

- [9] S. Berger, H. Hartmann, M. Wanner, J. Fiedler, W. Kaim, *Inorg. Chim. Acta*, **2001**, *314*, 22.
- [10] L. Shields, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2* **1985**, *81*, 1.
- [11] S. A. O'Kane, R. Clérac, H. Zhao, X. Ouyang, J. R. Galán-Mascarós, R. Heintz, K. R. Dunbar, *J. Solid State Chem.* **2000**, *152*, 159.
- [12] C. Campana, K. R. Dunbar, X. Ouyang, *Chem. Commun.* **1996**, 2427.
- [13] H. Miyasaka, C. S. Campos-Fernández, R. Clérac, K. R. Dunbar, *Angew. Chem.* **2000** *112*, 3989; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 3831.
- [14] a) A. Klein, C. Vogler, W. Kaim, *Organometallics* **1996**, *15*, 236.; b) S. Berger, A. Klein, W. Kaim, J. Fiedler, *Inorg. Chem.* **1998**, *37*, 5664.
- [15] Eine Mischung aus 300 mg (0.650 mmol) $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{bpy})(\text{Cl})]$ und 176 mg (0.696 mmol) AgPF_6 in 20 mL Dichlormethan und 5 mL Methanol wurde 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Filtration durch Celite zur Entfernung von AgCl und Abziehen der Lösungsmittel wurde der gelbe Rückstand in 20 mL CH_2Cl_2 gelöst und mit einer Lösung von 33 mg (0.163 mmol) TCNQ in 10 mL CH_2Cl_2 versetzt. Zur tiefblauen Lösung wurden nach 8 h (IR-Reaktionskontrolle) 10 mL *n*-Pentan gegeben. Beim Abkühlen auf -30°C fiel ein schwarzblauer Niederschlag aus, der in Dichlormethan aufgenommen und durch Zugabe von *n*-Pentan nochmals ausgefällt wurde. Trocknung im Vakuum lieferte 150 mg (37%) **1**-(PF_6)₄. Elementaranalyse (%): ber. für $\text{C}_{64}\text{H}_{36}\text{F}_{24}\text{N}_{12}\text{O}_{12}\text{P}_4\text{Re}_4$: C 30.87, H 1.46, N 6.75; gef.: C 30.65, H 1.46, N 6.40%; $^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): $\delta = 7.32$ (s, 4H; TCNQ-H), 7.71 (dd, 8H; $\text{H}^{5,5'}(\text{bpy})$), 8.26 (dd, 8H; $\text{H}^{4,4'}(\text{bpy})$), 8.43 (d, 8H; $\text{H}^{3,3'}(\text{bpy})$), 8.99 (d, 8H; $\text{H}^{6,6'}(\text{bpy})$); IR (Nujol): $\tilde{\nu} = 2241$ (v(CN)), 2031, 1967, 1950 (v(CO)), 840 cm^{-1} ($\delta(\text{CH})$); IR-Spektroelektrochemie ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/0.1\text{M Bu}_4\text{NPF}_6$): Tetrakation: $\tilde{\nu} = 2235$ (v(CN)), 2039, 1956, 1945 cm^{-1} (v(CO)); Triktion: $\tilde{\nu} = 2223$, 2182 (v(CN)), 2038, 1945, 1940(sh) cm^{-1} (v(CO)); Dikation: 2210(br), 2149 (v(CN)), 2036, 1934(br) cm^{-1} (v(CO)); UV/Vis (CH_2Cl_2): $\lambda_{\text{max}}(\epsilon) = 680$ (13 100), 382 (12 400), 321 nm (26 700 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$); UV/Vis-Spektroelektrochemie ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/0.1\text{M Bu}_4\text{NPF}_6$): Triktion: $\lambda_{\text{max}}(\epsilon) = 1020$ (12 100), 905 (9 000), 425(sh), 405 (11 800), 305 nm (23 600 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).
- [16] Einkristalle wurden aus einer gesättigten Lösung in CH_2Cl_2 erhalten. $\text{C}_{64}\text{H}_{36}\text{F}_{24}\text{N}_{12}\text{O}_{12}\text{P}_4\text{Re}_4$: Schwarzblaue Stäbchen, $0.8 \times 0.1 \times 0.05$ mm, monoklin, Raumgruppe $P2_1/n$, $a = 10.3137(4)$, $b = 22.0360(5)$, $c = 20.6476(6)$ Å, $\beta = 97.252(1)^\circ$, $V = 4655.1(2)$ Å³, $T = 293$ K, $Z = 2$, $\rho_{\text{ber.}} = 1.770$ g cm^{-3} , $\mu(\text{MoK}\alpha) = 5.356$ cm^{-1} , 17 485 gemessene Reflexe, 6048 beobachtete Reflexe mit $I > 2\sigma(I)$. $R_1 = 0.0603$, $wR_2 = 0.1564$, GOF = 1.026, min./max. Restelektroendichte $-0.938/0.949$ e Å⁻³. Die kristallographischen Daten (ohne Strukturaktoren) der in dieser Veröffentlichung beschriebenen Struktur wurden als „supplementary publication no. CCDC-160093“ beim Cambridge Crystallographic Data Centre hinterlegt. Kopien der Daten können kostenlos bei folgender Adresse in Großbritannien angefordert werden: CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ (Fax: (+44) 1223-336-033; E-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk).
- [17] a) W. Kaim, B. Olbrich-Deussner, R. Gross, S. Ernst, S. Kohlmann, C. Bessenbacher in *Importance of Paramagnetic Organometallic Species in Activation, Selectivity and Catalysis* (Hrsg.: M. Chanon), Kluwer Academic, Dordrecht, **1989**, S. 283; b) R. Gross, W. Kaim, *J. Organomet. Chem.* **1987**, *333*, 347.
- [18] a) B. Olbrich-Deussner, R. Gross, W. Kaim, *J. Organomet. Chem.* **1989**, *366*, 155; b) B. Olbrich-Deussner, W. Kaim, R. Gross-Lannert, *Inorg. Chem.* **1989**, *28*, 3113.
- [19] L. R. Melby, R. J. Harder, W. R. Hertler, W. Mahler, R. E. Benson, W. E. Mochel, *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, *84*, 3374.
- [20] H. Hartmann, S. Berger, R. Winter, J. Fiedler, W. Kaim, *Inorg. Chem.* **2000**, *39*, 4977.
- [21] F. M. Hornung, K. W. Klinkhammer, W. Kaim, *Chem. Commun.* **1998**, 2055.

