

Proteine aus der D-chiralen Welt

Von Günther Jung*

Chiralität und ganz allgemein Symmetrie haben die Menschen schon immer fasziniert. Dies läßt sich über Jahrtausende anhand vieler Bauwerke und künstlerischer Darstellungen verfolgen, die vom Menschen mit seinen beiden spiegelbildlich gebauten Händen geschaffen wurden. Seit Louis Pasteur, Emil Fischer und van't Hoff hat die Stereochemie der chemischen Forschung ständig neue Impulse gegeben. Kent et al.^[1] haben vor kurzem eine immer wieder diskutierte Möglichkeit realisiert und das erste enzymatisch aktive D-Protein synthetisiert. Kents Erfahrungen bei der optimierten Herstellung einer Vielzahl hochreiner Analoga der HIV-1-Protease^[2, 3], die auch zur Röntgenstrukturanalyse geeignete Einkristalle lieferten, ermutigten ihn zum Aufbau des 99 Aminosäuren langen D-enantiomeren Proteins.

Die Merrifield-Synthese nach der in den USA immer noch dominierenden *t*Boc-Strategie (*t*Boc = *tert*-Butoxycarbonyl) wurde mit einem modifizierten ABI 430 A-Synthesizer für Schnellsynthesecyclen durchgeführt. Zwei Synthesen wurden mit exakt demselben Protokoll durchgeführt: eine mit N²-*t*Boc-L-Aminosäurederivaten, die andere mit den ebenfalls kommerziell erhältlichen N²-*t*Boc-D-Aminosäurederivaten und jeweils geeigneten Seitenschutzketten. Wie bei früheren Synthesen kristalliner L-HIV-1-Protease, wurden zwei Cysteinreste in den Positionen 67 und 95 isoster durch α -Amino-*n*-buttersäure (Aba) ersetzt, was weder Faltung noch Enzymaktivität beeinträchtigt. Die D-Aminosäurederivate sollen nach Herstellerangaben nur 0.01–0.08 % L-Enantiomere enthalten. Die Kupplungen erfolgten mit Benzo-triazolyltetramethyluronium-hexafluorophosphat (HBTU) dessen Verwendung als Reagens zur Voraktivierung mit in-situ-Neutralisation nach Henklein et al.^[4] geringstmögliche Racemisierung zeigt. Zur Syntheseüberwachung wurden einige mit Fluorwasserstoff vom Polystyrolharz abgespaltene Peptidproben mit matrixunterstützter Laserdesorptions-Massenspektrometrie untersucht. Die beiden enantiomeren Proteine wurden bisher mit Aminosäurenanalyse, Elektrospray-Massenspektrometrie (L-Enzym: $10\,748 \pm 4$ Da, D-Enzym $10\,751 \pm 3$ Da, berechnete monoisotopische Masse $10\,748$ Da) und Hochdruckflüssigkeitschromatographie verglichen. Die Circular dichroismus(CD)-Spektren zeigten, wie erwartet, in der Intensität gleiche, im Vorzeichen entgegengesetzte Cotton-Effekte.

Die chemisch-synthetisierten D- und L-Proteine haben identische, kovalent verknüpfte Aminosäuresequenzen, diese sollten sich in exakt gleicher Weise zur dreidimensionalen Struktur (Tertiärstruktur) falten, falls es stimmt, daß die Aminosäuresequenz allein die 3D-Struktur eines Proteins bestimmt. Die zueinander spiegelbildlich richtige 3D-Faltung (Abb. 1) aus denaturierenden Bedingungen heraus und darüber hinaus die Bildung einer homodimeren Quartärstruktur der enantiomeren Enzyme wird in eindrucksvoller Weise belegt durch die vergleichenden Untersuchungen der enzymatischen Aktivitäten. Das L-Enzym reagiert nur mit

dem fluorogenen L-Hexapeptidsubstrat und das D-Enzym spaltet nur das enantiomere D-Substrat 2-Aminobenzoyl-all-D-Thr-Ile-Nle-Phe(*p*-NO₂)-Gln-Arg-NH₂ (Nle = Norleucin). Eine umgekehrt chirale Spezifität zeigten auch die als chirale Inhibitoren eingesetzten, acetylierten D- und L-Pseudohexapeptamide Ac-Thr-Ile-Nle- ψ [CH₂-NH]-Nle-Gln-Arg-NH₂. Der achirale Proteaseinhibitor Evans Blue inhibierte beide enantiomeren Enzyme.

