

## Herstellung modifizierter Proteine durch kombinierte Synthese und Biosynthese

Roger S. Goody, Kirill Alexandrov und Martin Engelhard

Max-Planck Institute für molekulare Physiologie, Abt. Physikalische Biochemie, Dortmund

► Die Fähigkeit, biologische Moleküle mit den Methoden der synthetischen Chemie herzustellen, ist eine bedeutsame Errungenschaft der modernen Wissenschaft. Trotz der eindrucksvollen Synthesen der letzten Jahrzehnte blieben aber die wichtigsten biologischen Makromoleküle, die Nukleinsäuren und die Proteine, mit diesen Methoden nur begrenzt zugänglich. Für Nukleinsäuren ist die Synthese bis zu einer Kettenlänge von ca. 100 Nukleotiden (für DNA; die Grenze liegt für RNA niedriger) Routine geworden. Um aber längere DNA Sequenzen (z.B. für die Gensynthese) herzustellen, muss auf enzymatische Methoden für die Ligation von chemisch-hergestellten DNA Fragmenten zurückgegriffen werden. Die Herstellung von synthetischen Genen ist jetzt möglich und wird im Einzelfall praktiziert<sup>[1]</sup>, viel öfter wird aber eine natürlich vorkommende Sequenz mit enzymatischen Methoden repliziert, amplifiziert und notfalls modifiziert. Diese Möglichkeiten, kombiniert mit der Fähigkeit, die Protein-Genprodukte in gut manipulierbaren Organismen (z.B. Bakterien, Hefe, virus-infizierten Zellen) zu produzieren (Expression oder Überexpression) erlaubt die Herstellung von relativ großen Proteinmengen, falls erwünscht mit veränderter Sequenz.

Diese Vorgehensweise ist eine der wichtigsten Komponenten in der modernen Erforschung von Struktur-Funktionsbeziehungen an Proteinen. Sie hat aber den Nachteil, dass mit wenigen Ausnahmen nur natürlich vorkommende Aminosäuren in Proteine eingebaut werden können. Die Möglichkeit, andere Aminosäuren einzubauen, würde ein ganzes zusätzliches Spektrum an Anwendungen erlauben. Als Beispiele sind zu nennen, der Orts-spezifische Einbau von Aminosäureseitenketten mit Reportergruppen für spektroskopische Methoden (Chromophore, Isotopen für NMR und FTIR), von Resten mit einer veränderten oder völlig anderen Rückgratchemie, oder von Resten mit Funktionalitäten für Quervernetzung oder für Immobilisierung auf Oberflächen. Ein zusätzliches Anwendungsgebiet ist die Herstellung von Proteinen mit natürlichen post-translationalen Modifikationen, die durch konventionelle Überexpression nicht oder nur schwer zugänglich sind (z.B. lipidierte oder phosphorylierte Proteine).

Der Fortschritt der letzten Jahre auf diesem Gebiet wird hier zusammengefasst. Nicht berücksichtigt wird die Methode der *in vitro* Suppression, die prinzipiell einige der Vorteile der chemischen Synthese teilt (für einen Vergleich der Methoden siehe<sup>[2]</sup>).

