

Designer-Proteine: über die Kunst, De-novo-Metalloproteine zu synthetisieren**

Heinz-Bernhard Kraatz*

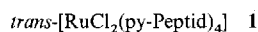
Professor P. Michael Boorman gewidmet

Die moderne chemische Forschung überschreitet oft die Linie, die die klassischen Disziplinen Chemie und Biologie einst voneinander trennte. Eines der Gebiete, das alte Grenzen sprengt, ist sicherlich die Koordinationschemie. Sie bewegt sich auf eine Definition zu, wonach Komplexbildung lediglich verlangt, daß „diskrete molekulare Spezies durch bindende Wechselwirkung gebildet werden“^[1]. Der Entwurf von Modellsubstanzen für die aktiven Zentren von Metalloenzymen war schon immer eine große Herausforderung für Komplexchemiker. Das „Nitrogenase-Problem“ ist hierfür ein hervorragendes Beispiel: Es hat bei der raschen Entwicklung der Koordinationschemie von Molybdän mit Schwefelliganden eine zentrale Rolle gespielt. Die jüngsten Fortschritte auf dem Gebiet des Designs von nicht-natürlichen Proteinen wurden durch die Kombination von klassischer Komplexchemie und Proteinchemie ermöglicht. Ziel dabei ist es, die komplexen, natürlichen Proteine auf ihre für eine bestimmte Funktion essentiellen Struktureigenschaften zu reduzieren. Nach der Proteinsynthese, die nach Standardmethoden erfolgt, kann das vereinfachte Modellprotein dann dazu verwendet werden, die strukturelle Annahme, die zu seiner Konstruktion geführt hat, zu beurteilen. Dies kann zum Verständnis des komplizierten Zusammenspiels zwischen Proteinstruktur und -funktion führen. Die aktuelle Forschung auf diesem Gebiet hat zum Design einer Reihe von künstlichen Proteinen geführt^[2].

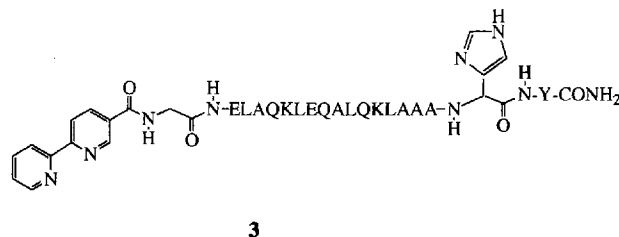
Beim Entwurf von De-novo-Proteinen lassen sich hauptsächlich zwei Methoden unterscheiden: a) Die Synthese eines größeren Peptids mit Untereinheiten bekannter Sekundärstruktur, das eine bestimmte Tertiärstruktur einnehmen wird und b) die Konstruktion kleinerer Peptiduntereinheiten mit bekannter Sekundärstruktur und ihre Verknüpfung auf einem Templat, so wie es von Mutter et al.^[3] beschrieben wurde. Die Konstruktion spezifischer und topologisch determinierter Proteinstrukturen aus kleineren amphiphilen Peptidvorstufen über einfacher Selbstaggregation wird dadurch erschwert, daß Peptide in wäßriger Lösung dazu neigen in Gleichgewichten aus Monomeren und Aggregaten vorzuliegen. Die Kontrolle der Zahl der be-

teiligten Peptide und deren relativer Stereochemie ist deshalb in der Tat eine schwer zu bewältigende Aufgabe.

Ein großer Schritt vorwärts auf diesem Gebiet gelang nun Ghadiri et al. Durch Metall-Ionen-induzierte Selbstassoziation konnten sie das zuvor diskutierte Problem lösen^[4], ganz im Sinne der modernen Definition von Komplexchemie. Die Koordination von chemisch modifizierten Peptiden an ein Metallzentrum über eine koordinierende Gruppe führt zu einem Peptid-Metall-Komplex. Dabei können sowohl die Stereochemie des Komplexes als auch die Zahl der Peptiduntereinheiten, die das fertige De-novo-Protein bilden, kontrolliert werden. Zu einem großen Teil besteht die Kunst, diese Strategie erfolgreich anzuwenden, darin, das richtige Metallzentrum und die geeignete chemische Modifikation eines bestimmten Peptids zu wählen. Diese erstaunlich einfache Methode wurde zur Synthese mehrerer helixförmiger Metalloproteine mit exakt bestimmter Stereochemie herangezogen, so zum Beispiel zur Darstellung von **1** (py = Pyridin)^[4a] und **2**^[4c].



