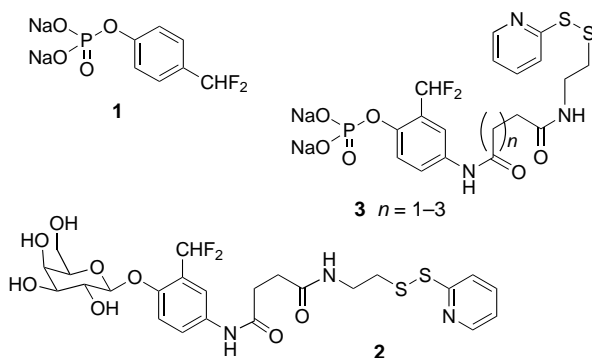


Direkte Identifizierung von Proteinkatalysatoren mit Phosphatase-Aktivität durch kovalente Bindung an ein Suizid-Substrat**

Jason R. Betley, Sandro Cesaro-Tadic, Abdelaziz Mekhalfia, James H. Rickard, Hazel Denham, Lynda J. Partridge, Andreas Plückthun* und G. Michael Blackburn*

Für die Identifizierung und Herstellung katalytischer Antikörper mit Phosphomonoesterase-Aktivität haben wir eine direkte Selektionsmethode etabliert, bei der, basierend auf Phosphatase-Suizid-Inhibitoren, die katalytischen Molekülspezies kovalent abgefangen wurden. Dem Konzept liegt die Arbeit von Halazy et al.^[1] zugrunde, in der aus *o*- und *p*-Fluormethylphenolen Chinonmethide als Suizid-Substrate für Glucosidasen erzeugt werden. Withers et al. verwendeten 4-Difluormethylphenylphosphat **1** als Suizid-Substrat für eine



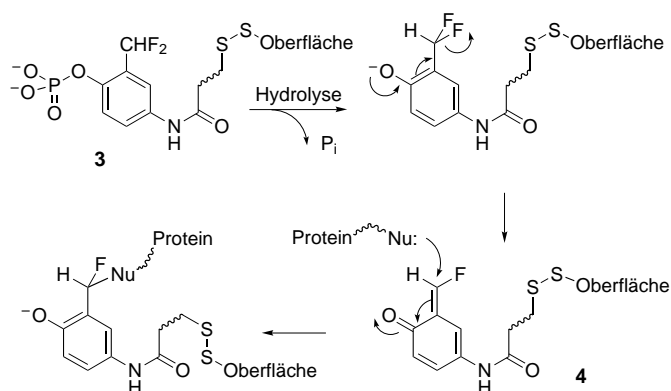
Saure Phosphatase aus menschlicher Prostata und für eine Phosphotyrosin-Phosphatase,^[2] während Myers und Widlansky 4-Monofluormethylphenylphosphat als Substrat nutzten.^[3] Diese Strategie wurde später von Janda et al.^[4] übernommen, die durch Anreicherung aus einer Bibliothek aus Fabtragenden Phagen mit 9×10^3 Mitgliedern unter Verwendung des Rinderserumalbumin(BSA)-gekuppelten, reaktiven Substrats **2** katalytische Antikörper mit Galactosidase-Aktivität selektierten.

[*] Prof. A. Plückthun, S. Cesaro-Tadic
Biochemisches Institut der Universität Zürich
Winterthurerstrasse 190, 8057 Zürich (Schweiz)
Fax: (+41) 1-6355712
E-mail: plueckthun@biocfebs.unizh.ch

Prof. G. M. Blackburn, J. R. Betley, A. Mekhalfia, J. H. Rickard
Krebs Institute, Department of Chemistry
University of Sheffield
Sheffield, S3 7HF (Großbritannien)
Fax: (+44) 1142-738673
E-mail: g.m.blackburn@sheffield.ac.uk
H. Denham, Dr. L. J. Partridge
Department of Molecular Biology and Biotechnology
University of Sheffield
Western Bank, Sheffield, S10 2TN (Großbritannien)

[**] Diese Arbeit wurde gefördert durch ein BBSRC-Stipendium für J.B. und H.D., ein EPSRC-Stipendium für J.H.R. und ein EC-TMR-Stipendium für S.C.-T.

