

Exprimierte enzymatische Ligation zur Semisynthese chemisch modifizierter Proteine**

Zuzana Machova, Regula von Eggelkraut-Gottanka,
Nicole Wehofsky, Frank Bordusa und Annette G. Beck-
Sickinger*

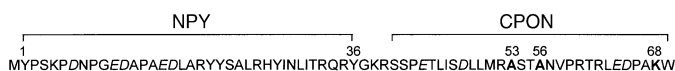
Die chemische Synthese ist die leistungsfähigste Methode, um selektiv modifizierte Proteine zu gewinnen. Sie eröffnet ein Ausmaß an Flexibilität für gezielte Proteinmodifizierungen, das das konventioneller ortsgerichteter Mutagenesetechniken weit übertrifft. Eine Reihe von Methoden ist bislang für die chemische Proteinsynthese entwickelt worden, von denen die native chemische Ligation (NCL)^[1] derzeit am häufigsten angewendet wird. Dieser Ligationsansatz basiert auf der chemoselektiven Reaktion eines C-terminalen Peptidthioesters mit einem zweiten Peptid, das N-terminal einen Cysteinrest enthält, wobei die Reaktion mit der Bildung einer nativen Peptidbindung endet. Mehrere Versuche wurden unternommen, um die Notwendigkeit eines Cysteinrests an der Ligationsstelle zu überwinden. Obwohl teilweise erfolgreich, z. B. mit Glycin^[2] oder Selenocystein^[3] anstelle von Cystein, limitiert dieses Merkmal noch immer die Flexibilität der NCL.

Die exprimierte Proteinligation (EPL)^[4] eröffnete eine neue Dimension hinsichtlich der Kettenlänge synthetisierbarer Proteine, indem sie rekombinante Techniken einschloss, unterliegt jedoch analogen Restriktionen wie die native Ligation. Als Ligationskatalysatoren eingesetzte Proteasen dagegen tolerieren eine größere strukturelle Vielfalt an der Kupplungsstelle. Die eingeschränkte primäre Substratspezifität dieser Enzyme engt jedoch ihren Einsatz für die Synthese grundsätzlich ein. Die Subtiligase-katalysierte Fragmentkondensation (SCFC), eine der bislang erfolgreichsten enzymatischen Ligationsstrategien, setzt ein genetisch optimiertes Enzym zur Synthese von nativer und modifizierter Ribonuclease A ein.^[5] Auch wenn hierdurch das Synthespektrum auf der Proteinseite erweitert werden konnte, unterliegt dieses Verfahren doch ebenfalls den typischen, durch die eingeschränkte Enzymspezifität hervorgerufenen Restriktionen

hinsichtlich der Sequenz geeigneter Kupplungsstellen. Dies macht deutlich, dass trotz der erzielten Fortschritte bei der Proteinsynthese ein großer Bedarf an alternativen Synthesemethoden mit breiter Anwendbarkeit besteht.

Wir stellen hier mit der „exprimierten enzymatischen Ligation“ (EEL) einen weiteren Schritt in Richtung dieses ehrgeizigen Zieles vor. Dieser Ansatz vereint die Vorteile der EPL mit denen der Substratmimetika-vermittelten Ligationsstrategie. Letztere eliminiert das Spezifitätsproblem der klassischen Protease-katalysierten Synthese, indem eine enzymspezifische Esterabgangsgruppe an den C-Terminus der ursprünglich nichtspezifischen Peptideinheit angefügt wird.^[6] Zugleich nutzt dieser kombinierte Ansatz die Vorteile der rekombinanten Expression langkettiger Peptidthioester, die dann als Substratmimetika fungieren können. Neben dem Einsatz einer gewöhnlichen Protease, z. B. der Glu/Asp-spezifischen Serin-Protease V8 aus *Staphylococcus aureus*, kennzeichnet diese Technik, dass die Ligationsreaktionen unabhängig von der Spezifität des Enzyms durchgeführt werden können.

