



Bildung und Umlagerung von Homoserin-Depsipeptiden und -proteinen durch α -Ketosäure-Hydroxylamin-Ligation mit 5-Oxaprolin**

Thomas G. Wucherpfennig, Florian Rohrbacher, Vijaya R. Pattabiraman und Jeffrey W. Bode*

Abstract: Die Hauptprodukte der chemischen Ligation von α -Ketosäuren und 5-Oxaprolin sind Ester und nicht – wie zuvor berichtet – Amide. Durch die schnell ablaufende Umlagerung in basischen Puffern lässt sich das Depsipeptidprodukt in das Amid überführen. Die Esterbildung ermöglicht Rückschlüsse auf den möglichen Mechanismus von Typ-II-KAHA-Ligationen und eröffnet einen Weg zur chemischen Synthese von Depsiproteinen.

Die chemoselektive Ligation großer ungeschützter Peptidsegmente ermöglicht die chemische Synthese von Proteinen, die der Untersuchung biologischer Systeme dienen können.^[1] Die α -Ketosäure-Hydroxylamin(KAHA)-Ligation mit 5-Oxaprolin (Opr)^[2] bietet eine Alternative zur etablierteren nativen chemischen Ligation von Thioestern und N-terminalen Cysteinen.^[3] Das leicht zugängliche 5-Oxaprolin-Monomer ist ein stabiles und dennoch reaktives Alkoxylamin, das leicht in synthetische Peptide zu inkorporieren ist. Seit wir 2012 zum ersten Mal über Ligationen mit 5-Oxaprolin berichteten, haben wir deren Verwendung zur Peptid- und Proteinsynthese umfangreich untersucht und einige Proteine mit mehr als 100 Aminosäuren synthetisiert. Während dieser Untersuchungen stellten wir fest, dass es sich bei den Hauptprodukten der KAHA-Ligationen mit 5-Oxaprolin um Ester handelt – und nicht wie erwartet um Amide (Abbildung 1). Hier beschreiben wir unsere Beobachtungen bezüglich der Bildung der Depsipeptidprodukte, ein Nachweisverfahren für deren Identifizierung, Reaktionsbedin-

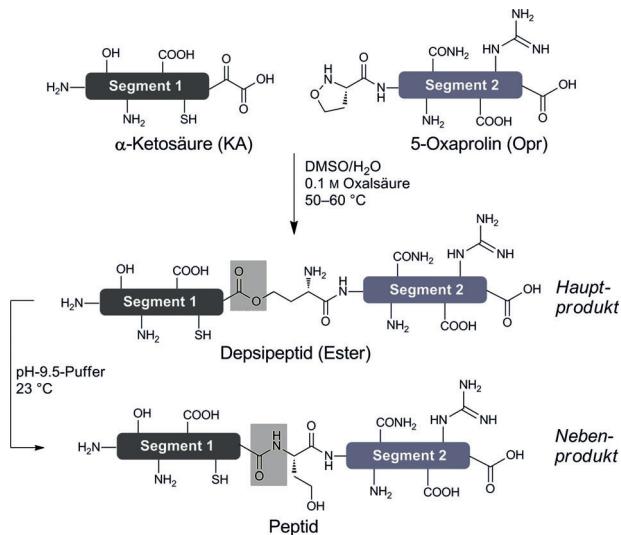


Abbildung 1. Bildung von Depsipeptiden durch KAHA-Ligation mit 5-Oxaprolin und O→N-Acyltransfer zur Bildung des Amids an der Ligationsstelle. DMSO = Dimethylsulfoxid.

gungen für eine glatte Umlagerung in Amide, sowie erste mechanistische Studien zur Esterbildung.

