

Katalytische Aktivität von Enzymen mit modifiziertem aktivem Zentrum

Von Emil Thomas Kaiser*

Design und Aufbau von Peptiden und Proteinen mit neuartigen Bindungseigenschaften und neuartigem katalytischem Verhalten sind das Ziel des Protein-Engineerings^[**]. Eine Möglichkeit, dieses Ziel zu erreichen, ist die Umwandlung des aktiven Zentrums natürlicher Proteine, und zwar entweder durch ortsspezifische Mutagenese („site-directed mutagenesis“) oder durch chemische Modifizierung. Sofern durch solche Eingriffe die Tertiärstruktur nicht entscheidend verändert wird, sollte das Bindungszentrum des ursprünglichen Proteins wenigstens teilweise erhalten bleiben, so daß das umgewandelte Enzym weiterhin Komplexe mit seinen Substraten bilden kann. Es sind viele Proteine mit Mutationen am aktiven Zentrum bekannt; dazu zählt auch die von uns gewonnene Cystein-Mutante der alkalischen Phosphatase. Eine grundsätzliche Einschränkung der ortsspezifischen Mutagenese besteht darin, daß nur die zwanzig natürlichen Aminosäuren ausgetauscht werden können. Die alternative chemische Modifizierung ist schwierig durchzuführen, wenn eine Aminosäure spezifisch durch eine andere ersetzt werden soll. Wir konnten jedoch zeigen, daß Coenzymanaloga auf chemischem Weg in geeignete Positionen von Proteinen eingeführt und kovalent gebunden werden können. Dadurch wird die Gewinnung halbsynthetischer Enzyme möglich, deren katalytische Aktivität sich grundlegend von der ihrer Vorläufer-Proteine unterscheidet. Ein weiterer Zweig des Protein-Engineerings konzentriert sich auf Systeme, bei denen – in erster Näherung – die Faltung vernachlässigt werden kann und der Aufbau spezieller Sekundärstrukturen angestrebt wird. Beispiele aus unseren Arbeiten für das erfolgreiche Design biologisch aktiver Peptide und Proteine auf diesem Weg sind Moleküle, die die Eigenschaften von Apolipoproteinen, Toxinen und vielen Hormonen nachahmen. Vor kurzem haben wir begonnen, die beiden oben beschriebenen Möglichkeiten des Protein-Engineerings zu kombinieren. Auf diese Weise konnten kleine Enzyme wie Ribonuclease T₁ und deren Strukturanaloga vollsynthetisch erhalten werden.

1. Einleitung

Ein wichtiges Ziel unserer Forschungen auf dem Gebiet des Protein-Engineerings ist das Design neuer enzymatischer Katalysatoren – ausgehend von den Aminosäuren. Dies ist in der Tat eine Herausforderung, besonders da noch keine verlässlichen Verfahren existieren, um die Tertiärstruktur (die Faltung) anhand der Primärstruktur (der Aminosäuresequenz) vorherzusagen. Zu Beginn unserer Arbeiten vor einigen Jahren haben wir uns deshalb entschlossen, das Ziel auf zwei Wegen anzusteuern.

Auf dem einen Weg sind wir von natürlich vorkommenden Enzymen mit gefalteten Strukturen ausgegangen und haben die aktiven Zentren verändert, entweder durch chemische Modifizierung^[1-3] oder durch ortsspezifische Mutagenese („site-directed mutagenesis“)^[4]. Solange solche Umwandlungen keine größeren Veränderungen in der Tertiärstruktur bewirken, sollte es auf diese Weise möglich sein, das Bindungszentrum des ursprünglichen Enzyms zu

mindest teilweise für die Komplexbildung zwischen dem modifizierten Enzym und dessen Substraten zu nutzen.

Unser zweiter Weg für den Aufbau neuer Proteine konzentriert sich auf das Design von Strukturbereichen unter Beibehaltung der vorhandenen aktiven Zentren. Anders als Tertiärstrukturen scheinen Aminosäuresequenzen, die definierte Sekundärstrukturen bilden, recht gut vorhersagbar zu sein, besonders wenn die Peptide oder Proteine an biologische Grenzflächen binden. Oberflächenaktive Peptide und Proteine, deren biologische Aktivität von Apolipoproteinen über chemotaktische Agentien und Peptidtoxine bis hin zu Peptidhormonen reicht, dürften somit bei Bindung an amphiphile Oberflächen wie die meisten biologischen Grenzflächen bereitwillig „amphiphil“ Sekundärstrukturen annehmen (d.h. Sekundärstrukturen, die auf der einen Seite hydrophil, auf der anderen hydrophob sind)^[5-7].

Wir haben nun Designprinzipien für Modellpeptide und -proteine entwickelt, welche die biologischen und physikalischen Eigenschaften der natürlich vorkommenden amphiphilen Systeme simulieren. So schlugen wir zum Beispiel nach sorgfältiger Prüfung eines Kalottenmodells von Lachs-Calcitonin vor (Peptidhormon mit hoher hypocalcämischer Aktivität), daß die biologisch aktive Form des Hormons aus drei Abschnitten besteht^[8,9] (Abb. 1A). Da ist zunächst das aktive Zentrum, welches die Reste 1-7 umfaßt, die über eine Disulfidbrücke verknüpft sind. Der zweite Strukturabschnitt aus den Resten 8-22 kann eine amphiphile α -Helix bilden (Abb. 1B). Bei eingehender Be-

[*] Prof. Dr. E. T. Kaiser
Laboratory of Bioorganic Chemistry and Biochemistry
The Rockefeller University
1230 York Avenue, New York, NY 10021-6399 (USA)

[**] Andere wichtige Zusammenfassungen: D. L. Oxender, C. F. Fox (Hrsg.): *Protein Engineering*, Alan R. Liss, New York 1987; A. R. Fersht, J.-P. Shi, A. J. Wilkinson, D. M. Blow, P. Carter, M. M. Y. Waye, G. P. Winter, *Angew. Chem.* 96 (1984) 455; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 23 (1984) 505; J. R. Knowles, *Science (Washington, D.C.)* 236 (1987) 1252.

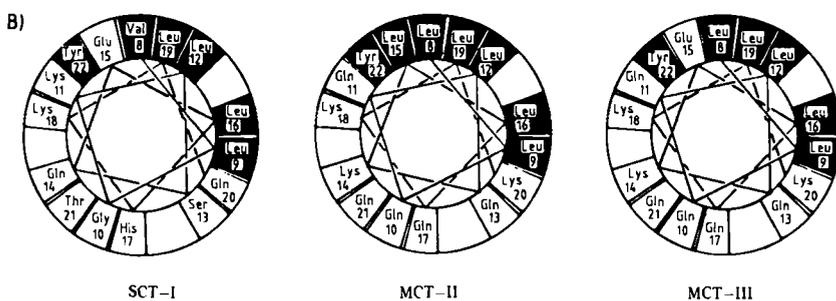
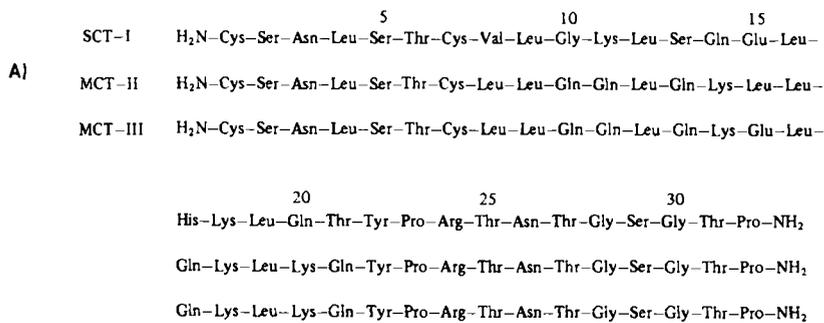


Abb. 1. A) Aminosäuresequenzen des Lachs-Calcitonins I (SCT-I) und der Modell-Calcitonine MCT-II und MCT-III. MCT-II unterscheidet sich von MCT-III nur durch einen Leucinrest anstelle eines Glutaminsäurerestes in Position 15. Die hypocalcämische Aktivität von MCT-II ist vergleichbar mit der von SCT-I, während MCT-III um einiges aktiver ist. B) α -helicale Projektionen der Aminosäurereste 8–22 von SCT-I, MCT-II und MCT-III. Die Aminosäurereste in den dunklen Feldern sind hydrophob, in den hellen Feldern hydrophil. Eine Aufteilung der Helix in hydrophobe und hydrophile Bereiche ist deutlich erkennbar.

trachtung dieser Helix fällt auf, daß nur ein Rest – Glutaminsäure in Position 15 – die hydrophob-hydrophile Aufteilung stört. Der dritte Strukturbereich aus den Resten 23–32 dient als eine Art hydrophiler Spacer. Der Prolinamidrest am C-Terminus ist für die biologische Aktivität des Hormons entscheidend und sollte vielleicht zusätzlich zu den N-terminalen Resten 1–7 als Teil des aktiven Zentrums angesehen werden. In unseren Modellstudien haben wir die Bedeutung der amphiphilen Sekundärstruktur der Reste 8–22 durch Synthese von Analoga untersucht. Das N-terminale aktive Zentrum wurde dazu konstant gehalten und der mutmaßlich helicale Bereich durch Aminosäuresequenzen ersetzt, die vorzugsweise α -Helices bilden, sich jedoch grundlegend von der natürlichen Sequenz im Abschnitt 8–22 unterscheiden. Die hydrophobe Seite der helicalen Region des Lachs-Calcitonins enthält zahlreiche Leucinreste, die mit ihren aliphatischen Gruppen sehr gute α -Helixbildner sind. Bei der Gestaltung der Ersatzhelices haben wir gefunden, daß die aktivsten unserer synthetischen Analoga auf der hydrophoben Seite fast die gleiche Sequenz und Verteilung der Aminosäuren wie Lachs-Calcitonin haben, während sie auf der hydrophilen Seite eine völlig andere Sequenz mit erhöhtem α -helicalem Potential aufweisen (Abb. 1B). Bei unserem neuesten Analogon, MCT III, unterscheidet sich die hydrophile Seite recht stark von der des natürlichen Lachs-Calcitonins; auf der hydrophoben Seite ist dagegen nur ein Rest des natürlichen Hormons (Val) durch einen ähnlichen (Leu) ersetzt (Abb. 1). Dieses Analogon zeigt eine zweieinhalb- bis dreimal so hohe hypocalcämische Aktivität wie das natürliche Hormon^[10]. Mit ähnlich erhaltenen Modellverbindungen konnten wir zeigen, daß amphiphile Sekundärstrukturen für die physikalischen und biologischen Eigenschaften vieler Hormone eine entscheidende Rolle spielen^[11]. Zu diesen Hormonen zählen β -Endorphin, Corticotropin-Releasing-Hormon, Glucagon, Wachstumshormon-Releasing-

Faktor, Neuropeptid Y sowie das vasoaktive Intestinalpeptid.

