

# Auf dem Weg zu synthetischen DNA-Reparatur-enzymen: Einbau einer Flavin-Aminosäure in ein DNA-bindendes Oligopeptid\*\*

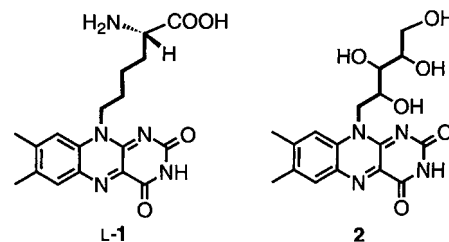
Thomas Carell\* und Jens Butenandt

Die UV-Bestrahlung von Zellen führt zur Bildung von Cyclobutan-Pyrimidindimeren aufgrund einer  $[2\pi + 2\pi]$ -Cycloaddition zweier in der DNA-Doppelhelix übereinander angeordneter Pyrimidinbasen.<sup>[1, 2]</sup> Um dem resultierenden, letalen Verlust an genetischer Information entgegenzuwirken, haben Organismen ausgeklügelte DNA-Reparaturmechanismen entwickelt, die derartige DNA-Schäden erkennen, reparieren und dadurch die Genomintegrität wiederherstellen.<sup>[3]</sup> Untersuchungen der erblichen und oft tödlich verlaufenden Krankheit *Xeroderma pigmentosum* haben aufgezeigt, daß DNA-Reparaturdefizite direkt mit der Entstehung von Tumoren zusammenhängen.<sup>[4, 5]</sup> DNA-Photolyasen sind frühzeitliche Reparaturenzyme, welche spezifisch Cyclobutan-Pyrimidindimere erkennen. Vermutlich wird hierbei das Pyrimidindimer aus der DNA-Doppelhelix heraus und in das aktive Zentrum des Enzyms hinein geklappt.<sup>[6]</sup> Die Reparatur des Schadens wird dann durch eine Reihe lichtgetriebener Energie- und Elektronentransferschritte eingeleitet. Zunächst führt die Anregung eines Flavinsemichinon-Cofaktors ( $\text{FADH}^\bullet$ ) zu dessen Reduktion. Die Grundlage hierfür ist ein Elektronentransfer vom ca. 13 Å entfernten  $\text{Trp}^{306}$ .<sup>[6]</sup> Ein zweiter lichtgetriebener Elektronentransfer von  $\text{FADH}^\bullet$  zum gebundenen Pyrimidindimer führt zu dessen Monomerisierung (Reparatur). Neben  $\text{FADH}^\bullet$  haben alle bekannten mikrobiellen Photolyasen entweder ein 8-Hydroxy-5-desazaflavin oder ein Methenyltetrahydrofolat als zweiten Cofaktor. Dieser überträgt als Photoantenne Anregungsenergie auf die Flavineinheit.<sup>[6, 7]</sup>

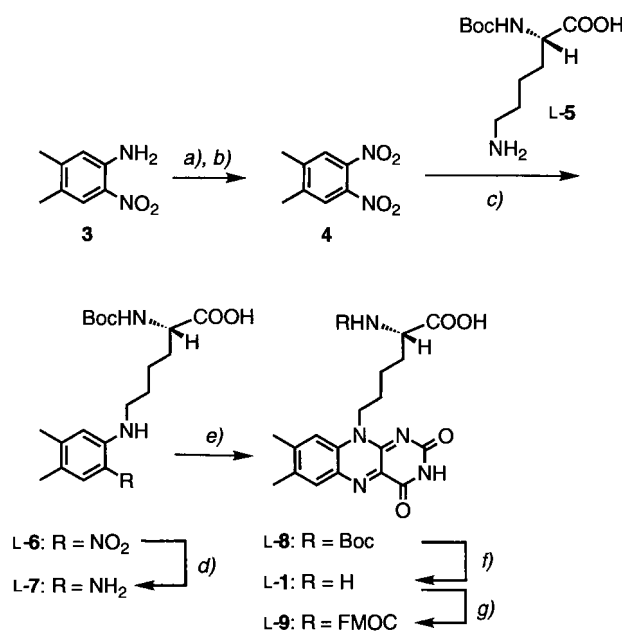
Zum besseren Verständnis dieser Energie- und Elektronentransferschritte haben wir ein Forschungsprogramm initiiert, indem wir kleine, Cofaktor enthaltende Modellproteine darstellen, die in der Lage sind, stabile und strukturell klar definierte Komplexe mit DNA zu bilden. Diese Modellproteine sollten leicht modifizierbar sein und den chemischen Einbau von Cofaktoren gestatten, um ein detailliertes Studium der Abhängigkeiten der Energie- und Elektronentransferprozesse an der Grenze zwischen Proteinen und Nucleinsäuren zu ermöglichen.

