

Enzymspezifität

Charakterisierung der Substratspezifität von Protein-Methyltransferasen

PHILIPP SCHNEE, SARA WEIRICH, ALBERT JELTSCH
 INSTITUT FÜR BIOCHEMIE UND TECHNISCHE BIOCHEMIE, ABTEILUNG BIOCHEMIE,
 UNIVERSITÄT STUTTGART

The regulation of cellular activities is a key hallmark in the development of complex life forms. Among other factors, it is facilitated by protein lysine methyltransferases (PKMTs), which modify proteins in a highly specific manner and regulate their biological activities. Here, we describe methods to decipher the PKMT-substrate specificity by biochemical experiments and molecular dynamics simulations. This led to the discovery of novel PKMT substrates and rational design of even better non-natural substrates, which represent a promising starting point for the design of novel PKMT inhibitors.

DOI: 10.1007/s12268-023-1930-y
 © Die Autorinnen und Autoren 2023

Die genetische Information einer jeden Zelle ist in der Basenpaarsequenz der DNA gespeichert. Die Transkription und Expression von einzelnen Genen wird von mehreren Mechanismen reguliert, darunter Transkriptionsfaktoren, nicht codierende RNA und die Struktur des Chromatins. Der Grundbaustein des Chromatins ist das Nukleosom, ein globuläres Histonoktamer, um welches die DNA gewickelt ist (Abb. 1A). Histone haben aus dem globulären Teil herausragende Enden (Histon tails), an denen in großer Zahl posttranslationale Modifikationen, u. a. Lysin-Methylierung, vorkommen. Die Methylierung bestimmter Lysinreste ist der Startpunkt für eine Kaskade an weiteren biologischen Prozessen, die ultimativ zu einer Restrukturierung des Chromatins führen und damit direkt Einfluss auf die Expression von Genen haben. PKMTs (Protein-Lysin-Methyltransferasen) sind Enzyme, die hochspezifisch eine bis maximal drei Methylgruppen an bestimmte Lysinreste des Histon tails übertragen (Abb. 1B). Dabei wird die aktivierte Methylgruppe vom Koenzym S-Adenosyl-L-Methionin (SAM) bereitgestellt [1].

Substratspezifität von PKMTs

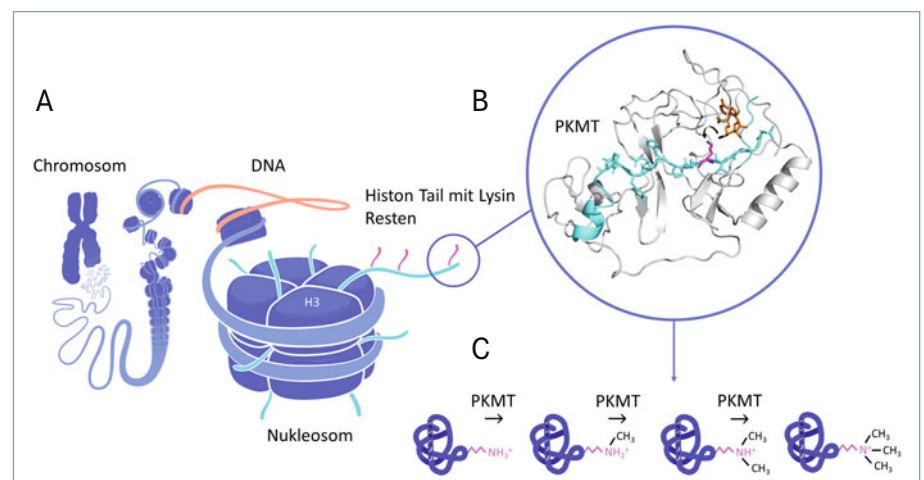
Histon tails besitzen mehrere Lysinreste, wobei eine Methylierung jeder Position ein

unterschiedliches Signal sendet, welches auch von der Methylierungsstufe abhängt (Abb. 1C). Zusätzlich weisen eine Reihe von Nicht-Histonproteinen in Zellkern und Cytosol Lysin-Methylierungen auf, die oft an der Regulation der biologischen Aktivität beteiligt sind. Die übertragene Methylgruppe kann beispielsweise Proteine stabilisieren

