

Künstliche Adapterproteine zur Initiierung von Protein-Protein-Wechselwirkungen**

Christoph Meyer und Maja Köhn*

Dimerisierungen · Phosphorylierungen ·
Protein-Protein-Wechselwirkungen ·
Signaltransduktion · Synthetische Biologie

Protein-Protein-Wechselwirkungen sind ein grundlegendes Prinzip zur Weitergabe von biochemischen Signalen innerhalb lebender Zellen und spielen damit eine Schlüsselrolle bei der für das Überleben von Organismen wichtigen interzellulären Kommunikation.^[1] Bei dieser kann ein spezifisches Signal durch die Di- oder Oligomerisierung der beteiligten Proteine direkt oder infolge biochemischer Modifikation eines Bindungspartners durch den anderen ausgelöst werden.^[1,2] Eine fehlerhafte Regulation dieser komplexen Vorgänge ist oft Ursache schwerwiegender Erkrankungen wie Krebs oder Diabetes, und daher ist es essenziell, diese Prozesse im Detail zu verstehen.^[1,3]

Methoden zur Untersuchung von Signaltransduktionswegen auf molekularer Ebene umfassen die Anwendung von Inhibitoren und die genaue Analyse ihrer Wirkung, Methoden aus der Gentechnik wie die RNA-Interferenz,^[4] die Isolierung von Proteinen mit Antikörpern und auch vielfältige mikroskopische Methoden.^[5] Eine weitere etablierte Methode ist die Anwendung von chemischen Induktoren der Dimerisierung (CIDs). Dies sind zellgängige Moleküle, die gezielt die Homo- oder Heterodimerisierung spezifischer Proteine einleiten können.^[6] Durch genetische Fusion zweier Proteindomänen, wie des FK506 bindenden Proteins (FKBP) und der FKBP-Rapamycin bindenden (FRB-)Domäne, die denselben Induktor, Rapamycin, an unterschiedlichen Stellen des Moleküls binden, können gewissermaßen alle beliebigen Kombinationen von Proteinen in räumliche Nähe gebracht und die Auswirkungen dieser erzwungenen Dimerisierung studiert werden.^[6] Auf dem Gebiet der synthetischen Biologie werden bereits genetisch fusionierte Gerüstproteine (so genannte „Scaffold-Proteine“) eingesetzt, um Signaltransduktionswege von Grund auf neu zu verschalten.^[7]

Eine ganz neue Herangehensweise, um Proteine in räumliche Nähe zu bringen, präsentieren die Autoren Schepartz und Hobert in ihrer jüngsten Veröffentlichung.^[8] Dabei machen sie sich sogenannte Miniatur-Proteine zunutze.

Durch die Verbindung zweier solcher Miniatur-Proteine in einem Molekül konnten die Autoren ein künstliches Adapterprotein kreieren, das zeitgleich sowohl eine spezifische Kinase als auch selektiv ein zweites Protein in einem ternären Komplex bindet. Die räumliche Nähe der beiden gebundenen Proteine induziert dabei die Phosphorylierung des zweiten Bindungspartners, der unter normalen Umständen kein bevorzugtes Substrat der Kinase ist (Abbildung 1 A).^[8]

Miniatur-Proteine bestehen meist aus weniger als 50 Aminosäuren und sind kompakte Proteindomänen mit einem hohen Anteil an typischerweise helikalen Sekundärstrukturen.^[8,9] Ihre für Proteine relativ geringe Größe macht sie synthetisierbar wie auch genetisch codier- und entwickelbar.^[8] Miniatur-Proteine werden ausgehend von Domänen größerer Proteine, die gewünschte biochemische Eigenschaften aufweisen, entwickelt und durch Modifizierung von Sequenz und Struktur weiter verbessert.^[9] Durch die Isolierung der Eigenschaften einer bestimmten Domäne sind Miniatur-Proteine in Bezug auf Aktivität und Selektivität dem ursprünglichen Protein häufig überlegen.^[8,9]

