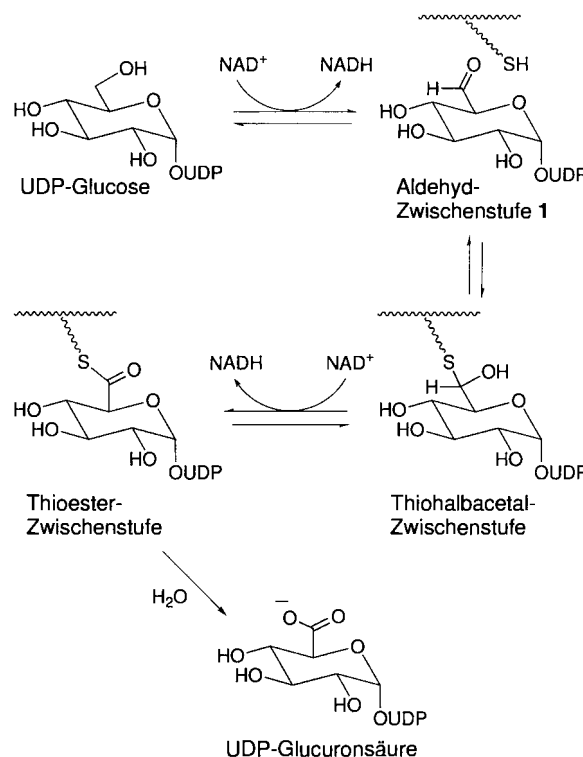


- 0.5% TFA. Mobile Phase B: CH₃CN. Gradient 10 bis 30% B in 45 min. ESI-Massenspektren: **P1**: Masse ber., 2794, Masse gef. 2794. **P2**: Masse ber. 2554, Masse gef. 2556. **P3**: Masse ber. 3012, Masse gef. 3011. **P4**: Masse ber. 6181, Masse gef. 6181.
- [19] R. V. Talanian, J. McKnight, P. S. Kim, *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- α -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⁺-abhängige Oxidation von UDP-Glucose zu UDP-Glucuronsäure (Schema 1).^[1] Die Säugern werden in der Leber Stoffwechsel-Endprodukte mit dieser Verbindung für die Ausscheidung derivatisiert,^[2] und sie spielt eine Rolle in der Biosynthese von Glycosaminoglycanen wie Heparin^[3] und Hyaluronsäure.^[4] In vielen pathogenen Bakterienstämmen wie den Streptokokken der Gruppe A^[5] und *Streptococcus pneumoniae* Typ 3^[6] 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.^[7–9]

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.^[1] Entsprechend konnte das vermutete Zwischenprodukt, Diphospho- α -D-glucosahexodialdose **1**, nie nachgewiesen oder mit Reagentien, die auf Carbonylgruppen wirken, während der Oxidation abgefangen werden.^[10–12] 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.^[13] Dies paßt nicht zu dem damals

schon bekannten Nachweis von nur einem Sauerstoffatom aus dem Lösungsmittel in der resultierenden Säure.^[14] 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.^[11, 13] 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^[15] 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.^[16] Es ist zwar vielfach belegt, daß in solchen Systemen leicht eine β -Eliminierung zum α,β -ungesättigten Enon vorkommt,^[17] doch verlief eine Moffat-Oxidation bei ähnlichen Verbindungen mild genug, um den Anteil an Eliminierung zu minimieren.^[18] 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 Reagens^[19] 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.

