



Parallele chemische Proteinsynthese auf der Oberfläche zur schnellen Analyse der Phosphoregulierung von SH3-Domänen

Robert Zitterbart und Oliver Seitz*

Abstract: Mangelnde Verfügbarkeit erschwert die Analyse posttranslational modifizierter Proteindomänen, denn rekombinante Methoden vermitteln nur selten die gewünschte Ortsspezifität. Die Totalsynthese ermöglicht zwar eine nahezu vollkommene Kontrolle über posttranslationale und andere Modifikationen, jedoch bleiben chemische Methoden auf kürzere Peptide beschränkt. Zur Lösung dieses Problems präsentieren wir hier eine Methode, die a) Immobilisierung N-terminaler Thio-Peptidhydrazide über Hydrazonverknüpfung, b) native chemische Ligation auf der Oberfläche mit selbstgereinigten Peptidthioestern c) radikalisch induzierte Entschwefelung und d) einen oberflächenbasierten Fluoreszenzbindungs-Assay zur funktionellen Charakterisierung kombiniert. Die Methode wurde zur schnellen Untersuchung von 20 SH3-Domänen verwendet. Die Analyse lässt schließen, dass Tyrosinphosphorylierung der SH3-Domänen in Abl-Kinasen als Schalter fungiert, der sowohl einen Verlust als auch einen Gewinn an Affinität für prolinreiche Liganden induzieren kann.

Die Kombination von Festphasenpeptidsynthese und nativer chemischer Ligation (NCL) ermöglicht es, posttranslationale Proteinmodifikationen (PTMs) mit einer Präzision zu untersuchen, die gängigen rekombinanten Methoden momentan nicht zugänglich ist.^[1] Dies trifft auch auf mechanistische Studien zur „Phosphoregulierung“ zu, bei der ortsspezifisch phosphorylierte Proteine benötigt werden.^[2] Rekombinante Methoden liefern zwar gefaltete Phosphoproteine,^[3] die eingeschränkte Verfügbarkeit geeigneter Proteinkinasen erschwert jedoch die globale Analyse alternativer Phosphoformen. Beispielsweise wird die SH3-Domäne des Abl-Proteins – eine Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase, die ursächlich mit der chronischen myeloischen Leukämie (CML) verknüpft ist^[4,5] – an allen drei Tyrosinresten phosphoryliert (Y⁷, Y³⁰, Y⁵²).^[6,7] Allein, verfügbare Kinasen wie Lyn, Fyn oder Hck phosphorylieren nur an zwei Stellen (Y⁷ und Y⁵²).^[8]

Die chemische Totalsynthese bietet uneingeschränkten Zugang zu Proteinphosphoformen. Allerdings ist die parallele Synthese mittels NCL^[9] eine mühsame Aufgabe, besonders wenn die zu verwendenden Proteinfragmente kaum löslich und schwierig zu reinigen sind. Um die Proteinsynthese zu vereinfachen, wurde die NCL auf polymeren Träger

durchgeführt.^[10] Die Notwendigkeit, relativ große Mengen HPLC-gereinigter Fragmente einzusetzen, ist ein Flaschenhals bei der Analyse alternativer PTMs. Wir stellten eine Methode vor, die eine rasche chemische Synthese von Proteindomänen mit nachfolgender Analyse auf Mikrotiterplatten ermöglicht.^[11] Die Methode basierte auf einem C-terminalen Hexahistidin-Tag, das die Immobilisierung auf Nickelbeschichteten Oberflächen ermöglicht. Dies erwies sich als problematisch. Wegen der Empfindlichkeit des Nickel-Histidin-Komplexes gegen Thioladditive wurde die NCL vor der Immobilisierung in Lösung durchgeführt. Schritte in Lösung sind jedoch arbeitsintensiv. Die Schwäche der Ni-His-Bindung war ebenso der Grund, wieso keine Methoden der erweiterten NCL, die auf Ligationsauxiliaren oder Entschwefelungsmethoden beruhen,^[12,13] verwendet wurden. Dies beschränkte die Synthese auf SH3-Domänen mit natürlich vorkommendem Cystein.

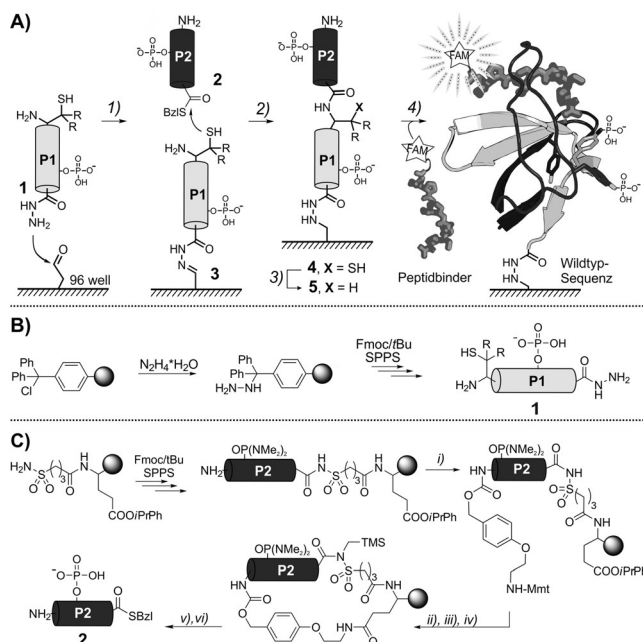
Wir suchten nach einer Methode, die eine rasche Synthese und funktionale Analyse aller in der Phosphosite-Datenbank gelisteten Phosphoformen ermöglichen sollte, ohne auf die Existenz von Cystein angewiesen zu sein. Wir erdachten eine Kombination aus Hydrazonverknüpfung (zur Immobilisierung von Cysteinylpeptidhydraziden **1**), Oberflächen-NCL mit biotinylierten Peptidthioestern **2** mit gleichzeitiger Hydrazonreduktion (für eine stabile Oberflächenverankerung), Entschwefelung sowie oberflächenbasierten Bindungsmessungen zur funktionellen Charakterisierung (Schema 1 A).

