

Chemoenzymatische Synthese eines charakteristischen Glycophosphopeptids aus der Transaktivierungsdomäne des Serum-Response-Faktors**

Jörg Sander und Herbert Waldmann*

Die posttranslationale Modifizierung von Serin und Threonin durch Phosphorylierung^[1] und O-Glycosylierung mit *N*-Acetylglucosamin (GlcNAc)^[2] spielt eine entscheidende Rolle bei der zellulären Transduktion mitogener Signale. Beispielsweise wird der Serum-Response-Faktor (SRF), ein weit verbreiteter Transkriptionsfaktor, als Antwort auf extrazelluläre Reize an mehreren Serin- und Threoninresten phosphoryliert. Er tritt daraufhin in den Zellkern ein, bindet an das in den Promotoren zahlreicher Gene vorkommende Serum-Response-Element (SRE) und induziert die Gentranskription.^[3] Darüber hinaus wird der SRF an vier Positionen glycosyliert,^[4] wobei die Hauptglycosylierungsstelle – wahrscheinlich Serin383 in der Transaktivierungsdomäne – von mehreren Phosphorylierungsstellen umgeben ist (Abbildung 1). Diese Befunde legen nahe, daß die richtige Feinab-

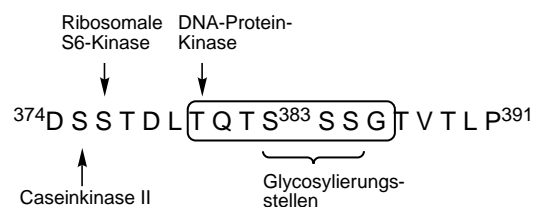


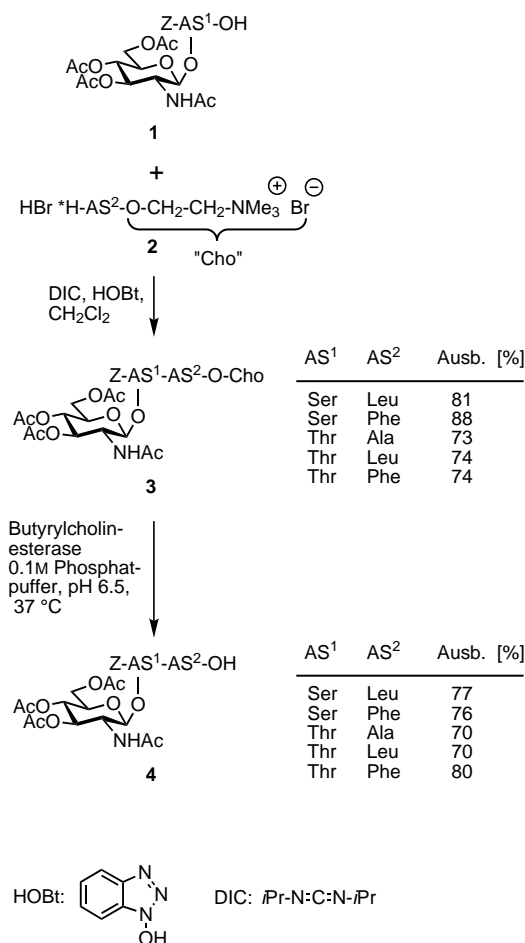
Abbildung 1. Phosphorylierungs- und Glycosylierungsstellen in der Transaktivierungsdomäne des Serum-Response-Faktors (unterstrichene Aminosäuresymbole). Die für die Phosphorylierung einer bestimmten Aminosäure verantwortliche Kinase ist angegeben. Die Aminosäuresequenz des phosphorylierten und glycosylierten Heptapeptids **17**, dessen Synthese in dieser Arbeit beschrieben wird, ist eingerahmt.

stimmung von Phosphorylierung und Glycosylierung des SRF sowie die kontrollierte Entfernung dieser kovalenten Proteinmodifikationen für die Regulierung der Gentranskription unter dem Einfluß des Serum-Response-Faktors von besonderer Bedeutung sind.