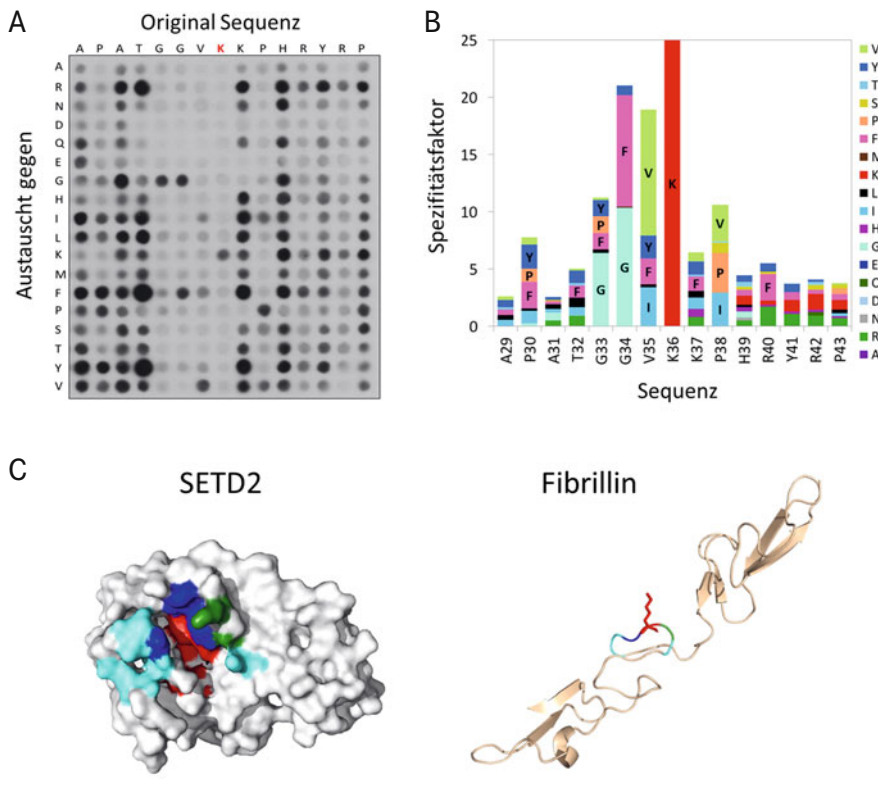
oder destabilisieren oder Protein-Protein-Interaktionen steuern [2]. Die Substratspezifität von PKMTs spielt deshalb eine essenzielle Rolle in der Regulation des zellulären Stoffwechsels. Eine durch Mutationen veränderte Substratspezifität von PKMTs kann daher dramatische Folgen haben und zu diversen Krebserkrankungen führen. Aus diesem Grund stellt die Charakterisierung der Substratspezifität einen entscheidenden Baustein für das Verständnis von beispielsweise akuten myeloischen Lymphomen dar, welche durch eine Mutation der PKMT NSD2 entstehen können [3].

Peptidarrays zur Charakterisierung der Substratspezifität von PKMTs

Damit die Substratspezifität von PKMTs aufgeklärt werden kann, müssen dem Enzym möglichst viele verschiedene Substrate angeboten werden. Deren unterschiedliche Methylierungseffizienz gibt dann Aufschluss darüber, welche Substrate bevorzugt werden. Für systematische Studien können Peptide als PKMT-Substrate eingesetzt werden, welche als Peptidarray mithilfe der SPOT-Technologie auf einer Cellulosemembran synthet-



▲ **Abb. 1:** Protein-Lysin-Methyltransferasen (PKMTs) sind Enzyme, welche die Struktur des Chromatins regulieren, indem sie Methylgruppen auf Histone übertragen. **A,** Nukleosome sind die kleinste Untereinheit des Chromatins und ein zentraler Regulator in der Genexpression. **B,** PKMTs übertragen Methylgruppen auf spezifische Lysinreste in Proteinen, z. B. in den Histon tails. **C,** Lysinreste in Proteinen und Peptiden können von PKMTs 1–3 Methylgruppen übertragen bekommen.



