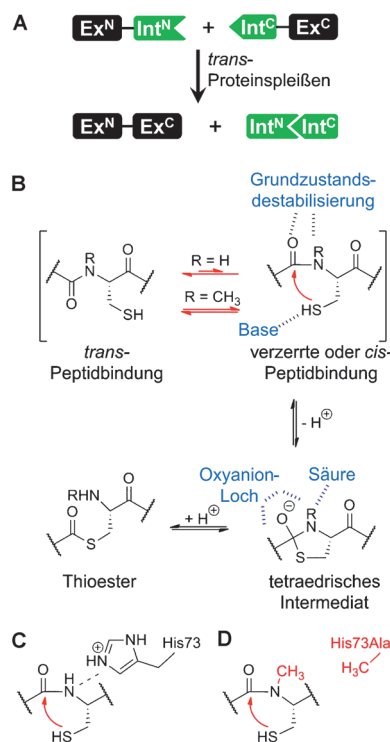


Chemischer „Bypass“ des Intein-katalysierten N-S-Acyltransfers im Proteinspleißen**

Jens Binschik und Henning D. Mootz*

Inteine sind selbst-prozessierende Proteindomänen, die sich in einem mehrstufigen Reaktionsweg, genannt Proteinspleißen, aus einem Vorläuferprotein herauschneiden. Bei dieser Reaktion werden die das Intein flankierenden Polypeptidsequenzen, die N- und C-terminalen Exteine, mit einer Peptidbindung verknüpft (Schema 1 A). Inteine bewirken nur einen einfachen Reaktionsumsatz; sie verwenden allerdings katalytische Strategien, die denen von Enzymen entsprechen. Inteine haben vielfältige Einsatzgebiete in biotechnologischen und proteinchemischen Anwendungen gefunden. Wichtige Aspekte des Mechanismus des Proteinspleißens sind aber noch nicht verstanden.^[1] Besonders faszinierend ist der N-S- (oder N-O) Acyltransfer an der stromaufwärts vom Intein gelegenen zu spaltenden Peptidbindung unter Bildung eines Thioesters (oder Oxoesters); siehe Schema 1 B. Diese Umlagerung ist der erste Schritt des Proteinspleißens in Standard-Inteinen^[2] und wird vielfach für die Generierung von Proteinthioestern genutzt.^[3] Obwohl die Umlagerung thermodynamisch nicht bevorzugt ist, sind dafür keine Co-faktoren oder Energieäquivalente erforderlich. Verschiedene katalytische Mechanismen sind für diese Reaktion vorgeschlagen worden, darunter die Destabilisierung des Grundzustands der zu spaltenden Peptidbindung, allgemeine Säure-Base-Katalyse zur Erhöhung der Nukleophilie der Cystein- (oder Serin-)Seitenkette an der Position 1 des Inteins und die Stabilisierung des tetraedrischen Intermediats durch Ausbildung eines Oxyanionen-Lochs (Schema 1 B). Manche, eventuell sogar alle dieser Mechanismen können wahrscheinlich in Kombination genutzt werden und in verschiedenen Inteinen unterschiedlich stark zur Katalyse beitragen. Hier haben wir einen neuartigen chemischen Ansatz verfolgt, um die Bedeutung der Destabilisierung des Grundzustands mithilfe eines Alkylsubstituenten am Stickstoffatom der zu spaltenden Amidbindung zu testen (Schema 1 B). Diese Strategie wurde durch die aktuellen Entwicklungen von N-S-Umlagerungseinheiten inspiriert, die in der chemischen Synthese von Peptidthioestern Verwendung gefunden haben.^[4] Die vorgeschlagene chemische Manipulation begünstigte tatsächlich



Scheme 1. Grundzustandsdestabilisierung für den N-S-Acyltransfer. Die gleichen mechanistischen Überlegungen gelten für *cis*-spleißende Inteine. A) Schema des *trans*-Proteinspleißens. (Ex^{N} , Ex^{C} = N- und C-terminale flankierende Exteinpolypeptidsequenzen; Int^{N} , Int^{C} = N- und C-terminale Intein-Fragmente) B) Mechanismus der Thioesterbildung mit vorgeschlagenen katalytischen Beiträgen des Inteins. C) Vorgeschlagene Rolle des Block-B-Histidins (His 73 im *Ssp* DnaB-Intein) zur Destabilisierung der zu spaltenden Peptidbindung. D) Chemische Aktivierung der zu spaltenden Peptidbindung durch N-Methylierung.

den N-S-Acyltransfer, sogar soweit, dass ein normalerweise essentieller Bestandteil des katalytischen Zentrums des Inteins, das hochkonservierte Histidin im Block-B-Motiv, funktionell ersetzt werden konnte. Zusammengefasst verdeutlichen unsere Daten die Rolle des Histidins in der Destabilisierung des Grundzustands und schließen andere Modelle für die Rolle dieser Aminosäure aus.

