

ANGEWANDTE CHEMIE

98. Jahrgang 1986

Heft 9

Seite 765–842

Proteinkristallographie und Computer-Graphik – auf dem Weg zu einer planvollen Arzneimittelentwicklung

Von Wim G. J. Hol*

“The coincidence of the ideal of progress with the advance of science is not a mere coincidence. Before this advance men placed the golden age in remote antiquity. Now they face the future with a firm belief that intelligence properly used can do away with evils once thought inevitable. To subjugate devastating disease is no longer a dream; the hope of abolishing poverty is not utopian”.

John Dewey in
“Democracy and Education” (1916)

1. Einleitung

Der Ursprung von Krankheiten kann vielfältig sein. Sie können von außen kommen – nach Infektionen mit Viren, Bakterien, Protozoen, Würmern oder anderen Parasiten. Sie können von innen kommen – angeboren sein – beispielsweise bei genetisch bedingten Krankheiten wie juvenilem Diabetes, Sichelzellenanämie oder Down-Syndrom. Oder sie können durch einen Schaden im Verlaufe des Lebens hervorgerufen werden wie etwa Krebs.

Jahrtausendlang war die Menschheit im Kampfe gegen Krankheiten von zufälligen Entdeckungen abhängig. Aufmerksame Beobachtungen führten zu einer bemerkenswerten Vielfalt an nützlichen Kräutern, die bereits den frühen Menschen bekannt waren. In den letzten drei oder vier Jahrhunderten wurden die aufmerksamen Beobachtungen durch wissenschaftliche Überlegungen unterstützt. Trotzdem beträgt die Anzahl neuer Medikamente, die insgesamt pro Jahr auf den Weltmarkt gebracht werden, vielleicht nicht einmal ein halbes Dutzend. Zur gleichen Zeit werden Menschen weiterhin durch Leiden wie Lepra, Leishmaniose und Arthritis geschwächt, Malaria kommt in einer

ungeheuren Welle erneut über die Menschheit, und Krebs zerstört langsam die Lebenskräfte von alten und jungen Menschen.

Zwar gab es niemals zuvor so viele Möglichkeiten zur Beseitigung von Krankheiten wie heute, doch hat es sich gezeigt, daß dieses Ziel nur schwer erreicht werden kann. Einer der Gründe ist die inhärente Schwierigkeit, sichere und zuverlässige Medikamente zu entwickeln. Die augenblickliche Explosion unseres Wissens über die biochemische Maschinerie von Mensch und Krankheitserreger bis herab zum atomaren Detail erlaubt es jedoch, bezüglich der Entdeckung neuer Pharmaka optimistisch zu sein. Dieser Optimismus basiert auf den enormen methodischen Fortschritten in einer Reihe von Arbeitsgebieten: Proteinreinigung, Gen- und Proteinsequenzierung, Gentechnologie, Oligonucleotidsynthese, Proteinkristallographie, rechnergestützte Moleküldarstellung und -modellierung (Computer-Graphik) und theoretische Biochemie.

In dieser Übersicht wird gezeigt, daß die intensive, einander stimulierende Kooperation zwischen den modernsten biochemischen Techniken und der medizinischen Chemie den beteiligten Laboratorien faszinierende Möglichkeiten zur Entwicklung neuer Pharmaka eröffnet. Betrachten wir nun, wie solche Zusammenarbeit sich abspielen könnte und wie sie sich bereits in begrenztem Umfang abspielt (siehe auch ^[1]).

[*] Prof. Dr. W. G. J. Hol
Laboratory of Chemical Physics
University of Groningen
Nijenborgh 16, NL-9747 AG Groningen (Niederlande)

2. Eine neue Strategie zur planvollen Arzneimittelentwicklung (Drug Design)

Bis vor kurzem beruhten Entwicklung oder Entdeckung neuer Pharmaka im wesentlichen auf den folgenden Strategien:

1. Detaillierte Untersuchungen der Wirkstoffe von Kräutern und Pflanzen, die von der Volksmedizin als wichtig erachtet wurden;
2. Verfolgung zufälliger Befunde von modernen physiologischen und biochemischen Untersuchungen;
3. intensives Prüfen aller aussichtsreich erscheinenden Substanzen (Screening);
4. Eingriffe in bekannte Schlüsselschritte des Stoffwechsels oder in andere biochemische Aktivitäten von Mensch und Krankheitserreger.

Penicillin ist ein ausgezeichnetes Beispiel für die zweite Kategorie. Malaria liefert Beispiele für die anderen drei Kategorien: *Chinin* und *Qinghaosu* (Artemisin) sind die Wirkstoffe der chinesischen Pflanze *Artemisia annua*, die in der Volksmedizin verwendet wurde^[2,3]. *Mefloquin* ist das Ergebnis eines ausgedehnten Screeningprogramms am Walter Reed Army Hospital^[3] (wird aber aus Kostengründen nicht kommerziell produziert). *Pyrimethamin* ist ein selektiver Inhibitor der Dihydrofolat-Reduktase des Malariaerregers. Das Auffinden dieser Verbindung war ein großer Erfolg bei der biochemischen Untersuchung eines Schlüsselschritts im Parasiten-Metabolismus^[4].

Trotz Einfallsreichtum und Raffinesse leiden diese vier Strategien jedoch darunter, daß das zu treffende Ziel unsichtbar ist. Im Grunde entspricht dies einem Boxkampf mit verbundenen Augen – nur durch Versuch und Irrtum wird entdeckt, wo sich der Gegner befindet und wie er k.o. geschlagen werden kann. Sicher wäre es hilfreich, wenn der Gegner sichtbar gemacht werden könnte (obwohl man auch dann noch ein gewaltiges Problem vor sich hat!), und genau das soll mit einer neuen Strategie erreicht werden, nach der seit kurzem in mehreren Laboratorien gearbeitet wird.

Der Eckpfeiler dieses neuen Ansatzes ist die genaue Kenntnis der dreidimensionalen Struktur von potentiellen Zielproteinen oder anderen Biomakromolekülen, z. B. DNA. Dafür benötigt man die *Röntgen-Strukturanalyse* als einzige Methode, mit der exakte Informationen über die dreidimensionale Gestalt von Biomakromolekülen mit relativen Molekulargewichten von einigen Tausend bis zu einer Million erlangt werden können. Weiterhin benötigt man *Computer-Graphik*, denn nur so kann man die komplizierten Strukturen, die von den Kristallographen aufgeklärt werden, auch visuell analysieren. Solche Graphiken sind auch bequeme Zwischenglieder zu Datenbanken mit bekannten Strukturen und schließlich zu hypothetischen Strukturen, die sich durch *Molekülmechanik*- und *Moleküldynamik*-Rechnungen erzeugen lassen.

Um diese in letzter Zeit entwickelten Techniken zur vollen Blüte zu treiben, müssen die potentiellen Zielproteine in ausreichenden Mengen vorhanden sein. Bis vor einigen Jahren war dies der Engpaß der gesamten Strategie, weil oft nur minimale Materialmengen zur Verfügung standen. Hier kamen die Techniken zur Erzeugung *rekombinanter DNA* und zur *Genklonierung* zur Hilfe. Sie wurden unter-

stützt durch wirksame *Mikrosequenzierungsmethoden* und eine stete Verbesserung der *Reinigungsmethoden für Proteine*. Obwohl sich jedes Projekt im Detail von den anderen unterscheidet, kann folgendes typisches Beispiel gegeben werden: Einer Gruppe von Biochemikern gelingt die Darstellung einer kleinen Menge eines medizinisch wichtigen Proteins. Ein Gasphasensequenator-Lauf etabliert die Aminosäuresequenz der ersten 20 bis 80 Reste. Dem folgt die *Oligonucleotid-Synthese* einer Serie von DNA-Fragmenten, die möglicherweise mit dem für dieses Protein codierenden Gen hybridisieren. Wenn das Gen identifiziert ist, wird es in einen anderen Organismus übertragen, wo es exprimiert wird, d. h. dieser Organismus produziert dann große Mengen des erwünschten Proteins. Nach einer Reinigung, die erstaunlich einfach sein kann, falls es geeignete *monoklonale Antikörper* gibt, stehen schließlich Gramm-Mengen des Proteins zur Verfügung. Damit hat man die Voraussetzungen sowohl für eine vollständige biochemische und kinetische Charakterisierung als auch für die Züchtung geeigneter Kristalle für die Röntgen-Strukturanalyse geschaffen.

Dies ist, stark vereinfacht, das Vorspiel für den Einsatz von Röntgen-Strukturanalyse, Computer-Graphik, Quantenmechanik sowie der Molekülmechanik und -dynamik. Die letztgenannten Techniken führen zu zahlreichen Vorschlägen, welche Arten von Molekülen zu Pharmaka taugen könnten. Diese Moleküle müssen dann synthetisiert und auf ihre Wirksamkeit getestet werden. Soweit ist kaum ein Unterschied zu den konventionellen Methoden vorhanden. Jedoch ermöglicht nun die Kenntnis der dreidimensionalen Struktur der Zielproteine eine wichtige Rückkopplung. Da Proteinkristalle etwa 50% Lösungsmittel enthalten, können kleine Moleküle in vielen Fällen durch die Kanäle diffundieren und ihren Bindungsplatz am Protein erreichen und besetzen. Wenn das funktioniert, ermöglicht die Differenz-Fourier-Technik eine schnelle Strukturbestimmung des Komplexes zwischen Protein und kleinem Molekül. Wenn das nicht funktioniert, kann man versuchen, den Komplex in Lösung zu erzeugen und dann Kristalle zu züchten. Hat man röntgentaugliche Kristalle des Komplexes erhalten, wird die Röntgen-Strukturanalyse gewöhnlich erheblich beschleunigt, wenn die Struktur des nichtkomplexierten Proteins bekannt ist, da die „Molekülersatz-Methode“^[5] eingesetzt werden kann.

Die genauen dreidimensionalen Strukturen der Komplexe eines Proteins mit diversen kleinen Molekülen sind eine erfolversprechende Grundlage für die Entwicklung neuer Verbindungen, die von diesem Protein gebunden werden. Es kommt allerdings auch vor, daß die kleinen Moleküle in überraschenden Positionen binden; die Vorhersagemethoden sind noch längst nicht vollkommen. Darüber hinaus können die Untersuchungen mehr oder weniger erhebliche Konformationsänderungen des Proteins aufdecken, deren Kenntnis bei der Entwicklung neuer Verbindungen ausgenutzt werden kann. Bei diesem „Cyclus zur planvollen Arzneimittelentwicklung“ (Abb. 1) erweitert jede bekannte Struktur eines Komplexes zwischen Protein und einer neuen Verbindung die Datenbasis, von der aus dann immer konkretere Ideen für pharmazeutisch aktivere Verbindungen ausgehen können. Das Ziel ist natürlich, diesen Cyclus durch Fertigstellung eines erfolgreichen neuen Medikaments so schnell wie möglich zu verlassen.

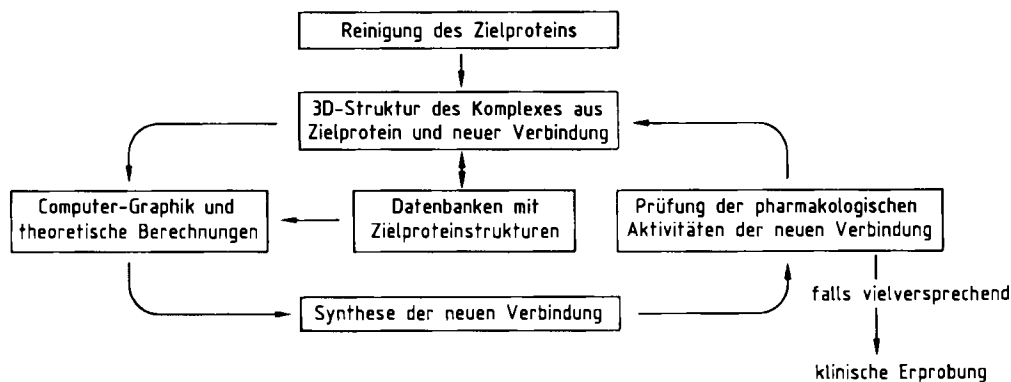


Abb. 1. Ein „Cyclus zur planvollen Arzneimittelentwicklung“ (Drug Design) unter Verwendung der dreidimensionalen Strukturen von Komplexen aus Zielproteinen und kleinen Molekülen (Liganden).