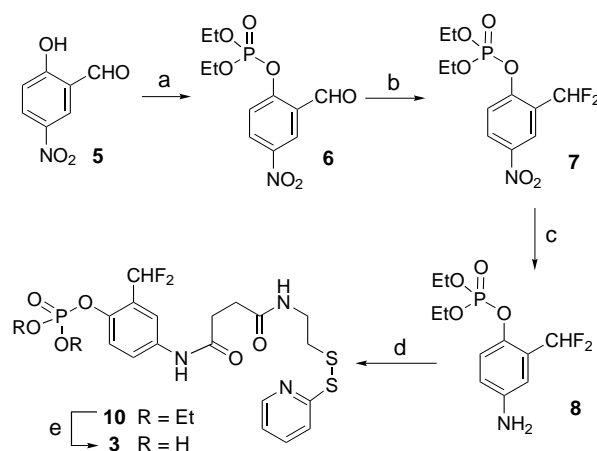
Beim Design von **3** haben wir uns an diesen Beispielen orientiert (Schema 1). Das reaktive 2-Difluormethylphenylphosphat ist über einen variablen Abstandshalter mit einem Pyridyl-2'-disulfid verknüpft. So ist es möglich, das Suizid-Substrat an eine feste Trägeroberfläche zu kuppeln sowie



Schema 1. Mechanismus der kovalenten Bindung des Suizid-Substrats **3** durch Bildung eines Chinonmethids **4**. Im Anschluss an die Phosphat-hydrolyse wird katalytisch aktives Protein kovalent an die Trägeroberfläche gekuppelt.

kovalent gebundene Proteinmoleküle durch anschließende Reduktion des Disulfids wieder abzuspalten. Die kovalente Proteinbindung erfolgt über ein reaktives Chinonmethid^[5] **4**, das erst nach der Protein-katalysierten Phosphomonoester-Spaltung und Eliminierung von Fluorid gebildet wird. **4** wirkt als molekulare „Falle“, da katalytische Proteinmoleküle (Antikörper oder Enzyme) kovalent gebunden werden, sobald es zur Addition eines Nucleophils an das gebildete Chinonmethid im oder nahe des aktiven Zentrums kommt.

3 wurde in 6 Stufen ausgehend von 2-Hydroxy-5-Nitrobenzaldehyd **5** synthetisiert (Schema 2).^[6] Die Phosphorylierung von **5** ergab den Phosphatriester **6** in quantitativer Ausbeute. **6** wurde zu **7** fluoriert^[7], die Reaktion mit Eiswasser beendet und das entstandene Produkt **7** an Kieselgel chromatographisch gereinigt. Katalytische Hydrierung reduzierte die



Schema 2. Synthese von **3**: a) $(\text{EtO})_2\text{POCl}$, Et_3N , CH_2Cl_2 ; b) Et_2NSF_3 , 2.1 Äquiv. 0°C , 25 min; c) H_2 , Pd/C (10%); Succinanhydrid, $i\text{Pr}_2\text{Et}$, CH_2Cl_2 ; d) 2-PySSCH₂CH₂NH₂ (**9**), EDC, CH_2Cl_2 ; e) Me_3SiBr , CH_2Cl_2 dann MeOH.

Nitrogruppe von **7** ohne Einfluss auf die Difluormethylgruppe, und das erhaltene Anilin **8** wurde mit Succinanhydrid umgesetzt. Das erhaltene Succinhemiamid wurde mit Kieselgelchromatographie gereinigt, wobei dem Elutionsmittel eine Spur Essigsäure zugesetzt wurde. Der als Thiolaustausch-Modul vorgesehene Molekülteil 2-PySSCH₂CH₂NH₂ **9**, der aus Bis-2-Aminoethyldisulfid-dihydrochlorid in zwei Stufen hergestellt wurde,^[8] wurde mit EDC (*N*-Ethyl-*N'*-Dimethyl-Aminopropylcarbodiimid) an **8** gekuppelt und ergab den Disulfidester **10**. Dieser wurde schließlich durch selektive Spaltung des Phosphorsäureethylesters mit Bromtrimethylsilan^[9] in das Suizid-Substrat **3** (*n* = 1) überführt.^[10] Die Synthese der beiden höheren Homologen von **3** wurde entsprechend mit Glutarsäure- bzw. Adipinsäureanhydrid durchgeführt.^[11]

