

Bilden und Brechen von Peptidbindungen: Protein-Engineering mithilfe von Sortase

Maximilian Wei-Lin Popp und Hidde L. Ploegh*

Protein-Engineering · Proteinmodifikationen ·
Sortasen · Ortsspezifität · Transpeptidierung

Sortasen gehören zu einer Klasse bakterieller Enzyme, die Transpeptidaseaktivität aufweisen. Die Fähigkeit, Peptidbindungen ortspezifisch zu brechen und neue Bindungen mit einem angreifenden Nukleophil zu bilden, macht Sortase zu einem hervorragenden Hilfsmittel für das Protein-Engineering. Diese Methode wurde für eine Reihe von Anwendungen angepasst, die von der Chemie über die Zellbiologie bis hin zu technischen Gebieten reichen. Wir wollen hier einen kurzen Überblick über die Biologie der Sortaseenzyme und ihre Anwendungen im Protein-Engineering geben, auf Gebiete für zukünftige Innovationen hinweisen und neue Anwendungen vorschlagen.

1. Biologische Funktion und Biochemie von Sortase A (SrtA)

Viele Gram-positive Bakterien haben Virulenzfaktoren in ihrer Zellwand, die eine erfolgreiche Kolonisierung und Pathogenese ermöglichen.^[1] Sortaseenzyme sind eine Klasse von Transpeptidasen, die Thiolgruppen enthalten, und haben die Fähigkeit, Proteine in der bakteriellen Zellwand zu verankern.^[2-4] Diese Enzyme erkennen Substratproteine, die ein „Sortierungsmotiv“ (LPXTG im Fall von *Staphylococcus aureus*) enthalten, und tragen einen katalytischen Cysteinrest, um die Peptidbindung zwischen Threonin und Glycin in diesem Pentapeptid zu spalten.^[5-7] Andere Sortasen verschiedener Bakterienspezies nutzen die gleiche oder eine ähnliche Erkennungssequenz.^[8-10] Datensammlungen für Sortase und ihre Substrate sind im Internet zu finden.^[11,12] Die von der Sortase katalysierte Reaktion führt zuerst zu einer Thioacylzwischenstufe,^[13,14] analog dem Mechanismus von Cysteinproteasen. Wo Cysteinproteasen jedoch Wasser zur Hydrolyse der Zwischenstufe nutzen, akzeptiert Sortase den N-Terminus eines Oligoglycinnukleophils zur Bildung einer neuen Peptidbindung (Abbildung 1). Bei der natürlichen

Sortierungsreaktion bindet die Pentaglycinbrücke in der Lipid-II-Zellwandvorstufe das Acylenzym als Nukleophil.^[15] Die Zellwandvorstufe mit ihrem kovalent gebundenen Protein wird anschließend in die wachsende Peptidoglycanschicht eingebaut.

Zusätzlich zur Verankerung von Virulenzfaktoren in der Zellwand bauen Sortasen auch die Pilusstruktur auf, die von vielen Bakterien genutzt wird, um sich an der Wirtzelle zu verankern und einen Biofilm zu bilden.^[16-19] Die Details dieses Prozesses unterscheiden sich zwar für verschiedene Bakterienarten,^[20-24] aber im Allgemeinen verknüpfen Sortasen Pilinmonomere, die sowohl ein Sortierungssignal als auch eine nukleophile Lysin-ε-Aminogruppe in einem internen Erkennungsmotiv enthalten.^[25] Diese Protein-Protein-Verknüpfung führt zu einer Polymerisation der Pilinmonomere, vermittelt jedoch nicht die Verankerung an der Zellwand. Die Verankerung wird vielmehr von der „Housekeeping“-Sortase ausgeführt, die das Lipid-II-Vorstufennukleophil aufnimmt.^[26]

Wegen ihrer zentralen Bedeutung für die Virulenz gelten Sortasen als vielversprechendes Angriffsziel für Wirkstoffe.^[27-31] Rekombinante Sortase, der die Transmembrandomäne fehlt, kann einfach und in hoher Ausbeute hergestellt werden.^[6,32,33] Eine detaillierte Vorschrift für die Sortaseherstellung, beschrieben in Lit. [34], hat ausführliche strukturelle^[35-38] und biochemische Untersuchungen^[39-41] des Enzyms ermöglicht. Die Struktur der Sortase A von *S. aureus* besteht aus einer achtsträngigen β-Barrel-Faltstruktur (genannt Sortasefaltstruktur) mit einer hydrophoben Spalte, die von den β7- und β8-Strängen gebildet wird. Diese Spalte ist von

[*] M. W.-L. Popp, Prof. Dr. H. L. Ploegh
Whitehead Institute for Biomedical Research
9 Cambridge Center, Cambridge, MA 02142 (USA)
und
Department of Biology, Massachusetts Institute of Technology
77 Massachusetts Avenue, Cambridge, MA 02142 (USA)
E-Mail: ploegh@wi.mit.edu

C-terminale Markierung

N-terminale Markierung

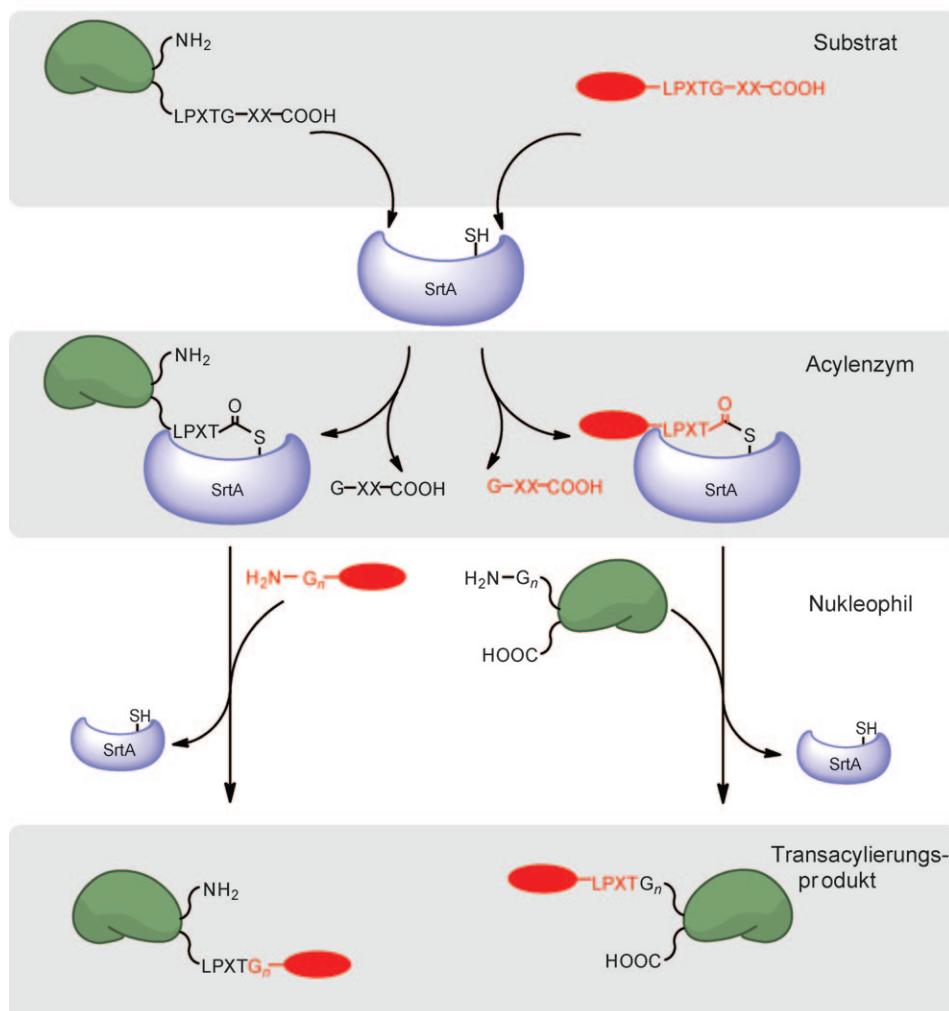


Abbildung 1. Ortsspezifische C- und N-terminale Markierung unter Verwendung von Sortase A. C-terminale (links) und N-terminale Markierung (rechts) erfolgen durch einen Substraterkennungsschritt (oben), gefolgt von der Bildung eines Thioacylintermediats (Mitte) und der Auflösung des acylierten Enzyms durch ein exogen zugeführtes Nukleophil (unten). Siehe Text für Details.

