

# Synthetische Peptide und ihre Anwendungsmöglichkeiten

Von Rudolf Moser, Stephan Klauser, Thomas Leist, Hanno Langen,  
Thomas Epprecht und Bernd Gutte\*

Zunehmend beschäftigen sich Peptidchemiker mit der Synthese biologisch und medizinisch wichtiger Polypeptide. In diesem Aufsatz werden einige nützliche Anwendungen von synthetischen Peptiden in Biochemie, Molekularbiologie, Immunologie und Medizin beschrieben. Synthetische Peptide sind von Interesse für Untersuchungen über Struktur-Funktions-Beziehungen bei Polypeptiden, als Peptidhormone und Hormonanaloga, für die Herstellung kreuzreagierender Antikörper und für die Konstruktion neuer Enzyme. Peptidchemiker können zum Fortschritt in den biologischen und medizinischen Wissenschaften beitragen, wenn sie mit deren aktuellen Problemen vertraut sind.

## 1. Einleitung – Methoden der Peptidsynthese

Das Ziel der Peptidsynthese ist die Knüpfung von Peptidbindungen zwischen Aminosäuren (Abb. 1). Zwar ist es möglich, Proteine auf chemischem Weg herzustellen, Anstrengungen dieser Art sind jedoch höchst unökonomisch. Gegenwärtig ist die gen-/biotechnologische Synthese weit vorteilhafter.

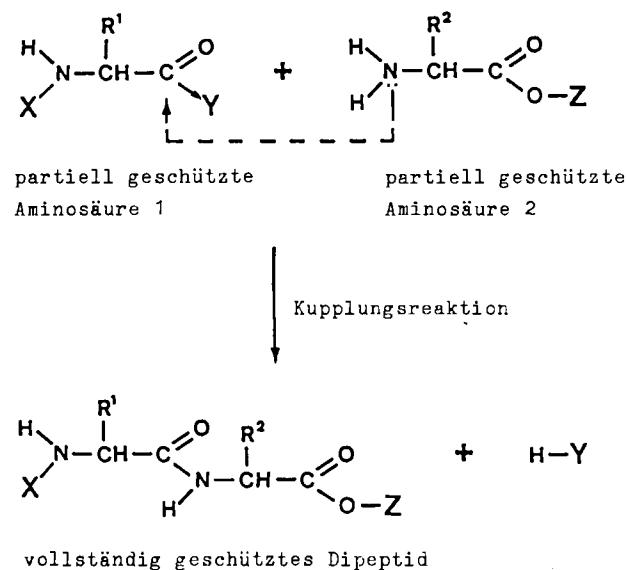


Abb. 1. Knüpfung einer Peptidbindung. X: Aminoschutzgruppe (eine häufig benützte Gruppe ist die säurelabile *tert*-Butyloxycarbonylgruppe). CO-Y: für die Kupplungsreaktion aktivierte Carboxylgruppe (Y=N<sub>3</sub>: Azidmethode, Y=O-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-p-NO<sub>2</sub>: p-Nitrophenylestermethode, Y=O-C(-NH-C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>)=N-C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>: Dicyclohexylcarbodiimidmethode). Z: Carboxyschutzgruppe. Bei der Festkörperpeptidsynthese ist Z ein unlösliches Harz (häufig ein zu 1% quervernetztes Polystyrol), mit dem der COOH-terminale Aminosäurerest des aufzubauenden Peptids während der ganzen Synthese durch eine Esterbindung verknüpft ist. Die Synthese erfolgt vom COOH- zum NH<sub>2</sub>-Ende der Kette. Der letzte Schritt ist die Entfernung des synthetischen Produkts vom Harz durch spezifische Hydrolyse der Esterbindung.

Peptide können hingegen chemisch in Lösung und an festen Trägern synthetisiert werden. Eine umfassende Dar-

stellung des Methodenarsenals für Synthesen in Lösung stammt von Wünsch et al.<sup>[1]</sup>. Die Festphasenmethode wurde von Merrifield<sup>[2,3]</sup> im Jahre 1963 eingeführt. Obwohl die aus 124 Aminosäureresten bestehende RNase A (Ribonuclease A) nach beiden Methoden mit hoher spezifischer Aktivität hergestellt wurde<sup>[4,5]</sup> (die synthetische RNase A von Yajima und Fujii<sup>[5]</sup> wurde auch kristallisiert), beschränken sich die Peptidchemiker gewöhnlich auf die Synthese von Polypeptiden, die nicht mehr als ca. 50 Reste enthalten, um Fehlinterpretation basierend auf Ergebnissen, die mit inhomogenen synthetischen Produkten erhalten wurden, zu vermeiden. Zu den Polypeptiden, die in letzter Zeit mit hohem Reinheitsgrad nach der Festphasenmethode hergestellt wurden, gehören kristallines Glukagon (Mojsov und Merrifield<sup>[6]</sup>) und ein künstliches, aus 24 Aminosäureresten bestehendes DDT-bindendes Peptid, das nach einem einzigen Reinigungsschritt kristallisiert werden konnte und nach dem Edman-Abbau die erwartete Aminosäuresequenz hatte (Moser et al.<sup>[7,8]</sup>).

## 2. Untersuchungen zur Beziehung zwischen Struktur und Funktion bei Peptiden und Proteinen

### 2.1. Peptidhormone, Releasing-Faktoren, Opioidpeptide

Modifizierung, Austausch oder Deletion von Aminosäureresten sind wichtige Werkzeuge zur Untersuchung von Konformation und Wirkungsmechanismus von biologisch aktiven Polypeptiden. Kurze Peptidhormone, Releasing-Faktoren und Opioidpeptide eignen sich für diese Studien besonders gut, da sie mit hohem Reinheitsgrad synthetisiert werden können. Tatsächlich sind zahlreiche Analoga dieser Verbindungen beschrieben worden. Ein besonders interessantes Beispiel ist das hochaktive cyclische Hexapeptid-Analogon des Tetradecapeptidhormons Somatostatin, das von Veber et al.<sup>[9]</sup> hergestellt wurde, und in dem neun Aminosäurereste der Somatostatin-Sequenz durch einen Prolinrest ersetzt sind (Abb. 2). Vermutlich sind die resultierende konformationelle Spannung und die verminderte Empfindlichkeit gegenüber proteolytischem Abbau für die hohe Aktivität und die längere Wirkungsdauer dieses Analogons verantwortlich.

[\*] Prof. Dr. B. Gutte, Dipl.-nat. R. Moser, Dipl.-nat. S. Klauser, Dipl.-nat. T. Leist, Dipl.-nat. H. Langen, T. Epprecht  
Biochemisches Institut der Universität  
Winterthurerstrasse 190, CH-8057 Zürich (Schweiz)

Ala-Gly-Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys

A

Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe  
B Pro

Abb. 2. Sequenz des Somatostatins A [36] und des aktiven cyclischen Hexapeptid-Somatostatin-Analogons B [9].

## 2.2. Proteine

### 2.2.1. Chemische Synthese von Protein-Analoga

Die Zahl der Proteine, die man chemisch oder enzymatisch spalten kann und deren Fragmente sich zu biologisch aktiven Komplexen zusammenlagern, steigt ständig. In vielen Fällen werden Fragmente gebildet, die klein genug sind, um chemisch synthetisiert werden zu können. Bei der Aufklärung der Struktur nativer Proteine und ihrer aktiven Komplexe wurden in den letzten Jahren große Fortschritte erzielt; dies schuf die Voraussetzung für detaillierte Studien zur Beziehung zwischen Struktur und Funktion.

RNase S ist das klassische Beispiel eines voll aktiven Komplexes aus zwei Fragmenten (RNase 1-20 und RNase 21-124), die durch Subtilisin-Spaltung von RNase A erhalten wurden<sup>[10]</sup>. Die Auswirkungen von Modifizierung, Substitution oder Deletion von Aminosäureresten im synthetischen NH<sub>2</sub>-terminalen Fragment RNase 1-20 auf Bildung und Aktivität des Komplexes mit natürlicher RNase 21-124 sind ausführlich untersucht worden<sup>[11]</sup>. Kürzlich wurde gezeigt, daß His12, von dem man annimmt, daß es für den Wirkungsmechanismus von RNase A<sup>[11]</sup> essentiell ist, durch β-(4-Pyridyl)-L-Alanin ersetzt werden kann, wobei ungefähr 30% der enzymatischen Aktivität von RNase A gegenüber RNA als Substrat erhalten bleiben<sup>[12]</sup>. Ein aus 63 Resten bestehendes RNase-A-Analogon, das überwiegend die hydrophobe Substratbindungsstelle umfaßte und dem mehrere Oberflächenregionen des Elternproteins einschließlich der Aminosäurereste 1 bis 25 fehlten, zeigte bei der Transphosphorylierung von poly(C) und poly(U) noch etwa 10% der Aktivität der RNase A<sup>[13]</sup>.

