

Struktur und Mechanismus einer Aspartimid-abhängigen Peptidligase in humanem Legumain^{**}

Elfriede Dall, Julia C. Fegg, Peter Briza und Hans Brandstetter*

Abstract: Peptidligasen erweitern das genetisch kodierte Repertoire der Proteinstrukturen und -funktionen. Unter Verbrauch von ATP oder NTP knüpfen diese Ligasen nicht-kanonische Peptidbindungen. Hier beschreiben wir die Entdeckung einer konzeptuell neuen Ligaseaktivität im humanen Legumain (AEP). Legumain ist eine Cysteinprotease, die eine wichtige Rolle für die Immunabwehr und im Tumorgeschehen spielt. Diese Aufgaben wurden bis dato ihrer gut charakterisierten Proteaseaktivität zugeschrieben. Völlig unerwartet erweist sich der der Ligaseaktivität zugrunde liegende Mechanismus unabhängig vom katalytischen Cystein. Stattdessen wird bei der Ligation die Umwandlung eines energiereichen, metastabilen Aspartimids zu Aspartat als endogenes Energiereservoir genutzt. Während die Proteasefunktion bei saurem pH dominiert, zeigt die Ligase bei neutralem pH ihr Aktivitäts optimum. Diese pH-Abhängigkeit der beiden gegensätzlichen Aktivitäten legt nahe, dass die Lokalisierung des Enzyms über seine Funktion bestimmt. Relevant wird diese duale Wirkungsweise beispielsweise beim reversiblen Ein-/Ausschalten von Inhibitoren der Cystatin-Familie, bei der (In-)Aktivierung von Enzymen, wie auch bei der Generierung von 3D-Epitopen für die Beladung von MHCII-Rezeptoren. Zudem stellt das hier verwendete Aspartat-Aspartimid-(Succinimid)-Paar eine neue Möglichkeit dar, endergonische Reaktionen in ATP-armen Umgebungen durch Kupplung zu realisieren.

Die Cysteinprotease Legumain wurde ursprünglich in endolysosomalen Zellkompartimenten entdeckt, in denen es als Schlüsselenzym bei der Prozessierung von Fremdantigenen für die anschließende Präsentation durch Immunrezeptoren agiert.^[1] Neben anderen Funktionen wird ihr auch eine wichtige Rolle bei der Reifung von TLRs^[2] bzw. bei der Metastasierung von Tumoren zugeschrieben.^[3] Auf einer funktionellen Ebene kann Legumain, abhängig vom pH und der zellulären Umgebung, sowohl Asparagin-spezifische Endopeptidase(AEP)- als auch Carboxypeptidaseaktivitäten

(ACP) entwickeln.^[4] Um Fehlschaltungen zu verhindern, bedarf es daher einer komplexen Regulation dieser Proteaseaktivitäten. Die Typ 2 Cystatine C, F und, wegen seines hohen inhibitorischen Potenzials, im speziellen Cystatin E/M spielen hier von Natur aus eine wichtige Rolle.^[5] Bei der Untersuchung des Wirkungsmechanismus von Cystatin E/M auf Legumain entdeckten wir eine Peptidligaseaktivität in Legumain, die zur Katalyse keine exogene Energiequelle (ATP) benötigt. Während bindungskonservierende Modifikationen, wie man sie z.B. in Inteinen oder Sortasen findet, energetisch ausgeglichen ablaufen (d.h. es werden nur Bindungen verschoben),^[6] brauchen professionelle Ligasen die Kupplung an eine exogene Energiequelle.^[7] Ligase- und Zyklaseaktivitäten wurden bereits für pflanzliche Legumaine beschrieben, der zugrunde liegende Mechanismus war bis jetzt allerdings gänzlich unverstanden.^[6b,8] Diese teilweise widersprüchlichen Beobachtungen nahmen wir zum Anlass, humanes Cystatin E (hCE) alleine sowie im Komplex mit Legumain zu kristallisieren und strukturbiologisch zu untersuchen.

Cystatin E weist die klassische Cystatin-Faltung auf, die durch ein 5-strängiges antiparalleles β -Faltblatt, das sich um eine zentrale α -Helix schmiegt, gekennzeichnet ist. Die Cystatin-Faltung wird zusätzlich durch zwei Disulfide zwischen den Strängen $\beta 4$ und $\beta 5$ sowie der hCE-spezifischen Appendixstruktur stabilisiert. Letztere ist zwischen den Strängen $\beta 3$ und $\beta 4$ inseriert (Abbildung 1a sowie Abbildung S1 und Tabelle S1 in den Hintergrundinformationen). Teile der Appendixstruktur (Thr76-His82) waren nicht durch die Elektronendichtheckarte definiert, d.h. flexibel in ihrer Konformation.

