

Metallionen bindende Peptide: von der Katalyse zur Proteinmarkierung

Giulia Licini* und Paolo Scrimin*

Stichwörter:

Homogene Katalyse · Kombinatorische Chemie ·
Metallionen · Peptide · Sensoren

Metallionen gehören zu den wichtigsten Cofaktoren in Proteinen. Sie haben entscheidende Aufgaben bei der Steuerung der Proteinaktivität an allosterischen und katalytischen Wirkorten. Natürliche Aminosäuren enthalten in den Seitenketten verschiedene funktionelle Gruppen, die Metallionen binden können. Nehmen diese Gruppen in der Proteinsequenz eine geeignete, durch die Sekundär- und Tertiärstruktur des Polymers festgelegte Position ein, so binden sie je nach Art und Position viele Metallionen mit oft bemerkenswerter Selektivität. Es überrascht daher nicht, dass Chemiker bei der Wahl von Liganden für Metallionen für unterschiedliche Anwendungen zunehmend auf Peptidsequenzen zurückgreifen.^[1] Dabei nutzen sie häufig natürliche Sequenzen, von denen bekannt ist, dass sie ein bestimmtes Metallion binden. Darüber hinaus haben Forscher die bestehende Vielfalt an koordinierenden Strukturmotiven aus natürlichen Aminosäuren erweitert, indem sie neue Strukturen synthetisierten und spezifische Endgruppen in Peptidsequenzen einführten.^[2] Zu den bisher beschriebenen Anwendungen gehört die Synthese von Katalysatoren für Reaktionen, die nicht unbedingt ein biologisches Gegenstück haben müssen, ebenso wie die Herstellung von Sensoren für analytische Zwecke.

[*] Prof. Dr. G. Licini, Prof. Dr. P. Scrimin
Department of Organic Chemistry
and ITM-CNR, Padova Section
University of Padova
Via Marzolo, 35131 Padova (Italien)
Fax: (+39) 049-827-5239
E-mail: giulia.licini@unipd.it
paolo.scrimin@unipd.it

Einer der Hauptvorteile von Peptidsequenzen gegenüber anderen Bausteinen ist, dass sie durch Festphasensynthese leicht zugänglich sind und demnach eine kombinatorische Methode zur Herstellung von Substanzbibliotheken^[3] zur Verfügung steht. Die Entwicklung von Screening-Methoden für diese Bibliotheken ist jedoch schwierig. Bei dieser Strategie muss die Bindungsstärke der Liganden für Metallionen abgeschätzt und die Aktivität der Komplexe entsprechend ihrer späteren Verwendung als Katalysatoren oder Sensoren untersucht werden.

Funktionale Metallopeptide sind zweifellos die attraktivsten Zielverbindungen. Francis und Jacobsen entdeckten in kombinatorischen Bibliotheken metallbindender Liganden neuartige Peptidkatalysatoren für die Epoxidierung von Alkenen.^[4] Berkessel und Héault beschrieben einen kombinatorischen Zugang zur Phosphatspaltung durch hydrolytische Metallopeptide.^[5] Ihre Strategie ermöglichte das direkte „On-Bead-Screening“ einer Bibliothek aus 625 festphasengebundenen Undecapeptiden mit einem chromogenen Phosphat-Modellsubstrat. So konnten sie aktive Verbindungen nachweisen, deren Wirksamkeit in Lösung ebenfalls geprüft wurde. Ferner gelang Long et al. die kombinatorische Optimierung des Tripeptids Xaa-Xaa-His, das an Ni²⁺-Ionen bindet, und die auf Desoxyribose basierende (oxidative) Spaltung von B-DNA.^[6] Dazu synthetisierten sie zwei Substanzbibliotheken (aus 18 natürlichen Aminosäuren, außer Cys und Trp), in denen sie die erste und zweite Position des Liganden variierten. Das optimierte Metallopeptid Ni²⁺-Pro-Lys-His spaltete DNA um eine Größenord-

nung besser als die Referenzverbindung Ni²⁺-Gly-Gly-His, die als Ausgangspunkt des Selektionsprozesses diente. Interessanterweise änderten sich die Metallkomplexierung und die Selektivität des optimierten Metallopeptids für AT-reiche Sequenzen nicht, während die Affinität der DNA-Bindung nur leicht zunahm. Wie Versuche mit Modellverbindungen ergeben haben, hängt die beobachtete Steigerung der Aktivität hauptsächlich von der Bindungsgeometrie ab.