Vor kurzem<sup>[14]</sup> haben wir RNase 1-14 und des-His-12-RNase 1-14 für eine weitere Untersuchung der Bedeutung von His 12 für Struktur und Funktion synthetisiert. Es war bekannt, daß der Komplex aus RNase 1-14 und RNase 21-124 enzymatisch voll aktiv ist<sup>[15]</sup>. Wenn nun RNase 1-14 gegen des-His-12-RNase 1-14 ausgetauscht wird, bleibt nur eine Restaktivität. Es spricht viel dafür, daß des-His-12-RNase 1-14 die Fähigkeit von RNase 1-14, eine Helix zu bilden, verloren hat und deshalb nicht mehr an RNase 21-124 binden kann<sup>[14]</sup>. Dies würde die Hypothese stützen<sup>[16]</sup>, daß eine Salzbrücke zwischen den Seitenketten von Glu 9 und His 12 die von Rest 3 bis Rest 13 in RNase 1-20<sup>[17]</sup> (oder RNase 1-14) reichende α-Helix stabilisiert. In des-His-12-RNase 1-14 existiert diese Salzbrücke nicht. Möglicherweise ist His 12 für die strukturelle Integrität der Substratbindungsstelle wichtiger als für die Katalyse. Die Eigenschaften von des-His-12-RNase 1-14 demonstrieren ausgezeichnet, welche drastische Konsequenzen die Deletion eines einzigen Aminosäurerests für Struktur und Funktion eines Proteins haben kann.

Die strukturelle und funktionelle Bedeutung einzelner Reste im COOH-terminalen Bereich von RNase A wurde mit Hilfe von Gemischen von natürlicher RNase 1-118 mit synthetischen Analoga von RNase 111-124 untersucht<sup>[18-20]</sup>. Die Überlappung der Sequenzen ist für die Bildung der Komplexe aus großem und kleinem Fragment essentiell.

Partielle tryptische Verdauung von Staphylokokken-Nuclease in Gegenwart von Thymidin-3',5'-diphosphat und Ca<sup>2+</sup> ergibt einen aktiven Komplex, der Nuclease-T genannt wird und aus den Fragmenten 6-48 und 49-149 oder 50-149 besteht. Die getrennten Fragmente haben in Lösung keine stabile Struktur; durch Rekonstitution der Komplexe wird eine Konformation regeneriert, die mit der nativen nahezu übereinstimmt<sup>[21,22]</sup>. Des weiteren sind die Röntgen-Diffraktionsbilder einzelner Kristalle von ligandenbindender nativer Nuclease<sup>[23]</sup> und ligandenbindendem Nuclease-T-Komplex (Fragment 6-48 plus Fragment 49-149)<sup>[24]</sup> sehr ähnlich, und die Kristalle selbst sind isomorph. Ein zweiter aktiver Komplex wird durch die überlappenden Fragmente 1-126 und 99-149 oder 111-149<sup>[25]</sup> gebildet. Von Fragment 6-48 und Fragment 99-149 wurden synthetische Analoga hergestellt<sup>[26-28]</sup>, um die Wirkungen, die verkürzte Fragmente und der Austausch einzelner Aminosäurereste auf Bildung, Konformation und Aktivität der Komplexe haben, zu untersuchen.

Später beschrieben Juillerat et al.<sup>[29]</sup> einen biologisch aktiven Komplex aus drei Fragmenten von Pferdeherz-Cytochrome-c. Die drei Komponenten waren die Reste 1-25 (mit dem kovalent gebundenen Häm), 28-38 und 56-104; ihre Größe macht alle drei für peptidsynthetische Untersuchungen von Struktur-Funktions-Beziehungen in Pferdeherz-Cytochrome-c geeignet.

### 2.2.2. Ortsspezifische Mutagenese

Ortsspezifische Mutagenese ist eine chemisch-molekulärbiologische Methode zur gezielten Einführung spezifischer Mutationen in Gene<sup>[30-33]</sup>. Eine ringförmige einzelsträngige DNA-Matrize, die den Wildtyp des zu mutierenden Gens enthält, wird mit einem synthetischen Oligodesoxynucleotid, das in der Position der gewünschten Mutation nicht komplementär zur Matrize ist, hybridisiert. Das Oligodesoxynucleotid wird dann mit DNA-Polymerase und DNA-Ligase zum Komplementärstrang verlängert und cyclisiert. Der gebildete Heteroduplex wird in *E. coli* kloniert. Einige Klone enthalten das Gen des Wildtyps, andere das der Mutante. Werden die klonierten Gene exprimiert, kann man die Genprodukte isolieren und vergleichen. Die ortsspezifische Mutagenese ist schon jetzt eine weit verbreitete Methode zur Untersuchung der Beziehung zwischen Struktur und Funktion von Proteinen geworden.

## 3. Synthese von Peptidhormonen

### 3.1. Chemische Synthese

Zahlreiche Human-Polypeptidhormone werden für therapeutische Zwecke benötigt. Die kürzeren, wie z.B. Oxytocin, sind leicht durch chemische Synthese zugänglich. Aber auch größere wie das humane adrenocorticotrope Hormon (ACTH, 39 Reste) sind pharmazeutisch rein mit konventionellen Methoden<sup>[34]</sup> und nach dem Festkörper-

verfahren<sup>[35]</sup> hergestellt worden. Im Falle von ACTH wird die Aufgabe des Peptidchemikers durch die Tatsache erleichtert, daß die ersten 24 Reste der ACTH-Sequenz für die biologische Aktivität des Hormons verantwortlich sind.

Somatostatin (14 Reste, Abb. 2) ist ein Inhibitor der Sekretion verschiedener Hormone, z. B. des Wachstumshormons, des Glukagons und des Insulins. Nach seiner Isolierung im Jahre 1973<sup>[36]</sup> wurden zahlreiche Synthesen durchgeführt (Beispiele siehe<sup>[37]</sup> und<sup>[38]</sup>). Die mögliche Verwendung von Somatostatin-Analoga zur Behandlung von Diabetes hat zu großem Interesse an diesem Polypeptidhormon geführt. Analoga, die nur die Glukagonausschüttung inhibieren, wären ideal<sup>[39]</sup>. Somatostatin-Analoga lassen sich für biologische Untersuchungen am effizientesten immer noch durch chemische Peptidsynthese herstellen. Dabei können auch D-Aminosäuren eingebaut werden, wobei die damit verbundenen Konformationsänderungen die Lebensdauer und die biologische Aktivität der Peptidhormon-Analoga zum Teil erhöhen<sup>[40]</sup>. Bei der ribosomalen Proteinbiosynthese werden nur L-Aminosäuren eingebaut. Die Verwendung von synthetischen Peptiden als Medikamente und Diagnostica wurde kürzlich von Geiger zusammenfassend beschrieben<sup>[40]</sup>.

### 3.2. Synthese von Human-Polypeptidhormonen in Bakterien

Die synthetischen Gene des Somatostatins<sup>[41]</sup> und der A- und B-Kette des Human-Insulins<sup>[42]</sup> sind in *E. coli* nach Transformation der Bakterien durch die entsprechenden Hybridplasmide exprimiert worden. Human-Insulin, das durch Kombination<sup>[43]</sup> von bakteriell hergestellten A- und B-Ketten erhalten wurde, wird mittlerweile auf dem Markt angeboten. Das Interesse an chemisch synthetisiertem Somatostatin ist nach wie vor unvermindert groß.

## 4. Erzeugung von Antikörpern gegen synthetische Peptide

Gegenwärtig beschäftigen sich viele Arbeitsgruppen mit der Produktion von Antikörpern, die gegen ein synthetisches Segment eines Proteins erzeugt wurden und die mit dem intakten nativen Protein kreuzreagieren. Antikörper dieser Art entstehen, wenn das als Immunogen (Antigen) verwendete synthetische Peptid einem Teil eines Proteins gleicht, der in dessen nativer Form an der Oberfläche liegt und dessen native Konformation wenigstens zeitweise auch vom Peptid angenommen werden kann. Abbildung 3 zeigt die Entstehung von kreuzreagierenden Antikörpern. Synthetische Peptide mit weniger als ungefähr zwanzig Aminosäureresten sind gewöhnlich gute Immunogene nach Kupplung an ein Trägerprotein, z. B. Serumalbumin. Längere Peptide benötigen für die Immunisierung keinen Träger. Häufig sind synthetische Peptide, die Oberflächenbereiche eines Proteins darstellen, bessere Immunogene als die entsprechenden Strukturen auf dem nativen Protein.