Die Wechselwirkung von papainartigen Proteasen mit Cystatinen wurde mit dem sogenannten „Elefantenrüssel“-Modell beschrieben.^[9] Wichtige Interaktionspartner auf Cystatin-Seite sind in diesem Modell der N-Terminus (der „Rüssel“) und zwei charakteristische Schleifen (L1 und L2, die „Elefantenfüße“). Wir beobachteten, dass die Konfor-

[*] Dr. E. Dall, M. Sc. J. C. Fegg, Prof. Dr. P. Briza,
Prof. Dr. H. Brandstetter
Fachbereich Molekulare Biologie, Universität Salzburg
5020 Salzburg (Österreich)
E-Mail: hans.brandstetter@sbg.ac.at
M. Sc. J. C. Fegg, Prof. Dr. H. Brandstetter
CD Labor für Biosimilar Charakterisierung
Universität Salzburg (Österreich)

[**] Wir danken Lukas Mach für die Bereitstellung von Cathepsin B und des Z-FR-AMC Substrats, Stefan Kofler und Thomas Zögg für Messungen am Synchrotron, den Mitarbeitern am ESRF (Grenoble) für ihre fachliche Unterstützung, Edvard Munch für Inspiration bei der Erstellung der Abbildung S7, der Österreichischen Akademie

der Wissenschaften (ÖAW Projekt Nummer 22866), dem Bundesministerium für Wissenschaft, Forschung und Wirtschaft und dem Fonds zur Förderung der Wissenschaftlichen Forschung (FWF Projekt P_23454-11) für finanzielle Unterstützung.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201409135> zu finden.

© 2014 Die Autoren. Veröffentlicht von Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Dieser Open Access Beitrag steht unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution License, die jede Nutzung des Beitrages in allen Medien gestattet, sofern der ursprüngliche Beitrag ordnungsgemäß zitiert wird.

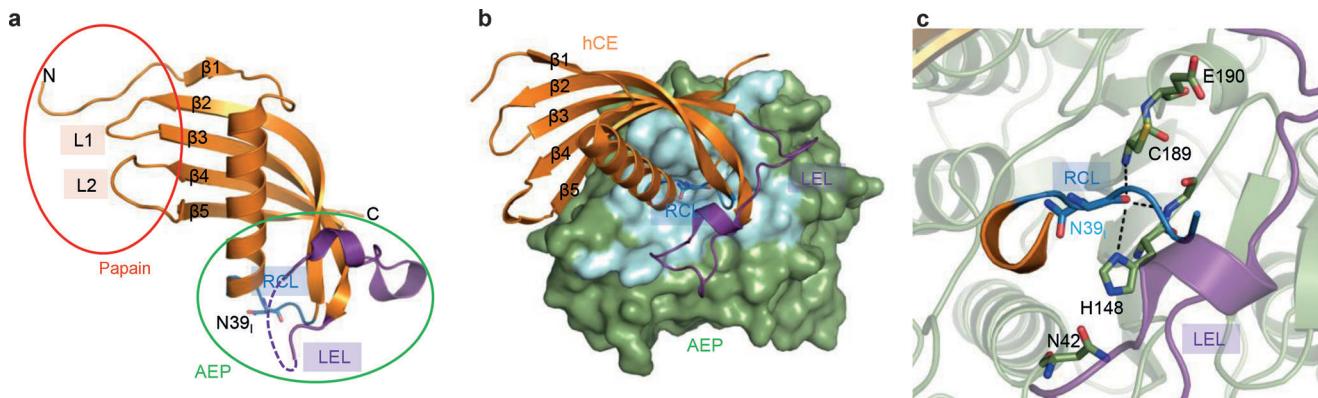


Abbildung 1. Kristallstruktur von isoliertem humanem Cystatin E (hCE) und im Komplex mit Legumain. a) Papain- und Legumain(AEP)-Bindestellen sind mit einem roten bzw. grünen Kreis angedeutet. Die Papain-inhibitorische Bindestelle setzt sich aus dem N-Terminus und den Schleifen L1 und L2 zusammen, die Legumain-Bindestelle aus dem *Reactive Center Loop* (RCL), der das konservierte Asn39_I trägt, und dem *Legumain Exosite Loop* (LEL). b) Die Wechselwirkung von Cystatin E (hCE, orange) mit Legumain (AEP, grün) erfolgt über den RCL (dunkelblau) und den LEL (lila). Oberflächenbereiche am AEP, die an der Bindung von hCE beteiligt sind, sind hellblau dargestellt. c) Detailansicht auf das AEP-katalytische Zentrum. Der hCE RCL bindet substratartig an Legumain. Katalytische Reste sind als grüne Stäbchen dargestellt, Asn39_I in blau.

mation der L2-Schleife im Detail von jener in Cystatin C (hCC) und Cystatin F (hCF) abweicht (PDB Einträge 3gax und 2ch9; Abbildung 1b). Diese Abweichung konzentrierte sich auf die N-Glykosylierungsstelle glyco-Asn108_I und hatte eine Verschiebung der Aminosäuren Pro105_I-Met110_I relativ zu den in hCC und hCF beobachteten Konformationen zur Folge (die Nummerierung der Cystatinsequenzen basiert auf Cystatin C und wird mit einem Index I gekennzeichnet). In der Folge verglichen wir die inhibitorische Affinität von glykosyliertem und nicht glykosyliertem (in *E. coli* produziertem) hCE gegen Cathepsin B. Es zeigte sich, dass Cathepsin B mit doppelter Affinität an glykosyliertes hCE ($IC_{50} = 5.7 \pm 1.3$ nm) im Vergleich zu *E. coli* produziertem hCE ($IC_{50} = 9.3 \pm 2.4$ nm) bindet.