In einer Machbarkeitsstudie testeten wir die Synthese der SH3-Domäne des YSC84-Proteins aus Hefe. Zuerst prüften wir die Immobilisierungsschemie. Aldehyd-funktionalisierte Mikrotiterplatten wurden durch die Zugabe des Polyethylenglycol-Mercaptoacetal-Linkers **6** (hergestellt in drei Stufen; Abbildung S1 der Hintergrundinformationen) zu Maleimid-aktivierten, schwarzen 96er-Platten erhalten (Schema 2). Saure Acetalöffnung lieferte **7**. Im folgenden Schritt werden Peptidhydrazide **1** ungereinigt verwendet (erhalten durch automatisierte Festphasensynthese; Schema 1 B).^[14] Wir nahmen an, dass nur Vollängenpeptide in der nachfolgenden NCL reagieren können. Um die Hydrazonverknüpfung zu begünstigen, wurde die Immobilisierung über 1 h bei pH 4 in Gegenwart von Anilin durchgeführt (Abbildung S2).^[15] Die NCL der immobilisierten Peptide **3a** mit Peptidthioestern **2a** (hergestellt mittels Selbstreinigung, die Peptidthioester als Rohprodukte hoher Reinheit liefert; Schema 1 C, siehe Abschnitt 3.2 der Hintergrundinformationen, SI)^[11,16] fand an einer Leu-Cys-Verknüpfung statt, die eine folgende Umwandlung zur natürlichen Leu-Ala-Struktur ermöglicht (Schema 3). Die Reaktionsmischung wurde mit NaCNBH₃ versetzt, um das Hydrazon zu dem stabileren N-alkylierten Peptidhydrazid zu reduzieren. Somit wurde das

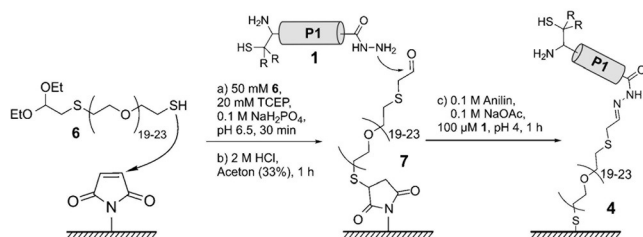
[*] R. Zitterbart, Prof. Dr. O. Seitz
Institut für Chemie
Humboldt-Universität zu Berlin
Brook-Taylor-Straße 2, 12489 Berlin (Deutschland)
E-Mail: oliver.seitz@chemie.hu-berlin.de

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind unter:
<http://dx.doi.org/10.1002/ange.201601843> zu finden.

Volllängenpeptid **4a** aus **2a** und **3a** erhalten. Ein Biotin-quantifizierungs-Assay ergab eine Beladung mit 144 pmol der YSC84-SH3-Domänen-A21C-Mutante **4a** pro Vertiefung



Schema 1. A) Oberflächensynthese/-analyse von Proteindomänen durch 1) Immobilisierung von Cystein- oder Penicillamin-Peptidhydraziden **1**; 2) NCL mit Peptidthioestern **2** und begleitende Reduktion des Hydrazons **3**; 3) radikalische Entschwefelung; 4) Oberflächenbindungsanalyse mit Fluorescein (FAM)-markierten Peptiden. B) Synthese der Peptidhydrazide **1**. C) Selbstreinigende Festphasensynthese (SPPS) von Peptidthioestern **2**: i) 5 Vol.-% NEt₃, 10 Äquiv. Mmt-NH-(CH₂)₂OC₄H₄CH₂OCOC₄H₄NO₂, ii) 1% TFA, iii) PyBOP, iv) Me₃SiCH₂N₂, v) NaSPH, BzSH und Waschen, vi) TFA-Spaltung vom Träger. Bzl = Benzyl, Fmoc = Fluorenylmethoxycarbonyl, Mmt = Monomethoxytrityl, PyBOP = Benzotriazolyl-1-oxy-tripyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat, TFA = Trifluoressigsäure.



Schema 2. Aldehydfunktionalisierung der Maleimid-aktivierten Mikrotiterplatten. R = H, CH₃. TCEP = Tris(carboxyethyl)phosphin.

