

Die Konstruktion von neuen Proteinen und Enzymen – eine Zukunftsperspektive?**

Von Manfred Mutter*

Professor Paul J. Flory zum 75. Geburtstag gewidmet

In der Natur ist von der fast unendlichen Zahl möglicher Proteine nur eine verschwindend kleine Zahl realisiert. Läßt sich das verbleibende Potential an struktureller und funktioneller Vielfalt zur Konstruktion von neuen Proteinen ausnutzen? Steht gar eine „zweite Evolution“ von Proteinen und Enzymen bevor? Diese Fragen sind aktuell geworden, seit die DNA-Rekombinationstechnik die Möglichkeit bietet, jede beliebige Aminosäuresequenz aufzubauen. Am Beispiel von Enzymmodellen wird deutlich, daß die außergewöhnlichen katalytischen Eigenschaften von Enzymen an die Anwesenheit spezifisch gefalteter Polypeptidketten mit komplexer dreidimensionaler Gestalt gebunden sind. Entscheidend auf dem Weg zu künstlichen Proteinen ist die Frage: Wie findet man Aminosäuresequenzen, die zur Faltung in eine *Tertiärstruktur* befähigt sind? – Neuere Erkenntnisse über Topologie und Faltungsmechanismus haben wesentliche Einblicke in das Zustandekommen und die Gesetzmäßigkeiten der dreidimensionalen Architektur von Proteinen erbracht. Offensichtlich nehmen Sekundärstrukturen im Faltungsprozeß eine Schlüsselstellung ein: Helices und β -Strukturen dirigieren als Nucleationszentren den Faltungsweg und sind Ursache für die überraschend kleine Zahl unterschiedlicher Faltungstopologien. Die Sekundärstrukturbildung läßt sich durch Konformationsstudien an Modellpeptiden direkt untersuchen: Bereits heute gelingt es, Oligopeptide mit maßgeschneiderten physikochemischen, strukturellen und konformativen Eigenschaften zu konzipieren. Damit sind die theoretischen und experimentellen Grundlagen für den Aufbau von Polypeptiden mit stabiler Tertiärstruktur geschaffen; der Weg zu Makromolekülen mit einer unermeßlichen Vielfalt neuartiger Eigenschaften ist frei.

1. Einleitung

Die außerordentlichen katalytischen Fähigkeiten von Enzymen stehen im Mittelpunkt vielfältiger Forschungsaktivitäten. Die von synthetischen Katalysatoren unerreichte Eigenschaft von Enzymen, Reaktionen spezifisch und selektiv zu beschleunigen, macht sich der Chemiker in rasch zunehmendem Maße zunutze.

Von der geradezu astronomischen Anzahl potentieller Aminosäuresequenzen ist in der Natur nur ein verschwindend kleiner Teil zu finden. Bei der Evolution wurden solche Polypeptidketten ausgewählt, die zur Faltung in eine globuläre, dreidimensionale Struktur (*Tertiärstruktur*) und damit zu biologischer Funktion befähigt sind. Bezuglich einer spezifischen biologischen Funktion sind natürliche Proteine und Enzyme somit optimierte Systeme, was sich in einer bis heute nur wenig durchschauten Komplexität in Struktur und Funktion ausdrückt. Vor diesem Hintergrund stellt sich die Frage: Lassen sich Moleküle mit Enzymähnlichen strukturellen und funktionellen Eigenschaften neu kreieren? Dies könnte auf zwei Wegen versucht werden:

- durch die Übertragung Enzym-spezifischer Merkmale auf einfacher zugängliche Moleküle und

- durch den Entwurf von neuen Proteinen mit unnatürlichen Aminosäuresequenzen („künstliche Proteine“^[1]).

Wo liegen nun die Möglichkeiten und Grenzen der sowohl wissenschaftlich als auch für die praktische Anwendung bedeutenden Konstruktion neuer Proteine und Enzyme?

Eine kritische Analyse bisher entwickelter „Enzym-ähnlicher“ Katalysatoren ergibt, daß der komplexe Zusammenhang Enzym-spezifischer Strukturmerkmale und Eigenschaften wie räumliche Orientierung reaktiver Gruppen, spezifische Ligand- und Substratbindung, Solubilisierung hydrophober Bereiche oder allosterische Steuerung nur bei multifunktionellen, *makromolekularen* Gebilden vorliegt^[1,2,10]. Einzelne Enzym-typische Eigenschaften können dagegen durchaus von einfachen Strukturen imitierbar werden, was für praktische Anwendungen von erheblicher Relevanz ist. Im Zusammenhang mit der Konstruktion künstlicher Enzyme müssen deshalb zunächst folgende Fragen geklärt werden:

Ist die komplexe *dreidimensionale* Architektur von Proteinen Voraussetzung für Enzym-analoge Funktionen? Hat die Natur einen „Überfluß“ – im Sinne eines „molecular tinkering“^[4,5] – an Komplexität geschaffen?

Diesen Fragen wird in Abschnitt 2 und 3 des vorliegenden Fortschrittsberichtes nachgegangen, wobei das Pro-

[*] Prof. Dr. M. Mutter

Institut für Organische Chemie der Universität
St.-Johans-Ring 19, CH-4056 Basel (Schweiz)

[**] Erweiterte Fassung eines Vortrags anlässlich der Verleihung des Max-Bergmann-Preises; 3. Max-Bergmann-Konferenz, 7.–9. Oktober 1982, Bozen (Italien).

[¹] Als „künstliche Proteine“ werden hier Polypeptidketten mit einer in der Natur nicht auftretenden Aminosäuresequenz bezeichnet, die zur Faltung in eine *Tertiärstruktur* befähigt sind und damit Protein-typische Merkmale aufweisen. „Künstliche Enzyme“ zeigen darüber hinaus katalytische Aktivität.

blem nur punktuell anhand der Hydrolyseaktivität von „Enzymmodellen“ auf Polymer-, insbesondere Polypeptidbasis beleuchtet wird.

Die Idee, neue Proteine mit maßgeschneiderten funktionellen Eigenschaften zu konstruieren, ist durch die Entwicklung der DNA-Rekombinationstechnik („genetic engineering“) aktuell geworden^[3]. Prinzipiell ist es bereits möglich, jede beliebige Aminosäuresequenz zuverlässig aufzubauen. Durch die praktisch unbegrenzte Zahl von Sequenzpermutationen steht für die Konzeption neuer Proteine ein unermeßliches Potential an struktureller und funktioneller Vielfalt zur Verfügung. Das zu lösende Problem liegt demnach weniger im Aufbau der Primärsequenz als vielmehr im Verständnis des Zustandekommens der räumlichen Struktur von Proteinen. Das „Rätsel Tertiärstruktur“ bildet somit die eigentliche Hürde auf dem Weg zu künstlichen Proteinen. Wenn auch die Entschlüsselung des Faltungscodes bis heute nicht gelungen ist^[4], hat doch die Röntgen-Strukturanalyse wesentliche Einblicke in die Gesetzmäßigkeiten des räumlichen Baus von Proteinen erbracht^[4-6]. In Abschnitt 4 des Fortschrittsberichtes wird nach einer Diskussion dieser Grundlagen eine Strategie zur Herstellung neuer Proteine diskutiert, die auf den heutigen Erkenntnissen über den Zusammenhang zwischen Primär-, Sekundär- und Tertiärstruktur basiert.

2. Müssen Enzyme eine Tertiärstruktur haben?

Ein Blick auf den zum Teil überraschend übersichtlichen und vergleichsweise einfachen Aufbau des aktiven Zentrums von Enzymen^[7-9] legt nahe, daß zur Erreichung Enzym-analoger Funktionen möglicherweise wesentlich einfacher aufgebaute Moleküle entwickelt werden können. Die Bildung eines aktiven Zentrums, bei dem z. B. funktionelle Gruppen in spezifischer Weise durch räumliche Fixierung in Wechselwirkung treten, erscheint prinzipiell nicht an peptidartige Strukturen, d. h. an ein Kettengerüst aus Aminosäurebausteinen, gebunden zu sein. Analog verhält es sich bei weiteren typischen Strukturmerkmalen von Enzymen, z. B. dem hydrophoben Kern innerhalb einer hydrophilen, solubilisierenden Oberfläche (Abb. 1)^[10]. Die

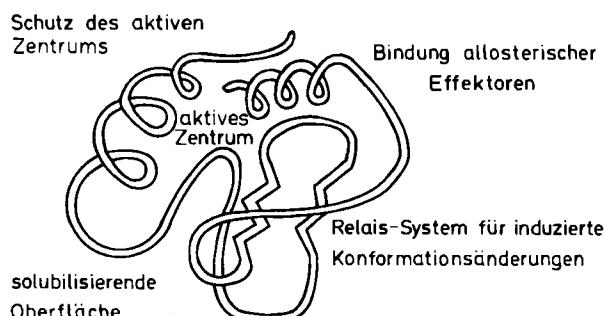
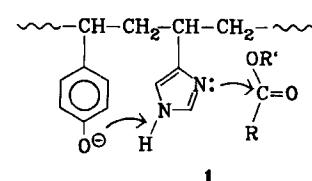


Abb. 1. Allgemeine Struktur- und Funktionsmerkmale von Enzymen: Die Eigenschaften eines Enzyms basieren auf der komplexen dreidimensionalen Struktur, die durch die charakteristische Faltung der Polypeptidkette zu stande kommt.

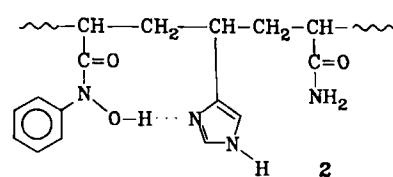
im folgenden beispielhaft ausgewählten Modelle haben das Ziel, diese Merkmale von Enzymen zu imitieren.

2.1. Polymere Katalysatoren als Enzymmodelle

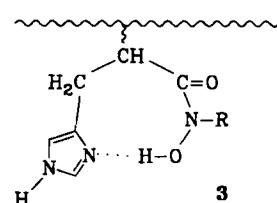
Die mögliche Variationsbreite in der Herstellung, Funktionalisierung und Derivatisierung von synthetischen Polymeren setzt der Phantasie zur Imitation Enzym-spezifischer Eigenschaften praktisch keine Schranken. Die überwiegende Zahl von Arbeiten über polymere Katalysatoren beschäftigt sich mit dem Einfluß hydrophober und kooperativer Effekte auf die katalytische Aktivität von Imidazol als Modell für Histidin-enthaltende Enzyme^[1,2,11-13]. Ein Copolymer 1 aus 4-Vinylimidazol und 4-Vinylphenol beschleunigt z. B. die Hydrolyse von aktiven Estern deutlich stärker als die monomeren Ausgangsverbindungen, was durch einen kooperativen Mechanismus erklärt werden kann^[14,15].



Kooperative Effekte räumlich benachbarter funktioneller Gruppen werden auch in Copolymeren des Typs 2 gefunden, bei denen durch Bildung von Wasserstoffbrücken



(ähnlich wie bei Serin in α -Chymotrypsin) die Nucleophilie der Hydroxamsäuregruppierung erhöht wird^[16,17]. Verbindungen des Typs 2 reagieren nach einem typischen Zweistufenmechanismus, bei dem der Desacylierungsschritt durch die benachbarte Imidazolgruppe um zwei Größenordnungen schneller als bei den Monomeren verläuft. Die katalytische Aktivität läßt sich noch weiter steigern, wenn die kooperativ wechselwirkenden funktionellen Gruppen bereits im Grundbaustein 3 kovalent fixiert sind^[13,18,19]. Allerdings wird die katalytische Aktivität dieser Systeme durch Polymereffekte, die ihre Ursache in konformationell und sterisch bedingten Wechselwirkungen innerhalb des Polymerknäuels haben, zum Teil erheblich herabgesetzt^[11].



Polymere Katalysatoren mit „random-coil“-Struktur weisen infolge der großen Kettenflexibilität eine Zufalls-

orientierung der funktionellen Gruppen auf^[20, 83]. Darüber hinaus ist der strukturelle Aufbau im allgemeinen heterogen, so daß experimentell ermittelte Geschwindigkeitskonstanten häufig nur schwer zu interpretieren sind. Dies gilt besonders für „Enzymmodelle“, die auf einer statistischen Funktionalisierung oder polymeranalogem Derivatisierung von vernetzten oder verzweigten Polymeren (z. B. Polyethylenimin) beruhen^[21–24]. Infolge des komplexen Wechselspiels zwischen Katalysator, Substrat und Lösungsmittel ist eine systematische Untersuchung einzelner, für die Katalyse jeweils entscheidender Parameter nur an Modellen mit definierter Struktur möglich. Diese Voraussetzung ist bei „Single-Center“-Modellen erfüllt^[2, 25, 26, 28] (Abb. 2).

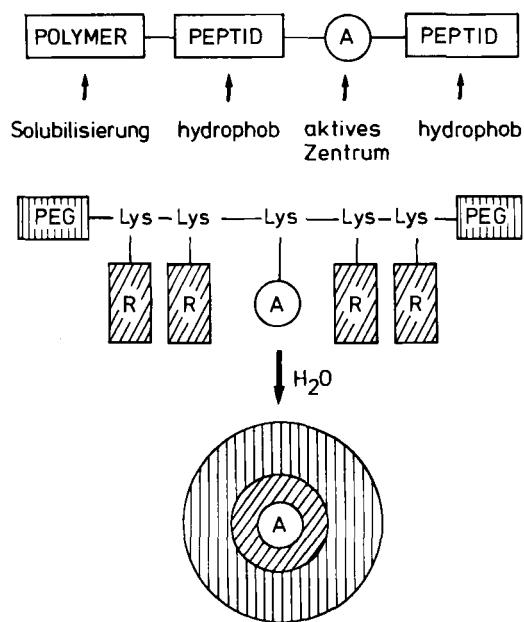


Abb. 2. Single-Center-Modelle zum Studium der enzymatischen Katalyse. Das Peptid (z. B. Oligolysin) mit hydrophober Seitenkette R (z. B. mesogene N^o-Aminoschutzgruppe [28]) wird stufenweise an löslichen Polymeren (z. B. PEG = Polyethylenglycol) synthetisiert, so daß das aktive Zentrum A (z. B. NH₂, Imidazol, Histidin-N-hydroxyamid) gezielt eingebaut werden kann. Im Gegensatz zu polyfunktionellen Modellen hat das Makromolekül nur ein aktives Zentrum in definierter Umgebung. In wäßrigem Medium bilden sich durch Aggregation der Seitenketten micellenartige Strukturen, in denen A sich im hydrophoben Kern befindet und die solubilisierende PEG-Kette die Enzymoberfläche imitiert [25, 26, 28].