Peptidkonjugate, die charakteristische Strukturelemente der natürlichen Proteinkonjugate enthalten (d.h. Phosphatgruppen und O-Glycoside), können wertvolle Werkzeuge für das Studium solcher biologischen Prozesse im molekularen Detail sein.^[5, 6] Glycopeptide sind jedoch säure- und basenempfindlich, und die Basenlabilität von Phosphopeptiden ist sogar noch stärker ausgeprägt. Die Kohlenhydrate und die Phosphotriestergruppen werden bei pH-Werten >8–9 in einer β -Eliminierung abgespalten. Bei der Synthese von Glycophosphopeptiden potenzieren sich diese Probleme, so daß Schutzgruppen benötigt werden, die vollkommen selektiv

unter möglichst milden Bedingungen abgespalten werden können, vorzugsweise bei pH 6–8 und Raumtemperatur.^[5] Wir haben nun gefunden, daß solche empfindlichen Peptidkonjugate erfolgreich aufgebaut werden können, wobei die enzymatische Abspaltung der Cholinester- und der *p*-Phenylacetoxybenzyloxycarbonyl(PhacOZ)-Gruppe die entscheidenden Schritte sind.

Die Cholinestergruppe ist bereits früher als mögliche Schutzgruppe für die Glycopeptidsynthese untersucht worden, unter den für ihre Abspaltung nötigen Bedingungen (pH 10–11) wurden die empfindlichen O-glycosylierten Peptide aber zerstört.^[7] Durch Verwendung des Enzyms Butyrylcholinesterase aus Pferdeserum für die Ablösung der Schutzgruppe kann dieses Problem jedoch effizient gelöst werden. Um zu prüfen, ob die enzymatische Spaltung des Cholinesters für die Glycopeptidsynthese geeignet ist, wurden die O-GlcNAc-modifizierten Serin/Threonin-Bausteine **1**^[8] mit den Aminosäurecholinestern **2**^[7] gekuppelt. Die in hoher Ausbeute gebildeten Glycopeptide **3** wurden nachfolgend mit Butyrylcholinesterase in Phosphatpuffer bei pH 6.5 behandelt (Schema 1). Bei der enzymatischen Reaktion wurden nur die C-terminalen Cholinestergruppen abgespalten, ein Angriff auf die Acetat- sowie die N-terminalen Urethangruppen oder eine Anomerisierung oder β -Eliminierung des Kohlenhydrats



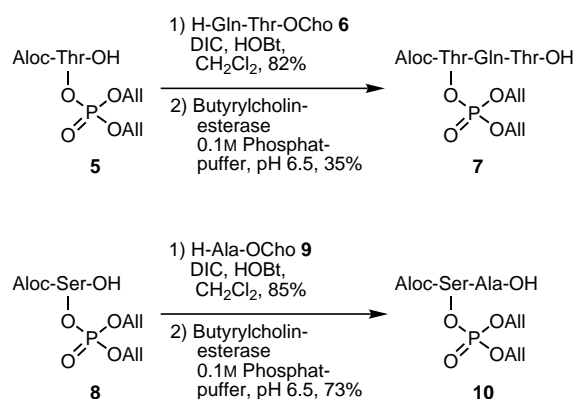
Schema 1. Synthese und selektives enzymatisches Entschützen von Glycopeptidcholinestern mit Butyrylcholinesterase aus Pferdeserum. AS = Aminosäure, DIC = Diisopropylcarbodiimid, HOBT = 1-Hydroxy-1*H*-benzotriazol, HOCho = Cholin, Z = Benzyloxycarbonyl.