Die Arbeitsgruppe von Hoveyda setzte Metallopeptidkomplexe ein, um eine Reihe recht unterschiedlicher Reaktionen stereoselektiv zu katalysieren. Der entscheidende Schritt, die Identifizierung der wirksamsten Kombination aus chiralem Ligand und Metallsalz für eine bestimmte Reaktion, erfolgte durch ein erstes Parallelscreening unterschiedlicher Metallvorstufen mit leicht modifizierbaren (modularen) Liganden. In allen Fällen wurden Schiff-Basen von Peptiden mit unterschiedlichen O-, N- oder P-Donorfunktionen und Ionen sowohl früher als auch später Übergangsmetalle getestet. Auf diese Weise gelang die Entwicklung effizienter und hoch stereoselektiver C-C-Verknüpfungsreaktionen wie der Ti^{IV}-katalysierten CN⁻-Addition an Epoxide^[7] und Imine,^[8] der Al^{III}-katalysierten CN⁻-Addition an Ketone,^[9] der Zr^{IV}-katalysierten Addition von Dialkylzink an Imine,^[10] der Cu-katalysierten konjugierten Addition an Enone^[11] und der Allylsubstitution.^[12] So erwiesen sich Pyridinylpeptidderivate als wirksame chirale Liganden für die Cu-katalysierte allylische Substitution von di- und trisubstituierten Alkenen. Mit diesem Katalysatorsystem gelang die Synthese von (R)-(-)-

Sporochnol mit 82 % Gesamtausbeute und 82 % ee.^[12]

