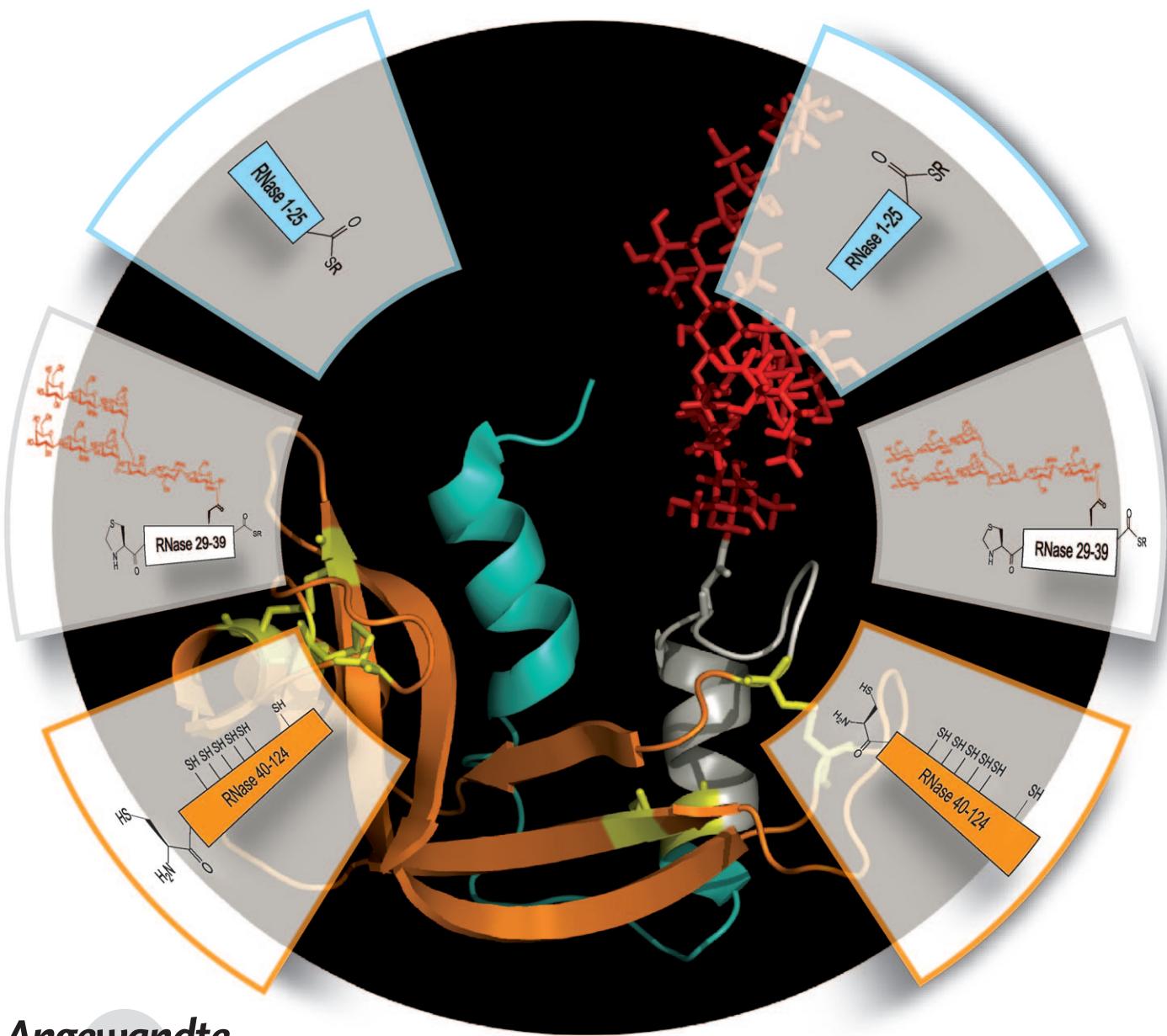


Semisynthese eines homogenen Glycoprotein-Enzyms: Ribonuclease C (Teil 1)**

Christian Piontek, Petra Ring, Olaf Harjes, Christian Heinlein, Stefano Mezzato,
Nelson Lombana, Claudia Pöhner, Markus Püttner, Daniel Varón Silva,
Andreas Martin, Franz Xaver Schmid und Carlo Unverzagt*