β 3- β 4-, β 2- β 3-, β 6- β 7- und β 7- β 8-Strängen umgeben (Abbildung 2). Die Falte enthält den katalytischen Cysteinrest (Cys184) und die Substratbindestelle. Ein zusätzliches Strukturmerkmal des Enzyms von *S. aureus* ist eine Binde-

stelle für Calcium, die von der β 3/ β 4-Schleife gebildet wird. Das Calciumion, das an dieser Stelle bindet, wird von einem Rest in der β 6/ β 7-Schleife koordiniert. Dadurch vermindert sich die Bewegungsfreiheit der β 6/ β 7-Schleife, was dem



Hidde Ploegh erhielt seinen BSc 1975 von der Universität Groningen und promovierte 1981 an der Universität Leiden (Niederlande) über seine Arbeiten im Labor von Jack Strominger (Harvard University, USA). Ab 1980 war er Laborleiter in Köln. Nach dieser Zeit arbeitete er am Netherlands Cancer Institute (1984–1992), am MIT (1992–1997) und an der Harvard Medical School (1997–2005), bevor er zu seinem jetzigen Standort am Whitehead Institute/MIT wechselte. Er beschäftigt sich zurzeit mit dem Immunsystem und der Entwicklung chemischer Hilfsmittel zu seiner Erforschung.



Max Popp erhielt seinen BSc in Biologie und seinen BA in Chemie von der University of Rochester (2005). Er ist zurzeit Doktorand am MIT im Labor von Hidde Ploegh, wo er daran arbeitet, die Methode der Sortase-vermittelten Proteinmodifizierung weiterzuentwickeln.

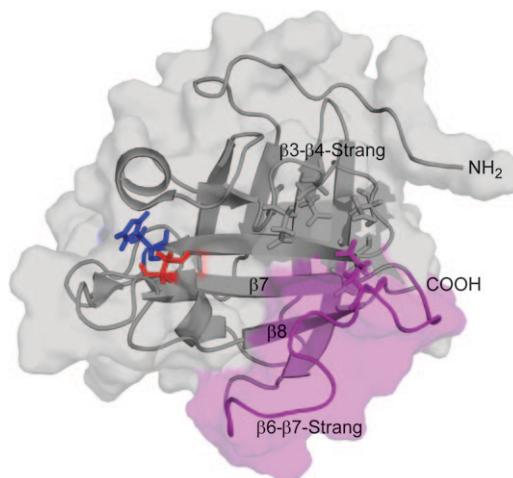


Abbildung 2. NMR-spektroskopisch ermittelte Struktur der Sortase A von *Staphylococcus aureus* (PDB-Code: 1IJA).^[36] Der aktive Cysteinrest (Cys184) ist rot und der aktive Histidinrest (His120) blau dargestellt. Die β 7- und β 8-Stränge, die die Unterseite des aktiven Zentrums bilden, sind angegeben, und der β 6- β 7-Strang, der an der Substraterkennung beteiligt ist,^[93] ist violett markiert. Calcium koordinierende Reste sind als Stabmodelle dargestellt.^[42]

Substrat die Bindung ermöglicht. Die Aktivität wird so um einen Faktor 8 erhöht.^[42] Zu den biochemischen Merkmalen des aktiven Zentrums zählt ein wichtiger Histidinrest (H120), der ein Thiolat-Imidazolium-Ionenpaar mit dem katalytischen Cysteinrest bildet.^[43] Für die Katalyse muss die deprotonierte Form des Cysteinrestes vorliegen. Bei einem physiologischen pH-Wert befindet sich diese jedoch im Gleichgewicht mit der neutralen Form, weshalb immer nur ein kleiner Teil (ca. 0.6 %) des gesamten Enzyms zu einer gegebenen Zeit wirksam sein kann.^[44,45] Der Cysteinrest greift die Peptidbindung zwischen dem Threonin- und Glycinrest im Sortierungsmotiv an. Das protonierte Imidazoliumion wirkt in allgemeiner Weise als Säure für die freigesetzte Glycin- α -NH₂-Gruppe und führt zur Bildung einer acylierten Form der Sortase. Das an kommende Glycinnukleophil wird dann deprotoniert, greift den Thioester an und bildet erneut eine Peptidbindung. Wenn stattdessen Wasser die Acylenzymzwischenstufe angreift, führt diese Reaktion irreversibel zu einem Hydrolyseprodukt.^[46]

2. Engineering bakterieller Oberflächen

Das Sortasesystem zur Verankerung von Proteinen in der Zellwand Gram-positiver Bakterien wurde zuerst dazu verwendet, Mikroben mit heterologen Proteinen zu versehen. Solche Experimente erfordern eine genetische Fusion des heterologen Proteins mit dem Sortierungsmotiv. Das heterologe Protein wird dann exprimiert und über den normalen Zellwandsortierungsweg auf die Oberfläche gebracht. Auf diese Weise gelang die Fixierung alkalischer Phosphatase in der Zellwand von *Staphylococcus aureus*,^[47] des E7-Proteins von humanem Papillomvirus 16 (HPV16) auf *Streptococcus gordonii*, einer konsensalen Mikroben in der Mundhöhle^[48] sowie der α -Amylase an das Peptidoglycan von *Bacillus*

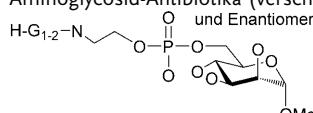
Subtilis, letzteres mithilfe einer Koexpression des Sortasegens von *Listeria monocytogenes*.^[49] Die Peptidoglycanzellwand kann durch Inkubation von sich teilenden *S. aureus* mit chemischen Sonden, die am N-Terminus des LPXTG-Peptids angehängt sind, sogar mit nichtbiologischen Bausteinen wie Fluorescein, Biotin oder Aziden markiert werden.^[50] Beim Einbau von N-terminalen Markierungssonden (siehe Abschnitt 4) wird das endogene Sortaseenzym verwendet, das die exogen zugeführten Sonden an den Pentaglycinseitenketten der Zellwand verankert.

3. C-terminale Markierung

Die Fähigkeit der Sortase zur Erkennung des Sortierungsmotivs bei dessen Einbringen in rekombinant exprimierte Proteine ermöglicht die ortsspezifische Einführung von Teilen oder funktionellen Gruppen, die genetisch nicht kodiert werden können (Abbildung 1). Diese Methode erfordert lediglich, dass das LPXTG-Motiv dem Lösungsmittel ausgesetzt ist und liefert gewöhnlich hohe Ausbeuten des gewünschten Transpeptidierungsprodukts. Mittlerweile wurden viele Proteinsubstrate mit Sonden markiert, die ein breites Spektrum an Funktionalitäten abdecken, beispielsweise Biotin, Fluorophore, Vernetzungssagentien und multifunktionelle Sonden (Tabellen 1 und 2).^[34] Das Markieren rekombinanter Proteine mit Sortase A erfordert keine hochentwickelte Synthesechemie; die meisten Sonden sind durch gewöhnliche Peptidsynthesen und mit leicht erhältlichen Reagentien zugänglich. In der Regel werden die Produktion und Faltung der rekombinanten Substratproteine nicht durch die Gegenwart der kleinen LPXTG-Markierung beeinträchtigt. Da alle Transformationen durch die Verwendung von Sortase unter physiologischen Pufferbedingungen (pH-Wert, Ionenstärke und -bedingungen) an Substraten durchgeführt werden, deren richtige Faltung und Aktivität vor der Reaktion verifiziert werden können, wird fast nie ein Verlust an biologischer Aktivität beim Endprodukt beobachtet. Die Fähigkeit, eine Sortase-katalysierte Transacylierung einzugehen, scheint allein durch die Zugänglichkeit und Flexibilität des Sortierungsmotivs bestimmt zu werden. Auf Inteinen beruhende Methoden des Protein-Engineerings erfordern üblicherweise, dass sich Substrate zuerst falten, während sie noch mit einer Inteindomäne fusioniert sind, die die Größe eines Proteins hat, was zu Löslichkeitsproblemen führen kann.^[51]

