

OLIVER SEITZ

Proteine, Nucleinsäuren und Hybride zur Erforschung biologischer Systeme/ Bioorganische Synthese

Die Gruppe entwickelt Methoden zur chemischen Synthese von Proteinen und Nucleinsäuren sowie deren Hybriden. Als biomolekulare Werkzeuge eingesetzt, können mit diesen Verbindungen biologische Vorgänge gezielt untersucht werden.

Allgemeine Einführung in das Fachgebiet

Auf molekularer Ebene ist Leben durch eine Vielfalt biomolekularer Wechselwirkungen definiert. DNA und RNA erkennen sich gegenseitig und gewährleisten die Speicherung und die Weitergabe genetischer Information. Spezialisierte Adaptermoleküle übersetzen bei der Proteinbiosynthese die buchstabenähnliche Sprache der Erbinformation in die Form-

men- und Funktionssprache der Proteinwelt. Diese wiederum wechselwirken mit den Erbmolekülen, anderen

Internet

www2.chemie.hu-berlin.de/seitz



Linke Abb.: Beispiele biomolekularer Interaktionsmodule. Links: Struktur eines DNA-Peptidnucleinsäure-Komplex (Pdb: 1PDT), Rechts: Struktur von Smac im Komplex mit der BIR3-Domäne von XIAP (Pdb: 1G73)
oben: Dr. Oliver Seitz, Professor für Bioorganische Synthese am Institut für Chemie der Humboldt-Universität zu Berlin.

Proteinen sowie den Substanzen, die durch die katalytische Funktion von Proteinen hergestellt werden. Bei aller Komplexität der aufgebauten Netzwerke, oftmals werden von Biomolekülen immer wieder typähnliche, spezialisierte Erkennungsmodule eingesetzt. Eines der Hauptanliegen der Medizinischen Chemie und der Chemischen Biologie ist es, in diese Vorgänge einzugreifen, um etwa einer Fehlfunktion zu begegnen oder durch eine gezielte Störung über die Bedeutung des Vorgangs für die Zelle zu lernen. Die Gruppe Seitz nimmt die natürlicherweise vorkommenden Wechselwirkungsmodule zum Vorbild und stattet diese durch die Mittel der chemischen Synthese mit neuen Funktionen aus. Dies stellt besondere Anforderungen an die Synthesechemie, denn es gilt, selbst komplexe Bio-

Abstract

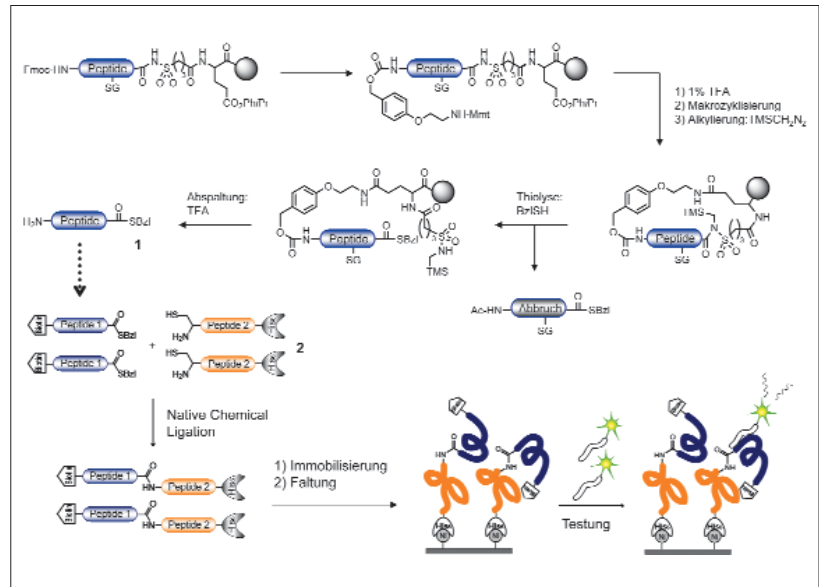
The group develops methods for the chemical synthesis of proteins and nucleic acids and their hybrids. The conjugates are used as biomolecular tools in the interrogation of biological processes.