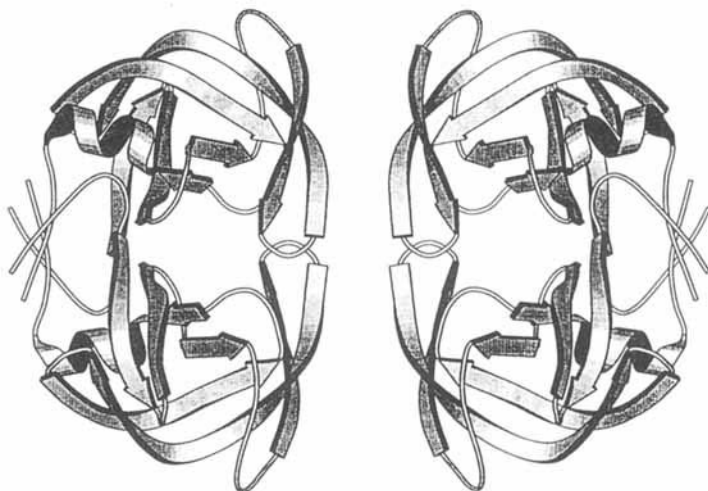


Abb. 1. Dreidimensionale Struktur der L- (links) und der D-HIV-Protease (rechts) (aus Lit. [1]).

So weit, so gut, alles wie erwartet, werden viele sagen, bringen uns D-Proteine irgendwelche Vorteile außer der schönen, erstmals experimentellen Demonstration des Verhaltens des D-Enantiomers in den chiroptischen und substratspezifischen Untersuchungen? Einer der wichtigsten Vorteile eines D-Proteins ist dessen enzymatische Stabilität eine Eigenschaft, die auch viele D-Aminosäuren enthaltende Peptidantibiotika haben.

Es ist schon lange bekannt, daß Polypeptide mit L-Aminosäuren rechtshändige α -Helices und solche mit D-Aminosäuren linkshändige bilden. Merrifield et al.^[5, 6] zeigten, daß drei, in Lipiddoppelschichten spannungsabhängige Ionenkanäle bildende, helicale Polypeptide, Cecropin A, Magainin-2-amid und Melittin, als D-Enantiomere ebenfalls antibakteriell wirksam sind. Eine weitere neuere Arbeit^[10] beschreibt enantiomere Gramicidin-A-Kanäle. Gramicidin A ist ein Polypeptidantibiotikum, das aus D- und L-Aminosäuren genau alternierend aufgebaut ist. Bei diesen Antibiotika ist die biologische Aktivität allerdings nicht von einem chiralen Rezeptormolekül abhängig, d. h. links- und rechtshändige Kanäle aus oligomeren Peptidaggregaten sollten in gleicher Weise Ionenströme leiten.

Tatsächlich müßte aber ein geringer Unterschied bei den Experimenten an Lipiddoppelschichtmembranen bemerkbar sein, da Helices mit entgegengesetztem Schraubensinn mit chiralen Lipidmembranen unterschiedlich wechselwir-

[*] Prof. Dr. G. Jung
Institut für Organische Chemie der Universität
Auf der Morgenstelle 18, W-7400 Tübingen

ken sollten. Offensichtlich sind die Unterschiede so gering, daß sie selbst mit der hochempfindlichen elektrischen Meßanordnung (vgl. dazu Lit.^[7]) nicht detektierbar sind. Wir hatten bereits vor längerer Zeit festgestellt, daß Homopolypeptide aus der achiralen Aminobuttersäure (Aib), beispielsweise für Z-(Aib)₁₀-OtBu 1200mal pro Sekunde von einer linkshändigen in eine rechtshändige 3₁₀-Helix und vice versa enantiotopomerisieren^[8]. Auch diese enantiomeren Helices bilden ionenleitende Kanäle in Lipiddoppelschichtmembranen trotz ihrer gegenseitigen Umwandlung bei Raumtemperatur^[9].

