

Peptid-Ligasen – Werkzeuge für die Peptidsynthese

Hans-Dieter Jakubke*

Seit der ersten chemischen Knüpfung einer Peptidbindung durch Theodor Curtius 1881 im Laboratorium von Hermann Kolbe in Leipzig bis zur Totalsynthese eines Enzyms hat die chemische Peptidsynthese^[1] eine fast neunzigjährige Entwicklung durchgemacht. Die aus 124 Aminosäureresten aufgebaute Ribonuclease A (RNase A) wurde sowohl durch Segmentkondensation in Lösung^[2] als auch durch Festphasensynthese^[3] aufgebaut. Etwa zehn Jahre später synthetisierten Yajima und Fujii^[4] die RNase A nach einer verbesserten konventionellen Synthesestrategie in Lösung und erhielten erstmals ein kristallines synthetisches Enzym mit voller enzymatischer Aktivität. Für die chemische Knüpfung der Peptidbindung gibt es nach wie vor keine ideale, universell einsetzbare Methode. Da bei der Chemosynthese Reaktionen an Gruppierungen ablaufen, die in der Regel mit einem Chiralitätszentrum verknüpft sind, existiert ein permanentes Racemisierungsrisiko. Das gilt in Einzelfällen selbst für schrittweise Kettenverlängerungen unter Verwendung von Schutzgruppen des Urethanotyps, die eigentlich Racemisierung verhindern sollten; besonders gefährdet sind chemische Segmentverknüpfungen.

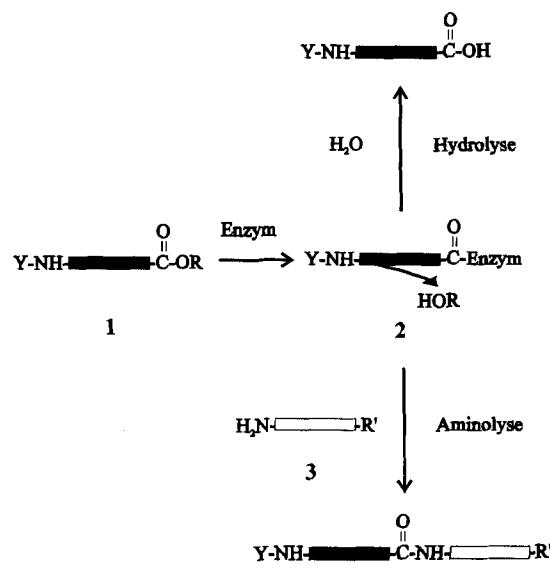
Eine unlängst erschienene Arbeit^[5] beschreibt eine Synthese der RNase A, wobei für die Verknüpfung der durch Festphasensynthese erhaltenen Segmente erstmals ein Enzym erfolgreich eingesetzt wurde. Die Idee, Enzyme zur Knüpfung von Peptidbindungen einzusetzen, ist etwa so alt wie die chemische Peptidsynthese selbst. In Kenntnis der Reversibilität chemischer Reaktionen hatte 1898 van't Hoff auf die Möglichkeit aufmerksam gemacht, für die Katalyse der Knüpfung von Peptidbindungen Enzyme einzusetzen. Erst 1938 wurde dieser Gedanke aufgegriffen und experimentell durch Max Bergmann bestätigt.

Die Knüpfung von Peptidbindungen durch Enzyme bietet aufgrund von deren Stereo- und Regiospezifität ohne Zweifel eine Reihe von Vorteilen gegenüber chemischen Verfahren, wie milde Reaktionsbedingungen, keine Notwendigkeit eines permanenten Schutzes von funktionellen Gruppen in Seitenketten, racemisierungsfreien Syntheseverlauf und einfaches Scale-up nach Prozeßoptimierung. Um diese Vorteile aber nutzen zu können, benötigt man eine möglichst universell einsetzbare Peptid-Ligase^[**], die im Prinzip bei allen theoretisch möglichen Amino-

