

Genetisch kodierte Photovernetzer als molekulare Sonden zur Untersuchung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR)**

Annette G. Beck-Sickinger* und Nediljko Budisa*

Aminosäuren · Photoaktivatoren · Photochemie · Rezeptoren · Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen

Kristallstrukturen von verschiedenen Rezeptoren und Rezeptor/Ligand-Komplexen geben wichtige Impulse für die Arbeit an den dynamischen Eigenschaften dieser Systeme. Allerdings sind Rezeptoren meist integrale Membranproteine, die schwierig zu kristallisieren sind.^[1] Zudem zeigen kristallographische Strukturen nur einen Schnappschuss von Ligand-gebundenen Grundzuständen und sind deshalb auf ein einzelnes statisches Bild einer bestimmten Konformation beschränkt. Da zahlreiche hydrophile Liganden (dazu gehören Pheromone, Hormone, Neurotransmitter, kleine Moleküle, Peptide und sogar große Proteine) über Rezeptoren Signale aus der Umgebung in den intrazellulären Raum vermitteln, spielt diese Proteinklasse eine wichtige Rolle in der Kommunikation zwischen Zellen. Um Informationen für das Verständnis der Spezifität, der Affinität von Ligand-Erkennung und -Bindung sowie der Dynamik der Ligand/Rezeptor-Konformation zu erhalten, sind daher dringend biophysikalische, biochemische, spektroskopische und funktionale Studien nötig.

G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) sind klassische Beispiele von dynamischen Membranproteinen, die an der Aktivierung und Regulierung der zellulären Signalwege beteiligt sind.^[2] Es überrascht nicht, dass die GPCR-Familie etwa 4 % des Protein-kodierenden Teils des menschlichen Genoms umfasst. Die GPCRs werden in verschiedene Klassen eingeteilt, die einfach A, B, C heißen oder nach ihren Hauptrepräsentanten GRAFS (Glutamat-, Rhodopsin-, Adhäsions-, „frizzled“, Sekretin-Familien) benannt sind.^[2] Da gegenwärtig 30 % aller zugelassenen Arzneimittel über

GPCR wirken, sind präzise chemische Informationen über die molekularen Mechanismen der Transmembran-Signalübertragung und das Verständnis der molekularen Pharmakologie dieses Prozesses außerordentlich interessant und relevant.^[3]

Der Einbau nichtkanonischer Aminosäuren (nkAS) in Proteine ist zu einem wichtigen Hilfsmittel für das differenzierte Studium der biochemischen Eigenschaften von Proteinen geworden und kann genutzt werden, um einen Mangel an Strukturinformationen auszugleichen. Der Vorteil des ortsspezifischen Einbaus von nkAS ist, dass spezifische reaktive Aminosäureseitenketten eingeführt werden können, die die Untersuchung bestimmter Strukturmerkmale ermöglichen oder für weitere Derivatisierung, z.B. Markierung mit Fluoreszenzmarkern oder Biotin, oder für ortsspezifische Vernetzung (Crosslinking) mit Wechselwirkungspartnern geeignet sind.

Verschiedene Techniken wurden für den nkAS-Einbau entwickelt, einschließlich der natürlichen chemischen Ligation^[4] (Kombination von synthetischen Segmenten und rekombinant exprimierten Proteinen) oder der Erweiterung des genetischen Kodes unter Nutzung von Suppressor-basierten Techniken^[5] oder auxotrophen Bakterien (Abbildung 1).^[6] Besonders interessant sind photolabile nkAS wie *p*-Benzoyl-L-phenylalanin (Bpa), das bei der Bestrahlung an die Seitenketten von Wechselwirkungspartnern in einem Umkreis von 3–4 Å kovalent bindet. Diese nichtinvasive In-situ-Chemie ist jedoch nur verfügbar, wenn die reprogrammierte Translationsmaschinerie in den untersuchten Zellen verfügbar ist. Darüber hinaus ermöglichen eingebaute Ketoaminoäuren wie *p*-Acetyl-L-phenylalanin (AcF) die spezifische Markierung mit Hydrazin- oder Hydroxylamin-Derivaten.^[7]

