

# Proteasekatalysierte kinetisch kontrollierte Peptidsynthese \*\*

Von Volker Schellenberger und Hans-Dieter Jakubke \*

Trotz des enormen Fortschritts bei der Synthese von Peptiden und Proteinen mit kommerziellen Peptidsynthesizern und der großen biotechnologischen Möglichkeiten der DNA-Rekombinationstechnik ist zur racemisierungssicheren Verknüpfung von Peptidsegmenten eine C-N-Ligase ein wichtiges Hilfsmittel. Da die Aktivierung der  $\alpha$ -Carboxyfunktion eines Peptidsegmentes mit dem partiellen Verlust der Enantiomerenreinheit verbunden sein kann, bergen chemische Verknüpfungen von Peptidsegmenten Racemisierungsgefahren. Die Natur hat zur Synthese der riesigen Sequenzvielfalt von Peptiden und Proteinen mit der Peptidyltransferase nur ein einziges Enzym entwickelt, das unabhängig vom Charakter der Seitenkettenfunktionen der proteinogenen Aminosäurebausteine seine volle katalytische Funktion entfaltet. Jedoch ist die Peptidyltransferase nur als integraler Bestandteil des Ribosoms in einer koordinierten Interaktion mit anderen ribosomalen Faktoren wirksam, d. h. für die enzymatische Synthese nicht zu verwenden. Alternativ bieten sich für enzymatische Peptidsynthesen, wenn man von den eingeschränkten Möglichkeiten der Nutzung von Multienzymkomplexen der bakteriellen Peptidsynthese absieht, nur noch die Proteasen an, die aber aufgrund ihrer in-vivo-Funktion als Hydrolasen keine idealen C-N-Ligasen sein können. Erst gezielte thermodynamische und reaktionskinetische Manipulationen ermöglichen die Umkehrung der Proteasewirkung und damit eine Programmierung in Richtung Ligation. Ohne Zweifel ist eine synthesebegünstigende Einflußnahme bei einer durch Serin- und Cysteinproteasen katalysierten kinetisch kontrollierten Reaktionsführung variabler und effizienter zu realisieren als bei gleichgewichtskontrollierten Synthesen. Dieser Beitrag beschreibt den Einfluß der Enzymspezifität auf die Effizienz von kinetisch kontrollierten Synthesen. Es werden Schlußfolgerungen für eine breitere Nutzung von Serin- und Cysteinproteasen zur Katalyse von C-N-Verknüpfungen abgeleitet.

## 1. Einleitung

Die Verwendung von Enzymen zur Knüpfung von Peptidbindungen bietet prinzipiell eine Reihe von Vorteilen gegenüber chemosynthetischen Verfahren. Durch die Regiospezifität der Enzyme kann weitgehend auf die reversible Blockierung bestimmter Seitenkettenfunktionen der Aminosäurebausteine verzichtet werden. Die für enzymkatalysierte Reaktionen üblichen milden und ökologisch vorteilhaften Reaktionsbedingungen garantieren einen racemisierungsfreien Syntheseverlauf; aufgrund der Stereospezifität können selbst beim Einsatz von *N*-geschützten racemischen Aminosäurederivaten optisch einheitliche Produkte erhalten werden. Um diese Vorzüge nutzen zu können, benötigt man eine C-N-Ligase, die in einfacher Weise, praktisch anstelle eines Kupplungsreagens, zur Knüpfung der Peptidbindung eingesetzt werden kann. Da eine solche Ligase nicht zur Verfügung steht, wird der enzymatischen, allgemein anwendbaren Peptidsynthese als Alternative zur Chemosynthese selbst von Verfechtern dieser Strategie wenig Chancen eingeräumt. Dennoch sollten mit Nachdruck weiterführende Grundlagenstudien durchgeführt werden, um mit anderen, sicherlich nicht so idealen Enzymen, Lösungswege aufzuzeigen.

Trotz der hohen Effizienz der nahezu automatisch ablaufenden Festphasen-Peptidsynthesen und der Entwicklung von Kupplungsreagentien, denen in Modellreaktionen prak-

tische Racemisierungssicherheit bescheinigt wird, können die hohen Chiralitätsansprüche für die Synthesen von Pharmaka nicht absolut garantiert werden. Insbesondere ist die Gefahr der Racemisierung sehr stark von der Aminosäuresequenz in der unmittelbaren Umgebung der zu knüpfenden Peptidbindung abhängig, die ständig variiert. Deshalb sind Ergebnisse von Standardracemisierungstests nicht allgemein gültig. Besonders leicht tritt Racemisierung bei chemischen Segmentverknüpfungen<sup>[1]</sup>, aber auch bei Festphasen-Synthesen unter Verwendung von Schutzgruppen des Urethantyps auf, was durch die zunehmende Empfindlichkeit der analytischen Methoden nachgewiesen werden kann.

Der Einsatz von Enzymen ist vor allem erforderlich a) für Verknüpfungen von natürlichen Proteinspaltstücken bei der Semisynthese, b) für die Kondensation schrittweise aufgebauter Peptidsegmente bei konventionellen Peptidsynthesen und c) für Modifizierungsreaktionen an gentechnisch hergestellten Produkten.

Für einen enzymtechnischen Einsatz ist bekanntlich die ribosomale Peptidyltransferase nicht geeignet, und auch die Multienzymkomplexe der bakteriellen Peptidsynthese lassen gegenwärtig keine allgemeine Verwendbarkeit erkennen, so daß praktisch nur noch die Proteasen eingesetzt werden können. Deren prinzipielle Eignung für die Peptidsynthese wurde aufgrund der Reversibilität proteasekatalysierter Reaktionen schon vor mehr als 90 Jahren durch *van't Hoff*<sup>[2]</sup> vorausgesagt und durch *Bergmann* und *Fraenkel-Conrat*<sup>[3]</sup> 1937 experimentell nachgewiesen.

In der Literatur werden zwei Strategien der proteasekatalysierten Peptidsynthese unterschieden (vgl. neuere Übersichten<sup>[4-8]</sup>). Während die gleichgewichtskontrollierte Synthese eine einfache Umkehrung der Proteolyse ist, werden bei der kinetisch kontrollierten Synthese schwach aktivierte

[\*] Prof. Dr. H.-D. Jakubke, Dr. V. Schellenberger  
Fachbereich Biowissenschaften der Universität  
Talstraße 33, O-7010 Leipzig

[\*\*] In diesem Beitrag werden die Aminosäurereste der Peptidsubstrate *P*, *P'* und die Bindungsorte im Enzym *S*, *S'* mit Kursivschreibweise gekennzeichnet, um Verwechslungen mit *S* = Substrat sowie *P* = Produkt oder Abgangsgruppe (Schema 1) auszuschließen.

Carboxykomponenten eingesetzt. Beide Verfahren werden in Abbildung 1 verglichen.

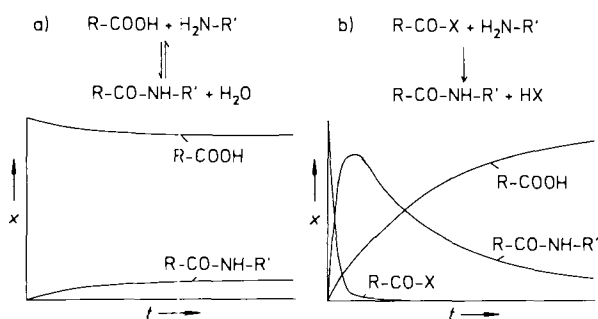


Abb. 1. Vergleich von a) gleichgewichtskontrollierten und b) kinetisch kontrollierten Peptidsynthesen. Bei der kinetisch kontrollierten Reaktion entsteht neben dem Peptidprodukt  $R\text{-CO-NH-R'}$  auch die Säure  $R\text{-COOH}$ .  $x$  = Umsatz.

## 2. Grundlagen der proteasekatalysierten kinetisch kontrollierten Segmentverknüpfung

Die gleichgewichtskontrollierte Peptidsynthese als direkte Umkehrung der proteasekatalysierten Hydrolyse einer Peptidbindung hat den Vorteil, daß alle Proteasen unabhängig von ihrem katalytischen Mechanismus eingesetzt werden können. Nachteilig ist der hohe Enzymbedarf, die geringere Synthesegeschwindigkeit und die meist notwendigen, hohen Konzentrationen an organischen Lösungsmitteln, um die Ionisierung der Edukte zurückzudrängen. Trotz dieser Einschränkungen bewährte sich diese Strategie bei der trypsin-katalysierten Semisynthese von Humaninsulin sowie bei der Aspartamsynthese unter Verwendung von Thermolysin (vgl.<sup>[4-8]</sup>). Sollen dagegen Segmente mit ungeschützten

Drittfunktionen in vorwiegend wäßrigen Medien auf diese Weise verknüpft werden, dann darf der spezifitätsbestimmende C-terminale Aminosäurerest der Carboxykomponente nicht nochmals Baustein in den beiden Edukten sein, da es sonst zu unerwünschten Bindungsspaltungen kommt.

Nun ist schon seit langem bekannt, daß Serin- und Cysteinproteasen aufgrund ihres Reaktionsmechanismus neben der Hydrolyse von Peptiden und Proteinen auch Acyltransfers auf Acceptoren katalysieren können<sup>[9,10]</sup>. Im Verlauf der Katalyse bildet sich ein Acylenzymintermediat, das durch den nucleophilen Angriff von Wasser oder von anderen Nucleophilen gespalten werden kann. Von besonderer praktischer Bedeutung ist der Einsatz von Esterderivaten von Aminosäuren oder Peptiden für den Acyltransfer auf andere Peptidderivate, der in der Literatur als kinetisch kontrollierte Peptidsynthese bezeichnet wird. Im Gegensatz zur gleichgewichtskontrollierten Synthese lassen sich, ausgehend von Carboxykomponenten mit C-terminalen Estergruppierungen, temporäre Produktakkumulationen erreichen, die weit über der thermodynamisch determinierten Gleichgewichtskonzentration liegen (siehe Abb. 1).

Kinetisch kontrollierte enzymatische Segmentverknüpfungen mit ungeschützten Seitenkettenfunktionen lassen sich aufgrund der entscheidend verbesserten Löslichkeit der Edukte in wäßrigen Medien mit nur geringen Zusätzen organischer Lösungsmittel durchführen. Damit können ungünstige Konformationseffekte vollgeschützter Peptide auf den Syntheseverlauf vermieden werden, die bei der chemischen Kondensation von Segmenten auftreten. Ein planbarer Einsatz von Proteasen für die Synthese erfordert Kenntnisse zur Kinetik von Acyltransferreaktionen. Nachfolgend wird gezeigt, daß mit wenigen kinetischen Parameter der Reaktionsverlauf beschrieben werden kann. Methoden zur Bestimmung der einzelnen Parameter werden verglichen und deren Bedeutung erläutert.



*Hans-Dieter Jakubke, geboren 1933 in Mosau (Mark Brandenburg), studierte von 1952 bis 1958 Chemie an der Universität Halle-Wittenberg. 1961 promovierte er bei W. Langenbeck über Enzymmodelle und cyclische Peptide. Nach weiterer Tätigkeit als Oberassistent und einem Forschungsaufenthalt in Prag bei J. Rudinger habilitierte er sich 1968 über racemisierungsfreie Peptidsynthesen. 1970 wurde er an das Institut für Biochemie der Universität Halle-Wittenberg als Dozent berufen, 1977 als Ordinarius für Biochemie an die Universität Leipzig. 1990 wurde Jakubke in das Council der European Peptide Society aufgenommen. Er ist Coautor einiger Bücher und beschäftigt sich vorwiegend mit der Peptidchemie, der enzymatischen Peptidsynthese und Spezifitätsuntersuchungen an Proteasen.*



*Volker Schellenberger, geboren 1960 in Leipzig, studierte von 1979 bis 1983 Biochemie an der Universität Leipzig und promovierte 1986 bei H.-D. Jakubke über proteasekatalysierte Peptidsynthesen. Nach Forschungsaufenthalten bei Yu. V. Mitin (Puschchino, UdSSR), A. Aaviksaar (Tallinn, Estland) und einem FEBS Fellowship bei V. Kasche (Hamburg) habilitierte er sich 1991 an der Universität Leipzig über proteasekatalysierte Acyltransferreaktionen. Nach einem Aufenthalt bei H.-J. Fritz in Göttingen arbeitet er derzeit als Postdoktorand bei W. J. Rutter am Hormone Research Institute in San Francisco.*

### 3. Übersicht über proteasekatalysierte Acyltransferreaktionen

Die ersten Experimente zum proteasekatalysierten Acyltransfer dienten vor allem der Aufklärung des Katalysemechanismus<sup>[11–13]</sup>, seit Mitte der siebziger Jahre steht dagegen die präparative Nutzung dieser Reaktionen im Vordergrund (vgl. beispielsweise<sup>[14–20]</sup>). Der Einfluß der Struktur der Reaktanten und auch der Einfluß der Reaktionsbedingungen auf die Ausbeute an Peptidprodukt wurde untersucht. Aufgrund der variablen Bedingungen (Art und Konzentration zugesetzter Lösungsmittel, pH, Ionenstärke, Reaktantenkonzentration, Temperatur) ist die Vergleichsmöglichkeit der Resultate sehr begrenzt. Da in vielen Arbeiten nur die Konzentration des Peptidprodukts zu einem bestimmten Zeitpunkt angegeben ist, nicht aber das initiale Verhältnis zwischen Synthese- und Hydrolyseprodukt, sind Schlußfolgerungen zur Spezifität der eingesetzten Enzyme für die verschiedenen Aminokomponenten kaum möglich.