3. Drei Fälle

Man kann drei Fälle für die Entwicklung eines neuen Medikaments auf der Basis von potentiellen Zielproteinstrukturen in Betracht ziehen:

1. Ein Humanprotein arbeitet nicht ordnungsgemäß oder muß aus anderen Gründen in seiner Aktivität moduliert werden. Dann wird lediglich die dreidimensionale Struktur dieses Proteins benötigt. Proteine von Krankheitserregern müssen nicht in Erwägung gezogen werden.
2. Das mögliche Ziel ist ein Schlüsselprotein in einem infektiösen Organismus, zu dem kein homologes Humanprotein existiert. Dann wird die dreidimensionale Struktur des ausgewählten Proteins des Krankheitserregers zum Startpunkt; Humanproteinstrukturen brauchen nicht berücksichtigt zu werden.
3. Das Zielprotein gehört zu einem schädlichen Organismus, und es existiert ein homologes Humanprotein. In diesem Falle muß das Zielprotein so selektiv inhibiert werden, daß das entsprechende Humanprotein nicht beeinträchtigt wird; für den Entwurf des gewünschten selektiven Inhibitors sollten die dreidimensionalen Strukturen von beiden homologen Proteinen verfügbar sein (Abb. 2).

Natürlich sind die Grenzen zwischen diesen Fällen keineswegs strikt. Es gibt Projekte, bei denen zwei dieser Fälle gleichzeitig in Betracht gezogen werden können. Trotzdem ist die Einteilung sinnvoll, wie die folgenden drei Abschnitte zeigen.

4. Medikamente, die auf Humanproteine wirken

4.1. Sichelzellenanämie

Hämoglobin gehört zu den ersten strukturell aufgeklärten Proteinen, und seine Struktur gehört ebenfalls zu den ersten, die zur Entwicklung neuer Verbindungen mit vorhergesagten physiologischen Wirkungen eingesetzt wurden. Die Bindungsstelle für den natürlichen Effektor 2,3-Diphosphoglycerat in der Desoxykonformation des Human-Hämoglobins^[6] haben Beddell et al.^[7] als Modell-Rezeptorstelle ausgewählt. Sie konzipierten und synthetisier-

ten eine Serie von Bibenzylidicarbaldehyd-Derivaten, die den erwünschten Effekt hervorriefen, nämlich eine Stabilisierung der Desoxykonformation und eine daraus folgende Rechtsverschiebung der Sauerstoffsättigungskurve.

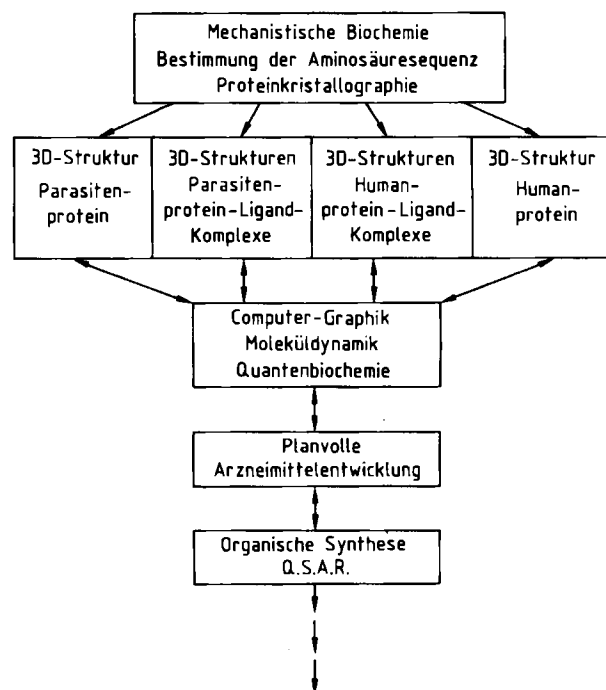


Abb. 2. Flußdiagramm von aufeinanderfolgenden Schritten in einer Strategie zur planvollen Arzneimittelentwicklung, in der die Kenntnis der Struktur von Schlüsselproteinen eine Rolle spielt. Q.S.A.R. bedeutet quantitative Struktur-Wirkungs-Beziehungen.

Diesem einleitenden Experiment folgte ein Versuch, Medikamente zur Linderung der klinischen Symptome der Sichelzellenanämie zu entwickeln, die vom Sichelhämoglobin HbS^[8] verursacht werden. Dazu wurden substituierte Benzaldehyde vorgesehen, die bevorzugt an Human-Hämoglobin in Oxykonformation binden sollten, und zwar an eine Position zwischen den N-terminalen Resten der α -Untereinheiten. Tatsächlich erzeugten diese Verbindungen sowohl in verdünnten Hämoglobinlösungen als auch in Vollblut den erwünschten Effekt, nämlich Linksverschiebung der Sauerstoffsättigungskurve. Interessanterweise ist eine

dieser Verbindungen auch ein wirksamer Inhibitor der Sichelbildung von Erythrocyten bei Patienten mit Sichelzellenanämie. Dieser Inhibitor könnte sich als klinisch verwendbarer Antisichelzellen-Wirkstoff erweisen^[8].

Die Konzeption von Antisichelzellen-Wirkstoffen ist schwierig, da zwei einander widersprechende Erfordernisse ausbalanciert werden müssen: 1. Es sollen keine Desoxy-HbS-Fasern gebildet werden, die den Durchgang der Erythrocyten durch die Kapillaren verhindern; 2. die Sauerstoff-Transportkapazität darf nicht zu drastisch herabgesetzt werden.

Mehrere andere Arbeitsgruppen verwenden die dreidimensionale Struktur des Hämoglobinmoleküls, um Antisichelzellen-Wirkstoffe zu entwickeln, beispielsweise *Walder et al.*^[9] und *Abraham et al.*^[10]. Durch die Arbeiten von *Abraham et al.* wurden die Strukturen von Komplexen des Hämoglobins mit einer Reihe von Verbindungen bekannt. Einige davon sind in recht unerwarteter Weise gebunden^[11].

Zukünftige Anstrengungen zur Entwicklung von Antisichelzellen-Pharmaka werden darüber hinaus von der Kenntnis der hochaufgelösten Strukturen von Oxy- und Desoxyhämoglobin profitieren, die nunmehr zur Verfügung stehen^[12]. Weiterhin wurde die Genauigkeit der Desoxyhämoglobin-S-Struktur kürzlich beträchtlich verbessert^[13,14]. Das ist besonders wichtig, weil von der Struktur des kristallbildenden HbS-Aggregats vermutet wird, daß sie der Struktur des Polymers im Erythrocyten stark ähnelt^[13,14].

Unter den für die planvolle Arzneimittelentwicklung interessanten Humanproteinen ist Hämoglobin eines der sehr wenigen, deren dreidimensionale Struktur exakt bekannt ist. Jedoch kann auch die dreidimensionale Struktur eines homologen Proteins aus einem anderen Organismus als Startpunkt für die Ermittlung der Struktur eines Humanproteins dienen; dabei darf aber nicht vergessen werden, daß Aminosäureaustausche mehr oder weniger subtile Konformationsänderungen verursachen. Mehrere dieser potentiell nützlichen homologen Strukturen sind in Tabelle 1 zusammengefaßt, einige werden im folgenden diskutiert.

4.2. Bluthochdruck

Bluthochdruck ist in der Industriegesellschaft eines der wichtigsten Gesundheitsprobleme; er trägt zum Herzinfarkt, Schlaganfall und Nierenversagen bei. Man weiß, daß das Hormon Angiotensin II ein wichtiger Faktor bei der Blutdruckregulation ist, wenn auch seine Wirkungsweise noch nicht voll verstanden wird. Höhere Hormonkonzentrationen führen zu höherem Blutdruck. Das Hormon entsteht im Körper in zwei Schritten (Abb. 3). Zuerst wird Angiotensin I durch das Enzym *Renin* vom inaktiven Prohormon Angiotensinogen abgespalten. Dann entfernt das *Angiotensin-konvertierende Enzym* (ACE) das C-terminale Dipeptid und erzeugt dadurch Angiotensin II. Die Inhibition von Renin oder ACE oder beiden würde die Angiotensin-II-Konzentration vermindern und damit zur Blutdrucksenkung beitragen. Bisher ist die dreidimensionale Struktur von ACE noch nicht bekannt. Man weiß jedoch, daß dieses Enzym eine Zink-Peptidase ist, und man kennt die Strukturen von zwei solchen Proteasen mit hoher Genauigkeit: Carboxypeptidase A und Thermolysin^[15,16].

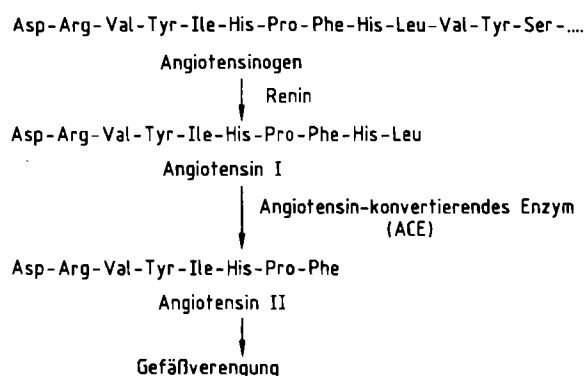


Abb. 3. Freisetzung des Oligopeptids Angiotensin II durch die proteolytischen Enzyme Renin und Angiotensin-konvertierendes Enzym (ACE). Angiotensin II wirkt bei der Regulation des Blutdrucks mit.

Die Analogie zwischen den katalytisch aktiven Zentren von ACE und Carboxypeptidase A verwendeten *Cushman et al.*^[17], um einen spezifischen ACE-Inhibitor zu entwick-

Tabelle 1. Proteine mit bekannter dreidimensionaler Struktur, die für die planvolle Entwicklung von Arzneimitteln nützlich sein könnten, und zwar solchen, die nur mit Humanproteinen wechselwirken.

Protein	Herkunft	Krankheit	Potentiell Human-Zielpotein	Lit.
Hämoglobin	Mensch	Sichelzellenanämie	Hämoglobin S	[8-14]
Phospholipase A ₂	Pankreas, Schlangengift	Entzündung	intrazelluläre Phospholipase A ₂	[55-59]
Dihydrofolat- Reduktase	Bakterien	Krebs	Dihydrofolat-Reduktase	[33]
Carboxypeptidase A	Rind	Bluthochdruck	Angiotensin-konvertie- rendes Enzym (ACE)	[15, 18-20]
Thermolysin	Bakterien			[16, 21-24]
Aspartyl-Proteasen	Bakterien	Bluthochdruck	Renin	[25-27, 30, 121, 122]
Elastase	Schwein	Emphysem	Leukocyten-Elastase	[123]
Subtilisin: Eglin	Bakterien			
α ₁ -Proteinase- Inhibitor	Mensch	Emphysem Thrombose	α ₁ -Proteinase-Inhibitor Antithrombin	[124]
Calmodulin	Ratte	Psychose	Calmodulin	[125, 126]
Troponin C	Huhn, Truthahn		Troponin C	[127-129]

keln. Die erste synthetisierte Carboxyalkanoyl-aminosäure, Succinyl-L-prolin, hatte einen I_{50} -Wert von 330 μM für die Inhibition von ACE aus Kaninchenlunge. Von diesem Startpunkt aus wurden viele modifizierte Verbindungen synthetisiert, wobei die Architektur des aktiven Zentrums der Carboxypeptidase als Leitbild diente. Ersatz der Carboxygruppe ergab 1-(3-Mercaptopropanoyl)-L-prolin mit einem I_{50} -Wert von 0.2 μM . Weitere Veränderungen führten zum bisher wirksamsten Inhibitor 1-(D-3-Mercapto-2-methylpropanoyl)-L-prolin mit einem I_{50} -Wert von 0.023 μM ^[17]. Dieser Inhibitor ist nun unter dem Namen Captopril auf dem Markt. Er kann als erstes kommerziell erhältliches Medikament angesehen werden, das zumindest teilweise anhand der bekannten Kristallstruktur eines Proteinmoleküls entwickelt worden ist. Dieser Erfolg war natürlich ein Anreiz für weitere Untersuchungen über die Bindung von Inhibitoren an die beiden Enzyme Carboxypeptidase A^[18–20] und Thermolysin^[21–24].