Zu diesem Zweck haben wir Oligopeptide mit der Sequenz der DNA-bindenden Domäne des *Helix-loop-helix*-Transkriptionsfaktors MyoD<sup>[8, 9]</sup> durch Festphasensynthese dargestellt. In dieses Peptid wurde die DNA-Reparaturfunktion durch den Einbau der Flavin-Aminosäure L-1 integriert.<sup>[10]</sup> Diese Cofaktor-modifizierten Oligopeptide wurden auf ihre Fähigkeit hin untersucht, Cyclobutan-Pyrimidindimere in Einzelstrang-DNA zu reparieren. Für diese Untersuchungen wurde ein definiertes Oligonucleotid dargestellt, das einen synthetisch herbeigeführten Dimerschaden enthält.<sup>[11]</sup> Das definierte Substrat ermög-

lichte die Quantifizierung der Reparaturgeschwindigkeit und erlaubte es, potentielle Nebenprodukte mit Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) aufzuspüren, wie sie bei Bestrahlung von DNA in Gegenwart von Riboflavin 2 beobachtet werden.<sup>[12]</sup>



Die Synthese der L-Flavin-Aminosäure L-1 gelang in Grammengen auf dem in Schema 1 gezeigten Weg. Die ersten zwei Schritte beinhalten die Oxidation des Nitrodimethylanilins 3,



Schema 1. Synthese der Flavin-Aminosäure L-1 und der Fmoc-geschützten Aminosäure L-9: a)  $\text{H}_2\text{SO}_5$ , Raumtemperatur (r.t.), 80%. b)  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{HNO}_3$ , r.t., 85%. c)  $\text{KOAc}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{EtOH}$ ,  $n\text{-BuOH}$ , 80 °C, 3d, 60%. d)  $\text{H}_2$ , Pd/C, quant. e)  $\text{HOAc}$ ,  $\text{B(OH)}_3$ , Alloxan, r.t., 65%. f) Trifluoressigsäure (TFA), r.t., quant. g) Fmoc-OSu,  $\text{NaCO}_3$ , 95%.

zuerst mit Caroscher Säure und dann mit Wasserstoffperoxid/Salpetersäure, zum Dinitrodimethylbenzol 4.<sup>[13]</sup> Reaktion von 4 mit dem chiralen Baustein *N*- $\alpha$ -Boc-L-Lysin, L-5, (Boc = *tert*-Butoxycarbonyl) ergab das Nitroanilin L-6. L-5 wurde ausgewählt, da die freie Carboxylfunktion die baseinduzierte Racemisierung des  $\alpha$ -CH-Chiralitätszentrums während der *ipso*-Substitution verhindert. Die Reaktionsbedingungen wurden dann systematisch zur weiteren Unterdrückung der Racemisierung variiert. Optimale Resultate wurden schließlich mit Kaliumacetat als Base in Wasser/Ethanol/*n*-Butanol (1:1:2) erzielt. Die katalytische Hydrierung der Nitroanilin-Aminosäure L-6 ergab die Aminosäure L-7, welche mit Alloxan-Monohydrat zur Boc-geschützten Flavin-Aminosäure L-8 umgesetzt wurde.<sup>[14]</sup> Entschützen von L-8 und Reaktion der entstehenden ungeschützten Flavin-Aminosäure L-1 mit 9-Fluorenylmethoxycarbonyl-*N*-hydroxysuccinimid (Fmoc-OSu) in Natriumhydrogencarbo-

[\*] Dr. T. Carell, Dipl.-Chem. J. Butenandt  
Laboratorium für Organische Chemie, ETH-Zentrum  
Universitätsstrasse 16, CH-8092 Zürich (Schweiz)  
Telefax: Int. +1/6321109  
E-mail: tcarell@org.chem.ethz.ch

[\*\*] Diese Arbeit wurde gefördert vom Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung, durch ein Liebig-Stipendium der Stiftung Stipendien-Fonds des Verbandes der Chemischen Industrie an T. C. und durch ein Doktoranden-Stipendium vom Boehringer Ingelheim Fonds an J. B. Wir danken der ASTA Medica, Frankfurt, und der BASF AG, Ludwigshafen, für die Unterstützung mit Fmoc-geschützten Aminosäuren (ASTA) und für die geschützten Nucleotidbausteine und das benötigte Festphasenmaterial für die Oligonucleotidsynthese (BASF). Wir sind Prof. F. Diederich für die Unterstützung dieser Arbeiten zu besonderem Dank verpflichtet.

nat-Lösung ergab die Fmoc-geschützte L-Flavin-Aminosäure **L-9** in einer Gesamtausbeute von 25%.