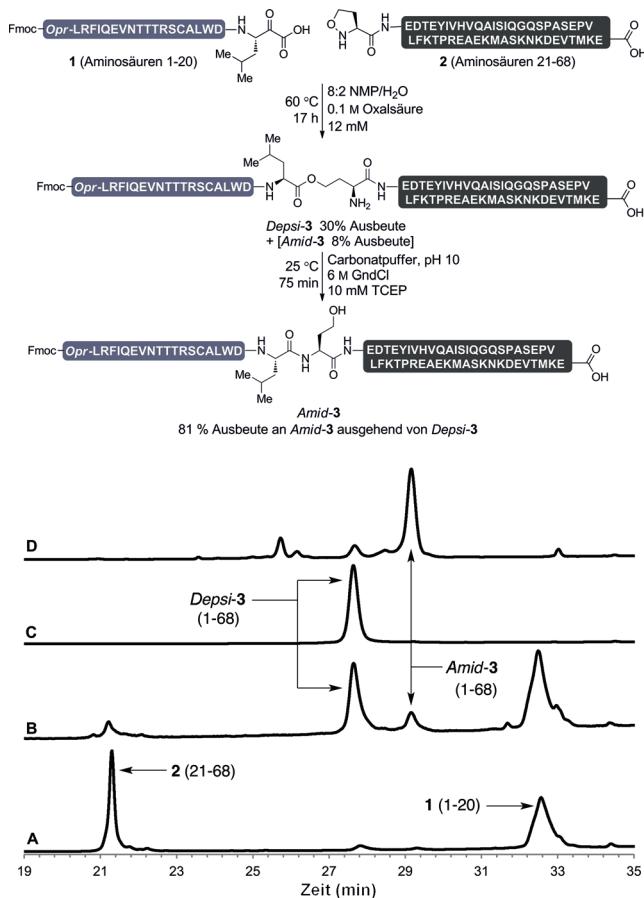
Die in Schema 1 dargestellte Kupplung zweier Pepidsegmente ist exemplarisch für KAHA-Ligationen mit 5-Oxaprolin. Die Reaktionen wurden bei einer Peptidsegmentkonzentration zwischen 10 und 20 mM in NMP/H₂O in Gegenwart von Oxalsäure (pH 1–2) durchgeführt. Die Bildung eines neuen Produkts ließ sich bereits einige Minuten nach Start der Reaktion beobachten, und innerhalb von sechs bis acht Stunden erreichte der Umsatz ein Maximum. Bei genauer Untersuchung der HPLC-Chromatogramme zeigte sich ein zweiter kleiner Peak mit derselben Masse wie das Produkt.^[4] Beide Peaks wurden mittels präparativer HPLC isoliert und basischen Bedingungen ausgesetzt, die üblicherweise einen O→N-Acyltransfer induzieren.^[5] Überraschenderweise blieb das Nebenprodukt unter diesen Bedingungen unverändert, während das Hauptprodukt glatt in das Nebenprodukt überführt wurde (Schema 1).

Eine plausible Erklärung dieser Beobachtung ist, dass ein Ester anstelle eines Amids durch KAHA-Ligation mit 5-Oxaprolin gebildet wurde. Da die KAHA-Ligation mit 5-Oxaprolin unter sauren Bedingungen abläuft, wurde zunächst die Möglichkeit eines säureinduzierten N→O-Acyltransfers des Amids zum Depsipeptid ausgeschlossen.^[6] Anderweitig hergestellte Homoserin beinhaltende Peptide konnten durch die Reaktionsbedingungen (NMP/H₂O, 60 °C, 0.1M Oxalsäure) in keinem der bisher untersuchten Fälle in die entspre-

[*] T. G. Wucherpfennig, F. Rohrbacher, Dr. V. R. Pattabiraman, Prof. Dr. J. W. Bode
Laboratorium für Organische Chemie, Departement Chemie und Angewandte Biowissenschaften, ETH Zürich
8093 Zürich (Schweiz)
E-Mail: bode@org.chem.ethz.ch
Homepage: <http://www.bode.ethz.ch>
Prof. Dr. J. W. Bode
Institute of Transformative Bio-Molecules (WPI-ITbM)
Nagoya University, Chikusa, Nagoya 464-8602 (Japan)
Homepage: <http://www.itbm.nagoya-u.ac.jp>

[**] Diese Arbeit wurden von der ETH Zürich und dem Schweizerischen Nationalfonds (200020_150073) unterstützt. Wir danken dem Massenspektrometrie- und NMR-Service des Laboratoriums für Organische Chemie der ETH Zürich für Analysen, Dr. Gildas Deniau (Polyphor Ltd., Allschwil) und Dr. Marc-Olivier Ebert (LOC NMR Service) für hilfreiche Diskussionen, Ayodele O. Ogunkoya für die Wiederholung der Synthese von UFM1 und Dr. Chunmao He, Dr. Sameer Kulkarni und Ivano Pusterla für weiterführende Untersuchungen.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201406097> zu finden.

