

Ein chemischer Weg zu neuen Proteinen – Templat-assoziierte synthetische Proteine (TASP)

Von Manfred Mutter* und Stéphane Vuilleumier

In memoriam Emil Thomas Kaiser

Fortschritte in den Methoden der Chemie und der Molekularbiologie veranlassen uns, einige Strukturprinzipien von Proteinen im Hinblick auf die Möglichkeit, künstliche Proteine zu entwerfen, erneut zu betrachten. Die chemische Synthese von Polypeptiden und die ortsspezifische Mutagenese von Proteinen haben sich zu Standardmethoden entwickelt und den Weg zur Konstruktion neuer Proteine geebnet. Obwohl in den vergangenen Jahren wesentliche Einblicke in den räumlichen Bau von natürlichen Proteinen gewonnen werden konnten, sind wir heute noch weit davon entfernt, nicht-natürliche Proteine mit maßgeschneiderten strukturellen und funktionellen Eigenschaften zu konstruieren – zweifellos ein Ziel von weitreichender wissenschaftlicher und ökonomischer Tragweite. Die entscheidende Hürde liegt weniger in der Synthese dieser Moleküle per se als vielmehr in einem besseren Verständnis des komplizierten Faltungsprozesses von Polypeptidketten in eine definierte räumliche Struktur. Kann der Chemiker seine Synthesewerkzeuge dazu einsetzen, diese als „Faltungsproblem“ bekanntgewordene Klippe des Neuentwurfs von Proteinen („de-novo-Design“) zu umschiffen? Im vorliegenden Bericht wird das kürzlich in unserem Laboratorium entwickelte TASP-Konzept vorgestellt, das einen synthetischen Zugang zu künstlichen Proteinen mit vorausbestimmter dreidimensionaler Struktur eröffnet. Damit ist ein erster Schritt auf dem Weg zu neuen Proteinen mit interessanten funktionellen Eigenschaften getan.

“Synthetic analogs of globular proteins are unknown. The capability of adopting a dense globular configuration stabilized by self-interactions and of transforming reversibly to the random coil are characteristics peculiar to the chain molecules of globular proteins alone.”

P. J. Flory^[1]

1. Einleitung

In den letzten Jahren haben wesentliche Fortschritte in der Synthese, Modifizierung und Analyse von Peptiden und Proteinen^[2, 3] uns der Überzeugung näher gebracht, daß die

fundamentalen Probleme der Proteinchemie in absehbarer Zeit gelöst werden können. Die Flut der wissenschaftlichen Daten hat es Chemikern und Molekularbiologen jetzt ermöglicht, jede beliebige Polypeptidkette effizient aufzubauen und molekulare Details über Struktur, Faltung und Funktion von Peptiden und Proteinen zu erfassen. Diese rasche Zunahme unserer Erkenntnisse über den Bau von Proteinen ließ die Idee reifen, neue, in der Natur nicht vorhandene (somit „künstliche“) Proteine zu konstruieren mit dem Ziel, einen Zugang zu Makromolekülen mit maßgeschneiderten strukturellen und funktionellen Eigenschaften

[*] Prof. Dr. M. Mutter [+], Dipl.-Natw. S. Vuilleumier
Institut für Organische Chemie der Universität
St.-Johanns-Ring 19, CH-4056 Basel (Schweiz)

[+] Neue Adresse:
Institut für Organische Chemie der Freien Universität
Takustraße 3, D-1000 Berlin 33

zu finden. Wie hat sich der Stand der Technik des Protein-Design seit unserem letzten Bericht^[4] verändert und vor allem: Wie weit sind wir heute noch von diesem faszinierenden Ziel entfernt? Der vorliegende Beitrag will darauf eine Antwort geben: Zunächst befassen wir uns mit den für die Konstruktion neuer Proteine relevanten Aspekten der Proteinstruktur; wir zeigen dann, daß die gentechnologische Modifizierung von natürlichen Proteinen (Protein-Engineering) und der Neuentwurf faltbarer Polypeptidketten (Protein-de-novo-Design) konvergierende Methoden sind, die wesentliche Einblicke in die Möglichkeiten und Grenzen des Protein-Design liefern. Auf dieser Basis beschreiben wir dann eine kürzlich von uns entwickelte neue Strategie zur Konstruktion künstlicher Proteine, die sich auf das Potential der chemischen Synthese stützt und zeigt, welche Rolle der Chemiker auf dieser heute weitgehend von Molekularbiologen beherrschten Bühne des Protein-Design in Zukunft spielen kann.

1.1. Proteine und Chemiker

Die Entwicklung der Gentechnologie^[5] hat die Identifizierung, Genklonierung und Sequenzierung sowie die Expression und Isolierung von praktisch jedem Protein ermöglicht und dazu geführt, daß Proteine heute als wesentlicher Teil der Pharmazeutika von morgen angesehen werden^[6]. Nicht zuletzt darin begründet sich das zunehmende Interesse des Chemikers an den molekularen Details von Proteinen. Die Proteinchemie wurde zur Herausforderung für Chemiker, nachdem *Emil Fischer* die chemische Synthese von Polypeptiden^[7] „zu möglichst langen Ketten“ fortsetzte, „um solche Produkte mit den natürlichen Proteinen vergleichen zu können“^[8]. Wir wissen heute, daß die natürliche Evolution in der Auswahl der Sequenzen sehr restriktiv war. Bei einer Kettenlänge von 100 Aminosäuren ließen sich zum Beispiel aus den 20 proteinogenen Aminosäuren 20¹⁰⁰ Proteine aufbauen, eine Zahl, die größer ist als die geschätzte Zahl der Atome im Universum. Zum Vergleich haben Menschen lediglich ca. 10⁵ Gene, die sich zur Codierung von Proteinen eignen. Die Aminosäuresequenzen (Primärsequenz) sind aber nur ein Teil der Geschichte: Natürliche Proteine sind einzigartig in der Welt der Polymere, denn sie können eine dichte, wohldefinierte, globuläre Konformation annehmen^[1] – ein charakteristisches und wesentliches Merkmal von Proteinen, das *Fischer* wohl kaum vorhersehen konnte. Einerseits bilden unterschiedliche Sequenzen den gleichen Strukturtyp^[9], andererseits jedoch können kurze, gleiche Sequenzen in unterschiedlichen Proteinen verschiedene Konformationen haben^[10].

Die meisten von Menschenhand entworfenen Polypeptidsequenzen falten keineswegs, sondern liegen vielmehr in Lösung als ungeordnete, flexible Knäuelstrukturen vor; dies zeigt deutlich, daß die Faltung in eine globuläre Struktur an strenge Kriterien geknüpft ist, eine Tatsache, die der „Protein-Designer“ als Faltungsproblem kennenlernt^[11, 12].

1.2. Das Protein kennt den Faltungsweg^[13]

Aber – um bei *Edsall*^[13] zu bleiben – haben wir inzwischen tatsächlich gelernt, es dem Protein gleichzutun? Die klas-

sische Arbeit von *Anfinsen* über Ribonuclease A^[14] zeigte, daß zumindest bei einigen Proteinen die Aminosäuresequenz die gesamte Information zur Faltung in die einzigartige globuläre Struktur enthält und daß das Protein denaturiert und renaturiert werden kann, ohne die enzymatische Aktivität zu verlieren. Dies bedeutet, daß der reversible Übergang zwischen entfaltetem und gefaltetem Zustand von der Freien Energie des Faltungsprozesses bestimmt wird. Man weiß noch nicht, ob die thermodynamische Stabilität die einzige Determinante des Faltungsweges ist; ob die native Konformation dem globalen oder einem lokalen Minimum der Energiehyperfläche entspricht, ist ebenfalls noch ungeklärt. Ein „Durchtesten“ aller möglichen Konformationen eines Proteins würde einen unermesslichen Zeitraum erfordern^[15], was die Annahme einer kinetischen Steuerung des Faltungsprozesses nahelegt. Dies gilt aber nur für den unrealistischen Fall, daß keinerlei weitreichende Wechselwirkungen den Konformationsraum der Kette einschränken. Berücksichtigt man nämlich die Effekte des ausgeschlossenen Volumens sowie die Tatsache, daß die verbleibenden möglichen Konformationen unterschiedliche Energien haben, kommt man eher zum Schluß, daß weder kinetische Argumente noch metastabile Zustände als Erklärung für die Erreichung der einzigartigen nativen Konformation herangezogen werden müssen^[16].

1.3. Kugel und Kette

Die Komplexität des Faltungsproblems von Proteinen hält uns gefangen im Bereich der Hypothesen und Spekulationen. Es erscheint deshalb sinnvoll, das Problem zunächst von den Grundlagen der Proteinstruktur aus zu beleuchten. Natürliche Proteine bestehen aus linearen Ketten von Aminosäuren, die durch Amid-(Peptid-)Bindungen miteinander verknüpft sind; die Reihenfolge (Sequenz) der Bausteine wird als *Primärstruktur* bezeichnet. Die Polypeptidkette ist aufgrund der Rotationsfreiheitsgrade um die N-C_α-Bindung (Diederwinkel Φ) und C_α-CO-Bindung (Diederwinkel Ψ) flexibel^[2, 3]. Der Konformationsraum (definiert durch die energetisch erlaubten Winkel Φ und Ψ) der Kette wird im wesentlichen durch energetisch ungünstige Wechselwirkungen innerhalb jedes Aminosäurebausteines eingeschränkt^[17]. Dennoch ergibt sich für eine Kette von der Länge eines typischen Proteins im entfalteten, statistischen Knäuelzustand („random-coil“) eine sehr große Zahl möglicher Konformere^[18]. Da die native Form eines Proteins einem dichtgepackten Zustand mit hohem Ordnungsgrad entspricht^[19], kommt der Konformationsentropie in der Energiebilanz zwischen gefalteter und entfalteter Kette entscheidendes Gewicht zu^[16]; eine experimentelle Erfassung dieses Energieterms ist allerdings äußerst schwierig. Die signifikanten sterischen Beschränkungen im dichtgepackten Zustand begünstigen die Entstehung regulärer Strukturmotive^[2, 3, 9, 16]. *Sekundärstrukturen* wie die α -Helix^[20], das β -Faltblatt^[21] und die „ β -Turns“^[22] sind typische Beispiele; einige im Zusammenhang mit dem Protein-Design wichtige Aspekte werden in Abschnitt 3.2 eingehend diskutiert werden. Die *Tertiärstruktur* von Proteinen kommt durch charakteristische Zusammenlagerung dieser Sekundärstrukturelemente zu kompakten dreidimensionalen Konformationen zustande.

Es ist denkbar, daß der Faltungsprozeß den Regeln der Sturkturhierarchien im Protein folgt. Dabei käme der spontanen Bildung von H-Brücken-stabilisierten Sekundärstrukturen eine entscheidende Rolle zu, indem sie als eine Art „Keime“^[2,3] im frühen Stadium der Faltung entstehen und den weiteren Faltungsprozeß gezielt und effektiv dirigieren. Experimentelle Studien des Faltungsweges und die strukturelle Charakterisierung von Zwischenstufen der Faltung^[1,12,23] weisen auf die Entstehung von Zwischenzuständen hin, die bereits typische Strukturmerkmale des nativen Zustandes aufweisen; dabei ist zu beachten, daß die hohe Kooperativität des Faltungsprozesses diese Experimente außerordentlich erschwert. Ein neueres und populäres Modell geht davon aus, daß die entfaltete Kette unter renaturierenden Bedingungen rasch zu einem kompakten Zustand („molten globule“) mit Sekundärstruktur kollabiert, der sich anschließend in den nativen Endzustand umlagert^[24]. Bezeichnenderweise scheint bis heute noch ungeklärt zu sein, ob es für eine gegebene Polypeptidkette *einen* oder *mehrere* Faltungswege gibt^[25]. An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, daß die Situation in vivo durchaus nicht derjenigen im Reagensglas entsprechen muß: So wurden zum Beispiel Enzyme gefunden, die die Disulfid-Umlagerung und die Peptidyl-Prolyl-*cis-trans*-Isomerisierung katalysieren^[26], die Bildung nicht korrekt gefalteter Strukturen verhindern sowie die Rückfaltung unterstützen können^[27].

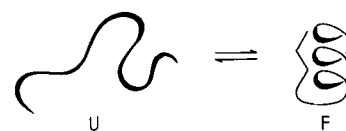
1.4. Das komplexe Zusammenspiel verschiedener Energieteile bestimmt die Proteinstabilität

Welches sind nun die treibenden Kräfte, die ein Protein „im Innersten“ zusammenhalten? Zur Erreichung einer definierten, einzigartigen dreidimensionalen Konformation muß vor allem die hohe Konformationsentropie^[16] der entfalteten Kette (siehe Abschnitt 1.3) durch mehrere Energieteile im gefalteten Zustand kompensiert werden (Abb. 1, Tabelle 1).

Zunächst haben hydrophobe Seitenketten die Tendenz, durch Zusammenlagerung im Innern des Proteins ihren Kontakt zum Lösungsmittel (Wasser) zu minimieren; hydrophile, geladene Gruppen dagegen kommen durch den bevorzugten Kontakt mit dem Lösungsmittel an die Proteinoberfläche. Die „hydrophobe Wechselwirkung“ wurde von *Kauzmann* vorausgesagt und diskutiert^[28], bevor die ersten Proteinstrukturen durch Röntgenstrukturanalysen ermittelt waren. Dieses Phänomen wurde inzwischen anhand der Verteilung von Aminosäurederivaten zwischen polaren und unpolaren Phasen^[29] sowie der Beiträge verschiedener Atomtypen zur Freien Energie der Solvation^[30] intensiv untersucht.

Die beiden wichtigsten Sekundärstrukturtypen, die α -Helix und die β -Faltblattstruktur, bleiben durch Bildung eines umfassenden Netzes von H-Brückenbindungen erhalten^[2,3,9]. Die meisten zur Wasserstoffbrückenbindung fähigen Gruppen scheinen im Proteinverband tatsächlich H-verbrückt zu sein^[31]. Dennoch wird der H-Brückenbindung zur Proteinstabilisierung in jüngerer Zeit geringeres Gewicht beigemessen, da es unklar ist, ob H-Brücken innerhalb des Proteins grundsätzlich stabiler sind als solche zwischen Lösungsmittel und Protein. Wenn auch der Energiebeitrag einer einzelnen H-Brücke zur Gesamtstabilität des Proteins zwei-

fellos sehr klein ist, spielt die kooperative Bildung von H-Brücken sehr wahrscheinlich eine entscheidende Rolle im Faltungsprozeß.



$$\Delta G_{F-U} = \Delta H - T\Delta S_{\text{Sol}} - T\Delta S_{\text{Kette}}$$

Abb. 1. Energiegleichung für die Faltung einer Polypeptidkette in eine Faltungseinheit: ΔG = Gibbssche Freie Energie des Faltungsprozesses, ΔH = Enthalpie, ΔS_{Sol} = Solvationsentropie, ΔS_{Kette} = Kettenentropie. Der kleine absolute Wert von ΔG ist die Folge der geringen Differenz der Energieteile im gefalteten (F) und entfalteten (U) Zustand der Polypeptidkette (vgl. Tabelle 1). Eine Vorhersage der thermodynamischen Stabilität von Proteinen ist somit sehr schwierig.

Tabelle 1. Abschätzung der Energiebeiträge (für ein Protein aus hundert Aminosäureresten), die für die Proteinstabilität bestimmend sind (nach [2]).

Energiebeiträge	ΔG_{F-U} [kcal mol ⁻¹]
Konformationsentropie	+ 330 bis + 100
Ungünstige Wechselwirkungen in F	+ 200
Hydrophobe Wechselwirkungen	- 264
van-der-Waals-Wechselwirkungen	- 227
Andere H-Brückenbindungen	- 49 bis - 719
Gefundene Werte für ΔG_{F-U}	- 5 bis - 10

Welche relative Bedeutung sich für die elektrostatischen Wechselwirkungen im Proteinverband ergibt, hängt sehr stark von der Abschätzung des Wertes der Dielektrizitätskonstante ϵ ab. So ist z. B. völlig unklar, ob und unter welchen Umständen die Proteinoberfläche den ϵ -Wert des umgebenden Lösungsmittels Wasser ($\epsilon \approx 81$) erhalten soll oder welcher Wert für ϵ die Verhältnisse im Innern des Proteins am besten wiedergibt (siehe^[32] für eine neuere Diskussion dieses Problems). Ionenpaarwechselwirkungen scheinen eher die Tertiärstruktur als die Sekundärstruktur zu stabilisieren und werden bevorzugt an der Oberfläche beobachtet^[33]. Dipolwechselwirkungen sind vor allem im Zusammenhang mit α -Helices intensiv studiert worden^[34,35]: Der Helixdipol ist parallel zur Helixachse orientiert und hat am N-Terminus eine positive, am C-Terminus eine negative Partialladung; dieser Befund wurde als Ursache für die bevorzugte *anti-parallele* Anordnung der Helices in Helixbündel-Strukturen angesehen. Weitere Energiebeiträge wie die Valenzkräfte kovalenter Bindungen, die anziehenden London-Dispersionskräfte und van-der-Waals-Abstoßungskräfte^[2,3] spielen in der Gesamtenergiebilanz des Faltungsprozesses eine geringere Rolle, da sie gleichermaßen den entfalteten wie den gefalteten Zustand des Moleküls beeinflussen; sie müssen aber bei Berechnungen berücksichtigt werden.

Eine besondere strukturstabilisierende Funktion hat die Disulfidbindung zwischen zwei Cysteinbausteinen, denn sie verankert zwei weiter entfernte Teile einer Kette miteinander. Solche „Quervernetzer“ schränken insbesondere den Konformationsraum der entfalteten, flexiblen Polypeptidkette drastisch ein, verringern die Kettenentropie (S_{Kette}) und begünstigen somit den gefalteten Zustand^[36,37] des Moleküls.

Da wir uns bisher auf die „statischen“ Elemente der Proteinstruktur konzentriert haben, könnte der Eindruck entstanden sein, Proteine seien starre, bewegungslose Makromoleküle. Dies entspricht freilich nicht den Tatsachen, da Flexibilität auf allen Ebenen der Struktur und Funktion von Proteinen eine wichtige Rolle spielt^[38]. In der Tat können Proteine als eine Komposition von „substates“ beschrieben werden^[39]. Außerdem befaßt sich natürlich ein weites Gebiet der Proteinwissenschaften mit der Dynamik von Proteinen^[40].

Als wohl wichtigsten Befund kann man aus den Studien über Proteininstabilität entnehmen, daß die Gesamtenergie-differenz ΔG_{F-U} (Abb. 1) zwischen gefaltetem und ungefaltetem Zustand ein verhältnismäßig kleiner Beitrag ist (in der Größenordnung von $5-10 \text{ kcal mol}^{-1}$)^[2, 3, 18, 28, 41] im Vergleich zu den einzelnen strukturstabilisierenden und -destabilisierenden Energiebeiträgen des Gesamtsystems (Tabelle 1); dies macht eine Abschätzung oder gar Berechnung der Proteininstabilität praktisch unmöglich.

2. Von der Strukturvorhersage zum Strukturentwurf

Bei der Berechnung von Peptid- und Proteinstrukturen^[42] tritt eine Reihe von schier unüberwindbaren Schwierigkeiten auf. Zum einen erfordert die Energieminimierung von Makromolekülen wegen der vielen Variablen dieser Systeme sehr lange Rechenzeiten. Zum anderen führt die unterschiedliche Gewichtung der einzelnen Energierterme zur Verwendung verschiedener Energiefunktionen, was einen Vergleich von modellierten Strukturen häufig erschwert. Am wichtigsten ist aber wohl der Vorbehalt, daß die Berücksichtigung von Entropie- und Lösungsmittelleffekten trotz signifikanter Fortschritte bis heute nicht befriedigend gelöst ist^[43].

Da man also offensichtlich nicht imstande ist, aus einer gegebenen Sequenz die Struktur zuverlässig zu berechnen^[44], müssen mehr oder weniger ausgefeilte empirische Vorhersagemethoden herangezogen werden. Dabei spielt die Verwendung des Computers, der nicht zuletzt wegen des lawinenartigen Anwachsens der Sequenzierungsdaten in der Gentechnologie^[45] ein Standardwerkzeug im biochemischen Laboratorium geworden ist, eine zunehmende Rolle. Heute sind zur „Interpretation“ einer gegebenen Aminosäuresequenz eine Vielzahl von Vorhersagealgorithmen kommerziell erhältlich^[46]. Semiempirische Methoden zur Strukturvorhersage haben bereits eine lange Entwicklung hinter sich. Der vielleicht noch immer populärste Vorhersagecode von Chou und Fasman^[47] gewichtet jede einzelne Aminosäure nach ihrer statistischen Häufigkeit, Teil einer α -Helix, eines β -Faltblatts oder eines β -Turns zu sein. Mit diesen Parametern werden dann empirische Regeln zur Vorhersage von Sekundärstrukturen aufgestellt. Des weiteren seien hier die aus der Informationstheorie abgeleitete Methode von Garnier et al.^[48], der statistisch-mechanische Ansatz von Tanaka und Scheraga^[49] sowie Methoden, die auf stereochemischen Betrachtungen basieren, erwähnt. Die letzteren reichen von einfachen visuellen Hilfsdarstellungen wie dem Helixrad („helical wheel“)^[50] und der Netzdarstellung von Helices^[51] (Abb. 2) bis hin zu den hochentwickelten Vorhersageregeln von Lim^[52].

In jüngster Zeit sind mehrere kombinatorische, Struktur-muster erkennende Ansätze vorgeschlagen worden^[54], die ihre Wurzeln in der modernen Computertechnologie haben.