Zur Bestimmung der Enantiomerenreinheit der Flavin-Aminosäure **L-1** wurde die korrespondierende D-Aminosäure **D-1**, Schema 1 folgend, mit dem D-Lysin-Ausgangsmaterial **D-5** dargestellt. Das Racemat erhielt man durch Mischen der beiden Enantiomere. Die Trennung der Enantiomere gelang mit Dünnschicht-Ligandenaustauschchromatographie an einer Umkehrphase (CHIRALPLATES<sup>[15]</sup>). Ein Verdünnungsexperiment – abnehmende Mengen des D-Isomers **D-1** wurden der L-Form zugesetzt und die Mischung dünn-schichtchromatographisch untersucht – ergab, daß Mengen bis zu 1 % des D-Isomers nachweisbar sind. Da das synthetische Material (**L-1**) nur einen Spot ergibt, hat die synthetische Flavin-Aminosäure **L-1** eine Enantiomerenreinheit von  $\geq 99:1$ .

Zur Synthese der in Abbildung 1 dargestellten Oligopeptide wurde ein manuelles Standard-Fmoc-Festphasensynthese-Protokoll leicht modifiziert.<sup>[16]</sup> Für das erste Design der Flavin-Peptide wurde die Kristallstruktur des *Helix-loop-helix*-Transkriptionsfaktors MyoD im Komplex mit DNA analysiert.<sup>[17]</sup>

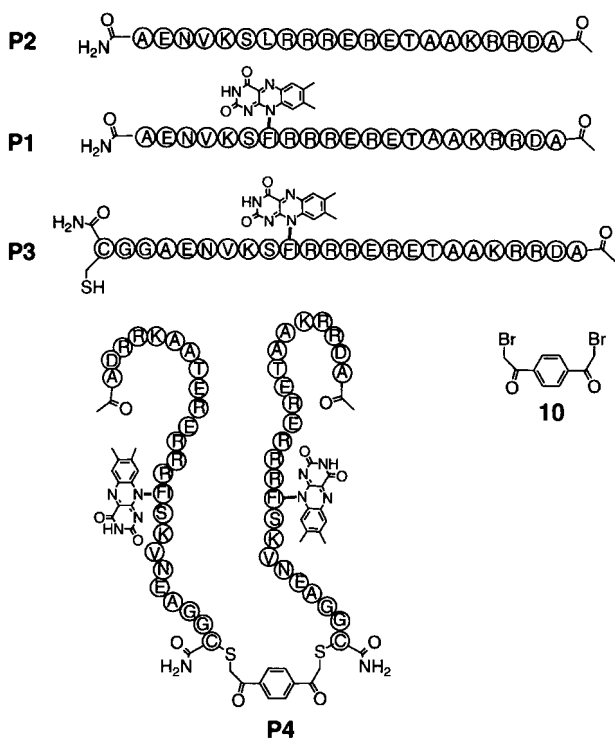


Abb. 1. Sequenz des synthetisierten Oligopeptides **P2** und der Flavin-enthaltenden Oligopeptide **P1** und **P3**. Darstellung des Templates **10** und des verknüpften Oligopeptides **P4**. Die Peptide wurden manuell unter Verwendung eines Rink-Amide-MBHA-Trägers (Fmoc-Chemie mit einem HOBt/HBTU-Kupplungsprotokoll) dargestellt.

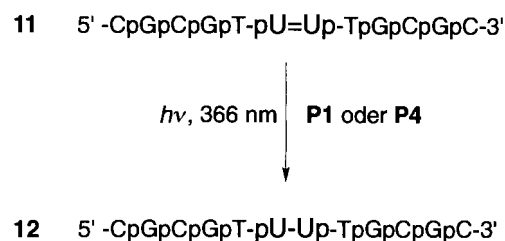
Die Seitenkette von Leu<sup>121</sup>, am C-Terminus der basischen Domäne gelegen, ragt in die große Furche der DNA-Doppelhelix. Deshalb wurde Leu<sup>121</sup> durch die Flavin-Aminosäure **L-1** ersetzt. Die Festphasensynthese des Flavin-Oligopeptides **P1** wurde analog zur Synthese des Flavin-freien Peptides **P2** durchgeführt. Aufgrund der geringeren Kupplungsgeschwindigkeit der Flavin-Aminosäure **L-9** wurde die Kupplungszeit dieser Aminosäure von 25 auf 45 min erhöht, und die Kupplung wurde dreimal mit jeweils einem dreifachen Überschuß durchgeführt. *Capping*-Prozeduren (z. B. Essigsäureanhydrid/Hünig-Base), die oft nach einer Kupplung durchgeführt werden, wurden nach dem

Einbau des Flavins, wann immer möglich, vermieden. Die Abspaltung des fertigen Peptides vom Träger und die Abspaltung der Seitenketten-Schutzgruppen wurde mit leicht erhöhten Mengen an Triisopropylsilan (2 Vol.-%) und, im Fall des Cystein-enthaltenden Peptides **P3**, an Ethandithiol (2 Vol.-%) durchgeführt, um die Flavin-Oligopeptide **P1** und **P3** in Ausbeuten und Reinheiten ähnlich denen des Nicht-Flavin-Peptid **P2** zu erhalten.