Zur Kupplung von **3** an BSA wurde BSA mit Trauts-Reagens modifiziert,^[12] sodass einige der verfügbaren ϵ -Aminogruppen der Lysinreste der Oberfläche in Thiole überführt wurden. Der Disulfidaustausch mit dem Suizid-Substrat **3** wurde unverzüglich bei 4 °C durchgeführt. Die Dephosphorylierung des BSA-**3**-Konjugats mit Alkalischer Phosphatase wurde durch Messung des freigesetzten Phosphats mit Resorufin quantifiziert (P_iPer Phosphate Assay Kit, Molecular Probes). Diese Bestimmung ergab, dass alle gebundenen Substratmoleküle für das Enzym zugänglich waren und der Umsatz mit dem des freien Substrats **3** vergleichbar war. Das an BSA konjugierte Suizid-Reagens **3** wurde in verschiedenen Konzentrationen auf der Oberfläche gängiger Maxisorp-Mikrotiterplatten immobilisiert. Der unterschiedlich lang dauernden Inkubation mit Alkalischer Phosphatase folgte das Waschen in Tris-Puffer pH 9.0 und 0.1 M Glycin-HCl pH 2.2. Enzym, das über die Suizid-Reaktion mit **3** kovalent fixiert worden war, wurde mit Anti-Alkalische-Phosphatase-Antikörpern aus Mäusen und Anti-Maus-HRP-Sekundär-Antikörpern (Sigma) mit TMB-Substrat (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) detektiert. Maximale Bindung der Alkalischen Phosphatase wurde nach 3-tägiger Inkubation erhalten^[13] (OD₄₅₀ von 1.5, mit 10 µg mL⁻¹ BSA-**3** Konjugat zur Immobilisierung und 10 units Phosphatase pro Vertiefung).

Für diese Selektionsstrategie maßgebend, aber bisher noch nicht geklärt war die Frage, ob nicht auch nichtkatalytisch wirkende Proteinmoleküle in die Suizid-Falle geraten könnten. Die Ergebnisse von Janda et al.^[4] über einen Antikörper mit Galactosidase-Aktivität zeigen mehrfachen Substratumsatz des kovalent abgefangenen Enzyms. Das legt nahe, dass Aminosäurereste *außerhalb* des aktiven Zentrums, möglicherweise nicht einmal im selben Molekül, modifiziert werden könnten. Ferner haben Raushel et al. gezeigt, dass der Verlust der katalytischen Aktivität von Phosphotriesterasen durch Präzipitation des Enzyms durch mehrfache Modifikation mit Chinonmethiden hervorgerufen werden kann.^[14] Um diese Möglichkeit für **3** zu überprüfen, wurde Alkalische Phosphatase (10 units pro Vertiefung) mit BSA-**3** für 3 Tage inkubiert und nach entsprechenden Waschschritten *p*-Nitrophenylphosphat (3 mM in 10 mM Diethanolamin-Puffer pH 9.0, 50 µL/Vertiefung) zugegeben. Das Vorliegen kovalent gebundener Alkalischer Phosphatase wurde durch ELISA wie oben beschrieben nachgewiesen.^[15] Dagegen

wurde auch nach langer Inkubationszeit keine Bildung von *p*-Nitrophenolat beobachtet.^[16] Daraus lässt sich schließen, dass das Enzym entweder im aktiven Zentrum selbst oder zumindest so nahe gebunden wurde, dass das aktive Zentrum vom sperrigen BSA-Konjugat verdeckt wurde. Diese Ergebnisse zeigen, dass **3** als Suizid-Falle für Alkalische Phosphatase gleichermaßen zur Immobilisierung und Inaktivierung des Proteins führt.