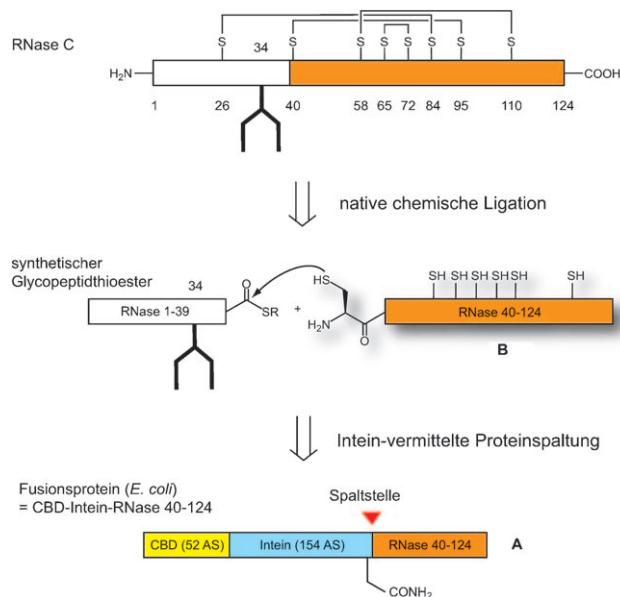
Professor Chi-Huey Wong zum
60. Geburtstag gewidmet



Angewandte
Chemie

Die Entwicklung chemoselektiver Kupplungsmethoden hat die Totalsynthese von Proteinen entscheidend verbessert.^[1] Besonders hervorzuheben ist die Methode der nativen chemischen Ligation (NCL),^[2] die an der Ligationsstelle eine natürliche Peptidbindung erzeugt. Bei der NCL wird ein Peptidthioester selektiv mit einem weiteren Peptid verknüpft, das ein N-terminales Cystein trägt. Die Ligation rekombinanter Fragmente wurde als Ligation exprimierter Proteine (expressed protein ligation, EPL) eingeführt.^[3] Derzeit können rekombinante Peptidthioester nur über die thiolysische Abspaltung eines Inteins erzeugt werden.^[3b] Proteinfragmente, die ein N-terminales Cystein tragen, werden aus den Vorstufen durch spezifische Proteasen^[3f-i] oder durch BrCN-Spaltung^[3j] freigesetzt. Bisher wurde die Nutzung der entsprechenden kommerziell erhältlichen Intein-Methode nur in wenigen Fällen beschrieben.^[4] Die Synthese von einheitlich glycosylierten therapeutischen Glycoproteinen ist von großem Interesse, da die für Struktur-Wirkungs-Beziehungen benötigten homogenen natürlichen Glycoformen am ehesten durch Peptidligation zugänglich sind.^[5] Die pankreatischen Ribonucleasen (RNases) stellen ein etabliertes Referenzsystem der Proteinsynthese dar.^[6a-c] RNase A liegt nicht glycosyliert vor, wogegen die RNases B, C und D unterschiedliche Glycosylierungen tragen. Bei RNase B findet man ein oligomannosidisches und bei RNase C ein komplexes N-Glycan.^[6] Wir haben bovine RNase C^[6d] als Modell für die Glycoproteinsemisynthese ausgewählt, da die meisten therapeutischen Glycoproteine (z.B. Hormone, Enzyme, Antikörper) ebenfalls mehrere Disulfide sowie komplexe N-Glycane enthalten. Eine richtungsweisende Studie wurde mit den verschiedenen Glycoformen der pankreatischen RNase B durchgeführt.^[6e] Im Verlauf unserer Arbeiten haben wir eine rekombinante Methode zur Gewinnung von chemisch stabilisierten Proteinfragmenten entwickelt. Es zeigte sich, dass die Isolierung von thiolreichen Proteinfragmenten mit N-terminalem Cystein durch Schützung in Form gemischter Disulfide wesentlich erleichtert wird.

Bovine Ribonuclease besteht aus 124 Aminosäuren und enthält eine N-Glycosylierungsstelle an Asn34 sowie acht Cysteine, die vier Disulfidbrücken bilden. Anfänglich sollte RNase durch NCL aus dem Fragment 40–124 (**B**) und dem Glycopeptidthioester 1–39 (**C**) aufgebaut werden (Schema 1). Der Thioester **C** sollte an PEGA-Doppelkettner-Harz^[7] erzeugt werden, wogegen für RNase-Fragment **B** eine rekombinante Methode die rasche Herstellung des Cys-Fragments **B** erlauben sollte. Da sich Inteine für die Gewinnung von Thioestern für EPL bestens bewährt haben, sollten sie auch



Schema 1. Retrosynthese einheitlich glycosylierter RNase C.

bei Fragment **B** eingesetzt werden. Die C-terminale Proteaseaktivität des Inteins ist pH-abhängig und erzeugt ein Succinimid aus einem C-terminalen Asparagin.^[4b] Daher sollte RNase-Fragment **B** als Teil des Fusionsproteins **A** exprimiert werden, das ein Ssp-DnaB-Intein und eine Chitinbindedomäne (CBD) enthält, die zur Affinitätsreinigung verwendet werden kann.