Alle Peptide wurden durch präparative Umkehrphasen-HPLC gereinigt und mit analytischer Umkehrphasen-HPLC, Elektrospray-Massenspektrometrie und Laserdesorptions-Massenspektrometrie charakterisiert.<sup>[18]</sup> Das UV/Vis-Spektrum der Flavin-Peptide zeigt die typischen Flavinbanden bei ca. 450 und 360 nm. In den Fluoreszenzspektren der Peptide ist die Fluoreszenzbande bei 550 nm beobachtbar.

Zur Steigerung der DNA-bindenden Eigenschaften müssen derartige basische Oligopeptide, z. B. durch Anknüpfen an ein Templat, dimerisiert werden.<sup>[19]</sup> Derartige Dimere sind dann in der Lage, die Eigenschaft von *Helix-loop-helix*-Proteinen nachzuahmen, in eine  $\alpha$ -helicale Konformation zu falten und strukturell klar definierte Komplexe mit dem DNA-Doppelstrang zu bilden.<sup>[19]</sup> Um zu untersuchen, ob die Flavin-Peptide dimerisiert werden können, haben wir das Peptid **P3** dargestellt, das über einen Cys-Gly-Gly-Linker verfügt.<sup>[19]</sup> Dieses Peptid wurde dann in Anwesenheit des Bis(bromacetyl)benzol-Templates **10**,<sup>[20]</sup> aber unter Ausschluß von Sauerstoff, gerührt (Abb. 1). Hierbei wurde eine neue Peptidspezies erhalten, die durch präparative Umkehrphasen-HPLC isoliert wurde.<sup>[18]</sup> Das Elektrospray-Massenspektrum dieser Verbindung belegt das Vorliegen der Templat-verknüpften Verbindung **P4**.

Um zu untersuchen, ob die Flavineinheit innerhalb des Transkriptionsfaktor-Fragmentes eine funktionsfähige Einheit ist, mit der eine saubere DNA-Reparatur durchgeführt werden kann, wurden die Peptide **P1** und **P4** zu einer Lösung gegeben, die das synthetische Oligonucleotid **11**<sup>[11]</sup> enthält (Schema 2).



Schema 2. Reparatur des geschädigten Oligonucleotides **11**, welches ein spezifisch eingebautes Cyclobutan-Pyrimidindimer enthält (U=U) [11]. Das Oligonucleotid-Produkt der Reaktion, **12**, wurde unabhängig synthetisiert und coinjiziert, um die Bildung von **12** abzusichern.

Die Reaktionslösungen wurden mit Stickstoff entgast und bei 4 °C mit Tageslicht oder mit Licht der Wellenlänge 366 nm bestrahlt. Den Lösungen wurde Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) zugesetzt, um die Isoalloxazin-Einheit photochemisch zu reduzieren. Hierbei wurde das Flavin in die auch im Enzym aktive, voll reduzierte Form überführt. Das Peptid **P1** wandelt das Oligonucleotid **11** mit einem eingebauten Schaden sehr sauber zum reparierten Oligonucleotid **12** um. Die Bestrahlungszeiten, die für die vollständige Umwandlung benötigt werden, schwanken hierbei zwischen einer und mehreren Stunden je nach verwendeter Peptid- und Oligonucleotid-Konzentration und in Abhängigkeit von der Salzkonzentration. Dieses Ergebnis zeigt, daß die Assoziation des Peptides mit dem Oligonucleotid wichtig ist. Hierbei sind vermutlich die Arginin- und Lysin-

Phosphodiester-Wechselwirkungen von entscheidender Bedeutung. Die sich bildenden Assoziate sind jedoch noch unstrukturiert, da ähnliche Transkriptionsfaktor-Fragmente nur mit Doppelstrang-DNA definierte Komplexe bilden können.<sup>[21]</sup>

Trotzdem: Während der Bestrahlung wird das reparierte Oligonucleotid **12** sehr sauber und ohne das Auftreten von Strangbrüchen – die sich bei Bestrahlung von DNA mit Riboflavin ergeben<sup>[12]</sup> – gebildet. Das Resultat eines langen Bestrahlungsexperimentes ist in Abbildung 2 dargestellt (10  $\mu$ M DNA **11**,