Eine Destabilisierung des Grundzustands der N-terminal zum Intein gelegenen Peptidbindung wurde auf der Basis von Strukturstudien vorgeschlagen; ihre direkte Untersuchung ist jedoch schwierig. In zwei Kristallstrukturen von Inteinen wurden Abweichungen der Konformation dieser Peptidbindung von der üblichen *trans*-Konformation zur energetisch ungünstigeren *cis*-^[5] bzw. einer verzerrten Konformation^[6] beobachtet (Schema 1 B). Eine NMR-Studie von Muir et al.

[*] Dr. J. Binschik, Prof. Dr. H. D. Mootz
Institut für Biochemie, Universität Münster
Wilhelm-Klemm-Straße 2, 48149 Münster (Deutschland)
E-Mail: henning.mootz@uni-muenster.de

[**] Wir danken Alexandra Wasmuth und Julian Matern für Diskussionen und der Deutschen Forschungsgemeinschaft (grant MO 1073/3-1,2) für finanzielle Unterstützung.

Hintergrundinformationen (detaillierte experimentelle Protokolle und vollständige SDS-PAGE-Gele der in Abbildung 2 gezeigten Analyse) zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201208863> zu finden.

an einem *Mxe* GyrA-Inteinvorläuferprotein, das aktiv den N-S-Acyltransfer katalysierte, ließ eine signifikante Verzerrung der Peptidbindung vermuten.^[7] Dabei war das hochkonservierte Histidin des Block-B-Signaturmotivs (His75 im *Mxe* GyrA-Intein) entscheidend für den Effekt. Eine His75Ala-Mutante war inaktiv in der Thioesterbildung und zeigte auch keine messbare konformationelle Verzerrung der Peptidbindung.^[7] Block B ist eines der konservierten Sequenzmotive in Inteinen.^[1a] Eine Schlüsselrolle des Block-B-Histidins im N-S-Acyltransfer wurde bereits aus vielen Kristallstrukturen abgeleitet (z. B. Lit. [5, 6, 8]), da es typischerweise in einer für eine Wasserstoffbrückenbindung geeigneten Entfernung zum Amid-Stickstoffatom der zu spaltenden Bindung lokalisiert ist (Schema 1C). Eine Mutation des Histidins zu Alanin blockiert den N-S-Acyltransfer in den meisten Inteinen und inhibiert ihn deutlich in anderen.^[9] Daraus folgt, dass der Beitrag des Histidins nicht essentiell sein muss, wenn andere Mechanismen, wie z. B. die Stabilisierung des Oxyanions des tetraedrischen Intermediates,^[9, 10] einen größeren Anteil haben. Dennoch ist diese Aminosäure die am höchsten konservierte Aminosäure aller Inteinsequenzen.^[10, 11] Das weit verbreitete Modell für das Block-B-Histidin postuliert einen Beitrag zum N-S-Acyltransfer durch Destabilisierung der zu spaltenden Peptidbindung. Es wird angenommen, dass dies durch eine Polarisierung und schließlich eine Protonierung der Amino-Abgangsgruppe des Oxythiazolidin-Anion-Intermediats geschieht (Schema 1B).^[7, 10] Allerdings gibt es bis auf die oben genannte Studie^[7] keinen direkten biochemischen Nachweis für dieses Modell. In den meisten Studien wurden nur inaktivierende Mutationen eingeführt. Darüber hinaus haben Belfort, Wang et al. kürzlich eine zweifache Rolle des Block-B-Histidins vorgeschlagen. In pK_s -Messungen zeigte sich eine Veränderung zwischen einem Vorläuferprotein, dem das C-Extein fehlte, und dem gespleißten Intein. Daraus schlossen sie, dass das Histidin im Vorläuferprotein zuerst das katalytische Cystein für den nukleophilen Angriff deprotoniert und dann die Amino-Abgangsgruppe protoniert.^[12] Eine Stabilisierung des Thiolat-Anions könnte nachgeordnet vom gut konservierten Aspartat des Block F bewirkt werden.^[13] Eine weitere für das Block-B-Histidin vorgeschlagene Rolle ist die Stabilisierung des Oxyanions des tetraedrischen Intermediats während des N-S-Acyltransfers im *Sce* VMA-Intein (Schema 1B).^[14] Demzufolge bleibt die genaue Rolle des Block-B-Histidins noch unklar.

