

Synthese von Proteinmimetika mit nichtlinearer Rückgratstruktur durch Kombination von molekularbiologischen, enzymatischen und chemischen Methoden**

Stephan Pritz, Oliver Kraetke, Annerose Klose, Jana Klose, Sven Rothemund, Klaus Fechner, Michael Bienert und Michael Beyermann*

Professor Louis A. Carpino zum 80. Geburtstag gewidmet

Die Entwicklung leistungsfähiger Methoden zur Proteinsynthese eröffnet neue Wege zur Aufklärung der Wirkungsmechanismen lebenswichtiger Proteine. Dabei werden einerseits modifizierte Aminosäuren als Sonden in natürliche Proteine eingebaut oder andererseits Proteinmodelle hergestellt, die Strukturen und Funktionen der natürlichen Proteine nachahmen. Während sich für die Herstellung von modifizierten oder künstlichen Proteinen mit der normalen, linearen Rückgratstruktur die Ligation exprimierter Proteine und das *trans*-Spleißen als semisynthetische Methoden bewährt haben,^[1] erfordert die Herstellung von Proteinen mit mehrfach verzweigtem und polycyclischem Rückgrat eine Kombination molekularbiologischer, enzymatischer und chemischer Synthesemethoden („combination of recombinant, enzymatic and chemical synthesis“, CRECS). Derartige Proteine mit nichtlinearer Rückgratstruktur könnten Modelle für den extrazellulären Teil von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) ergeben, mit deren Hilfe Informationen über die Bindungsmechanismen der biologischen Peptidliganden solcher Rezeptoren erhalten werden können.

Die meisten Pharmaka greifen an GPCRs an,^[2] aber das Wissen über die molekularen Mechanismen dieser Prozesse ist sehr begrenzt, da GPCRs hoch auflösenden Strukturanalysemethoden gegenwärtig kaum zugänglich sind. Für Peptidrezeptoren konnte gezeigt werden, dass die extrazellulären Rezeptordomänen – der N-Terminus (ECD1) und die drei Schleifen (Loops; ECD2, 3, 4) – für die Ligandbindung häufig von besonderer Bedeutung sind. Im Fall des Rezeptors vom Subtyp 1 für den Corticotropin-releasing-Faktor (CRF₁), der zur Familie B1 der GPCRs gehört, wurde beispielsweise ge-

zeigt, dass der N-Terminus die Hauptbindungsstelle für den Liganden darstellt, da ein löslicher, nichtglykosylierter ECD1 bereits beträchtliche Affinität für den natürlichen Peptidagonisten Urocortin 1 und den peptidischen Antagonisten Astressin aufweist.^[3] Bemerkenswert ist aber, dass wir für ECD1 von CRF₁ für ¹²⁵I-markiertes Sauvagin,^[4] einen weiteren natürlichen Peptidagonisten mit einer dem Urocortin 1 vergleichbaren Affinität für den nativen CRF-Rezeptor,^[5] keine Bindung fanden. Dieses Ergebnis lässt uns für diese beiden Agonisten eine unterschiedliche Beteiligung der extrazellulären Loops an der Rezeptorbindung vermuten. Um diesen Sachverhalt zu untersuchen, haben wir ein Konstrukt aus den vier extrazellulären Domänen des CRF1-Rezeptors synthetisiert und dessen Bindungseigenschaften für Urocortin 1 und Sauvagin bestimmt. Gleichzeitig sollte mit dieser Synthese eines Rezeptormodells mit nichtlinearem Rückgrat das Potenzial einer CRECS-Strategie demonstriert werden.

