

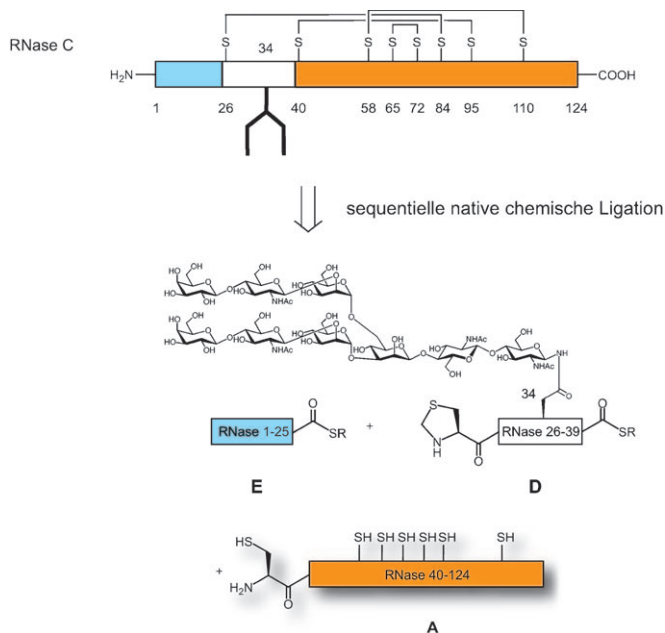
Semisyntese eines homogenen Glycoprotein-Enzyms: Ribonuclease C (Teil 2)**

Christian Piontek, Daniel Varón Silva, Christian Heinlein, Claudia Pöhner, Stefano Mezzato, Petra Ring, Andreas Martin, Franz Xaver Schmid und Carlo Unverzagt*

In memoriam Bruce Merrifield

Die Synthese von einheitlich glycosylierten Glycoproteinen^[1–7] und Analoga^[8,9] ist ein neuartiger Ansatz, um den Einfluss der Kohlenhydratketten auf die Funktion therapeutischer Glycoproteine zu untersuchen. Diese Forschungen ergaben sich zunächst aus der Anforderung, definierte Glycoformen für derartige Untersuchungen bereitzustellen, und sie erhielten zusätzliche Bedeutung, nachdem gezeigt wurde, dass einzelne Glycoformen^[10] sehr unterschiedliche Funktionen haben können.^[11,12] Die gegenwärtigen Methoden zur Synthese von N-Glycoproteinen umfassen die Festphasenglycopeptidsynthese,^[13,14] die Verwendung von Transglycosidasen^[15] oder enzymatisches Remodeling,^[16] maßgeschneiderte Zelllinien^[17,18] und besonders den Einsatz chemoselektiver Ligationmethoden.^[19–21] In der vorausgehenden Zuschrift^[22] konnten wir durch Ligation exprimierter Proteine (EPL) aktive RNase A erhalten, wobei das rekombinante RNase-Segment mit sieben Cysteinen durch die Bildung von gemischten Disulfiden chemisch stabilisiert wurde. Wir haben diesen Ansatz weiter ausgebaut und eine Glycoform der bovinen RNase, die ein biantennäres komplexes Nonasaccharid enthält (RNase C^[23]), durch sequentielle native chemische Ligation synthetisiert (Schema 1).

Die ursprüngliche Strategie zum Aufbau N-glycosylierter RNase sah lediglich eine Ligation an Cys40 vor (Schema 1), die das rekombinante RNase-Fragment 40–124 mit dem synthetischen Glycopeptidthioester RNase 1–39 verknüpfen sollte. Ein Thioester von RNase 1–39, der ein acetyliertes N-Acetylglucosamin an Asn34 enthielt, konnte nach der Fmoc-Strategie an einem Polystyrol-Harz mit Safety-Catch-Linker synthetisiert werden.^[25] Nach der Alkylierung, Thiolyse und Entschützung wurde der Glycopeptidbenzylthioester von RNase 1–39 erhalten, jedoch in geringer Ausbeute und Reinheit. Diese Schwierigkeiten regten die Entwicklung eines Safety-Catch/Rink-Amid-Doppellinker-PEGA-Harzes an, das sich als günstig für die Synthese von Glycopeptid-



Schema 1. Retrosynthese von einheitlich glycosylierter RNase C.