Als Expressionsvektor wurde der kommerziell erhältliche pTWIN1-Vektor^[8] eingesetzt. Das Genfragment für RNase 40–124 **B** wurde durch Polymerasekettenreaktion aus fünf synthetischen Oligonucleotiden zusammengefügt, deren Codons für eine Expression in *E. coli* optimiert waren (Schema S1 in den Hintergrundinformationen). Das Ampliton wurde in den Vektor kloniert und dieser in *E. coli* K12 (B ER2566) eingeschleust. Die Überexpression des Fusionsproteins wurde durch Isopropylthiogalactosid (IPTG, 3 h, 36 °C) induziert, was zu unlöslichen Einschlusskörpern mit inaktiver Inteindomäne^[4c] führte (Abbildung 1a). Da die Einschlusskörper leicht gereinigt werden konnten (Abbildung 1b),^[9] wurde auf eine Affinitätsreinigung verzichtet. Um das Zielpeptid **B** nach einer Rückfaltung der CBD-Inteindomäne abzuspalten, wurde das Fusionsprotein **A** zunächst in 6 M Guanidinhydrochlorid(GdmCl)-Lösung (pH 8, 5 mM TECP)^[10] unter Argon gelöst und langsam mit Puffern, die Faltungsadditive enthielten, bei pH 7.4 verdünnt. Eine schnelle Verdünnung oder Dialyse^[4d] führte zu Niederschlägen. Anschließend wurde die Rückfaltungslösung 24 h bei pH 6.9 belassen. Die beste Spaltung (Abbildung 1c) wurde nach der Zugabe von 0.5 M L-Arginin^[9] und 5 mM TCEP (Tris(2-carboxyethyl)phosphan)^[10] zu den Rückfaltungspuffern gefunden, wobei die Spaltung erst bei GdmCl-Konzentrationen unterhalb von 2 M auftrat. Das gewünschte Fragment, RNase 40–124 (**B**) (9 kDa), zeigte nur eine schwache Bande im SDS-Gel und konnte weder isoliert noch durch HPLC-MS nach Reduktion nachgewiesen werden. Das Fragment **B** enthält sieben Cysteine, die oxidationsempfind-

[*] Dr. C. Piontek, P. Ring, O. Harjes, C. Heinlein, Dr. S. Mezzato, N. Lombana, C. Pöhner, Dr. M. Püttner, Dr. D. Varón Silva, Dr. A. Martin, Prof. F. X. Schmid, Prof. C. Unverzagt
Bioorganische Chemie, Gebäude NW1, Universität Bayreuth
95440 Bayreuth (Deutschland)
Fax: (+49) 921-555-365
E-Mail: carlo.unverzagt@uni-bayreuth.de

[**] Diese Arbeiten wurden von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie unterstützt.
Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200804734> zu finden.