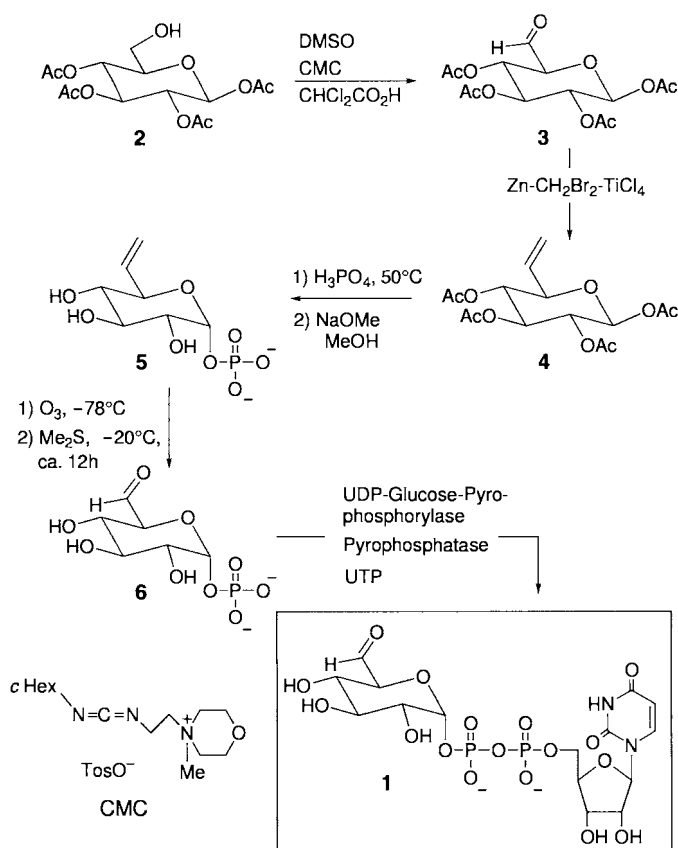
Tabelle 1. Ausgewählte physikalische Daten der Verbindungen 1, 4 und 5[a].

1 (Dinatriumsalz): $^1\text{H-NMR}$ (D_2O): δ = 3.51 (m, 2H, H-2", H-4"), 3.74 (dd, J = 9.5, 9.5, 1H, H-3"), 3.83 (dd, J = 1.3, 10.0, 1H, H-5"), 4.16–4.42 (m, 4H, H-3', H-4', H-5'), 4.34 (d, J = 3.3, 1H, H-2'), 5.17 (d, J = 1.3, 1H, H-6"), 5.62 (dd, $J(\text{H,H})$ = 3.4, $J(\text{H,P})$ = 7.6, 1H, H-1"), 5.95 (m, 2H, H-1', H-5), 7.91 (d, J = 8.2, 1H, H-6); $^{31}\text{P-NMR}$ (D_2O): δ = -12.45 (d, $J(\text{P,P})$ = 20.9, 1P), -10.82 (d, $J(\text{P,P})$ = 20.9, 1P); MS: ber. für $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_{17}\text{P}_2\text{Na}$ (nichthydratisiertes Mononatriumsalz) 585.01349, gef. 585.01370

4: $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 1.96, 1.98, 2.00, 2.07 (4s, 12H, CH_3), 3.99 (dd, J = 7.1, 9.8, 1H, H-5), 4.93 (dd, J = 9.7, 9.7, 1H, H-4), 5.09 (dd, J = 9.6, 8.3, 1H, H-2), 5.23 (dd, J = 9.5, 9.5, 1H, H-3), 5.26 (d, J = 10.5, 1H, H-7-trans), 5.34 (d, J = 17.2, 1H, H-7-cis), 5.69 (m, 1H, H-6), 5.73 (d, J = 8.3, 1H, H-1); DCI-MS (NH_3): m/z (%): 362 (100, $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$); CH-Analyse für $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_9$: ber. C 52.33, H 5.85; gef. C 52.36, H 5.82

5 (Mononatriumsalz): $^1\text{H-NMR}$ (D_2O): δ = 3.32 (dd, J = 9.6, 9.7, 1H, H-4), 3.57 (dt, J = 9.8, 2.7, 1H, H-2), 3.76 (dd, J = 9.6, 9.5, 1H, H-3), 4.25 (dd, J = 9.4, 8.7, 1H, H-5), 5.44 (m, 3H, H-1, H-7-trans, H-7-cis), 5.86 (m, 1H, H-6); $^{31}\text{P-NMR}$ (D_2O): δ = 0.373; MS: ber. für $\text{C}_7\text{H}_{12}\text{O}_8\text{P}$ 255.02698, gef. 255.02786