Der molekularen Erkennung auf der Spur: die duale Funktion von Pseudoprolinen für das Design von SH3-Liganden**

Gabriele Tuchscherer,* Daniel Grell, Yoshiro Tatsu, Patricia Durieux, Jimena Fernandez-Carneado, Beatrice Hengst, Christian Kardinal und Stephan Feller*

Protein-Protein-Wechselwirkungen über prolinreiche Sequenzen spielen in zahlreichen zellulären Prozessen wie z. B. Signaltransduktion, Motilität, Membrantransport und Zellteilung eine Schlüsselrolle.^[1–5] Solche prolinreiche Liganden bilden eine linksgängige Polyprolin-II(PPII)-Helixkonformation und erkennen eine hochkonservierte Ansammlung aromatischer Aminosäuren. Die Anordnung dieser Reste auf der Oberfläche, z. B. von SH3-Domänen, ist für die Erkennung einer PPII-Helix mit ihren besonderen geometrischen Eigenschaften ideal. Außerdem ermöglichen sie van-der-Waals-Kontakte und spezifische Wasserstoffbrücken zwischen den Carbonylsauerstoffatomen des Ligandrückgrats und den Funktionalitäten der aromatischen Aminosäuren des Proteins.^[6] Konzeptionell sind SH3-Domänen in einer Vielzahl von Krankheiten, wie AIDS, Krebs und Entzündungen, überaus attraktive Ziele für pharmakologische Interventionen, da sie häufig in kritischen intrazellulären Signalproteinen auftreten.^[5b, 7] Ein wesentliches Merkmal der SH3-Liganden ist das übereinstimmende Sequenzmuster Pro-Xaa-Xaa-Pro (Xaa = verschiedene Aminosäuren).^[8] Zur detaillierten Untersuchung der Ligandeneigenschaften wurden kombinatorische Peptidbibliotheken synthetisch^[5, 9] oder durch Phagendisplay^[7, 10] hergestellt, deren Komponenten SH3-Domänen in der Regel mit gleicher oder etwas geringerer Affinität als die natürlicher Pro-Xaa-Xaa-Pro-Peptide binden. Im Entwurf neuer SH3-Inhibitoren mit erhöhter Affinität und Spezifität wurden in einem weiterführenden Schritt nichtnatürliche, N-substituierte Bausteine in die Schlüsselpositionen eines von mSoS („Son of Sevenless“, ein Guanin-Nucleotid-Austauschfaktor; m = Maus) abgeleiteten Dodecapeptids eingeführt. Hierbei wurde von der Hypothese ausgegangen, dass durch N-substituierte Peptoide mit unterschiedlichen Seitenketten die Komplementarität zur Erkennungsdomäne und damit die Affinität aufgrund der

[*] Priv.-Doz. Dr. G. Tuchscherer, Dr. D. Grell, Dr. Y. Tatsu, Dipl.-Chem. P. Durieux, Dipl.-Chem. J. Fernandez-Carneado, Dr. B. Hengst
Institut für Organische Chemie
Universität Lausanne
BCH-Dorigny, 1015 Lausanne (Schweiz)
Fax: (+41) 21-692-3955
E-mail: gabriele.tuchscherer@ico.unil.ch
Priv.-Doz. Dr. S. Feller, Dr. C. Kardinal
Labor für Molekulare Onkologie, MSZ
Universität Würzburg
97078 Würzburg (Deutschland)
Fax: (+49) 931-201-3835
E-mail: stephan.feller@mail.uni-wuerzburg.de

[**] Diese Arbeit wurde vom Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung unterstützt.

erhöhten Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen optimiert werden kann.^[5c,d]

Allerdings ist die PPII-Konformation eines Peptids die strukturelle Voraussetzung zur effektiven Bindung prolinreicher Liganden an SH3-Domänen. Ausgehend von diesen Überlegungen bietet das vor kurzem vorgestellte Konzept der Pseudoprolin (ΨPro), das sind von Ser, Thr oder Cys abgeleitete prolinähnliche Strukturen (Abbildung 1),^[11] einen