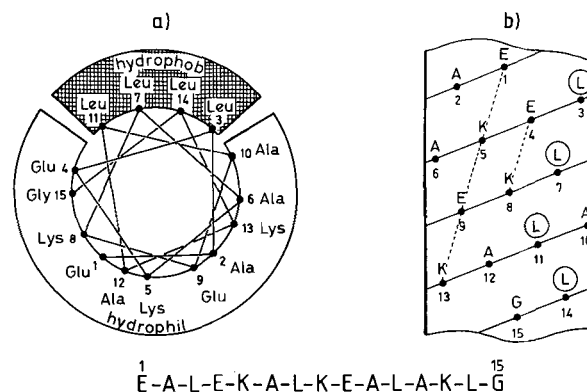


Abb. 2. Anwendung a) der Helixrad-[50] und b) der Netz-Darstellung[51] für den Entwurf von α -Helices. In a) werden die Amphiphile und in b) die bevorzugten elektrostatischen Wechselwirkungen[35] der helicalen Sequenz Glu-Ala-Leu-Glu-Lys-Ala-Leu-Lys-Glu-Ala-Leu-Ala-Lys-Leu-Gly deutlich[53].

Diese Vorhersagealgorithmen bringen einige Verbesserungen, allerdings auf Kosten einer großen Zahl neuer Variablen, die aus hochaufgelösten Röntgenstrukturanalysen von Proteinen abgeleitet werden müssen. Daß trotz aller Verbes-

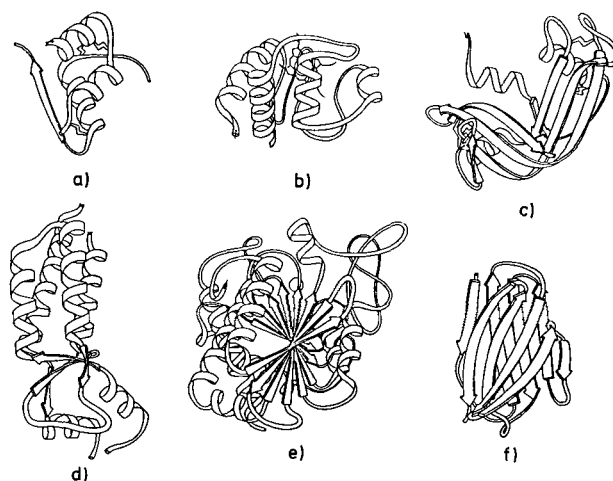


Abb. 3. Beispiele für Packungsanordnungen (Topologien) in Proteinen (nach J. S. Richardson[9]), basierend auf den Strukturen, die durch Röntgenstrukturanalyse bestimmt wurden. a) Insulin (kleines, disulfidreiches Protein), b) Cytochrom C (kleines, metallreiches Protein), c) Ribonuclease A (antiparallele β -Struktur), d) Tabakmosaik-Virus-Protein (antiparalleles „up and down“- α -Helixbündel), e) Carboxypeptidase (parallele α/β -Struktur), f) Immunoglobulin-V₁-Domäne (antiparallele „ β greek key β -barrel“-Struktur). Die Strukturen sind nicht in einheitlichem Maßstab dargestellt.

serungen die Vorhersagegenauigkeit in einem Drei-Zustands-Modell (α , β , random coil) auch heute noch unter 60% liegt^[55], hat in allen Fällen die gleiche Ursache: Die Vorhersageschemata basieren auf lokalen Wechselwirkungen entlang der Aminosäuresequenz und lassen – da Rönt-

genstrukturanalysen einer homologen Sequenz fehlen – weitreichende Wechselwirkungen notwendigerweise unberücksichtigt; diese können aber für die endgültige Konformation einer Peptidkette entscheidend sein^[44] (ausführlichere Darstellungen des Problems der Strukturvorhersage siehe^[54–56]).

Zusammenfassend ergibt sich, daß man trotz intensiver Forschungen über Proteinfaltung^[11,12] und Proteinstruktur^[2,3,9] noch weit von einer Vorhersage entfernt ist, ob eine gegebene Polypeptidsequenz unter geeigneten Bedingungen faltet und welche räumliche Struktur das Molekül dann einnehmen wird. Wir haben zwar insbesondere aus Röntgenstrukturdaten wesentliche Einblicke in die Gesetzmäßigkeiten der Proteintopologie erhalten (Abb. 3), und es ist zu erwarten, daß durch systematisches Absuchen der Datenbanken immer wieder neue, bisher versteckte Struktur motive von Proteinen ans Tageslicht befördert werden; unser Wissen über den Faltungsweg liegt aber noch weitgehend im Dunkeln^[57]. Diese Feststellung deutet bereits auf die zu erwartenden Hürden auf dem Weg zur Konstruktion neuer Proteine hin. Die Tatsache, daß eine beliebig entworfene Polypeptidkette mit hoher Wahrscheinlichkeit keinerlei Tendenz zur Faltung in eine Tertiärstruktur hat, unterstreicht diesen Punkt. Dieser unbefriedigende Stand der Dinge führte zur Idee, für eine gegebene, bekannte Struktur (quasi ein „vorgefaltetes Peptidrückgrat“^[57]) alle kompatiblen Primärsequenzen aufzufinden (Abb. 4). Diese in dieser Form

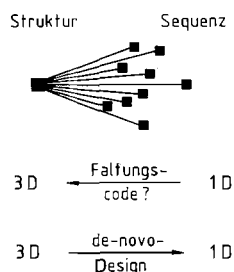


Abb. 4. Es ist heute noch nicht möglich vorauszusagen, „ob und wie“ eine gegebene (eindimensionale) Primärsequenz (1 D) in eine einzigartige dreidimensionale Struktur (3 D) faltet. Das Protein-de-novo-Design geht den umgekehrten Weg: Es versucht, für eine beliebig vorgegebene dreidimensionale Konformation eine Polypeptidsequenz zu entwerfen, die unter geeigneten Bedingungen tatsächlich in diese Konformation faltet. Die Grundlage für diesen Ansatz liegt in dem aus Röntgenstrukturdaten ermittelten Befund, daß unterschiedliche Polypeptidsequenzen in die gleiche dreidimensionale Struktur falten können („degenerierter Faltungscode“).

erstmal von Drexler formulierte Idee^[58] ist inzwischen mathematisch behandelt worden^[59] und ist nur ein Beispiel für die heute zu beobachtende „Symbiose“ zwischen biologischer Forschung und Computerwissenschaft. Protein-Design ist heute noch weitgehend eine Domäne des Molecular Modeling^[60] und der datengestützten („knowledge-based“) Strukturvorhersage^[61] und tendiert dazu, sich mit der farbigen Welt von Computerbildschirmen zu begnügen. Zweifellos wird aber erst die experimentelle Abstützung der am Computerbildschirm kreierte Moleküle zeigen, ob unsere Vorstellungen von Faltung und Aufbau von Proteinen der Realität nahe kommen.

3. Protein-Design: Eine wissenschaftliche Herausforderung mit bedeutendem Anwendungspotential

Man könnte sich fragen, ob es angesichts der Fülle natürlicher Proteine überhaupt sinnvoll ist, neue Proteine zu entwerfen. Doch, war es nicht schon immer ein „Urtrieb“ des Synthetikers, neue Moleküle mit interessanten Eigenschaften zu konstruieren? Und vor allem: Würde die Konstruktion neuer, nicht in der Natur vorhandener Proteine nicht schlüssig beweisen, daß wir das komplexe Zusammenspiel zwischen Primärstruktur, Sekundärstruktur und Tertiärstruktur natürlicher Proteine wirklich verstanden haben? In diesem Sinne käme der Konstruktion künstlicher Proteine eine ähnliche Schlüsselfunktion zu wie der Totalsynthese eines erstmals in der Struktur aufgeklärten Naturstoffs.

Neben diesen den „wissenschaftlichen Ehrgeiz“ befriedigenden Zielen besteht zweifellos ein Bedarf, über Makromoleküle zu verfügen, die einerseits ähnliche Funktionen wie Proteine und Enzyme übernehmen können, andererseits aber speziellen Anforderungen in Forschung und Industrie entsprechen. Gelingt es uns, chemische *Architekten* zu werden? In Ermangelung klarer Konstruktionspläne, die einen Aufbau von Grund auf (de-novo-Design) ermöglichen würden, erscheint es zunächst aussichtsreicher, Schritt für Schritt bereits vorhandene Bauwerke (natürliche Proteine) umzubauen. Dies ist der Weg des Protein-Engineering, der in Abschnitt 3.1 hinsichtlich seines Potentials zur Konstruktion neuer Proteine diskutiert wird.

3.1. Protein-Engineering: Manipulation einer natürlichen dreidimensionalen Struktur

Unter den Werkzeugen der Gentechnologie^[62] hat die Technik der ortsspezifischen Mutagenese („site-directed mutagenesis“)^[63], die die beliebige Veränderung der Aminosäuresequenz durch gezielten Einbau eines synthetischen Oligonucleotids in das Protein-Gen ermöglicht (Abb. 5a), von Anfang an^[64] einen enormen Einfluß auf die Proteinchemie gehabt. Durch ihre „nicht-destruktive“, äußerst selektive Verfahrensweise hat diese Technik die Möglichkeiten der klassischen Methoden zur chemischen Proteinmodifizierung^[65] entscheidend erweitert. Obschon eher ungewöhnlich für den traditionell arbeitenden Chemiker, ist sie ein

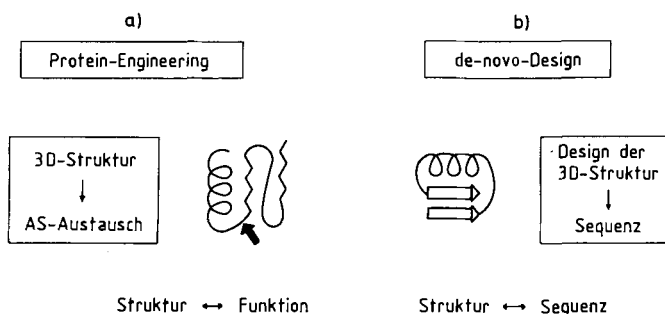


Abb. 5. a) Protein-Engineering und b) Protein-de-novo-Design sind zwei konvergierende Strategien zur Konstruktion von neuen Proteinen. Bei a) wird die natürliche Sequenz durch Punktmutation (ortsspezifische Mutagenese) modifiziert, so daß detaillierte Studien über den Zusammenhang zwischen Sequenz, Struktur und Funktion von Proteinen möglich werden (AS = Aminosäure). Bei b) wird die dreidimensionale Konformation vorgegeben; hier besteht die entscheidende Hürde im Entwurf einer Primärsequenz, die in diese Konformation faltet.

vergleichsweise sicheres Verfahren, um zu neuen Proteinen zu gelangen, da als Basis eine Polypeptidsequenz dient, die in eine Tertiärstruktur faltet. Allerdings können Modifizierungen oft nur in engen Grenzen durchgeführt werden, sollen die strukturellen und funktionalen Parameter des untersuchten Objekts erhalten bleiben. Dies ist nicht zuletzt eine Folge des subtilen Energiegleichgewichts zwischen entfalteter und gefalteter Form (siehe Abschnitt 1.4).

Es wäre vermessen, wollte man in diesem Beitrag alle Leistungen und Möglichkeiten des Protein-Engineering vorstellen, zumal es bereits ausgezeichnete Monographien zu diesem Thema gibt^[66]. Dennoch wollen wir auf die Möglichkeiten dieser Technik, wichtige Aspekte der Proteinfaltung und -stabilität besser verstehen zu lernen – eine Voraussetzung für das Protein-Design – kurz eingehen.

Arbeiten, die sich mit der Stabilität von Enzymen beschäftigen, sind hinsichtlich der Verwendung dieser Systeme als Katalysatoren von direktem industriellem Interesse: So kann es zum Beispiel gelingen, T4-Lysozym durch Einführung einer Disulfidbindung^[67] wärmebeständiger zu machen; auf ähnliche Art wurde die Stabilität von Subtilisin gegenüber Oxidation, Wärme und Basen erhöht^[68] sowie seine Substratspezifität durch Änderung sterischer, hydrophober und elektrostatischer Faktoren an der Bindungsstelle modifiziert^[68]. Ortsspezifische Mutagenese an „klassischen“ Enzymen wie Trypsin^[69] und Carboxypeptidase^[70] hat unser Verständnis der katalytischen Wirkungsweise dieser Systeme entscheidend vertieft. Im Falle der Tyr-tRNA-Synthetase ermöglichte die ortsspezifische Mutagenese einen bis zu dieser Zeit nicht realisierbaren Einblick in die molekularen Details des Katalysevorgangs^[71].

Die ortsspezifische Mutagenese hat erstmals auch den Weg zu detaillierten Untersuchungen der Proteinstruktur eröffnet. Angesichts der Fülle von Daten, die in jüngster Zeit publiziert worden sind, können wir hier nur einige repräsentative Beispiele geben. Die Bedeutung von Sekundärstrukturelementen für Faltung und Stabilität wurde am Beispiel der Dihydrofolat-Reduktase aufgezeigt^[72]. Der Ersatz von einem Lysin- durch einen Leucinrest in einer amphipathischen Helixsequenz des Rinderwachstumshormons führte unter verstärkter Ausfällung zur Verlangsamung des Faltungsprozesses; dies deutet auf die Stabilisierung assoziierter Zwischenstufen durch Aggregation amphiphiler Helices hin^[73]. Ähnlich hemmt eine Prolin-zu-Alanin-Mutation in Thioredoxin den geschwindigkeitsbestimmenden Faltungsschritt und belegt somit die essentielle Rolle des Prolins bei der Faltung^[74]. Eine weitere Studie zur Bedeutung der Prolinisomerisierung mit *Staphylococcus*-Nuclease legt nahe, daß dieser Prozeß sowohl für den gefalteten als auch für den ungefalteten Zustand des Moleküls wichtig ist^[75]. Am gleichen Modellprotein konnten die bei einer Mutation auftretenden Änderungen in den enthalpischen und entropischen Beiträgen zur Freien Energie der Denaturierung auf Änderungen in der Solvation und/oder der Konformation im denaturierten Zustand zurückgeführt werden^[76]. Ein wichtiger Befund wurde aus systematischen Änderungen der N-terminalen Region des Phagen- λ -Repressors erhalten: Während der Austausch von Aminosäuren in einigen Positionen drastische Effekte auf das Faltungsgleichgewicht auslöste, konnten andere Bausteine praktisch ohne Konsequenzen auf die Gesamtstruktur des Proteins^[77] in weiten Grenzen variiert werden. Dies zeigt deutlich, daß die struktu-

relle Information im allgemeinen sehr ungleichmäßig über die Sequenz verteilt ist.

Ausführliche Untersuchungen an T4-Lysozym haben zu wichtigen Erkenntnissen über die Proteinstabilität geführt^[78]: Das Protein erwies sich als überraschend tolerant gegenüber Mutationen an seiner Oberfläche, wohingegen Mutationen, die zu erhöhter Wärmeempfindlichkeit führten, eher im Bereich weniger flexibler Regionen und schlechter Lösungsmittelzugänglichkeit im gefalteten Zustand lagen. Zahlreiche Austauschoperationen des Prolins im C-terminalen Bereich der T4-Lysozym- α -Helix führten zur Verlängerung dieses Helixblocks, ohne jedoch die Proteinstabilität zu verändern^[79]. Daraus folgt, daß intramolekulare H-Brückenbindungen nicht stabiler sind als solche zwischen Protein und Lösungsmittel oder daß die resultierende α -Helix weniger gute Wechselwirkungen mit dem Rest des Proteins aufweist als die ursprüngliche Helix im Wildtypenzym.

Die Bedeutung hydrophober Wechselwirkungen in Proteinen wurde ebenfalls am Beispiel des T4-Lysozyms studiert^[80]; diese Ergebnisse ermöglichen einen experimentellen Vergleich mit den aus Hydrophobieskalen von Aminosäurederivaten^[29] abgeleiteten Daten.

In einer weiteren Studie an Ribonuclease als Modellprotein wurde die Rolle hydrophober Wechselwirkungen auf die Packungseigenschaften amphiphiler α -Helices und β -Faltblattstrukturen untersucht^[81]. Erste experimentelle Hinweise auf die Bedeutung des Helixdipols für die Proteinstabilität wurden erhalten^[82]; schließlich kann die ortsspezifische Mutagenese zu einem quantitativen Verständnis der Wasserstoffbrückenbindung beitragen^[83]. Spezielle Gesichtspunkte dieses sich rasch entwickelnden Gebietes sind kürzlich zusammengefaßt worden^[84].

Dieser kleine Ausschnitt der momentanen Aktivitäten auf dem Gebiet des Protein-Engineering macht deutlich, daß die Strategien zum Neuentwurf (de-novo-Design) von Proteinen in hohem Maße von den Ergebnissen dieser potenten Technik in bezug auf unser Verständnis von Tertiärstrukturen profitieren werden. Trotz aller Wertschätzung für dieses faszinierende Werkzeug zur gezielten und spezifischen Proteinmodifizierung darf aber ein Aspekt nicht unterschlagen werden: Die extreme Komplexität der Effekte, die beim Austausch einzelner Bausteine auf das Gesamtsystem des Proteinverbandes auftreten können, ermöglicht nur in Ausnahmefällen eine quantitative Analyse und Interpretation. Die Komplexität natürlicher Systeme als schier unüberwindbare Hürde im quantitativen Erfassen der Kräfte, die für die Proteinstruktur wichtig sind, könnte geradezu ein Signal für die Zuhilfenahme der *Peptidsynthese als Werkzeug* sein, um das Zustandekommen von Tertiärstrukturen an Systemen mit geringerer Komplexität zu studieren. In diesem Sinne sind Protein-Engineering und Protein-de-novo-Design mit chemischen Methoden zwei konvergierende Strategien zur Konstruktion neuer Proteine (vgl. Abb. 5).

3.2. Protein-de-novo-Design: Die Konstruktion einer dreidimensionalen Konformation aus elementaren Bausteinen

Im Lichte der Komplexität der Proteinfaltung scheint der Neuentwurf einer Primärstruktur, die in eine vorgegebene Konformation falten soll (Abb. 5b), ein hoffnungsloses Un-

terfangen zu sein. Können wir die Klippe des Proteinfaltungsproblems in irgendeiner Weise umschiffen, indem wir z. B. Proteine mit „festgelegtem“ Faltungsweg konstruieren? Zu dieser gewissermaßen optimistischen Vorstellung geben die oben diskutierten Gesetzmäßigkeiten der Faltungstopologie Anlaß, insbesondere

- 1) die begrenzte Anzahl unterschiedlicher Faltungstopologien^[9, 85] in natürlichen Proteinen (Abb. 3),
- 2) die „Entartung“ des Faltungs-codes (d. h. eine gegebene Konformation kann von einer Vielzahl unterschiedlicher Sequenzen eingenommen werden, Abb. 4) sowie
- 3) der Fortschritt in der Erkenntnis des Zusammenhangs zwischen Sequenz und Sekundärstrukturbildung, insbesondere aus Modellstudien an synthetischen Peptiden, und der Proteinfaltung und Proteinstabilität (durch die Technik der ortsspezifischen Mutagenese, siehe Abschnitt 3.1).

Als Leitfaden für das de-novo-Design dienen die grundlegenden Gesetzmäßigkeiten der Proteinstruktur, die in den vorangehenden Abschnitten dargestellt sind. Danach setzt sich eine Tertiärstruktur aus Sekundärstrukturelementen zusammen^[9, 85, 86], die durch Faltstellen („Turns“)^[22], Schleifen („Loops“)^[87] oder weniger geordnete Kettensegmente verbunden sind (Abb. 6).

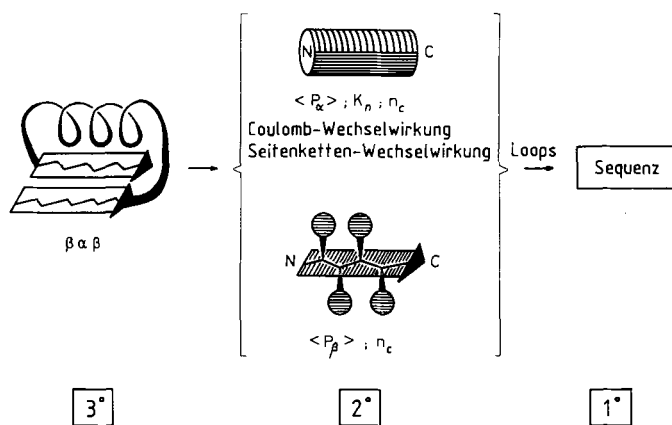


Abb. 6. Die Konstruktion von Tertiärstrukturen (3°) basiert auf den gängigen Vorstellungen über Faltung und Topologie von Proteinen, wie am Beispiel einer $\beta\alpha\beta$ -Faltungseinheit gezeigt ist. Danach wird eine dreidimensionale Konformation gebildet, indem sich Sekundärstrukturblöcke (2°) zusammenlagern, die über kurze Peptidketten (Schleifen („Loops“)) und Faltstellen („Turns“) miteinander verknüpft sind. Der Entwurf von Sequenzen (Primärstrukturen, 1°), die möglicherweise amphiphile Sekundärstrukturen bilden, erfolgt auf der Grundlage empirischer Vorhersagecodes (z. B. des Chou-Fasman-Codes^[47], der die Wahrscheinlichkeitsparameter $\langle P \rangle$ einzelner Aminosäuren, Teil einer Helix ($\langle P_\alpha \rangle$) oder einer β -Faltblattstruktur ($\langle P_\beta \rangle$) zu sein, festlegt), des Zimm-Bragg-Koeffizienten K_α ^[88] für die Helixbildung sowie der experimentell ermittelten Daten über die kritischen Kettenlängen n_c oder α -Helix- und β -Strukturbildung unter Einbeziehung von stabilisierenden Coulomb- und Seitenketten-Wechselwirkungen^[35].