In diesem Beitrag wollen wir uns auf eine der Möglichkeiten des Protein-Engineerings konzentrieren, und zwar auf die Modifizierung des aktiven Zentrums in Enzymen mit Tertiärstruktur. Wir werden uns jedoch nicht mehr mit dem Design von Systemen mit Sekundärstruktur befassen, bei denen – wie bei Calcitonin – in erster Näherung die Tertiärstruktur vernachlässigt werden kann, sondern zu Fällen übergehen, bei denen die Tertiärstruktur entscheidend ist. Je mehr wir über die Neugestaltung von Bereichen mit Sekundärstruktur in solchen Molekülen lernen, desto eher wird es auch möglich sein, unser Wissen über den Molekülbau in Regionen außerhalb des aktiven Zentrums mit den Erkenntnissen aus unseren Arbeiten am aktiven Zentrum zu kombinieren, so daß wir schließlich die Konstruktion vollständiger Enzymsysteme mit neuen Strukturen und neuen katalytischen Funktionen wagen können.

2. Auswahl der Protein-Templats für die Modifizierung von katalytischen Funktionalitäten

Bei der Auswahl der Protein-Templats für die Modifizierung von katalytischen Zentren hielten wir es für sinnvoll, von Systemen auszugehen, deren Tertiärstruktur durch Röntgenstrukturanalyse eindeutig festgelegt ist. Weitere wichtige Kriterien waren einfacher Zugang und problemlose Reinigung der Ausgangsproteine. Da die Entwicklung der konzeptionellen Aspekte für das Design aktiver Zentren im Brennpunkt unserer Arbeit stehen sollte, haben wir tunlichst auf Systeme verzichtet, bei denen experimentelle Schwierigkeiten bei der Reinigung oder Charakterisierung der modifizierten Enzyme auftreten könnten. Als Proteine verwendeten wir hauptsächlich alkalische Phosphatase aus *E. coli*^[12], Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

(aus Kaninchenskelettmuskeln^[13] und aus *Bacillus thermophilus*^[14]), Hämoglobin^[15] und Papain^[16-22]. Bei der alkalischen Phosphatase wurde das aktive Zentrum durch ortsspezifische Mutagenese verändert, während die drei anderen Enzyme durch chemische Modifizierung in Proteine umgewandelt wurden, die wir als „halbsynthetische Enzyme“ bezeichnen. Zur Neugestaltung des aktiven Zentrums zogen wir Molekülmodelle und Computergraphik auf der Basis von Röntgenstrukturdaten heran. In jedem Fall haben wir auf diesem Weg geprüft, ob das modifizierte aktive Zentrum potentielle Substrate binden kann. Für die Vorhersage, welche Art von Substraten für Untersuchungen an den mutierten Enzymen verwendet werden können, haben sich solche Modellstudien als enorme Hilfe erwiesen.

3. Auswahl der Reste für die Modifizierung

Wird das aktive Zentrum des Enzyms durch ortsspezifische Mutagenese modifiziert, so ist man sehr flexibel bei der Auswahl des zu verändernden Rests. Obwohl sterische und elektrostatische Überlegungen eine Rolle spielen, wird diese Auswahl nur durch Schwierigkeiten bei der Expression des mutierten Gens eingeschränkt. Bei Strukturänderungen durch chemische Modifizierung sind dagegen nucleophile Gruppen im Enzym die besten Angriffspunkte, da die meisten für stöchiometrische Umwandlungen benutzten Reagentien elektrophile Zentren enthalten. So haben wir bei der Erzeugung halbsynthetischer Enzyme aus Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, Hämoglobin und Papain jeweils eine besonders reaktive Thiolgruppe durch Reaktion mit Coenzymanaloga modifiziert^[13-22]. Wesentlich für die Auswahl der Reste für die Modifizierung ist natürlich eine leichte Zugänglichkeit des veränderten aktiven Zentrums für die zu bindenden Substrate. Voraussagen darüber sind durch Studien an Molekülmodellen möglich.

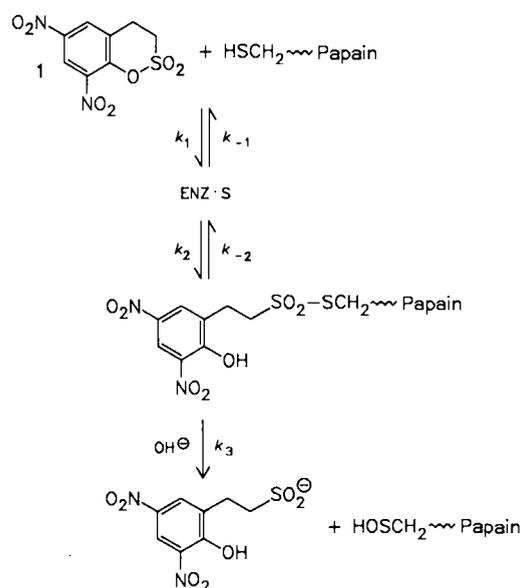
4. Möglichkeiten für die Einführung neuer Gruppen in das aktive Zentrum von Proteinen

4.1. Chemische Methoden

Das erste Beispiel für die Umwandlung eines nucleophilen Rests im aktiven Zentrum eines Proteins untersuchten unabhängig voneinander die Arbeitsgruppen von *Bender*^[23] und *Koshland*^[24]. Sie setzten Subtilisin mit α -Toluolsulfonylfluorid um und tauschten die dabei gebildete Sulfonatgruppe durch Thiolacetat aus. Die anschließende Hydrolyse der Acetylgruppe ergab „Thiolsubtilisin“, ein modifiziertes Enzym mit Cystein (anstelle von Serin-221) im aktiven Zentrum. Da Thiolsubtilisin einen Histidinrest in unmittelbarer Nähe zur neuen Cysteingruppe enthält, schien es möglich, daß das Enzym in ähnlicher Weise proteolytisch aktiv wie das natürlich vorkommende Thiolenzym Papain sein könnte. Man fand jedoch, daß Thiolsubtilisin nur eine sehr schlechte Endopeptidase ist, obwohl das Protein weiterhin durch aktivierte Ester oder Acylimidazole an der Thiolgruppe im aktiven Zentrum acyliert werden kann.

Im Anschluß an die Thiolsubtilisin-Arbeiten modifizierten wir Enzyme durch hochreaktive cyclische Ester und

untersuchten, wie sich die Einführung solcher potentiell nucleophilen Gruppen auf das aktive Zentrum des Enzyms auswirkt^[25-28]. So haben wir zum Beispiel in das Enzym Papain eine phenolische Hydroxygruppe eingeführt. Dazu wurde eine Thiolgruppe im aktiven Zentrum (Cys-25) durch das Sulton **1** modifiziert. Wir konnten zeigen, daß diese phenolische Hydroxygruppe als effektives intramolekulares Nucleophil wirken kann: Das Enzym wird durch Wiederherstellung des cyclischen Sulfonats desulfoniert (k_{-2} in Schema 1). Natürlich wird durch diese Reaktion noch kein neues katalytisch wirksames Nucleophil erzeugt, aber es wird deutlich, daß eine nucleophile Gruppe, die sich von der ursprünglich im Enzym vorhandenen unterscheidet, in das aktive Zentrum eingeführt werden kann und im Enzymtemplat wirkungsvoll arbeitet.



Schema 1.