Was die drei D-enantiomeren, antibakteriell voll aktiven Peptidantibiotika von Merrifield et al. besonders interessant macht, ist ihre enzymatische Stabilität und damit ihre mögliche auch orale Wirksamkeit. Tam^[11] synthetisierte kürzlich ebenfalls antibakteriell aktive D-Peptidantibiotika, die Cystinbrücken enthaltenden, eine β -Faltblattstruktur bildenden Defensine.

In die meisten der mehrere Hundert bekannten Peptidantibiotika hat schon die Natur D-Aminosäuren eingebaut. Gemischt D- und L-chirale Peptidstrukturen können Mikroorganismen als Sekundärmetabolite über Multienzymkomplexe aufbauen, d. h. nicht sehr selektiv. Multienzymkomplexe machen häufig auch „Synthesefehler“, was sich in der oft hohen natürlichen Mikroheterogenität von Peptidantibiotika zeigt. Die meisten dieser antibiotisch aktiven Polypeptide bestehen aus weniger als 20 Aminosäuren. Zu den größten Polypeptidantibiotika gehören die Lantibiotika^[12, 13], die D-Aminosäuren in Form von Lanthionin-Ringstrukturen enthalten, dazu nutzen allerdings die Mikroorganismen ein hochspezifisches Biosyntheseprinzip über ribosomal synthetisierte Vorläuferproteine mit posttranslationaler Modifikation. Bei der Biosynthese der Lantibiotika werden in bis zu 60 Aminosäuren langen Precursor-Peptiden mehrere Sulfidbrücken unter Konfigurationsumkehr von ursprünglichen Serin- und Threoninresten eingebaut^[14].

Diese neueren Arbeiten zeigen, daß peptidchemisch biologisch aktive all-D-Peptidwirkstoffe und sogar ein reines D-Enzym synthetisiert werden konnte. Ferner lassen sich in neu entdeckten Biosynthesen mit Mikroorganismen z. B. meso-Lanthionin und α, β -Didehydroaminosäuren in Proteine einbauen.

Die einheitliche Chiralität der Bausteine der Biopolymere wird als Voraussetzung angesehen für deren dreidimensionalen Aufbau mit hohen Anteilen an den geordneten Strukturen α -Helix und β -Faltblatt. Ein funktionelles Enzym aus D- und L-Aminosäuren wäre durchaus vorstellbar, wenn jeweils genügend viele D-Aminosäuren aufeinanderfolgend eine linkshändige α -Helix bilden würden, die dann zusammen mit einem ebenfalls aus L-Aminosäuren bestehenden β -Faltblattsegment z. B. eine „D-Domäne“ α -Helix-Turn- β -Faltblatt formieren. Andere Domänen könnten aus L-Aminosäuren bestehen und enzymatische Sollbruchstellen enthalten. Solche Konstrukte wären durch Kombinationen aus peptidchemisch und biotechnologisch hergestellten Segmenten möglich. Es gibt seit einiger Zeit vielversprechende Versuche zur Totalsynthese von Enzymen mit Templaten^[15, 16]. Das de-novo-Design solcher Konstrukte könnte in Zukunft auch D-Domänen einbeziehen. Der Phantasie sind dabei nur Grenzen hinsichtlich der peptidchemisch noch zugänglichen Proteingröße mit derzeit etwa 150 Aminosäuren und im Jahre 2000 vielleicht 250 Aminosäuren ge-

setzt (zu neueren Möglichkeiten der Festphasensynthese vgl. Lit.^[17, 18]).