### 4.1. Antikörper für die Immunoaffinitätschromatographie

Affinitätschromatographie erlaubt die schnelle und spezifische Reinigung eines Polypeptids aus einem komplexen

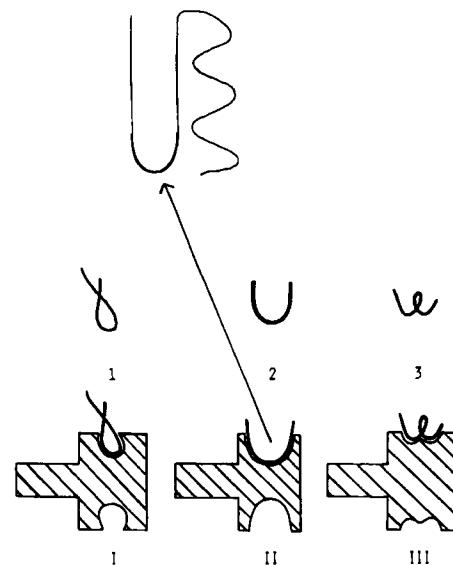


Abb. 3. Erzeugung von Antikörpern gegen ein Oberflächensegment eines nativen Proteins. Oben: Angenommene Faltung eines fiktiven Proteins; das hervorgehobene Segment wird chemisch synthetisiert. Mitte: Drei der vielen möglichen ineinander umwandelbaren Strukturen des synthetischen Peptids in Lösung. Unten: Antikörper-Antigen-Komplexe. Wenn die Konformere 1, 2 und 3 des synthetischen Peptids die Produktion von Antikörpern stimulieren, werden die Antikörper I und III nur das Peptid binden; Antikörper II wird wegen der großen strukturellen Ähnlichkeit der antigenen Determinanten von Peptidkonformer 2 und natürlichem Protein auch dieses erkennen (siehe Pfeil).

**Gemisch von Produkten.** Immunoaffinitätschromatographie dient entweder der Isolierung eines Antigens oder – wenn reines Antigen vorhanden ist – der Fraktionierung polyklonaler und monoklonaler Antikörper. Im folgenden sind zwei Beispiele aus unserem Laboratorium beschrieben.

Wir synthetisierten das Human-Interferon (IFN)- $\alpha 1$ -Fragment 111–166<sup>[46]</sup>, eine stark konservierte Sequenz der IFN- $\alpha$ - und IFN- $\beta$ -Familie<sup>[44, 45]</sup>. Die Vermutung, daß dieses Fragment antiviral ist, bestätigte sich nicht<sup>[46]</sup>. Es zeigte sich jedoch, daß ein monoklonaler Antikörper, der gegen das synthetische Fragment hergestellt worden war, mit in *E. coli* produziertem Human-IFN- $\alpha 1$ , - $\alpha 2$ <sup>[46]</sup> und - $\alpha A$ <sup>[47]</sup> kreuzreagiert. Er wurde an CNBr-aktiviertes Sepharose 4B gebunden, um Human-IFN- $\alpha 2$  aus *E. coli* affinitätschromatographisch zu reinigen. Das gereinigte Interferon hatte eine spezifische Aktivität von ungefähr  $10^8$  Einheiten pro mg Protein<sup>[46]</sup>. Weitere peptidsynthetische Untersuchungen ergaben, daß die antigene Determinante, die durch den monoklonalen Antikörper erkannt wird, zwischen den Resten 151 und 166 der IFN- $\alpha 1$ -Sequenz lokalisiert ist<sup>[48]</sup>.

Im zweiten Fall wurde ein gereinigtes, künstliches, aus 24 Resten bestehendes, DDT-bindendes Polypeptid<sup>[7]</sup> an Affi-Gel 10 gekuppelt, um die Immunglobulin G(IgG)-Fraktion des Antiserums, das gegen das Polypeptid in Kaninchen erzeugt wurde, weiter aufzutrennen. Nur ungefähr 5% vom isolierten IgG wurden durch das immobilisierte Peptid gebunden<sup>[49]</sup>, 95% erkannten das über seine NH<sub>2</sub>-terminale Aminogruppe an den unlöslichen Träger gebundene Antigen nicht. Die spezifisch bindenden Antikörper können für den Nachweis der Expression des klonierten synthetischen Gens des künstlichen DDT-bindenden Polypeptids in *E. coli*<sup>[50]</sup> verwendet werden.

## 4.2. Synthetische Peptide als potentielle Impfstoffe

In letzter Zeit sind synthetische Peptide, die Oberflächensequenzen von Virushüllproteinen oder Toxinen repräsentieren, mit Erfolg zur Immunisierung eingesetzt worden. Schützen die gebildeten Antikörper den Organismus gegen Viren oder Toxine, spricht man von aktiver Immunisierung. Es besteht die Hoffnung, daß aktive Immunisierung durch synthetische Peptide generell anwendbar wird.

Im Jahr 1965 zeigten *Anderer und Schlumberger*<sup>[51]</sup>, daß Kaninchenantiseren gegen künstliche Antigene, die synthetische Hexa-, Penta-, Tetra- oder Tripeptide mit der COOH-terminalen Aminosäuresequenz des Hüllproteins von Tabakmosaikvirus (TMV, Stamm *vulgare*) gebunden hatten, das intakte Virus präzipitieren und neutralisieren. Die neutralisierende Wirkung des Antiserums gegen das Hexapeptid war der eines Anti-TMV-Antiserums vergleichbar. Obwohl TMV ein pflanzliches Virus ist und Pflanzen keine Antikörper produzieren, wiesen diese Arbeiten den Weg zur aktiven Immunisierung mit synthetischen Peptiden. Diese wurden auf verschiedene Weise ausgewählt.

*Lerner et al.*<sup>[52]</sup> synthetisierten Peptide mit der kontinuierlichen Aminosäuresequenz des NH<sub>2</sub>- und COOH-terminalen Bereichs sowie der Sequenz hydrophiler Abschnitte und möglicher „turns“ (Richtungsänderungen) der Polypeptidkette des Hepatitis-B-Oberflächenantigens (HBsAg); dies ist das wichtigste Oberflächenantigen der 42nm-Dane-Partikel des Hepatitis-B-Virus. Die Aminosäuresequenzen wurden aus der Nucleotidsequenz des HBsAg-Gens abgeleitet. Antiseren von Kaninchen gegen mehrere Peptide, die mehr als zehn Aminosäurereste enthalten, reagieren mit nativem HBsAg und präzipitieren spezifisch die beiden Formen des Antigens (Molekulargewicht 23 000 und 28 000 Dalton) aus Dane-Partikeln. Diejenigen Peptide, die die Bildung dieser Antiseren auslösen, könnten als synthetische Impfstoffe Verwendung finden.

*Arnon et al.*<sup>[53, 54]</sup> und *Audibert et al.*<sup>[55]</sup> konnten mit Hilfe eines Disulfidpeptids bzw. eines Peptids, das im nativen Zustand durch eine Disulfidbrücke gestützt wird, Antikörper erzeugen, die mit den jeweiligen nativen Proteinen kreuzreagieren. Antikörper von Kaninchen gegen das natürliche Fragment 64–83<sup>[53]</sup> und Antikörper von Kaninchen und Ziegen gegen das synthetische Fragment 64–82<sup>[54]</sup> von Hühnereiweiß-Lysozym binden auch intaktes Lysozym (alle drei Antigene enthalten die Disulfidbrücke, die durch die Halbcystine 64 und 80 gebildet wird), während sie mit den oxidierten offenkettigen Fragmenten nicht interagieren. *Audibert et al.*<sup>[55]</sup> erzeugten Antikörper in Meerschweinchen gegen das synthetische Tetradecapeptid 188–201 des Diphtherie-Toxins. Die Sequenz dieses Peptids bildet die Schleife, die durch die Disulfidbrücke zwischen den Halbcystinen 186 und 201 des nativen Toxins stabilisiert wird. Das Diphtherie-Toxin wird von den Antikörpern nicht nur spezifisch gebunden, sondern auch neutralisiert; dies war das erste Beispiel einer erfolgreichen aktiven Immunisierung gegen ein letales bakterielles Toxin mit einem synthetischen Peptidantigen.

Mehrere polare Aminosäurereste können nur auf der Oberfläche von Proteinmolekülen aufeinanderfolgen. Daraus schlossen *Hopp und Woods*<sup>[56]</sup>, daß Sequenzen mit

überwiegend polaren Resten antigenen Determinanten charakterisieren könnten; tatsächlich konnten sie zeigen, daß die Punkte höchster lokaler Hydrophilie, die durch schrittweise Mittelung der Hydrophiliewerte<sup>[57]</sup> von sechs aufeinanderfolgenden Aminosäureresten entlang der Polypeptidkette erhalten wurden, innerhalb enger Grenzen mit der Lage von antigenen Determinanten übereinstimmen. In die Analyse wurden zwölf Proteine einbezogen, mit denen umfangreiche immunchemische Untersuchungen durchgeführt worden waren. Um ihr Verfahren zur Identifizierung antigener Determinanten zu testen, synthetisierten die Autoren mit der Festkörpermethode das Fragment 138–149 von HBsAg, das die hydrophile Hexapeptidsequenz Lys 141-Pro-Thr-Asp-Gly-Asn 146 enthält, wobei die Cysteinreste 138, 139, 147 und 149 durch α-Aminobuttersäurereste ersetzt wurden. Das deblockierte Peptidharz band Anti-HBsAg-Antikörper, die mit <sup>125</sup>I markiert waren. Damit war experimentell bestätigt, daß das synthetische Fragment zumindest einen großen Teil einer antigenen Determinante von HBsAg enthält.