[*] Prof. Dr. H. Waldmann, Dr. J. Sander
Institut für Organische Chemie der Universität
Richard-Willstätter-Allee 2, D-76128 Karlsruhe
Fax: (+49) 721-608-4825
E-mail: waldmann@ochhades.chemie.uni-karlsruhe.de

[**] Diese Arbeit wurde vom Fonds der Chemischen Industrie gefördert.

finden nicht statt. Das Enzym erkennt unterschiedliche Aminosäurekombinationen und toleriert auch sterisch anspruchsvolle Reste am C-Terminus, z.B. Phenylalanin. Die gewünschten, selektiv entschützten Glycodi-peptide **4** wurden in Ausbeuten von 70–80 % erhalten. Diese Ergebnisse belegen, daß die enzymatische Abspaltung der Cholinestergruppe erfolgreich in der Glycopeptidchemie eingesetzt werden kann. Besonders vorteilhaft ist dabei, daß die geladenen Substrate sehr gut in wäßrigem Puffer löslich sind. Ein löslichkeitsvermittelndes organisches Cosolvens, das möglicherweise das Enzym denaturiert, wird nicht benötigt.

Die Eignung der Cholinestergruppe für die Phosphopeptid-synthese wurde nach Kuppeln der O-phosphorylierten Threonin-^[9] und Serinderivate **5** bzw. **8** mit dem Peptidcholinester **6** sowie dem Alanincholinester **9**^[10] geprüft (Schema 2). Die

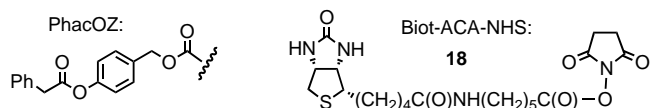
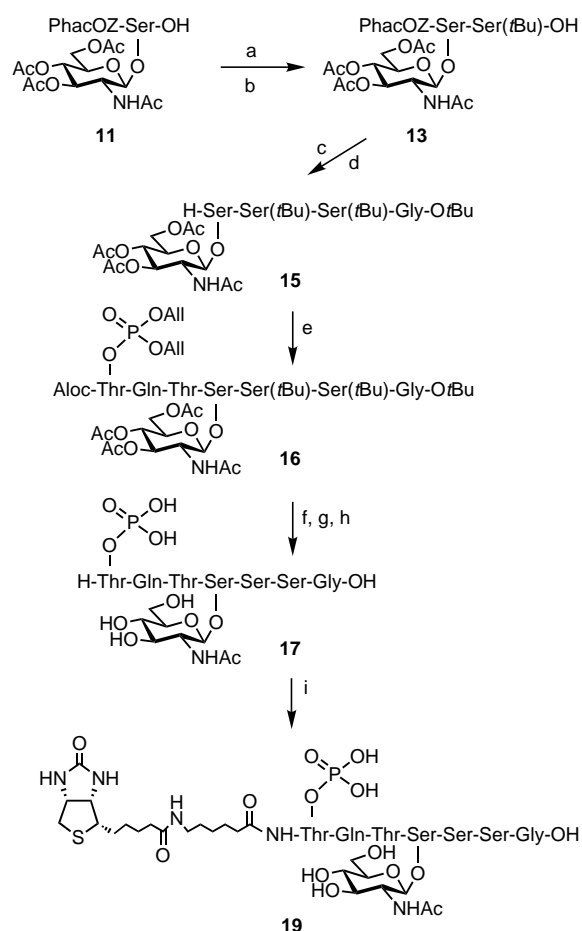


Schema 2. Synthese und selektives enzymatisches Entschützen von Phosphopeptidcholineres mit Butyrylcholinesterase aus Pferdeserum. All = Allyl, Aloc = Allyloxycarbonyl.

Entschützungen unter den vorstehend beschriebenen Bedingungen verliefen erneut ohne unerwünschten Angriff auf die Seitenkettenmodifikationen, und auch eine β -Eliminierung der Phosphatgruppe wurde nicht beobachtet.^[11] Die Cholinestergruppe kann also auch vorteilhaft bei der Synthese sehr basenempfindlicher Phosphopeptide eingesetzt werden.