Asn39_I wird als kritischer Rest für die Wechselwirkung mit dem katalytischen Zentrum (P1-S1) von Legumain gehandelt. In der Kristallstruktur von hCE befand sich Asn39_I in einer Orientierung ähnlich jener in hCC und hCF auf dem Legumain *Reactive Center Loop* (RCL) (Abbildung 1a und Abbildung S1c). Die konservierte Konformation des RCL legte nahe, dass Familie 2 Cystatine höchstwahrscheinlich substratartig (kanonisch) an ihr Ziel (Legumain) binden.^[5a] Demgemäß sollten sich Unterschiede in der Bindestärke einzelner Cystatine (hCC/E/F) durch die jeweiligen Exosite-Interaktionen erklären lassen. Aufgrund ihrer sterischen Nähe zum RCL zogen wir Cys73_I-Cys83_I als eine potentiell spezifitätsbestimmende Exosite-Region in Erwägung, die im Folgenden als *Legumain Exosite Loop* (LEL) bezeichnet wird. Der LEL ist über geladene/ionische Interaktionen von Lys75_I zu den P2(Ser38_I)- und P1'(Ser40_I)-Carboxylen relativ zum RCL stabilisiert (Abbildung 1a und Abbildung S1c).

Tatsächlich zeigte die Kokristallstruktur von Legumain mit hCE, dass sowohl der RCL als auch der LEL zur Bindung an Legumain wesentlich beitragen. Besonders interessant ist, dass beide Elemente an jene Oberflächenbereiche des Legumains binden, die im Prolegumain durch die Prodomäne abgedeckt werden (Abbildung 1b und Abbildung S2a,e).^[4] In weiterer Folge stellte sich die Frage, ob diese sterische Ähn-

lichkeit der beiden Bindungsmodi im Prolegumain und im AEP-hCE-Komplex sich auch in funktionelle Analogien übertragen lässt. Eine charakteristische Eigenschaft von Prolegumain im Vergleich zu aktivem AEP ist seine Stabilität bei neutralem pH. Wird Prolegumain einmal über pH-Absehung zu AEP aktiviert, verliert dieses seine Stabilität bei $pH > 6$ und wird irreversibel denaturiert.^[10] In der Tat konnten wir zeigen, dass die Komplexbildung mit hCC und hCE zu einer Erhöhung der thermischen Stabilität im Vergleich zu isoliertem AEP führt (Abbildung S2b). Diese konformativale Stabilisierung zeigte sich auch in einer – vordergründig paradoxen – Aktivitätssteigerung durch den Inhibitor hCC bei näherungsweise neutralem pH: Während die Inkubation von isoliertem AEP bei pH 6.5 eine irreversible Inaktivierung zur Folge hatte, konnte durch Vorinkubation von AEP mit hCC eine basale Restaktivität gemessen werden (Abbildung S2c). Die Cystatin-induzierte Aktivität lässt sich durch kontinuierliches Abdissoziieren des Inhibitors (hCC) vom AEP-hCC-Komplex und die damit einhergehende Freisetzung von temporär stabilem/aktivem Enzym erklären. Cystatin C wirkt demnach nicht nur als AEP-Inhibitor, sondern auch als apparenter Agonist bei neutralem pH. Absenkung des pH-Wertes des AEP-hCC-Komplexes von pH 6.5 auf $pH \leq 4$ hatte die quantitative Freisetzung und Regenerierung von ca. 80% der ursprünglich eingesetzten Aktivität zur Folge (Abbildung S2c). Dieses Verhalten ist hCC-spezifisch (Abbildung 2a) und lässt sich durch Unterschiede in der Aminosäurezusammensetzung des LEL in hCE und hCC verstehen.

Während der hCE LEL primär aus hydrophoben Aminosäuren zusammengesetzt ist, enthält der hCC LEL geladene Reste, wie z.B. Arg70_I und Arg93_I, die Salzbrücken mit Glu190 ausbilden können. Diese Schlussfolgerung bestätigte sich ferner dadurch, dass die Einführung der E190K-Punktmutation kompatibel mit der Ausbildung des AEP-hCE-Komplexes war, jedoch nicht mit der Bindung von hCC an AEP vereinbar war (Abbildung S2d).