Der Nutzen der Sortasemarkierungsmethode beruht auf der Tatsache, dass das Enzym Substrate toleriert, die in ihrer Struktur und Sequenz vor der Spaltstelle sehr unterschiedlich sein können. Diese Eigenschaft ist nicht unerwartet, wenn man bedenkt, dass Sortase fähig ist, eine große Bandbreite an Proteinsubstraten an der Zellwand zu verankern. Das Substrat muss nicht einmal ein Protein sein – Peptidnukleinsäuren (PNAs), die mit dem Sortaseerkennungsmotiv verbunden sind, können an einem Peptid, das ein Glycin trägt und zellgängig ist (amphipathisches Modellpeptid, MAP), angebracht werden, was zu aktiven, zellpenetrierenden Antisense-PNA-Peptid-Konjugaten führt.^[52] Auch scheint die Identität der Substituenten in C-terminaler Position zum Glycinnukleophil

Tabelle 1: Beispiele für synthetische Nukleophile zur ortsspezifischen Sortase-A-Transpeptidierung.

Nr.	Sonde	Markierungsart	hinzugefügte Eigenschaft	Lit.
1	H-G ₃ K(Biotin)L-OH	C-terminal	biophysikalischer Griff	[32, 55]
2	H-G ₃ K(ANP)K(Biotin)L-OH	C-terminal	biophysikalischer Griff/Photospaltung	[32]
3	H-G ₃ K(Phenylazid)K(Biotin)G-OH	C-terminal	biophysikalischer Griff/Photovernetzer	[32]
4	H-G ₃ K(FITC)-NH ₂	C-terminal	Fluoreszenz	[32]
5	H-G ₃ K(K(TAMRA))-NH ₂	C-terminal	Fluoreszenz	[32, 71]
6	H-G ₃ YC(Biotin)-NH ₂	C-terminal	biophysikalischer Griff	[33]
7	H-G ₃ YC(Alexa 488)-NH ₂	C-terminal	Fluoreszenz	[33]
8	H-AA-Ahx-K(K(TAMRA))-NH ₂	C-terminal (<i>S. pyogenes</i>)	Fluoreszenz	[56]
9	H-G ₃ K(C12-C24)-NH ₂	C-terminal	Lipidierung	[64]
10	H-G ₃ K(1-Ad)-NH ₂ ^[a]	C-terminal	Hydrophobie	[64]
11	H-G ₃ WK(Cholesterol)-NH ₂	C-terminal	Lipidierung	[64]
12	D-Tat (1. Rest ist G)	C-terminal	Zellpenetration	[53]
13	H-G ₃ Y-PTD5-NH ₂	C-terminal	Zellpenetration	[53]
14	(H ₂ NRRQRRTSKLMKRAhx) ₂ KYK(GG-NH ₂)-NH ₂	C-terminal	Zellpenetration	[53]
15	H-G ₃ K(Folat)-NH ₂	C-terminal	Folsäure	[53]
16	H ₂ N-PEG	C-terminal	inertes Polymer	[54]
17	H-G ₃ K(PEG)-OH	C-terminal	inertes Polymer	[54]
18	H-G ₃ -MAP-NH ₂	C-terminal	Zellpenetration	[52]
19	Aminoglycosid-Antibiotika (verschiedene)	C-terminal	Antibiotika	[60]
20		C-terminal	GPI-Mimetikum	[61]
21	GPI-Mimetika auf Basis von 19 mit Trisaccharidkernen	C-terminal	GPI-Mimetikum	[62, 63]
22	Biotin-PEG-YLPETGG-NH ₂	N-terminal	biophysikalischer Griff	[57]
23	Alexa 647-LPETGG-NH ₂	N-terminal	Fluoreszenz	[57]
24	Alexa 488-LPETGG-NH ₂	N-terminal	Fluoreszenz	[58]
25	Biotin-LPRT-OMe	N-terminal	biophysikalischer Griff	[56]
26	FITC-Ahx-LPRT-OMe	N-terminal	Fluoreszenz	[56]
27	FAM-LPETGG-NH ₂	N-terminal	Fluoreszenz	[50]
28	Biotin-GGLPETG-NH ₂	N-terminal	biophysikalischer Griff	[50]
29	N ₃ -ALPETG-NH ₂	N-terminal	bioorthograle Reaktionen	[50]

[a] 1-Ad = 1-Adamantyl, Ahx = Aminohexansäure, FAM = Carboxyfluorescein, FITC = Fluoresceinisothiocyanat, PEG = Polyethylenglycol, TAMRA = Carboxytetramethylrhodamin

ohne Bedeutung zu sein: D-Aminosäure enthaltende Peptide, Folate, verzweigte Proteintransduktionsdomänen^[53] und lange Polyethylenglykolketten^[54] wurden alle mithilfe von Sortase angehängt. Die Spaltstelle muss auch nicht nahe dem C-Terminus des Substratproteins sein. Eine ausreichend große Schleife, die dem Lösungsmittel zugänglich ist, genügt. Diese Eigenschaft wurde genutzt, um den Beitrag einer entscheidenden Schleife im desubiquitinierenden Enzym Ubiquitin C-Terminal Hydrolase 3 (UCHL3) zur Substratbindung und Katalyse zu studieren.^[55] Da die Bruchstelle in eine Schleife eingebaut werden kann, ist es möglich, das Proteinrückgrat zu durchtrennen, während gleichzeitig ein Reporter eingebaut wird (Biotin oder Fluorophor), um das Verhalten des unterbrochenen Enzyms in Gegenwart von intaktem Wildtypenzym zu untersuchen. Diese Eigenschaft trifft wahrscheinlich auf viele Proteine zu, die in einer Konformation mit flexiblen, exponierten Schleifen vorliegen.

Die C-terminale Markierung ist besonders nützlich, um Typ-II-Transmembranproteine in der lebenden Zellmembran von Säugetierzellen zu studieren. Der C-Terminus von Membranproteinen des Typs II ist dem extrazellulären Raum zugewandt und eignet sich deshalb besonders für Sortase-vermittelte Markierung. Proteine mit dieser Typ-II-Topologie sind besonders ungünstig für eine genetische Fusion mit fluoreszierenden Proteinen wie dem grün fluoreszierenden

Protein (GFP). Das Anbringen eines fluoreszierenden Proteins am N-Terminus verhindert gewöhnlich die kotranslationale Insertion von Membranproteinen des Typs II in das endoplasmatische Retikulum (ER), während die Markierung des C-Terminus mit GFP diesen sperrigen Substituenten nahe an die Stelle bringt, an der das untersuchte Typ-II-Transmembranprotein mit seinem Liganden wechselwirkt. Der CD40-Ligand (CD40 L), die Influenza-Neuraminidase^[52] und der Osteoclast Differentiation Factor (ODF)^[53] wurden alle auf diese Weise auf lebenden Zellen markiert.

4. N-terminale Markierung

Eine Proteinmarkierung des N-Terminus gelingt ganz einfach durch Verlagerung des Sortaseerkennungselements vom Protein zur kurzen Peptidsonde und durch Einführung einer geeigneten Zahl von Glycinen am N-Terminus des Zielproteins (Abbildung 1). Sowohl Methylestermimetika des Sortasemotivs^[56] als auch das komplette LPXTG-Sortaseerkennungsmotiv können als Gerüst für solche Sonden genutzt werden.^[57] Diese Markierungsmethode ähnelt dem Verfahren zur Markierung des C-Terminus, außer dass das Acylenzym-Intermediat zwischen der Sortase und der Peptidsonde gebildet wird und dass das markierte Protein mehr

Tabelle 2: Beispiele für Proteine, die durch Sortase-A-Transpeptidierung markiert wurden.

