

Ein supramolekularer Peptidsynthesizer**

Jordi Bertran-Vicente und Christian P. R. Hackenberger*

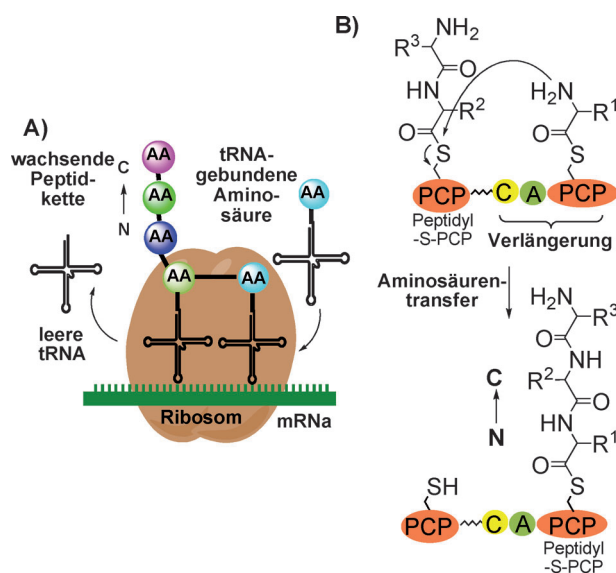
Peptide · Peptidsynthese · Polypeptidbiosynthese ·
Ribosomen · Supramolekulare Chemie

Die Peptidsynthese ist seit vielen Jahrzehnten ein Forschungsschwerpunkt für Chemiker. Zu den Höhepunkten zählen die erste Peptidsynthese in Lösung von Fischer und Fourneau 1901,^[1] Merrifields Festphasensynthese^[2] und die Entwicklung der chemischen Ligation – insbesondere der nativen chemischen Ligation (NCL) durch Kent et al.^[3] –, die die Herstellung von ungeschützten Peptiden und Proteinen synthetischer und biotechnologischer Herkunft ermöglicht. Von diesen revolutionären Beiträgen hat sich die Festphasensynthese (solid phase peptide synthesis, SPPS), die sich die Immobilisierung des wachsenden Peptids an einem unlöslichen Kunstharz zu Nutze macht und so Peptide mit 40–50 Aminosäuren in guten Ausbeuten liefert, als Standardmethode etabliert. Bei der SPPS werden Aminosäuren schrittweise an eine wachsende Peptidkette addiert, wobei jeder Aminosäurebaustein zuvor aktiviert und orthogonal am N-Terminus und an den Seitenketten geschützt werden muss. Dies ermöglicht die selektive Abspaltung der N-terminalen Schutzgruppe und die Kupplung mit der nächsten natürlichen oder nichtnatürlichen Aminosäure. Trotz vieler Verbesserungen bei der SPPS gilt nach wie vor, dass die Synthese – im Unterschied zur Peptidbiosynthese – vom C- zum N-Terminus stattfindet und dass die Spezifität durch die Reaktion einer ausgewählten aktivierten Aminosäure mit einem am N-Terminus ungeschützten, immobilisierten Peptid garantiert wird.

Erst Anfang 2013 stellten Leigh und Mitarbeiter ein neues Verfahren vor, bei dem die Aminosäuren für die Synthese von kleinen Peptiden in einem supramolekularen System vororganisiert werden.^[4] In dieser artifiziellen molekularen Maschine sind Parallelen zur natürlichen ribosomalen wie auch nichtribosomalen Peptidbiosynthese erkennbar – ein Meilenstein des Designs biologisch basierter supramolekularer Maschinen.^[5]

Der interessanteste Aspekt dieser Arbeit ist daher nicht nur die Fähigkeit der molekularen Maschine, Peptide zu

synthetisieren, sondern auch wie das Design von den Prozessen der Natur profitiert: Die Natur hat zwei Biosynthesewege entwickelt, um Aminosäuren zu Polypeptiden zusammenzusetzen, nämlich die ribosomale (RPS)^[6] und die nichtribosomale Peptidsynthese (NRPS).^[7] Ribosomale Peptide werden durch die Translation von Boten-RNA (messenger-RNA, mRNA) synthetisiert (Schema 1 A), einen Pro-



Schema 1. A) Ribosomale Peptidsynthese (RPS); B) nichtribosomale Peptidsynthese (NRPS). AMP = Adenosinmonophosphat, PCP = Peptid-Carrier-Protein.