Die enzymatische Stabilität synthetischer D-Enzyme gibt Anlaß, über mögliche therapeutische Anwendungen nachzudenken^[1, 11]. D-Enzyme könnten achirale Substrate bei lang andauernder in-vivo-Aktivität umsetzen, da D-Proteine im Säugetier nicht durch L-Proteasen spaltbar sind. Dies hätte als wünschenswerten Nebeneffekt zur Folge, daß D-Proteine nicht oder nur wenig immunogen sind. Eine langandauernde Immunität gegen ein Fremdprotein setzt dessen Prozessierung und Präsentation des Peptidantigens auf den Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)-Molekülen voraus, um eine Erkennung durch T-Helferzellen (über MHC-Klasse II) oder cytotoxische T-Lymphozyten (CTL, über MHC-Klasse I) zu ermöglichen. Das dazu notwendige Herausschneiden eines Peptidteilstücks mit MHC-spezifischem Sequenzmotiv^[19] ist aus einem D-Protein nicht möglich. Ein völlig nicht immunogenes D-Protein chemisch zu synthetisieren und zu reinigen, ist mit den derzeit zur Verfügung stehenden Methoden trotzdem wohl kaum durchführbar. Dies liegt nicht an den mit Sicherheit noch vorhandenen Fehlsequenzen aus unvollständigen Kupplungen. Der Grund dafür liegt in der extrem empfindlichen und hochspezifischen Erkennungsreaktion zwischen Peptidantigen, MHC-Molekül, T-Zellrezeptor und assoziierten Proteinen wie β -Mikroglobulin. Mit diesem multimeren Komplex sind sogar in-vitro-Assays auf CTL-Epitopen im attomolaren Bereich möglich. Keine der üblichen Aminosäurereaktivierungen verläuft völlig racemisierungsfrei. Auch wenn mit höchstempfindlichen Racemisierungstests keine L-Aminosäuren im D-Protein gefunden werden, könnte eine Erkennung durch schon vorhandene Antikörper erfolgen, und eine immunologische T-Zell-vermittelte Reaktion ist bei wiederholter Anwendung mit Sicherheit zu erwarten. Das heißt, es müßten Spuren an durch L-Proteasen spaltbarem Material entfernt werden, um immunologisch unbedenkliche D-Proteinpharmaka herzustellen.

Andere nichttherapeutische Anwendungen, die über das rein akademische Interesse hinausgehen, machen D-Proteine ebenfalls interessant. Die – allerdings extrem teuren – D-Enzyme könnten zur Herstellung von schwer zugänglichen chiralen Produkten herangezogen werden, wobei besonders die enzymatische Synthese und Modifikation von L-Kohlenhydraten attraktiv wäre. Könnte man mit den D-Proteinen eine L-Zuckerwelt und über L-Ribose/L-Desoxyribose gar eine L-RNA/DNA-Welt aufbauen?

Zurück zu den praktischen Aspekten und Realisationsmöglichkeiten, die sich über synthetische D-Proteine ergeben. Zawadzke und Berg^[20] synthetisierten ein D-Protein aus einem völlig anderen Grund. Sie bauten D-Rubredoxin auf, ein Eisen-Schwefel-Protein, das in Mikroorganismen in die Elektronentransportkette eingeschaltet ist. Das synthetische D-Rubredoxin wurde mit ebenfalls synthetischem L-Rubredoxin zu einem Racemat vereinigt, genau zu dem also, was man sonst mit vieler Mühe zu trennen versucht. Die Autoren erhielten daraus Einkristalle höchster Qualität mit zentrosymmetrischer Raumgruppe. Diese Raumgruppe führt zu einer Restriktion des Phasenproblems bei der Röntgenstrukturanalyse, das dadurch rascher lösbar wird. Zudem wird die Genauigkeit der Strukturanalyse wesentlich besser, und die Kristallisationsfreude des Proteinracemats sollte gegenüber den reinen Enantiomeren ebenfalls verbessert sein. Sollte

auch nur letzteres erreichbar sein, so wäre dies den beträchtlichen Syntheseaufwand wert, zumindest aus der Sicht eines Protein-Kristallographen, wie Petsko^[11] kommentiert hat.