Substrat	in Lösung/ an der Zelloberfläche	Markierungsart	Sonde(n) ^[a]	Lit.
H-2K ^b	Lösung	C-terminal	1,2,3,4,5	[32]
CD154	Zelloberfläche	C-terminal	1,5	[32]
Neuraminidase	Zelloberfläche	C-terminal	1	[32]
ODF	Zelloberfläche	C-terminal	6,7	[33]
Cre	Lösung	C-terminal	5	[71]
UCHL3	Lösung	C-terminal (Schleife)	1	[55]
p97	Lösung	C-terminal	5	[71]
eGFP	Lösung	C-terminal	9,10,11	[64]
GFP	Lösung	C-terminal	13,14,15	[53]
PNA	Lösung	C-terminal	18	[52]
eGFP	Lösung	C-terminal	16,17	[54]
Mrp	Lösung	C-terminal	19	[60]
YALPETGK	Lösung	C-terminal	19	[60]
(His) ₆ YALPETGKS	Lösung	C-terminal	20	[61]
CD52-Peptide	Lösung	C-terminal	21	[62]
CD24	Lösung	C-terminal	21	[62]
MUC1	Lösung	C-terminal	21	[63]
LPETG ₅ -ECFP-TM	Zelloberfläche	N-terminal	22,23	[57]
LPETG ₅ -PAFR	Zelloberfläche	N-terminal	24	[58]
G ₃ /G ₃ -CTXB	Lösung	N-terminal	25,26	[56]
G ₃ -eGFP	Lösung	N-terminal	26	[56]
G-UCHL3	Lösung	N-terminal	26	[56]
S.-aureus-Oberflächen-Peptidoglycan	Zelloberfläche	N-terminal	27,28,29	[50]
eGFP	Lösung	N- und C-terminal	26 und 8	[56]
UCHL3	Lösung	N- und C-terminal	26 und 8	[56]

[a] Sondennummer gemäß Tabelle 1.

rere Glycinreste am N-Terminus enthält, dessen α -NH₂-Gruppe als Nukleophil fungieren kann. Mit dieser Strategie wurde eine Fluoreszenzsonde am N-Terminus eines Membranproteins in lebenden Säugetierzellen eingeführt, nachdem zuvor das Glycinnukleophil in geschickter Weise ebenfalls mit Sortase freigesetzt worden war.^[57] Dieses System wurde später dazu verwendet, Reporterfluorophore am N-Terminus des G-Protein-gekoppelten Platelet-Activating Factor Receptor (PAFR) einzubauen. Dies ermöglichte eine direkte Beobachtung des Traffickings der Rezeptoren, die sich während der Markierung auf der Zelloberfläche befanden. So wurde gezeigt, dass PFAR-Rezeptoren mit bestimmten Mutationen fehlerhaft in der Zelle wandern.^[58] Die Sortasemethode zur Markierung des C- und N-Terminus von Zelloberflächenproteinen gibt lediglich Zugriff auf den Pool eines zu untersuchenden Proteins, der sich an der Zelloberfläche befindet. Dies ist ein Vorteil, wenn nur das Verhalten desjenigen Bruchteils einer Proteinmenge von Interesse ist, der der Oberfläche ausgesetzt ist. Dies ist gewöhnlich auch der relevante Teil, wenn die Bindung an Liganden auf die Zelloberfläche beschränkt ist. Proteine, die genetisch mit einem fluoreszierenden Protein fusioniert sind, sind ab dem Moment ihrer Entstehung detektierbar. Diese Eigenschaft hat zwar durchaus ihre Vorteile, kann allerdings die Unterscheidung zwischen dem Verhalten gerade synthetisierter Proteine und dem reifer, biologisch relevanter Proteine erschweren. Daher sollten die Strategien auf Sortasebasis eher als hilfreiche Ergänzung zu den auf GFP-Methoden betrachtet werden, mit dem zusätzlichen Vorteil größerer chemischer Flexibilität.

5. Markierung an N- und C-Terminus

Durch die Verwendung von Sortasen mit verschiedenen Substratspezifitäten ist es möglich, die N- und C-terminalen Markierungsstrategien zu kombinieren. SrtA_{Strep} von *Streptococcus pyogenes*^[59] erkennt und spaltet das LPXTA-Motiv und akzeptiert Nukleophile, die auf Alanin beruhen. Es spaltet auch – wenngleich mit geringerer Effizienz – das SrtA_{Staph}-LPXTG-Motiv (SrtA_{Staph}: Sortase A von *Staphylococcus aureus*). Im Unterschied dazu spaltet das SrtA_{Staph}-Enzym das LPXTA-Motiv nicht, wodurch diese beiden Enzyme orthogonal hinsichtlich dieses Motivs sind. Diese Eigenschaft wurde genutzt, um die beiden Termini von GFP und UCHL3 mit unterschiedlichen Fluorophoren zu markieren. Hierfür wurde eine Maskierungsstrategie angewendet, in der die zur SrtA_{Staph}-Markierung notwendigen N-terminalen Glycine durch proteolytische Spaltung mit Thrombin freigesetzt wurden. Durch diesen Schritt wurde eine Proteinoligomerisierung vermieden, die wahrscheinlich während des C-terminalen Markierungsprozesses mit SrtA_{Strep} stattfinden würde.^[56]

6. Imitation posttranslationaler Modifikationen

Die Sortasemethode ermöglicht die Herstellung homogener rekombinanter Proteine mit posttranslationalen Modifikationen, die nicht genetisch kodiert sind. Auf diese Weise können Glycoproteine hergestellt werden, die normalerweise durch eine Reihe komplizierter enzymatischer Prozesse im

sekretorischen Weg biosynthetisiert werden. LPXTG-markierte Proteine und Peptide können mit Nukleophilen modifiziert werden, die auf 6-Aminohexose beruhen, darunter Aminoglycosid-abgeleitete Antibiotika und ihre Analoga.^[60] Glycosylphosphatidylinositol(GPI)-Anker, die normalerweise am C-Terminus des Proteins angebracht sind, können durch Bindung von LPXTG-Peptiden an synthetische Glycin-nukleophile, die ihrerseits an die Phosphoethanolamineinheit eines GPI-Derivats gebunden sind, imitiert werden.^[61] Eine Reihe von Peptiden (CD52-Fragment, Mucin-1-Peptide) und kleinen Proteinen (CD24) wurde so an GPI-Mimetika mit Trisaccharidkernen angehängt.^[62,63] Lipidmodifikationen von Proteinen sind weitere wichtige posttranskriptionale Veränderungen, die wenig studiert sind, da es an Methoden mangelt, um homogene Präparationen von Lipoproteinen zu erhalten. Zur Lösung dieses Problems wurde Sortase verwendet.^[64] Ein Gerüst auf Glycinbasis wurde mit einer Auswahl an linearen Alkylketten (C₁₂–C₂₄), Cholesterin sowie Adamantan modifiziert und anschließend dazu verwendet, geeignete Versionen von enhanced GFP (eGFP) zu modifizieren, die mit LPETG markiert waren. Diese eGFP-Lipoproteine assoziierten abhängig von der Kettenlänge mit den Plasmamembranen lebender Zellen (wobei eine C₂₂-Kette das beste Resultat lieferte), von wo aus sie Zugang zum endosomalen Kompartiment fanden.