Die Anwendbarkeit der EEL konnte durch die Synthese eines mit Carboxyfluorescein (CF) markierten Analogons des 69 Aminosäuren langen Prohormons des Neuropeptids Y (proNPY) belegt werden. Dieses Analogon enthält keine natürlich vorkommenden Cysteinreste (Schema 1). Die Pro-



Schema 1. Sequenz des von proNPY abgeleiteten und durch EEL synthetisierten Analogons. Alaninsubstitutionen erfolgten an den Positionen 53 und 56. Der Austausch von Met68 gegen Lysin erlaubte die ortsspezifische Einführung einer CF-Markierung in die Zielsequenz. Die Glu-X- und Asp-X-Peptidbindungen sind als potenzielle Spaltstellen kursiv hervorgehoben. Der zusätzliche N-terminale Methioninrest leitet sich vom Translationsstartcodon aller bakteriell exprimierten N-terminalen Segmente ab.

zessierung von proNPY führt zum Neuropeptid Y (NPY, 36 Aminosäuren), einem der häufigsten Neuropeptide im Gehirn, und zum C-flankierenden Peptid von NPY (CPON). NPY ist in zahlreiche biologische Prozesse involviert, z. B. in die Regulation der Nahrungsaufnahme und den Umgang mit Stress.^[7]

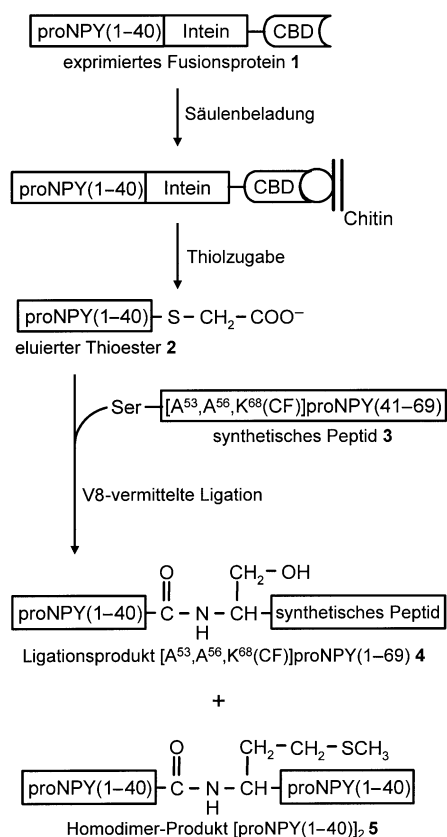
Die Synthesestrategie ist in Schema 2 skizziert. Der als Substratmimetikum agierende Thioester wurde über das System der Intein-vermittelten Reinigung mit einem Chitin bindenden Affinitätstag (IMPACT-System) gewonnen. Alle rekombinant exprimierten Proteine wurden mit einem zusätzlichen Methioninrest am N-Terminus erhalten.^[8] ProNPY(1–40) wurde als Fusionsvorläuferprotein, das eine C-terminale Intein-Chitin-Bindungsdomäne (CBD) aufwies, kloniert und in *E. coli* exprimiert. Unter optimierten Bedingungen konnte ein hohes Expressionsniveau des proNPY (1–40)-Intein-CBD-Proteins **1** realisiert werden (ca. 270 mg lösliches Protein pro Liter Zellkultur). Nach dessen Immobilisierung an Chitinharz wurde durch Thiol-induzierte Selbstspaltung des Inteins der sehr reine Thioester **2** erhalten (40 mg pro Liter Bakterienkultur), der direkt für die enzymatische Ligation eingesetzt werden konnte. Die Wahl von

[*] Prof. Dr. A. G. Beck-Sickinger, Dr. Z. Machova,
Pharm. R. von Eggelkraut-Gottanka
Institut für Biochemie der Universität Leipzig
Brüderstraße 34, 04103 Leipzig (Deutschland)
Fax: (+49) 341-97-36-909
E-mail: beck-sickinger@uni-leipzig.de

Dr. N. Wehofsky, Dr. F. Bordusa
Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung
06120 Halle (Deutschland)

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 610/Projekte A1 und A3) und dem Fonds der Chemischen Industrie unterstützt. Die Autoren danken Regina Reppich für die Aufnahme der MALDI-Massenspektren.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.