Zur Realisierung einer gewünschten Proteintopologie hat die Arbeitsgruppe von Mutter^[6] das TASP-Konzept (template assembled synthetic proteins) vorgeschlagen und unter anderem für die Synthese eines Konstrukt mit drei Rezeptorschleifen erprobt.^[7] Da keine experimentellen Daten zur Struktur von Rezeptoren der Klasse B vorliegen, gaben wir für unser Rezeptormodell vorerst keine strukturellen Einschränkungen vor, sondern legten Wert auf Flexibilität der einzelnen Domänen. Dadurch sollte geklärt werden, ob es im Konstrukt eine Selbstorganisation durch spezifische Wechselwirkungen der Domänen untereinander geben kann. Unser vorrangiges Ziel bestand in der Entwicklung einer einfachen Synthesestrategie für die einzelnen Rezeptordomänen – die cyclischen Formen der Schleifensequenzen und den N-Terminus mit seinen drei Disulfidbrücken – sowie deren Kupplung an ein geeignetes Templat. Um ein einheitliches Konstrukt zu erhalten, war es notwendig, die einzelnen Domänen vor der ortsspezifischen Kupplung an das Templat reinigen und analysieren zu können. Das Templatpeptid wurde aus Glycin, Glutaminsäure und Lysin aufgebaut, wobei die Glutaminsäurereste der besseren Wasserlöslichkeit und die Aminogruppen der Lysinreste als Ankergruppen für die einzelnen Domänen dienten. Zusätzlich wurde ein Biotinrest in das Templat eingeführt, um in Hinblick auf spätere Bindungsuntersuchungen (scintillation proximity assay, SPA) eine Fixierung an avidinbeschichtetes Harz zu ermöglichen (Abbildung 1).

[*] S. Pritz, Dr. O. Kraetke, A. Klose, Dr. J. Klose, Dr. S. Rothemund, Dr. K. Fechner, Prof. M. Bienert, Dr. M. Beyermann
Abteilung für Peptidchemie und -biochemie
Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie
Robert-Rössle-Straße 10, 13125 Berlin (Deutschland)
Fax: (+ 49) 30-9479-3159
E-Mail: beyermann@fmp-berlin.de
Homepage: <http://www.fmp-berlin.de>

[**] Wir danken Gabriela Vogelreiter (Bindungsuntersuchungen) und Dr. H. Berger (kritische Diskussion des Manuskripts) sowie der DFG (SFB 449, TP A6) und der Europäischen Kommission (QLK3-CT-2002-01989) für die finanzielle Unterstützung.

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

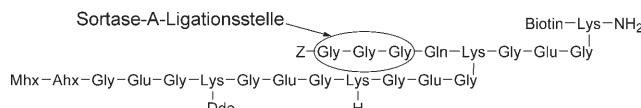


Abbildung 1. Struktur des Templaats für die ortsspezifische Anknüpfung der Rezeptordomänen (Mhx = Maleimidohexansäure, Ahx = ϵ -Aminohexansäure).

Die aufeinanderfolgende ortsspezifische Kupplung der einzelnen Domänen an das Templat wurde durch Verwendung orthogonaler Schutzgruppen für die Aminofunktionen (Z = Benzyloxycarbonyl, Dde = (4,4-Dimethyl-2,6-dioxocyclohexyliden)ethyl) erreicht – einerseits zur schrittweisen Einführung von Maleimidohexansäureresten, die zur Thiol-kupplung der Schleifen verwendet wurden, und andererseits zur enzymatischen Ligation des N-Terminus an die Triglycyl-Kette des Templaats (Abbildung 2).

Die natürlichen Cysteinreste in ECD2 und 3 konnten durch Alanin und Serin ersetzt werden, weil die entsprechende Rezeptormutante unveränderte Affinität gezeigt hatte.^[8] Der zur Ligation an das Templat notwendige Thiolrest wurde dann durch einen N-terminal in die lineare

