\text{-b}^*[\text{Hpg}]/[(4\text{-Aza})\text{Trp}]$  dagegen sind signifikant anders (Kurve 2). Die Verschiebung des Minimums zu 205 nm und der deutliche Abfall der Bandenintensitäten bei den Wellenlängen 222 und 208 nm deuten auf einen Verlust an geordneter Proteinstruktur und eine Reduktion des  $\alpha$ -helicalen Anteils in der gesamten Sekundärstruktur des Proteins hin. Das Spektrum der dreifach substituierten, (4-Aza)Trp enthaltenden  $\psi\text{-b}^*$ -Variante wiederum zeigt um etwa 20% intensivere Minima (Kurve 4), was für eine Stabilisierung der Struktur durch (4S-F)Pro.



**Abbildung 3.** A) CD- und B) Fluoreszenzspektren der doppelt und dreifach substituierten  $\psi\text{-b}^*$ -Varianten; Nummerierung der Proteinvarianten wie in Abbildung 2. Beachtenswert ist vor allem die starke Rotverschiebung (80 nm) im Fluoreszenzemissionsspektrum der (4-Aza)Trp enthaltenden Proteinspezies ( $\lambda_{\text{max,em}}(2,4) = 420 \text{ nm}$ ) im Gegensatz zum Spektrum des Wildtyp-Proteins (nicht gezeigt) und  $\psi\text{-b}^*[\text{Hpg}]/[(4\text{-S-F})\text{Pro}]$  ( $\lambda_{\text{max,em}}(3) = 340 \text{ nm}$ ). Die Schulter bei 374 nm ist auf (4-Aza)Trp53 zurückzuführen, das im hydrophoben Innern des Proteins verborgen ist. Die Fern-UV-CD-Spektren (200–260 nm) wurden bei  $20^\circ\text{C}$  aufgenommen; die mittlere Elliptizität pro Aminosäurerest ( $[\theta]_R$ ) ist in  $\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$  angegeben; RF: relative Fluoreszenzintensität. Die Fluoreszenzspektren von  $\psi\text{-b}^*$  und seinen Varianten wurden nach Anregung bei  $295 \text{ nm}$  aufgenommen.

Kürzlich konnten wir zeigen, dass ein schwacher Circulardichroismus zwischen 210 und 225 nm in den Fern-UV-CD-Spektren von Aminotryptophan enthaltenden  $\psi\text{-b}^*$ -Proteinen eher auf die Sekundärstruktur der Proteine zurückzuführen ist als auf den intrinsischen Beitrag der Aminotryptophanreste.<sup>[28]</sup> Sehr wahrscheinlich gilt dies auch für  $\psi\text{-b}^*$  mit (4-Aza)Trp, da (4-Aza)Trp ähnliche physikochemische Eigenschaften hat wie 4-Aminotryptophan (Hydropholie, pH-Empfindlichkeit, intramolekularer Ladungstransfer).<sup>[18]</sup> Unser Modellprotein  $\psi\text{-b}^*$  enthält drei Trp-Reste: Trp53 im Innern des Proteins, Trp38, das ganz oder teilweise lösungsmittelexponiert ist, und Trp44, das direkt an der Interaktion mit Barnase beteiligt ist.<sup>[33]</sup> Aus diesem Grund überrascht es nicht, dass Proteinvarianten mit (4-Aza)Trp Barnase nicht so effizient inhibieren wie  $\psi\text{-b}^*$  und die  $\psi\text{-b}^*[\text{Hpg}]/[(4\text{-S-F})\text{Pro}]$ -Variante (siehe Hintergrundinformationen).

Generell kann gesagt werden, dass der durch (4-Aza)Trp verursachte Verlust an struktureller Stabilität durch die Co-Translation der dritten nichtkanonischen Aminosäure (4S-F)Pro in  $\psi\text{-b}^*$  zumindest teilweise kompensiert werden konnte. Dies wurde auch mit temperaturinduzierten Entfaltungsexperimenten bestätigt, bei denen die CD-Intensitäten bei 222 nm beobachtet wurden (siehe Hintergrundinformationen). Insbesondere konnten wir zeigen, dass die Gegen-