Scheme 2. Ablauf der EEL. Das Zielprotein proNPY(1-40) wurde in Bakterien mit einem C-terminalen Intein-CBD-Tag exprimiert. Nach Reinigung des Fusionsproteins 1 an Chitinharz wurde die Inteinspaltung durch Zugabe von 2-Thioessigsäure (HSCm) induziert. Der eluierte Thioester 2, der die spezifische Abgangsgruppe (S-CH₂-COO⁻) trägt, wurde für die Ligation mit synthetischem, von proNPY(41-69) abgeleitem Peptid 3 eingesetzt, das einen N-terminalen Serinrest enthält. Neben dem entsprechenden Ligationsprodukt 4 (Ausbeute 60%) wurde das selbstassoziierte Homodimer 5 in einer Ausbeute von 6% erhalten. Zu beachten ist, dass bedingt durch das Translationsstartcodon die Proteine 2, 4 und 5 einen zusätzlichen N-terminalen Methioninrest tragen.

HSCm als induzierendem Agens des Inteinspleißens beruhte auf dessen Fähigkeit, die Akzeptanz nichtspezifischer (nicht Glu- und Asp-haltiger) Acylreste durch die Protease V8 vermitteln zu können.^[9] Die Umsetzungsaktivität des Intein-Fusionsproteins betrug bei diesem untypischen Thiol unter optimierten Bedingungen bis zu 95% (für nähere Angaben siehe die Hintergrundinformationen). Das C-terminale, von proNPY(41-69) abgeleitete Fragment 3 wurde mittels üblicher, auf Fmoc basierender Festphasenpeptidsynthese hergestellt; es enthält den natürlich vorkommenden Serinrest am N-Terminus. Alaninsubstitutionen wurden an den Positionen 53 und 56 vorgenommen. Darüber hinaus wurde Met68 durch Lysin ersetzt, das an der Seitenkette mit CF modifiziert wurde (kommerziell erhältliches CF liegt als Gemisch zweier Isomere vor).

Zunächst wurde untersucht, ob die Protease V8 in der Lage ist, den Thioester 2 als Substrat zu erkennen. Hierfür wurde 2 in einem Ammoniumbicarbonat-Puffer mit einer Endkonzentration von 1.2 mM gelöst und mit 0.24 μM Enzym

inkubiert. Der Bicarbonat-Puffer wurde verwendet, da er die Spaltung von Glu-X-Bindungen unterdrückt.^[10] Die Protease V8 wurde zusätzlich mit HSCm vorinkubiert, um ihre proteolytische Aktivität zu minimieren. HPLC-Analysen zeigten, dass nach einer Inkubationszeit von 9 h der Ester vollständig verbraucht und somit die grundsätzliche Akzeptanz von 2 durch das Enzym gewährleistet ist. Unter diesen Bedingungen wurden keine unerwünschten proteolytischen Spaltungen nach den beiden Glutaminsäure- oder den drei Asparaginsäureresten von 2 detektiert (Abbildung 1 a). Inter-

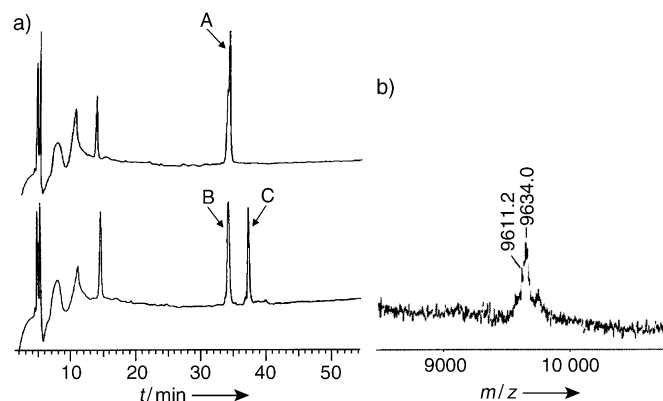


Abbildung 1. Analyse der durch die Protease V8 katalysierten Dimerisierung von proNPY(1-40) mittels Umkehrphasen-HPLC. a) HPLC-Profile des Ligationsansatzes zu Beginn (oben) und nach 9 h Reaktionszeit (unten) bei 220 nm. Die Analyse wurde auf einer C18-Säule mit 0.08% Trifluoressigsäure (TFA) in Acetonitril und 0.1% TFA in Wasser als Elutionssystem durchgeführt (Gradient 0 auf 100% Acetonitril über 90 min bei einer Fließgeschwindigkeit von 0.6 mL min⁻¹). Der proNPY(1-40)-SCm-Thioester 2 (Peak A) diente als Acyldonor und -acceptor in der Ligation. Nach Beendigung der enzymatischen Reaktion wurden der hydrolysierte Ester (Peak B) und das Homodimer 5 (Peak C) detektiert. Die verbleibenden Peaks entsprechen freigesetztem HSCm und Pufferhintergrund. b) Identifizierung von 5 mittels MALDI-Massenspektrometrie: $m/z_{\text{ber.}}$: 9610.8, $m/z_{\text{exp.}}$: 9634.0 (+Na⁺). Die Proteine 2, 4 und 5 tragen einen zusätzlichen N-terminalen Methioninrest.