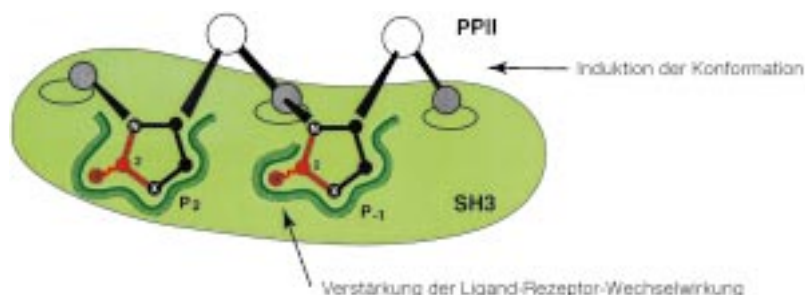


Abbildung 1. Die duale Rolle funktioneller Pseudoprolin (ΨPro) bei der Liganderkennung durch SH3-Domänen (graue und weiße Kreise symbolisieren Aminosäuren): Die Bildung der schematisch dargestellten PPII-Helix ist eine Voraussetzung für eine effiziente Bindung von prolinreichen Regionen an SH3-Domänen. Günstige Beiträge für eine hochaffine Bindung – Formkomplementarität und damit eine dichte Packung der Seitenketten – bestehen aufgrund fehlender funktioneller Gruppen in der Prolinringstruktur nicht. Die duale Funktion von ΨPro, d.h. die Induktion der PPII-Helixkonformation und die Optimierung von van-der-Waals-Kontakten durch die C2-Substituenten R^1 und R^2 , führt zu einer optimalen Packung und damit zu höherer Affinität und Spezifität.

neuen Weg zum rationalen Design von Liganden.^[12] Insbesondere können durch die Wahl der C2-Substituenten R^1 und R^2 das *cis/trans*-Isomerisierungsgleichgewicht und die Kinetik von Polyprolinhelixübergängen (PPI/PPII) maßgeschneidert werden.^[11a,b]

Neben der Fähigkeit, eine PPII-Helixkonformation zu induzieren, sind Substituenten unterschiedlicher Größe und Polarität am C2-Atom von ΨPro auch dazu geeignet, Ligand-

Rezeptor-Wechselwirkungen zu modulieren. Wie in Abbildung 1 dargestellt, zeichnen sich ΨPro-Bausteine durch eine duale Funktion aus, bestehend aus 1) der Induktion der notwendigen PPII-Konformation und 2) der Verstärkung und Optimierung der van-der-Waals-Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindung zum Rezeptormolekül. Insbesondere können mit einer synthetischen Bibliothek aus Peptiden mit verschiedenen Substituenten an C2 die Faktoren bewertet werden, die die Affinität und Spezifität von Protein-Protein-Wechselwirkungen bestimmen, was zur Aufklärung der Liganderkennung durch SH3-Domänen auf molekularer Ebene beitragen könnte.

Zur Anwendung dieses Prinzips beim Design von neuen SH3-Liganden wurden im von SoS abgeleiteten Peptid Val-Pro-Xaa-Pro-Val-Xaa-Pro-Lys-Lys-Lys **1** die beiden Prolinreste in den Positionen P_{-1} und P_2 durch ΨPro-Bausteine ($Xaa = Ser(\Psi pro^{Ph,H})$) ersetzt.^[13] Ausgehend von bekannten Kristallstrukturen haben Molecular-Modeling-Untersuchungen gezeigt, dass C2-monosubstituierte ΨPro-Systeme in der (*S*)-Konfiguration energetisch günstigere Wechselwirkungen mit dem Rezeptor eingehen als die entsprechenden (*R*)-Epimere. So kann die Phenylgruppe in der (*S*)-Konfiguration durch geringfügige strukturelle Veränderungen der SH3-Bindungsstelle (z.B. Torsion um χ_1 der Tyr7-

Seitenkette in P_2) problemlos in die Bindungstaschen P_{-1} und P_2 eingepasst werden (Abbildung 2). Zusätzlich bleibt eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen Tyr 52 und dem Ligandrückgrat erhalten. Ist das C2-Zentrum (*R*)-konfiguriert, so weist der Substituent in Richtung der SH3-Domänenoberfläche, und es kann zu sterischen Überlappungen kommen. Besonders die Packung des Tyr52-Restes in P_2 und des Trp36-Restes in P_{-1} führt zu sterisch ungünstigen Wechselwirkun-

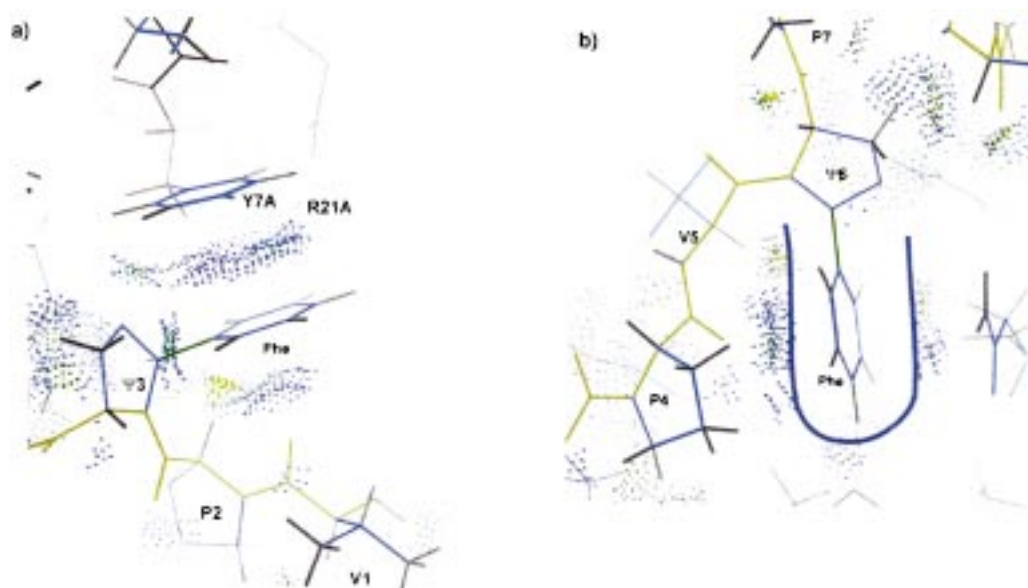


Abbildung 2. Detailansichten der P_2 - und der P_{-1} -SH3-Bindungstasche, die die Oberflächenkontaktpunkte^[19] der aus MD-Simulationen resultierenden gemittelten Struktur des Peptids **1** zeigen: a) Mögliche Orientierung des Liganden in der Tasche P_2 ; es dominieren van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen Tyr7 und dem Phenylsubstituenten an C2; b) dichte Packung in der P_{-1} -Bindungstasche.

gen, die sich nur durch eine größere konformative Anpassung von Ligand oder Protein vermeiden lässt.