Eine weitere Schwierigkeit bei der Interpretation der Strukturstudien entsteht dadurch, dass in den meisten Kristallstrukturen von Inteinen an der betreffenden Position die ungespannten, normalen Peptidbindungen in *trans*-Konformation gefunden wurden^[8c, 14, 15] und damit die Bedeutung einer Peptidbindungsverzerrung in Frage gestellt werden kann. Ein grundsätzliches Problem in allen bisherigen Strukturstudien ist zudem, dass stets mutierte oder verkürzte Inteinvarianten verwendet wurden, um Proteinspleißen oder Spaltungsreaktionen dieser selbst-prozessierenden Proteine zu verhindern. Auch in der oben diskutierten NMR-Studie^[7] wurde ein Inteinvorläuferprotein verwendet, das nicht der Lage war, Proteinspleißen zu katalysieren, da das C-Extein entfernt und ein Teil des katalytischen Zentrums mutiert war. Solche Veränderungen könnten die Struktur des katalyti-

schen Zentrums und die räumliche Ausrichtung der beteiligten Aminosäuren entscheidend verändern. Insgesamt verdeutlichen diese Überlegungen die Schwierigkeit des Studiums eines einzelnen Reaktionsschrittes bzw. des Katalysmechanismus von Inteinen. Ideal wäre eine nur minimale Veränderung ohne größere strukturelle Auswirkungen, die den Spleißmechanismus im Prinzip intakt lässt.

Hier war unser Ziel, den Beitrag einer Grundzustandsdestabilisierung für den N-S-Acyltransfer durch Einführung einer subtilen chemischen Veränderung in der aktiven Tasche eines Inteins zu untersuchen. Unsere Arbeits-hypothese bestand darin, dass eine N-Methylgruppe an der N-terminalen Spleißstelle die zu spaltende Peptidbindung durch Grundzustandsdestabilisierung schwächen sollte (Schema 1B). Wenn eine Destabilisierung ein wichtiger Teil der katalytischen Strategie eines Inteins ist, dann sollte ein positiver Effekt auf den N-S-Acyltransfer durch eine solche Veränderung zu erwarten und messbar sein.

Eine N-Alkylierung verschiebt das thermodynamische Gleichgewicht zwischen *trans*- und *cis*-Peptidbindungen zugunsten des energiereicheren *cis*-Konformers, da die Energie der *trans*-Form angehoben wird (Schema 1B). Dieser Effekt ist für Prolin, die einzige proteinogene Iminosäure, wohlbekannt. In Aminoacylprolyl-Peptidbindungen liegt das *trans*/*cis*-Verhältnis typischerweise nur bei ca. 4:1, während es bei einer normalen Peptidbindung ca. 1000:1 beträgt. Eine N-Alkylierung hebt die Energie des *trans*-Konformers durch sterische Effekte an und resultiert in ähnlicheren Interkonversionsraten zwischen den beiden Isomeren.^[16] N-alkyliertes Cystein wurde bereits als schaltbarer Baustein für die chemische Synthese von Peptidthioestern im Zusammenhang mit Anwendungen in der nativen chemischen Ligation verwendet.^[4, 17] Der N-S-Acyltransfer einer so geschwächten Amidbindung wird durch einen niedrigen pH-Wert herbeigeführt, vermutlich weil das sekundäre Amin durch seine höhere Basizität leichter protoniert und so die Rückreaktion verhindert wird.

Um die nichtnatürliche Methylierung des Peptidrückgrats in das katalytische Zentrum des Inteins einzubauen, haben wir ein semisynthetisches gespaltenes *Ssp* DnaB-Intein verwendet, in dem die betreffende Peptidbindung ein Teil des synthetischen Peptids ist (siehe Abbildung 1 für alle verwendeten Konstrukte). Diese Inteinvariante wurde bereits zuvor durch eine künstliche Spaltung des Inteins zwischen den Aminosäuren 11 und 12 generiert und besteht aus einem kurzen N-terminalen Fragment (Int^N) aus 11 und einem längeren C-terminalen Fragment (Int^C) aus 143 Aminosäuren.^[18] Int^N-Peptide mit einer kurzen flankierenden Sequenz sind leicht durch Peptidfestphasensynthese zugänglich. Wie in Abbildung 1 dargestellt, assoziieren sie spontan mit Int^C-Fusionsproteinen. Der Komplex faltet in die aktive Konformation und führt zum semisynthetischen Spleißprodukt (SP) und den abgetrennten Int^N- und Int^C-Fragmenten. Das unmethylierte Kontrollpeptid Fl-KKESG-CISGDSLISLA-OH (**1**; zu spaltende Peptidbindung kursiv; Fl = 5(6)-Carboxyfluorescein) wurde unter Verwendung einer Standard-Fmoc-Schutzgruppenstrategie synthetisiert. Die Inkubation mit rekombinant produziertem Int^C-Trx-His₆ (Konstrukt **2**) führte zu 76 % Spleißausbeute (Abbildung 2), in Übereinstimmung

