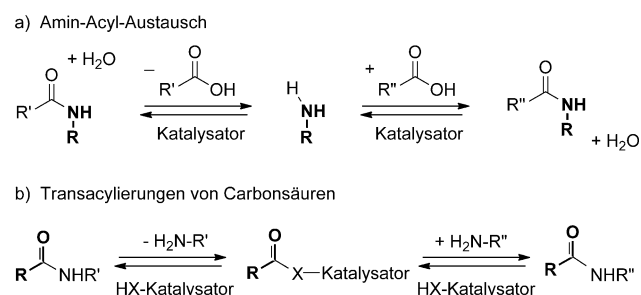


Enzymatischer Amin-Acyl-Austausch in Peptiden auf Gold-Oberflächen**

Roberto Castangia, Martina Austeri und Sabine L. Flitsch*

Enzymatisch katalysierte Reaktionen und Synthesen von Aminen sind essenziell in den Bereichen Biologie, Chemie, Biotechnologie und Nanotechnologie. Unter den Transformationen der Amide wurden die Amidsynthese aus Carbonsäuren, Aktiv-Estern oder Amiden durch Transacylierung weitgehend untersucht (Schema 1b). Dagegen ist der enzy-



Schema 1. Gegenüberstellung von Amin-Acyl-Austausch (a) und Transacylierungen (b).

matisch katalysierte Amin-Acyl-Austausch von nichtaktivierte Amiden mit Carbonsäuren (Schema 1a) wenig untersucht. Eine kürzlich beschriebene,^[1] elegante chemische Methode, unter Verwendung von perfluorierten Anhydriden, erfordert die Aktivierung des Amides sowie der Carbonsäure und ist begrenzt auf sekundäre Amide mit mangelnder Chemo-selektivität. Der Einsatz von Enzymen könnte eventuell zu einem selektiveren und biokompatiblen Amin-Acyl-Austausch führen, ohne dass die Aktivierung der Carbonsäuren nötig wäre. Hinzu käme eine hohe Stereo- und Chemo-selektivität.

Alle untersuchten Enzym-katalysierten Umwandlungen der Amide können als Transacylierung von Carboxylaten klassifiziert werden (Schema 1b), zum Beispiel die durch Transglutaminase,^[2] Sortase,^[3] diverse Proteasen^[4] und Lipasen wie CalB^[5] vermittelten Prozesse. Es gibt einige wichtige mechanistische Unterschiede zwischen den beiden Reaktionstypen: Der Amin-Acyl-Austausch beinhaltet eine reversible Umwandlung von Aminen und freien Carbonsäuren,

wohingegen die Transacylierung von Carboxylaten über ein Acyl-Enzym-Intermediat verläuft, das selektiv reagiert. Zudem kann durch kinetische Kontrolle der Reaktion in Schema 1b die Hydrolyse verhindert werden, beispielsweise durch Umleiten der Reaktionsführung über ein Katalysator-Acyl-Intermediate, um freie stabile Carboxylate zu vermeiden. Die größere Herausforderung liegt in dem Amin-Acyl-Austausch, da dieser auf Gleichgewichten beruht und stabilere Carboxylate als Substrate verwendet. Unseres Wissens wurde dieser Enzym-katalysierte Acylaustausch nur in sehr eingeschränkten Aminen wie Harnstoff beschrieben.^[6]

Transacylierungen in biologischen Systemen, zum Beispiel während des Protein-Spleißens oder im Proteasom, wurden bislang stets dem Reaktionstyp in Schema 1b zugeordnet.^[7] Es wäre spannend zu untersuchen, inwieweit der Amin-Acyl-Austausch durch Proteasen, der nicht über ein Acyl-Enzym-Intermediat verläuft, unter physiologischeren Reaktionsbedingungen katalysiert werden und daher im Peptid-Spleißens zur Anwendungen kommen könnten. Diese Reaktionen würden über stabile Zwischenstufen verlaufen und wären toleranter gegenüber der zeitlichen und räumlichen Verfügbarkeit der Reaktionspartner. Deshalb haben wir nach Reaktionssystemen gesucht, die einen Enzym-katalysierten Amin-Acyl-Austausch in wässriger Umgebung ermöglichen.