Von der Vorhersage, welche Teile einer Proteinsequenz antigenen Determinanten sein könnten, bis zu synthetischen Peptidimpfstoffen sind nacheinander folgende Schritte nötig:

- Vorhersage von antigenen Bereichen eines Proteins nach den Methoden von *Hopp und Woods*<sup>[56]</sup> oder *Pfaff et al.*<sup>[58]</sup> (letztgenannte wird im folgenden diskutiert)
- chemische Synthese der diese Bereiche repräsentierenden Peptide
- Produktion von Antikörpern gegen diese synthetischen Peptide
- Untersuchung der Fähigkeit dieser Antikörper, an die antigenen Determinanten des nativen Proteins zu binden und dessen pathogene Eigenschaften zu neutralisieren.

Peptide, die die Bildung neutralisierender Antikörper auslösen, sind potentielle synthetische Impfstoffe. Geht man nach obigem Schema vor, werden mit hoher Wahrscheinlichkeit Antikörper entstehen, die auch das native Protein erkennen; die Entstehung neutralisierender Antikörper hingegen ist nicht zwingend.

Eine antigenen Determinante, die von Aminosäureresten gebildet wird, die einer α-Helix auf der Proteinoberfläche angehören, kann durch die Methode von *Hopp und Woods*<sup>[56]</sup> nicht klar identifiziert werden. Eine solche α-Helix hat eine hydrophobe Seite, die auf dem Rest des Proteinmoleküls aufliegt, und eine hydrophile Seite, die mit Wasser interagiert. Bei einer solchen α-Helix-Struktur tritt keine kontinuierliche Sequenz von mindestens sechs hydrophilen Resten auf; stattdessen beobachtet man ein annähernd paarweises Alternieren von hydrophilen und hydrophoben Resten, wie es sich auch durch die Darstellung der Aminosäuresequenz einer Oberflächenhelix als helikales Rad<sup>[59]</sup> ergibt. Aus diesem Grund schlugen *Pfaff et al.*<sup>[58]</sup> zur Entwicklung eines synthetischen Peptidimpfstoffs gegen das Maul- und Klauenseuche-virus (FMDV) den folgenden Weg ein: Unter Berücksichtigung von Sekundärstrukturvorhersagen, Helixrad-Darstellungen und Ergebnissen einer serologischen Analyse großer Virusprotein-1(VP1)-Fragmente<sup>[60]</sup> lokalisierten *Pfaff et al.*<sup>[58]</sup> einen wichtigen immunogenen Bereich des FMDV auf einer vorhergesagten Oberflächenhelix von VP1 zwischen den Ami-

nosäureresten 144 und 159. Ein synthetisches Hexadecapeptid, das diese Sequenz enthielt, ergab in Kaninchen hohe Titer von Antikörpern, die das Virus spezifisch erkannten und neutralisierten. Die hohe Qualität der Immunantwort wurde auf die konformationelle Stabilität des immunogenen synthetischen Hexadecapeptids zurückgeführt, das mit großer Wahrscheinlichkeit  $\alpha$ -helikale Struktur hat.

Mit synthetischen Peptiden konnten auch Antikörper erzeugt werden, die das Poliovirus neutralisieren<sup>[61]</sup>. Synthetische Peptidimpfstoffe gegen das Influenzavirus wären von besonderem großem medizinischem Interesse.

### 4.3. Antikörper für die Identifizierung von Genprodukten

Die Entwicklung von Methoden zur schnellen DNA-Sequenzierung hat zu einer exponentiellen Zunahme von DNA-Sequenzdaten geführt. Das Tempo ist so groß, daß die Proteinchemie kaum folgen kann. In vielen Fällen ist nicht bekannt, ob ein DNA-Abschnitt mit offenem Leseraster (d. h. mit einer langen Sequenz von Basentriplets, die nicht durch ein Stopcodon unterbrochen wird) tatsächlich ein Protein codiert. Zum Nachweis eines Proteins, dessen Existenz man vermutet, können wiederum synthetische Peptide sehr nützlich sein. Zuerst wird die Sequenz des Proteins von der DNA-Sequenz abgeleitet. Dann wird ein Fragment der vorhergesagten Proteinsequenz (vorzugsweise ein COOH-terminales Peptid<sup>[62,63]</sup> oder ein nicht-terminales hydrophiles Peptid, das nach der Methode von *Hopp* und *Woods*<sup>[56]</sup> ausgewählt wurde) chemisch synthetisiert, und gegen das synthetische Fragment werden Antikörper erzeugt. Existiert das vermutete Protein tatsächlich, kann es immunologisch nachgewiesen werden, vorausgesetzt, daß die gegen das synthetische Peptid gebildeten Antikörper mit dem Genprodukt kreuzreagieren.

Dieses Schema wurde von *Sutcliffe* et al.<sup>[64]</sup> für die Auffindung eines neuen retroviralen Genprodukts angewendet. Bei der Analyse der Nucleotidsequenz des 3'-Endes des Genoms des Moloney-Maus-Leukämievirus fanden die Autoren einen offenen Leseraster, der sich über die codierende Region der bekannten viralen Genprodukte hinaus erstreckt. Antikörper gegen eine synthetische Pentadecapeptidsequenz des vermuteten Proteins erkannten kreuzreagierendes Material in infizierten Zellen. Auf die gleiche Weise identifizierten *Chomyn* et al.<sup>[63]</sup> die Polypeptide, die im ATPase-6-Gen und in den offenen Leserastern 1 und 3 der menschlichen Mitochondrien-DNA codiert sind. Die Antikörper, die gegen synthetische COOH-terminale Peptide (sieben bis elf Reste) der drei vermuteten Genprodukte gebildet wurden, immunpräzipitieren spezifisch die Komponenten 17, 12 und 24 der mitochondrialen Translationsprodukte von HeLa-Zellen. Eine umfassende Übersicht über Antikörper gegen synthetische Peptide wurde von *Walter* und *Doolittle* publiziert<sup>[65]</sup>.

## 5. Konstruktion von neuen Polypeptiden

Die Konstruktion von neuen, biologisch aktiven Polypeptiden ist der jüngste Zweig der Proteinchemie. Zwei Fragen sollten am Anfang gestellt werden: 1. Brauchen wir

neue Polypeptide oder Proteine? 2. Ist die Konstruktion von neuen Polypeptiden möglich?

Die erste Frage kann klar mit ja beantwortet werden. So könnten zum Beispiel Proteine mit neuen enzymatischen Aktivitäten für Forschung, Biotechnologie und Medizin von Nutzen sein. Sie könnten auch eine wichtige Rolle für den Umweltschutz spielen, wenn sie in der Lage wären, toxische Stoffe mit großer Lebensdauer wie DDT (Abb. 4) oder „Dioxin“ abzubauen.

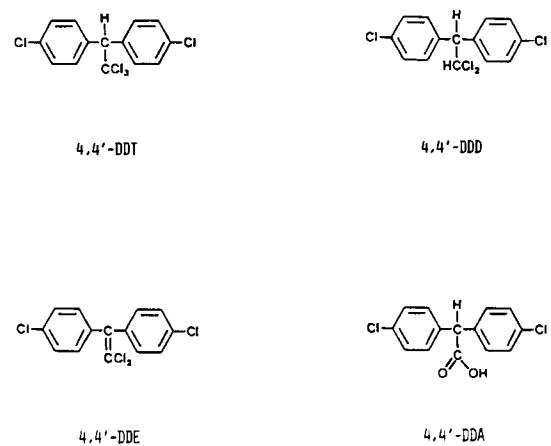


Abb. 4. 4,4'-DDT: 1,1,1-Trichlor-2,2-bis(*p*-chlorphenyl)-ethan; 4,4'-DDD: 1,1-Dichlor-2,2-bis(*p*-chlorphenyl)-ethan; 4,4'-DDE: 1,1-Dichlor-2,2-bis(*p*-chlorphenyl)-ethylen; 4,4'-DDA: Bis(*p*-chlorphenyl)-essigsäure. DDD, DDE und DDA sind Stoffwechselprodukte von DDT.