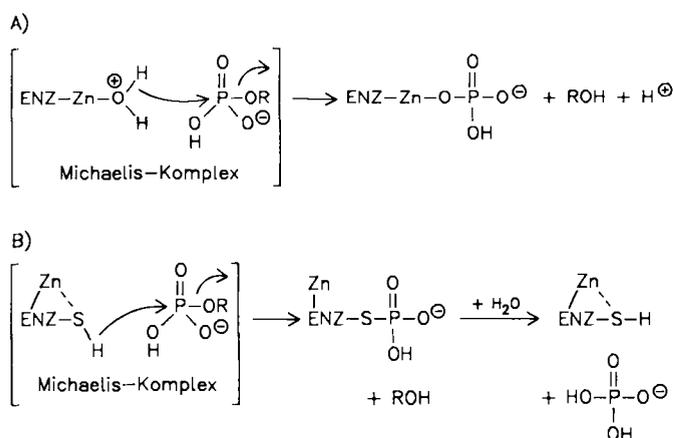
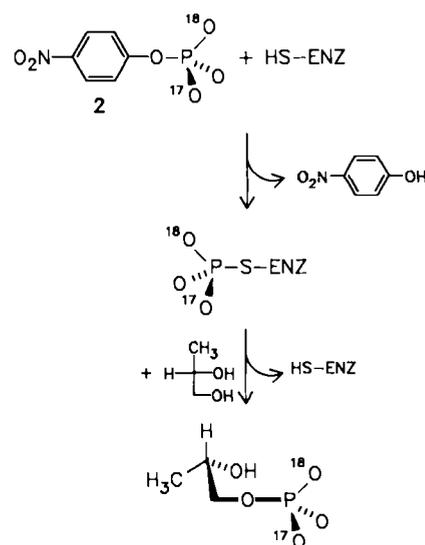
Bei einer Reihe von Enzymen, die an Acyltransferreaktionen beteiligt sind, hat man nucleophile Gruppen im aktiven Zentrum modifiziert^[4,29-31]. Im allgemeinen führen solche Änderungen zu Enzymen, die – außer gegenüber stärker aktivierten Substraten – nur schwach aktiv sind, wie es bereits bei Thiolsubtilisin beobachtet wurde. Der katalytische Verlauf der meisten Acyltransferreaktionen umfaßt Bildung und Zerfall tetraedrischer Zwischenstufen (außer vermutlich in Gegenwart sehr guter Abgangsgruppen) und verlangt eine Reihe schneller Protonenübertragungen. Der Austausch eines nucleophilen Rests im aktiven Zentrum eines proteolytischen Enzyms könnte einige der Protonentransferschritte verzögern und somit einen Engpaß im gesamten katalytischen Prozeß verursachen. Falls diese Hypothese zutrifft, lassen sich möglicherweise nur dann neue wirksame Nucleophile im aktiven Zentrum von Acyltransferenzymen erhalten, wenn zusätzlich die Umgebung des aktiven Zentrums verändert wird.

4.2. Ortsspezifische Mutagenese

Veränderungen an nucleophilen Gruppen im aktiven Zentrum sollten sich möglicherweise bei solchen Enzymen

weniger nachteilig auswirken, die Gruppentransferreaktionen katalysieren, bei denen kein Protonenaustausch für eine effektive Katalyse notwendig ist. Solche Überlegungen haben uns zu Untersuchungen an alkalischer Phosphatase aus *E. coli* veranlaßt^[12,31]. Wird ein Serinrest im aktiven Zentrum der alkalischen Phosphatase durch ortsspezifische Mutagenese in Cystein umgewandelt, so erhält man ein mutiertes Enzym mit hoher katalytischer Aktivität gegenüber Substraten wie 4-Nitrophenylphosphat und 2,4-Dinitrophenylphosphat. Während das Wildtyp-Enzym für viele Substrate eine von der Abgangsgruppe unabhängige Geschwindigkeitskonstante k_{cat} zeigt, wird bei der „thiolalkalischen Phosphatase“ eine bemerkenswerte Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstante von der Abgangsgruppe beobachtet. Außerdem haben Experimente mit Tris als abfängendem Nucleophil ergeben, daß beim Wildtyp-Enzym die Abfangreaktion im allgemeinen nicht von der Art der Abgangsgruppe am Phosphorsäuremonoester abhängt. Beim Thiolenzym dagegen zeigt die Abfangreaktion eine starke Abhängigkeit von der Art der Abgangsgruppe. Versuche, die Thiolgruppe im aktiven Zentrum der „thiolalkalischen Phosphatase“ mit Thiol-Reagentien wie 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure), DTNB, zu titrieren, waren erfolglos. Dafür gibt es zwei Erklärungen: Entweder wird DTNB aufgrund sterischer Probleme nicht an das aktive Zentrum gebunden, oder die Thiolgruppe bindet an das Zink-Ion im aktiven Zentrum des mutierten Enzyms. Erst nach dem Entfernen des Metall-Ions aus dem aktiven Zentrum durch Behandlung des Enzyms mit starker Säure ließ sich die Thiolgruppe titrieren. Wir haben versucht, mit der stopped-flow-Spektrophotometrie die Bildung eines Phosphorylenzyms bei der Umsetzung der „thiolalkalischen Phosphatase“ mit 2,4-Dinitrophenylphosphat als Substrat nachzuweisen, und zwar unter Bedingungen, unter denen das Wildtyp-Enzym schlagartig reagiert^[32]. Das mutierte Enzym zeigte keine solche Reaktion^[33]. Diese Ergebnisse lassen mehrere Interpretationen zu (Schema 2). Eine mög-

nicht geändert hat, sondern daß nur ein anderer Reaktionsschritt geschwindigkeitsbestimmend geworden ist – die Phosphorylierung des mutierten Enzyms (Schema 2B). Um zwischen diesen Möglichkeiten unterscheiden zu können, haben wir ein Experiment mit 4-Nitrophenylphosphat **2** durchgeführt, welches am Phosphor mit verschiedenen Sauerstoffisotopen markiert und deswegen chiral war. Falls die Reaktion über Zinkhydroxid oder Zink/Wasser abläuft (Schema 2A), würde man erwarten, daß nur ein einmaliger Austausch stattfindet. Bei Übertragung der Phosphorylgruppe auf einen geeigneten Acceptor sollte man somit stereochemische Inversion beobachten. Setzt sich die Thiolgruppe dagegen nach dem üblichen Reaktionsmechanismus um, d. h. nach Schema 2B über ein Phosphorylenzym, so sollte man Retention der Konfiguration beobachten aufgrund einer Inversion bei der Bildung und einer weiteren Inversion beim Zerfall des Phosphoryl-



Schema 2.

liche Erklärung wäre, daß eine Koordination der Thiolgruppe der „thiolalkalischen Phosphatase“ an das Zink-Ion im aktiven Zentrum das Enzym soweit verändert, daß es nach einem neuen Schema – einem Carboanhydrase-Mechanismus – arbeitet; dabei greifen an Zink gebundene Hydroxid-Ionen oder Wassermoleküle die Phosphorsäuremonoester-Substrate an (Schema 2A). Es erscheint aber auch möglich, daß sich der Reaktionsmechanismus

enzym^[34,35]. Wir haben die Umsetzung des Thiolenzyms unter Verwendung von (*S*)-Propan-1,2-diol als Phosphorylgruppenacceptor^[33] verfolgt, und es stellte sich heraus, daß die Reaktion unter Retention verlief. Die „thiolalkalische Phosphatase“ setzt sich mit Phosphorsäuremonoestern somit nach dem normalen Reaktionsschema (Schema 2B) um, jedoch unter Änderung des geschwindigkeitsbestimmenden Schritts. Unter den von uns angewendeten Bedingungen scheint beim Thiolenzym die Phosphorylierung geschwindigkeitsbestimmend zu sein. Beim Wildtyp-Enzym ist dagegen – in Abhängigkeit vom pH-Wert – die Dephosphorylierung oder die Abspaltung von anorganischem Phosphat der geschwindigkeitsbestimmende Schritt.

4.3. Halbsynthetische Enzyme durch kovalente Modifizierung aktiver Zentren mit Coenzymanaloga

Die Arbeiten an proteolytischen Enzymen haben gezeigt, daß der Austausch von Nucleophilen im aktiven Zentrum kein einfacher Weg zur Gewinnung hochaktiver mutierter Enzyme ist. Vor einigen Jahren haben wir uns

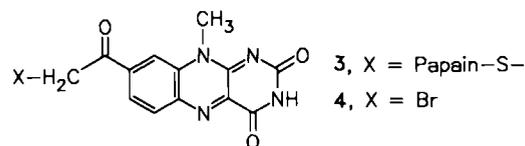
daher entschlossen, uns auf den Aufbau modifizierter Enzyme („halbsynthetischer Enzyme“) zu konzentrieren, bei denen für eine effektive Katalyse keine aufeinanderfolgenden schnellen Protonentransferschritte erforderlich sind^[1, 3, 13-22]. Dazu haben wir einen Aminosäurerest eines geeigneten Proteintemplats mit einem reaktiven Coenzym-analogon chemisch modifiziert. Bei sinnvollem Design sollte man annehmen, daß in den Hybridspezies die allgemeinen Bindungseigenschaften des Proteintemplats mit der katalytischen Aktivität des kovalent gebundenen Coenzym kombiniert sein könnten. Als besonders gute prosthetische Gruppen haben sich bei unseren Arbeiten Flavin-Cofaktoren erwiesen; es bleibt aber noch eine Vielzahl anderer Cofaktoren zu untersuchen. Die Isoalloxazin-Derivate haben folgende Vorteile: Sie sind einfach zu synthetisieren, sind gute Modellverbindungen für die biologischen Cofaktoren FAD und FMN und katalysieren in Lösung viele der von natürlich vorkommenden Flavoproteinen gesteuerten Reaktionen, allerdings langsamer und weniger selektiv. Bisher haben wir mit Isoalloxazinen drei Templats erfolgreich modifiziert: die Enzyme Papain, Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase und Hämoglobin, die alle als wirksame Flavin-abhängige Oxidoreduktasen arbeiten. Diese Systeme sollen nun nacheinander diskutiert werden.

