

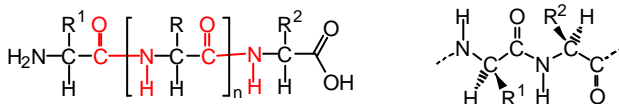
11. Peptide, Proteine, Eiweißstoffe

Peptide und Proteine gehören zu den Grundbausteinen des Lebens. Betrachtet man die Nucleinsäuren (Kap. 13) als den Konstruktionsplan, so sind die Proteine das Material, das zur Realisierung der Bauanleitung dient. Sie erfüllen Funktionen als Strukturelemente, als Enzyme für Stoffwechselfvorgänge, als Rezeptoren und Hormone sowie inter- und intrazelluläre Signalstoffe. Viele Wirkstoffe wie Immunglobuline, Antibiotika, tierische und pflanzliche Toxine, *etc.*, sind Peptide bzw. Proteine. Sie sind die Hauptbestandteile der Biomasse in den Zellen und machen zusammen mit den Nucleinsäuren mehr als 2/3 der Trockenmasse der Zelle aus.

11.1 Peptidbindung, Bauprinzip und Nomenklatur

11.1.1 Peptidbindung und Bauprinzip

Peptide zeichnen sich durch wiederholte, amidartige Verknüpfung der α -Aminogruppe einer Aminosäure mit der Carboxylgruppe einer anderen Aminosäure aus. Das "Rückgrat" der so entstandenen Peptidkette bildet damit die sich wiederholende Gruppierung $-\text{NH}-\text{CO}-\text{CHR}-$. Die α -Aminogruppe der ersten Aminosäure (*N-terminale Aminosäure*) und die Carboxylgruppe der letzten Aminosäure (*C-terminale Aminosäure*) liegen in freier Form vor.



Formel 11-1. Verknüpfung von Aminosäuren durch Peptidbindung.

Die Peptidbindung als N-substituierte Säureamidbindung ist stark resonanzstabilisiert. Die Mesomerie bedingt einen partiellen Doppelbindungscharakter (etwa 40 %) der Amidbindung, der Abstand zwischen dem C- und dem N-Atom beträgt 0.132 nm (vgl. 0.125 nm der C=N-Doppelbindung gegenüber 0.147 nm einer C-N-Einfachbindung). Die C=O-Doppelbindung besitzt damit auch $\approx 40\%$ Einfachbindungscharakter. Als Konsequenz ist die C-N-Bindung der Amidgruppe in Peptiden relativ starr und nicht frei drehbar. Die *trans*-Form ist im allgemeinen um 8 kJ/mol stabiler als die *cis*-Form, Ausnahme machen Peptidbindungen, die von N-substituierten Aminosäuren (Prolin, Hydroxyprolin) ausgehen. Die beiden Formen der Amidgruppe lassen sich mit Hilfe der IR-Spektroskopie unterscheiden (Tab. 11-1).

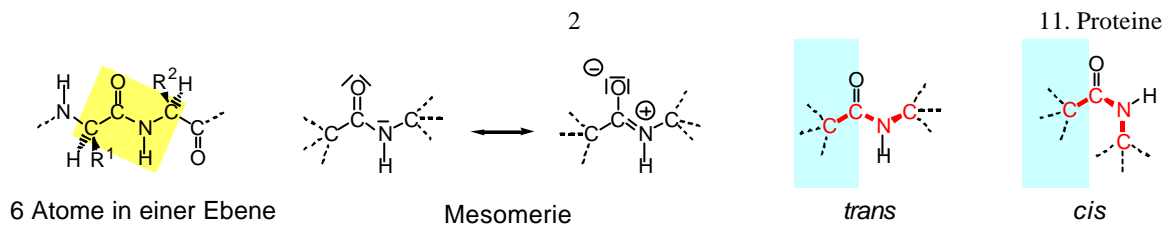


Abb. 11- . Struktur der Peptidbindung

Bei homodeten cyclischen Peptiden mit kleiner Ringstruktur muß zumindest ein Teil der Peptidbindungen in der *cis*-Form vorliegen. Bei cyclischen Dipeptiden [2,5-Dioxopiperazine] liegen alle Peptidbindungen in der *cis*-Form vor, cyclische Tetrapeptide enthalten zwei *cis*- und zwei *trans*-Peptidgruppen.