▲ **Abb. 2:** Die charakteristische Substratspezifität von PKMTs kann durch Methylierung von SPOT-Peptidarrays ermittelt werden. **A,** Aktivitätsprofil der PKMT SETD2 auf einem SPOT-Peptidarray. Die vertikale Achse zeigt 18 Aminosäuren, durch welche der entsprechende Rest der Ausgangssequenz (horizontal) ausgetauscht wurden. **B,** Analyse der Methylierung des Peptidarrays gibt Aufschluss über die präferenzierten Aminosäuren von SETD2 an jeder Position des Substratpeptids. **C,** Mit dem Spezifitätsprofil können unbekannte Methylierungssubstrate im Proteom gefunden werden. Beispielsweise methyliert die PKMT SETD2 zusätzlich zum bekannten Histon-H3-Proteinsubstrat auch das Glykoprotein Fibrillin, welches mit für die Struktur des Bindegewebes verantwortlich ist. Das Farbschema zeigt die Aminosäuresequenz von Fibrillin sowie die entsprechenden Kontaktpositionen in SETD2.

tisiert werden [4]. Ausgehend von der Sequenz einer bekannten Methylierungsstelle, z. B. 15 Aminosäuren aus dem Histon H3 *tail*, wird dann permutierend jede Position der Ausgangssequenz des Peptids gegen andere Aminosäuren ausgetauscht. An jedem Spot ist damit ein unterschiedliches Peptid gebunden (**Abb. 2A**). Die Membran wird anschließend mit radioaktiv markiertem Koenzym SAM und der zu untersuchenden PKMT inkubiert. Mittels Autoradiographie kann darauffolgend quantitativ ermittelt werden, welche Aminosäuren an welcher Position in den Peptiden einen positiven oder negativen Effekt auf die Methylierungseffizienz haben (**Abb. 2B**). Aus dem resultierenden Spezifitätsprofil lässt sich die genaue Substratspezifität der PKMT ablesen [5].

Identifizierung neuer PKMT-Substrate

Die entschlüsselte Substratspezifität einer PKMT eröffnet verschiedenste Applikationsmöglichkeiten. PKMTs haben neben den Histonen auch andere Nicht-Histon-Proteine als Substrate. Bisher sind für die meisten PKMTs allerdings nur wenige Nicht-Histon-Substrate

bekannt und für viele in massenspektroskopischen Experimenten nachgewiesene Lysin-Methylierungen ist die dafür verantwortliche PKMT nicht identifiziert [5]. Durch das Verständnis der Substratspezifität einer PKMT kann gezielt im Proteom nach Aminosäuresequenzen gesucht werden, die von der zu untersuchenden PKMT methyliert werden können (**Abb. 2C**). Durch diesen Ansatz konnten bereits diverse Nicht-Histon-Substrate von PKMTs gefunden werden. Beispielsweise wurde auf Grundlage des Spezifitätsprofils von SETD2 erkannt, dass SETD2 neben dem bekannten Histon-H3-Protein auch andere Substrate methyliert, die beispielsweise für die Struktur des Bindegewebes (Fibrillin) eine wichtige Rolle spielen [6].

Die Entdeckung von PKMT-Supersubstraten

Eine weitere spannende Applikation der PKMT-Spezifitätsprofile entwickelte sich aus der überraschenden Beobachtung, dass die Interaktion von PKMTs mit ihren bekannten Substraten in vielen Fällen nicht optimal ist. An mehreren Spots des Spezifitätsscans der

PKMT SETD2 war eine andere Aminosäure gegenüber der des eigentlichen Substrats (Histon H3 Lysin 36, H3K36) bevorzugt. Eine Kombination aus präferierten Aminosäuren führte zu einem rational designten Peptid, welches 100-fach effizienter von SETD2 methyliert wird [6].

Molekulardynamiksimulationen der Methylierung von Supersubstraten

Um die großen Unterschiede der Umsatzraten des natürlichen Peptidsubstrats (H3K36) und des Supersubstrats (ssK36) zu verstehen, wurden Kristallstrukturen beider Peptide im Komplex mit SETD2 angefertigt. Der Vergleich zeigte jedoch nur marginale Unterschiede und konnte die wesentlich effizientere Methylierung von ssK36 nicht erklären [9]. Da Kristallstrukturen nur den Grundzustand der Interaktion von Enzym und Peptid zeigen, wurden im nächsten Schritt molekulardynamische (MD-) Simulationen verwendet. MD-Simulationen sind Computersimulationen, welche die Wechselwirkungen zwischen Atomen iterativ berechnen. Daraus ergeben sich Bewegungsabläufe der Moleküle in einer Zeitskala von mehreren hundert Nanosekunden bis zu Millisekunden. In den Bewegungsabläufen können anschließend Interaktionen in dynamischen Zuständen gefunden werden, die in einer Kristallstruktur nicht beobachtet werden können [7].