Als vielversprechende Alternative zur Inhibition des Stoffwechselweges von Angiotensinogen zu Angiotensin II wird die Aspartyl-Protease Renin betrachtet, weil sie besonders spezifisch katalysiert. Da die hochaufgelösten Strukturen von mehreren bakteriellen Aspartyl-Proteasen^[25–27] sowie die Aminosäuresequenz von Humanrenin bekannt waren^[28,29], konnten Modelle des Humanenzym durch Computer-Graphik abgeleitet werden. Diese Modelle dienten als Basis für die Vorhersage der Substratbindungsstellen^[30]. Detaillierte kristallographische Daten über die Struktur eines Komplexes aus einer Aspartyl-Protease und einem Inhibitor zeigten, daß die Vorhersagen im wesentlichen korrekt waren^[31]. Dieser Bereich wird intensiv bearbeitet, was beispielsweise durch eine Veröffentlichung aus einer pharmazeutischen Firma der USA^[32] über die erfolgreiche Kristallisation des Komplexes zwischen dem Renin der Maus und einem Inhibitor veranschaulicht wird.

4.3. Krebs

Krebs fällt in die Kategorie von Krankheiten, in der erfolgreiche Medikamente nur mit Humanproteinen spezifisch reagieren müssen. Obwohl man die Struktur des Komplexes zwischen dem weitverbreiteten Cytostaticum Methotrexat und einer bakteriellen Dihydrofolat-Reduktase im Detail kennt^[33], ist es kaum vorstellbar, wie diese Kenntnisse bei der Entwicklung besserer Cytostatica eingesetzt werden könnten: Dihydrofolat-Reduktase ist eben zu wichtig für *alle* sich teilenden Zellen. Diese Schlüsselrolle des Zielproteins in nicht-transformierten Zellen erklärt die schwerwiegenden Nebeneffekte von Methotrexat. Aus ähnlichen Gründen gibt es auch bei anderen Cytostatica enorme Schwierigkeiten.

Das „ideale“ Cytostaticum sollte mit einem *spezifischen* Merkmal der Tumorzelle wechselwirken, das von entscheidender Bedeutung für die unkontrollierte Zellteilung ist. Solche spezifische Differenz zwischen normaler Zelle und Tumorzelle ist möglicherweise durch die Punktmutation im *ras*-, „Oncogen“ gegeben, die dem davon abgelesenen p21-Protein transformierende Eigenschaften verleiht^[34–36]. Wierenga und Hol beobachteten eine Sequenzanalogie zwischen den ersten 30 Resten von p21 und einer Familie

von Dinucleotid-bindenden Proteinen und konstruierten davon ausgehend ein hypothetisches Modell für diesen Teil von p21^[37] (Abb. 4). Diese 30 Reste könnten sich zu

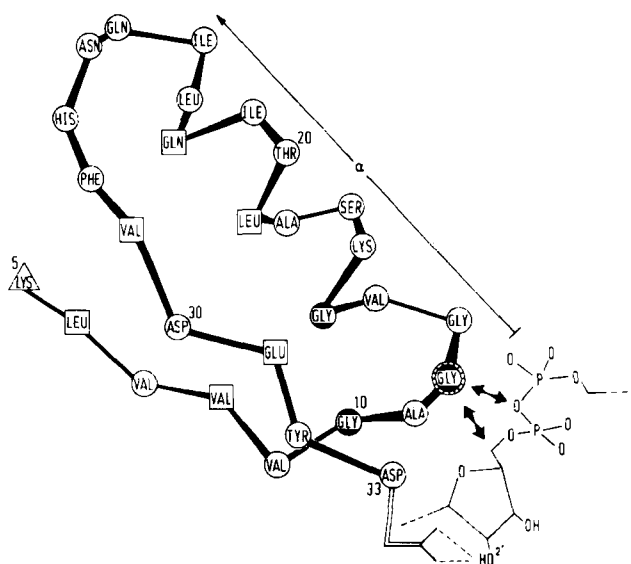


Abb. 4. Hypothetisches Modell der Reste 5 bis 33 des vom *ras*-Oncogen codierten p21-Proteins. Auch der vorhergesagte Ribosediphosphat-Bereich eines gebundenen Nucleotids ist dargestellt. Mutationen von Glycin-12 würden notwendigerweise eine Seitenkette in diese Position bringen und dadurch die postulierte Bindung des Nucleotids beeinträchtigen [37].

einer kompakten $\beta\alpha\beta$ -Einheit falten, in der Glycin in Position 12 sich dicht an der Phosphatgruppe eines gebundenen Nucleotids befindet. In mehreren Arten von Tumorzellen ist dieses Glycin-12 zu einem anderen Rest mutiert (z. B. [34–36, 38–41]). Im hypothetischen $\beta\alpha\beta$ -Modell^[37] hätte dieser Austausch eine sterische Hinderung zwischen der Seitenkette des Nicht-Glycin-Restes und dem Nucleotidphosphat und somit eine veränderte Bindung zur Folge. Es wird postuliert, daß damit die Funktion von p21 in einer Weise gestört wird, die die Zellteilung außer Kontrolle geraten läßt. Wäre dieses Modell korrekt, dann könnten möglicherweise Wirkstoffe entwickelt werden, die durch ihre Bindung an das mutierte p21 seine katastrophalen Eigenschaften unterdrücken. Solche Wirkstoffe würden einen kritischen Unterschied zwischen Tumorzelle und normaler Zelle ausnutzen und wären damit im Gegensatz zu den gegenwärtigen Cytostatica nicht mit Nebenwirkungen behaftet.

Es sei erwähnt, daß die Vorhersagen von Wierenga und Hol für die Struktur von p21 keineswegs die einzigen sind^[42–46]. Weiterhin wurde durch raffiniert ausgeführte gezielte Mutationen demonstriert, daß alle Nicht-Glycin-Reste in Position 12 dem p21-Protein kreberzeugende Eigenschaften verleihen – mit Ausnahme von Prolin^[47]. Das erscheint kaum mit der vorhergesagten Bindung des Dinucleotids an eine $\beta\alpha\beta$ -Einheit vereinbar. Jedoch selbst wenn p21 eine Struktur hat, die von allen Vorhersagen abweicht, bleibt der Gedankengang des letzten Absatzes korrekt: Ein hochspezifisches Merkmal in einem Protein, das für die schnelle Vermehrung einer transformierten Zelle entscheidend ist, bildet im Prinzip die Grundlage für die Entwicklung eines neuen und vielleicht „idealen“ Medikaments für gewisse Krebsformen.

4.4. Entzündungen und Asthma

Prostaglandine, Thromboxane und Leukotriene sind die Vermittler von anaphylaktischen Reaktionen und Entzündungen^[48–52]. Sie werden auf komplizierten Stoffwechselwegen als Antwort auf verschiedenartigste Reize hergestellt; die Synthese von Arachidonsäure ist dabei ein Schlüsselschritt (Abb. 5). Dieser Schritt wird vom Enzym

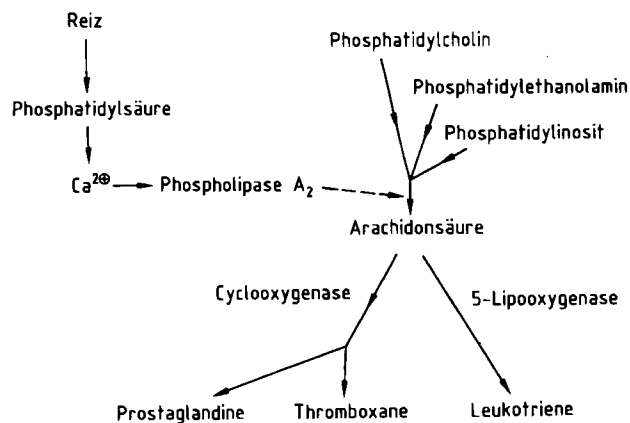


Abb. 5. Schematische Darstellung des Schlüsselschritts bei der Biosynthese von Prostaglandinen, Thromboxanen und Leukotrienen, der von zellulärer Phospholipase A₂ katalysiert wird.

Phospholipase A₂ katalysiert, genauer gesagt von der intrazellulären Ca²⁺-abhängigen Phospholipase A₂. Trotz seiner enormen Wichtigkeit ist von diesem Enzym relativ wenig bekannt. Allerdings konnten Okamoto et al.^[53] kürzlich zeigen, daß diese intrazelluläre Phospholipase A₂ immunologisch mit der exakt charakterisierten sekretorischen Phospholipase A₂ verwandt ist (siehe z. B. ^[54]). Mehrere dreidimensionale Strukturen von pankreatischen Phospholipasen A₂ sind bekannt^[55–58] (Abb. 6); darüber hinaus ähneln sich die Strukturen der Enzyme aus Schlangengift und Pankreas weitgehend^[59]. Offensichtlich kann diese Strukturinformation als Startpunkt für die Entwicklung von Inhibitoren für die intrazelluläre Phospholipase A₂ dienen, denn immunologische Verwandtschaft^[53] bedeutet fast mit Sicherheit auch eine beträchtliche Ähnlichkeit im Bereich um das aktive Zentrum. Es wäre eine große Hilfe,

wenn wenigstens die Struktur eines einzigen Komplexes aus pankreatischer Phospholipase A₂ und einem Phospholipid-Analogon bekannt wäre; eine solche Struktur könnte aber bisher nicht aufgeklärt werden. Einer der Gründe für die Schwierigkeiten dürfte die überraschende Empfindlichkeit der Konformation des pankreatischen Enzyms gegenüber selbst minimalen Änderungen sein^[58]. Trotzdem ist heute die Struktur des – am katalytisch aktiven Histidin des Enzyms – kovalent gebundenen Inhibitors *p*-Bromphenacylbromid bei einer Auflösung von 3.0 Å bekannt. Für diese Analyse stand nur ein einziger Kristall zur Verfügung^[60]. Dieses Beispiel einer Inhibitorbindung könnte als erster experimenteller Startpunkt für die Entwicklung weiterer spezifischer Inhibitoren dienen.

Noch aktueller ist die Aufklärung der Aminosäuresequenz des Proteins Macrocortin oder Lipocortin^[61], das von Glucocorticoiden^[48] induziert wird und Phospholipase A₂ inhibiert. Von der Struktur eines Lipocortin : Phospholipase-A₂-Komplexes müßte eine großartige Inspiration für die Entwicklung neuer Wirkstoffe ausgehen, die mit der Arachidonsäuresynthese interferieren. Auf jeden Fall wird heute schon in mehreren Laboratorien versucht, neue Inhibitoren auf der Grundlage der Informationen über die Struktur von Phospholipase A₂ zu entwickeln.

