

Proteinexpression

Expression und Untersuchung von Pflanzenproteinen mit *Leishmania tarentolae*

ELFRIEDE DALL¹, ANDREAS LICHT², HANS BRANDSTETTER¹

¹ UNIVERSITÄT SALZBURG

² JENA BIOSCIENCE GMBH, JENA

Glycosylation is an important post-translational modification that can be found in many eukaryotic proteins. Since it can be crucial for protein structure and function, properly glycosylated proteins are of paramount importance for crystal structure determination. The eukaryotic expression system LEXSY, based on the protozoan *Leishmania tarentolae*, has been used to express and crystallize fully glycosylated *Arabidopsis thaliana* legumain γ and elucidate the role of glycosylation for its function.

DOI: 10.1007/s12268-019-0994-1
© Die Autoren 2019

Open Access

Leishmanien sind eine Familie einzelliger, eukaryotischer Parasiten, die in ihrem Lebenszyklus einen Wirtswechsel zwischen Sandmücken (Phlebotominae) und Säugern (z. B. Hunde, Menschen) durchlaufen. Während die meisten *Leishmania*-Arten verschiedene Typen der Leishmaniose hervorrufen, zeichnet sich die Spezies *Leishmania tarentolae* durch eine Besonderheit aus: Im Laufe der Evolution vollzog sie einen Wirtswechsel von Säugetieren zu Reptilien und ist nicht mehr in der Lage, Säuger zu infizieren [1]. Dabei hat *L. tarentolae* das den anderen Leishmanien-Spezies eigene säugertypische Glykosylierungsmuster beibehalten, was sie zu einem interessanten Organismus für die Proteinexpression macht [2]. Das Unternehmen Jena Bioscience hat daraus das eukaryotische Proteinexpressionssystem LEXSY entwickelt (Abb. 1, [3]). LEXSY zeichnet sich durch eine mit prokaryotischen Sys-

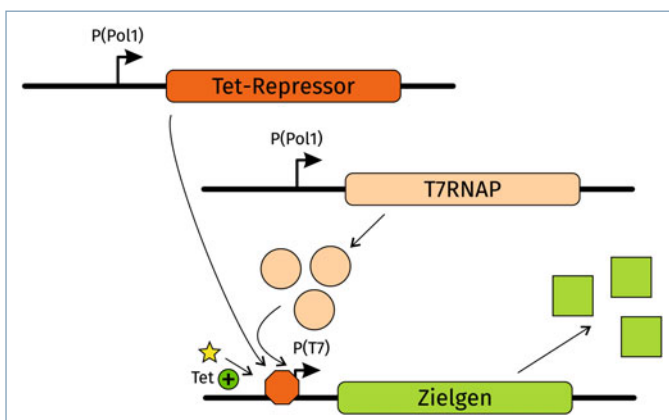
temen vergleichbare einfache Handhabbarkeit aus, wobei ein kompletter eukaryotischer Proteinfaltungsapparat und eine breite Palette eukaryotischer Proteinmodifikationen, wie Glykosylierung, Acetylierung und Myristoylierung, zur Verfügung stehen. Die Generationszeit von LEXSY ist mit sechs bis acht Stunden für einen Eukaryoten vergleichsweise niedrig, wodurch in kurzer Zeit hohe Zelldichten erreicht werden können. Leishmanien können im Gegensatz zu anderen Parasiten in günstigem Medium (TB, BHI) kultiviert werden und sind auch für die Anzucht in Fermentern geeignet [4]; dabei können Proteinausbeuten von bis zu 500 Milligramm pro Liter Kultur erreicht werden. LEXSY wurde erfolgreich von der Arbeitsgruppe um Hans Brandstetter an der Universität Salzburg genutzt, um die Rolle der Glykosylierung von Legumain zu untersuchen [5].