4.3.1. Untersuchungen mit Flavopapain

Das hydrolytische Enzym Papain zählt zu den erfolgreichsten Ausgangsmolekülen für die Gewinnung halbsynthetischer Enzyme nach unserer Methode. Aus Röntgenstrukturuntersuchungen^[36, 37] und Untersuchungen in Lösung ist bekannt, daß sich in der Nähe des Aminosäurerests Cys-25 im aktiven Zentrum eine ausgedehnte, etwa 25 Å lange Furche erstreckt. Außerdem läßt sich Cys-25 sehr leicht durch Reagentien mit elektrophilen Zentren modifizieren, und diese Umsetzung kann durch viele Techniken, z. B. durch Titration der Thiolgruppen oder den Abfall der proteolytischen Aktivität, ohne Schwierigkeiten verfolgt werden. Anhand der Röntgenstrukturdaten erstellte Modelle lassen vermuten, daß bei Modifizierung der Cys-25-Thiolgruppe durch Flavin-Coenzymanaloga die ausgedehnte Bindungsfurche in der Nähe des Cysteinrests für potentielle, mit der Flavineinheit reagierende Substrate weiterhin zugänglich bleibt. Wir haben die Flavine besonders deshalb als Coenzymanaloga für unsere Modifizierungsexperimente gewählt, da diese Verbindungen auch in Abwesenheit eines Enzyms verschiedene Oxidations-Reduktions-Reaktionen recht wirksam katalysieren^[38]. Daher nahmen wir an, daß es ausreichen könnte, ein potentiell Substrat geometrisch günstig in die Nähe des Enzym-gebundenen Flavins zu bringen, um eine hohe Reaktionsgeschwindigkeit zu erzielen. Mit anderen Worten: Im Gegensatz zu den Hydrolysereaktionen, bei denen die Beschleunigung des Protonentransfers wahrscheinlich eine bestimmte Anordnung der funktionellen Gruppen des Enzyms voraussetzt, ist für die Flavinreaktionen am Enzym nur die Bindungstasche des Enzyms erforderlich, ohne daß eine spezifische Beteiligung Enzym-gebundener funktioneller Gruppen notwendig ist^[1, 13, 16-20, 36, 37]. Da unsere älteren Arbeiten über Flavoproteine schon recht ausführlich

referiert worden sind^[1, 39], wollen wir uns an dieser Stelle auf die Beschreibung neuerer Untersuchungen beschränken.

Das bisher wirksamste Flavopapain **3** wurde durch Alkylierung von Papain mit 8-Bromacetyl-10-methylisoalloxazin **4** erhalten. Das modifizierte Enzym reagiert schnell mit einer Vielzahl von hydrophoben *N*-Alkyl-1,4-dihydronicotinamiden. Für die Oxidation von *N*-Hexyl-1,4-dihydronicotinamid, des besten bisher untersuchten Substrats, wurde in Luft-gesättigtem Puffer bei pH 7.5 und 25°C ein k_{cat}/K_m -Wert in der Größenordnung von $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ gemessen^[20, 21]. Vergleicht man diesen Wert mit der Ge-



schwindigkeitskonstante zweiter Ordnung für die entsprechende Oxidationsreaktion, die durch die einfache Modellverbindung 8-Acetyl-10-methylisoalloxazin katalysiert wird, so zeigt sich, daß das enzymatische System die Reaktion um das 10^3 fache beschleunigt. Mit der „stopped-flow“-Technik haben wir unter anaeroben Bedingungen die einzelnen Schritte der katalytischen Oxidation von *N*-Alkyl-1,4-dihydronicotinamid mit Flavopapain **3** untersucht. Die so erhaltenen Ergebnisse sind mit Schema 3 vereinbar.



Schema 3. E_{ox} = oxidierte Form des Flavopapains **3**; EH_2 = reduzierte Form des Flavopapains **3**; $E_{ox} \cdot NRNH$ = Michaelis-Komplex; $NRNH$ = *N*-Alkyl-1,4-dihydronicotinamid; NRN = *N*-Alkylnicotinamid.

Bei drei Dihydronicotinamiden – *N*-Hexyl-, *N*-Benzyl- und *N*-Propyl-1,4-dihydronicotinamid – wurden sehr hohe Werte für die Geschwindigkeitskonstante k_2 gemessen, d. h. für die Umsetzung des Michaelis-Komplexes zu den reduzierten Dihydroflavopapain-Spezies ($370 \pm 70 \text{ s}^{-1}$, $29 \pm 5.5 \text{ s}^{-1}$ bzw. $31 \pm 11 \text{ s}^{-1}$). Für die *N*-Hexylverbindung lag k_2 mit $\approx 400 \text{ s}^{-1}$ so hoch, daß der Wert selbst mit einem sehr leistungsfähigen „stopped-flow“-Gerät nur abgeschätzt werden konnte.

Sauerstoff ist unter den angewendeten „turnover“-Bedingungen ein ziemlich schlechtes Oxidationsmittel für die Dihydroform des Flavopapains **3**, so daß die Oxidation des Dihydroflavopapains bei allen geprüften Substratkonzentrationen weitgehend geschwindigkeitsbestimmend ist^[21]. Um Bedingungen zu erreichen, bei denen nicht die Oxidation des Dihydroflavopapains, sondern der Reduktionsschritt geschwindigkeitsbestimmend ist, muß man einen Acceptor verwenden, der besser als molekularer Sauerstoff reagiert. Wir haben gefunden, daß 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,4-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) ein besonders effektiver Acceptor ist, um hohe Reaktionsgeschwindigkeiten mit dem Flavopapain **3** zu erzielen. Mit etwa 400 μM MTT haben wir für die Oxidation von *N*-Benzyl- und *N*-Propyl-1,4-dihydronicotinamid k_{cat} -Werte von

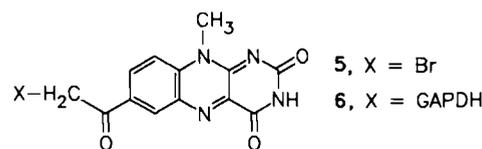
$31.5 \pm 1.0 \text{ s}^{-1}$ bzw. $62.5 \pm 9.5 \text{ s}^{-1}$ gemessen. Diese Werte stimmen recht gut mit den Geschwindigkeitskonstanten k_2 (Schema 3) überein, die mit diesen Substraten bei der Reduktion des Flavopapains **3** unter anaeroben Bedingungen erhalten wurden. Diese Arbeit demonstriert, daß sich mit dem aktiven Zentrum und dem Bindungszentrum des hydrolytischen Enzyms Papain ein Flavoenzym aufbauen läßt, das sowohl bezüglich des k_{cat}/K_m -Werts als auch bezüglich der Cyclenzahl eine hohe katalytische Wirksamkeit aufweist. Das natürlich vorkommende Coenzym NADH ist ein relativ schlechtes Substrat für das Flavopapain **3**. Dieser Befund ist über die Struktur von Papain zu verstehen, dessen Bindungsregion recht hydrophob ist und daher besser mit *N*-Alkyl-1,4-dihydropyridinoniden wechselwirkt als mit NADH.

Wie wir ebenfalls gezeigt haben, können über Flavopapaine auch Thiole zu Disulfiden oxidiert werden^[22,40]. Das Flavopapain **3** hat sich auch für diese Reaktionen als effektiver Katalysator erwiesen. Unter anaeroben Bedingungen wird für die Reduktion des Flavopapains durch D,L-Dihydroliponamid und D,L-Dihydroliponsäure ein k_2/K_s -Wert (vgl. dazu Schema 3) von 4400 bzw. 3400 $\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ gemessen. Diese Geschwindigkeitsparameter sind 126- bzw. 200mal größer als die Geschwindigkeitskonstanten zweiter Ordnung für die entsprechenden Reaktionen von D,L-Dihydroliponamid und D,L-Dihydroliponsäure mit der Modellverbindung 8-Acetyl-10-methylisoalloxazin. Mit dem Farbstoff MTT als Elektronenacceptor haben wir für die Oxidation von Dihydroliponamid durch das Flavopapain **3** k_{cat} - und K_m -Werte bestimmt, die annähernd mit den unter anaeroben Bedingungen gemessenen k_2 - und K_s -Werten übereinstimmen. Damit wird deutlich, daß für den katalytischen Cyclus die Substratoxidation und nicht die Oxidation des Dihydroflavins geschwindigkeitsbestimmend ist^[22].

4.3.2. Untersuchungen mit Flavo-Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (Flavo-GAPDH)

In letzter Zeit haben wir intensiv an einem neuen Enzymtemplat, GAPDH, gearbeitet. Dieses tetramere Enzym ist leicht zugänglich und in seiner Primär- und Tertiärstruktur aufgeklärt^[41]. Das aktive Zentrum enthält eine Bindungsstelle für NAD^+/NADH in der Nähe des Aminosäurerests Cys-149 und des katalytischen Bereichs, in dem Glycerinaldehyd-3-phosphat gebunden wird. Die für die Katalyse notwendige Thiolgruppe kann – auch durch sterisch anspruchsvolle Gruppen – alkyliert werden, ohne daß die Nicotinamid-Bindung verhindert wird^[42,43]. Computergraphische Studien (Evans and Sutherland PS-300) anhand der Röntgenstrukturdaten des thermophilen Enzyms aus *Bacillus stearothermophilus*^[44] legten die Vermutung nahe, daß GAPDH ein gutes Templat für das Design Flavin-abhängiger Oxidoreduktasen sein könnte, die selektiv mit NADH und nicht mit den hydrophoben *N*-Alkyl-1,4-dihydropyridinoniden reagieren, welche bevorzugt durch das Flavopapain **3** oxidiert werden. Zunächst haben wir GAPDH aus Kaninchenmuskelgewebe verwendet^[13]; die meisten unserer neueren Arbeiten sind jedoch mit dem

thermophilen Enzym aus *Bacillus stearothermophilus*^[14] durchgeführt worden, da dieses viel stabiler als das Muskelprotein ist. Bei der Modifizierung von apo-GAPDH aus den beiden Spezies mit 7-Bromacetyl-10-methylisoalloxazin **5** wurde pro Untereinheit dieser tetrameren Enzyme jeweils nur ein Flavinmolekül inkorporiert.



HPLC- und Gelfiltrationsuntersuchungen zeigen, daß zunächst tetrameres Flavo-GAPDH **6** gebildet wird. In einem offensichtlich irreversiblen Prozeß dissoziiert das bakterielle halbsynthetische Enzym jedoch langsam zu den Dimeren (in etwa einem Tag bei 4°C). Beim thermophilen Enzym haben wir grundsätzlich das Dimer untersucht. Das Flavoenzym aus Kaninchenmuskelprotein ist weit weniger stabil und verliert in etwa 12 h 40–60% seiner Aktivität^[13], so daß wir in diesem Fall nur das Tetramer untersucht haben. Bei Reaktivitätsstudien mit verschiedenen Dihydropyridinoniden erwies sich NADH, wie erwartet, für beide Proteine als bestes Substrat. Das tetramere Enzym aus Kaninchenmuskel reagiert nach einer normalen Michaelis-Menten-Kinetik, während für das bakterielle Dimer eine ausgeprägte negative Kooperativität beobachtet wird. Derzeit können wir triviale Erklärungen für diese vermeintliche Kooperativität (z. B. eine Anzahl heterogener aktiver Zentren) nicht eindeutig ausschließen. Da jedoch Reaktivität an der Hälfte der Zentren („half-of-the-sites reactivity“) für GAPDH selbst eindeutig nachgewiesen ist, ist eine kooperative Katalyse für das bakterielle Flavoenzym **6** durchaus vorstellbar.