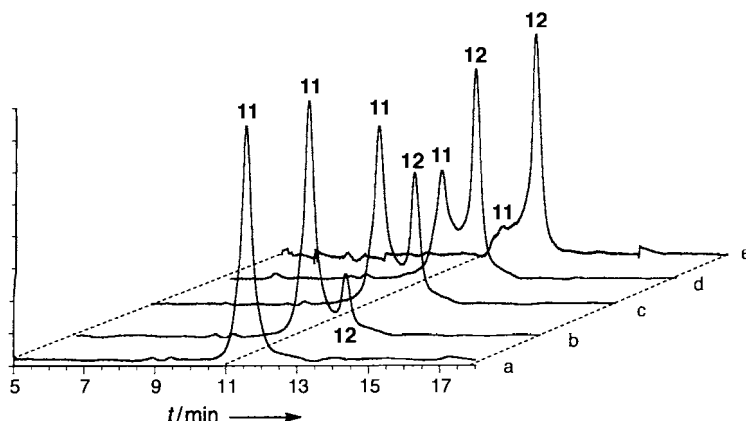


Abb. 2. HPL-Chromatogramme (a: 0 h; b: 1 h; c: 3 h; d: 6 h; e: 14 h) während der Bestrahlung von 10  $\mu$ M Oligonucleotid-11-Lösung im Reaktionspuffer (12.5 mM Tris, 5 mM EDTA, 6 mM NaOH, pH 7.8) bei 4 °C in Anwesenheit von 20  $\mu$ M Flavin-Oligopeptid **P1**. Säule: Lichrosphere C18, 100 Å, 0.4  $\times$  250 mm. Mobile Phase A: H<sub>2</sub>O, 0.1 M NEt<sub>3</sub> · HOAc. Mobile Phase B: 80% CH<sub>3</sub>CN, 20% H<sub>2</sub>O, 0.1 M NEt<sub>3</sub> · HOAc. Gradient 0 bis 30% B in 30 min. Injektionsvolumen: 20  $\mu$ L. *t* = Retentionszeit.

20  $\mu$ M Flavin-Peptid **P1**). 75% Umwandlung von **11** nach **12** wird unter diesen Bedingungen nach 6 h Bestrahlung erhalten. Die weitere Bestrahlung führt zur fast vollständigen Reparatur. Die unabhängige Synthese des reparierten Oligonucleotides **13**<sup>[11]</sup> belegte nach der Coinjektion die ausschließliche Bildung von **13**.

Erste Bestrahlungsexperimente mit dem Peptid **P4** zeigen, daß das dimere Oligopeptid im Vergleich zu **P1** die Reparaturreaktion schneller und bei niedrigerer, substöchiometrischer Konzentration durchführt (1–2  $\mu$ M Peptid, 10  $\mu$ M DNA). Bei Bestrahlung der DNA-Lösungen mit Riboflavin oder mit dem Peptid **P1** ohne die Anwesenheit von EDTA findet statt der Reparaturreaktion eine Zersetzung des Oligonucleotides statt. Bei Abwesenheit eines Flavin-Peptids und in Gegenwart des Flavin-freien Peptids **P2** wurde unter ansonsten identischen Bedingungen keine Reparatur beobachtet. Diese Kontrollexperimente bestätigen, daß die synthetisierten, Flavin-derivatisierten Transkriptionsfaktor-Fragmente **P1** und **P4** in der Lage sind, eine primitive DNA-Reparatur-Funktion auszuüben. Bis jetzt wurde die Reversion eines Pyrimidindimers innerhalb eines DNA-Stranges lediglich mit Hilfe des elektronendonierenden Tripeptides Lys-Trp-Lys durchgeführt. In diesem Fall wurde maximal 60% Umsatz erzielt, da die Photoreparatur schädliche Strahlung einer Wellenlänge < 300 nm benötigte.<sup>[22]</sup> Kürzlich wurde über die katalytische Reparatur mit Diimin(9,10-phenanthrenchinon)rhodium-Komplexen berichtet. Diese Reparaturreaktion beruht jedoch auf einer Elektronenabstraktion aus dem DNA-Strang.<sup>[23]</sup> Damit sind die Flavin-Peptide die ersten Verbindungen, die eine vollständige Reparatur geschädigter Oligonucleotide durch Simulation des lichtgetriebenen Reparaturprozesses der DNA-Photolyasen bewerkstelligen können.<sup>[24]</sup>

Wir haben gezeigt, daß die enantiomerenreine Flavin- $\alpha$ -aminosäure **L-1** in Grammengen leicht erhältlich ist und als Bau-

stein in der FMOC-Festphasensynthese zur Darstellung von Oligopeptiden verwendet werden kann. Die erhaltenen Flavin-Peptide lassen sich mit Hilfe eines Templates leicht ligieren.<sup>[25, 26]</sup> Besonders wichtig ist der Befund, daß die Flavin-Peptide ein synthetisches, Pyrimidindimer-enthaltendes Oligonucleotid sauber reparieren können. Dieses Resultat ermöglicht nun die Darstellung kleiner, DNA-bindender Cofaktorproteine, mit denen Energie- und Elektronentransferprozesse an der Grenze zwischen Proteinen und DNA ausgelotet werden können.