säurekombinationen, d. h. spezifitätsneutral ohne Berücksichtigung der Seitenkettenfunktionen der an der Peptidknüpfung beteiligten Aminosäuren, eine hohe Katalyseeffizienz aufweist. Da man auf einen so idealen Biokatalysator wie die ribosomale Peptidyl-Transferase nicht zurückgreifen kann und auch Multienzymkomplexe der bakteriellen Peptidsynthese nur für spezielle Synthesezwecke genutzt werden können, stehen für die Knüpfung der Peptidbindung nur die Proteasen zur Verfügung; für ihre Nutzung werden zwei mechanistisch unterschiedliche Strategien unterschieden^[6].

Mehr gezielte Manipulationsmöglichkeiten als die gleichgewichtskontrollierte Reaktionsführung bietet die kinetisch kontrollierte Peptidsynthese^[7], für die bei geringem Enzymbedarf und kurzen Reaktionszeiten aus mechanistischen Gründen nur Serin- oder Cystein-Proteasen eingesetzt werden können. Leider sind die Proteasen keine perfekten Acyl-Transferasen, da aufgrund ihrer begrenzten Spezifität parallel zum Acyltransfer andere, unerwünschte Reaktionen ablaufen können, wie Hydrolyse des Acylenzyms **2**, Sekundärhydrolyse des Peptidproduktes **4** und andere unerwünschte Spaltungen, wenn in **1**, **3** und **4** proteaselabile Bindungen vorliegen (Schema 1).

Zur Ausschaltung oder Minimierung dieser Nachteile bietet sich ein gezieltes Engineering des Enzyms und/oder des Reaktionsmediums sowie der mechanistischen Prozeßgestaltung an,



Schema 1.

[*] Prof. Dr. H.-D. Jakubke

Institut für Biochemie
Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie der Universität
Talstraße 33, D-04103 Leipzig
Telefax: Int. + 341/960-3099

[**] Als Peptid-Ligase soll in Abweichung von der EC-Nomenklatur ein die Knüpfung der Peptidbindung katalysierender Biokatalysator verstanden werden.

wie es in Abbildung 1 schematisch gezeigt wird^[8]. Durch Medium-Engineering versucht man, die unerwünschten hydrolytischen Nebenreaktionen auszuschalten. Proteasekatalysierte Synthesen in einphasigen organischen Lösungsmitteln oder in zweiphasigen wäßrig-organischen Systemen verlaufen mit weniger proteolytischen Nebenreaktionen; in organischen Medien sind obendrein die Reaktanten besser löslich, wodurch eine Anpassung zwischen chemischen und enzymatischen Schritten möglich wird. Aber auch durch direkte Reduzierung des Wasserstoffgehaltes im Reaktionsmedium, wie bei Synthesen in gefrorenen wäßrigen Systemen oder Umsetzungen in hochdichten Medien, lassen sich Nebenreaktionen ausschalten und Peptidausbeuten signifikant steigern. Wichtigstes Ziel der Abgangsgruppenmanipulation bei einer kinetisch kontrollierten Reaktionsführung ist es, daß das Enzym vor allem mit dem Acyldonor **1** und nicht mit dem Peptidprodukt **4** und in unerwünschter Weise mit der Aminokomponente **3** reagiert, so daß auch proteaselabile Produkte in guten Ausbeuten erhalten werden können. Einen Überblick über die aktuellen Manipulationsmöglichkeiten geben zwei neuere Übersichten.^[8, 9]