Die zweite Frage kann gegenwärtig nicht klar beantwortet werden. Wenn ein Mikroorganismus leicht an DDT als Substrat für sein Wachstum angepaßt werden könnte, wäre der biologische Weg zur Entwicklung neuer Enzyme dem theoretisch-chemischen überlegen. Es kommt hinzu, daß unsere Kenntnis des Faltungsmechanismus der Proteine noch unvollständig ist<sup>[84]</sup>. Wir können mit einiger Sicherheit die Sekundärstrukturelemente ( $\alpha$ -Helices,  $\beta$ -Stränge und „turns“) einer Polypeptidkette mit bekannter Aminosäuresequenz vorhersagen (siehe *Pfaff* et al.<sup>[58]</sup> und *Gutte* et al.<sup>[66]</sup> sowie jeweils zit. Lit.), nicht jedoch die Anordnung dieser Strukturelemente relativ zueinander in der dreidimensionalen biologisch aktiven Struktur eines Proteins. Es ist also möglich, eine  $\alpha$ -Helix, ein  $\beta$ -Faltblatt oder einen „turn“ zu konstruieren, nicht jedoch ein neues funktionelles Protein komplexer Struktur. Aus diesem Grund wurden bisher nur kleine, biologisch aktive Polypeptide mit relativ einfachen „eindimensionalen“ oder „zweidimensionalen“ Strukturen wie einer einzelnen  $\alpha$ -Helix<sup>[67]</sup>, einem  $\beta$ -Faltblatt<sup>[7,68]</sup> oder einer Mischung von beiden<sup>[69]</sup> konstruiert. Trotz dieser Einschränkung sind die Ergebnisse sehr interessant und ermutigend.

### 5.1. Ligandenbindende Polypeptide

Ein erster Schritt in Richtung der Konstruktion neuer Polypeptide sind Versuche, biologisch aktive Modelle von Bindungsstellen<sup>[68,70]</sup>, Peptidhormonen<sup>[9]</sup> und Proteinhibitoren<sup>[71]</sup> herzustellen. *Lee* und *Atassi*<sup>[70]</sup> bestätigten mit einer „Oberflächensimulationssynthese“ Position und Topologie einer antigenen Determinante von Lysozym. Diese antigene Determinante wird von Aminosäureresten gebildet, die in der dreidimensionalen Struktur benachbart

sind, in der Sequenz jedoch teilweise weit auseinander liegen. Ein lineares Decapeptid, in dem die Aminosäurereste, die die antigene Stelle konstituieren, entweder direkt oder über Brückenaminosäuren verbunden sind, ist immunologisch von der entsprechenden antigenen Determinante des nativen Lysozyms nicht unterscheidbar. Kullmann<sup>[68]</sup> konstruierte ein Tetracontapeptid, das die Bindungseigenschaften von natürlich vorkommenden Opioidrezeptoren imitiert. Die Aminosäuresequenz dieses künstlichen Rezeptors wurde anhand von Regeln zur Vorhersage von Sekundärstrukturen und der Kenntnis der Strukturen verschiedener Enkephalin- und Morphinderivate festgelegt. Sequenz und Faltung der Bindungsstelle von natürlichen Opioidrezeptoren sind noch nicht bekannt. Das hochaktive cyclische Hexapeptidmodell des Peptidhormons Somatostatin, das von Veber et al.<sup>[19]</sup> hergestellt wurde, ist bereits im Abschnitt 2.1 diskutiert worden.

Ein aus dreizehn Aminosäureresten bestehender kompetitiver Trypsininhibitor wurde von *Kitchell* und *Dyckes*<sup>[71]</sup> konstruiert. Dieser Modellinhibitor umfaßt die Trypsin-bindungsstelle (zwei antiparallele  $\beta$ -Stränge, Reste 13 bis 18 und 35 bis 39) des basischen Pankreas-Trypsininhibitors<sup>[72]</sup> und das Dipeptid D-Phe-Pro, das die beiden  $\beta$ -Stränge miteinander verbindet und ihre antiparallele Anordnung ermöglicht. Weitere synthetische Peptide als Modelle für Bindungsstellen sind beschrieben<sup>[66]</sup>.

## **5.2. Konstruktion von Polypeptiden mit enzymatischer Aktivität**

Bisher sind Beispiele für konstruierte synthetische Enzyme, die nur aus Polypeptidketten und – falls erforderlich – prosthetischen Gruppen bestehen, äußerst rar. In Kenntnis des Wirkungsmechanismus von Lysozym<sup>[73]</sup> und mit Hilfe der Regeln zur Vorhersage von Sekundärstrukturen<sup>[74]</sup> konstruierten Chakravarty et al.<sup>[67]</sup> ein  $\alpha$ -helikales Decapeptid (Abb. 5), das gegenüber den Substraten Chitin und Dextran beträchtliche lysozymähnliche Aktivität hat. Wahrscheinlich befinden sich die essentiellen Seitenkettencarboxygruppen<sup>[73]</sup> dieses Lysozymmodells und des natürlichen Enzyms in sehr ähnlicher Umgebung. Es wurde nicht untersucht, ob die Aktivität des synthetischen Decapeptids sequenzspezifisch<sup>[67]</sup> ist, oder ob Analoga mit gleichen Aminosäureresten, aber veränderter Sequenz die gleiche enzymatische Aktivität aufweisen.

In unserem Laboratorium wurde ein aus 34 Resten bestehendes Polypeptid (Abb. 5) konstruiert, das mit Nucleinsäuren interagiert<sup>[69]</sup>. Dieses Peptid und ein über Disulfidbrücken verknüpftes Dimer binden bevorzugt Cytidinphosphate und zeigen schwache Ribonucleaseaktivität (0.1% bzw. 2.5% der Aktivität von RNase A gegenüber tRNA als Substrat) mit hoher Präferenz für die Spaltung von Polynucleotidketten am 3'-Ende von 3'-Cytidylsäureresten. So erfreulich diese Ergebnisse waren, offenbarten sie einmal mehr, wie fragmentarisch unser Wissen über die Faktoren, die die Faltung von Proteinen bestimmen, ist<sup>[84]</sup>. Das aus 34 Resten bestehende Polypeptid war konstruiert worden, um spezifisch mit dem Trinucleotid GAA zu interagieren. Die Bindung von C durch das synthetische Produkt ist jedoch ungefähr 100mal stärker ( $K_D = 5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ ) als die Bindung von GAA, und die enzymatische Aktivität des künstlichen Polypeptids war nicht vorausgesehen worden. Die vorgeschlagene Sekundärstruktur des konstruierten Polypeptids<sup>[69]</sup> wurde durch Messung des Circular dichroismus teilweise bestätigt<sup>[75]</sup>. Eine weitergehende Untersuchung der Faltung war nicht möglich, da die Kristalle des synthetischen Peptids für eine Röntgen-Strukturanalyse nicht geeignet waren.

### **5.2.1. Konstruktion eines DDT-bindenden und -abbauenden Polypeptids – gegenwärtiger Stand und Perspektive**

Auch für die Konstruktion des 24 Reste enthaltenden DDT-bindenden Peptids<sup>[7]</sup> waren der Bau von Modellen und die Regeln von *Chou* und *Fasman*<sup>[76]</sup> sowie *Levitt*<sup>[77]</sup> zur Vorhersage von Sekundärstrukturen wichtig. Die abgeleitete Aminosäuresequenz hatte nach unseren Kenntnissen die Möglichkeit, eine stabile viersträngige antiparallele  $\beta$ -Faltblatt-Struktur (Abb. 6) zu bilden, wobei eine DDT-Bindungsstelle hoher Komplementarität unter Beteiligung der Seitenketten von Phe 14, His 16, Ile 21, Met 11 und Ile 4 entstünde. Da DDT wasserunlöslich ist und sich bei Aufnahme durch den Organismus in Membranen ansammelt, mußte das künstliche DDT-bindende Peptid gleichfalls lipophil sein.

Das Polypeptid wurde nach der Festkörpermethode<sup>[2,3]</sup> synthetisiert. Nach einer einzigen Gelfiltration hatte das synthetische Produkt die erwartete Aminosäurezusammensetzung; es war dünnenschichtchromatographisch homogen, konnte kristallisiert werden<sup>[7]</sup>, ergab einen symmetrischen

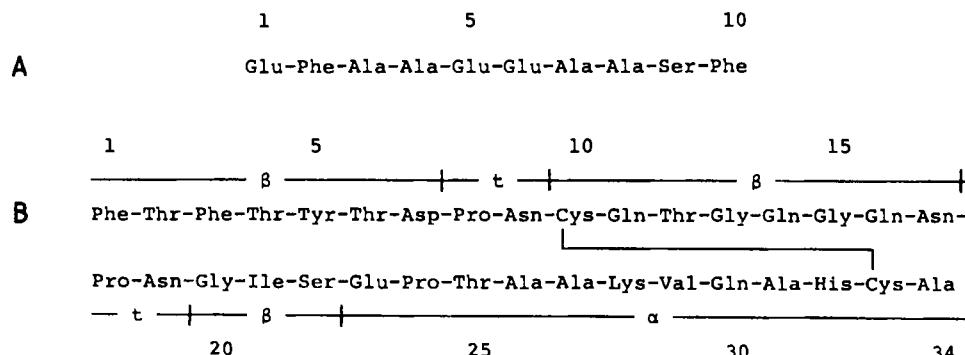


Abb. 5. Sequenzen des konstruierten  $\alpha$ -helikalen Decapeptids mit lysozymähnlicher Aktivität (**A**) [67] und der künstlichen, 34 Reste enthaltenden Ribonuclease (**B**) [69]. Als Sekundärstrukturelemente der letztgenannten wurden drei  $\beta$ -Stränge ( $\beta$ ), zwei „ $\beta$ -turns“ ( $\tau$ ) und ein  $\alpha$ -helikaler Abschnitt ( $\alpha$ ) postuliert.