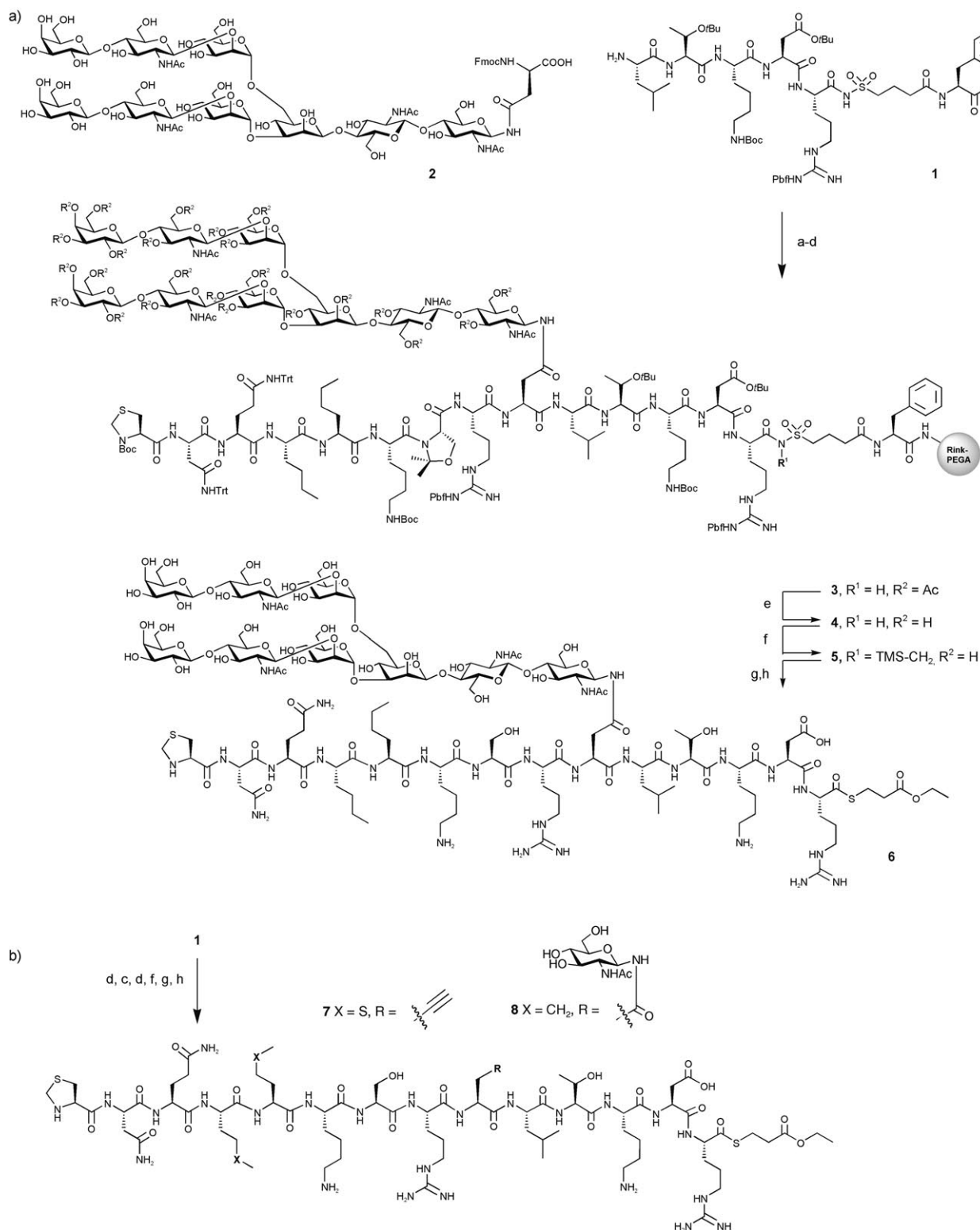
thioestern mit komplexen N-Glycanen erwiesen hatte.^[26,27] Beim Versuch einer schrittweise Synthese des Glycopeptids RNase 1–39 mit einem acetylierten komplexen N-Glycan-Nonasaccharid an Asn34 brach die Reaktion überraschenderweise bereits bei Glycopeptiden mit weniger als 20 Aminosäuren aufgrund zahlreicher Nebenreaktionen ab. Daher wurde eine weitere Ligation an Cys26 eingeplant. Dadurch reduzierte sich der synthetische Glycopeptidthioester auf ein 14-mer (26–39), der Cys26 in maskierter Form für eine sequentielle native chemische Ligation mit dem Thioester E der RNase 1–25 trägt (Schema 1). In der sequentiellen nativen chemischen Ligation sollte der vor kurzem entwickelte Thiazolidinschutz des N-terminalen Cysteins eingesetzt werden, da dieses Verfahren auch als Eintopfreaktion durchgeführt werden kann.^[28,29]