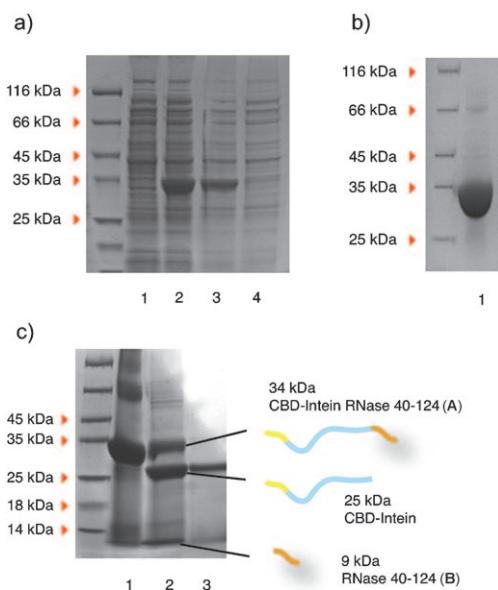
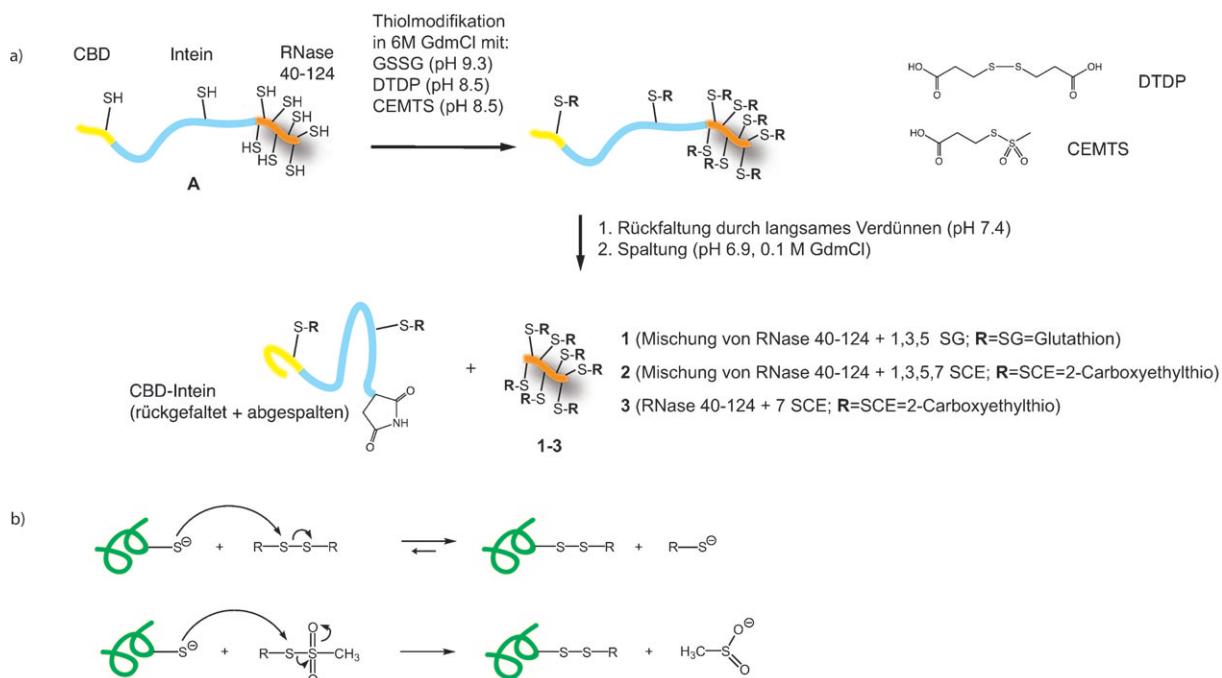


Abbildung 1. SDS-PAGE a) 1: vor Induktion, 2: nach Induktion, 3: unlösliche Proteine nach der Lyse, 4: lösliche Proteine nach der Lyse; b) 1: gereinigte Einschlussskörper; c) Rückfaltung und Spaltung nach Verdünnung zu: 2 M GdmCl (1), 0.5 M GdmCl (2), 0.1 M GdmCl (3).

lich sind und die Isolierung erschweren. Um diese Schwierigkeiten zu überwinden, sollten ihre Thiolgruppen selektiv geschützt werden z. B. als gemischte Disulfide^[11] oder S-Sulfonate.^[12] Zunächst wurde untersucht, ob die Bildung von gemischten Disulfiden die Rückfaltung und die Abspaltung des Inteins beeinflussen. Dazu wurde das reduzierte Fusionsprotein mit Glutathion umgesetzt (GSSG, pH 9.3)^[9] und