essanterweise katalysierte das Enzym die Dimerisierung des Thioesters zum 82 Aminosäuren langen Dimer 5 nahezu ebenso schnell wie seine Hydrolyse (Abbildung 1 a, Peaks B und C).

Unter analogen Bedingungen wurde die Ligationsreaktion zwischen 2 und 3 durchgeführt, wobei beide Reaktanten in einer Konzentration von 1.2 mM eingesetzt wurden. Der Fortschritt der Synthese konnte wegen der CF-Markierung bei 3 einfach bei 450 nm verfolgt werden. Nach 9 h und vollständigem Esterverbrauch wurde die Reaktion beendet und mittels HPLC analysiert. Abbildung 2 zeigt ausgewählte HPLC-Profile, die das Entstehen einer Reihe von Produkten verdeutlichen. Deren Identität wurde mittels Massenspektrometrie aufgeklärt. Demnach entsprechen die Hauptproduktpeaks B dem gewünschten CF-markierten Produkt 4, das in einer Ausbeute von fast 60% gebildet wurde. Die Ausbeute an Esterdimer 5 erreichte nur 6%. Die Peaks C entsprechen verkürzten Peptidfragmenten, die aus kompetitiven Spaltungen von 3 in einem Ausmaß von 20% resultierten. Obwohl

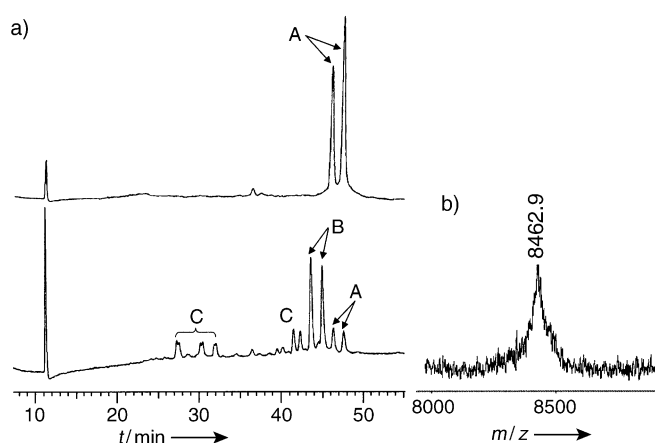


Abbildung 2. Analyse der Protease-katalysierten Synthese von $[A^{53}, A^{56}, K^{68}(CF)]\text{proNPY}(1-69)$ **4** mittels Umkehrphasen-HPLC. a) HPLC-Profil des Ligationsansatzes zu Beginn (oben) und nach 9 h Reaktionszeit (unten). Die Analyse wurde auf einer C18-Säule mit 0.08 % TFA in Acetonitril und 0.1 % TFA in Wasser als Elutionssystem durchgeführt (Gradient 0 auf 100 % Acetonitril über 90 min bei einer Fließgeschwindigkeit von 0.6 mL min^{-1}). Der Thioester **2** diente als Acyldonor und $[A^{53}, A^{56}, K^{68}(CF)]\text{proNPY}(41-69)$ **3** (Peaks A) war der Acylacceptor. Neben den intrinsischen Spaltprodukten von **3** (Peaks C) ließ sich das korrespondierende Ligationsprodukt **4** einfach identifizieren, da es eine CF-Markierung enthielt (Peaks B). Wegen der Markierung mit CF-Isomeren konnten das Edukt **3** und das Produkt **4** als zwei separate Peaks detektiert werden. b) Identifizierung des Ligationsprodukts **4** (mit N-terminalem Methioninrest) durch MALDI-Massenspektrometrie: $m/z_{\text{ber.}}$: 8423.6, $m/z_{\text{exp.}}$: 8462.9 ($+K^+$).

das Endprodukt **4** aus einem teilweise gegenüber Spaltungen sensitiven Fragment aufgebaut wurde, erwies es sich auch nach längeren Inkubationszeiten von bis zu einem Tag als ausgesprochen stabil.