Wegen des geringen Expressionsniveaus von GPCR in Zellen und der Schwierigkeiten bei der rekombinanten bakteriellen Expression und Solubilisierung wurden bisher nur wenige Beispiele für die effiziente Expression von nkAS-haltigen GPCR berichtet. Sakmar und Mitarbeiter bauten 2008 zwei verschiedene nkAS (AcF und Bpa) in zwei unterschiedliche GPCR ein: CCR5 (ein Chemokin-Rezeptor und wichtiger Korezeptor für das HI-Virus) und Rhodopsin.^[8] Sowohl AcF als auch Bpa wurden in GPCR von HEK293T-Säugerzellen eingefügt, wobei zwei orthogonale Paare (o-Paare) genutzt wurden, die aus der Suppressor-tRNA (*Bst*-

[*] Prof. Dr. A. G. Beck-Sickinger
AK Biochemie und Bioorganische Chemie, Institut für Biochemie
Universität Leipzig
Brüderstraße 34, 04103 Leipzig (Deutschland)
E-Mail: beck-sickinger@uni-leipzig.de
Homepage: <http://www.biochemie.uni-leipzig.de/agbs>

Prof. Dr. N. Budisa
AK Biokatalyse, Institut für Chemie
Technische Universität Berlin
Franklinstraße 29, 10587 Berlin (Deutschland)
E-Mail: budisa@biocat.tu-berlin.de
Homepage: <http://www.biocat.tu-berlin.de>

[**] Wir danken Dr. Michael Hoesl für die kritische Durchsicht des Manuskripts.

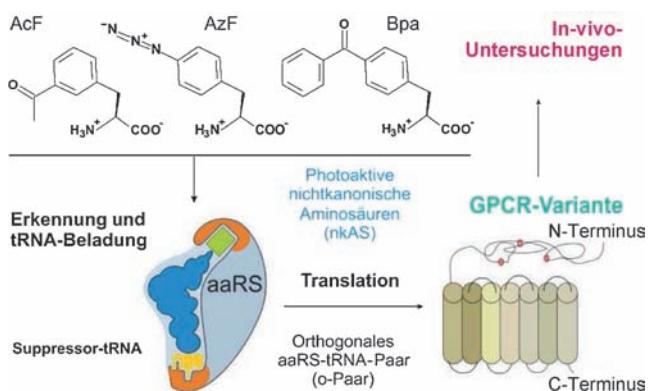


Abbildung 1. In-vivo-Einbau von nkAS in Säugerzellen für Studien von GPCR in natürlicher Umgebung: GPCR sind dynamische Membranproteine, die zelluläre Signalwege aktivieren und regulieren. Die am häufigsten verwendeten nkAS in Struktur-Funktions-Studien von GPCR sind *p*-Acetyl-L-phenylalanin (AcF) – das mit einem Hydrazid- oder Hydroxylamin-Derivat reagieren kann –, *p*-Benzoyl-L-phenylalanin (Bpa) – ein nützlicher, durch UV-Licht aktivierbarer Vernetzer – und *p*-Azido-L-phenylalanin (azF) – eine wichtige IR-Sonde, die auch als Marker für bioorthogonale Konjugationen durch Click-Chemie und Staudinger-Bertozzi-Ligation genutzt werden kann. Orthogonale Paare erhält man aus evolutionär entfernten Organismen durch Nutzung der artsspezifischen Aminoacylierung (d.h. Aminoäureaktivierung und tRNA-Beladung). Diese in verschiedene GPCR eingebauten nkAS ermöglichen Studien sowohl von Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen als auch von intermolekularer Konformationsdynamik und Signalübertragung.

Yam) des *Bacillus stearothermophilus* und den aus der Tyrosyl-tRNA-Synthetase (TyrRS) von *Escherichia coli* entwickelten Varianten AcpRS und BzpRS stammen. Diese o-Paare waren im Vorfeld für die Translation von nkAS durch Überlesen eines Amber-Stopcodons (UAG) in mRNA von Hefe entwickelt worden. Beide GPCR enthalten damit an speziellen Positionen reaktive Ketofunktionen. Die Proteine wurden in ausreichender Menge hergestellt, sodass unterschiedliche spektroskopische Sonden integriert werden konnten (z.B. konnte Rhodopsin nichtinvasiv durch Fluorescein-Hydrazid markiert werden).^[9] In ähnlicher Weise nutzten Becker und Mitarbeiter eine photoaktivierbare nkAS um die potentielle Bindungsstelle des Pheromonrezeptors *Ste2* (ein Hefe-GPCR) zu untersuchen. Sie fanden Produkte nach der Vernetzung, die als Bindungsstellen für den natürlichen α -Faktor-Peptidliganden identifiziert werden konnten.^[10] Zudem wurde *p*-Azido-L-phenylalanin (AzF) in Rhodopsin eingebaut und seine Dynamik durch Fourier-transformierte Infrarotspektroskopie gemessen.^[11]