Wir haben bereits sowohl Hydrolyse als auch die Synthese von Amiden mit Proteasen beschrieben (erster und zweiter Schritt der Reaktion in Schema 1a), wobei die Substrate über den Aminanteil an ein Festphasensystem (R) gekuppelt waren.^[8] Dabei konnte gezeigt werden, dass funktionalisierte selbstorganisierte Monoschichten (SAMs) auf Goldoberflächen vollständig kompatibel mit chemischen und biochemischen Reaktionen sind, sodass wir Protease-katalysierte Reaktionen untersuchen konnten. Zur markierungsfreien Reaktionsmessung des Systems ist In-situ-MALDI-Tof-Massenspektrometrie bestens geeignet. Aufgrund unserer Erfolge mit der Protease-katalysierten Peptidsynthese auf diesen Oberflächen^[9] wurde diese Plattform verwendet, um zu untersuchen, ob ein Amin-Acyl-Austausch möglich ist.

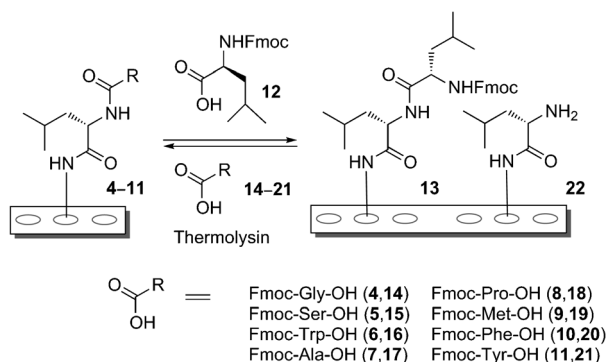
Dazu wurden „Spot Surfaces“ in einem 64-Felder-Gold-Array (geeignet für MALDI-Tof-Messungen) mit DMSO-Lösungen funktionalisierter Alkanthiole inkubiert, um ein SAMs-Array zu erhalten.^[10] Die Dichte der funktionellen Gruppen wurde über das Verhältnis der eingesetzten Thiole [HS(CH₂)₁₇(OCH₂CH₂)₆OCH₂COOH] (**1**) und [HS(CH₂)₁₇(OCH₂CH₂)₃OH] (**2**) eingestellt. N-Fmoc-Diaminobutan (**3**) wurde an **1** über N-Succinimid-Aktivierung gekuppelt, bevor die Fmoc-Gruppe abgespalten wurde. Mithilfe von Standard-Peptidkupplungsreaktionen wurden neun verschiedene Fmoc-geschützte Dipeptide an den funktionellen Linker ge-

[*] R. Castangia, Dr. M. Austeri, Prof. S. L. Flitsch
The School of Chemistry and MIB, The University of Manchester
131 Princess Street, Manchester M1 7DN (Großbritannien)
E-Mail: sabine.flitsch@manchester.ac.uk

[**] Dieses Projekt wurde durch EPSRC, die Europäische Union FP6&7, den Schweizerischen Nationalfonds (M.A.) und die Royal Society (Wolfson Merit award für S.L.F.) finanziell gefördert.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201205404> zu finden.

koppelt,^[9] um die Dipeptid-Oberflächen **4–11** (Schema 2) zu erhalten. Dieser Prozess wurde mit MALDI-ToF-Massenspektrometrie überwacht (Abbildung 1 a).



Schema 2. Thermolysin-katalysierter reversibler Amin-Acyl-Austausch auf einem Gold-Array.