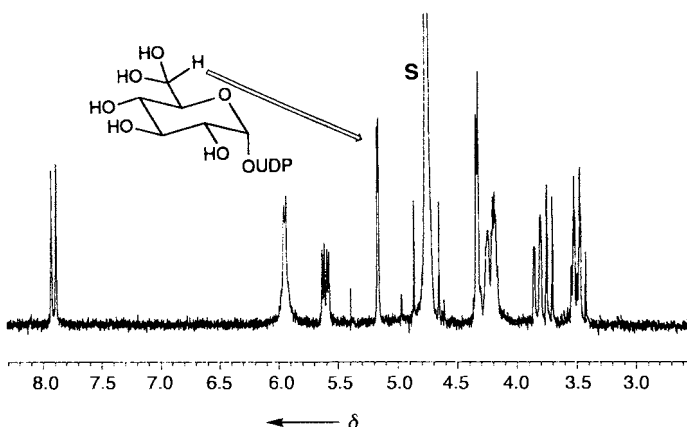
[a] 400-MHz- ^1H -, 300-MHz- ^{31}P -NMR-Spektren, J in Hz, hochaufgelöste Flüssig-Sekundärionen-Massenspektren im Negativ-Ionen-Modus in einer Glycerinmatrix.



Schema 2. Schrittweise Synthese von 1 unter Nutzung einer Alkeneinheit als maskierter Aldehydfunktion.

α -Phosphat wurde aus 4 über eine modifizierte MacDonald-Reaktion^[20] hergestellt; bei diesem Reaktionsschritt entstand kein β -Anomer. Anschließend wurden die Acetylgruppen mit Natriummethanolat abgespalten (Verbindung 5, 39% Ausbeute). Die Umwandlung von 5 in den Aldehyd 6 wurde durch Ozonolyse und anschließende Behandlung mit Dimethylsulfid erreicht. Der Aldehyd wurde sofort in einer enzymkatalysierten Kupplungsreaktion mit UTP, UDP-Glucose-Pyrophosphorylase und Pyrophosphatase umgesetzt.^[21] Wir erwarteten, daß 6 das physiologische Substrat Glucose- α -1-phosphat in der Kupplungsreaktion ersetzen würde, weil die sterischen Unterschiede zwischen den beiden Verbindungen nur gering sind. Tatsächlich

konnte durch Ionenpaar-Umkehrphasen-HPLC^[22] nachgewiesen werden, daß in der Reaktion ein Äquivalent UTP glatt zu Uridindiphospho- α -D-glucose-1-phosphat 1 umgesetzt wurde. Diese war erstaunlich stabil und konnte in 44% Ausbeute (bezogen auf 5) mit einer Kombination aus Anionenaustausch-(DE-52-Harz) und Ausschlusschromatographie (Bio-Gel P-2) isoliert werden. Das Aldehydproton liefert in D_2O im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum ein Dublett bei δ = 5.17 (Abb. 1, Tabelle 1). Dies zeigt, daß über 95% des Aldehyds als Hydrat vorliegen.^[23]


Abb. 1. 200-MHz- $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von 1 in der Hydratform in D_2O . „S“ kennzeichnet das Restsignal der Lösungsmittelprotonen.