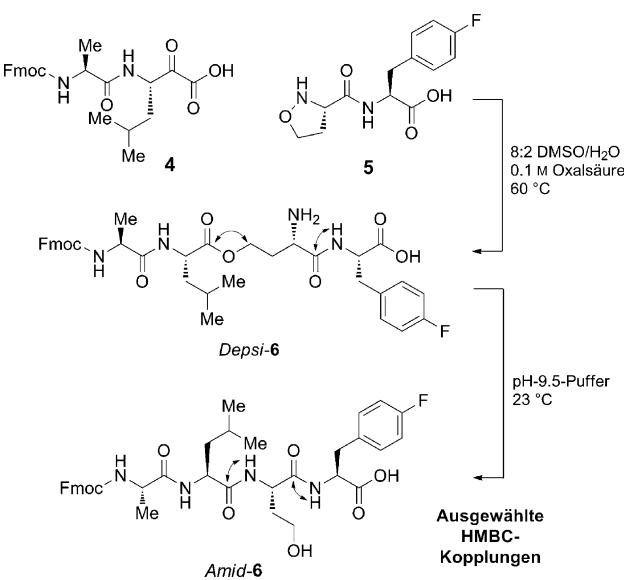


Schema 1. KAHA-Ligation mit 5-Oxaprolin zwischen den Peptidsegmenten **1** und **2** und Umsetzung von **Dепси-3** zu **Amid-3**. A) Ligation nach 0 h. Proteinsegmentkonzentration 12 mM in NMP/H₂O 8:2 mit 0.1 M Oxalsäure. B) Ligation nach 17 h bei 60 °C. C) Aufgereinigtes Ligationsprodukt **Dепси-3**. D) Umsetzung von **Dепси-3** zu **Amid-3** nach 75 min in pH 10 Puffer. Ausbeuten beziehen sich auf isoliertes Produkt nach präparativer HPLC. NMP = 1-Methyl-2-pyrrolidon, GndCl = Guanidiniumchlorid, TCEP = Tris(2-carboxyethyl)phosphan.

chenden Depsipeptide überführt werden (siehe die Hintergrundinformationen).

Um die Bildung des Esters zu bestätigen, wurden zwei einfache Dipeptide als Modell synthetisiert, deren Ligationsprodukte problemlos NMR-spektroskopisch zu charakterisieren sind. Die Ligation zwischen **4** und **5** unter Standardbedingungen führte zur Bildung zweier Produkte im Verhältnis von 9:1 (Schema 2). Durch Vergleich der NMR-Spektren dieser Produkte mit denen unabhängig hergestellter Diastereomere konnte eine Epimerisierung an der Ligationsstelle ausgeschlossen werden (siehe die Hintergrundinformationen). Die beiden Produkte wurden mittels NMR-Spektroskopie (¹H, ¹³C, TOCSY, ¹H-¹³C- und ¹H-¹⁵N-HSQC sowie ¹H-¹³C-HMBC) vollständig charakterisiert, und es konnte eindeutig gezeigt werden, dass ein Ester das Hauptprodukt der Ligation war. Nach der Isolierung konnte der Ester in pH 9.5-Puffer sauber in das Amid umgelagert werden.

Die Bildung von Depsipeptiden durch KAHA-Ligation mit 5-Oxaprolin ist nicht auf diese Sequenz beschränkt und wird offenbar auch nicht von angrenzenden Aminosäuren

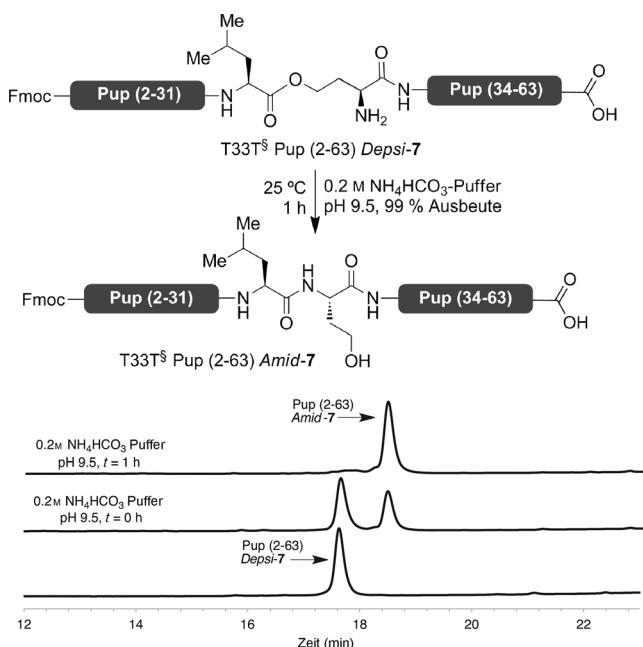


Schema 2. Bildung von **Dепси-6** durch KAHA-Ligation mit 5-Oxaprolin und Umsetzung zu **Amid-6**. Sowohl Ester- als auch Amid-Produkte wurden vollständig mittels NMR-Spektroskopie charakterisiert.