Die aus Moleküldynamik(MD)-Simulationen^[14] hervorgehenden Strukturen (Abbildung 3) ergeben eine stabile Grundstruktur mit einer insgesamt etwas erhöhten Mobilität im Vergleich zu der der nativen, prolinreichen Sequenz (durchschnittliche Standardabweichung (rmsd) gegenüber der Kristallstruktur $<0.7 \text{ \AA}$), was durch zwei mögliche Bindungsorientierungen des Phenylrings in der P_2 -Position erklärt werden kann.

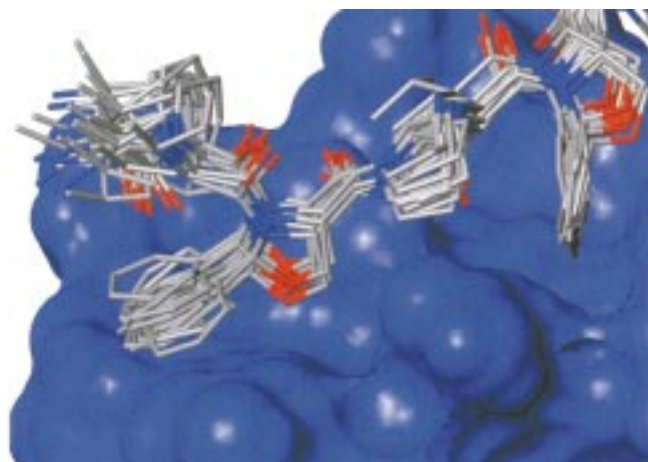


Abbildung 3. Überlagerung von 40 Momentaufnahmen aus den MD-Simulationen des Peptids **1** (Stäbchendarstellung, Wasserstoffatome sind der Übersichtlichkeit wegen nicht dargestellt) im Komplex mit der N-terminalen Gbr2-SH3-Domäne (Connolly-Oberfläche).

Die (*S*)-Konfiguration an C2 des Rings eröffnet somit Möglichkeiten zum Design von Liganden mit optimierter Komplementarität zur Topographie der SH3-Domäne. Ausgehend von einer zu etwa 40 % als PPII-Helix vorliegenden Startkonformation der Pro- oder Ψ Pro-Modellpeptide können Ψ Pro-Liganden aufgrund einer wesentlich rascheren Isomerisierung bezüglich der tertiären Xaa- Ψ Pro-Amidbindung leichter eine PPII-Konformation einnehmen als Oligo-L-Pro-Peptide.^[11b]

Die (*S*)-Konformere der Oxazolidinderivate Pro-Ser(Ψ pro^{Ph,H}) und Val-Ser(Ψ pro^{Ph,H}) wurden stereoselektiv nach der Postinsertionsstrategie hergestellt.^[11] Dabei wurden die entsprechenden Dipeptide Fmoc-Xaa-Ser-OH (Xaa = Pro, Val; Fmoc = 9-Fluorenylmethoxycarbonyl) mit Benzaldehydimethylacetal zum Pseudoprolin in der kinetisch bevorzugten (*S*)-Konfiguration umgesetzt.^[15] Diese Bausteine wurden für die stufenweise Synthese des Peptids **1** am Harz nach der Fmoc-Strategie eingesetzt.^[16] Das HPLC-Chromatogramm des Peptids nach der Abspaltung vom Harz zeigt einen relativ breiten Peak einheitlicher Masse, was darauf hindeutet, dass aufgrund der Ψ Pro-Bausteine unterschiedliche, aber definierte Konformere vorliegen. Die Umsetzung der Ψ Pro-haltigen Peptide mit Trifluoressigsäure (TFA) führt zu einem schärferen Peak, da durch die Öffnung des Ψ Pro-Rings der ursprüngliche Serinrest freigelegt wird (Abbildung 4).

Die Circular dichroismus(CD)-Spektren des Modellpeptids Pro-Pro-Pro-Ser(Ψ pro^{Ph,H})-Pro-Val-Ser(Ψ pro^{Ph,H})-Pro-Pro-Pro-**2** in Wasser zeigen die typischen Banden einer PPII-

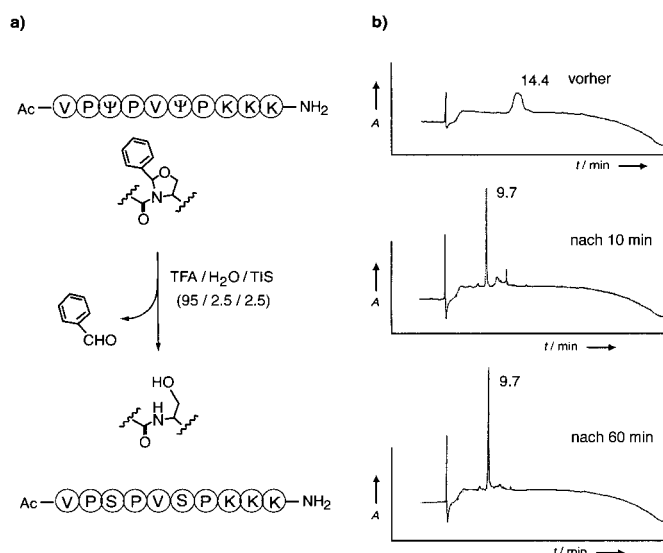


Abbildung 4. a) Die Umsetzung von Pseudoprolin(Ψ Pro)-Peptiden mit Säure führt zur Öffnung der Ringstruktur und damit zur Wiederherstellung der ursprünglichen Aminosäure (Ser); b) Verfolgung der Ψ Pro-Ringöffnung mittels HPLC (siehe Text). TIS = Triisopropylsilan.

