

- [2] H. Weber, B. A. Vick, E. Farmer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 10473–10478.
- [3] a) EPC = enantiomerically pure compounds. Übersicht: T. K. Sarkar, B. K. Ghorai, *J. Indian. Chem. Soc.* **1999**, *76*, 693–706; b) G. Helmchen, A. Goeke, G. Lauer, M. Urmann, J. Fries, *Angew. Chem.* **1990**, *102*, 1079–1080; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, *29*, 1024–1025; c) K. Weinges, U. Lernhardt, *Liebigs Ann. Chem.* **1990**, *751*–754; d) F.-P. Montforts, I. Gesing-Zibulak, W. Grammenos, M. Schneider, K. Laumen, *Helv. Chim. Acta* **1989**, *72*, 1852–1859; e) T. Kitahara, T. Nishi, K. Mori, *Tetrahedron* **1991**, *47*, 6999–7006; f) J. S. U. H. S. Park, S. Gupta, J. K. Cha, *Synth. Commun.* **1997**, *27*, 2931–2941; g) H. Stadtmüller, A. Vaupel, C. E. Tucker, T. Stüdemann, P. Knochel, *Chem. Eur. J.* **1996**, *2*, 1204–1220; h) G. J. Roth, S. Kirschbaum, H. J. Bestmann, *Synlett* **1997**, 618–620; i) T. K. Sarkar, B. Mukherjee, S. K. Gosh, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 3243–3254; j) C. Fehr, J. Galindo, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 581–585; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 569–573.
- [4] L. Crombie, K. M. Mistry, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1991**, 1981–1991, zit. Lit..
- [5] a) P. A. Grieco, N. Abood, *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 6008–6010.
- [6] a) C. B. Chapleo, M. A. Finch, T. V. Lee, S. M. Roberts, R. F. Newton, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1979**, 676–677; b) C. B. Chapleo, M. A. W. Finch, S. M. Roberts, G. T. Wooley, R. F. Newton, D. W. Selby, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1980**, 1847–1852.
- [7] P. Sennhenn, B. Gabler, G. Helmchen, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 8595–8598.
- [8] S. Kudis, G. Helmchen, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 3210–3212; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 3047–3050.
- [9] a) R. F. Newton, D. P. Reynolds, J. Davies, P. B. Kay, S. M. Roberts, T. W. Wallace, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1983**, 683–685; b) C. B. Chapleo, M. A. Finch, T. V. Lee, S. M. Roberts, R. Newton, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1980**, 2084–2087.
- [10] C. Marschner, J. Baumgartner, H. Griengl, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 5224–5235.
- [11] a) S. K. Johansen, H. T. Korno, I. Lundt, *Synthesis* **1999**, 171–177; b) S. K. Johansen, I. Lundt, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1999**, 3615–3622.
- [12] P. Knochel, R. Singer, *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 2117–2188.
- [13] P. Knochel, T.-S. Chou, C. Jubert, D. Rajgopal, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 588–599.
- [14] E. W. Weiler, T. Albrecht, B. Groth, Z.-Q. Xia, M. Luxem, H. Liss, L. Andert, P. Spengler, *Phytochemistry* **1993**, *32*, 591–600.
- [15] Anmerkung in der Druckfahne (13. September 2002): Eine weitere Synthese von enantiomerenreinem 12-ODPA wurde kürzlich veröffentlicht: Y. Kobayashi, M. Matsumi, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 4361–4364.

## Kationenkontrolle bei der Funktionsprogrammierung von Helices: Strukturen eines D,L-Peptid-Ionenkanals\*\*

Hans-Dieter Arndt, Dirk Bockelmann,  
Andrea Knoll, Stefanie Lamberth,  
Christian Griesinger\* und Ulrich Koert\*

Moleküle, die sich kontrolliert in helicale Strukturen falten, eignen sich hervorragend zur Erzeugung von Funktionseinheiten. Helices dienen dazu, Information zu speichern und zu prozessieren (DNS-Doppelhelix),<sup>[1]</sup> bilden die Grundlage für steife Materialien (Tripelhelix des Kollagens),<sup>[2]</sup> vermitteln Transportprozesse ( $\beta$ -Helix der D,L-Peptide)<sup>[3]</sup> und können dazu verwandt werden, photo-, elektro- oder transportaktive Gruppen dreidimensional anzuordnen.<sup>[4]</sup> Die Entwicklung synthetischer Verbindungen mit einem vorhersagbaren Faltingsverhalten („programmiertes Falten“) wird aktuell erforscht,<sup>[5]</sup> wobei sich der überwiegende Teil der Arbeiten auf die Beschreibung der Strukturen beschränkt.