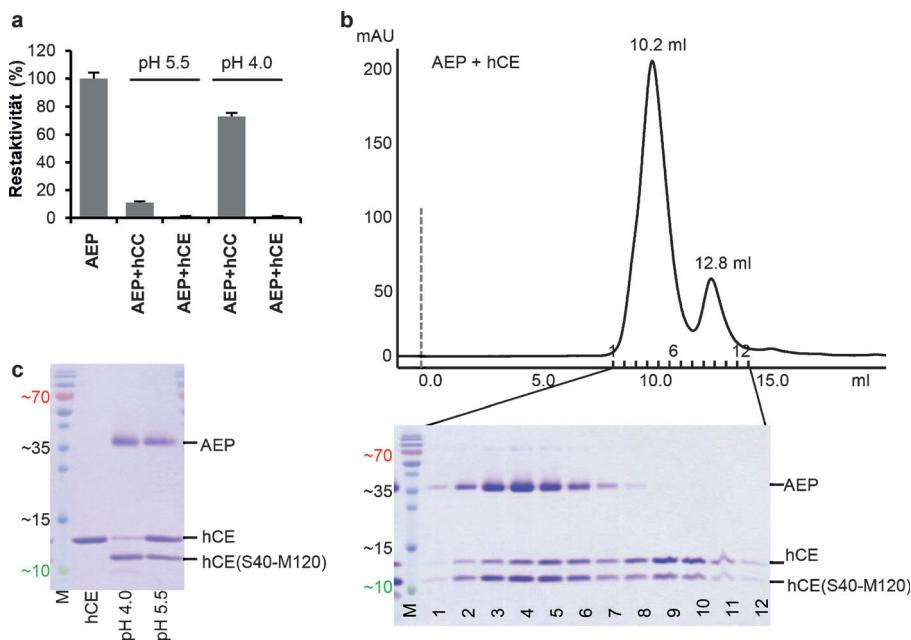


Abbildung 2. Cystatine sind sowohl Legumain-Inhibitoren als auch Legumain-Substrate. a) Die Bindung von Cystatin C (hCC) an Legumain ist pH-abhängig und reversibel bei pH 4.0. Sowohl hCE als auch hCC sind effiziente Legumain-Inhibitoren bei pH 5.5. Während weitere Inkubation bei pH 4.0 keinen offensichtlichen Effekt auf die hCE-AEP-Wechselwirkung hatte, konnte im Falle von hCC ca. 80% der Enzymaktivität regeneriert werden, verursacht durch Abdissoziation des hCC. b) Sowohl gespaltenes als auch intaktes hCE binden an Legumain. In Gelfiltrationsexperimenten konnten wir zeigen, dass intaktes und gespaltenes hCE mit AEP im gleichen Peak koeluiieren, sowie auch in einem separaten Peak. c) Die Spaltung von hCE durch AEP ist pH-abhängig. Ein Überschuss hCE kann bei pH 4.0 umgesetzt werden, jedoch nicht bei pH 5.5.

Die Struktur des AEP-hCE-Komplexes offenbarte außerdem, dass der RCL substratartig („kanonisch“) in das aktive Zentrum von Legumain bindet. Insbesondere inserierte Asn39₁ (P1) in die S1-Spezifitätstasche, wobei die zu spaltende Peptidbindung (P1–P1') intakt und durch die Elektronendichtheckarte definiert war (Abbildung 1c und Abbildung S2e). Der sterische Aufbau des aktiven Zentrums und des RCL war im Komplex und in den Strukturen der einzelnen Komponenten weitgehend ident. Lediglich die Orientierung der Seitenketten des katalytischen Nukleophils Cys189 und des benachbarten Glu190 waren verändert. Das Thiol des Cys189 war um 180° gedreht und bildete ein zwitterionisches Paar mit dem Carboxylat des Glu190. Diese Konformation stellt einen „schlafenden“ Proteasezustand dar (Abbildung 1c).

Kanonisch bindende Inhibitoren ahmen oft Substrate nach, die sehr langsam umgesetzt werden.^[11] Um zu testen, ob dieser Umstand auch auf den AEP-hCE-Komplex zutrifft, inkubierten wir AEP mit einem doppelten molaren Überschuss hCE bzw. hCC bei pH 4.0/5.0 für 2 h und analysierten die Proben mittels Gelfiltrationschromatographie (Abbildung 2b und Abbildung S3a). Das Elutionsprofil zeigte zwei Peaks: Der größere AEP-hCE-Komplex, gefolgt von überschüssigem, monomerem hCE. Interessanterweise eluierte gespaltenes hCE in beiden Peaks (Abbildung 2b). Mittels Massenspektrometrie konnten wir außerdem bestätigen, dass die Spaltung C-terminal von Asn39₁ erfolgte. Beide Ergebnisse sind konsistent mit dem postulierten kanonischen Bindungsmodus.

Bei substratartiger Bindung eines Liganden an ein Enzym ist davon auszugehen, dass die gespaltene Spezies über die Zeit akkumuliert. Diese Beobachtung konnten wir nicht machen. Im Gegenteil, das Verhältnis von gespaltenem zu intaktem Cystatin blieb über die Zeit konstant. Um diesem Phänomen nachzugehen, untersuchten wir die pH-Abhängigkeit der Prozessierung von hCE durch AEP (Abbildung 2c). Das intrinsische pH-Optimum von AEP für Peptidsubstrate liegt bei pH 5.5.^[10] Umso überraschender war es, dass die Spaltung von hCE nach Asn39₁ bei pH ≤ 4 am effizientesten war. Darüber hinaus konnten wir zeigen, dass dieses Prozessierungsverhalten spezifisch für Familie-2-Cystatine ist. Stefin A und B (Familie-1-Cystatine) wurden von Legumain nach Asn107₁ und Asn61₁ (nur Stefin B) gespalten und schon nach kurzer Zeit vollständig umgesetzt (Abbildung S3b).

Auf der Suche nach einer Erklärung für die beobachteten scheinbaren Widersprüche stellte sich die Frage, ob die Proteaseaktivität möglicherweise in Konkurrenz mit einer überlagerten Ligaseaktivität steht. In diesem Fall würde sich die unvollständige Spaltung von hCC/E (Abbildung 2b,c und Abbildung S3a) durch ein pH-abhängiges Gleichgewicht dieser beiden gegensätzlichen Reaktionen erklären lassen, wobei die Protease bei saurem pH (pH 4) und die Ligase bei neutralem pH (pH 6) dominiert.

Um diese Hypothese zu überprüfen, inkubierten wir hCE/C mit AEP bei pH 4.0/5.0, um eine vollständige Spaltung der Inhibitoren zu erzielen. Inkubierte man nun diesen Komplex aus AEP mit gespaltenem Cystatin ($\text{hCE}^{\dagger}/\text{hCC}^{\dagger}$) bei verschiedenen pH-Werten, so stellten sich die jeweiligen Gleichgewichte aus gespaltenem und religiertem Cystatin wieder ein. Die Religation von hCE^{\dagger} zu intaktem hCE funktionierte am effizientesten bei pH ≥ 6 (Abbildung 3a und Abbildung S4a,b).