Dieses Konzept wurde inzwischen weiter verfeinert, und es gelang, ein Ru^{II}-Metalloprotein mit genau definierter Metallkoordinationsstelle zu synthetisieren^[5]. Erreicht wurde dies mit Hilfe des Peptids **3**. Dieses hat zwei mögliche Metallbindungsstellen:

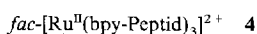


einen N-terminalen Bipyridinrest (bpy) und ein Imidazol-Stickstoffatom eines Histidinrestes in der Nähe des C-Terminus von **3**. Letzteres wurde so konstruiert, daß es eine helixförmige Struktur bevorzugt. Das Einfügen der bpy-Gruppen am N-Terminus eines jeden Peptids ermöglichte – mit einem Ru^{II}-Ion als Templat – die Selbstassoziation dreier Peptide zu einem aus drei Helices

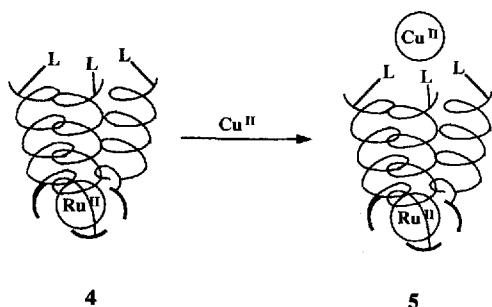
[*] Dr. H.-B. Kraatz
Department of Organic Chemistry, The Weizmann Institute of Science
76100 Rehovot (Israel)
Telefax: Int. + 8/34-4142

[**] Diese Arbeit wurde von der Minerva-Gesellschaft, München, gefördert. Bei Prof. D. Milstein bedanke ich mich für seine Anregungen und seine Unterstützung.

bestehenden Proteinbündel. Dabei entstand ausschließlich kinetisch inertes **4**. Die drei Peptiduntereinheiten liegen eng bein-



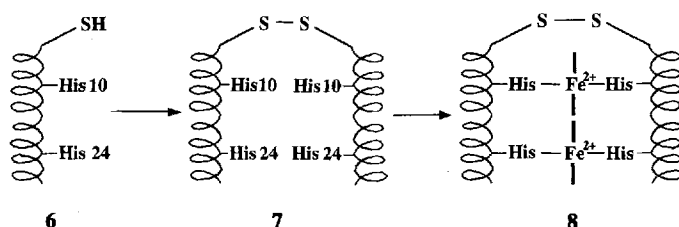
ander. Dadurch treten über kurze Distanzen wirksame intramolekulare hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den drei metallgebundenen Peptiden auf. Diese sind größer als die intermolekularen abstoßenden Wechselwirkungen und fördern deshalb die Bildung einer helixförmigen Gesamtstruktur von **4** (Circulardichroismus (CD) Spektrum: $\theta_{222} = -23\,000^\circ \text{cm}^2 \text{dmol}^{-1}$). Mit UV-VIS-Spektroskopie ($\lambda_{\text{max}} = 289$ und 475 nm) und Elektrospray-Massenspektrometrie (gef.: $M = 6887 \pm 2$; ber.: $M = 6887$) sowie Gelpermeationschromatographie kann **4** eindeutig charakterisiert werden. Dabei ist es wichtig, darauf hinzuweisen, daß sich die drei His18-Gruppen nahe der C-Termini der drei Peptiduntereinheiten gerade wegen der helixförmigen Anordnung in nächster Nähe befinden und dadurch eine Metallkoordinationsstelle bilden. Komplexierung von Cu^{2+} an dieser Stelle verändert die Struktur des Proteins nicht wesentlich, was auf das Vorhandensein der Bindungsstelle nach der Selbstassoziation von **4** hinweist (CD-Spektrum: $\theta_{222} = -24\,000^\circ \text{cm}^2 \text{dmol}^{-1}$). Die deutliche Verringerung der Fluoreszenzemission des benachbarten Tyrosinchromophors, sowie die Analyse der ESR- ($g_{\parallel} = 2.27$ und $A_{\parallel} = 173 \text{ cm}^{-1} \times 10^4$) und der UV-VIS-Spektren ($\lambda_{\text{max}} = 375$ (Charge-Transfer) und 495 nm) führten Ghadiri und Case^[5] zum Schluß, daß sich Cu^{II} an diese Metallkoordinationsstelle anlagern kann, wobei das $\text{Ru}^{\text{II}}\text{Cu}^{\text{II}}$ -Protein **5** entsteht (Schema 1).



Schema 1.