Unser Interesse an der funktionalen Faltung von künstlichen Ionenkanälen<sup>[6]</sup> führte uns dazu, D,L-Peptide als Strukturtemplate für Ether- $\delta$ -peptide einzusetzen, um so Ionenkanäle mit neuartigen Funktionen zu generieren.<sup>[7]</sup> Ausgangspunkt dafür war der Ionenkanal, der vom D,L-Peptid Gramicidin A (gA) gebildet wird (Abbildung 1a).<sup>[3]</sup> gA selbst kann eine Vielzahl von Konformationen einnehmen, deren Besetzung vom umgebenden Medium bestimmt wird. In organischen Lösungsmitteln bildet gA bevorzugt dimere Doppelhelices, die sich in ihrer Händigkeit und Topologie unterscheiden.<sup>[8]</sup> Wenn diese Doppelhelices Kationen binden, erweitert sich der Durchmesser der Helix.<sup>[9]</sup> Nur in membranartiger Umgebung bildet gA aus zwei rechts-gängigen, einzelsträngig vorliegenden  $\beta$ -Helices ein einzigartiges, Kopf-an-Kopf-assoziiertes Dimer.<sup>[10]</sup> Diese Konformation mit 6.3 Aminosäuren pro Windung gilt allgemein als die ionenkanalaktive Spezies.<sup>[11a–c]</sup> Da es aber bislang nicht

[\*] Prof. Dr. C. Griesinger, Dipl.-Chem. D. Bockelmann, Dr. S. Lamberth  
Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie  
Am Fassberg 11, 37077 Göttingen (Deutschland)  
Fax: (+49) 551-201-2201  
E-mail: cigr@nmr.mpibpc.mpg.de

Prof. Dr. U. Koert  
Philipps-Universität Marburg  
Fachbereich Chemie  
Hans-Meerwein-Straße, 35032 Marburg (Deutschland)  
Fax: (+49) 6421-282-5677  
E-mail: koert@chemie.uni-marburg.de

Dr. H.-D. Arndt, Dr. A. Knoll  
Humboldt-Universität zu Berlin  
Institut für Chemie  
Brook-Taylor-Straße 2, 12489 Berlin (Deutschland)

[\*\*] Diese Arbeit wurde von der Volkswagen-Stiftung, der Max-Planck-Gesellschaft, der Deutschen Forschungsgemeinschaft, dem Fonds der Chemischen Industrie sowie der Pinguin-Stiftung unterstützt. Wir danken Dr. Clemens Mügge für NMR-spektroskopische Unterstützung sowie Dipl.-Chem. Jochen Pfeifer und MSc Lo'ay Al-Momani für CD-spektroskopische Messungen.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

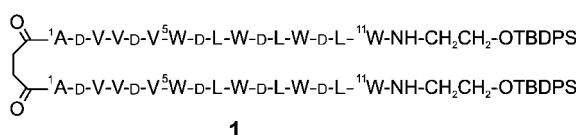
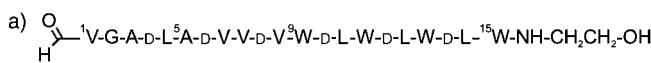


Abbildung 1. a) Primärsequenz von gA und **1**. b) Repräsentative Stromspur von **1** in planaren Lipiddoppelschichten (1M CsCl, 120 mV, Sojalecithin). Für Einzelheiten siehe Hintergrundinformationen.

gelungen ist, diese  $\beta^{6,3}$ -Helix in isotroper Lösung oder durch Einkristallstrukturanalyse zu untersuchen, wurde ihre Bedeutung auch kontrovers diskutiert.<sup>[11d]</sup>

Wir konnten zeigen, dass das synthetische 22mer „Minigramicidin“ **1** (Abbildung 1a) in Phospholipiddoppelschichten als Ionenkanal aktiv ist (Abbildung 1b), wobei die Aktivität stark von der Membrandicke abhängt.<sup>[12a]</sup> Voruntersuchungen ergaben außerdem, dass **1** einen eingeschränkten Konformationsraum aufweist als gA.<sup>[12b]</sup> Mit dem Ziel, die Aktivkonformation von **1** besser zu verstehen, unternahmen wir Strukturuntersuchungen in An- und Abwesenheit von  $\text{Cs}^+$ -Ionen.

Die Verbindung **1** setzt sich aus den terminalen 11mer-Peptiden von gA zusammen, die durch ein Succinatmolekül kovalent Kopf-an-Kopf-verknüpft sind. Diese Verknüpfung verhindert das Auftreten des lateralen Dissoziationsgleichgewichts,<sup>[12b]</sup> das bei gA Strukturuntersuchungen erschwert.<sup>[13,14]</sup> Die terminalen *tert*-Butyldiphenylsilyl(TBDPS)-Gruppen in **1** erhöhen die Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln, was die Strukturuntersuchungen erleichtert. Einzelkanalstrommessungen an planaren Lipiddoppelschichten zeigten, dass **1** hochaktive  $\text{Cs}^+$ -Kanäle bildet ( $[1] = 10^{-14} \text{ M}$  in der wässrigen Badlösung, siehe Hintergrundinformationen). Es wurde nur eine Art von Ionenkanälen beobachtet, was darauf hinweist, dass eine einzige Aktivkonformation in der Membran vorliegt (Abbildung 1b).