Das Supersubstrat von SETD2 bildet in Lösung Haarnadelstrukturen aus

MD-Simulationen der Peptide in wässriger Lösung ohne Enzym zeigten, dass das Supersubstrat von SETD2 häufig in einer Haarnadelstruktur vorliegt, während das H3K36-Peptid eher eine ausgestreckte Konformation präferiert (**Abb. 3A**). Diese Beobachtung steht in Kontrast zu den Kristallstrukturen, die beide Peptide in einer ausgestreckten Konformation in einer Bindungsfurche des Enzyms zeigen. MD-Simulationen, die den Assoziationsprozess abbilden, zeigten jedoch, dass die Haarnadelstruktur vorteilhaft für die initiale Bindung des Supersubstrats und SETD2 ist. Die Haarnadel entfaltet sich dann im Zuge des Bindungsprozesses, sodass das Peptid in eine gestreckte Konformation übergeht (**Abb. 3B**). Das zu methylierende Lysin ist mittig in der Schleifenregion positioniert und kann mit maximaler Flexibilität positioniert werden, während die umliegenden Aminosäuren wie bei einem Reißverschluss graduell ihre Interaktionen mit dem Enzym ausbilden, wodurch sich die

Haarnadel öffnet (**Abb. 3C**). Bei einer Bindung in der ausgestreckten Konformation müssten demgegenüber alle Aminosäuren des Peptids ungefähr gleichzeitig ihre Interaktionen mit dem Enzym ausbilden, was schwieriger ist [8].

Das Supersubstrat interagiert besser mit dem Enzym in katalytisch relevanten Konformationen

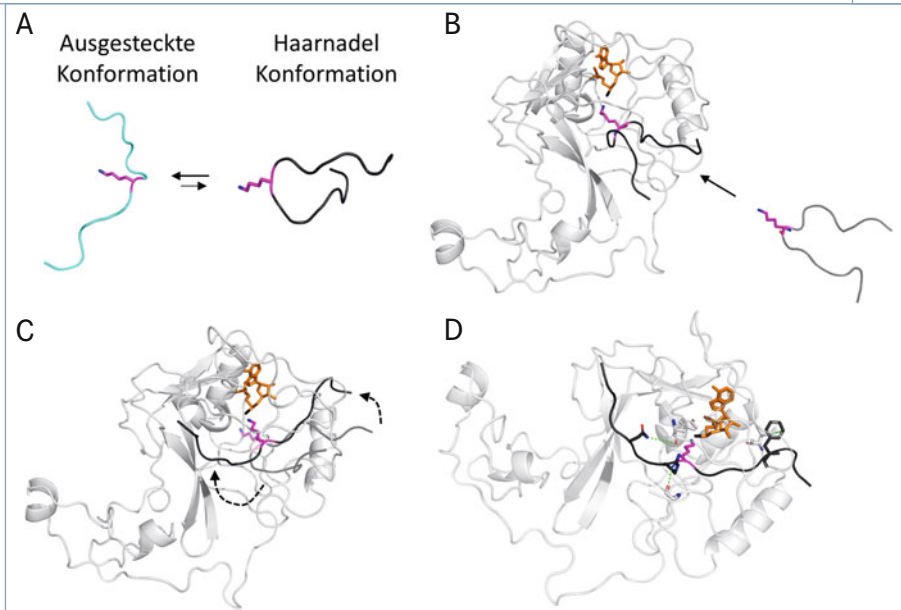
Auf Grundlage der Kristallstrukturen wurden weitere MD-Simulationen von SETD2 im Komplex mit jeweils den H3K36- und ssK36-Peptiden durchgeführt (**Abb. 3D**). Hierbei wurden besonders die Konformationen analysiert, deren Struktur dem bekannten Übergangszustand der Methylübertragung ähnlich sind. Die Ergebnisse zeigten, dass das Supersubstrat in diesen Übergangszustand ähnlichen Konformationen bestimmte Interaktionen mit SETD2 sehr viel stärker oder schwächer ausbildet als das H3K36-Peptid. Die veränderten Interaktionen, welche u. a. von den mutierten Aminosäuren ausgehen, sind ein weiterer Grund, warum das ssK36-Peptid wesentlich effizienter von SETD2 methyliert wird.