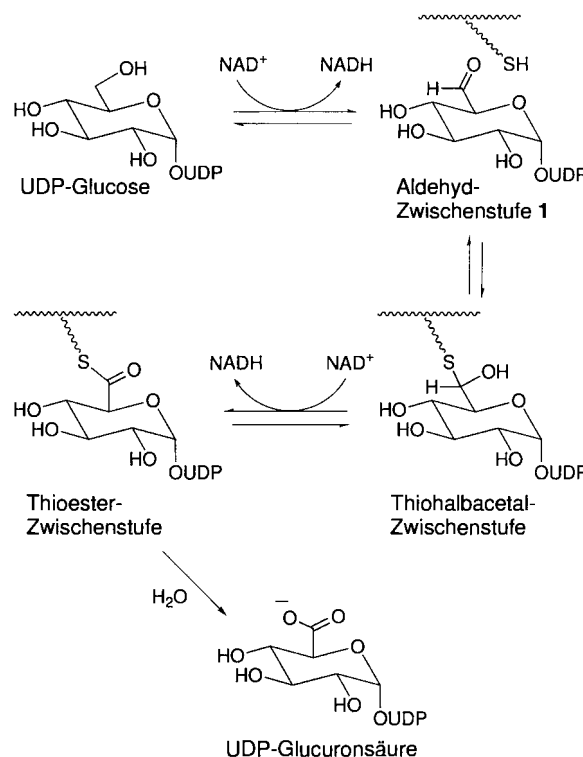
Eingegangen am 15. Januar,  
veränderte Fassung am 24. März 1997 [Z 10000]

**Stichworte:** DNA-Reparatur · Elektronentransfer · Flavine · Nucleobasen · Peptide

- [1] T. Lindahl, *Nature (London)* **1993**, 362, 709–715.
- [2] J.-S. Taylor, *Acc. Chem. Res.* **1994**, 27, 76–82.
- [3] E. C. Friedberg, G. W. Walker, W. Siede, *DNA Repair and Mutagenesis*, ASM Press, Washington, **1995**.
- [4] H. W. Thielmann in *Recent Results in Cancer Research, Vol. 128 (Skin Carcinogenesis in Man and in Experimental Models)* (Hrsg.: E. Hecker, E. G. Jung, F. Marks, W. Tilgen), Springer, **1993**, S. 275–297.
- [5] Geschädigte DNA-Reparaturfaktoren könnten auch für das Auftreten der Alterungsphänomene Werner- und Hutchinson-Gilford-Syndrom verantwortlich sein: C.-E. Yu, J. Oshima, Y.-H. Fu, E. M. Wijman, F. Hisama, R. Alisch, S. Matthews, J. Nakura, T. Miki, S. Ouais, G. M. Martin, J. Mulligan, G. D. Schellenberg, *Science* **1996**, 272, 258–262.
- [6] H.-W. Park, S.-T. Kim, A. Sancar, J. Deisenhofer, *Science* **1995**, 268, 1866–1872.
- [7] Übersichten siehe: A. Sancar, *Biochemistry* **1994**, 33, 1–9. S.-T. Kim, A. Sancar, *Photochem. Photobiol.* **1993**, 57, 895–904. P. F. Heelis, R. F. Hartman, S. D. Rose, *Chem. Soc. Rev.* **1994**, 27, 394–401. T. P. Begley, *Acc. Chem. Res.* **1994**, 27, 394–401. T. Carell, *Angew. Chem.* **1995**, 107, 2697–2700; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 2491–2494.
- [8] D. Sassoon, G. Lyons, W. E. Wright, V. Lin, A. Lassar, H. Weintraub, M. Buckingham, *Nature (London)* **1989**, 341, 303–307.
- [9] P. Lamb, S. L. McKnight, *Trends Biochem. Sci.* **1991**, 16, 417–422.
- [10] Einbau anderer Cofaktoraminosäuren in kleine Peptide: B. Imperiali, R. Sinha Roy, G. K. Walkup, L. Wang in *Molecular Design and Bioorganic Catalysis* (Hrsg.: C. S. Wilcox, A. D. Hamilton) Kluwer, Dordrecht, **1996**, S. 35–52.
- [11] Das eingebaute Cyclobutan-Uracildimer U=U enthält statt der verbrückenden Phosphateinheit (p) eine isosterische Formacetalbrücke. Diese ermöglicht die Synthese des Schadens in großen Mengen, wie es für die geplanten sequenzabhängigen und abstandsabhängigen Reparaturstudien benötigt wird. Die Formacetalbrücke ist ein isosterischer Ersatz der Phosphateinheit, wie wir aus einer Röntgenstrukturanalyse des Monomerbausteines wissen. Das Formacetal-Dimer ist auch ein Substrat für die Photolyasen aus den Spezies *Neurospora crassa* und *Anacystis nidulans*. (Für die Überlassung der Enzyme danken wir Prof. A. P. M. Eker, Erasmus Universität, Rotterdam). Die Synthese des Dimers, dessen Röntgenstrukturanalyse, der Einbau in Oligonucleotide und die Reparaturstudien mit den Enzymen werden in Kürze mitgeteilt. Laserdesorptions-Massenspektrometrie der Oligonucleotide: (Detektion der negativ geladenen Ionen): **11** Masse ber. 3548.6, Masse gef. 3549. **12**: Masse ber. 3548.6, Masse gef. 3548.
- [12] Der spektroskopische polyT-Assay, der normalerweise zur Bestimmung von Photolyase-Aktivitäten angewendet wird, ist hier nicht anwendbar, da er die Detektion von Strangbrüchen nicht ermöglicht. Bestrahlung von DNA in Gegenwart von Riboflavin: K. Ito, S. Inoue, K. Yamamoto, S. Kawanashi, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 13221–13227. J. G. Peak, M. J. Peak, M. MacCoss, *Photochem. Photobiol.* **1984**, 39, 713–716. Mit RNA: P. Burgstaller, M. Famulok, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 1137–1138.
- [13] E. Bamberger, R. Hübner, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1903**, 36, 3803–3823. R. Kuhn, W. van Klaveren, *ibid.* **1938**, 71, 779–780.
- [14] R. Kuhn, F. Weygand, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1934**, 67, 1409–1413. R. Kuhn, F. Weygand, *ibid.* **1935**, 68, 1282–1288.
- [15] CHIRALPLATES sind erhältlich von Macherey & Nagel GmbH & Co. KG, D-52313 Düren. K. Günther, *J. Chromatogr.* **1988**, 448, 11–30.