Die von *Schechter* und *Berger*<sup>[21]</sup> eingeführte Nomenklatur der Spezifität von Proteasen wird in Abbildung 2 erläutert. Eine Charakterisierung der *S'*-Spezifität der Proteasen

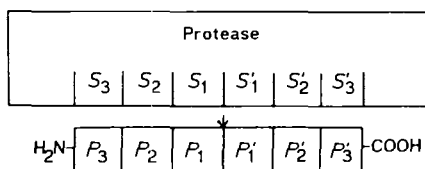


Abb. 2. Schematische Darstellung der von *Schechter* und *Berger* [21] eingeführten Nomenklatur der Spezifität von Proteasen. Die Aminosäurereste eines Peptidsubstrates werden mit *P* oder *P'* bezeichnet. Sie treten mit den entsprechenden Bindungsorten (*S* bzw. *S'*) im aktiven Zentrum des Enzyms in Wechselwirkung. Der Pfeil kennzeichnet die Spaltstelle bei der Proteolyse. Von dort aus werden *P* oder *S* nach der Sequenzabfolge numeriert.

erfordert zahlreiche Serien von Acyltransferreaktionen, deren Kinetik bei einheitlichen Reaktionsbedingungen untersucht werden muß. In Tabelle 1 sind wesentliche Arbeiten zum serin- und cysteinproteasekatalysierten Acyltransfer zusammengestellt, die diese Bedingungen erfüllen.

Eine ausführliche Diskussion der Ergebnisse dieser Publikationen würde den Rahmen des vorliegenden Aufsatzes sprengen. Einige verallgemeinernde Aussagen scheinen jedoch zulässig zu sein, auch wenn sich die einzelnen Arbeiten bezüglich der Reaktionsbedingungen und des Meßverfahrens unterscheiden.

Bei Cysteinproteasen liegt das Verhältnis zwischen Aminolyse und Hydrolyse des Acylenzyms im allgemeinen günstiger als bei Serinproteasen. Dies ist in Einklang mit dem Befund, daß das Verhältnis von Esterase- zu Amidaseaktivität bei Cysteinproteasen deutlich unter dem Wert für Serinproteasen liegt<sup>[35]</sup>. Von den Serinproteasen zeigen die Enzyme der Trypsinfamilie eine höhere Acyltransfereffizienz als die Enzyme vom Subtilisintyp, die in der Regel sehr gute Esterasen sind<sup>[36]</sup>.

Die Hydrolyse des intermediär gebildeten Acylenzym-Nucleophil-Komplexes (EAN, siehe Schema 1) wurde relativ selten beobachtet<sup>[31, 37–39]</sup>. Eine besondere Bedeutung scheint ihr bei trypsin-katalysierten Reaktionen zuzukom-

men<sup>[28]</sup>. Die meisten Informationen liegen derzeit zur Acyltransfereffizienz von Chymotrypsin vor. Diese Daten werden im Abschnitt 7 diskutiert.

Tabelle 1. Repräsentative Beispiele für proteasekatalysierte Acyltransferreaktionen, bei denen Serien verschiedener Nucleophile in ihrer Effizienz charakterisiert wurden.

Protease	Nucleophil	Methode [a]	Lit.
Papain	Oligoglycinamide	A	[22]
	<i>n</i> -Alkohole	A	[23]
	Aminosäureamide	A	[24]
	Aminosäureamide, Alkohole, Amine	A	[25]
Leukocytelastase	Aminosäureamide	A	[26]
Pankreaselastase	Aminosäureamide, Peptide	B	[27]
Rindertrypsin	Aminosäureamide	D	[28]
$\alpha$ -Chymotrypsin	Amine, Alkohole	A	[11]
	Aminosäureamide, Peptide	D	[29]
	Aminosäureamide, Peptide	B	[30]
	Aminosäureamide	C	[31]
$\lambda$ -Chymotrypsin	Aminosäureamide, Amine	A	[32]
V8-Protease	Aminosäureamide, Peptide	C	[33]
Endoproteinase Glu/Asp-C (Actinomyces)	Aminosäureamide	C	[34]

[a] Methoden zur Analyse der Acyltransfereffizienz: A: Beschleunigung der Desacylierung durch das Nucleophil; B: Meßapparatur entsprechend Abschnitt 5.2.2; C: Produktanalyse mit HPLC; D: photometrische Messung des Produktverhältnisses (vgl. Abschnitt 5.2.1).

### 4. Konkurrenzreaktionen beim Acyltransfer

Proteasen sind keine perfekten Acyltransferasen, da aufgrund ihrer begrenzten Spezifität parallel zum Acyltransfer andere Reaktionen ablaufen können (Abb. 3). Das im Verlauf der Reaktion gebildete Acylenzym kann beispielsweise hydrolysiert werden, wobei die dabei entstehende Säure ein sehr niedriges Acylierungspotential hat und somit für die Produktbildung verloren geht. Aus diesem Grund kommt dem Verhältnis zwischen Aminolyse und Hydrolyse des Acyldonors, das primär von der *S'*-Spezifität des Enzyms bestimmt wird, eine entscheidende Bedeutung beim Acyltransfer zu. Die beim Acyltransfer gebildete Peptidbindung kann vom verwendeten Enzym gespalten werden, und der enzymatische Angriff dieser Bindung wird in der Literatur als Sekundärhydrolyse bezeichnet.

Mit der Länge des zu synthetisierenden Peptids nimmt die Wahrscheinlichkeit zu, daß die Sequenz weitere Peptidbindungen enthält, die der Spezifität der verwendeten Protease entsprechen. Dies gilt insbesondere für die Verknüpfung längerer Peptidsegmente, die ja das Hauptziel der proteasekatalysierten Synthese ist. Bei der in Abbildung 3 dargestellten Reaktion wurde vorausgesetzt, daß der Acyldonor nur noch eine zusätzliche Spaltstelle für das Enzym enthält. Dabei wird deutlich, daß daraus viele Reaktionsmöglichkeiten resultieren, von denen in der Abbildung nur einige aufgeführt sind.

Für die Unterdrückung solcher unerwünschter Nebenreaktionen muß die Esterbindung des Acyldonors im Vergleich zu allen anderen Bindungen in den Reaktanten und im Produkt bevorzugt vom Enzym angegriffen werden. Die für das Auftreten von Nebenreaktionen entscheidenden Parameter der Enzymspezifität sollen im Abschnitt 8 diskutiert werden.

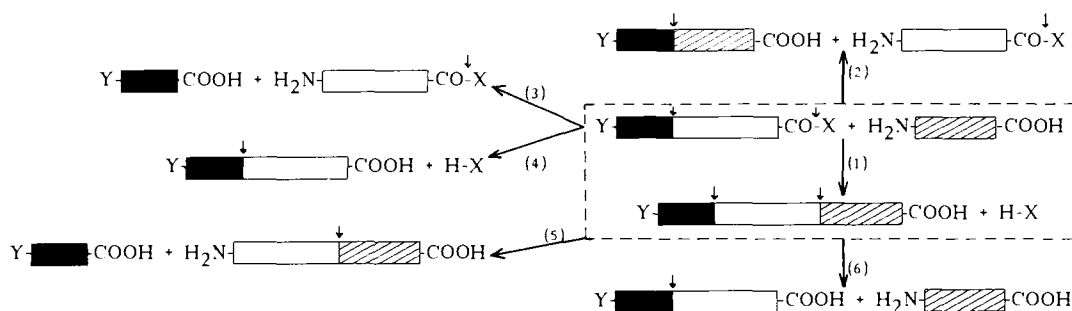


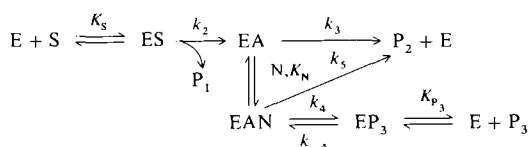
Abb. 3. Reaktionswege beim proteasekatalysierten Acyltransfer. Die Synthese (1) des Peptidproduktes ausgehend vom Acyldonor und der Aminokomponente ist durch die Umrahmung hervorgehoben. Spaltstellen in den einzelnen Verbindungen sind durch kleine Pfeile gekennzeichnet. Parallel zur Synthesereaktion (1) erfolgt die Hydrolyse der Esterbindung (CO-X) des Acyldonors (4). Es wurde angenommen, daß der Acyldonor neben der Esterbindung noch eine zusätzliche Spaltstelle im Acylteil aufweist. Wird diese Peptidbindung des Acyldonors von der Protease angegriffen, so kann es neben der Hydrolyse (3) auch zu einem Acyltransfer (2) auf die Aminokomponente kommen. Im Syntheseprodukt kann die gerade geknüpfte Bindung einer Sekundärhydrolyse (6) unterliegen oder die Hydrolyse einer anderen Peptidbindung (5) ist möglich. Viele der dargestellten Folgeprodukte können weitere proteasekatalysierte Umsetzung eingehen, da sie ebenfalls Spaltstellen für das Enzym enthalten oder weil sie aufgrund einer freien  $\alpha$ -Aminofunktion als nucleophiler Acceptor fungieren können.

## 5. Konkurrenz von Aminokomponente und Wasser um das Acylenzym

### 5.1. Definition und Bedeutung der Partitionskonstante

Wie bereits erwähnt, ist das Verhältnis der Bildung von Aminolyse- und Hydrolyseprodukt für die präparative Peptidsynthese entscheidend und läßt Rückschlüsse auf die  $S'$ -Spezifität der Protease zu. Deshalb ist es notwendig, einen Parameter zur Beschreibung der Acyltransfereffizienz der Protease einzuführen.

Die Kinetik proteasekatalysierter Acyltransferreaktionen läßt sich in der Regel durch Schema 1 beschreiben. Im Laufe der Reaktion wird die nucleophile Aminokomponente an das Acylenzym gebunden, wobei der entstandene Acylenzym-Nucleophil-Komplex EAN sowohl eine Aminolyse als auch eine Hydrolyse eingehen kann<sup>[23]</sup>.



Schema 1. Proteasekatalysierte Acyltransferreaktion. E = Enzym, S = Acyldonor (Carboxykomponente), N = Nucleophil (Aminokomponente), P<sub>1</sub> = Abgangsgruppe des Acyldonors, P<sub>2</sub> = Hydrolyseprodukt, P<sub>3</sub> = Peptidprodukt, EA = Acylenzym, EAN = Acylenzym-Nucleophil-Komplex.

Das Verhältnis der Bildung von Aminolyse- zu Hydrolyseprodukt, das auch als Selektivität bezeichnet wird<sup>[40]</sup>, wird von der Acyltransfereffizienz der Protease für die entsprechenden Reaktanten bestimmt.

In Anlehnung an die Definition der Michaeliskonstante entschieden wir uns für die Einführung der Partitionskonstante  $p$  entsprechend Gleichung (1)<sup>[41]</sup>. Danach entspricht

$$\frac{v_H}{v_A} = \frac{d[P_2]}{d[P_3]} = \frac{p}{[N]} \quad (1)$$

die Partitionskonstante derjenigen Nucleophilkonzentration, bei der Aminolyse ( $v_A$ ) und Hydrolyse ( $v_H$ ) des Acyl-

enzym mit gleicher Geschwindigkeit verlaufen. Diese Definition der Partitionskonstante hat den Vorteil, daß ihr kein bestimmter kinetischer Reaktionsablauf zugrunde liegt. Darüber hinaus kann die Ausbeute von Acyltransferreaktionen durch  $p$  schnell abgeschätzt werden. Nur wenn  $[N] > p$  gilt, kann eine hohe Ausbeute an Peptidprodukt erhalten werden.