ohne Zwischenreinigung durch langsames Verdünnen zurückgefaltet (Schema 2a). Nach der Abspaltung des Inteins (2 d, 50% Abspaltung laut SDS-PAGE) wurde die Reaktionsmischung konzentriert und durch RP-HPLC gereinigt (Ausbeute: 2.1 mg an **1** aus 1 L Kultur). Die HPLC-MS-Analyse zeigte jedoch, dass eine Mischung mit einem, drei und fünf Disulfiden mit Glutathion vorlag. Auch bei Verwendung des kleinen Disulfidreagens 3,3'-Dithiodipropionsäure (DTDP, 50 mM) wurde das Fragment **B** nur als heterogene Mischung von Molekülen mit eins bis sieben Disulfiden (**2**) bei 50% Spaltung des Fusionsproteins erhalten. Die Einführung von gemischten Disulfiden durch Disulfidaustausch ist eine Gleichgewichtsreaktion, die unvollständig bleibt. Dagegen ist die Umsetzung mit Thiosulfonaten schneller und nahezu irreversibel, da keine Thiole freigesetzt werden (Schema 2b).^[13] Nach der Derivatisierung mit 2-Carboxyethylmethanthiosulfonat (CEMTS, 50 mM, Schema S2) wurde eine Spaltungseffizienz von 80–90% erreicht (Schema S4), wobei in dem gereinigten Fragment **3** alle sieben Cysteine als gemischte Disulfide (Abbildung 2c) vorlagen (Schemata S2 und S4). Weiterhin ergab Fragment **3** bessere Ausbeuten als **2** (3.5 mg an **3** aus 1 L Kultur, 2.8 mg an **2**). Fragment **3** ist unempfindlich gegenüber Oxidation und kann im trockenen Zustand über mehrere Monate aufbewahrt werden. In einer alternativen Vorgehensweise konnte **3** nach einer Disulfidbildung am partiell zurückgefalteten Fusionsprotein (1 M GdmCl) erhalten werden.

Um die Reaktivität der RNase-Fragmente **1–3** in nativen chemischen Ligations zu untersuchen, wurde eine analytische Reaktion mit der Verbindung **2** und dem Glycopeptid-thioester RNase 30–39 (**4**)^[7] (1.5 Äquiv.) in 6 M GdmCl (3 % Thiophenol) durchgeführt (Schema 3). Die gemischten Disulfide von **2** wurden in situ reduziert, allerdings trübe die



Schema 2. a) Schutz der SH-Gruppen des Fusionproteins **A** durch gemischte Disulfide mit anschließender Rückfaltung und Abspaltung des Inteins. b) Mechanismen der Bildung von gemischten Disulfiden.

Reaktionsmischung nach längerer Reaktionszeit ein (2 d). Nach Reduktion mit 0.2 M Dithiothreitol (DTT) klarte die Reaktionsmischung auf, und das Ligationsprodukt RNase 30–124 (**5**) ließ sich durch HPLC-MS nachweisen (Schema S5).

Die Reaktionsbedingungen für eine Ligation zur Volllängen-RNase^[14] wurden mit dem rekombinanten Thioester Met-RNase 1–39 (**6**) (Schema 4, erhalten aus einem synthetischen Gen über die Inteinmethode und dem pTWIN1-Vektor)^[8] und Fragment **3** mit sieben Disulfiden optimiert. Zur vollständigen Freisetzung der sieben Thiole von RNase 40–124 (**3**) wurde dem Ligationspuffer das Reduktionsmittel TCEP (30 mM) zugefügt. Trotz einer leichten Trübung der Reaktionsmischung nach 2 d konnte das Ligationsprodukt Met-RNase 1–124 (**7**) durch HPLC-MS ohne Vorbehandlung nachgewiesen werden (Schema S6). Die Reoxidation durch Luftsauerstoff ließ sich vermeiden, indem die Reaktion unter einer inerten Atmosphäre in einem Stickstoffzelt durchgeführt wurde (< 10 ppm O₂). Selbst nach längeren Reaktionszeiten (> 2 d) trat unter diesen Bedingungen keine Trübung auf. Das Produkt **7** wurde nach Gelfiltration in 36 % Ausbeute isoliert. Anschließend wurde das synthetische Protein in 6 M GdmCl gelöst und mit 0.2 M Glutathion (GSH) reduziert, und die Rückfaltung wurde durch schnelle Verdünnung mit einem Puffer, der 0.3 mM oxidiertes Glutathion enthielt (GSSG 0.09 Äquiv.), initiiert. Ein Aliquot dieser Rückfaltungsmischung wurde in einem RNase-Test^[15] verwendet, der anhand der Hydrolyse von cCMP die RNase-Aktivität der rückgefalteten Met-RNase **8** nachwies (Schema S7). Es konnte damit gezeigt werden, dass sich die stabilen und disulfidmodifizierten RNase-Fragmente sehr gut für die native chemische Ligation unter reduzierenden Bedingungen eignen. Neben der Anwendung in der Totalsynthese von boviner RNase C (siehe folgende Zuschrift)^[16] konnte dieses Konzept auch auf weitere Cystein-reiche Proteindomänen übertragen werden.^[17]