2a: H-K^(BT)SATPTAVAL YNFAGEQPGD L-SBzl

2b: H-K^(BT)KENPWATAE YDYAAEDNE LTFVENDKII NIEF-SBzl

3a: H-CFKKGDVITI LKKSDSQND WWTGRTNGKEG IFPANYVRVS-NH₂
3b: H-PenDDDWLGEK EKDGSGLF PSNYVSLGN β Ala-NH₂

↓ i) NCL

H-K^(BT)SATPTAVAL YNFAGEQPGD **X**FKKGDVITI LKKSDSQNDW WTGRTNGKEG IFPANYVRVS-NH₂ → **4a**, X = Cys → **5a**, X = Ala
H-K^(BT)KENPWATAE YDYAAEDNE LTFVENDKII IEF**X**DDDWL GELEKDGSGLF LFPSNYVSLG N β Ala-NH₂ → **4b**, X = Pen → **5b**, X = Val

Schema 3. Oberflächensynthese der SH3-Domänen von YSC84 **5a** und AP1 **5b** aus Hefe. i) 100 μ M **2**, 0.1 M Na₂HPO₄, 3 M GdnHCl, 50 mM Natriumascorbat, 50 mM NaCNBH₃, 20 mM TCEP, 50 mM Natriummercaptoethylsulfonat, pH 7; ii) 0.1 M Na₂HPO₄, 3 M GdnHCl, 0.2 M VA044 (2,2'-Azobis[2-(2-imidazolin-2-yl)propan]dihydrochlorid), 0.25 M TCEP, 80 mM tBuSH (Cys) oder Glutathion (Pen), pH 6.5, 50°C, 5 h. GdnHCl = Guanidinium-Hydrochlorid.

(Abbildung S5).^[11] Da die maximale Beladung sich laut Hersteller auf 150 pmol beläuft, nahmen wir an, dass sowohl die Immobilisierung als auch die folgende NCL quantitativ verliefen. Das so erhaltene Peptid wurde der metallfreien Entschwefelung ausgesetzt.^[17] Dieser Schritt benötigt hohe Konzentrationen von Phosphinen und *tert*-Butylmercaptan oder Glutathion.^[18] Die Biotinbeladung blieb unverändert, was die Stabilität der Peptidhydrazidbindung unterstreicht (Abbildung S5).

Zur Erprobung des Oberflächenbindungs-Assays wurde die immobilisierte YSC84-SH3-Domäne mit einem bekannten Binder titriert, dem Peptid FAM- β Ala β Ala-GTTNRGPPPLPPRA-NH₂ (**8**; K_D = 1.3 μ M) des Hefeproteins ACF2 (Abbildung S11).^[19] Die synthetische YSC84-SH3-Domäne zeigte einen K_D-Wert von 1.2 μ M (Tabelle 1). Zum

Tabelle 1: Bindungsaffinitäten (bestimmt als K_D in μ M)^[a] von immobilisierten Cystein- oder Penicillaminmutanten oder entschweiften SH3-Domänen von YSC84 oder AP1 für prolinreiche Peptide ACF2 und YIR003 (FAM- β Ala β Ala-RPKRRAPPPVKKP-NH₂).

SH3-Domäne	ACF2, 8	YIR003, 9
A21C-Mutante von YSC84	1.9 \pm 0.4	10 \pm 2
entschwefelt zu nativem YSC84	1.2 \pm 0.3 (1.1) ^[b]	1.6 \pm 0.4
V34Pen-Mutante von Abp1	2.8 \pm 0.6	0.9 \pm 0.4
entschwefelt zu nativem Abp1	2.6 \pm 0.6	0.4 \pm 0.2 (0.1) ^[b]

[a] Bestimmt durch Fluoreszenzsättigungsanalyse auf der Oberfläche.

[b] Bestimmt nach Landgraf et al.^[19]

Vergleich immobilisierten wir die rekombinante, GST-markierte SH3-Domäne auf einer glutathionbeschichteten Platte. Die Oberflächenbindungsanalyse ergab K_D = 1.2 μ M. Dies stimmt mit dem K_D-Wert von 1.1 μ M überein, der bereits früher durch Oberflächenplasmonenresonanz bestimmt worden war.^[19] Für eine weitere Überprüfung der Messungen an der Oberfläche führten wir Bindungsexperimente in Lösung durch. Der in einem Fluoreszenzpolarisations (FP)-Assay ermittelte K_D-Wert von 1.4 μ M stimmte mit den Daten der Oberflächenbindungsanalyse überein (Abbildung S11). Auch untersuchten wir den Einfluss der Cysteinmutation. Wie sowohl der Oberflächen-Assay (Tabelle 1) als auch der FP-Assay in Lösung (Abbildung S11) zeigten, ist die Wechselwirkung der synthetischen A21C-Mutante mit dem Peptid **8** nur geringfügig geschwächt (K_D = 1.9 μ M). Einen größeren Einfluss übte die Cysteinsubstitution bei der Wechselwirkung mit dem prolinreichen Fragment von YIR003 **9** aus. Hier wurde die Affinität um 84% verringert (A21C-YSC84-SH3: K_D = 10 μ M; Wildtyp-YSC84-SH3: K_D = 1.6 μ M). Dies unter-

streicht die Bedeutung chemischer Methoden, durch die die Reichweite der NCL über Cysteinligationen hinaus erweitert werden kann.

Die Verwendung N-terminaler Thio-Aminosäuren ermöglicht – nach NCL und Entschwefelung – Zugang zu einer Vielzahl neuer Verknüpfungsstellen. Wir untersuchten die Pen-Ligation^[18] in der Oberflächensynthese der SH3-Domäne von Abp1 (**5b** in Schema 3). Das Pen-Peptidhydrazon **3b** wurde mit dem 34-mer Peptidthioester **2b** umgesetzt. Die Pen-Ligation verlief mit einer Ausbeute von 74% (Abbildung S6). Nachfolgend wurde die V34Pen-Mutante **4b** radikalisch entschweifelt, wodurch die Wildtyp-SH3-Domäne **5b** von Abp1 erhalten wurde. Das entschweifelte Protein hatte eine nur geringfügig niedrigere Affinität für die Peptidbinder **8** und **9** als das Protein vor der Entschwefelung (Tabelle 1). Wir folgerten, dass Penicillamin einen vergleichsweise guten Ersatz für Valin darstellt.