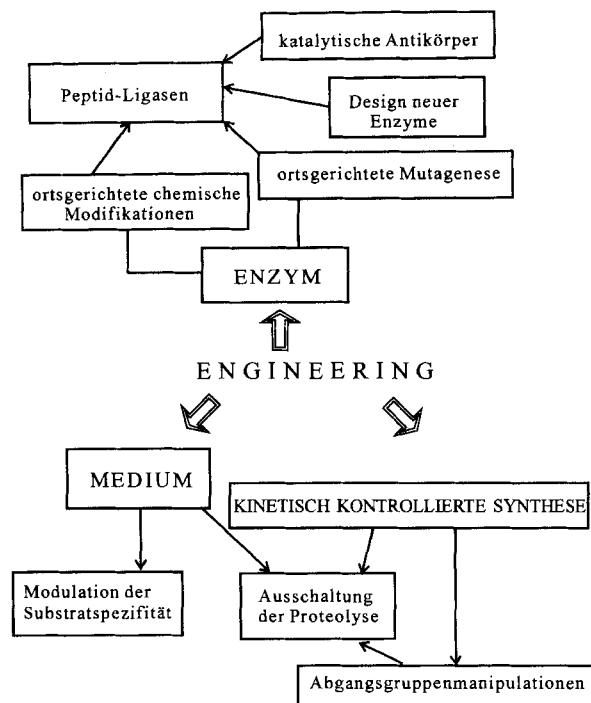
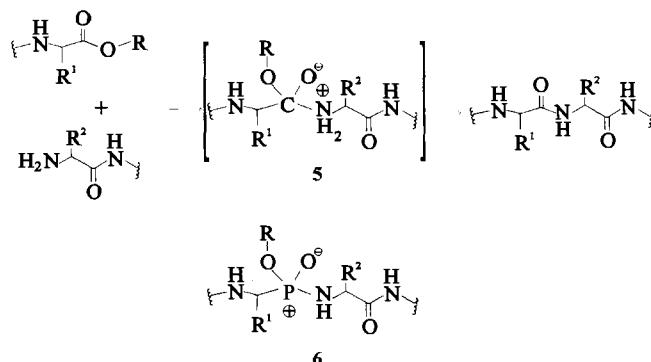


Abb. 1. Möglichkeiten für ein Engineering der enzymatischen Peptidsynthese auf unterschiedlichen Ebenen.

Enzym-Engineering^[10] (vgl. Abb. 1) erstreckt sich von einer gezielten chemischen Modifizierung bis zum gentechnischen Umbau eines Wildtyp-Enzyms. Jackson et al.^[5] gelangen mit „Subtiligase“, einer durch Protein-Design veränderten Mutante von Subtilisin BPN', erstmals anspruchsvolle enzymatische Segmentkondensationen im Rahmen einer weiteren Totalsynthese von RNase A. Diese Arbeit demonstriert in der Kombination Festphasensynthese von Segmenten und enzymatische Verknüpfung dieser Segmente zur aktiven RNase A den aktuellen Stand der Peptidsynthese und belegt eindrucksvoll das Potential von Enzymen für Peptidbindungsknüpfungen. Bei den Seg-

mentverknüpfungen konnten durchschnittliche Ausbeuten von ca. 75 % erreicht werden. Die vorzügliche Abgangsgruppe des mit Phe-NH₂-modifizierten Carboxamidomethylesters, der sich bereits in nichtmodifizierter Form bei anderen Synthesen als sehr guter Acyldonor bewährte^[11], und die Verwendung eines deutlichen Überschusses an Acyldonor garantierten die Unterdrückung der meisten Nebenreaktionen. Nach den fünf Segmentverknüpfungen betrug die Totalausbeute 15 % und nach der Faltung des Syntheseproduktes 8 %. Ausgehend von 100 mg Startpeptid-(98-124) kann die RNase A im 10 mg-Maßstab erhalten werden. Die Segmente (77-97, 64-76, 52-63, 21-51, 1-20) wurden so konzipiert, daß C-terminal die Reste Tyr⁹⁷, Tyr⁷⁶, Val⁶³, Leu⁵¹ und Ala²⁰ vorlagen, die der Substratspezifität der Subtilisinmutante am nächsten kamen. Des weiteren wurden nach einer ähnlichen Strategie drei Varianten der RNase A synthetisiert, in denen die beiden Histidinreste His¹² und His¹⁹ im aktiven Zentrum einzeln und gemeinsam gegen L-4-Fluorhistidin ausgetauscht wurden; die Auswirkungen dieser Substitutionen in den drei RNase-A-Analoga wurden umfassend studiert.