Wir haben eine neue Methode entwickelt, um thiolreiche Protein-Fragmente mit N-terminalem Cystein aus Intein-Fusionsproteinen zu isolieren und zu stabilisieren. Die Verwendung von Thiosulfonaten ermöglichte eine vollständige Umwandlung der Cystein-Thiole zu Disulfiden. Die Disulfide

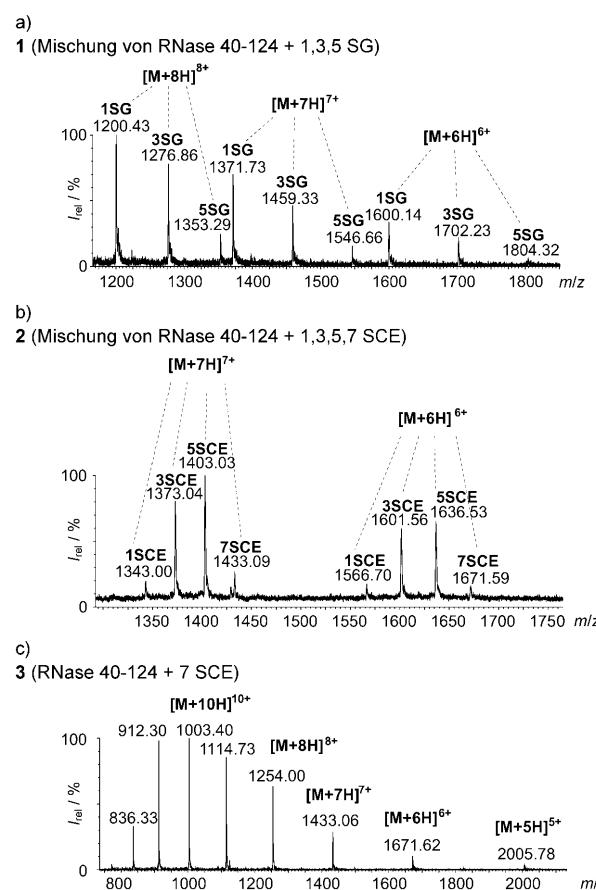
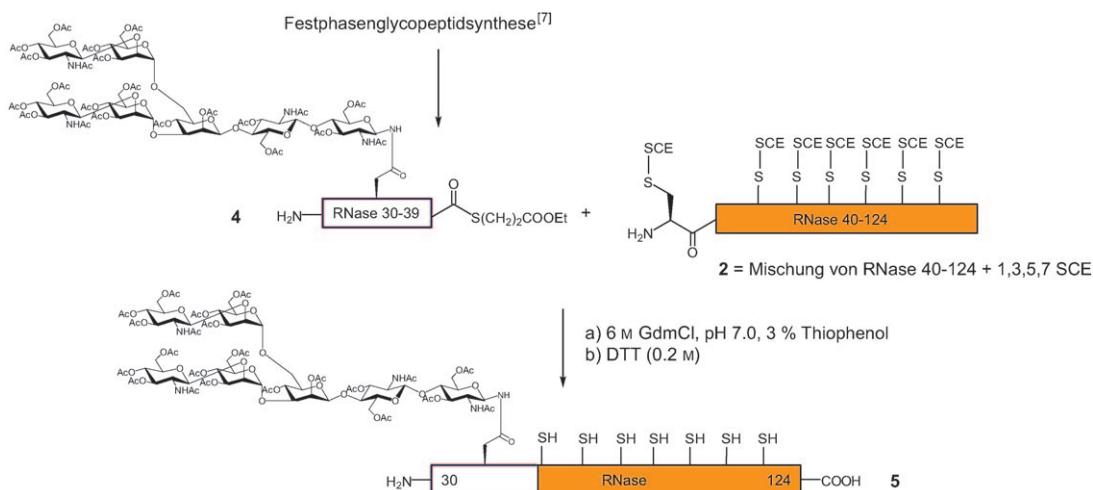
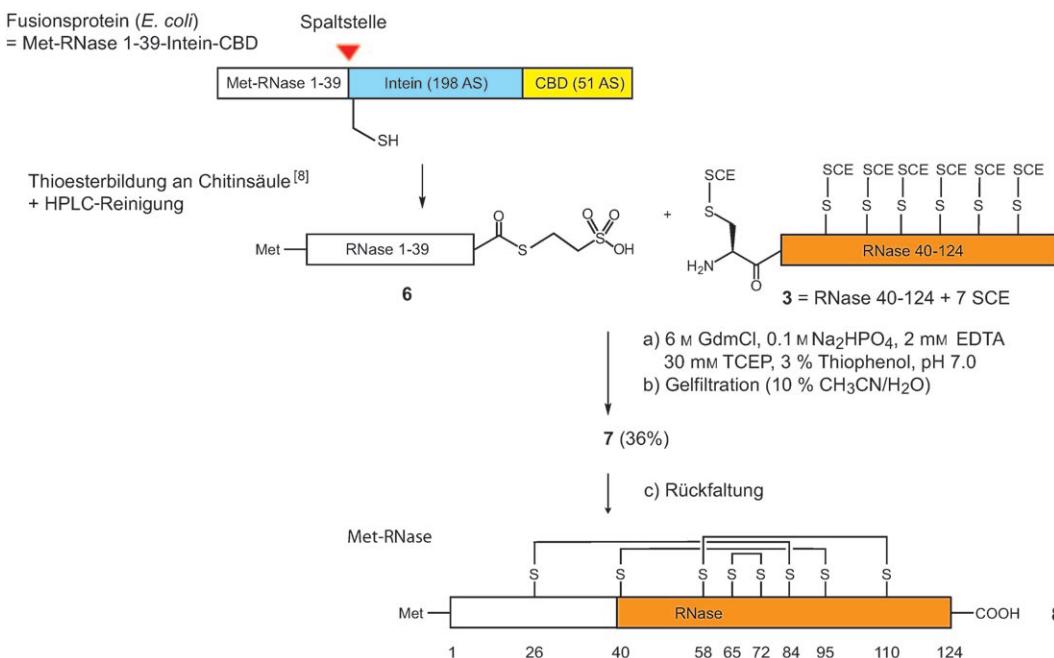