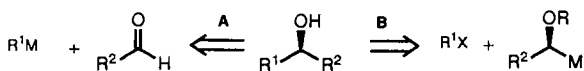
- [1] R. C. deL. Milton, S. C. F. Milton, S. B. H. Kent, *Science* **1992**, 256, 1445–1448.
- [2] A. Wlodawer, M. Miller, M. Jaskólski, B. K. Sathyanarayana, E. Baldwin, J. T. Weber, L. M. Selk, L. Clawson, J. Schneider, S. B. H. Kent, *Science* **1989**, 245, 616–621.
- [3] M. Miller, J. Schneider, B. K. Sathyanarayana, M. V. Toth, G. R. Marshall, L. Clawson, L. M. Selk, S. B. H. Kent, A. Wlodawer, *Science* **1989**, 246, 1149–1152.
- [4] P. Henklein, M. Beyermann, B. Costisella, R. Sohr in *Innovation and Perspectives in Solid Phase Synthesis* (Hrsg.: R. Epton), Intercept, Andover, **1992**, S. 401–403.
- [5] R. B. Merrifield, H. G. Boman, D. Andreu, Z. Li, J. Fink, D. Wade in *Peptides 1990, Proc. 21st Eur. Pept. Symp.* (Hrsg.: E. Giralt, D. Andreu), Escom, Leiden, **1991**, S. 3–16.
- [6] D. Wade, A. Boman, B. Wahlin, C. M., Drain, D. Andreu, H. G. Boman, R. B. Merrifield, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, 87, 4761–4765.
- [7] a) E. Neher, *Angew. Chem.* **1992**, 104, 837–843; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, 31, 824–829; b) B. Sakmann, *ibid.* **1992**, 104, 844–856 bzw. **1992**, 31, 830–841.

- [8] R.-P. Hummel, C. Toniolo, G. Jung, *Angew. Chem.* **1987**, 97, 1180–1182; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1987**, 26, 1150–1152.
- [9] G. Boheim, C. Toniolo, G. Jung, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [10] R. E. Koeppe II, L. L. Providence, D. V. Greathouse, F. Heitz, Y. Trudelle, N. Purdie, O. S. Andersen, *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **1992**, 12, 49–62.
- [11] Vgl. Notiz von G. A. Petsko, *Science* **1992**, 256, 1403–1404.
- [12] G. Jung, *Angew. Chem.* **1991**, 103, 1067–1084; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, 30, 1051–1068.
- [13] *Nisin and Novel Lantibiotics* (Hrsg.: G. Jung, H. G. Sahl), Escom, Leiden, **1991**.
- [14] N. Schnell, K.-D. Entian, U. Schneider, F. Götz, H. Zähner, R. Kellner, G. Jung, *Nature* **1988**, 333, 276–278.
- [15] M. Mutter, S. Vuilleumier, *Angew. Chem.* **1989**, 101, 551–571; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1989**, 28, 535–555.
- [16] J. M. Stewart, J. R. Cann, K. W. Hahn, W. A. Klis in *Peptides, Chemistry and Biology, Proc. 12th Am. Pept. Symp.* (Hrsg.: J. A. Smith, J. Rivier), Escom, Leiden, **1992**, S. 335–336.
- [17] E. Bayer, *Angew. Chem.* **1991**, 103, 117–133; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, 30, 96–112.
- [18] G. Jung, A. G. Beck-Sickinger, *Angew. Chem.* **1992**, 104, 375–391; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, 31, 367–383.
- [19] K. Falk, O. Röttschke, S. Stevanović, G. Jung, H. G. Rammensee, *Nature* **1991**, 351, 290–296.
- [20] L. Zawadzke, J. Berg, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, im Druck, vgl. Lit. [11].

