

**Prof. Dr. Franz P. Schmidtchen**

## Eine neue Methode zur regioselektiv N-terminalen kovalenten Verknüpfung von Proteinen mit anderen Biopolymeren zu Konjugaten oder mit festen Trägern

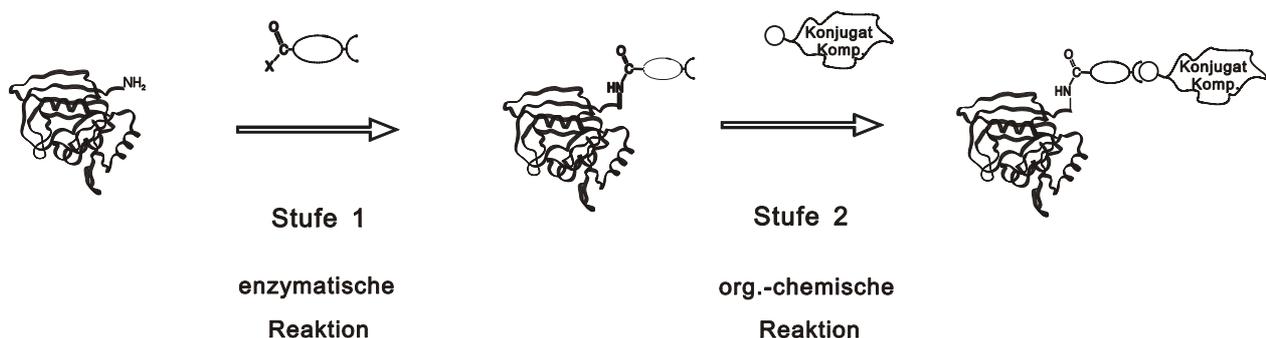
Die Funktion von Proteinen in ihrem natürlichen Umfeld, aber auch in künstlichen Anwendungen hängt wesentlich von post-translational eingeführten Strukturelementen ab. In der Regel ist die Dekoration der Proteine mit solchen nicht-proteinogenen Motiven (prosthetische Gruppen, Membrananker, Zuckerketten, Aminosäure-Modifikationen, etc.) nicht direkt genetisch codiert, sondern unterliegt der kinetischen Kontrolle von Prozessierungsenzymen. Die Spezifität dieser post-translationalen Modifikationen variiert in weiten Grenzen vom höchst selektiven Herausschneiden eines Strangabschnitts (z.B. bei der Überführung der Proformen in die eigentlich aktiven Proteine) bis zur weitgehend promiskuen Einführung von Phosphorylgruppen in Speicherproteine wie Casein. Für viele Anwendungen von Proteinen möchte man jedoch gerne Methoden einsetzen, die ganz spezifisch eine einzige Position adressieren und dort eine Derivatisierung setzen, die zielgerichtet weiterentwickelt werden kann. Rein abiotische Verfahren eignen sich hierfür nicht.

Die bekannte Chemie der Bindung von nativen Proteinen aneinander, an andere biologische Komponenten (Zucker, Lipide, Nucleinsäuren, Coenzyme, etc.) oder an aktivierte feste Träger ist sehr facettenreich, aber im Kern weitgehend unselektiv. Die unausweichliche Folge dieser Verfahren ist daher ein oft herber Verlust an funktioneller Aktivität und unzureichende Reproduzierbarkeit, da immer ein Kollektiv verschiedener molekularer Spezies gebildet wird, dessen exakte Zusammensetzung schlecht kontrolliert werden kann.

Abhilfe in dieser unbefriedigenden Situation könnten Methoden bringen, die auf ein einziges Konjugationsprodukt abzielen, das multifunktionelle Protein also nur an einer einzigen Stelle in voraussagbarer Weise zur Reaktion bringen. Da organisch-chemische Reaktionen – von einzelnen isolierten Ausnahmen einmal abgesehen – die erforderliche Selektivität nicht beibringen können, wollen wir dafür enzymatische Verfahren einsetzen. Wir verfolgen dabei eine Zweistufenstrategie (Abb.1): In der ersten Stufe wird durch eine enzymatisch katalysierte, kovalente Modifikation der

N-Terminus des Proteins mit einem chemisch spezifisch adressierbaren Strukturelement verknüpft. Die einzigartige Funktion dient dann als Anker für die nachfolgende Kupplung mit dem eigentlichen Konjugationspartner, für die gut eingeführte, aber auch attraktive neue Methoden literaturbekannt sind. Konzeptionell wird die Gesamtaufgabe also in zwei aufeinanderfolgende Teilbereiche zerlegt, wobei im ersten Abschnitt die regioselektive Derivatisierung des Proteins anfällt. Das vorliegende Projekt diente der Sondierung einer neuen Variante dieser Aufgabe.