7. Schrittweiser Aufbau von Proteinen, Proteindomänen und Peptiden

Gefaltete Proteine mit einem exponierten Glycinrest am N-Terminus können als Nukleophile für eine Markierung mit Sortase verwendet werden. Substratproteine mit LPXTG-Motiv können mit dem ankommenden Nukleophilprotein fusioniert werden, was zu großen Transpeptidierungsprodukten führt. Durch Verwendung unabhängig gefalteter Proteine als Substrate ist es möglich, viele der Löslichkeitsprobleme zu vermeiden, die die Expression genetisch kodierter Fusionen erschweren. Diese Eigenschaft wurde genutzt, um die Strukturanalyse mit NMR-Spektroskopie zu erleichtern, bei der geringe Löslichkeit ein Hauptproblem ist, da hier gewöhnlich hohe Protein-Konzentrationen notwendig sind. Mithilfe von Sortase wurde eine unmarkierte und daher für die NMR-Spektroskopie unsichtbare, Löslichkeitserhöhende Domäne auf Basis der B1-Immunglobulin-Bindungsdomäne (G₃-GB1) an den C-Terminus der Vav-SRC-Homologie-3-Domäne (SH3; eine Domäne, die um pH 7 nahezu unlöslich ist) angebracht.^[65] Die Struktur der ¹³C/¹⁵N-markierten, angehefteten Vav-SH3-Domäne wurde im Anschluss NMR-spektroskopisch ohne Störsignale vonseiten der Löslichkeitserhöhenden Gruppe aufgeklärt. Auch über die teilweise Markierung des MecA-Proteins von *Bacillus subtilis* durch Verwendung von Sortase in einer NMR-spektroskopischen Studie wurde berichtet.^[66] Mit Sortase wurden auch zahlreiche Immundetektionsreagentien erzeugt. Weiterhin gelangen Protein-Protein-Ligationen zwischen dem Fc-Bindungsmodul (ZZ-Domäne) und mehreren Detektionsenzymen (alkalische Phosphatase, Luciferase, Glucoseoxidase) mit Sortase.^[67] Außerdem wurden Mucin-Glycopeptide syn-

thetisiert, die N- und O-gebundene Glycane enthalten. Durch eine Kombination von chemischer Synthese mit Glycanstrukturaufklärung durch enzymatische Synthese wurden unterschiedliche Peptide aufgebaut, die N- und O-gebundene Glycane enthalten. Diese Glycopeptide wurden anschließend durch Sortase zu einem stereochemisch homogenen Präparat verbunden.^[68,69] Sortase wurde in einer kombinierten Strategie aus rekombinanter, enzymatischer und chemischer Synthese (CRECS) dazu verwendet, Mimetika von G-Proteinkoppelten Rezeptoren (GPCR) herzustellen.^[70] Die GPCRs sind Proteine mit sieben Transmembrandomänen, die ihre Liganden über drei extrazelluläre Schleifen und das extrazelluläre N-terminale Segment binden. Zur Nachahmung dieser Anordnung wurden drei Schleifen synthetisiert, die durch native chemische Ligation cyclisiert und an ein Peptidgerüst mit einem Triglycinmotiv angehängt wurden. Im Anschluss wurde der N-Terminus des GPCR, der die Sortasespaltsequenz trug, in *E. coli* exprimiert und durch eine Sortase-vermittelte Ligation an das Gerüst angehängt. Diese elegant entworfenen, löslichen Mimetika sollten eine systematische Charakterisierung der Beiträge jeder Region zur Ligandenbindung ermöglichen und demonstrieren die Möglichkeiten einer Kombination von chemischer Synthese mit Molekularbiologie.

Eine einzigartige Variante der Protein-Protein-Ligation findet statt, wenn das LPXTG-Motiv und N-terminale Glycine im selben Konstrukt vorhanden sind. Wenn die beiden Einheiten im gefalteten Protein einander nahe genug kommen, kann ein zirkuläres Transpeptidierungsprodukt gebildet werden, indem der N-Terminus mit dem Sortaseerkennungselement eine stabile Bindung eingeht.^[54,71] Zirkuläre Proteine haben nützliche biochemische Eigenschaften: Sie sind widerstandsfähig gegen Aggregation, benötigen mehr Energie für die Denaturierung und sind, da sie keinen exponierten Terminus haben, in ihrem natürlichen Zustand vor einem Exoproteasenangriff geschützt.^[72–76]

8. Verankerung an festen Oberflächen

Auch eine kovalente Immobilisierung an festen Oberflächen wurde durch Sortase erreicht. Ein Hauptvorteil dieser Methode ist, dass dank des Spezifität des Sortaseenzymes Proteine einheitlich und mit definierter Orientierung für die nachfolgende Analyse an festen Oberflächen verankert werden können. Wegen der starken Amidbindung zwischen Oberfläche und Protein können auch harsche Waschbedingungen angewendet werden, z. B. für die kovalente Bindung von GFP an Glycin-derivatisierte Polystyrolkugelchen.^[54] Auf ähnliche Weise wurden Adhäsionsproteine von Gram-positiven Bakterien an fluoreszierende, Glycin-derivatisierte Polystyrolkugelchen gebunden.^[77] Ebenfalls gelang eine Verankerung von GFP und Tus-Proteinen an Glycidylmethacrylatkugelchen, die mit Oligoglycin derivatisiert waren, sowie an Glycin-modifizierter Agarose (Affigel) und an Glycin-modifiziertem Aminosilan auf Glasplättchen.^[78] Ein weiteres Beispiel ist die orientierte Verankerung von Proteinen an Triglycin-modifizierten, carboxymethylierten Dextran-Biocore-Sensorchips für die Oberflächenplasmonenresonanz-

spektroskopie.^[79] Rekombinantes Fibronectin-Bindungsprotein (rFba-LPETG) von A-Streptokokken (Group A Streptococcus, GAS) wurde auf diese Art verankert, was die Messung der Bindung des humanen Faktors H an immobilisiertes Protein ermöglichte. Für die Entwicklung von Reagenzien zur chemoenzymatischen Synthese von Glycokonjugaten wurden immobilisierte β -1,4-Galactosyltransferase (rhGalT) und α -1,3-Fucosyltransferase (rHFucT) aus *Helicobacter pylori* kovalent an Alkylamin-Sepharosekügelchen befestigt. Diese Enzyme sind aktiv und wiederverwendbar, wenn sie mit definierter Ausrichtung an der festen Oberfläche verankert sind.^[80]

9. Proteinexpression und -aufreinigung

Genetische Fusionen von Sortase mit anderen Proteinen wurden zum Zwecke der Proteinaufreinigung durchgeführt. Ein hochreines Protein mit einem zusätzlichen Glycinrest^[81] wurde erhalten, indem Hexahistidin-markierte Sortase, gefolgt von LPETG, mit dem zu untersuchenden Protein linear fusioniert wurde, durch Metallchelat-Affinitätschromatographie an einer Nickelnitritolotriacetatmatrix (Ni-NTA-IMAC) aufgereinigt wurde und zum Schluss durch Versetzen mit Ca^{2+} und Triglycin von der festen Phase abgespalten wurde (Abbildung 3). Mit dem Ziel einer allgemeinen Reinigungsme-

Sortase A von *S. aureus* ist ein sehr gut lösliches Enzym, das in hoher Ausbeute ($> 40 \text{ mg L}^{-1}$ Kultur) hergestellt werden kann. Diese Eigenschaft wurde genutzt, um die Löslichkeit von Proteinen durch Fusion mit einer Sortaseversion ohne katalytischen Cysteinrest zu erhöhen.^[83]

10. Ausblick

In der mikrobiologischen Welt gibt es eine Vielfalt von Sortasen mit unterschiedlichen Präferenzen für Spaltsequenz und Nukleophil.^[84] Zum Beispiel akzeptieren die Pilin aufbauenden Sortasen die ϵ -Aminogruppe eines Lysins in der YPKN-Sequenz als Nukleophil, die Sortase A von *S. aureus* dagegen den N-Terminus von Glycinanhängen. Sortase B (SrtB) von *S. aureus* spaltet die NPQTG-Sequenz,^[85,86] während SrtB von *Bacillus anthracis* die NPKTG-Sequenz spaltet^[87] und *meso*-Diaminopimelinsäure als Nukleophil akzeptiert.^[88–90] Noch befindet sich der Einsatz von Sortasen für die Proteinmarkierung in seinen Anfängen, allerdings sind die Perspektiven vielversprechend, wenn die erforderlichen Reaktionsbedingungen und die Bedingungen für die Substraterkennung erst einmal besser geklärt sind. Mit dem Aufkommen zahlreicher Techniken zur gesteuerten Proteinevolution wird sich vielleicht verbessern lassen, was uns die Natur zur Verfügung gestellt hat. In ihrem gewöhnlichen biologischen Zusammenhang verankert die Housekeeping-Sortase strukturell sehr unterschiedliche Substrate in der Zellwand.^[91] Die einzige Anforderung für den Sortaseangriff scheint das Vorhandensein des LPXTG-Pentapeptids zu sein. Dieser Befund – zusammen mit der Tatsache, dass die Substraterkennung primär eine Funktion der $\beta 6\text{-}\beta 7$ -Schleife ist^[92–94] – lässt vermuten, dass sich möglicherweise Versionen von Sortase entwickeln lassen, die Peptidsequenzmotive komplett orthogonal angreifen können. Wenn man die Vielfalt an Sortasen in Betracht zieht, die verschiedene Ankerstrukturen erkennen können,^[88,89] sollte die Entwicklung von Enzymen möglich sein, die nichtnatürliche Nukleophile akzeptieren. Vorstellbar ist auch eine orthogonale Markierung verschiedener Proteine in einem Reaktionsansatz oder ihrer biologischen Äquivalente in derselben Zellumgebung durch Kombination von Sortasen unterschiedlicher Spezifität. Die Geschwindigkeit der Sortasereaktion mit SrtA von *S. aureus* ist bestenfalls mäßig, wahrscheinlich weil das Gleichgewicht des aktiven Zentrums auf der Seite des nichtaktiven, nichtionisierten Cysteinrestes liegt. Zwar kann dieses Problem leicht durch Verwendung großer Mengen an Sortase (und dadurch einer größeren Gesamtmenge des katalysefähigen Enzyms) überwunden werden, jedoch wäre es von Vorteil, die Gesamtkinetik durch gesteuerte Proteinevolution zu verbessern.