Die Partitionskonstante ist eine empirisch eingeführte Größe. Ihre konkrete Bedeutung ergibt sich aus dem jeweiligen kinetischen Reaktionsablauf. Nimmt man ein Gleichgewicht zwischen dem Acylenzym und dem Acylenzym-Nucleophil-Komplex an, so ergeben sich ausgehend von Schema 1 für die Geschwindigkeiten von Hydrolyse und Aminolyse des Acylenzyms die Gleichungen (2) und (3). Die Kombination der Gleichungen (1)–(3) führt zu Gleichung (4).

$$v_H = [EA]k_3 + [EA][N]\frac{k_5}{K_N} \quad (2)$$

$$v_A = [EA][N]\frac{k_4}{K_N} \quad (3)$$

$$p = \frac{[N]k_5}{k_4} + \frac{K_N k_3}{k_4} \quad (4)$$

Demnach folgt bei Gültigkeit von Schema 1 ein linearer Zusammenhang zwischen der Partitionskonstante und der Nucleophilkonzentration. Der Quotient  $k_5/k_4$  entspricht dem Verhältnis zwischen Hydrolyse und Aminolyse des EAN-Komplexes, und der Term  $K_N k_3/k_4$  ist ein Maß für die Effizienz des Nucleophils.

Das Konzept der Partitionskonstante wurde von einigen Arbeitsgruppen übernommen<sup>[42, 43]</sup>. Von Gololobov et al.<sup>[44]</sup> wurde ein Parameter  $\beta$  vorgeschlagen, der sich reziprok zur Partitionskonstante verhält. Einige Autoren bevorzugen aber auch die Charakterisierung der nucleophilen Effizienz mit Quotienten verschiedener Geschwindigkeitskonstanten<sup>[22, 26, 29, 31, 32]</sup>. Leider können hier die Resultate kaum miteinander verglichen werden, da sie vom jeweiligen kinetischen Reaktionsablauf abhängen.

## 5.2. Methoden zur Bestimmung der Partitionskonstante

### 5.2.1. Produktverhältnis bei einem Überschuß an Nucleophil

Entsprechend Gleichung (1) ergibt sich die Partitionskonstante aus dem Verhältnis der Geschwindigkeiten von Aminolyse und Hydrolyse des Acylenzyms. Wird die Reaktion in Gegenwart eines großen Überschusses an Nucleophil durchgeführt ( $[N]_0 \gg [S]_0$ ), dann kann die Abnahme der Nucleophilkonzentration im Verlauf der Reaktion vernachlässigt werden. Unter diesen Bedingungen ist das Verhältnis  $v_H/v_A = [P_2]/[P_3]$ . Diese Beziehung erlaubt eine einfache Berechnung der Partitionskonstante entsprechend Gleichung (5).

$$p = \frac{[P_2][N]}{[P_3]} \quad (5)$$

Die Bestimmung des Produktverhältnisses erfolgt bevorzugt mit HPLC-analytischen Methoden (HPLC = High Pressure Liquid Chromatography).

Bei Verwendung geeigneter Acyldonorester läßt sich das Verhältnis zwischen Hydrolyse- und Aminolysereaktion aus der Extinktionsänderung im Reaktionsverlauf ermitteln<sup>[29, 37]</sup>. Voraussetzung dafür ist, daß sich die Extinktionsänderungen für die beiden Reaktionen unterscheiden ( $\epsilon_{P_2} \neq \epsilon_{P_3} - \epsilon_N$ ).

### 5.2.2. Meßapparatur zur Bestimmung von $p$

Die Bestimmung der Partitionskonstante durch HPLC ist eine diskontinuierliche Methode; die Trennbedingungen müssen an das jeweilige Produktgemisch angepaßt werden. Um die Einsatzmöglichkeiten der Proteasen für die Peptid-

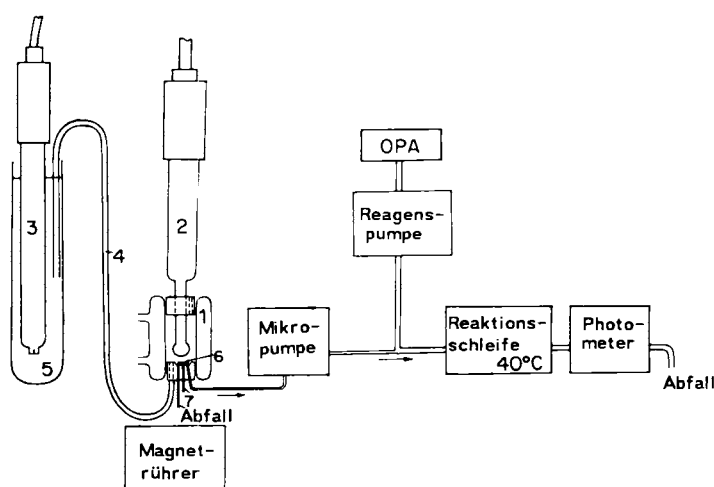


Abb. 4. Meßanordnung zur kontinuierlichen Verfolgung von proteasekatalysierten Acyltransferreaktionen. Die Reaktion wird in einem thermostatisierbaren Gefäß (1) durchgeführt, das mit einem Magnetrührer (6) und einer Kanüle für den Titrant (7) ausgestattet ist. Die pH-Messung erfolgt mit einer Miniaturgaselektrode (2). Um das Reaktorvolumen gering zu halten, wurde die Referenzelektrode (3) über einen als Strombrücke fungierenden Polyethylenschlauch (4) mit dem Gefäß verbunden. Die Referenzelektrode und der Polyethylenschlauch befinden sich in einem mit gesättigter Kaliumchloridlösung gefüllten Reagenzglas (5). Aus dem Reaktionsansatz wird kontinuierlich das Probenmisch abgepumpt und über eine zweite Pumpe mit *o*-Phthalaldehyd-Reagenzlösung (OPA) gemischt. Die Extinktion des Analysengemisches bei 340 nm wird nach Durchlaufen einer Reaktionsschleife kontinuierlich registriert.

synthese abschätzen zu können, sind jedoch umfangreiche Untersuchungen zum Acyltransfer erforderlich, wobei eine große Anzahl von Acyldonorestern und Nucleophilen in verschiedenen Kombinationen getestet werden müssen.

Speziell für ein breit angelegtes Screening der *S'*-Spezifität von Proteasen wurde von uns eine Meßapparatur entwickelt<sup>[45]</sup>, in der die Geschwindigkeit der Hydrolysereaktion durch Titration ermittelt wird. Die Geschwindigkeit der Aminolyse des Acylenzyms wird indirekt über die Abnahme der Konzentration des Nucleophils im Ansatz bestimmt. Dazu wird die Reaktion von freien Aminogruppen mit *o*-Phthalaldehyd genutzt, die photometrisch ausgewertet werden kann<sup>[46]</sup>.

Der Aufbau der Apparatur ist in Abbildung 4 schematisch dargestellt. Mit dieser Meßanordnung konnten umfangreiche Meßserien von Acyltransferreaktionen durchgeführt werden, bei denen die *S'*-Spezifität von  $\alpha$ -Chymotrypsin oder Elastase aus Schweinepankreas untersucht wurde<sup>[27, 30]</sup>.

### 5.2.3. Beschleunigung der Desacylierung durch das Nucleophil

Bei der serin- und cysteinproteasekatalysierten Hydrolyse spezifischer Estersubstrate ist in der Regel die Desacylierung des Acylenzyms der geschwindigkeitsbestimmende Schritt, d. h. es gilt  $k_2 \gg k_3$  und  $k_{kat} = k_3$  (siehe Schema 1). Unter diesen Umständen erhöht sich in Gegenwart eines zugesetzten Nucleophils die katalytische Konstante ( $k_{kat,app}$ ) entsprechend Gleichung (6). Wenn  $k_5 = k_3$  oder  $k_4 \gg k_3$  gilt, so läßt sich Gleichung (6) zu Gleichung (7) vereinfachen.

$$(k_{kat,app}) = k_3 \frac{K_N}{K_N + [N]} + (k_4 + k_5) \left( 1 - \frac{K_N}{K_N + [N]} \right) \quad (6)$$

$$(k_{kat,app}) = k_3 + k_4 \frac{K_N}{K_N + [N]} \quad (7)$$

Verwendet man einen Acyldonorester mit einer chromogenen Abgangsgruppe, so kann aus dem Zuwachs von  $k_{kat}$  bei Nucleophilzugabe auf die Effizienz des zugesetzten Nucleophils geschlossen werden. Anwendungen dieser Methode sind in einigen Arbeiten beschrieben<sup>[22, 24, 26, 32, 38]</sup>. Für unspezifische Estersubstrate besteht auch die Möglichkeit, das Acylenzym zu isolieren und die Desacylierung direkt zu verfolgen<sup>[25]</sup>.

### 5.2.4. Bestimmung von $p$ aus dem integrierten Zeitgesetz

Wie in Abschnitt 5.2.1 erwähnt, wird bei der Analyse von Acyltransferreaktionen durch HPLC die nucleophile Aminokomponente im Überschuß zum Acyldonor zugesetzt. Bei der präparativen Nutzung von Acyltransferreaktionen ist ein großer Überschuß an Nucleophil jedoch nicht sinnvoll, da ja beide Reaktanten möglichst vollständig umgesetzt werden sollen. Aus diesem Grund entwickelten wir eine Methode, die die Bestimmung der Partitionskonstante  $p$  aus HPLC-Daten ermöglicht, auch wenn während der Reaktion die Nucleophilkonzentration signifikant abnimmt<sup>[47]</sup>.

Für die Nucleophilkonzentration im Ansatz gilt Gleichung (8) und durch Einsetzen von Gleichung (8) und (4) in Gleichung (1) und Integration gelangt man zu Gleichung (9).

$$[N] = [N]_0 - [P_3] \quad (8)$$

$$\frac{[P_2]}{[P_3]} = \frac{k_3}{k_4} + K_N \frac{k_3}{k_4} \frac{\ln([N]_0/([N]_0 - [P_3]))}{[P_3]} \quad (9)$$

Entsprechend Gleichung (9) ergibt das Auftragen von  $[P_2]/[P_3]$  gegen  $\ln([N]_0/([N]_0 - [P_3]))/[P_3]$  eine Gerade mit der Steigung  $K_N k_3/k_4$  und einem Schnittpunkt mit der y-Achse bei  $k_3/k_4$ . Abbildung 5 zeigt eine Auftragung entsprechend Gleichung (9) für Acyltransferreaktionen, katalysiert durch V8-Protease<sup>[47]</sup>.

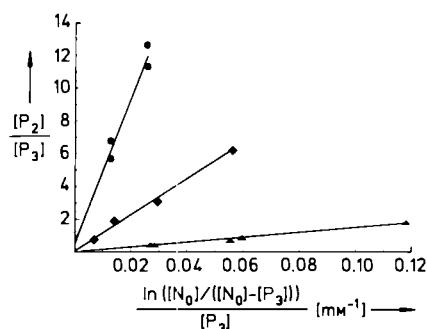
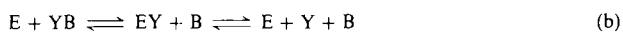
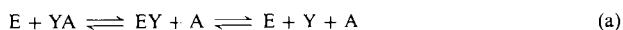


Abb. 5. Auftragung entsprechend Gleichung (9) für den V8-proteasekatalysierten Acyltransfer mit Z-Glu-OMe als Acyldonor (Z = Benzyloxycarbonyl). Nucleophile Aminokomponente:  $\Delta$  H-L-Leu-NH<sub>2</sub>;  $\bullet$  H-D-Leu-NH<sub>2</sub>;  $\blacksquare$  H-L-Val-NH<sub>2</sub>.

Mit der vorgestellten Methode kann  $p$  unter den Bedingungen der präparativen Peptidsynthesen bestimmt werden. Damit sollte sie bei der Optimierung der Reaktionsbedingungen besonders nützlich sein. Ein weiterer Vorteil ist, daß die Reaktionen in Gegenwart eines Überschusses an Acyldonor durchgeführt werden können. Dies ermöglicht die Analyse von Reaktionen, bei denen das Peptidprodukt weitere proteasekatalysierte Umsetzungen eingeht. Derartige Verhältnisse sind z.B. für die Thiolprotease Papain bekannt<sup>[35, 48]</sup>. Ein Überschuß an Acyldonor schützt das Peptidprodukt vor Sekundärhydrolyse durch das Enzym und erlaubt so eine exakte Bestimmung der Partitionskonstante.

## 6. S'-Spezifität bei Acyltransfer und Peptidhydrolyse

Die Acylierung des Enzyms durch ein Peptidsubstrat ist die Umkehrung der Aminolyse des Acylenzyms durch das entsprechende Nucleophil. Zur Verdeutlichung dieses Sachverhaltes soll die Hydrolyse zweier Peptidsubstrate YA und YB verglichen werden [Gl. (a) und (b)]. Beide Substrate sollen sich nur in ihrer Abgangsgruppe unterscheiden.



Der Verlauf der freien Enthalpie für beide Reaktionen ist in Abbildung 6 dargestellt. Bei der Hydrolyse beider Substrate entsteht intermediär das gleiche Acylenzym EY. Folglich ist die freie Enthalpie der Hydrolyse des Acylenzyms  $\Delta G_{\text{deac}}$  für beide Substrate gleich.