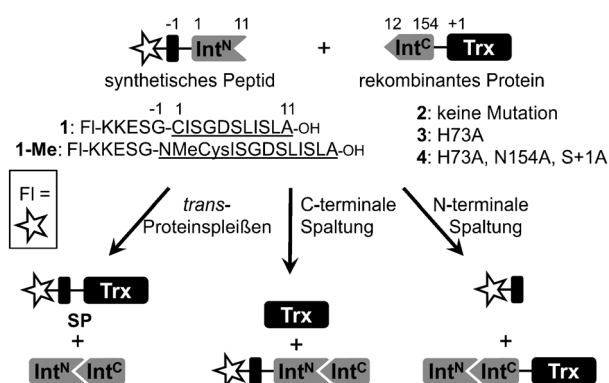


Abbildung 1. Verwendete Konstrukte und Reaktionsschemata. Das künstliche gespaltene semisynthetische *Ssp* DnaB-Intein besteht aus einem kurzen Int^N-Fragment (11 Aminosäuren), welches das katalytische Cys1 enthält, und einem längeren Int^C-Fragment (143 Aminosäuren). Die unterstrichene Peptidsequenz entspricht dem Int^N-Fragment. Trx diente als Modellprotein für die Fusion. Gezeigt sind mögliche Reaktionen. Die berechneten Massen betragen: Proteine **2**, **3** = 30.3 kDa; Protein **4** = 30.2 kDa; Int^C = 16.7 kDa; Int^C (H73A) = 16.6 kDa; Trx = 13.7 kDa. (FI: 5(6)-Carboxyfluoreszein; SP = Spleißprodukt; Trx = Thioredoxin mit Hexahistidin-Tag; S+1A = Mutante mit Alanin an Position +1 anstelle von Serin im nativen Protein.)

mit früheren Ergebnissen.^[18b] Die Mutation des hochkonservierten Block-B-Histidins (His73Ala; Konstrukt **3**) unterband wie erwartet die Spleißproduktbildung praktisch vollständig, während die C-terminale Spaltung (Abbildung 1) in leicht erhöhtem Maße auftrat (Abbildung 2). Diese Nebenreaktion entsteht durch verfrühte Cyclisierung des Asparagins an der C-terminalen Spleißstelle und zeigte in diesem Zusammenhang, dass das mutierte Int^C-Fragment im rekonstituierten Inteinkomplex insgesamt eine korrekte Struktur angenommen hat. Die ausgebliebene Spleißaktivität war also eine Konsequenz der fehlenden Histidin-Seitenkette. In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis hatten wir im Zusammenhang mit der Untersuchung eines Int^C-Fragments, bei dem zwei zusätzliche Mutationen (His73Ala, Asn154Ala, Ser+1Ala; Konstrukt **4**) zur Blockierung der C-terminalen Spaltung eingeführt wurden, bereits gezeigt, dass eine His73Ala-Mutante zur Inaktivierung des N-S-Acyltransfers führt.^[18b] Zusammengefasst stützen diese Befunde, dass das His73 des Block B, im Einklang mit anderen Inteinen, eine entscheidende Rolle in der Aktivierung der Peptidbindung an der N-terminalen Spleißstelle spielt.

Als nächstes synthetisierten wir das Peptid **1-Me** mit *N*-Methylcystein anstelle des katalytischen Cys1 (Abbildung 1). Dieser nichtnatürliche Baustein wurde als Fmoc-*N*-MeCys-(Trt)-OH in der Peptidsynthese eingebaut. Bei Inkubation von **1-Me** mit Protein **2** konnten jedoch nur marginale Mengen des Spleißproduktes (< 1 %) detektiert werden. Die effiziente Bildung des Produktes der C-terminalen Spaltung (> 85 %) zeigte aber, dass das rekonstituierte Intein insgesamt richtig gefaltet war (Abbildung 2). Deshalb haben wir spekuliert, dass der Verlust der Spleißaktivität durch eine ungewünschte lokale Hinderung mit der zusätzlichen Methylgruppe hervorgerufen wurde. Der beste Kandidat für eine solche Interaktion war das katalytisch essentielle His73 selbst,