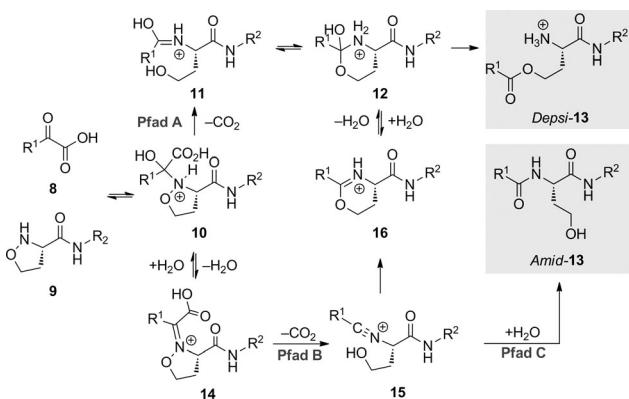
beeinflusst. Bei der Synthese der Proteine Pub (Leu- α -Ketosäure), CspA (Tyr- α -Ketosäure), UFM1 (Phe- und Ala- α -Ketosäure) und IFITM3 (Arg- α -Ketosäure) handelt es sich bei den direkten Ligationsprodukten um Ester und nicht wie zuvor berichtet um Amide.^[2] Für die publizierten Proteinsynthesen (Pub, cspA und UFM1) wurden die Ligationsnochmals untersucht und alle Ester- und Amid-Ligationsprodukte neu charakterisiert (siehe die Hintergrundinformationen).

Die KAHA-Ligation mit 5-Oxaprolin und einigen einfachen α -Ketosäuren (Fmoc-Leu-Ketosäure, α -Ketoglutaräure, 2-Oxobutansäure und Phenylglyoxylsäure) ergibt ebenfalls ein Gemisch aus Ester und Amid im Verhältnis von ungefähr 9:1 in guter Ausbeute. In jedem der untersuchten Fälle lagern die Ester unter basischen Bedingungen glatt in die jeweiligen Amide um. Bei manchen größeren Peptiden wie dem in Schema 1 gezeigten Depsipeptid mit 68 Aminosäuren sind die Umlagerungen möglicherweise durch die Präsenz von Sekundärstrukturen innerhalb des Peptids etwas langsamer. In diesen Fällen kann die Verwendung einer auf pH 10 eingestellten 6 M Guanidiniumchlorid-Lösung die Reaktion beschleunigen. In den meisten Fällen, wie bei den Depsiproteinen Pub und UFM1 mit 62 bzw. 82 Aminosäuren, ist dies jedoch nicht nötig, und die Umlagerung läuft bei pH 9.5 innerhalb von 1–2 h ab (Schema 3).

Wie zuvor berichtet, läuft die KAHA-Ligation abhängig vom verwendeten Hydroxylamin nach zwei verschiedenen Mechanismen ab, die wir als Typ I und Typ II bezeichnen haben.^[7] Wir haben detaillierte Untersuchungen über Ligations des Typs I mit O-unsubstituierten Hydroxylaminen und Wasser als Abgangsgruppe veröffentlicht. Allerdings haben wir den Mechanismus der Typ-II-Ligationen, zu denen auch Ligations mit 5-Oxaprolin gehören, nicht vollständig aufgeklärt. Die Bildung von Estern durch KAHA-Ligation lässt Rückschlüsse auf den möglichen Mechanismus von Typ-II-Ligationen zu. Das Amid-Produkt kann durch eine kon-



Scheme 3. Umlagerung von Pup (2-63) Depsi-7 zu Amid-7 in flüchtigem Puffer bei pH 9.5.