Zur Synthese des Glycopeptidthioesters der RNase 26–39 (6) (Schema 2a) wurde das Doppellinker-PEGA-Harz verwendet, an dem die RNase 35–39 (1) wie beschrieben angeknüpft wurde.^[26] Der Fmoc-Asn-Baustein 2, der ein biantennäres komplexes Nonasaccharid trägt, wurde aus Eigelb^[30] über eine disialylierte Fmoc-Asn-Vorstufe erhalten, die unter sauren Bedingungen hydrolysiert wurde.^[31] Die Glycosylaminosäure 2 (0.8 Äquiv.) wurde an das Harz 1 gekuppelt,

[*] Dr. C. Piontek, Dr. D. Varón Silva, C. Heinlein, C. Pöhner, Dr. S. Mezzato, P. Ring, 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.200804735> zu finden.



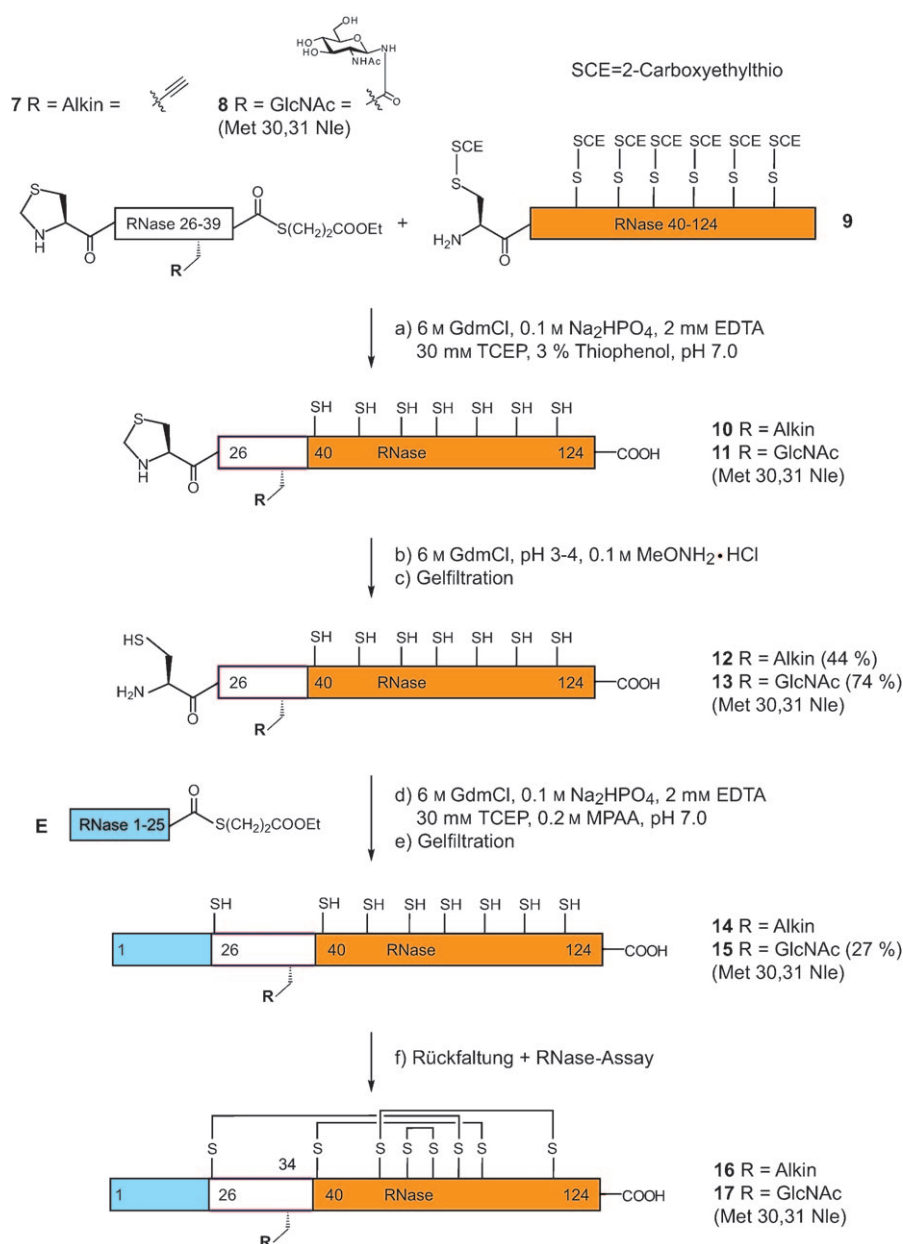
Scheme 2. Synthese des Thioesters der RNase 26–39: a) Fmoc-Asn-(Nonasaccharid)-OH (**2**) (R² = OH), PyBOP, DIPEA, DMSO/NMP; b) Ac₂O/AcOH/Pyridin (1:1:1.5) (R² = Ac); c) 20% Piperidin/NMP; d) manuelle Festphasensynthese mit Fmoc-Aminosäuren (4 Äquiv.), HCTU (4 Äquiv.), Cl-HOBt (4 Äquiv.), DIPEA (9 Äquiv.), NMP; e) 10% Hydrazin in THF/MeOH (1:1); f) TMSCHN₂, *n*-Hexan, DCM; g) 3-Sulfanylpropionsäureethylester, DMF; h) TFA, 3-Sulfanylpropionsäureethylester, TES, H₂O. PyBOP = Benzotriazolyl-1-oxytripyrrolidino-phosphoniumhexafluorophosphat, DIPEA = Diisopropylethylamin, DMSO = Dimethylsulfoxid, NMP = *N*-Methylpyrrolidon, HCTU = *N*-[(1*H*-6-Chlorbenzotriazol-1-yl)](dimethylamino)-methylen]-*N*-methylmethanaminium-hexafluorophosphat-*N*-oxid, HOBt = 1-Hydroxybenzotriazol, TES = Triethylsilan, Boc = *tert*-Butoxycarbonyl, Trt = Triphenylmethyl, Pbf = 2,2,4,6,7-Pentamethyl-2,3-dihydro-1-benzofuran-5-sulfonyl