Nachdem die Machbarkeit gezeigt worden war, lenkten wir unsere Aufmerksamkeit auf die oberflächenbasierte Synthese und Analyse von phosphorylierten SH3-Domänen. Aufgrund der Bedeutung in der CML widmeten wir uns der SH3-Domäne des Abl-Proteins, einer Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase, die in Leukämiezellen häufig an Tyrosinresten phosphoryliert wird.^[6–8] Die SH3-Domäne erkennt *in cis* eine prolinreiche SH2-Kinase-Interdomäne und stabilisiert einen geschlossenen, inaktiven Zustand der Abl-Kinase (Abbildung 1 A, links). Wechselwirkungen mit prolinreichen SH3-Liganden *in trans* begünstigen die Öffnung zu einem aktiven Zustand (Abbildung 1 A, rechts).^[20]

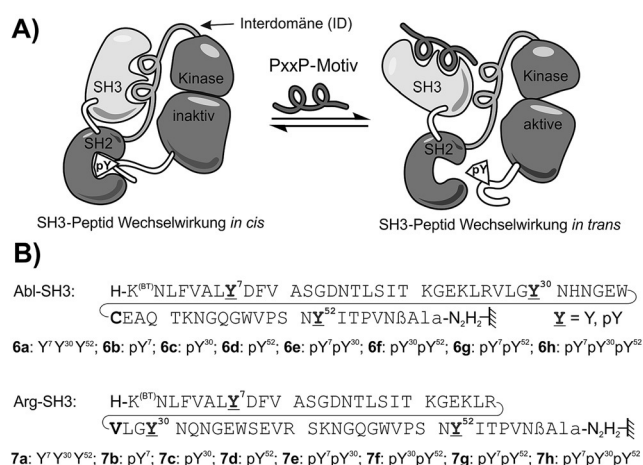


Abbildung 1. A) Aktivierung der Kinasen der Src-Familie durch Verdrängung der Interdomäne nach Moarefi et al.^[20a] B) Sequenzen der synthetischen Abl- und Arg-SH3-Domäne in verschiedenen Phosphoformen mit zugehöriger Nummerierung.

Phosphorylierung von SH3 erhöht die Abl-Kinaseaktivität, was mit einer Störung der Erkennung der prolinreichen Interdomäne *in cis* erklärt wurde.^[8b,21] Wenig jedoch ist über den Effekt der Phosphorylierung auf Wechselwirkungen *in trans* bekannt. Zusätzlich untersuchten wir die SH3-Domäne des Arg(Abl2)-Proteins, einer eng verwandten Kinase, die eine Rolle bei der Tumorentstehung spielen

soll.^[5b,22] Phosphoproteomikstudien ergaben sowohl bei der Abl- als auch bei der Arg-SH3-Domäne Hinweise auf Phosphorylierung an allen drei Tyrosinresten (Abbildung 1 B).^[6] Durch die Nutzung der Trp³⁶-Cys³⁷-Ligationsstelle stellten wir mithilfe vier verschiedener (Phospho)peptidthioester und zwei unterschiedlicher (Phospho)peptidhydrazide (Abbildung S12) acht unterschiedliche Abl-SH3-Domänen (**6a–h**) her. Einer ähnlichen Analyse folgend wurden für den Aufbau der Arg-SH3-Domäne (**7a–h**) über die Arg²⁶-Val²⁷-Ligationsstelle und nachfolgende Entschwefelung zwei (Phospho)peptidthioester und vier (Phospho)peptidhydrazide benötigt.

Zur funktionalen Analyse der phosphorylierten Abl- und Arg-SH3-Domänen wurden vier fluoreszenzmarkierte Peptide verwendet: zwei Liganden als Partialsequenzen der Adapterproteine 3BP1 und 3BP2,^[23] ein designtes Hochaffinitätspeptid p41^[24] sowie die Interdomänen(ID)-Sequenz zwischen der Abl-SH2- und Kinase-Domäne.^[25] Die Wechselwirkungen der drei ersten Peptide mit der nicht-phosphorylierten rekombinanten Abl-SH3-Domäne wurden bereits quantifiziert.^[23,24] Vergleichbare Werte wurden im Oberflächen-Assay mit der synthetischen Abl-SH3-Domäne erhalten (Tabelle 2).

Eher unerwartete Ergebnisse kamen bei der Messung der phosphorylierten SH3-Domänen zu Tage. Monophosphorylierung der Abl-SH3-Domäne führte zu einer 2–6-fachen Erhöhung der Affinität für den 3BP1-Liganden. Zu beachten ist, dass Doppelposphorylierung von Y³⁰ und Y⁵² die höchste Affinitätssteigerung (um eine Größenordnung) induzierte ($K_D = 3.0 \mu\text{M}$ von pY³⁰pY⁵² gegenüber $K_D = 40 \mu\text{M}$ für die nicht-phosphorylierte Abl-SH3-Domäne). Im Unterschied dazu hob die gleichzeitige Phosphorylierung von Y⁷ und Y⁵² die Wechselwirkung mit jedem der getesteten Liganden auf (Tabelle 2). Die beiden Tyrosinreste befinden sich in unmittelbarer Nachbarschaft zur Bindungsregion (Abbildung 2 A). Gleichzeitige Phosphorylierung von Y⁷ und Y⁵² könnte somit die Protein-Liganden-Erkennung hemmen.^[24,25] Bei der