wart von (4S-F)Pro ( $\psi$ -b\*[Hpg]/[(4S-F)Pro]) den Schmelzpunkt wieder auf einen Wert ähnlich dem des Wildtyp-Proteins angehoben hat ( $T_m = 64.6$  gegenüber  $66.3^\circ\text{C}$ ). Das thermische Entfalten der (4-Aza)Trp enthaltenden  $\psi$ -b\*-Varianten führte oberhalb von  $85^\circ\text{C}$  allerdings zur Aggregation, sodass keine thermodynamischen Parameter ermittelt, sondern lediglich  $T_m$ -Werte verglichen werden konnten. In  $\psi$ -b\* ist Trp53 vollkommen im Innern des hydrophoben Proteinkerns verborgen und dort essenziell für die Faltung und die Stabilität des gesamten Proteins. Aus diesem Grund wurde erwartet, dass der Austausch Trp53 → (4-Aza)Trp53 die Hydrophilie im Proteinkern erhöht und dadurch die gesamte Struktur destabilisiert. Tatsächlich ist der  $T_m$ -Wert ( $42^\circ\text{C}$ ) von  $\psi$ -b\*[Hpg]/[(4-Aza)Trp] um etwa  $20^\circ\text{C}$  niedriger (siehe Hintergrundinformationen). Erwartungsgemäß führte die Co-Translation von (4S-F)Pro wieder zu einem deutlichen Anstieg des  $T_m$ -Wertes von über  $8^\circ\text{C}$  ( $T_m = 50.6^\circ\text{C}$  bei  $\psi$ -b\*[Hpg]/[(4-Aza)Trp]/[(4S-F)Pro]). Diese Proteinvariante erwies sich außerdem als wesentlich besser lagerfähig und toleranter gegenüber den Reaktionsbedingungen der Klick-Chemie als  $\psi$ -b\*[Hpg]/[(4-Aza)Trp].

Um die Eignung des dreifach funktionalisierten Proteins für die Klick-Chemie zu zeigen, wurden CuAAC-Reaktionen mit zwei verschiedenen Liganden durchgeführt, mit einem Azidozucker (1-Azido-1-desoxy- $\beta$ -D-glucopyranosid) und mit Azido-PEG570 (Azidopolyethylenglycol, 570 Da). Die Konjugationsreaktion mit dem Azidozucker war sehr effizient und ergab das erwartete fluorierte, blau fluoreszierende Glycoprotein (Abbildung 4A). Die Klick-Reaktion mit Azido-PEG570 ergab, weniger effizient, das PEGylierte, fluorierte und blau fluoreszierende Protein (Abbildung 4B). Beide Reaktionen bestätigten, dass dreifach funktionalisiertes  $\psi$ -b\* sehr gut für bioorthogonale Transformationen geeignet ist.

Unserem Kenntnisstand nach ist dies die erste Demonstration eines erfolgreichen In-vivo-Dreifacheinbaus von synthetischen Aminosäuren in ein rekombinantes Protein. Der simultane Doppel- und Dreifachaustausch von chemisch

unterschiedlichen synthetischen Aminosäuren erlaubt die Konzentration einer Vielzahl von Schritten zur Funktionalisierung eines Proteins, die zuvor einzeln und nacheinander zu erfolgten hatten, in einem einzigen Experiment. Auf diese Weise öffnet sich der Zugang zu einer Reihe unterschiedlichster Anwendungen für ein einzelnes Protein (Visualisierung, bioorthogonale Transformationen, Fluorierung etc.). Diese multiple In-vivo-Funktionalisierung erweitert die Möglichkeiten der Verwendung synthetischer Aminosäuren für individuelle Proteinmodifizierungen auf dem Gebiet des Protein-Engineerings und der Biotechnologie enorm. Künftig wird die flexible und anwendungsorientierte multiple In-vivo-Funktionalisierung als einfache durchzuführendes und effizientes Werkzeug die speziellen Anforderungen der akademischen Forschung wie auch der industriellen Anwendung erfüllen und zufriedenstellen.