Die unterschiedlichen Funktions- und Strukturmerkmale eines Enzyms werden hier durch Verwendung eines Blockcopolymers imitiert: Der Polymerblock dient zur Solubilisierung und ermöglicht zugleich den stufenweisen Aufbau des Peptidblocks^[27, 81, 89], dessen funktionelle und physikochemische Eigenschaften gezielt modifizierbar sind^[26, 28, 161]. An dem in Abbildung 2 dargestellten System läßt sich z. B. durch den micellenartigen Einschluß des aktiven Zentrums in eine hydrophobe Umgebung eine Beschleunigung der Hydrolyse von *p*-Nitrophenyllaurat in der Größenordnung bis zu 10⁴ ermitteln^[26]. Eine Variante dieses Prinzips ist der gezielte Aufbau von Oligopeptidketten in der Seitenkette von polyfunktionellen Trägern^[29, 169, 170] (Abb. 3).

Ein wesentlicher Schritt in Richtung Enzym-ähnlicher Katalyse besteht in der räumlichen Fixierung funktioneller Gruppen durch Versteifung des flexiblen Kettengerüsts. Dazu sind Polypeptidketten aufgrund ihrer Fähigkeit zur Bildung von Wasserstoffbrücken potentiell geeignete Kandidaten. Die Polymerisation von Aminosäuren des aktiven

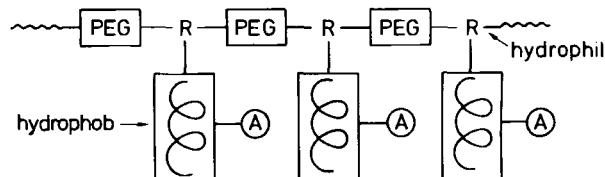


Abb. 3. Polymere Katalysatoren als Enzymmodelle: Oligopeptide mit Tendenz zur Sekundärstrukturbildung werden in der Seitenkette sequenzierter Polyetherblöcke (PEG) aufgebaut. Infolge des amphiphilen Charakters des Makromoleküls können sich in wäßriger Umgebung Cluster-ähnliche Strukturen bilden, wobei sich die aktiven Zentren A in der hydrophoben Peptidschicht befinden [29].

Zentrums von α -Chymotrypsin führt jedoch zu Polypeptiden mit „random-coil“-Struktur und – als Folge davon – zu sehr geringer katalytischer Aktivität^[30–32].

Die Kettenflexibilität kann durch Cyclisierung des Peptids herabgesetzt werden^[53, 149]. Hydrolyseversuche an cyclischen Modellpeptiden des Typs 4, bei denen eine ko-



operative Wechselwirkung zwischen den Seitenketten von Ser und His zu erwarten ist, zeigen jedoch nur geringe Effekte bei der Hydrolyse von *p*-Nitrophenylacetat^[33–35]. Vollkommen neue Möglichkeiten zum Aufbau von Modellen mit enzymatischer Aktivität ergeben sich durch die Synthese von Peptidsequenzen mit Sekundärstruktur: Durch den gezielten Einbau trifunktioneller Aminosäuren in α -Helix- oder β -Struktur-bildende Wirtpeptide können katalytisch aktive Gruppen immobilisiert und spezifisch zueinander orientiert werden^[36–38] (Abb. 4).

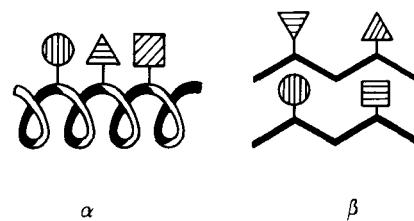
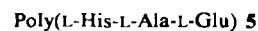
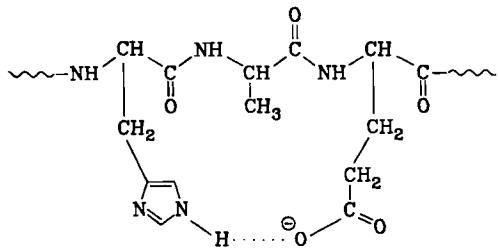


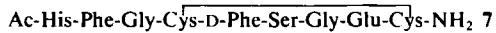
Abb. 4. Sekundärstruktur-bildende Peptide als Enzymmodelle: Durch Bildung von α -Helixstrukturen und antiparallelen β -Strukturen („ β -hairpins“) können gezielt eingegebene funktionelle Gruppen relativ zueinander orientiert werden, so daß sie ähnliche kooperative Effekte wie Enzyme zeigen.

So führt die Bildung einer partiellen α -Helixstruktur im Falle der Sequenz 5 zu einem kooperativen Effekt zwischen His- und Glu-Seitenketten^[37].





Im gleichen Sinne wird die Helixstruktur der Sequenz 6, einem Modell für das aktive Zentrum von α -Chymotrypsin, durch Bildung eines Wasserstoffbrückensystems der Seitenketten von Glu, His und Ser stabilisiert^[39].



Eine originelle Variante ist die aufgrund von CPK-Modellstudien konzipierte Sequenz 7^[40]. Die Orientierung und Fixierung der funktionellen Gruppen wird hier durch einen „ β -turn“, das heißt durch Einbau einer S–S-Brücke, erreicht. Durch starke Wechselwirkung der Phe-Seitenketten wird der hydrophoben Tasche zur Substratbindung Rechnung getragen. Die geringe katalytische Aktivität dieses Modells deutet darauf hin, daß die Bildung eines Wasserstoffbrückensystems kein hinreichendes Kriterium zur Erreichung von Hydrolyseaktivitäten ist, die denen von α -Chymotrypsin ähneln^[41]. Neuere Untersuchungen scheinen diesen Befund zu bestätigen^[42, 43].

2.2. Was können „synthetische Enzyme“ von natürlichen Enzymen lernen?

Die aus der großen Zahl von Enzymmodellen herausgegriffenen Beispiele zeigen, daß synthetische Katalysatoren durchaus „lernfähig“ sind: Enzym-spezifische Eigenschaften wie Reaktionsbeschleunigung durch Kooperativität oder Veränderung der Mikroumgebung aktiver Gruppen, Sättigungskinetik, Substrataffinität und Spezifität lassen sich in bestimmten Grenzen auf funktionelle Polymere und Polypeptide übertragen. Allerdings liegen die gefundenen Effekte um *Größenordnungen* unter denen natürlicher Enzyme. Es ist deshalb fragwürdig, ob Bezeichnungen wie „Enzym-artige Polymere“ oder „synthetische Enzyme“ („Synzymes“) gerechtfertigt sind^[1]. Dagegen ist jede Verbesserung synthetischer Katalysatoren für eine Anwendung in der organischen Synthese von praktischer Relevanz. Obwohl die Ergebnisse noch nicht befriedigen^[1, 2, 44], haben die Studien über die Bedeutung hydrophober und kooperativer Effekte wegweisende Resultate für weitere Untersuchungen gebracht. Die dargestellten Beispiele zeigen aber auch, daß die vereinfachten – reduktionistischen – Modellvorstellungen der enzymatischen Katalyse weit von der Realität entfernt sind. In diesem Sinne ist die Bemerkung von Morawetz^[167], daß synthetische makromolekulare Katalysatoren „keinerlei neue Erkenntnisse für den Enzymchemiker“ gebracht hätten, eine logische Konsequenz und gilt im wesentlichen auch heute noch. Nicht selten ist der Mechanismus der katalytischen Funktion in

Modellsystemen noch undurchschaubarer als im Enzym selbst: Dies gilt vor allem bei polymeren (homogenen wie heterogenen) Katalysatoren mit statistischer Anordnung der aktiven Gruppen^[1, 2, 11, 12].

Enzymatische Katalyse als Ineinandergreifen komplexer Einzeleffekte^[48–52] ist offensichtlich an eine makromolekulare Struktur mit definierter räumlicher Architektur von Kettengerüst und reaktiven Gruppen gebunden. Die Fähigkeit zur spezifischen Faltung in eine starre Gerüstkonformation mit Kristall-ähnlicher Kompaktheit^[19] scheint jedoch ein Privileg von Polypeptidketten zu sein^[10, 20]. Ein *erster Schritt* auf dem Wege zu künstlichen Proteinen und Enzymen muß demnach die Entwicklung von Aminosäuresequenzen sein, die zur Faltung in eine Tertiärstruktur fähig sind. Die geradezu unendliche Vielfalt in den Variationsmöglichkeiten der Primärsequenz spiegelt zugleich die Komplexität und den Schwierigkeitsgrad des Unterfangens wider. Aus diesem Grunde muß zuerst der Frage nachgegangen werden: Wie kommt die Tertiärstruktur von Proteinen zustande?

3. Das Rätsel „Tertiärstruktur“

Die Klärung der Frage des „Warum“ und des „Wie“ der Proteinfaltung ist trotz der enormen Zunahme an Informationen über Faltungsmechanismus, Topologie und Struktur-Aktivitäts-Beziehung bis heute weitgehend unlöst^[4, 5, 46, 47, 163]. Eine übersichtliche Darlegung des Problems der Proteinfaltung ist kürzlich von Jaenike erschienen^[15]. Hier sollen deshalb nur die Probleme diskutiert werden, die für die aktuelle Fragestellung wesentlich sind.

3.1. Warum faltet ein Polypeptid in die Tertiärstruktur?

Die Frage des „Warum“ läßt sich seit *Anfängen* grundlegenden Renaturierungs-Denaturierungs-Studien am Beispiel der Ribonuclease vom Standpunkt der Energiebilanz einer einzelnen Polypeptidkette in einem gegebenen Medium beantworten^[54, 55, 64]. Die Energiebilanz des Gesamtsystems für das thermodynamisch kontrollierte Gleichgewicht zwischen entfalteter (denaturierter) und gefalteter (nativer) Konformation

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S_{\text{SOL}} - T\Delta S_{\text{CH}}$$

erweist sich als Differenz großer Zahlen: Die im denaturierten Zustand überwiegende Kettenentropie ΔS_{CH} muß beim Übergang zur nativen Konformation durch die Summe der Energien der intramolekularen Wechselwirkungen ΔH (Wasserstoffbrücken, van-der-Waals- und Coulomb-Kräfte) und der (positiven) Solvationsentropie ΔS_{SOL} („hydrophobe Wechselwirkung“) kompensiert werden. Eine stabile Tertiärstruktur ist somit ein optimiertes System, in dem die Minimierung hydrophober Kontaktflächen mit dem hydrophilen Lösungsmittel sowie die Optimierung intramolekularer Wechselwirkungen die treibenden Kräfte für die Faltung sind^[55–57]. Die Erreichung einer stabilen Tertiärstruktur in Lösung ist eine spezifische Fähigkeit von Polypeptiden, die neben dem stark eingeschränkten Konformationsraum der einzelnen Aminosäurebausteine^[168] (Verminderung von ΔS_{CH}) durch Bildung

intramolekularer Wasserstoffbrücken strukturstabilisierende Elemente enthalten. Synthetische Polymere mit ihrer überaus großen Kettenflexibilität sind dazu nicht imstande^[20]. Dennoch ist die Fähigkeit einer Polypeptidkette, eine definierte, stabile Tertiärstruktur zu bilden, eher die Ausnahme als die Regel: Von der großen Zahl möglicher Polypeptidketten (eine Peptidkette mit n Aminosäurebausteinen kann in 20ⁿ unterschiedlichen Sequenzen vorliegen) bildet vermutlich nur eine verschwindend kleine Zahl eine stabile Tertiärstruktur (geschätzte Zahl der in der Natur vorkommenden Proteine etwa 10⁹–10¹⁰). Aus diesem Grunde ist es erklärlich, daß die Zufallserzeugung von Primärsequenzen zu Polypeptiden mit „random-coil“-Konformation führt.

3.2. Wie faltet ein Polypeptid in die Tertiärstruktur?

Sämtliche Informationen, die ein Polypeptid zur Faltung in die einzigartige, native Konformation benötigt, sind in der Primärsequenz gespeichert.

Grundsätzlich kann heute als gesichert gelten, daß die native Konformation eine thermodynamisch günstige Konformation mit einem Minimum der freien Energie ist^[9, 55, 58–60]. Nur so ist zu erklären, daß die zu faltenden Polypeptidketten einer Spezies von einer Vielzahl von Startkonformationen in eine einzige, native Konformation finden (eine Peptidkette mit 150 Aminosäuren hat potentiell etwa 10⁴⁵ Konformationen!). Ob es sich dabei um das globale Minimum der multidimensionalen Hyperfläche des Konformationsraums handelt, wird noch diskutiert^[4, 5, 46, 60]. Dennoch sind Versuche, durch empirische Berechnungen der Konformationsenergie die native Konformation aus der Primärsequenz vorauszusagen, bisher am „Multiminima-Problem“ gescheitert^[55, 60–64]: Bei der Minimierung der Konformationsenergie von nur mittelgroßen Peptiden tritt bereits eine Vielzahl lokaler Minima auf^[60, 63], so daß die Chance, das globale oder das energetisch tiefste Minimum zu finden, ohne Vorinformation

(z.B. Startkonformation zur Energieminimierung in der Nähe des globalen Minimums^[60–62]) praktisch aussichtslos ist (Abb. 5).

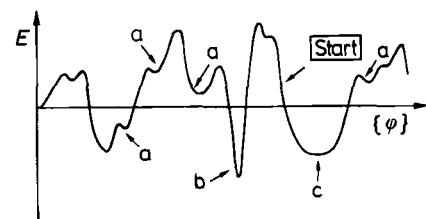


Abb. 5. Multidimensionale Hyperfläche der Konformationsenergie: Bei der Minimierung der Konformationsenergie E (Summe aus van-der-Waals-, Coulomb- und Rotationspotentialtermen [20]) wird eine Vielzahl lokaler Minima (a) gefunden. Dieses „Multiminima-Problem“ verhindert, daß die Konformation des biologisch aktiven Proteins ohne experimentelle Vorinformation (die z.B. zu einer Startkonformation in der Nähe des globalen Minimums (c) führen würde) aus der alleinigen Kenntnis der Aminosäuresequenz berechnet werden kann. Ob sich das native Molekül in einem lokalen (a), im absoluten (b) oder im globalen (c, Einbeziehung der Kettenentropie) Minimum befindet, ist heute noch umstritten [5, 46].