Der Komplex von AEP und hCE wurde bei pH 6.5 kristallisiert und spiegelt daher den Ligasezustand von AEP wider. In dieser Struktur ist das Thiol (SH) des katalytischen Cys189 von der zu spaltenden Peptidbindung abgewandt (Abbildung 1c). Diese Beobachtung legt nahe, dass das für die Proteasereaktion essentielle katalytische Cys189 für die Ligasereaktion keine katalytische Funktion erfüllen kann. Um diese Hypothese zu überprüfen, oxidierten wir Cys189 durch Zugabe von S-Methylmethanthsulfonat (MMTS). MMTS führt zur kovalenten Anlagerung einer SCH_3 -Gruppe

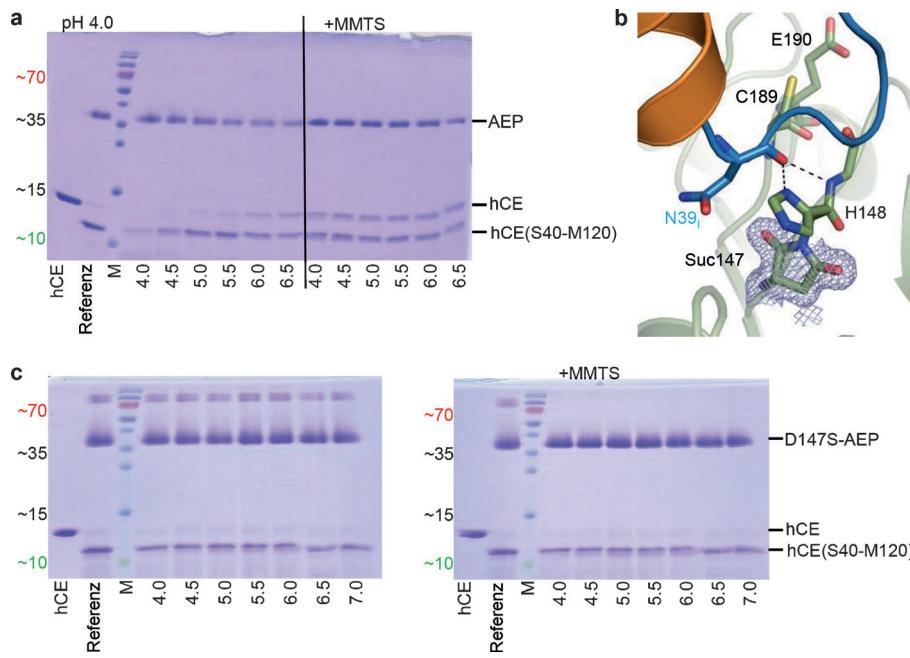


Abbildung 3. Die Ligaseaktivität von Legumain. a) Legumain (AEP) zeigt Ligaseaktivität bei neutralem pH, unabhängig vom katalytischen Cys189. Inkubation von hCE mit AEP bei pH 4.0 führte zur vollständigen Umsetzung in die Asn39-prozessierte Form. Wurde dieser Komplex aus gespaltenem hCE und AEP nun bei ansteigenden pH-Werten inkubiert, so tauchte bei pH ≥ 6.0 jene Bande wieder auf, die intaktem (ungespaltenem) hCE entspricht. Diese Beobachtung legt nahe, dass die Asn39-Ser40-Peptidbindung religiert wurde. Wurde das katalytische Cys189 durch Zugabe von MMTS kovalent modifiziert, so beobachteten wir eine pH-unabhängige Resynthese des intakten Inhibitors. b) Asp147 liegt im AEP-hCE-Komplex als Succinimid vor. Detailansicht auf das AEP(grün)-katalytische Zentrum im Komplex mit hCE (orange). Katalytische Reste sind als grüne Stäbchen dargestellt, der hCE RCL (mit Asn39_i) in blau. Die Elektronendichteckarte ($2F_{\text{obs}} - F_{\text{cal}}$), die das Succinimid 147 (Suc147) beschreibt, ist mit einem Konturlevel von 1σ über dem Mittelwert dargestellt. c) Asp147 spielt eine kritische Rolle bei der Ligation. Das Experiment, das in (a) beschrieben wurde, wurde mit einer Kombination aus D147S-AEP und Wildtyp-hCE wiederholt. D147S-AEP konnte hCE spalten, was bestätigte, dass es korrekt gefalten ist und den Inhibitor korrekt bindet. Gleichzeitig konnte jedoch weder über pH-Erhöhung, noch Zugabe von MMTS eine Resynthese des intakten Inhibitors erzielt werden. Diese Beobachtung bestätigt die kritische Rolle von Asp147 für die Ligaseaktivität. Selbiges Experiment wurde auch für eine D147G-AEP-Mutante durchgeführt, mit dem gleichen Ergebnis.

an Cys189 (Cys189-S-CH₃) und somit zur Bildung eines gemischten Disulfids.

Solch modifiziertes AEP wird im Weiteren als AEP_{ox} bezeichnet. Die Modifikation wurde in einer Kristallstruktur bestätigt (Abbildung S5a) und blockierte außerdem erwartungsgemäß die AEP-Proteaseaktivität. Inkubierten wir AEP_{ox} mit gespaltenem hCE[†], so beobachteten wir die Resynthese von intaktem, ungespaltenem hCE bei pH 4.0 bis 6.0 (Abbildung 3a und Abbildung S4a,b). Mit diesem Experiment konnten wir bestätigen, dass 1) Protease- und Ligaseaktivität voneinander getrennte Aktivitäten sind, die jedoch im Gleichgewicht stehen. Außerdem verwendet 2) die Ligaseaktivität einen katalytischen Mechanismus, der unabhängig von Cys189 ist. In Konsequenz ist 3) die Ligasereaktion also nicht die Umkehrung der Proteasereaktion (mit einem Thioester-Intermediat), sondern sie verwendet einen unterschiedlichen Reaktionsmechanismus.^[12] Daraus ergibt sich in weiterer Folge insbesondere, dass AEP_{ox} keinen Intein- oder Sortase-ähnlichen Mechanismus für die Ligasereaktion verwendet, wobei Bindungen und Energie erhalten blieben.