zess, der verschiedene Zellkomponente benötigt: die Aminoacyl-tRNA-Synthetase (aaRS), die für die Selektion und das Laden der Aminosäuren verantwortlich ist und die aktivierte Aminosäuren zum Ribosom transferiert, und natürlich das Ribosom selbst, in dem das Dekodieren und die Peptidsynthese stattfinden. Die nichtribosomale Maschinerie nutzt dagegen einen großen Multienzymkomplex als Syntheseort und katalysiert die Peptidkondensation in mehreren Schritten (Schema 1 B). Ähnlich wie in der RPS wählt das Enzym (A-Domäne) eine Aminosäure aus und aktiviert sie zum Aminoacyladenylat. Die aktivierte Aminosäure wird anschließend auf ein Transportprotein geladen, das eine ähnliche Funktion wie die tRNA ausübt. Wichtig (besonders für die Publikation von Leigh et al.) ist dabei, dass diese Domäne einen reaktiven Thiolrest enthält, der durch die Reaktion mit einer aktivier-

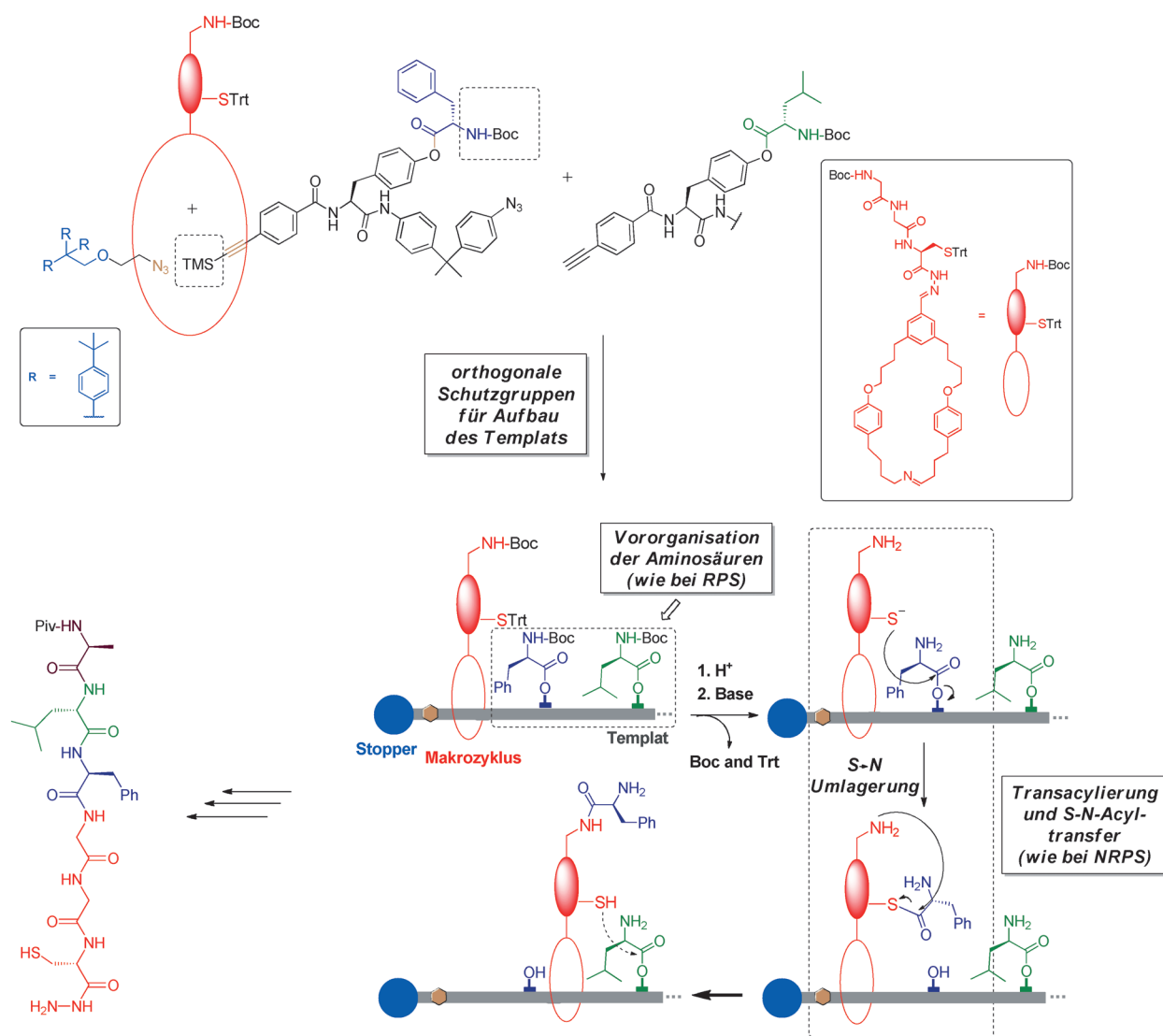
[*] M. Sc. J. Bertran-Vicente, Prof. Dr. C. P. R. Hackenberger
Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP)
Robert-Rössle-Straße 10, 13125 Berlin (Deutschland)
und
Humboldt-Universität zu Berlin, Institut für Chemie
Brook-Taylor-Straße 2, 12489 Berlin (Deutschland)
E-Mail: hackenbe@fmp-berlin.de
Homepage: <http://www.fmp-berlin.de/hackenbe.html>