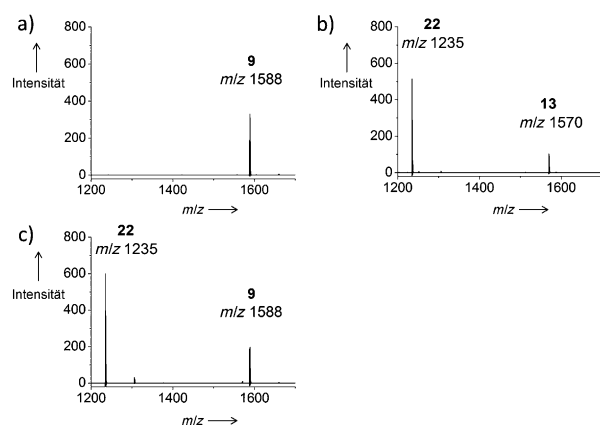


Abbildung 1. MALDI-ToF-Spektren des Acyl-Austausches von **9**. a) Ausgangsmaterial **9** (m/z 1588) als Disulfid-Dimer-Natrium-Addukt. b) Nach dem ersten Austausch mit Thermolysin und Fmoc-Leu: **9** scheint vollständig zu **13** (m/z 1570) und dem Hydrolyseprodukt **22** (m/z 1235) umgesetzt zu sein. c) Ein zweiter Acyl-Austausch des Produktes aus Reaktion (b) mit Fmoc-Met wandelt **13** wieder in **9** (m/z 1588) um.

Die oberflächengebundenen Dipeptide **4–11** wurden dann mit der Protease Thermolysin aus *B. Thermoproteolyticus rocco* in Gegenwart eines Überschusses Fmoc-Leucin (**12**; Schema 2) inkubiert, da Leucin als gutes Substrat für Thermolysin in P_1 -Position bekannt ist.^[11] Eine Reihe von Reaktionsbedingungen wurde getestet, wobei 4M NaCl in Tris-Puffer (100 mM, pH 7.5) mit gesteigerten Ausbeuten gefunden wurde.^[12] Abbildung 1 b zeigt die Massenspektren für die Umsetzung von **9** zu **13** (m/z 1570).^[13] Es scheint, als wäre **9** vollständig zu **13** und dem Hydrolyseprodukt **22** (m/z 1235) umgesetzt. Ähnliche Ergebnisse wurden für die Dipeptide **4–7** und **9–11** erhalten. Lediglich das Prolin-Derivat **8** führte zu einer Mischung aus Startmaterial **8** und Produkt **13**, wahrscheinlich wegen der bekannten geringen Aktivität der Protease Thermolysin gegenüber Prolin an P_1 -Position.^[11b,c,14]

Die Reversibilität des Amin-Acyl-Austausches wurde weiterhin untersucht, indem die oberflächengebundenen Produkte mit frischer Protease-Lösung versetzt wurden, diesmal jedoch mit verschiedenen Fmoc-geschützte Aminosäuren **14–21** anstelle von Fmoc-Leucin (**12**; d.h. die Reaktion verläuft nach dem unteren Reaktionspfeil in Schema 2).

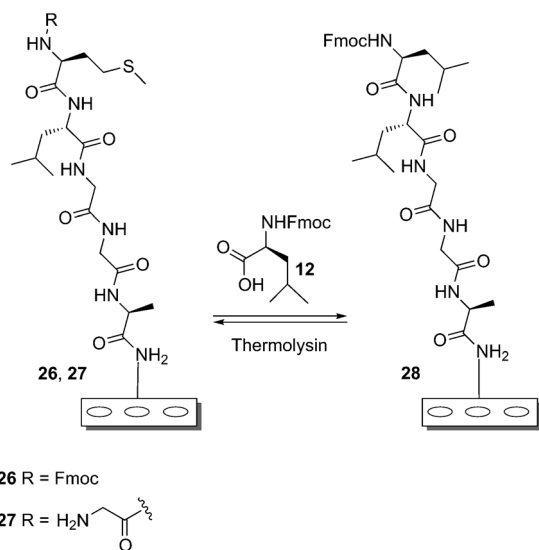
Abbildung 1 c zeigt die Massenspektren der Probe aus Abbildung 1 b nach Behandlung mit einem Überschuss an Fmoc-Methionin (**19**), was zu einer Oberfläche führt, die frei von Startmaterial **13** (erwartet bei m/z 1570) zu sein scheint und dafür **9** (m/z 1588) als einziges detektierbares Dipeptid enthält. Ähnliche Ergebnisse wurden für die Umsetzung von **13** mit Fmoc-Alanin (**17**) und Fmoc-Tyrosin (**21**) erhalten, wohingegen Fmoc-Serin (**15**), Fmoc-Tryptophan (**16**) und Fmoc-Prolin (**18**) zu Gemischen mit **13** führten, was wahrscheinlich wieder der Substratspezifität des Enzyms geschuldet ist. Die Reaktion mit Fmoc-Glycin (**14**) und Fmoc-Phenylalanin (**20**) zeigte keine Umsetzung.