moleküle für eine bestimmte Funktion maßzuschneidern. Eines der Ziele ist es, Moleküle herzustellen, die die Anwesenheit eines bestimmten RNA-Moleküls durch Aussenden von Fluoreszenzlicht sogar in lebenden Zellen anzeigen. Es ist möglich, mit den Methoden der chemischen Totalsynthese funktionale Proteine herzustellen und diese zu verändern. Durch die Konstruktion von chimären Molekülen, die sowohl Nucleinsäure- als auch Proteineigenschaften aufweisen, könnte es gelingen, einen Wirkstoff nur in kranken Zellen freizusetzen, so dass gesunde Zellen nicht unter Nebenwirkungen zu leiden haben.

Forschungsgebiete

■ **Totalsynthese von Proteinen**

Die chemische Proteinsynthese ist im Gegensatz zur biologischen Synthese nicht auf proteinogene Aminosäuren beschränkt. Auch können Modifizierungen, die in einer Zelle die Funktion der Proteine regulieren, durch chemische Synthese einheitlicher vorgenommen werden als durch die Biosynthese. Allerdings ist die chemische Synthese funktionsfähiger Proteine kein triviales Unterfangen. Noch in den 90igern galt dies als unpraktikabel. Dies hat sich mit der Erfindung der Nativen Chemischen Verknüpfung geändert. Hierbei wird ein großes Protein durch schrittweise Kupplung von Teilsegmenten hergestellt. Diese gelingen in Wasser und führen zu einer natürlichen Peptidbindung, der man nicht ansieht, dass sie über chemische Methoden geknüpft wurde. Grundlage ist die Reaktion eines Peptidthioesters mit einem Segment, das einen N-terminalen Cysteinrest trägt. Allerdings sind Peptidthioester nicht so einfach herzustellen wie die sonst verwendeten Peptidsäuren und -amide. Zudem ist Cystein eine seltene Aminosäure, so dass es oftmals erforderlich ist, ein künstliches Cystein einzuführen. Hier setzen die Arbeiten der Gruppe Seitz an. Es wird versucht, zum einen die



Synthese von Peptidthioestern zu vereinfachen und zum anderen die Beschränkung auf die Aminosäure Cystein aufzuheben bzw. Verfahren zu entwickeln, mit denen rasch ermittelt werden kann, ob bei einem gegebenen Protein ein künstliches Cystein toleriert wird. In Abb. 1 ist als Beispiel ein Verfahren gezeigt, bei dem ein integrierter Selbstreinigungseffekt Peptidthioester 1 hoher Reinheit liefert (Mende 2010). Diese können nach der Synthese ohne Reinigungsschritte direkt mit den Cysteinylpeptiden 2 umgesetzt werden. Die anschließende Bindung der Produkte an Oberflächen erleichtert die Testung der Proteinfunktion. Mit diesem Verfahren kann eine Cysteinraasterung des interessierenden Proteins durchgeführt werden, so dass sehr rasch ermittelt werden kann, welche Aminosäuren für die Proteinfunktion nötig sind.

■ **Bildgebender Nachweis viraler mRNA in infizierten Zellen**

RNA-Moleküle dienen nicht nur als transportable Blaupausen für die Herstellung von Proteinen, sondern RNA hat auch regulatorische Funktion inne. Es herrscht ein großes Interesse, die Entstehung und Lokalisierung von RNA-Molekülen in einer lebenden Zelle verfolgen zu können. In Zusammenarbeit mit Forschern am Institut für Biologie (AG Herrmann) interessieren wir uns in einem langfristig angelegten Forschungsprojekt dafür, die zeitlichen und räumlichen Muster des Viruszusammenbaus in einer infizierten Zelle zu ermitteln. Hierzu entwickelten wir eine neue Klasse von Sondenmolekülen (Abb. 2), den sogenannten FIT-Sonden, die bestimmte virale mRNA in einer

Abb. 1 Rasche chemische Totalsynthese funktionaler Proteine. Die automatisierte Festphasensynthese von Peptidthioestern mit Selbstreinigungseffekt gelingt an einem Sulfonamidlinker durch eine Abfolge von Makrozyklisierungs-, Alkylierungs- und Thiolyse-Reaktionen. Die in der Abspaltungsreaktion erhaltenen Peptidthioester liefern nach der Nativen Chemischen Peptidkupplung und Immobilisierung Proteindomänen-Arrays.