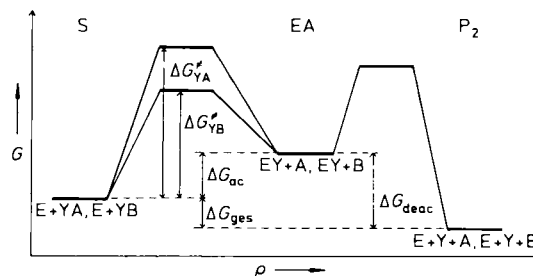


Abb. 6. Vergleich der Reaktionskoordinaten  $\rho$  für die enzymatischen Hydrolysen zweier Peptidsubstrate S(YA und YB) mit gleichem Acylteil. EA = Acylenzym, P<sub>2</sub> = Hydrolyseprodukt.

Fersht und Requena<sup>[49]</sup> führten umfangreiche Untersuchungen zum Einfluß der Struktur von Peptiden auf die Gleichgewichtskonstante der Hydrolyse durch. Dabei wurde die freie Enthalpie der Peptidhydrolyse nur wenig von der Struktur der beteiligten Aminosäureseitenketten beeinflusst, solange sich die pK-Werte der bei der Hydrolyse freiwerdenden Aminogruppen nicht wesentlich unterscheiden. Deshalb darf auch angenommen werden, daß sich die freie Enthalpie der Hydrolyse beider Substrate  $\Delta G_{\text{ges}}$  kaum unterscheidet.

Die freie Enthalpie der Acylierung des Enzyms durch die Substrate ergibt sich aus Beziehung (10). Für die beiden

$$\Delta G_{\text{ac}} = \Delta G_{\text{ges}} - \Delta G_{\text{deac}} \quad (10)$$

Substrate muß  $\Delta G_{\text{ac}}$  gleich sein, da sich die Substrate auch in  $\Delta G_{\text{ges}}$  und  $\Delta G_{\text{deac}}$  nicht unterscheiden. Angenommen das Substrat YB besitzt die höhere Spezifitätskonstante  $k_{\text{kat}}/K_M$ , d. h.  $\Delta G_{\text{YB}}^* < \Delta G_{\text{YA}}^*$ , dann muß die nucleophile Effizienz der Abgangsgruppe B um den gleichen Faktor über der Effizienz von A liegen, da bei der Aminolyse des Acylenzyms der gleiche Übergangszustand durchlaufen wird wie bei der Peptidhydrolyse.

Vergleicht man also nur Peptide, deren freie Enthalpie der Hydrolyse sich nicht wesentlich unterscheidet, so besteht ein strenger Zusammenhang zwischen der S'-Spezifität bei der Peptidhydrolyse und auch bei der Aminolyse des Acylenzyms. Damit eröffnet sich die Möglichkeit, die S'-Spezifität von Serin- und Cysteinproteasen über Acyltransferreaktionen zu untersuchen. Diese Tatsache ist von großem Wert, da Untersuchungen zur Spezifität von Proteasen bei Peptidhydrolysen mit einigen Problemen verbunden sind. Bei solchen Studien müssen umfangreiche Serien von Peptidsubstraten gemessen werden. Vor allem bei längeren Peptiden muß mit dem Auftreten mehrerer Spaltstellen in der Sequenz gerechnet werden. Zudem ist eine Peptidhydrolyse in der Regel nicht mit photometrisch auswertbaren Änderungen der Absorption verbunden. Da beim Acyltransfer vergleichsweise reaktive Ester als Acyldonor eingesetzt werden, kann man die Spezifität selbst für Peptidsequenzen ermitteln, die von der entsprechenden Protease praktisch nicht hydrolysiert werden<sup>[32]</sup>.

## 7. Chymotrypsinkatalysierter Acyltransfer

$\alpha$ -Chymotrypsin ist eines der am intensivsten untersuchten Enzyme überhaupt<sup>[10]</sup> und seine Raumstruktur konnte durch Röntgenstrukturanalyse ermittelt werden<sup>[50–52]</sup>.  $\alpha$ -Chymotrypsin ist eine Endoprotease mit einer ausgeprägten Primärspezifität für Peptidsubstrate mit aromatischen Aminosäuren in  $P_1$ -Position<sup>[53]</sup> (vgl. Abb. 2).

Die Spezifität von  $\alpha$ -Chymotrypsin für die Abgangsgruppe der Substrate wurde intensiv untersucht, wobei substituierte Phenylester, Anilide oder aliphatische Alkylester verschiedener Struktur eingesetzt wurden<sup>[54–58]</sup>. Jedoch liegen kaum Informationen über die  $S'$ -Spezifität von  $\alpha$ -Chymotrypsin bei der Hydrolyse von Peptiden vor. Derartige Untersuchungen waren auf Substrate mit aromatischen Aminosäuren in  $P_1$ -Position und kleinen hydrophoben Aminosäuren in  $P'_1$ -Position beschränkt<sup>[17, 18, 59–62]</sup>.

### 7.1. Spezifität der $S'$ -Bindungsstelle

In der Literatur ist eine große Anzahl chymotrypsinkatalysierter Acyltransferreaktionen beschrieben<sup>[29, 30–32, 37]</sup>, die eine Charakterisierung der  $S'$ -Spezifität des Enzyms zum Ziel hatten. Entsprechend dem Endoproteasecharakter von Chymotrypsin fand kein Acyltransfer auf freie Aminosäuren statt<sup>[29]</sup>. Auch für H- $\beta$ -Ala-Gly-OH und für Derivate von D-Aminosäuren als Nucleophil konnte kaum Aminolyse des Acylenzyms beobachtet werden<sup>[30, 31]</sup>. Offenbar ist der Aufbau der Nucleophile aus  $\alpha$ -Aminosäuren mit L-Konfiguration eine Voraussetzung für ihre Effizienz beim Acyltransfer.

Um die Spezifität der  $S'_1$ -Bindungsregion des Enzyms näher zu charakterisieren, wurde eine große Anzahl von Aminosäureamiden in ihrer Eigenschaft als Nucleophile untersucht. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Tabelle 2 zusammengestellt. Die Werte zeigen eine Bevorzugung des

Tabelle 2. Partitionskonstanten [mm] für den chymotrypsinkatalysierten Acyltransfer auf Aminosäureamide [a].

Nucleophil	Ac-Tyr-OEt [31]	Ac-Phe-ONp [32] [b]	Mal-Phe-OMe [30]	Mal-Leu-OBzl [30]
H-Met-NH <sub>2</sub>			3.3	4.9
H-Tyr-NH <sub>2</sub>		8.5		
H-Trp-NH <sub>2</sub>		22		
H-Leu-NH <sub>2</sub>	19 [c]		4.2	10
H-Val-NH <sub>2</sub>	21 [c]		6.7	15
H-Ala-NH <sub>2</sub>	23 [c]	23	9.3	18
H-Ser-NH <sub>2</sub>	49			
H-Gly-NH <sub>2</sub>	104	87	44	90
H-Arg-NH <sub>2</sub>			0.11	0.24
H-D-Ala-NH <sub>2</sub>	5500			

[a] Die Acyldonorester und die Literaturquelle sind im Tabellenkopf angegeben. Alle Acyltransferexperimente wurden unter vergleichbaren Bedingungen durchgeführt (25 °C; pH 9.0–10.0; Lösungsmittelgehalt < 5 %; Ionenstärke = 0.19–0.95). Mal = Maleyl(3-carboxyacryloyl). [b]  $\delta$ -Chymotrypsin wurde verwendet. Alle anderen Reaktionen wurden mit  $\alpha$ -Chymotrypsin durchgeführt. [c] Die Partitionskonstante ist abhängig von der Nucleophilkonzentration, d. h.  $k_2/k_4 > 0$ .

$S'_1$ -Bindungsstellen für Aminosäuren mit hydrophoben Seitenketten, wobei H-Arg-NH<sub>2</sub> eine Ausnahme bildet, da es deutlich effizienter als alle anderen Aminosäureamide ist. Als Ursache dafür werden elektrostatische Wechselwirkungen mit dem Enzym angenommen, die im folgenden Abschnitt gesondert diskutiert werden.

Die Spezifität der  $S'_1$ -Region von Chymotrypsin läßt sich anhand der Struktur von Komplexen des Enzyms mit Proteininhibitoren erklären. Solche Inhibitoren sind spezifische Substrate für die Protease, wobei ihre Hydrolyse aufgrund der Struktur des Gesamtmoleküls reversibel verläuft<sup>[63]</sup>. Die Strukturen solcher Inhibitoren und von Enzyminhibitor-komplexen können als Modell für die Wechselwirkungen von Proteasen mit ihren Peptidsubstraten dienen.

Aus dem Modellkomplex von Rinderpankreas-Trypsin-inhibitor mit Chymotrypsin wurde abgeleitet, daß die  $P'_1$ -Seitenkette des Substrates vom Enzym abgewandt ist<sup>[64]</sup>. Dementsprechend können natürlich auch große Aminosäureseitenketten gebunden werden. Dasselbe Modell macht auch die niedrige Effizienz von H-D-Ala-NH<sub>2</sub> verständlich.

Untersuchungen zum Acyltransfer auf Dipeptidamide ergaben, daß zusätzliche Wechselwirkungen im  $S'_2$ -Bindungs-ort die Spezifität der  $S'_1$ -Region geringfügig beeinflussen<sup>[30]</sup>. Serien von Dipeptidnucleophilen mit unterschiedlichen Resten in  $P'_2$ -Position zeigten, daß in dieser Region Aminosäuren mit hydrophoben Seitenketten bevorzugt werden<sup>[29, 65]</sup>.

### 7.2. Ionische Wechselwirkung in den $S'$ -Bindungsstellen

Nucleophile mit geladenen Gruppen verhalten sich im Vergleich zu ungeladenen Nucleophilen in  $\alpha$ -chymotrypsinkatalysierten Acyltransferreaktionen deutlich anders (vgl. Tabelle 3). So wurden für H-Arg-NH<sub>2</sub>  $p$ -Werte gemessen, die um mehr als eine Größenordnung unter den Werten für die restlichen Aminosäureamide liegen. Ebenso auffällig sind die hohen Partitionskonstanten der Nucleophile mit freien Carboxygruppen. Als Ursache für den Einfluß geladener Gruppen auf die Nucleophileffizienz wird von uns ein negatives elektrostatisches Potential in der  $S'$ -Region des Enzyms angenommen<sup>[37]</sup>.

Auch eine statistische Analyse von Proteolysedaten bestätigte, daß  $\alpha$ -Chymotrypsin spezifisch auf Peptidbindungen mit Arginin oder Lysin in  $P'_1$ -Position reagiert<sup>[66]</sup>. Ein weiteres Ergebnis war, daß Leu-Asp-Bindungen in Proteinen von  $\alpha$ -Chymotrypsin wesentlich seltener gespalten werden, als man von der Häufigkeit dieser Bindungen erwarten sollte.

Die Röntgenstrukturanalyse eines Komplexes von Chymotrypsin und einem Proteaseinhibitor aus Ovomucoid ergab, daß sich eine Salzbrücke zwischen dem  $P'_3$ -Argininrest des Inhibitors und Asp<sup>64</sup> des Enzyms bildet<sup>[67]</sup>.

Ein Vergleich der Oligoglycine in Tabelle 3 zeigt den Einfluß der Entfernung zwischen der nucleophilen Aminogruppe und der geladenen Carboxygruppe. Mit wachsender Län-

Tabelle 3. Einfluß geladener Gruppen des Nucleophils auf die Aminolyse von Mal-Phe- $\alpha$ -chymotrypsin.

Nucleophil	$p$ [mm]	Lit.
H-Arg-NH <sub>2</sub>	0.11	[30]
H-Leu-NH <sub>2</sub>	4.2	[30]
H-Arg-OMe	22 [a]	[37]
H-Leu-OMe	> 600	[37]
H-Ala-Ala-OH	58	[30]
H-Ala-Ala-NH <sub>2</sub>	4.9	[30]
H-Gly-Gly-OH	214	[30]
H-Gly-Gly-Gly-OH	138	[30]
H-Gly-Gly-Gly-Gly-OH	103	[30]

[a] Die Partitionskonstante ist abhängig von der Nucleophilkonzentration.

ge des Nucleophils kommt es zu weniger starken elektrostatischen Wechselwirkungen mit den negativ geladenen Resten in der  $S'$ -Region von  $\alpha$ -Chymotrypsin. Günstige Wechselwirkungen der Nucleophile mit den  $S'_3$ - und  $S'_4$ -Bindungsorten können den Einfluß der Länge des Nucleophils auf die  $p$ -Konstante nicht erklären, da für H-Gly-NH<sub>2</sub> eine höhere Effizienz als für H-Gly-Gly-Gly-Gly-OH ermittelt wurde (vgl. Tabellen 2 und 3).