5. Inhibition von Proteinen, die nur in infektiösen Organismen vorkommen

5.1. Blockierung der Bakterienzellwand-Synthese

Penicillin ist zweifellos das bestbekannte Beispiel für einen Wirkstoff, der in einem infektiösen Organismus einen lebenswichtigen metabolischen Schritt blockiert, welcher kein Äquivalent im Menschen hat. Die Penicillinfamilie ist durch Cephalosporine und andere chemisch verwandte Verbindungen vergrößert worden (siehe z. B. ^[62]), so daß nun eine ganze Palette von antibakteriellen Wirkstoffen zur Verfügung steht, die mit der Zellwand-Synthese interferieren. Diese Entdeckungen revolutionierten im 20. Jahrhundert die Behandlung von bakteriellen Infekten^[62]. Trotzdem bleibt die bakterielle Resistenz eine allgegenwärtige

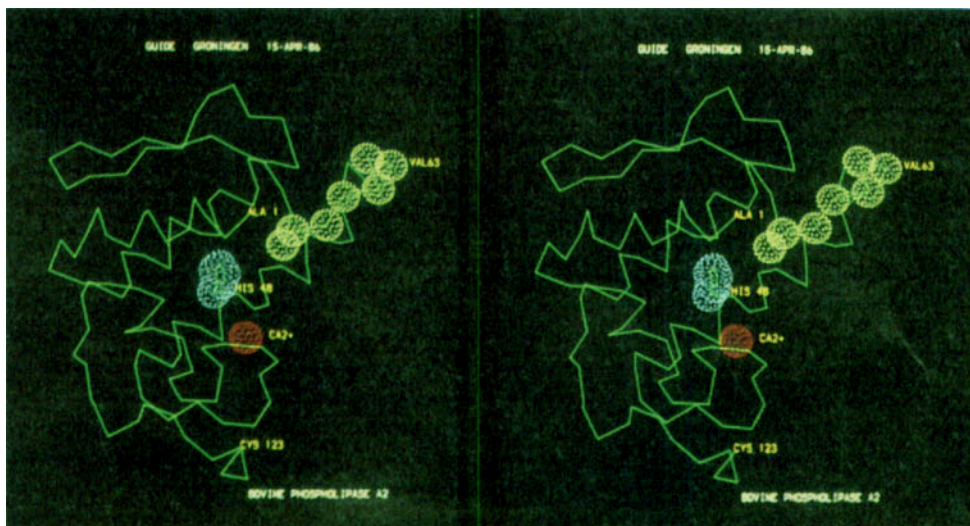
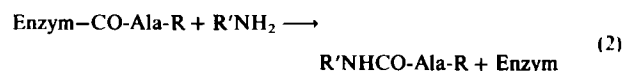
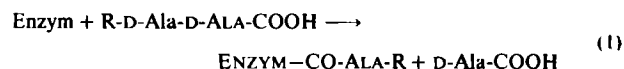


Abb. 6. Stereobild der Struktur von Phospholipase A₂ aus Rinderpankreas, die der zellulären Phospholipase A₂ stark ähneln dürfte. Speziell gekennzeichnet sind das essentielle His-48 (blau) und das für die Aktivität notwendige Calcium-Ion (rot). Die „Sechziger-Schleife“ ist durch gelbgepunktete Kugeln hervorgehoben, die sich jeweils am Ort der C_α-Atome befinden. Diese Schleife hat spezielle Eigenschaften: Je nach Phospholipase ist sie entweder ungeordnet oder nimmt eine Konformation an, die sich von der des Rinderenzym stark unterscheidet^[55–59].

tige Bedrohung. In einigen Fällen wird die Resistenz von Enzymen wie β -Lactamasen vermittelt; diese können Mitglieder der Penicillinfamilie abbauen und damit entschärfen.

Penicillin greift in die letzten Schritte der Synthese von Peptidoglycan ein, einem wesentlichen Bestandteil der Bakterienzellwand:



wobei R und R' die beiden quervernetzenden Polysaccharide sind. Einige der beteiligten Enzyme katalysieren beide Schritte und wirken als Carboxypeptidase-Transpeptidasen, oder sie begnügen sich in Schritt (2) mit Wasser als Acceptor und agieren somit als Carboxypeptidasen. Andere Enzyme führen als D-Alanyl-Carboxypeptidasen nur Schritt (1) aus^[63].

Die Struktur einer Zn^{2+} -enthaltenden D-Alanyl-D-Alanyl-Carboxypeptidase aus *Streptomyces albus* wurde von Dideberg et al.^[64] bei einer Auflösung von 2.5 Å aufgeklärt. Dieses Enzym ist Penicillin-unempfindlich, nur β -Iodpenicillinat bindet irreversibel im aktiven Zentrum^[64]. Wenn die Strukturen dieses Enzyms und seiner Komplexe mit Inhibitoren erst einmal im genaueren Detail bekannt sind, dürften sie weitere Modifizierungen von Penicillin stimulieren. Hier ist man besonders an Wirkstoffen interessiert, die ganze Klassen von Resistenz-vermittelnden Carboxypeptidasen blockieren können.

Auch die von Kelly et al.^[65] aufgeklärte Struktur einer Penicillin-empfindlichen D-Alanyl-Carboxypeptidase-Transpeptidase ist von großer Bedeutung. Diese Arbeitsgruppe stellte auch die ersten kristallographischen Bindungsstudien mit vier von Penicillin abgeleiteten Spezies vor: drei β -Lactamen und einem Cyclobutanon^[66].

Während der Abfassung dieser Übersicht wurden auch erste Details einer β -Lactamase I aus *Bacillus cereus* publiziert. Größere Bereiche dieses Enzyms scheinen eine ähnliche Tertiärstruktur wie die Penicillin-empfindliche D-Ala-D-Ala-Carboxypeptidase-Transpeptidase zu haben^[67]. Obwohl noch weitere Modellbaustudien und kristallographische Verfeinerungen notwendig sind, um Details der β -Lactamasestruktur herauszuarbeiten, ist doch schon abzusehen, daß gegenwärtig wichtige Strukturinformationen von Penicillin-empfindlichen und -abbauenden Enzymen verfügbar werden. Zu gegebener Zeit wird es daher Wirkstoff-Synthetikern möglich sein, Verbindungen zu entwickeln, die einerseits fest im aktiven Zentrum von Zellwand-synthetisierenden Carboxypeptidasen binden, jedoch andererseits maßgeschneiderte Substituenten tragen, die den Abbau durch Lactamasen verhindern. Alternativ könnten auch wirkungsvolle Inhibitoren der β -Lactamasen entworfen werden. Zwar informiert die Röntgen-Strukturanalyse hier über die räumliche Anordnung der Atome, aber die Umwandlung dieser Kenntnisse in nützliche Medikamente oder Kombinationen von Medikamenten wird auch zukünftig eine faszinierende Herausforderung bleiben.

5.2. Virushüllen

Hochaufgelöste Strukturen von Viren und Virushüllproteinen sind für die Entwicklung neuer Impfstoffe gegen mehrere allgemein verbreitete Krankheiten des Menschen außerordentlich wichtig. Aber auch für die planvolle Arzneimittelerwicklung dürften die kristallographischen Studien sowohl über Rhino- und Polioviren^[68, 69] als auch über die Grippevirushüllproteine Hämagglutinin^[70] und Neuraminidase^[71] nützlich werden. Beispielsweise könnte man durch Inspektion der verzahnten Kontakte zwischen den Untereinheiten der Virushüllproteine Bindungsstellen für kleine Moleküle entdecken, die dann in den Zusammenbau des Viruspartikels eingreifen. Alternativ könnten mit dieser Strukturkenntnis auch maßgeschneiderte quervernetzende Reagentien konzipiert werden – wobei man den Arbeiten zur Entwicklung von difunktionellen Antisichelzell-Wirkstoffen^[8] folgen könnte: Massive Quervernetzung könnte die Viren zu harmlosen Wesen machen. Eine dritte Möglichkeit ist die Entwicklung von Wirkstoffen, die fest am Rezeptor für Rhino- und Polioviren binden und damit deren Eintritt in die Zelle blockieren. Die eindrucksvollen Leistungen der Röntgen-Strukturanalyse von Proteinen sind reichhaltige Inspirationsquellen für die Entwicklung neuer Antivirus-Mittel.

5.3. Bakterielle Toxine

Es gibt Bakterien, die ihren Wirt durch Absonderung von einem oder mehreren Toxinen beeinflussen. Einige der bestcharakterisierten Toxine sind das von *Corynebacterium diphtheriae* ausgeschiedene Diphtherietoxin (DT), das Cholera toxin (CT) von *Vibrio cholerae* und das eng verwandte hitzelabile Enterotoxin (LT) von enterotoxischen *Escherichia coli*-Stämmen^[72-75].

Das Diphtherietoxin wird als eine einzige Polypeptidkette mit $M_r = 62\,000$ synthetisiert und anschließend in eine A-Kette mit $M_r = 21\,000$ und eine B-Kette mit $M_r = 40\,000$ gespalten. Die A-Kette ist ein Enzym, das die ADP-Ribosylierung des Elongationsfaktors-2 katalysiert, während die B-Kette den Eintritt der A-Kette in die Zelle vermittelt. Eine ähnliche Wirkungsweise wurde bei CT und LT beobachtet, obgleich sowohl deren Architektur als auch der genaue Punkt des Eingriffs in die Zellregulierung etwas anders als bei DT sind. CT und LT bestehen wie DT aus einer A-Kette ($M_r = 27\,000$) und einer B-Kette ($M_r = 13\,000$), bilden jedoch einen AB_5 -Komplex. Die B-Ketten vermitteln die Bindung an die Zelloberfläche, wo sie mit GM_1 -Gangliosiden wechselwirken (Abb. 7). Auch hier katalysiert die A-Kette eine ADP-Ribosylierung, doch ist in diesem Fall die regulatorische Komponente G_s des Adenylatcyclase-Systems betroffen. Die Ribosylierung schaltet das G_s -Protein permanent auf „an“; dadurch wird die Adenylatcyclase zur Produktion von cAMP stimuliert, das wiederum zum massiven Ausfluß von Wasser und Nährstoffen in den Darm führt. Dieser Effekt hat schwerwiegende Konsequenzen – von erheblichen Unannehmlichkeiten in der nördlichen Hemisphäre bis zu Kindersterblichkeit in weniger entwickelten Gegenden.