Die volle Leistungsfähigkeit der enzymatischen Schutzgruppentechnik wurde durch die Synthese eines glycosylierten und phosphorylierten Heptapeptids demonstriert. Dieses Peptid (siehe Abbildung 1) repräsentiert den zentralen Teil eines mehrfach phosphorylierten und glycosylierten Abschnitts aus der Transaktivierungsdomäne des Serum-Response-Faktors. Bei der Synthese haben wir den enzymlabilen Cholinester als C-terminale Schutzgruppe mit der ebenfalls enzymatisch ablösbaren *p*-Phenylacetoxybenzyloxycarbonyl-Urethangruppe kombiniert. Dieses Urethan kann durch die von Penicillin-G-Acylase katalysierte Hydrolyse der terminalen Phenyllessigsäureestergruppe und nachfolgende spontane Fragmentierung des dabei freigesetzten Phenolats unter sehr milden Bedingungen gespalten werden.^[12]

O-Glycosyliertes PhacOZ-Serin^[12] **11** wurde mit Serin-cholinester **12** kondensiert, und die Cholingruppe wurde aus dem entstandenen PhacOZ-maskierten Glycodi-peptid **13** mit 88 % Ausbeute abgespalten (Schema 3). Bei dieser Umsetzung trat erneut keine unerwünschte Nebenreaktion ein. Die Substrat-



Schema 3. Synthese eines biotinilierten Glycophosphopeptids aus der Transaktivierungsdomäne des Serum-Response-Faktors. a) H-Ser(*t*Bu)-OCHO **12**, DIC, HOBT, CH₂Cl₂, 73 %; b) Butyrylcholinesterase, 0.01M Phosphatpuffer (pH 6.5), 37 °C, 88 %; c) H-Ser(*t*Bu)-Gly-OtBu **14**, DIC, HOBT, CH₂Cl₂, 78 %; d) Penicillin-G-Acylase, 0.7M Phosphatpuffer/Methanol (70:30, pH 7), NaI (500 Äquiv.), Raumtemperatur (RT), 65 %; e) Aloc-Thr(P(O)(OAll)₂)-Gln-Thr-OH **7**, DIC, HOBT, CH₂Cl₂, 74 %; f) [Pd(PPh₃)₄], HCOOH/*n*BuNH₂ (10 Äquiv./6 Äquiv.), RT; g) F₃CCOOH; h) Hydrazinhydrat (3000 Äquiv.), Methanol, RT, 40 % (über drei Stufen); i) Biotin-ACA-NHS **18**, DMF, 68 %.

spezifität der Cholinesterase und die milden Reaktionsbedingungen garantieren, daß das Glycosid und der in der N-terminalen Schutzgruppe enthaltene Phenyllessigsäurephenylester nicht angegriffen werden. Nach Verlängerung der Peptidkette mit dem Dipeptid **14** wurde das PhacOZ-Urethan durch Penicillin-G-Acylase-initiierte Fragmentierung der Urethangruppe selektiv und mit hoher Ausbeute zum gezielt demaskierten Glycotetrapeptid **15** gespalten. Die Peptidkette wurde durch Kupplung mit dem Phosphopeptid **7** verlängert, das durch selektives Spalten einer C-terminalen Cholinestergruppe zugänglich ist (siehe Schema 2). Das dabei in hoher Ausbeute entstandene Glycophosphopeptid **16** wurde dann vollständig entschützt. Dafür wurden zunächst alle allylischen Schutzgruppen durch Behandeln mit Ameisensäure-

re/n-Butylamin in Gegenwart eines Pd⁰-Katalysators bei Raumtemperatur abgespalten und nachfolgend die *tert*-Butyl-Schutzgruppen mit Trifluoressigsäure entfernt. Die Entschützung der Hydroxygruppen gelang mit Hydrazinhydrat in Methanol.