Pflanzliche Legumaine (VPEs, AEPs)

Die Cysteinprotease Legumain wurde ursprünglich in Vakuolen von Leguminosen entdeckt, woher sie auch ihren Namen erhielt [6]. Im Gegensatz zu Säugern, bei denen es nur eine Legumain-Isoform gibt, findet man in Pflanzen bis zu sieben funktionelle Legumain-Isoformen. Legumaine spielen eine wichtige Rolle für die Prozessierung und Reifung von Samenspeicherproteinen in der Vakuole, wodurch sie auch ihre Beinamen *vacuolar processing enzymes* (VPE) und aufgrund ihrer Substratspezifität *asparaginyl endopeptidase* (AEP) erhielten. Legumain wird als inaktive Proform (Prolegumain), bestehend aus einer N-terminalen Caspase-artigen Proteasedomäne und einer C-terminalen Prodomäne, hergestellt (Abb. 2A). Diese Proform ist stabil bei neutralem pH-Wert. Verschiebt sich jedoch der pH ins Saure, wie z. B. im Lysosom oder der Vakuole, kommt es zu einer autokatalytischen Aktivierung durch Spaltung des Aktivierungspeptids, das die katalytische Domäne mit der C-terminalen Prodomäne verbindet (Abb. 3, [6]).

Expression von Legumain in LEXSY

Kritisch für die Herstellung und Funktion von Legumainen ist eine Reihe posttranslationaler Modifikationen. So wird die Prodomäne über zwei Disulfidbrücken stabilisiert, aktives Enzym über proteolytische Spaltung des Aktivierungspeptids und ggf. der Prodomäne hergestellt sowie Stabilität und Funktionalität der Proteasedomäne über Glykosylierung reguliert [7]. Die Proteasedomäne enthält je nach Organismus und Isoform mindestens eine und bis zu vier N-Glykosylierungsstellen. Gerade auch deswegen hat sich die rekombinante Herstellung von pflanzlichen Legumainen bislang als sehr schwierig erwiesen. Mittlerweile hat sich LEXSY als ein robustes Expressionssystem für die Herstellung pflanzlicher Legumaine etabliert. Damit ist es erstmals gelungen, die Legumain-Proformen der β - und γ -Isoformen von *A. thaliana* (proAtLEG β/γ) in Milligramm-Mengen zu exprimieren und aufzureinigen [8]. Die so hergestellten Proteine konnten erfolgreich über pH-Absenkung aktiviert werden, was



◀ **Abb. 1:** Prinzip des induzierbaren Leishmanien-Expressionssystems LEXSY. T7-RNA-Polymerase und Tet-Repressor werden konstitutiv im ribosomalen RNA-Locus exprimiert, bei Zugabe von Tetrazyklin (Tet) wird der Repressor von der DNA entfernt und das Zielgen exprimiert.

die Funktionalität der Proteine bestätigte (Abb. 2B). Zudem ist es gelungen, die Kristallstrukturen von inaktivem proAtLEG γ und aktivem AtLEG γ im Komplex mit einem Substratanalogen zu lösen [5]. Dabei hat sich unter anderem gezeigt, dass es Unterschiede in der Glykosylierung der einzelnen Isoformen gibt und dass sich die Glykosylierungsstellen an strukturell und funktionell kritischen Positionen befinden (Abb. 3).

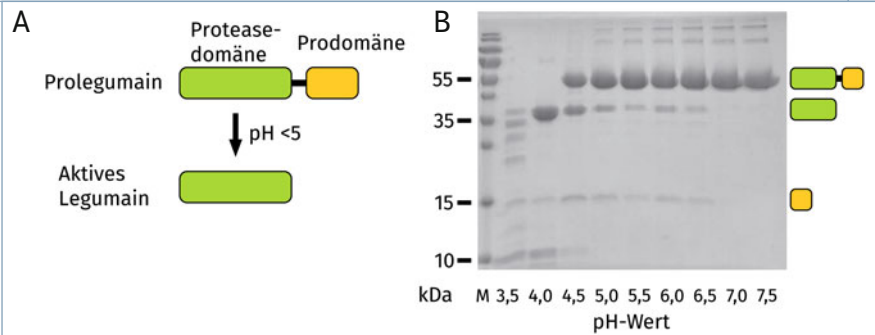
Glykosylierung als Regulator von Aktivität und Stabilität