Tabelle 11-1. IR-Banden *cis*- und *trans*-ständiger Amidgruppen

	NH-Valenz- schwingung	Amidbanden		
		I	II	III
<i>cis</i> -CO-NH	3180 ... 3195	1670 ... 1690	1440 ... 1455	1305 ... 1345
<i>trans</i> -CO-NH	3350	ca. 1650	ca. 1550	

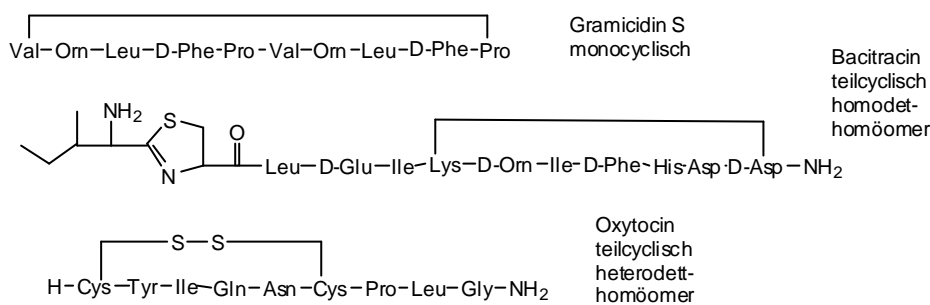
An der Bildung natürlich vorkommender Peptide und Proteine sind die 20 durch den genetischen Code programmierten *proteinogenen Aminosäuren* beteiligt. Die unterschiedlichen Reste R bedingen die Variabilität der Peptide und Proteine; bei einer Peptidkette aus 100 Aminosäuren ergeben sich bereits 20^{100} Möglichkeiten der Verknüpfung.

10.1.2 Nomenklatur

Nach der Zahl der Aminosäurebausteine werden Peptide als *Dipeptid*, *Tripeptid*, *Tetrapeptid*, *etc.* bezeichnet, kleinere Einheiten mit 2-10 Aminosäure-Einheiten als *Oligopeptide*, 10-100 Einheiten als *Polypeptide*, die Grenzen sind jedoch fließend. Daran schließen sich die Proteine an (Molmassen >10.000).

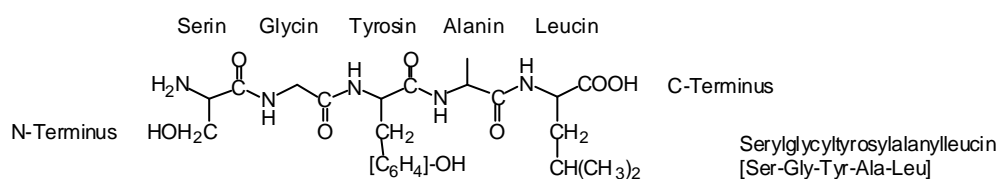
Peptide, die nur von Aminosäuren gebildet werden, heißen *homömere Peptide*. *Heteromere Peptide* sind aus Aminosäuren und Pseudoaminosäuren aufgebaut. Zu ihnen gehören z.B. die *Depsipeptide* (Kap. 18.), die alternierend amidartig und esterartig verknüpfte Aminosäuren und Hydroxycarbonsäuren enthalten. Cyclische Depsipeptide werden auch als *Peptolide* bezeichnet. Nach Art der Bindungen in den Peptiden werden außerdem *homodete* und *heterodete Peptide* unterschieden. Homodete Peptide enthalten nur Amidbindungen, heterodete Peptide daneben auch andere Bindungen, wie z.B. Disulfidbrücken.

Lineare Peptide sind unverzweigt, *verzweigt-kettige Peptide* können durch Reaktionen der Seitenketten gebildet werden. Innerhalb der *cyclischen Peptide* (Formel 10-2) unterscheidet man teils cyclische und mono-, bi- bis polycyclische Peptide, Peptide, deren Aminosäure-Ketten zum Ring geschlossen sind, oder solche, die über Disulfid-Brücken zum Ring geschlossen sind wie z.B. Insulin und Oxytocin (10.6.8). Häufig enthalten *Cyclopeptide* ungewöhnliche Aminosäuren, optische Antipoden der normalen proteinogenen L-Aminosäuren oder wie die Peptolide Hydroxycarbonsäuren. Von Mikroorganismen ausgeschiedene Cyclopeptide haben oft antibiotische Wirkung (Actinomycine, Gramicidine, Polymyxine, Tyrocidine, etc., Kap. 10.6.8). Viele Cyclopeptid-Alkaloide sind starke Gifte (Amanitin, Phalloidin, 10.6.6.4). Ein polycyclisches Peptid-Enzym ist die Ribonuclease S (Kap. 11.).