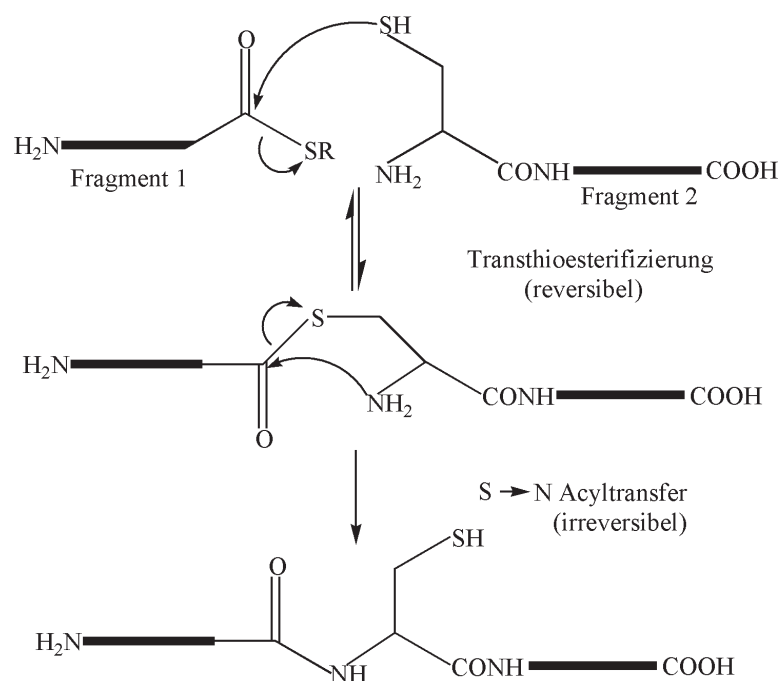
### Chemische Peptidsynthese

Peptide sind seit einigen Jahrzehnten synthetisch zugänglich. Die Einführung der Festphasenmethode vor 40 Jahren durch Merrifield<sup>[3]</sup> war ein wichtiger Durchbruch und zusammen mit der Entwicklung geeigneter Schutzgruppenstrategien führte dies dazu, dass Peptide mit einer Kettenlänge von 60–70 Aminosäuren routinemäßig hergestellt werden können. Diese Methode bietet erheblich mehr Möglichkeiten für den Einbau von unnatürlichen Resten als die zelluläre Expression. Die Seitenkettenstruktur kann erheblich variiert werden, es können D- statt L-Aminosäuren eingebaut werden, und andere chemische Verknüpfungen als Peptidbindungen verwendet werden. Post-translationalen Modifikationen können ein-

geführt werden, z.B. durch Lipid-Zucker- oder Phosphatreste. Die großen Vorteile der chemischen Synthese konnten aber bis vor wenigen Jahren nicht voll ausgenutzt werden, da die meisten Proteine eine Kettenlänge von erheblich mehr als 60–70 Aminosäuren aufweisen und somit nicht als ein einziges Fragment hergestellt werden können. Ein analoger Ansatz zu der enzymatischen Ligation von DNA Fragmenten steht nicht zur Verfügung, zumindest nicht als generell-anwendbare Methode. Es sind deshalb bisher relativ wenige Proteine durch direkte Synthese von einem einzigen Polypeptid hergestellt worden.

### Synthese von Proteinen durch Peptidsynthese und chemische Ligation

Die Begrenzung der Größe chemisch-synthetischer Proteine könnte prinzipiell überwunden werden, falls einer der DNA-Ligation analoges Verfahren zur Verfügung stünde. Über enzymatische Ansätze ist berichtet worden (z.B.<sup>[4]</sup>), die sich allerdings bisher nicht als allgemein-anwendbare Methoden weiterentwickeln ließen. Verschiedene chemische Methoden sind entwickelt worden<sup>[5,6]</sup> wovon sich eine (die sogenannte native chemische Ligation) sich als besonders leistungsfähig erwiesen hat<sup>[7]</sup>. Die dieser Methode zu Grunde liegende Reaktion ist seit Mitte der 50er Jahre bekannt<sup>[8]</sup> wurde aber bis vor einigen Jahren nicht für die Verknüpfung zweier größerer Peptide verwendet. Das Prinzip ist in Schema 1 dargestellt. Für die Herstellung eines Proteins aus zwei