Auf diese Weise konnte die Arbeitsgruppe in vorangegangenen Arbeiten Miniatur-Proteine entwickeln, die die zur Familie der Src-Kinasen gehörende Kinase Hck (YY2) und das Protein hDM2 (3.3), das ein negativer Regulator des Tumorsuppressors p53 ist, selektiv und mit hoher Affinität im mikro- oder nanomolaren Bereich binden.^[9b] Durch die Verschmelzung der Eigenschaften des kleinen, aber strukturell sehr stabilen pankreatischen Polypeptids des Vogels (aPP = „avian pancreatic polypeptide“) und eines Peptides, das die SH3-Domäne von Src-Kinasen bindet, entstand das Miniatur-Protein YY2 (4.4 kDa). Dieses ist in der Lage, in vitro die SH3-Domäne der Kinase Hck zu binden und diese dadurch zu aktivieren.^[9a] Auf ähnliche Weise wurde das 4.8 kDa schwere Miniatur-Protein 3.3 entwickelt, indem in das α -helikale Segment von aPP Aminosäuren eingeführt wurden, die für die Bindung von p53 zu hDM2 entscheidend sind. Weitere Optimierung der Sequenz in Bezug auf Bindungsstärke und Helizität durch Phagen-Display identifizierte 3.3 als das Miniatur-Protein, das hDM2 am stärksten bindet.^[9b] Weiterhin konnte gezeigt werden, dass 3.3 effektiv die Bildung des deaktivierenden p53-hDM2-Komplexes in vitro verhindert und dadurch ein genetisch codierbarer p53-Aktivator in vivo sein könnte.^[9b,10]

[*] C. Meyer, Dr. M. Köhn
Genome Biology Unit, EMBL Heidelberg
Meyerhofstraße 1, 69117 Heidelberg (Deutschland)
E-Mail: koehn@embl.de
Homepage: http://www.koehn.embl.de/_koehn/home.html

[**] M.K. dankt der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Unterstützung im Rahmen des Emmy Noether-Programms.