Echte Peptidsynthese, also nicht bloßes Verschieben von Bindungen, erfordert typischerweise eine Aktivierung der Carboxylsäure am C-Terminus (P1) durch Kupplung an eine energiereiche Gruppe.^[13] Interessanterweise fanden wir ein Aspartimid (Succinimid) auf Position 147 (vor dem katalytischen His148) (Abbildung 3b). Asparaginsäuren können über eine Kondensationsreaktion einen Ringschluss durchführen. Obwohl dieser Ring (Succinimid) einen energiereichen, metastabilen Zustand darstellt, war Asp147 im AEP-hCE-Komplex vollständig in Succinimid umgewandelt und durch die strukturelle Umgebung stabilisiert (bestätigt durch Kristallographie und Massenspektrometrie) (Tabelle S2). Massenspektrometrische Messungen zeigten zusätzlich, dass Asp147 zwar im Prolegumain zu finden ist, die autokatalytische Aktivierung bei saurem pH jedoch in nahezu vollständiger Umwandlung zu Suc147 resultierte.

Basierend auf den Tatsachen, dass Succinimide gängige Kuppelungsreagentien bei der Synthese von Peptidbindungen sind^[13] und dass Asp147 in allen bekannten Legumainsequenzen streng konserviert ist, jedoch in Caspisen häufig durch ein Serin ersetzt ist (Abbildung S5b),^[14] kamen wir zu dem Schluss, dass Suc147 eine katalytische Rolle für die Ligaseaktivität spielen könnte. Während die D147S-

und D147G-AEP-Varianten (verminderte) Proteaseaktivität und somit korrekte Faltung aufwiesen, zeigten sie keine Ligaseaktivität (Abbildung 3c). Dieses Experiment bestätigte, dass das Asp147-Suc147-Paar eine kritische Rolle für die Ligaseaktivität spielt. Analog zu ATP treibt Suc147 die endergonische Peptidbindungssynthese energetisch an.^[7,15] Basierend darauf schlagen wir einen Mechanismus vor, bei dem das O⁻ des negativ geladenen Carboxylats des P1-Restes (Asn39_i) den elektrophilen Kohlenstoff im nahen Keton von Suc147 angreift. Daraus resultiert ein tetraedrischer Übergangszustand, der mit der Ringöffnung einhergeht (Abbildung 4a,b). Der so aktivierte C-Terminus von P1 könnte nun von einem nahen N-Terminus über nukleophile Substitution angegriffen werden, wobei His148 als katalytische Base fungieren würde. Im konkreten Fall ist der aktivierte C-Terminus jedoch sterisch zu weit vom P1'-Nukleophil entfernt.

Deshalb hielten wir es für wahrscheinlicher, dass die Asn-Seitenkette von P1 den elektrophilen Kohlenstoff am Säure-anhydrid angreift und so ein offenes (Iso)Asp147 freisetzt. Diese nukleophile Substitutionsreaktion generiert ein weite-

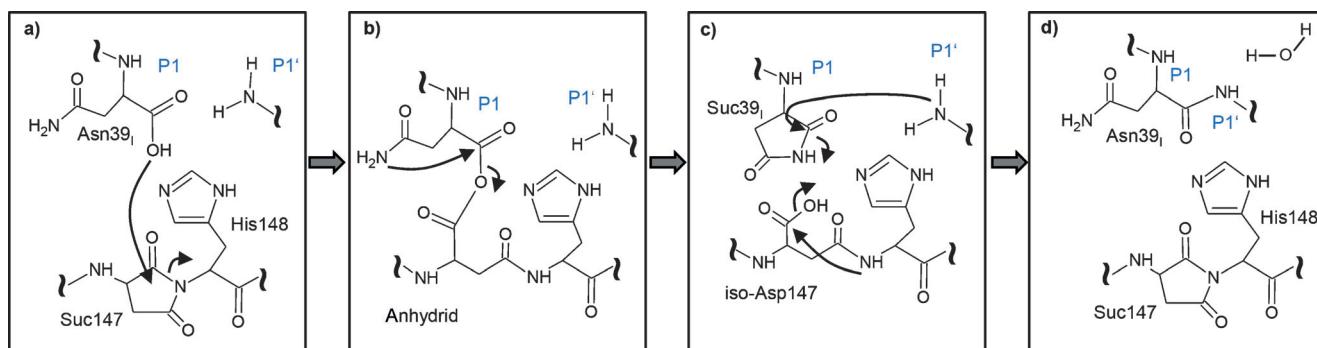


Abbildung 4. Vorgeschlagenes Reaktionsdiagramm der Ligaseaktivität von Legumain. a) Das O⁻ des neuen C-Terminus von hCE (Asn39i) greift das energiereiche Suc147 an. So wird eine aktivierte Carboxylsäure auf Position P1 erhalten. b) Im nächsten Schritt greift der Carbamoyl-Stickstoff der P1-Asn39i-Seitenkette den elektrophilen Kohlenstoff des Carboxylanhydrids an. c) Der so generierte Succinimid-Ring (Suc39i) kann nun über eine nukleophile Substitutionsreaktion des P1'-Stickstoffs geöffnet werden. d) Dabei wird die intakte P1-P1'-Peptidbindung wiederhergestellt. Zusätzlich kann Suc147 über eine Kondensationsreaktion regeneriert werden.