Die heutigen Vorstellungen über den Faltungsmechanismus gehen davon aus, daß das Molekül nicht alle möglichen Faltungswege (und damit alle potentiellen Konformationen) durchläuft (dazu würde eine Peptidkette mit 150 Aminosäureresten ungefähr 10²⁶ Jahre benötigen), sondern daß ein kinetisch gesteuerter, mehrstufiger Faltungsweg durchschritten wird^[4, 6, 46, 65–68] (Abb. 6).

Danach bilden sich in der ersten Stufe eines einkettigen Ein-Domänen-Proteins infolge kurzreichender Wechselwirkungen fluktuierende Nucleationszentren, die im wesentlichen aus α -Helices, β -Strukturen und „ β -bends“ (Faltstellen) bestehen^[6, 69–71]. Es wird vermutet, daß diese Nucleationszentren nicht stationär sind, sondern in raschem Gleichgewicht mit der ungeordneten („random-coil“) Konformation sich entsprechend ihrer Initiierungsenthalpie über die Peptidkette verteilen. Im zweiten Schritt lagern sich Sekundärstrukturblöcke unter dem Einfluß von mittelweit- und weitreichenden Wechselwirkungen zusammen. Schließlich finden in einem langsamen Prozeß unter

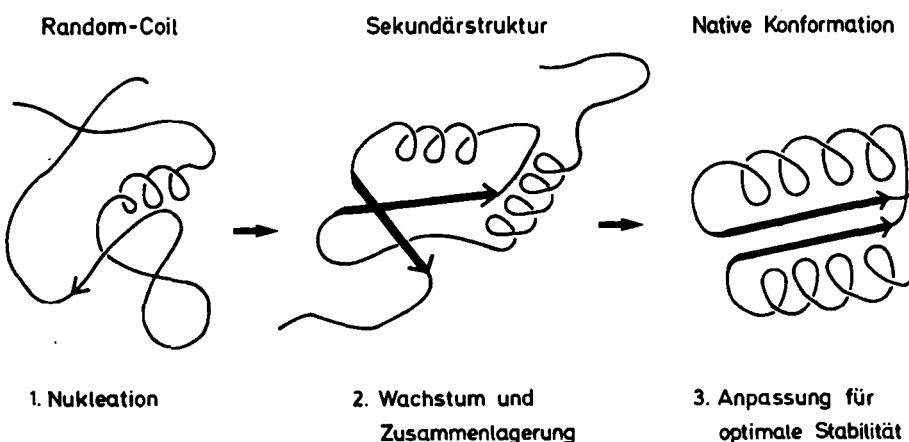


Abb. 6. Hypothetischer Mechanismus der Faltung einer linearen Polypeptidkette in die native Konformation [4, 6, 46]: Die entfaltete, ungeordnete Polypeptidkette („random-coil“) bildet in einem ersten Nucleationsschritt infolge kurzreichender Wechselwirkungen Bereiche mit Sekundärstruktur (insbesondere α -Helices, „ β -hairpins“, „ β -sheets“), die durch Wechselwirkungen mittlerer Reichweite stabilisiert werden und durch Zusammenlagerung die Faltung in eine Tertiärstruktur dirigieren. Die native Konformation ergibt sich unter dem Einfluß weitreichender Wechselwirkungen, wobei infolge optimaler intramolekulärer Anpassung der Seitenketten eine Kristall-ähnliche Dichte des Proteinverbandes zustande kommt.

Optimierung sämtlicher intramolekularen Wechselwirkungen bestimmte Anpassungen („readjustments“) von Seitenketten innerhalb der Molekülkette statt, wobei es auch zur Aufhebung ursprünglich gebildeter Sekundärstrukturbereiche kommen kann^[183]. Der letzte Faltungsschritt besteht schließlich in der Assoziation von Domänen oder Untereinheiten. Die intermediäre Bildung von **Sekundärstrukturen** nimmt eine Schlüsselstellung im Faltungsprozeß ein.

3.3. Die „Anatomie“ der Tertiärstruktur

Die Röntgen-Strukturanalyse einer rasch wachsenden Zahl von Proteinen hat zu dem überraschenden Ergebnis geführt, daß es nur sehr wenige Faltungstopologien gibt. Nach einer umfassenden Studie über Gesetzmäßigkeiten von Proteinstrukturen lassen sich die bisher untersuchten Proteine in wenige Gruppen mit ähnlichem Muster der Tertiärstruktur^[6, 9, 69, 72–74] einteilen. Die Grundlage für eine derartige Proteinklassifizierung bilden strukturelle Ordnungsprinzipien innerhalb des hierarchischen Aufbaus von Proteinen (Abb. 7).

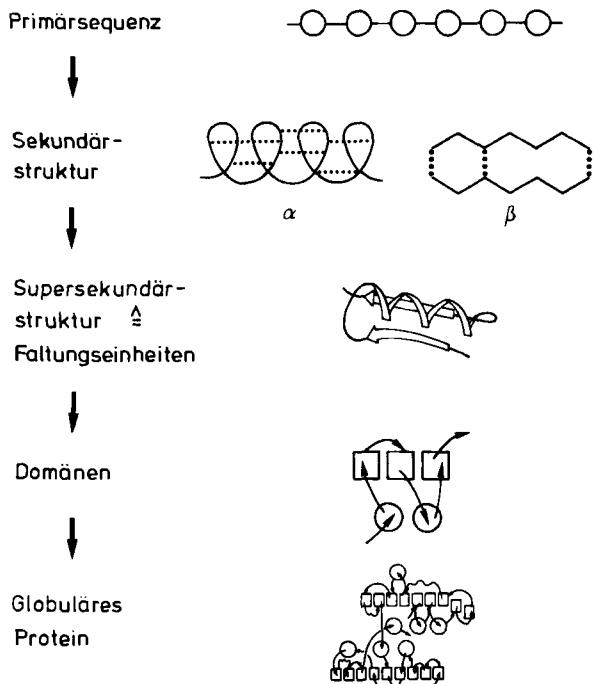


Abb. 7. Hierarchie der Proteintopologie [69, 72]: Sekundärstrukturen wie α -Helices und „ β -sheets“ bilden durch Zusammensetzung über „loops“ charakteristische Supersekundärstrukturen (z. B. „ $\beta\beta$ “-Faltungseinheiten), die als kleinste Bauelemente von Domänen aufzufassen sind. Die globuläre Struktur ergibt sich durch intramolekulare Wechselwirkungen unabhängig faltbarer Domänen.

Faltungseinheiten mit charakteristischer Organisation von Sekundärstrukturblöcken (Supersekundärstrukturen)^[75, 76] scheinen schlechthin das Bauelement von Proteinen zu sein. Die zentrale Bedeutung von Sekundärstrukturblöcken bei der Bildung von Tertiärstrukturen findet letztendlich im Faltungsmechanismus selbst ihre Begründung: Beim Durchschreiten des Faltungsweges sind nur solche intermediären Strukturen für die Kinetik der Proteinfaltung relevant, die hinreichend stabil sind. Energetische Betrachtungen über Initiierung und Wachstum von

Kandidaten für intermediär gebildete Strukturen (α -Helices, „ β -hairpins“, „ β -bends“, hydrophobe Cluster) ergeben, daß insbesondere α -Helices und „ β -hairpins“ als Nucleationszentren für die Faltung in Frage kommen^[71]. Aus diesen Überlegungen läßt sich ableiten, daß

- 1) die in der ersten Stufe der Faltung gebildeten Nucleationszentren für die Topologie und damit den Strukturtyp des Proteins bestimmt sind;
- 2) häufig auftretende – von Primärsequenz und Funktion des Proteins unabhängige – Faltungseinheiten energetisch bevorzugte Strukturtypen sind (Abb. 8).

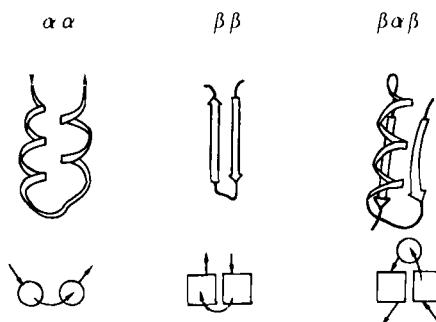


Abb. 8. Faltungseinheiten (Supersekundärstrukturen) als kleinste Bauelemente einer Tertiärstruktur [6, 75, 76]: $\alpha\alpha$: zwei Helixstränge sind über einen „loop“ verbunden; $\beta\beta$: antiparalleles Faltblatt, das über einen „ β -turn“ oder „loop“ zu einem „ β -hairpin“ verknüpft ist; $\beta\alpha\beta$: ein Helixstrang liegt über einem parallel angeordneten „ β -sheet“. Die besondere Stabilität dieser Faltungseinheit kommt durch den amphiphilen Charakter der Sekundärstrukturblöcke zustande, der zu einem hydrophoben Cluster im Innern und zu einer hydrophilen Oberfläche des Moleküls führt.

Unter diesen Aspekten ist es nicht überraschend, daß die Tertiärstruktur von Proteinen in vielen Fällen gegen den Austausch von Aminosäuren weitgehend „immun“ ist^[77, 78]. Dagegen liefert die systematische Veränderung der Primärsequenz im aktiven Zentrum durch Punktmutation einen Einblick in die Struktur-Aktivitäts-Beziehung von Enzymen und ermöglicht eine gezielte Modifizierung spezifischer Eigenschaften („protein engineering“^[79]). Für die Konstruktion von künstlichen Proteinen ist die „Entartung des Faltungscodes“ von entscheidender Bedeutung: Eine gegebene Tertiärstruktur ist nicht an eine spezifische Primärsequenz gebunden. Die Modifizierung oder der vollständige Austausch der Primärsequenz unter Erhaltung der Tertiärstruktur ist somit ein Wegweiser zum Bau künstlicher Proteine.

4. Die Sekundärstruktur als Schlüssel zur Konstruktion neuer Proteine

Eine Bilanz heutiger Kenntnisse über die Tertiärstruktur von Proteinen zeigt, daß eine Entzifferung des Faltungscodes noch in weiter Ferne liegt^[5]. Das Multiminima-Problem und die Komplexität des Faltungsmechanismus scheinen im Augenblick einer voraussetzungslosen Vorher sage der Tertiärstruktur (3°) aus der Primärsequenz (1°) unüberwindbare Schranken zu setzen:

$$1^\circ \not\rightarrow 3^\circ$$

Die Aufklärung des Faltungscodes ist für die Konstruktion neuer Proteine jedoch keine notwendige Voraussetzung. Hier ist die Frage entscheidend: Kann für eine gegebene Tertiärstruktur eine (von vielen potentiell möglichen) codierende Primärsequenz gefunden werden?



4.1. Die Proteintopologie als Ausgangsbasis

Eine Analyse der Proteintopologien und des postulierten Faltungsmechanismus weist auf die zentrale Bedeutung der *Sekundärstruktur* für das Zustandekommen der Tertiärstruktur von Proteinen hin^[69, 72]. Ein Vergleich häufig vorkommender Topologien von Proteinen mit unterschiedlicher Funktion ergibt eine überraschend hohe Übereinstimmung im räumlichen Bau von Faltungseinheiten^[80, 164–166]: Obwohl die in Abbildung 9 dargestellten Fal-

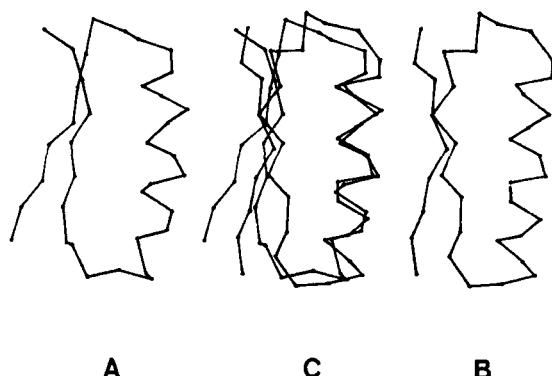
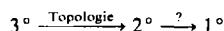


Abb. 9. Vergleich der räumlichen Architektur von „ $\beta\alpha\beta$ “-Faltungseinheiten [80]: Trotz unterschiedlicher Aminosäuresequenz haben die beiden Peptidsegmente (A = 5-Lactat-Dehydrogenase, Sequenz D47-D84; B = 1-Arabinose-Binding-Protein, Sequenz L3-P41) eine charakteristische Faltungseinheit vom Typ „ $\beta\alpha\beta$ “ mit nahezu identischer räumlicher Struktur, wie die Überlagerung der beiden Segmente (C) zeigt.

tungseinheiten vom Typ „ $\beta\alpha\beta$ “ (Abb. 8) keinerlei Übereinstimmung in Funktion und Primärsequenz aufweisen, sind die geometrischen Projektionen^[80] (Länge und Anordnung der Helix- und „ β -sheet“-Blöcke) nahezu deckungsgleich. Die Bildung der gleichen räumlichen Struktur trotz unterschiedlicher Codierung der Peptidkette deutet darauf hin, daß es sich hier um unabhängig faltbare Bereiche im Proteinverband handelt. Diese Supersekundärstrukturen sind demnach die kleinsten in sich faltbaren Polypeptidketten und möglicherweise ein Maß für die „kritische Größe“ zur Erreichung einer Tertiärstruktur. Dennoch sind in der Regel zusätzliche weitreichende Wechselwirkungen zur Stabilisierung der Gesamtstruktur notwendig. Die Ursache liegt in der Labilität der Sekundärstrukturblöcke, welche die Tertiärstruktur konstituieren.

Wie aus Konformationsstudien an Partialsequenzen hervorgeht, zeigen die „isolierten“ Segmente im allgemeinen nicht die im Gesamtproteinverband gefundene Konformation. Häufig wird ein Übergang Sekundärstruktur → „random-coil“-Konformation beobachtet. Auf dem Weg zur Konstruktion einer Tertiärstruktur von minimaler Größe und maximaler Stabilität ist der Entwurf von Peptidseg-

menten mit *stabiler Sekundärstruktur* eine entscheidende Hürde:



4.2. Primärsequenz und Sekundärstruktur

Für die Ermittlung des Zusammenhangs zwischen Primärsequenz und Sekundärstruktur sind systematische Konformationsstudien an Modellpeptiden besonders aufschlußreich. Untersuchungen an monodispersen Homooligopeptiden haben wesentliche Einblicke in Bildung, Stabilität und Sequenzabhängigkeit von Sekundärstrukturen gebracht^[81, 82, 84, 85, 89, 90–95, 106].