Das Potential von **3** als ein Inhibitor, der gezielt auf die Aktivität von Phosphatasen gerichtet ist, wurde durch eine BIAcore-Analyse weitergehend untersucht.^[17] Inhibitor **3** wurde durch Disulfidaustausch in definierter Orientierung kovalent auf einem BIAcore-Chip immobilisiert. Bei Injektion von Alkalischer Phosphatase (AP) konnte aufgrund der Bindung an den Inhibitor eine Zunahme des Signals beobachtet werden (Abbildung 1, Schritt c). Je höher dabei die

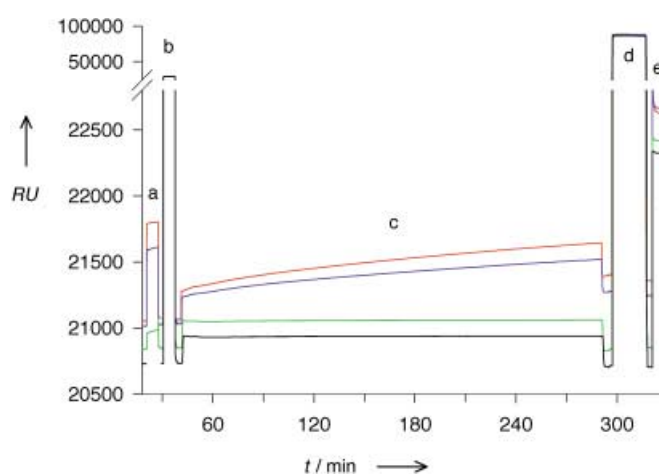


Abbildung 1. Auf katalytischem Umsatz basierende kovalente Interaktion mit dem Enzym bei drei Konzentrationen von **3** (*n* = 2). Die Response-Signale (RU) sind im Sensorgramm gegen die Zeit aufgetragen. **3** wurde über Disulfid-Austausch auf der Thiol-aktivierten Chipoberfläche immobilisiert (Schritt a) mit Intensitäten von 5, 11 und 20 RU. Gemäß der Molekülmasse entspricht dies Oberflächenkonzentrationen von 0.1, 0.2 und 0.4 mM in Flusszelle 2 (grüne Linie), 3 (blaue Linie) bzw. 4 (rote Linie). Flusszelle 1 (schwarze Linie) diente als unterivatisierte Referenzoberfläche. In allen Flusszellen wurden die überschüssigen Thiolgruppen desaktiviert (Schritt b) und 0.1 µM AP für 4 h injiziert (Schritt c). Bindung des Enzyms ergab je 249 RU und 336 RU in den Flusszellen 3 und 4. Zuletzt wurde nichtkovalent gebundenes Protein mit 6 M GdmCl gewaschen (Schritt d). Die verbleibenden Signalintensitäten von 215 RU und 295 RU entsprechen kovalent verknüpftem Enzym und machen 86 % bzw. 88 % der insgesamt gebundenen Phosphatase in den Flusszellen 3 und 4 aus. Bei der niedrigsten Inhibitorkonzentration wurde das Enzym sehr schwach gebunden (11 RU). Auf der Referenzoberfläche in Flusszelle 1 wurde keine Bindung der AP beobachtet. Der Enzym-Inhibitor-Komplex konnte erst durch Reduktion der Disulfidbrücke abgelöst werden (Schritt e).

Konzentration des Inhibitors auf der Oberfläche war, desto mehr Enzym wurde gebunden. Nach der Injektion von AP wurde kontinuierlich Puffer injiziert. Dies führte nur zu einer geringen Abnahme der Signalintensität, was bedeutet, dass nur wenig Phosphatase aus dem Komplex von der Oberfläche dissoziiert war. Das wichtigste Indiz war aber, dass das Enzym größtenteils (> 85 %) selbst dann gebunden blieb, wenn mit 6 M Guanidiumchlorid (GdmCl) ausgiebig gewaschen wurde.