Schleifensequenz eingefügten Cysteinrest erhalten, der auch zur Cyclisierung über einen entsprechenden Peptidthiolester mit nativer chemischer Ligation (NCL)^[9] genutzt wurde. Um die Epimerisierung zu vermeiden, und im Sinne einer schnellen Cyclisierung, wurde C-terminal zusätzlich ein Glycinrest eingefügt. Die Maleimidogruppe für die Addition der ersten Schleife (ECD4) wurde im Verlauf der Festphasensynthese des Templaats eingebaut. Da ECD4 keinen Lysinrest enthält, konnte nach der Kupplung an die Maleimidogruppe die freie Aminogruppe am Templat gezielt mit Maleimidohexansäure-N-hydroxysuccinimidester (Mhx-OSu) acyliert werden. Anschließend wurde ECD2 über Thiolligation eingeführt. Da auch ECD2 keinen Lysinrest trägt, konnte nach Abspaltung der Dde-Schutzgruppe durch Hydrazinolyse die freigesetzte Aminogruppe mit Mhx-OSu umgesetzt und daraufhin ECD3 über die so erhaltene Maleimidgruppe eingeführt werden. Die nachfolgende Abspaltung der Z-Gruppe mit Trifluormethansulfonsäure (TFMSA) lieferte schließlich das Dreischleifenkonstrukt (Abbildung 3B), das zur enzymatischen Kupplung mit dem N-Terminus eingesetzt wurde (LC-MS-Ergebnisse für alle Zwischenprodukte sind in den Hintergrundinformationen dargestellt).