4.2.1. Kritische Kettenlängen von α -Helices und β -Strukturen

Beim stufenweisen Aufbau von Helix bildenden Homooligopeptiden findet ein kontinuierlicher Übergang von der ungeordneten („random-coil“) Konformation zur α -Helixstruktur statt, wie durch Messung des Circulardichroismus gezeigt werden kann^[82, 84, 86, 87]. Die kritische Kettenlänge zur Induktion einer Helixstruktur liegt in Helix-fördernden Lösungsmitteln wie Trifluorethanol bei $n=7$ Aminosäureresten; die vollständige Bildung einer Helixstruktur in Lösung wird bei $n \approx 15$ beobachtet (Abb. 10).

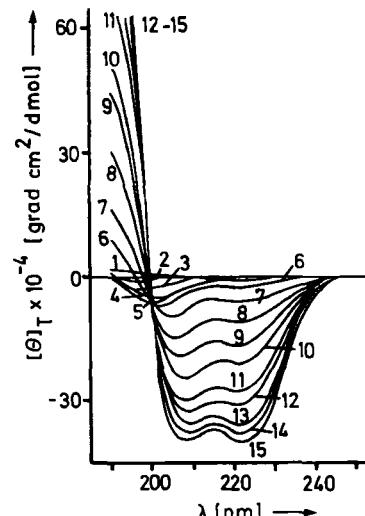


Abb. 10. Kritische Kettenlänge c_n für die α -Helixbildung: Bei Kettenverlängerung geht das Homooligopeptid Boc-(Met)_n-PEG in Trifluorethanol von der ungeordneten Konformation ($n=6$) stufenweise in die α -Helixstruktur über, die bei ca. 15 Aminosäureresten vollständig ausgebildet ist (charakteristische Cotton-Effekte im CD-Spektrum bei $\lambda = 207$ nm und 222 nm) [87].

β -Strukturen bilden sich im allgemeinen bei kürzeren Kettenlängen ($n \approx 6$), wobei der Übergang „random-coil“ → β -Konformation zum Teil sehr scharf ist (Abb. 11)^[88, 96, 125]. Diese experimentellen Befunde reflektieren die unterschiedlichen freien Energien für Initierung und Wachstum von α -Helices und β -Strukturen^[64, 71] und erklären auch den bei der schrittweisen Kettenverlängerung von

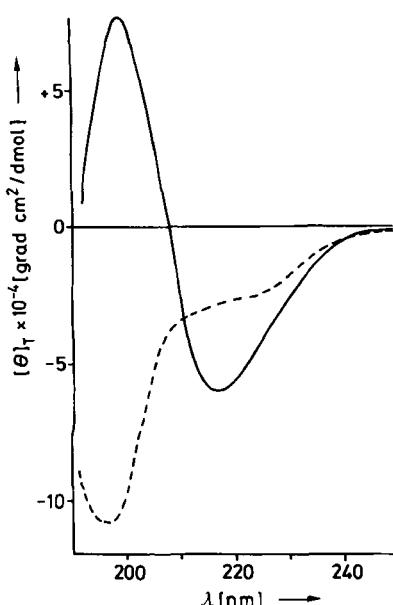


Abb. 11. Kritische Kettenlänge c_n für die Bildung von β -Strukturen: CD-Spektrum von $(\text{Ser-Leu})_4\text{-Gly-PEG}$ (—) und $\text{Leu}-(\text{Ser-Leu})_3\text{-Gly-PEG}$ (---) in H_2O . Das amphiphile Peptid zeigt bei einer Kettenlänge von acht Aminosäureresten einen scharfen Übergang von der ungeordneten Konformation zur β -Struktur (negativer Cotton-Effekt bei $\lambda=218 \text{ nm}$). Die C-terminale PEG-Kette dient zur Solubilisierung des ansonsten schwerlöslichen Peptids [125].

Homooligopeptiden häufig beobachteten Konformationsübergang: „random-coil“ → β -Struktur → α -Helix^[81, 86, 87, 96] (Abb. 12).

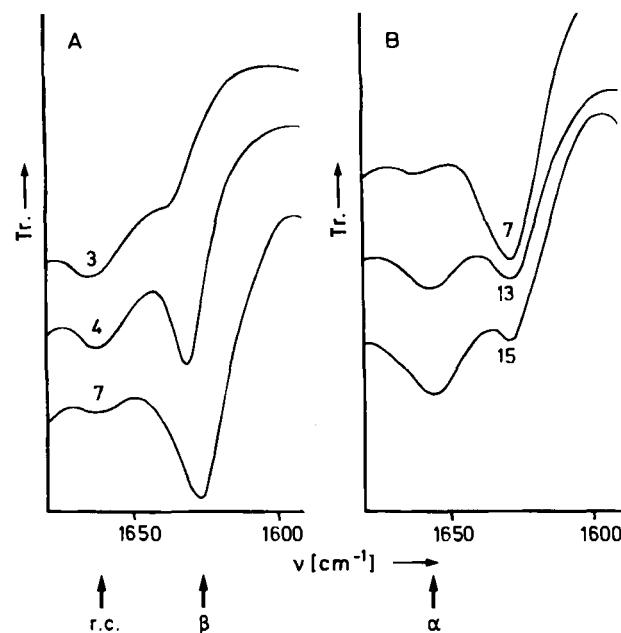


Abb. 12. IR-Spektrum von festem $[\text{Lys}(Z)]_n\text{-PEG}$ [96]. Das Oligopeptid zeigt einen Konformationsübergang vom Typ random-coil (r.c.) → β -Struktur → α -Helix, der sich durch die Amid-I-Absorptionsbande besonders deutlich beobachten lässt. Die für die r.c.-Konformation typische Bande bei $\nu=1656 \text{ cm}^{-1}$ ($n=3, 4$) nimmt bei Kettenverlängerung zugunsten der Bande bei $\nu=1635 \text{ cm}^{-1}$ ($n=7$, β -Struktur) ab (A); der Übergang zur α -Helix zeigt sich durch das erneute Auftreten einer Absorptionsbande bei $\nu=1655 \text{ cm}^{-1}$ ($n=13-15$) (B). Tr. = Durchlässigkeit.

Die kritischen Kettenlängen zur Bildung von α -Helices und β -Strukturen liegen bei *Homooligopeptiden* deutlich

unter denen *sequentieller Peptide*. Interessanterweise stimmen diese kritischen Kettenlängen zur Erreichung stabiler Sekundärstrukturen trotz des Fehlens weitreichender Wechselwirkungen – die im Proteinverband zur Stabilisierung beitragen – mit den in Proteinen häufig beobachteten Längen der Sekundärstrukturblöcke überein^[6, 69]. Damit sind *Homooligopeptide* potentielle Kandidaten für stabile Nucleationszentren bei der Konstruktion von Proteinen.

4.2.2. Zur Stabilität von Sekundärstrukturen

Die Stabilität von Sekundärstrukturen hängt vom Zusammenspiel von kurzreichenden (Seitenkette mit eigenem Kettengerüst) und mittelweit-reichenden (nachbarschafts-abhängigen) Wechselwirkungen innerhalb der Peptidkette ab. Es gilt als gesichert, daß für die Initiierung von α -Helices, β -Strukturen und „ β -hairpins“ kurzreichende Wechselwirkungen bestimend sind^[60, 97, 98]. Dagegen haben Untersuchungen an Wirt-Gast-Peptiden (Abb. 13) gezeigt,

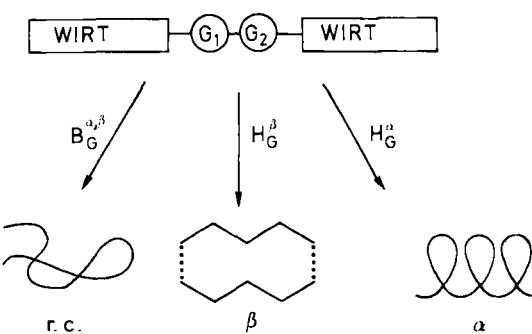


Abb. 13. Wirt-Gast-Modelle zur Untersuchung konformationeller Präferenzen von Aminosäuren und Peptiden [36, 102]. Der Einbau von Gastaminosäuren (G) beeinflußt die Tendenz zur Sekundärstrukturbildung des Wirtpeptids (z.B. Oligo-Ala, -Val, -Met) in charakteristischer Weise: Die Einführung Sekundärstruktur-brechender Aminosäuren (B=Wasserstoffbrücken-Brecher [105]) führt zur random-coil(r.c.)-Konformation. Dagegen bewirkt der Einbau α -Helix- oder β -Struktur-bildender Aminosäuren (H=Wasserstoffbrücken-Bildner [105]) eine Stabilisierung der Sekundärstruktur des Wirt-Gast-Peptids. An diesen Modellpeptiden lassen sich Konformationsparameter einzelner Aminosäuren (und deren Seitenketten-geschützter Derivate) unter verschiedenen experimentellen Bedingungen sowie die Rolle kurz- und mittelweit-reichender Wechselwirkungen beim Zustandekommen von Sekundärstrukturen ermitteln.

dass die Stabilität von β -Strukturen durch Nachbarschaftswechselwirkungen entscheidend beeinflusst wird^[81, 99-101]. Der Einbau von „Gastaminosäuren“ in ein β -Struktur-bildendes Homooligopeptid (Wirt) führt unabhängig von den spezifischen konformationellen Eigenschaften der Gastaminosäure zu einer Destabilisierung der Sekundärstruktur^[36, 81, 102]. Die Stabilität von Sekundärstrukturen wird demnach von der inneren Symmetrie der Peptidseitenketten bestimmt und ist bei *Homooligopeptiden* am größten. Der Einbau von nur einer Gastaminosäure mit voluminöser Seitengruppe (z. B. L-Val) in das Zentrum eines Wirtpeptids (z. B. Oligo-L-Ala) kann zur vollständigen Zerstörung der Sekundärstruktur führen^[36, 102, 103]. Diese nur experimentell zugänglichen Informationen sind von grundlegender Bedeutung für die Konzeption von Sekundärstruktur-bildenden Sequenzen mit funktionellen Eigenschaften.

4.2.3. Zur Vorhersage von Sekundärstrukturen

Die Vorhersage von Sekundärstrukturen bei gegebener Primärsequenz unter Anwendung statistisch ermittelten Konformationsparameter und empirischer Regeln („prediction codes“) gehört heute bereits zu den Standardmethoden bei der Untersuchung konformationsabhängiger Eigenschaften von Peptiden und Proteinen^[104–116]. Die ursprünglich von *Chou* und *Fasman*^[104, 105] in verständlicher – und damit für die Alltagspraxis des Proteinchemikers brauchbarer – Form entwickelten empirischen Vorhersageschemata wurden als Folge des rasch zunehmenden Datenmaterials (aus Röntgen-Strukturanalysen von Proteinen) ständig modifiziert; allerdings scheinen die dadurch erzielten Verbesserungen der Vorhersagegenauigkeit die Zunahme der Komplexität der verschiedenen Vorhersagealgorithmen kaum zu rechtfertigen^[81, 109, 114]. Als symptomatisches Beispiel hierfür kann die statistisch-mechanische Methode von *Scheraga* und *Tanaka* dienen^[107], bei der erstmals nachbarschaftsabhängige Wechselwirkungen in die Computer-unterstützten Berechnungen einbezogen werden. Zwar gelingt es, die α -Helixregion und – mit größerer Unsicherheit – die „ β -sheets“ sowie die „ β -bends“ in Proteinen zu lokalisieren, jedoch bereitet die Festlegung der Endpunkte periodischer Sekundärstrukturen noch erhebliche Schwierigkeiten. Eine entscheidende Verbesserung empirischer Vorhersagealgorithmen ist wegen der in der Methode begründeten Limitierung (keine quantitative Erfassung weitreichender Wechselwirkungen) nicht zu erwarten^[81, 109]. Die Vorhersage von Sekundärstrukturen *kurzkettiger* Peptide bei gegebener Primärsequenz mit diesen statistischen Algorithmen ist wegen der Lösungsmittel- und Endgruppeneinflüsse auf die bevorzugte Lösungskonformation noch erheblich problematischer. Hier liefern die durch das Studium von Modellpeptiden gewonnenen experimentellen Informationen wesentlich zuverlässigere Einblicke in den Zusammenhang zwischen Primärsequenz und Sekundärstruktur^[36, 81]. Empirische Vorhersagemethoden sind demnach für das zu lösende Problem nur von begrenzter Aussagekraft.

4.3. Peptide mit Sekundärstruktur als „Bauelemente“

Für die Konstruktion von künstlichen Proteinen ist die Verfügbarkeit von maßgeschneiderten (Kettenlänge, physikalische Eigenschaften) Oligopeptidblöcken mit stabiler Sekundärstruktur als Bauelemente eine strategische Voraussetzung. Systematische Untersuchungen an Modellpeptiden haben ergeben, daß Homooligopeptide mittlerer Kettenlänge zur Bildung von Sekundärstrukturen neigen. Der jeweils bevorzugte Konformationstyp wird von den Seitenketten determiniert. Während die hydrophoben aliphatischen Aminosäuren in der Reihe Ala < Leu < Val < Ile bereits bei Kettenlängen von $n=6$ –8 zu stabilen β -Strukturen führen, liegen die Werte für die Helixbildung vor allem in wäßrigen Systemen erheblich höher. Zur Regulation der Helixblocklänge bietet sich hier ein Kunstgriff an: Der Einbau einer stark Helix-induzierenden Aminosäure wie α -Aminoisobuttersäure (Aib) verringert die kritische Kettenlänge für die Helixbildung je nach eingebautem Anteil auf das gewünschte Maß^[117–121]. Bereits Pentapeptide, die Aib enthalten, können Helixstruktur aufweisen^[122].