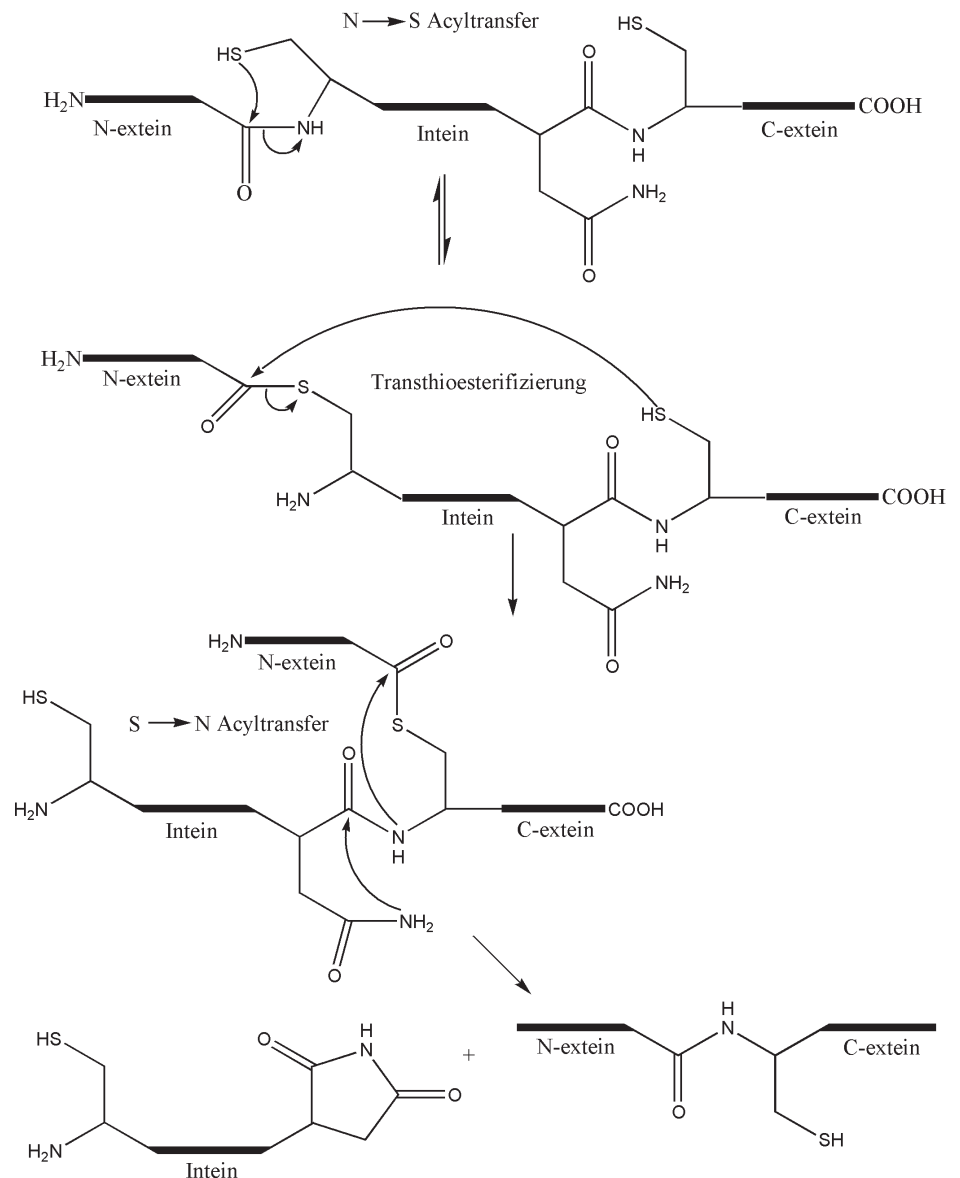
Schema 1: Mechanismus der nativen chemischen Ligation

Peptiden wird typischerweise ein N-terminales Peptid auf einer Thioesterfestphase hergestellt. Nach Entfernung von der Festphase durch ein Thiolreagenz entsteht das Peptid mit einem C-terminalen Thioester. Das zweite (C-terminale) Peptid wird so hergestellt, dass es am N-Terminus einen Cysteinrest trägt. Wenn beide Peptide in Anwesenheit von Thiophenol gemischt werden, kommt es zu einer Transthioesterifizierung zwischen dem C-terminalen Thioester des ersten Peptids und dem Cysteinrest des zweiten Peptids, wie in Schema 1 dargestellt wird. In einer spontanen Folgereaktion findet eine S->N Acyltransferreaktion mit der  $\alpha$ -Aminogruppe des Cysteinrestes unter Bildung einer natürlichen Peptidbindung statt. Dieses Verfahren ist in mehreren Fällen erfolgreich für die Herstellung von Proteinen mit bis zu ca. 160 Aminosäureresten verwendet worden<sup>[9]</sup>. Eine der Anwendungsgebiete ist die Einführung unnatürlicher Aminosäuren<sup>[10, 11]</sup>. Eine andere ist die Herstellung von kovalent-verknüpften Dimeren, die durch Expression schwer zugänglich sind<sup>[12]</sup>.