Bei dieser Strategie werden im ersten Schritt Peptidblöcke mit hoher Tendenz zur Bildung definierter Konformationen (α -Helices, β -Faltblattstrukturen, Turns) auf einer Basis von experimentell oder semiempirisch ermittelten Konformationsparametern der Bausteine entworfen und im zweiten Schritt dann zu kleinen „globulären Tertiärstrukturen“ (Faltungseinheiten) zusammengelagert. Grundsätzlich ist dieser Weg sowohl mit chemischen als auch mit gentechnologischen Methoden zu beschreiten; jedoch sind die Bestrebun-

gen, neue Proteine direkt mit der DNA-Rekombinationstechnik zu entwerfen, noch kaum beschrieben worden. Wie oben angedeutet, kann die Größe (Komplexität) der Systeme, die sich mit gentechnologischen Methoden studieren lassen, eindeutigen Aussagen oft zum Verhängnis werden. Für das de-novo-Design mit chemischen Methoden – das Thema, auf das wir uns im folgenden konzentrieren werden –, scheinen hingegen wegen der praktischen Limitierungen in der Synthese und Reinigung der Produkte (siehe unten) nur kleinere Proteine in Frage zu kommen.

Die Faltung in eine kompakte, globuläre Struktur scheint bei kurzen Polypeptidketten vom energetischen Standpunkt aus besonders ungünstig zu sein, wobei folgende Faktoren ins Gewicht fallen^[4, 89]:

- 1) Die hohe Flexibilität linearer Polypeptide (kleine Effekte des ausgeschlossenen Volumens),
- 2) das kleine Volumen/Oberflächen-Verhältnis, das die Zahl möglicher hydrophober Wechselwirkungen (S_{Solv} als entscheidende Triebkraft zur Faltung, Abb. 1) begrenzt,
- 3) der Mangel an weitreichenden Wechselwirkungen, die zur Stabilisierung von Sekundärstrukturen beitragen.

Um diese die Faltung hemmenden Faktoren kurzer Polypeptidketten zu kompensieren, werden in der Regel strikt amphiphile Sekundärstrukturblöcke mit optimaler Stabilität entworfen^[4, 90], die als treibende Kraft zur Faltung ähnlich den natürlichen Proteinen einen hydrophoben „Kern“ im Innern des Moleküls und eine hydrophile Oberfläche bilden (Abb. 7).

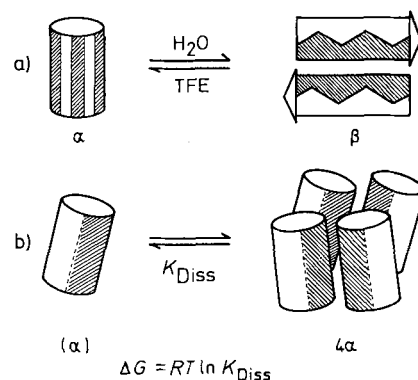


Abb. 7. Die Amphiphilie von Sekundärstrukturen als treibende Kraft für die Faltung in eine Tertiärstruktur: a) Amphiphile Sequenzen des Typs (A-B)_n, wobei A einer hydrophoben (z. B. Leu, Val) und B einer hydrophilen (z. B. Glu, Lys) Aminosäure entsprechen, haben in wässrigem Medium eine hohe Tendenz zur Assoziation; dabei kann sich durch Übereinanderlagerung von Ketten eine β -strukturartige Doppelschicht mit hydrophobem Inneren und hydrophiler Oberfläche bilden^[91]. In Trifluoethanol (TFE) ist diese Struktur weniger günstig, und das Konformationsgleichgewicht verschiebt sich mit steigendem Gehalt an TFE auf die Seite der α -Helixbildung. b) Amphiphile Helices haben eine hohe Neigung zur Selbstassoziation zu mehr oder weniger definierten multimeren Komplexen. Zum Beispiel scheinen Primärsequenzen des Typs (A-A-B-B)_n in Wasser bevorzugt 4 α -Helixbündel-Strukturen (4 α) zu bilden; die Freie Energie der Tetramerisierung (ΔG) wurde am Beispiel von Helices mittlerer Blocklänge auf ca. 20 kcal mol⁻¹ geschätzt^[92].

3.2.1. Entwurf von Sekundärstrukturblöcken mit maßgeschneiderten Eigenschaften

Systematische Untersuchungen an synthetischen Modellpeptiden haben in den vergangenen Jahren Aufschlüsse über das Zustandekommen von Sekundärstrukturen geliefert und bilden eine experimentelle Basis für die empirischen und se-

miempirischen theoretischen Ansätze der Strukturvorhersage. Dies ist gerade im Hinblick auf die Konstruktion neuer Proteine wichtig, da letztendlich die experimentelle Verifikation das Ziel jeglicher Strukturvorhersagen und Entwürfe ist.

Erste Studien an synthetischen Homooligopeptiden befaßten sich vor mehr als 20 Jahren hauptsächlich mit den Grundphänomenen der Sekundärstrukturbildung, insbesondere der kritischen Kettenlänge für die α -Helix- und β -Faltblattstrukturbildung in Abhängigkeit vom Aminosäurebaustein und von den experimentellen Bedingungen^[93, 94]. Diese Untersuchungen wurden durch Verwendung von „Wirt-Gast“-Cooligopeptiden erweitert^[95]. Dieses Konzept, das seinen Namen der makrocyclischen Organischen Chemie verdankt^[96], wurde erfolgreich zur experimentellen Ermittlung der Zimm-Bragg-Parameter σ und s ^[88] für die Beschreibung des Helix-Knäuel-Übergangs^[97] angewendet. Nach diesem Prinzip wird der Einfluß einer gezielt in ein Wirtpeptid eingebauten Aminosäure (Gast) auf die Konformationseigenschaften des Wirtpeptids bestimmt und somit indirekt das Helixbildungspotential der Gastaminosäure ermittelt. Detaillierte Untersuchungen zur Sekundärstrukturbildung gelangen durch die Synthese wohldefinierter Wirt-Gast-Peptide, wobei erstmals die Bedeutung von Nachbarschaftseffekten (mittelweitreichende Wechselwirkungen) auf die Stabilität von β -Faltblattstrukturen und Helices untersucht wurde^[94, 98–101]. Die daraus versuchsweise ermittelten Regeln für die Sekundärstrukturbildung deuten an, daß die aus Röntgenstrukturdaten kristalliner Proteine ermittelten Konformationsparameter und die daraus abgeleiteten Vorhersageregeln nicht ohne weiteres auf kurzkettige Peptide in Lösung anwendbar sind^[102]. Ein „Nebenaspekt“ dieser Studien von erheblicher praktischer Bedeutung war die Untersuchung konformationsabhängiger physikochemischer Eigenschaften bei der Peptidsynthese^[98, 99, 103].

Homo- und Cooligopeptide reflektieren die komplexen Verhältnisse sequentieller Peptide im Proteinverband zwar nur ungenügend, eignen sich aber hervorragend zum Design von Sekundärstrukturblocken mit maßgeschneiderten Eigenschaften (Blocklänge, Hydrophobie, etc.). Besonders wichtig für das Protein-Design sind hierbei amphiphile Strukturen.

Durch Synthese von Cooligopeptiden mit alternierend hydrophilen und hydrophoben Aminosäureresten konnte die Tendenz solcher amphiphiler Systeme zur Bildung von β -Faltblattstrukturen ermittelt werden (Tabelle 2)^[100]. Lös-

Tabelle 2. Experimentell ermittelte Werte der kritischen Zahl n_c an Dipeptideinheiten, die zur Bildung von β -Faltblattstrukturen in amphiphilen Oligopeptiden unterschiedlicher Sequenz notwendig ist (PEG = Polyethylenglycol als C-terminale Schutzgruppe, KL = Kettenlänge).

Peptid	Lösungsmittel	n_c	KL
(Ile-Gln) _n -Ile-Gly-PEG	H ₂ O	2	6
(Ile-Thr) _n -Gly-OH	CF ₃ CH ₂ OH	3	7
(Thr-Val) _n -Gly-OH	H ₂ O	4	9
(Ser-Leu) _n -Gly-PEG	H ₂ O	4	9
(Ser-Ala) _n -Ser-PEG	H ₂ O	> 4	> 9
(Val-Lys) _n -Gly-PEG	H ₂ O, pH 10	> 5	> 11

lichkeitsprobleme, die im allgemeinen eine Konformationsanalyse in Lösung erschweren, wurden durch Verwendung von Polyethylenglycolen als C-terminale, solubilisierende Schutzgruppe des Peptids^[104] umgangen. Somit konnten

vor allem β -Faltblattstruktur-bildende Oligopeptide, die besonders schwerlöslich sind^[105], auch in wäßriger Lösung untersucht werden. Wie aus Tabelle 2 ersichtlich, liegt die kritische Kettenlänge zur β -Strukturbildung bei 6–11 Aminosäureresten und ist damit im Bereich der bei Proteinen beobachteten Werte^[106]. Die überraschend hohe Neigung amphiphiler Peptide (vergleichbar mit hydrophoben Homooligopeptiden^[107]) zur Bildung dieses Sekundärstrukturtyps kann am besten durch Entstehung einer „Zweischichtstruktur“ (Abb. 7) erklärt werden^[91], bei der die hydrophilen Reste sich der wäßrigen Phase zuwenden. Sequenzspezifische Effekte (Tabelle 2) sowie eine genügende Gesamthydrophobie des Peptids (zur Freisetzung der Solvatationsentropie S_{Solv}) scheinen die Stabilität dieses Strukturtyps entscheidend zu beeinflussen^[108].

Die kritische Kettenlänge zur Bildung von α -Helices^[110] liegt je nach Helixpotential der einzelnen Aminosäuren bei ca. 10–15 Aminosäureresten in Helix-fördernden Lösungsmitteln wie 2,2,2-Trifluorethanol. Eine Verkleinerung der kritischen Kettenlänge kann durch den Einbau der stark Helix-induzierenden Aminosäure α -Aminoisobuttersäure (Aib)^[113] erreicht werden. Die Vielzahl der Studien von Aib enthaltenden Peptiden^[110–112] ermöglicht es, einige Richtlinien für den Entwurf maßgeschneiderter Helixblöcke abzuleiten: Mit zunehmendem Anteil an Aib-Bausteinen wird die Stabilität der Helix erhöht, d. h. die kritische Kettenlänge zur Helixbildung nimmt ab. Der Einbau von Aib muß entsprechend der Helixrad-Darstellung (vgl. Abb. 2) zu einer amphiphilen Helixstruktur führen. Wie aus Abbildung 8 her-

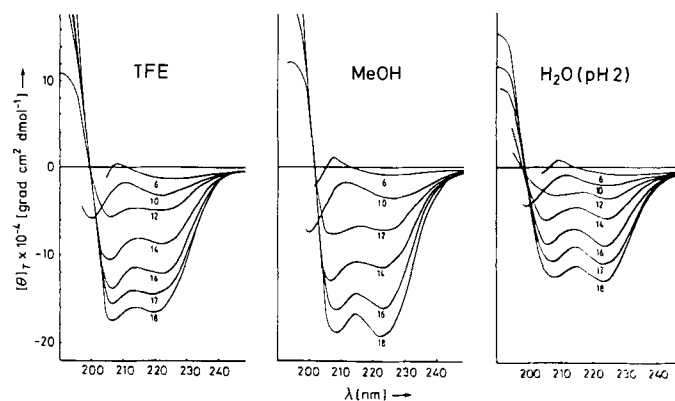


Abb. 8. Kettenlängenabhängigkeit der α -Helixbildung am Beispiel der Sequenz Pro-Glu-(Ala-Aib-Glu-Aib)_{1–4} [109]. Circular dichroismus-(CD)-Spektren deuten eine stufenweise Zunahme des Helixgehalts mit der Kettenlänge in den Lösungsmitteln Trifluorethanol (TFE), Methanol (MeOH) und Wasser (pH 2) bei einer Konzentration von 1 mg Peptid mL⁻¹ an. Aus den Gesamteptizitäten $[\theta]_T$ läßt sich der α -Helixgehalt abschätzen. Einbau der ungewöhnlichen Aminosäure α -Aminoisobuttersäure (Aib) fördert die Helixbildung [109–112]. Die Zahlen unter den Kurven entsprechen der Anzahl von Aminosäureresten pro Peptid. Die Sequenz mit 12 Aminosäureresten kommt beispielsweise wie folgt zustande: Pro-Glu-(Ala-Aib-Glu-Aib)₂-Ala-Aib.

vorgeht, weist ein amphiphiles, Aib-haltiges Peptid bei einer Kettenlänge von 18 Aminosäuren in einer Reihe von Lösungsmitteln (vor allem auch in Wasser) eine weit fortgeschrittene Helixbildung auf^[109–112]; der Ersatz von Aib durch Ala in solchen Peptiden führt zu einer signifikanten Verringerung des Helixgehalts^[112]. Inzwischen sind elegante Strategien zur Synthese von 2-Methyl-aminosäuren beschrieben worden^[114], so daß zu erwarten ist, daß diese Bausteine sich zu wertvollen Werkzeugen für die Konstruktion von maßgeschneiderten Helixblöcken entwickeln werden^[115].

3.2.2. Was können wir von Peptiden über Proteine lernen und vice versa?

Angesichts der großen Fortschritte in der Konformationsanalyse natürlicher Peptide, insbesondere durch moderne NMR-^[116], CD-^[117] und IR-Techniken^[118], sind die Untersuchung und die Optimierung der Sekundärstrukturbildung heute kein grundsätzliches Problem beim Protein-Design mehr. Das Studium der Konformationseigenschaften von Peptiden ist vor allem hinsichtlich der biologischen Funktion von Peptiden in den letzten Jahren in den Blickpunkt des Interesses gelangt. Dies wiederum hat zu einer Neubeurteilung der Wichtigkeit von Sekundärstrukturen für den Aufbau natürlicher Proteine geführt. Überraschenderweise haben detaillierte Untersuchungen der Sekundärstrukturbildung natürlich vorkommender Peptidsequenzen^[35, 119] ergeben, daß die Zimm-Bragg-Theorie über die Helixbildung^[120] erweitert werden muß, da der experimentell ermittelte Helixanteil in diesen Peptiden deutlich höher liegt als theoretisch erwartet. Dies ist in Einklang mit Modellen der Proteinfaltung, nach denen die Bildung der Sekundärstruktur in einer frühen Phase der Faltung beginnt^[23, 24]. In jüngster Zeit hat man Modellpeptide zum Studium des Faltungsweges herangezogen^[121].

Synthetische Modellpeptide können auch mit dem Ziel eingesetzt werden, charakteristische Eigenschaften makromolekularer Systeme (z. B. von Proteinoberflächen) an weniger komplexen Systemen zu imitieren; dabei wird die Flexibilität der Peptide durch Einschränkung des Konformationsraumes gezielt herabgesetzt. Neben den Pionierarbeiten von *E. T. Kaiser* an amphiphilen helicalen Peptidhormonen und Toxinen^[90] seien einige kürzlich beschriebene, typische Experimente erwähnt, die sich mit Peptiden zur Calmodulinbindung^[122], zinkbindenden Peptiden mit „Zinkfinger“-Konformation^[123], Modellen für die Proteinionenkanalbildung^[124], Rezeptor-Mimetica^[125], DNA-bindenden Peptiden^[126] sowie Peptiden mit Konformationseigenschaften von Epitopen in Proteinen^[127] befassen.

Modellpeptide werden auch in Zukunft eine wesentliche Rolle beim Studium der Tertiärstrukturbildung von Polypeptidketten spielen und letztendlich dazu beitragen, das Problem der Strukturvorhersage aus der Aminosäuresequenz zu lösen. Ebenso nützliche Dienste können sie bei der Ermittlung des Zusammenhangs zwischen Sequenz, Konformation und physikochemischen Eigenschaften von Peptiden und Proteinen leisten. Die wesentliche Hürde auf dem Weg zu neuen Proteinen liegt also weniger im Design der Bauelemente (Sekundärstrukturblöcke) selbst als vielmehr im Übergang von der Sekundär- zur Tertiärstrukturbildung. Die Abschätzung, wie schwierig die experimentelle Verifizierung dieses Schrittes ist, wird in naher Zukunft einen wesentlichen Teil der Forschungsbemühungen auf dem Gebiet der Protein- und Peptidstruktur ausmachen.

3.2.3. Von der Sekundär- zur Tertiärstruktur: Der lange Weg neuentwurfener Proteine vom Computerbildschirm zum Reagensglas

Bezeichnenderweise ist die experimentelle Rückkopplung auf dieser höheren Ebene der strukturellen Ordnung – der Tertiärstruktur – äußerst spärlich, gibt es doch nur wenige

Arbeiten, die konzeptionell diese Richtung verfolgen. Als Beispiele sind zu nennen: Ein $\beta\alpha$ -Struktur-bildendes 34-Peptid mit DNA-bindenden Eigenschaften^[128], ein viersträngiges DDT-bindendes antiparalleles β -Faltblattpeptid^[129, 130], ein synthetisches Modell von Tropomyosin mit einer zweisträngigen Helixstruktur („coiled-coils“)^[131], eine Studie an repetitiven Peptidsequenzen mit „Cross- β -Konformation“^[132], zwei Faltungseinheiten mit $\beta\alpha\beta$ -Topologie (aus 38 bzw. 35 Aminosäureresten)^[133] und schließlich die Synthese eines 66-Peptids mit antiparalleler β -Struktur („Betabellin“)^[134, 135]. Der vielleicht erfolgreichste Ansatz des Protein-Design umfaßt den schrittweisen Aufbau eines Vier-Helixbündel-Proteins: Zunächst konnte gezeigt werden, daß amphiphile Helices in wäßrigem Medium bevorzugt zu tetrameren Spezies assoziieren^[136]; ein chemisch synthetisiertes entsprechendes Dimer (ein 35-Peptid aus zwei Helices, die mit einer Loop-Sequenz verknüpft sind) ging durch Selbstassoziation in eine stabilere Vier-Helixbündel-Struktur über^[92]. Schließlich wurden die Erfahrungen an diesem System in bezug auf die physikochemischen Eigenschaften und das Konformationsverhalten dazu benutzt, ein einsträngiges lineares Polypeptid zu entwerfen und durch DNA-Rekombinationstechnik zu synthetisieren^[137, 138]; erste Befunde deuten darauf hin, daß sich die postulierte Vier-Helixbündel-Struktur tatsächlich bildet. Für alle zitierten Beispiele gilt allerdings der Einwand, daß erst eine Röntgenstrukturanalyse oder detaillierte NMR-Untersuchungen in Lösung den endgültigen Strukturbeweis erbringen können.

Ein Grund dafür, daß hier bis heute noch wenig experimentelles Material greifbar ist, sind nach unserer Erfahrung die ungünstigen Löslichkeitseigenschaften der neu entworfenen Peptide. Dies äußert sich gleich zweifach: Die Schwerlöslichkeit der vollgeschützten, wachsenden Peptidkette bereitet große Probleme bei der chemischen Synthese, und das entschützte, ungefaltete Polypeptid neigt in hohem Maße zur Aggregation und damit ebenfalls zur Schwerlöslichkeit des Produktes. Die Neigung zu intermolekularer Aggregation als konkurrierendem Prozeß zur (gewünschten) *intramolekularen* Faltung scheint ein zentrales, intrinsisches Problem der Konstruktion künstlicher Proteine zu sein. Dies wird bei Betrachtung der energetischen Faktoren der Proteinfaltung (Abb. 1, Tabelle 1) und der sich daraus ergebenden Konsequenzen für das de-novo-Design deutlich:

- 1) Um eine Tendenz zur Faltung in eine globuläre Struktur zu zeigen, muß das Polypeptid ausreichend hydrophob sein (die hydrophobe Entropie S_{soliv} kompensiert maßgeblich den Verlust an Kettenentropie S_{kette} im gefalteten Zustand, vgl. Tabelle 1). Zu große Hydrophobie führt aber zur Unlöslichkeit in wäßrigem Medium.
- 2) Zur Herabsetzung der Kettenentropie des entfalteten Polypeptids sowie als Keimbildung für die Faltung müssen die Sekundärstrukturblöcke auch ohne stabilisierende weitreichende Wechselwirkungen partiell ausgebildet sein. Um dies zu erreichen, werden im Regelfall strikt amphiphile α -Helices und β -Faltblattstrukturen aus Aminosäuren mit hohem Potential zur Sekundärstrukturbildung entworfen. Die ausgeprägte Amphiphilie der Sekundärstrukturblöcke im noch ungefalteten Molekül macht aber die Polypeptidkette in diesem „Zwischenzustand“ des Faltungsweges anfällig für Aggregationsprozesse.

Aus den bisherigen Versuchen (und vor allem den Fehlversuchen) kann man ableiten, daß die Balance dieser für die Faltung entscheidenden Faktoren äußerst subtil ist. Möglicherweise wird sich die „Zweistufenstrategie“, d. h. Design von stabilen Sekundärstrukturblo­cken mit anschließender Verknüpfung durch „Loops“ und „Turns“ (Abb. 6) zu Faltungseinheiten, in bezug auf den postulierten Faltungsweg als zu stark vereinfacht erweisen. Ein besseres Verständnis der Rolle von „Loops“ und „Turns“ im Faltungsprozeß könnte entscheidende Verbesserungen im Protein-Design erbringen^[92, 137, 138]. Auf alle Fälle reicht das „perfekte“ Design („overdesign“^[135]) von dreidimensionalen Konformationen mit optimalen intramolekularen Wechselwirkungen offensichtlich nicht aus, unser mangelndes Wissen über den *Faltungsmechanismus* zu kompensieren. Hier liegt also noch ein weites Feld für die Grundlagenforschung offen.

Diese Probleme schließen jedoch nicht aus, daß uns auch heute schon „Einzeltreffer“ gelingen, wie einige der angeführten Beispiele andeuten. Aber die entscheidende Frage für die Zukunft des rationalen Protein-Design wird sein: Können wir nach einer *allgemeinen Strategie* in einem ersten Schritt Proteine mit wohldefinierter dreidimensionaler Konformation und ausreichender Stabilität entwerfen, so daß in einem zweiten Schritt die Einführung funktioneller Eigenschaften in die vorgegebene räumliche Gerüststruktur möglich wird?

Es ist unsere Überzeugung, daß gerade die chemische Synthese durch ihr weites Potential an Methoden zur Strukturmodifizierung zur Lösung einiger dieser grundlegenden Probleme des Protein-Design beitragen kann. Bevor wir auf das Protein-Design mit chemischen Werkzeugen eingehen, wollen wir einen kritischen Blick auf das „Handwerk“ des Peptidchemikers selbst werfen.