Die Struktur von **1** in Abwesenheit von Metallionen wurde in  $[\text{D}_6]\text{Benzol}/[\text{D}_6]\text{Aceton}$  10:1 und in  $\text{CDCl}_3/[\text{D}_3]\text{MeOH}$  1:1 durch NMR-Spektroskopie bestimmt. Beide Lösungsmittelgemische imitieren die Polarität einer Zellmembranumgebung,<sup>[15]</sup> und in beiden Medien lag das Peptid in derselben, hochsymmetrischen Struktur **A** vor: Ein Peptid-Dimer bildet eine linksgängige  $\beta$ -Doppelhelix der Ganghöhe 5.7 mit einer Länge von etwa 38 Å (Abbildung 2), wobei das Succinatmolekül eine antiperiplanare Konformation aufweist. Eine entsprechende Sekundärstruktur nimmt gA nur in Gegenwart von  $\text{CaCl}_2$  ein.<sup>[8g]</sup>

Bei Zugabe von  $\text{Cs}^+$ -Salzen wandelt sich die gesamte Struktur in eine neue Spezies um. Nach Sättigung mit  $\text{CsI}$  liegt das Peptid **1** in  $\text{CDCl}_3/[\text{D}_3]\text{MeOH}$  1:1 oder 3:1 als Monomer in der Konformation **B** vor (Abbildung 3). Hierbei bildet sich eine rechtsgängige  $\beta$ -Helix mit ca. 6.3 Aminosäuren pro

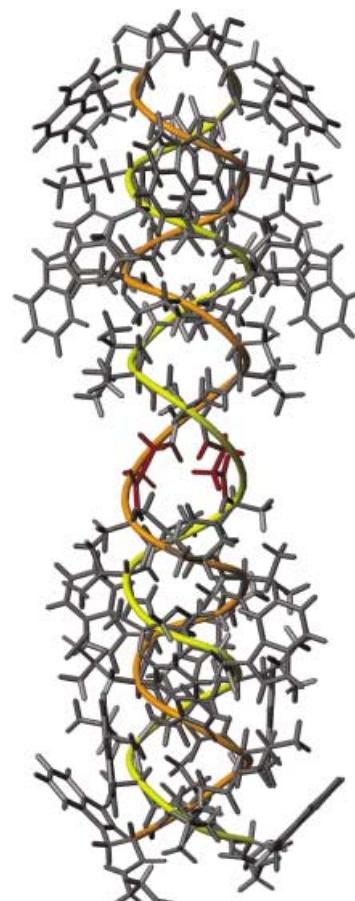


Abbildung 2. Gemittelte Struktur **A** (PDB-Referenzcode 1 KQE; berechnet aus den 16 energetisch günstigsten Strukturen) von **1** in  $[\text{D}_6]\text{Benzol}/[\text{D}_6]\text{Aceton}$  10:1. Die TBDPS-Endgruppen konnten wegen Signalüberlagerungen nicht berücksichtigt werden. Das verbindende Succinatmolekül ist rot dargestellt. Alle NMR-Spektren wurden bei 600 MHz aufgenommen (Bruker AMX). Die Zuordnung erfolgte mit Felix 2000 (Accelrys, San Diego, CA) durch die kombinierte Auswertung von DQF-COSY-, NOESY- und TOCSY-Experimenten nach dem üblichen Verfahren.<sup>[16]</sup> H-H-Abstände wurden den NOESY-Spektren bei einer Mischzeit von 150 und 300 ms entnommen. Insgesamt wurden 688 NOE-Kreuzsignale ausgewertet (330 Aminosäurerest-interne, 138 sequenzielle und 220 von mittlerer Reichweite). Für jede Aminosäure konnten  $^3J(\text{H}^a, \text{H}^a)$  Kopplungskonstanten bestimmt werden, die alle im für  $\beta$ -Faltblätter typischen Bereich lagen. Die H-H-Abstände und  $\text{H}^a, \text{H}^a$ -Kopplungskonstanten dienten als Parameter für eine Strukturrechnung durch „simulated annealing“<sup>[17]</sup> mit dem Programm X-PLOR.<sup>[18]</sup> Die mittlere Standardabweichung der Rückgratatomkoordinaten in den so erhaltenen 16 Strukturen mit minimaler Energie betrug 0.61 Å.

Windung und einer Länge von etwa 17 Å. Das Succinatmolekül verknüpft die beiden Einfachhelices symmetrisch ( $C_2$ -Achse) und antikinal (gemittelte Struktur).

Die Struktur **B** besitzt alle Merkmale der wahrscheinlichen Aktivkonformation von gA – im Gegensatz zur  $\text{Cs}^+$ -freien  $\beta$ -Doppelhelix **A**. Der Porendurchmesser steigt von 1.2 Å im Dimer **A** auf 4.5 Å in der monomeren  $\beta^{6,3}$ -Helix **B**, weit genug, um  $\text{Cs}^+$ -Ionen aufzunehmen. Die Struktur **B** enthält einen durchgehenden Kanal, welcher dem Kopf-an-Kopf-Dimer von gA in membranähnlicher Umgebung gleicht.<sup>[11]</sup> In der Struktur **B** fügen sich die Amidcarbonylgruppen des Succinatmoleküls in das Gesamt muster der Carbonylfunktionen des Peptids ein. Sie vervollständigen somit die Koordi-