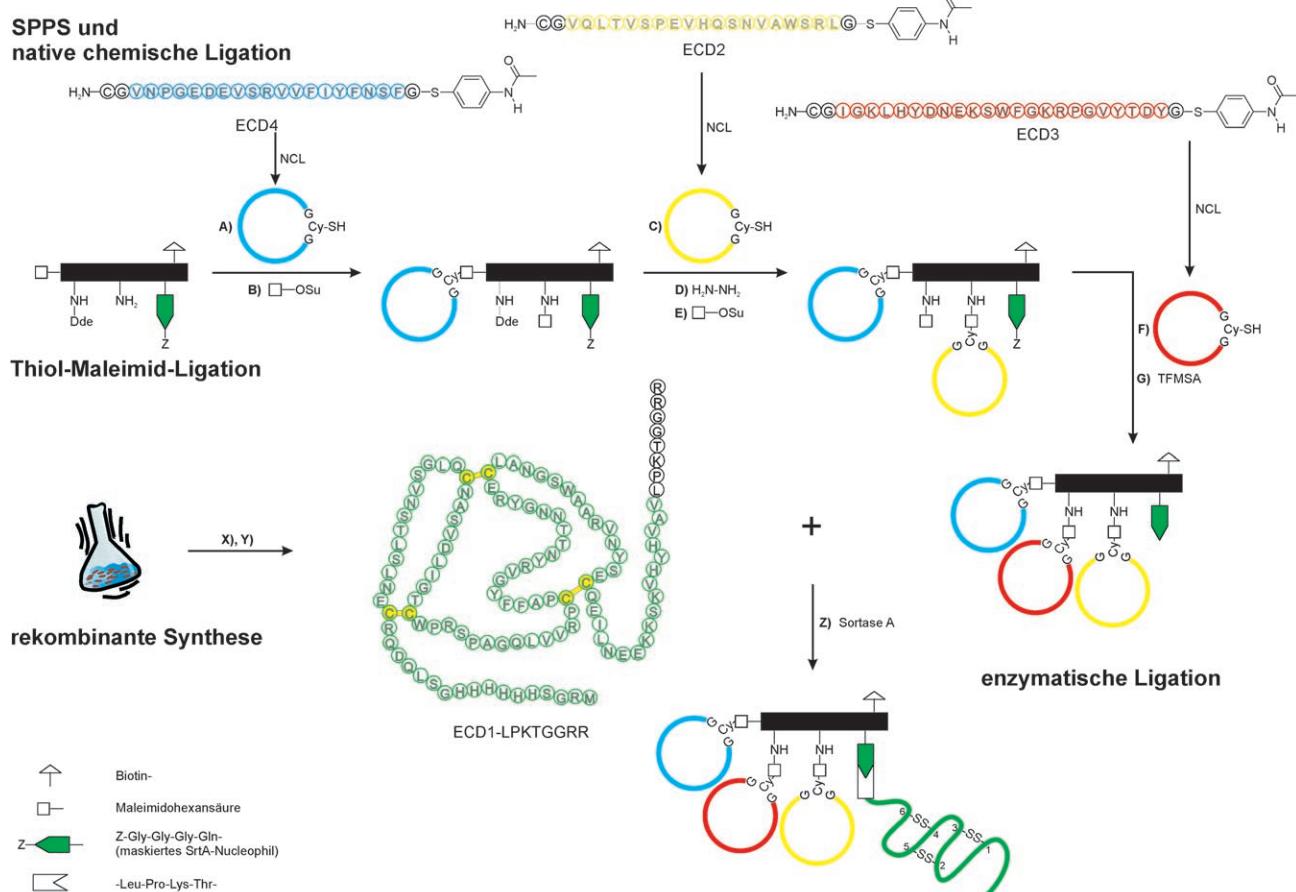


Abbildung 2. CRECS-Strategie zur Herstellung eines Proteinmimetikums für den extrazellulären Teil des G-Protein-gekoppelten Rezeptors CRF₁: A,C,F) Thiol-Maleimid-Ligation, B,E) Kupplung von Maleimidohexansäure über OSu-Ester, D) Abspaltung der Dde-Gruppe mit Hydrazin, G) Abspaltung der Z-Gruppe mit TFMSA/TFA, X) Expression von ECD1-LPKTGGRR in *E. coli*, Y) oxidative Faltung/Bildung des Disulfidmusters von ECD1-LPKTGGRR, Z) Sortase-A-katalysierte Ligation des Dreischleifenkonstrukt und ECD1-LPKTGGRR (siehe die Hintergrundinformationen).