und die freien Aminogruppen wurden mit Essigsäureanhydrid/Essigsäure/Pyridin (1:1:1.5) blockiert, ohne dass der Safety-Catch-Linker acetyliert wurde.^[26] Unter diesen Bedingungen wurden auch die OH-Gruppen acetyliert, um ihre mögliche Veresterung bei den nachfolgenden Peptidkuppelungen zu vermeiden. Die Anknüpfung der terminalen Aminosäuren war nach dem Einbau eines Lys-Ser-Pseudoprolinbausteins deutlich vereinfacht.^[32] Zusätzlich wurden Norleucin-Reste anstelle von Methionin 30 und 31 verwendet, da die bekannte Neigung dieser RNase-Sequenz zur Bildung von Sulfoxiden während der manuellen Synthese nicht unterdrückt werden konnte. Im Allgemeinen hat ein Ersatz durch Norleucin keinen Einfluss auf die Faltung und Aktivität der meisten Proteine.^[33,34] Als weitere Verbesserung sollte der Glycopeptidthioester 26–39 mit einem entschützten N-Glycan erzeugt werden, um die anschließende native chemische Ligation zu vereinfachen und Nebenreaktionen zu vermeiden. Daher wurde eine Abspaltung der Acetylgruppen an der Festphase^[35] versucht, indem das Harz **3** kurz mit Hydrazinhydrat in Wasser, THF oder Methanol behandelt wurde. Eine vollständige Entschützung konnte nur unter Verwendung einer optimierten Lösungsmittelmischung (MeOH/THF 1:1) erreicht werden, was darauf hindeutet, dass gleichzeitig ein gutes Quellen des Harzes (MeOH) sowie eine gute Löslichkeit des Peptids (THF) notwendig sind. Danach wurde der Safety-Catch-Linker mit TMS-Diazomethan^[36] in einem optimierten Lösungsmittelgemisch (Hexan/CHCl₃ 1:1) alkyliert, und nach der Thiolyse wurden die Peptidschutzgruppen in Gegenwart von 3-Sulfanylpropionsäureethylester entfernt. Trotz einer begleitenden O-Methylierung des Zuckerteils (10–20%) konnte reiner Thioester **6** in 18% Ausbeute nach HPLC-Reinigung erhalten werden (siehe Hintergrundinformationen, Schema S3).