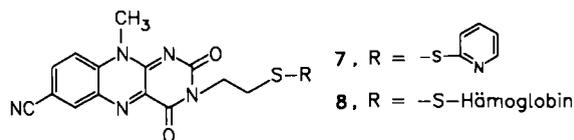
Für die Oxidation von NADH mit 7-Acetyl-10-methylisoalloxazin beträgt die Geschwindigkeitskonstante k_2 in Luft-gesättigtem Puffer bei 25°C nur $12.9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Unter denselben Bedingungen wird die Reaktionsgeschwindigkeit des Enzyms aus Kaninchenmuskel auf das 83fache (bestimmt über die Geschwindigkeitskonstante k_{cat}/K_m) und die des bakteriellen Flavoproteins beinahe auf das 6000fache erhöht (unter Bedingungen, bei denen die negative Kooperativität minimal ist)^[14]. Verständlicherweise liegen die k_{cat}/K_m -Werte für Flavo-GAPDH **6** bei niedrigen Substratkonzentrationen in der gleichen Größenordnung wie die k_{cat}/K_m -Werte von natürlich vorkommenden, NADH-oxidierenden Flavoenzymen. Unseren Beobachtungen für das Flavopapain **3** entsprechend ist die Cyclenzahl von Flavo-GAPDH **6** unter aeroben Bedingungen durch die Reoxidationsgeschwindigkeit des im katalytischen Cyclus erzeugten Dihydroflavins begrenzt. Aus diesem Grund hängt der gemessene k_{cat}/K_m -Wert eindeutig von der Sauerstoffkonzentration ab und gibt somit nicht die eigentliche Wirksamkeit des Hydridübertragungsschritts wieder. Um die Geschwindigkeit für die Reduktion des Flavins im Enzym-Substrat-Komplex zu bestimmen, haben wir deshalb Techniken zur schnellen Mischung unter anaeroben Bedingungen angewendet. Während sich Flavo-GAPDH **6** aus Kaninchenmuskel als zu instabil für die „stopped-flow“-Experimente erwies, konnte mit dieser

Methode die Entfärbung des Enzym-gebundenen Flavin-Cofaktors in bakteriellem **6** ohne Schwierigkeiten beobachtet werden. In Gegenwart von NADH im Überschuß folgt diese Reduktion einer Zweiphasenkinetik. Etwa die Hälfte der Isoalloxazin-Moleküle wird sehr schnell reduziert, während sich der Rest nur langsam umsetzt. Dieses Verhalten ist typisch für negativ kooperative Enzyme mit Aktivität an der Hälfte der Zentren^[45]. Die Geschwindigkeitsdaten für den schnellen Reduktionsschritt des bakteriellen Flavoenzyms **6** entsprechen einer Sättigungskinetik. Durch kinetische Messungen des schnellen Reduktionsschritts wurde für die Reduktion der schnell reagierenden Untereinheit, die aus dem entsprechenden Michaelis-Komplex entsteht, eine Geschwindigkeitskonstante $k_1 = 1.14 \text{ s}^{-1}$ und eine Dissoziationskonstante für den Michaelis-Komplex von $12.4 \mu\text{M}$ erhalten. So beträgt die scheinbare Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung für die Reduktion der schnell reagierenden Untereinheit des Enzyms $91900 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Dieser Wert liegt nur wenig höher als der Wert von k_{cat}/K_m ($75600 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), der mit NADH für dieses Enzym im stationären Zustand bestimmt wurde, und ist etwa ebenso groß wie k_{cat}/K_m von natürlich vorkommenden NADH-oxidierenden Enzymen. Falls ein geeigneter Elektronenacceptor gefunden werden könnte, der die Dihydroflavo-GAPDH sehr viel schneller reoxidiert als Sauerstoff, so könnte die Cyclenzahl für das bakterielle Flavoenzym an 1 s^{-1} heranreichen – einen Wert, der mit dem einiger natürlicher Systeme vergleichbar ist. Die bisher erhaltenen Befunde machen hinreichend deutlich, daß GAPDH ein exzellentes Templat für den Aufbau künstlicher Enzyme ist.

4.3.3. Untersuchungen mit Flavohämoglobin

Kürzlich haben wir Flavohämoglobin entwickelt, ein neuartiges halbsynthetisches Enzym, bei dem die Hämgruppe im Protein erhalten bleibt, aber durch kovalente Modifizierung ein Flavinmolekül eingefügt wird^[15]. Typisch für Hämproteine wie Cytochrom P-450, die Redoxreaktionen katalysieren, sind Ein-Elektronen-Übertragungsschritte^[46]. Wenn solche Enzyme sich mit einem der üblichen biologischen Elektronendonoren wie NADPH umsetzen, der über Zwei-Elektronen-Übergänge arbeitet, ist ein Elektronentransportsystem erforderlich. In einem für P-450 typischen Elektronentransportsystem aus NADPH, O_2 und NADPH-Cytochrom-P-450-Reduktase – einem der wichtigsten Flavoproteine des mikrosomalen Elektronentransportsystems^[47] – katalysiert Hämoglobin eine Vielzahl von Monooxygenasereaktionen^[48-52]. Wir stellten uns die Frage, ob Hämoglobin so modifiziert werden kann, daß es direkt, d. h. ohne Mitwirkung eines vollständigen Elektronentransportsystems, mit Zwei-Elektronen-Donoren reagiert. Zu diesem Zweck haben wir Hämoglobin in der Nähe des Häms mit einem kovalent gebundenen Isoalloxazinrest versehen. Wir hofften, daß die Flavineinheit den Elektronentransfer vermitteln würde und die P-450-Reduktase überflüssig wäre (EC 1.6.2.4). Es stellte sich heraus, daß die Flavohämoglobin-Spezies tatsächlich in Abwesenheit des Reduktaseproteins als Hydroxylase für Anilin verwendet werden konnte^[15]. Zur chemischen Mo-

difizierung diente ein Derivat des 7-Cyanisoalloxazins **7**, dessen reaktive Disulfidgruppe über eine Kette an N-3 des Isoalloxazins gebunden ist. Diese Disulfidgruppe setzt sich mit der Thiolgruppe des Cysteinrests β -93 im Kohlenmonoxid-Hämoglobin ($\text{COHb}^{2\oplus}$) um. Durch Oxidation mit Kaliumhexacyanoferrat wurde die so erhaltene kovalent modifizierte Spezies $\text{Fl-COHb}^{2\oplus}$ anschließend in das Eisen(III)-flavohämoglobin $\text{Fl-Hb}^{3\oplus}$ **8** übergeführt.



Kinetische Messungen für die Anilin-Hydroxylase-Aktivität von $\text{Fl-Hb}^{3\oplus}$ bei pH 7.5 ergaben, daß die K_m -Werte für Anilin mit den Werten übereinstimmen, die für Eisen(III)-Hämoglobin $\text{Hb}^{3\oplus}$ in Anwesenheit und Abwesenheit von NADPH-Cytochrom-P-450-Reduktase gefunden wurden. Der k_{cat} -Wert für $\text{Hb}^{3\oplus}$ erhöhte sich bei Rekonstitution des Systems mit P-450-Reduktase erheblich, war jedoch selbst im rekonstituierten System kleiner als k_{cat} für $\text{Fl-Hb}^{3\oplus}$ ohne Reduktase^[48-52]. Dieses Ergebnis macht deutlich, daß der kovalent an Hämoglobin gebundene Flavinrest in $\text{Fl-Hb}^{3\oplus}$ die Reduktase ersetzen kann, wobei der Elektronenaustausch zwischen den benachbarten prosthetischen Gruppen im $\text{Fl-Hb}^{3\oplus}$ sogar wirkungsvoller abläuft als im $\text{Hb}^{3\oplus}$ -Reduktase-System.

Da ein ungebundenes Flavinmolekül die *p*-Hydroxylierung von Anilin in Abwesenheit von Hämoglobin nicht katalysieren kann, muß die Hämgruppe direkt an der Reaktion des Flavohämoglobins mit Anilin beteiligt sein. Die Bevorzugung der *p*-Hydroxylierung vor der *o*-Hydroxylierung ($p/o > 4/1$) läßt auch vermuten, daß die aktive Sauerstoff-Spezies an Häm gebunden ist und somit nicht frei diffundieren kann wie bei der Anilin-Hydroxylierung mit Fentons Reagens, bei der *o*-Aminophenol als Hauptprodukt entsteht. Es könnte also sein, daß Flavohämoglobin analog zum Cytochrom-P-450-System arbeitet (mikrosomale „mixed-function“-Oxidase). Über den genauen Mechanismus der Sauerstoff-Aktivierung durch Flavohämoglobin bestehen jedoch noch Unklarheiten, mit denen wir uns gegenwärtig befassen.