Formel 11-2. Beispiele zur Bezeichnung cyclischer Peptide.

Die Peptide werden fortlaufend nach ihren Aminosäurenkomponenten, beginnend bei der aminoterminalen (N-terminalen) Säure, benannt. Die Reihenfolge der Aminosäuren im Peptid heißt die *Sequenz*.



Synthetisch sind Polymere zugänglich, die nur aus einer oder wenigen Aminosäuren aufgebaut sind. Als *Homopolymere* bezeichnet man Polymere einer einzigen Aminosäure. *Copolymere* enthalten zwei oder mehrere polymere Grundbausteine.

11.2 Einteilung, Ampholytcharakter, Löslichkeit, Hydratation

11.2.1 Einteilung der Proteine

Proteine werden aufgrund ihrer Strukturtyps eingeteilt in die faserartigen *Skleroproteine* (10.7) und die kugelförmigen oder ellipsoiden *Sphäroproteine*. Skleroproteine sind als Gerüstsubstanzen im tierischen Organismus bekannt. Hierzu zählen die *Kollagene* (11.7.1) als Bestandteil des Stütz- und Bindegewebes. Das *Seidenfibroin* (10.7.4) ist die Gerüstsubstanz der Naturseide, nahe verwandt sind die β -*Keratine* (10.7.2), unlösliche Strukturproteine der Haare, Hufe, Horn, Schuppen, Federn, usw. Auch das *Fibrin* der Blutgerinnung (10.7.5) besitzt β -Keratinstruktur. Zu den Sphäroproteinen zählen die *Albumine* (), einfache Proteine, die in Körperflüssigkeit und Pflanzenbestandteilen vorkommen. Sie sind niedermolekular und meist gut kristallisierbar. Die sphärischen *Globuline* () sind höhermolekular und lassen sich in eine α -, β - und γ -Globulinfraktion auftrennen. Daneben unterscheidet man noch eine kleinere Gruppe von pflanzlichen Proteinen, die *Prolamine*, *Gluteline* und *Gliadine*, die zusammen das Eiweiß des Getreides bilden.

Sitzen am Protein noch artfremde Gruppen [prothetische Gruppen], so spricht man von zusammengesetzten oder *konjugierten Proteinen* oder *Proteiden*. Die *prothetische Gruppe* kann kovalent an die Seitenketten der Aminosäuren, heteropolar oder koordinativ gebunden sein. So enthalten z.B. enthalten *Chromoproteide* wie das Hämoglobin (), der Farbstoff der roten Blutkörperchen, einen Porphyrin-farbstoff als prothetische Gruppe. Zu den *Nucleoproteiden* zählen die stark basischen Protamine und die Histone. *Glykoproteide* sind zusammengesetzt aus Eiweißkomponente und einem Zucker, *Lipoproteide* bestehen aus einem Lipidderivat und einem Protein. Das *Proteom* ist die Gesamtheit der Proteine, die zu einem bestimmten Zeitpunkt in einem Organismus oder einer Zelle vorhanden sind. Es liefert zusätzliche Information über die Entwicklung des Organismus und das funktionale Zusammenspiel der Gene.

11.2.2 Ampholytcharakter, Löslichkeit und Hydratation

Die Ladung eines Proteins wird durch dessen Gehalt an sauren und basischen Gruppen und den p_H -Wert der Lösung bestimmt, die Iminogruppe $-NH-$ selbst neigt von p_H 0 bis p_H 14 nur geringfügig zur Ionisation und Protonierung. Proteine besitzen daher ebenso wie die Aminosäuren einen isoelektrischen Punkt pI , bei dem sie im elektrischen Feld nicht wandern und ihre Löslichkeit in Wasser am geringsten ist, und wirken als *Ampholyte*. Der isoelektrische Punkt der Proteine kann beträchtlich schwanken. Sie wirken wie die Aminosäuren als Puffer und lassen sich elektrophoretisch trennen.