1                            6                            12  
 H-Met-Thr-Phe-Ile-Arg-Pro-Asn-Val-Gly-Ala-Met-Ser-  
 13                            18                            24  
 Asn-Phe-Tyr-His-Tyr-Pro-Asn-[Ile]-[Ile]-Ile-Thr-Phe-OH

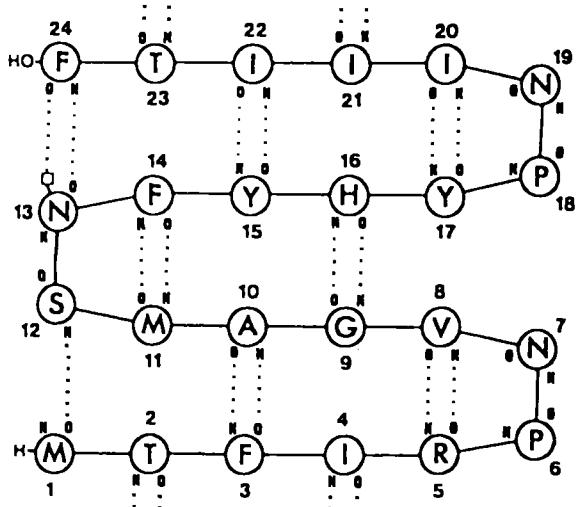


Abb. 6. Sequenz und postulierte Sekundärstruktur eines künstlichen, aus 24 Resten aufgebauten, DDT-bindenden Polypeptids. Die gepunkteten Linien stellen Wasserstoffbrücken zwischen NH- und CO-Gruppen des Rückgrats und der Seitenketten dar. Mit Genehmigung reproduziert aus [7] (Copyright 1983, Federation of European Biochemical Societies).

Peak bei der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) und hatte die korrekte Aminosäuresequenz beim Festphasenabbau nach *Edman*<sup>[8]</sup>.

Das konstruierte Peptid bindet DDT<sup>[7]</sup>. In Ethanol/0.05 M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>-Lösung (6 : 5, V/V) beträgt die Dissoziationskonstante des Komplexes  $K_D \approx 2 \cdot 10^{-5}$  M. Nucleotide wie z. B. 2'-CMP werden nicht gebunden. Die Interaktion von DDT mit einem Analogon des konstruierten Peptids, das die gleichen Aminosäurereste in veränderter Sequenz enthält, und mit Rinderserumalbumin ist deutlich schwächer ( $K_D \approx 3 \cdot 10^{-3}$  M bzw.  $1 \cdot 10^{-2}$  M).

Es wäre von theoretischer und praktischer Bedeutung, wenn das DDT-bindende Peptid in ein DDT-abbauendes oder modifizierendes Enzym umgewandelt werden könnte. In vivo ist membrangebundenes DDT ein schlechtes Substrat für Cytochrom-P-450-Enzyme, deren prosthetische Gruppe Häm ist. Es lassen sich anaerobe und aerobe Wege des DDT-Abbaus unterscheiden. Ein Beispiel für die erstgenannten ist die reduktive Dechlorierung von DDT zu DDD (Abb. 4)<sup>[78]</sup>, ein Beispiel für die letztgenannten ist die Bildung von DDA (Abb. 4), des Hauptausscheidungsprodukts von DDT im Urin von Säugern. Hydroxylierung der aromatischen Ringe von DDT ist auch zu erwarten.

Es sind mehrere einfache Cytochrom-P-450-Modellsysteme bekannt. *Sakurai et al.*<sup>[79, 80]</sup> benutzten Hämin-Cystein- und Hämin-Glutathion-Komplexe, um aromatische Substrate zu hydroxylieren, zu desalkylieren und um Methylwanderungen zu initiieren. Wir fanden, daß der Hämin-Cystein-Komplex auch DDT modifizierte. Dünnenschichtchromatographie und HPLC der Reaktionsgemische (Abb. 7A) zeigten, daß die Produkte polarer als DDT sind. Die Hauptprodukte wurden identifiziert<sup>[81, 82]</sup>, und

mögliche Mechanismen ihrer Entstehung sind in Abbildung 8 dargestellt. In Gegenwart des DDT-bindenden Peptids verläuft der durch Hämin-Cystein bewirkte DDT-Abbau ähnlich (Abb. 7B). Es wäre denkbar, daß die Verlängerung des aus 24 Resten bestehenden Peptids zur Einführung einer Häminbindungsstelle, die der DDT-Bindungsstelle gegenüber liegt, zu einem Komplex mit erhöhter DDT-abbauender Aktivität führt.

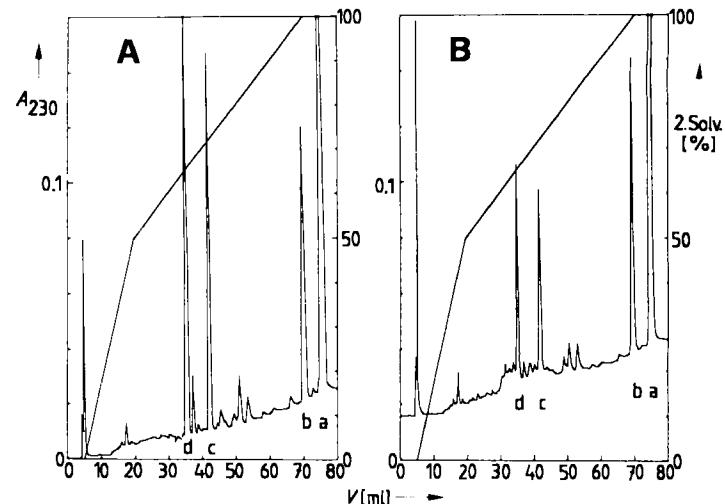
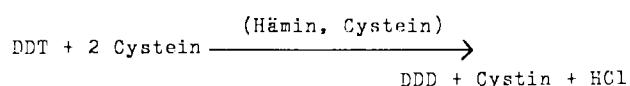
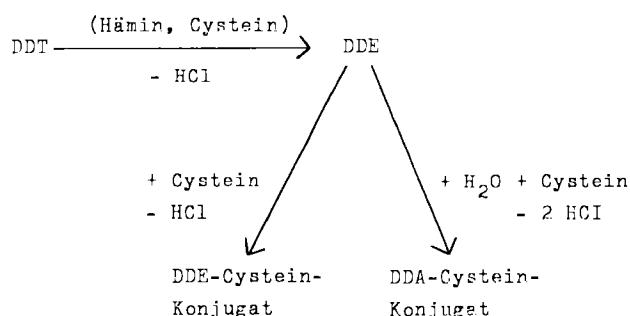


Abb. 7. HPLC-Trennung der in Abwesenheit (A) und in Gegenwart (B) des konstruierten DDT-bindenden Polypeptids gebildeten DDT-Abbauprodukte. DDT, Hämin und Cystein wurden in Ethanol/0.05 M Natriumacetat, pH 5.2 (6:5, V/V) bei 37°C 48 h inkubiert. Dann wurden die Reaktionsgemische zentrifugiert, und ein Aliquot des Überstandes wurde durch HPLC getrennt [Aquapore-RP-300-Säule (Brownlee), Lösungsmittelgradient (erstes Lösungsmittel: 0.1proz. Trifluoressigsäure, zweites Lösungsmittel: 60proz. Acetonitril in 0.1proz. Trifluoressigsäure)]. Die folgenden Produkte wurden identifiziert: a: DDT; b: DDD; c: DDE-Cystein-Konjugat; d: DDA-Cystein-Konjugat. Die millimolare Extinktionskoeffizienten von DDT und DDD sind  $\epsilon_{230}^{25} = 15.002$  bzw. 19.125.  $A_{230}$ : Absorption bei 230 nm; 2. Solv.: Anteil des zweiten Lösungsmittels.