Konformation, z. B. einen stark negativen Cotton-Effekt bei $\lambda = 206 \text{ nm}$ und einen schwach positiven bei $\lambda = 228 \text{ nm}$ (Abbildung 5a). Im Unterschied zu Homooligo-Pro-Peptiden

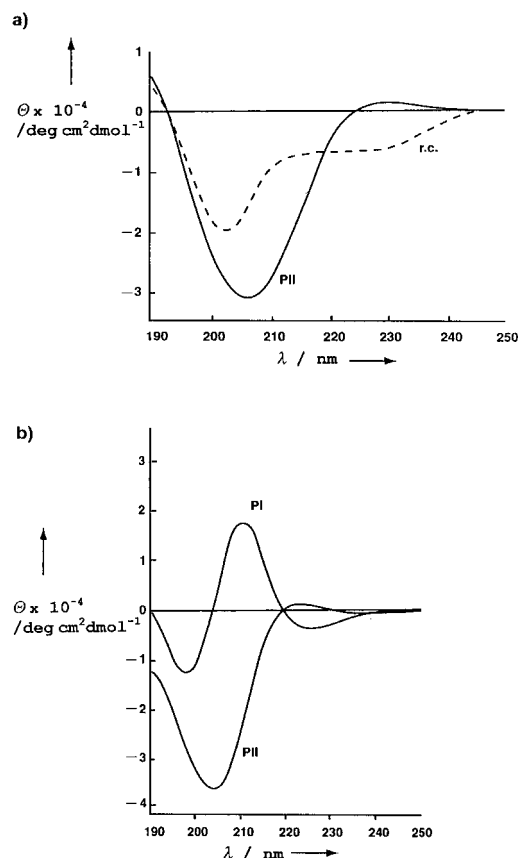


Abbildung 5. a) CD-Spektren des Pseudoprolin-Peptids **2**: Das in Wasser gemessene Spektrum (—) zeigt die charakteristischen Banden einer PPII-Helix und das in Propanol gemessene die einer ungeordneten Struktur (---; r.c. = random coil, Zufallsknäuel); $c = 1 \text{ mg mL}^{-1}$. b) CD-Spektren des lösungsmittelinduzierten PPI(Pananol)/PPII(Wasser)-Übergangs von Poly-L-Prolin.

(Abbildung 5b) bevorzugt das Peptid **2** in *n*-Propylalkohol/Wasser (99.5/0.5, v/v) eine ungeordnete gegenüber einer geordneten PPI-Konformation. In Übereinstimmung mit früheren Arbeiten reicht der Einbau von zwei C2-monosubstituierten Ψ Pro-Bausteinen mit geringer Tendenz zur Bildung einer *cis*-Amidbindung nicht aus, um eine stabile PPI-Helix zu induzieren.^[11, 15]

Erste In-vitro-Fluoreszenztests zur Bindungsaktivität des monoarylierten Pseudoprolinmodellpeptids gegenüber Crk-, Crkl- und Grb2-SH3-Domänen ergaben Dissoziationskonstanten im mikromolaren Bereich, was typisch für SH3-vermittelte Protein-Protein-Wechselwirkungen ist. In Konkurrenzversuchen mit vollständigem Zell-Lysat^[17] der chronisch-myelogenen Human-Leukämiezelllinie K562 (CML)^[18] konnte gezeigt werden, dass Ψ Pro-Peptide die Grb2-SH3(N)-SoS-Komplexbildung inhibieren (Abbildung 6); dies ist ein deutliches Indiz dafür, dass an C2 substituierte Ψ Pro-Bausteine tatsächlich die postulierte duale Funktion ausüben und die Effekte von Prolin in Erkennungsprozessen verstärken.

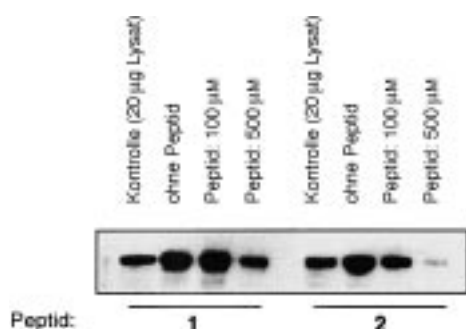


Abbildung 6. Western-Blot der Grb2-SH3(N)-SoS-Komplexbildungsinhibition durch die native SoS-Sequenz und ein Peptid, das einen von Cys abgeleiteten, monoarylierten Pseudoprolinrest enthält. Peptide: **1** = Ac-VPPVPVKKK-NH₂; **2** = Ac-VPPPVC(Ψ Pro^{Ph.H})PKKK-NH₂.