Ein potentielles Problem bei der chemischen Synthese von Proteinen ergibt sich dadurch, dass die Proteine zunächst in nicht-nativer, ungefalteter Form vorliegen. Die Erfahrung zeigt, dass viele, vielleicht alle Proteine, durch geeignete Wahl der Bedingungen und gegebenenfalls durch Addition von Kofaktoren in die native Form gebracht werden können.

Ein Nachteil der chemischen Ligation in der gegenwärtig eingesetzten Ausführung ist die Notwendigkeit eines N-terminalen Cysteinrestes. In günstigen Fällen können natürlich-vorkommende Cysteine verwendet werden. Falls dies nicht zutrifft, können andere Aminosäuren durch Cystein ersetzt werden, was aber vermutlich nicht in allen Fällen ohne Einfluss auf die Funktionalität bleibt. Es werden deshalb zur Zeit Verfahren entwickelt, die eine Kopplung an Stellen ohne Cystein erlauben. In einem neuen vielversprechenden Ansatz wird die Aminogruppe des N-terminalen Restes des zu kopplenden Fragments mit einer Hilfsgruppe versehen (1-Phenyl-2-mercaptoethyl), die die notwendige Thiolgruppe enthält<sup>[13]</sup>. Die Hilfsgruppe kann nach der Ligation unter sauren Bedingungen entfernt werden.

Die hier beschriebenen Ansätze zur Vollsynthese von Proteinen können für die Herstellung von Proteinen mit bis zu ca. 200 Aminosäuren verwendet werden (zum Teil durch Ligation von 3 Fragmenten<sup>[9]</sup>). Prinzipiell könnten durch weitere Ligationschritte größere Proteine hergestellt werden, allerdings wäre der synthetische Aufwand sehr groß und die Ausbeuten eher gering. In solchen Fällen scheint die Kombination mit



**Schema 2: Mechanismus des „Intein-Splicing“**

molekularbiologischen Methoden besser geeignet zu sein.

### Kombination von synthetischen und biosynthetischen Methoden

Biosynthetische Methoden für die Herstellung von Proteinen bieten den Vorteil, dass sie keiner prinzipiellen Begrenzung der Kettenlänge unterliegen. Um diesen Vorteil mit den Vorteilen des synthetischen Ansatzes zu kombinieren werden Methoden für die Ligation zweier Fragmente gebraucht. Im einfachsten Fall kann ein N-terminales Peptid mit einer gewünschten Modifikation und einem C-terminalen Thioester hergestellt werden. Der Rest des Proteins kann überexprimiert werden (z.B. in Bakterien), wobei dafür Sorge getragen werden muss, dass am N-Terminus ein Cysteinrest vorhanden ist.

Dies kann über eine spezifische Proteaseschnittstelle nach einem kurzen Fusionsanteil und vor einem Cysteinrest erreicht werden. Danach können beide Fragmente ligiert werden. Dieser Ansatz, der generell anwendbar für Proteine mit Modifikationen in den ersten 60–70 Resten sein könnte, ist noch nicht routinemäßig zum Einsatz gekommen, obwohl erste Ergebnisse sehr vielversprechend sind<sup>[9]</sup>.

Falls der Bereich des Proteins, in den eine Modifikation eingeführt werden soll, weiter als ca. 60–70 Aminosäuren weg vom N-Terminus liegt, wird eine andere Strategie gebraucht. Der unmodifizierte Bereich kann durch Überexpression produziert werden, der Rest des Proteins (wenn nicht zu lang) einschließlich der Modifikation durch Synthese. Allerdings fehlt dem exprimierten Protein der reaktive C-Terminus (Thio-