Die Verwendung der Pilus bildenden Sortasen, die Isopeptidbindungen durch Polymerisation von Untereinheiten aufbauen, sollte noch eingehender erforscht werden. Diese Enzyme könnten von besonderem Interesse sein, da sie sich entwickelt haben, um posttranslational kovalente Protein-Protein-Bindungen zu bilden. Diese Eigenschaft könnte dazu genutzt werden, um in vitro ähnliche Protein-Protein-Ligationen durchzuführen und interne, exponierte Lysinreste als ankommende Nukleophile zu nutzen. Da Isopeptidbindun-

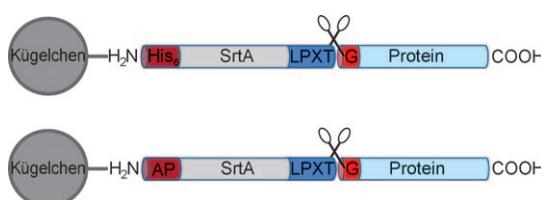


Abbildung 3. Proteinaufreinigung mit Sortase A. Rekombinant exprimierte Proteine werden als Fusionsproteine hergestellt, die entweder eine Hexahistidinmarkierung^[81] (His, oben) oder ein Biotinakzeptorpeptid^[82] (AP, unten) enthalten, gefolgt vom katalytischen Zentrum der Sortase, der LPXTG-Markierung und dem zu untersuchenden Protein. Versetzen des immobilisierten Fusionsproteins mit Ca^{2+} -Ionen und Oligoglycin stimuliert die Sortaseaktivität. Das zu untersuchende Protein wird als gereinigtes Produkt mit einem zusätzlichen N-terminalen Glycinrest freigesetzt.

thode für die großtechnische Proteinherstellung wurde diese Methode an ein zellfreies Weizenkeim-Translationssystem angepasst. Bei dieser Version wird die Hexahistidinmarkierung durch ein Biotinakzeptorpeptid ersetzt (ein 15 Aminosäuren langes Peptid, das von der *E. coli*-Biotinligase erkannt wird), und die Proteine werden mit immobilisiertem Streptavidin in Gegenwart von Calciumchelatoren gereinigt, um eine vorzeitige Abspaltung zu vermeiden.^[82] Beide Methoden führen zu einem Zielprotein mit einem zusätzlichen Glycinrest am N-Terminus, eine Konfiguration, die für die N-terminale Markierung durch Sortase sehr geeignet ist (Abbildung 3).

gen in vielen biologischen Prozessen vorkommen, z.B. im Ubiquitinsystem, wäre die Möglichkeit zur Bildung homogener ortsspezifischer Isopeptidbindungen sehr nützlich.

Ein interessante Frage ist, wie man die Hindernisse für die intrazelluläre Markierung durch Sortase überwinden könnte. Es ist möglich, die Sortase innerhalb lebender bakterieller und eukaryotischer Zellen zu exprimieren – das Enzym faltet sich richtig und ist aktiv.^[95] Das *S. pyogenes*-Enzym, das keine zweiwertigen Kationen benötigt, ist in Calcium-freien Kompartimenten aktiv, z.B. im Cytosol. Ähnlich dazu können Substrate, die ein exponiertes LPXTG-Motiv aufweisen, leicht exprimiert werden und – abhängig vom Protein – die Lokalisierung und/oder Funktion ihrer unmodifizierten Variante beibehalten. Wenn das Nukleophil für die Transpeptidierung genetisch als Teil eines Substratproteins kodiert ist, wie im Fall von Zirkularisierungsreaktionen oder Protein-Protein-Ligationsreaktionen, verläuft die Transpeptidierung leicht^[95] und führt in Hefezellen, Säugetierzellen und Prokaryoten intrazellulär zu zirkularisierten Proteinen. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt für die einfache Markierung von C-Termini ist deshalb die Verfügbarkeit eines exogenen Nukleophils im Zellinneren in Mengen, die hoch genug sind, um das Transpeptidierungsprodukt biochemisch analysieren zu können. Diese Begrenzung könnte dadurch überwunden werden, dass man eine der vielen Proteintransduktionssequenzen des HIV-TAT-Proteins (TAT: Trans-Activator of Transcription) oder sonstiger Quellen am markierten Nukleophil befestigt. Diese Möglichkeit vernachlässigt jedoch den weiteren Verbleib nichtinkorporierter cytoplasmatischer Nukleophile und wurde bisher nicht in die Praxis umgesetzt. Andererseits wäre es vielleicht möglich, die Sonden irreversibel zuzuführen, indem man die α -Aminogruppe und andere Gruppen, die die Translokation ins Cytosol verhindern, mithilfe von chemischen Gruppen temporär maskiert, indem man chemische Gruppierungen einführt, die sich durch Esterasen, photochemisch oder im reduzierenden Milieu des Cytoplasmas wieder abspalten lassen.

Ein wesentlicher Vorteil der Markierung mit Sortase ist, dass die nukleophilen Sonden relativ leicht synthetisiert werden können. Die meisten Sonden sind einfache, C-terminale Glycinanhänge, die durch chemische Routinekupplungen an einer festen Phase oder in Lösung hergestellt werden. Literaturdaten zeigen, dass viele derartige Sonden wahrscheinlich in gleicher Weise als Nukleophile mit einer gegebenen Zielstruktur reagieren. Dies macht es möglich, eine ganze Reihe von Biokonjugaten herzustellen, ohne die Notwendigkeit einer Neuoptimierung jedes einzelnen Konjugats. Transportproteine, mit denen sich Bibliotheken von small interfering RNA (siRNA) und Antikörper-Medikament-Konjugaten zell- und gewebespezifisch verabreichen lassen, könnten in Reichweite sein. Ein zusätzlicher Vorteil der Sortasemethode liegt in der genauen Steuerbarkeit der Stöchiometrie des Markierungsprozesses, was quantitative Arbeiten zu solchen Biokonjugatbibliotheken sehr viel einfacher machen sollte.

Außerdem ermöglicht es Sortase auch, die Orientierung von Ligationspartnern zu steuern, was bei der Herstellung von Protein-Protein-Konjugaten nützlich sein könnte. Durch Austausch der N-terminalen Glycine einer Einheit gegen das

Sortasemotiv des Partnerproteins kann die Orientierung der Untereinheiten umgekehrt werden. Durch klug entworfene Sonden, die „Griffe“ für bioorthogonale Reaktionen enthalten (z.B. die Reaktion eines Azids mit einem Alkin, eines Azids mit einem gespannten Cyclooctin oder eines Aldehyds mit einer Aminooxygruppe), sollte es möglich sein, Proteine aufzubauen, die kovalent in nichtnatürlicher Topologie (N-N- oder C-C-Verknüpfung) verbunden sind. Alternativ könnte man zweistufige Transacylierungsprozesse mit den semi-orthogonalen SrtA_{Staph}- und SrtA_{Strep}-Enzymen sowie passenden Peptidsonden für N-N- oder C-C-Bindungen nutzen. Die Sortasemethode eröffnet damit den Zugang zu Proteinbindungen, die nicht in der Natur vorkommen. Ein Gebiet, das von dieser Möglichkeit profitieren kann, ist die Konstruktion spezieller Liganden zum Studium der Signaltransduktion in Zellen. Es wäre möglich, chimäre, gefaltete Proteinliganden zu entwerfen, die die Bindung und Heterodimerisierung ihrer zugehörigen Rezeptoren einschränken. Die leichte Anwendbarkeit und die Flexibilität der Sortasemarkierungs methode werden mit großer Sicherheit noch weitere hochinteressante neue Forschungsbereiche erschließen.