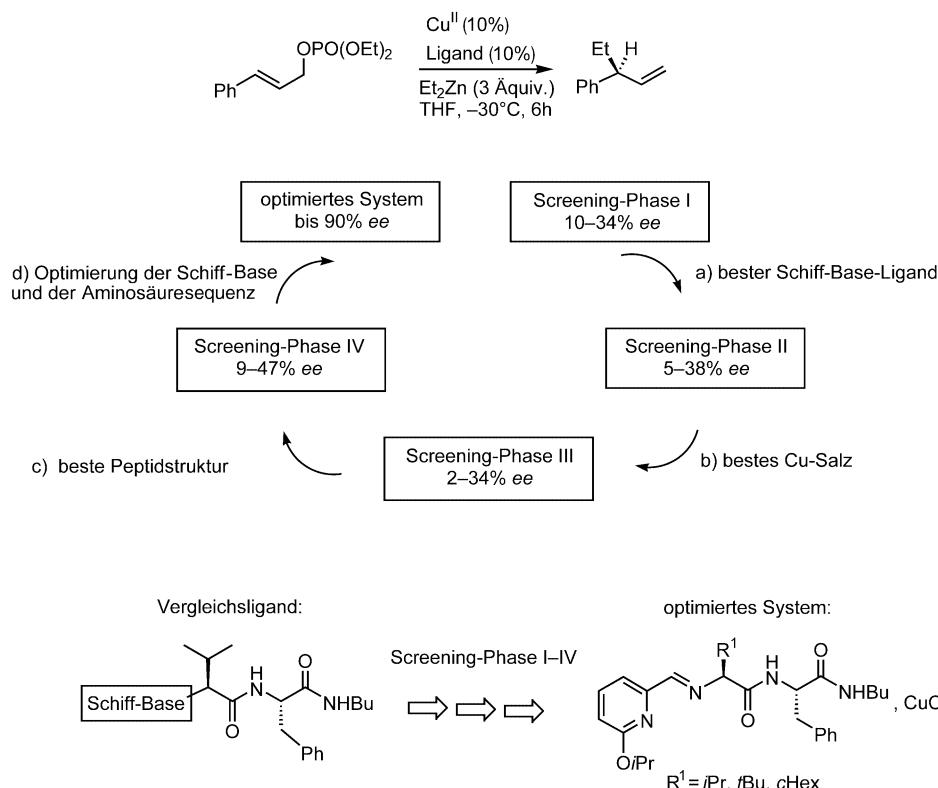
Die Optimierung der Reaktionsbedingungen gelang mit einem rationalen anstelle eines kombinatorischen Screenings in folgenden Schritten (Schema 1): a) Identifizierung der reaktivsten Substrate und Metallvorstufen (Allylphosphat und CuCN) sowie der für die Addition von Et₂Zn in THF am besten geeigneten Schiff-Base. Unter diesen Bedingungen erzielten die beiden besten Liganden zunächst wenig beeindruckende ee-Werte von 34 % und 26 %. b) Identifizierung der besten Kombination aus Ligand und Cu-Salz aus den zuvor gewählten Liganden und sechs Kupfersalzen. c) Bestimmung des optimalen Peptids (Länge der Aminosäuresequenz, C-terminale Gruppe). d) Feinabstimmung der Schiff-Base und der ersten Aminosäure. Durch dieses Selektionsverfahren konnten die ee-Werte mit Aryl-disubstituierten Alkenen auf bis zu 87 % und mit Aryl-trisubstituierten Alkenen auf bis zu 90 % gesteigert werden. Ähnliche Enantioselektivitäten wurden mit einem nichtrationalen Verfahren erhalten, bei

dem Parallelbibliotheken von Substraten, Lösungsmitteln und Metallionen durchmustert wurden.^[8a,10] Diese Beobachtung weist darauf hin, dass bei der Entwicklung eines katalytischen Systems kleine gebündelte Bibliotheken ebenso gute Ergebnisse liefern können wie eine zeitaufwändige rationale Methode.

Auf einen wichtigen Aspekt bei der Wahl von Katalysatoren aus Phosphan-Peptidliganden und späten Übergangsmetallionen machen Gilbertson et al. aufmerksam:^[13,14] die Bestimmung der besten Kombination aus chiralem Ligand und Substrat. Es werden also Katalysatoren gesucht, die hoch spezifisch für ein Substrat sind – eine typische Eigenschaft von Enzymen. Die Arbeitsgruppe untersuchte auch die Bedeutung der Sekundärstruktur des Peptids für die Stereoselektivität einer katalytischen Reaktion anhand der Pd^{II}-katalysierten Addition von Dimethylmalonat an Cyclopentadienylacetat, wobei die Liganden aus zwei Reihen von Peptidbibliotheken mit 96 bzw. 40 Verbindungen ausgewählt wurden. Dabei zeigte sich, dass β -Schleifen besser geeignet sind als

Helixkonformationen. In einigen Fällen werden beim direkten Screening von Katalysatoren an dem Träger, an dem sie synthetisiert wurden, ähnliche Ergebnisse erhalten wie in Lösung.