Diese ersten Experimente bestätigten, dass die ortsspezifische nkAS-Einführung in einen Rezeptor ein unschätzbares, nichtinvasives Hilfsmittel für Untersuchungen der Mechanismen und der Dynamik der Ligandenbindung und der Signalübermittlung ist. Besonders interessant ist, dass es das Repertoire der nkAS ermöglicht, auch Informationen über die Struktur und die Funktionsweise des GPCR zu gewinnen, indem z.B. ein Rezeptor-Liganden-Komplex durch photoaktivierbare Vernetzer eingefangen oder die Beweglichkeit mit Fluoreszenzsonden beobachtet wird. Darüber hinaus könnte die Markierung eines Rezeptors durch o-Paare mit dem Einsatz beliebig chemisch veränderter synthetischer

Liganden kombiniert werden. In diesem Jahr wendeten Sakmar und Mitarbeiter einen In-situ-Photovernetzungsansatz an, wobei sie o-Paare für AzF und AcF nutzten, um die Bindungswechselwirkungen des Inhibitors T140 mit dem CXC-Chemokinrezeptor 4 (CXCR4) zu charakterisieren, der in der gerichteten Zellmigration, bei Krebsmetastasierung und bei der HIV-Fusion wichtig ist. Sie testeten acht Aminosäurepositionen an der Rezeptorkontaktfläche und identifizierten in vivo eine einzige UV-Licht-abhängige Vernetzung – die Stelle der spezifischen Wechselwirkung zwischen dem CXCR4-Rest 189 und T140 (HIV-1-Korezeptorblocker). Damit stimmen ihre Forschungsergebnisse mit dem kristallstrukturbasierten molecular Modeling sehr gut überein.^[12]

Die erste Studie eines GPCR der Klasse B, des Rezeptors 1 des Corticotropin-Freisetzungsfaktors (CRF-R1), der nach endogener Peptidligandenbindung an der Stressantwort des Organismus beteiligt ist, wurde kürzlich von Wang und Mitarbeitern durchgeführt.^[13] Wie andere Mitglieder dieser Klasse B (oder Sekretin-Familie) hat CRF-R1 eine große N-terminale Domäne (etwa 120 Reste), die als wichtigster Bindungsort für peptidbasierte Liganden fungiert. Da bisher kein Rezeptor in voller Länge mit NMR-Spektroskopie oder Röntgenkristallographie strukturell charakterisiert wurde, kommt die Strukturinformation über diese Rezeptoren hauptsächlich aus klassischen Vernetzungsstudien (z.B. Derivatisierung von Cysteinen mit thiolspezifischen, maleimid- oder halogenacetamidbasierten Reagentien). CRF-R1-Rezeptoren wurden in 293T-Zellen untersucht, die mit dem plasmidkodierten o-Paar (tRNA_{CUA}(Tyr)-AzFRS, abgeleitet von *E. coli*) für ortsspezifischen Einbau von AzF als Antwort auf das UAG-Codon transfiziert waren. Im experimentellen Aufbau war der endogene Ligand radioaktiv markiert, was die Identifizierung von Vernetzungsprodukten ermöglichte, die durch Vernetzungsmethoden ohne diese hohe Empfindlichkeit nicht gefunden werden. Ferner wurde die genaue Charakterisierung dieser Wechselwirkungen durch Studien des Vernetzungsverhaltens verschiedener Liganden mit Rezeptoren, die sich nur in der Position des AzF unterscheiden, ermöglicht. Vier AzF enthaltende CRF-R1-Varianten wurden für die Vernetzung parallel mit vier radioaktiv markierten Liganden getestet. Überraschenderweise war die Zahl von Vernetzungsprodukten sehr klein, was zeigt, dass die Liganden im natürlichen zellulären Kontext nicht sehr fest an die CRF-R1-Rezeptoren gebunden waren.