4. Die chemische Peptid- und Proteinsynthese: Handwerk oder Kunst?

Die chemische Peptidsynthese überspannt wissenschaftliche Bemühungen eines ganzen Jahrhunderts. Es ist deshalb aussichtslos, einen umfassenden Überblick des aktuellen Standes zu geben, vielmehr erscheint es sinnvoll, an dieser Stelle nur diejenigen Aspekte und Probleme zu diskutieren, die für das Gebiet des Protein-Design mit chemischen Methoden relevant sind (umfassende Monographien siehe ^[139–141]; neuere Symposiumsberichte siehe ^[142]).

Aus der Distanz betrachtet scheint das Problem der Peptidsynthese gelöst zu sein und eher in den Bereich der Routinemethoden zu gehören. Da gibt es zum einen die vollautomatisch arbeitenden Peptidsyntheseapparate, mit denen Peptide mit Kettenlängen bis über 50 Aminosäuren innerhalb kürzester Zeit und in variabler Ansatzgröße aufgebaut werden können. Zum anderen erlaubt die DNA-Rekombinationstechnik im Prinzip die Synthese jeder Aminosäuresequenz; selbst die Produktion in industriellem Maßstab ist schon heute in einigen Fällen möglich. Angesichts dieser Situation ist man versucht, den Schluß zu ziehen, daß die Synthese von Peptiden und Proteinen kein lohnenswertes wissenschaftliches Ziel mehr ist. In der Tat waren es gerade die herausragenden Pionierleistungen, *Merrifields* geniales Konzept der Synthese am festen Träger^[143] und die Anwendung

der DNA-Rekombinationstechnik zur Peptidsynthese (siehe z. B. ^[5, 6, 123, 130, 137, 138, 144, 145]), die zu einer Art Verdrängung langanstehender und fundamentaler wissenschaftlicher Probleme der Peptid- und Proteinchemie geführt haben. Trotz der Erfolge dieser Methoden gibt es nämlich kein allgemein anwendbares Verfahren zum Aufbau von Peptiden. Wie in Tabelle 3 dargelegt, hat jede Strategie ihre charakteristischen Vorzüge und Grenzen; demzufolge steht bei der Wahl der Synthesemethode die Verwendung des Peptids im Vordergrund.

Es ist unbestritten, daß die Methode zur Synthese von Peptiden am festen Träger^[143] entscheidend zum Fortschritt unseres Wissens über diese wichtige Klasse von Biomolekülen beigetragen hat^[147]. Dennoch erscheint es angebracht, hinsichtlich der hohen Erwartungen an diese Strategie für die zukünftigen Ziele der Peptid- und Proteinsynthese eine kritische Bilanz der Möglichkeiten und Grenzen der Methode zu ziehen. Die Errungenschaften der Peptidsynthese wurden 1971 von *Wünsch* zusammengefaßt^[160], zu einem Zeitpunkt, als die konventionelle Peptidsynthese (Fragmentkondensation in Lösung) viele beeindruckende Erfolge erzielt hatte. Die Methoden der Schutzgruppentechnik, Aktivierung und Kupplung von Aminosäuren sowie der Peptidreinigung und -analytik hatten ein hohes Maß an Perfektion erreicht; dagegen zeichneten sich bei der Peptidsynthese am festen Träger im achten Jahr ihrer Entwicklung einige grundsätzliche methodische Limitierungen ab, die *Wünsch* trefflich als „Geburtsfehler“ dieser Methode bezeichnete, und zwar

- die absolute Notwendigkeit für die Erreichung quantitativer Umsätze in jedem Schritt des Synthesecyclus,
- die Verwendung großer Überschüsse an Aminosäurederivaten bei der Kupplungsreaktion,
- die Gefahr von Nebenreaktionen bei der Aktivierung, Kupplung und Schutzgruppenabspaltung,
- die schwierige analytische Kontrolle im heterogenen System (z. B. haben die Testreaktionen für quantitative Kupplungen dieselben Grenzen wie die zu testende Reaktion selbst),
- die Schwerlöslichkeit einiger Aminosäurederivate sowie Quell- und Diffusionsprobleme des Harzes aufgrund von Aggregationserscheinungen der wachsenden Peptidkette,
- die oft drastischen Abspaltungsbedingungen des Peptids vom polymeren Träger.

Haben wir nun entscheidende Fortschritte bei der Überwindung dieser grundsätzlichen Schwierigkeiten im Bereich der Synthese gemacht? In den letzten Jahren sind einige wichtige methodologische Verbesserungen erzielt worden, unter anderem bei der Weiterentwicklung der Schutzgruppenchemie. Zum Beispiel hat man neue Methoden sowohl zum Schutz der funktionellen Gruppen in den Seitenketten als auch zur Verankerung des Peptides am polymeren Träger entwickelt^[148]; auch sind die Nebenreaktionen während der Peptidkupplung oder der Abspaltung der Schutzgruppen^[161] heute besser bekannt. Eine wichtige Verbesserung war die Einführung einer alternativen Strategie zur Boc/Bzl-Standardkombination für den Schutz der Haupt- und Seitenkette des Peptids – der milderen Fmoc/*t*Bu-Chemie^[162] –, die sich vor allem in Verbindung mit neuen polymeren Trägern sehr bewährt hat^[163]. Der wohl entscheidende Impuls für die enorme Ausweitung der automatisierten Peptidsyn-

Tabelle 3. Vergleich der heutigen Methoden zur Peptid- und Proteinsynthese (AS = Aminosäure).

Methode	Bevorzugter Anwendungsbereich	Vorteile	Nachteile	Lit. [a]
Synthese in Lösung [b]	< 100 AS-Reste	Reinigung von Zwischenprodukten möglich, hohe Reinheit	Know how nötig, Zeitaufwand, Löslichkeitsprobleme	[139*, 146]
Synthese am festen Träger [b]	< 50 AS-Reste (obwohl > 100 oft beschrieben)	einfach, schnell, Screening möglich, automatisch	Reinigungsprobleme, analytische Kontrollen nötig	[147*, 148*, 92, 129, 133, 149, 150]
Kondensation von (am festen Träger erzeugten) Fragmenten [b]	< 100 AS-Reste	Reinigung von Fragmenten möglich	geringe Löslichkeiten und Ausbeuten, Racemisierung	[151]
Synthese am löslichen Träger (Polyethylenglycol als Schutzgruppe) [b]	< 30 AS-Reste	Solubilisierung, homogene Reaktionsbedingungen	schwierige Automatisierung und Isolierung des Peptids	[104*, 133]
Semisynthese [b]	Proteinfragmente, Proteine	minimaler Seitenkettenschutz	Optimierung nötig, keine Routine-Methode	[152*, 153]
Enzymatische Synthese [b]	AS-Bausteine → Proteine	Selektivität, keine Racemisierung, wäßriges Medium, Löslichkeit	Optimierung nötig, keine Routine-Methode	[154*, 155]
DNA-Rekombinationstechnik [c]	meistens Proteine	„natürliche Reinheit“, „unbegrenzter Vorrat“	Genexpression, Genproduktisolierung („inclusion bodies“)	[5*, 6*, 144*, 123, 130, 137, 138, 145, 156]

[a] Ausgewählte Literaturhinweise; ein Sternchen kennzeichnet Übersichtsartikel. [b] Chemische Methoden, die die Verwendung von nichtproteinogenen Aminosäuren [133, 150], Peptid-Mimetica [157], Turn-Mimetica [158], α - und β -Struktur-Mimetica [159] oder die selektive Einführung von spektroskopisch nachweisbaren Sonden ermöglichen. [c] Genetische Verfahren, die auf natürliche Gensequenzen beschränkt sind.

these kam aus dem Bereich der Peptidreinigungsverfahren, insbesondere der HPLC-Technik.

Im Hinblick auf die oben zitierten grundsätzlichen Probleme der Festphasensynthese läßt sich aber feststellen, daß gerade die unerwartet großen Erfolge der synthetischen Peptidchemie in der modernen Biologie^[164] die weiteren Forschungen über die *Grundlagen* der Peptidsynthese eher gehemmt haben.

Als Beispiel für ein weitgehend noch ungelöstes Problem der Peptidchemie sei der Einfluß der Konformation auf die physikochemischen Eigenschaften des Peptids wie Solvationsverhalten oder Kupplungskinetik erwähnt^[98, 99]. Systematische Untersuchungen der Sekundärstrukturbildung in Lösung und an Polymer-gebundenen Peptiden in unserem Laboratorium ergaben, daß beim Konformationsübergang des wachsenden Peptids von einer ungeordneten Struktur zu einer β -Faltblattkonformation die Reaktionsgeschwindigkeit im Kupplungsschritt drastisch abnimmt. Da wir heute noch wenig über die Sekundärstrukturbildung bei vollgeschützten Peptiden unter den Bedingungen der Peptidsynthese wissen, kann der Einfluß dieser Konformationseffekte auf den Verlauf der Peptidsynthese nur begrenzt vorausgesagt werden^[98, 99, 103]; jedes einzelne Peptid hat charakteristische Eigenschaften, ist also eine komplexe, einzigartige Spezies, und gerade diese Tatsache schließt ein allgemeingültiges, standardisiertes Syntheseverfahren von Peptiden aus.

Wo liegen heute die Perspektiven der chemischen Synthese von Peptiden und Proteinen? Kann sich diese Methode in Zukunft als potente, wertvolle Ergänzung oder gar Alternative zur DNA-Rekombinationstechnik entwickeln? Ein Vorzug der chemischen Synthese gegenüber dem biochemischen Weg ist offensichtlich: So ist der Einbau nichtproteinogener Aminosäuren und unnatürlicher Bausteine ein unverzichtbares Werkzeug der modernen Wirkstoffherstellung (Drug-Design), der Konformationsanalyse von Peptiden und Proteinen sowie bei Struktur-Aktivitäts-Untersuchungen und Rezeptorbindungsstudien.

Möglicherweise liegt das Gebiet mit dem zukunftsreichsten Potential für die chemische Synthese in der Konstruktion neuer Proteine, einer Forschungsrichtung, die sicherlich noch ganz in den Anfängen steckt. Die effiziente und zuverlässige Synthese selbst kleiner Proteindomänen (Faltungseinheiten aus 50–100 Aminosäureresten) erfordert zum Aufbau der Primärstruktur im allgemeinen eine Kombination mehrerer Synthesestrategien. Dabei scheint der Fragmentkondensation zwischengereinigter Peptide am polymeren Träger zunehmendes Gewicht zuzukommen (Literaturzitate siehe Tabelle 3). Langfristig wird die in Abbildung 9 dargestellte Kombination chemischer, enzymatischer und biologischer Methoden für die Ausnutzung des gesamten Potentials zur Konstruktion neuer Proteine entscheidend sein.

In dieser Hinsicht ist jedoch nicht die Synthese das Hauptproblem. In der Tat könnten die Syntheseprobleme sogar grundsätzlich als gelöst betrachtet werden, da es mit gentech-

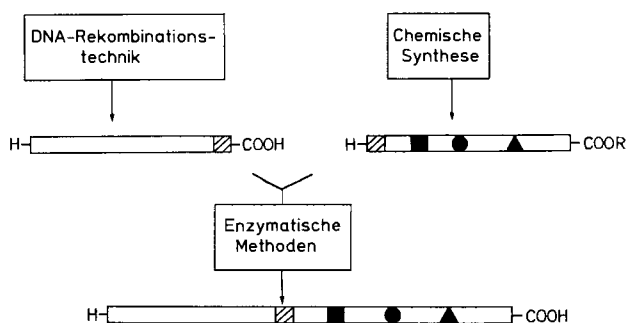


Abb. 9. Die Kombination biologischer, enzymatischer und chemischer Methoden zum Aufbau von Proteinen hat möglicherweise ein großes Potential für die Zukunft des Protein-Design. Wie das hypothetische Schema zeigt, wird dabei ein durch DNA-Rekombinationstechnik hergestelltes Peptidfragment (links) enzymatisch an ein chemisch (unter minimalem Seitenkettenschutz) synthetisiertes Fragment (rechts) gekuppelt. Durch dieses Verfahren ist es möglich, nichtproteinogene Aminosäuren, Mimetica oder spektroskopische Sonden (gefüllte Symbole) in die Sequenz einzubauen.

nologischen Methoden prinzipiell möglich ist, jede Aminosäuresequenz aufzubauen. Auch die chemischen Methoden zur Peptid- und Proteinsynthese, die wegen ihres unbegrenzten Potentials zur Strukturmodifizierung an Aktualität nichts verloren haben, sind eher durch den Aufwand an Zeit und Know-how als durch methodologische Faktoren beschränkt.

5. Die Verwendung chemischer Werkzeuge beim Protein-Design – Templat-assoziierte synthetische Proteine (TASP)

Die eigentliche Hürde auf dem Weg zu neuen Proteinen liegt also nicht etwa in der Etablierung der chemischen Struktur von Proteinen, sondern vielmehr im Auffinden von Polypeptidsequenzen, die in eine gewünschte räumliche Konformation falten. Die Aussichten, dieses „Faltungsproblem“ in absehbarer Zeit lösen zu können, müssen als sehr gering eingestuft werden. Gerade die Möglichkeiten des Protein-Engineering haben aufgedeckt, wie komplex der Zusammenhang zwischen Sequenz und Faltungstopologie bei natürlichen Proteinen ist. Es scheint fast aussichtslos, die Gesetzmäßigkeiten des evolutionären Selektions- und Optimierungsprozesses so zu erfassen, daß daraus allgemeine Regeln zum Bau neuer Proteine abgeleitet werden könnten.

In diesem Zusammenhang erscheint hier die Frage berechtigt, ob denn lineare Polypeptidketten überhaupt die „geeignetsten“ Grundstrukturen zur Konstruktion globulärer Proteine sind. Nach einer unbeweisbaren Spekulation blieb Mutter Natur, nachdem zuerst die ribosomale „Synthesefabrik“ von linearen Polypeptiden entwickelt war, keine andere Wahl, als in einem über Jahrmillionen dauernden Optimierungsprozeß die Faltung in eine biologisch sinnvolle, globuläre Konformation „zu erlernen“. Die These, daß die-



Abb. 10. Strategien für das Protein-de-novo-Design. Globuläre Strukturen können auf zwei Wegen konstruiert werden, wie hier am Beispiel eines 4 α -Helixbündel-Proteins gezeigt wird: Um die durch Selbstassoziation amphiphiler Helixblöcke entstandene tetramere Struktur (Mitte, vgl. Abb. 7b) zu erhalten, können die Helices durch Schleifen („Loops“) zu einer linearen Polypeptidkette verknüpft werden (links, siehe dazu [138]) – ein Weg, der dem natürlichen Aufbau von Proteinen entspricht. Die gleiche Packungsanordnung der Helices wird aber auch erreicht, wenn die einzelnen Helixblöcke auf einem Trägermolekül (Templat) kovalent fixiert werden (rechts). Diese Templat-assoziierten synthetischen Proteine (TASP) haben eine nicht-natürliche (verzweigte) Konnektivität der Peptidketten und sind somit nur durch chemische Synthese zugänglich.

ser Faltungsprozeß in eine einzigartige, alternative Konformation ausschließende^[137] dreidimensionale Struktur eine ungewöhnliche Eigenschaft linearer Polypeptide ist, zeigt sich darin, daß nur eine verschwindend kleine Zahl der denkbaren Polypeptidketten diese Fähigkeit tatsächlich hat.

Genau an diesem Punkt setzen unsere Überlegungen ein: Kann der Chemiker den steinigen Weg des Nachvollziehens der natürlichen Evolution von Proteinen eventuell meiden und statt dessen mit seinen Werkzeugen zu proteinartigen

Makromolekülen mit maßgeschneiderten strukturellen und funktionellen Eigenschaften gelangen^[89]? Wäre es z. B. möglich, Peptidgerüststrukturen zu konstruieren, die eine viel höhere Tendenz zur Faltung in eine globuläre Konformation haben als lineare Polypeptide? Der Aufbau von Peptidketten mit nicht-natürlicher Verknüpfung der Peptidsequenz (z. B. verzweigte Strukturen, Abb. 10) könnte ein Weg sein. Erstaunlicherweise haben Peptidchemiker, die sich mit dem Protein-Design befassen, von diesem vielleicht mächtigsten Werkzeug bisher kaum Gebrauch gemacht.

Mehrere Arbeitsgruppen beschäftigen sich seit einigen Jahren mit dem Bau künstlicher Proteinstrukturen. So haben wir z. B. bei der Konstruktion eines Enzymmodells vorgeschlagen, Peptidblöcke gezielt auf ein multifunktionelles Trägermolekül aufzupropfen^[4,165]. Ein ähnliches Konzept wurde von Heidemann et al.^[166] zum Studium der Tripelhelixbildung als Kollagenmodell entwickelt. Die Verwendung einer multifunktionellen Ankergruppe bei der Festkörpersynthese eines „ β -Barrel“-bildenden Proteins („Betabellin“) diente als Brücke zur Stabilisierung der hypothetischen Tertiärstruktur^[134,135,167]. In jüngster Zeit wurde auch eine Disulfidbrücke zur Stabilisierung paralleler Helices in Troponomyosin-„coiled-coil“-Modellen^[168] verwendet.

Wir haben nun kürzlich aus diesen Ansätzen eine allgemeine neue Strategie zur Konstruktion von künstlichen Proteinen entwickelt, welche die Gesetzmäßigkeiten der Proteinstruktur mit den Möglichkeiten der synthetischen Organischen Chemie konzeptionell verbindet^[169]. Danach werden amphiphile, Sekundärstruktur-bildende Peptidblöcke auf einem topologisch maßgeschneiderten Templatmolekül kovalent fixiert; dem Templatmolekül kommt die Funktion zu, die Peptidketten zu einer ähnlichen Packungsanordnung wie in Proteinen zu dirigieren. Die resultierenden Makromoleküle bezeichnen wir entsprechend ihrem strukturellen Aufbau als Templat-assoziierte synthetische Proteine (TASP, Abb. 11).

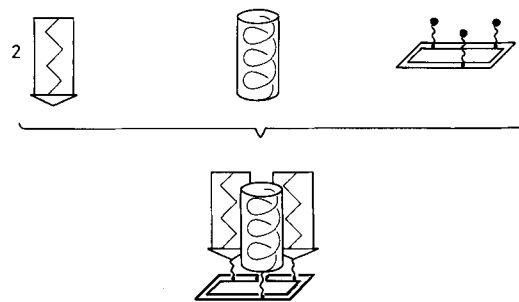


Abb. 11. Templat-assoziierte synthetische Proteine (TASP) als neues Konzept für künstliche Proteine. Amphiphile, Sekundärstruktur-bildende Peptidblöcke (β -Faltblattstrukturen, α -Helices) werden kovalent auf einem maßgeschneiderten Trägermolekül (Templat) fixiert; das Templat dirigiert die Peptidblöcke zu einer charakteristischen dreidimensionalen Struktur („Templateffekt“, siehe Text). Im abgebildeten Beispiel werden zwei β -Faltblattstränge und ein α -Helixblock auf einem trifunktionellen Templatmolekül zu einer „ $\beta\alpha\beta$ “-ähnlichen Faltungseinheit zusammengelagert.

Wie aus Abbildung 10 am Beispiel eines Vier-Helixbündel-Proteins ersichtlich wird, führt die nichtlineare Verknüpfung der Helices zu einem verzweigten Molekül. Dieser Unterschied in der Konnektivität des Kettengerüsts hat hinsichtlich der Bildung einer globulären Struktur erhebliche Konsequenzen: Während bei der linearen Anordnung von Helices das Molekül einen spezifischen Faltungsprozeß zur Bildung

der postulierten Tertiärstruktur durchlaufen muß, kann das verzweigte Molekül diese kompakte Struktur wesentlich direkter erreichen. Es ist offensichtlich, daß dem multifunktionalen Trägermolekül hierbei eine entscheidende Rolle zufällt, indem es

- 1) die intramolekularen Wechselwirkungen der kovalent fixierten Peptidblöcke begünstigt und
- 2) aufgrund der räumlichen Anordnung der funktionellen Gruppen („Verankerungsstellen“) die Packungstopologie des TASP-Moleküls festlegt (Abb. 12).

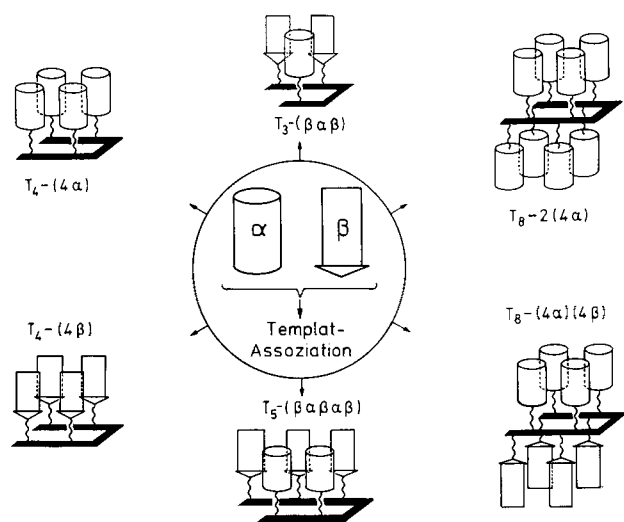


Abb. 12. Schematische Darstellung unterschiedlicher Packungsanordnungen (Topologien) von TASP-Molekülen (T_n : T = Templatmolekül; n = Zahl der Verankerungsstellen (funktionellen Gruppen) auf T ; α, β = amphiphile Peptidblöcke mit α -Helix- bzw. β -Faltblattstruktur). Zahl, Art und räumliche Orientierung der Verankerungsstellen des Trägermoleküls legen die postulierte dreidimensionale Konformation fest, d. h. sie wirken als *Templat* für die Faltung des Moleküls in die vorausbestimmte Struktur.