Die Katalyse hat sich als ausgezeichnetes Versuchsfeld erwiesen, um das Wirkungsvermögen von Metallopeptiden zu prüfen. Über eine neue Anwendung von Metallopeptiden als Fluoreszenzmarker berichteten Imperiali et al. Sie untersuchten zunächst Peptidderivate als Fluoreszenz-Chemosensoren für Zn²⁺-Ionen^[15] und entdeckten dann ein Ln³⁺-bindendes Peptid zum schnellen Nachweis markierter Proteine. Die Entwicklung von Fluoreszenzproteinen als molekularen Endgruppen kann dazu beitragen, Zusammenhänge zwischen komplexen biochemischen Vorgängen und den Aufgaben lebender Zellen zu erkennen.^[16] Die Arbeit von Imperialis Gruppe basiert auf früheren Untersuchungen anderer Forscher über Ähnlichkeiten der Ionenradien und des Koordinationsverhaltens von Ca²⁺- und Ln³⁺-Ionen gegen Aminosäuresequenzen, die in bestimmten Schleifendomänen Calcium-bindender Proteine auftre-



Schema 1. Verfahren zur Optimierung einer Peptidligand/Cu-Salz-Kombination für die asymmetrische allylische Substitution von Alkenen nach Hoveyda et al.

ten.^[17] In einer früheren Arbeit^[18] wurden die aktiven Stellen genau bestimmt, die für die Bindung und Fluoreszenzverstärkung in Peptiden mit 14 Aminosäureeinheiten entscheidend sind. Beim Screening^[19] einer großen Bibliothek (annähernd 500000 Verbindungen) aus Peptiden mit der allgemeinen Sequenz Ac-Gly-Xaa-Zaa-Xaa-Zaa-Xaa-Gly-Trp-Zaa-Glu-Zaa-Zaa-Glu-Leu (Xaa = potenziell metallbindende Aminosäuren: Asp, Asn, Ser oder Glu; Zaa = hydrophobe Aminosäuren) entdeckten Imperiali et al. ein Peptid, dessen K_D -Wert für Tb^{3+} -Ionen nur 0.22 μM beträgt.

Die Autoren vermuteten, dass diese Lanthanoid-bindenden Endgruppen (lanthanide-binding tags, LBTs) eine neue Alternative sein könnten, um fluoreszierende Fusionsproteine durch molekulärbiologische Routineverfahren zu exprimieren. Um das zu prüfen, hängten sie die aussichtsreichsten Sequenzen an Ubiquitin an (Abbildung 1). Zwischen das N-terminale His-Fragment und die LBT-Gruppe wurde eine Gly-Pro-Gly-Stoppsequenz eingeschoben, um das Peptid anschließend vom His-Fragment abspalten zu können. Die Proteinexpression wurde durch die Anwesenheit der LBT-Endgruppe nicht verringert. Untersuchungen mit unterschiedlichen Metallionen ergaben für die LBTs eine gute Selektivität für Tb^{3+} -Ionen. Die

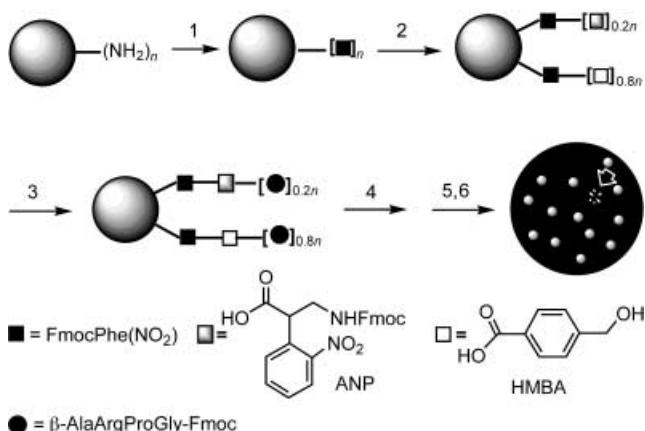


Abbildung 2. Verfahren von Imperiali et al. für die Synthese und das Screening Tb^{3+} -bindender Peptide. 1) Kupplung von N - α -Fmoc-4-nitrophenylalanin; 2) Kupplung von ANP:HMBA (1:10); 3) Einführung der Spacer-Sequenz; 4) Synthese einer „Split-and-Pool“-Bibliothek; 5, 6) Entschützen der Aminosäure-Seitenketten, anschließendes Gießen in Agarose mit 50 μM Tb^{3+} -Ionen und Photolyse. Nach Selektion der lumineszierenden Kugelchen und Aufarbeitung werden sie mit Tb^{3+} -Ionen titriert und die Sequenz durch MALDI-MS ermittelt. Fmoc = 9-Fluorenylmethoxycarbonyl.