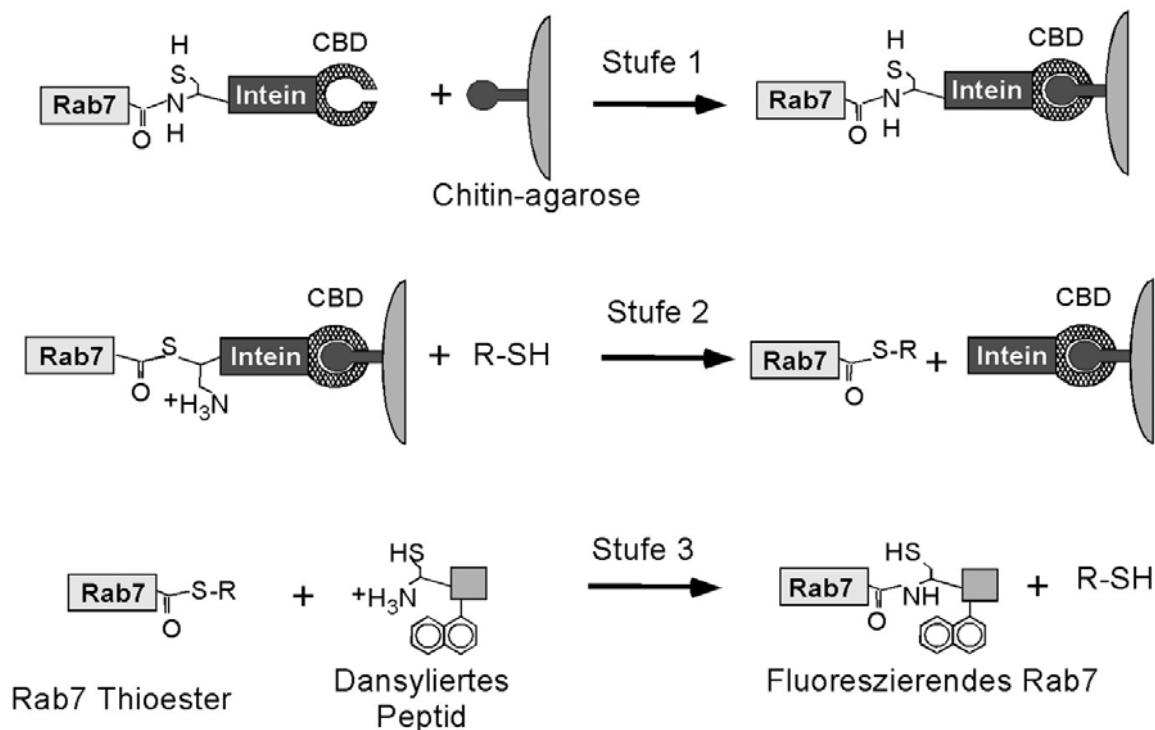
Herstellung von semi-synthetischen Rab7 durch *in vitro* Ligation

Abb.: Anwendung der „Expressed Protein Ligation“ Methode für die Herstellung von fluoreszierenden Rab Molekülen. CBD = Chitin-bindende Domäne.

ester), sodass die chemische Ligation nach Kent et al. nicht durchgeführt werden kann. Die chemische Manipulation des C-Terminus des nicht mit Schutzgruppen versehenen exprimierten Proteins ist kaum möglich. Eine Lösung dieses Problems wird durch das Phänomen des Protein-Spleißens geboten<sup>[14]</sup>. Proteine, die in der Natur durch diesen Prozess heranreifen, haben eine N-Extein-Intein-C-Extein Struktur. Als Ergebnis des Vorgangs wird das Intein herausgeschnitten und die beiden Exteinteile ligiert (Schema 2). Dieser Prozess beinhaltet folgende Schritte: 1) N→S Acyltransfer an einem Cysteinrest am N-Extein/Intein-Übergang; 2) Trans(thio)esterifizierung mit einem Cystein-(oder Serin-) Rest am Intein/C-Extein-Übergang; 3) S→N Acyltransfer am Übergang zwischen den beiden Exteinteilen unter Beteiligung des C-terminalen Asparaginrests des Inteins.