## Experimentelles

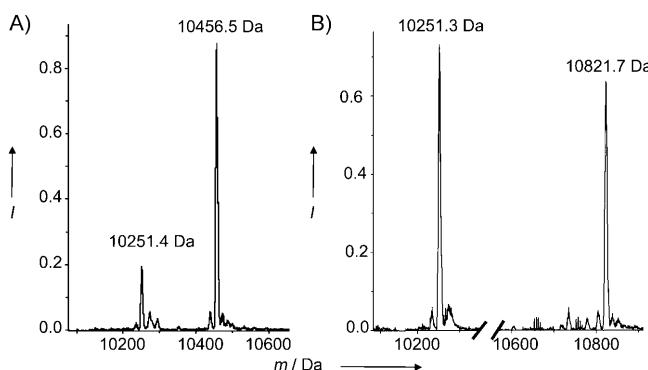
Expression und Fermentation: Der *Escherichia coli*-Stamm JE 7345 mit einer stabilen Auxotrophie für Met und Trp wurde als optimaler Expressionswirt für den Doppelteinbau identifiziert. Dafür wurden die Zellen über Nacht bei  $37^\circ\text{C}$  in NMM<sup>[5]</sup> mit definierten Konzentrationen von Trp und Met angezüchtet.  $4\text{ }\mu\text{M}$  L-Trp und  $30\text{ }\mu\text{M}$  L-Met wurden dabei als optimale limitierende Konzentrationen für ein Zellwachstum bis zu einem  $\text{OD}_{600}$ -Wert zwischen 0.6 und 0.8 ermittelt. Der *Escherichia coli*-Stamm JE 5630 wurde als optimaler Expressionswirt für den Dreifacheinbau identifiziert. Kalibrierung und Optimierung der Fermentations- und Expressionsbedingungen für den Dreifacheinbau waren identisch zu denen des Doppelteinbaus (siehe oben). Konzentrationen von  $6\text{ }\mu\text{M}$  L-Trp,  $35\text{ }\mu\text{M}$  L-Met und  $58\text{ }\mu\text{M}$  L-Pro führten zu einem kontinuierlichen Zellwachstum bis zum vollständigen Verbrauch der kanonischen Aminosäuren bei einer Zeldichte zwischen  $\text{OD}_{600}$  0.6 und 0.8.

CuAAC-Reaktionen:  $1\text{ mg mL}^{-1}$  der Hpg enthaltenden  $\psi$ -b\*-Varianten (in  $50\text{ mM}$  Natriumphosphatpuffer, pH 7.4) wurden 18 h bei Raumtemperatur mit  $3.75\text{ mM}$   $\text{CuSO}_4$ ,  $3.75\text{ mM}$  Ascorbinsäure,  $200\text{ mM}$  Natriumphosphatpuffer (pH 7.4) und den benötigten Mengen des entsprechenden Azidliganden (1-Azido-1-desoxy- $\beta$ -D-glucopyranosid:  $2.5\text{ mg mL}^{-1}$ ; Azido-PEG570:  $5\text{ mg mL}^{-1}$ ; Reaktionsvolumen  $200\text{ }\mu\text{L}$ ) inkubiert.

Weitere Methoden und Experimente: UV-, Fluoreszenz-, CD- und massenspektrometrische Messungen sowie weitere Experimente sind in den Hintergrundinformationen beschrieben.

Eingegangen am 25. Januar 2010,  
veränderte Fassung am 7. Mai 2010  
Online veröffentlicht am 23. Juni 2010

**Stichwörter:** Aminosäureanaloga · genetischer Code · Methionin · Prolin · Tryptophan



**Abbildung 4.** Massenspektrometrische Analyse der Produkte von Klick-Reaktionen des dreifach funktionalisierten Proteins (10251 Da). A) Die Glykonjugationsreaktion mit 1-Azido-1-desoxy- $\beta$ -D-glucopyranosid resultierte hoch effizient (ca. 80%) in blau fluoreszierendem  $\psi$ -b\*[Hpg]/[(4-Aza)Trp]/[(4S-F)Pro]{triazol}Zucker ( $m_{\text{ber.}} = 10456.6$  Da). B) Die PEGylierungsreaktion lieferte – etwas weniger effizient (ca. 45–50%) – blau fluoreszierendes  $\psi$ -b\*[Hpg]/[(4-Aza)Trp]/[(4S-F)Pro]{triazol}PEG570 ( $m_{\text{ber.}} = 10821.6$  Da).