Schließlich wurde an das Glycophosphoheptapeptid **17** durch N-Acylierung mit Biotinyl-6-aminocapronsäure-*N*-hydroxysuccinimid **18** (Biotin-ACA-NHS; siehe Schema 3) ein Biotinbaustein geknüpft. Das dabei gebildete biotinilierte Peptidkonjugat **19** kann als effiziente molekulare Sonde dienen: Der Biotinbaustein kann durch die Bindung an das Protein Streptavidin aufgespürt werden, das fluoreszenzmarkiert oder modifiziert mit kolloidalem Gold erhältlich ist. Der so gebildete, äußerst stabile Komplex ist ein Modell für ein glycosyliertes und phosphoryliertes Protein und kann z. B. nach Mikroinjektion in eukaryontische Zellen durch Fluoreszenz- bzw. Elektronenmikroskopie detektiert werden.^[13]

Wir haben eine neue und effiziente Strategie für die Synthese glycosylierter und phosphorylierter Peptide entwickelt, die auf der Kombination geeigneter enzymlabiler Schutzgruppen beruht. Mit dieser Methode können säure- und basenlabile, markierte Peptidkonjugate aufgebaut werden, die biologisch relevant sind und neue Forschungsrichtungen in Biologie und Bioorganischer Chemie eröffnen können. Insbesondere sollten sie für die Aufklärung der chemisch-biologischen Eigenschaften des Serum-Response-Faktors und der Bedeutung seiner posttranslationalen Modifikation im molekularen Detail geeignet sein.

Eingegangen am 24. November 1998 [Z12705]

International Edition: *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 1250–1252

Schlagwörter: Enzymkatalyse • Glycopeptide • Proteinmodifikationen • Schutzgruppen • Signaltransduktion

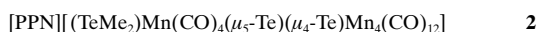
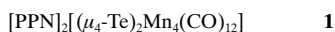
- [1] *Protein Phosphorylation* (Hrsg.: F. Marks), WILEY-VCH, Weinheim, **1996**.
- [2] Übersichtsartikel: G. W. Hart, L. K. Kreppel, F. I. Comer, C. S. Arnold, D. M. Snow, Z. Ye, X. Cheng, D. DellaManna, D. S. Caine, B. J. Earles, Y. Akimoto, R. N. Cole, B. K. Hayes, *Glycobiology* **1996**, 6, 711–716.
- [3] a) C. Norman, M. Runswick, R. Pollock, R. Treisman, *Cell* **1988**, 55, 989–1003; b) J. M. Almendral, D. Sommer, H. MacDonald-Bravo, J. Burckhardt, J. Perera, R. Bravo, *Mol. Cell Biol.* **1988**, 8, 2140–2148.
- [4] A. J. Reason, M. R. Morris, M. Panico, R. Marais, R. H. Treisman, R. S. Haltiwanger, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 16911–16921.
- [5] K. Hinterding, D. Alonso-Díaz, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 716–780; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 688–749.
- [6] Für ein illustratives Beispiel siehe: T. Tagawa, T. Kuroki, P. K. Vogt, K. Chida, *J. Cell Biol.* **1995**, 130, 255–263.
- [7] a) H. Kunz, M. Buchholz, *Chem. Ber.* **1979**, 112, 2145–2157; b) M. Buchholz, H. Kunz, *Liebigs Ann. Chem.* **1983**, 1859–1885.
- [8] G. Arsequell, L. Krippner, R. A. Dwek, S. Y. C. Wong, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, 2383–2384.
- [9] D. Sebastian, A. Heuser, S. Schulze, H. Waldmann, *Synthesis* **1997**, 1098–1108, zit. Lit.
- [10] V. Jungmann, Dissertation, Universität Karlsruhe, **1998**.
- [11] Die relativ niedrige Ausbeute an **7** ist auf Schwierigkeiten bei der Aufarbeitung zurückzuführen. Der durch die Reaktion von **5** und **6** erhaltene Phosphotripeptidcholinester wurde vollständig umgesetzt.
- [12] T. Pohl, H. Waldmann, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 6702–6710.
- [13] G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego, **1996**.