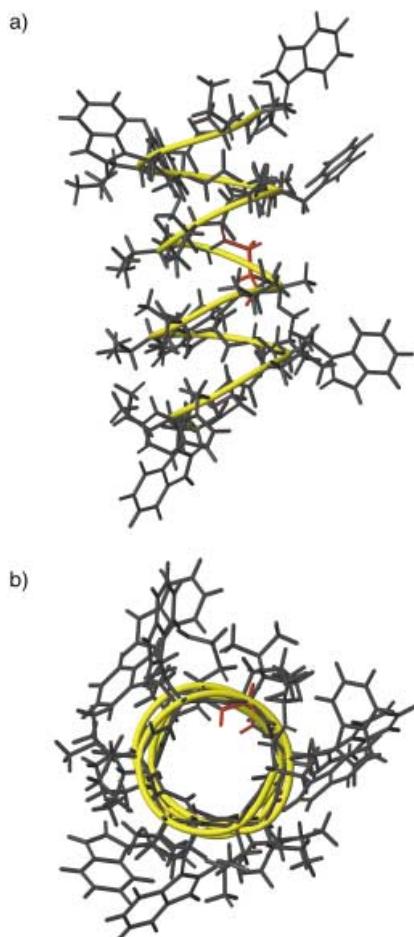


Abbildung 3. Gemittelte Struktur **B** von **1** in  $\text{CDCl}_3/\text{D}_3\text{MeOH}$  3:1 gesättigt mit CsI. a) Seitenansicht, b) Aufsicht. Die Struktur wurde wie für **A** beschrieben (Abbildung 2) bestimmt. In diesem Fall wurden 213 NOE-Kreuzsignale ausgewertet (97 Aminosäurerest-interne, 51 sequenzielle und 65 von mittlerer Reichweite). Die mittlere Standardabweichung der Rückgratatomkoordinaten der zehn Strukturen mit minimaler Energie lag bei 0.91 Å.

dinationsumgebung der  $\text{Cs}^+$ -Ionen, die vermutlich symmetrische Positionen besetzen.<sup>[19]</sup>

Die Konformationsumwandlung von **A** nach **B** ließ sich durch NMR-Titration mit CsI in  $\text{CDCl}_3/\text{D}_3\text{MeOH}$  1:1 verfolgen (Abbildung 4a, siehe Hintergrundinformationen). Verschiedene Modellrechnungen (1–2 Ionen, kein Aggregat oder das Peptid als Dimer, Trimer oder Tetramer) nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate ergaben, dass nur das in Abbildung 4b gezeigte Szenario die Daten sinnvoll wiedergibt: Das Dimer **A** dissoziiert in zwei Monomere **C** ( $K_D$ ). Ein Monomer **C** bindet nacheinander zwei  $\text{Cs}^+$ -Ionen ( $K_1, K_2$ ). Es gelang wegen der starken Kopplung von  $K_D$  und  $K_1$  nicht, einen verlässlichen Wert für  $K_D$  aus den Daten zu erhalten. Mit einem Näherungswert von  $K_D = 0.00126 \text{ M}^{0.5}$  (98 % Dimer bei  $[\text{Cs}^+] = 0$ ) erhielten wir für die Bindungskonstanten Werte von  $K_1 = (63 \pm 5) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$  und  $K_2 = 36 \pm 20 \text{ M}^{-1}$  (siehe Hintergrundinformationen). Das erste  $\text{Cs}^+$ -Ion bindet wesentlich fester als das zweite ( $\Delta G_1 = -28 \text{ kJ mol}^{-1}$ ,  $\Delta G_2 = -9 \text{ kJ mol}^{-1}$ ). Dies zeigt an, dass für die Konformationsumwandlung vor der Bindung des ersten  $\text{Cs}^+$ -Ions weniger Energie aufgebracht werden muss als für die Überwindung

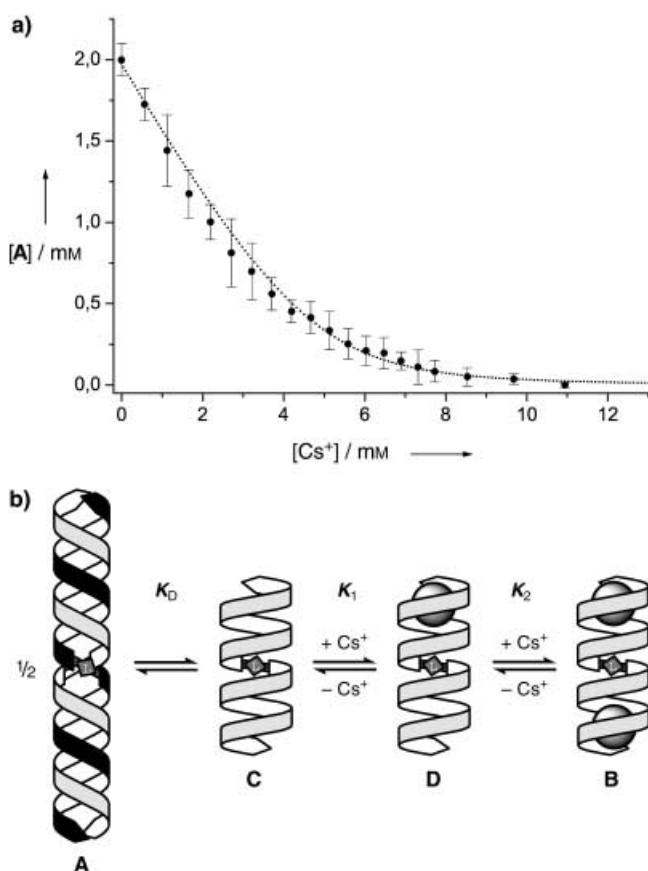


Abbildung 4. a) NMR-Titration von **1** mit CsI in  $\text{CDCl}_3/\text{D}_3\text{MeOH}$  1:1, die angepasste Funktion ist gepunktet dargestellt; b) schematische Darstellung der Konformationsgleichgewichte für die Umwandlung von **A** nach **B** über das angenommene Monomer **C** und den 1:1-Komplex **D** bei  $\text{Cs}^+$ -Zugabe.

der Coulomb-Abstoßung, die bei der Bindung des zweiten Ions auftritt.