### a) Reduktive Dechlorierung



b) Konjugatbildung



**Abb. 8.** Abbauwege von DDT bei pH 5.2 in Gegenwart des Hämin-Cystein-Cytochrome-P-450-Modellsystems.

Um die Eigenschaften des konstruierten DDT-bindenden Polypeptids *in vivo* zu untersuchen, wurde das Gen des künstlichen Polypeptids synthetisiert, in ein Plasmid inseriert und in *E. coli* kloniert. Diese Experimente wurden mit *E.-L. Winnacker et al.* durchgeführt<sup>[83]</sup>. Kennte man alle Regeln der Proteinfaltung und wären alle Schwierigkeiten der Expression fremder DNA in Bakterien oder höheren Organismen überwunden, könnten konstruierte Proteine in sehr reiner Form allein durch gentechnologische Methoden hergestellt werden. Dies würde ihre chemische Synthese überflüssig machen.

Die Aufklärung der Struktur des künstlichen, aus 24 Resten aufgebauten DDT-bindenden Polypeptids ist für die Zukunft der Konstruktion von neuen Proteinen wichtig. Man muß wissen, wie weit postulierte und tatsächlich auftretende Faltung übereinstimmen. Außerdem könnten bei bekannter Struktur der DDT-Bindungsstelle die Bindungseigenschaften des künstlichen Polypeptids nachträglich verbessert werden. Mit der Erzeugung von (vorzugsweise monoklonalen) Antikörpern gegen DDT wurde begonnen; mit ihnen sollte man natürliche und künstliche DDT-bindende Polypeptide vergleichen und DDT in biologischen Proben quantitativ bestimmen können. Schließlich wurde aus dem räumlichen Modell des konstruierten Peptids deutlich, daß auch „Dioxin“ nach geringfügiger Anpassung einiger Aminosäureseitenketten in die DDT-Bindungsstelle paßt. Der experimentelle Nachweis wird hierfür allerdings nicht leicht zu erbringen sein.

## 6. Ausblick

Die Konstruktion neuer Polypeptide ist noch sehr risikoreich; sie wird aber faszinierend, sobald ein funktionsfähiges System gefunden ist. Die Peptidsynthese wird besonders dann eine große Zukunft haben, wenn Chemiker mit Biologen zusammenarbeiten. Die Rolle des Proteinchemikers kann dabei eine sehr aktive sein, wenn er mit den modernen experimentellen Techniken der Molekularbiologie und Immunologie vertraut ist. Er sollte aber trotzdem nicht die Suche nach neuen Methoden zur schnellen chemischen Synthese von Proteinen mit guter Ausbeute und hoher Reinheit der Produkte aufgeben.

*Wir danken M. Linden für die Ausführung von DDT-Abbauexperimenten. Die Arbeiten unseres Laboratoriums wurden vom Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung unterstützt. Vor 1980 durchgeführte Arbeiten wurden mit Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der Stiftung Volkswagenwerk finanziert.*

Eingegangen am 9. November 1984,  
ergänzte Fassung am 4. April 1985 [A 550]

- [1] E. Wünsch (Hrsg.): *Houben-Weyl: Methoden der organischen Chemie*, Bd. 15, 4. Aufl., Thieme, Stuttgart 1974.
- [2] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85 (1963) 2149.
- [3] G. Barany, R. B. Merrifield in E. Gross, J. Meienhofer (Hrsg.): *The Peptides*, Vol. 2, Academic Press, New York 1979, S. 1.
- [4] B. Gutte, R. B. Merrifield, *J. Biol. Chem.* 246 (1971) 1922.
- [5] H. Yajima, N. Fujii, *J. Am. Chem. Soc.* 103 (1981) 5867.
- [6] S. Mojsow, R. B. Merrifield, *Biochemistry* 20 (1981) 2950.
- [7] R. Moser, R. M. Thomas, B. Gutte, *FEBS Lett.* 157 (1983) 247.
- [8] R. Moser, B. Gutte et al., unveröffentlicht.

- [9] D. F. Veber, R. M. Freidinger, D. S. Perlow, W. J. Paleveda, Jr., F. W. Holly, R. G. Strachan, R. F. Nutt, B. H. Arison, C. Homnick, W. C. Randall, M. S. Glitzer, R. Saperstein, R. Hirschmann, *Nature (London)* 292 (1981) 55.
- [10] F. M. Richards, P. J. Vithayathil, *J. Biol. Chem.* 234 (1959) 1459.
- [11] F. M. Richards, H. W. Wyckoff in P. D. Boyer (Hrsg.): *The Enzymes*, Vol. IV, 3. Aufl., Academic Press, New York 1971, S. 647.
- [12] C. J. T. Hoes, *Dissertation*, Universität Leiden 1983.
- [13] B. Gutte, *J. Biol. Chem.* 252 (1977) 663.
- [14] Z. Novak, *Diplomarbeit*, Universität Zürich 1984.
- [15] K. H. Hofmann, F. M. Finn, M. Limetti, J. Montibeller, G. Zanetti, *J. Am. Chem. Soc.* 88 (1966) 3633.
- [16] A. Bierzyński, P. S. Kim, R. L. Baldwin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (1982) 2470.
- [17] H. W. Wyckoff, D. Tsernoglou, A. W. Hanson, J. R. Knox, B. Lee, F. M. Richards, *J. Biol. Chem.* 245 (1970) 305.
- [18] M. C. Lin, B. Gutte, S. Moore, R. B. Merrifield, *J. Biol. Chem.* 245 (1970) 5169.
- [19] M. C. Lin, B. Gutte, D. G. Caldi, S. Moore, R. B. Merrifield, *J. Biol. Chem.* 247 (1972) 4768.
- [20] R. S. Hodges, R. B. Merrifield, *J. Biol. Chem.* 250 (1975) 1231.
- [21] H. Taniuchi, C. B. Anfinsen, A. Sodja, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 58 (1967) 1235.
- [22] H. Taniuchi, C. B. Anfinsen, *J. Biol. Chem.* 243 (1968) 4778.
- [23] A. Arnone, C. J. Bier, F. A. Cotton, V. W. Day, E. E. Hazen, Jr., D. C. Richardson, J. S. Richardson, A. Yonath, *J. Biol. Chem.* 246 (1971) 2302.
- [24] H. Taniuchi, D. R. Davies, C. B. Anfinsen, *J. Biol. Chem.* 247 (1972) 3362.
- [25] H. Taniuchi, C. B. Anfinsen, *J. Biol. Chem.* 246 (1971) 2291.
- [26] I. M. Chaiken, C. B. Anfinsen, *J. Biol. Chem.* 246 (1971) 2285.
- [27] C. B. Anfinsen, P. Cuatrecasas, H. Taniuchi in P. D. Boyer (Hrsg.): *The Enzymes*, Vol. IV, 3. Aufl., Academic Press, New York 1971, S. 177.
- [28] I. Parikh, L. Corley, C. B. Anfinsen, *J. Biol. Chem.* 246 (1971) 7392.
- [29] M. Juillerat, G. R. Parr, H. Taniuchi, *J. Biol. Chem.* 255 (1980) 845.
- [30] G. Winter, A. R. Fersht, A. J. Wilkinson, M. Zoller, M. Smith, *Nature (London)* 299 (1982) 756.
- [31] A. J. Wilkinson, A. R. Fersht, D. M. Blow, P. Carter, G. Winter, *Nature (London)* 307 (1984) 187.
- [32] Übersicht: 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.
- [33] K. P. Nambiar, J. Stackhouse, D. M. Stauffer, W. P. Kennedy, J. K. Eldredge, S. A. Benner, *Science* 223 (1984) 1299.
- [34] P. Sieber, W. Rittel, B. Riniker, *Helv. Chim. Acta* 55 (1972) 1243.
- [35] D. Yamashiro, C. H. Li, *J. Am. Chem. Soc.* 95 (1973) 1310.
- [36] P. Brazeau, W. Vale, R. Burgus, N. Ling, M. Butcher, J. Rivier, R. Guillemin, *Science* 179 (1973) 77.
- [37] J. Rivier, P. Brazeau, W. Vale, N. Ling, R. Burgus, C. Gilon, J. Yardley, R. Guillemin, *C. R. Acad. Sci.* 276 (1973) 2737.
- [38] A. M. Felix, M. H. Jimenez, C. T. Wang, J. Meienhofer, *Int. J. Pept. Protein Res.* 15 (1980) 342.
- [39] M. Brown, J. Rivier, W. Vale, *Science* 196 (1977) 1467.
- [40] R. Geiger, *Naturwissenschaften* 71 (1984) 252.
- [41] K. Itakura, T. Hirose, R. Crea, A. D. Riggs, H. L. Heyneker, F. Bolivar, H. W. Boyer, *Science* 198 (1977) 1056.
- [42] D. V. Goeddel, D. G. Kleid, F. Bolivar, H. L. Heyneker, D. G. Yansura, R. Crea, T. Hirose, A. Kraszewski, K. Itakura, A. D. Riggs, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 (1979) 106.
- [43] P. G. Katsoyannis, A. C. Trakatellis, S. Johnson, C. Zalut, G. Schwartz, *Biochemistry* 6 (1967) 2642.
- [44] T. Taniguchi, N. Mantei, M. Schwarzstein, S. Nagata, M. Muramatsu, C. Weissmann, *Nature (London)* 285 (1980) 547.
- [45] D. V. Goeddel, D. W. Leung, T. J. Dull, M. Gross, R. M. Lawn, R. McCandless, P. H. Seeburg, A. Ullrich, E. Yelverton, P. W. Gray, *Nature (London)* 290 (1981) 20.
- [46] H. Arnheimer, R. M. Thomas, T. Leist, M. Fountoulakis, B. Gutte, *Nature (London)* 294 (1981) 278.
- [47] H. Arnheimer, M. Ohno, M. Smith, B. Gutte, K. C. Zoon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 (1983) 2539.
- [48] M. Aguet, P. Salgam, B. Gutte, H. Arnheimer, *Eur. J. Biochem.* 146 (1985) 689.
- [49] D. Holenstein, *Diplomarbeit*, Universität Zürich 1984.
- [50] B. Gutte et al., unveröffentlicht.
- [51] F. A. Anderer, H. D. Schlumberger, *Biochim. Biophys. Acta* 97 (1965) 503.
- [52] R. A. Lerner, N. Green, H. Alexander, F.-T. Liu, J. G. Sutcliffe, T. M. Shinnick, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981) 3403.
- [53] R. Arnon, M. Sela, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 62 (1969) 163.
- [54] R. Arnon, E. Maron, M. Sela, C. B. Anfinsen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68 (1971) 1450.
- [55] F. Audibert, M. Jolivet, L. Chedid, J. E. Alouf, P. Boquet, P. Rivaille, O. Siffert, *Nature (London)* 289 (1981) 593.
- [56] T. P. Hopp, K. R. Woods, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981) 3824.