Für eine Reihe von Modellreaktionen konnte gezeigt werden, daß sich die nucleophile Effizienz von Dipeptiden mit freier Carboxygruppe durch die Zugabe von anorganischen Salzen zum Reaktionsmedium um mehr als eine Größenordnung verbessern läßt<sup>[65]</sup>. Ursache dafür ist wahrscheinlich die Abschirmung ungünstiger elektrostatischer Wechselwirkungen zwischen den negativ geladenen Carboxygruppen der Nucleophile und dem negativen Potential in der  $S'$ -Region des Acylenzyms. In ähnlicher Weise lassen sich die Wechselwirkungen von Argininresten im Nucleophil mit dem Enzym durch Zugabe verschiedener Salze beeinflussen<sup>[68]</sup>.

Alle hier genannten Beispiele belegen, daß bei der Proteolyse, der Bindung von Inhibitoren und dem Acyltransfer die gleichen Einflüsse wirksam sind. Sie zeigen auch, daß das Verständnis der molekularen Wechselwirkungen zwischen Acylenzym und Nucleophil eine gezielte Optimierung der Acyltransfereffizienz ermöglicht.

### 7.3. Einfluß der Struktur des Acyldonors auf die Partitionskonstante

Für die Planung von proteasekatalysierten Peptidsynthesen ist es von erheblicher Bedeutung, ob die Nucleophilspezifität der Protease von der Struktur des Acyldonors beeinflusst wird. Aus diesem Grund verglichen wir den  $\alpha$ -chymotrypsinkatalysierten Acyltransfer von zwei verschiedenen Acyldonorestern auf eine Reihe von Nucleophilen<sup>[30]</sup>.

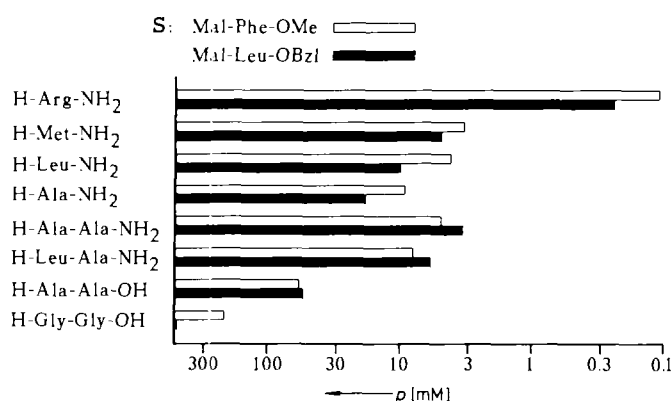


Abb. 7. Vergleich der Partitionskonstanten  $p$  für den  $\alpha$ -chymotrypsinkatalysierten Acyltransfer mit zwei verschiedenen Acyldonorestern S<sup>[30]</sup>.

Wie Abbildung 7 zeigt, differieren die Partitionskonstanten für ein bestimmtes Nucleophil um nicht mehr als eine Größenordnung, während für die einzelnen Nucleophile bei demselben Acyldonor Unterschiede von mehr als drei Größenordnungen registriert wurden. Die Art der Besetzung der  $S$ -Bindungsorte von  $\alpha$ -Chymotrypsin ist offensichtlich

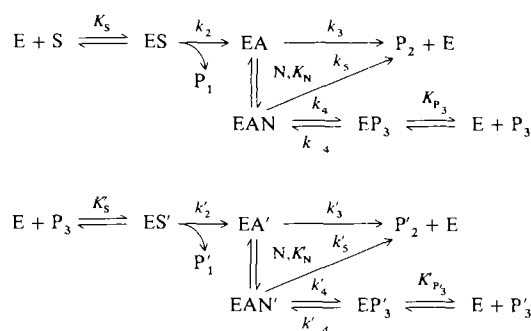
von geringem Einfluß auf die Bindung der Nucleophile in der  $S'$ -Region. Eine umfangreiche Meßserie, bei der der Acyltransfer von vierzehn Acyldonorestern auf vier verschiedene Nucleophile untersucht wurde, bestätigte diese Schlußfolgerung<sup>[30]</sup>.

Für die Charakterisierung der  $S'$ -Spezifität von  $\alpha$ -Chymotrypsin ist es demnach ausreichend, eine Serie von Nucleophilen mit einem bestimmten Acyldonor umzusetzen. Die resultierenden Daten lassen sich mit einer für präparative Belange ausreichenden Genauigkeit auf andere Acyldonorester übertragen.

## 8. Konkurrenz um das freie Enzym

Neben der bereits ausführlich behandelten Hydrolyse des Acylenzyms ist als weitere Nebenreaktion der Angriff auf Bindungen des Peptidproduktes durch das Enzym praktisch relevant (vgl. Abb. 3), wobei es zur Sekundärhydrolyse der geknüpften Peptidbindung kommen kann. Mit zunehmender Länge des zu synthetisierenden Peptids nimmt aber auch die Wahrscheinlichkeit zu, daß andere Bindungen im Produkt der Spezifität des Enzyms entsprechen und angegriffen werden. Akkumuliert sich im Verlauf der Reaktion ein Produkt mit einer proteaselabilen Bindung, dann kommt es beim Fortschreiten der Reaktion zu einer weiteren enzymatischen Umsetzung des gewünschten Produktes. Eine kinetische Analyse solcher Reaktionen ist Voraussetzung für die gezielte Optimierung der Peptidausbeute.

Sollen die Gesetzmäßigkeiten von proteolytischen Folgereaktionen herausgearbeitet werden, so ist es ausreichend anzunehmen, daß das Peptidprodukt neben der gerade geknüpften Peptidbindung nur noch eine weitere proteaselabile Bindung hat. Der Reaktionsmechanismus für diesen Fall wird in Schema 2 wiedergegeben. Ungeachtet der großen



Schema 2. Proteasekatalysierter Acyltransfer und konkurrierende Umsetzung des Peptidproduktes P<sub>3</sub>. Bei der Reaktion von P<sub>3</sub> zu EA' wird eine andere Bindung gespalten als die im oberen Teil des Schemas geknüpfte Bindung. Buchstabensymbole siehe Schema 1.

Anzahl von Geschwindigkeits- und Gleichgewichtskonstanten in Schema 2 lassen sich die kinetischen Verhältnisse in einer relativ einfachen Weise diskutieren, wenn man neben der bereits verwendeten Partitionskonstante weitere Parameter für die Enzymspezifität einführt. Alle verwendeten kinetischen Parameter und ihre Bedeutung sind in Tabelle 4 zusammengestellt.



Tabelle 4. Kinetische Parameter zur Beschreibung proteasekatalysierter Acyltransferreaktionen. Die Parameter charakterisieren jeweils die Konkurrenz zwischen den zwei Reaktionswegen in Schema 2. Die Quotienten  $k_2/K_s$ ,  $k'_2/K'_s$ ,  $k_{-4}/K_{p_1}$  und  $k'_{-4}/K'_{p_1}$  entsprechen den Gleichgewichtskonstanten für die Reaktionen 2. Ordnung, die in den beiden letzten Spalten der Tabelle angegeben sind. Sie sind damit gleich den Spezifitätskonstanten  $k_{\text{kat}}/K_M$  dieser Reaktionen.

Parameter	Gleichung [a]	Konkurrierende Reaktionen	
$p$	$p = [N] \frac{k_2}{k_4} + K_N \frac{k_3}{k_4}$	$EA \longrightarrow P_2$	$EA + N \longrightarrow P_3$
$p'$	$p' = [N] \frac{k'_2}{k'_4} + K'_N \frac{k'_3}{k'_4}$	$EA' \longrightarrow P'_2$	$EA' + N \longrightarrow P'_3$
$\alpha$	$\alpha = \frac{k_{-4}/K_{p_1}}{k_2/K_s}$	$E + P_3 \longrightarrow EA$	$E + S \longrightarrow EA$
$\alpha'$	$\alpha' = \frac{k'_{-4}/K'_{p_1}}{k'_2/K'_s}$	$E + P'_3 \longrightarrow EA'$	$E + S \longrightarrow EA'$
$\alpha_1$	$\alpha_1 = \frac{k_2/K_s}{k_3/K_4}$	$E + P_3 \longrightarrow EA'$	$E + S \longrightarrow EA$

[a] Die Gleichung gibt den Parameter entsprechend Schema 2.

### 8.1. Parameter $\alpha$ der Sekundärhydrolyse

Der Angriff der neu geknüpften Peptidbindung durch das Enzym ist die Umkehrung der Aminolyse des Acylenzyms, d. h. bei jeder enzymatischen Peptidsynthese muß mit diesen Nebenreaktionen gerechnet werden. Für das Verständnis der Kinetik ist entscheidend, daß der eingesetzte Acyldonor und das entstehende Peptidprodukt um das freie Enzym konkurrieren. Dementsprechend bestimmen die Konzentrationsverhältnisse und die Spezifitätskonstanten  $k_{\text{kat}}/k_M$ , welche Substanz bevorzugt umgesetzt wird.

Die Tendenz zur Sekundärhydrolyse bei kinetisch kontrollierten Synthesen wird durch den Parameter  $\alpha$  charakterisiert<sup>[44]</sup> (siehe Tabelle 4). Ein kleiner  $\alpha$ -Wert bedeutet, daß die Sekundärhydrolyse kaum auftritt.

Werden Serinproteasen bei der Synthese verwendet, so muß in der Regel nicht mit der Sekundärhydrolyse des Produktes gerechnet werden, solange noch etwas Acyldonor-ester im Ansatz vorhanden ist. Für Enzyme dieser Klasse bilden Ester meist wesentlich bessere Substrate als Peptide mit dem gleichen Acylteil. Bei Cysteinproteasen ist die Bevorzugung von Estersubstraten deutlich geringer<sup>[35]</sup> und proteolytische Nebenreaktionen wurden beobachtet<sup>[48]</sup>.

### 8.2. Parameter $\alpha_1$ der Spezifität

Vergleicht man die Vielfalt der zu synthetisierenden Peptidsequenzen mit der begrenzten Anzahl der für präparative Zwecke verfügbaren Proteasen, so wird deutlich, daß man vor allem bei der Verknüpfung längerer Peptidsegmente keine absolute Spezifität der Enzyme für die zu synthetisierende Bindung voraussetzen kann. Soll die proteasekatalysierte Peptidsynthese nicht von vornherein auf wenige Spezialfälle beschränkt bleiben, dann muß die Segmentverknüpfung auch dann möglich sein, wenn das Peptidprodukt mehrere Spaltstellen für das Enzym enthält.

Für die in Schema 2 dargestellte Reaktion wurde angenommen, daß das Peptidprodukt  $P_3$  neben der unmittelbar geknüpften Bindung noch eine weitere proteaselabile Bindung enthält. Zur Beschreibung der Konkurrenz zwischen dieser Bindung und dem Acyldonor um das freie Enzym

fürten wir den Parameter  $\alpha_1$  ein<sup>[48]</sup>, wie in Tabelle 4 beschrieben.

### 8.3. Berechnung des Reaktionsverlaufs

Unter Anwendung des Steady-state-Prinzips läßt sich auf der Basis der in Tabelle 4 enthaltenen Parameter aus Schema 2 das folgende Gleichungssystem (11)–(16) ableiten. Die nu-

$$\frac{d[P_2]}{dt} = [E] \frac{k_2}{K_s} \frac{[S] + \alpha[P_3]}{1 + [N]/p} \quad (11)$$

$$\frac{d[P_3]}{dt} = [E] \frac{k_2}{K_s} \frac{[S][N]/p - (\alpha + \alpha_1 + \alpha_1[N]/p)[P_3]}{1 + [N]/p} \quad (12)$$

$$\frac{d[P'_2]}{dt} = [E] \frac{k_2}{K_s} \alpha_1 \frac{[P_3] + \alpha'[P'_3]}{1 + [N]/p'} \quad (13)$$

$$\frac{d[P'_3]}{dt} = [E] \frac{k_2}{K_s} \alpha_1 \frac{[P_3][N]/p' - \alpha'[P'_3]}{1 + [N]/p'} \quad (14)$$

$$[N] = [N]_0 - [P_3] - [P'_2] - 2[P'_3] \quad (15)$$

$$[S] = [S]_0 - [P_2] - [P_3] - [P'_2] - [P'_3] \quad (16)$$

merische Lösung dieses Gleichungssystems ermöglicht die Berechnung der Ausbeute an Peptidprodukt ausgehend von den vorgegebenen Anfangsbedingungen (Konzentration an Nucleophil und Acyldonor).

Der Term  $[E]k_2/K_s$  tritt in allen vier Differentialgleichungen auf und hat dementsprechend keinen Einfluß auf die Konzentrationsverhältnisse der einzelnen Produkte. Die Enzymkonzentration beeinflusst lediglich die Geschwindigkeit der Reaktion, nicht jedoch ihren Verlauf oder die Ausbeute an  $P_3$ .