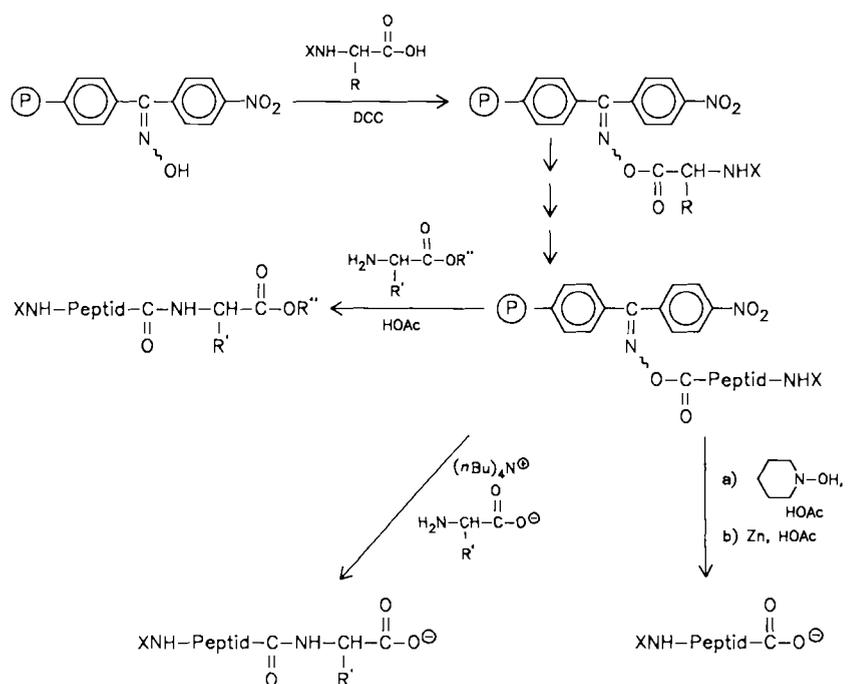
5. Anwendung von Enzymen mit modifiziertem aktivem Zentrum für Synthesen

Vor kurzem haben wir mit Untersuchungen zur Anwendung halbsynthetischer Enzyme in der Synthese begonnen^[53]. Wie im folgenden kurz beschrieben wird, haben wir uns mit der Totalsynthese kleiner Proteine wie Ribonuclease T₁ und ihrer Strukturanaloga beschäftigt. Prinzipiell könnte dieses Enzym auch durch Gentechnologie hergestellt werden, und zwar entweder mit dem natürlich vorkommenden Gen oder mit einem synthetischen Gen^[54], und die Strukturanaloga könnte man durch ortsspezifische Mutagenese am natürlichen Gen oder durch Veränderun-

gen bei der Synthese des Gens aufbauen. Wir haben uns jedoch entschlossen, das Enzym durch Synthese von Peptidsegmenten und deren Kondensation herzustellen^[55]. Diesen Weg haben wir aus mehreren Gründen den genetischen Methoden vorgezogen. Zunächst vermeiden wir auf diese Weise das Problem der Expression. Es ist bereits bekannt, daß bei einigen Mutanten von Ribonuclease T₁ die Expression sehr gering ist, da die Mutanten die Bakterien schädigen, in denen sie produziert werden^[54]. Ein weiterer Vorteil der chemischen Synthese besteht darin, daß markierte oder unnatürliche Aminosäuren gezielt in spezifische Positionen eingeführt werden können. Die Möglichkeit der Markierung ist besonders im Hinblick auf die Verwendung für Fluoreszenz- und NMR-Untersuchungen von großem Vorteil. Weiterhin können wir bei der Synthese nicht nur unnatürliche Aminosäuren an verschiedene Stellen des Proteins bringen, sondern es ist auch möglich, nicht-peptidische Bindungen einzufügen. Dies könnte bedeuten, daß wir modifizierte Proteine produzieren könnten, die nicht-peptidische Segmente enthalten. Diese Regionen könnten den normalen Abbau durch Proteolyse im biologischen Milieu verhindern. Bei Arbeiten über Modellverbindungen des Peptid-Hormons β -Endorphin^[56] ist uns eine derartige Substitution bereits gelungen. Dort wurde der Abschnitt zwischen den Resten 6–13, der als hydrophiler Linker fungieren dürfte, durch eine sich wiederholende Einheit von vier γ -Hydroxymethyl- γ -aminobuttersäureresten ersetzt, die über Amidbindungen miteinander verknüpft sind. Dieser neugestaltete Bereich enthält zwar Amidbindungen, doch sind es nicht die üblichen Peptidbindungen. Dennoch zeigt diese β -Endorphin-Modellverbindung hohe analgetische Wirkung.

Das erste Problem, das wir bei der Synthese kleiner Proteine zu lösen hatten, war der Aufbau von Peptidsegmenten mit intakten Schutzgruppen, um die Segmente nach Reinigung ohne Schwierigkeiten miteinander verknüpfen

zu können. Die Peptidsegmente haben wir an einem von uns entwickelten Oximpolymer synthetisiert^[57–59]. Dieses Verfahren ist in Schema 4 wiedergegeben und soll kurz erläutert werden. Das Polymer wird durch Umsetzung eines Polystyrol-1%-Divinylbenzol-Copolymers mit *p*-Nitrobenzoylchlorid erzeugt. Dabei entsteht ein Keton, das mit Hydroxylamin zum Oxim reagiert. Anschließend wird die erste Aminosäure mit Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) als Kupplungsreagens an das Harz gebunden, wobei Schutzgruppen wie Boc für die α -Aminofunktion und für mögliche reaktive Seitenketten verwendet werden. Nachdem die erste Aminosäure gebunden ist, wird durch sukzessive Freisetzungs- und Kupplungsreaktionen ein geschütztes Peptidderivat erzeugt, welches als Oximester an das Polymer gebunden ist. Die Bindung als Oximester ist weniger stabil als beispielsweise die Bindung als Benzylester bei der schrittweisen Merrifield-Synthese. Peptide mit wesentlich mehr als zehn Aminosäureresten werden normalerweise nicht am Oxim-Harz aufgebaut, da Verluste durch Ablösung vom Harz mit wachsender Kettenlänge des Peptids zunehmen. Ein großer Vorteil des Oxim-Polymers besteht darin, daß die wachsende Peptidkette durch eine Vielzahl von Methoden freigesetzt werden kann. Das resultierende geschützte Peptidsegment enthält entweder eine freie C-terminale Carboxygruppe oder eine C-terminale Esterfunktion. Wir wollen an dieser Stelle keine ausführliche Übersicht über Freisetzungsmethoden geben, sondern nur darauf hinweisen, daß die Peptidkette durch Einwirkung von *N*-Hydroxypiperidin, einem α -Nucleophil, abgespalten werden kann; dabei bildet sich der geschützte Peptidester von *N*-Hydroxypiperidin. Dieser Ester kann durch Zink/Eisessig in die freie Carbonsäure übergeführt werden – ein Verfahren, das allgemein anwendbar ist, außer bei Peptiden mit Schwefelfunktionen wie Methionin. Alternativ kann das geschützte Peptid mit dem Tetrabutylammoniumsalz einer Aminosäure^[60] oder mit einem Aminosäure-

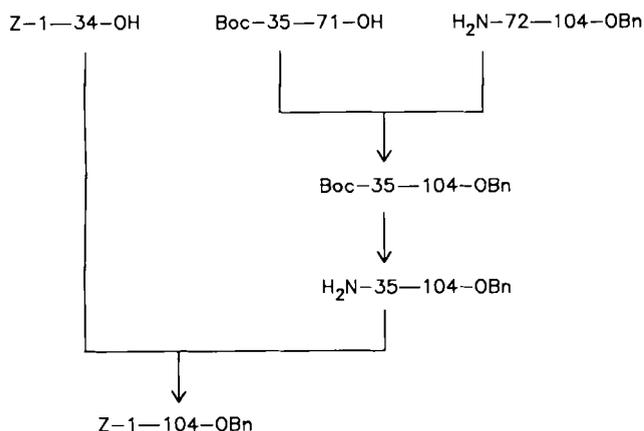


Schema 4. Die drei senkrechten Pfeile symbolisieren sukzessive Schutzgruppenabspaltungen und Kupplungen. X = Schutzgruppe.

ester mit freier Aminogruppe aus dem Harz freigesetzt werden. Als Katalysator werden dem Reaktionsgemisch einige Äquivalente Essigsäure zugesetzt. Bei diesem Verfahren wird das Peptid am C-Terminus um die zur Freisetzung verwendete Aminosäure oder den verwendeten Aminosäureester verlängert.

Bei unserer Strategie zur Synthese der Ribonuclease T_1 ^[55] teilten wir das Molekül in drei Hauptsegmente, die zum einen nach ihrer präparativen Zugänglichkeit und zum anderen nach strukturellen Gesichtspunkten ausgewählt wurden. So weiß man beispielsweise aus der Röntgenstrukturanalyse des Enzyms, daß das Segment mit den Aminosäureresten 1–34 einen helicalen Bereich enthält, der sich über die Reste 12–29 erstreckt und amphiphilen Charakter aufweist^[61]. Eines unserer derzeitigen Ziele ist die Synthese einer Ersatzhelix, die den amphiphilen Charakter des natürlichen Systems beibehält, aber aus anderen Aminosäuren aufgebaut ist. Dadurch wollen wir nachweisen, ob sich das Enzym, das diese umgestaltete Helix enthält, weiterhin richtig faltet und als Katalysator wirkt.

Die drei Hauptsegmente der Ribonuclease T_1 haben wir aus Peptidsegmenten aufgebaut, die am Oxim-Polymer hergestellt, sodann gereinigt und durch die üblichen Methoden wie NMR-Spektroskopie, Massenspektrometrie oder Aminosäureanalyse vollständig charakterisiert wurden. Für den Aufbau der Hauptsegmente wurden diese kleineren Segmente am polymeren Träger nacheinander gekuppelt, beispielsweise unter Verwendung von Dicyclohexylcarbodiimid und *N*-Hydroxybenzotriazol, das die Racemisierung verhindert. Wir haben so weit wie möglich versucht, Segmentkupplungen zu vermeiden, bei denen die Racemisierung zu einem größeren Problem werden könnte, doch ließ sich die Möglichkeit der Racemisierung bei unserem Vorgehen nicht vollständig ausschließen. Nach der Kupplung wurden die erhaltenen Hauptsegmente aus dem Harz freigesetzt und gründlich gereinigt. Die endgültige Kupplung der drei Hauptsegmente wurde in Lösung durchgeführt (Schema 5).