Tabelle 11-2. Isoelektrischer Punkt [pI] einiger Proteine

Protein	pI
Thymohiston	10.8
Serumalbumin	4.7 - 4.9
γ_1 -Globulin (Mensch)	5.8

Fibrinogen	5.5 - 5.8
Keratin	3.7 - 5.0
Gelatine	4.7 - 5.0
Insulin	5.35
Pepsin	ca. 1.0

Die Proteine werden nach ihrer Löslichkeit in Albumine, Globuline und Histone eingeteilt (Tab. 10-3). Albumine sind leicht wasserlöslich, ihre Molmasse beträgt etwa 70.000. Globuline sind wasserunlöslich, gehen aber in verdünnten Salzlösungen, wie z.B. physiologischer Kochsalzlösung, und in verdünnten Säuren und Laugen in Lösung. Durch einen hohen Arginin-Gehalt reagieren Histone basisch und sind mit verdünnten Säuren extrahierbar; durch Alkohole werden sie ausgefällt. Sie finden sich an Nucleinsäuren gebunden vor allem in den Zellkernen der roten und weißen Blutkörperchen. Prolamine sind in Wasser und Alkohol unlöslich, jedoch löslich in 80 proz. Alkohol. Die Gluteline sind in verdünnten Laugen löslich.

Die Löslichkeit eines Proteins wird durch den p_H -Wert und die Salzkonzentration bestimmt. Die Löslichkeit globulärer Proteine erhöht sich mit steigender Salzkonzentration bis zu einem Optimum [*Einsalzeffekt*], bei weiterer Erhöhung der Salzkonzentration setzt die Löslichkeit wieder herab [*Aussalzeffekt*].

Die Polypeptidketten der Proteine sind in ihrer natürlichen wäßrigen Umgebung so angeordnet, dass die polaren Aminosäuren an der Oberfläche sitzen (vgl. Tertiärstruktur, Kap. 10.3.3). Die polaren Gruppen, darunter vor allem die ionogenen, treten in Wechselbeziehungen mit dem Wasser, wobei jede Aminosäure durchschnittlich 3 Moleküle Wasser bindet. Die inneren (hydrophoben) Aminosäuren sind im allgemeinen nicht hydratisiert (solvatisiert). Es bilden sich verschiedene Hydratschichten um das Proteinmolekül, deren Wasser unterschiedlich gebunden ist. Dieses gebundene Wasser unterscheidet sich in seinen thermodynamischen Eigenschaften von dem normalen "freien" Wasser der Umgebung. Die unterschiedliche Beweglichkeit des gebundenen und des "freien" Wassers läßt sich anhand der Relaxationszeiten NMR-spektroskopisch verfolgen. Man rechnet durchschnittlich mit einer Hydrathülle von 0.2 bis 0.6 g Wasser pro g Protein. Diese Hydrathülle bleibt auch im kristallinen Zustand erhalten. Durch hohe Salz- oder Wasserstoffionen-Konzentration wird die Hydrathülle teilweise abgebaut, da die Elektrolyte selbst Wasser binden. Es kommt zum Ausfällen der Proteine infolge Aggregation [*Aussalzeffekt*]. Auch die durch Ionenbeziehungen zusammengehaltenen Nucleoproteine enthalten nur wenig Wasser.

11.3 Strukturen der Polypeptide und Proteine

Bei den Polypeptiden und Proteinen werden mehrere Strukturebenen unterschieden. Unter *Primärstruktur* wird die Sequenz der Aminosäuren in der Peptidkette verstanden. Diese Definition schließt andere

kovalente Bindungen oder Wechselwirkungen als die Amidbindung aus. Die Mikrokonformation bestimmter Teile der Polypeptidkette wird als Sekundärstruktur bezeichnet. Die *Sekundärstruktur* ist die lokale räumliche Anordnung der Polypeptidhauptkette und beschreibt die geordneten Bereiche der Peptidkette, z.B. helikale, nichthelikale sowie Faltblattstrukturen. Die Definition erfaßt nicht die Konformationen der Seitenketten und Wechselwirkungen mit anderen Segmenten. Daneben können Peptide auch ungeordnet als statistisches Knäuel [*random coil*] vorliegen. Unter *Tertiärstruktur* wird die Makrokonformation der gesamten Polypeptidkette verstanden. Sie umfaßt die gesamte räumliche Anordnung unter Berücksichtigung der Seitenketten der Aminosäuren. Durch Bildung von Assoziaten aus mehreren Untereinheiten selbständiger Peptide kommt es zur Ausbildung der *Quartärstruktur* eines Proteins. Sie beschreibt die gegenseitige räumliche Anordnung dieser Untereinheiten zueinander.