Amphiphile Sekundärstruktur-bildende Peptidblöcke spielen als treibende Kraft zur Faltung einer linearen Polypeptidkette in eine Tertiärstruktur eine entscheidende Rolle. Durch alternierende Anordnung hydrophober und hydrophiler Aminosäurereste in der Primärsequenz lassen sich Schichtstrukturen erhalten^[123–125], die sich durch Bildung hydrophober „Cluster“ (unter Freiwerden der Solvationsentropie ΔS_{SOL}) auszeichnen (Abb. 14). Interessan-

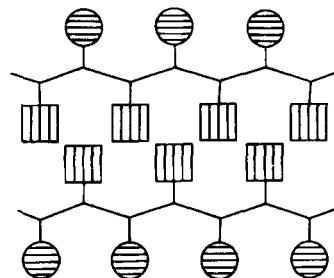


Abb. 14. Bildung hydrophober Cluster durch Entstehung von Schichtstrukturen in amphiphilen Peptiden [123, 125]. Der repetitive Aufbau führt bei Bildung von „ β -sheets“ (vgl. Abb. 11) zu einer Konformation, bei der sich die hydrophoben (■) und hydrophilen (□) Seitenketten auf unterschiedlichen Seiten des Peptidgerüsts orientieren.

terweise liegen die kritischen Kettenlängen für die Bildung amphiphiler β -Strukturen in der gleichen Größenordnung wie bei Homooligopeptiden^[125]: Die Sequenz (Ser-Leu)_n zeigt z. B. bereits bei $n=4$ eine vollständig ausgebildete β -Struktur in Wasser (vgl. Abb. 11). In ähnlicher Weise lassen sich durch repetitiven Einbau hydrophiler Aminosäu-

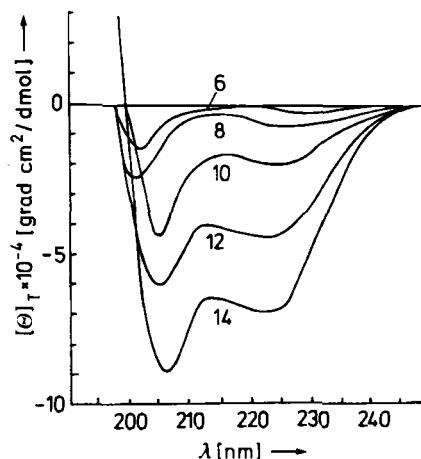


Abb. 15. Kritische Kettenlänge c_n für die Bildung amphiphiler Helices: CD-Spektrum von (Ala-Aib-Glu-Glu)_m-PEG in H₂O [127]. Der Übergang von einer ungeordneten (random-coil) Konformation zu einer helicalen Struktur findet bei ca. zehn Aminosäureresten statt. Die amphiphile Helix, bei der die hydrophilen (Glu) und hydrophoben (Ala, Aib) Aminosäurereste auf unterschiedlichen Seiten des Helixzyinders liegen, ist bei einer Kettenlänge von $n \approx 14$ voll ausgebildet.

ren (Glu, Gln, Lys) in hydrophobe Grundstrukturen amphiphile Helices erzeugen^[126, 127]. Für die Sequenz (Ala-Aib-Glu-Glu)_m wird ähnlich wie bei Homooligopeptiden ein kontinuierlicher Übergang zur Helixstruktur gefunden^[127] (Abb. 15).

Das Zustandekommen hydrophober Wechselwirkungen entlang der Helixachse scheint allgemein eine entscheidende Triebfeder zur Helixbildung zu sein. Auf dem Konzept der Ermittlung amphiphiler Strukturen entlang der Peptidkette basiert demnach eine Vorhersagemethode („helical wheel“) für α -Helices^[108, 115].

Als Nucleationszentren spielen „ β -turns“ („ β -bends“) eine herausragende Rolle; ihre Entstehung läßt sich auf kurzreichende Wechselwirkungen zurückführen, die sich in unterschiedlichen Codierungstendenzen zur „ β -turn“-Bildung einzelner Aminosäuren ausdrückt. Zur Vorhersage von „ β -turns“ können empirische^[128, 129] und experimentell^[130–132] ermittelte Parameter herangezogen werden. Die ausgewählten Beispiele zeigen, daß Konzeption und Synthese von Sekundärstruktur-bildenden Peptidblöcken mit maßgeschneiderten strukturellen, konformativen und physikochemischen Eigenschaften bereits heute prinzipiell realisierbar sind.

4.4. Von der Sekundärstruktur zur Tertiärstruktur

Die Analyse der Topologie, des Faltungsmechanismus und des Zusammenhangs zwischen Primär- und Sekundärstruktur bildet die Grundlage für eine allgemeine Strategie zur Konstruktion von Polypeptidketten, die zur Faltung in eine Tertiärstruktur befähigt sind (Abb. 16): Ausgangspunkt für die Konzeption einer Tertiärstruktur sind maßgeschneiderte Oligopeptide mit Sekundärstruktur, die als stabile Nucleationszentren die Topologie des Kettengerüsts bestimmen. Als „Bauplan“ für die dreidimensionale Architektur dienen die Gesetzmäßigkeiten in der Faltungs-

topologie natürlicher Proteine, wobei häufig beobachtete Faltungseinheiten als kleinste Domänen eines künstlichen Proteins zu betrachten sind (Abb. 7, 8). Die Primärsequenz wird unter dem Aspekt der

- maximalen Stabilität der Sekundärstrukturblöcke (Homooligopeptide) sowie der
- optimalen Energie der intramolekularen Wechselwirkung im gefalteten Polypeptid (amphiphile Sequenzen)

konzipiert. In die für die Gesamtstabilität weniger relevanten „loops“ werden vorteilhaft hydrophile Aminosäuren eingesetzt.

Funktionelle Aminosäuren oder aktive Zentren müssen so in das Gerüst des Wirtpeptids eingebaut werden, daß die Stabilität der Tertiärstruktur nicht beeinträchtigt wird. Nach bisherigen experimentellen Befunden^[36] ist folgende Priorität zu wählen: „loops“ > α -Helix > „ β -sheets“. Zur Stabilisierung der Tertiärstruktur kann die Primärsequenz modifiziert werden (z. B. durch S–S-Brücken, Coulomb-Kontakte, Komplexbildung). Diese Manipulationen lassen sich durch Computer-unterstützte Strukturmodellierung („Molecular Modeling“) in Verbindung mit Berechnungen der Konformationsenergie effizient steuern (siehe z. B. Abb. 19).

Das vorliegende Konzept zur Konstruktion von faltbaren Polypeptidketten lehnt sich eng an die heutigen Vorstellungen des Faltungsmechanismus von Proteinen an: Die Tertiärstruktur kommt durch Zusammenlagerung „starrer“ Sekundärstrukturblöcke im Sinne einer intramolekularen Aggregation zustande. Die Strategie unterscheidet sich damit grundlegend von der Konzeption, eine gege-

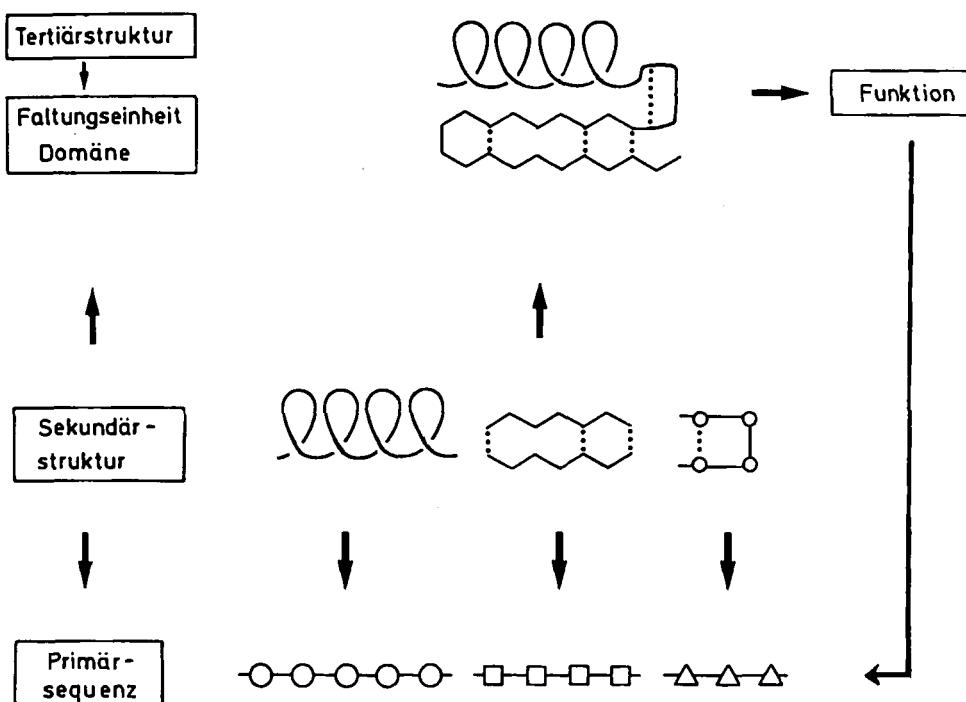


Abb. 16. Allgemeine Strategie zur Konstruktion von Polypeptiden mit Tertiärstruktur: Sekundärstrukturblöcke („stabile Nucleationszentren“) werden zu charakteristischen Faltungseinheiten und Domänen zusammengelagert. Die Primärsequenz wird so gewählt, daß die Peptidsegmente maximale Stabilität der Sekundärstruktur (Helix, „ β -sheet“, „ β -turn“) aufweisen (z. B. Homo- oder Cooligopeptide) und beim Faltungsprozeß zu einer optimalen intramolekularen Wechselwirkung der Seitenketten führen. Beim gezielten Einbau funktioneller Gruppen oder aktiver Zentren in die Primärsequenz muß die Gesamtstabilität der dreidimensionalen Struktur erhalten bleiben; die dazu erforderlichen Sequenzmanipulationen können durch „Molecular Modeling“ gesteuert werden [80].

bene Primärsequenz von Proteinen durch Austausch von Aminosäuren unter Erhaltung der Sekundär- und der Tertiärstruktur zu verändern^[79, 150]. Die „Modellierung“ von Peptiden und Proteinen mit dem Ziel der Veränderung physikochemischer oder funktioneller Eigenschaften kann jedoch durchaus als spezieller Test für die hier entwickelte allgemeine Strategie zum Bau künstlicher Proteine angesehen werden.

4.5. Energiebilanz von Modellproteinen

Der Faltungsmechanismus von Modellproteinen (z. B. $\beta\beta\beta$ -Einheit) kann als zweistufiger Prozeß aufgefaßt werden (Abb. 17): I) Bildung der Sekundärstruktur, II) Faltung in die Tertiärstruktur.

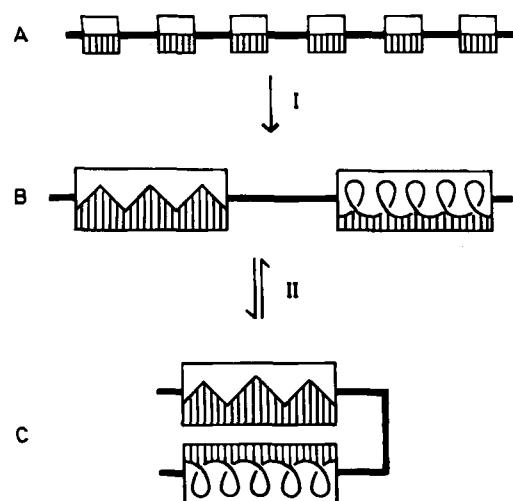


Abb. 17. Faltungsschema von künstlichen Proteinen: Der erste Nucleationsschritt (I) führt hier im Gegensatz zum Faltungsprozeß natürlicher Proteine von einer ungeordneten Konformation (A) zu stabilen Sekundärstrukturen als Nucleationszentren (B) und legt damit den weiteren Faltungsweg sowie die Gesamttopologie des Moleküls fest. Treibende Kraft für die Faltung (II) in eine stabile Tertiärstruktur (C) ist die Bildung hydrophober Cluster im Inneren des Polypeptids (Freisetzung der Solvationsentropie) infolge der amphiphilen Natur der Sekundärstrukturblöcke. Hierbei versucht das Molekül, seine hydrophoben Kontaktflächen zum Lösungsmittel (H_2O) zu minimieren.

Anders als bei natürlichen Proteinen (fluktuierende Sekundärstruktur) liegt das Gleichgewicht des ersten Faltungsschrittes praktisch vollständig auf der Seite der thermodynamisch stabilen Sekundärstruktur. Durch die „Versteifung“ der Peptidkette (Einschränkung des Konformationsraums) liefert dieser schnelle Nucleationsschritt den entscheidenden Energiebeitrag für die Bildung einer Tertiärstruktur und dirigiert den weiteren Faltungsweg. Treibende Kraft für die Faltung in eine Tertiärstruktur (zweiter Schritt) sind hydrophobe Wechselwirkungen infolge des amphiphilen Charakters der Sekundärstrukturblöcke. Bei natürlichen Proteinen muß der hohe Verlust der Kettenentropie im Faltungsschritt durch optimale intramolekulare Wechselwirkungen und einen hohen Gewinn an Solvationsentropie (freiwerdendes Lösungsmittel) kompensiert werden. Bei Modellproteinen mit stabiler Sekundärstruktur dagegen genügt bereits ein wesentlich geringerer Energiebeitrag, um den viel kleineren Verlust an Kettenentropie nach dem ersten Nucleationsschritt zu überwinden (ΔG = Differenz kleiner Zahlen). Die bei na-

türlichen Proteinen zur Stabilisierung der Sekundärstrukturblöcke entscheidenden weitreichenden Wechselwirkungen erklären, daß bei „Isolierung“ dieser Segmente in der Regel ein Übergang zur ungeordneten Konformation stattfindet. Durch Vergleich der Energiebilanzen kann man jedoch ableiten, daß künstliche Proteine infolge der größeren Stabilität der Sekundärstrukturelemente eine *stabilere* Tertiärstruktur haben sollten.

Dagegen muß offen bleiben, welche kritische Kettenlänge zur Erreichung einer Tertiärstruktur notwendig ist. Experimentelle Befunde an enzymatisch gespaltenen Proteinen deuten auf eine Mindestlänge von ca. 40 Aminosäureresten hin^[133–135]. Diese Größenordnung liegt interessanterweise im Bereich von $\beta\beta\beta$ -Faltungseinheiten.