Das Enzym war eindeutig kovalent an den immobilisierten Inhibitor gebunden.

Die langsame, aber stetige Bindung der Alkalischen Phosphatase bei der Inkubation für mehrere Stunden in ELISA-Experimenten oder nach langem Durchfluss von Enzym über die immobilisierte Inhibitoroberfläche weist daher auf eine vom katalytischen Umsatz abhängige Wechselwirkung hin. Sie ist nicht mit der raschen Bildung eines Michaelis-Komplexes zwischen Enzym und Substrat zu erklären. Diese Art der Bindung würde im BIAcore-Experiment kein kinetisch auflösbares Bindungs- oder Dissoziationsignal erwarten lassen und die Signalthöhe wäre bei den verwendeten Konzentrationen, die klein im Verhältnis zu K_M sind, äußerst gering.^[18] Der Anteil an irreversibel gebundenem Enzym war abhängig von der Injektionsdauer der Alkalischen Phosphatase, übereinstimmend mit dem zeitabhängigen Verhalten auf Mikrotiterplatten. Andere Proteine, z.B. BSA, konnten weder die molekulare Fallschlinge des Inhibitors aktivieren noch das Suizid-Substrat binden. Diese Ergebnisse machen deutlich, dass Inhibitor **3** die grundlegenden Merkmale der Umsatz-abhängigen Enzyminaktivierung aufweist, und eine effiziente und selektive Molekülfalle für die Phosphatase ist.

Es stellte sich die Frage, ob man auch Proteinkatalysatoren mit sehr niedriger Umsatzrate, wie man sie in den ersten Selektionsrunden aus einer anfänglich nichtenzymatischen Proteinbibliothek, z.B. mit katalytischen Antikörpern, erwarten würde,^[19] mit dieser Screening-Methode identifizieren könnte. Als Modell diente eine Mutante der Alkalischen Phosphatase, S102A, der im aktiven Zentrum das primäre Nucleophil fehlt. Obwohl die Wechselzahl k_{cat} von S102A etwa vier Größenordnungen kleiner als für den Wildtyp ist, ist die Enzymreaktion immer noch wesentlich schneller als die unkatalysierte Reaktion ($k_{cat}/k_{uncat} \approx 10^5$).^[20] Die Bindung dieser Mutante an das Suizid-Substrat wurde wie das Wildtyp-Enzym durch eine BIAcore-Analyse untersucht, und nach Injektion wurde nichtkovalent gebundenes Protein mit GdmCl fortgewaschen. Dabei blieben nach diesem Schritt noch mehr als 30% des gebundenen Proteins an der Oberfläche. Das kovalent gekuppelte Protein konnte erst durch reduzierende Spaltung des Disulfids im Linker, der das Suizid-Substrat an der Oberfläche fixiert, wieder abgespalten werden. Demnach kann auch ein schwach aktives Protein mit dieser auf katalytischem Umsatz beruhenden Screening-Methode detektiert werden. Dies deutet darauf hin, dass der Grad kovalenter Inaktivierung eher von der Reaktion eines zweiten Nucleophils mit dem Chinonmethid als von der Rate der ursprünglichen Hydrolyse abhängt. Unter den gleichen Bedingungen wird allerdings weniger Enzym kovalent gebunden als im Falle des Wildtyp-Enzyms. Eventuell kann mit dem Suizid-Inhibitor direkt auf katalytische Effizienz selektiert werden. Es sei nochmals erwähnt, dass BSA als Kontrolle keinerlei kovalente Bindung zeigt. Damit lässt sich ausschließen, dass die kovalente Bindung von zufälligen, reaktiven Oberflächennucleophilen des Proteins herrührt.