11.3.1 Primärstruktur

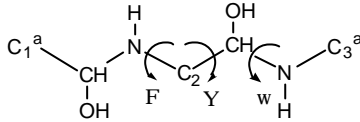
Die *Primärstruktur* beschreibt ausschließlich die Sequenz der Aminosäuren und wird durch Angabe der N- und C-terminalen Aminosäure eindeutig bestimmt. Die Reihenfolge der Aminosäuren steuert die Faltung der Peptidkette, die die korrekte, aktive Konformation ergibt. Für die Aufklärung der Primärstruktur eines Proteins [Sequenzanalyse] sind, abhängig von der Zusammensetzung, folgende Schritte erforderlich:

1. Isolierung eines homogenen Proteins mit anschließender Molmassenbestimmung und Aminosäureanalyse.
2. Gegebenenfalls ist die Spaltung in Einzelketten und deren Isolierung erforderlich, die Reduktion von Disulfidbrücken, Blockierung der Mercaptogruppen mit nachfolgender neuerlicher Aminosäureanalyse und Endgruppenbestimmung.
3. Selektive Spaltung der Ketten, Isolierung der Fragmente mit anschließender Aminosäureanalyse, Endgruppenbestimmung und abschließender Sequenzbestimmung.

11.3.2 Sekundärstruktur

Die *Sekundärstruktur* beschreibt die sterische Anordnung der Aminosäuren in der Peptidkette und ist aufgrund des partiellen Doppelbindungscharakters der planaren CO–NH-Bindung letztendlich eine Folge der Primärstruktur. Die C^α–C- und die N–C^α-Bindung hingegen können im wesentlichen frei um ihre Achse rotieren, und diese Drehbarkeit ermöglicht eine Vielzahl von Konformationen einer Peptidkette. Bei einem Protein mit 170 Aminosäuren sind damit Konformationen in der Größenordnung von 10⁸⁰ möglich. Der Rotationswinkel um die C^α–C-Bindung wird mit als Torsionswinkel N–C–C–N mit Ψ , der

um die N–C^α-Bindung mit Φ und der um die N–CO-Bindung mit ω bezeichnet. Ψ und ω sind 0, wenn die beiden planaren Amidgruppen in einer Ebene liegen.



Aus sterischen Gründen ist nicht jede beliebige Konformation und Winkeleinstellung erlaubt, es gibt vielmehr energetisch bevorzugte Konformationen. Darüberhinaus können durch nichtkovalente Bindungen, insbesondere Wasserstoffbrücken, bestimmte Anordnungen stabilisiert werden.

Aus Röntgenuntersuchungen und Modellbetrachtungen entwickelten L. PAULING und E.J. COREY das *Faltblatt* und die *Helix* als geordnete Sekundärstrukturen mit maximaler Stabilisierung durch Wasserstoffbrücken. In manchen Proteinen liegen etwa 75 % der Aminosäuren in Form einer dieser Sekundärstrukturen vor.

RAMACHANDRAN *et al.* haben alle möglichen Konformationen eines Peptids durchgerechnet. Diese RAMACHANDRAN-Diagramme (Abb. 10-1), die durch Auftragen von Φ gegen Ψ erhalten werden, lassen Bereiche erkennen, in denen unter Berücksichtigung noch tolerierbarer Abstände zwischen nicht miteinander verbundenen Atomen sich die wichtigsten geordneten Strukturen befinden.