Die Umsetzung von 1 mit der UDP-Glucose-Dehydrogenase aus *Streptococcus pyogenes*^[10] in Gegenwart von NAD^+ (500 μM) lieferte laut Ionenpaar-Umkehrphasen-HPLC^[22] quantitativ UDP-Glucose-6-phosphat und NADH. Kinetik und Stöchiometrie der Reaktion wurden anhand der NADH-Bildung UV-spektroskopisch bei 340 nm verfolgt. Für jedes Molekül 1, das oxidiert wurde, entstand ein Molekül NADH. Die Oxidation von 1 bei 30°C und pH 8.7 folgte einer Michaelis-Menten-Kinetik mit den Konstanten k_{cat} = 1.0 s^{-1} und K_{M} = 14 μM .^[24, 25] Diese Werte ähneln denen, die unter identischen Bedingungen mit UDP-Glucose als Substrat erhalten werden (k_{cat} = 1.2 s^{-1} , K_{M} = 14 μM).^[10, 25] Diese Übereinstimmung der kinetischen Konstanten zeigt, daß der Aldehyd kinetisch gesehen ein Zwischenprodukt in der physiologischen Reaktionsfolge sein kann.

Wir halten zwei Wege für die Oxidation von 1 für möglich: Entweder katalysiert das Enzym die Oxidation des nur in kleinen Mengen in Lösung vorliegenden nichthydratisierten Aldehyds – die hydratisierte Form würde dann kompetitiv, aber unproduktiv gebunden; oder das Enzym setzt die hydratisierte Form um, wobei ein Dehydratisierungsschritt der Oxidation vorgelagert wäre. Dagegen scheint es uns unwahrscheinlich, daß das Hydrat direkt oxidiert wird, denn aus einer großen Zahl an Experimenten^[10, 26, 27] läßt sich schließen, daß der zweite Oxidationsschritt analog zu der Reaktion, die durch die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase katalysiert wird, über einen Thioester als Zwischenstufe verläuft.^[28, 29] Der gebundene Aldehyd liegt wahrscheinlich im Gleichgewicht mit einem Thiohalbacetal-Zwischenprodukt vor, das kovalent an einen Cysteinrest im aktiven Zentrum des Enzyms gebunden ist (siehe Schema 1).

Eingegangen am 7. Januar 1997 [Z9970]

