

Neue polymere Materialien aus monodispersen Copolypeptiden durch biotechnologische Methoden **

Von Helmut Ritter*

Die Vielzahl der bekannten und auch angewendeten chemischen Methoden zum Aufbau von Peptiden demonstriert eindrucksvoll, daß bis heute ein ideales Verfahren nicht zu existieren scheint. Dies hatte bereits *Emil Fischer* frühzeitig erkannt und mit dem Ausdruck „der Ochs kann's besser“ in kerniger Weise belegt. Allerdings zeichnet sich seit einiger Zeit durch Anwendung biotechnologischer Verfahren eine Kursänderung ab, wobei nicht nur im Pharma- und im Agrarbereich Erfolge vorzuweisen sind, sondern ganz aktuell auch bei der Herstellung neuer, interessanter Protein-Materialien mit definiertem Strukturaufbau ein erster Durchbruch zu erkennen ist^[1]. Das Bemühen, Peptide nicht nur durch immer bessere chemische Verfahren, sondern auch biokatalytisch unter Verwendung von freien oder trägergebundenen Enzymen kinetisch oder thermodynamisch kontrolliert zu synthetisieren, hat das Stadium der wissenschaftlichen Erprobung längst hinter sich und, z. B. bei der racemisierungsfreien Herstellung des Süßstoffes Aspartam (Asp-Phe) mit Thermolysin, industrielle Anwendung gefunden^[2]. Ergänzend zu den sehr weit entwickelten chemischen Peptidsynthesen am Polymerträger^[3] sind wir derzeit damit beschäftigt, auch Reinenzyme, z. B. α -Chymotrypsin, zur Anknüpfung von Peptiden an Seitenketten bei kammartig strukturierten Polymeren einzubeziehen^[4].

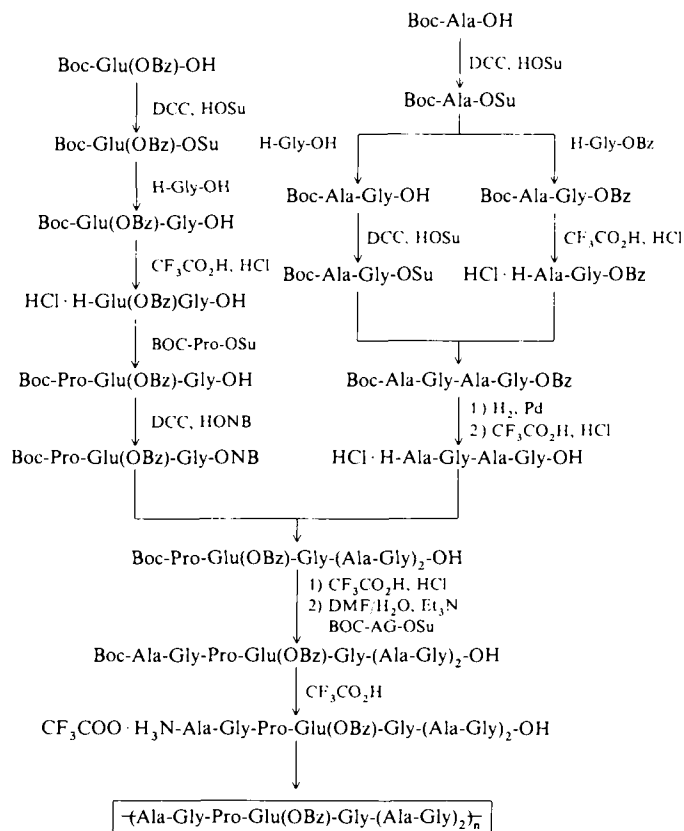
Die Verwendung des Enzymapparates ganzer Zellen hat in jüngster Zeit zur Synthese chiraler Polyester mit Phenylgruppen und Fluoratome enthaltenden Seitenketten geführt. Die Molekülmasse solcher durch *Pseudomonas oleovorans* erzeugter Polyester erreichte \bar{M}_w -Werte bis 350 000^[5].