Abbildung 1



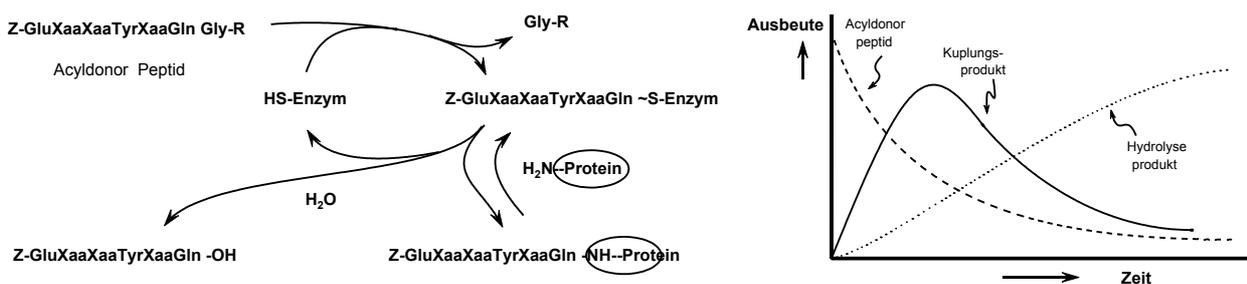
Prinzipiell sind Enzyme sehr wohl in der Lage, trotz der nahezu gleichen chemischen Reaktivität vieler derivatisierbarer Gruppen an der Oberfläche von Zielproteinen nur eine einzige Funktion selektiv anzusprechen. Die große Zahl der biologisch aktiven Proteinkonjugate belegt dies augenfällig. Meist sind diese Modifikationen aber so substratspezifisch, dass sie sich für eine allgemein anwendbare Derivatisierungsmethode, die wir entwickeln wollen, nicht eignen. Ein solches Verfahren muss sich bei allem Respekt vor der Individualität der Proteine auf ein allen gemeinsames Epitop fokussieren. In dieser Hinsicht ist der N-Terminus ein attraktiver Angriffspunkt, der auch von der Enzymklasse der Aminoproteasen selektiv erkannt und von allen anderen primäre Aminogruppen enthaltenden Epitopen unterschieden wird. Außerdem ist der N-Terminus mit hoher Wahrscheinlichkeit unstrukturiert und aus der Lösung frei zugänglich, weil er in aller Regel schon mindestens eine Stufe enzymatischer Prozessierung eingegangen ist.

Als Werkzeug für die kovalente Anknüpfung an dieses Epitop bieten sich Aminopeptidasen an, die in Umkehrung ihrer biologischen Rolle selbst in Wasser unter bestimmten Bedingungen Peptidbindungen in guter Ausbeute bilden (reverse Proteolyse). Auf der Basis eines typischen Vertreters dieser Enzymklasse, des Cathepsins C, haben wir vor einiger Zeit ein taugliches Verfahren zur Peptidmodifikation entwickelt (C.Gittel et al. *Bioconjugate Chem.* **1995**, 6,70-76). Für Proteine ist diese Methodik allerdings nur in Ausnahmefällen geeignet, weil die meisten Proteine durch Aminopeptidasen angegriffen und abgebaut werden.

Die Unspezifität gewöhnlicher Proteasen ist ein hohes Hindernis für ihren Verwendung in allgemeinen Modifikationsverfahren, das man durch den Einsatz spezifischerer Endoproteasen überwinden kann. Die meisten Proteasen erkennen die  $\alpha$ -Aminocarbonyleinheiten des Peptidstrangs und können so in der Umkehrung der Hydrolysereaktion, der Peptidbindungsbildung, zwischen der N-terminalen  $\alpha$ -Aminogruppe und den Seitenkettenaminogruppen des Lysins ohne weiteres unterscheiden.