Phase A: 99.5% H<sub>2</sub>O, 0.5% TFA. Mobile Phase B: CH<sub>3</sub>CN. Gradient 5 bis 40 min. Retentionszeiten=**P2**: 19.7 min, **P3**: 19.7 min, **P4**: 21.7 min. Präparative HPLC: Vydac C18, 100 Å, 2.5  $\times$  250 mm. Mobile Phase A: 99.5% H<sub>2</sub>O,

- 0.5% TFA. Mobile Phase B: CH<sub>3</sub>CN. Gradient 10 bis 30% B in 45 min. ESI-Massenspektren: **P1**: Masse ber., 2794, Masse gef. 2794. **P2**: Masse ber. 2554, Masse gef. 2556. **P3**: Masse ber. 3012, Masse gef. 3011. **P4**: Masse ber. 6181, Masse gef. 6181.
- [19] R. V. Talanian, J. McKnight, P. S. Kim, *Science* **1990**, *249*, 769–771. M. Ueno, A. Murakami, K. Makino, T. Morii, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 12575–12576. B. Cuenoud, A. Schepartz, *Science* **1993**, *259*, 510–513. C. Rodgers Palmer, L. S. Sloan, J. C. Adrian, Jr., B. Cuenoud, D. N. Paolella, A. Schepartz, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 8899–8907.
- [20] P. Ruggli, E. Gassenmeier, *Helv. Chim. Acta* **1939**, *22*, 496–503.
- [21] Diskussion der Bindung von bZIP-Peptiden an DNA s.: S. J. Metallo, A. Schepartz, *Nature Struct. Biol.* **1997**, *4*, 115–117.
- [22] C. Hélène, M. Charlier, *Photochem. Photobiol.* **1977**, *25*, 429–434.
- [23] Bericht nach der Annahme dieses Manuskriptes: P. J. Dandliker, R. E. Holmlin, J. K. Barton, *Science* **1997**, *275*, 1465–1468.
- [24] T. Carell, R. Epple, V. Gramlich, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 676–679; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 620–623. R. Epple, E. U. Wallenborn, T. Carell, *J. Am. Chem. Soc.* eingereicht.
- [25] Übersichten über *De-novo*-Protein-design: G. Tuchscherer, P. Dumy, M. Mutter, *Chimia* **1996**, *50*, 644–648. J. S. Richardson, D. C. Richardson, *Trends Biochem. Sci.* **1989**, *14*, 304–309. J. W. Bryson, S. F. Betz, H. S. Lu, D. J. Suich, H. X. Zhou, K. T. O'Neil, W. F. DeGrado, *Science* **1995**, *270*, 935–941.
- [26] Frühere Studien zur Modifikation von DNA-bindenden Proteinen und Peptiden: C.-H. B. Chen, D. S. Sigman, *Science* **1987**, *237*, 1197–1201. J. P. Sluka, S. J. Horvath, M. F. Bruist, M. I. Simaon, P. B. Dervan, *ibid.* **1987**, *238*, 1129–1132. R. H. Ebright, Y. W. Ebright, P. S. Pengergrast, A. Gunasekera, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 2882–2886.



Schema 1. Vorschlag für den Mechanismus der von der UDP-Glucose-Dehydrogenase katalysierten Reaktion.