Bei dieser konzeptionellen Schlüsselfunktion in der TASP-Strategie kommt dem Trägermolekül entgegen früheren Ansätzen im Protein-Design nicht nur eine *strukturstabilisierende* Rolle (als „Quervernetzer“) zu, sondern es dient als *Templat* für die zu entwerfende dreidimensionale Konformation des Moleküls.

5.1. TASP-Moleküle – Die „Flucht“ des Chemikers aus dem Faltungsproblem?

Die konzeptionelle Einfachheit der neuen Strategie ermöglicht es, einige grundsätzliche energetische Aspekte zur Faltung von TASP-Molekülen zu diskutieren (Abb. 13). Wie oben aufgezeigt, induziert das Templatmolekül intramolekulare Wechselwirkungen zwischen kovalent gebundenen Peptidketten, so daß das Molekül im entfalteten Zustand eine hohe Knäuelichte (vielleicht mit einem „kollabierten Zustand“ eines linearen Kettenmoleküls vergleichbar) aufweist. Die Amphiphilie der Sekundärstrukturblöcke, die sich bei geeigneten („renaturierenden“) Bedingungen bilden, führt zur Selbstassoziation dieser Templat-gebundenen Peptide zu einer kompakten Struktur („intramolekularer Kollaps“) unter Optimierung der hydrophoben Wechselwirkungen, wobei

die Bildung der Sekundärstrukturen (Nucleationsschritt) zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt für die Faltung wird (Abb. 13).

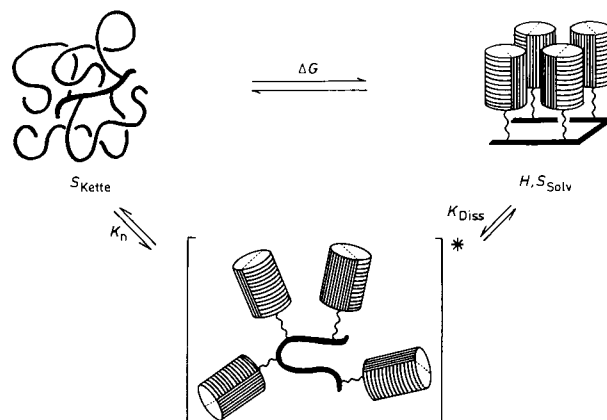
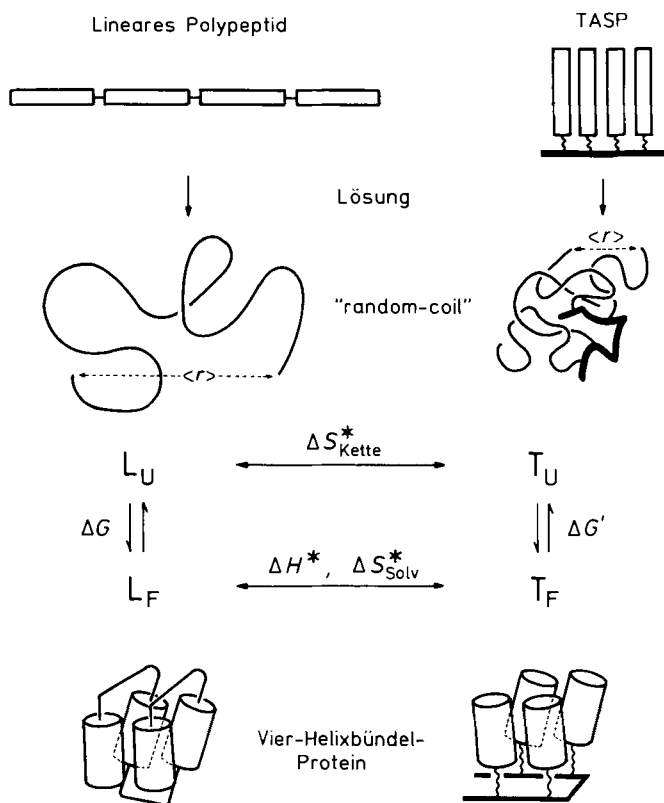


Abb. 13. Hypothetischer Faltungsweg von TASP-Molekülen am Beispiel einer 4α -Helixbündel-Struktur. Das ungeordnete, „kompakte“, verzweigte Molekül erreicht danach seine globuläre Struktur über einen geschwindigkeitsbestimmenden Nucleationsschritt, in welchem die Sekundärstruktur gebildet wird und die Kettenentropie S_{Kette} gegenüber der des ungeordneten Zustands abnimmt. Im Falle der Helixbildung kann dieser Schritt durch die Zimm-Bragg-Gleichung beschrieben werden: $K_n = \sigma s^n$ (σ und s bezeichnen die Faktoren der Helixnucleation bzw. des Helixwachstums, n = Kettenlänge des Peptids [88]). Bei der intramolekularen Assoziation der amphiphilen Sekundärstrukturblöcke ist die Zunahme der Solvationsentropie S_{Solv} (assoziierte Wassermoleküle werden durch Bildung eines hydrophoben Kerns freigesetzt) die entscheidende Triebkraft für die Faltung in eine globuläre Struktur. Die Freie Energie der Tetramerisierung von Helices kann dabei durch $K_{\text{Diss}} = [\alpha]^4 / [4\alpha]$ beschrieben werden. In der hypothetischen Zwischenstufe (durch ein Sternchen markiert) werden intramolekulare Wechselwirkungen durch die Fixierung der Helices an das Templat erzwungen, so daß die bei linearen Amphiphilen beobachtete Tendenz zu intermolekularer Aggregation bei TASP-Molekülen erheblich verringert ist.

Aufgrund dieses hypothetischen „Faltungsmechanismus“ von TASP-Molekülen ist nicht zu erwarten, daß im Faltungsprozeß substantielle Energiebarrieren überwunden werden müssen, wie dies bei linearen Polypeptidketten postuliert wird (Abb. 14).

Vom experimentellen Standpunkt her betrachtet ist das Phänomen der Selbstassoziation sehr wichtig: Durch die Templat-induzierten Nachbarschaftswechselwirkungen sind intermolekulare Assoziationen der amphiphilen Peptide weniger wahrscheinlich als intramolekulare Kontakte, d. h. die Aggregationstendenz sollte bei TASP-Molekülen erheblich kleiner sein als bei linearen Polypeptiden.

Durch die verzweigte Struktur von TASP-Molekülen und die dadurch bedingte hohe Volumendichte wirken sich signifikante Effekte des ausgeschlossenen Volumens aus; dies erniedrigt die Kettenentropie S_{Kette} im entfalteten Zustand U und erhöht konsequenterweise den Wert von ΔG_{F-U} (vgl. Abb. 1) [89]. Ein qualitativer Vergleich (Abb. 14) von linearen (L) und verzweigten Polypeptiden (T) illustriert diesen Punkt. Die Destabilisierung des entfalteten Zustands im verzweigten Polypeptid T beträgt $\Delta S_{\text{Kette}}^*$; somit ist T im gefalteten Zustand F thermodynamisch um ΔG_{L-T}^* stabiler als ein gefaltetes, lineares Polypeptid L ; unter der Voraussetzung, daß bei L und T im gefalteten Zustand (L_F bzw. T_F) die Packungsdichten und damit die Enthalpien H sowie die Solvationsentropien S_{Solv} von vergleichbarer Größe sind, führen diese Überlegungen zur Vorhersage, daß TASP-Moleküle thermodynamisch stabiler als lineare Polypeptide von



$$\Delta G_{L-T}^* = \Delta G' - \Delta G \approx \Delta S_{Kette}^*$$

Abb. 14. Schematische Darstellung thermodynamischer Aspekte für die Faltung von linearen (L) und verzweigten (T) Polypeptiden. Während die ungeordneten (U) Knäuelkonformationen beider Makromoleküle in schlecht solvatisierenden Lösungsmitteln (nahe am Thetapunkt) ausschließlich von kurzreichenden Wechselwirkungen bestimmt werden, treten bei guter Solvation der Ketten infolge weitreichender Wechselwirkungen erhebliche Effekte des ausgeschlossenen Volumens auf^[1], die sich z. B. durch eine Vergrößerung des End-zu-End-Vektors $\langle r \rangle$ (die Klammer bedeutet den statistisch-mechanischen Durchschnitt von r über alle dem Molekül zugänglichen Konformationen) bemerkbar machen. Aufgrund der höheren Knäuelichte im verzweigten Molekül wird dort die Zahl der dem Molekül zugänglichen Konformationen durch diese Effekte stärker eingeschränkt als im linearen Kettenmolekül (Verlust an Kettenentropie S_{Kette}); dies destabilisiert den entfalteten Zustand im verzweigten Molekül (T_U). Unter der Voraussetzung, daß die intramolekularen Wechselwirkungsenergien des gefalteten Zustands (F) in beiden Molekülen von vergleichbarer Größenordnung sind (d. h. ΔH^* , $\Delta S^* \approx 0$), ergibt sich aus dieser Darstellung, daß verzweigte Moleküle um ΔG_{L-T}^* stabiler sind als lineare Moleküle. TASP-Moleküle sollten demzufolge thermodynamisch stabiler sein als gefaltete lineare Polypeptide mit ähnlicher Packungstopologie (hier eine „Vier-Helixbündel“-Struktur). Dieser energetische Aspekt ist hinsichtlich einer „nachträglichen“ Funktionalisierung dieser Strukturen essentiell.

ähnlicher Größe sind. Dieser energetische Aspekt von TASP-Molekülen ist mit Blick auf die Zielsetzung des Protein-Design, nämlich die Einführung funktioneller Eigenschaften in vorgegebene dreidimensionale Strukturen (Abschnitt 6), von grundlegender Bedeutung.

5.2. Entwurf und Synthese von TASP-Molekülen

Der für das Protein-Design wohl wertvollste Aspekt des TASP-Konzepts besteht in der Zugänglichkeit von dreidimensionalen Konformationen mit einer großen Variationsbreite der Packungsanordnungen (Topologien) (vgl. Abb. 12). Das Computer-gestützte Design von TASP-Molekülen umfaßt vier Schritte:

- 1) den Entwurf von amphiphilen Peptidblöcken entsprechend den Regeln zur Sekundärstrukturbildung (Abb. 15a),
- 2) die Selbstassoziation der Peptidblöcke zu Systemen mit vorgegebener Packungsanordnung, so daß günstige intramolekulare Wechselwirkungen zustandekommen („conformational relaxation“); (Abb. 15b),
- 3) den Entwurf eines maßgeschneiderten Templatmoleküls und die Verknüpfung der Sekundärstrukturblöcke mit den funktionellen Gruppen des Templats (Abb. 15c und 15d),
- 4) die Minimierung der Konformationsenergie mit dem Ziel, eine hypothetische Struktur des TASP-Moleküls zu erhalten (Abb. 15e und 15f).

Prinzipiell kann jedes Molekül mit geeigneter räumlicher Anordnung der funktionellen Gruppen (Verankerungsstellen für die Peptidblöcke) als Templatmolekül dienen (Abb. 16); unter anderem ziehen wir cyclische Peptide, Peptide mit konformativen Einschränkungen, Saccharide sowie polycyclische aromatische und aliphatische Systeme in Betracht. In unseren explorativen Studien des Konzepts haben wir synthetische Oligopeptide als Templatmoleküle verwendet, weil hier die gut ausgereifte orthogonale Schutzgruppentechnik^[173] der Peptidchemie zur Verfügung steht, die eine hohe Flexibilität in der Synthesestrategie von TASP-Molekülen garantiert (Abb. 17, 18).

Das in Abbildung 15c dargestellte Modelltemplat ist ein cyclisches Decapeptid, das aus zwei über β -Turns verbrückten antiparallelen β -Faltblattstruktursegmenten der Sequenz (Lys-Ala-Lys) aufgebaut ist und von der Gramicidin-S-Struktur abgeleitet wurde^[171]. Durch Computer-gestütztes Molecular Modeling läßt sich zeigen, daß die vier ϵ -Aminogruppen der Lysinreste in einer energetisch bevorzugten Konformation einen idealen Abstand zur Konstruktion einer Vier-Helixbündel-Struktur haben (Abb. 15). Der Aufbau von TASP-Molekülen gelingt durch die üblichen Strategien der chemischen Peptidsynthese, also nach der konventionellen Lösungsmethode^[139] oder am polymeren Träger^[104, 148]. Abbildung 18 zeigt ein charakteristisches Beispiel. Der Variationsbreite des Konzepts sind vom Standpunkt der Synthese aus betrachtet keine Grenzen gesetzt. Die oben angeführte orthogonale Schutzgruppentechnik (Abb. 17) ermöglicht im Zusammenhang mit der Segmentkondensation (Abb. 19) den Aufbau einer Vielfalt von TASP-Topologien; so ist es unter anderem möglich, Peptidblöcke mit unterschiedlicher Sequenz und gegenseitiger Orientierung zusammenzulagern, um beispielsweise den Einfluß des Dipols^[34] bei paralleler oder antiparalleler Anordnung der Ketten auf die Stabilität einer dreidimensionalen Konformation experimentell zu überprüfen.

Die stufenweise Synthese am Träger ist durch ihre hohe Effizienz zwar geeignet, einige globale Eigenschaften der Moleküle rasch zu bewerten, doch gewähren die Lösungsmethoden (Segmentkondensation) höhere Flexibilität bei der Synthese und führen nicht zuletzt zu verlässlicheren Daten. Hinsichtlich der oben diskutierten Limitierungen der Peptidsynthese durch Konformationseffekte ist der Befund wichtig, daß das TASP-Molekül die postulierte Struktur erst *nach* Abspaltung aller Schutzgruppen, also nach Fertigstellung des Moleküls, einnimmt. Bei der Synthese dieser Moleküle gibt es somit keine anderen Beschränkungen als bei der Synthese linearer Polypeptide^[98, 99, 103].

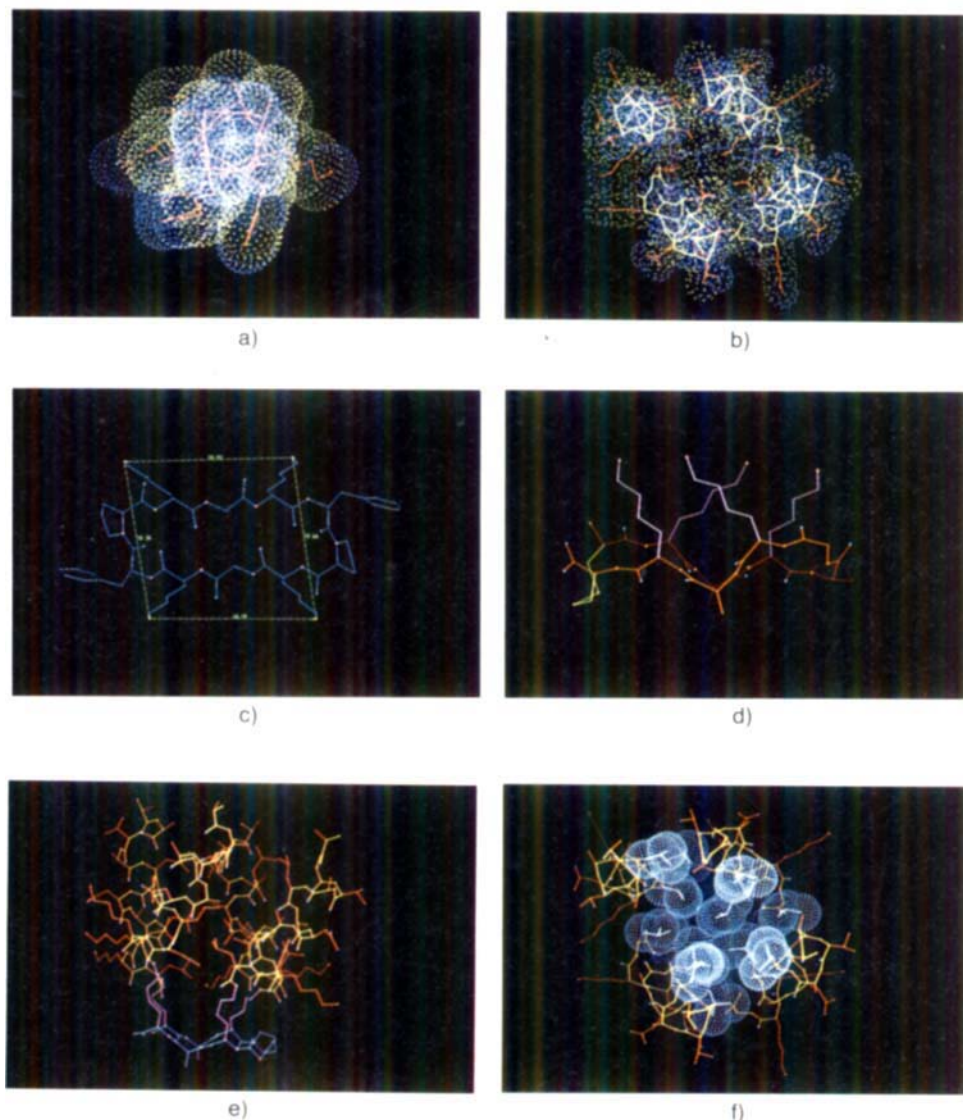


Abb. 15. TASP-Design durch Computer-gestütztes Molecular Modeling (unter Verwendung des „Roche interactive molecular graphic system“ (RIMG)[170]) am Beispiel eines Templat-assoziierten Vier-Helixbündel-Proteins (T_4 -(4 α) in Abb. 12). a) Entwurf des Sekundärstrukturblocks: Computer-generierte Modellhelix (Ansicht entlang des Helixzylinders) der Sequenz Glu-Ala-Leu-Glu-Lys-Ala-Leu-Lys-Glu-Ala-Leu-Ala-Lys-Leu (vgl. dazu auch Abb. 2). Die punktierten van-der-Waals-Oberflächen der hydrophoben (gelb) und der hydrophilen (blau) Seitenketten der Aminosäuren lassen den amphiphilen Charakter dieser Sequenz erkennen. b) „Selbstassoziation“ der Helices zu einer Vier-Helixbündel-Anordnung, bei der die hydrophoben Seitenketten (Leu) „nach innen“ und die hydrophilen Gruppen (Glu-Lys) auf der Oberfläche zu liegen kommen. c) Entwurf eines maßgeschneiderten Templatmoleküls: Cyclisches Decapeptid (Aufsicht der Sequenz cyclo(-Pro-Lys-Ala-Lys-D-Phe-)₂ (Analogon von Gramicidin S[171]). Das Peptid besteht aus zwei antiparallelen β -Struktursträngen (Lys-Ala-Lys), die über zwei β -Turns (D-Phe-Pro) vom Typ II verbrückt sind. Der gegenseitige Abstand der vier ϵ -Aminogruppen der Lysin-Bausteine beträgt in dieser energetisch bevorzugten Konformation des Peptids ca. 10–11 Å (gelbpunktiertes Viereck); das tetrafunktionelle Molekül ist somit ein ideales Templat für die Aufpfropfung der Vier-Helixbündel-Struktur (vgl. Abb. 15e, f). d) Seitenansicht eines cyclischen Templatmoleküls der Sequenz Cys-Lys-Ala-Lys-Pro-Gly-Lys-Ala-Lys-Cys. Der Ringschluß des Peptids erfolgt hierbei über eine S-S-Brücke ($-\text{CH}_2-\text{S}-\text{S}-\text{CH}_2-$, gelb) der Cysteinbausteine (Peptidgerüst rot und orange, Lysinseitenketten rosa). e) Seitenansicht eines Templat-assoziierten Vier-Helixbündel-Proteins[172]. Die C-terminalen Carboxygruppen der vier Helices der Bündelstruktur (vgl. Abb. 15b) werden mit den ϵ -Aminogruppen der vier Lysinreste des Templats (offenkettige Variante der in Abb. 15d gezeigten Verbindung) durch Amidbindung verknüpft. Unter Fixierung der Konformation des Templatgerüsts (blau) werden die Lysinseitenketten (rosa) sowie die aufgepfropften Helices (gelb und rot) unter Freigabe aller Rotationswinkel des Moleküls konformativ relaxiert, so daß eine spannungsfreie, energetisch günstige Konformation resultiert. f) Das gleiche Molekül wie in Abb. 15e vom N-Terminus der vier Helixzylinder aus betrachtet. Die Bildung eines hydrophoben Kerns im Innern des Vier-Helixbündels wird durch die blaupunktierten van-der-Waals-Oberflächen der Leucin-Seitenketten deutlich. Die Helixachsen sind in dieser bevorzugten Konformation des Moleküls wie bei natürlichen Proteinen mit Vier-Helixbündel-Struktur gegeneinander geneigt (Helixgerüst gelb, hydrophile Seitenketten rot).

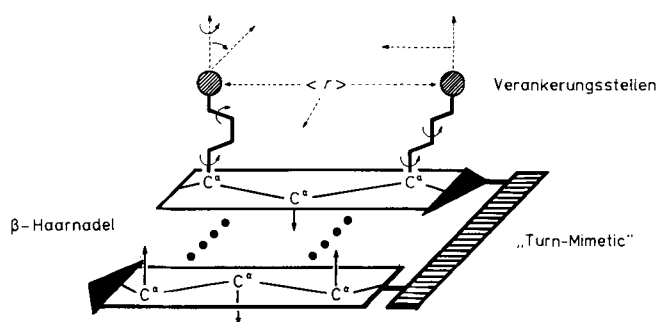


Abb. 16. Schematische Darstellung eines Templatmoleküls im TASP-Design. Der Einbau eines β -Turn-Mimetics (z. B. eines starren, bifunktionellen Moleküls, das den räumlichen Verhältnissen eines Dipeptids in der β -Turn-Konformation entspricht) stabilisiert die gewünschte „ β -Haarnadel“-Konformation des Templats (vgl. Abb. 15d). Durch Rotation um die C-C-Einfachbindungen der Lysinseitenketten kann der durchschnittliche Abstand $\langle r \rangle$ der Verankerungsstellen (ϵ -Aminogruppen der Lysinreste) den Erfordernissen der zu konstruierenden Packungstopologien (vgl. Abb. 12) angepaßt werden.