Eingegangen am 30. Dezember 2010
Online veröffentlicht am 27. April 2011

Übersetzt von Dr. Gerhard Popp und Paul-Albert König

- [1] L. A. Marraffini, A. C. Dedent, O. Schneewind, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2006**, *70*, 192.
- [2] S. K. Mazmanian, G. Liu, H. Ton-That, O. Schneewind, *Science* **1999**, *285*, 760.
- [3] S. K. Mazmanian, H. Ton-That, O. Schneewind, *Mol. Microbiol.* **2001**, *40*, 1049.
- [4] S. D. Zink, D. L. Burns, *Infect. Immun.* **2005**, *73*, 5222.
- [5] H. Ton-That, O. Schneewind, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 24316.
- [6] H. Ton-That, G. Liu, S. K. Mazmanian, K. F. Faull, O. Schneewind, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 12424.
- [7] R. G. Kruger, B. Otvos, B. A. Frankel, M. Bentley, P. Dostal, D. G. McCafferty, *Biochemistry* **2004**, *43*, 1541.
- [8] S. Dramsi, P. Trieu-Cuot, H. Bierne, *Res. Microbiol.* **2005**, *156*, 289.
- [9] M. G. Pucciarelli, E. Calvo, C. Sabet, H. Bierne, P. Cossart, F. Garcia-del Portillo, *Proteomics* **2005**, *5*, 4808.
- [10] D. Comfort, R. T. Clubb, *Infect. Immun.* **2004**, *72*, 2710.
- [11] a) Internet-Adresse: http://bamics3.cmbi.kun.nl/cgi-bin/jos/sortase_substrates/index.py; b) J. Boekhorst, M. W. de Been, M. Kleerebezem, R. J. Siezen, *J. Bacteriol.* **2005**, *187*, 4928.
- [12] M. J. Pallen, A. C. Lam, M. Antonio, K. Dunbar, *Trends Microbiol.* **2001**, *9*, 97.
- [13] H. Ton-That, S. K. Mazmanian, K. F. Faull, O. Schneewind, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 9876.
- [14] A. Aulabaugh, W. Ding, B. Kapoor, K. Tabei, L. Alksne, R. Dushin, T. Zatz, G. Ellestad, X. Huang, *Anal. Biochem.* **2007**, *360*, 14.
- [15] A. M. Perry, H. Ton-That, S. K. Mazmanian, O. Schneewind, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 16241.
- [16] H. Ton-That, O. Schneewind, *Trends Microbiol.* **2004**, *12*, 228.
- [17] J. R. Scott, D. Zahner, *Mol. Microbiol.* **2006**, *62*, 320.
- [18] A. Mandlik, A. Swierczynski, A. Das, H. Ton-That, *Trends Microbiol.* **2008**, *16*, 33.
- [19] T. Proft, E. N. Baker, *Cell. Mol. Life Sci.* **2009**, *66*, 613.
- [20] H. Ton-That, O. Schneewind, *Mol. Microbiol.* **2003**, *50*, 1429.
- [21] H. Ton-That, L. A. Marraffini, O. Schneewind, *Mol. Microbiol.* **2004**, *53*, 251.