Wegen der großen Zahl verschiedener Protease-Klassen mit verschiedenen Katalysemechanismen war es interessant zu sehen, ob der Amin-Acyl-Austausch auf Thermolysin (eine Zink-abhängige Protease) begrenzt ist, oder ob beispielsweise auch Serinproteasen wie α -Chymotrypsin funktionieren. Obwohl α -Chymotrypsin ein anderes Substratspektrum hat als Thermolysin, sollten einige der Verbindungen aus Schema 2 als Substrate für beide Proteasen dienen können und deswegen hilfreich für direkt vergleichende Studien zu der Amin-Acyl-Austauschaktivität beider Proteasen sein. Somit wurden die immobilisierten Dipeptide Fmoc-Tyr-Leu- R^S (**11**, wobei R^S die Festphase ist) und Fmoc-Tyr-Phe- R^S (**23**) mit Fmoc-Leu (**12**) und Fmoc-Phe (**20**) inkubiert, um die Produkte Fmoc-Leu-Leu- R^S (**13**), Fmoc-Phe-Leu- R^S (**10**) und Fmoc-Phe-Phe- R^S (**24**) neben den Hydrolyseprodukten Leu- R^S (**22**) und Phe- R^S (**25**) zu erhalten. Diese Ergebnisse zeigen, dass ein Amin-Acyl-Austausch mit verschiedenen Protease-Klassen unabhängig von dem zugrundeliegenden Mechanismus möglich ist, was nahelegt, dass die Reaktion einer thermodynamischen statt einer kinetischen Kontrolle unterliegt.

Ein großer Vorteil der enzymatischen gegenüber der chemischen Methode ist die Möglichkeit, Reaktionen stereoselektiv durchzuführen, was mit den gängigen chemischen Acyl-Austauschmethoden nicht möglich ist. Deshalb wurden die enzymatischen Umwandlungen der Enantiomere L,L-**9**, L,D-**9**, D,L-**9** und D,D-**9** mit Thermolysin in Gegenwart der Isomere L-**12** und D-**12** unter denselben Reaktionsbedingungen wie in Schema 2 untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass der Amin-Acyl-Austausch tatsächlich stereoselektiv verläuft – lediglich die Reaktion von L,L-**9** mit L-**12** ergab ein Produkt mit der Masse des entsprechenden Dipeptids **13** (siehe die Hintergrundinformationen, Abbildungen S11 und S12). Diese Ergebnisse bestätigen, dass die Amin-Acyl-Austauschreaktionen tatsächlich Enzym-katalysiert verlaufen und nicht über chemische Nebenreaktionen.

Neben der Stereoselektivität der Protease-katalysierten Amin-Acyl-Austauschreaktion könnte man auch Chemoselektivität erwarten, da Proteasen normalerweise eine Bindungsspezifität aufweisen. Daher sollte das Enzym in der Lage sein, strukturell unterschiedliche Peptidbindungen, mit eventuell ähnlicher chemischer Reaktivität, auszutauschen.

Um diese Selektivität zu testen, wurden die Peptide **26** und **27** (Schema 3) über „Spot-Synthese“ direkt auf einer Goldoberfläche synthetisiert.^[15] **26** ist ein Pentapeptid mit einem Fmoc-geschützten N-Terminus, wohingegen das Hexapeptid



Schema 3. Enzym-katalysierter Acyl-Austausch von Peptiden auf Gold-Arrays. (Siehe die Hintergrundinformationen für eine detaillierte Beschreibung des Experiments.)