Der Thioester 1–25 (**E**) konnte am Doppellinker-PEGA-Harz aufgebaut werden, wobei ein Ser-Ser-Pseudoprolindipeptid an den Positionen 15,16 und 21,22 eingesetzt und die vorherigen Bedingungen zur Thioesterbildung und Entschützung verwendet wurden (Ausbeute: 20% nach HPLC).

Nach der Bereitstellung der drei Segmente der RNase C wurden erste Ligationsexperimente im Eintopfverfahren durchgeführt, um die Isolierung der thiolreichen und oxida-

tionsempfindlichen Intermediate zu umgehen. Das durch gemischte Disulfide geschützte Fragment **B** (**9**) und der Thioester **6** wurden sehr effizient in Gegenwart von Tris-2-(carboxyethyl)phosphan (TCEP)^[37] und Thiophenol ligiert, und das N-terminale Cystein konnte anschließend durch eine Behandlung mit Methoxyamin^[28] (0.2 M, pH 3–4, 4 h) entschützt werden. Allerdings ergab die folgende Ligation mit dem Thioester **E** nur einen geringen Anteil der Volllängen-RNase. Stattdessen hatte sich das C-terminale N-Methoxyamid^[38] von **E** in Abhängigkeit vom jeweiligen pH-Wert gebildet. Trotz der wiederholten Zugabe von weiterem Thioester **E** bei pH 6.5 konnte nur eine unvollständige Ligation (ca. 20%) erreicht werden. Daher musste das entschützte Glycopeptid RNase 26–124 mit acht freien Thiolgruppen



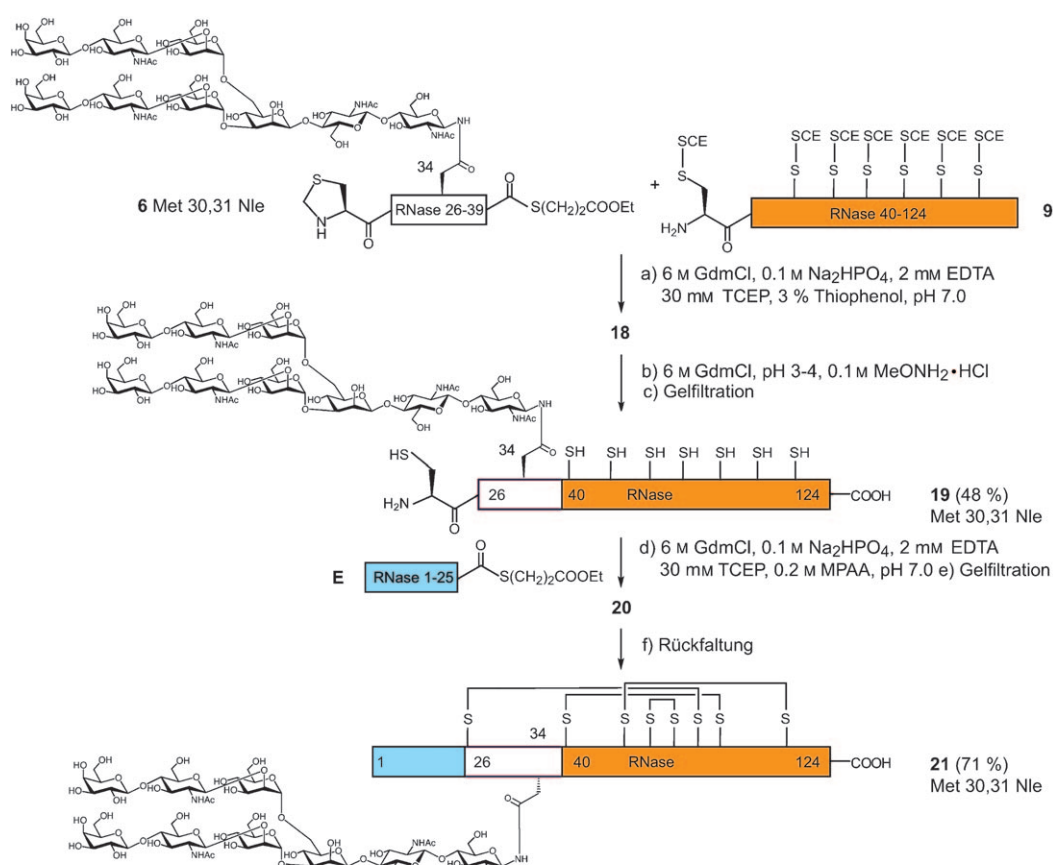
Schema 3. Sequentielle native chemische Ligation von RNase-Varianten, die an Asn 34 Propargylglycin oder GlcNAc-β-Asn enthalten. Die Zwischenprodukte **12** und **13** wurden isoliert, zu Volllängen-RNasen ligiert und zurückgefaltet.