Es bestehen mehrere Möglichkeiten, die Inteinbiochemie für synthetische Zwecke zu verwenden. In einem vielseitig anwendbaren Ansatz werden mutierte Inteinproteine verwendet, die nur den ersten der 3 Schritte durchlaufen können<sup>[15]</sup>. Das thioesterverknüpfte Produkt dieses Schrittes kann mit Thioleagenzien gespalten werden, sodass der Anteil, der in dem mutierten Inteinprotein das N-Extein bildet, als Frag-

ment mit einem C-terminalen Thioester abgespalten wird. Dieses Fragment kann wie oben beschrieben mit einem anderen Peptid oder Protein mit einem N-terminalen Cysteinrest ligiert werden. Dieses Verfahren wird „expressed protein ligation“ genannt, und ist für die Herstellung einer Reihe von Proteinen verwendet worden<sup>[16,17]</sup>. Ein Beispiel für die Anwendung dieses Ansatzes wird in Abb. 1 gezeigt. Es sollte ein Rab-Protein (GTPase der Ras-Superfamilie, die an der Regulation des vesikulären Proteintransports beteiligt ist) hergestellt werden, das in der Nähe des C-Terminus einen fluoreszierenden Rest trägt. In diesem Bereich liegen zwei Cysteinreste, die intakt bleiben sollten, da sie posttranslational modifiziert werden (durch Geranylgeranylierung). Es wurde ein „Minintein“ Konstrukt hergestellt, das aus Rab7 (C-terminal verkürzt), einem Inteinbereich und einer Chitin-bindenden Domäne (CBD) besteht. Nach Expression in *E. coli* konnte dieses Protein an immobilisiertes Chitin gebunden und danach mit einem Thioleagenz gespalten werden. Das entstehende C-terminal aktivierte Rab7 wurde anschließend mit einem fluoreszierenden Hexapeptid ligiert (Sequenz: CK(dansyl)SCSC). Das entstehende Protein zeigte Fluoreszenzänderungen bei der Wechselwirkung mit Partnerproteinen und

konnte enzymatisch an den Cysteinresten geranylgeranyliert werden<sup>[18]</sup>. Über einen ähnlichen Ansatz konnte ein fluoreszierendes, prenyliertes Derivat von Rab7 direkt durch Ligation mit einem dansylmarkierten und prenyliertem Hexapeptid hergestellt werden<sup>[19]</sup>.

### Zusammenfassung

Die Fortschritte der letzten Jahre haben dazu geführt, dass mit Hilfe der chemischen Peptidsynthese modifizierte Aminosäuren an praktisch jede Stelle in der Sequenz eines Proteins eingeführt werden kann. Dies kann für kleine Proteine (bis zu ca. 180 Aminosäuren) durch chemische Synthese alleine erreicht werden. Für größere Proteine ist eine Kombination mit biosynthetischen Methoden erforderlich, z.B. unter Ausnutzung der Möglichkeiten der Inteinbiochemie. Zusätzlich zu der Möglichkeit des Einbaus von unnatürlichen Nukleotiden können posttranslationale Modifikationen eingeführt werden, die mit reinen biosynthetischen Methoden bewerkstelligt werden können. Die Möglichkeiten werden von großem Nutzen für Untersuchungen von Struktur-Funktionsbeziehungen an Proteinen sein.