- [1] N. Budisa, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 6586; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 6426.
- [2] A. J. Link, M. L. Mock, D. A. Tirrell, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, *14*, 603.
- [3] N. Budisa, C. Minks, S. Alefelder, W. Wenger, F. M. Dong, L. Moroder, R. Huber, *FASEB J.* **1999**, *13*, 41.
- [4] A. J. Link, D. A. Tirrell, *Methods* **2005**, *36*, 291.
- [5] C. Minks, S. Alefelder, L. Moroder, R. Huber, N. Budisa, *Tetrahedron* **2000**, *56*, 9431.
- [6] L. Moroder, N. Budisa, *ChemPhysChem* **2010**, *11*, 1181.

- [7] T. Steiner, P. Hess, J. H. Bae, B. Wiltschi, L. Moroder, N. Budisa, *PLoS ONE* **2008**, 3, e1680.
- [8] C. Wolschner, A. Giese, H. A. Kretzschmar, R. Huber, L. Moroder, N. Budisa, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, 106, 7756.
- [9] H. Neumann, K. Wang, L. Davis, M. Garcia-Alai, J. W. Chin, *Nature* **2010**, DOI: 10.1038/nature08817.
- [10] H. Neumann, A. L. Slusarczyk, J. W. Chin, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 2142.
- [11] R. E. Doerig, B. Suter, M. Gray, E. Kubli, *EMBO J.* **1988**, 7, 2579–2584.
- [12] T. S. Young, I. Ahmad, J. A. Yin, P. G. Schultz, *J. Mol. Biol.* **2010**, 395, 361.
- [13] A. K. Antonczak, Z. Simova, E. M. Tippmann, *J. Biol. Chem.* **2009**, 284, 28795.
- [14] W. Wan, Y. Huang, Z. Wang, W. K. Russell, P.-J. Pai, D. R. Russell, W. Liu, *Angew. Chem.* **2010**, 122, 3279; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2010**, 49, 3211.
- [15] E. A. Rodriguez, H. A. Lester, D. A. Dougherty, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, 103, 8650.
- [16] T. W. Muir, J. N. Abelson (Eds.), *Methods Enzymol.* **2009**, 462.
- [17] B. Nolting, R. Golbik, A. R. Fersht, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, 92, 10668.
- [18] L. Merkel, M. G. Hoesl, M. Albrecht, A. Schmidt, N. Budisa, *ChemBioChem* **2010**, 11, 305.
- [19] N. Budisa, M. Rubini, J. H. Bae, E. Weyher, W. Wenger, R. Golbik, R. Huber, L. Moroder, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 4238; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 4066.
- [20] P. C. Cirino, Y. Tang, K. Takahashi, D. A. Tirrell, F. H. Arnold, *Biotechnol. Bioeng.* **2003**, 83, 729.
- [21] J. H. Bae, M. Rubini, G. Jung, G. Wiegand, M. H. J. Seifert, M. K. Azim, J.-S. Kim, A. Zumbusch, T. A. Holak, L. Moroder, R. Huber, N. Budisa, *J. Mol. Biol.* **2003**, 328, 1071.
- [22] S. L. Dong, L. Merkel, L. Moroder, N. Budisa, *J. Pept. Sci.* **2008**, 14, 1148.
- [23] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 2708; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 2596.
- [24] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 3057.
- [25] S. L. Dong, L. Moroder, N. Budisa, *ChemBioChem* **2009**, 10, 1149.
- [26] L. Merkel, H. S. G. Beckmann, V. Wittmann, N. Budisa, *ChemBioChem* **2008**, 9, 1220.
- [27] S. Leptien, M. G. Hoesl, L. Merkel, N. Budisa, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, 105, 16095.
- [28] M. Rubini, S. Leptien, R. Golbik, N. Budisa, *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteomics* **2006**, 1764, 1147.
- [29] C. Renner, S. Alefelder, J. H. Bae, N. Budisa, R. Huber, L. Moroder, *Angew. Chem.* **2001**, 113, 949; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 923.
- [30] M. D. Shoulders, K. A. Satyshur, K. T. Forest, R. T. Raines, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, 107, 559.
- [31] N. Budisa, P. P. Pal, *Biol. Chem.* **2004**, 385, 893.
- [32] J. Z. Tang, G. Hernandez, D. M. LeMaster, *Protein Expression Purif.* **2004**, 36, 100.
- [33] R. W. Hartley, *Methods Enzymol.* **2001**, 341, 599.