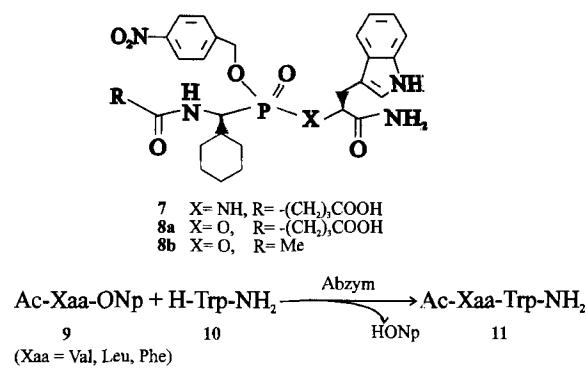
Bei proteasekatalysierten Peptidverknüpfungen spielt die Spezifität der Substratbindung im aktiven Zentrum^[7] eine entscheidende Rolle für den Syntheseerfolg. Leider kann eine einfache C-N-Ligase nicht, z.B. durch induzierte Anpassung, differenzierte Substratbindungsregionen für die strukturell so unterschiedlichen Aminosäureseitenkettenfunktionen ausbilden. Nach Linus Pauling hängt die Wirkung eines Enzyms von der Komplementarität des aktiven Zentrums zum Übergangszustand **5** einer Reaktion ab, wie in Schema 2 für den Peptidknüpfungsschritt gezeigt.



Schema 2.

Selbst wenn das Enzym das Substrat nur verhältnismäßig schwach binden darf, aber den Übergangszustand deutlich stabilisieren muß, ist es wenig wahrscheinlich, daß ein relativ einfaches Enzym als universelle Peptid-Ligase wirken kann. Das bestätigten auch zwei kürzlich erschienene Arbeiten von Hirschmann et al.^[12] sowie Jacobsen und Schultz^[13] über die Knüpfung von Peptidbindungen mit Hilfe katalytischer Antikörper (Abzyme). Um Antikörper mit der richtigen Anordnung der katalytischen Gruppen zu erzeugen, werden als Haptene Analoga des Übergangszustandes verwendet; exemplarisch für beide Strategien ist in Schema 2 das von Hirschmann et al.^[12] synthetisierte Übergangszustandsanalogon **6** gezeigt. Man injiziert diese Haptene anschließend einem Tier, dessen Immunsystem

Antikörper dagegen erzeugt. Da die Struktur des tetraedrischen Intermediats **5** auch entscheidend durch die Aminosäureseitenkettenreste R^1 und R^2 bestimmt wird, ist fraglich, ob universell einsetzbare katalytische Antikörper für die Peptidbindungs-knüpfung erzeugt werden können. Durch gezielte Änderungen der Struktur der Übergangszustandsanalogen **7**, **8a** und **8b** für die Bildung von Abzymen, die die Umsetzung von **9** mit **10** katalysieren, konnte durch den Einbau des Cyclohexylrestes in **7**, **8a** und **8b** eine verbreiterte Substratspezifität dieses Abzyms realisiert werden (Schema 3).



Schema 3.

Bei diesen abzymkatalysierten Dipeptidsynthesen konnten alle möglichen Stereoisomere in Ausbeuten zwischen 44 und 94 % erhalten werden. Die Abzyme katalysierten weder die Hydrolyse der Dipeptidprodukte noch der eingesetzten aktivierten Ester. Jacobsen und Schultz^[13] erzeugten Antikörper gegen ein neutrales Phosphonatdiester-Übergangszustandsanalogon, die die Verknüpfung eines N^{α} -Acylalaninazids mit einem Phenylalaninderivat im Vergleich zur unkatalysierten Reaktion signifikant beschleunigten. Bei der Bildung katalytischer Antikörper wird die grundlegende Eigenschaft des Immunsystems ausgenutzt, in den Faltungen der Antikörper Bindungsstellen analog den aktiven Zentren in den Enzymen zu generieren. Einen Be-