Das nun kürzlich von *Tirrell* et al. publizierte Verfahren des gezielten Aufbaus von Proteinen mit definierter Molekülmasse und wiederkehrenden Strukturelementen durch Genmanipulation weist einen völlig neuen Zugang zu Materialien, die ähnlich auch in der Natur (z. B. Seide oder Elastin) vorkommen und interessante Eigenschaften, wie Elastizität bei Fasern oder das Klebevermögen von Ausscheidungsprodukten bestimmter Muschelarten, aufweisen. Während biotechnologisch produzierte Enzyme oder Hormone die volle Breite der zwanzig gängigen Aminosäuren ausschöpfen, bestehen die neuen Biomaterialien aus nur wenigen, immer wiederkehrenden Aminosäuren. Dies bedeutet allerdings auch, daß die dazugehörigen DNAs und mRNAs in hohem Maße repetierend aufgebaut sein müssen. Da dieser einfache, regelmäßige Strukturaufbau Probleme mit sich bringt, z. B. Versteifung der mRNA durch sekundäre Wasserstoffbrücken, wodurch die Translation erschwert ist, wurde der genetische Code alternierend abgewandelt. Beispielsweise wurde die Codierung von Glycin durch GGT und GGC, die von Alanin abwechselnd durch GCC und GCT vorgenommen. Um die Fehler bei der Gensynthese möglichst gering zu halten, wurden zunächst DNA-Sequenzen mit zwei Wiederholungseinheiten, z. B. eines Nonapeptids,

konventionell chemisch hergestellt, diese anschließend durch Insertion in ein Plasmid, welches in *Escherichia coli* als Wirtszelle eingeführt und vermehrt wurde, geklont. Die so amplifizierte DNA-Segmente wurden zu einer Serie von Multimeren durch Selbstligation verknüpft und erneut mit *E. coli* in Antibiotica enthaltendem Nährmedium geklont. Vereinzelte Kolonien wurden separat weiter vermehrt und von dem daraus jeweils produzierten Protein durch Gelelektrophorese die zugehörige Molekülmasse ermittelt. Damit lassen sich gestaffelt monodisperse Proteine mit definierten Molekülmassen aus den Separat-Kulturen in größeren Mengen (ca. 40 mg L⁻¹) produzieren. Nach dem stark vereinfachten beschriebenen allgemeinen Verfahren wurde sehr effektiv ein Copolypeptid mit genau 14 Wiederholungseinheiten der Undecapeptidsequenz **1** hergestellt^[1].



Das neue „Polykondensat“ hat eine Glas-temperatur von 182° C und zersetzt sich oberhalb von ca. 250° C. Aus einer Ameisensäure-Lösung lassen sich homogene Filme gießen. Das zugehörige, 82 Basenpaare enthaltende Oligonucleotid wurde an einem Träger mit Hilfe der Phosphoramiditchemie aufgebaut.



Schema 1. Konventioneller peptidchemischer Aufbau eines Proteins mit repetierenden Nonapeptidsequenzen. DCC = Dicyclohexylcarbodiimid, HOSu = *N*-Hydroxysuccinimid, HONB = *N*-Hydroxy-5-norbornen-2,3-dicarbonsäureimid.

[*] Prof. Dr. H. Ritter
Universität-Gesamthochschule
Fachbereich 9
Gausstraße 20, W-5600 Wuppertal 1

[**] Professor Dr. W. Reineke, Wuppertal, danke ich für wertvolle Hinweise.

Zum Vergleich wurde auch die chemische Synthese eines Proteins mit sich wiederholenden Nonapeptideinheiten in relativ aufwendiger Weise gemäß Schema 1 durchgeführt^[6]. Die Gesamtausbeute nach 18 Stufen betrug bei dem konventionellen Verfahren lediglich 11 %. Durch Gelpermeationschromatographie wurde das Vorliegen einer polydispersen Mischung mit nur relativ geringer mittlerer Molekülmasse von ca. 10000 ermittelt.

Nach den neuesten Befunden^[1] scheint der Zugang zu Proteinen mit repetierenden Aminosäuresequenzen durch biotechnologische Methoden besonders aussichtsreich zu sein. Die großen Anstrengungen, solche relativ einfach aufgebauten Materialien bereitzustellen, rechtfertigen sich besonders dadurch, daß Anwendungen im Bereich der Medizin schon jetzt erkennbar sind. So könnten z. B. Blockcokondensate aus repetierenden Aminosäuresequenzen als Seide-Analoga und Sequenzen, die eine hohe Bindungsfähigkeit zu Zelloberflächen aufweisen, zur „Verklebung“ von einzelnen Zellen zu größeren Aggregaten, wie es z. B. bei Brandverletzungen notwendig ist, genutzt werden. Die Verknüpfung von Hart- und Weichsegmenten von entsprechend repetierend aufgebauten Aminosäuresequenzen wird als Ursache für die hohe Elastizität von Spinnweben angesehen. Die nun biotechnologisch zugänglichen Materialien sollten bei blockartiger Verknüpfung ähnliche Eigenschaften aufweisen und in

Form von Folien zur Wundabdeckung oder als Beschichtungsmaterial von Implantaten besonders interessant sein^[7].