Die Aminosäuresequenzen dieser Toxine sind seit einiger Zeit bekannt^[76-80]; Röntgen-Strukturuntersuchungen

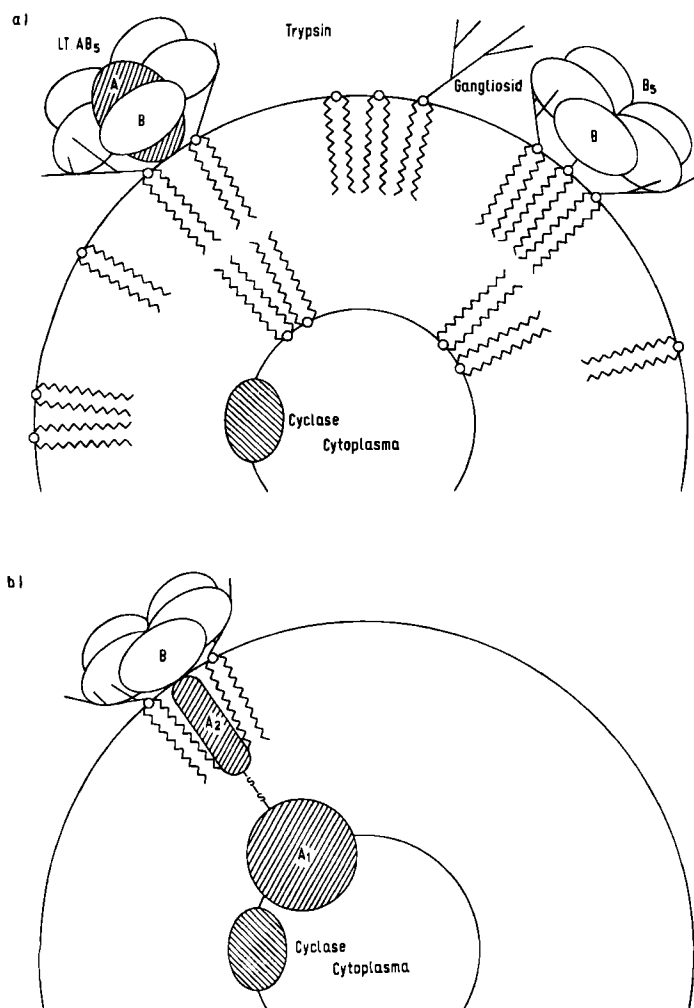


Abb. 7. Wirkungsweise des hitzelabilen Enterotoxins (LT) von *E. coli*, die im wesentlichen mit der des Cholera-toxins übereinstimmt. a) Bindung von AB₅- und B₅-Komplexen an Ganglioside (GM₁) in der Membran der Epithelzellen des Darms; b) Translokation des A₁-Fragments ($M_r = 22000$) durch die Membran, gefolgt von einer ADP-Ribosylierung der G_s-Komponente des Adenylatcyclasesystems (freundlicherweise von Sylvia Pronk gezeichnet).

von DT, CT und LT laufen^[81-84]. Wenn diese Untersuchungen zu hochaufgelösten Strukturen geführt haben, können Wirkstoffe entwickelt werden, die in eine Reihe von Schlüsselschritten bei der Tätigkeit dieser Toxine eingreifen. Beispielsweise:

- beim Zusammenbau des AB₅-Komplexes von CT und LT sowie des AB-Komplexes von DT;
- bei der Bindung an den Rezeptor an der Zelloberfläche;
- beim Eintritt der A-Kette in die Zelle;
- bei der ADP-Ribosylierung, die von der A-Kette katalysiert wird, sobald sie in die Zelle gelangt ist.

Die Bemühungen zur planvollen Entwicklung solcher Pharmaka müssen mit Impfstoff-Entwicklungsprogrammen konkurrieren, die entweder auf Techniken zur Erzeugung rekombinanter DNA oder auf der Synthese von Peptidfragmenten basieren und gegenwärtig in einer Reihe von Laboratorien ausgeführt werden. Weiterhin scheint die orale Rehydratations-Therapie eine billige und wirksame Methode zur Bekämpfung der Kindersterblichkeit durch

enterotoxische *E.-coli*- und *V.-cholerae*-Infektionen in Entwicklungsländern zu sein. Trotzdem könnte sich die genaue Kenntnis der dreidimensionalen Strukturen der „Mondfähren“-ähnlichen bakteriellen Toxine als Ausgangspunkt für die Entwicklung neuer Medikamente herausstellen, insbesondere wenn die Strukturen der Komplexe aus Toxin und GM₁ sowie NAD-Analoga aufgeklärt werden können.

6. Selektive Inhibition von Proteinen aus infektiösen Organismen

In der Literatur gibt es nur wenige Beispiele für kristallographische Projekte, die sich mit der Inhibition des Enzyms eines Krankheitserregers unter Schonung des homologen Enzyms im menschlichen Wirt befassen. Ein gut bekannter Fall betrifft die bakteriellen Dihydrofolat-Reduktasen. Ein weiteres Beispiel sind die glycolytischen Enzyme von *Trypanosoma brucei*, dem Erreger der Schlafkrankheit.

6.1. Dihydrofolat-Reduktase

Dihydrofolat-Reduktase (DHFR) ist ein Schlüsselenzym im Metabolismus zahlreicher Organismen und das Zielprotein für eine Reihe weitverbreiteter Medikamente. Das Enzym ist essentiell für die Zellvermehrung, denn es hält in der Zelle den Spiegel des voll reduzierten Folats aufrecht, das für die Synthese von Thymidylat notwendig ist (Abb. 8).

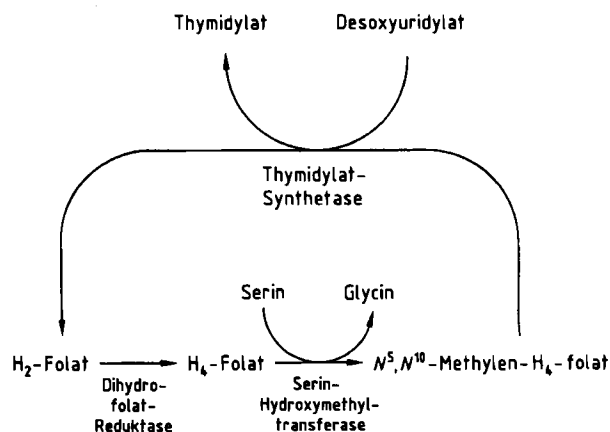


Abb. 8. Stoffwechselweg mit drei Enzymen, welche die Synthese von Thymidylat und damit von Nucleinsäuren vermitteln. Die Unterschiede in den Eigenschaften der Dihydrofolat-Reduktase von verschiedenen Organismen bilden die Grundlage für mehrere wichtige antibakterielle Medikamente und Antimalaria-Medikamente. Die Human-Dihydrofolat-Reduktase ist außerdem das Ziel des Cytostaticums Methotrexat.

Insgesamt drei Klassen von Dihydrofolat-Reduktasen sind bisher beschrieben worden (siehe z. B. ^[85,86] und dort zitierte Literatur):

1. Chromosomale DHFRs mit $M_r \approx 15000$ und anscheinend gemeinsamer Architektur (Abb. 9), obwohl nur 30% der Aminosäuren übereinstimmen. Die dreidimensionalen Strukturen der Enzyme von *E. coli*, *Lactobacil-*

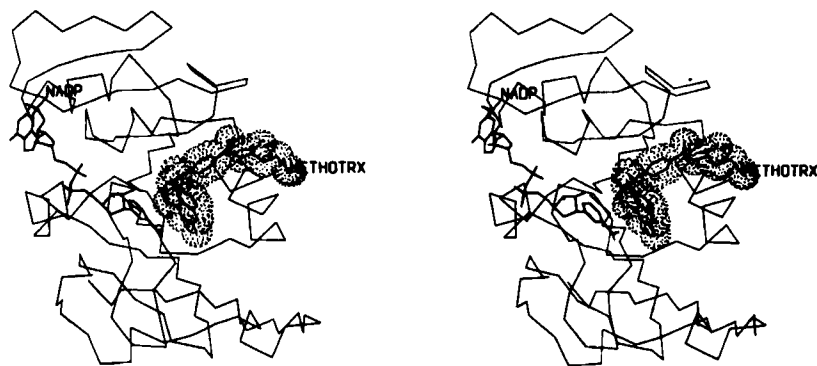


Abb. 9. Stereobild der Struktur des Komplexes zwischen der Dihydrofolat-Reduktase aus *Lactobacillus casei* mit dem Coenzym NADP und dem Pharmakon Methotrexat (METHOTRX) (Koordinaten freundlicherweise von D. A. Matthews und J. Kraut zur Verfügung gestellt).

lus casei und Huhn sind bekannt^[33,87,88]. Ein vorläufiger Bericht über die Struktur einer zweiten Wirbeltier-DHFR, des Enzyms aus L1210-Maus-Lymphadenom, wurde von den Wellcome Laboratories in Großbritannien veröffentlicht^[89].

2. Plasmid-codierte DHFRs aus Bakterienstämmen, die gegen das antibakterielle Medikament Trimethoprim resistent sind. Unter diesen resistenten DHFRs können drei Typen unterschieden werden^[85]:

- Typ I: dimere Moleküle aus Untereinheiten mit $M_r \approx 17\,500$, deren Resistenz hauptsächlich auf erniedrigter Affinität gegenüber Trimethoprim beruht;
- Typ II: ein tetrameres Molekül mit $M_r \approx 8\,500$ pro Untereinheit;
- Typ III: monomere Proteine mit $M_r \approx 18\,000$, deren Resistenz darauf beruht, daß ihre Affinität zu Trimethoprim erniedrigt und zum Substrat erhöht ist.

Aminosäuren, die essentiell für die Funktion der chromosomalen DHFR sind, sind in plasmid-codierten DHFRs vom Typ I und Typ III konserviert, was gemeinsame Vorfahren und ähnliche Gesamtstruktur nahelegt. Die DHFRs vom Typ II haben ein völlig anderes Faltungsmuster, wie bei apo-R67-DHFR gezeigt wurde: Die jeweils 78 Reste einer Untereinheit sind zu einem sechssträngigen antiparallelen β -Faß gefaltet^[85].

3. DHFR von Protozoen mit $M_r \approx 110\,000$. Diese großen Enzyme wurden im Nagetier-Malaria-Parasiten *Plasmodium berghei*, in *Leishmania tropica* und in *Trypanosoma cruzi*^[90-92] gefunden. Überraschenderweise ist dieses Protozoen-Enzym difunktionell: Es zeigt sowohl DHFR- als auch Thymidylat-Synthetase-Aktivität^[91,92]. Bisher gibt es keine Strukturinformationen über diese DHFR-Klasse, obwohl sie sehr wichtig für mehrere schwere und häufige Tropenkrankheiten sind. Die Bedeutung der DHFRs wird drastisch durch das schnelle Ansteigen der Resistenz gegen eines der wichtigsten Antimalaria-Medikamente, Pyrimethamin^[2], gezeigt. Dieser Wirkstoff ist ein DHFR-Inhibitor, der an das Plasmodium-Enzym 1400mal fester bindet als an das Human-Enzym^[93]. Jedoch können die resistenten Malaria-Stämme irgendwie der Wirkung des Medikaments ausweichen.

In einer sehr interessanten Arbeit berichtete die Gruppe von Matthews und Kraut in San Diego kürzlich über die Röntgen-Strukturanalyse von Komplexen des Zielproteins DHFR mit nicht weniger als zehn Wirkstoffen^[94]. Die Strukturen dieser Komplexe gemeinsam mit den Struktu-

ren der Komplexe zwischen dem antibakteriellen Medikament Trimethoprim und den DHFRs von Huhn und *E. coli*^[95] ermöglichten es, die differentielle Bindung von Trimethoprim an bakterielle DHFR und Säuger-DHFR auf atomarem Niveau zu erklären: Die Aminosäurereste an gegenüberliegenden Positionen des Spalts im aktiven Zentrum sind im *E.-coli*-Enzym etwa 1.5–2.0 Å näher beieinander als die äquivalenten Reste im Enzym des Huhns.

Der beschränkte Platz erlaubt es nicht, hier auf Details dieser Untersuchungsreihe einzugehen; sie bietet großartige Einblicke in die Wirkungsweise von Medikamenten und verwandten Verbindungen. Es ist beinahe sicher, daß diese Strukturen beim Durchlaufen des „Cycelus zur geplanten Arzneimittelentwicklung“ (Abb. 1) zu neuen antibakteriellen Wirkstoffen führen werden. Berichte über mehrere solche Untersuchungen sind bereits erschienen (z. B. ^[96-98]).

6.2. Glycolytische Enzyme und Schlafkrankheit

Schlafkrankheit oder Human-Trypanosomiasis in Afrika südlich der Sahara wird von der Weltgesundheitsorganisation zur Zeit als eine der sechs wichtigsten Tropenkrankheiten angesehen^[2]. Die Krankheit wird vom protozoischen Parasiten *Trypanosoma brucei* verursacht. Da es nur drei Medikamente zur Behandlung dieser Krankheit gibt, die alle schwerwiegende Nebenwirkungen haben^[99], werden neue und bessere Medikamente dringend benötigt.