4.6. Synthese von Peptiden

Die chemische Synthese von längeren Peptidketten ist trotz beachtlicher Fortschritte in der Strategie der Aufbauprinzipien sowie in der Schutzgruppentechnik auch heute noch eines der zentralen Probleme der Peptidchemie^[136–139, 180]. Die Entwicklung der DNA-Rekombinationstechnik eröffnet für den Bau neuer Peptide und Proteine langfristig gesehen vollkommen neue Möglichkeiten^[3, 140]. Das bei der chemischen Peptidsynthese bis heute unerreichte Ziel, Peptide und Proteine mit beliebiger Kettenlänge und Primärsequenz zuverlässig aufzubauen, ist durch diese Entwicklung realisierbar geworden. Die Synthese von Proteinen gehört somit für die Zukunft eindeutig zur Domäne des „genetic engineering“. Jedoch eröffnet gerade die Kombination von biotechnologischer und chemischer Synthesestrategie neue Perspektiven für die Modifizierung und die Konstruktion von künstlichen Proteinen. Der besondere Vorteil dieser Strategie liegt darin, daß das gesamte Potential der chemischen Peptidsynthese zur funktionellen und strukturellen Modifizierung von Peptidsequenzen – z. B. zum Einbau von unnatürlichen oder von D-Aminosäuren – ausgenutzt werden kann. Hier kommt der Semisynthese, bei der natürliche und synthetisch hergestellte Segmente enzymatisch verknüpft werden, in Zukunft große Bedeutung zu^[141–143, 155].

Faltungseinheiten mit Kettenlängen von ca. 30–40 Aminosäureresten scheinen derzeit die Grenze der chemischen Peptidsynthese zu bilden, wenn Effizienz und Zuverlässigkeit berücksichtigt werden; dieses Ziel ist nur zu erreichen, wenn das gesamte Potential heutiger Synthesestrategien ausgeschöpft wird: Durch die in jüngerer Zeit erreichten methodischen Verbesserungen der Schutzgruppenstrategie^[172, 173], der Verankerungstechnik^[138, 139, 173–175, 181] und der Trägereigenschaften^[138, 173, 176, 177] kommt der stufenweisen Peptidsynthese an polymeren Trägern wieder steigende Bedeutung zu. Insbesondere hat die Entwicklung effizienter Trennverfahren – allen voran die präparative Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) – zu einem entscheidenden Durchbruch der Festphasensynthese geführt: Mittelgroße Peptide bis zu etwa 20 Aminosäureresten lassen sich durch die HPLC-Technik zuverlässig reinigen^[172, 178]. Dagegen erscheint die Totalsynthese höherer Peptide an polymeren Trägern weiterhin problematisch; häufig lassen sich auf diesem Wege jedoch wertvolle Vorinformationen über physikochemische und strukturelle Eigenschaften des Zielpeptids gewinnen. Zum Aufbau von

längerkettigen Peptiden könnte die Kombination von stufenweiser Trägersynthese und anschließender Segmentkondensation in Lösung oder am polymeren Träger zur Methode der Wahl werden. Um die Entstehung von Fehlpeptiden zu vermeiden^[171], die im Falle amphiphiler Peptidsequenzen mit alternierender Aminosäuresequenz zur drastischen Destabilisierung der Überstruktur führt, ist die Kupplung von Dipeptiden beim stufenweisen Aufbau besonders vorteilhaft.

Bei der Synthese von Faltungseinheiten bietet die Verwendung löslicher polymerer Träger^[27, 138] besondere Vorteile: Hier kann die bevorzugte Konformation der solubilisierten Peptidkette in jeder Synthesestufe durch spektroskopische Methoden ermittelt werden^[89, 179, 182]. Die zum Aufbau von Faltungseinheiten eingesetzten Peptidsegmente mit Sekundärstruktur lassen sich auf diese Weise vor der Fragmentkondensation strukturell und konformativ charakterisieren.

Infolge des engen Zusammenhangs zwischen Konformation und physikochemischen Eigenschaften von Peptiden^[144–148, 162] fordert der Aufbau von Sekundärstrukturbildenden Oligopeptiden den Synthetiker besonders heraus. Dabei ist die Schwerlöslichkeit einzelner Segmente ein limitierendes Problem: Die Bildung intermolekular assoziierter „β-sheets“ führt zur Aggregation und damit zur Unlöslichkeit hydrophober und latent amphiphiler Peptidketten (Abb. 18)^[26, 148]. Dieses Minimum der Löslichkeit bei

derartige Konformationsübergänge von erheblicher Relevanz: So kann z. B. durch Aufbau des β-Struktur-bildenden Peptidblocks an Polyethylenglycolen^[27, 138] und anschließende Verknüpfung des gut löslichen Helixsegments das Löslichkeitsproblem teilweise umgangen werden. Eine vielversprechende, in der praktischen Durchführung noch unausgereifte Variante ist die enzymatische Verknüpfung von ungeschützten (und damit gut löslichen) Segmenten.

Neben der üblichen analytischen Charakterisierung der Primärsequenz (Reinheitskriterien) ist die Identifizierung der Tertiärstruktur ein spezifisches Problem, zumal biologische Aktivitätstests als Beweis für Reinheit und Struktur entfallen. Da eine Röntgen-Strukturanalyse nur in Ausnahmefällen möglich sein dürfte, müssen möglichst viele spektroskopische (insbesondere CD, IR, NMR, Fluoreszenz), chemische (z. B. katalytische Effekte, Komplexbildung), physikochemische (z. B. Aggregationsverhalten, Lichtstreuung, Kerr-Effekt) und gegebenenfalls biochemische Methoden zur Charakterisierung der räumlichen Struktur herangezogen werden. Ein weiterer Gesichtspunkt verdient Beachtung: Die Faltung in die Tertiärstruktur verläuft nur unter jeweils spezifischen Bedingungen spontan^[10]. Neben Konzeption und Synthese der Primärsequenz nimmt demnach das Studium der optimalen Faltungsbedingungen eine wichtige Stellung ein.

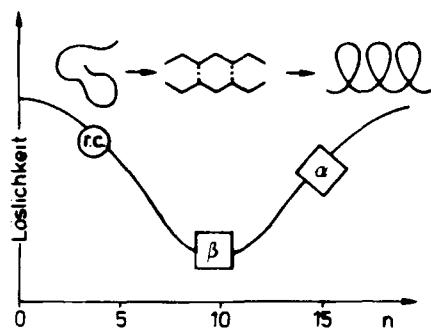


Abb. 18. Zusammenhang zwischen Konformation und physikochemischen Eigenschaften von Peptiden: Der bei Kettenverlängerung eines Peptids (z. B. Oligo-Lys(Z), -Glu(BzL), -Leu) häufig beobachtete Übergang von der ungeordneten (r.c.) Konformation in die β-Struktur ist von einer drastischen Löslichkeitsabnahme des Peptids begleitet und erklärt die Schwerlöslichkeit mittelgroßer Peptidsegmente. Bei Erreichung der kritischen Kettenlänge für die α-Helix nimmt die Löslichkeit infolge der Bildung intramolekularer Wasserstoffbrücken wieder zu. Dieser enge Zusammenhang zwischen bevorzugter Konformation und Eigenschaften des Peptids wie Löslichkeitsverhalten, Aggregationstendenz oder Reaktivität ist für die Synthese höherer Peptide von grundsätzlicher Bedeutung [144, 145, 162].

mittelgroßen Peptiden kann bei weiterer Kettenverlängerung infolge einer zunehmenden Tendenz des Peptids zu intramolekularen Wechselwirkungen (Übergang zur Helixstruktur oder zur Faltung) überwunden werden^[81, 144, 145]. Für die Strategie des Aufbaus von Faltungseinheiten sind

4.7. Der aktuelle Stand bei der Konstruktion künstlicher Proteine

Nachdem der in diesem Fortschrittsbericht dargelegte Zusammenhang zwischen Primärsequenz und Sekundärstruktur von Peptiden über viele Jahre im Mittelpunkt experimenteller und theoretischer Untersuchungen stand, scheint die Zeit für einen ebenso schwierigen wie faszinierenden Schritt gekommen zu sein: den Übergang von der Sekundär- zur Tertiärstruktur. Die augenblickliche Situation ist durch rege Aktivitäten im Grenzbereich zwischen Sekundär- und Tertiärstruktur gekennzeichnet: Hier bilden Versuche zur „Modellierung“ der Sekundärstruktur in biologisch aktiven Peptiden und Proteinen eine erste wichtige Stufe. Der Ersatz von Helix-bildenden Sequenzen in mittelgroßen Peptiden und Peptidhormonen durch amphiphile Modellpeptide mit stabiler Sekundärstruktur hat bereits zu interessanten Resultaten geführt, z. B. zur Modifizierung der biologischen Aktivität bei der Substrat-Rezeptor-Bindung^[150, 151]. Am Beispiel des Ribonuclease-S-Peptids konnte gezeigt werden, daß beim Ersatz eines Sekundärstrukturblocks durch ein Modellpeptid die biologische Funktion weitgehend erhalten bleibt^[152]. Auf der Grundlage empirischer Konformationsvorhersagen gelang der Entwurf eines Modellpeptids, das zur DNA-Wechselwirkung fähig ist^[153, 154]. Wir befassen uns derzeit mit der „Modellierung“ von Domänen natürlicher Proteine und Enzyme sowie mit der Synthese von Faltungseinheiten mit neuartigen katalytischen und funktionellen Eigenschaften. In der βαβ-Faltungseinheit der Thioredoxinsequenz 22–58 wurden z. B. sämtliche Sekundärstrukturblocks (α-Helix 36–50, „β-sheets“ 22–29 und 53–58) durch einfache Modellsequenzen unter Erhaltung des aktiven Zentrums (Cys³²-Gly-Pro-Cys³⁵) ausgetauscht; weitere kleine Ände-

rungen sind ohne Belang (Abb. 19). Spektroskopische Daten deuten darauf hin, daß die Tertiärstruktur von Modellsequenz und natürlicher Sequenz (als isolierte Struktureinheit und im Gesamtproteinverband) übereinstimmen^[127].

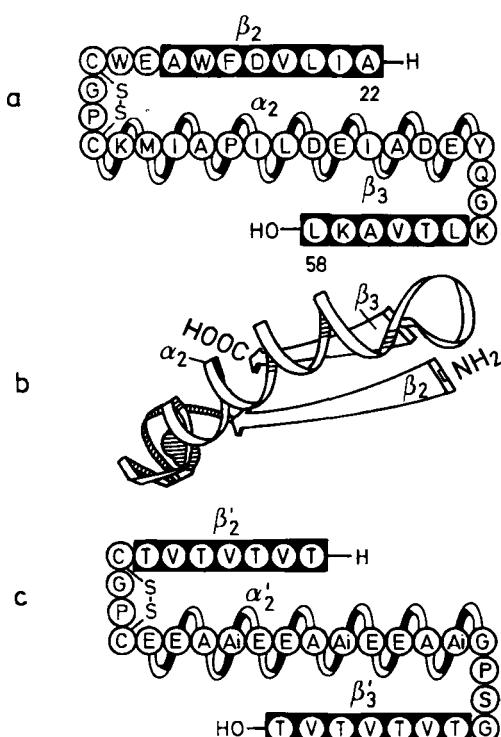


Abb. 19. „Modellierung“ der Partialsequenz 22–58 von Thioredoxin. Die natürliche Aminosäuresequenz (a) wird unter Erhaltung des aktiven Zentrums Cys¹²-Gly-Pro-Cys³⁵ durch eine amphiphile Modellhelix (Glu-Glu-Ala-Alb), (α_2) und durch zwei amphiphile β -Strukturböcke mit der Sequenz (Thr-Val)-Thr (β_2' und β_3') ersetzt (c). Die räumliche Struktur dieser Partialsequenz entspricht einer $\beta\alpha\beta$ -Faltungseinheit (b) und bleibt trotz der drastischen Modifizierungen der Primärsequenz auch im Modellpeptid erhalten [127].

Trotz dieser ermutigenden Ansätze zur Konstruktion von künstlichen Proteinen sind noch viele Fragen offen. So liegt z. B. das Problem der Aggregation von Polypeptidketten als Konkurrenzvorgang zur intramolekularen Faltung noch weitgehend im Dunkeln. Es läßt sich zeigen, daß die als Bauelemente verwendeten amphiphilen Helix- und β -Struktur-Blöcke in wäßrigen Systemen zur Aggregation neigen^[26, 148]. Diese Aggregationstendenz amphiphiler Sekundärstrukturen bildet die Triebfeder für die intramolekulare Faltung. Vorläufige Versuche am Beispiel von $\beta\alpha\beta$ -Faltungseinheiten scheinen diese These zu bestätigen.

5. Schlußbemerkungen

Albert Einsteins Bekenntnis „Die Religiosität des Forschers liegt im verzückten Staunen über die Harmonie der Naturgesetzmäßigkeit, in der sich eine so überlegene Vernunft offenbart, daß alles Sinnvolle menschlichen Denkens und Anordnens dagegen ein gänzlich nichtiger Abglanz ist“^[156] könnte man als Leitmotiv für die im vorliegenden Bericht skizzierte Situation wählen: Zum einen stehen wir beim Versuch, neue Proteine zu konstruieren, „staunend“ vor dem Rätsel der Tertiärstruktur von Prote-

inen, zum anderen erscheinen die bis heute synthetisierten Enzymmodelle als „nichtiger Abglanz“ der Wirklichkeit. In diesem Sinne mag der Versuch zur Konstruktion neuer Proteine als gewaltiger *interdisziplinärer Lernprozeß* aufgefaßt werden (Abb. 20), bei dem der Lehrplan durch das Studium der Enzyme selbst gegeben ist: „The molecule knows, how to fold, so we may learn, how it does it“^[157].

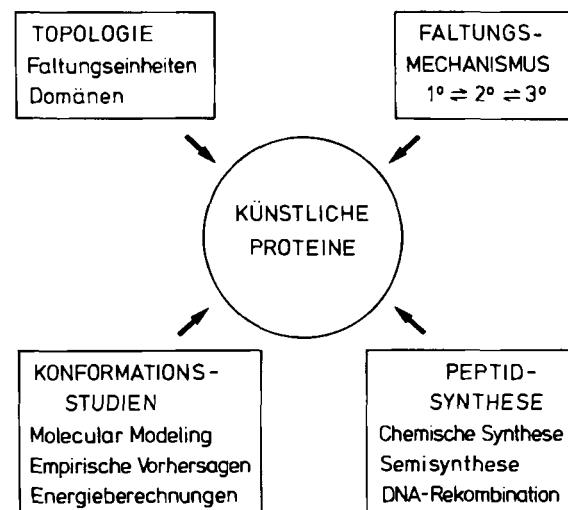


Abb. 20. Der Bau künstlicher Proteine als interdisziplinäre Aufgabe. Ausgangspunkt für den Bau künstlicher Proteine bilden die experimentellen Belege über die *Topologie* (aus Röntgen-Strukturanalysen) und den *Faltungsmechanismus* (aus Denaturierungs-Renaturierungs-Studien) natürlicher Proteine. Experimentelle *Konformationsuntersuchungen* an Modellpeptiden liefern die Grundlage für den Entwurf von Peptidsequenzen mit maßgeschneiderten konformationellen und physikochemischen Eigenschaften, wobei auch theoretische Studien vorteilhaft herangezogen werden können. Schließlich ist die *Synthesemöglichkeit* beliebiger Aminosäuresequenzen Voraussetzung für die Realisierung der Gesamtkonzeption. Hierbei kommt der Kombination chemischer und biotechnologischer Synthesestrategien wachsende Bedeutung zu. Einen Zugang zu neuen Proteinen zu schaffen ist somit gleichermaßen eine Herausforderung für den Konformationsanalytiker, den Biochemiker, den Biotechnologen und nicht zuletzt für den Peptidsynthetiker.