27 ein N-terminal ungeschütztes Glycin enthält. (Weitere Beispiele mit kürzeren Peptiden **31**, **34**, **37**, **38** und **39** sind in den Hintergrundinformationen zu finden.) Unter Behandlung mit Thermolysin in Gegenwart von Fmoc-Lysin (**12**) wie in Schema 3 zeigt die resultierende Masse deutlich, dass nur die Met-Leu-Bindung ausgetauscht wurde, wobei das Peptid **28** in beiden Fällen mit Hydrolyse-Nebenprodukten entstanden ist. Es konnte gezeigt werden, dass das Enzym selektiv eine Peptidbindung der vier bzw. fünf in **26** und **27** austauscht.

Zusammenfassend haben wir Reaktionsbedingungen in wässrigem Puffer entwickelt, die es erlauben reversible, Protease-katalysierte Amin-Acyl-Austauschreaktionen zu beobachten. Diese Reaktionen verlaufen unter milden, biokompatiblen Bedingungen und sind stereo- sowie chemoselektiv. Wir konnten zeigen, dass der Amin-Acyl-Austausch von verschiedenen Proteaseklassen (Zink-abhängige Metalloprotease Thermolysin und Serinprotease α -Chymotrypsin) katalysiert werden kann. Unseres Wissens ist dies der erste Beweis dafür, dass Protease-katalysierte Transpeptidierungen in wässriger Umgebung als Amin-Acyl-Austausch und nicht als Transacylierung verlaufen. Diese Austauschreaktionen sollten hilfreiche Anwendung in der biokompatiblen und selektiven Modifikation von Amin-funktionalisierten Oberflächen in „Bottom-up“-Bio-Nano-Funktionalisierungsstrategien finden.^[16]

Nach unseren Studien zufolge sind Amin-Acyl-Austauschreaktionen unter physiologischen Bedingungen möglich und sollten als mechanistische Grundlage für das Peptid-Spleißen im humanen Proteasom in Betracht gezogen werden.^[7] Das Peptid-Spleißen produziert immunogene Peptide aus zwei nicht aufeinanderfolgenden Fragmenten aus

dem Stammprotein und könnte für die Impfstoffentwicklung von Bedeutung sein. Diese Transpeptidierungen wurden in der Vergangenheit den Transacylierungen von Carboxylaten (Schema 1b) zugeordnet, aber die gezeigten Ergebnisse zeigen die Fähigkeit der Proteasen Amin-Acyl-Austauschreaktionen zu katalysieren, welche eher Gleichgewichts- als Kinetik-getrieben sind und die verschiedenen Anforderungen an Mechanismus- und Substrat-Voraussetzungen haben.

Eingegangen am 9. Juli 2012,
 veränderte Fassung am 30. August 2012
 Online veröffentlicht am 20. November 2012

Stichwörter: Chymotrypsin · Enzymkatalyse · Peptide · Thermolysin · Transacylierungen