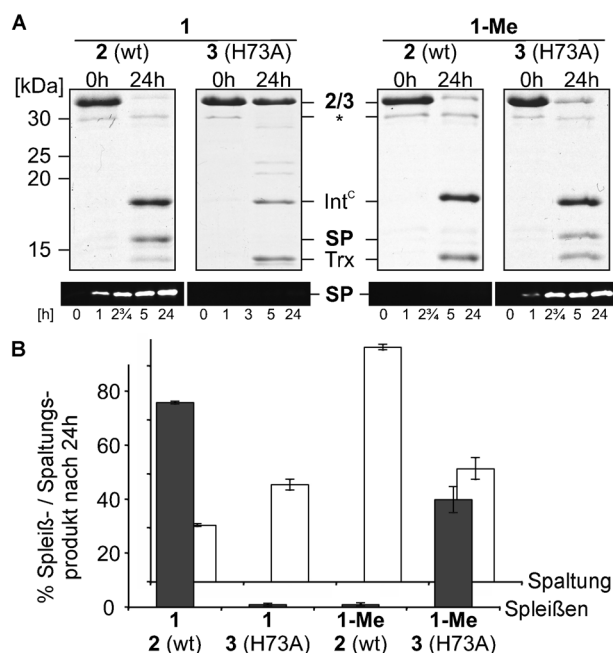


Abbildung 2. *trans*-Proteinspleißen. Die Reaktionen wurden mit den Int^N-Peptiden **1** oder **1-Me** (60 μ M) und den Int^C-Konstrukten **2** oder **3** (20 μ M) bei pH 7.0 und 25 °C für 24 h durchgeführt. A) Gezeigt sind SDS-PAGE-Gele, die mit Coomassie-Brillantblau gefärbt (oben) bzw. unter UV-Licht angeregt wurden (Ausschnitte unterhalb). SP steht für das Spleißprodukt FI-KKESG-Trx-His₆, und Trx markiert das C-terminale Spaltungsprodukt Trx-His₆. B) Quantifizierung der Bildung des SP (schwarz) und des C-terminalen Spaltungsproduktes (weiß) durch densitometrische Analyse. (* = Proteinkontamination).

da es in Abstand von nur 2.7 Å (einer für die Bildung einer Wasserstoffbrücke geeigneten Entfernung) zum Amid-Stickstoffatom des Cys1 zu finden ist.^[8c] Deshalb haben wir Peptid **1-Me** mit der His73Ala-Mutante **3** inkubiert (Schema 1D). In dieser Kombination war tatsächlich robustes *trans*-Proteinspleißen mit 40 % Ausbeute zu beobachten. Auch die Reaktionsgeschwindigkeit nahm gegenüber dem ursprünglichen System nur geringfügig ab (Abbildung 2A). Es traten zudem ca. 42 % C-terminale Spaltung auf, sodass die Menge des aktiven Inteins vergleichbar war mit der Kombination **1** + **2** und insgesamt 80–85 % betrug (Abbildung 2B). Die Int^N-Peptide **1** und **1-Me** verhielten sich also in Kombinationen mit dem nativen Int^C-Fusionsprotein **2** und dessen His73-Mutante **3** hinsichtlich ihrer Spleißaktivitäten reziprok (Abbildung 2B). Diese Ergebnisse zeigen, dass die *N*-Methylierung der zu spaltenden Peptidbindung tatsächlich vorteilhaft für den N-S-Acyltransfer ist; sogar in dem Maße, dass das Block-B-Histidin funktionell ersetzt werden kann.

Um zu klären, zu welchem Zeitpunkt die *N*-Methylierung zur Aktivierung des N-S-Acyltransfers beigetragen hat, wurden Kontrollreaktionen durchgeführt. Anhand des bekannten Effekts von *N*-Alkylcystein als schaltbarer Baustein war es denkbar, dass das Peptid **1-Me** bereits in Form des Thioesters in das aktive Zentrum kam. In diesem Fall wäre eine Inteinkatalyse des N-S-Acyltransfers nicht mehr notwendig. Wir haben daher Kontrollen durchgeführt, in denen **1-Me** bei pH 7.0 zur Thioesterspaltung mittels Thiolase mit

verschiedenen Thiolen inkubiert wurde, jeweils in Anwesenheit oder Abwesenheit der Int^C-Mutante **4**. Wie zuvor erwähnt, ist diese Mutante in allen katalytischen Schritten nach Intein-Fragmentassoziiierung blockiert und erlaubt somit die isolierte Untersuchung der unkatalysierten Thioesterbildung und -spaltung. Das Peptid **1-Me** allein war in Gegenwart von 50 mM DTT fast vollständig stabil (> 90 %), wohingegen bei Zugabe von **4** bereits 2 mM DTT ausreichten, um eine vollständige Spaltung der Peptidbindung an der N-terminalen Spleißstelle zu erreichen (Abbildung 3 A). Die geringe Spaltung in Abwesenheit des Proteinpartners könnte mit einem geringen Ausmaß an spontanem N-S-Acyltransfer erklärt werden. Das unmethylierte Peptid **1** war dagegen vollständig stabil unter den beiden gleichen Bedingungen (Abbil-