## Literatur

- [1] **Friedrich, T., Geibel, S., Kalmbach, R., Chizhov, I., Ataka, K., Heberle, J., Engelhard, M. and Bamberg, E.** (2002): Proteorhodopsin is a Light-driven Proton Pump with Variable Vectoriality. *J Mol.Biol.* 321: 821–838.
- [2] **Goody, R.S., Alexandrov, K. and Engelhard, M.** (2002): Combining chemical and biological techniques to produce modified proteins. *ChemBioChem* 3: 399–403
- [3] **Merrifield, R.B.** (1963): Solid phase peptide synthesis 1. Synthesis of a tetrapeptide. *Journal of the American Chemical Society* 85: 2149–2154
- [4] **Jackson, D.Y., Burnier, J., Quan, C., Stanley, M., Tom, J. and Wells, J.A.** (1994): A designed peptide ligase for total synthesis of ribonuclease A with unnatural catalytic residues. *Science* 266: 243–247
- [5] **Dawson, P.E., Muir, T.W., Clark-Lewis, I. and Kent, S.B.** (1994): Synthesis of proteins by native chemical ligation. *Science* 266: 776–779
- [6] **Tam, J.P., Yu, Q. and Miao, Z.** (1999): Orthogonal ligation strategies for peptide and protein. *Biopolymers* 51: 311–332
- [7] **Dawson, P.E. and Kent, S.B.** (2000): Synthesis of native proteins by chemical ligation. *Annu.Rev.Biochem.* 69: 923–960
- [8] **Wieland, T., Lang, H.U. and Liebsch, D.** (1956): Über Peptidsynthesen. 11. Intramolekulare Aminoacyl-wanderung bei Peptiden. *Annalen der Chemie-Justus Liebig* 597: 227–234
- [9] **Becker, C.F.** (2001): Chemische Synthese von Proteinen: Generierung biologischer Aktivität ohne Nutzung des zellulären Synthesearrappats. *Dissertation, Universität Dortmund*
- [10] **Sydot, J.R., Herrmann, C., Kent, S.B., Goody, R.S. and Engelhard, M.** (1999): Design, total chemical synthesis and binding properties of a [Leu-91-N<sup>1</sup>-methyl-7-azaTrp]Ras-binding domain of c-Raf-1. *Proc. Natl Acad Sci USA* 96: 7865–7870.
- [11] **Becker, C.F., Hunter, C.L., Seidel, R.P., Kent, S.B., Goody, R.S. and Engelhard, M.** (2001): A sensitive fluorescence monitor for the detection of activated Ras: total chemical synthesis of site-specifically labeled Ras binding domain of c-Raf1 immobilized on a surface. *Chem. Biol.* 8: 243–252.
- [12] **Baca, M., Muir, T.W., Schnölzer, M. and Kent, S.B.** (1995): Chemical ligation of cysteine-containing peptides – synthesis of a 22-KDa tethered dimer of HIV-1 protease. *Journal of the American Chemical Society* 117: 1881–1887
- [13] **Botti, P., Carrasco, M.R. and Kent, S.B.** (2001): Native chemical ligation using removable N $\alpha$ -(1-phenyl-2-mercaptoethyl) auxiliaries. *Tetrahedron Letters* 42: 1831–1833
- [14] **Paulus, H.** (2000): Protein splicing and related forms of protein autoproccessing. *Annu.Rev.Biochem.* 69: 447–496
- [15] **Chong, S., Mersha, F.B., Comb, D.G., Scott, M.E., Landry, D., Vence, L.M., Perler, F.B., Benner, J., Kucera, R.B., Hirvonen, C.A., Pelletier, J.J., Paulus, H. and Xu, M.Q.** (1997): Single-column purification of free recombinant proteins using a self-cleavable affinity tag derived from a protein splicing element. *Gene* 192: 271–281
- [16] **Muir, T.W., Sondhi, D. and Cole, P.A.** (1998): Expressed protein ligation: a general method for protein engineering. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95: 6705–6710
- [17] **Cowburn, D. and Muir, T.W.** (2001): Segmental isotopic labeling using expressed protein ligation. *Methods Enzymol.* 339: 41–54
- [18] **Iakovenko, A., Rostkova, E., Merzlyak, E., Hillebrand, A.M., Thoma, N.H., Goody, R.S. and Alexandrov, K.** (2000): Semi-synthetic Rab proteins as tools for studying intermolecular interactions. *FEBS Lett.* 468: 155–158
- [19] **Alexandrov, K., Heinemann, I., Durek, T., Sidorovitch, V., Goody, R.S. and Waldmann, H.** (2002): Intein-mediated synthesis of geranylgeranylated Rab7 protein in vitro. *J.Am.Chem.Soc.* 124: 5648–5649

## Korrespondenzadresse:

**Prof. Dr. Roger S. Goody**  
**Max-Planck Institute für molekulare Physiologie**  
**Abteilung Physikalische Biochemie**  
**Otto-Hahn-Straße 11**  
**D-44227 Dortmund**