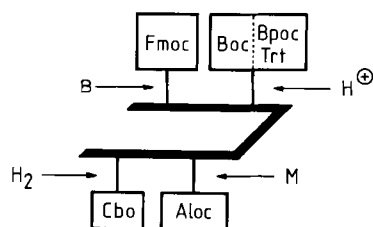


Abb. 17. Die selektive Entfernung von Schutzgruppen an den Verankerungsstellen des Templatmoleküls („orthogonale Schutzgruppentechnik“)[173] ist eine Voraussetzung zur Ausschöpfung des gesamten Potentials der TASP-Strategie. Als Beispiele sind hier folgende Aminoschutzgruppen (z. B. zum Schutz von ϵ -Aminogruppen der Lysinreste des Templatmoleküls, Abb. 16) aufgeführt: Fmoc (9-Fluorenylmethoxycarbonyl), spaltbar durch Basen (B); Boc (*tert*-Butoxycarbonyl), Bpoc (Biphenyl-isopropoxycarbonyl) und Trt (Trityl), die unterschiedlich labil gegenüber Säuren (H^+) sind; Cbo (Benzyloxycarbonyl), spaltbar durch Hydrogenolyse (H_2); Aloc (Allyloxycarbonyl), spaltbar durch Metallkomplexe (M), z. B. von Pd^0 (in Abb. 18 und 19 sind Anwendungsbeispiele angegeben).

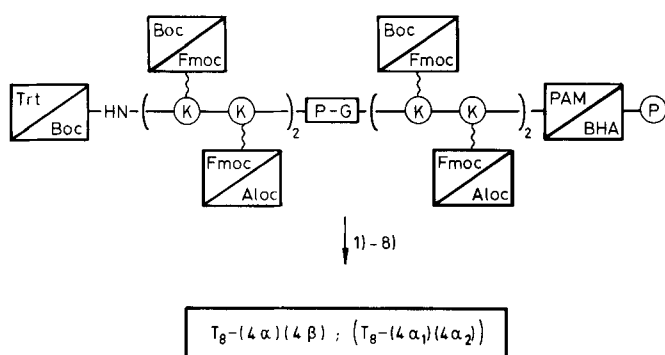


Abb. 18. Synthesestrategie zum Aufbau eines „Zwei-Domänen“-TASP-Moleküls[174] vom Typ $T_8-(4\alpha)(4\beta)$ oder $T_8-(4\alpha_1)(4\alpha_2)$ (Abb. 12). Das Templatmolekül wurde stufenweise an quervernetztem Polystyrol (P) als Träger über die säurelabile Phenylacetamidomethyl(PAM)-Ankergruppe unter Verwendung von N^{α} -Trt-Aminosäuren und N^{ϵ} -Fmoc- oder N^{ϵ} -Boc-geschütztem Lysin (K) aufgebaut. In einer alternativen Schutzgruppenstrategie wurde die Kombination N^{α} -Boc/ N^{ϵ} -Fmoc/ N^{ϵ} -Aloc in Verbindung mit dem säurelabilen Benzhydrylamin(BHA)-Anker verwendet. Die selektive Entfernung der orthogonal geschützten Lysin- ϵ -Aminogruppen des Templats vervollständigt schließlich den Aufbau der beiden „Domänen“ 4α und 4β (siehe Abb. 24a) oder $4\alpha_1$ und $4\alpha_2$. Einzelschritte: 1) Trt-(Boc)-Abspaltung; 2) N-Acylierung; 3) Boc-(Fmoc)-Abspaltung; 4) 15 (13) Kupplungszyklen α (α_1); 5) Fmoc-(Aloc)-Abspaltung; 6) 9 (15) Kupplungszyklen β (α_2); 7) N-Acylierung; 8) Entfernung der Schutzgruppen und Abspaltung vom Harz.

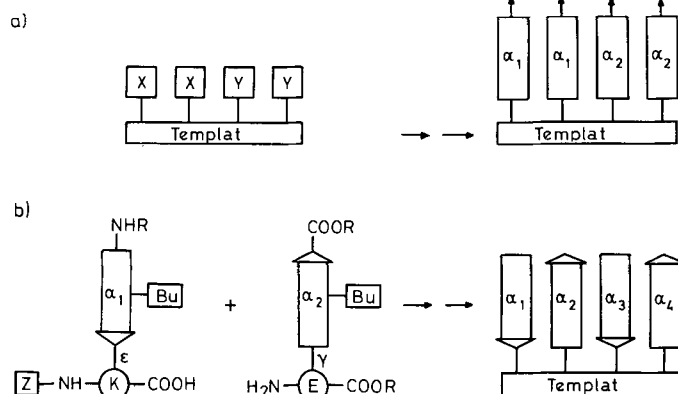


Abb. 19. Synthesestrategien im TASP-Design: Die selektive Abspaltung von Schutzgruppen (vgl. Abb. 18) ermöglicht den Aufbau von TASP-Molekülen mit unterschiedlicher Sequenz der Sekundärstrukturblöcke. a) Durch unabhängige Abspaltung der beiden Schutzgruppen X und Y im Templatmolekül können vier parallel orientierte Helices erzeugt werden, wobei jeweils zwei die gleiche Sequenz aufweisen. Die Helices lassen sich stufenweise oder durch Segmentkondensation aufbauen. b) Synthesestrategie, bei der durch Verwendung vollgeschützter Fragmente TASP-Moleküle mit antiparalleler Orientierung der Sekundärstrukturblöcke erhalten werden können (K = Lysin, E = Glutaminsäure, Z = Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppe, Bu = Schutzgruppen auf *tert*-Butyl-Basis).

5.3. Eigenschaften von TASP-Molekülen

Inzwischen haben wir TASP-Moleküle mit $\beta\alpha\beta$ -[175], „Vier-Helix-Bündel“-[172, 175] und „Zwei-Domänen“-($4\alpha/4\beta$)-Struktur[174] (Abb. 12) nach den oben entwickelten Prinzipien entworfen und experimentell untersucht (Abb. 20).

Obwohl eine umfassende Untersuchung der strukturellen und dynamischen Eigenschaften weiteren Studien – insbesondere detaillierten NMR-Untersuchungen – vorbehalten ist, lassen sich einige charakteristische Eigenschaften dieser neuartigen Makromoleküle bereits heute ableiten:

- 1) TASP-Moleküle zeigen durchweg gute Löslichkeitseigenschaften und liegen in wässriger Lösung in der Regel als monomere Spezies vor. Dieser Befund ist hinsichtlich der postulierten Struktur von erheblicher Aussagekraft: Durch die ausgeprägte Amphiphilie der Sekundärstruktur-bildenden Peptidblöcke ist die Tendenz zur Aggregation in wässrigen Systemen äußerst hoch; dies zeigt sich deutlich an linear verknüpften amphiphilen Polypeptidketten mit gleicher Aminosäurezusammensetzung und gleichem Molekulargewicht (d. h. die α -Helix- und β -Faltblattstruktur-bildenden Oligopeptide sind durch „Loops“ linear verknüpft), bei denen ungerichtete intermolekulare Assoziationen der Ketten die gewünschte intramolekulare Faltung häufig verhindern. Dagegen werden durch die kovalente Fixierung an ein Templatmolekül und die damit erzwungene räumliche Nachbarschaft der amphiphilen Oligopeptidketten intramolekulare Wechselwirkungen begünstigt, und die intrinsische Tendenz zur Aggregation führt in TASP-Molekülen wie gewünscht zur Bildung einer kompakten, monomeren Spezies, bei der die polaren Seitenketten sich dem Lösungsmittel zuwenden und somit gute Löslichkeit bewirken.
- 2) Die spektroskopischen Daten (besonders CD- und IR-Daten) zeigen, daß die Tendenz zur Bildung von α -Helix- und β -Faltblattstrukturen der Templat-gebundenen Oligopeptide erheblich größer ist als bei den individuellen Peptidblöcken. Besonders deutlich kann diese Templat-induzierte Sekundärstrukturbildung bei Modellpeptiden beobachtet werden, deren Kettenlänge unterhalb der experimentell bestimmten kritischen Länge zur α -Helix- bzw. β -Faltblattstrukturbildung liegt (Abb. 20).

Diese Resultate können im Rahmen des hier vorgestellten Modells interpretiert werden. Die Stabilisierungsenergie ist eine Folge von weitreichenden Wechselwirkungen zwischen den benachbarten Peptidblöcken. Sie führt dazu, daß die kritische Kettenlänge zur Sekundärstrukturbildung – anders als bei „isolierten“ (monomeren) Oligopeptidketten – den in globulären Proteinen beobachteten Blocklängen von Helices und β -Faltblattstrukturen entspricht[106]. Quelle dieser Stabilisierung ist die Bildung eines hydrophoben Kerns unter Freisetzung der Solvationsentropie (hydrophobe Wechselwirkung[28]), ein Prozeß, der durch die Fixierung der Peptidblöcke an ein Templatmolekül begünstigt wird (siehe oben).

Vorläufige Studien zur Denaturierung scheinen den vom energetischen Standpunkt zu erwartenden Befund zu bestätigen, daß die thermodynamische Stabilität von TASP-Molekülen signifikant größer als die von linearen Polypeptidket-

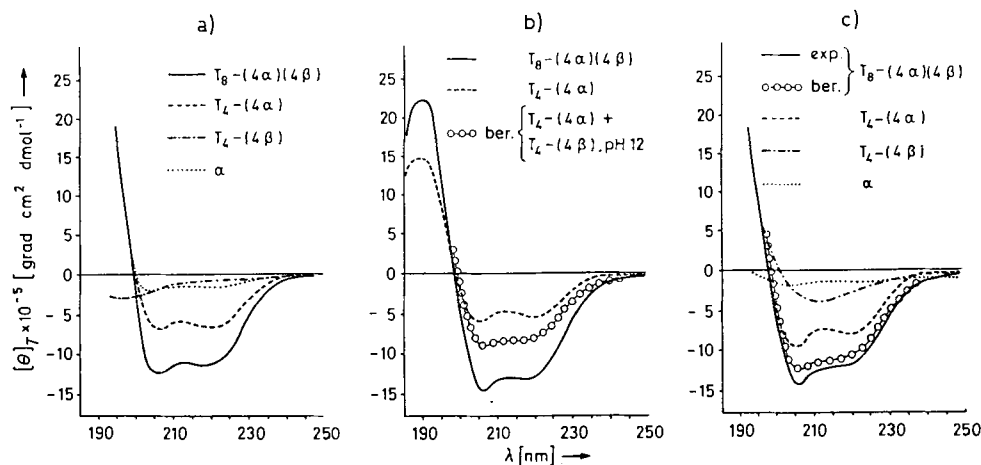


Abb. 20. CD-Spektren von $T_8-(4\alpha)(4\beta)$, einem repräsentativen Zwei-Domänen-TASP-Molekül, in wässriger Pufferlösung bei a) pH 5, b) pH 7 und c) pH 12; Konzentration 0.1 mM (aus [174]). Folgende Sequenzen liegen zugrunde: T_8 : Ac-[Lys(α)-Lys(β)]₂-Pro-Gly-[Lys(β)-Lys(α)]₂-εCA-GlyOH (εCA = ε-Aminohexansäure als Spacer-Gruppe zum Träger). α : Ac-Glu-Ala-Leu-Glu-Lys-Ala-Leu-Lys-Glu-Ala-Leu-Ala-Leu-Ala-Lys-Leu-Gly-; β : Ac-[Val-Lys]₄-Gly-. Die Elliptizitäten von $T_8-(4\alpha)(4\beta)$ entsprechen bei pH 12 der berechneten Summe aus den experimentell ermittelten Werten der einzelnen Domänen $T_4-(4\alpha)$ und $T_4-(4\beta)$; bei pH 7 wird eine deutliche Templatstabilisierung der beiden Sekundärstrukturen beobachtet. Besonders typisch ist der Befund, daß die einzelnen, nicht Templat-gebundenen Peptidblöcke keine signifikante Helixbildung zeigen; erst die Assoziation der Ketten auf dem Templatmolekül führt zur Sekundärstrukturbildung (Struktur-induzierender Effekt des Templats, siehe Text).

ten mit natürlicher Faltungstopologie ist (siehe dazu Abschnitt 5.1 sowie Abb. 14).

Neben diesen Untersuchungen geht es im nächsten Entwicklungsschritt des neuen Konzepts darum, die räumliche Struktur von TASP-Molekülen möglichst detailliert (hochauflösende NMR-Spektroskopie, Röntgenstrukturanalyse) zu erfassen. Dazu sind in unserem Laboratorium Anstrengungen im Gange, TASP-Moleküle entsprechend dem konventionellen Verfahren in Lösung nach unterschiedlichen Aufbauprinzipien zu synthetisieren (Abb. 19) und nach Möglichkeit zu kristallisieren.

6. Die Perspektiven des Protein-Design mit chemischen Methoden

“As we learn an increasing amount about the redesign of secondary structural regions in molecules where tertiary structure is all important, we are moving closer to the time when it will be possible to put together what we have learned about building molecules in regions outside the active site with the work which we have done on the active sites so that we can consider the construction of whole enzymatic systems with new structural features and catalytic functions.”

E. T. Kaiser^[179]

TASP-Moleküle mit ihrer nicht-natürlichen Architektur sind eine neue Klasse von Makromolekülen, deren Strukturmerkmale sowohl von synthetischen Polymeren (verzweigte Ketten, Pfropfpolymeren) als auch von globulären Proteinen (Peptidbausteine, hydrophober Kern, hydrophile Oberfläche) stammen. Das Design dieser Moleküle, das sich auf die synthetische Organische Chemie stützt, macht sich damit das große Potential struktureller Modifizierungen zunutze (Abb. 21), das nur durch die Intuition des Chemikers limitiert wird.

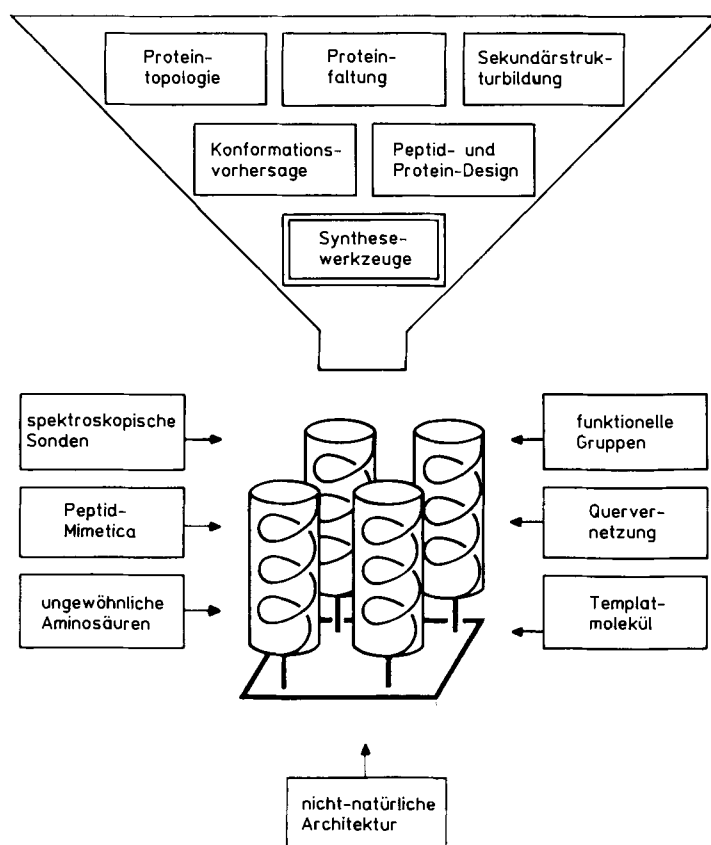


Abb. 21. „Nature's Rules and Chemist's Tools“ [89]: Die Vereinigung unserer Erkenntnisse über Struktur und Faltung natürlicher Proteine mit den Synthesewerkzeugen des Chemikers eröffnet möglicherweise einen Weg zur Lösung des Faltungsproblems bei der Konstruktion neuer Proteine. TASP-Moleküle sind eine neue Generation von Makromolekülen, die Eigenschaften von natürlichen Proteinen (globuläre Struktur) und von synthetischen Polymeren (nicht-natürliche Architektur) in sich vereinigen.

Wir können im Lichte der ermutigenden, in Abschnitt 5 skizzierten Resultate der spekulativen Hypothese nicht widerstehen, daß das Konzept der Templat-assoziierten synthetischen Proteine sich ganz allgemein zum Bau künstlicher Proteine mit einer Vielzahl räumlich wohldefinierter Struk-

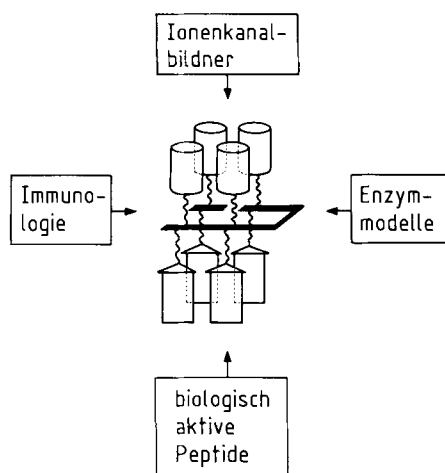


Abb. 22. Anwendungen des TASP-Konzepts. Vom Entwurf einer Tertiärstruktur zur Funktion: Wenn wir Zugang zu künstlichen Proteinen mit vorausbestimmter dreidimensionaler Konformation haben, wird die Einführung funktioneller Eigenschaften der nächste Schritt im TASP-Design sein (siehe auch Abb. 23 und 24). Ein nach diesen Prinzipien entworfenes Molekül, das katalytische Aktivität aufweist, wurde in jüngster Zeit von *Sasaki* und *Kaiser* beschrieben [176].

turen anwenden läßt und damit eine überraschende Lösung des zentralen Problems im heutigen Protein-de-novo-Design gefunden ist: Die wenig verstandene Faltung einer linearen Polypeptidkette in eine globuläre Struktur wird „umgangen“, indem Strukturen mit einer dem Molekül innewohnenden Triebkraft („Templat-Effekt“) zur Faltung konstruiert werden. Wenn wir imstande sind, Moleküle mit vorausbestimmter dreidimensionaler Konformation zu entwerfen, ist

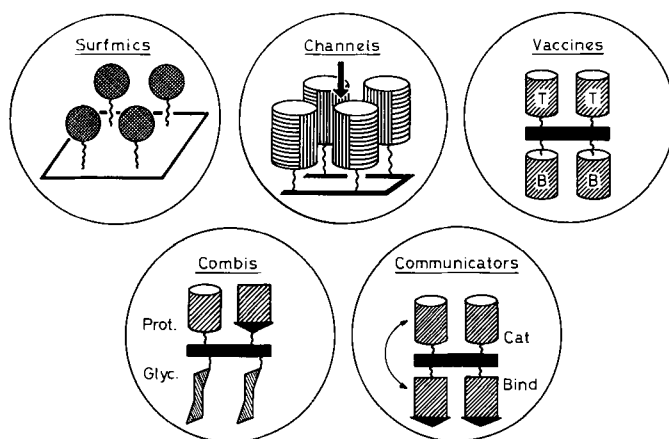


Abb. 23. Zukunftsperspektiven des Protein-Designs aus der Sicht des neuentwickelten TASP-Konzepts. Die gezielte Funktionalisierung von TASP-Molekülen zur „Rekonstruktion“ von Teilen von Rezeptoren sowie von immunologisch oder gar katalytisch relevanten Zentren von Proteinen und Enzymen steht im Mittelpunkt des Interesses. „Surfmics“ imitieren Oberflächenbereiche von Proteinen, wobei funktionell relevante Seitenketten auf ein geeignetes Templatmolekül „übertragen“ werden. „Communicators“ könnten TASP-Moleküle mit wechselwirkenden „Zwei-Domänen“-TASP-Strukturen sein (z. B. mit Resten sowohl aus einer Bindungsstelle als auch aus einem aktiven Zentrum eines Proteins); in immunologisch interessanten TASP-Molekülen („Vaccines“) sind z. B. die beiden Faltungsdomänen aus B- und T-Zellen-Epitopen aufgebaut. „Channels“ symbolisieren eine membranaktive Variante von TASP-Molekülen, in denen selektive Ionenkanäle durch Assoziation von Membran-durchspannenden Helices (unter Bildung eines hydrophilen Kanals und einer hydrophoben Oberfläche) [184] mit maßgeschneiderten Templatmolekülen entworfen werden. Glycoprotein-ähnliche TASP-Moleküle („Combis“) schließlich werden durch die Kombination glycosidischer und proteinartiger Strukturen auf einem Templatmolekül in Analogie zum Syntheseprinzip von „Zwei-Domänen“-TASP-Strukturen konstruiert. Explorative Studien zum Entwurf und zur Synthese dieser „funktionellen“ TASP-Moleküle sind in unserem Laboratorium im Gange.