Schema 5. Synthese von Ribonuclease T_1 .

Obwohl kleine Proteine wie Ribonuclease T_1 über die Synthese von Segmenten und deren anschließende Kuppelung hergestellt werden können, schneidet diese Methode beim Vergleich mit der Totalsynthese von DNA-Molekü-

len schlecht ab. Zwar sind die geschützten Peptidsegmente mit der Oximester-Methode recht einfach zu synthetisieren, doch bestehen bei der Kondensation der Segmente noch erhebliche Schwierigkeiten. Die Ausbeuten sind nicht immer zufriedenstellend, die Möglichkeit der Racemisierung muß bedacht werden, und manchmal können bei den geschützten Peptiden auch Löslichkeitsprobleme auftreten. Ein entscheidender Unterschied zwischen der Synthese kleiner Proteine nach der hier beschriebenen Methode und der Synthese von Genen nach der DNA-Methode besteht darin, daß die DNA-Segmente mit Ligasen verknüpft werden können. Es ist zwar in vielen Fällen gelungen, auch Peptide durch enzymatische Katalyse zu koppeln^[62–69], normalerweise mit Endopeptidasen und Exopeptidasen, doch setzen diese Reaktionen Bedingungen voraus, bei denen das Gleichgewicht zwischen Peptidsynthese und Peptidhydrolyse auf seiten der Synthese liegt. In einigen Fällen wird das Gleichgewicht durch die geringe Löslichkeit zu den Kupplungsprodukten verschoben, in anderen Fällen kann die Peptidsynthese durch gut gewählte Bedingungen wie Lösungsmittelzusammensetzung und pH-Wert bevorzugt werden. Die Schwierigkeit bei der Verwendung proteolytischer Enzyme besteht jedoch darin, daß die Bedingungen für jeden einzelnen Kupplungsprozeß optimiert werden müssen. Mit anderen Worten: Die Peptidsynthese über Enzyme erfordert für jede einzelne Reaktion die Suche nach spezifischen Reaktionsbedingungen. Es wäre somit ideal, Peptid-Ligasen zu finden, mit denen Peptidsegmente unter allgemeingültigen Bedingungen gekuppelt werden könnten. An diesem Punkt stellt sich die Frage, ob es realistisch ist, nach solchen Ligasen zu suchen oder sie zu entwickeln. Die Ergebnisse unserer Arbeit mit dem halbsynthetischen Enzym Thiolsubtilisin legen nahe, daß wir einen Ansatz zur Lösung dieses Problems gefunden haben. Wie in Abschnitt 4.1 erwähnt wurde, fanden *Bender et al.*^[23] und *Koshland et al.*^[24], daß Thiolsubtilisin nur eine geringe Endopeptidase-Aktivität aufweist, während die nucleophile SH-Gruppe im aktiven Zentrum des Enzyms weiterhin mit Acylgruppen aktivierter Derivate wie aktiver Ester oder Acylimidazole reagiert. Wir haben nun erkannt, daß gerade diese Eigenschaften günstig für die Verwendung eines Enzyms als Peptid-Ligase sind. Genauer gesagt, Thiolsubtilisin kann an der Thiolgruppe im aktiven Zentrum durch ein N-geschütztes Peptidsegment acyliert werden, das am C-Terminus durch eine *p*-Chlorphenyl-Estergruppe aktiviert ist. Als Thiolester reagiert das so erzeugte Acylderivat bereitwillig mit geeigneten Aminkomponenten unter Aminolyse. Auf diese Weise könnte Thiolsubtilisin die Bildung der Amidbindung zwischen dem aktivierten Ester eines N-geschützten Peptids und der freien N-terminalen Aminogruppe einer anderen Peptidkette katalysieren. Die treibende Kraft für die Knüpfung der Peptidbindung ist die Reaktion eines aktivierten Esters mit einer Aminkomponente; die Rückreaktion, die Hydrolyse des Peptids, ist wegen der schlechten Endopeptidase-Eigenschaften des Thiolsubtilisins nicht zu befürchten. Diese Methode der Enzymkatalyse haben wir bei zahlreichen Peptidsynthesen angewendet. Zwei Beispiele sind die Synthese von (Leu)⁵-Enkephalinamid (Schema 6A) sowie die Herstellung des Ribonuclease- T_1 -Segments 12–23 (Schema 6B).

- A) Z-Tyr-Gly₂-Phe-OR + Leu-NH₂ →
 Z-Tyr-Gly₂-Phe-Leu-NH₂ + HOR
 67% Ausbeute an reinem Produkt
- B) Fmoc-Ser₃-Asp-Val-Ser-Thr-Ala-OR + Gln-Ala₂-Gly →
 Fmoc-Ser₃-Asp-Val-Ser-Thr-Ala-Gln-Ala₂-Gly + HOR
 47% Ausbeute an reinem Produkt
 R = C₆H₄Cl-p

Schema 6. A) Synthese von (Leu)⁵-Enkephalinamid; Bedingungen: pH 8,0, 0,1 M Phosphatpuffer/DMF (50/50, v/v), Raumtemperatur, 5 h. B) Synthese des Ribonuclease-T₁-Segments 12-23; Bedingungen: pH 7,0, 0,01 M Phosphatpuffer/DMF (50/50, v/v), Raumtemperatur, 30 min. Als Katalysator für A und B dient Thiolsubtilisin.

Natürlich lassen sich mit Thiolsubtilisin nur solche Peptidsegmente kuppeln, deren spezifischen Eigenschaften der Bindungstasche des Enzyms entsprechen. Um den Anwendungsbereich der Enzym-katalysierten Peptidbildung auszudehnen, wird es notwendig sein, weitere Enzyme mit anderen spezifischen Eigenschaften auf ähnliche Weise zu verwenden. Auch wenn die Cystein-Mutanten anderer Serin-Proteasen als geeignete Zielmoleküle für zukünftige Arbeiten über Peptid-Ligasen erscheinen, sollte man dennoch bedenken, daß andere Mutanten gefunden werden könnten, die ebenfalls nur die Bildung der Peptidbindung mit aktiven Estern katalysieren und nicht mit Peptiden reagieren. Außerdem erscheint es aussichtsreich, nach Reaktionsbedingungen zu suchen, unter denen sich unveränderte Endopeptidasen mit Peptidestern umsetzen und die Rückreaktion durch Hydrolyse nur sehr langsam abläuft.

6. Ausblick

Wie wir zu Beginn dieses Beitrags gesehen haben, schießen die Eigenschaften des ersten halbsynthetischen Enzyms, des Thiolsubtilisins, kein günstiges Vorzeichen für weitere Entwicklungen auf diesem Gebiet zu sein. Die geringe Aktivität dieses mutierten Enzyms könnte jedoch widerspiegeln, wie wichtig es ist, in mehreren Stufen des katalytischen Prozesses einen schnellen Protonenaustausch zu erzielen, nämlich in den Stufen, die durch die Aciditätsunterschiede zwischen dem ursprünglichen Nucleophil (der OH-Gruppe im natürlichen Enzym) und dem veränderten Nucleophil (der SH-Gruppe im mutierten Protein) beeinflusst werden könnten. Durch die Bindung von Flavinanaloga an geeignete Positionen mehrerer Proteine konnten wir zeigen, daß sich hochwirksame, halbsynthetische Enzyme darstellen lassen, die Oxidations-Reduktions-Reaktionen oder Hydroxylierungen katalysieren. Bei diesen Reaktionen ist eine exakte Anordnung der Enzymgebundenen funktionellen Gruppen, die an Protonentransferreaktionen beteiligt sind, wahrscheinlich nicht erforderlich. Vielmehr dürfte die Wirksamkeit dieser halbsynthetischen Enzyme darauf zurückzuführen sein, daß sie Substrate in unmittelbarer Nähe der reaktiven Coenzymfunktion binden können. Für weitere Untersuchungen ist es wichtig, die Bandbreite der verwendeten Coenzym-Spezies zu erweitern. Außerdem ist die katalytische Vielseitigkeit halbsynthetischer Enzyme wie Flavohämoglobin noch nicht vollständig untersucht – eine wichtige Aufgabe, mit

der wir uns zur Zeit befassen. Um die Flexibilität der chemischen Modifizierung zu erhöhen, erwägen wir eine Kombination mit der ortsspezifischen Mutagenese. Insbesondere beginnen wir mit Forschungsarbeiten, bei denen durch ortsspezifische Mutagenese geeignete „Henkel“ in Positionen des Proteins gebracht werden, deren chemische Modifizierung durch Coenzymanaloga aussichtsreich zur Herstellung von Spezies mit gewünschten Bindungseigenschaften für Substrate erscheint. Die Methode zum Aufbau halbsynthetischer Enzyme wird noch bei weitem leistungsfähiger, wenn wir für die chemische Modifizierung nicht mehr nur auf geeignete Bindungsstellen in natürlich vorkommenden Proteinen angewiesen sind, sondern wenn wir solche Bindungsstellen vorher durch gentechnologische Methoden einführen können. Zum Schluß sei noch erwähnt, daß durch Erzeugung katalytisch wirksamer Antikörper^[70-72] sehr interessante Effekte erzielt worden sind und daß ein vielversprechender Weg zur Weiterführung des „halbsynthetischen Konzepts“ darin besteht, es auch auf die Modifizierung von Antikörpern anzuwenden.

Meinen Mitarbeitern, deren Namen in den Literaturzitationen aufgeführt sind, danke ich sehr für ihre experimentellen und konzeptionellen Beiträge. Diese Arbeit wurde zum Teil durch die National Science Foundation (CHE-8418878) finanziert.