Pseudoprolin sind den hier vorgelegten Ergebnissen zufolge zur Untersuchung und Optimierung der SH3-vermittelten Liganderkennung, einem wesentlichen Bestandteil der zellulären Regulation und damit von Protein-Protein-Wechselwirkungen im Allgemeinen, außerordentlich nützlich. Die Ergebnisse unterstützen das Konzept der dualen Rolle funktioneller Pseudoprolin wie am Beispiel des Entwurfs eines neuen SH3-Liganden mit bemerkenswerter Bioaktivität gezeigt werden konnte. Die herausragende Eigenschaft der Ψ Pro-Bausteine besteht darin, dass die Substituenten an C2 bei der Liganderkennung zum einen eine optimal komplementäre Struktur zur SH3-Topographie aufweisen, wodurch die Bindungsaffinität und -spezifität moduliert werden können, und zum anderen durch eine Erhöhung der Geschwindigkeit der *cis/trans*-Isomerisierung die erforderliche PPII-Helixkonformation induzieren können. Auf der Suche nach potenten SH3-Liganden wird derzeit nach der Postinsertionsstrategie eine Bibliothek aus Peptiden mit unterschiedlichen C2-substituierten Ψ Pro-Resten synthetisiert, die dazu dienen soll, die Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen weiter zu optimieren.

Experimentelles

Die Peptide wurden nach Standardvorschriften für die Synthese von Peptiden an fester Phase^[16] (SPPS) nach der Fmoc-Strategie am Sieber-Harz^[20] aufgebaut. Der Pseudoprolinrest, die von Serin abgeleitete 2-Phenyl-2H-1,3-oxazolidin-4-carbonsäure Ser(Ψ Pro^{Ph.H}), wurde während der stufenweisen Festphasensynthese als Dipeptidbaustein eingeführt.^[11] Dazu wurde das entsprechende Dipeptid, Fmoc-Pro-Ser-OH oder Fmoc-Val-Ser-OH, in THF mit 10 Äquiv. Benzaldehyddimethylacetal und 0.2 Äquiv. Pyridinium-*p*-toluolsulfonat (PTTS) 1.5 h unter Rückfluss erhitzt. Nach der Aufarbeitung wurden die beiden Epimere Flash-chromatographisch an Kieselgel mit CH₂Cl₂/MeOH (100/5, v/v) getrennt und durch Elektrospray-Ionisierungs-Massenspektrometrie (ESI-MS) und ¹H-NMR-Spektroskopie charakterisiert (Finnigan-APCI/ESI- bzw. Bruker-DPX-400-Spektrometer).

Zur Kupplung wurden die Aminosäuren und Pseudoprolindipeptide in zweifachem Überschuss eingesetzt. Nach der Synthese wurden die Peptide mit TFA (1-proz. Lösung in Dichlormethan) vom Harz abgespalten, durch Umkehrphasen-HPLC gereinigt und durch ESI-MS charakterisiert (**1**: *m/z* 1189; **2**: *m/z* 1287). Vor der Abspaltung des Peptids vom Harz wurde die (4,4-Dimethyl-2,6-dioxocyclohexylen)ethyl(Dde)-Schutzgruppe der Lysinseitenketten in **1** mit 2 % H₂NNH₂ in DMF entfernt.

Die CD-Spektren wurden mit einem Jobin-Yvon-Mark-VI-Circulardichrometer mit Quarzzellen (0.1 cm Schichtdicke) bei einer Peptidkonzentration von 0.1 mg mL⁻¹ in H₂O sowie in *n*-Propanol/Wasser (99.5/0.5, v/v) aufgenommen.

Die Inhibition der Grb2-SH3(N)-SoS-Komplexbildung wurde mit der chronisch-myelogenen Human-Leukämiezelllinie K562 (CML) in RPMI 1640 getestet, das mit 5 % fötalem Rinderserum (FBS; GibcoBRL) und Penicillin/Streptomycin (GibcoBRL) angereichert war. Die Zellyse wurde wie in Lit. [17] beschrieben durchgeführt und das gesamte Zellysat für die In-vitro-Inhibitionstests verwendet. Dazu wurden 20 µg GST-markiertes Grb2-SH3(N)-Fusionsprotein 2 h bei 4 °C in 250 µL IP-Puffer (20 mM TrisHCl, pH 7.5, 1 mM Na₂EDTA, 100 mM NaCl, 5 Vol.-% Glycerin, 0.1 % Tween 20 (Roth)) vorinkubiert. Der IP-Puffer enthielt außerdem Proteasehemmer (0.2 mg mL⁻¹ Phenylmethylsulfonylfluorid (Sigma), 10 µg mL⁻¹ Aprotinin (Roth), 0.5 µg mL⁻¹ Leupeptin (Serva), 5 µg mL⁻¹ Antipain · HCl (Sigma), 0.7 µg mL⁻¹ Pepstatin (Roche)) und Glutathion-Sephrose-Perlen. Das K562-Protein (250 µg) wurde mit den Peptiden in 250 µL IP-Puffer in der in Abbildung 6 jeweils angegebenen Konzentration gemischt, zur SH3-Domäne hinzugegeben und über Nacht inkubiert. Die Niederschläge wurden dreimal mit 0.5 % TX-Puffer (20 mM TrisHCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 5 Vol.-% Glycerin, 1 mM Na₂EDTA, 0.5 % Triton X-100 (Sigma)) gewaschen. Nach Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-elektrophorese (SDS-Page) und „semi-dryblotting“ wurde an GST-Grb2-SH3(N) gebundenes SoS mit Anti-SoS-Antiserum (Upstate Biotechnology Inc.) detektiert.