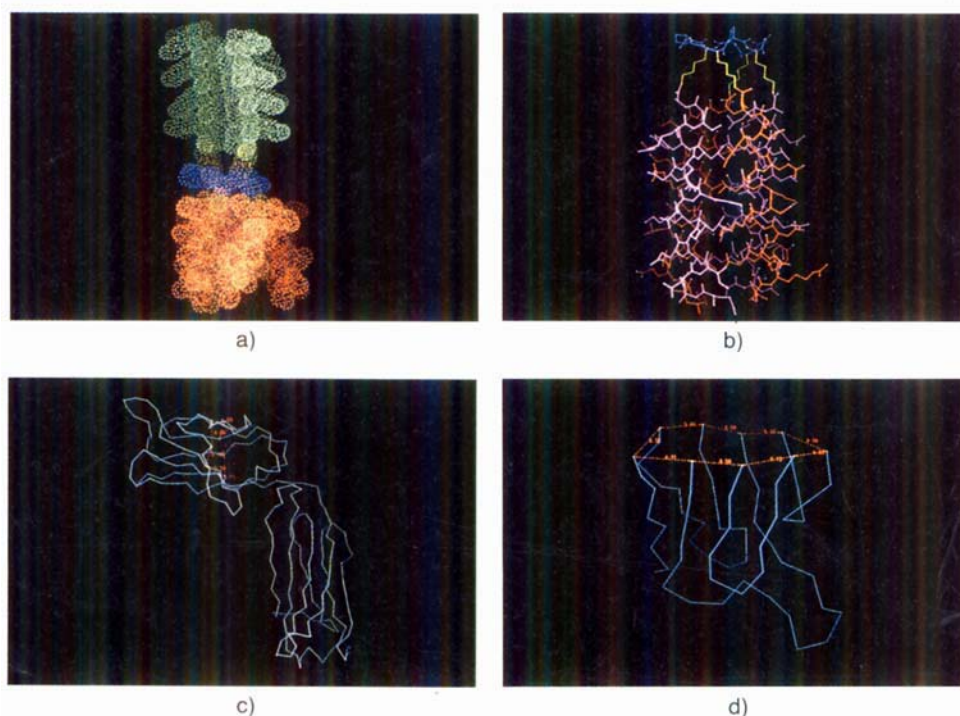


Abb. 24. Einige Anwendungen des TASP-Konzepts zum Entwurf funktioneller künstlicher Proteine am Beispiel von Computer-generierten TASP-Molekülen: a) Modell eines Templat-assoziierten „Zwei-Domänen“-Proteins [174], T_8 -(4 α)(4 β) in Abb. 12 (Templat blau, Lysinseitenketten des Templats gelb, 4 α -Helixbündel-Struktur rot, 4 β -Struktur grün; Seitenansicht). Die unabhängige Funktionalisierung der beiden Faltungsdomänen eröffnet eine Vielzahl von Anwendungsmöglichkeiten (siehe Abb. 22 und 23). b) TASP-Modell des ROP-Proteins [180] als Beispiel für ein biologisch relevantes TASP-Molekül. Das Vier-Helixbündel-Protein ROP (Dimer aus zwei identischen Helix-Turn-Helix-Sequenzen) wurde so modelliert, daß eine kovalente Fixierung der vier assoziierten Helices (weiß, rot, rosa, ocker) auf einem tetrafunktionalen (gelbe Lysinseitenketten) Templat (blau) ermöglicht wird. Nach konformativer Relaxation des TASP-ROP-Modells konnte eine spannungsfreie dreidimensionale Struktur mit ähnlicher Packungsanordnung wie im natürlichen Protein erhalten werden [181]. c) TASP-Moleküle mit bindenden Eigenschaften: Die variable Domäne des Phosphocholin-bindenden Immunoglobulins McPC603-Fab-Fragment [182] wurde durch Querschnittsbildung (rote Linie) vom Rest des Proteins abgetrennt und d) nach dem TASP-Konzept auf ein maßgeschneidertes Templat aufgepropft [183]. Ein synthetischer Zugang zu Proteinteildomänen nach diesem Prinzip ist eine Erweiterung des „Templat-Konzepts“.

der – vielleicht entscheidende – Schritt auf dem Weg zu neuen, proteinartigen Makromolekülen mit den jeweils gewünschten *funktionellen* Eigenschaften getan (Abb. 22).

Bei diesem Schritt könnte sich das hier dargestellte TASP-Konzept als sehr potent erweisen: Die energetischen Aspekte (Abb. 14) sprechen dafür, daß TASP-Moleküle sich deutlich besser funktionalisieren lassen als lineare Polypeptidketten. Erfreulicherweise hat die Suche nach unkonventionellen und grenzüberschreitenden Ansätzen zu den interessanten Fragestellungen der modernen Molekularbiologie in jüngster Zeit zu ersten Erfolgen geführt. Es erscheint uns deshalb durchaus lohnenswert, Versuche aus jüngster Zeit, mit chemischen und biochemischen Methoden maßgeschneiderte Proteinmodelle wie katalytische Antikörper^[177, 178], „Hybridenzyme“^[177] und Enzyme mit verändertem aktivem Zentrum^[179] zu erzeugen, im Hinblick auf die Möglichkeiten des TASP-Designs neu zu überdenken.

Die in Abbildung 23 schematisch dargestellten TASP-Moleküle deuten auf solche Möglichkeiten hin. Das Design und die experimentelle Verifizierung solcher Systeme sind sicherlich ein Objekt interdisziplinärer Forschungsanstrengungen der nahen Zukunft. Vielleicht gehören die zunächst nur auf dem Computerbildschirm kreierten künstlichen Proteine (Abb. 24) schon bald nicht mehr in den Bereich der Zukunftsvisionen.

Die in diesem Beitrag referierten eigenen Arbeiten wurden durch den Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung, die Hoffmann-La Roche Research Foundation sowie die CIBA-Foundation unterstützt. S. V. dankt dem Fonds der Schweizerischen Chemischen Gesellschaft für ein Doktorandenstipendium. Der besondere Dank von M. M. gilt allen zitierten Mitarbeitern sowie Priv.-Doz. Dr. Klaus Müller und Dr. K. Gubernator (Hoffmann-La Roche) für die fruchtbare Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Molecular Modeling. Herrn R. Biemann sind wir für die Hilfe bei der Fertigstellung der Abbildungen zu Dank verpflichtet.

Eingegangen am 4. Oktober 1988 [A 717]

- [1] P. J. Flory, *Statistical Mechanics of Chain Molecules*, Interscience, New York 1969.
- [2] T. E. Creighton: *Proteins*, Freeman, New York 1983.
- [3] G. E. Schulz, R. H. Schirmer: *Principles of Protein Structure*, Springer, Berlin 1979.
- [4] M. Mutter, *Angew. Chem.* 97 (1985) 639; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 24 (1985) 639.
- [5] Beispiele: a) J. E. Davies, H. G. Gassen, *Angew. Chem.* 95 (1983) 26; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 22 (1983) 13; b) E. Gross, J. Meienhofer (Hrsg.): *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, Academic Press, New York; c) R. Wetzel, D. V. Goeddel in [5b], Vol. 5, 1983, S. 2.
- [6] D. Blohm, C. Bollschweiler, H. Hillen, *Angew. Chem.* 100 (1988) 213; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 27 (1988) 207.
- [7] E. Fischer, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 39 (1906) 530.
- [8] E. Fischer, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 40 (1907) 1754.
- [9] a) J. S. Richardson, *Adv. Protein Chem.* 34 (1981) 167; b) A. V. Finkelstein, O. B. Ptitsyn, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 50 (1987) 171.
- [10] a) W. Kabsch, C. Sander, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984) 1075; b) I. A. Wilson, D. H. Haft, E. D. Getzoff, J. A. Tainer, R. A. Lerner, S. Brenner, *ibid.* 82 (1985) 5255; c) P. Argos, *J. Mol. Biol.* 197 (1987) 331.
- [11] R. Jaenicke, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 49 (1987) 117.
- [12] T. E. Creighton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988) 3082.
- [13] T. J. Edsall in R. Alexander (Hrsg.): *Structural Chemistry and Molecular Biology*, Freeman, San Francisco 1968, S. 88.
- [14] C. B. Anfinsen, *Science (Washington, D.C.)* 181 (1973) 223.
- [15] C. Levinthal, *J. Chim. Phys.* 65 (1968) 44.
- [16] K. A. Dill, *Biochemistry* 24 (1985) 1501.
- [17] G. N. Ramachandran, V. Sasisekharan, *Adv. Protein Chem.* 23 (1968) 283.
- [18] C. Tanford, *Adv. Protein Chem.* 23 (1968) 121.
- [19] a) F. M. Richards, *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 6 (1977) 151; b) M. H. Zehfus, G. D. Rose, *Biochemistry* 25 (1986) 5759.
- [20] a) T. E. Creighton, *Nature (London)* 326 (1987) 547; b) D. J. Barlow, J. M. Thornton, *J. Mol. Biol.* 201 (1988) 601; c) L. G. Presta, G. D. Rose, *Science (Washington, D.C.)* 240 (1988) 1632; d) J. S. Richardson, D. C. Richardson, *ibid.* 240 (1988) 1640.
- [21] F. R. Salemme, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 42 (1983) 95.
- [22] a) G. D. Rose, L. M. Gierasch, J. A. Smith, *Adv. Protein Chem.* 37 (1985) 1; b) E. J. Milner-White, R. Poet, *Trends Biochem. Sci. Pers. Ed.* 12 (1987) 189.
- [23] a) R. L. Baldwin, *Trends Biochem. Sci. Pers. Ed.* 11 (1986) 6; b) P. S. Kim, R. L. Baldwin, *Annu. Rev. Biochem.* 51 (1982) 459.
- [24] Siehe z. B. a) R. Pain, *Trends Biochem. Sci. Pers. Ed.* 12 (1987) 309; b) D. A. Dolgikh, R. I. Gilmanshin, E. V. Brazhnikov, V. E. Bychkova, G. V. Semisotnov, S. Y. Venyaminov, O. B. Ptitsyn, *FEBS Lett.* 136 (1981) 311; c) M. Ohgushi, A. Wada, *ibid.* 164 (1983) 21; d) K. Kuwajima, H. Yamaya, S. Miwa, S. Sugai, T. Nagamura, *ibid.* 221 (1987) 115.
- [25] S. C. Harrison, R. Durbin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 (1985) 4028.
- [26] R. Freedman, *Nature (London)* 329 (1987) 196, zit. Lit.
- [27] H. Pelham, *Nature (London)* 332 (1988) 776, zit. Lit.
- [28] W. Kauzmann, *Adv. Protein Chem.* 14 (1959) 1.
- [29] a) A. Radzicka, R. Wolfenden, *Biochemistry* 27 (1988) 1664; b) J.-L. Fauchère, V. Pliska, *Eur. J. Med. Chem. Chim. Ther.* 18 (1983) 369; c) G. D. Rose, A. R. Geselowitz, G. J. Lesser, R. H. Lee, M. H. Zehfus, *Science (Washington, D.C.)* 229 (1985) 834, zit. Lit.
- [30] D. Eisenberg, A. D. McLachlan, *Nature (London)* 319 (1986) 199.
- [31] E. N. Baker, R. E. Hubbard, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 44 (1984) 97.
- [32] A. Warshel, *Nature (London)* 330 (1987) 15.
- [33] a) D. J. Barlow, J. M. Thornton, *J. Mol. Biol.* 168 (1983) 867; b) A. A. Rashin, B. Honig, *ibid.* 173 (1984) 515.
- [34] a) W. G. J. Hol, P. T. van Duijnen, H. J. C. Berendsen, *Nature (London)* 273 (1978) 443; b) W. G. J. Hol, L. M. Halie, C. Sander, *ibid.* 294 (1980) 532; c) R. M. Sheridan, R. M. Levy, F. R. Salemme, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (1982) 4545; d) W. G. J. Hol, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 45 (1985) 149; e) K.-C. Chou, G. M. Maggiora, G. Nemethy, H. A. Scheraga, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988) 4295.
- [35] a) K. R. Shoemaker, P. S. Kim, E. J. York, J. M. Stewart, R. L. Baldwin, *Nature (London)* 326 (1987) 563; b) S. Marqusee, R. L. Baldwin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987) 8898.
- [36] T. E. Creighton, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 33 (1978) 231.
- [37] R. Wetzel, *Trends Biochem. Sci. Pers. Ed.* 12 (1987) 478.
- [38] R. Huber, *Angew. Chem.* 100 (1988) 79; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 27 (1988) 79.
- [39] H. Frauenfelder, F. Parak, R. D. Young, *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 17 (1988) 451.
- [40] J. A. McCammon, S. C. Harvey: *Dynamics of Proteins and Nucleic Acids*, Cambridge University Press, Cambridge 1987.
- [41] P. L. Privalov, *Adv. Protein Chem.* 33 (1979) 167.
- [42] a) H. A. Scheraga, *Biopolymers* 22 (1983) 1; b) V. J. Hruby (Hrsg.): *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, Vol. 7, Academic Press, Orlando 1985; c) S. S. Zimmermann in [42b], S. 165.
- [43] a) A. T. Hagler in [42b], S. 213; b) W. L. Jorgensen, J. Tirado-Rives, *J. Am. Chem. Soc.* 110 (1988) 1657; c) M. Levitt, R. Sharon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988) 7557.
- [44] J. M. Thornton, *Nature (London)* 335 (1988) 10.
- [45] C. DeLisi, *Science (Washington, D.C.)* 240 (1988) 47.
- [46] G. von Heijne, *Nature (London)* 333 (1988) 605.
- [47] P. Y. Chou, G. D. Fasman, *Adv. Enzymol.* 47 (1978) 45.
- [48] J. Garnier, D. J. Osguthorpe, B. Robson, *J. Mol. Biol.* 120 (1978) 97.
- [49] S. Tanaka, H. A. Scheraga, *Macromolecules* 10 (1977) 305, zit. Lit.
- [50] M. Schiffer, A. B. Edmundson, *Biophys. J.* 7 (1967) 121.
- [51] P. Dunnill, *Biophys. J.* 8 (1968) 865.
- [52] a) V. I. Lim, *J. Mol. Biol.* 88 (1974) 857; b) *ibid.* 88 (1974) 873.
- [53] Ein-Buchstaben-Symbole für Aminosäuren: IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN), *Biochem. J.* 219 (1984) 345; *Eur. J. Biochem.* 138 (1984) 9.
- [54] W. R. Taylor, *Protein Eng.* 2 (1988) 77, zit. Lit.
- [55] a) W. Kabsch, C. Sander, *FEBS Lett.* 155 (1983) 179; b) K. Nishikawa, *Biochim. Biophys. Acta* 748 (1983) 285.
- [56] a) G. E. Schulz, *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 17 (1988) 1; b) R. Y. Yada, R. L. Jackman, S. Nakai, *Int. J. Pept. Protein Res.* 31 (1988) 98; c) M. J. Rooman, S. J. Wodak, *Nature (London)* 335 (1988) 45.
- [57] C. Pabo, *Nature (London)* 301 (1983) 200.
- [58] K. E. Drexler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981) 5275.
- [59] J. W. Ponder, F. M. Richards, *J. Mol. Biol.* 193 (1987) 775.
- [60] a) P. Kollman, *Annu. Rev. Phys. Chem.* 38 (1987) 303; b) J. A. McCammon, *Science (Washington, D.C.)* 238 (1987) 486; c) H. Fröhbeis, R. Klein, H. Wallmeier, *Angew. Chem.* 99 (1987) 413; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 26 (1987) 403.
- [61] a) T. Blundell, D. Carney, S. Gardner, F. Hayes, B. Howlin, T. Hubbard, J. Overington, D. A. Singh, B. L. Sibanda, M. Sutcliffe, *Eur. J. Biochem.* 172 (1988) 513; b) W. G. J. Hol, *Angew. Chem.* 98 (1986) 765; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 25 (1986) 767.