res Succinimid-Intermediat am P1-Asn39_i (Suc39_i), ähnlich wie bei Inteinen und Asparagin-Peptidlyasen.^[16] Suc39_i ist nun sterisch und energetisch optimal geeignet, um vom P1'-Nukleophil angegriffen zu werden. Dadurch kommt es zur (Wieder-)Ausbildung einer Peptidbindung und zur (Wieder-)Freisetzung der P1-Asn-Seitenkette (Abbildung 4c,d). Um diesen zweiten Teil der Reaktion zu überprüfen, generierten wir eine N39_iD-hCE-Variante. Diese Mutante inhibierte die AEP-Proteaseaktivität und wurde auch C-terminal vom Asp39_i hydrolysiert, vergleichbar mit Wildtyp-hCE, wodurch die korrekte Faltung dieser Cystatin-Mutante bestätigt wurde (Abbildung S5c). Entscheidend ist jedoch, dass diese Mutation die Ligaseaktivität unterdrückte und somit die Relevanz des P1-Asn für die Peptidsynthese (Abbildung S5d) bestätigte. Zudem konnten wir massenspektrometrisch eine partielle Deamidierung des Asn39_i nachweisen, wodurch das postulierte P1-Succinimid-Intermediat indirekt bestätigt wird (Tabelle S2).

Ein weiteres wichtiges Ergebnis war, dass die Ligaseaktivität nicht auf Cystatine limitiert ist. Wir konnten Peptidligaseaktivität auch bei gespaltenem Prolegumain feststellen. Durch Inkubation von (D303E-D309E)-Prolegumain bei pH 5.0 erhält man die charakteristische autokatalytische In-trans-Spaltung der Asn323-Asp324-Peptidbindung.^[10] Erhöhung des pH-Wertes auf 6.0 führte zur Resynthese der Asn323-Asp324-Peptidbindung und somit (Re-)Zymogenisierung in inaktives Prolegumain (Abbildung S4c). Dieses Ergebnis deckt sich auch mit Beobachtungen am Maus-Legumain.^[17] Die katalytische Effizienz (Geschwindigkeit) der Ligaseaktivität liegt bei mindestens 1 min⁻¹, basierend auf SDS-PAGE-Experimenten (Abbildung S4d).

In dieser Arbeit beschäftigten wir uns mit der Untersuchung der Wechselwirkung von Cystatin E mit Legumain. Erwartungsgemäß erfolgt die Bindung der Cystatine an Legumain über einen Cystatin-Bindegereich, der sich von dem für die Inhibition von Papain/Cathepsinen verwendeten Bereich unterscheidet. In-silico-Interaktionsstudien bestätigten, dass Cystatine der Familie 2 gleichzeitig Cathepsine und Legumain über zwei sterisch getrennte Bindestellen binden können.^[5a] So können diese wichtigen endolysosomalen Enzymfamilien kolokalisiert werden (Abbildung S6 und S7).

Legumain kann im extrazellulären oder zytosolischen Milieu als Ligase arbeiten und so möglicherweise bereits aktivierte Proteasen wieder in einen inaktiven, Zymogenartigen Zustand zurückführen.^[7] Ausgestattet mit sowohl Protease- als auch Ligasefunktion kann Legumain auch bei In-cis- und In-trans-Proteinslicing eine tragende Rolle spielen: Einzelne oder mehrere Proteine werden an mehreren Stellen gespalten und zu einem neuen Protein mit neuer Funktion rekombiniert.^[18] Der Umstand, dass Legumain als Protease/Ligasepaket vorliegt, und seine endolysosomale Lokalisation machen Legumain zu einem kritischen Faktor in der Antigenprozessierung, im Speziellen bei der Beladung von MHCII-Komplexen (MHC = Hauptkompatibilitätskomplex) mit Antigenfragmenten. Während die Proteaseaktivität von Legumain dafür bekannt ist, lineare Peptidepitope für die MHCII-Präsentation zu generieren,^[19] könnte seine Ligaseaktivität sequentiell entfernte Epitope verbinden und so die Präsentation von 3D-Epitopen ermöglichen. Außerdem könnte Legumain bereits aktivierte MHCII-Komplexe durch Religation der invarianten Kette (Ii) wieder inaktivieren und so die Beladung mit Peptiden verhindern. Schließlich zeigt die Entdeckung des konjugierten Asparaginsäure-Succinimid-Paares eine neue Möglichkeit eines intrinsischen Energiereservoirs, um in ATP-armen Umgebungen (z.B. extrazellulär) endergone Reaktionen zu katalysieren.

Eingegangen am 15. September 2014,
veränderte Fassung am 4. November 2014
Online veröffentlicht am 29. Januar 2015

Stichwörter: Endergonische Reaktionen ·
Enzymatische Katalyse · Hydrolyse · Ligasen ·
Proteinmodifikation

- [1] a) C. B. Chan, M. Abe, N. Hashimoto, C. Hao, I. R. Williams, X. Liu, S. Nakao, A. Yamamoto, C. Zheng, J. I. Henter, M. Meeths, M. Nordenskjold, S. Y. Li, I. Hara-Nishimura, M. Asano, K. Ye, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 468–473; b) K. Wolk, G. Grutz, K. Witte, H. D. Volk, R. Sabat, *Genes Immun.* **2005**, *6*, 452–456.