Trypanosomen haben mehrere Besonderheiten; eine davon ist das variable Oberflächenglycoprotein (VSG), mit dem der Parasit die menschliche Immunabwehr ausmanövriert^[100]. Die dreidimensionale Struktur eines VSG bei niedriger Auflösung ist bekannt^[101], eine Analyse mit höherer Auflösung schreitet fort. VSG hat offenbar mit dem Hämagglutinin des Influenzavirus eine gemeinsame Strukturkomponente, nämlich lange verdrehte α -Helices senkrecht zur Membranoberfläche. Wenn die Struktur des VSG-Proteins und die Kontakte zwischen den Untereinheiten erst im Detail bekannt sind, kann man die bei den Virushüllproteinen (Abschnitt 5.2) erwähnten Strategien verfolgen. Entweder konstruiert man Wirkstoffe, die in den Zusammenbau der VSG-Proteine eingreifen, oder es werden Verbindungen entwickelt, die an spezifische Positionen zwischen zwei benachbarten VSG-Proteinen binden und zur Quervernetzung führen. Da man die Human-Makromoleküle natürlich nicht beschädigen darf, ist der letztere Ansatz nicht ohne Probleme.

In einem anderen Projekt kooperieren drei Arbeitsgruppen – in Amsterdam, Brüssel und Groningen – beim Versuch, neue Wirkstoffe gegen die Schlafkrankheit zu entwickeln. Diese Gruppen konzentrieren sich auf eine weitere spezifische Eigenart der *Trypanosomatidae*: das Vorkommen von Glycosomen. Das sind Peroxysom-ähnliche Organellen, die essentiell für die Energieversorgung der Blutbahnform der Trypanosomen sind^[102–104]. Die bedeutendsten glycosomalen Proteine sind neun Enzyme des Glucose- und Glycerin-Metabolismus. Alle neun stehen jetzt gereinigt zur Verfügung^[105, 106]. Außerdem wurden die Aminosäuresequenzen von fünf glycolytischen Enzymen aus Trypanosomen durch Sequenzierung der korrespondierenden Gene ermittelt^[107–109]. Die Kristallisation dieser Enzyme ist noch schwieriger als gewöhnlich, weil nur geringe Materialmengen vorhanden sind. Trotzdem konnten aus etwa 1 mg Triosephosphat-Isomerase (TIM) Kristalle hoher Qualität hergestellt werden^[110], die die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur der Trypanosomen-TIM ermöglichten^[111]. Glücklicherweise gehört TIM zu denjenigen *T. brucei*-Enzymen, deren Sequenz bekannt ist^[107]. Weiterhin ist die dreidimensionale Struktur der TIM des Huhns bekannt^[112], die wegen hoher Sequenzhomologie einen klaren Eindruck vom Human-Enzym gibt. Die Struktur der TIM aus *T. brucei* erfordert noch erhebliche Verfeinerung, bevor sie als Grundlage für die planvolle Arzneimittelentwicklung dienen kann. Aber es wird schon jetzt deutlich, daß die Entwicklung von Wirkstoffen, die spezifisch die katalytische Reaktion des Trypanosomen-Enzyms inhibieren, ohne das Human-Enzym zu stören, nicht trivial sein wird. Der Grund ist die große Ähnlichkeit der aktiven Zentren in den Human- und Parasiten-Proteinen (Abb. 10). Einer der Unterschiede in der Umgebung des aktiven Zentrums betrifft die Reste 100–102: In *T. brucei* sind es Ala-Tyr-Tyr, im Menschen His-Val-Phe^[107]. Um diesen Unterschied für selektive Inhibitoren auszunutzen, muß man eine Distanz von etwa 20 Å zwischen dem Substratbindungsplatz und dem Rest 102 überbrücken. Das wird sicher nicht auf einen Schlag geschehen. Jedoch könnte es unter Verwendung des „Cyclus zur geplanten Arzneimittelentwicklung“ (Abb. 1) möglich sein, die synthetisierten Verbindungen nach und nach zu vergrößern,

jeweils deren Bindung zu studieren und neue Modifikationen daraus abzuleiten, so daß schließlich die notwendige Selektivität erreicht werden könnte.

Bei einem anderen glycosomalen Protein, der Phosphoglycerat-Kinase (PGK), ist lediglich die Aminosäuresequenz bekannt^[108]. Hier sind die dreidimensionalen Strukturen der Enzyme aus Pferd und Hefe aufgeklärt^[113, 114a, b]. Unglücklicherweise zeigt *T. brucei*-PGK bisher noch keinerlei Anzeichen von Kristallbildung. Jedoch haben Modellstudien auf einem Computer-Graphik-System gekoppelt mit Energieminimierung approximierte Modelle der Enzyme von *T. brucei* und Mensch ergeben^[114c]. Anscheinend weisen hier die aktiven Zentren größere Unterschiede auf als bei TIM, so daß die Entwicklung selektiver Inhibitoren einfacher sein könnte.

Selektive Inhibition von Enzymen ist jedoch nicht der einzige Weg, mit dem das Vorkommen von Glycosomen für die planvolle Entwicklung von Medikamenten gegen die Schlafkrankheit ausgenutzt werden kann. Zum Unterschied von ihren Homologen im Menschen müssen die glycolytischen Enzyme der Trypanosomen in das Glycosom gebracht werden; damit ergibt sich die Möglichkeit, in den Importmechanismus einzugreifen. Eine Analyse der Sequenzinformationen über glycosomale Enzyme zusammen mit den bekannten dreidimensionalen Strukturen von Triosephosphat-Isomerase (TIM), Phosphoglycerat-Kinase (PGK) und Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase hat zu einem Vorschlag für den glycosomalen Import geführt^[115]: Zwei Bereiche mit hoher positiver Ladungsdichte, etwa 40 Å voneinander entfernt, werden als wichtige Elemente des Importsignals angesehen.

Interessanterweise führt diese Hypothese zu einem Vorschlag für die Wirkung von Suramin (auch unter dem Namen Germanin bekannt), einem der wenigen wirksamen Medikamente gegen die Schlafkrankheit^[99]. Suramin ist ein kompliziertes Molekül mit zwei trisulfoierten Naphthalin-Ringen, die in gestreckter Konformation etwa 40 Å voneinander entfernt sind. Von diesem Medikament ist bekannt, daß es mit der Glycolyse interferiert; seine therapeutische Wirkung könnte durch Blockade des Enzymimports in die Glycosomen zustandekommen. Für den Beweis dieser Hypothesen sind weitere Untersuchungen not-

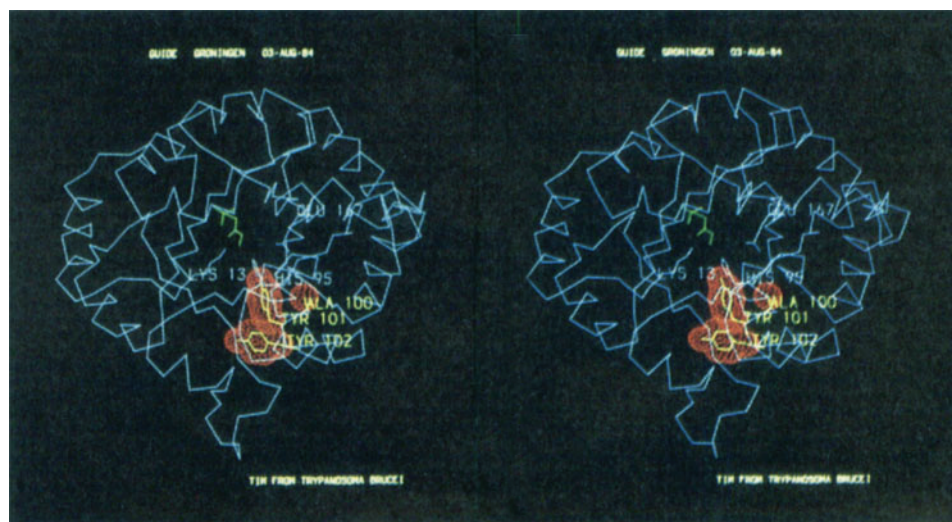


Abb. 10. Stereobild der Struktur der Triosephosphat-Isomerase (TIM) aus *Trypanosoma brucei* (Koordinaten freundlicherweise von R. K. Wierenga zur Verfügung gestellt). Überlagerung der Strukturen von TIM aus *T. brucei* und TIM aus Hefe im Komplex mit dem Substrat Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) (Koordinaten freundlicherweise von G. Petsko zur Verfügung gestellt) ergab eine ungefähre Position von DHAP im Komplex mit TIM aus *T. brucei* (Bildmitte, grün). Zur besseren Übersicht wurden im allgemeinen nur die Ca^{2+} -Atome gezeichnet. Sechs Aminosäurereste sind mit Seitenketten gezeigt, und zwar die bei der Katalyse direkt mitwirkenden Reste Lys-13, His-95 und Glu-167 sowie drei Reste nahe am aktiven Zentrum: Ala-100, Tyr-101, Tyr-102 (gelb mit roter van-der-Waals-Oberfläche). Das Human-Enzym enthält stattdessen His-100, Val-101, Phe-102.

wendig, und sie werden auch ausgeführt. Ob diese Spekulationen nun richtig sind oder nicht – der glycosomale Enzymimport bleibt auf jeden Fall ein interessantes Ziel für die planvolle Arzneimittelentwicklung, denn es gibt im Menschen kein analoges System.

7. Proteinkristallographie

Der Methode der Röntgen-Strukturanalyse von Proteinen wurde in diesem Aufsatz nur wenig Aufmerksamkeit gewidmet, und zwar aus zwei Gründen: Erstens würde der gegebene Rahmen gesprengt, und zweitens gibt es ausführliche Zusammenfassungen zu diesem Thema (z. B. ^[116, 117]). Beide Monographien befassen sich eingehend mit dem Haupthindernis, das vor der Strukturaufklärung überwunden werden muß – der Züchtung von röntgentauglichen Kristallen. Dieser Schritt gelingt manchmal innerhalb eines Monats, in anderen Fällen erfordert er ein oder zwei Jahre hingebungsvoller Arbeit, und in weiteren Fällen ist es unmöglich, die notwendigen röntgentauglichen Kristalle herzustellen. Deshalb kann man kaum vorhersagen, ob und wann eine Struktur aufgeklärt sein wird. Jedoch bessern sich die Aussichten auf Kristalle mit fortschreitender Vervollkommenung der Kristallzüchtungsmethoden und mit der Herstellung von Gramm-Mengen von Protein durch Genklonierungstechniken zunehmend. In Zukunft ist auch eine „Protein-Veränderung zur Kristallisation“ denkbar, das heißt die Produktion leicht modifizierter Proteine, die noch aktiv sind, aber besser kristallisieren. Eine solche Prozedur wird einleuchtenderweise eine „Versuch- und Irrtum“-Prozedur sein, könnte sich jedoch in einigen Fällen, in denen man unbedingt die Kristallstruktur aufklären möchte, als einzig mögliche Lösung herausstellen. In schwierigen Fällen kann man auch an die Kristallisation von Komplexen zwischen dem interessierenden Protein und monoklonalen Antikörpern denken. Wenn erst einmal Kristalle vorhanden sind, dann lassen sich die Strukturen dank raffinierter Soft- und Hardware für Datensammlung und Phasenbestimmung immer schneller und genauer bestimmen.