Eingegangen am 21. Dezember 1987 [A 677]
 Übersetzt von Dr. Sabine Töteberg-Kaulen, Bergisch Gladbach

- [1] E. T. Kaiser, D. S. Lawrence, *Science (Washington, D.C.)* 226 (1984) 505.
- [2] E. T. Kaiser, *Ann. N. Y. Acad. Sci. (Enzyme Eng. 8)* 501 (1987) 14.
- [3] D. Hilvert, E. T. Kaiser, *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 5 (1987) 297.
- [4] E. T. Kaiser, *Nature (London)* 313 (1985) 630.
- [5] E. T. Kaiser, F. J. Kezdy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 (1983) 1137.
- [6] E. T. Kaiser, F. J. Kezdy, *Science (Washington, D.C.)* 223 (1964) 249.
- [7] E. T. Kaiser, *Trends Biochem. Sci. (Pers. Ed.)* 12 (1987) 305.
- [8] G. R. Moe, R. J. Miller, E. T. Kaiser, *J. Am. Chem. Soc.* 105 (1983) 4100.
- [9] G. R. Moe, E. T. Kaiser, *Biochemistry* 24 (1985) 1971.
- [10] F. R. Green III, B. Lynch, E. T. Kaiser, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110 (1988) 682.
- [11] J. W. Taylor, E. T. Kaiser, *Pharmacol. Rev.* 38 (1986) 291.
- [12] S. S. Ghosh, S. C. Bock, S. E. Rokita, E. T. Kaiser, *Science (Washington, D.C.)* 231 (1986) 145.
- [13] D. Hilvert, E. T. Kaiser, *J. Am. Chem. Soc.* 107 (1985) 5805.
- [14] D. Hilvert, Y. Hatanaka, E. T. Kaiser, *J. Am. Chem. Soc.*, im Druck.
- [15] T. Kokubo, S. Sassa, E. T. Kaiser, *J. Am. Chem. Soc.* 109 (1987) 606.
- [16] H. L. Levine, Y. Nakagawa, E. T. Kaiser, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 76 (1977) 64.
- [17] H. L. Levine, E. T. Kaiser, *J. Am. Chem. Soc.* 100 (1978) 7670.
- [18] E. T. Kaiser, H. L. Levine, T. Otsuki, H. E. Fried, R. M. Dupeyre, *Adv. Chem. Ser.* 191 (1980) 35.
- [19] J. T. Slama, S. R. Oruganti, E. T. Kaiser, *J. Am. Chem. Soc.* 103 (1981) 182.
- [20] J. T. Slama, C. Radziejewski, S. R. Oruganti, E. T. Kaiser, *J. Am. Chem. Soc.* 106 (1984) 6778.
- [21] C. Radziejewski, D. P. Ballou, E. T. Kaiser, *J. Am. Chem. Soc.* 107 (1985) 3352.
- [22] K. D. Stewart, C. Radziejewski, E. T. Kaiser, *J. Am. Chem. Soc.* 108 (1986) 3480.
- [23] L. Polgar, M. L. Bender, *J. Am. Chem. Soc.* 88 (1966) 3153.
- [24] K. E. Neet, D. E. Koshland, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 56 (1966) 1606.
- [25] E. T. Kaiser, *Acc. Chem. Res.* 3 (1970) 145.
- [26] J. H. Heidema, E. T. Kaiser, *J. Am. Chem. Soc.* 92 (1970) 6050.
- [27] P. Campbell, E. T. Kaiser, *Bioorg. Chem.* 1 (1971) 432.
- [28] P. Campbell, E. T. Kaiser, *J. Am. Chem. Soc.* 95 (1973) 3735. Im letzten Schritt von Schema 1 sind diejenigen Produkte aufgeführt, die normaler-

- weise im ersten Schritt der Hydrolyse von Thiolsulfonaten entstehen. Die Existenz der Enzym-sulfensäure ist zwar spekulativ, doch gibt es Hinweise, daß Sulfensäuren im aktiven Zentrum von Enzymen stabil sein könnten; siehe A. N. Glazer, *Annu. Rev. Biochem.* 39 (1970) 101.
- [29] I. S. Sigal, B. G. Harwood, R. Arentzen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (1982) 7157.
- [30] G. Dalbodie-McFarland, L. W. Cohen, A. D. Riggs, C. Morin, K. Itakura, J. H. Richards, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (1982) 6409.
- [31] D. A. Kendall, E. T. Kaiser in A. Torriani-Gorini, F. G. Rothman, S. Silver, A. Wright, E. Yagil (Hrsg.): *Phosphate Metabolism and Cellular Regulation in Microorganisms*. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1987, S. 115-117.
- [32] S. H. D. Ko, F. J. Kezdy, *J. Am. Chem. Soc.* 89 (1967) 7139.
- [33] J. Butler-Ransohoff, persönliche Mitteilung.
- [34] S. R. Jones, L. A. Kindman, J. R. Knowles, *Nature (London)* 257 (1978) 564.
- [35] J. R. Knowles, *Annu. Rev. Biochem.* 49 (1980) 877.
- [36] J. Drenth, J. N. Jansonius, R. Koekoek, B. G. Wolthers, *Adv. Protein Chem.* 25 (1971) 79.
- [37] J. Drenth, K. H. Kalk, H. M. Swen, *Biochemistry* 15 (1976) 3731.
- [38] T. C. Bruice, *Prog. Bioorg. Chem.* 4 (1976) 1.
- [39] H. L. Levine, E. T. Kaiser, *J. Am. Chem. Soc.* 102 (1980) 343.
- [40] H. E. Fried, E. T. Kaiser, *J. Am. Chem. Soc.* 103 (1981) 182.
- [41] J. L. Harris, M. Waters in P. Boyer (Hrsg.): *The Enzymes, Vol. 13*. Academic Press, New York 1976, S. 1-49.
- [42] G. N. Rafter, S. P. Colowick, *Arch. Biochem. Biophys.* 66 (1957) 190.
- [43] L. V. Benitez, W. S. Allison, *Arch. Biochem. Biophys.* 159 (1973) 89.
- [44] G. Biesecker, J. L. Harris, J. C. Thierry, J. E. Walker, A. J. Wonacott, *Nature (London)* 266 (1977) 328.
- [45] A. Levitzki, *J. Mol. Biol.* 90 (1974) 451.
- [46] R. Sato, T. Omura (Hrsg.): *Cytochrome P-450*. Kodansha/Academic Press, Tokyo/New York 1978.
- [47] R. W. Estabrook, *Methods Enzymol.* 52 (1978) 43.
- [48] J. J. Mieyal, R. S. Ackerman, J. L. Blumer, L. S. Freeman, *J. Biol. Chem.* 25 (1976) 3436.
- [49] I. Golly, P. Hlavica, *Biochim. Biophys. Acta* 760 (1983) 69.
- [50] O. Takikawa, R. Yoshida, O. Hayaishi, *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 6808.
- [51] B. L. Ferraiolo, G. M. Onady, J. J. Mieyal, *Biochemistry* 23 (1984) 5528.
- [52] D. W. Starke, K. S. Blisard, J. J. Mieyal, *Mol. Pharmacol.* 25 (1984) 467.
- [53] T. Nakatsuka, T. Sasaki, E. T. Kaiser, *J. Am. Chem. Soc.* 109 (1987) 3808.
- [54] M. Ikehara, E. Ohtsuka, T. Tokunaga, S. Nishikawa, S. Uesugi, T. Tanaka, Y. Aoyama, S. Kilyodani, K. Fujimoto, K. Yanase, K. Fuchimura, H. Morioka, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 (1986) 4695.
- [55] T. Sasaki, M. Findeis, persönliche Mitteilung.
- [56] B. Rajashekhhar, E. T. Kaiser, *J. Biol. Chem.* 261 (1986) 13617.
- [57] W. F. DeGrado, E. T. Kaiser, *J. Org. Chem.* 45 (1980) 1295.
- [58] W. F. DeGrado, E. T. Kaiser, *J. Org. Chem.* 47 (1982) 3258.
- [59] S. H. Nakagawa, H. S. H. Lau, F. J. Kezdy, E. T. Kaiser, *J. Am. Chem. Soc.* 107 (1985) 7087.
- [60] P. Lansbury, persönliche Mitteilung.
- [61] U. Heinemann, W. Saenger, *Nature (London)* 299 (1982) 27.
- [62] M. Bergmann, J. S. Fruton, *Adv. Enzymol.* 1 (1941) 63.
- [63] J. S. Fruton, *Adv. Enzymol.* 53 (1982) 239.
- [64] Y. V. Mitin, N. P. Zapevalova, E. V. Gorbunova, *Int. J. Pept. Protein Res.* 23 (1984) 528.
- [65] W. Kullmann, *J. Org. Chem.* 47 (1982) 5300; *J. Biol. Chem.* 255 (1980) 8234.
- [66] P. Luthi, P. L. Luisi, *J. Am. Chem. Soc.* 106 (1984) 7285.
- [67] H.-D. Jakubke, P. Kuhl, A. Könnicke, *Angew. Chem.* 97 (1985) 79; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 24 (1985) 85.
- [68] K. Nakanishi, R. Matsuno, *Eur. J. Biochem.* 161 (1986) 533.
- [69] J. B. West, C.-H. Wong, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1986, 417; *J. Org. Chem.* 51 (1986) 5728.
- [70] A. D. Napper, S. J. Benkovic, A. Tramontano, R. A. Lerner, *Science (Washington, D.C.)* 237 (1987) 1041.
- [71] J. W. Jacobs, P. G. Schultz, R. Sugasawara, M. Powell, *J. Am. Chem. Soc.* 109 (1987) 2187.
- [72] R. A. Lerner, A. Tramontano, *Trends Biochem. Sci. (Pers. Ed.)* 12 (1987) 427.