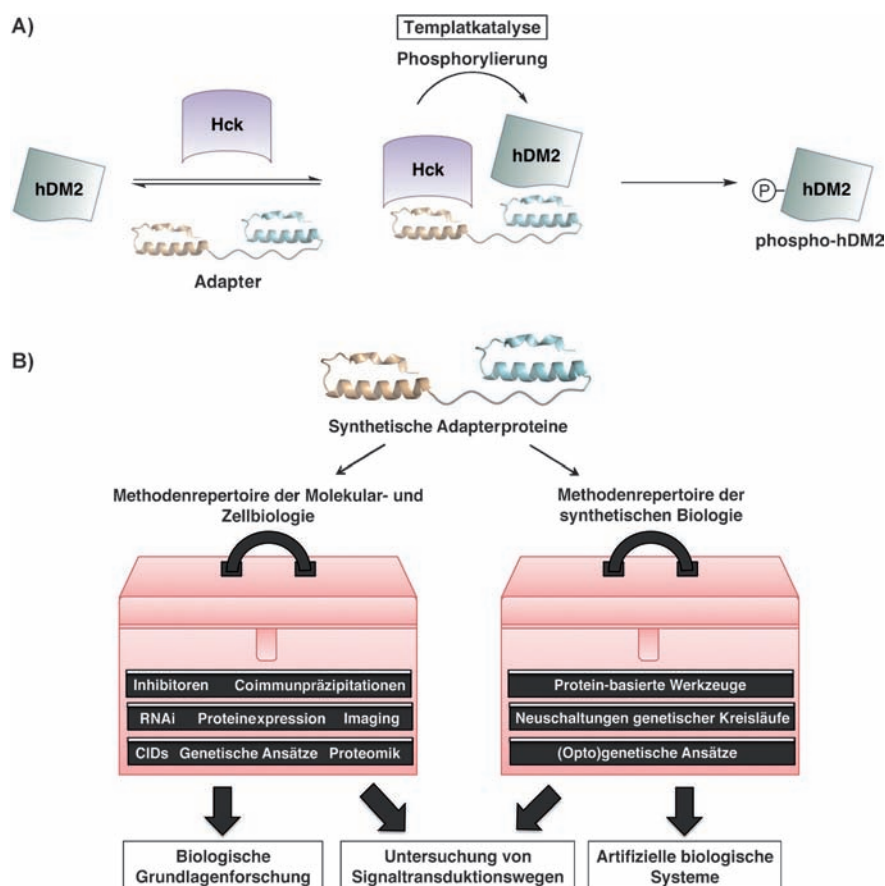


Abbildung 1. Prinzip und potenzielle Anwendungen von Adapterproteinen. A) Illustration des ternären Komplexes und die darauffolgende räumlich induzierte Phosphorylierung. B) Synthetische Adapterproteine als neuer Bestandteil des Methodenrepertoires zur Erforschung von Signaltransduktionswegen und in der synthetischen Biologie.

Wie Fluoreszenzpolarisierung und Pulldown-Assays zeigen, konnte durch die Verbindung dieser beiden Miniatur-Proteine mit einem optimierten Verbindungsstück ein Molekül erzeugt werden, das sowohl Hck als auch hDM2 in einem ternären Komplex bindet.^[8] Das Protein hDM2 wird unter normalen Umständen von der c-Abl-Kinase phosphoryliert und ist ein schlechtes Substrat der Hck-Kinase. Interessanterweise konnte durch Zugabe des Adapterproteins und die dadurch bedingte räumliche Annäherung beider Proteine eine zweifach erhöhte Phosphorylierung von hDM2 durch Hck bei In-vitro-Experimenten beobachtet werden.^[8] Dieser Befund kann durch das Phänomen der räumlich induzierten Katalyse erklärt werden, die unter anderem bei der DNA-Templatkatalyse oder der Target-gerichteten Synthese Anwendung fand.^[11] Das Tyrosin 405 in hDM2 konnte durch LC/MS/MS und Western-Blot-Analyse als hauptsächliche Phosphorylierungsstelle von Hck identifiziert werden.^[8]

Sollte es der Gruppe um Schepartz in weiteren Experimenten gelingen, durch z.B. die Adapterprotein-induzierte Phosphorylierung von hDM2 und dadurch Aktivierung von p53 in vivo zu demonstrieren, würde dies die Allgemeingültigkeit dieses Verfahrens bestätigen, das angesichts der breiten Verwendung modularer Domänen bei Signalproteinen für viele weitere Protein-Protein-Wechselwirkungen genutzt werden könnte.^[1]

Anders als die etablierte Methode der CID hat das Konzept von Schepartz und Hobert den Vorteil, die genetische Manipulation oder Überexpression der Bindungspartner zu vermeiden.^[6] Auf der anderen Seite ist das CID-System zurzeit breiter einsetzbar, da nicht für jede gewünschte Wechselwirkung ein neues Adapterprotein entwickelt werden muss, wofür wiederum gewisse Voraussetzungen, wie das Vorhandensein von Proteindomänen mit den entsprechenden Eigenschaften, erfüllt sein müssen.^[6]

Durch die Möglichkeit, Adapterproteine direkt im gewünschten Modellorganismus genetisch zu codieren, können potenzielle Probleme wie schlechte Zellpenetration oder niedrige Stabilität vermieden werden.^[8] Gerade in Experimenten auf dem Gebiet der Signaltransduktion werden jedoch oft schnelle und reversible Effekte benötigt. Um dies mit Adapterproteinen zu erreichen, könnte die Strategie des „Peptid-Staplings“ genutzt werden, die erfolgreich angewendet wurde, um α -helikale Peptide in Zellen einzuschleusen.^[12] Die Technik erreicht die Stabilisierung von α -helikalen Strukturen durch das Anbringen einer Kohlenwasserstoffkette innerhalb der Helix.^[12] Es wäre interessant zu sehen, ob so zellgängige und damit schnell wirkende „stapled“ Adapterproteine entwickelt werden könnten.