Mit diesen jüngsten Experimenten und Durchbrüchen zeigte sich, dass der Einsatz eines erweiterten genetischen Kodes ein unverzichtbares Hilfsmittel für den nichtinvasiven Einbau von nkAS in In-vivo-Studien in Säugerzellen und sogar in Organismen ist. Diese Methode stellt chemische funktionelle Gruppen als Sonden für die Untersuchung von Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen, Rezeptoraktivierung, Echtzeitabfrage aktiver Signal-Komplexe usw. bereit. Jedoch gilt es vor der routinemäßigen Anwendung dieser Methode noch eine Reihe von Hürden zu überwinden: Beispiele hierfür sind die korrekte Transkription, die Verarbeitung, Modifikation und der Export ins Zellzytoplasma der tRNA der o-Paare oder die Anforderung, dass einige o-aaRS hochspezifisch sowohl für die orthogonale tRNA als auch die nkAS sein sollten. Schließlich könnte die mRNA, die ein Ziel kodiert

und das *in-frame*-Stopcodon trägt, ein Substrat für den so genannten NMD (nonsense-mediated decay)^[14] werden, der Transkripte mit vorzeitigen Terminationssignalen abbaut. Die aus dem Gebrauch von *p*-Azido-L-phenylalanin (AzF) im biologischen Kontext erhaltenen Resultate sollten zudem kritisch evaluiert werden, da es bekannt ist, dass nach seinem Einbau in das Zielprotein reduzierte Formen ebenfalls beobachtet werden. Dies kann zur chemischen Reaktionsfähigkeit und Photoinstabilität der Aryl-Azidogruppe während verschiedener analytischer Verfahren, wie der Massenanalyse, beitragen. Allerdings wurde beschrieben, dass z.B. *Saccharomyces cerevisiae* als Biokatalysator zur Reduktion von Arylaziden zu Arylaminen eingesetzt werden kann.^[15]

Abgesehen von dem Problem der chemischen und metabolischen Stabilität sowie der intrazellulären Aufnahme bestimmter nkAS gibt es vor der Planung und dem Design dieser Experimente mindestens vier Aspekte zu Bedenken: Erstens ist die Einbaueffizienz der nkAS in *E. coli* zwar relativ hoch, in Hefe und vor allem in Säugerzellen aber allgemein viel niedriger. Die niedrige Überleserate des Amber-Stopcodons kann eine Anhäufung verkürzter Proteinspezies verursachen, was potenziell toxisch sein oder sich störend auf die Funktion der normal langen Zielproteine auswirken kann. Deshalb erfordert die Anwendung der nkAS-Mutagenese in Säugerzellen eine wesentlich höhere Effizienz und Selektivität der o-Paare. Zweitens ist die effiziente Translation verschiedener nkAS in Membranproteine in Säugerzellen immer noch schwierig, nicht nur wegen der Ineffizienz der o-Paare, sondern auch wegen der geringen Proteinausbeute in Systemen, in denen diese nicht hoch exprimiert werden. Drittens wird der Typ der verwendeten nkAS stets durch die Natur des untersuchten biologischen Problems diktiert. Zum Beispiel ermöglichen die so genannten photoaktivierbaren („caged“) Aminosäuren in lebenden Zellen die Photokontrolle von Proteinwechselwirkungen, Proteinlokalisation, enzymatischer Aktivität und zellulärer Signalisierung, wogegen die Translation von Vernetzer-nkAS für die Charakterisierung der nichtkovalenten Wechselwirkungen von schwachen oder flüchtigen Protein-Interaktionen eingesetzt wird. In ihrer Konformation eingeschränkte nkAS könnten eingebaut werden, um die Rolle von lokalen Energiebarrieren zu untersuchen.^[16] Nicht zuletzt ist der Einbau von nkAS, die als bio-orthogonale chemische Gruppen und biophysikalische Sonden fungieren, für biologische Studien das Mittel der Wahl, wenn diese für die Visualisierung oder Spektroskopie benötigt werden. Trotzdem wird es in vielen Fällen notwendig sein, eine suppressorbasierte Methode mit anderen Ansätzen^[17] wie der SNAP-Tag-Technik, FlaSH-Tag-Methoden, GFP-Fusion, klassischen Cys-Modifikationen^[18] und sogar semisynthetischen Methoden wie Proteinligationen^[19] zu kombinieren oder sie ganz zu ersetzen. Dies gilt z.B., wenn Rückgratmodifikationen untersucht werden sollen, Pulse-Chase-Experimente nötig sind, große nichtnatürliche Segmente eingeführt werden sollen, Proteinimmobilisierung nötig ist oder wenn eine nachfolgende Modifizierung wegen niedriger Proteinkonzentrationen nicht stattfindet. Somit ist dies, trotz des gegenwärtigen Erfolgs, gerade erst der Beginn eines

jungen Forschungsfelds, das auf eine mit biologischen Systemen kompatible Chemie aufbaut. Es gibt noch viel Raum für Verbesserungen, vor allem wenn Membranproteine, z.B. verschiedene Rezeptoren, untersucht oder intrazelluläre Proteine spezifisch modifiziert werden sollen.