[**] Wir danken dem DFG (SFB 765 und SPP 1623), dem FCI und der Boehringer Ingelheim Stiftung (Perspektivenprogramm Plus 3) für Ihre Unterstützung sowie Kristina Siebertz für die deutsche Übersetzung.

ten Aminosäure einen Thioester bildet. Die Kondensationsdomäne (C-Domäne) katalysiert schließlich die Peptidbildung, ähnlich wie im Ribosom in der RPS. Dennoch gibt es einige Unterschiede zwischen den beiden Biosynthesewegen: Anders als bei der RPS sind nichtribosomale Peptide nicht auf kanonische Aminosäuren beschränkt. Außerdem unterscheidet sich die Art der Peptidsequenzkodierung – bei der NRPS stammt die Information von der A-Domäne, da jede nichtribosomale Peptidsynthetase nur einen Typ Peptid synthetisieren kann. Dies garantiert die Spezifität der NRPS und führt zu einem definierten Peptidprodukt. Bei der RPS ist die mRNA für die Kodierung der Peptidsequenz verantwortlich, die durch die Manipulation einzelner Kodons verändert werden kann, was bei der NRPS nur durch aufwändige genetische Veränderungen zu erreichen ist.

In Leighs molekularer Maschine sind einige Aspekte der Biosynthese wiederzufinden (Schema 2). Eine Analogie zur RPS ist, dass das Templat die aktivierten elektrophilen Aminosäuren schon vor der Synthese in die richtige Rei-

henfolge bringt, also ähnlich wie durch die mRNA und den tRNA-mRNA-Komplex. Außerdem ist die Bildung der Peptidbindung vergleichbar mit der bei der NRPS: In Leighs System initiiert ein reaktiver Thiolrest, der an ein makrocyclisches Rotaxan gebunden ist, die PCP-Domäne (Schema 2). Für die Synthese der molekularen Maschine sind, ähnlich wie bei der SPPS, orthogonale Schutzgruppen notwendig, da die Templatsynthese auf einer schrittweisen Konjugation einzelner orthogonal geschützter Aminosäurebausteine beruht, um die gewünschte Sequenz zu erhalten. Abschließend wird die Peptidbindung durch ein Capture/Rearrangement und eine S→N-Acylumlagerung gebildet, wie sie auch bei der NCL zu finden sind.^[8] Leighs Gruppe hat damit die besten Eigenschaften jeder Methode miteinander kombiniert und so eine molekulare Maschine entwickelt, die durch aufeinanderfolgende intramolekulare Reaktionen kleine Peptide synthetisieren kann. Doch wie verrichten alle Komponente ihre Arbeit? Das Konzept beruht auf etablierten chemischen Reaktionen: Das Templat wird etwa durch Kupfer-kataly-



Schema 2. Eine auf Rotaxan basierende molekulare Maschine für die Synthese kurzer Peptide. Boc = *tert*-Butoxycarbonyl, Piv = Pivaloyl, TMS = Trimethylsilyl, Trt = Triphenylmethyl.

sierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) herstellt, wobei terminale TMS-Alkine eine selektive Triazolbildung garantieren.^[9] Auch für die Rotaxansynthese wird CuAAC verwendet, um den Makrocyclus einzufädeln und einen Stopper zu befestigen, der verhindert, dass der Makrocyclus nach hinten von der Templatachse abrutscht. Letztlich wird der Peptidstrang mit dem Thiol-besetzten Cystein durch Hydrazonbildung eingefügt.