Eingegangen am 22. Januar 2001 [Z16480]

- [1] J. Kuriyan, D. Cowburn, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1997**, 26, 259–288.
- [2] M. J. Macias, M. Hyvonen, E. Baraldi, J. Schultz, M. Sudol, M. Saraste, H. Oshkhat, *Nature* **1996**, 382, 646–649.
- [3] a) A. A. Federov, E. Federov, F. Gertler, S. C. Almo, *Nat. Struct. Biol.* **1999**, 6, 661–665; b) F. B. Gertler, K. Niebuhr, M. Reinhard, J. Wehland, P. Soriano, *Cell* **1996**, 87, 227–239; c) S. M. Ahern-Djamali, A. R. Comer, C. Bachmann, A. S. Kastenmeier, S. K. Reddy, M. C. Beckerle, U. Walte, F. M. Hoffmann, *Mol. Biol. Cell* **1998**, 9, 2157–2171.
- [4] N. M. Mahoney, D. A. Rozwarski, E. Federov, A. A. Federov, S. C. Almo, *Nat. Struct. Biol.* **1999**, 6, 666–671.
- [5] a) W. A. Lim, F. M. Richards, F. O. Fox, *Nature* **1994**, 372, 375–379; b) S. Feng, J. K. Chen, H. Yu, J. A. Simon, S. L. Schreiber, *Science* **1994**, 266, 1241–1247; c) J. T. Nguyen, C. W. Turck, F. E. Cohen, R. N. Zuckermann, W. A. Lim, *Science* **1998**, 282, 2088–2092; d) B. Aghazadeh, M. K. Rosen, *Chem. Biol.* **1999**, 6, R241–R246.
- [6] a) G. Siligardi, A. F. Drake, *Biopolymers* **1995**, 37, 281–292; b) B. J. Stapley, T. P. Creamer, *Prot. Sci.* **1999**, 8, 587–595.

- [7] a) D. C. Dalgarno, M. C. Botfield, R. J. Rickles, *Biopolymers* **1997**, *43*, 383–400; b) J. E. Ladbury, S. Arold, *Chem. Biol.* **2000**, *7*, R3–R8.
- [8] M. Lewitzky, C. Kardinal, N. H. Gehring, E. K. Schmidt, B. Konkol, M. Eulitz, W. Birchmeier, U. Schaeper, S. Feller, *Oncogene* **2001**, im Druck.
- [9] a) A. P. Combs, T. M. Kapoor, S. Feng, J. K. Chen, L. F. Daude-Snow, S. L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 287–288; b) T. M. Kapoor, A. Hamilton, Andreotti, S. L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 23–29; c) J. P. Morken, T. M. Kapoor, S. Feng, F. Shirai, S. L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 30–36.
- [10] a) C. Cheadle, Y. Ivashchenko, V. South, G. H. Searfoss, S. French, R. Howk, G. A. Ricca, M. Jaye, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 24034–24039; b) A. B. Sparks, L. A. Quilliam, J. M. Thorn, C. J. Der, B. K. Kay, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 23853–23856; c) R. J. Rickles, M. C. Botfield, X. M. Zhou, P. A. Henry, J. S. Brugge, M. J. Zoller, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 10909–10913.
- [11] a) T. Wöhr, F. Wahl, A. Nefzi, B. Rohwedder, T. Sato, X. Sun, M. Mutter, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9218–9227; b) M. Mutter, T. Wöhr, S. Gioria, M. Keller, *Biopolymers* **1999**, *51*, 121–128; c) A. Wittelsberger, M. Keller, L. Scarpellino, L. Patiny, H. Acha-Orbea, M. Mutter, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 1153–1156; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 1111–1115.
- [12] X. Wu, B. Knudsen, S. M. Feller, J. Zheng, A. Sali, D. Cowburn, H. Hanafusa, J. Kuriyan, *Structure* **1995**, *3*, 215.
- [13] D. Bowtell, P. Fu, M. Simon, P. Senior, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 6511–6515; P. Chardin, J. H. Camonis, N. W. Gale, L. Van Aelst, M. H. Wigler, D. Bar-Sagi, *Science* **1993**, *260*, 1338–1343; M. Rozakis-Adcock, R. Fernley, J. Wade, T. Pawson, D. Bowtell, *Nature* **1993**, *363*, 83–85.
- [14] Die molekülmechanischen Rechnungen wurden mit dem Programmpaket INSIGHTII durchgeführt (Version 97, Molecular Simulations, 1997), die Energieminimierungen und Moleküldynamiksimulationen auf einer Silicon-Graphics-OCTANE-Workstation mit dem Programm CVFF/FDISCOVER (Version 97, Molecular Simulations, 1997). Bei den Simulationen wurden ein Cutoff-Abstand von 2 Å, Zeitschritte von 1 fs und eine abstandsabhängige Dielektrizitätskonstante ϵ von $4.00 \cdot r$ (r = Abstand) verwendet. Die Ausgangskoordinaten des Proteinerückgrats der Grb-2-N-terminalen SH3-Domäne wurden festgehalten. Eine implizite Behandlung der Solvation und Restraints erlaubte längere MD-Simulationen innerhalb eines geeigneten Zeitraums. Nach 5000 Minimierungsschritten nach dem Kriterium maximaler Energieabnahme wurde das System nach dem implementierten Standardverfahren FDISCOVER auf 298 K gebracht. Nach einer Initialisierungszeit von 10 ps wurde der Simulationslauf noch 1 ns fortgesetzt. Gemittelte Strukturen wurden aus den 50 ps der Simulation erhalten und in 500 Schritten nach dem Kriterium maximaler Energieabnahme weiter minimiert, es folgte eine Conjugate-gradient-Minimierung bis zu einem mittleren (rms) Gradienten von $<0.01 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ Å}^{-1}$. Nach diesem Verfahren wurde der Peptidligand Val-Pro-Ser($\Psi^{\text{Pro}^{\text{H}}}$)-Pro-Val-Ser($\Psi^{\text{Pro}^{\text{H}}}$)-Pro-Arg-Arg mit Val-Pro-Pro-Pro-Val-Pro-Arg-Arg-Arg, der decameren nativen SoS-Peptidsequenz 3gbq, verglichen.^[21] Fluktuationen wurden für die letzten 500 ps der Simulation analysiert.
- [15] M. Keller, M. Mutter, C. Lehmann, *Synlett* **1999**, *SI*, 935–939; M. Keller, C. Lehmann, M. Mutter, *Tetrahedron* **1999**, *55*, 413–422.
- [16] J. M. Stewart, J. D. Young, *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2. Aufl., Pierce Chemical, Rockford, IL, **1984**.
- [17] E. Klein, H. Ben-Bassat, H. Neumann, P. Ralph, J. Zeuthen, A. Polliack, F. Vanky, *Int. J. Cancer* **1976**, *18*, 421–431.
- [18] G. Posern, J. Zheng, B. S. Knudsen, C. Kardinal, K. B. Muller, J. Voss, T. Shishido, D. Cowburn, G. Cheng, B. Wang, G. D. Kruh, S. K. Burell, C. A. Jacobson, D. M. Lenz, T. J. Zamborelli, K. Adermann, H. Hanafusa, S. M. Feller, *Oncogene* **1998**, *16*, 1903–1912.
- [19] J. M. Word, S. C. Lovell, T. H. LaBean, H. C. Taylor, M. E. Zalis, B. K. Presley, J. S. Richardson, D. C. Richardson, *J. Mol. Biol.* **1999**, *285*, 1711–1733.
- [20] P. Sieber, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 2107.
- [21] M. Wittekind, C. Mapelli, V. Lee, V. Goldfarb, M. S. Friedrichs, C. A. Meyers, L. Müller, *J. Mol. Biol.* **1997**, *267*, 933–952.