Eingegangen am 12. Oktober 2011
Online veröffentlicht am 30. November 2011

- [1] C. Ostermeier, H. Michel, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1997**, 7, 697.
- [2] a) A. G. Gilman, *Annu. Rev. Biochem.* **1987**, 56, 615; b) H. B. Schiöth, R. Fredriksson, *Gen. Comp. Endocrinol.* **2005**, 142, 94.
- [3] J. P. Overington, B. Al-Lazikani, A. L. Hopkins, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2006**, 5, 993.
- [4] a) P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. B. Kent, *Science* **1994**, 266, 776; b) T. W. Muir, D. Sondhi, P. A. Cole, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 6705; c) T. W. Muir, *Annu. Rev. Biochem.* **2003**, 72, 249.
- [5] a) H. H. Chung, D. R. Benson, P. G. Schultz, *Science* **1993**, 259, 806; b) R. Furter, *Protein Sci.* **1998**, 7, 419; c) L. Wang, A. Brock, B. Herberich, P. G. Schultz, *Science* **2001**, 292, 498.
- [6] a) N. Budisa, *Angew. Chem.* **2004**, 116, 6586; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 6426; b) A. J. Link, M. L. Mock, D. A. Tirrell, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, 14, 603; c) M. Hoesl, N. Budisa, *Angew. Chem.* **2011**, 123, 2948; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 2896.
- [7] K. A. Daggett, T. P. Sakmar, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, 15, 392.
- [8] T. Huber, S. Menon, T. P. Sakmar, *Biochemistry* **2008**, 47, 11013.
- [9] S. Ye, C. Köhrer, T. Huber, M. Kazmi, P. Sachdev, E. C. Yan, A. Bhagat, U. L. RajBhandary, T. P. Sakmar, *J. Biol. Chem.* **2008**, 283, 1525.
- [10] L. Y. Huang, G. Umanah, M. Hauser, C. Son, B. Arshava, F. Naider, J. M. Becker, *Biochemistry* **2008**, 47, 5638.
- [11] S. Ye, E. Zaitseva, G. Caltabiano, G. F. Schertler, T. P. Sakmar, X. Deupi, R. Vogel, *Nature* **2010**, 464, 1386.
- [12] A. Grunbeck, T. Huber, P. Sachdev, T. P. Sakmar, *Biochemistry* **2011**, 50, 3411.
- [13] I. Coin, M. H. Perrin, W. W. Vale, L. Wang, *Angew. Chem.* **2011**, 123, 8227; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 8077.
- [14] J. Hodgkin, A. Papp, R. Pulak, V. Ambros, P. Anderson, *Genetics* **1989**, 123, 301.
- [15] a) A. Kamal, Y. Damayanthi, B. L. Narayan Reddy, B. S. Praveen Reddy, *Chem. Commun.* **1997**, 1015; b) J. W. Back, O. David, G. Kramer, G. Masson, P. T. Kasper, L. J. de Koning, L. de Jong, J. H. van Maarseveen, C. G. de Koster, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 8160; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 7946.
- [16] a) E. B. van Arnam, H. A. Lester, D. A. Dougherty, *ACS Chem. Biol.* **2011**, PMID: 21776983; b) L. Moroder, N. Budisa, *ChemPhysChem* **2010**, 11, 1181.
- [17] a) M. J. Hinner, K. Johnsson, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2010**, 21, 766; b) I. Böhme, A. G. Beck-Sickinger, *Cell Commun. Signaling* **2009**, 7, 16; c) C. Jing, V. W. Cornish, *Acc. Chem. Res.* **2011**, 44, 784.
- [18] L. Merkel, L. Moroder, N. Budisa in *Protein Eng* (Hrsg.: U. RajBhandary, C. Koehler), Springer, Heidelberg, **2008**, S. 29–64.
- [19] a) Z. Machova, R. von Eggelkraut-Gottanka, N. Wehofsky, F. Bordusa, A. G. Beck-Sickinger, *Angew. Chem.* **2003**, 115, 5065; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 4916; b) R. David, R. Günther, L. Baumann, T. Lühmann, D. Seebach, H. J. Hofmann, A. G. Beck-Sickinger, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 15311; c) K. Bellmann-Sickert, A. G. Beck-Sickinger, *ChemMedChem* **2011**, 6, 193.