Die hier entwickelte allgemeine Strategie benutzt die Methode der *Deduktion*^[158]. Aus der – von der Natur entliehenen – „Idee der Tertiärstruktur“^[184] wird eine Primärsequenz stufenweise abgeleitet. Nach Popper^[159] sind Erfolg („Verifikation“) und Mißerfolg („Falsifikation“) beim Bau neuer Proteine „Bewährungskriterien“ für unsere Vorstellungen („Theorie“) über das Zustandekommen der Tertiärstruktur.

Wie so oft in der Forschung wächst die Palette potentieller Anwendungen schneller als die grundlegenden Zielvorstellungen realisiert werden können:

- maßgeschneiderte Katalysatoren
- immunologische und biochemische Anwendungen und nicht zuletzt
- Aufklärung des Faltungscodes

sind Erwartungen, die mit der Synthese künstlicher Proteine verknüpft werden. In Anbetracht der Komplexität des zu lösenden Problems wird hier – zumindest was die zeitliche Entwicklung betrifft – sokratische Bescheidenheit angebracht sein. Der Bau künstlicher Proteine ist so gesehen eine *Zukunftsperspektive*.

Die eigentliche Faszination für den Peptidchemiker liegt dabei in der Einbeziehung einer neuen Dimension – der dreidimensionalen Architektur von Polypeptiden – in die Syntheseplanung. Damit wird möglicherweise eine im holistischen Sinne „neue Qualität“ synthetischer Makromoleküle erschlossen, die sich in der enzymatischen Katalyse offenbart und in Umrissen an Modellen für synthetische Enzyme erkennbar ist.

Nach diesem Blick in die Zukunft soll abschließend ein Blick in die Vergangenheit geworfen werden: Wie sind Proteine entstanden? Aufgrund experimenteller Ergebnisse ist es denkbar, daß infolge kooperativer Effekte die Entstehung von Homooligopeptiden mit Sekundärstruktur begünstigt war und daß durch Zusammenlagerung dieser Blöcke im Sinne des Faltungsmechanismus von Proteinen einfache Formen der Tertiärstruktur („Proteinoide“) entstanden, die durch Einlagerung von „Gastaminosäuren“ unter Erhaltung der dreidimensionalen Struktur „funktionalisiert“ und damit schrittweise zur katalytischen Aktivität fähig wurden („structure before function“, Abb. 21).

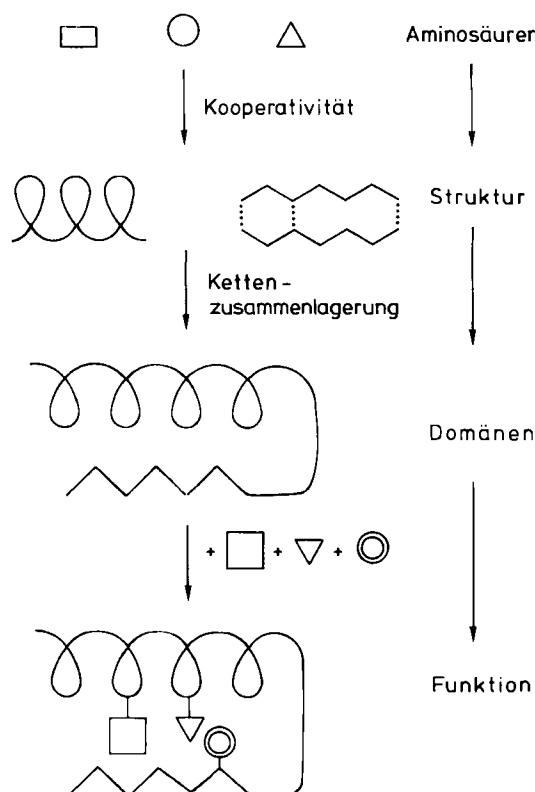


Abb. 21. Hypothetische Evolution von natürlichen Proteinen. Nach dieser Vorstellung führen kooperative Effekte bei der Kondensation von Aminosäuren zur bevorzugten Bildung von Homooligopeptiden mit stabiler Sekundärstruktur, die sich durch Wechselwirkungskräfte zu größeren Domänen („Proteinoide“) zusammenlagern. Durch sukzessiven Einbau funktioneller Aminosäuren in das Kettengerüst wird schließlich schrittweise eine katalytische Aktivität erreicht („structure before function“).

Sollte die hier entwickelte Strategie für den Bau künstlicher Proteine und Enzyme mit der natürlichen Entstehungsweise von Proteinen übereinstimmen, so wäre dies – im Sinne Monods^[16] – eher eine in der Natur der Sache begründete Notwendigkeit als ein Zufall.

Die in diesem Beitrag referierten eigenen Arbeiten wurden durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft, den Fonds der Chemischen Industrie, die Firma Hoffmann-La Roche, die Ciba-Stiftung sowie den Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung unterstützt. Mein besonderer Dank gilt allen zitierten Mitarbeitern. Wessentliche Ergebnisse auf dem Gebiet der Konformationsanalyse von Modellpeptiden gehen auf eine langjährige, fruchtbare Zusammenarbeit mit Professor C. Toniolo, Universität Padua, zurück. Priv.-Doz. Dr. K. Müller, Hoffmann-La Roche, danke ich für sein großes Engagement auf dem Gebiet des Molecular Modeling. Herr Dipl.-Chem. K.-H. Altmann hat bei der Abschluss des Manuskripts wertvolle Hilfe geleistet. Professor Max Brenner bin ich für die konstruktive Kritik dankbar. Schließlich möchte ich Professor Paul J. Flory danken, der mich in das Gebiet der Konformationsberechnungen an Biopolymeren eingeführt hat.

Eingegangen am 11. März 1985 [A 543]

- [1] G. P. Royer, *Adv. Catal.* 29 (1980) 197.
- [2] P. L. Luisi in E. Ségelyny (Hrsg.): *Optically Active Polymers*, D. Reidel, Dordrecht 1979, S. 357.
- [3] J. E. Davies, H. G. Gassen, *Angew. Chem.* 95 (1983) 26; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 22 (1983) 13.
- [4] R. Jaenicke (Hrsg.): *Protein Folding*, Elsevier, Amsterdam 1980.
- [5] R. Jaenicke, *Angew. Chem.* 96 (1984) 385; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 23 (1984) 395.
- [6] J. S. Richardson, *Adv. Protein Chem.* 34 (1981) 167.
- [7] F. Dietrich, *Chem. Unserer Zeit* 17 (1983) 105.
- [8] R. E. Dickerson, I. Geis: *The Structure and Function of Proteins*, Harper & Row, New York 1969; *Struktur und Funktion der Proteine*, Verlag Chemie, Weinheim 1971.
- [9] G. E. Schulz, R. H. Schirmer: *Principles of Protein Structure*, Springer, Berlin 1979.
- [10] P. L. Luisi, *Chimia* 37 (1983) 73.
- [11] I. Tabushi, *Tetrahedron* 40 (1984) 269.
- [12] T. Kunitake, Y. Okahata, *Fortschr. Hochpolym.-Forsch.* 20 (1976) 159.
- [13] H. Nistride, W. Stock, G. Manecke, *J. Mol. Catal.* 6 (1979) 23.
- [14] C. G. Overberger, N. J. Vorchheimer, *J. Am. Chem. Soc.* 85 (1963) 951.
- [15] C. G. Overberger, J. C. Salamone, *Acc. Chem. Res.* 2 (1969) 217.
- [16] T. Kunitake, Y. Okahata, *Chem. Lett.* 1974, 1057.
- [17] T. Kunitake, Y. Okahata, *Macromolecules* 9 (1976) 15.
- [18] K. H. Altmann, M. Mutter, unveröffentlicht.
- [19] N. Gamsjäger, P. Walter, G. Greber, *Makromol. Symposium*, Hamburg 1984.
- [20] P. J. Flory: *Statistical Mechanics of Chain Molecules*, Interscience, New York 1969.
- [21] I. M. Klotz, G. P. Royer, I. S. Scarpa, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68 (1971) 263.
- [22] H. Kiefer, W. I. Gordon, I. S. Scarpa, I. M. Klotz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69 (1972) 2155.
- [23] C. S. Lege, J. A. Deyrup, *Macromolecules* 14 (1981) 1629.
- [24] C. S. Lege, J. A. Deyrup, *Macromolecules* 14 (1981) 1634.
- [25] K. H. Altmann, J. Schmitt, M. Mutter, *Chimia*, im Druck.
- [26] J. Schmitt, *Dissertation*, Universität Mainz 1985.
- [27] M. Mutter, E. Bayer in E. Gross, J. Meienhofer (Hrsg.): *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, Vol. 2, Academic Press, New York 1980, S. 285.
- [28] a) H. Anzinger, *Dissertation*, Universität Mainz 1982; b) H. Anzinger, J. Schmitt, M. Mutter, *Makromol. Chem. Rapid Commun.* 2 (1981) 637.
- [29] J. Maul, *Dissertation*, Universität Mainz 1985.
- [30] E. Katchalski, G. D. Fasman, E. Simons, E. R. Blout, F. R. N. Gurd, W. L. Kaltun, *Arch. Biochem. Biophys.* 88 (1960) 361.
- [31] J. Noguchi, H. Yamamoto, *J. Biochem. (Tokyo)* 64 (1969) 703.
- [32] H. Yamamoto, J. Noguchi, *J. Biochem. (Tokyo)* 67 (1970) 103.
- [33] J. C. Sheehan, D. N. McGregor, *J. Am. Chem. Soc.* 84 (1962) 3000.
- [34] N. Nishi, M. Morishige, A. Tsutsumi, B. Nakajima, *Int. J. Biol. Macromol.* 5 (1983) 42.
- [35] B. Nakajima, N. Nishi, *Int. J. Biol. Macromol.* 5 (1983) 116.
- [36] F. Maser, M. Mutter, C. Toniolo, G. M. Bonora, *Biopolymers*, im Druck.
- [37] H. J. Goren, T. Fletcher, M. Fridkin, E. Katchalski-Katzir, *Biopolymers* 17 (1978) 1679.
- [38] J.-G. Chaves, Y. Trudelle, *J. Polym. Sci. Polym. Symp.* 52 (1975) 125.
- [39] D. Bellof, M. Mutter, *Int. J. Biol. Macromol.*, im Druck.