Um diese Befunde mit denen für gA verglichen zu können,<sup>[8f,12b]</sup> wurden die Sekundärstrukturen von **1** durch Circulardichroismus(CD)-Spektroskopie charakterisiert (Abbildung 5). In organischen Lösungsmitteln wie  $\text{CH}_3\text{CN}$  oder  $\text{C}_2\text{H}_4\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  werden zwei *negative* Cotton-Effekte bei  $\lambda = 228$  und  $208 \text{ nm}$  beobachtet (Abbildung 5a, Spektren c und d),<sup>[12b]</sup> was mit der linksgängigen, parallelen  $\beta$ -Doppelhelix **A** im Einklang steht.<sup>[12b,20]</sup> Für den  $\text{Cs}^+$ -Komplex **B** wird dagegen in  $\text{C}_2\text{H}_4\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  oder MeOH ein *positiver* Cotton-Effekt bei  $\lambda = 230 \text{ nm}$  beobachtet (Abbildung 5a; Spektren a und b), was die Rechtsgängigkeit der  $\beta$ -Helix anzeigt. Allerdings unterscheiden sich die CD-Spektren von **B** deutlich vom Spektrum von **1** in DMPC-Vesikeln,<sup>[20]</sup> welches wiederum mit dem von gA in diesem Lipidmedium nahezu übereinstimmt (Abbildung 5b) und üblicherweise der rechtsgängigen  $\beta^{6,3}$ -Helix zugeordnet wird.<sup>[8f]</sup> Letzteren Helixtyp haben wir jedoch zweifelsfrei für den Komplex **B** in organischen Lösungsmitteln nachgewiesen. Wir können diese Unstimmigkeit zum jetzigen Zeitpunkt nicht erklären, vermuten jedoch, dass die voneinander abweichenden CD-Spektren ihre Ursache in lokal unterschiedlichen Konformationen haben, welche die globale Struktur nicht beeinflussen (Manuskript in Vorbereitung).

Um herauszufinden, ob die Konformationsumwandlungen von **1** mit dem Transportprozess in der Membran korrelieren,