Pflanzliche Legumaine besitzen eine stark konservierte Glykosylierungsstelle am Beginn des Aktivierungspeptids (Asn336; Abb. 3), das im Zuge der Aktivierung gespalten wird. Glykosylierung an dieser Stelle limitiert die sterische Zugänglichkeit möglicher Spaltstellen und bietet so eine elegante Möglichkeit, den Aktivierungszustand zu regulieren.

Eine weitere Glykosylierungsstelle befindet sich bei den Isoformen α und δ am Boden der Proteasedomäne auf der α II-Helix (Asn150). Diese Helix trägt bei Säugerlegumainen ein konserviertes RGD-Motiv, das für die Bindung an Integrinrezeptoren genutzt wird. In einer früheren Studie konnte gezeigt werden, dass die Bindung an Integrine einen pH-stabilisierenden Effekt auf humanes Legumain hat [7]. Ähnlich dazu scheint es sehr wahrscheinlich, dass die Glykosylierung an Asn150 bei pflanzlichen Legumainen auch einen stabilisierenden Effekt hat.

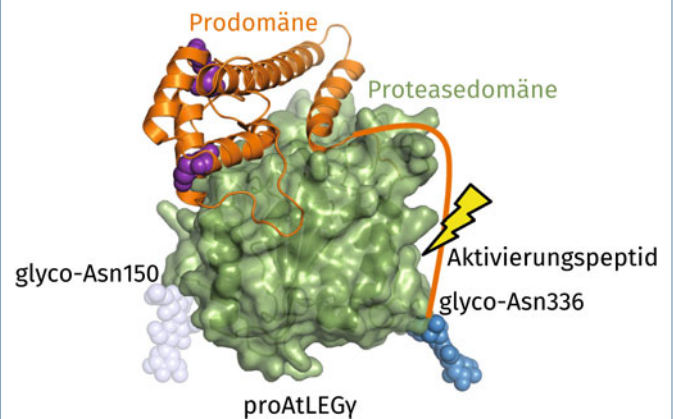
Mittlerweile ist es teilweise auch gelungen, pflanzliches Legumain in *Escherichia coli* herzustellen, wobei dieses aufgrund fehlender Glykosylierung ein abweichendes autokatalytisches Spaltmuster aufweist und – anders als das LEXSY-produzierte AtLEG γ – keinen stabilen Zwei-Ketten(*two-chain*)-Aktivierungszustand ausbildet [9]. Diese und andere Beobachtungen zeigten auf, wie kritisch die Wahl des Expressionssystems bei der strukturellen und funktionellen Charakterisierung von Proteinen ist.

Neben Legumain konnten mit LEXSY zahlreiche weitere, in anderen Systemen schwer oder nicht exprimierbare Proteine gewonnen werden, wie z. B. Antikörper [10], das Hepatitis-C-Virus-Hüllprotein [11], das Transmembranprotein Channelrhodopsin 2 [12] oder humane Kallikreine (KLKs) [13, 14]. Damit stellt LEXSY einen wichtigen Vertreter im stetig wachsenden Arsenal von Expressionssystemen dar. ■



▲ **Abb. 2:** Der Aktivitätszustand von Legumain wird über den pH-Wert gesteuert. **A,** Die Aktivierung von Legumain erfolgt über autokatalytische Abspaltung der C-terminalen Prodomäne bei saurem pH (Vakuole). **B,** Die mit LEXSY hergestellte Proform der β -Isoform von Legumain aus *Arabidopsis thaliana* (proAtLEG β) ist enzymatisch inaktiv bei neutralem pH und aktiv bei saurem pH. M: Marker.