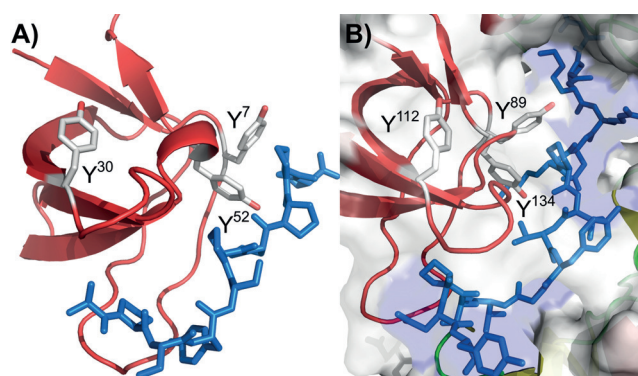


Abbildung 2. A) Röntgenkristallstruktur (PDB: 1BBZ)^[24] der Abl-SH3-Domäne mit p41 (blau) gebunden in der RT-schleife. Phosphorylierte Tyrosine sind in Stabdarstellung gezeigt. B) Röntgenkristallstruktur (PDB: 2FO0)^[25] der c-Abl-Tyrosinkinase. In der inaktiven Abl-Kinase-Form wechselwirkt die SH3-Domäne (rot) mit der SH2/Kinase-Interdomäne (blau). Die Seitenketten der entsprechenden Tyrosine sind gezeigt (Y⁸⁹ entspricht Y⁷ in der SH3-Nummerierung, Y¹¹² entspricht Y³⁰, und Y¹³⁴ entspricht Y⁵²).

Tabelle 2: Bindungsaffinitäten (als K_D in μM)^[a] der phosphorylierten (p) und nicht-phosphorylierten (–) humanen SH3-Domänen von Abl und Arg für prolinreiche Peptide 3BP1 (FAM- β Ala β AlaPTMPPPLPP), 3BP2 (FAM- β Ala β AlaPPAYPPPPVP), p41 (FAM- β Ala β AlaPTYSPPPPP) und das Abl-Interdomänenpeptid ID (FAM- β Ala β Ala-PAPKRNKPTVYGVSPPNY).

SH3-Domäne ^[f]			SH3-Liganden			
Y^7	Y^{30}	Y^{52}	3BP1	3BP2	p41	ID
Abl-Kinase						
–	–	–	40 ± 20 (34) ^[b] (24 \pm 2) ^[e]	4.4 ± 0.8 (5) ^[b]	1.6 ± 0.8 (1.5) ^[c]	6 ± 1.5 , (7 \pm 4) ^[d] (12 \pm 2) ^[e]
p	–	–	7 ± 3 (7 \pm 4) ^[d] , (10 \pm 1) ^[e]	5 ± 2 (5.7 \pm 0.6) ^[d]	12 ± 5 (16 \pm 4) ^[d]	nab nab ^[d,e]
–	p	–	15 ± 11	13 ± 6	2.4 ± 0.8	nab
–	–	p	7 ± 2 (6 \pm 3) ^[d]	4 ± 3 (3 \pm 1) ^[d]	0.7 ± 0.2 (0.6 \pm 0.3) ^[d]	nab nab ^[d]
p	p	–	13 ± 6	2.4 ± 0.5	1.5 ± 0.8	nab
–	p	p	3.0 ± 0.7 (2 \pm 1) ^[d]	10 ± 3 (10 \pm 6) ^[d]	0.6 ± 0.2 (0.7 \pm 0.2) ^[d]	nab nab ^[d]
p	–	p	nab, nab ^[d]	nab, nab ^[d]	nab, nab ^[d]	nab, nab ^[d]
p	p	p	nab	nab	nab	nab
Arg-Kinase						
–	–	–	19 ± 5	4.1 ± 0.4	1.4 ± 0.5	ng
p	–	–	10 ± 4	4 ± 2	1.6 ± 0.9	ng
–	p	–	6 ± 2	7 ± 4	5 ± 2	ng
–	–	p	5 ± 2	2.4 ± 0.9	0.8 ± 0.5	ng
p	p	–	19 ± 10	4.4 ± 0.7	1.8 ± 0.9	ng
–	p	p	15 ± 3	6 ± 1	2.6 ± 0.7	ng
p	–	p	nab	nab	nab	ng
p	p	p	nab	nab	nab	ng

[a] Bestimmt durch Fluoreszenzsättigungs-Bindungsmessung auf der Oberfläche (vgl. Abbildung S49–S55), Fehler sind die Standardabweichung. [b] Bestimmt von Viguera et al.^[23] [c] Bestimmt von Pisabarro et al.^[24] [d] Bestimmt durch Fluoreszenzpolarisation in Lösung (Abbildung S22–S24). [e] Bestimmt durch Trp-Emission in Lösung (Abbildung S25–S28). [f] Nummerierung der Tyrosinreste gibt die Position in der SH3-Domäne und nicht die im Protein an. nab = keine Affinität bestimmbar, ng = nicht gemessen.

Wechselwirkung mit dem 3BP2-Liganden führte die Doppelphosphorylierung zu bemerkenswerten Effekten. Während $\text{Y}^7, \text{Y}^{30}$ -Phosphorylierung die Bindung verbesserte, bewirkte die Phosphorylierung von Y^{30} und Y^{52} eine Abschwächung der 3BP2-Erkennung. Diese Beobachtung ist bemerkenswert. Im nicht-phosphorylierten Zustand wird Abl-SH3 den 3BP2-Liganden affiner binden als den 3BP1-Liganden. Gleichzeitige Phosphorylierung von Y^{30} und Y^{52} schaltet die Präferenz zu 3BP1, während $\text{Y}^7, \text{Y}^{52}$ -Doppelphosphorylierung die Domäne abschaltet. Der nachteilige Effekt des letztgenannten Phosphorylierungsmodus wurde auch für das designierte p41-Peptid beobachtet. Wie bereits bei 3BP1 verzeichnet, wurde p41 durch das $\text{pY}^{30}\text{pY}^{52}$ -Protein stärker gebunden – im submikromolaren Bereich – als durch das nicht-phosphorylierte Protein.