- [2] a) S. E. Ewald, A. Engel, J. Lee, M. Q. Wang, M. Bogyo, G. M. Barton, *J. Exp. Med.* **2011**, *208*, 643–651; b) S. Maschalidi, S. Hassler, F. Blanc, F. E. Sepulveda, M. Tohme, M. Chignard, P. van Endert, M. Si-Tahar, D. Descamps, B. Manoury, *PLoS Pathog.* **2012**, *8*, e1002841.
- [3] a) M. H. Haugen, H. T. Johansen, S. J. Pettersen, R. Solberg, K. Brix, K. Flatmark, G. M. Maelandsmo, *PLoS One* **2013**, *8*, e52980; b) Y. Ohno, J. Nakashima, M. Izumi, M. Ohori, T. Hashimoto, M. Tachibana, *World J. Urol.* **2013**, *31*, 359–364; c) L. Wang, S. Chen, M. Zhang, N. Li, Y. Chen, W. Su, Y. Liu, D. Lu, S. Li, Y. Yang, Z. Li, D. Stupack, P. Qu, H. Hu, R. Xiang, *J. Cell. Biochem.* **2012**, *113*, 2679–2686.
- [4] E. Dall, H. Brandstetter, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 10940–10945.
- [5] a) M. Alvarez-Fernandez, A. J. Barrett, B. Gerhardt, P. M. Dando, J. Ni, M. Abrahamson, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 19195–19203; b) J. J. Briggs, M. H. Haugen, H. T. Johansen, A. I. Riker, M. Abrahamson, O. Fodstad, G. M. Maelandsmo, R. Solberg, *BMC Cancer* **2010**, *10*, 17; c) J. A. Hardy, J. Lam, J. T. Nguyen, T. O'Brien, J. A. Wells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 12461–12466; d) M. Donepudi, A. Mac Sweeney, C. Briand, M. G. Grutter, *Mol. Cell* **2003**, *11*, 543–549.
- [6] a) F. B. Perler, N. M. Allewell, *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 14488–14489; b) S. K. Mazmanian, G. Liu, T. T. Hung, O. Schneewind, *Science* **1999**, *285*, 760–763.
- [7] K. Tanaka, T. Suzuki, T. Chiba, *Mol. Cells* **1998**, *8*, 503–512.
- [8] a) I. Hara-Nishimura, K. Inoue, M. Nishimura, *FEBS Lett.* **1991**, *294*, 89–93; b) G. Basurto-Islas, I. Grundke-Iqbali, Y. C. Tung, F. Liu, K. Iqbal, *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 17495–17507.
- [9] W. Machleidt, U. Thiele, B. Laber, I. Assfalg-Machleidt, A. Esterl, G. Wiegand, J. Kos, V. Turk, W. Bode, *FEBS Lett.* **1989**, *243*, 234–238.
- [10] E. Dall, H. Brandstetter, *Acta Crystallogr. Sect. F* **2012**, *68*, 24–31.
- [11] a) W. Bode, R. Huber, *Biochim. Biophys. Acta Protein Struct. Mol. Enzymol.* **2000**, *1477*, 241–252; b) O. D. Ekici, M. G. Gotz, K. E. James, Z. Z. Li, B. J. Rukamp, J. L. Asgian, C. R. Caffrey, E. Hansell, J. Dvorak, J. H. McKerrow, J. Potempa, J. Travis, J. Mikolajczyk, G. S. Salvesen, J. C. Powers, *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1889–1892.
- [12] a) D. Y. Jackson, J. Burnier, C. Quan, M. Stanley, J. Tom, J. A. Wells, *Science* **1994**, *266*, 243–247; b) L. Abrahmsen, J. Tom, J. Burnier, K. A. Butcher, A. Kossiakoff, J. A. Wells, *Biochemistry* **1991**, *30*, 4151–4159.
- [13] V. R. Pattabiraman, J. W. Bode, *Nature* **2011**, *480*, 471–479.
- [14] P. Fuentes-Prior, G. S. Salvesen, *Biochem. J.* **2004**, *384*, 201–232.
- [15] a) L. Stryer, *Biochemistry*, Vol. 4, Spektrum, Heidelberg, **2003**; b) K. Tabata, H. Ikeda, S. Hashimoto, *J. Bacteriol.* **2005**, *187*, 5195–5202.
- [16] N. D. Rawlings, A. J. Barrett, A. Bateman, *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 38321–38328.
- [17] L. Zhao, T. Hua, C. Crowley, H. Ru, X. Ni, N. Shaw, L. Jiao, W. Ding, L. Qu, L. W. Hung, W. Huang, L. Liu, K. Ye, S. Ouyang, G. Cheng, Z. J. Liu, *Cell Res.* **2014**, *24*, 344–358.
- [18] D. J. Craik, U. Malik, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17*, 546–554.
- [19] a) B. Manoury, E. W. Hewitt, N. Morrice, P. M. Dando, A. J. Barrett, C. Watts, *Nature* **1998**, *396*, 695–699; b) B. Manoury, D. Mazzeo, D. N. Li, J. Billson, K. Loak, P. Benaroch, C. Watts, *Immunity* **2003**, *18*, 489–498.