Durch Überexpression in der Hefe *Pichia pastoris* zu erhöhter Enantioselektivität: neue Aspekte bei der Anwendung von Schweineleber-Esterase**

Anna Musidlowska, Stefan Lange und
Uwe T. Bornscheuer*

Professor Günter Schmidt-Kastner
zum 75. Geburtstag gewidmet

Lipasen und Esterasen lassen sich als effiziente Biokatalysatoren zur Herstellung einer Vielzahl optisch aktiver Verbindungen einsetzen.^[1] Während jedoch eine ganze Reihe von Lipasen – insbesondere mikrobiellen Ursprungs – kommerziell erhältlich ist, gibt es nur sehr wenige Esterasen, die für den Einsatz in einer Racematspaltung oder Desymmetrisierung zur Verfügung stehen. In der Mehrzahl der Publikationen wird Schweineleber-Esterase^[2] (PLE, pig liver esterase) verwendet. Obwohl gezeigt werden konnte, dass mit dieser Präparation eine Vielzahl von Verbindungen mit teilweise sehr hoher Stereoselektivität umgesetzt werden kann, ist dessen Verwendung doch mit einer Reihe von Nachteilen verbunden. Neben einer Variation des Esteraseanteils zwischen verschiedenen Chargen ist insbesondere die Anwesenheit weiterer Hydrolasen als problematisch bezüglich der Selektivität anzusehen.^[3] Außerdem liegt Schweineleber-Esterase in Form mehrerer Isoenzyme vor,^[4] die sich teilweise erheblich in ihrer Substratspezifität unterscheiden. So gelang es nach elektrophoretischer Trennung durch isoelektrische Fokussierung, Fraktionen zu isolieren, die unter anderem bevorzugt Butyrylcholin (ähnlich der Butyrylcholin-Esterase), Prolin- β -Naphthylamid und Methylbutyrat spalten.^[5a,b] Öhrner und Mitarbeiter^[5c] fanden nicht nur einen Einfluss der Kettenlänge von *p*-Nitrophenylestern auf die Aktivität verschiedener PLE-Fraktionen, sondern auch eine deutliche Änderung der Enantioselektivität bei der Hydrolyse prostereogener Substrate. Im Gegensatz hierzu berichteten Jones und Mitarbeiter, dass verschiedene Isoenzyme nahezu keine Unterschiede in der stereoselektiven Hydrolyse mehrerer monocyclischer und acyclischer Diester zeigten. Lediglich Unterschiede in der Aktivität wurden festgestellt.^[6]

Die Herstellung von Enzymen in gleich bleibender und definierter Zusammensetzung lässt sich durch Überexpression der kodierenden Gene in geeigneten Wirtorganismen wie *Escherichia coli*, *Pichia pastoris* oder *Aspergillus oryzae*

[*] Prof. Dr. U. T. Bornscheuer, A. Musidlowska
Institut für Chemie und Biochemie
AK Technische Chemie & Biotechnologie
Universität Greifswald
Soldmannstraße 16, 17487 Greifswald (Deutschland)
Fax: (+49) 3834-86-4373
E-mail: bornsche@mail.uni-greifswald.de
S. Lange
Institut für Technische Biochemie
Universität Stuttgart (Deutschland)

[**] Wir danken der Konrad-Adenauer-Stiftung (St. Augustin) für die Gewährung eines Stipendiums für A.M., Prof. R. D. Schmid (Institut für Technische Biochemie, Universität Stuttgart) für seine Unterstützung und Diskussionsbereitschaft und A. Gollin für die Synthesen der Acetate.