Unser Konzept beruht auf der Umkehrung der Hydrolysereaktion (reverse Proteolyse), die hohe Ausbeuten an einem Peptidverknüpfungsprodukt selbst in wässriger Lösung bereitstellen kann, wenn bestimmte strukturelle und mechanistische Bedingungen erfüllt sind. Voraussetzung ist die kinetische Verzweigung der Spaltreaktion an einem Enzym-gebundenen Intermediat, das einerseits durch Wasser hydrolysiert, zum anderen durch Angriff eines gleichzeitig im aktiven Zentrum gebundenen Aminonukleophils (z.B. dem N-Terminus eines Proteinsubstrats) in ein neues Peptid umgewandelt werden kann (Transpeptidierung, Abb. 2). Um diesen Schritt zu optimieren, ist sowohl die hinreichende "Beladung" des Kupplungsenzyms durch einen Acyldonor (siehe unten: Bildung des Acyl(thio)esters aus dem spezifischen Heptapeptid) als auch die zeitlich angepasste Unterbrechung der Reaktion bei maximaler Ausbeute an Transpeptidierungsprodukt nötig. Letzteres ist naturgemäß ebenfalls ein Substrat für das Kupplungsenzym und würde bei ungestörtem Verlauf wieder gespalten.

Abbildung 2



Die Nutzung der reversen Proteolyse zur Einführung nicht-natürlicher Strukturelemente hängt auch davon ab, inwieweit es gelingt, die später chemisch adressierbaren Funktionen (vgl. 2.Stufe der Modifizierungsstrategie) in dem Acyldonor zu "verstecken". In den speziellen Fall des vorliegenden Vorhabens stehen dafür 4 Positionen zur Auswahl (die 3 Seitenketten der nicht-spezifisierten AS-Reste und der N-Terminus der Spezifitätssequenz), so dass die Aussichten für die wirksame Einbettung von weiter spezifisch entwicklungsfähigen Strukturmotiven sehr günstig waren.

Damit Endoproteasen als Syntheseenzyme infrage kommen, muss ihre Spaltungsspezifität so hoch sein, dass sie gewöhnliche globuläre Proteine nicht hydrolysieren. Das hier dargestellte Konzept ist

mit der Serin Endoprotease *IgA-Protease* erfolgreich realisiert worden (Lewinska, M. et al. *Bioconj.Chem.* **2004**, 15, 231-234).

Unter den vielen bekannten hochspezifischen Proteasen, die auch als Restrictionsproteasen in Analogie zu den entsprechenden Nukleinsäure-spaltenden Enzymen bezeichnet werden, nimmt die *Tobacco-Etch-Virus Protease (TEV-Protease)* eine Sonderstellung ein. Sie ist als rekombinantes Protein vergleichsweise billig käuflich, weil sie zum Trimmen von Fusionsproteinen herangezogen wird. Außerdem ist ihre Aktivität von einer mindestens 7 Aminosäurereste langen Spezifitätsdeterminante gesteuert (GluXaaXaaTyrXaaGln ↓ Gly), so dass nur Proteine gespalten werden, die diese Primärsequenz an zugänglicher Stelle besitzen. Im vorliegenden Projekt sollte nun der Einsatz einer Thiolprotease (*TEV-Protease*), die von der chemischen Reaktivität her deutlich bessere Voraussetzungen für die Transpeptidierung mitbringt, in der in vitro Proteinmodifikation erprobt werden. Darüber hinaus muss die Substratspezifität für das Proteinsubstrat (dieses Merkmal bestimmt die Anwendungsbreite der Methode) sowie für den organisch-synthetisch darzustellenden Acyldonor erkundet werden.