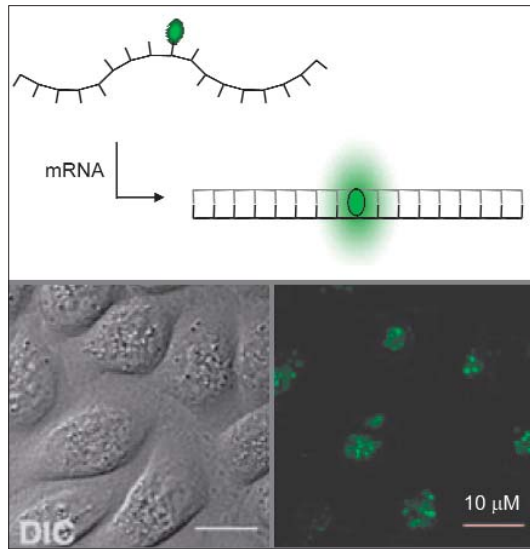
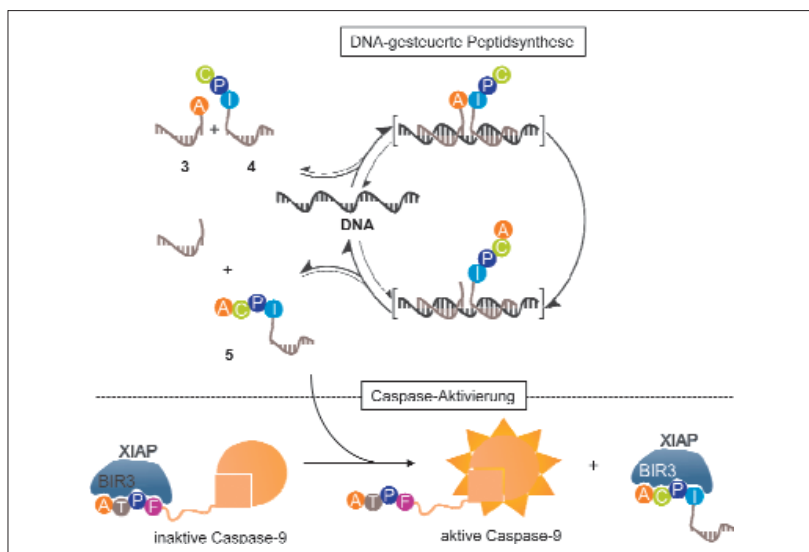


Abb. 2
Visualisierung von mRNA des Influenzavirus H1N1 in lebenden infizierten Zellen durch so genannte FIT-Sonden.

lebenden Zelle erkennen und dies durch Verstärkung eines Fluoreszenzsignals anzeigen (Kummer 2011). Die Sonden basieren auf dem DNA-analogen PNA-Rückgrat, das im Gegensatz zu konventionell verwendeten Oligonucleotidsonden von den Enzymen einer Zelle nicht abgebaut werden kann. Ein hochspezialisierter Fluorophor aus der Familie der Thiazolorange-Derivate wurde anstelle einer Nucleobase eingebaut. Durch diesen Anbindungsmodus erfährt der Fluorophor nur dann eine Fluoreszenzintensivierung, wenn er nach Bindung an die Ziel-RNA im Inneren der sich bildenden Helix positioniert wird. Der unvermeidbare Kontakt mit den Proteinen einer Zelle lässt die Fluoreszenzeigenschaften unberührt. So leuchten Sonden, die gegen die mRNA von Neuraminidase des H1N1-Influenzavirus gerichtet sind, nur in virusinfizierten Zellen auf (Abb. 2). Nichtinfizierte Zellen bleiben dunkel.