- [22] C. Manzano, C. Contreras-Martel, L. El Mortaji, T. Izore, D. Fenel, T. Vernet, G. Schoehn, A. M. Di Guilmi, A. Dessen, *Structure* **2008**, *16*, 1838.
- [23] F. Neiers, C. Madhurantakam, S. Falker, C. Manzano, A. Dessen, S. Normark, B. Henriques-Normark, A. Achour, *J. Mol. Biol.* **2009**, *393*, 704.
- [24] C. Manzano, T. Izore, V. Job, A. M. Di Guilmi, A. Dessen, *Biochemistry* **2009**, *48*, 10549.
- [25] J. M. Budzik, L. A. Marraffini, P. Souda, J. P. Whitelegge, K. F. Faull, O. Schneewind, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 10215.
- [26] A. Mandlik, A. Das, H. Ton-That, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 14147.
- [27] S. K. Mazmanian, G. Liu, E. R. Jensen, E. Lenoy, O. Schneewind, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 5510.
- [28] G. K. Paterson, T. J. Mitchell, *Trends Microbiol.* **2004**, *12*, 89.
- [29] A. W. Maresso, O. Schneewind, *Pharmacol. Rev.* **2008**, *60*, 128.
- [30] N. Suree, M. E. Jung, R. T. Clubb, *Mini-Rev. Med. Chem.* **2007**, *7*, 991.
- [31] G. K. Paterson, T. J. Mitchell, *Microbes Infect.* **2006**, *8*, 145.
- [32] M. W. Popp, J. M. Antos, G. M. Grotenbreg, E. Spooner, H. L. Ploegh, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 707.
- [33] T. Tanaka, T. Yamamoto, S. Tsukiji, T. Nagamune, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 802.
- [34] M. W. Popp, J. M. Antos, H. L. Ploegh, *Curr. Protoc. Protein Sci.* **2009**, Kap. 15, Abschnitt 15.3.
- [35] U. Ilangovan, J. Iwahara, H. Ton-That, O. Schneewind, R. T. Clubb, *J. Biomol. NMR* **2001**, *19*, 379.
- [36] U. Ilangovan, H. Ton-That, J. Iwahara, O. Schneewind, R. T. Clubb, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 6056.
- [37] Y. Zong, T. W. Bice, H. Ton-That, O. Schneewind, S. V. Narayana, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 31383.
- [38] N. Suree, C. K. Liew, V. A. Villareal, W. Thieu, E. A. Fadeev, J. J. Clemens, M. E. Jung, R. T. Clubb, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 24465.
- [39] R. G. Kruger, P. Dostal, D. G. McCafferty, *Anal. Biochem.* **2004**, *326*, 42.
- [40] L. A. Marraffini, H. Ton-That, Y. Zong, S. V. Narayana, O. Schneewind, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 37763.
- [41] B. A. Frankel, Y. Tong, M. L. Bentley, M. C. Fitzgerald, D. G. McCafferty, *Biochemistry* **2007**, *46*, 7269.
- [42] M. T. Naik, N. Suree, U. Ilangovan, C. K. Liew, W. Thieu, D. O. Campbell, J. J. Clemens, M. E. Jung, R. T. Clubb, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 1817.
- [43] H. Ton-That, S. K. Mazmanian, L. Alksne, O. Schneewind, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 7447.
- [44] K. M. Connolly, B. T. Smith, R. Pilpa, U. Ilangovan, M. E. Jung, R. T. Clubb, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 34061.
- [45] B. A. Frankel, R. G. Kruger, D. E. Robinson, N. L. Kelleher, D. G. McCafferty, *Biochemistry* **2005**, *44*, 11188.
- [46] X. Huang, A. Aulabaugh, W. Ding, B. Kapoor, L. Alksne, K. Tabei, G. Ellestad, *Biochemistry* **2003**, *42*, 11307.
- [47] O. Schneewind, P. Model, V. A. Fischetti, *Cell* **1992**, *70*, 267.
- [48] G. Pozzi, M. Contorni, M. R. Oggioni, R. Manganelli, M. Tommasino, F. Cavalieri, V. A. Fischetti, *Infect. Immun.* **1992**, *60*, 1902.
- [49] H. D. Nguyen, W. Schumann, *J. Biotechnol.* **2006**, *122*, 473.
- [50] J. W. Nelson, A. G. Chamesian, P. J. McEnaney, R. P. Murelli, B. I. Kazmierczak, D. A. Spiegel, *ACS Chem. Biol.* **2010**, *5*, 1147.
- [51] M. Vila-Perelló, T. W. Muir, *Cell* **2010**, *143*, 191.
- [52] S. Pritz, Y. Wolf, O. Kraetke, J. Klose, M. Bienert, M. Beyermann, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 3909.
- [53] H. Mao, S. A. Hart, A. Schink, B. A. Pollok, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 2670.
- [54] R. Parthasarathy, S. Subramanian, E. T. Boder, *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 469.
- [55] M. W. Popp, K. Artavanis-Tsakonas, H. L. Ploegh, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 3593.
- [56] J. M. Antos, G. L. Chew, C. P. Guimaraes, N. C. Yoder, G. M. Grotenbreg, M. W. Popp, H. L. Ploegh, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 10800.
- [57] T. Yamamoto, T. Nagamune, *Chem. Commun.* **2009**, 1022.
- [58] N. Hirota, D. Yasuda, T. Hashidate, T. Yamamoto, S. Yamaguchi, T. Nagamune, T. Nagase, T. Shimizu, M. Nakamura, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 5931.
- [59] P. R. Race, M. L. Bentley, J. A. Melvin, A. Crow, R. K. Hughes, W. D. Smith, R. B. Sessions, M. A. Kehoe, D. G. McCafferty, M. J. Banfield, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 6924.
- [60] S. Samantaray, U. Marathe, S. Dasgupta, V. K. Nandicorri, R. P. Roy, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 2132.
- [61] X. Guo, Q. Wang, B. M. Swarts, Z. Guo, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 9878.
- [62] Z. Wu, X. Guo, Q. Wang, B. M. Swarts, Z. Guo, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 1567.
- [63] Z. Wu, X. Guo, Z. Guo, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 5773.
- [64] J. M. Antos, G. M. Miller, G. M. Grotenbreg, H. L. Ploegh, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 16338.
- [65] Y. Kobashigawa, H. Kumeta, K. Ogura, F. Inagaki, *J. Biomol. NMR* **2009**, *43*, 145.
- [66] M. A. Refaei, A. Combs, D. J. Kojetin, J. Cavanagh, C. Caperelli, M. Rance, J. Sapitro, P. Tsang, *J. Biomol. NMR* **2011**, *49*, 3.
- [67] T. Sakamoto, S. Sawamoto, T. Tanaka, H. Fukuda, A. Kondo, *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 2227.
- [68] T. Matsushita, S. Nishimura, *Methods Enzymol.* **2010**, *478*, 485.
- [69] T. Matsushita, R. Sadamoto, N. Ohyabu, H. Nakata, M. Fumoto, N. Fujitani, Y. Takegawa, T. Sakamoto, M. Kuroguchi, H. Hinou, H. Shimizu, T. Ito, K. Naruchi, H. Togame, H. Takemoto, H. Kondo, S. Nishimura, *Biochemistry* **2009**, *48*, 11117.
- [70] S. Pritz, O. Kraetke, A. Klose, J. Klose, S. Rothemund, K. Fechner, M. Bienert, M. Beyermann, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 3698; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 3642.
- [71] J. M. Antos, M. W. Popp, R. Ernst, G. L. Chew, E. Spooner, H. L. Ploegh, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 16028.
- [72] R. J. Clark, H. Fischer, L. Dempster, N. L. Daly, K. J. Rosengren, S. T. Nevin, F. A. Meunier, D. J. Adams, D. J. Craik, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 13767.
- [73] R. J. Clark, J. Jensen, S. T. Nevin, B. P. Callaghan, D. J. Adams, D. J. Craik, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 6695; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 6545.
- [74] M. Trabi, D. J. Craik, *Trends Biochem. Sci.* **2002**, *27*, 132.
- [75] D. J. Craik, *Science* **2006**, *311*, 1563.
- [76] A. S. Andersen, E. Palmqvist, S. Bang, A. C. Shaw, F. Hubalek, U. Ribel, T. Hoeg-Jensen, *J. Pept. Sci.* **2010**, *16*, 473.
- [77] S. Wu, T. Proft, *Biotechnol. Lett.* **2010**, *32*, 1713.
- [78] L. Chan, H. F. Cross, J. K. She, G. Cavalli, H. F. Martins, C. Neylon, *PLoS One* **2007**, *2*, e1164.
- [79] F. Clow, J. D. Fraser, T. Proft, *Biotechnol. Lett.* **2008**, *30*, 1603.
- [80] T. Ito, R. Sadamoto, K. Naruchi, H. Togame, H. Takemoto, H. Kondo, S. Nishimura, *Biochemistry* **2010**, *49*, 2604.
- [81] H. Mao, *Protein Expression Purif.* **2004**, *37*, 253.
- [82] S. Matsunaga, K. Matsuoka, K. Shimizu, Y. Endo, T. Sawasaki, *BMC Biotechnol.* **2010**, *10*, 42.
- [83] J. Caswell, P. Snoddy, D. McMeel, R. J. Buick, C. J. Scott, *Protein Expression Purif.* **2010**, *70*, 143.
- [84] T. C. Barnett, A. R. Patel, J. R. Scott, *J. Bacteriol.* **2004**, *186*, 5865.
- [85] L. A. Marraffini, O. Schneewind, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 16263.
- [86] S. K. Mazmanian, H. Ton-That, K. Su, O. Schneewind, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 2293.
- [87] A. W. Maresso, T. J. Chapa, O. Schneewind, *J. Bacteriol.* **2006**, *188*, 8145.
- [88] A. H. Gaspar, L. A. Marraffini, E. M. Glass, K. L. Debord, H. Ton-That, O. Schneewind, *J. Bacteriol.* **2005**, *187*, 4646.

- [89] J. M. Budzik, S. Y. Oh, O. Schneewind, *J. Biol. Chem.* **2008**, 283, 36676.
- [90] E. M. Weiner, S. Robson, M. Marohn, R. T. Clubb, *J. Biol. Chem.* **2010**, 285, 23433.
- [91] R. Janulczyk, M. Rasmussen, *Infect. Immun.* **2001**, 69, 4019.
- [92] C. K. Liew, B. T. Smith, R. Pilpa, N. Suree, U. Ilangovan, K. M. Connolly, M. E. Jung, R. T. Clubb, *FEBS Lett.* **2004**, 571, 221.
- [93] M. L. Bentley, H. Gaweska, J. M. Kielec, D. G. McCafferty, *J. Biol. Chem.* **2007**, 282, 6571.
- [94] M. L. Bentley, E. C. Lamb, D. G. McCafferty, *J. Biol. Chem.* **2008**, 283, 14762.
- [95] K. Strijbis, M. W. Popp, unveröffentlichte Ergebnisse.

Neugierig? Sachbücher von WILEY-VCH

MICHAEL GROß

Der Kuss des Schnabeltiers**und 60 weitere irrwitzige Geschichten aus Natur und Wissenschaft**ISBN: 978-3527-32490-3
September 2009 278 S. mit 26 Abb.
Gebunden € 24,90

Groß berichtet von winzigen „Bärtierchen“, die schon mal einen „Winterschlaf“ von 100 Jahren machen; von Fröschen, die man getrost küssen kann, auch wenn sie sich nicht in Prinzen verwandeln; von der Rekonstruktion genetischer Codes, die uns irgendwann einen echten Jurassic Park bescheren könnten. „Die Maus, die in die Kälte ging“, „Bakterien halten zusammen“ oder „Die spinnen, die Spinnen!“ – Michael Groß hat Spaß an den intelligenten und mitunter etwas bizarren Erfindungen der Natur. Spannende Phänomene, dazu ungewöhnliche Forscherpersönlichkeiten und neueste Technologien stellt er in 61 Kapiteln vor.

Der Chemiker und Wissenschaftsjournalist, der auch für Magazine wie „Nature“ oder „New Scientist“ schreibt, zeigt, dass Wissenschaft Spaß macht, Neugier weckt und den eigenen Forschergeist beflügelt.



529350908_hu

 **WILEY-VCH**
Wiley-VCH • Tel. +49 (0) 62 01-606-400 • Fax +49 (0) 62 01-606-184 • E-Mail: service@wiley-vch.dewww.wiley-vch.de/sachbuch