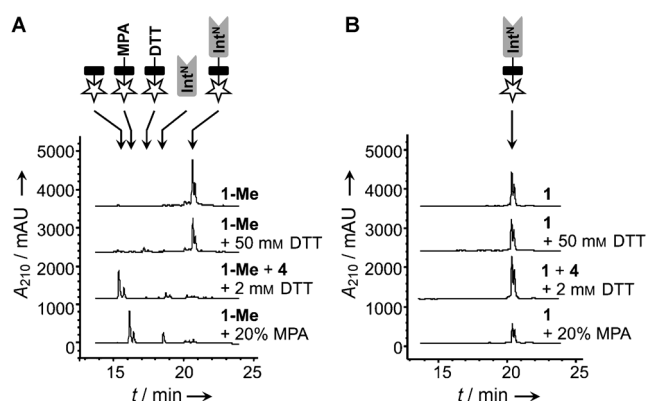


Abbildung 3. Thioesterbildung und -spaltung. Gezeigt sind die Chromatogramme einer Analyse der Reaktionsansätze mittels Umkehrphasen-HPLC. Die angegebenen Kombinationen der Int^N-Peptide (15 μ M) und des mutierten Int^C-Konstrukts (30 μ M) wurden bei pH 7.0 und 25 °C für 24 h in Gegenwart der angegebenen Thiole inkubiert und anschließend zur Entfernung des Proteins **4** aufgeköcht. Die markierten Signale wurden nachfolgend durch Analyse mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie identifiziert (nicht gezeigt). Obwohl die Ex^N-Signale klar erkennbar sind, konnten nur Spuren des Int^N-Fragments nachgewiesen werden; wahrscheinlich aufgrund von Copräzipitation mit **4**. Zu beachten ist, dass alle Peptide mit FI (= 5(6)-Carboxyfluorescein) wegen der beiden Regioisomeren als Doppelsignal erscheinen.

dung 3B). Zusammenfassend kann daraus geschlossen werden, dass die zu spaltende Peptidbindung des freien Peptids **1-Me** in der Amidform vorlag. Der Kontext des gefalteten Inteins ist auch im Falle dieses Peptids für einen effizienten N-S-Acyltransfer erforderlich.

Die bekannten chemischen N-Alkylbausteine werden bei niedrigem pH-Wert anstelle des hier verwendeten neutralen pH-Wertes geschaltet; typischerweise mit 20 % (v/v) 3-Mercaptopropionsäure (MPA) bei pH \approx 2.^[4b] Um zu kontrollieren, dass die Sequenz von **1-Me** eine solche Induktion nicht unterbindet, wurden diese Versuchsbedingungen ebenfalls getestet. Dabei wurde in Abwesenheit von **4** eine vollständige Spaltung von **1-Me** beobachtet, während das unmethylierte Peptid **1** vollkommen stabil blieb (Abbildung 3).

Unsere Ergebnisse lassen mehrere Rückschlüsse auf den Mechanismus des Proteinspleißens durch das *Ssp* DnaB-

Intein zu: 1) Die N-Methylierung der Peptidbindung an der N-terminalen Spleißstelle ermöglicht den N-S-Acyltransfer in Abwesenheit des ansonsten essentiellen Block-B-Histidins. Dieser Befund stützt das Modell, nach dem die Grundzustandsdestabilisierung einen wichtigen Teil der Katalyse darstellt, da durch die N-Methylierung im Vergleich zur unmodifizierten Peptidbindung das *cis*-Konformer bzw. eine verzerrte Bindung energetisch begünstigt wird. Er bekräftigt auch die Annahme, dass das Block-B-Histidin eine wichtige Rolle in der Grundzustandsdestabilisierung spielt; vermutlich durch Koordination des Stickstoffatoms der betreffenden Peptidbindung (Schema 1 C). 2) Unsere Beobachtungen zeigen auch, dass dies die einzige wichtige Rolle des Histidins im N-S-Acyltransfer ist. Für das *Mtu* RecA-Intein wurde eine weitere Rolle dieses Restes als allgemeine Base zur Deprotonierung der Thiolseitenkette des katalytischen Cys1 vorgeschlagen.^[12] Dies kann als wichtiger Teil des Mechanismus ausgeschlossen werden, zumindest für das hier untersuchte *Ssp* DnaB-Intein, wenn man annimmt, dass die Deprotonierung der N-MeCys-Thiolseitenkette dieselbe Base erfordert. Diese Schlussfolgerung ist auch im Einklang mit unserem früheren Ergebnis, dass eine Substitution des Cys1 zu Homocystein einen effizienten N-S-Acyltransfer erlaubte, obwohl die relative Positionierung der Thiol- und Imidazolgruppen durch die zusätzliche Methylengruppe verändert gewesen sein sollte.^[19] Unser Modell lässt sich ebenfalls mit dem ungewöhnlich niedrigen pK_S-Wert für das Histidin in einem gespleißten Intein in Übereinstimmung bringen,^[12] der sich durch die räumliche Nähe zu dem protonierten freien Aminoterminus des Inteins ergeben würde. 3) Unsere Daten zeigen, dass das Block-B-Histidin auch für die nachfolgenden Schritte des Proteinspleißens oder die Koordinierung der einzelnen Reaktionen nicht wichtig sein kann, denn die His73Ala-Mutante **3** katalysierte Proteinspleißens mit Peptid **1-Me** in guten Ausbeuten und Geschwindigkeiten. Es muss daher die Rekonstituierung des annähernd vollständig aktiven Inteins möglich gewesen sein. Die hier vorgeschlagene Rolle des Block-B-Histidins sollte allgemeingültig sein, wenn man seine hohe Konservierung in der Primärsequenz und die hohe strukturelle Konservierung des aktiven Zentrums von Inteinen berücksichtigt. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass andere Inteine, wie z. B. das *Mtu* RecA-Intein, leicht unterschiedliche Mechanismen verfolgen.