Abb. 3
DNA- bzw. RNA-gesteuerte Peptidsynthese



■ Nucleinsäure-gesteuerte Aktivität

Die Fähigkeit zur gegenseitigen Erkennung ist eine Schlüsseleigenschaft von DNA und RNA. Die Bildung der dabei entstehenden Komplexe folgt wohl-bekanntem Gesetzmäßigkeiten und gelingt daher in vorhersehbarer Weise. Dies ermöglicht es, DNA oder RNA als eine Schablone zu verwenden, durch die chemische Gruppen und Funktionseinheiten selbst auf nanometergroßen Strukturen mit Angstromgenauigkeit platziert werden können. Wir nutzen dies, um chemische Reaktionen unter die Kontrolle von DNA oder RNA zu stellen. Die chemischen Reaktionen werden so entworfen, dass eine DNA- oder RNA-Sequenz in der Lage ist, Verknüpfungsreaktionen oder Transferreaktionen zu beschleunigen. Eines der Ziele ist es, das Reaktionsdesign so zu entwickeln, dass ein Templatmolekül die Bildung mehrerer Produktmoleküle steuert und damit gewissermaßen die Aktivität eines Katalysators erwirbt. Da die Reaktionsprodukte nur bei Anwesenheit der »richtigen« Sequenz entstehen, ist es möglich, DNA oder RNA mit hoher Empfindlichkeit und Genauigkeit nachzuweisen. Die Methode kann auch für den DNA- oder RNA-gesteuerten Aufbau eines biologisch wirksamen Peptids genutzt werden. So entwickelten wir ein Reaktionssystem (Abb. 3), bei welchem die Sequenzinformation eines unstrukturierten DNA-Templats genutzt wird, um die Übertragung eines Alaninrests vom Konjugat 3 auf das Peptid-Konjugat 4 auszulösen (Erben 2011). Das entstehende Peptid 5 kann in einer Zelle ein Programm zum gezielten Zelltod anstoßen. Normalerweise ist das Immunsystem in der Lage, entartete Zellen zu erkennen und diese in den programmierten Zelltod zu treiben. Viele Krebszellen schützen sich durch so genannte anti-apoptotische Inhibitorproteine wie XIAP (X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein). Durch Bindung des gebildeten Peptid-Konjugats 5 an XIAP kann das Selbstmordprogramm der kranken Zelle reakt-

tiviert werden. Die Konjugate 3 und 4 würden also als »Molekulare Doktoren« wirken. Zunächst würden die Molekularen Doktoren die Gegenwart einer bestimmten krankheitsrelevanten DNA- oder RNA-Sequenz entdecken (= Diagnose). Die gleichzeitige Bindung an diese DNA oder RNA würde sodann die Bildung eines Zellgifts bewirken (= Therapie). Bislang haben Seitz und Mitarbeiter in Versuchen im Reagenzglas gezeigt, dass die den programmierten Zelltod steuernden Enzyme, die Caspasen, aktiviert werden können. Der Prozess gelingt auch in Gegenwart aller Biomoleküle, die in einer Zelle zu finden sind (d.h. im Zellysate). In zukünftigen Arbeiten werden zelluläre Testsysteme erprobt.