## Synthese von Uridindiphospho- $\alpha$ -D-glucosahexodialdose und deren Rolle in der durch UDP-Glucose-Dehydrogenase katalysierten Reaktion\*\*

Robert E. Campbell und Martin E. Tanner\*

Die UDP-Glucose-Dehydrogenase katalysiert die irreversible, NAD<sup>+</sup>-abhängige Oxidation von UDP-Glucose zu UDP-Glucuronsäure (Schema 1).<sup>[1]</sup> Die Säugern werden in der Leber Stoffwechsel-Endprodukte mit dieser Verbindung für die Ausscheidung derivatisiert,<sup>[2]</sup> und sie spielt eine Rolle in der Biosynthese von Glycosaminoglycanen wie Heparin<sup>[3]</sup> und Hyaluronsäure.<sup>[4]</sup> In vielen pathogenen Bakterienstämmen wie den Streptokokken der Gruppe A<sup>[5]</sup> und *Streptococcus pneumoniae* Typ 3<sup>[6]</sup> liefert diese Oxidation die Glucuronsäure, die für die Synthese einer phagocytosehemmenden Kapsel benötigt wird. Diese Kapsel ermöglicht es den Bakterien, dem Immunsystem des Wirts zu entgehen, und trägt daher wesentlich zu ihrer Virulenz bei.<sup>[7–9]</sup>

Die UDP-Glucose-Dehydrogenase gehört zu einer kleinen Klasse von Enzymen, die die zweistufige Oxidation eines Alkohols zur Säure ohne die Freisetzung eines Aldehyds als Zwischenprodukt katalysieren.<sup>[1]</sup> Entsprechend konnte das vermutete Zwischenprodukt, Diphospho- $\alpha$ -D-glucosahexodialdose **1**, nie nachgewiesen oder mit Reagentien, die auf Carbonylgruppen wirken, während der Oxidation abgefangen werden.<sup>[10–12]</sup> In einer früheren Arbeit über dieses Enzym aus der Rinderleber wurde die Vermutung geäußert, daß der Aldehyd kein Zwischenprodukt der Reaktion sei, sondern daß der Alkohol direkt in ein Imin umgewandelt werde, das über eine Lysinseitenkette an das Enzym gebunden sei.<sup>[13]</sup> Dies paßt nicht zu dem damals

schon bekannten Nachweis von nur einem Sauerstoffatom aus dem Lösungsmittel in der resultierenden Säure.<sup>[14]</sup> Bei einem Imin als Zwischenprodukt würde man erwarten, daß beide Sauerstoffatome der Säure-Carboxygruppe aus dem Lösungsmittel stammen. Um die Behauptung zu stützen, daß **1** ein fest gebundenes Zwischenprodukt ist, haben wir es synthetisiert und die kinetischen Parameter bestimmt, die seine enzymatische Oxidation beschreiben.

In früheren Arbeiten war berichtet worden, daß **1** mit Hilfe der Enzyme UDP-Galactose-4-Epimerase und Galactose-Oxidase aus UDP-Glucose gewonnen werden kann.<sup>[11, 13]</sup> Bei diesem Verfahren kann man jedoch nur in sehr kleinem Maßstab arbeiten und benötigt große Mengen teurer Enzyme. Außerdem führt dieser Ansatz notwendigerweise zu einem untrennbaren Gemisch von Epimeren bezüglich C-4, und entsprechend wurde weder eine spektroskopische Charakterisierung des Produkts vorgenommen noch eine Angabe zu seiner Reinheit gemacht. Daher beschlossen wir, Verbindung **1** schrittweise zu synthetisieren.

Die 1995 erschienene Arbeit von Müller und Schmidt<sup>[15]</sup> über die Synthese eines dTDP-Ketozuckers brachte uns auf die Idee, eine Alkeneinheit als maskierte Aldehydfunktion zu nutzen (Schema 2). Die Synthese begann mit der Oxidation der bekannten Tetraacetylglucose **2** an C-6.<sup>[16]</sup> Es ist zwar vielfach belegt, daß in solchen Systemen leicht eine  $\beta$ -Eliminierung zum  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Enon vorkommt,<sup>[17]</sup> doch verlief eine Moffat-Oxidation bei ähnlichen Verbindungen mild genug, um den Anteil an Eliminierung zu minimieren.<sup>[18]</sup> Als Kupplungsreagens wurde anstelle von *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid das wasserlösliche Carbodiimid CMC verwendet, weil sich das damit bildende Harnstoffderivat leicht extrahieren läßt. Auf diese Weise konnten wir den Aldehyd **3** synthetisieren und setzten ihn ohne vollständige Reinigung weiter ein. Die Alkenfunktion wurde mit Lombardos Reagents<sup>[19]</sup> eingeführt, und Verbindung **4** (Tabelle 1) wurde in 12% Ausbeute bezogen auf **2** isoliert. Das

[\*] Dr. M. E. Tanner, R. E. Campbell  
The University of British Columbia, Department of Chemistry  
Vancouver, BC V6T 1Z1 (Kanada)  
Telefax: Int. + 604/822-2847  
E-mail: mtanner@chem.ubc.ca

[\*\*] Diese Arbeit wurde vom kanadischen Natural Sciences and Engineering Research Council gefördert.