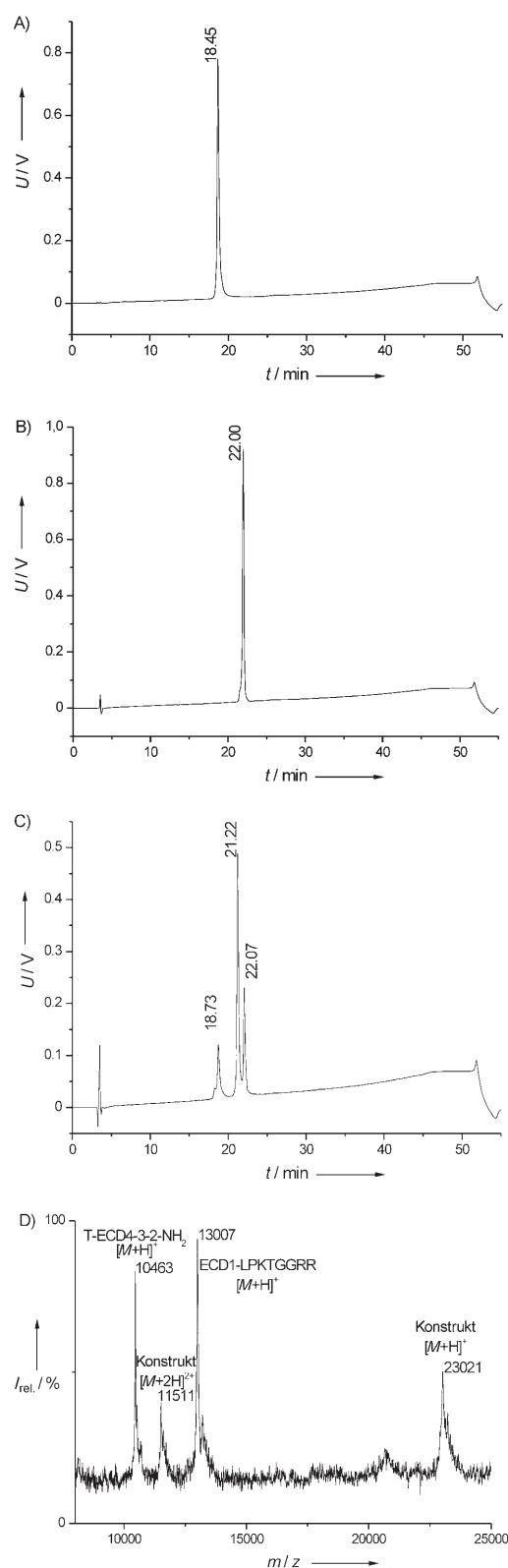


Abbildung 3. Sortase-A-katalysierte Ligation: HPLC-Profil (220 nm) von ECD1-LPKTGGR (A), Dreischleifenkonstrukt (B) und der Ligationsmischung nach 2 Tagen (C) sowie ein MALDI-MS-Spektrum dieser Ligationsmischung (D).

Für ECD1-LPKTGGR verwendeten wir ein kürzlich von uns beschriebenes Protokoll^[4] zur rekombinanten Synthese des CRF-Rezeptor-N-Terminus in *E. coli*, In-vitro-Faltung und HPLC-Reinigung, wobei der N-Terminus C-terminal um eine Spaltstelle für Sortase A (LPKTGGRR) verlängert wurde. ECD1-LPKTGGR wurde in hoher Reinheit erhalten (Abbildung 3 A), und das korrekte Disulfidbrückenmuster wurde durch eine LC-MS-Analyse der Fragmente nach dem Chymotrypsin-Abbau bestätigt (siehe die Hintergrundinformationen). Sortase A spaltet das LPXTG-Motiv zwischen T und G und überträgt das Proteinfragment über einen Thiolester auf N-terminale Oligoglycin-Ketten wie das GGG-Motiv im Dreischleifenkonstrukt. Unsere optimierten Bedingungen zur Sortase-A-katalysierten Peptidübertragung^[10] waren auch in diesem Fall erfolgreich (Abbildung 3,C,D). Das Produkt konnte anschließend mithilfe von HPLC gereinigt werden (Abbildung 4 A), und die MALDI-massenspektrometrische Analyse bestätigte die Identität des Proteinmimetikums für CRF₁ (Abbildung 4 B).

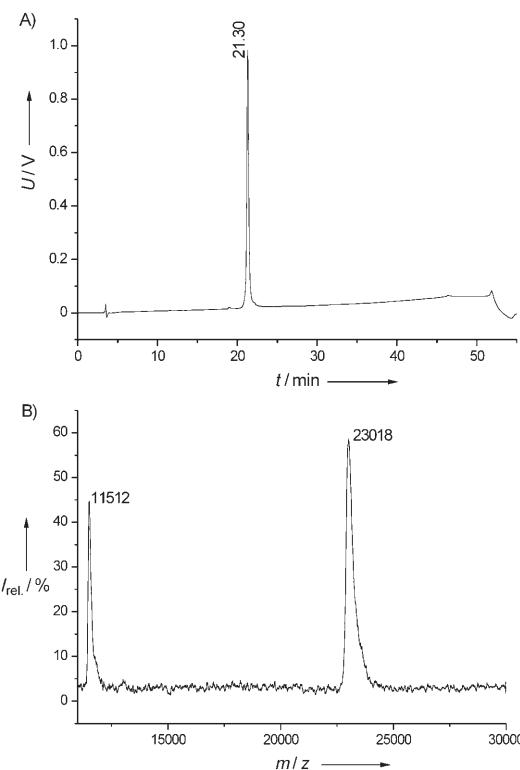


Abbildung 4. Charakterisierung des Proteinmimetikums für den extrazellulären Teil des CRF₁-Rezeptors. A) HPLC-Profil (220 nm) und B) MALDI-MS-Ergebnisse: $[M+H]^+$ ber.: 23 024, gef.: 23 018 \pm 10; $[M+2H]^{2+}$ ber.: 11 512, gef.: 11 512 \pm 10.