► **Abb. 3:** Basierend auf der Kristallstruktur der γ -Isoform von Legumain aus *Arabidopsis thaliana* (AtLEG γ ; PDB: 4NIJ) wurden Glykosylierungsstellen der At-Legumaine modelliert. Weiß: Glykosylierung, gefunden bei AtLEG α und δ ; dunkelblau: Glykosylierung, gefunden bei AtLEG α , γ und δ . Disulfide sind als lila Kugeln dargestellt.



Danksagung

Die vorgestellte Forschung wurde vom Fonds für Förderung der wissenschaftlichen Forschung (FWF) gefördert.

Literatur

- [1] Wenyon CM (1920) Observations on the intestinal protozoa of three Egyptian lizards, with a note on a cell-invading fungus. *Parasitology* 12:350
- [2] Breiting R, Klingner S, Callewaert N et al. (2002) Non-pathogenic trypanosomatid protozoa as a platform for protein research and production. *Protein Expr Purif* 25:209–218
- [3] Kushnir S, Gase K, Breiting R et al. (2005) Development of an inducible protein expression system based on the protozoan host *Leishmania tarentolae*. *Protein Expr Purif* 42:37–46
- [4] Fritsche C, Sitz M, Wolf M et al. (2008) Development of a defined medium for heterologous expression in *Leishmania tarentolae*. *J Basic Microbiol* 48:488–495
- [5] Zauner FB, Elsässer B, Dall E et al. (2018). Structural analyses of *Arabidopsis thaliana* legumain γ reveal differential recognition and processing of proteolysis and ligation substrates. *J Biol Chem* 293:8934–8946
- [6] Dall E, Brandstetter H (2016) Structure and function of legumain in health and disease. *Biochimie* 122:126–150
- [7] Dall E, Brandstetter H (2013) Mechanistic and structural studies on legumain explain its zymogenicity, distinct activation pathways, and regulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:10940–10945
- [8] Zauner FB, Dall E, Regl C et al. (2018) Crystal structure of plant legumain reveals a unique two-chain state with pH-dependent activity regulation. *Plant Cell* 30:686–699
- [9] Harris KS, Durek T, Kaas Q et al. (2015) Efficient backbone cyclization of linear peptides by a recombinant asparaginyl endopeptidase. *Nat Commun* 6:10199
- [10] Just J, Lykkesmark S, Nielsen CH et al. (2017) Pericyte modulation by a functional antibody obtained by a novel single-cell selection strategy. *Microcirculation* 24:e12365
- [11] Grzyb K, Czarnota A, Brzozowska A et al. (2016) Immunogenicity and functional characterization of

- Leishmania*-derived hepatitis C virus envelope glycoprotein complex. *Sci Rep* 6:30627
- [12] Volkov O, Kovalev K, Polovinkin V et al. (2017) Structural insights into ion conduction by channelrhodopsin 2. *Science* 358, doi: 10.1126/science.aan8862
- [13] Skala W, Utzschneider DT, Magdolen V et al. (2014) Structure-function analyses of human kallikrein-related peptidase 2 establish the 99-loop as master regulator of activity. *J Biol Chem* 289:34267–34283
- [14] Guo S, Briza P, Magdolen V et al. (2018) Activation and activity of glycosylated KLKs 3, 4 and 11. *Biol Chem* 399:1009–1022

Open Access:

This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits use, duplication, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made.

Open access funding provided by Paris Lodron University of Salzburg.

Korrespondenzadressen:

Dr. Elfriede Dall
Universität Salzburg
Billrothstraße 11
A-5020 Salzburg
Tel.: +43-(0)662-80447278
elfriede.dall@sbg.ac.at
www.uni-salzburg.at/index.php?id=209043

Dr. Andreas Licht
Jena Bioscience GmbH
Löbstedter Straße 71
D-07749 Jena
Tel.: 03641-6285257
andreas.licht@jenabioscience.com
www.jenabioscience.com