Stichworte: Enzymkatalyse · Kohlenhydrate · Nucleotide · Zwischenstufen

- [1] N. J. Oppenheimer, A. L. Handlon in *The Enzymes*, Vol. 20 (Hrsg.: D. S. Sigman), Academic Press, San Diego, 1992, S. 453–504.
- [2] G. J. Dutton, *Glucuronidation of Drugs and Other Compounds*, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 1980.
- [3] L. Kjellén, U. Lindahl, *Annu. Rev. Biochem.* 1991, 60, 443–475.
- [4] *The Biology of Hyaluronan* (Hrsg.: D. Evered, J. Whelan), Wiley, Chichester, 1989.
- [5] B. A. Dougherty, I. van de Rijn, *J. Biol. Chem.* 1993, 268, 7118–7124.
- [6] C. Arrecubieta, E. García, R. López, *J. Bacteriol.* 1996, 178, 2971–2974.
- [7] D. A. Watson, D. M. Musher, *Infect. Immun.* 1990, 58, 3135–3138.
- [8] E. R. Moxon, J. S. Kroll, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1990, 150, 65–86.
- [9] M. R. Wessels, J. B. Goldberg, A. E. Moses, T. J. DiCesare, *Infect. Immun.* 1994, 62, 433–441.
- [10] R. E. Campbell, R. F. Sala, I. van de Rijn, M. E. Tanner, *J. Biol. Chem.* 1997, 272, 3416–3422.
- [11] G. L. Nelsestuen, S. Kirkwood, *J. Biol. Chem.* 1971, 246, 3828–3834.
- [12] J. L. Strominger, E. S. Maxwell, J. Axelrod, H. M. Kalckar, *J. Biol. Chem.* 1957, 224, 79–90.
- [13] A. B. Ordman, S. Kirkwood, *J. Biol. Chem.* 1977, 252, 1320–1326.
- [14] J. G. Schiller, A. M. Bowser, D. S. Feingold, *Carbohydr. Res.* 1972, 25, 403–410.
- [15] T. Müller, R. R. Schmidt, *Angew. Chem.* 1995, 107, 1467–1468; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1995, 34, 1328–1329.
- [16] D. D. Reynolds, W. L. Evans, *Organic Syntheses*, Vol. 3, (Hrsg.: E. C. Horning), Wiley, New York, 1955, S. 432–434.
- [17] R. W. Binkley, *J. Org. Chem.* 1977, 42, 1216–1221.
- [18] D. Nicoll-Griffith, L. Weiler, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1984, 659–661.
- [19] L. Lombardo, *Tetrahedron Lett.* 1982, 23, 4293–4296.
- [20] C. D. Warren, R. W. Jeanloz, *Biochemistry* 1973, 12, 5031–5037.
- [21] A. N. Singh, J. S. Newborn, F. M. Raushel, *Bioorg. Chem.* 1988, 16, 206–214.
- [22] I. Meynial, V. Paquet, D. Combes, *Anal. Chem.* 1995, 67, 1627–1631.
- [23] D. Horton, M. Nakadate, J. M. J. Tronchet, *Carbohydr. Res.* 1968, 7, 56–65.
- [24] Eine Dismutierung zu Alkohol und Säure zu Beginn der Reaktion wurde während der Oxidation von Aldehyden durch Pferdeleber-Alkohol-Dehydrogenase beobachtet (G. T. M. Henahan, N. J. Oppenheimer, *Biochemistry* 1993, 32, 735–738). Mit UDP-Glucose-Dehydrogenase läuft diese Reaktion nicht ab, weil UDP-Glucuronsäure (und nicht NADH) als letztes Produkt vom Enzym freigesetzt wird [10]. Während der Oxidation von **1** wurde keine Anfangsverzögerung beobachtet.
- [25] Die Anpassung dürfte noch besser sein, wenn Korrekturen für den Einfluß schwacher allosterischer Wechselwirkungen berücksichtigt würden. Diese Korrekturen (Hill-Koeffizient $n = 1.5$ für UDP-Glucose und 1.3 für **1**) würden allerdings den k_{cat} -Wert um nicht mehr als 10% ändern.
- [26] B. Franzen, C. Carrubba, D. S. Feingold, J. Ashcom, J. S. Franzen, *Biochem. J.* 1981, 199, 603–609.
- [27] W. P. Ridley, J. P. Houchins, S. Kirkwood, *J. Biol. Chem.* 1975, 250, 8761–8767.
- [28] C. Corbier, F. Della Seta, G. Branlant, *Biochemistry* 1992, 31, 12532–12535.
- [29] J. I. Harris, M. Waters in *The Enzymes*, Vol. 13 (Hrsg.: P. D. Boyer), Academic Press, New York, 1976, S. 1–49.

Computergestützte Studien zur Bindung in orthogonalen Cyclosporin-Cyclophilin-Paaren**

Albert C. Pierce und William L. Jorgensen*

Professor Dieter Seebach zum 60. Geburtstag gewidmet

Von der Gentherapie verspricht man sich viel für die Behandlung von Erbkrankheiten, und gegenwärtig wird intensiv nach effektiven Gen-Transportsystemen gesucht. Die exakte Dosierbarkeit des Genprodukts ist dabei ein wichtiger Gesichtspunkt, dem sich in den letzten Jahren Schreiber, Crabtree und

Mitarbeiter zugewandt haben.^[1] Ihre elegante Methode zur Regulierung von Transgenen ist durch die Aktivierung eines zellulären Prozesses via Assoziation von zwei Proteinen nach Zugabe eines einzelnen Wirkstoffmoleküls gekennzeichnet (Abb. 1).