- [40] R. M. Schultz, J. P. Huff, P. Anagnostaras, V. Olsher, E. R. Blout, *Int. J. Pept. Protein Res.* 19 (1982) 454.
- [41] T. Vorherr, M. Mutter, *Int. J. Biol. Macromol.*, im Druck.
- [42] M. N. G. James, *J. Mol. Biol.* 144 (1980) 32.
- [43] A. A. Kossiakoff, S. A. Spencer, *Biochemistry* 20 (1981) 6462.
- [44] K. H. Altmann, M. Mutter, *Adv. Polym. Sci.*, im Druck.
- [45] F. Jacob: *The Possible and the Actual*, Pantheon Books, New York 1982; *Science* 195 (1977) 1161.
- [46] M. Goodman (Hrsg.): „Peptides, Polypeptides and Proteins: Interactions and their Biological Implications“, *Biopolymers* 22 (1983).
- [47] M. G. Rossmann, P. Argos, *Annu. Rev. Biochem.* 50 (1981) 497.
- [48] P. H. Westheimer, *Adv. Enzymol.* 24 (1962) 456.
- [49] T. C. Bruice in P. D. Boyer (Hrsg.): *The Enzymes*, Vol. 2, Academic Press, New York 1970, S. 217.
- [50] C. DeLisi, D. M. Crothers, *Biopolymers* 12 (1973) 2813.
- [51] A. Warshel, *Acc. Chem. Res.* 14 (1981) 284.
- [52] W. N. Lipscomb, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 362 (1981) 389.
- [53] H. Kessler, *Angew. Chem.* 94 (1982) 509; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 21 (1982) 512.
- [54] C. B. Anfinsen, E. Haber, M. Sela, F. H. White, Jr., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 47 (1961) 1301.
- [55] C. B. Anfinsen, H. A. Scheraga, *Adv. Protein Chem.* 29 (1975) 205.
- [56] H. Frauenfelder, G. A. Petsko, D. Tsernoglou, *Nature (London)* 280 (1979) 558.
- [57] H. Sund, C. Veeger (Hrsg.): *Mobility and Recognition in Cell Biology*. Proc. FEBS Lect. Course, de Gruyter, Berlin 1983; D. Beece, L. Eisenstein, H. Frauenfelder, D. Good, M. C. Marden, L. Reinisch, A. H. Reynolds, L. B. Sorensen, K. T. Yue, *Biochemistry* 19 (1980) 5147.
- [58] G. Némethy, H. A. Scheraga, *Annu. Rev. Biophys.* 10 (1977) 239.
- [59] G. M. Crippen, H. A. Scheraga, *Arch. Biochem. Biophys.* 144 (1971) 453.
- [60] H. A. Scheraga in [46], S. 1.
- [61] M. Levitt, A. Warshel, *Nature (London)* 253 (1975) 694.
- [62] O. B. Ptitsyn, V. Finkelstein in [46], S. 15.
- [63] K. D. Gibson, H. A. Scheraga, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 63 (1969) 9.
- [64] H. A. Scheraga in [4], S. 261.
- [65] T. E. Creighton, *J. Mol. Biol.* 113 (1977) 275.
- [66] S. Tanaka, H. A. Scheraga, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 (1977) 1320.
- [67] H. A. Scheraga in [85], S. 49.
- [68] S. Tanaka, H. A. Scheraga, *Macromolecules* 10 (1977) 291.
- [69] J. S. Richardson in [4], S. 41.
- [70] C. Chothia, M. Levitt, D. Richardson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 (1977) 4130.
- [71] O. Ptitsyn, A. Finkelstein in [4], S. 101.
- [72] M. Levitt, *Nature (London)* 261 (1976) 552.
- [73] C. Chothia, *Annu. Rev. Biochem.* 53 (1984) 537.
- [74] M. Levitt, *Biochemistry* 17 (1978) 4277.
- [75] S. T. Rao, M. G. Rossmann, *J. Mol. Biol.* 76 (1973) 241.
- [76] A. V. Efimov, *FEBS Lett.* 166 (1984) 33.
- [77] P. D. Boyer (Hrsg.): *The Enzymes*, 3. Aufl., Academic Press, New York.
- [78] M. G. Rossmann, A. Liljas, C.-I. Brändén, L. J. Banaszak in [77], Vol. 2, 1975, S. 61.
- [79] A. R. Fersht, J.-P. Shi, A. J. Wilkinson, D. M. Blow, P. Carter, M. M. Y. Waye, G. P. Winter, *Angew. Chem.* 96 (1984) 455; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 23 (1984) 467.
- [80] K. Müller, T. Vorherr, M. Mutter, noch unveröffentlicht.
- [81] F. Maser, K. Bode, V. N. R. Pillai, M. Mutter, *Adv. Polym. Sci.* 65 (1984) 177.
- [82] M. Goodman, A. Verdini, C. Toniolo, W. Phillips, F. Bovey, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 64 (1969) 444.
- [83] a) P. J. Flory, U. W. Suter, M. Mutter, *J. Am. Chem. Soc.* 98 (1976) 5733; b) M. Mutter, U. W. Suter, P. J. Flory, *ibid.* 98 (1976) 5745.
- [84] M. Rinaudo, A. Domard, *J. Am. Chem. Soc.* 98 (1976) 6360.
- [85] M. Goodman, C. Toniolo, F. Naider in E. R. Blout, F. A. Boyer, M. Goodman, N. Lotan (Hrsg.): *Peptides, Polypeptides and Proteins*, Wiley, New York 1974, S. 308.
- [86] M. Mutter, *Macromolecules* 10 (1977) 1413.
- [87] C. Toniolo, G. M. Bonora, S. Salardi, M. Mutter, *Macromolecules* 12 (1979) 620.
- [88] C. Toniolo, G. M. Bonora, M. Mutter, *Int. J. Biol. Macromol.* 1 (1979) 188.
- [89] V. N. R. Pillai, M. Mutter, *Acc. Chem. Res.* 14 (1981) 122.
- [90] G. M. Bonora, C. Toniolo, M. Mutter, *Polymer* 19 (1978) 1382.
- [91] C. Toniolo, G. M. Bonora, M. Mutter, *J. Am. Chem. Soc.* 101 (1979) 450.
- [92] G. M. Bonora, M. Palumbo, C. Toniolo, M. Mutter, *Makromol. Chem.* 180 (1979) 1293.
- [93] A. A. Ribeiro, R. Saltman, M. Goodman, M. Mutter, *Biopolymers* 21 (1982) 2225.
- [94] H. R. Kricheldorf, M. Mutter, F. Maser, D. Müller, H. Förster, *Biopolymers* 22 (1983) 1357.
- [95] M. Goodman, F. Naider, F. Rupp, *Bioorg. Chem.* 1 (1971) 310.
- [96] C. Toniolo, G. M. Bonora, H. Anzinger, M. Mutter, *Macromolecules* 16 (1983) 147.
- [97] S. S. Zimmerman, H. A. Scheraga in R. Walter, J. Meienhofer (Hrsg.): *Peptides: Chemistry, Structure and Biology*, Ann Arbor Science Publ., Ann Arbor 1975, S. 263.
- [98] H. A. Scheraga, *Pure Appl. Chem.* 36 (1973) 1.
- [99] F. Maser, B. Klein, M. Mutter in [46], S. 233.
- [100] M. Mutter, H. Anzinger, K. Bode, F. Maser, V. N. R. Pillai in W. Voelter, E. Wünsch, J. Ovchinnikov, V. Ivanov (Hrsg.): *Chemistry of Peptides and Proteins*, Vol. 1, de Gruyter, New York 1982, S. 217.
- [101] C. Toniolo, G. M. Bonora, M. Mutter, V. N. R. Pillai, *Makromol. Chem.* 182 (1981) 2007.
- [102] F. Maser, *Dissertation*, Universität Mainz 1982.
- [103] K.-H. Altmann, M. Mutter, *Int. J. Pept. Protein Res.*, im Druck.
- [104] P. Y. Chou, G. D. Fasman, *Biochemistry* 13 (1974) 312.
- [105] P. Y. Chou, G. D. Fasman, *Adv. Enzymol.* 47 (1978) 45.
- [106] M. Sueki, S. Lee, S. P. Powers, J. B. Denton, Y. Konishi, H. A. Scheraga, *Macromolecules* 17 (1984) 148.
- [107] S. Tanaka, H. A. Scheraga, *Macromolecules* 10 (1977) 305.
- [108] V. I. Lim, *J. Mol. Biol.* 88 (1974) 857.
- [109] W. Kabsch, C. Sander, *FEBS Lett.* 155 (1983) 179.
- [110] O. B. Ptitsyn, V. Finkelstein in [46], S. 15.
- [111] D. Eisenberg, *Annu. Rev. Biochem.* 53 (1984) 595.
- [112] S. Lifson, C. Sander, *Nature (London)* 282 (1979) 109.
- [113] M. J. Geisow, R. D. B. Roberts, *Int. J. Biol. Macromol.* 2 (1980) 387.
- [114] J. Palau, P. Argos, P. Puigdomenech, *Int. J. Pept. Protein Res.* 19 (1982) 349.
- [115] M. Schiffer, A. B. Edmundson, *Biophys. J.* 8 (1978) 29.
- [116] M. J. E. Sternberg, J. M. Thornton, *Nature (London)* 271 (1978) 15.
- [117] G. Jung, H. Schmitt, W. Winter in D. H. Rich, E. Gross (Hrsg.): *Peptides: Synthesis, Structure, Function*, Pierce Chem. Comp., Rockford 1981, S. 311.
- [118] R. Oekonomopoulos, G. Jung, *Liebigs Ann. Chem.* 1979, 1151.
- [119] R. Oekonomopoulos, G. Jung, *Biopolymers* 19 (1980) 203.
- [120] E. S. Vijayakumur, T. S. Sudha, P. Balaram, *Biopolymers* 23 (1984) 877.
- [121] W. Mayr, G. Jung, *Liebigs Ann. Chem.* 1980, 1489.
- [122] R. Bosch, G. Jung, H. Schmitt, G. M. Sheldrick, W. Winter, *Angew. Chem.* 96 (1984) 440; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 23 (1984) 450.
- [123] A. Brack, L. Orgel, *Nature (London)* 256 (1975) 383.
- [124] A. Brack, A. Caille, *Int. J. Pept. Protein Res.* 11 (1978) 128.
- [125] K.-H. Altmann, A. Flörsheimer, M. Mutter, *Int. J. Biol. Macromol.*, im Druck.
- [126] D. Fukushima, Y. S. Kupferberg, D. J. Kroon, E. T. Kaiser, E. J. Kézdy, *J. Am. Chem. Soc.* 101 (1979) 3703.
- [127] J. Herbert, *Dissertation*, Universität Basel 1985.
- [128] A. S. Kolaskar, V. Ramabrahman, K. V. Soman, *Int. J. Pept. Protein Res.* 16 (1980) 1.
- [129] P. Y. Chou, G. D. Fasman, *J. Mol. Biol.* 115 (1977) 135.
- [130] K. Bode, M. Goodman, M. Mutter, *Helv. Chim. Acta*, im Druck.
- [131] K. Bode, *Dissertation*, Universität Mainz 1982.
- [132] J. A. Smith, L. G. Please, *Crit. Rev. Biochem.* 8 (1980) 315.
- [133] D. B. Wetlaufer, *Adv. Protein Chem.* 34 (1981) 61.
- [134] A. Fontana, C. Vita, I. M. Chaiken, *Biopolymers* 22 (1983) 69.
- [135] H. Reutemann, P. L. Luisi, A. Holmgren, *Biopolymers* 22 (1983) 107.
- [136] E. Wünsch, *Angew. Chem.* 83 (1971) 773; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 10 (1971) 786.
- [137] M. Bodansky: *Principles of Peptide Synthesis*, Springer, Berlin 1984.
- [138] V. N. R. Pillai, M. Mutter, *Top. Curr. Chem.* 106 (1982) 119.
- [139] G. Barany, R. B. Merrifield in [27], S. 3.
- [140] P. H. Abelson, *Science* 219 (1983) 611.
- [141] G. I. Tesser, P. B. W. Ten Kortenaar, H. A. Boots in V. Ragnarsson (Hrsg.): *Peptides 1984*, Almqvist & Wiksell, Stockholm 1984, S. 221.
- [142] D. Itansen, D. Brandenburg, H.-G. Gattner, D. Saunders, A. Wollmer in [117], S. 225.
- [143] H. Zahn, V. K. Naithani, H.-G. Gattner, E. E. Bülesbach, P. M. Tamm, *Naturwissenschaften* 68 (1981) 56.
- [144] M. Mutter, V. N. R. Pillai, H. Anzinger, E. Bayer, C. Toniolo in K. Brunsfeld (Hrsg.): *Peptides 1980*, Scriptor, Copenhagen 1981, S. 660.
- [145] S. Abd el Rahman, H. Anzinger, M. Mutter, *Biopolymers* 19 (1980) 173.
- [146] M. Narita, I. Kazunuzi, J. Y. Chen, Y. Kim, *Int. J. Pept. Protein Res.* 24 (1984) 580.
- [147] M. Narita, K. Ishikawa, H. Nakano, S. Isokawa, *Int. J. Pept. Protein Res.* 24 (1984) 14.
- [148] J. Schmitt, M. Mutter, *Biopolymers* 22 (1983) 1849.
- [149] M. Mutter, *J. Am. Chem. Soc.* 99 (1977) 8307.
- [150] E. T. Kaiser, F. J. Kézdy, *Science* 223 (1984) 249.
- [151] R. G. Moc, R. J. Miller, E. T. Kaiser, *J. Am. Chem. Soc.* 105 (1983) 4200.
- [152] A. Komorita, I. M. Chaiken in [117], S. 709.
- [153] R. Moser, R. M. Thomas, B. Gutte, *FEBS Lett.* 157 (1983) 247.

- [154] B. Gutte, M. Däumigen, E. Wittschieber, *Nature (London)* 281 (1979) 650.
- [155] R. E. Offord: *Semisynthetic Proteins*, Wiley, New York 1980.
- [156] A. Einstein: *Mein Weltbild*, Ullstein Materialien, Berlin 1980.
- [157] T. J. Edsall in R. Alexander (Hrsg.): *Structural Chemistry and Molecular Biology*, W. H. Freeman, San Francisco 1968, S. 88.
- [158] K. R. Popper: *Logik der Forschung*, 6. Aufl., J. C. B. Mohr, Tübingen 1976.
- [159] K. R. Popper: *Objektive Erkenntnis*, Hoffmann und Campe, Hamburg 1984.
- [160] J. Monod: *Zufall und Notwendigkeit*, Piper, München 1971.
- [161] H. Anzinger, J. Schmitt, M. Mutter, *Makromol. Chem., Rapid Commun.* 2 (1981) 637.
- [162] F. Maser, B. Klein, M. Mutter, C. Toniolo, G. M. Bonora in [46], S. 233.
- [163] A. D. McLachlan in [4], S. 79.
- [164] E. Zuckerkandl, L. Pauling in V. Bryson, J. H. Vogel (Hrsg.): *Evolving Genes and Proteins*, Academic Press, New York 1965, S. 97.
- [165] M. F. Perutz, J. C. Kendrew, H. C. Watson, *J. Mol. Biol.* 13 (1965) 669.
- [166] R. J. Almassy, R. E. Dickerson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75 (1978) 2674.
- [167] H. Morawetz, *Adv. Catal. Relat. Subj.* 20 (1969) 341.
- [168] G. N. Ramachandran, V. Sasisekharan, *Adv. Protein Chem.* 23 (1968) 238.
- [169] H. W. Lucas, *Dissertation*, Universität Mainz 1985.
- [170] H. Hellermann, *Dissertation*, Universität Mainz 1985.
- [171] E. Bayer, H. Eckstein, K. Hägele, W. A. König, W. Brüning, H. Hagenmaier, W. Parr, *J. Am. Chem. Soc.* 92 (1970) 1735.
- [172] J. Meienhofer in [141], S. 19.
- [173] a) R. C. Sheppard, *Chem. Br.* 1983, 402; b) E. Atherton, L. E. Cammish, P. Goddard, J. D. Richards, R. C. Sheppard in [141], S. 153.
- [174] V. N. R. Pillai, M. Mutter, E. Bayer, I. Gatfield, *J. Org. Chem.* 45 (1980) 5364.
- [175] M. Mutter, D. Bellof, *Helv. Chim. Acta* 67 (1984) 2009.
- [176] C. Birr: *Aspects of the Merrifield Peptide Synthesis*, Springer, Berlin 1978.
- [177] H. Becker, H.-W. Lucas, J. Maul, V. N. R. Pillai, M. Mutter, *Makromol. Chem.* 184 (1983) 2603.
- [178] J. T. F. Gabriel, J. Michalewsky, J. Meienhofer in A. Eberle, R. Geiger, T. Wieland (Hrsg.): *Perspectives in Peptide Chemistry*, S. Karger, Basel 1981, S. 196.
- [179] a) W. Schoknecht, K. Albert, G. Jung, E. Bayer, *Liebigs Ann. Chem.* 1982, 1514; b) W. Mayr, R. Oekonomopoulos, G. Jung, *Tetrahedron* 34 (1978) 2045.
- [180] E. Wünsch in [141], S. 5.
- [181] R. Arshady, E. Atherton, M. J. Gait, R. C. Sheppard, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1979, 423.
- [182] M. Mutter, H. Mutter, E. Bayer in M. Goodman, J. Meienhofer (Hrsg.): *Peptides: Proc. 5th Am. Pept. Symp.*, Wiley, New York 1977, S. 403.
- [183] A. S. Kolaskar, V. Ramabrahman, *Int. J. Pept. Protein Res.* 24 (1984) 392.
- [184] R. Steiner: *Die Philosophie der Freiheit*, Verlag Freies Geistesleben, Stuttgart 1973.