Der von Tirrell et al. gewiesene Weg zum Aufbau von Proteinen, die wenige, immer wiederkehrende Aminosäure-Einheiten enthalten und die eine exakt festgelegte Molekülmasse haben, hat sich gegenüber klassischen Methoden bezüglich Aufwand und Ergebnis als überlegen erwiesen. Damit werden dem Polymer- und Proteinchemiker neue Materialien in die Hand gegeben, die sich durch chemische und enzymatische Prozesse weiter umwandeln lassen sollten, z. B. in Block- oder Pfropfcokondensate. Schließlich bleibt abzuwarten, inwieweit die Strukturvielfalt der monodispersen Proteine, z. B. durch fluoridierte Aminosäuren im Nährmedium, noch zu vergrößern ist.

- [1] H. S. Creel, M. J. Fournier, T. L. Mason, D. A. Tirrell, *Macromolecules* 24 (1991) 1213.
- [2] H. D. Jakubke, P. Kuhl, A. Könnicke, *Angew. Chem.* 97 (1985) 79; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 24 (1985) 85.
- [3] E. Bayer, *Angew. Chem.* 103 (1991) 117; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 30 (1991) 113.
- [4] H. Rehse, H. Ritter, *Makromol. Chem.* 189 (1988) 529; M. Gormanns, H. Ritter, *ibid.*, im Druck.
- [5] K. Fritzsche, R. W. Lenz, R. C. Fuller, *Makromol. Chem.* 191 (1990) 1957; C. Abe, Y. Taima, Y. Nakamura, Y. Doi, *Polym. Commun.* 31 (1990) 404.
- [6] K. P. McGrath, D. A. Tirrell, M. Kawai, T. L. Mason, M. J. Fournier, *Bio-technol. Prog.* 6 (1990) 188.
- [7] D. A. Tirrell, Amherst, MA, USA, persönliche Mitteilung.

C₆₀: From Soot to Superconductors

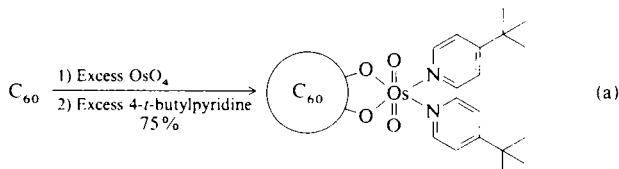
By François Diederich* and Robert L. Whetten

In 1990, a team of astronomers led by Krätschmer and Huffman^[1] reported that the new allotrope of carbon C₆₀ (buckminsterfullerene, so named after Buckminster Fuller, an architect renowned for his geodesic domes)^[2] can be produced in macroscopic quantities through resistive heating of graphite under inert atmosphere. In an *Angewandte Chemie* Highlight article in January 1991, Fraser Stoddart summarized the early results in the vigorous worldwide research efforts that were triggered by this surprising development.^[3] Only half a year later, a series of exciting new findings require that yet another Highlight article be written (closing date May 20, 1991).

X-ray Crystal Structure Analysis of Osmylated C₆₀

Although the icosahedral-cage structure of C₆₀ was strongly suggested by ¹³C NMR^[3], IR^[3–6], Raman^[6], and photoelectron spectroscopy,^[7] as well as by scanning tunneling microscopy (STM) imaging,^[8–10] the ultimate confirmation and detailed parameters of the soccerball-shaped framework had to await X-ray crystallography. However, rapid isotropic rotational motion of the orderly packed spherical molecules in the crystal to temperatures down to

100 K^[11,12] have so far prevented a successful high resolution X-ray crystal structure analysis. To break the symmetry of C₆₀ and prevent its rapid spinning in the crystal, Hawkins et al. prepared by osmylation [Eq. (a)] a remarkable 1:1



C₆₀-osmium tetraoxide adduct.^[13,14] The crystal structure of this adduct was subsequently solved by the Berkeley group and clearly confirms the soccerball structure of C₆₀, composed of 20 six-membered rings fused to 12 five-membered rings (Fig. 1).^[14] All tricoordinate carbon atoms of C₆₀ are pyramidalized and lie at an average distance of 3.512(3) Å from the center of the sphere. The unfunctionalized five- and six-membered rings are all planar within ± 0.05 Å. The two bond lengths in these rings are 1.388(9) Å for the fusion between two six-membered rings and 1.432(5) Å for the fusion between a six- and a five-membered ring. Values of 1.40 (± 0.015) Å and 1.45 (± 0.015) Å were determined for the two bond lengths in C₆₀ by solid-state ¹³C NMR.^[15]

[*] Prof. Dr. F. Diederich, Prof. R. L. Whetten
Department of Chemistry and Biochemistry
University of California, Los Angeles, CA 90024-1569 (USA)