8. Abschließende Bemerkungen

Der hier beschriebene Ansatz zur planvollen Arzneimittelentwicklung kann in zwei Richtungen ausgedehnt werden. Zunächst können auch andere Biomakromoleküle als Ziele verwendet werden, worauf bereits in der Einleitung angespielt worden ist. Die Röntgen-Strukturanalyse von *Oligonucleotiden* vermittelte detaillierte Einsicht in die DNA-Struktur. Beispielsweise könnte die kürzlich publizierte Struktur des Komplexes von DNA mit Netropsin (Congocidin)^[118] zu einem Startpunkt für die Entwicklung von Pharmaka gegen spezifische DNA-Sequenzen werden. Man kann sich weiterhin vorstellen, daß Unterschiede in den tRNA-, rRNA- und nRNA-Strukturen von Krankheitserregern und Wirt zur Entwicklung von Pharmaka verwendet werden können.

Weiterhin kann die beschriebene Strategie zur planvollen Arzneimittelentwicklung auch auf Unkraut- und Schädlingsbekämpfungsmittel angewendet werden. Tatsächlich hat es die phantastische Strukturaufklärung des

Reaktionszentrums der Photosynthese bereits ermöglicht, das Herbizid Terbutryn an seinem Wirkungsort zu identifizieren^[119].

Inmitten des allgemeinen Optimismus sei aber auch daran erinnert, daß eine lange Reihe von Hindernissen überwunden werden muß, bevor ein Wirkstoff mit der erwünschten Aktivität im Reagensglas endlich als Medikament auf dem Markt verkauft werden kann. Die Applikation des Medikaments, seine Sicherheit, seine eventuelle Metabolisierung sowie ökonomische Überlegungen zu seiner Produktion sind Punkte, die sorgfältig bedacht werden müssen und daher Zeit verschlingen. In dieser Hinsicht unterscheidet sich der hier und in anderen Arbeiten (z. B. ^[11]) beschriebene Ansatz wenig von der bisher üblichen Prozedur. Die drastischen Unterschiede liegen in den ersten Stufen – nicht nur weil man „sehen“ kann, welche Verbindungen wirkungsvoll sein könnten, sondern auch weil die dreidimensionalen Strukturen von Zielproteinen oft unmittelbar zeigen, welche Modifizierung einer Verbindung *nicht* zu aktiveren Molekülen führen kann, weil das derart veränderte Molekül einfach nicht in das aktive Zentrum paßt. Freudenreich et al.^[120] gaben mit der Entwicklung von Inhibitoren der Alkohol-Dehydrogenase auf der Grundlage der dreidimensionalen Struktur des Enzyms ein schönes Beispiel für diese Punkte.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß sich in der letzten Dekade eine neue Strategie zur planvollen Arzneimittelentwicklung herausgeschält hat, die auf der genauen Kenntnis der dreidimensionalen Strukturen von Biomakromolekülen beruht. Diese Biomakromoleküle müssen spezifisch von pharmazeutisch aktiven Verbindungen angegriffen werden. Angesichts der großen Vorteile dieser Strategie gegenüber den bisher beschrittenen Wegen kann man unschwer vorhersagen, daß ein beträchtlicher Anteil der neuen Medikamente um das Jahr 2000 seine Entwicklung der hier beschriebenen Methodik verdanken wird.

Es ist mir ein Vergnügen, mich für die anregenden Diskussionen mit Rik Wierenga, Bauke Dijkstra, Jan Drenth und Sylvia Pronk von der Groninger Proteinkristallographiegruppe und mit Klaus Müller von Hoffmann-La Roche in Basel zu bedanken. Ich möchte weiterhin Randy Read für zahlreiche Vorschläge zur Verbesserung des Textes sowie Dave Matthews für die Zusendung eines Vorabdrucks seiner Zusammenfassung über Dihydrofolat-Reduktase danken. Roeline Hogenkamp hat mich in exzellenter Weise bei der Fertigstellung des Manuskripts unterstützt.

Eingegangen am 30. Mai 1986 [A 590]

- [1] P. J. Goodford, *J. Med. Chem.* 27 (1984) 557.
- [2] World Health Organization: *Tropical Disease Research – Seventh Programme Report*, Genf 1985.
- [3] T. H. Maugh, *Science* 196 (1977) 413; D. L. Klayman, *ibid.* 228 (1985) 1049.
- [4] E. A. Falco, L. G. Goodwin, G. H. Hitchings, I. M. Rollo, P. B. Russell, *Br. J. Pharmacol.* 6 (1951) 185.
- [5] M. G. Rossmann: *The Molecular Replacement Method*, Gordon and Breach, New York 1972.
- [6] A. Arnone, *Nature (London)* 237 (1972) 146.
- [7] C. R. Beddell, P. J. Goodford, F. E. Norrington, S. Wilkinson, R. Wootton, *Br. J. Pharmacol.* 57 (1976) 201.
- [8] C. R. Beddell, P. J. Goodford, G. Kneen, R. D. White, S. Wilkinson, R. Wootton, *Br. J. Pharmacol.* 82 (1984) 397.
- [9] J. A. Walder, R. Y. Walder, A. Arnone, *J. Mol. Biol.* 141 (1980) 195.

- [10] D. J. Abraham, M. F. Perutz, S. E. V. Phillips, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 (1983) 324.
- [11] M. F. Perutz, persönliche Mitteilung.
- [12] B. Shaanan, *J. Mol. Biol.* 171 (1983) 31; G. Fermi, M. F. Perutz, B. Shaanan, R. Fourme, *ibid.* 175 (1984) 159.
- [13] E. A. Padlan, W. E. Love, *J. Biol. Chem.* 260 (1985) 8272.
- [14] E. A. Padlan, W. E. Love, *J. Biol. Chem.* 260 (1985) 8280.
- [15] D. C. Rees, M. Lewis, W. N. Lipscomb, *J. Mol. Biol.* 168 (1983) 367.
- [16] M. A. Holmes, B. W. Matthews, *J. Mol. Biol.* 160 (1982) 623.
- [17] D. W. Cushman, H. S. Cheung, E. F. Sabo, M. A. Ondetti, *Biochemistry* 16 (1977) 5484.
- [18] D. C. Rees, W. N. Lipscomb, *J. Mol. Biol.* 160 (1982) 475.
- [19] L. C. Kuo, J. M. Fukuyama, M. W. Makinen, *J. Mol. Biol.* 163 (1983) 63.
- [20] D. C. Rees, W. N. Lipscomb, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 (1983) 7151.
- [21] W. R. Kester, B. W. Matthews, *Biochemistry* 16 (1977) 2506.
- [22] A. F. Monzingo, B. W. Matthews, *Biochemistry* 21 (1982) 3390.
- [23] A. F. Monzingo, B. W. Matthews, *Biochemistry* 23 (1984) 5724.
- [24] D. G. Hangauer, A. F. Monzingo, B. W. Matthews, *Biochemistry* 23 (1984) 5730.
- [25] M. N. G. James, A. R. Sielecki, *J. Mol. Biol.* 163 (1983) 299.
- [26] E. Subramanian, I. D. A. Swan, M. Liu, D. R. Davies, J. A. Jenkins, I. J. Tickle, T. L. Blundell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 (1977) 556.
- [27] R. Bott, E. Subramanian, D. R. Davies, *Biochemistry* 21 (1982) 6956.
- [28] F. Soubrier, J.-J. Panthier, P. Corvol, F. Rougeon, *Nucleic Acids Res.* 11 (1983) 7181.
- [29] T. Imai, H. Miyazaki, S. Hirose, H. Hori, T. Hayashi, R. Kageyama, H. Ohkubo, S. Nakanishi, K. Murakami, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 (1983) 7405.
- [30] a) T. Blundell, B. L. Sibanda, L. Pearl, *Nature (London)* 304 (1983) 273; b) B. L. Sibanda, T. Blundell, P. M. Hobart, M. Fogliano, J. S. Bindra, B. W. Dominy, J. M. Chirgwin, *FEBS Lett.* 174 (1984) 102.
- [31] T. L. Blundell, persönliche Mitteilung.
- [32] M. A. Navia, J. P. Springer, M. Poe, J. Boger, K. Hoogsteen, *J. Biol. Chem.* 259 (1984) 12714.
- [33] J. T. Bolin, D. J. Filman, D. A. Matthews, R. C. Hamlin, J. Kraut, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 13 650.
- [34] C. J. Tabin, S. M. Bradley, C. I. Bargmann, R. A. Weinberg, *Nature (London)* 300 (1982) 143.
- [35] E. P. Reddy, R. K. Reynolds, E. Santos, M. Barbacid, *Nature (London)* 300 (1982) 149.
- [36] E. Taparowsky, Y. Suard, O. Fasano, K. Shimizu, M. Goldfarb, M. Wigler, *Nature (London)* 300 (1982) 762.
- [37] R. K. Wierenga, W. G. J. Hol, *Nature (London)* 302 (1983) 842.
- [38] E. Santos, D. Martin-Zanca, E. P. Reddy, M. A. Pierotti, G. Della Porta, M. Barbacid, *Science* 223 (1984) 661.
- [39] D. J. Capon, P. H. Seeburg, J. P. McGrath, J. S. Hayflick, U. Edman, A. D. Levinson, D. V. Goeddel, *Nature (London)* 304 (1983) 507.
- [40] I. Guerrero, A. Villasante, V. Corcos, A. Pellicer, *Science* 225 (1984) 1159.
- [41] H. Zarbl, S. Sukumar, A. V. Arthur, D. Martin-Zanca, M. Barbacid, *Nature (London)* 315 (1985) 382.
- [42] N. J. Gay, J. E. Walker, *Nature (London)* 301 (1983) 262.
- [43] M. R. Pincus, J. Van Renswoude, J. B. Harford, E. H. Chang, R. P. Carty, R. D. Klausner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 (1983) 5253.
- [44] E. Santos, E. P. Reddy, S. Pulciani, R. J. Feldmann, M. Barbacid, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 (1983) 4679.
- [45] F. Jurnak, *Science* 230 (1985) 32.
- [46] F. McCormick, B. F. C. Clark, T. F. M. La Cour, M. Kjeldgaard, L. Nørskov-Lauritsen, J. Nyborg, *Science* 230 (1985) 78.
- [47] P. H. Seeburg, W. W. Colby, D. J. Capon, D. V. Goeddel, A. D. Levinson, *Nature (London)* 312 (1984) 71.
- [48] R. Flower, *Trends Pharmacol. Sci.* 2 (1981) 186.
- [49] E. G. Lapetina, *Trends Pharmacol. Sci.* 3 (1982) 115.
- [50] J. L. Marx, *Science* 215 (1982) 1380.
- [51] J. W. Weiss, J. M. Drazan, N. Coles, E. R. McFadden, P. F. Weller, E. J. Corey, R. A. Lewis, K. F. Austen, *Science* 216 (1982) 196.
- [52] B. Samuelsson, *Science* 220 (1983) 568.
- [53] M. Okamoto, T. Ono, H. Tojo, T. Yamano, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 128 (1985) 788.
- [54] H. M. Verhey, A. J. Slotboom, G. H. De Haas, *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 91 (1981) 91.
- [55] B. W. Dijkstra, K. H. Kalk, W. G. J. Hol, J. Drenth, *J. Mol. Biol.* 147 (1981) 97.
- [56] B. W. Dijkstra, G. J. H. Van Nes, K. H. Kalk, N. P. Brandenburg, W. G. J. Hol, J. Drenth, *Acta Crystallogr. B* 38 (1982) 793.
- [57] B. W. Dijkstra, R. Renetseder, K. H. Kalk, W. G. J. Hol, J. Drenth, *J. Mol. Biol.* 168 (1983) 163.
- [58] B. W. Dijkstra, K. H. Kalk, J. Drenth, G. H. De Haas, M. R. Egmond, A. J. Slotboom, *Biochemistry* 23 (1984) 2759.
- [59] S. Brunie, J. Bolin, D. Gewirth, P. B. Sigler, *J. Biol. Chem.* 260 (1985) 9742; R. Renetseder, S. Brunie, B. W. Dijkstra, J. Drenth, P. B. Sigler, *ibid.* 260 (1985) 11627.
- [60] R. Renetseder, B. W. Dijkstra, J. Drenth, persönliche Mitteilung.
- [61] B. P. Wallner, R. J. Mattaliano, C. Hession, R. L. Cate, R. Tizard, L. K. Sinclair, C. Foeller, E. Pingchang Chow, J. L. Browning, K. L. Ramachandran, R. B. Pepinsky, *Nature (London)* 320 (1986) 77.
- [62] E. P. Abraham, *Sci. Am.* 244 (6) (1981) 64; *Spektrum Wiss.* 1981 (8) 46.
- [63] J.-M. Frère, B. Joris, *CRC Crit. Rev. Microbiol.* 11 (1985) 299.
- [64] O. Dideberg, P. Charlier, G. Dive, B. Joris, J.-M. Frère, J.-M. Ghuysen, *Nature (London)* 299 (1982) 469.
- [65] J. A. Kelly, P. C. Moews, J. R. Knox, J.-M. Frère, J.-M. Ghuysen, *Science* 218 (1982) 479.
- [66] J. A. Kelly, J. R. Knox, P. C. Moews, G. J. Hite, J. B. Bartolone, H. Zhao, B. Joris, J.-M. Frère, J.-M. Ghuysen, *J. Biol. Chem.* 260 (1985) 6449.
- [67] B. Samraoui, B. J. Sutton, R. J. Todd, P. J. Artymiuk, S. G. Waley, D. C. Phillips, *Nature (London)* 320 (1986) 378.
- [68] M. G. Rossmann, E. Arnold, J. W. Erickson, E. A. Frankenberger, J. P. Griffith, H.-J. Hecht, J. E. Johnson, G. Kamer, M. Luo, A. G. Mosser, R. R. Rueckert, B. Sherry, G. Vriend, *Nature (London)* 317 (1985) 145.
- [69] J. M. Hogle, M. Chow, D. J. Filman, *Science* 229 (1985) 1358.
- [70] I. A. Wilson, J. J. Skehel, D. C. Wiley, *Nature (London)* 289 (1981) 366.
- [71] J. N. Varghese, W. G. Laver, P. M. Colman, *Nature (London)* 303 (1983) 35.
- [72] J. L. Middlebrook, R. B. Dorland, *Microbiol. Rev.* 48 (1984) 199.
- [73] J. Holmgren, *Nature (London)* 292 (1981) 413.
- [74] A. M. Pappenheimer, *Annu. Rev. Biochem.* 46 (1977) 69.
- [75] S. Van Heyningen, *Biosci. Rep.* 2 (1982) 135.
- [76] R. J. Collier, D. A. Kaplan, *Sci. Am.* 250 (7) (1983) 44.
- [77] A. Kurosky, D. E. Markel, J. W. Peterson, W. M. Fitch, *Science* 195 (1977) 299; C.-Y. Lai, *J. Biol. Chem.* 252 (1977) 7249.
- [78] E. K. Spicer, J. A. Noble, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 5716.
- [79] W. S. Dallas, S. Falkow, *Nature (London)* 288 (1980) 499.
- [80] T. Yamamoto, T. Tamura, T. Yokota, *J. Biol. Chem.* 259 (1984) 5037.
- [81] R. J. Collier, E. M. Westbrook, D. B. McKay, D. Eisenberg, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 5283.
- [82] P. B. Sigler, M. E. Druyan, H. C. Kiefer, R. A. Finkelstein, *Science* 197 (1977) 1277.
- [83] J. A. Zelano, E. Westbrook, A. Yonath, M. E. Druyan, P. B. Sigler in M. Balaban (Hrsg.): *Molecular Mechanism of Biological Recognition*, Elsevier-North Holland, Amsterdam 1979, S. 157-163.
- [84] S. E. Pronk, H. Hofstra, H. Groendijk, J. Kingman, M. B. A. Swarte, F. Dorner, J. Drenth, W. G. J. Hol, B. Witholt, *J. Biol. Chem.* 260 (1985) 13580.
- [85] J. Kraut, D. A. Matthews in F. Jurnak, A. McPherson (Hrsg.): *Biological Macromolecules and Assemblies*, Vol. 3, Wiley, New York 1986, im Druck.
- [86] R. L. Blakley in R. L. Blakley, S. J. Benkovic (Hrsg.): *Chemistry and Biochemistry of Folate*, Vol. 1, Wiley, New York 1984, S. 191-253.
- [87] D. J. Filman, J. T. Bolin, D. A. Matthews, J. Kraut, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 13663.
- [88] K. W. Volz, D. A. Matthews, R. A. Alden, S. T. Freer, C. Hansch, B. T. Kaufman, J. Kraut, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 2528.
- [89] D. K. Stammers, J. N. Champness, J. G. Dann, C. R. Beddell in J. A. Blair (Hrsg.): *Chemistry and Biology of Pteridines*, de Gruyter, Berlin 1983, S. 567-571.
- [90] R. Ferone, J. J. Burchall, G. H. Hitchings, *Mol. Pharmacol.* 5 (1969) 49.
- [91] C. E. Garrett, J. A. Coderre, T. D. Meek, E. P. Carvey, D. M. Claman, S. M. Beverley, D. V. Santi, *Mol. Biochem. Parasitol.* 11 (1984) 257.
- [92] R. Ferone, S. Roland, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980) 5802.
- [93] J. J. Jaffe, J. J. McCormack, W. E. Gutteridge, *Exp. Parasitol.* 25 (1969) 311.
- [94] D. A. Matthews, J. T. Bolin, J. M. Burridge, D. J. Filman, K. W. Volz, J. Kraut, *J. Biol. Chem.* 260 (1985) 392.
- [95] D. A. Matthews, J. T. Bolin, J. M. Burridge, D. J. Filman, K. W. Volz, B. T. Kaufman, C. R. Beddell, J. N. Champness, D. K. Stammers, J. Kraut, *J. Biol. Chem.* 260 (1985) 381.
- [96] L. F. Kuyper, B. Roth, D. P. Baccanari, R. Ferone, C. R. Beddell, J. N. Champness, D. K. Stammers, J. G. Dann, F. E. A. Norrington, D. J. Baker, P. J. Goodford, *J. Med. Chem.* 25 (1982) 1120.
- [97] B. Birdsall, J. Feeney, C. Pascual, G. C. K. Roberts, I. Kompis, R. L. Then, K. Müller, A. Kroehn, *J. Med. Chem.* 27 (1984) 1672.
- [98] R. L. Tansik, D. R. Averett, B. Roth, S. J. Paterson, D. Stone, D. P. Baccanari, *J. Biol. Chem.* 19 (1984) 12299.
- [99] W. W. Gutteridge, *Br. Med. Bull.* 41 (1985) 162.
- [100] M. J. Turner, *Adv. Parasitol.* 21 (1982) 69.
- [101] D. M. Freymann, P. Metclaf, M. Turner, D. C. Wiley, *Nature (London)* 311 (1984) 167.