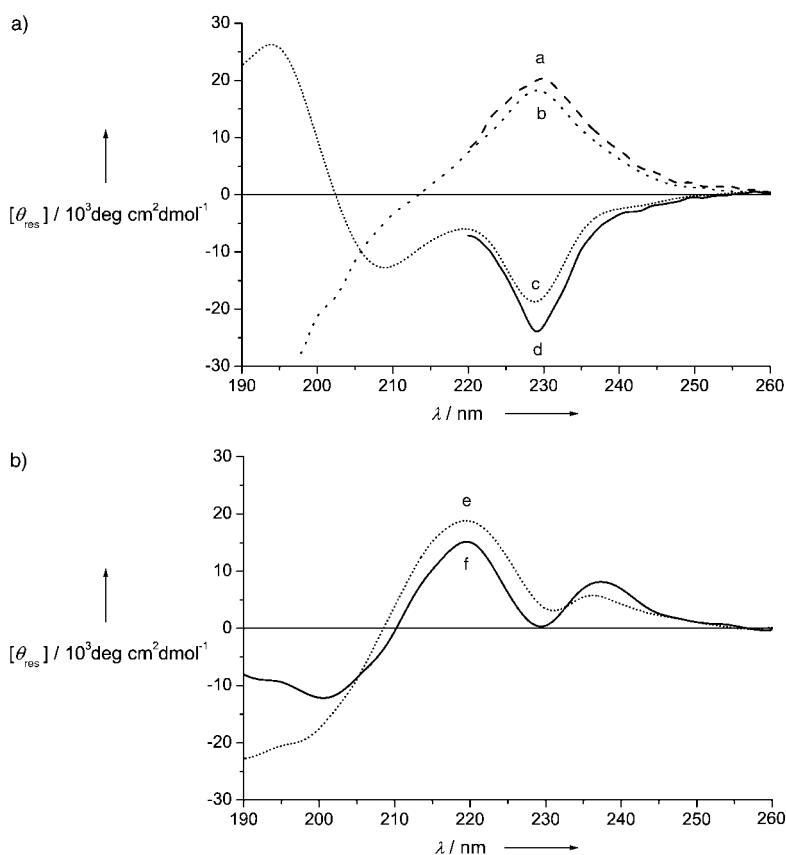


Abbildung 5. a) CD-Spektren von **1** in organischen Lösungsmitteln ( $T = 22^\circ\text{C}$ ,  $[\mathbf{1}] = 10^{-5}\text{ M}$ ). Spektrum a:  $\text{C}_2\text{H}_4\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  1:1, gesättigt mit  $\text{CsCl}$  (---); Spektrum b: 50 mM  $\text{CsCl}$  in  $\text{MeOH}$  (---); Spektrum c:  $\text{CH}_3\text{CN}$  (•••); Spektrum d:  $\text{C}_2\text{H}_4\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  1:1 (—); b) CD-Spektren von 1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholin (DMPC)-Vesikeln<sup>[20]</sup> ( $T = 22^\circ\text{C}$ ,  $[\text{gA}]$  oder  $[\mathbf{1}] = 10^{-5}\text{ M}$ ). Spektrum e: gA (•••); Spektrum f: **1** (—). Die Form der Spektren a und d war bei  $[\mathbf{1}] = 10^{-3}\text{ M}$  unverändert (nicht gezeigt).  $[\theta]_{\text{res}} = \text{Mittlere molare Elliptizität pro Amidcarbonylgruppe}$ .

untersuchten wir die Ionenkanalleitfähigkeit  $A$  in Abhängigkeit von der  $\text{Cs}^+$ -Konzentration in der Badlösung (Abbildung 6a).<sup>[21]</sup> Die so gewonnenen Daten zeigen drei Besonderheiten: 1) Selbst bei sehr niedrigen  $\text{Cs}^+$ -Konzentrationen konnte Einzelkanalleitfähigkeit nachgewiesen werden. 2) Im mittleren Konzentrationsbereich (10–100 mM) wächst die Leitfähigkeit  $A$  supralinear an. 3) Bei ca. 1.5 M durchläuft  $A$  ein Maximum. Diese Merkmale weisen auf einen Transportvorgang mit mehreren Bindungsstellen hin.<sup>[21b]</sup> Ein Kinetikmodell mit zwei symmetrischen Bindungsstellen und vier Zuständen<sup>[22]</sup> gab die Daten sehr gut wieder (Abbildung 6b). Die scheinbaren Geschwindigkeitskonstanten ergeben sich ( $\pm 30\%$ ) daraus zu  $A = 5.2 \times 10^8 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $B = 4.9 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ ,  $K = 5.1 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$ ,  $D = 4.4 \times 10^7 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$  und  $E = 5.4 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$ . Offensichtlich wird also ein doppelt besetzter Zustand von **1** während des Transportprozesses populiert, gerade bei höheren  $\text{Cs}^+$ -Konzentrationen.

Wir konnten hiermit zeigen, dass das Minigramicidin **1** in unpolaren Medien ein stabförmiges, doppelhelicales Aggregat **A** bildet, dessen Deaggregation in die kanalaktive Konformation entweder durch den Einbau in eine Membranumgebung oder durch das Binden von  $\text{Cs}^+$ -Ionen ausgelöst wird. Letzteres gestattete es uns, die rechtsgängige  $\beta$ -Helix der D,L-Peptide zum ersten Mal in Lösung zu charakterisieren. Die Struktur **B** sollte der Aktivkonformation (im von zwei  $\text{Cs}^+$ -Ionen besetzten Zustand) des Ionenkanals **1** in der Membran sehr ähnlich sein.

Eingegangen am 9. Januar 2002,  
veränderte Fassung am 29. Juli 2002 [Z18500]

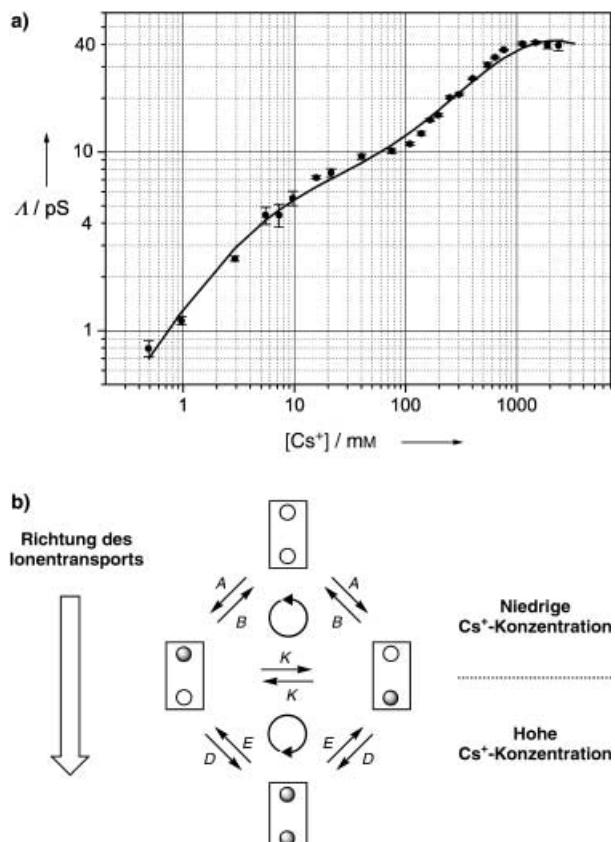


Abbildung 6. a) Konzentrationsabhängigkeit der  $\text{Cs}^+$ -Einzelkanalleitfähigkeit von **1** bei  $T = 22^\circ\text{C}$  in Sojalecithin ( $n > 50$ ). b) Kinetisches Modell mit zwei symmetrischen Bindungsstellen und vier Zuständen, das die Konzentrationsabhängigkeit der Leitfähigkeit wiedergibt.<sup>[22]</sup>