Interessanterweise haben Perler et al. in einer sehr aktuellen Studie das *Tko* CDC21-1-Intein als Vertreter einer kleinen Gruppe von Inteinen untersucht, denen das Block-B-Histidin fehlt. Mutationsanalyse und Strukturmodellierung führten zu dem Modell, dass in diesem Fall der durch das fehlende Histidin herbeigeführte Reaktivitätsverlust durch die Stabilisierung des Oxyanions im tetraedrischen Intermediat (Schema 1 B) mittels eines spezifischen Lysins ausgeglichen werden kann.^[10] Unsere Ergebnisse lassen sich ebenfalls als ein Alternativmechanismus interpretieren, um den Verlust des Histidins zu kompensieren und das Spalten der Peptidbindung für den N-S-Acyltransfer zu ermöglichen, jedoch mithilfe eines künstlichen, chemischen „Bypass“.

In einer übergreifenden Betrachtung lässt sich feststellen, dass auch die chemischen Syntheseprotokolle für die Generierung von Peptidthioestern durch N-S-Acyltransfer-Reak-

tionen ohne eine Protein-vermittelte Katalyse auskommen müssen.^[20] Diese beinhalten die erwähnten, schaltbaren N-Alkylcystein-Bausteine,^[4] Cysteinylprolyl-Ester-Einheiten, um den Zustand des gebildeten Thioesters zu arretieren,^[21] und sogar besonders reaktive Peptidbindungen, wie Gly-Cys, Cys-Cys und His-Cys.^[22] Diese präparativen Routen funktionieren alle am besten bei niedrigem pH-Wert, was auf die Bedeutung der Protonierung zur Verlangsamung des reversen S-N-Acyltransfers hindeutet. Erstaunlicherweise ist die Cysteinseitenkette unter diesen Bedingungen protoniert, im Einklang mit unserem Vorschlag, dass eine generelle Base zur Thioldeprotonierung auch für die katalytische Route der Inteine nicht erforderlich sein könnte. Die Aktivierung der zu spaltenden Peptidbindung durch das Block-B-Histidin wird deshalb wahrscheinlich durch Einführung von Spannungsenergie mittels elektronischer Effekte – von der Polarisierung des Amids bis zur Protonierung der Amino-Abgangsgruppe (Schema 1B–C) – oder aber durch sterische Effekte hervorgerufen.

Zusammenfassend haben wir gezeigt, dass das katalytisch essentielle Block-B-Histidin durch eine N-Methylierung des Cysteins an der N-terminalen Spleißstelle funktionell ersetzt werden kann. Dabei ist wichtig, dass das veränderte Intein, im Gegensatz zu anderen Studien, immer noch zum Proteinspleißen in der Lage war. Somit haben wir klare Hinweise für die Bedeutung des Histidins im N-S-Acyltransfer sammeln können. Wir können zudem andere mögliche Rollen dieser Aminosäure ausschließen. Diese Arbeit unterstreicht auch die Stärke der Einführung von subtilen chemischen Modifikationen im aktiven Zentrum eines Proteins für mechanistische Studien.

Eingegangen am 5. November 2012,
veränderte Fassung am 13. Dezember 2012
Online veröffentlicht am 6. März 2013

Stichwörter: Enzymologie · Peptidchemie · Peptidligation · Protein-Semisyntese · Thioester