Um die Bedeutung der einzelnen Parameter zu erläutern ist es nützlich, die Bedingungen im Produktmaximum zu betrachten. Es ist erreicht, wenn  $d[P_3]/dt = 0$  gilt. Bezeichnet man die Konzentrationen an Acyldonor und Nucleophil zum Zeitpunkt maximaler Produktkonzentration mit  $[S]^*$  bzw.  $[N]^*$ , so ergibt sich aus Gleichung (12) Gleichung (17).

$$[P_3]_{\text{max}} = \frac{[N]^*[S]^*}{p(\alpha + \alpha_1 + \alpha_1[N]^*/p)} \quad (17)$$

Um hohe Produktausbeuten zu erhalten, müssen demnach  $[N] > p$ ,  $\alpha < 1$  und  $\alpha_1 < 1$  sein.

Das hier beschriebene Verfahren entspricht dem Ansatz von Gololobov et al.<sup>[44]</sup>, der um die Erfassung der Folgereaktionen des Produktes erweitert wurde. Ein modifizierter Ansatz zur Abschätzung der Produktkonzentration wurde von Bratovanova et al.<sup>[69]</sup> vorgeschlagen.

### 8.4. Bestimmung der $\alpha$ -Parameter

Der formal einfachste Weg zur Bestimmung der einzelnen  $\alpha$ -Parameter ergibt sich aus den in Tabelle 4 angegebenen Gleichungen. Dazu müssen die Hydrolyse des Acyldonor-esters und der Peptidprodukte  $P_3$  und  $P'_3$  kinetisch unter-

sucht werden. Bei der Hydrolyse des Peptidproduktes muß beachtet werden, daß es mehrere Spaltstellen enthalten kann. Die einzelnen Spaltstellen können als konkurrierende Substrate behandelt werden, d. h. die Umsetzung erfolgt proportional zu den Spezifitätskonstanten des Enzyms für die einzelnen Bindungen.

Einfacher ist die Analyse des Produktgemisches zum Zeitpunkt maximaler Ausbeute zu realisieren. Aus den Konzentrationsverhältnissen können die  $\alpha$ -Parameter mit Gleichung (17) errechnet werden. Für eine separate Bestimmung von  $\alpha$  und  $\alpha_1$  müssen mehrere Reaktionen mit verschiedenen Nucleophilkonzentrationen untersucht werden.

## 8.5. Möglichkeiten zur Unterdrückung von Konkurrenzreaktionen

Beobachtet man bei einer kinetisch kontrollierten proteasekatalysierten Synthesereaktion unerwünschte Folgereaktionen, dann ist es zunächst unwesentlich, welche Bindung vom Enzym gespalten wird. Es zeigt lediglich, daß die Spezifität des Enzyms zum Acyldonor nicht entscheidend über der Spezifität zum Peptidprodukt liegt. Da strukturelle Veränderungen in den Aminosäurebausteinen der Reaktanten nicht möglich sind, bleibt als einzige Variable die Abgangsgruppe des Acyldonors. Das verändern der Abgangsgruppen an der Carboxykomponente ist daher sehr wichtig, um unerwünschten Nebenreaktionen entgegenzuwirken. So konnte für Synthesen mit Carboxypeptidase Y<sup>[70]</sup> und Papain<sup>[71]</sup> durch die Wahl geeigneter Abgangsgruppen die Folgereaktionen am Produkt unterdrückt werden.

Am Beispiel der chymotrypsinkatalysierten Synthese des chromogenen Chymotrypsinsubstrates Mal-Leu<sup>1</sup>-Phe<sup>7</sup>-pNA (der Pfeil von oben zeigt die neu geknüpfte Peptidbindung), das wir als Modell für Peptidprodukte mit einer hochsensitiven Spaltstelle wählten, lassen sich chymotryptische Folgereaktionen (Pfeil von unten) in einfacher Weise photometrisch nachweisen<sup>[72]</sup>. Tabelle 5 zeigt deutlich den Zusammenhang zwischen der Spezifität des Acyldonoresters und der erzielten Syntheseausbeute. Während bei Verwendung

Tabelle 5. Einfluß der Spezifität des Acyldonors auf die  $\alpha$ -chymotrypsinkatalysierte Synthese von Mal-Leu-Phe-pNA [72].

Acyldonor	$k_{\text{cat}}/K_M$ [ $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ]	Ausbeute [%]
Mal-Leu-OMe	$4.7 \times 10$	3
Mal-Leu-OBzl	$3.2 \times 10^3$	65
Mal-Leu-ONb	$1.5 \times 10^4$	80.5

von Mal-Leu-OMe die Geschwindigkeit der Produktspaltung nach kurzer Zeit die Geschwindigkeit seiner Bildung erreicht, führt der Einsatz der spezifischeren Acyldonorester zu einer deutlichen Produktakkumulation. Erst nachdem Mal-Leu-ONb fast vollständig verbraucht war, konnte die Umsetzung des Produktes registriert werden. Dies zeigt, daß durch die Wahl spezifischer Abgangsgruppen des Acyldonors auch proteaselabile Produkte in guter Ausbeute erhalten werden können.

Werden inverse Substrate bei trypsinkatalysierten Peptidsynthesen eingesetzt, erfolgt eine noch wirksamere Unter-

drückung von Folgereaktionen. Bei inversen Trypsinsubstraten<sup>[73]</sup> befindet sich die für die Trypsinkatalyse erforderliche positive Ladung nicht in der  $P_1$ -Position, sondern in der Abgangsgruppe, woraus ein sehr interessantes Synthesekonzept für eine praktisch irreversible trypsinkatalysierte Peptidsynthese entwickelt wurde<sup>[74]</sup>. Von den bisher synthetisierten Acylaminosäureestern mit positiv geladenen Abgangsgruppen erwiesen sich die *p*-Guanidinophenylester als besonders günstig. Die extrem niedrige Spezifität von Trypsin für den Acylteil solcher inverser Substrate ermöglicht sogar die Knüpfung von Peptidbindungen nach Prolin, die normalerweise proteasekatalysiert nicht einfach zu realisieren sind. Mit diesem Konzept der inversen Substrate können somit trypsinkatalysierte Synthesen von Peptiden unabhängig vom Seitenkettenrest in der  $P_1$ -Position durchgeführt werden. Desweiteren ist die neugeknüpfte Peptidbindung nahezu resistent gegenüber der Sekundärhydrolyse, sieht man von trypsinlabilen -Arg(Lys)-Xaa-Bindungen ab. Von einer weiteren Syntheseoptimierung der inversen Substrate wird es abhängen, ob sich diese Strategie zu einer Standardmethode entwickeln kann.

Auch die Reaktionsbedingungen beeinflussen den Verlauf kinetisch kontrollierter Synthesen in unterschiedlicher Weise. Höhere pH-Werte begünstigen die Zunahme der nicht-protonierten Form der Aminokomponente und damit die Effizienz der aminolytischen Desacylierung des Acylenzyms. Gleichzeitig bewirkt eine pH-Wert-Erhöhung bei einigen Enzymen die Proteolysestabilität geknüpfter Bindungen. Bei der papainkatalysierten Synthesen führte beispielsweise eine Temperaturniedrigung von 40 °C auf 5 °C zu einer deutlichen Verringerung unerwünschter Folgereaktionen<sup>[48]</sup>.

Völlig neue Möglichkeiten eröffnet die proteasekatalysierte Synthese von Peptiden in gefrorenem Medium<sup>[75]</sup>. Bei Temperaturen bis -25 °C verbesserte sich das Verhältnis zwischen Aminolyse und Hydrolyse des Acylenzyms drastisch, vermutlich durch eine stark lokale Konzentrierung des Nucleophils. Mit diesem Verfahren war z. B. die chymotrypsinkatalysierte Anknüpfung von freien Aminosäuren möglich, die bei 25 °C keine detektierbaren Produktmengen liefert.

Sehr umfassend wurde die Möglichkeit der proteasekatalysierten Peptidsynthesen in organischen Lösungsmitteln untersucht<sup>[76]</sup>, unter anderem chymotrypsinkatalysierte Acyltransferreaktionen in unpolaren Lösungsmitteln in Gegenwart von Salzhydraten<sup>[77, 78]</sup>. Neben einer Minimierung unerwünschter proteolytischer Produktschädigungen sowie einer Verbesserung der Reaktantenlöslichkeit bieten proteasekatalysierte Synthesen in monophasischen organischen Lösungsmitteln günstige Voraussetzungen für die Anpassung der Reaktionsmedien zwischen enzymatischen und chemischen Syntheseschritten im Sinne der anzustrebenden enzymochemischen Synthesestrategie. Enzymatische Synthesen in monophasischen organischen Lösungsmitteln werden vielfach schon als Reaktionen mit lösungsmittelmodifizierten Enzymen bezeichnet. Neben einer solchen Modifizierung können aber Proteasen auch chemisch so verändert werden, daß sie sich in organischen Lösungsmitteln selbst lösen, wie beispielsweise Polyethylenglycol(PEG)-modifiziertes Chymotrypsin<sup>[79, 80]</sup> oder Papain<sup>[81]</sup>. Unter diesen Bedingungen können proteolytische Reaktionen meist vollständig unterdrückt werden. Reaktionen in monophasischen organischen Systemen haben aber auch Nachteile, wie die

drastische Verminderung der Geschwindigkeit der katalysierten Reaktion, den weitgehenden Verlust der Regiospezifität und damit notwendigen Schutz von Seitenkettenfunktionen, die Veränderungen der Substratspezifität sowie die notwendige Entsorgung organischer Lösungsmittel.

Chemisch und gentechnisch modifizierte Proteasen wurden aufgrund der erhöhten Lösungsmitteltoleranz und auch aufgrund der verminderten Amidase- und Peptidaseaktivität erfolgreich für Synthesen eingesetzt. Unter Verwendung von Cyanmethylestern erwies sich Methylchymotrypsin<sup>[82]</sup> als ein vorteilhafter Biokatalysator, der durch die abgeschwächte esterolytische Aktivität ebenfalls eine Verknüpfung von Aminokomponenten mit C-terminalen Alkylestergruppierungen ermöglicht. Thiolsubtilisin<sup>[83]</sup> ist gegenüber spezifischen Estersubstraten aktiv, zeigt aber keine Amidase- und Peptidaseaktivität. Es bewährte sich bei Synthesen von Leu-Enkephalin und einer Partialsegmentsynthese von Ribonuclease T<sub>1</sub>. Gute Einsatzmöglichkeiten zeigen auch das [Met(O)]<sup>192</sup> Chymotrypsin bei der Synthese von L,D-Dipeptiden<sup>[84]</sup>. Von Wong et al.<sup>[85]</sup> wurde durch multiple ortsgerichtete Mutagenese Subtilisin BPN' in die als Subtilisin 8350 bezeichnete Mutante überführt, mit der kinetisch kontrollierte Synthesen in Gegenwart hoher Konzentrationen an Dimethylformamid durchgeführt werden können. Diese von Wong et al. initiierte Entwicklung ebnet sicherlich den Weg für eine neue Phase der proteasekatalysierten Peptidsynthese.

Nichtproteasen sollten eigentlich günstig für enzymatische Peptidsynthesen sein, da unerwünschte proteolytische Spaltungen in Reaktanten und Produkt ausgeschlossen werden können. Als Alternativen zu den Proteasen bieten sich neben anderen Hydrolasen auch Synthetasen an. Lipasen, die die für Serinproteasen typische katalytische Triade enthalten<sup>[86, 87]</sup>, scheinen besonders geeignet. So wurden auch mit einigen Lipasen und mit Schweineleberesterase verschiedene Peptidderivate synthetisiert<sup>[88–90]</sup>. Anstelle einfacher Alkylester sind nach Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Wong<sup>[88, 89]</sup> Acyldonorester mit länger-kettigen Abgangsgruppen wie Glycerol oder *n*-Octanol besser geeignet. Von Lipase werden auch D-Aminosäurederivate als Substrate akzeptiert. So wurde lipasekatalysiert das Dipeptid *N*<sup>α</sup>-Phenacetyl-L-cysteinyl-D-valin synthetisiert<sup>[89]</sup>, das durch eine Cyclase in Penicillin G umgewandelt werden kann<sup>[91]</sup>.

Die Verwendung von Synthetasen für die Peptidsynthese ist durch die praktische Irreversibilität des Peptidbindungsschrittes sehr vorteilhaft. Neben dem Aminoacyl-tRNA-Synthetase-Aminoadenylat-Komplex<sup>[92, 93]</sup> und der Arginyl-tRNA:Protein-Arginyltransferase<sup>[94]</sup> wurden weitere Synthetase-Komplexe<sup>[95]</sup> für spezielle C-N-Knüpfungen erprobt, insbesondere für die Synthese mikrobieller bioaktiver Peptide. Enzymatische Synthesen von Cyclosporin und Analoga, Gramicidin S, spezieller  $\beta$ -Lactamantibiotica etc. unterstreichen die zunehmende Bedeutung des Einsatzes solcher Multienzymkomplexe.