- [1] *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*, 2. Aufl. (Hrsg.: G. M. Blackburn, M. J. Gait), Oxford University Press, Oxford, **1996**.
- [2] D. R. Eyre, *Science* **1980**, *207*, 1315–1322.
- [3] *Gramicidin And Related Ion Channel-Forming Peptides* (Hrsg.: D. J. Chadwick, G. Cardew), Wiley, Chichester, **1999b**) (Novartis Foundation Symposium 225); R. E. Koeppe II, O. S. Andersen, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1996**, *25*, 231–258; c) P. Läuger, *Angew. Chem.* **1985**, *97*, 939–959; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1985**, *24*, 905–925.
- [4] a) T. Katz, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 1997–1999; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 1921–1923; b) J.-C. Meillon, N. Voyer, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 1004–1006; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 967–969; c) U. Koert, M. M. Harding, J.-M. Lehn, *Nature* **1990**, *346*, 339–342.
- [5] a) D. Seebach, J. L. Matthews, *Chem. Commun.* **1997**, 2015–2022; b) S. H. Gellman, *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31*, 173–180; c) V. Berl, I. Huc, R. G. Khoury, M. J. Krische, J.-M. Lehn, *Nature* **2000**, *407*, 720–723; Übersichtsartikel: d) A. E. Rowan, R. J. M. Nolte, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 65; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 63; e) R. P. Cheng, S. H. Gellman, W. F. DeGrado, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3219–3232; f) D. Seebach, M. Albert, P. I. Arvidsson, M. Rueping, J. V. Schreiber, *Chimia* **2001**, *55*, 345–353.
- [6] Übersichtsartikel: a) Y. Kobuke in *Advances in Supramolecular Chemistry*, Vol. 4 (Hrsg.: G. W. Gokel), JAI, Greenwich, **1997**, S. 163–210; b) N. Voyer, *Top. Curr. Chem.* **1996**, *184*, 1–37; c) G. W. Gokel, O. Murillo, *Acc. Chem. Res.* **1996**, *29*, 425–432; neuere Beiträge: d) B. Baumeister, N. Sakai, S. Matile, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 2031–2034; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 1955–1958; e) N. Yoshino, A. Satake, Y. Kobuke, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 471–473; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 457–459, sowie Zitate in Lit. [7b].
- [7] a) H.-D. Arndt, A. Knoll, U. Koert, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 2137–2140; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2076–2078; b) A. Schrey, A. Vescovi, A. Knoll, C. Rickert, U. Koert, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 928–931; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 900–902.
- [8] a) W. R. Veatch, E. T. Fossel, E. R. Blout, *Biochemistry* **1974**, *13*, 5249–5257; b) V. F. Bystrov, A. S. Arseniev, *Tetrahedron* **1988**, *44*, 925–949; c) D. A. Langs, *Science* **1988**, *241*, 182–187; d) Z. Zhang, S. M. Pascal, T. A. Cross, *Biochemistry* **1992**, *31*, 8822–8828; e) S. M. Pascal, T. A. Cross, *J. Mol. Biol.* **1992**, *226*, 1101–1109; f) S. M. Pascal, T. A. Cross, *J. Biomol. NMR* **1993**, *3*, 495–513; g) Y. Chen, A. Tucker, B. A. Wallace, *J. Mol. Biol.* **1996**, *264*, 757–769; h) D. A. Doyle, B. A. Wallace, *J. Mol. Biol.* **1997**, *266*, 963–977.
- [9] a) A. S. Arseniev, I. L. Barsukov, V. F. Bystrov, *FEBS Lett.* **1985**, *180*, 33–39; b) A. N. Nekrasov, A. V. Stepanov, V. P. Timofeev, *FEBS Lett.* **1995**, *371*, 35–38; c) V. F. Bystrov, A. S. Arseniev, I. L. Barsukov, A. L. Lomize, *Bull. Magn. Reson.* **1987**, *8*, 84–94.
- [10] a) A. S. Arseniev, I. L. Barsukov, V. F. Bystrov, A. L. Lomize, Y. A. Ovchinnikov, *FEBS Lett.* **1985**, *186*, 168–174; b) R. R. Ketcham, W. Hu, T. A. Cross, *Science* **1993**, *261*, 1457–1460; c) F. Tian, T. A. Cross, *J. Mol. Biol.* **1999**, *285*, 1993–2003; d) R. Fu, M. Cotton, T. A. Cross, *J. Biomol. NMR* **2000**, *16*, 261–268.
- [11] a) F. Kovacs, J. Quine, T. A. Cross, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 7910–7915; b) O. S. Andersen, H.-J. Apell, E. Bamberg, D. D. Busath, R. E. Koeppe II, F. J. Sigworth, G. Szabo, D. W. Urry, A. Woolley, *Nat. Struct. Biol.* **1999**, *6*, 609; c) T. A. Cross, A. S. Arseniev, B. A. Cornell, J. H. Davis, J. A. Kilian, R. E. Koeppe II, L. K. Nicholson, F. Separovic, B. A. Wallace, *Nat. Struct. Biol.* **1999**, *6*, 610–611; d) B. M. Burkhardt, W. L. Duax, *Nat. Struct. Biol.* **1999**, *6*, 611–612.
- [12] a) H.-D. Arndt, A. Knoll, U. Koert, *ChemBioChem* **2001**, 221–223; b) H.-D. Arndt, A. Vescovi, A. Schrey, J. R. Pfeifer, U. Koert, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 2789–2801.
- [13] a) M. C. Goodall, *Arch. Biochem. Biophys.* **1973**, *157*, 514; b) D. W. Urry, C. M. Venkatachalam, A. Spisni, R. J. Bradley, T. L. Trapane, K. U. Prasad, *J. Membr. Biol.* **1980**, *55*, 29–51; c) C. J. Stankovic, S. H. Heinemann, J. M. Delfino, F. J. Sigworth, S. L. Schreiber, *Science* **1989**, *244*, 813–817; d) D. Lelievre, Y. Trudelle, F. Heitz, G. Spach, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1989**, *33*, 379–385; e) C. J. Stankovic, S. H. Heinemann, S. L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 3702–3704; f) S. Crouzy, T. B. Woolf, B. Roux, *Biophys. J.* **1994**, *67*, 1370–1386.
- [14] I. L. Barsukov, A. L. Lomize, A. S. Arseniev, V. F. Bystrov, *Biol. Membr. (USSR)* **1987**, *4*, 171–193.
- [15] R. Gratias, H. Kessler, *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 2027–2031.
- [16] K. Wüthrich, *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, Wiley, New York, **1986**.
- [17] M. Nilges, S. I. O'Donoghue, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1998**, *32*, 107–139.
- [18] A. T. Brünger, *X-PLOR: A System for X-ray Crystallography and NMR*, Yale University Press, New Haven, **1992**.
- [19] Die symmetrische Struktur **B** weist auf eine gerade Zahl gebundener Cs<sup>+</sup>-Ionen hin. Die NMR-Titration von **1** mit CsI zeigt zwei Cs<sup>+</sup>-Ionen an, wie auch das ESI-Massenspektrum, das vom [1+2Cs]<sup>2+</sup>-Ion dominiert wird. Wahrscheinlich sind die Cs<sup>+</sup>-Ionen im unteren bzw. oberen Drittel der Kanalpore gebunden. Da wir jedoch die genaue Position der Cs<sup>+</sup>-Ionen im Konformer **B** bislang nicht NMR-spektroskopisch eingrenzen konnten, wurden diese in der Strukturrechnung nicht berücksichtigt.
- [20] a) J. A. Killian, K. U. Prasad, D. Hains, D. W. Urry, *Biochemistry* **1988**, *27*, 4848–4855; b) D. V. Greathouse, J. F. Hinton, K. S. Kim, R. E. Koeppe II, *Biochemistry* **1994**, *33*, 4291–4299.
- [21] a) B. W. Urban, S. B. Hladky, D. A. Haydon, *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **1978**, *37*, 2628–2632; b) B. Hille, *Ionic Channels of Excitable Membranes*, 2. Aufl., Sinauer, Sunderland, **1992**.
- [22] S. B. Hladky, D. A. Haydon in *Current Topics in Membranes and Transport*, Vol. 21 (Hrsg.: F. Bronner), Academic Press, New York, **1984**, S. 327–372.