- [1] a) L. Saleh, F. B. Perler, *Chem. Rec.* **2006**, 6, 183; b) S. Elleuche, S. Poggeler, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, 87, 479; c) H. D. Mootz, *ChemBioChem* **2009**, 10, 2579; d) N. H. Shah, T. W. Muir, *Isr. J. Chem.* **2011**, 51, 854; e) H. Paulus, *Chem. Soc. Rev.* **1998**, 27, 375; f) Y. Anraku, Y. Satow, *Proc. Jpn. Acad. Ser. B* **2009**, 85, 409; g) T. L. Aboye, J. A. Camarero, *J. Biol. Chem.* **2012**, 287, 27026; h) G. Volkmann, H. D. Mootz, *Cell. Mol. Life Sci.*, DOI: 10.1007/S00018-012-1120-4.
- [2] K. Tori, B. Dassa, M. A. Johnson, M. W. Southworth, L. E. Brace, Y. Ishino, S. Pietrovski, F. B. Perler, *J. Biol. Chem.* **2010**, 285, 2515.
- [3] T. W. Muir, *Annu. Rev. Biochem.* **2003**, 72, 249.
- [4] a) H. Hojo, Y. Onuma, Y. Akimoto, Y. Nakahara, Y. Nakahara, *Tetrahedron Lett.* **2007**, 48, 25; b) L. A. Erlich, K. S. Kumar, M. Haj-Yahya, P. E. Dawson, A. Brik, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, 8, 2392.
- [5] T. Klabunde, S. Sharma, A. Telenti, W. R. Jacobs, Jr., J. C. Sacchettini, *Nat. Struct. Biol.* **1998**, 5, 31.
- [6] B. W. Poland, M. Q. Xu, F. A. Quijcho, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 16408.
- [7] A. Romanelli, A. Shekhtman, D. Cowburn, T. W. Muir, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, 101, 6397.
- [8] a) X. Duan, F. S. Gimble, F. A. Quijcho, *Cell* **1997**, 89, 555; b) K. Ichianagi, Y. Ishino, M. Ariyoshi, K. Komori, K. Morikawa, *J. Mol. Biol.* **2000**, 300, 889; c) Y. Ding, M. Q. Xu, I. Ghosh, X. Chen, S. Ferrandon, G. Lesage, Z. Rao, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 39133.
- [9] Z. Du, J. Liu, C. D. Albracht, A. Hsu, W. Chen, M. D. Marieni, K. M. Colelli, J. E. Williams, J. N. Reitter, K. V. Mills, C. Wang, *J. Biol. Chem.* **2011**, 286, 38638.
- [10] K. Tori, M. Cheriyan, C. S. Pedamallu, M. A. Contreras, F. B. Perler, *Biochemistry* **2012**, 51, 2496.
- [11] F. B. Perler, *Nucleic Acids Res.* **2002**, 30, 383.
- [12] Z. Du, P. T. Shemella, Y. Liu, S. A. McCallum, B. Pereira, S. K. Nayak, G. Belfort, M. Belfort, C. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 11581.
- [13] Z. Du, Y. Zheng, M. Patterson, Y. Liu, C. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 10275.
- [14] R. Mizutani, S. Nogami, M. Kawasaki, Y. Ohya, Y. Anraku, Y. Satow, *J. Mol. Biol.* **2002**, 316, 919.
- [15] a) E. Werner, W. Wende, A. Pingoud, U. Heinemann, *Nucleic Acids Res.* **2002**, 30, 3962; b) P. Sun, S. Ye, S. Ferrandon, T. C. Evans, M. Q. Xu, Z. Rao, *J. Mol. Biol.* **2005**, 353, 1093; c) M. A. Johnson, M. W. Southworth, T. Herrmann, L. Brace, F. B. Perler, K. Wuthrich, *Protein Sci.* **2007**, 16, 1316; d) J. S. Oeemig, A. S. Aranko, J. Djupsjobacka, K. Heinamaki, H. Iwai, *FEBS Lett.* **2009**, 583, 1451; e) B. P. Callahan, N. I. Topilina, M. J. Stanger, P. Van Roey, M. Belfort, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2011**, 18, 630; f) J. S. Oeemig, D. Zhou, T. Kajander, A. Wlodawer, H. Iwai, *J. Mol. Biol.* **2012**, 421, 85.
- [16] G. Fischer, *Chem. Soc. Rev.* **2000**, 29, 119.
- [17] P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. B. Kent, *Science* **1994**, 266, 776.
- [18] a) C. Ludwig, M. Pfeiff, U. Linne, H. D. Mootz, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 5343; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 5218; b) C. Ludwig, D. Schwarzer, H. D. Mootz, *J. Biol. Chem.* **2008**, 283, 25264.
- [19] D. Schwarzer, C. Ludwig, I. V. Thiel, H. D. Mootz, *Biochemistry* **2012**, 51, 233.
- [20] a) J. Kang, D. Macmillan, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, 8, 1993; b) F. Mende, O. Seitz, *Angew. Chem.* **2011**, 123, 1266; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 1232.
- [21] T. Kawakami, S. Aimoto, *Tetrahedron Lett.* **2007**, 48, 1903.
- [22] J. Kang, J. P. Richardson, D. Macmillan, *Chem. Commun.* **2009**, 407.