Abbildung 2. ESI-TOF-MS der geschützten RNase 40–124, Fragmente 1–3.

bieten eine Reihe von Vorteilen: Die Löslichkeit des Proteins wird erhöht, die Cysteinreste werden vor Oxidation geschützt, und weiterhin wird eine rasche Reduktion ohne Nebenreaktionen unter den Reaktionsbedingungen der nativen chemischen Ligation ermöglicht. Viele Proteine und Glycoproteine mit therapeutischem Potenzial (Wachstumsfaktoren,



Schema 3. Ligation des geschützten RNase-Fragments 40–124 (**2**) mit dem synthetischen Glycopeptidthioester **4**.



Schema 4. Ligation des vollständig geschützten RNase-Fragments 40–124 (3) mit dem Thioester Met-RNase 1–39 (6) und Rückfaltung.

Antikörper) enthalten Disulfidbrücken und sollten durch die Ligation von Disulfid-geschützten Fragmenten zugänglich sein.

Eingegangen am 28. September 2008
Online veröffentlicht am 28. Januar 2009

Stichwörter: Glycoproteine · Glycosylierungen · Native chemische Ligation · Ribonucleasen · Schutzgruppen

- [1] T. Kimmerlin, D. Seebach, *J. Pept. Res.* **2005**, *65*, 229.
[2] a) P. E. Dawson, T. W. Muir, I. C. Lewis, S. B. H. Kent, *Science* **1994**, *266*, 776; b) P. E. Dawson, S. B. H. Kent, *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 923; c) S. B. H. Kent, *J. Pept. Sci.* **2003**, *9*, 574.
[3] a) T. W. Muir, D. Sondhi, P. A. Cole, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 6705; b) C. J. Noren, J. M. Wang, F. B. Perler, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 458; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 450; c) Übersicht: T. W. Muir, *Annu. Rev. Biochem.* **2003**, *72*, 249; d) Z. Machova, A. G. Beck-Sickinger, *Methods Mol. Biol.* **2005**, *298*, 105; e) I. E. Gentle, D. P. De Souza, M. Baca, *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 658; f) T. J. Tolbert, C.-H. Wong, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *114*, 2275; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2171; g) D. A. Erlanson, M. Chyttil, G. L. Verdine, *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 981; h) D. Liu, R. Xu, K. Dutta, D. Cowburn, *FEBS Lett.* **2008**, *582*, 1163; i) M. P. Malakhov, M. R. Mattern, O. A. Malakhova, M. Drinker, S. D. Weeks, T. R. Butt, *J. Struct. Funct. Genomics* **2004**, *5*, 75; j) D. Macmillan, L. Arham, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9530; k) L. Brunsved, J. Kuhlmann, K. Alexandrov, A. Wittighofer, R. S. Goody, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 6774; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 6622; l) T. Kurpiers, H. D. Mootz, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 5327; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 5234.
[4] a) T. C. Evans, J. Brenner, M. X. Xu, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 3923; b) D. W. Wood, V. Derbyshire, W. Wu, M. Chartrain, M. Belfort, G. Belfort, *Biotechnol. Prog.* **2000**, *16*, 1055; c) C. Guo, Z. Li, Y. Shi, M. Xu, J. G. Wise, W. E. Trommer, J. Yuan, *Protein Expression Purif.* **2004**, *37*, 361; d) C. P. R. Hackenberger, M. M. Chen, B. Imperiali, *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 5043.