Um die *TEV-Protease*, die als Thiolprotease den Angriff eines Stickstoffnukleophils auf den intermediär gebildeten Aktivester wesentlich besser unterstützt als die *IgA-Protease*, in den regioselektiven reversen Proteolysen zu erproben, musste zunächst ein geeignetes Acyldonorsubstrat bereitgestellt werden. Aufgrund von Literaturbefunden hielten wir dafür das Nonapeptid H-ValGluAsnLeuTyrPheGlnSerTrp-NH<sub>2</sub> für sinnvoll. Es bietet mit seinem „offenen“ N-Terminus vielfältige Optionen zur Einführung der gewünschten abiotischen, aber „knüpfaktiven“ Strukturelemente und sollte wegen der vielen hydrophilen Seitenkettenfunktionen ausreichend wasserlöslich sein. Die Spaltung dieses Substrats durch *TEV-Protease* soll zwischen den Glutamin- und Serinresten erfolgen, was wegen der Fluoreszenz des dipeptidischen Spaltprodukts leicht HPLC-analytisch verfolgt werden kann. Erst durch jüngere Arbeiten zur Substratspezifität stellte sich heraus, dass die P<sub>1</sub>'-Position im Substrat in weiteren Grenzen substituiert sein darf als ursprünglich angenommen wurde (Toeszer, J. et al. *FEBS J.* **2005**, 272, 514-523). In einleitenden Versuchen wurden die Spaltungsbedingungen dieses Substrats durch *TEV-Protease* erkundet. Es zeigte sich bald, dass die *Protease* gegenüber diesem Peptidsubstrat nur sehr wenig aktiv ist, obwohl alle bekannten Selektivitätskriterien erfüllt waren. Diese Reaktionen wurden via HPLC verfolgt und die sehr träge Produktbildung durch Analyse der auftretenden Produktpeaks mittels MALDI-TOF charakterisiert. Dadurch ist die Abspaltung des C-terminalen Dipeptids SerTrp-NH<sub>2</sub> abgesichert und die Regiospezifität bewiesen. Für die Demonstration der Transpeptidierung wurden 3 Peptidsubstrate herangezogen, die alle kleine und mit der Substratspezifität kompatible Reste am N-Terminus trugen: Neben dem Octapeptid CSMP (carbohydrate-structure-mimicking-peptide) mit Alanin an Position 1 wurden noch die mutmaßlich besseren Nukleophile SerLeuNH<sub>2</sub> und (Gly)<sub>3</sub>Trp\_NH<sub>2</sub> ausprobiert. In keinem

Fall gelang uns unter den publizierten Standardbedingungen die bimolekulare Kupplung der Peptide. Die MALDI-TOF Analyse erbrachte den Nachweis der sehr trägen Spaltung des Acyldonor Substrats und belegte damit die Arbeitsfähigkeit des Enzyms, erlaubte aber nicht den Positivnachweis des Transpeptidierungsprodukts. Variation der experimentellen Bedingungen und auch des Nukleophil/Acyldonor-Verhältnisses führte zu keinem besseren Resultat.

Für dieses Negativergebnis kommen mehrere Erklärungsmöglichkeiten in Betracht, von denen wir zwei für wahrscheinlich halten. Da bekannt ist, dass die TEV-Protease sich autolytisch zu einem trankierten Derivat mit viel niedrigerer Aktivität (Kapust, R. et al. *Prot.Eng.* **2001**, *14*, 993-1000) vermuten wir, dass unsere Enzympräparation entsprechend geschädigt war. Die Stichhaltigkeit dieser Erklärungsmöglichkeit ist für uns schwer zu belegen, weil es für das Enzym keine Standardsubstrate zu kaufen gibt, an denen die Aktivität kalibriert werden könnte. Ein weiterer Grund für das völlige Fehlen der Kupplungsreaktion könnte sich aus der Inhibitorwirkung der Peptidsubstrate ergeben. Die Inhibition von TEV-Protease durch niedermolekulare Peptide ist wohl belegt und es sind solche sehr stabilen Inhibitorkomplexe jüngst röntgenkristallographisch studiert worden (Nunn, C.M. et al. *J.Mol.Biol.* **2005**, *350*, 145-155). In Abwesenheit von extern zugesetztem Peptid kristallisiert die autolytisch stabile C151A Variante in einer Form, die den C-Terminus im aktiven Zentrum gebunden hat! Diese überraschende Erfahrung ermutigt nicht, die TEV-Protease als heißen Kandidaten für die regioselektive Proteinmodifikation weiter zu verfolgen. Andere Enzyme bieten nach diesem Ergebnis eine vielversprechendere Perspektive.