Die Analyse wurde mit der Arg-SH3-Domäne wiederholt. Wiederum störte die Phosphorylierung von Y^7 und Y^{52}

die Wechselwirkung mit den getesteten Peptidliganden. Die Arg-SH3-Domäne tolerierte andere Phosphorylierungsmoden, und Phosphorylierung von Y^{52} erhöhte die Affinität für 3BP1 um das 4-Fache.

Die Erhöhung der Affinität von 3BP1 und p41 für manche phosphorylierten Abl-SH3-Domänen schien vorherigen Berichten zu widersprechen, in denen ein Verlust der SH3-Funktion durch Phosphorylierung beschrieben wurde.^[8,25] Demnach führte die Phosphorylierung an Y^{89} (entspricht Y^7 in der SH3-Nummerierung) zu einem Phänotyp, der an eine verkürzte Abl-Kinase erinnert, in der die SH3-Domäne fehlte oder defekt war.^[4,5a] Es wurde vermutet, dass die phosphorylierte SH3-Domäne nicht mehr in der Lage war, die zwischen der SH2- und Kinase-Domäne befindliche, prolinreiche Interdomäne zu erkennen (Abbildung 1 A). Um diese Hypothese zu überprüfen, analysierten wir die Bindung zu dem Interdomänenpeptid ID. In der Kristallstruktur von c-Abl belegt dieses Peptid die SH3-Bindungsfurche (Abbildung 2 B).^[25] Die nicht-phosphorylierte Abl-SH3-Domäne erkannte das Interdomänenpeptid ID *in trans* mit $K_D = 6 \mu\text{M}$ (Tabelle 2).

Demgegenüber zeigten die Phospho-SH3-Domänen keine Affinität für ID. Dies bestätigt auf der einen Seite die vorherige Meinung; Phosphorylierung der SH3-Domäne stört die intramolekulare Erkennung der Interdomäne. Auf der anderen Seite wird die Bindung zu prolinreichen Segmenten nicht generell durch Phosphorylierung der Domäne behindert. Phospho-Abl-SH3 bleibt funktional und verändert darüber hinaus das Erkennungsrepertoire dahingehend, dass andere prolinreiche Proteinsegmente (z. B. 3BP1) bevorzugt *in trans* gebunden werden.

Früher durchgeführte massenspektrometrische Messungen des Wasserstoff-Deuterium-Austauschs legten nahe, dass Phosphorylierung an Y^7 die Wechselwirkung mit Abl-SH3-Liganden unterbindet.^[8b] Demgegenüber zeigen unsere Experimente, dass Y^7 -Phosphorylierung eine Erhöhung der Affinität für 3BP1, 3BP2 und p41 zur Folge hat. Um unsere Befunde durch einen Assay in Lösung validieren zu können, synthetisierten wir fünf Abl-SH3-(Phospho)formen in Lösung (Abbildung S15–S19). Die Synthese im präparativen Maßstab erwies sich als umständlich. Die geringe Löslichkeit der Peptidthioester erforderte eine aufwendige Optimierung, die nötig war, um eine ausreichende Menge des SH3-Proteins zur funktionalen Analyse in Lösung erhalten zu können. Diese Probleme traten nicht auf, wenn die Synthese und Evaluierung wie in Schema 1 beschrieben an der Oberfläche mit wesentlich geringeren Mengen und Konzentrationen durchgeführt wurde. Die gereinigten Phosphoproteine wurden in einem FP-Assay auf ihre Bindung mit fluoreszenzmarkierten Liganden 3BP1, 3BP2, p41 und ID untersucht (Abbildung S22–S24). Die so bestimmten Dissoziationskonstanten stimmten mit den Daten überein, die durch die Bindungstests an der Oberfläche erhalten wurden (Tabelle 2).

Als zusätzliche Kontrolle charakterisierten wir die Ligandenbindung durch Messung der Fluoreszenzemission von Tryptophan in der SH3-Domäne. Dies ermöglichte die Verwendung von unmarkierten Peptiden. Wieder fanden wir, dass die Y^7 -Phosphorylierung die Wechselwirkung mit dem unmarkierten ID' unterbindet, während die Affinität für un-

markiertes 3BP1' zunimmt (Tabelle 2, Abbildung S25–S28). Messungen der ^1H -NMR-chemischen Verschiebung untermauerten diesen Befund weiter und bestätigten, dass beide SH3-Formen gefaltet vorlagen (Abbildung S29–S33).