Von Bedeutung sind in diesem Zusammenhang jüngste Berichte über den Entwurf und die Synthese von Cytochrom(cyt)-Modellen von Diederich et al.^[6], welche auf Polyether/Amid-Dendriten basieren, die eine zentrale Zn-Porphyrineinheit umschließen, sowie die Methode von DeGrado et al. zur Synthese nicht-natürlicher Peptide^[7]. Nach DeGrados Konzept wurden mehrere Peptide synthetisiert, die aus zwei identischen, aus 31 Aminosäuren bestehenden, helixförmigen Untereinheiten aufgebaut und durch eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Sie haben Histidiningruppen, die die Koordination von Fe^{II} -Hämgruppen über zwei *trans*-ständige Imidazolgruppen ermöglichen. Die Peptide lagern sich zu dimeren Bündeln aus vier Helices zusam-

men. Das Modellprotein **7** besteht aus zwei identischen Untereinheiten **6**, die je zwei Histidineinheiten (His10 und His24)



enthalten, um die cyt-b-Untereinheit von cyt bc₁ nachzuahmen. Es enthält zwei mögliche, auf zwei Histidiningruppen basierende Häm-Bindungsstellen pro Peptid; der Abstand der Fe-Atome im entsprechenden Komplex **8** wurde auf 20 \AA geschätzt. Wegen der Dimerisierung des Modellproteins **7** führt der Zusatz von Fe^{II} -Häm zur Anlagerung von vier Redoxzentren an den vier vorhergesagten Bindungsstellen des Proteindimers. CD-Spektroskopie bestätigt auch in diesem Fall die Existenz wohldefinierter Koordinationsstellen vor der Komplexbildung des Häms ($\theta_{222} = -26\,000^\circ \text{cm}^2 \text{dmol}^{-1}$). Wie erwartet, zeigt der Häm-Protein-Komplex ein rhombisches ESR-Spektrum ($g_z = 2.89$, $g_y = 2.24$, $g_x = 1.54$), was die Koordination über zwei *trans*-ständige Imidazolgruppen von Low-spin- Fe^{2+} -Ionen bestätigt.

Dies sind lediglich zwei Beispiele, die Licht auf die Möglichkeiten werfen, die sich innerhalb dieses neuen Forschungsgebiets an der Grenze zwischen Proteinchemie und Koordinationschemie ergeben. Die Synthese metallbindender Metalloproteine und die Einführung redoxaktiver Zentren in nichtnatürlichen Proteinen durch Selbstassoziation sind gewiß nur Anfänge. Man kann sich jedoch vorstellen, dieses Konzept auf die Integration von substratbindenden Enzymfunktionen – wie Sasaki und Kaiser bereits zeigten^[8] – auszuweiten, sowie auf den Einbau von photoempfindlichen Metallzentren in Proteine, die dann als lichtabsorbierende Analoga des Photosystems grüner Pflanzen wirken können.

[1] D. H. Busch, *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 847–860.

[2] a) W. F. DeGrado, Z. R. Wasserman, J. D. Lear, *Science (Washington D.C. 1883-)* **1989**, *243*, 622–628; b) K. T. O'Neil, R. H. Hoess, W. F. DeGrado, *ibid.* **1989**, *243*, 774–778; c) K. T. O'Neil, W. F. DeGrado, *Trends Biochem. Sci.* **1990**, *15*, 59–64; d) K. S. Åkerfeldt, J. D. Lear, Z. R. Wasserman, L. A. Chung, W. F. DeGrado, *Acc. Chem. Res.* **1993**, *26*, 191–197; e) K. W. Hahn, W. A. Klis, J. M. Stewart, *Science (Washington D.C. 1883-)* **1990**, *248*, 1544–1547; f) A. Grove, M. Mutter, J. E. Rivier, M. Montal, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 5919–5924; g) M. R. Ghadiri, J. R. Granja, L. K. Buehler, *Nature (London)* **1994**, *369*, 301–304.

[3] a) M. Mutter, S. Vuilleumier, *Angew. Chem.* **1989**, *101*, 551–571; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1989**, *28*, 535–554; b) für ein aktuelleres Beispiel siehe: M. Mutter, G. G. Tuchscherer, C. Miller, K.-H. Altmann, R. I. Carey, D. F. Wyss, A. M. Labhardt, J. E. Rivier, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 1463–1470.

[4] a) M. R. Ghadiri, A. M. Fernholz, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 9633–9635; b) M. R. Ghadiri, C. Soares, C. Choi, *ibid.* **1992**, *114*, 825–831; c) *ibid.* **1992**, *114*, 4000–4002.

[5] M. R. Ghadiri, M. A. Case, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 1663–1667; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 1594–1597.

[6] P. J. Dandliker, F. Diederich, M. Gross, C. B. Knobler, A. Louati, E. M. Sandford, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 1821–1824; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 1739–1742.

[7] D. E. Robertson, R. S. Farid, C. C. Moser, J. L. Urbauer, S. E. Mulholland, R. Pidikiti, J. D. Lear, A. J. Wand, W. F. DeGrado, P. L. Dutton, *Nature (London)* **1994**, *368*, 425–432.

[8] T. Sasaki, E. T. Kaiser, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 380–381.