Die Synthese und erfolgreiche Etablierung von **3** finden nun Anwendung bei der Selektion von katalytischen Proteinen aus großen Bibliotheken. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die BIAcore-Analyse ein direktes Screening einzelner Mitglieder der Bibliothek erlaubt, und die erforderlichen Reaktionsschritte der Enzymselektion aus einer Proteinbibliothek direkt verfolgt werden können. Die relativen Vorzüge von *o*-Trifluor-, *o*-Difluor-, und *o*-Monofluor-methylphenyl-Phosphat Suizid-Substraten^[11] werden gegenwärtig untersucht.

Eingegangen am 7. September 2001 [Z17867]

- [1] S. Halazy, V. Berges, A. Ehrhard, C. Danzin, *Bioorg. Chem.* **1990**, *18*, 330–344.
- [2] Q. Wang, U. Dechert, F. Jirik, S. G. Withers, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1994**, *200*, 577–583.
- [3] J. K. Myers, T. S. Widlanski, *Science* **1993**, *262*, 1451–1453.
- [4] K. D. Janda, L.-C. Lo, C.-H. L. Lo, M.-M. Sim, R. Wang, C.-H. Wong, R. A. Lerner, *Science* **1997**, *275*, 945–948; K. D. Janda, US 5571681, **1996**.
- [5] M. Wakselman, *New J. Chem.* **1983**, *7*, 439–447.
- [6] J. R. Betley, Dissertation, University of Sheffield (Großbritannien), **1997**.
- [7] W. J. Middleton, *J. Org. Chem.* **1975**, *40*, 574–578.
- [8] S. Pinitglang, Dissertation, University of London (Großbritannien), **1996**.
- [9] G. M. Blackburn, *Chem. Ind.* **1981**, 834; G. M. Blackburn, D. E. Kent, *Chem. Commun.* **1981**, 134–138; C. E. McKenna, J. Schmidhauser, *Chem. Commun.* **1979**, 739–740.
- [10] Alle neuen Verbindungen wurden mit ^1H -, ^{19}F - und ^{32}P -NMR-Spektroskopie und HRMS vollständig charakterisiert.
- [11] J. H. Rickard, Dissertation, University of Sheffield (Großbritannien), **2000**.
- [12] R. L. Jue, J. M. Lambert, L. R. Pierce, R. R. Traut, *Biochemistry* **1978**, *17*, 5399–5406; R. Singh, L. Kats, W. A. Blättler, J. M. Lambert, *Anal. Biochem.* **1996**, *236*, 114–125.
- [13] H. Denham, Dissertation, University of Sheffield (Großbritannien), **1998**.
- [14] L.-C. Lo, C.-H. L. Lo, K. D. Janda, D. B. Kassel, F. M. Raushel, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 2117–2200.
- [15] Wenn AP mit 10 mM EDTA vorinkubiert wurde (was die Phosphatase-Aktivität zu 95% inhibierte), war die Bindung des Substrats um die Hälfte vermindert.
- [16] AP, die für 3 Tage bei 37°C in einer BSA-beschichteten ELISA-Platte inkubiert wurde, hydrolysierte nach wie vor *p*-Nitrophenylphosphat.
- [17] K. M. Müller, K. M. Arndt, A. Plückthun, *Anal. Biochem.* **1998**, *261*, 149–158.
- [18] Bestimmung des abgespaltenen Phosphats bei Inkubation von freiem Inhibitor **3** mit AP in Lösung ergab eine Michaelis-Konstante K_M für **3** von 250 μM . Eine Affinität dieser Größenordnung wird bestenfalls zu einem winzigen Signalplateau führen, da sich aufgrund der hohen Dissoziationsgeschwindigkeit sofort ein Gleichgewicht mit der Oberfläche einstellt.
- [19] „Catalytic Antibodies“: G. M. Blackburn, A. Datta, H. Denham, P. Wentworth, *Adv. Phys. Org. Chem.* **1998**, *31*, 249–391.
- [20] B. Stec, M. J. Hehir, C. Brennan, M. Nolte, E. R. Kantrowitz, *J. Mol. Biol.* **1998**, *277*, 647–662; „Chemistry and enzymology of phosphatases“: T. S. Widlanski, W. Taylor, *Compr. Nat. Prod. Chem.* **1999**, *5*, 139–162.