isoliert werden. Aufgrund der Oxidationsempfindlichkeit dieses Intermediats wurden die Schritte mit den leichter zugänglichen Alkin-^[8] (**7**) und GlcNAc-Thioestern (**8**) optimiert (Schema 2b und Schema S3). Die Verbindungen **7** (14 % Ausbeute) und **8** (18 % Ausbeute) konnten an Doppellinker-PEGA-Harz^[26] synthetisiert werden. Die Ligationen der Thioester wurden in 6 M GdmCl-Lösung unter Zusatz von 30 mM TCEP und 3 % Thiophenol in einer Stickstoffatmosphäre durchgeführt (< 10 ppm O₂) (Schema 3). Nach zwei Tagen konnten durch HPLC-MS hohe Umsätze gefunden werden, worauf die Thiazolidine der Ligationsprodukte **10** (Schema S4) und **11** (Schema S5) durch Zugabe von 0.1 M Methoxyamin bei pH 3–4 geöffnet wurden. Das Cys-Peptid **12** wurde nach der vollständigen Entschützung (LC-MS) durch Gelfiltration unter sauren Bedingungen in 44 % Ausbeute isoliert. Eine zusätzliche Reduktion von **13** mit TCEP bei pH 6 vor der Gelfiltration ergab eine Ausbeute von 74 % (Schema S5). Beide Cys-Peptide wurden anschließend mit einem Überschuss an Thioester **E** unter reduzierenden Bedingungen ligiert, wobei das stark aktivierende Thiol^[39] *p*-Mercaptophenylessigsäure (MPAA, 0.2 M) verwendet und auf besonderen Ausschluss von Sauerstoff geachtet wurde. Unter diesen stringenten Bedingungen waren die Ligationen innerhalb eines Tages beendet, und die Vollängen-RNasen **14** (Schema S4) und **15** (Schema S5) konnten durch Gelfiltration erhalten werden. Die Rückfaltung der in 6 M GdmCl + 0.2 M GSH gelösten RNasen **14** und **15** wurde durch Verdünnen mit einem 0.3 mM GSSG enthaltenden Puffer eingeleitet. Mit einem Aliquot der Rückfaltungslösungen wurde die RNase-Aktivität von **16** und **17** durch einen Standardtest nachgewiesen, der auf einer Ringöffnungsreaktion von 2',3'-cyclischem CMP beruht (Schema S7).^[40]