weis dafür lieferte die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur eines für die Peptidspaltung entwickelten katalytischen Antikörpers^[14], dessen aktives Zentrum eine Ser-His-Diade enthält und deshalb Ähnlichkeiten mit den katalytischen Ser-His-Asp-Triaden in den aktiven Zentren von Serin-Proteasen aufweist. Diese aufsehenerregenden Ergebnisse leiten mit Sicherheit eine neue Ära der Konstruktion von Peptid-Ligasen ein. Der Beginn der Entwicklung katalytischer Antikörper für die Peptidsynthese verbreitert das Methodenarsenal und bietet hoffnungsvolle Perspektiven für die Zukunft. Es ist aber noch weit bis zur routinemäßigen Anwendungsreife, die bei der enzymatischen Peptidsynthese erreicht ist, was die eindrucksvolle chemoenzymatische Segmentsynthese der RNase A belegt.

Stichworte: Katalytische Antikörper · Ligasen · Peptidsynthesen · RNase A · Subtilisin

- [1] K.-H. Altmann, M. Mutter, *Chem. Unserer Zeit* **1991**, *27*, 274–286.
- [2] R. Hirschmann, R. F. Nutt, D. F. Veber, R. A. Vitali, S. L. Varga, T. A. Jacob, F. W. Holly, R. G. Denkewalter, *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 507–508.
- [3] B. Gutte, R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 501–502.
- [4] H. Yajima, N. Fujii, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 5867–5871.
- [5] D. Y. Jackson, J. Vurnier, C. Quan, M. Stanley, J. Tom, J. A. Wells, *Science* **1994**, *266*, 243–247.
- [6] Ausgewählte Übersichten: a) J. S. Fruton, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **1982**, 239–306; b) H.-D. Jakubke, P. Kuhl, A. Könnecke, *Angew. Chem. 1985*, *97*, 79–87; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1985**, *24*, 85–93; c) W. Kullmann, *Enzymatic Peptide Synthesis*, CRC, Boca Raton, FL, USA, 1987; d) H.-D. Jakubke in *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology* (Hrsg.: S. Udenfriend, J. Meienhofer), Band 9, Academic Press, New York, **1987**, S. 103–165; e) K. Morihara, *Trends Biotechnol.* **1987**, *5*, 164–170; f) C.-H. Wong, K.-T. Wang, *Experientia* **1991**, *47*, 1123–1129; g) A. J. Andersen, J. Fromsgaard, P. Thorbeck, S. Aasmul-Olsen, *Chim. Oggi* **1991**, *9*(3), 17–24; *ibid.* **1991**, *9*(4), 17–23.
- [7] V. Schellenberger, H.-D. Jakubke, *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 1440–1452; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 1437–1449.
- [8] H.-D. Jakubke, *J. Chin. Chem. Soc.* **1994**, *41*, 355–370.
- [9] J. Bongers, E. P. Heimer, *Peptides* **1994**, *15*, 183–193.
- [10] C.-H. Wong, *Chimia* **1993**, *47*, 127–132.
- [11] P. Kuhl, U. Zacharias, H. Burckhardt, H.-D. Jakubke, *Monatsh. Chem.* **1986**, *117*, 1195–1204.
- [12] R. Hirschmann, A. B. Smith III, C. M. Taylor, P. A. Benkovic, S. D. Taylor, K. M. Yager, P. A. Sprengeler, S. J. Benkovic, *Science* **1994**, *265*, 234–237.
- [13] J. R. Jacobsen, P. G. Schultz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 5888–5892.
- [14] G. W. Zhou, J. Guo, W. Huang, R. J. Fletterick, T. S. Scanlan, *Science* **1994**, *265*, 1059–1064.