Sobald die molekulare Maschine fertig zusammengebaut ist, wird die Peptidsynthese durch saure Abspaltung der Schutzgruppen des reaktiven Arms und anschließende Zugabe einer nukleophilen Base eingeleitet. Ähnlich wie beim Capture-Schritt der NCL findet eine Transacylierung zwischen der ersten Aminosäure und dem Thiolrest statt. Der gebildete Thioester kann nachfolgend durch eine S→N-Umlagerung die Aminosäure auf den reaktiven Arm übertragen. Dieser Capture/Rearrangement-Schritt ermöglicht dem Peptid-Makrocyclus, sich am Strang entlang zu bewegen und die nächste Aminosäure aufzunehmen. Sobald die letzte Aminosäure gekuppelt wurde, wird der Makrocyclus freigesetzt, und das synthetisierte Peptid kann durch Hydrolyse abgespalten werden. Bemerkenswerterweise wurden weder Startmaterial noch unerwartete Sequenzen bei der Analyse per HPLC-MS und Tandem-MS detektiert.

Verschiedene molekulare Eigenschaften bestimmen die eindrucksvolle Reaktionssequenz dieser molekularen Maschine. So sorgt etwa ein Abstandhalter dafür, dass der reaktive Arm nicht mit anderen Aminosäuren außerhalb der Sequenz reagieren kann. Die Transacylierung der Aminosäuren wird durch elektrophile Phenylester, die für die Bindung zum Templat verantwortlich sind, ermöglicht. Ein Gly-Gly-Dipeptid zwischen dem Cystein und der Kupplungsstelle am reaktiven Arm erleichtert zusätzlich die S→N-Umlagerung über einen bevorzugten Elfring-Übergangszustand bei der Konjugation der ersten Aminosäure.^[10] Einmal gestartet läuft die Maschine automatisch, und ihre geringe Größe (1/10 eines Ribosoms) ermöglicht eine Synthese in Milligramm-Mengen.

Obwohl es außer Frage steht, dass das Design und die Funktion dieser molekularen Maschine ein großer Erfolg sind, ist sie dennoch weit davon entfernt, mit den bereits etablierten Methoden zu konkurrieren, geschweige denn den ganzen Peptidbiosyntheseweg zu imitieren. Das Ribosom kann beispielsweise 15 Bausteine in einer Sekunde zusammensetzen – die molekulare Maschine braucht für eine Amidbindung allein zwölf Stunden.^[6] Ein weiteres Problem

ist die geringe Größe des Zielpeptids: Da die Peptidverlängerung von einer S→N-Acyumlagerung abhängt, ist es unwahrscheinlich, dass längere Peptide oder gar ganze Proteine mit dieser Methode synthetisiert werden können. Die strukturelle Umorganisation des wachsenden Peptids würde den Capture-Schritt behindern, da sich mit jeder neu addierten Aminosäure der ringförmige Übergangszustand vergrößert. Anders als beim Ribosom „zerstört“ der reaktive Arm den Code, was eine Arbeitsweise ähnlich zur RPS verlangt, bei der Aminosäuren immer kodiert beladen werden. Auch der Einbau ungeschützter Aminosäuren mit Azid- und Alkinmodifizierungen und mit nukleophilen Seitenketten wäre problematisch, da sie entweder im Capture/Rearrangement-Schritt oder bei der Zusammensetzung des Templats stören würden.

Trotz all dieser Limitierungen ist die neue molekulare Maschine ein großer Durchbruch auf dem Gebiet der supramolekularen Chemie, der neue Wege in der organischen Synthese mit künstlichen Nanomaschinen ebnet. Die Synthese von Molekülen auf der Basis von molekularen Templaten könnte zu neuen, vielversprechenden Synthesewegen für Polymere, Kunststoffe, Kohlenhydrate, Naturprodukte oder ganz neue Molekülklassen führen.

Eingegangen am 4. März 2013

Online veröffentlicht am 17. Mai 2013

- [1] E. Fischer, E. Fourneau, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1901**, *34*, 2868–2877.
- [2] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149–2154.
- [3] P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. B. Kent, *Science* **1994**, *266*, 776–779.
- [4] B. Lewandowski, G. De Bo, J. W. Ward, M. Papmeyer, S. Kuschel, M. J. Aldegunde, P. M. E. Gramlich, D. Heckmann, S. M. Goldup, D. M. D'Souza, A. E. Fernandes, D. A. Leigh, *Science* **2013**, *339*, 189–193.
- [5] W. R. Browne, B. L. Feringa, *Nat. Nanotechnol.* **2006**, *1*, 25–35.
- [6] A. Yonath, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 4438–4453; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 4340–4354.
- [7] R. Finking, M. A. Marahiel, *Annu. Rev. Microbiol.* **2004**, *58*, 453–488.
- [8] C. P. R. Hackenberger, D. Schwarzer, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 10182–10228; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 10030–10074.
- [9] V. Aucagne, D. A. Leigh, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4505–4507.
- [10] F. K. Hansen, K. Ha, E. Todadze, A. Lillicotch, A. Frey, A. R. Katritzky, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 7162–7167.