Zusammenfassend bestätigen diese Resultate die EEL als eine effiziente Alternative zur NCL und SCFC, die unabhängig von der Anwesenheit Thiol enthaltender wie enzymspezifischer Aminosäurereste an der Ligationsstelle ist. Die EPL-Strategie, die wir parallel zur Synthese von proNPY angewendet haben,^[11] erforderte den Einbau eines artifiziellen Cysteinrests in die Proteinsequenz. Diese wesentliche Einschränkung kann elegant durch die EEL umgangen werden, indem spezifische Thioester-Substratmimetika für die enzymvermittelte Ligation eingesetzt werden. Die erfolgreiche Kupplung an einen Ser- oder Met-Rest an der Kupplungsstelle, die zu den Produkten **4** bzw. **5** führt, gibt einen eindeutigen Hinweis darauf, dass ein breiteres Spek-

trum an N-terminalen Aminosäureresten von der Protease V8 akzeptiert wird. Zusätzliche Kupplungsreaktionen mit Modellpeptiden mit N-terminalem Tyrosin- oder Isoleucinrest als Acylacceptor stützen diese Annahme (siehe Hintergrundinformationen). Eine weitere Bestätigung der Hypothese leitet sich von unseren Screeningstudien zum Einfluss von Substratmimetika auf die Flexibilität der Protease V8 bei der Peptidsynthese ab,^[12] nach denen das Enzym a priori eine breite Toleranz gegenüber Sequenz und Länge des Acylacceptors aufweist. Dies gilt, vermittelt durch das Substratmimetikum, ebenfalls bezüglich der Acyldonorkomponente. Die hier vorgestellten Resultate lassen daher erwarten, dass die exprimierte enzymatische Ligation ein hohes Potenzial hinsichtlich der Erhöhung der Flexibilität bestehender Proteinsynthesemethoden hat. Weitergehende Untersuchungen zur Modifizierung von Proteinen, z. B. durch die Einführung von Spinresonanzsonden und nichtcodierten Aminosäuren in ausgewählte Zielsequenzen oder durch Photoaffinitätsmarkierungen, werden derzeit durchgeführt.

Eingegangen am 29. April 2003 [Z51774]
Online veröffentlicht am 30. September 2003

Stichwörter: Enzymatische Ligation · Fluoreszenzsonden · Neuropeptid Y · Proteinmodifikationen · Substratmimetika

- [1] P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. B. Kent, *Science* **1994**, 266, 776–779.
- [2] C. Marinzi, S. J. Bark, J. Offer, P. E. Dawson, *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, 9, 2323–2328.
- [3] R. J. Hondal, R. T. Raines, *Methods Enzymol.* **2002**, 347, 70–83.
- [4] T. W. Muir, R. M. Hofmann, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, 13, 297–303.
- [5] D. Y. Jackson, J. Burnier, C. Quan, M. Stanley, J. Tom, J. A. Wells, *Science* **1994**, 266, 243–247.
- [6] F. Bordusa, *Curr. Protein Pept. Sci.* **2002**, 3, 159–180.
- [7] D. R. Gehlert, *Neuropeptides* **1999**, 33, 329–338.
- [8] S. Chong, F. B. Mersha, D. G. Comb, M. E. Scott, D. Landry, L. M. Vence, F. B. Perler, J. Benner, R. B. Kucera, C. A. Hirvonen, J. J. Pelletier, H. Paulus, M. Q. Xu, *Gene* **1997**, 192, 271–281.
- [9] N. Wehofskey, F. Bordusa, *FEBS Lett.* **1999**, 443, 220–224.
- [10] J. J. Birktoft, K. Breddam, *Methods Enzymol.* **1994**, 244, 114–126.
- [11] R. A. von Eggelkraut-Gottanka, Z. Machova, E. Grouzmann, A. G. Beck-Sickinger, *ChemBioChem* **2003**, 4, 425–433.
- [12] N. Wehofskey, J. Wissmann, M. Alisch, F. Bordusa, *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, 1479, 114–122.