## 9. Planung und Optimierung proteasekatalysierter Synthesen

Enzyme können bei der Synthese von Peptiden nur dann einen sinnvollen Beitrag zu einer Synthesestrategie leisten, wenn die Vorteile enzymatischer Reaktionen dabei voll wirk-

sam werden. Der schrittweise, enzymatische Aufbau einer Peptidkette in Konkurrenz zur Festphasen-Peptidsynthese ist a priori ein falscher Ansatz und völlig unrealistisch. Nichts spricht aber dagegen, Di- und Tripeptide im großen Maßstab herzustellen, was sogar in einer kontinuierlichen Prozeßführung möglich ist<sup>[96, 97]</sup>. Für den Aufbau von bioaktiven Peptidwirkstoffen mittlerer Kettenlänge ist von Fall zu Fall zu prüfen, ob besonders racemisierungsgefährdete Peptidbindungen besser unter Enzymkatalyse geknüpft werden sollten. Handelt es sich um die Maßstabsvergrößerung eines vorliegenden Peptids, dann sind auch aus ökologischen Erwägungen nach Möglichkeit enzymatische Schritte zu integrieren. Durch vorgelagerte Proteolysestudien lassen sich Hinweise über die Spezifität der einzusetzenden Enzyme erhalten.

Von besonderem Interesse ist auch die proteasekatalysierte Modifikation gentechnisch hergestellter Peptidketten durch Acyltransferreaktionen. So können beispielsweise, durch die Kenntnisse zur S'-Spezifität von  $\alpha$ -Chymotrypsin, für dieses Enzym spezifische Spaltstellen in eine Peptidkette eingefügt werden. Am Beispiel eines Modellpeptids mit einer chymotrypsinlabilen Sequenz ließ sich experimentell zeigen, daß die chymotrypsinkatalysierte Modifikation des C-Terminus durch Transpeptidierung möglich ist<sup>[98]</sup>.

Neben der Enzymspezifität beeinflusst auch die Eduktlöslichkeit in gravierender Weise die Einsatzmöglichkeiten von Enzymen, wenn auch prinzipiell viele Lösungsmittel vom Idealmedium Wasser bis zu monophasischen organischen Lösungsmitteln eingesetzt werden können. Stets bestimmt der Charakter der Peptidedukte sowie der Schutzgruppen den einzugehenden Kompromiß in der Frage des Lösungsmittels.

Im Normalfall sind die für den Verlauf von enzymatischen Synthesen wesentlichen kinetischen Parameter im voraus nicht bekannt. Bestenfalls wird man diese Parameter ausgehend von Daten für ähnliche Substrate oder Nucleophile abschätzen können. Solche Schätzungen sind meist für die Festlegung einer optimalen Synthesestrategie ausreichend. Die Größen, die für die Optimierung der Peptidproduktausbeute notwendig sind, erhält man durch die Analyse des Verlaufs der Acyltransferreaktion. Die Konzentrationsverhältnisse der Reaktanten und der Produkte liefern die entscheidende Information, welcher Parameter die Ausbeute an Produkt limitiert. Dazu sollten die folgenden Punkte beachtet werden:

- In der Initialphase der Reaktion ist die Produktkonzentration niedrig. Dementsprechend können Folgereaktionen des Produktes vernachlässigt werden und man kann aus dem Verhältnis zwischen Peptidprodukt P<sub>3</sub> und Hydrolyseprodukt P<sub>2</sub> die Partitionskonstante errechnen. Wird  $p > [N]_0$ , d. h. ein großer Teil des Acyldonors hydrolysiert, so muß die Konzentration an Nucleophil erhöht oder die Reaktionsbedingungen (Temperatur, Zusatz von Lösungsmitteln oder anorganischen Salzen) optimiert werden.
- Informationen über das Auftreten von Folgereaktionen werden aus der Analyse des Reaktionsansatzes im Ausbeutemaximum für P<sub>3</sub> erhalten. Ist zu diesem Zeitpunkt der Acyldonorester noch hoch konzentriert, so ist die Spezifitätskonstante  $k_{\text{kat}}/K_M$  für den Acyldonor zu klein. In diesem Fall ist eine Ausbeutesteigerung über eine Erhöhung der Konzentration an Acyldonor oder günstiger über die Wahl einer spezifischeren Abgangsgruppe des Acyldonoresters zu erreichen.

c) In der Regel ist es günstig, den Acyldonor bei enzymatischen Synthesen im Überschuß einzusetzen, denn in Gegenwart des Acyldonors ist das Peptidprodukt vor einem Angriff des Enzyms weitgehend geschützt. Außerdem ist ein gewisser Verlust an Acyldonor durch Hydrolyse nicht vermeidbar.

Die Anwendung dieser Strategie ermöglichte die schnelle Optimierung der Synthese von D-Phe(6)-GnRH in einer chymotrypsinkatalysierten (3 + 7)-Segmentkondensation<sup>[99]</sup>. Bei geringerem Substanzbedarf für die Prozeßoptimierung gelang es, geeignete Reaktionsbedingungen zu finden, um eine Ausbeute von über 97 % zu erhalten.

Wird eine Reaktion im großen Maßstab durchgeführt, so sollten die wesentlichen kinetischen Parameter im voraus bestimmt werden. Um eine Abschätzung der zu erwartenden Ausbeute auf der Grundlage dieser Parameter zu erleichtern, haben wir das in Abbildung 8 dargestellte Diagramm berechnet. Werden die Parameter  $\alpha_1$  und  $p$  sowie die eingesetzte

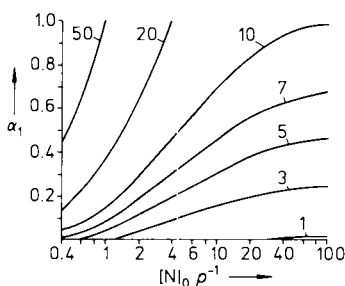


Abb. 8. Zusammenhang zwischen den kinetischen Parametern der Reaktion und den für die präparative Peptidsynthese erforderlichen Reaktantenkonzentrationen. Sind  $\alpha_1$ ,  $[N]_0$  und  $p$  gegeben, so läßt sich aus dem Diagramm das Verhältnis  $[S]_0/[N]_0$  ablesen, für das eine Ausbeute an Peptidprodukt von 90 % erhalten wird. Die Werte wurden ausgehend von dem Gleichungssystem (11)–(16) in Abschnitt 8.3 durch numerische Integration errechnet. Dazu wurde ein iteratives Verfahren nach Runge-Kutta benutzt [100]. Die weiteren in Tabelle 4 enthaltenen kinetischen Parameter wurden wie folgt behandelt: Für  $\alpha$  wurde ein Wert von 0,001 angenommen. Dies entspricht der Erfahrung, daß bei den meisten kinetisch kontrollierten Peptidsynthesen die Sekundärhydrolyse der geknüpften Bindung nur sehr langsam erfolgt. (Ist diese Bedingung nicht erfüllt, so kann in guter Näherung an Stelle von  $\alpha_1$  der Wert  $\alpha_{app} = (\alpha + \alpha_1 + \alpha_1[N]_0/p)$  eingesetzt werden). Weiterhin wurde  $p = p'$  angenommen. Wie in Abschnitt 7.3 gezeigt wurde, ist die Partitionskonstante in der Regel wenig von der Struktur des zu übertragenden Acylteils abhängig. Es wurde  $\alpha' = 1$  gesetzt, da es sich bei diesem Parameter um den Quotienten der Spezifitätskonstanten zweier Peptidsubstrate mit gleichem Acylteil handelt. Die Werte der Parameter  $\alpha'$  und  $p'$  sind von geringem Einfluß auf das Ergebnis der Rechnung. Variation dieser Parameter um eine Größenordnung ergab vernachlässigbare Änderungen der berechneten Ausbeute an Peptidprodukt. Dies ist verständlich, da beide Parameter die Folgereaktion des Peptidproduktes beschreiben. Wird eine Ausbeute von 90 % angestrebt, so muß das Auftreten von Folgereaktionen aber auf ein Minimum reduziert sein. Die Zahlen 1, 3, 5, 7, 10, 20, 50 an den Kurven geben das Verhältnis  $[S]_0/[N]_0$  an, bei dem eine Peptidausbeute von 90 % erhalten wird.

Konzentration an Aminokomponente vorgegeben, so kann aus der Grafik abgelesen werden, welche Konzentration an Acyldonor erforderlich ist, um eine Ausbeute an Peptidprodukt von 90 % bezogen auf die eingesetzte Aminokomponente zu erhalten.

## 10. Ausblick

Proteasekatalysierte kinetisch kontrollierte Peptidsynthesen haben eine Reihe von Vorteilen, die ihren Einsatz in der Peptid- und Proteinchemie attraktiv machen. Insbesondere

die Stereo- und Regiospezifität der Proteasen, die eine racemisierungsfreie Verknüpfung von Segmenten mit ungeschützten Seitenkettenfunktionen ermöglicht, ist für die präparative Zielsetzung von großer Bedeutung.

Zur Zeit dominieren Modelluntersuchungen an kleinen Peptiden, die die Charakterisierung der Spezifität der Enzyme und der den Reaktionsverlauf bestimmenden Parameter zum Ziel haben. Weitere Meßserien insbesondere zur Spezifität der  $S'$ -Bindungsorte der kostengünstig verfügbaren Proteasen sind erforderlich, um die Planung enzymochemischer Synthesen zu erleichtern. Für die Zukunft erscheint es durchaus möglich, mit ortsgerichteter Mutagenese die Spezifität der Proteasen an die praktischen Erfordernisse der Synthese anzupassen. Es ist auch an der Nutzung katalytischer Antikörper zu denken, deren Spezifität dem Syntheseobjekt angepaßt werden könnte.

Ein weiteres breites Anwendungsgebiet für proteasekatalysierte Reaktionen ergibt sich aus der raschen Entwicklung der DNA-Rekombinationstechniken. Diese Methoden liefern nahezu beliebig lange Peptidsequenzen, sind jedoch auf die 20 proteinogenen Aminosäuren beschränkt. Eine selektive chemische Modifikation genetisch hergestellter Peptide ist durch die Vielzahl ungeschützter Seitenkettenfunktionen kaum möglich. Eine Kombination von DNA-Rekombinationstechniken mit einem sich anschließenden proteasekatalysierten Processing könnte in Zukunft ein wichtiger Zugang zu länger-kettigen bioaktiven Peptiden sein.

Eingegangen am 31. Oktober 1990 [A 839]

- [1] Siehe beispielsweise J. Meienhofer, *Biopolymers* 20 (1981) 1761–1784.
- [2] J. H. van't Hoff, *Z. Anorg. Chem.* 18 (1898) 1–13.
- [3] M. Bergmann, H. Fraenkel-Conrat, *J. Biol. Chem.* 119 (1937) 707–720.
- [4] H.-D. Jakubke, P. Kuhl, A. Könnicke, *Angew. Chem.* 24 (1985) 85–93; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 24 (1985) 85–93.
- [5] W. Kullmann: *Enzymatic Peptide Synthesis*, CRC, Boca Raton, USA 1987.
- [6] H.-D. Jakubke in S. Udenfriend, J. Meienhofer (Hrsg.): *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology, Band 9*, Academic, New York 1987, S. 103–165.
- [7] K. Morihara, *Trends Biotechnol.* 5 (1987) 164–170.
- [8] V. Kasche in R. J. Beynon, J. S. Bond (Hrsg.): *Proteolytic Enzymes: a practical approach*, IRL, Oxford 1989, S. 125–143.
- [9] C. Walsh: *Enzymatic Reaction Mechanisms*, Freeman, San Francisco 1979.
- [10] A. R. Fersht: *Enzyme structure and mechanism*, Freeman, New York 1985.
- [11] P. W. Inward, W. P. Jencks, *J. Biol. Chem.* 240 (1965) 1986–1996.
- [12] M. L. Bender, G. E. Clement, C. R. Gunter, F. J. Kezdy, *J. Am. Chem. Soc.* 86 (1964) 3697–3703.
- [13] B. Zerner, M. L. Bender, *J. Am. Chem. Soc.* 86 (1964) 3669–3674.
- [14] a) F. Widmer, J. T. Johansen, *Carlsberg Res. Commun.* 44 (1979) 37–46; b) K. Bredam, F. Widmer, J. T. Johansen, *ibid.* 45 (1980) 361–367; c) F. Widmer, K. Bredam, J. T. Johansen, *ibid.* 45 (1980) 453–463; d) *ibid.* 46 (1981) 97–106.
- [15] T. Oka, K. Morihara, *J. Biochem.* 82 (1977) 1055–1062.
- [16] G. Fortier, S. L. MacKenzie, *Biotechnol. Lett.* 8 (1986) 777–782.
- [17] K. Morihara, T. Oka, *Biochem. J.* 183 (1977) 531–538.
- [18] S. A. Bizzozero, B. A. Rovagnati, H. Dutler, *Helv. Chim. Acta* 65 (1982) 1707–1719.
- [19] Yu. V. Mitin, N. P. Zapevalova, E. Yu. Gorbunova, *Int. J. Pept. Protein Res.* 23 (1984) 528–534.
- [20] E. N. Lysogorskaya, I. Yu. Philipova, S. E. Boytsova, E. S. Oksenoit, L. A. Lyublinskaya, V. M. Stepanov, *Bioorg. Khim.* 9 (1983) 470–477.
- [21] I. Schechter, A. Berger, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 27 (1967) 157–162.
- [22] L. J. Brubacher, M. L. Bender, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 27 (1967) 176–182.
- [23] A. L. Fink, M. L. Bender, *Biochemistry* 8 (1969) 5109–5118.
- [24] M. R. Alecio, M. L. Dann, G. Lowe, *Biochem. J.* 141 (1974) 495–501.
- [25] L. J. Brubacher, M. L. Bender, *J. Am. Chem. Soc.* 88 (1966) 5871–5899.
- [26] R. L. Stein, A. M. Strimpler, *Biochemistry* 26 (1987) 2238–2242.