Die optimierten Reaktionsbedingungen wurden auf die sequentielle Ligation zur Vollängen-RNase C mit einem Nonasaccharid des komplexen Typs angewendet (Schema 4). Die Ligation des Glycopeptids **6** mit **9** ergab die RNase **18**, die durch Einwirkung von Methoxyamin bei pH 3–4 entschützt wurde. Nach Reduktion mit TCEP und Gelfiltration in 25-proz. Acetonitril wurde die glycosylierte RNase 26–124 (**19**) mit freiem N-terminalem Cystein erhalten (48 %, Schemata S1 und S6). Die anschließende Ligation mit dem Thioester 1–25 (**E**) verlief glatt in gegenwart von 0.2 M MPAA als Aktivator unter streng sauerstofffreien Bedingungen und

ergab nach einem Tag RNase 1–124 (**20**) (Schema S6). Angesichts der guten Löslichkeit von MPAA zusammen mit ihren faltungsfördernden Eigenschaften^[41] wurde die Reaktionsmischung direkt durch Verdünnen mit einer 0.3 mM GSSG-Lösung zurückgefaltet. Dabei ersetzt MPAA das üblicherweise als Reduktionsmittel zugesetzte GSH. Nach 4 Tagen wurde das Protein aus der Rückfaltungslösung durch Gelfiltration isoliert (71 % Ausbeute, Schemata S1 und S7). Die rückgefaltete synthetische RNase C **21** wurde auf enzymatische Aktivität^[42] untersucht (Schema S7).^[39] Beim Vergleich mit einer kommerziellen Probe von RNase A der gleichen Konzentration ergab sich eine relative Aktivität von 56 %. Das CD-Spektrum zeigt, dass das synthetische Glycoprotein eine geordnete Struktur hat, die der nativen RNase ähnelt (Schema S8). Die nahezu native Struktur und die hohe enzymatische Aktivität des Endprodukts **21** belegen, dass die chemische Synthese eines Glycoproteins mit der Komplexität der RNase tatsächlich gelang. Am Beispiel der RNase C Met30,31Nle (**21**) wurde die erste Synthese eines N-Glycoprotein-Enzyms mit über 100 Aminosäuren durch sequentielle native chemische Ligation gezeigt.

Diese Semisynthese des Glycoprotein-Enzyms RNase C durch sequentielle native chemische Ligation kombiniert als Schlüsselemente die Verwendung eines rekombinanten RNase-Fragments, das durch gemischte Disulfide stabilisiert wurde, mit einem synthetischen Thioester, der nur einen Thiazolidin-Schutz trägt. Bei den thiolreichen Peptiden war



Schema 4. Optimierte sequentielle native chemische Ligationen und Rückfaltung von RNase C Met30,31Nle, die ein biantennäres N-Glycan an Asn 34 enthält.

der strikte Ausschluss von Sauerstoff eine essenzielle Voraussetzung für effiziente Ligationen. Aufbauend auf den verbesserten Reaktionsbedingungen, die im Verlauf dieses Projekts entwickelt wurden, rückt die Semisynthese von thiolreichen N-Glycoproteinen und Analoga von therapeutischem und biochemischem Interesse in greifbare Nähe.