Scheme 4. Möglicher Mechanismus der Depsipeptidbildung in Typ-II-KAHA-Ligationen mit 5-Oxaprolin.

zertifizierte Decarboxylierung/Eliminierung von **10** (Schema 4, Pfad A) erfolgen oder durch die vorherige Bildung des Iminiumions **14** und darauffolgende Eliminierung zum Nitriliumion **15** (Pfad B). Ähnliche Reaktionen mit Eliminierung/Decarboxylierung und simultaner Spaltung einer Oxim-N-O-Bindung wurden umfassend von Kemp untersucht.^[8] Wenngleich die Bildung des Esters über Pfad A durch Abfangen des Imidates **11** möglich ist, erscheint der intramolekulare Angriff auf das über Pfad B erzeugte Nitriliumion **15** wahrscheinlicher. Beispiele für sowohl die Bildung von cyclischen Iminoethern durch 6-*endo*-Angriff eines Alkohols an einem in situ erzeugten Nitriliumion^[9] als auch die Bildung von Estern durch saure Hydrolyse cyclischer Iminoether^[10] sind bekannt. Diesen Pfad stützt die fast komplettete ¹⁸O-Inkorporation in sowohl Ester als auch Amid bei Experimenten, die in DMSO/¹⁸OH₂ durchgeführt wurden. Die Amidbildung mit O-Bz-Hydroxylaminen – die keine Ester bilden können, da es

sich bei der Abgangsgruppe um eine Carbonsäure anstelle eines Alkohols handelt – ergibt ¹⁸O-markierte Produkte, die vermutlich über Pfad C gebildet werden, da über Pfad A hauptsächlich unmarkierte Produkte zu erwarten wären. Der Austausch des Keton-Sauerstoffatoms ist viel langsamer als die Ligation, und nicht umgesetztes Startmaterial wurde in unmarkierter Form isoliert. Wir können Pfad A nicht vollständig ausschließen,^[11] erachten es aber als weniger wahrscheinlich, dass **11** – das primäre Produkt von Pfad A – anstelle einer Tautomerisierung zum Amid bevorzugt zum Ester reagiert. Weder Temperatur noch Lösungsmittel (DMSO, NMP, CH₃CN, DMF) haben einen Einfluss auf das Verhältnis von Depsi- und Amid-Produkten. Die KAHA-Ligation mit 5-Oxaprolin läuft zwischen pH 1–3 rasch ab und wird mit steigendem pH-Wert langsamer.

Die Bildung von Depsipeptiden in KAHA-Ligationen beschränkt sich auf Reaktionen mit 5-Oxaprolin. Sowohl in publizierten als auch unpublizierten Arbeiten über KAHA-Ligationen mit anderen Hydroxylaminen wurde keine Bildung anderer Produkte neben den erwarteten Amiden beobachtet.^[12] Die Depsipeptid-Ligationsprodukte sind bemerkenswert stabil und zersetzen sich nicht unter den Reaktionsbedingungen der Ligation (pH 1–2, 60 °C), während der Fmoc-Entschützung unter wasserfreien Bedingungen (5 % HNEt₂, DMSO) und während präparativer HPLC (0.1 % TFA in CH₃CN/H₂O). Wir konnten noch keine Produkte beobachten, die durch einfache Hydrolyse der Esterbindung entstanden sind; die Umlagerung scheint weitaus schneller zu sein als die Hydrolyse. Dieser offensichtliche Vorteil verzögerte bei uns allerdings auch die Detektion der Ester, da das Verhalten und die hochauflösten Massenspektren der Peptide und Depsipeptide identisch sind. Es ist sehr wahrscheinlich, dass durch KAHA-Ligation mit 5-Oxaprolin hergestellte synthetische Proteine, die unter den Standardbedingungen in leicht basischem Medium gefaltet werden, innerhalb weniger Stunden zu den jeweiligen Amiden umlängern.

Wenngleich die Bildung von Depsipeptiden durch die esterbildende chemoselektive Ligation überraschend ist, so gibt es dennoch potenzielle Anwendungen. Der Austausch einer Amidbindung durch eine Esterbindung ist dafür bekannt, Sekundärstrukturen in Peptiden und Proteinen aufzubrechen und wurde für so genannte „switch peptides“ und „switch proteins“ genutzt, die Anwendung in Selbstorganisation und Wirkstofftransport gefunden haben.^[13] Im Allgemeinen sind Depsipeptide polarer und besser löslich als die entsprechenden Amide.^[14] Daher werden Kisos O-Acyl-Dipeptide oft zur Synthese großer hydrophober Peptide genutzt.^[15] Die KAHA-Ligation mit 5-Oxaprolin könnte ähnliche Vorteile in der Totalsynthese^[16] von Proteinen mit internen Esterbindungen bringen und Wege zu Proteinen öffnen, die mit rekombinanter Expression oder mit anderen Ligationsmethoden nicht zugänglich sind. Zudem kann sie als Anregung zur Entwicklung neuer Reaktionspartner einer neuen Klasse chemoselektiver esterbildender Ligationen dienen.