- [102] F. R. Oppendoes, P. Borst, *FEBS Lett.* 80 (1977) 360.
- [103] A. H. Fairlamb, F. R. Oppendoes, P. Borst, *Nature (London)* 256 (1977) 270.
- [104] F. R. Oppendoes, *Br. Med. Bull.* 41 (1985) 130.
- [105] O. Misset, F. R. Oppendoes, *Eur. J. Biochem.* 144 (1984) 475.
- [106] O. Misset, O. J. M. Bos, F. R. Oppendoes, *Eur. J. Biochem.*, im Druck.
- [107] B. W. Swinkels, W. C. Gibson, K. A. Osinga, A. Kramer, P. Borst, G. H. Veeneman, J. H. Van Boom, *EMBO J.*, im Druck.
- [108] K. A. Osinga, B. W. Swinkels, W. C. Gibson, P. Borst, G. H. Veeneman, J. H. Van Boom, P. A. M. Michels, F. R. Oppendoes, *EMBO J.* 4 (1985) 3811.
- [109] P. A. M. Michels, A. Poliszczak, K. A. Osinga, O. Misset, J. Van Beeumen, R. K. Wierenga, P. Borst, F. R. Oppendoes, *EMBO J.*, im Druck; C. E. Clayton, *ibid.* 4 (1985) 2997.
- [110] R. K. Wierenga, W. G. J. Hol, O. Misset, F. R. Oppendoes, *J. Mol. Biol.* 178 (1984) 487.
- [111] R. K. Wierenga, persönliche Mitteilung.
- [112] T. Alber, D. W. Banner, A. C. Bloomer, G. A. Petsko, D. Phillips, P. S. Rivers, I. A. Wilson, *Philos. Trans. R. Soc. London B* 293 (1981) 159.
- [113] D. W. Rice, *Acta Crystallogr. A* 37 (1981) 491.
- [114] a) H. C. Watson, N. P. C. Walker, P. J. Shaw, T. N. Bryant, P. L. Wendell, L. A. Fothergill, R. E. Perkins, S. C. Conroy, M. J. Dobson, M. F. Tuite, A. J. Kingsman, S. M. Kingsman, *EMBO J.* 1 (1982) 1635; b) C. C. F. Blake, D. W. Rice, *Phil. Trans. R. Soc. London Ser. B* 293 (1981) 93; c) T. Sixma, R. K. Wierenga, unveröffentlicht.
- [115] R. K. Wierenga, B. Swinkels, P. A. M. Michels, K. Osinga, O. Misset, W. Gibson, J. P. M. Postma, P. Borst, F. R. Oppendoes, W. G. J. Hol, noch unveröffentlicht.
- [116] T. L. Blundell, L. N. Johnson: *Protein Crystallography*. Academic Press, London 1976.
- [117] A. McPherson: *Preparation and Analysis of Protein Crystals*, Wiley, New York 1982.
- [118] M. L. Kopka, C. Yoon, D. Goodsell, P. Pjura, R. E. Dickerson, *J. Mol. Biol.* 183 (1985) 553; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 (1985) 1376.
- [119] J. Deisenhofer, O. Epp, K. Miki, R. Huber, H. Michel, *Nature (London)* 318 (1985) 618.
- [120] C. Freudenreich, J.-P. Samama, J.-F. Biellmann, *J. Am. Chem. Soc.* 106 (1984) 3344.
- [121] L. Sawyer, D. M. Shotton, J. W. Campbell, P. L. Wendell, H. Muirhead, H. C. Watson, R. Diamond, R. C. Ladner, *J. Mol. Biol.* 118 (1978) 137.
- [122] D. L. Hughes, L. C. Sieker, J. Bieth, J.-L. Dimicoli, *J. Mol. Biol.* 162 (1982) 645.
- [123] C. A. McPhalen, H. P. Schnebli, M. N. G. James, *FEBS Lett.* 188 (1985) 55; W. Bode, E. Papamokos, D. Musil, U. Seemueller, H. Fritz, *EMBO J.* 5 (1986) 813.
- [124] H. Loebermann, R. Takuoka, J. Deisenhofer, R. Huber, *J. Mol. Biol.* 177 (1984) 531.
- [125] Y. S. Babu, J. S. Sack, T. J. Greenhough, C. E. Bugg, A. R. Means, W. J. Cook, *Nature (London)* 315 (1985) 37.
- [126] D. L. Newton, M. D. Oldewurtel, M. H. Krinks, J. Shiloach, C. B. Klee, *J. Biol. Chem.* 259 (1984) 4419.
- [127] O. Herzberg, M. N. G. James, *Nature (London)* 313 (1985) 653.
- [128] M. Sundaralingam, R. Bergstrom, G. Strasburg, S. T. Rao, P. Roychowdhury, M. Greaser, B. C. Wang, *Science* 227 (1985) 945.
- [129] J. Gariépy, R. S. Hodges, *Biochemistry* 22 (1983) 1586.