[5] a) D. Macmillan, C. R. Bertozzi, *Tetrahedron* **2000**, *56*, 9515; b) T. J. W. Tolbert, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 5421; c) Übersicht: B. G. Davis, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 579; d) C. P. R. Hackenberger, C. T. Friel, S. E. Radford, B. Imperiali, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12882; e) S. Ficht, R. J. Payne, A. Brik, C.-H. Wong, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 6079; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 5975; f) Q. Wan, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 9408; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 9248; g) Übersicht: H. Hojo, Y. Nakahara, *Biopolymers* **2007**, *88*, 308; h) N. Yamamoto, Y. Tanabe, R. Okamoto, P. E. Dawson, Y. Kajihara, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 501.
[6] a) D. Y. Jackson, J. Burnier, C. Quan, M. Stanley, J. Tom, J. A. Wells, *Science* **1994**, *266*, 243; b) K. Witte, P. Sears, R. Martin, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 114; c) R. T. Raines, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1045; d) J. W. Baynes, F. Wold, *J. Biol. Chem.* **1976**, *251*, 6016; e) P. M. Rudd, H. C. Joao, E. Coghill, P. Fiten, M. R. Saunders, G. Opdenakker, R. A. Dwek, *Biochemistry* **1994**, *33*, 17.
[7] S. Mezzato, M. Schaffrath, C. Unverzagt, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 1677; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1650.
[8] a) T. C. Evans, Jr., J. Benner, M. Q. Xu, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 18359; b) IMPACT-TWIN Instruction Manual, Version 1.2, New England Biolabs Inc.
[9] R. Rudolph, G. Böhm, H. Lilie, R. Jaenicke in *Protein Function* (Hrsg.: T. E. Creighton), Oxford University Press, Oxford, **1997**, S. 57.
[10] J. A. Burns, J. C. Butler, J. Moran, G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 2648.
[11] a) R. Wynn, F. M. Richards, *Methods Enzymol.* **1995**, *251*, 351; b) B. G. Davis, R. C. Lloyd, J. B. Jones, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 9614; c) G. De Santis, X. Shang, J. B. Jones, *Biochemistry* **1999**, *38*, 13391.
[12] W. W. Chan, *Biochemistry* **1968**, *7*, 4247.
[13] J. W. Baynes, F. Wold, *J. Biol. Chem.* **1976**, *251*, 6016.
[14] Weitere Beispiele für Thioesterligationen zur Erzeugung boviner Volllängen-RNase A: a) T. C. Evans, Jr., J. Benner, M. Q. Xu, *Protein Sci.* **1998**, *7*, 2256; b) G. S. Beligere, P. E. Dawson, J.

Am. Chem. Soc. **1999**, *121*, 6332; c) R. J. Hondal, B. L. Nilsson, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 5140; d) U. Arnold, M. P. Hinderaker, R. T. Raines, *Sci. World J.* **2002**, *2*, 1823; e) B. L. Nilsson, R. J. Hondal, M. B. Soellner, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 5268; f) D. J. Boerema, V. A. Tereshko, S. B. H. Kent, *Biopolymers* **2008**, *90*, 278.

- [15] E. M. Crook, A. P. Mathias, B. R. Rabin, *Biochem. J.* **1960**, *74*, 234.
[16] C. Piontek, D. Varón Silva, C. Heinlein, C. Pöhner, S. Mezzato, P. Ring, A. Martin, F. X. Schmid, C. Unverzagt, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 1974; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1941.
[17] N. Lombana, S. Siebenhaar, Universität Bayreuth, unveröffentlichte Ergebnisse.
-