Autoren haben auch ein effizientes kombinatorisches „On-Bead-Screening“ entwickelt,^[20] um Sequenzen mit noch besserem Bindungsvermögen für dieses Lanthanoidion zu finden. Das Verfahren nutzt die kombinatorische „Split-and-Pool“-Peptidsynthese an der Festphase, bei dem orthogonal spaltbare Linker ein wirksames zweistufiges Screeningverfahren ermöglichen (Abbildung 2). Das erste Durchmustern umgeht die beim „On-Bead-Screening“ auftretende Interferenz dadurch, dass ein Teil der Peptide photochemisch abgespalten und für Untersuchungszwecke in einer Agarosematrix aufgefangen wird. Beim zweiten Durchmustern werden definierte wässrige Lösungen jedes Treffers weiter charakterisiert. In diesem Verfahren wurden auch Störungen durch den festen Träger vermieden, wie sie Miller et al.^[21] und Davis et al.^[22] beim „On-Bead-Screening“ von Produkten beobachteten, die sie mithilfe

eines trägergebundenen Katalysators erzeugten. Mit dieser Screening-Methode und durch weiteres gezieltes Verkleinern der Bibliothek wurde die Dissoziationskonstante für Tb^{3+} -Ionen auf 57 nm für ein lineares Peptid und auf 2 nm für ein durch Disulfidbildung cyclisiertes Peptid verringert. Zum Beweis wurden diese Peptidsequenzen zur Bestimmung der Proteinconzentration und des Expressionsprofils eingesetzt. Die Fluoreszenz des Lanthanoidions lässt sich für diesen Zweck nur nutzen, wenn die Bindungsstärke so groß ist, dass mit Metallionenkonzentrationen gearbeitet werden kann, die weit unter denjenigen für unspezifische Bindung liegen.

Obwohl die Untersuchungen zu Peptidliganden^[23] gerade erst begonnen haben, ist bereits eine eindrucksvolle Zahl nützlicher Anwendungen von Peptid-Metall-Komplexen bekannt. Funktionelle Peptide lassen sich nicht nur mit kombinatorischen Methoden durchmustern, sie können auch in Proteine eingebaut werden, die *in vivo* exprimiert werden. Auch nichtnatürliche Aminosäuren können codiert werden.^[24] Dadurch eröffnen sich neue Möglichkeiten für die Untersuchung von Proteinen und Zellfunktionen sowie für die Synthese von Generationen neuartiger Proteine mit ungewöhnlichen Eigenschaften.

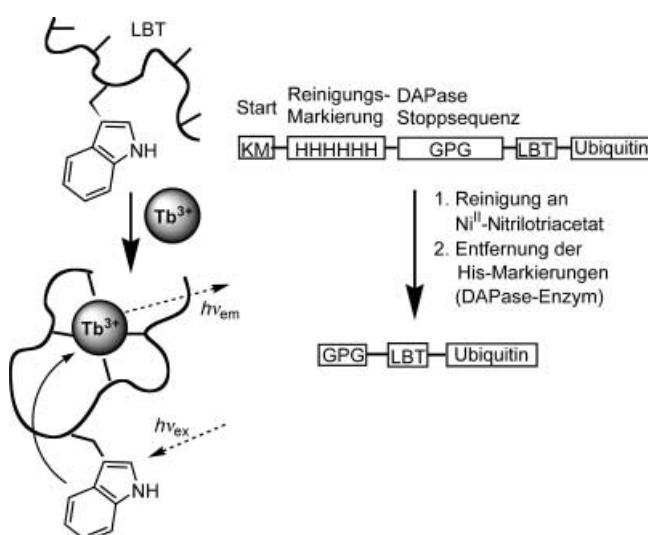


Abbildung 1. Die Methode der Lanthanoid-bindenden Endeinheiten (LBT, links) von Imperiali und Mitarbeitern und ihre allgemeine Synthese LBT-markierter Proteine (rechts). Die His-Gruppe kann mit dem TAGZyme-Verfahren abgespalten werden (mit dem Enzym Dipeptidylaminopeptidase, DAPase).