- [62] Siehe z. B.: D. Botstein, D. Shortle, *Science (Washington, D.C.)* 229 (1985) 1193.
- [63] a) R. J. Leatherbarrow, A. R. Fersht, *Protein Eng.* 1 (1986) 1; b) J. R. Knowles, *Science (Washington, D.C.)* 236 (1987) 1252; c) W. V. Shaw, *Biochem. J.* 246 (1987) 1.
- [64] 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.
- [65] R. E. Feeney, *Int. J. Pept. Protein Res.* 29 (1987) 145.
- [66] Beispiel: D. L. Oxender, C. F. Fox (Hrsg.): *Protein Engineering*, Alan R. Liss, New York 1987.
- [67] L. J. Perry, R. Wetzel, *Science (Washington, D.C.)* 226 (1984) 555.
- [68] J. A. Wells, D. A. Estell, *Trends Biochem. Sci. Pers. Ed.* 13 (1988) 291.
- [69] C. S. Craik, S. Rocznik, C. Largman, W. J. Rutter, *Science (Washington, D.C.)* 237 (1987) 909.
- [70] S. J. Gardell, C. S. Craik, D. Hilvert, M. S. Urdea, W. J. Rutter, *Nature (London)* 317 (1985) 551.
- [71] W. H. J. Ward, A. R. Fersht in S. A. Benner (Hrsg.): *Redesigning the Molecules of Life*, Springer, Berlin 1988, S. 59.
- [72] K. M. Perry, J. J. Onuffer, N. A. Touchette, C. S. Herndon, M. S. Gittelman, C. R. Matthews, J.-T. Chen, R. J. Mayer, K. Taira, S. J. Benkovic, E. E. Howell, J. Kraut, *Biochemistry* 26 (1987) 2674.
- [73] D. N. Brems, S. M. Plaisted, H. A. Harel, C.-S. C. Tomich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988) 3367.
- [74] R. F. Kelley, F. M. Richards, *Biochemistry* 26 (1987) 6765.
- [75] P. A. Evans, C. M. Dobson, R. A. Kautz, G. Hatfull, R. O. Fox, *Nature (London)* 329 (1987) 266.
- [76] D. Shortle, A. K. Micker, E. Freire, *Biochemistry* 27 (1988) 4761.
- [77] J. F. Reidhaar-Olson, R. T. Sauer, *Science (Washington, D.C.)* 241 (1988) 53.
- [78] a) B. W. Matthews, *Biochemistry* 26 (1987) 6885 (Übersicht); b) T. Alber, S. Dao-Pin, K. Wilson, J. A. Wozniak, S. P. Cook, B. W. Matthews, *Nature (London)* 330 (1987) 41; c) T. Alber, S. Dao-Pin, J. A. Nye, D. C. Muchmore, B. W. Matthews, *Biochemistry* 26 (1987) 3754.
- [79] T. Alber, J. A. Bell, S. Dao-Pin, H. Nicholson, J. A. Wozniak, S. Cook, B. W. Matthews, *Science (Washington, D.C.)* 239 (1988) 631.
- [80] M. Matsumura, W. J. Bechtel, B. W. Matthews, *Nature (London)* 334 (1988) 406.
- [81] J. T. Kellis, K. Nyberg, D. Sali, A. R. Fersht, *Nature (London)* 333 (1988) 784.
- [82] a) D. Sali, M. Bycroft, A. R. Fersht, *Nature (London)* 335 (1988) 740; b) H. Nicholson, W. J. Bechtel, B. W. Matthews, *ibid.* 336 (1988) 651.
- [83] A. R. Fersht, *Trends Biochem. Sci. Pers. Ed.* 12 (1987) 301.
- [84] D. P. Goldenberg, *Annu. Rev. Biophys. Chem.* 17 (1988) 481.
- [85] M. G. Rossman, P. Argos, *Annu. Rev. Biochem.* 50 (1981) 497.
- [86] C. Chothia, *Annu. Rev. Biochem.* 53 (1984) 537.
- [87] J. F. Leszczynski, G. D. Rose, *Science (Washington, D.C.)* 234 (1987) 849.
- [88] B. H. Zimm, J. K. Bragg, *J. Chem. Phys.* 31 (1959) 526.
- [89] M. Mutter, *Trends Biochem. Sci. Pers. Ed.* 13 (1988) 260.
- [90] a) E. T. Kaiser, F. J. Keady, *Science (Washington, D.C.)* 223 (1984) 249; b) E. T. Kaiser, *Trends Biochem. Sci. Pers. Ed.* 12 (1987) 305; c) E. T. Kaiser, F. J. Keady, *Annu. Rev. Biophys. Chem.* 16 (1987) 561.
- [91] a) G. Ebert, *Top. Curr. Chem.* 128 (1985) 1; b) M. Mutter, R. Hersperger, unveröffentlicht.
- [92] S. P. Ho, W. F. DeGrado, *J. Am. Chem. Soc.* 109 (1987) 6751.
- [93] M. Goodman, C. Toniolo, F. Naider in E. R. Blout, F. A. Bovey, M. Goodman, N. Lotan (Hrsg.): *Peptides and Proteins*, Wiley, New York 1974, S. 308.
- [94] F. Maser, K. Bode, V. N. R. Pillai, M. Mutter, *Adv. Polym. Sci.* 65 (1983) 177.
- [95] a) J. M. Becker, F. Naider, *Biopolymers* 17 (1978) 2189; b) F. Naider, J. M. Becker, A. Ribeiro, M. Goodman, *ibid.* 17 (1978) 2213.
- [96] D. J. Cram, K. N. Trueblood, *Top. Curr. Chem.* 98 (1981) 43.
- [97] a) H. A. Scheraga, *Pure Appl. Chem.* 50 (1978) 315; b) M. Sueki, S. Lee, S. P. Powers, J. B. Denton, Y. Konishi, H. A. Scheraga, *Macromolecules* 17 (1984) 148.
- [98] a) M. Mutter, V. N. R. Pillai, H. Anzinger, E. Bayer, C. Toniolo in K. Brunfeldt (Hrsg.): *Peptides 1980*, Scriptor, Copenhagen 1981, S. 660; b) S. Abdel Rahman, H. Anzinger, M. Mutter, *Biopolymers* 19 (1980) 173; c) V. N. R. Pillai, M. Mutter, *Acc. Chem. Res.* 14 (1981) 122; d) C. M. Deber, V. J. Hruby, K. D. Kopple (Hrsg.): *Peptides Structure and Function*, Pierce Chemical Company, Rockford 1985; e) M. Mutter, K.-H. Altmann, D. Bellof, A. Flörsheimer, J. Herbert, M. Huber, B. Klein, L. Strauch, T. Vorherr, H.-U. Gremlich in [98d], S. 397.
- [99] a) F. Maser, B. Klein, M. Mutter, C. Toniolo, G. M. Bonora, *Biopolymers* 22 (1983) 233; b) M. Mutter, F. Maser, K.-H. Altmann, C. Toniolo, G. M. Bonora, *ibid.* 24 (1985) 1057.
- [100] a) K.-H. Altmann, M. Mutter, *Int. J. Pept. Protein Res.* 26 (1985) 373; b) K.-H. Altmann, A. Flörsheimer, M. Mutter, *ibid.* 27 (1986) 314.
- [101] K. Bode, M. Mutter, M. Goodman, *Helv. Chim. Acta* 68 (1985) 705.
- [102] Siehe z. B.: J. Murphy, W.-J. Zhang, W. Macaulay, G. Fasman, R. B. Merrifield, *J. Biol. Chem.* 262 (1987) 17304.
- [103] a) S. B. H. Kent in [98d], S. 407; b) E. Atherton, R. C. Sheppard in [98d], S. 415; c) A. G. Ludwick, L. W. Jelinski, D. Live, A. Kintanar, J. J. Dumais, *J. Am. Chem. Soc.* 108 (1986) 6493; d) C. Toniolo, G. M. Bonora, E. P. Heimer, A. M. Felix, *Int. J. Pept. Protein Res.* 30 (1987) 232.
- [104] M. Mutter, E. Bayer in [5b], Vol. 2, 1980, S. 285.
- [105] Siehe z. B.: D. G. Osterman, E. T. Kaiser, *J. Cell. Biochem.* 29 (1985) 57.
- [106] W. R. Taylor, J. M. Thornton, *J. Mol. Biol.* 173 (1984) 487.
- [107] G. M. Bonora, M. Palumbo, C. Toniolo, M. Mutter, *Makromol. Chem.* 180 (1979) 1293.
- [108] M. Mutter, K.-H. Altmann, *Angew. Makromol. Chem.* 145/146 (1986) 211.
- [109] A. Flörsheimer, *Dissertation*, Universität Basel 1986.
- [110] M. Mutter, K.-H. Altmann, A. Flörsheimer, J. Herbert, *Helv. Chim. Acta* 69 (1986) 786.
- [111] Siehe z. B. a) D. Leibfritz, E. Haupt, N. Dubischer, H. Lachmann, R. Oekonomopoulos, G. Jung, *Tetrahedron* 38 (1982) 2165; b) C. Toniolo, G. M. Bonora, A. Bavoso, E. Benedetti, B. Di Blasio, V. Pavone, C. Pedone, *Biopolymers* 22 (1983) 205; c) B. V. V. Prasad, P. Balaran, *CRC Crit. Rev. Biochem.* 16 (1984) 307; d) G. Valle, M. Crisma, F. Formaggio, C. Toniolo, G. Jung, *Liebigs Ann. Chem.* 1987, 1055; e) E. K. S. Vijayakumar, T. S. Sudha, P. Balaran, *Biopolymers* 23 (1984) 877; f) H. Schmitt, G. Jung, *Liebigs Ann. Chem.* 1985, 321; g) H. Balaran, M. Sukumar, P. Balaran, *Biopolymers* 25 (1987) 2209; h) J. R. Cann, R. E. London, C. J. Unkefer, R. J. Vavrek, J. M. Stewart, *Int. J. Pept. Protein Res.* 29 (1987) 486; i) G. E. Esposito, J. A. Caver, J. Boyd, I. D. Campbell, *Biochemistry* 26 (1987) 1043; j) P. Wipf, H. Heimgartner, *Helv. Chim. Acta* 71 (1988) 140; k) *ibid.* 71 (1988) 258; l) I. L. Karle, J. L. Flipper-Anderson, M. Sukumar, P. Balaran, *Int. J. Pept. Protein Res.* 31 (1988) 567.
- [112] M. Mutter, M. Huber, S. Vuilleumier, unveröffentlicht.
- [113] A. W. Burgess, S. J. Leach, *Biopolymers* 12 (1973) 2599.
- [114] a) U. Schöllkopf, *Top. Curr. Chem.* 109 (1983) 65; b) G. C. Barrett in G. C. Barrett (Hrsg.): *Chemistry and Biochemistry of the Amino Acids*, Chapman and Hall, London 1985, S. 246; c) D. Seebach, R. Imwinkelried, T. Weber in R. Scheffold (Hrsg.): *Modern Synthetic Methods, Vol. 4*, Springer, Berlin 1986, S. 125.
- [115] a) E. Altmann, K.-H. Altmann, M. Mutter, *Angew. Chem.* 100 (1988) 855; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 27 (1988) 858; b) E. Altmann, K.-H. Altmann, K. Nebel, M. Mutter, *Int. J. Pept. Protein Res.* 32 (1988) 344.
- [116] a) K. Wüthrich: *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, Wiley, New York 1986; b) H. Kessler, M. Gehrke, C. Griesinger, *Angew. Chem.* 100 (1988) 507; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 27 (1988) 490; c) M. Nilges, A. M. Gronenborn, A. T. Brünger, G. M. Clore, *Protein Eng.* 2 (1988) 27; d) R. Kaptein, R. Boelens, R. M. Scheek, W. F. van Gunsteren, *Biochemistry* 27 (1988) 5389.
- [117] a) R. W. Woody in [42b], S. 15; b) W. C. Johnson, Jr., *Annu. Rev. Biophys. Chem.* 17 (1988) 145; c) A. M. Labhart, *Meth. Enzymol.* 131 (1986) 126.
- [118] a) S. Krimm, J. Bandekar, *Adv. Protein Chem.* 38 (1986) 181; b) W. K. Surewicz, H. H. Mantsch, *Biochim. Biophys. Acta* 952 (1988) 115; c) T. A. Keiderling, *Nature (London)* 322 (1986) 851.
- [119] a) A. Bierzinski, P. S. Kim, R. L. Baldwin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (1982) 2470; b) P. S. Kim, R. L. Baldwin, *Nature (London)* 307 (1984) 329; c) K. R. Shoemaker, P. S. Kim, D. N. Brems, S. Marqusee, E. J. York, I. M. Chaiken, J. M. Stewart, R. L. Baldwin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 (1985) 2349.
- [120] a) M. Vasquez, M. R. Pincus, H. A. Scheraga, *Biopolymers* 26 (1987) 351; b) M. Vasquez, H. A. Scheraga, *ibid.* 27 (1987) 41.
- [121] a) T. G. Oas, P. S. Kim, *Nature (London)* 336 (1988) 42; b) P. E. Wright, H. J. Dyson, R. A. Lerner, *Biochemistry* 27 (1988) 7167.
- [122] K. T. O'Neil, H. R. Wolfe, Jr., S. Erickson-Viitanen, W. F. DeGrado, *Science (Washington, D.C.)* 236 (1987) 1454.
- [123] A. D. Frenkel, J. M. Berg, C. O. Pabo, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987) 4841.
- [124] J. D. Lear, Z. R. Wasserman, W. F. DeGrado, *Science (Washington, D.C.)* 240 (1988) 1177.
- [125] W. J. Kullmann, *J. Med. Chem.* 27 (1984) 106.
- [126] Siehe z. B. a) R. Mayer, G. Lancelot, C. Helene, *FEBS Lett.* 153 (1983) 339; b) L. Walters, E. T. Kaiser, *J. Am. Chem. Soc.* 107 (1985) 6422.
- [127] a) E. Pfaff, M. Musgay, H. O. Böhm, G. E. Schultz, H. Schaller, *EMBO J.* 1 (1982) 869; b) H. J. Dyson, R. A. Lerner, P. E. Wright, *Annu. Rev. Biophys. Chem.* 17 (1988) 305; c) M. Mutter, K.-H. Altmann, K. Müller, S. Vuilleumier, T. Vorherr, *Helv. Chim. Acta* 69 (1986) 985.
- [128] a) B. Gutte, M. Däumgen, E. Wittschieber, *Nature (London)* 281 (1979) 650; b) R. Jaenicke, B. Gutte, U. Glatzer, W. Strassburger, A. Wollmer, *FEBS Lett.* 114 (1980) 161.
- [129] R. Moser, R. M. Thomas, B. Gutte, *FEBS Lett.* 157 (1983) 247.
- [130] R. Moser, J. Frey, K. Münger, T. Hehlhans, J. Klausner, H. Langen, E.-L. Winnacker, R. Mertz, B. Gutte, *Protein Eng.* 1 (1987) 339.
- [131] S. Y. M. Lau, A. K. Taneja, R. S. Hodges, *J. Biol. Chem.* 259 (1984) 13253.
- [132] a) F. R. Carbone, S. J. Leach, *Int. J. Pept. Protein Res.* 26 (1985) 225; b) *ibid.* 26 (1985) 498.
- [133] M. Mutter, K.-H. Altmann, T. Vorherr, *Z. Naturforsch. B41* (1986) 1315.
- [134] B. W. Erickson, S. B. Daniels, P. A. Reddy, C. G. Unson, J. S. Richardson, D. C. Richardson in R. Fletterick, M. Zoller (Hrsg.): *Current Com-*

- munications in Molecular Biology, Computer Graphics and Molecular Modeling, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1986, S. 53.
- [135] J. S. Richardson, D. C. Richardson in [66], S. 149.
- [136] D. Eisenberg, W. Wilcox, S. M. Eshita, P. M. Pryciak, S. P. Ho, W. F. DeGrado, *Proteins* 1 (1986) 16.
- [137] W. F. DeGrado, L. Regan, S. P. Ho, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 52 (1987) 521.
- [138] L. Regan, W. F. DeGrado, *Science (Washington, D.C.)* 241 (1988) 976.
- [139] a) E. Wünsch (Hrsg.): *Methoden der Organischen Chemie (Houben-Weyl)*, Band XV, Thieme, Stuttgart 1974; b) M. Bodansky: *Principles of Peptide Synthesis*, Springer, Berlin 1984; c) *The Practice of Peptide Synthesis*, Springer, Berlin 1984.
- [140] a) C. Birr: *Aspects of the Merrifield Peptide Synthesis*, Springer, Berlin 1978; b) J. M. Stewart, J. D. Young: *Solid Phase Peptide Synthesis*, Pierce Chemical Company, Rockford 1984.
- [141] J. Meienhofer et al. (Hrsg.): *The Peptides, Analysis, Synthesis, Biology, Vol. 1–9*, Academic Press, New York 1979–1987.
- [142] a) D. Theodoropoulos (Hrsg.): *Peptides 1986, Proceedings of the 19th European Peptide Symposium*, W. de Gruyter, Berlin 1987; b) G. R. Marshall (Hrsg.): *Peptides Chemistry and Biology, Proceedings of the 10th American Peptide Symposium*, Escom, Leiden 1988.
- [143] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85 (1963) 2149.
- [144] S. Josephson, R. Bishop, *Trends Biotechnol.* 6 (1988) 218.
- [145] J. S. Huston, D. Levinson, M. Mudgett-Hunter, M.-S. Tai, J. Novotny, M. N. Margolies, R. J. Ridge, R. E. Brucoleri, E. Haber, R. Crea, H. O. P. Permann, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988) 5879.
- [146] Siehe z. B. a) S. Kiyama, N. Fujii, H. Yajima, M. Moriga, A. Takagi, *Int. J. Pept. Protein Res.* 23 (1984) 174; b) H. Schmitt, G. Jung, *Liebigs Ann. Chem.* 1985, 321; c) A. M. Felix, E. P. Heimer, C. T. Wang, T. J. Lambros, J. S. Wistok, M. Roszkowski, M. Ahmad, A. Confalone, J. W. Scott, D. Parker, J. Meienhofer, A. Trzeciak, D. Gillissen, *Int. J. Pept. Protein Res.* 26 (1985) 130; d) N. Fujii, M. Sakurai, K. Akaji, M. Nomitsu, H. Yajima, K. Mizuta, M. Aono, M. Moriga, K. Inoue, R. Hosotani, T. Tobe, *Chem. Pharm. Bull.* 34 (1986) 2397; e) K. Ando, K. Kitagawa, S. Kiyama, T. Kawamoto, T. Akita, I. Yamamoto, K. K. Torizuka, *ibid.* 35 (1987) 60; f) E. Wünsch, L. Moroder, S. Göhring-Romani, H. J. Musiol, W. Göhring, G. Bovermann, *Int. J. Pept. Protein Res.* 32 (1988) 368.
- [147] S. B. H. Kent, *Annu. Rev. Biochem.* 57 (1988) 957.
- [148] a) G. Barany, R. B. Merrifield in [5b], *Vol. 2*, 1980, S. 3; b) G. Barany, N. Kneib-Cordonier, D. G. Mullen, *Int. J. Pept. Protein Res.* 30 (1987) 705.
- [149] a) I. Clark-Lewis, R. Aebersold, H. Ziltener, J. W. Schrader, L. E. Hood, S. B. H. Kent, *Science (Washington, D.C.)* 231 (1986) 134; b) W. F. Heath, R. B. Merrifield, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 (1986) 6367; c) J. D. Wade, S. P. Fitzgerald, M. R. McDonald, J. G. McDougall, G. W. Tregear, *Biopolymers* 25 (1986) S21; d) A. N. Eberle, E. Atherton, A. Dryland, R. C. Sheppard, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 1986, 361; e) G.-S. Lu, S. Mojsov, R. B. Merrifield, *Int. J. Pept. Protein Res.* 29 (1987) 545; f) J. Rivier, R. Galejean, L. Simon, L. J. Cruz, B. M. Olivera, W. R. Gray, *Biochemistry* 26 (1987) 8508; g) A. Fournier, C. T. Wang, A. M. Felix, *Int. J. Pept. Protein Res.* 31 (1988) 1; h) C.-R. Wu, J. D. Wade, G. W. Tregear, *ibid.* 31 (1988) 47; i) D. Hudson, *J. Org. Chem.* 53 (1988) 617; j) Y.-Z. Lin, G. Caporoso, P.-Y. Chang, X.-H. Lee, J. P. Tam, *Biochemistry* 27 (1988) 5640; k) K. Nohihara, T. Semba, *J. Am. Chem. Soc.* 110 (1988) 7847; l) R. F. Nutt, S. F. Brady, P. L. Darke, T. M. Ciccarone, C. D. Colton, E. M. Nutt, J. A. Rodkey, C. D. Bennett, L. H. Waxman, I. S. Sigal, P. S. Anderson, D. F. Veber, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988) 7129; m) I. Clark-Lewis, L. E. Hood, S. B. H. Kent, *ibid.* 85 (1988) 7897; n) E. Atherton, J. L. Holder, R. C. Sheppard, R. M. Valerio, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 1988, 2887; o) L. R. Cameron, J. L. Holder, M. Meldal, R. C. Sheppard, *ibid.* 1 1988, 2895.
- [150] B. Rajashekar, E. T. Kaiser, *J. Biol. Chem.* 261 (1986) 13 617.
- [151] a) S. H. Nakagawa, H. S. H. Lau, F. J. Kezdy, E. T. Kaiser, *J. Am. Chem. Soc.* 107 (1985) 7087; b) J. Blake, D. Yamashiro, K. Ramasharma, C. H. Li, *Int. J. Pept. Protein Res.* 28 (1986) 468; c) T. Kubiak, D. B. Whitney, R. B. Merrifield, *Biochemistry* 26 (1987) 7849; d) R. E. Reid, *Int. J. Pept. Protein Res.* 30 (1987) 613; e) M. Narita, S. Isokawa, S. Nagasawa, T. Ishijima, *Macromolecules* 20 (1987) 2306; f) F. Albericio, E. Nicolas, J. Josa, A. Grandas, E. Pedrosa, E. Giralt, C. Granier, J. van Rietschoten, *Tetrahedron* 43 (1987) 5961; g) J.-M. Sabatier, M. Tessier-Rochat, C. Granier, J. van Rietschoten, E. Pedrosa, A. Grandas, F. Albericio, E. Giralt, *ibid.* 43 (1987) 5973; h) P. Sieber, *Tetrahedron Lett.* 28 (1987) 2107; i) H. Rink, *ibid.* 28 (1987) 3787; j) T. A. Lyle, S. F. Brady, T. M. Ciccarone, C. D. Colton, W. J. Paleveda, D. F. Veber, R. F. Nutt, *J. Org. Chem.* 52 (1987) 3752; k) A. Ajayaghosh, V. N. R. Pillai, *Tetrahedron* 44 (1988) 6661; l) B. Blankemeyer-Menge, R. Frank, *Tetrahedron Lett.* 29 (1988) 5871.
- [152] a) R. E. Offord; *Semisynthetic Proteins*, Wiley, Chichester 1980; b) I. M. Chaiken, *CRC Crit. Rev. Biochem.* 11 (1981) 255; c) R. E. Offord, *Protein Eng.* 1 (1987) 151.
- [153] Beispiele: a) C. Mitchinson, R. L. Baldwin, *Proteins* 1 (1986) 23; b) K. Rose, C. Herrero, A. E. I. Proudfoot, R. E. Offord, C. J. A. Wallace, *Biochem. J.* 249 (1988) 83; c) T. L. Ciardelli, B. Landgraf, R. Galski, J. Strnad, P. E. Cohen, K. A. Smith, *J. Mol. Recognit.* 1 (1988) 42.
- [154] Siehe z. B. a) J. S. Fruton, *Adv. Enzymol.* 53 (1982) 239; b) K. Morihara, *Trends Biotechnol.* 5 (1987) 164; c) J. Meienhofer, S. Udenfriend (Hrsg.): *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology, Vol. 9*, Academic Press, Orlando 1987; d) H. D. Jakubke in [154c], S. 103.
- [155] a) T. Nakatsuka, T. Sasaki, E. T. Kaiser, *J. Am. Chem. Soc.* 109 (1987) 3808; b) C. F. Barbas III, J. R. Matos, J. B. West, C.-H. Wong, *ibid.* 110 (1988) 5162.
- [156] M. Ikekara, E. Ohtsuka, T. Tokunaga, S. Nishikawa, S. Uesegi, T. Tanaka, Y. Aoyama, S. Kikuyodani, K. Fujimoto, K. Yanase, K. Fuchimura, H. Morioka, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 (1986) 4695.
- [157] a) P. S. Farmer, „Drug Design“, *Med. Chem. (Academic Press)* 10 (1980) 119; b) A. F. Spatola, *Chem. Biochem. Amino Acids Pept. Proteins* 7 (1983) 267.
- [158] a) U. Nagai, K. Sato, *Tetrahedron Lett.* 26 (1985) 647; b) M. Kahn, S. Wilke, B. Chen, K. Fujita, *J. Am. Chem. Soc.* 110 (1988) 1638; c) D. S. Kemp, W. E. Stites, *Tetrahedron Lett.* 29 (1988) 5057; d) M. G. Hinds, N. G. J. Richards, J. A. Robinson, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1988, 1447; e) E. Ernest, I. Kalvoda, M. Mutter, unveröffentlicht.
- [159] a) D. S. Kemp, T. P. Curran, *Tetrahedron Lett.* 29 (1988) 4931; b) *ibid.* 29 (1988) 4935; c) D. S. Kemp, B. R. Bowen, *ibid.* 29 (1988) 5077; d) *ibid.* 29 (1988) 5081.
- [160] E. Wünsch, *Angew. Chem.* 83 (1971) 773; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 10 (1971) 786.
- [161] M. Bodansky, J. Martinez in [5b], *Vol. 5*, 1983, S. 111.
- [162] E. Atherton, R. C. Sheppard in [154c], S. 1.
- [163] A. Dryland, R. C. Sheppard, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 1986, 125.
- [164] R. A. Lerner, *Adv. Immunol.* 36 (1984) 1.
- [165] H. Anzinger, J. Schmitt, M. Mutter, *Makromol. Chem. Rapid Commun.* 2 (1981) 637.
- [166] a) W. Roth, E. Heidemann, *Adv. Polym. Sci.* 43 (1982) 143; b) W. Germmann, E. Heidemann, *Biopolymers* 27 (1987) 157.
- [167] a) C. G. Unson, B. W. Erickson, D. C. Richardson, J. S. Richardson, *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 43 (1984) 1837; b) J. S. Richardson, D. C. Richardson, B. W. Erickson, *Biophys. J.* 45 (1984) 25a; c) B. W. Erickson, US-Pat. 4 515 920 (1985).
- [168] R. S. Hodges, P. D. Semchuk, A. K. Taneja, C. M. Kay, J. M. R. Parker, C. T. Mant, *Pept. Res.* 1 (1988) 19.
- [169] a) M. Mutter in [142b], S. 349; b) M. Mutter, E. Altmann, K.-H. Altmann, R. Hersperger, P. Koziej, K. Nebel, G. Tuchscherer, S. Vuilleumier, H.-U. Gremlich, K. Müller, *Helv. Chim. Acta* 71 (1988) 835.
- [170] K. Müller, H. J. Ammann, D. M. Doran, P. Gerber, G. Schröpfner in A. F. Harms (Hrsg.): *Innovative Approaches in Drug Research*, Elsevier, Amsterdam 1986, S. 125.
- [171] S. E. Hull, R. Karlsson, P. Main, M. M. Woolfson, E. J. Dodson, *Nature (London)* 275 (1978) 206.
- [172] M. Mutter, G. Tuchscherer, *Makromol. Chem. Rapid Commun.* 9 (1988) 437.
- [173] G. Barany, F. Albericio, *J. Am. Chem. Soc.* 107 (1985) 4936, zit. Lit.
- [174] M. Mutter, R. Hersperger, K. Gubernator, K. Müller, *Proteins*, im Druck.
- [175] M. Mutter, K.-H. Altmann, G. Tuchscherer, S. Vuilleumier, *Tetrahedron* 44 (1988) 771.
- [176] T. Sasaki, E. T. Kaiser, *J. Am. Chem. Soc.* 111 (1989) 380.
- [177] P. G. Schultz, *Science (Washington, D.C.)* 240 (1988) 426.
- [178] Beispiele: a) K. D. Janda, D. Schloeder, S. J. Benkovic, R. A. Lerner, *Science (Washington, D.C.)* 241 (1988) 1188; b) S. J. Benkovic, A. D. Napper, R. A. Lerner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988) 5355.
- [179] E. T. Kaiser, *Angew. Chem.* 100 (1988) 945; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 27 (1988) 913.
- [180] D. Banner, M. Kokkinidis, *J. Mol. Biol.* 196 (1987) 657.
- [181] B. Dörner, K. Gubernator, M. Mutter, unveröffentlicht.
- [182] Y. Satow, G. H. Cohen, E. A. Padlan, D. R. Davies, *J. Mol. Biol.* 190 (1986) 593.
- [183] K. Müller, M. Mutter, unveröffentlicht.
- [184] W. F. DeGrado, Z. R. Wasserman, J. D. Lear, *Science (Washington D.C.)* 243 (1989) 622.