## Nichtinvasive Transformation von Proteinen in optische pH-Sensoren durch Austausch von Tryptophan gegen Aminotryptophan\*\*

Nediljko Budisa,\* Marina Rubini, Jae H. Bae, Elisabeth Weyher, Waltraud Wenger, Ralph Golbik, Robert Huber und Luis Moroder

Unter den genkodierten natürlichen Aminosäuren kommt Tryptophan in Proteinen nur selten vor (ca. 1.2%),<sup>[1]</sup> nimmt jedoch wegen der Beteiligung an vielfältigen spezifischen inter- und intramolekularen Wechselwirkungen eine besondere Stellung ein.<sup>[2]</sup> Tryptophan ist hauptsächlich für die UV-Absorption und Fluoreszenz von Proteinen verantwortlich<sup>[3]</sup> und wurde frühzeitig als nützliche intrinsische Sonde für Struktur- und Funktionsuntersuchungen von Proteinen sowie als attraktives Target für klassisches Protein-Engineering und -design erkannt. Die klassischen Protein-Engineering-Verfahren sind auf das Standardrepertoire der kanonischen Aminosäuren beschränkt. Diese Limitierung konnte aber in den letzten Jahren durch neuere Methoden überwunden werden, die eine Erweiterung des Aminosäureresertoires

[\*] Dr. N. Budisa, M. Rubini, J. H. Bae, E. Weyher, W. Wenger, Prof. Dr. R. Huber, Prof. Dr. L. Moroder  
Max-Planck-Institut für Biochemie  
Am Klopferspitz 18A, 82152 Martinsried (Deutschland)  
Fax: (+49) 89-8578-3516  
E-mail: budisa@biochem.mpg.de

Dr. R. Golbik  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
06120 Halle/Saale (Deutschland)

[\*\*] Wir danken Monika Franke für die Hilfe bei der deutschen Übersetzung.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.