-
- [1] G. Xing, V. J. DeRose, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 196–200.
- [2] H. Ishida, Y. Inoue, *Rev. Heteroat. Chem.* **1999**, *19*, 79–142.
- [3] B. E. Turk, L. C. Cantley, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 84–90.
- [4] M. B. Francis, E. N. Jacobsen, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 987–991; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 937–941.
- [5] A. Berkessel, D. A. Héroult, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 99–102; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 102–105.
- [6] X. Huang, M. E. Pieczko, E. C. Long, *Biochemistry* **1999**, *38*, 2160–2166.
- [7] K. D. Shimizu, B. M. Cole, C. A. Krueger, K. W. Kuntz, M. L. Snapper, A. H. Hoveyda, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 1781–1785; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 1703–1707, zit. Lit.
- [8] C. A. Krueger, K. W. Kuntz, C. D. Dzierba, W. G. Wirschum, J. D. Gleason, M. L. Snapper, A. H. Hoveyda, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 4284–4285; J. R. Porter, W. G. Wirschum, K. W. Kuntz, M. L. Snapper, A. H. Hoveyda, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2657–2658.
- [9] H. Deng, M. P. Isler, M. Snapper, A. H. Hoveyda, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 1051–1054; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1009–1012.
- [10] J. R. Porter, J. F. Traverse, A. H. Hoveyda, M. L. Snapper, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 984–985.
- [11] C. A. Luchaco-Cullis, H. Mizutani, K. E. Murphy, A. H. Hoveyda, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 1504–1508; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 1456–1460; S. J. Degrado, H. Mizutani, A. H. Hoveyda, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 13362–13363.
- [12] S. J. Degrado, H. Mizutani, A. H. Hoveyda, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 755–756.
- [13] S. R. Gilbertson, S. E. Collibee, A. Agarkov, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 6522–6523.
- [14] S. R. Gilbertson, X. Wang, *Tetrahedron* **1999**, *55*, 11609–11618, zit. Lit.
- [15] G. K. Walkup, B. Imperiali, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 3443–3450.
- [16] J. Lippincott-Schwartz, G. H. Patterson, *Science* **2003**, *300*, 87–91.
- [17] Zur Verwendung von EF-Hand-Proteinen (dem Calcium-bindenden Teil von Calmodulin) als Ln^{3+} -Metallonucleasen siehe: J. T. Welch, W. R. Kearney, S. J. Franklin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 3725–3730, zit. Lit.
- [18] J. P. MacManus, C. W. Hogue, B. J. Marsden, M. Sikorska, A. G. Szabo, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 10358–10366.
- [19] K. J. Franz, M. Nitz, B. Imperiali, *ChemBioChem* **2003**, *4*, 265–271.
- [20] M. Nitz, K. J. Franz, R. L. Maglathlin, B. Imperiali, *ChemBioChem* **2003**, *4*, 272–276.
- [21] R. F. Harris, A. J. Nation, G. T. Copeland, S. J. Miller, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 11270–11271.
- [22] M. Müller, T. W. Mathers, A. P. Davis, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 3929–3931; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3813–3815.
- [23] R. B. Hill, D. P. Raleigh, A. Lombardi, W. F. DeGrado, *Acc. Chem. Res.* **2000**, *33*, 745–754.
- [24] L. Wang, P. G. Schultz, *Chem. Commun.* **2002**, *1*–11.