Eingegangen am 10. Juni 2014
Online veröffentlicht am 22. September 2014

Stichwörter: Chemospezifität · Depsipeptide · Ligation · Proteine · Reaktionsmechanismen

- [1] a) S. B. H. Kent, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 11988–11996; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 12208–12217; b) S. B. H. Kent, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 338–351; c) R. Kleineweischede, C. P. R. Hackenberger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 5984–5988; *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 6073–6077; d) L. Raibaut, N. Ollivier, O. Melnyk, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 7001–7015.
- [2] a) V. R. Pattabiraman, A. O. Ogunkoya, J. W. Bode, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 5114–5118; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 5204–5208; b) A. O. Ogunkoya, V. R. Pattabiraman, J. W. Bode, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 9693–9697; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 9831–9835; c) J. W. Bode, R. M. Fox, K. D. Baucom, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1248–1252; *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 1270–1274.
- [3] a) P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clarklewis, S. B. H. Kent, *Science* **1994**, *266*, 776–779; b) P. E. Dawson, *Isr. J. Chem.* **2011**, *51*, 862–867.
- [4] Um die Bildung des Esters zu verdeutlichen, haben wir speziell diese Ligation ausgewählt, da sowohl die Startmaterialien als auch die Produkte (Ester und Amid) gut im HPLC-Chromatogramm aufgelöst sind.
- [5] C. F. Liu, J. P. Tam, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 6584–6588.
- [6] L. Moulis, G. Subra, C. Enjalbal, J. Martinez, J.-L. Aubagnac, *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 1173–1178.
- [7] I. Pusterla, J. W. Bode, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 513–516; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 528–531.
- [8] a) D. S. Kemp, K. G. Paul, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 7305–7312; b) D. S. Kemp, D. D. Cox, K. G. Paul, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 7312–7318.
- [9] G. T. Lee, A. Kucerovy, K. Prasad, O. Repic, T. J. Blacklock, *Synth. Commun.* **1998**, *28*, 4009–4018.
- [10] a) W. J. Dixon, F. Hibbert, *Can. J. Chem.* **1999**, *77*, 1035–1041; b) W. J. Dixon, F. Hibbert, J. F. Mills, *Perkin Trans. 2* **1997**, 1503–1509.
- [11] Versuche, das mutmaßliche Nitriliumintermediat in Ligationsen mit 5-Oxaprolin mit anderen Nucleophilen als Wasser abzufangen, ergaben lediglich Ester- und Amidprodukte. Versuche die durch Reaktion mit anderen Hydroxylaminen wie *O*-Bz-Hydroxylaminen erzeugten Intermediate abzufangen, waren ebenfalls erfolglos.
- [12] a) T. Narumi, J. W. Bode, *Heterocycles* **2011**, *82*, 1515–1525; b) N. Carrillo, E. A. Davalos, J. A. Russak, J. W. Bode, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 1452–1453.
- [13] a) G. Tuchscherer, A. Chandravarkar, M.-S. Camus, J. Bétard, K. Murat, A. Schmid, R. Mimna, H. A. Lashuel, M. Mutter, *Bio-polymers* **2007**, *88*, 239–252, zit. Lit.; b) M. Vila-Perelló, Y. Hori, M. Ribó, T. W. Muir, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 7764–7767; *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 7878–7881; c) L. Baumann, A. G. Beck-Sickinger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 9550–9553; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 9729–9732.
- [14] L. A. Carpino, E. Krause, C. D. Sferdean, M. Schümann, H. Fabian, M. Bienert, M. Beyermann, *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 7519–7523.
- [15] a) Y. Sohma, M. Sasaki, Y. Hayashi, T. Kimura, Y. Kiso, *Chem. Commun.* **2004**, 124–125; b) F. Liu, E. Y. Luo, D. B. Flora, A. R. Mezo, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 3983–3987; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 4064–4068.
- [16] a) Y. Sohma, Q.-X. Hua, J. Whittaker, M. A. Weiss, S. B. H. Kent, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 5489–5493; *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 5621–5625; b) M. Avital-Shmilovici, K. Mandal, Z. P. Gates, N. B. Phillips, M. A. Weiss, S. B. H. Kent, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 3173–3185.