Asymmetrische Deprotonierung zur effizienten enantioselektiven Synthese von funktionalisierten sekundären Alkoholen

Von Paul Knochel*

Die enantioselektive Synthese von chiralen sekundären Alkoholen gelingt mit mehreren Methoden. Ein vielfach praktizierter Weg ist die asymmetrische Addition von Organometallverbindungen R^1M an Aldehyde (Retrosyntheseweg A in Schema 1)^[1]. Die Bindungsspaltung unter Inversion der Polarität^[2] ist auch möglich (Retrosyntheseweg B in Schema 1). In diesem Fall entsteht der sekundäre Alkohol durch Substitution an in α -Stellung Sauerstoff-substituierten Carbenoiden^[3]. Obwohl präparativ häufig eingesetzt, sind dieser Methode durch die vielstufigen enantioselektiven Synthesen^[4] der Carbenoide Grenzen gesetzt.

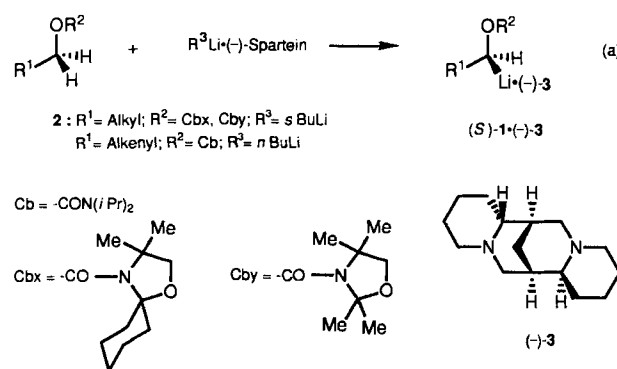


Schema 1.

Darüber hinaus muß für eine breite Anwendung in der Synthese das chirale Carbenoid unter den Reaktionsbedingungen konfigurationsstabil sein und die Umsetzung mit Elektrophilen stereoselektiv verlaufen, unter Retention oder Inversion.

Seit einigen Jahren sind enantioselektive Deprotonierungen bekannt, und elegante Synthesen sind mit dieser Methode durchgeführt worden^[5]. Hoppe et al. benutzten sie als einen zweckmäßigen Zugang zu einer Vielzahl von chiralen, in α -Stellung Sauerstoff-substituierten Carbenoiden **1**

[Gl. (a)]^[6–12], $M = Li$, ausgehend von leicht zugänglichen achiralen Carbamaten **2** und dem Komplex aus Alkyl-lithium-Verbindung und (–)-Sparteinein **3**^[13].



Die hochenantioselektiven Deprotonierungen gelingen innerhalb weniger Stunden bei -78°C , und es bilden sich dabei die Carbenoid-Sparteine-Komplexe $(S)\text{-}1 \cdot (-)\text{-}3$ ^[6–12]. Die Sparteine-Komplexe von lithiierten sekundären Allyl- und primären Alkylcarbamaten sind unterhalb von -30°C konfigurationsstabil, die von primären Allylcarbamaten wie **4** $\cdot (-)\text{-}3$ dagegen sind selbst bei -70°C nicht konfigurationsstabil. Es ist jedoch möglich, diese Reagentien für die Synthese einzusetzen, da das (S) -Diastereomer aus einem Pentan/Cyclohexan-Gemisch bevorzugt kristallisiert und somit das Gleichgewicht vollständig nach einer Seite verschoben ist. Nach der Transmetallierung von $(S)\text{-}4 \cdot (-)\text{-}3$ bei tiefer Temperatur mit Tetraisopropoxytitan im Überschuß wird unter Inversion der Konfiguration die Allyltitanverbin-

[*] Prof. Dr. Paul Knochel
Fachbereich Chemie der Universität
Hans-Meerwein-Straße, W-3550 Marburg