Mit den Daten von vier unabhängigen Messmethoden kann man spekulieren, dass die Tyrosinphosphorylierung der Abl-SH3-Domäne auch die beiden Aufgaben hat, die a) Öffnung/Aktivierung der Abl-Kinase durch einen induzierten Verlust an Bindungsaffinität für das interne ID-Peptidsegment zu erleichtern sowie b) die Rekrutierung von Adapterproteinen durch Erhöhung der Affinität für andere prolinreiche Segmente zu unterstützen. Phosphorylierungen von Abl-SH3 an Y^7 (Y^{89} in Vollängen-Abl) und Y^{52} (Y^{134} in Abl) durch Hck und andere Src-Familie-Kinasen wurden identifiziert und charakterisiert.^[8a,26] Unsere Bindungsdaten sprechen dafür, dass diese und möglicherweise auch andere Phosphorylierungsereignisse als Schalter fungieren, durch den nicht nur die Aktivierung von Abl unterstützt wird, sondern auch eine Feinregulierung der Rekrutierung von Adapterproteinen möglich wird. Während die Anzahl an Einträgen für die Y^{30} -Phosphorylierung, die durch massenspektrometrische Proteomik zugeordnet wurden, hoch ist (196 Einträge gegenüber 12 Einträgen für Y^7 und 221 Einträgen für Y^{52}) gibt es bisher, mit der Ausnahme unserer Arbeit, keinen Bericht, in dem dieses Phosphorylierungsereignis durch andere Methoden charakterisiert wird.^[6]

Wir eine Methode entwickelt, die einen schnellen und robusten Zugang zu Arrays phosphorylierter Proteindomänen liefert. Die Hydrazonverknüpfung ermöglichte die Immobilisierung von Cysteinylpeptiden, die anschließend in einer NCL-Reduktions-Reaktionssequenz eingesetzt wurden. Die oberflächenverknüpfte Peptidhydrazidbindung widerstand den Bedingungen der metallfreien Entschwefelungsreaktion. Sowohl die Peptidthioester als auch die Cysteinylpeptide wurden in Form von Rohprodukten verwendet, was den Ansatz schnell und komfortabel macht. Wir zeigten Verknüpfungen an Cystein, Alanin (Cys \rightarrow Ala) und Valin (Pen \rightarrow Val) und erwarten eine generelle Anwendbarkeit auf alle Thiobausteine, die bis heute in der erweiterten NCL Verwendung gefunden haben.^[12,27] Obwohl dies bei den hier getesteten SH3-Domänen unproblematisch war, merken wir einschränkend an, dass es sich in künftigen Studien als limitierend erweisen mag, die korrekte Faltung der immobilisierten Proteine sicherzustellen.

Die Bindungsanalyse der unterschiedlichen Phosphoformen lässt darauf schließen, dass Tyrosinphosphorylierung das Erkennungsrepertoire von SH3-Domänen regulieren kann. Wir haben gezeigt, dass die Phosphorylierung von Abl-SH3 (an Y^{30} und Y^{52}) die Affinität für spezifische prolinreiche SH3-Liganden um eine Größenordnung erhöht. Im Unterschied dazu schaltet gleichzeitige Phosphorylierung von Y^7 und Y^{52} oder Perphosphorylierung die SH3-Domäne aus. Bedenkt man die Bedeutung und den hohen Grad an Phosphorylierung der Abl-Kinase in chronisch myeloischer Leukämie und anderen Krebstypen^[4,5] scheint es plausibel anzunehmen, dass die Phosphoregulierung der SH3-Domänenfunktion zur Neuordnung des Proteininteraktionsnetzwerks während der Krebsentwicklung beiträgt.

Danksagung

Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft finanziell unterstützt (Se 819/9-2, SPP 1624). Wir danken Dr. Andre Dahmann für die NMR-Messungen der synthetischen Abl-SH3-Domäne und Luxembourg Bio Technologies Ltd. für die Spende von OxymaPure.

Stichwörter: Abl · Entschwefelung · Immobilisierung · Native chemische Ligation · Proteinphosphorylierung

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 7252–7256
Angew. Chem. **2016**, 128, 7368–7373