- [1] a) P. Rota, P. Allevi, R. Colombo, M. L. Costa, M. Anastasia, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 1894–1897; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 1850–1853; b) P. Rota, P. Allevi, I. S. Agnolin, R. Mattina, N. Papini, M. Anastasia, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 2885.
- [2] L. Fornelli, A. W. Schmid, L. Grasso, H. Vogel, Y. O. Tsybin, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 486–497.
- [3] K. Piotukh, B. Geltinger, N. Heinrich, F. Gerth, M. Beyermann, C. Freund, D. Schwarzer, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 17536–17539.
- [4] C. R. Berkers, A. de Jong, H. Ovaa, B. Rodenko, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2009**, *41*, 66–71.
- [5] a) O. Torre, E. Busto, V. Gotor-Fernandez, V. Gotor, *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 1481–1488; b) P. O. Syrén, K. Hult, *ChemCatChem* **2011**, *3*, 853–860; c) G. Cardillo, A. Gennari, L. Gentilucci, E. Mosconi, A. Tolomelli, S. Troisi, *Tetrahedron: Asymmetry* **2010**, *21*, 96–102.
- [6] N. P. Awasthi, R. P. Singh, *J. Oleo Sci.* **2007**, *56*, 507–509.
- [7] a) A. Dalet, V. Stroobant, N. Vigneron, B. J. van den Eynde, *Eur. J. Immunol.* **2011**, *41*, 39; b) J. Liepe, M. Mishto, K. Textoris-Taube, K. Janek, C. Keller, P. Henklein, P. M. Kloetzl, A. Zaikin, *PLoS Comput. Biol.* **2010**, *6*, e1000830; c) A. Dalet, N. Vigneron, V. Stroobant, K. Hanada, B. J. Van den Eynde, *J. Immunol.* **2010**, *184*, 3016; d) N. Vigneron, V. Stroobant, J. Chapiro, A. Ooms, G. Degiovanni, S. Morel, P. van der Bruggen, T. Boon, B. J. Van den Eynde, *Science* **2004**, *304*, 587.
- [8] R. V. Ulijn, B. Baragana, P. J. Halling, S. L. Flitsch, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 10988–10989.
- [9] R. Haddoub, M. Dauner, F. A. Stefanowicz, V. Barattini, N. Laurent, S. L. Flitsch, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 665–670.
- [10] a) J. C. Love, L. A. Estroff, J. K. Kriebel, R. G. Nuzzo, G. M. Whitesides, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1103–1169; b) B. T. Houseman, J. H. Huh, S. J. Kron, M. Mrksich, *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 270–274; c) N. Laurent, J. Voglmeir, A. Wright, J. Blackburn, N. T. Pham, S. C. C. Wong, S. J. Gaskell, S. L. Flitsch, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 883.
- [11] a) B. W. Matthews, *Acc. Chem. Res.* **1988**, *21*, 333–340; b) H. Matsubara, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1966**, *24*, 427–430; c) H. Matsubara, R. Sasaki, A. Singer, T. H. Jukes, *Arch. Biochem. Biophys.* **1966**, *115*, 324–331.
- [12] K. Inouye, *J. Biochem.* **1992**, *112*, 335–340.
- [13] Typische experimentelle Vorschrift: Die Fmoc-geschützte Aminosäure **12** (40 mg mL⁻¹) wurde in 100 mM Tris-Puffer (pH 7.5) mit 10 mM CaCl₂ und 4 M NaCl dispergiert. Dann wurde Thermolysin (0.01 mg mL⁻¹) zugesetzt. Die Mischung wurde auf die funktionalisierte Oberflächen mit den Peptiden **4–11** aufgetragen (0.5 μ L pro Feld). Anschließend wurde 30 min bei 37 °C inkubiert, und die Reaktion wurde durch Waschen der Platte mit

0.1 % Ameisensäure in Wasser beendet. Die Analyse erfolgte durch MALDI-ToF-MS (Bruker Ultraflex II TOF/TOF) mit einer 55 mM 2,4,6-Trihydroxyacetophenon-Monohydrat-(THAP)-Matrixlösung in Aceton. Um die Bildung von Kaliumaddukten zu verhindern, wurde die Matrixlösung mit 1 % einer 10 μ M NaCl-Lösung in Wasser (Reinheitsgrad HPLC) versetzt. Spektren wurden in „reflectron positive mode“ mit einem Stickstofflaser (337 nm) bei 40 % Abschwächung und einer 25-kV-Ionenquelle aufgenommen und mit der Flexanalysis

Software (Bruker, USA) bei Standard-Integrationseinstellungen analysiert.

- [14] R. L. Heinrikson, *Methods Enzymol.* **1977**, *47*, 175–189.
[15] N. Laurent, R. Haddoub, J. Voglmeir, S. C. C. Wong, S. J. Gaskell, S. L. Flitsch, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 2592–2596.
[16] A. R. Hirst, B. Escuder, J. F. Miravet, D. K. Smith, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 8122–8139; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8002–8018.