- [57] M. Levitt, *J. Mol. Biol.* 104 (1976) 59.  
 [58] E. Pfaff, M. Mussgay, H. O. Böhm, G. E. Schulz, H. Schaller, *EMBO J.* 1 (1982) 869.  
 [59] M. Schiffer, A. B. Edmundson, *Biophys. J.* 7 (1967) 121.  
 [60] K. Strohmaier, R. Franz, K. H. Adam, *J. Gen. Virol.* 59 (1982) 295.  
 [61] E. A. Emini, B. A. Jameson, E. Wimmer, *Nature (London)* 304 (1983) 699.  
 [62] G. Walter, K.-H. Scheidtmann, A. Carbone, A. P. Laudano, R. F. Doolittle, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980) 5197.  
 [63] A. Chomyn, P. Mariottini, N. Gonzalez-Cadavid, G. Attardi, D. D. Strong, D. Trovato, M. Riley, R. F. Doolittle, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 (1983) 5535.  
 [64] J. G. Sutcliffe, T. M. Shinnick, N. Green, F.-T. Liu, H. L. Niman, R. A. Lerner, *Nature (London)* 287 (1980) 801.  
 [65] G. Walter, R. F. Doolittle in J. K. Setlow, A. Hollaender (Hrsg.): *Genetic Engineering: Principles and Methodology*, Vol. 5, Plenum Press, New York 1983, S. 61.  
 [66] B. Gutte, R. Moser, S. Klauser, M. Weilenmann in J. Ricard, A. Cornish-Bowden (Hrsg.): *Dynamics of Biochemical Systems*, Plenum Press, New York 1984, S. 259.  
 [67] P. K. Chakravarty, K. B. Mathur, M. M. Dhar, *Experientia* 29 (1973) 786.  
 [68] W. Kullmann, *J. Med. Chem.* 27 (1984) 106.  
 [69] B. Gutte, M. Däumigen, E. Wittschieber, *Nature (London)* 281 (1979) 650.  
 [70] C.-L. Lee, M. Z. Atassi, *Biochem. J.* 159 (1976) 89.  
 [71] J. P. Kitchell, D. F. Dyckes, *Biochim. Biophys. Acta* 701 (1982) 149.  
 [72] R. Huber, D. Kukla, W. Steigemann, J. Deisenhofer, A. Jones in H. Fritz, H. Tschesche, L. J. Greene, E. Truscheit (Hrsg.): *Proteinase Inhibitors*, Springer, Berlin 1974.  
 [73] D. C. Phillips, *Sci. Am.* 215 (1966) 78.  
 [74] D. Kotelchuck, H. A. Scheraga, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 62 (1969) 14.  
 [75] R. Jaenicke, B. Gutte, U. Glatter, W. Strassburger, A. Wollmer, *FEBS Lett.* 114 (1980) 161.  
 [76] P. Y. Chou, G. D. Fasman, *Adv. Enzymol.* 47 (1978) 45.  
 [77] M. Levitt, *Biochemistry* 17 (1978) 4277.  
 [78] C. H. Walker, *Life Sci.* 8 (1969) 1111.  
 [79] H. Sakurai, *Chem. Pharm. Bull.* 28 (1980) 3437.  
 [80] H. Sakurai, S. Shimomura, K. Ishizu, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 101 (1981) 1102.  
 [81] H. Langer, *Diplomarbeit*, Universität Zürich 1984.  
 [82] T. Epprecht, *Diplomarbeit*, Universität Zürich 1985.  
 [83] B. Gutte et al. und E.-L. Winnacker et al., unveröffentlicht.  
 [84] R. Jaenicke, *Angew. Chem.* 96 (1984) 385; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 23 (1984) 395.

## Übergangsmetallpolysulfide, Koordinationsverbindungen mit rein anorganischen Chelatliganden

Von Mark Draganjac und Thomas B. Rauchfuss\*

Es ist schon sehr lange bekannt, daß sich manche Übergangsmetallsulfide in wäßrigem Ammoniumpolysulfid lösen. Obwohl anzunehmen war, daß sich dabei Metallpolysulfide bilden, hat man sich diesem Verbindungstyp erst in den letzten Jahren intensiver zugewandt. Dabei konnte eine Fülle neuer Komplexe mit Polysulfido-Chelatliganden  $S_n^{2-}$  ( $n=2, 3, 4 \dots$ ) isoliert und charakterisiert werden. Die Komplexe interessieren bezüglich ihrer Struktur und Reaktivität, aber auch im Hinblick auf mögliche Anwendungen; mit ihnen können Schwefelringe definierter Größe gezielt hergestellt werden, und es deutet sich an, daß sie auch in der Katalyse Verwendung finden könnten.

### 1. Einführung

Die erste Veröffentlichung zum Thema dieser Übersicht, das Hauptgruppen- und Koordinationschemie gleichermaßen berührt, erschien vor nunmehr über 80 Jahren, als Hofmann und Höchtl über  $(NH_4)_2PtS_5 \cdot 2H_2O$  und verwandte Verbindungen berichteten<sup>[1]</sup>. Erst in den sechziger Jahren aber waren die synthetischen, spektroskopischen und röntgenographischen Methoden soweit entwickelt, daß ein systematisches Studium von Polysulfido-Metallkomplexen möglich wurde. Da sich die Koordinationschemiker auf der Suche nach neuen Liganden zunehmend der Organischen Chemie zuwenden, ist die Entdeckung oder Wiederentdeckung einer neuen Klasse anorganischer Chelatliganden ein seltenes Phänomen.

Dieser Fortschrittsbericht beschreibt Synthese, Struktur und Reaktionsverhalten molekularer Übergangsmetallverbindungen mit Polysulfido-Liganden. Wichtige Aspekte

dieser Chemie betreffen auch Verbindungen mit Disulfido-Liganden; deren Koordinationschemie wurde jedoch kürzlich beschrieben<sup>[2]</sup> und wird deshalb hier nur insoweit diskutiert, als sie unmittelbar mit der von Polysulfiden in Beziehung steht. Wir beschreiben zuerst Synthese und Struktur von Übergangsmetallpolysulfiden und schildern dann ihr Reaktionsverhalten am Beispiel von Pentasulfidotitan- und -molybdän-Komplexen.

### 2. Synthese und Struktur von Übergangsmetallpolysulfiden

#### 2.1. Die Titan- und Vanadiumtriaden

$[Cp_2TiS_5]$  ( $Cp=\eta^5-C_5H_5$ ), das zuerst von Samuel<sup>[3]</sup> und Schmidt et al.<sup>[4]</sup> beschrieben wurde, ist einer der am einfachsten herzustellenden Polysulfido-Komplexe und war Gegenstand zahlreicher Studien. Mit einigen Verbesserungen<sup>[5]</sup> ist die Synthese von Köpf et al.<sup>[6]</sup>, die von wasserhaltigem Ammoniumpolysulfid und  $[Cp_2TiCl_2]$  ausgeht, nach wie vor für größere Mengen am geeignetsten. Daneben ste-

\* Prof. Dr. T. B. Rauchfuss, Dr. M. Draganjac  
School of Chemical Sciences, University of Illinois  
Urbana, IL 61801 (USA)