Supersubstrate mit Haarnadelstrukturen als PKMT-Inhibitoren

Mithilfe einer Kombination aus Peptidarrays und MD-Simulationen konnten ein Supersubstratpeptid für die PKMT SETD2 entwickelt und die molekularen Prinzipien seiner hyperschnellen Methylierung entschlüsselt werden. Diese Kombination ist ein vielversprechender Ansatz zum Design von Inhibitoren für PKMTs. In diversen Krebserkrankungen sind PKMTs mutiert und zeigen eine erhöhte Aktivität, was zu abnormalen Methylierungsmustern und zu einer fehlerhaften Genregulation führt [9]. Diese erhöhte Aktivität könnte durch individuell designte Supersubstrate wieder reduziert werden. Die Supersubstrate fungieren dabei als hocheffiziente kompetitive Inhibitoren und reduzieren die zelluläre PKMT-Aktivität. Erste biochemische Experimente zeigten, dass das Supersubstratpeptid die Aktivität von SETD2 auf sich umlenken kann und das eigentlich Zielmolekül Histon H3 schwächer von SETD2 methyliert wird. ■

Literatur

- [1] Allis CD, Jenuwein T (2016) The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nat Rev Genet* 17: 487–500
 [2] Weirich S, Schuhmacher MK, Kudithipudi S et al. (2020) Analysis of the Substrate Specificity of the SMYD2 Protein



▲ **Abb. 3:** MD-Simulationen erklären die effiziente Methylierung des Supersubstrats ssK36 durch SETD2. **A,** Das ssK36-Peptid präferiert eine Haarnadelstruktur in Lösung, das natürliche H3K36-Peptid dagegen eine gestreckte Konformation. **B,** Beschleunigte Assoziation des ssK36-Peptids an SETD2 aufgrund der Haarnadelstruktur und flexiblem Andocken des Ziel-Lysins. **C,** Entfaltungsprozess der Haarnadelstruktur in eine gestreckte Konformation. **D,** Spezifische Interaktionen zwischen dem Supersubstrat und SETD2.

- Lysine Methyltransferase and Discovery of Novel Non-Histone Substrates. *ChemBioChem* 21: 256–264
 [3] Copeland R, Moyer M, Richon V (2013) Targeting genetic alterations in protein methyltransferases for personalized cancer therapeutics. *Oncogene* 32: 939–946
 [4] Weirich S, Jeltsch A (2022) Specificity Analysis of Protein Methyltransferases and Discovery of Novel Substrates Using SPOT Peptide Arrays. *Methods Mol Biol* 2529: 313–325
 [5] Kudithipudi S, Jeltsch A (2016) Approaches and Guidelines for the Identification of Novel Substrates of Protein Lysine Methyltransferases. *Cell Chem Biol* 23: 1049–1055
 [6] Schuhmacher MK, Beldar S, Khella MS et al. (2020) Sequence specificity analysis of the SETD2 protein lysine methyltransferase and discovery of a SETD2 super-substrate. *Commun Biol* 3: 511
 [7] Hollingsworth SA, Dror RO (2018) Molecular Dynamics Simulation for All. *Neuron* 99: 1129–1143
 [8] Schnee P, Choudalakis M, Weirich S et al. (2022) Mechanistic basis of the increased methylation activity of the SETD2 protein lysine methyltransferase towards a designed super-substrate peptide. *Commun Chem* 5: 139
 [9] Kudithipudi S, Jeltsch A (2014) Role of somatic cancer mutations in human protein lysine methyltransferases. *Biochim Biophys Acta* 1846: 366–379

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.
Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Albert Jeltsch
 Institut für Biochemie und Technische Biochemie
 Universität Stuttgart
 Allmandring 31
 D-70569 Stuttgart
 albert.jeltsch@ibt.uni-stuttgart.de

AUTORINNEN UND AUTOREN



Philipp Schnee
 2015–2020 Biotechnologiestudium an der Universität Stuttgart. 2020 Beginn der Promotion im Bereich MD Simulationen und Epigenetik im Cluster of Excellence SimTech (EXC2075).



Sara Weirich
 2005–2012 Biotechnologiestudium an der Universität Stuttgart. 2012–2017 Promotion an der Universität Stuttgart, Institut für Biochemie und Technische Biochemie, Abteilung Biochemie. Seit 2017 Gruppenleiterin für Arbeiten an Protein-Methyltransferasen.



Albert Jeltsch
 1986–1991 Biochemie Studium an der Universität Hannover. 1992–1994 Promotion am Institut für Biophysikalische Chemie der Medizinischen Hochschule Hannover. 1999 Habilitation in Biochemie und Biophysikalischer Chemie an der Universität Gießen. 2006–2011 Full Professor für Biochemie an der Jacobs University Bremen. Seit 2011 Professor für Biochemie an der Universität Stuttgart.