Im Unterschied zum Rezeptor-N-Terminus^[4] bindet unser Rezeptormimetikum nicht nur Urocortin 1, sondern auch Sauvagin. Deshalb konnte ¹²⁵I-Sauvagin für das Mimetikum als Tracer (0.5 nM) verwendet werden, und Urocortin 1 zeigte hier ebenfalls eine hoch affine Bindung (Abbildung 5). Da das Mimetikum ohne den N-Terminus, d.h. das Dreischleifenkonstrukt, keinen der beiden Liganden bindet, bewirkt

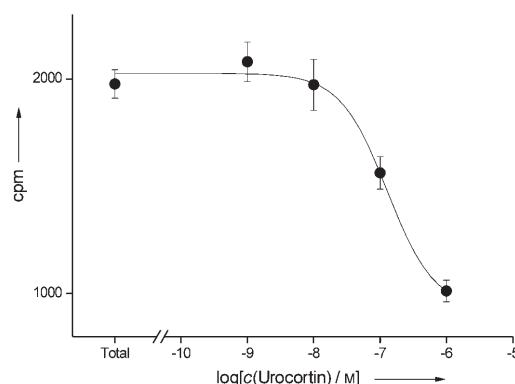


Abbildung 5. Bindung von Urocortin 1 an das Rezeptormimetikum für CRF₁. Tracer: 0.5 nm ¹²⁵I-Sauvagin.

offensichtlich erst das Zusammenspiel der Schleifen mit dem N-Terminus die hohe Affinität für Sauvagin. Dagegen wird die Affinität für Urocortin 1 durch die Gegenwart der Schleifen nur unwesentlich beeinflusst, da der N-Terminus allein schon ähnlich affin ist ($K_d = \approx 130$ nm^[4]) wie das Mimetikum.

Die Affinität von Urocortin 1 für CRF₁ im ungekoppelten Zustand (stabil exprimiert in HEK-Zellen; $K_d \approx 4$ nm^[11]) wird mit diesem ersten Rezeptormimetikum erwartungsgemäß nicht erreicht (Urocortin 1; $K_d \approx 70$ nm), aber das Ergebnis liefert einen Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen zum Einfluss einer veränderten Topologie, beispielsweise durch Verwendung eines cyclischen Templat oder durch die Einführung der nativen Disulfidbrücke zwischen ECD2 und 3, auf die Ligandbindungseigenschaften des Mimetikums. Darüber hinaus können derartige GPCR-Mimetika wegen ihrer geringen Größe im Vergleich zum nativen Rezeptor für strukturanalytische Untersuchungen zum Mechanismus der Ligandbindung interessant sein oder wegen ihrer Löslichkeit in wässrigen Systemen Untersuchungen ermöglichen, die mit membrangebundenen Proteinen nicht denkbar sind.

CRECS-Strategien wie die vorgestellte Kombination von rekombinanten, enzymatischen und chemischen Synthesemethoden, eröffnen den Zugang zu neuartigen Proteinmodellen mit nichtlinearer Rückgratarchitektur. Die Verwendung von orthogonalen Schutzgruppen und modernen chemischen Ligationstechniken ermöglicht den Aufbau komplexer Proteinstrukturen. Durch NCL und Thiol-Maleimid-Ligation kann die Synthese und schrittweise Kupplung von gereinigten, auch cyclischen Peptiden an ein Templat problemlos in wässrigen Systemen erfolgen. Besonders bemerkenswert sind die Möglichkeiten, die sich aus der Anwendung spezifischer Transpeptidasen wie der Sortase A ergeben, die nicht nur hoch sequenzspezifisch ist, und damit keine unerwünschte Proteolyse zeigt, sondern das Substrat in Gegenwart von geeigneten Nucleophilen auch nicht hydrolysiert. Aufgrund der milden Reaktionsbedingungen können solche Enzyme zum Einbau sehr labiler Systeme, wie den hier beschriebenen Strukturen mit Disulfidbrücken, aber auch von

glykosylierten oder sulfatierten Strukturen, eingesetzt werden, was die Möglichkeiten für die Proteinsynthese und damit für die Aufklärung von Struktur-Funktions-Beziehungen von Proteinen wesentlich erweitert.