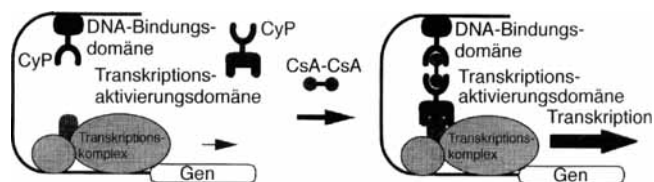
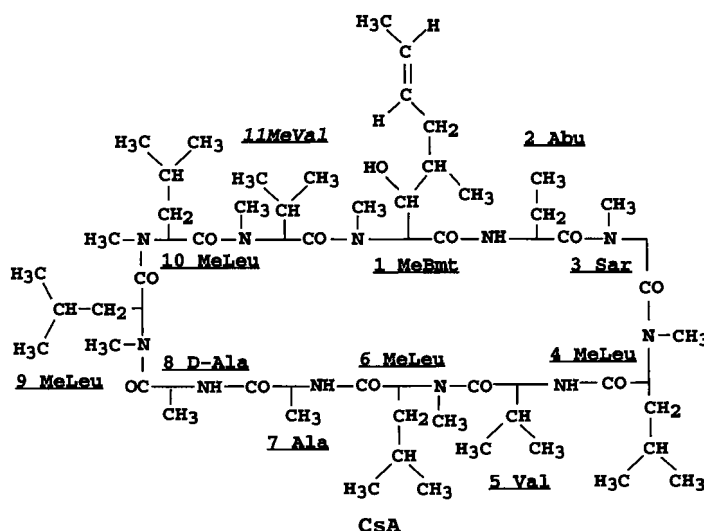


Abb. 1. Schematische Darstellung der Regulierung der Proteinsynthese mit einem chemischen Dimerisierungsauslöser.

Wenn es sich bei diesen Proteinen um die DNA-Bindungs- und die Promotordomänen eines Transkriptionsaktivators handelt, kann die Genexpression induziert werden. Die Rezeptoren sind chimäre Proteine, die Domänen zum Binden nichtüberlappender Regionen des Wirkstoffmoleküls enthalten. In der ersten Arbeit waren die wirkstoffbindenden Domänen Immunophiline wie Cyclophilin CyP oder FKBP12 mit einem synthetischen Dimer eines assoziierten immunsuppressiven Wirkstoffs als chemischem Dimerisierungsauslöser (chemical inducer of dimerization = CID).^[1] Mit diesem System gelangen Proteinsynthesen sowohl in vitro^[1] als auch in vivo^[1c, 1d, 2]. Das Ausmaß der Genexpression kann dabei durch Variation der Zeiten und der Menge des verabreichten Wirkstoffs beeinflusst werden.

Ein Problem jedoch ergibt sich aus der Tatsache, daß die Immunophilinen in vielen Zellarten in großer Menge exprimiert werden. Als Konsequenz kann der Wirkstoff im ganzen Organismus durch Immunophilinen unter Bildung von unproduktiven Proteinkomplexen gebunden werden. Eine Lösung bot das Konzept der orthogonalen Rezeptor-Ligand-Paare.^[3] Schreiber und Mitarbeiter modifizierten das cyclische Undecapeptid Cyclosporin A (CsA) mit einem sterisch anspruchsvollen Rest



(„Höcker“), indem sie den Rest MeVal11 durch den Rest Melle ersetzen, was zu einer drastischen Reduzierung der Bindung an Wildtyp-CyP führte. Danach wurden Mutanten von CyP mit zu dem Höcker passenden „Löchern“ exprimiert, z. B. die Mutante, in der der Phe113 durch Ala ersetzt ist (F113A) und deren Bindung an das veränderte CsA ähnlich gut ist wie die im natürlichen System.^[3] Auf diesem Weg können Probleme durch die

[*] Prof. W. L. Jorgensen, A. C. Pierce
Department of Chemistry, Yale University
New Haven, CT 06520-8107 (USA)
Telefax: Int. + 203/432-6299
E-mail: bill@adrik.chem.yale.edu

[**] Diese Arbeit wurde von den National Institutes of Health unterstützt. Dank gilt außerdem Dr. J. Tirado-Rives und M. L. Lamb für hilfreiche Diskussionen und Mitarbeit.