Weiterhin bietet die Kombination der CID-Technik mit der Methode der Adapterproteine neue experimentelle

Möglichkeiten. So könnte z.B. ein künstliches Phosphorylierungs/Dephosphorylierungs-System durch genetische Fusion eines Adapterproteins, das eine Kinase und ein Substrat bindet, mit einer FRB-Domäne entwickelt werden. Durch Zugabe von Rapamycin könnte eine geeignete Phosphatase, die mit FKBP fusioniert wurde, in räumliche Nähe gebracht werden, um den Phosphorylierungsstatus wieder auszugleichen und damit ein natürliches Kinase/Phosphatase-Gleichgewicht zu imitieren.

Wenn es gelingt, die In-vivo-Anwendbarkeit der synthetischen Adapterproteine als Initiatoren von Protein-Protein-Wechselwirkungen zu bestätigen, wäre dies eine Bereicherung für das Methodenrepertoire der Zell- und synthetischen Biologie (Abbildung 1B). Diese vielversprechende Methode ist ein Beispiel für die Effizienz der räumlich induzierten Templatkatalyse. Die Neuschaltung von Enzymaktivitäten könnte dazu beitragen, die Verbindungen in Signaltransduktionswegen, die von großer Wichtigkeit für die Regulation aller essenzieller Prozesse in lebenden Organismen sind, besser zu verstehen.

Eingegangen am 1. Mai 2012

Online veröffentlicht am 13. Juli 2012

[1] T. Hunter, *Cell* **2000**, *100*, 113–127.

[2] A. Ullrich, J. Schlessinger, *Cell* **1990**, *61*, 203–212.

[3] P. Blume-Jensen, T. Hunter, *Nature* **2001**, *411*, 355–365.

[4] J. Moffat, D. M. Sabatini, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2006**, *7*, 177–187.

[5] L. Dehmelt, P. I. H. Bastiaens, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2010**, *11*, 440–452.

[6] a) D. Spencer, T. Wandless, S. Schreiber, *Science* **1993**, *262*, 1019–1024; b) P. J. Belshaw, S. N. Ho, G. R. Crabtree, S. L. Schreiber, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 4604–4607; c) T. Corson, N. Aberle, C. Crews, *ACS Chem. Biol.* **2008**, *3*, 677–692; d) F.-S. Liang, W. Q. Ho, G. R. Crabtree, *Sci. Signaling* **2011**, *4*, rs2; e) M. Putyrski, C. Schultz, *Chem. Biol.* **2011**, *18*, 1126–1133.

[7] a) N. Nandagopal, M. B. Elowitz, *Science* **2011**, *333*, 1244–1248; b) P. Schwill, *Science* **2011**, *333*, 1252–1254.

[8] E. M. Hobert, A. Schepartz, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 3976–3978.

[9] a) C. D. Zellefrow, J. S. Griffiths, S. Saha, A. M. Hodges, J. L. Goodman, J. Paulk, J. A. Kritzer, A. Schepartz, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 16506–16507; b) J. A. Kritzer, R. Zutshi, M. Cheah, F. A. Ran, R. Webman, T. M. Wongjirad, A. Schepartz, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 29–31.

[10] M. Wade, Y. V. Wang, G. M. Wahl, *Trends Cell Biol.* **2010**, *20*, 299–309.

[11] a) Z. J. Gartner, J. R. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6961–6963; b) R. Manetsch, A. Krasinski, Z. Radić, J. Raushel, P. Taylor, K. B. Sharpless, H. C. Kolb, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12809–12818; c) V. P. Mocharla, B. Colasson, L. V. Lee, S. Röper, K. B. Sharpless, C.-H. Wong, H. C. Kolb, *Angew. Chem.* **2004**, *117*, 118–122; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *44*, 116–120.

[12] F. Bernal, A. F. Tyler, S. J. Korsmeyer, L. D. Walensky, G. L. Verdine, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 2456–2457.