Experimentelles

ECD2 (c(CGVQLTVSPEVHQSNVAWSRLG)), ECD3 (c(CGIGKLHYDNEKSWFGKRPGVYTDYG)), ECD4 (c(CGVNPGEDEVSRVVFYFNSFG)) und das Templat (Biotin-K-[Z-GGGQK(Mhx-Ahx-GEGK(Dde)GEGKGEG)GEG]-amid) wurden durch automatisierte Festphasenpeptidsynthese unter Verwendung der Fmoc-Strategie hergestellt (Applied Biosystems, 433a). Nach Abspaltung vom Peptidharz wurden Peptidthiolester der geschützten Peptide mit Carbodiimid und *p*-Acetamidothiophenol gebildet.^[12] Nach der vollständigen Deblockierung wurden die Peptidthiolester mithilfe von NCL cyclisiert und gereinigt. ECD2, 3 und 4 wurden nacheinander durch Thiol-Maleimid-Ligation mit dem Templat verknüpft. Der in *E. coli* exprimierte N-Terminus wurde nach oxidativer Faltung^[4] in einer Sortase A-katalysierter Ligation an das Dreischleifenkonstrukt gekuppelt. Die Reinheit und Identität des gereinigten Rezeptormimetikums sowie der Zwischenstufen wurden durch HPLC-Analyse und Massenspektrometrie bestätigt. Die Ligandbindungseigenschaften des Rezeptormimetikums wurden mit SPA bestimmt.^[4]

Eingegangen am 13. Dezember 2007
Online veröffentlicht am 28. März 2008

Stichwörter: Chemische Ligation · Enzymatische Ligation · Proteindesign · Rezeptormimetika

- [1] V. Muralidharan, T. W. Muir, *Nat. Methods* **2006**, *3*, 429–438.
- [2] J. Drews, *Science* **2000**, *287*, 1960–1964.
- [3] M. H. Perrin, W. H. Fischer, K. S. Kunitake, A. G. Craig, S. C. Koerber, L. A. Cervini, J. E. Rivier, J. C. Groppe, J. Greenwald, S. M. Nielsen, W. W. Vale, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 31528–31534.
- [4] J. Klose, K. Fechner, M. Beyermann, E. Krause, N. Wendt, M. Bienert, R. Rudolph, S. Rothmund, *Biochemistry* **2005**, *44*, 1614–1623.
- [5] J. Vaughan, C. Donaldson, J. Bittencourt, M. H. Perrin, K. Lewis, S. Sutton, R. Chan, A. V. Turnbull, D. Lovejoy, C. Rivier, J. Rivier, P. E. Sawchenko, W. Vale, *Nature* **1995**, *378*, 287–292.
- [6] M. Mutter, S. Vuilleumier, *Angew. Chem.* **1989**, *101*, 551–571; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1989**, *28*, 535–554.
- [7] M. Mutter, P. Dumy, P. Garrouste, C. Lehmann, M. Mathieu, C. Peggion, S. Peluso, A. Razaname, G. Tuchscherer, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 1588–1591; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 1482–1485.
- [8] L. J. Qi, A. T. Leung, Y. Xiong, K. A. Marx, A. B. AbouSamra, *Biochemistry* **1997**, *36*, 12442–12448.
- [9] P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. B. Kent, *Science* **1994**, *266*, 776–779.
- [10] S. Pritz, Y. Wolf, O. Kraetke, J. Klose, M. Bienert, M. Beyermann, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 3909–3912.
- [11] M. Beyermann, N. Heinrich, K. Fechner, J. Ferkert, W. Zhang, O. Kraetke, M. Bienert, H. Berger, *Br. J. Pharmacol.* **2007**, *151*, 851–859.
- [12] R. von Eggelkraut-Gottanka, A. Klose, A. G. Beck-Sickinger, M. Beyermann, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 3551–3554.