In Zusammenarbeit mit Forschern in Berlin (Sonderforschungsbereich 765) verwendet die Gruppe Seitz DNA als ein molekulares Lineal, um den Abstand zwischen den Bindungstaschen von biologischen Rezeptoren zu ermitteln (s. Abb. 4). Bei passender Anordnung der vom Rezeptor erkannten Liganden auf DNA-Architekturen binden die Konstrukte mit hoher Affinität an den Rezeptor, was wiederum Möglichkeiten für die Hemmung

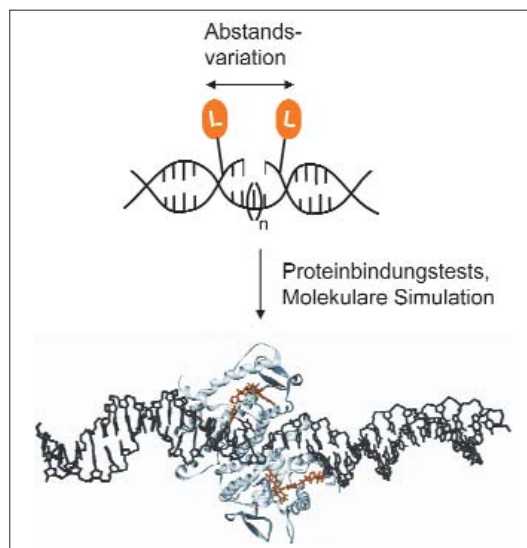


Abb. 4 DNA-basierte räumliche Rasterung von Rezeptoren. Ein Ligand L für einen Rezeptor wird an Oligonucleotide gebunden. Nach Zugabe komplementärer DNA-Stränge bilden sich bivalente Komplexe. Durch Variation der Anzahl ungepaarter Nucleotide kann der Abstand zwischen den Liganden verändert werden. Die Struktur unten modelliert die Bindung eines bivalenten DNA-Raloxifen-Komplexes an den Östrogenrezeptor.

(oder Aktivierung) dieses Rezeptors bietet. Das Prinzip der Abstandsraasterung durch Nucleinsäure-Schablonen wurde an drei bekannten biologischen Zielstrukturen validiert. So konnten die Abstände zwischen den Bindungstaschen eines zuckerbindenden Proteins (Lektin von Erythrina Cristigalli), einer peptidbindenden Proteindomäne (Tandem-SH2-Domäne der Syk-Kinase) sowie des Östrogenrezeptors (s. Abb. 4) bestimmt werden. In den Folgearbeiten untersucht die Gruppe Seitz nun strukturell nicht charakterisierte Proteine. Auch werden Rezeptoraggregate auf Zell- und Virusoberflächen räumlich abgerastert.

Ausgewählte Publikationen

- F. Mende, M. Beisswenger, O. Seitz, *J. Am. Chem. Soc.* 2010, 132, 11110;
- S. Kummer, A. Knoll, E. Socher, L. Bethge, A. Herrmann, O. Seitz, *Angew. Chem.* 2011, 123, 1972;
- A. Erben, T.N. Grossmann, O. Seitz, *Angew. Chem.* 2011, 123, 2880;
- F. Abendroth, A. Bujotzek, M. Shan, R. Haag, M. Weber, O. Seitz, *Angew. Chem.* 2011, 123, 8751.

Prof. Dr. Oliver Seitz

Jg. 1966. 1985–1991 Studium der Chemie an der Gutenberg-Universität Mainz; 1992–1995 Promotion an der Gutenberg-Universität Mainz; 1996–1997 Postdoktorat am Scripps Research Institute in San Diego; 1997–2000 Gruppenleiter an der Technischen Universität Karlsruhe; 2000–2003 Gruppenleiter am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund; 2002 Venia Legendi in Organischer Chemie an der Universität Dortmund. Seit 2003 Professur für Organische und Bioorganische Synthese an der Humboldt-Universität zu Berlin

Humboldt-Universität zu Berlin • Institut für Chemie

E-Mail: oliver.seitz@chemie.hu-berlin.de • www2.chemie.hu-berlin.de/seitz

Kooperationen

- Jens Dornedde, Charité – Universitätsmedizin Berlin
- Nikolaus Ernsting, Humboldt-Universität
- Christian Freund, Leibniz-Institut für molekulare Pharmakologie
- Rainer Haag, Freie Universität Berlin
- Volker Haucke, Freie Universität Berlin
- Andreas Herrmann, Humboldt-Universität
- Marcus Weber, Zuse-Institut Berlin
- Jesper Wengel, University of Southern Denmark, Odense