- [1] S. B. H. Kent, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, 38, 338–351; D. P. Gamblin, E. M. Scanlan, B. G. Davis, *Chem. Rev.* **2009**, 109, 131–163; C. P. R. Hackenberger, D. Schwarzer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 10030–10074; *Angew. Chem.* **2008**, 120, 10182–10228; V. Muralidharan, T. W. Muir, *Nat. Methods* **2006**, 3, 429–438; T. Abeywardana, M. R. Pratt, *ChemBioChem* **2014**, 15, 1547–1554; Y. Kajihara, M. Izumi, K. Hirano, T. Murase, D. Macmillan, R. Okamoto, *Isr. J. Chem.* **2011**, 51, 917–929; M. J. Stone, R. J. Payne, *Acc. Chem. Res.* **2015**, 48, 2251–2261.
- [2] Z. Chen, P. A. Cole, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2015**, 28, 115–122; W. Lu, K. Shen, P. A. Cole, *Biochemistry* **2003**, 42, 5461–5468; K. P. Chooi, S. R. G. Galan, R. Raj, J. McCullagh, S. Mohammed, L. H. Jones, B. G. Davis, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136, 1698–1701; M. K. Tarrant, H.-S. Rho, Z. Xie, Y. L. Jiang, C. Gross, J. C. Culhane, G. Yan, J. Qian, Y. Ichikawa, T. Matsuoka, N. Zachara, F. A. Etzkorn, G. W. Hart, J. S. Jeong, S. Blackshaw, H. Zhu, P. A. Cole, *Nat. Chem. Biol.* **2012**, 8, 262–269.
- [3] G. Burnett, E. P. Kennedy, *J. Biol. Chem.* **1954**, 211, 969–980; H. Dai, H. Ding, X. W. Meng, S.-H. Lee, P. A. Schneider, S. H. Kaufmann, *Cancer Res.* **2013**, 73, 6998–7008.
- [4] a) J. Y. J. Wang, *Curr. Opin. Genet. Dev.* **1993**, 3, 35–43; b) W. Franz, P. Berger, J. Wang, *EMBO J.* **1989**, 8, 137–147; c) P. Jackson, D. Baltimore, *EMBO J.* **1989**, 8, 449–456.
- [5] a) S. Wong, O. Witte, *Annu. Rev. Immunol.* **2004**, 22, 247–306; b) E. K. Greuber, P. Smith-Pearson, J. Wang, A. M. Pendergast, *Nat. Rev. Cancer* **2013**, 13, 559–571.
- [6] <http://www.phosphosite.org> zeigt viele Daten für die Phosphorylierung von Abl-SH3 an pY^7 (14 Einträge), pY^{30} (196 Einträge), pY^{52} (223 Einträge) und für Arg-SH3 an pY^7 (10 Einträge), pY^{30} (1 Eintrag), pY^{52} (220 Einträge) in Leukämie und anderen Krebszellen (18.02.2016). Die Positionen Y^7 , Y^{30} und Y^{52} (SH3-Nummerierung) entsprechen Y^{70} , Y^{93} und Y^{115} in Arg sowie Y^{116} , Y^{139} und Y^{161} in Abl.
- [7] Z. Tatárová, J. Brábek, D. Rösler, M. Novotný, *PLoS One* **2012**, 7, e36310.
- [8] a) M. A. Meyn, M. B. Wilson, F. A. Abdi, N. Fahey, A. P. Schiavone, J. Wu, J. M. Hochrein, J. R. Engen, T. E. Smithgall, *J. Biol. Chem.* **2006**, 281, 30907–30916; b) S. Chen, L. P. O'Reilly, T. E. Smithgall, J. R. Engen, *J. Mol. Biol.* **2008**, 383, 414–423.
- [9] P. Dawson, T. Muir, I. Clark-Lewis, S. Kent, *Science* **1994**, 266, 776–779.
- [10] L. E. Canne, P. Botti, R. J. Simon, Y. Chen, E. A. Dennis, S. B. H. Kent, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 8720–8727; L. Raibaut, H. Adihou, R. Desmet, A. F. Delmas, V. Aucagne, O. Melnyk, *Chem. Sci.* **2013**, 4, 4061–4066; M. Jbara, M. Seenayah, A. Brik, *Chem. Commun.* **2014**, 50, 12534–12537.
- [11] F. Mende, M. Beisswenger, O. Seitz, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 11110–11118.
- [12] a) S. F. Loibl, Z. Harpaz, O. Seitz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, 54, 15055–15059; *Angew. Chem.* **2015**, 127, 15269–15273; b) Z.

- Harpaz, S. Loibl, O. Seitz, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, 26, 1434–1437.
- [13] H. Rohde, O. Seitz, *Pept. Sci.* **2010**, 94, 551–559.
- [14] G.-M. Fang, Y.-M. Li, F. Shen, Y.-C. Huang, J.-B. Li, Y. Lin, H.-K. Cui, L. Liu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 7645–7649; *Angew. Chem.* **2011**, 123, 7787–7791.
- [15] A. Dirksen, S. Dirksen, T. M. Hackeng, P. E. Dawson, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 15602–15603.
- [16] F. Mende, O. Seitz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 4577–4580; *Angew. Chem.* **2007**, 119, 4661–4665.
- [17] Q. Wan, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 9248–9252; *Angew. Chem.* **2007**, 119, 9408–9412.
- [18] C. Haase, H. Rohde, O. Seitz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 6807–6810; *Angew. Chem.* **2008**, 120, 6912–6915.
- [19] C. Landgraf, S. Panni, L. Montecchi-Palazzi, L. Castagnoli, J. Schneider-Mergener, R. Volkmer-Engert, G. Cesareni, *PLoS Biol.* **2004**, 2, 94–103.
- [20] a) I. Moarefi, M. LaFevre-Bernt, F. Sicheri, M. Huse, C.-H. Lee, J. Kuriyan, W. T. Miller, *Nature* **1997**, 385, 650–653; b) B. Nagar, O. Hantschel, M. A. Young, K. Scheffzek, D. Veach, W. Bornmann, B. Clarkson, G. Superti-Furga, J. Kuriyan, *Cell* **2003**, 112, 859–871; c) O. Hantschel, G. Superti-Furga, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2004**, 5, 33–44.
- [21] S. Panjarian, R. E. Iacob, S. Chen, J. R. Engen, T. E. Smithgall, *J. Biol. Chem.* **2013**, 288, 5443–5450.
- [22] D. Srinivasan, D. M. Kaetzel, R. Plattner, *Cell. Signalling* **2009**, 21, 1143–1150.
- [23] A. R. Viguera, J. L. R. Arrondo, A. Musacchio, M. Saraste, L. Serrano, *Biochemistry* **1994**, 33, 10925–10933.
- [24] M. Pisabarro, L. Serrano, M. Wilmanns, *J. Mol. Biol.* **1998**, 281, 513–521.
- [25] B. Nagar, O. Hantschel, M. Seeliger, J. M. Davies, W. I. Weis, G. Superti-Furga, J. Kuriyan, *Mol. Cell* **2006**, 21, 787–798.
- [26] H. Steen, M. Fernandez, S. Ghaffari, A. Pandey, M. Mann, *Mol. Cell. Proteomics* **2003**, 2, 138–145; T. Pene-Dumitrescu, T. E. Smithgall, *J. Biol. Chem.* **2010**, 285, 21446–21457.
- [27] Eine aktuelle Übersicht: L. R. Malins, R. J. Payne, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, 22, 70–78.

Eingegangen am 22. Februar 2016

Online veröffentlicht am 10. Mai 2016