Eingegangen am 28. September 2008

Online veröffentlicht am 29. Januar 2009

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

- [1] B. G. Davis, *Chem. Rev.* **2002**, 102, 579.
- [2] Z. Zhang, J. Gildersleeve, Y. Y. Yang, R. Xu, J. A. Loo, S. Uryu, C. H. Wong, P. G. Schultz, *Science* **2004**, 303, 371.
- [3] Z. Guo, N. Shao, *Med. Res. Rev.* **2005**, 25, 655.
- [4] M. R. Pratt, C. R. Bertozzi, *Chem. Soc. Rev.* **2005**, 34, 58.
- [5] T. Buskas, S. Ingale, G. J. Boons, *Glycobiology* **2006**, 16, 113R.
- [6] C. S. Bennett, C. H. Wong, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, 36, 1227.
- [7] H. Hojo, Y. Nakahara, *Biopolymers* **2007**, 88, 308.
- [8] B. G. Davis, *Science* **2004**, 303, 480.
- [9] Y. Ito, S. Hagihara, I. Matsuo, K. Totani, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2005**, 15, 481.
- [10] P. M. Rudd, H. C. Joao, E. Coghill, P. Fiten, M. R. Saunders, G. Opdenakker, R. A. Dwek, *Biochemistry* **1994**, 33, 17.
- [11] R. M. Anthony, F. Nimmerjahn, D. J. Ashline, V. N. Reinhold, J. C. Paulson, J. V. Ravetch, *Science* **2008**, 320, 373.
- [12] R. Sackstein, J. S. Merzaban, D. W. Cain, N. M. Dagia, J. A. Spencer, C. P. Lin, R. Wohlgemuth, *Nat. Med.* **2008**, 14, 181.
- [13] N. Yamamoto, Y. Tanabe, R. Okamoto, P. E. Dawson, Y. Kajihara, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 501.
- [14] Q. Wan, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem.* **2007**, 119, 9408; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 9248.
- [15] L. X. Wang, *Carbohydr. Res.* **2008**, 343, 1509–1522.
- [16] L. J. Thomas, K. Panneerselvam, D. T. Beattie, M. D. Picard, B. Xu, C. W. Rittershaus, H. C. Marsh, Jr., R. A. Hammond, J. Qian, T. Stevenson, D. Zopf, R. J. Bayer, *Glycobiology* **2004**, 14, 883.
- [17] S. Wildt, T. U. Gerngross, *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, 3, 119.
- [18] C. Ferrara, P. Brunker, T. Suter, S. Moser, U. Puntener, P. Umana, *Biotechnol. Bioeng.* **2006**, 93, 851.
- [19] P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. B. Kent, *Science* **1994**, 266, 776.
- [20] T. Kimmerlin, D. Seebach, *J. Pept. Res.* **2005**, 65, 229.
- [21] T. W. Muir, *Annu. Rev. Biochem.* **2003**, 72, 249.
- [22] C. Piontek, P. Ring, O. Harjes, C. Heinlein, S. Mezzato, N. Lombana, C. Pöhner, M. Püttner, D. Varón Silva, A. Martin, F. X. Schmid, C. Unverzagt, *Angew. Chem.* **2009**, 121, 1968; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 1936.
- [23] J. W. Baynes, F. Wold, *J. Biol. Chem.* **1976**, 251, 6016.
- [24] P. E. Dawson, S. B. Kent, *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, 69, 923.
- [25] Y. Shin, K. A. Winans, B. J. Backes, S. B. H. Kent, J. A. Ellman, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 11 684.
- [26] S. Mezzato, M. Schaffrath, C. Unverzagt, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 1677; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 1650.
- [27] E. Meinjohanns, M. Meldal, H. Paulsen, R. A. Dwek, K. Bock, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1998**, 549.
- [28] D. Bang, S. B. Kent, *Angew. Chem.* **2004**, 116, 2588; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 2534.
- [29] J. D. Boerema, A. V. Tereshko, S. B. H. Kent, *Biopolymers* **2008**, 90, 278.
- [30] A. Seko, M. Koketsu, M. Nishizono, Y. Enoki, H. R. Ibrahim, L. R. Juneja, M. Kim, T. Yamamoto, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **1997**, 1335, 23.
- [31] Y. Kajihara, Y. Suzuki, K. Sasaki, L. R. Juneja, *Methods Enzymol.* **2003**, 362, 44.
- [32] T. Wöhr, F. Wahl, A. Nefzi, B. Rohwedder, T. Sato, X. Sun, M. Mutter, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 9218.
- [33] R. Rocchi, A. Scatturin, L. Moroder, F. Marchiori, A. M. Tamburro, E. Scoffone, *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, 91, 492.
- [34] C. B. Anfinsen, L. G. Corley, *J. Biol. Chem.* **1969**, 244, 5149.
- [35] E. Bardaji, J. L. Torres, P. Clapes, F. Albericio, G. Barany, R. E. Rodriguez, M. P. Sacristan, G. Valencia, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1991**, 1755.
- [36] R. Ingenito, E. Bianchi, D. Fattori, A. Pessi, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 11 369.
- [37] J. A. Burns, J. C. Butler, J. Moran, G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.* **1991**, 56, 2648.
- [38] E. C. Johnson, E. Malito, Y. Shen, D. Rich, W. J. Tang, S. B. Kent, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 11 480 (siehe Hintergrundinformationen, Schema S2).
- [39] E. C. Johnson, S. B. Kent, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 6640.
- [40] E. M. Crook, A. P. Mathias, B. R. Rabin, *Biochem. J.* **1960**, 74, 234.
- [41] J. D. Gough, E. J. Barrett, Y. Silva, W. J. Lees, *J. Biotechnol.* **2006**, 125, 39.
- [42] R. S. Hodges, R. B. Merrifield, *J. Biol. Chem.* **1975**, 250, 1231.