[(TeMe₂)Mn(CO)₄(μ₅-Te)(μ₄-Te)Mn₄(CO)₁₂][−]: ein fünffach koordinierender, verbrückender Telluridoligand in quadratisch-pyramidaler Geometrie**

Minghuey Shieh,* Horng-Sun Chen, Huey-Yea Yang und Chuen-Her Ueng

Chalkogen-haltige Übergangsmetallcarbonylkomplexe sind wegen ihrer vielfältigen Bindungsmodi und Reaktivitäten in neuerer Zeit sehr interessant.^[1] Mn-Te-CO-Cluster waren allerdings trotz beträchtlicher Fortschritte in der Chemie der Fe-Te-CO-Cluster bislang unbekannt.^[2, 3] Wir haben eine einfache und effiziente Synthese dieser neuartigen Cluster entdeckt, bei der die herkömmlichen Reagentien [Mn₂(CO)₁₀] und K₂TeO₃ thermisch miteinander umgesetzt werden. Im Unterschied zu den intensiv untersuchten Eisenverbindungen dieses Systems basieren die Strukturen der Mn-Te-Cluster auf Oktaedern mit μ₄-gebundenen Tellurzentren.

Die Stammverbindung **1** (PPN = [P(C₆H₅)₃]₂N⁺) wurde durch Umsetzung von K₂TeO₃ mit [Mn(CO)₁₀] in Methanol und nachfolgendes Ausfällen mit [PPN]Cl erhalten. Der Tellur-metallierte Komplex **2** wurde aus **1** und MeSO₃CF₃ in CH₂Cl₂ erhalten. Die Clusteranionen von **1** und **2** sind die ersten Telluridomangancarbonylcluster; jeder enthält vier Mangan-Mangan-Bindungen.



Telluridoliganden koordinieren in Übergangsmetallkomplexen auf vielfältige Weisen.^[4, 5] Häufig liegen zwei- und dreifach verbrückende Telluridoliganden vor, vierfach verbrückende sind wegen der geringeren Basizität des Tellurzentrums verglichen mit der der anderen hingegen viel seltener.^[1, 2, 4, 5] Die einzigen beiden bislang bekannten Komplexe mit μ₅-verbrückendem, pyramidal koordinierendem Telluridoliganden sind [Ni₉Te₆(PEt₃)₈] und [Ni₂₀Te₁₈(PEt₃)₁₂].^[6] Wir beschreiben hier erstmals, daß der Te²⁺-Ligand der pyramidalen TeMn₄-Einheit ein weiteres Metallzentrum axial binden kann.

Der Röntgenstrukturanalyse zufolge weist das Anion von **1** eine oktaedrische Geometrie auf und enthält zwei μ₄-Te-Liganden und vier siebenfach koordinierte Manganzentren (Abbildung 1).^[7] Strukturell charakterisierte Komplexe mit μ₄-Te-Liganden sind unter anderem [(μ₄-Te)₂Ru₄(CO)₁₁],^[8] [(μ₄-Te)₂Ru₂Fe₂(CO)₁₁],^[9] [(μ₄-Te)(μ₃-Te)Fe₂Os₃(CO)₁₇],^[10] [(Fe₂(CO)₆)(μ₄-Te)(μ₃-Te){Ru₃(CO)₁₁}],^[11] [(μ₄-Te)₂Co₄(CO)₆(Et₃P)₄],^[12] [Co₁₁Te₇(CO)₁₀]^{2−},^[13] [Ru₆(Te₂)₇(CO)₁₂]^{2−},^[14] und [(μ₄-Te)₂Fe₄(CO)₁₁].^[15] Es ließ sich allerdings nicht

[*] Prof. Dr. M. Shieh, H.-S. Chen, H.-Y. Yang, Prof. Dr. C.-H. Ueng
Department of Chemistry
National Taiwan Normal University
88, Sec. 4, Tingchow Rd., Taipei 116 (Taiwan)
Fax: (+886) 2-2932-4249
E-mail: chefv012@scc.ntnu.edu.tw

[**] Diese Arbeit wurde vom National Science Council der Republik China unterstützt (NSC-87-2113-M-003-001).