- [27] V. Schellenberger, U. Schellenberger, Yu. V. Mitin, H.-D. Jakubke, *Eur. J. Biochem.* 179 (1989) 161–163.
- [28] U.-K. Hanisch, A. Könecke, V. Schellenberger, H.-D. Jakubke, *Biocatalysis* 1 (1987) 129–136.
- [29] D. D. Petkov, I. Stoineva, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 118 (1984) 317–323.
- [30] V. Schellenberger, U. Schellenberger, Yu. V. Mitin, H.-D. Jakubke, *Eur. J. Biochem.* 187 (1990) 163–167.
- [31] L. Riechmann, V. Kasche, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120 (1984) 686–691.
- [32] A. R. Fersht, D. M. Blow, J. Fastrez, *Biochemistry* 12 (1973) 2035–2041.
- [33] M. Schuster, A. Aaviksaar, V. Schellenberger, H.-D. Jakubke, *Biochim. Biophys. Acta* 1036 (1990) 245–247.
- [34] M. Schuster, A. Aaviksaar, V. M. Stepanov, G. N. Rudenskaya, H.-D. Jakubke, *Biomed. Biochim. Acta* 50 (1991) 139–143.
- [35] B. Asboth, L. Polgar, *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.* 12 (1977) 329–333.
- [36] M. Ottesen, I. Svendsen in G. E. Perlmann, L. Lorand (Hrsg.): *Methods in Enzymology, Band 19*, Academic, New York 1970, S. 199–215.
- [37] V. Schellenberger, H.-D. Jakubke, *Biochim. Biophys. Acta* 869 (1986) 54–60.
- [38] A. L. Fink, M. L. Bender, *Biochemistry* 8 (1969) 5109–5118.
- [39] M. Yu. Gololobov, V. K. Svedas, *Biokhimiya (Moscow)* 53 (1988) 1174–1180.
- [40] A. Schwarz, D. Steinke, M.-R. Kula, C. Wandrey, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 12 (1990) 188–195.
- [41] A. Könecke, V. Schellenberger, H.-J. Hofmann, H.-D. Jakubke, *Pharmazie* 39 (1984) 785–786.
- [42] J. B. West, W. J. Hennen, J. L. Labonde, J. A. Bibbs, Z. Zhong, E. F. Meyer, Jr., C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* 112 (1990) 5313–5320.
- [43] P. Clapez, G. Valencia, J. L. Torres, F. Reig, J.-M. Garcia-Anton, J. Mata-Alvarez, *Biochim. Biophys. Acta* 953 (1988) 157–163.
- [44] M. Yu. Gololobov, I. L. Borisov, V. M. Belikov, V. K. Svedas, *Biotechnol. Bioeng.* 32 (1988) 866–872.
- [45] V. Schellenberger, U. Schellenberger, Yu. V. Mitin, H.-D. Jakubke, *Anal. Biochem.* 165 (1987) 327–330.
- [46] V. K. Svedas, I. J. Galaev, I. L. Borisov, I. V. Berezin, *Anal. Biochem.* 101 (1980) 188–195.
- [47] V. Schellenberger, M. Schuster, H.-D. Jakubke, *Biocatalysis* 4 (1990) 105–111.
- [48] M. Yu. Gololobov, U. Schellenberger, V. Schellenberger, H.-D. Jakubke, V. K. Svedas, *Biokhimiya (Moscow)* 55 (1990) 338–345.
- [49] A. R. Fersht, Y. Requena, *J. Am. Chem. Soc.* 93 (1971) 3499–3504.
- [50] B. W. Matthews, P. B. Sigler, R. Henderson, D. M. Blow, *Nature* 214 (1967) 652–656.
- [51] P. B. Sigler, D. M. Blow, B. W. Matthews, R. Henderson, *J. Mol. Biol.* 35 (1968) 143–164.
- [52] J. J. Birktoft, D. M. Blow, *J. Mol. Biol.* 68 (1972) 187–240.
- [53] J. Kraut, *Annu. Rev. Biochem.* 46 (1977) 331–358.
- [54] G. H. Nelson, J. L. Miles, W. J. Canady, *Arch. Biochem. Biophys.* 96 (1962) 545–549.
- [55] R. M. Eppand, I. B. Wilson, *J. Biol. Chem.* 238 (1963) 1718–1723.
- [56] R. E. Williams, M. L. Bender, *Can. J. Biochem.* 49 (1971) 210–217.
- [57] D. D. Petkov, E. Christova, I. Stoineva, *Biochim. Biophys. Acta* 527 (1978) 131–141.
- [58] C. Grieco, C. Hansch, C. Silipo, R. N. Smith, A. Vittoria, K. Yamada, *Arch. Biochem. Biophys.* 194 (1979) 542–551.
- [59] W. K. Baumann, S. A. Bizzozero, H. Dutler, *FEBS Lett.* 8 (1970) 257–260.
- [60] C.-A. Bauer, R. C. Thompson, E. R. Blout, *Biochemistry* 15 (1976) 1291–1295.
- [61] E. D. Djachenko, L. J. Volkova, L. V. Kozlov, V. K. Antonov, *Bioorg. Khim.* 2 (1976) 1665–1671.
- [62] C. R. Hill, G. C. Tomalin, *Arch. Biochem. Biophys.* 221 (1983) 324–328.
- [63] M. Laskowski, Jr., I. Kato, *Annu. Rev. Biochem.* 49 (1980) 593–626.
- [64] D. M. Blow, C. S. Wright, D. Kukla, A. Rühlmann, W. Steigemann, R. Huber, *J. Mol. Biol.* 69 (1972) 137–144.
- [65] V. Schellenberger, A. Aaviksaar, H.-D. Jakubke, *Biocatalysis* 4 (1991) 291–296.
- [66] B. Keil, *Protein Sequences Data Anal.* 1 (1987) 13–20.
- [67] M. Fujinaga, A. R. Sielecki, R. J. Read, W. Ardel, M. Laskowski, Jr., M. N. G. James, *J. Mol. Biol.* 195 (1987) 397–418.
- [68] a) V. Schellenberger, M. Kosk, H.-D. Jakubke, A. Aaviksaar, *Biochim. Biophys. Acta* 1078 (1991) 1–7; b) V. Schellenberger, H.-D. Jakubke, V. Kasche, *ibid.* 1078 (1991) 8–11.
- [69] E. K. Bratovanova, I. B. Stoineva, D. D. Petkov, *Tetrahedron* 44 (1988) 3633–3637.
- [70] K. Breddam, F. Widmer, J. T. Johanson, *Carlsberg Res. Commun.* 48 (1983) 231–237.
- [71] V. Schellenberger, U. Schellenberger, Yu. V. Mitin, H.-D. Jakubke, *Monatsh. Chem.* 120 (1989) 437–443.
- [72] V. Schellenberger, U. Schellenberger, A. Kucharski, H.-D. Jakubke in G. Jung, E. Bayer (Hrsg.): *Peptides 1988*, de Gruyter, Berlin 1989, S. 247–249.
- [73] a) K. Tanizawa, Y. Kasaba, Y. Kanaoka, *J. Am. Chem. Soc.* 99 (1977) 4484–4488; b) K. Tanizawa, Y. Kanaoka, W. Lawson, *Acc. Chem. Res.* 20 (1987) 337–343.
- [74] a) V. Schellenberger, H.-D. Jakubke, N. P. Zapevalova, Yu. V. Mitin, *Biotechnol. Bioeng.* 38 (1991) 104–108; b) V. Schellenberger, U. Schellenberger, H.-D. Jakubke, N. P. Zapevalova, Yu. V. Mitin, in E. Giralt, D. Andreu (Hrsg.): *Peptides 1990*, Escam, Leiden 1991, S. 287–288.
- [75] M. Schuster, A. Aaviksaar, H.-D. Jakubke, *Tetrahedron* 46 (1990) 8093–8102.
- [76] Siehe beispielsweise A. M. Klivanov, *Chemtech.* 16 (1986) 354–359.
- [77] P. Kuhl, S. Posselt, H.-D. Jakubke, *Pharmazie* 36 (1981) 463–465.
- [78] P. Kuhl, P. J. Halling, H.-D. Jakubke, *Tetrahedron Lett.* 31 (1990) 5213–5216.
- [79] A. Matsushima, M. Okada, Y. Inada, *FEBS Lett.* 178 (1984) 275–277.
- [80] H. P. Gaertner, A. J. Puigserver, *Proteins* 3 (1988) 130–137.
- [81] H. Lee, K. Takahashi, Y. Koder, T. Ohwada, T. Tsuzuki, A. Matsushima, Y. Inada, *Biotechnol. Lett.* 10 (1988) 403–407.
- [82] J. B. West, J. Scholten, N. J. Stolorow, J. L. Hogg, A. I. Scott, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* 110 (1988) 3709–3710.
- [83] T. Nakatsaka, T. Sasaki, E. T. Kaiser, *J. Am. Chem. Soc.* 109 (1987) 3808–3810.
- [84] J. B. West, C.-H. Wong, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1986, 417–418; J. B. West, W. J. Hennen, J. L. Lalonde, J. A. Bibbs, Z. Zhong, E. F. Meyer, Jr., C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* 112 (1990) 5313–5320.
- [85] C.-H. Wong, S.-T. Chen, W. J. Hennen, J. A. Bibbs, Y.-F. Wang, J.-C. Liu, M. W. Pantoliano, M. Whitlow, P. N. Bryan, *J. Am. Chem. Soc.* 112 (1990) 945–953.
- [86] F. K. Winkler, A. D'Acry, W. Hunzicker, *Nature* 343 (1990) 771.
- [87] L. Brady, A. M. Brzozowski, Z. S. Derewenda, E. Dodson, G. Dodson, S. Tolley, J. P. Turkenberg, L. Christiansen, B. Høge-Jensen, L. Nørskov, L. Thim, U. Menge, *Nature* 343 (1990) 767–770.
- [88] J. B. West, C.-H. Wong, *Tetrahedron Lett.* 28 (1987) 1629–1632.
- [89] J. R. Matos, J. B. West, C.-H. Wong, *Biotechnol. Lett.* 9 (1987) 233–236.
- [90] A. L. Margolin, A. M. Klivanov, *J. Am. Chem. Soc.* 109 (1987) 3802–3804.
- [91] J. M. Lugeno, M. T. S. Alemany, F. Salto, F. Ramos, M. J. Lopez-Nieto, J. F. Martin, *Biotechnology* 4 (1986) 44.
- [92] H. Nakajima, S. Kitabake, R. Tsurutani, I. Tomioka, K. Yamamoto, K. Imahori, *Biochim. Biophys. Acta* 790 (1984) 197–199.
- [93] M. Dombou, H. Nakashima, S. Kitabake, K. Tomita, K. Imahori, *Agric. Biol. Chem.* 50 (1986) 2967–2971.
- [94] M. Kato, T. Takanashi, *Agric. Biol. Chem.* 48 (1984) 2577–2578.
- [95] H. Kleinkauf, H. von Döhren (Hrsg.): *Biochemistry of Peptide Antibiotics*, de Gruyter, Berlin 1990.
- [96] A. Flörshäimer, M.-R. Kula, H.-J. Schütz, C. Wandrey, *Biotechnol. Bioeng.* 33 (1989) 1400–1405.
- [97] G. Hermann, A. Schwarz, C. Wandrey, G. Knaub, K. H. Drauz, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 13 (1991) 346–353.
- [98] V. Schellenberger, W. Tegge, R. Frank, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [99] V. Schellenberger, U. Schellenberger, H.-D. Jakubke, A. Hänsicke, M. Bienert, E. Krause, *Tetrahedron Lett.* 31 (1990) 7305–7306.
- [100] I. N. Bronstein, K. A. Semendjajew: *Taschenbuch der Mathematik*, Teubner, Leipzig 1983, S. 769–771.