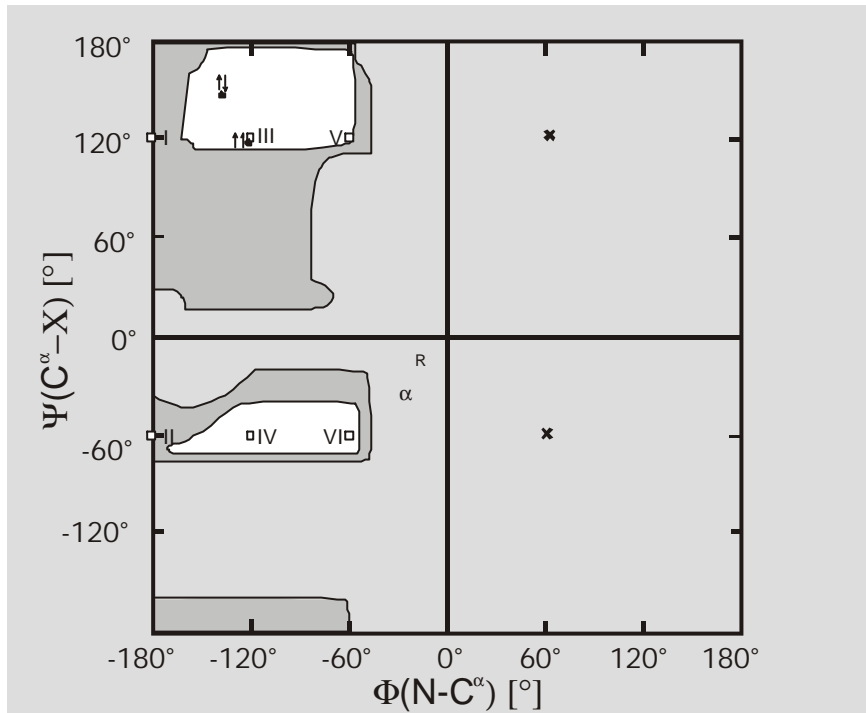


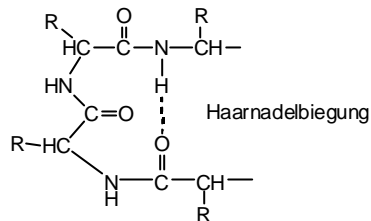
Abb. 10-1. RAMACHANDRAN- ϕ,ψ -Diagramm (nach EDSALL, FLORY, KENDREW, LIQUORI, NEMETHY, RAMACHANDRAN und SCHERAGA).

Aufgrund ihrer Struktur werden Proteine in globuläre (kugelförmige) und fibrilläre (fadenförmige) eingeteilt. Bei globulären Proteinen werden vor allem α -Helixstruktur und Faltblattstruktur gefunden. In ihrer reinen Form treten die Sekundärstrukturen nur bei den fibrillären Proteinen auf, deren wichtigste Vertreter die Skleroproteine (Kap. 11.7) sind. Tab.11-5 informiert über die vorherrschenden Sekundärstrukturen einiger globulärer Proteine.

Tabelle 11-5. Vorherrschende Sekundärstrukturen einiger globulärer Proteine (nach SCHULZ)

Sekundärstruktur	Proteine
Überwiegend α -Helix	Myoglobin, Hämoglobine, Hämerythrin, Bacteriorhodopsin
Überwiegend antiparalleles Faltblatt	Immunoglobulin, Superoxid-Dismutase, Concanavalin, Präalbumin, Chymotrypsin, Bacteriochlorophyll-Protein
Zentrales, meist paralleles Faltblatt mit umgebenden Helices	Malat-Dehydrogenase, Lactat-Dehydrogenase, Adenylat-Kinase, Phosphoglycerat-Kinase, Triosephosphat-Isomerase, Carboxypeptidase, Enzyme der Glycolyse
Keine Bevorzugung bestimmter Sekundärstrukturen	Ribonucleasen, Lysozym, Ferredoxin

Nur eine einzige Wasserstoffbrücke wird von der *Haarnadelbiegung* gebildet, wodurch Knickstellen – meist an der Oberfläche der Proteine – entstehen.



Vollständige Analysen der räumlichen Struktur sind ausschließlich röntgenographisch an kristallinen Proteinen möglich. Relativ genaue Hinweise auf das Vorliegen bestimmter Sekundärstrukturen in gelösten Proteinen lassen sich jedoch auch durch chiroptische Methoden gewinnen. Große Anstrengungen werden zur Zeit unternommen, mit Hilfe statistischer Methoden in Computerprogrammen aus der Kenntnis der Aminosäuresequenz bzw. der jeweiligen benachbarten Aminosäuren die Sekundärstruktur vorauszusagen. Diese und durch Hinzuziehen weiterer physikalischer Daten verbesserter Methoden haben sich jedoch nur als relativ treffsicher bei der Voraussage von Helixstrukturen erwiesen.

11.3.2.1 Falblattstrukturen

Bei der *Faltblattstruktur* [*pleated sheet*, β -Konformation, Abb. 11-2] werden die Polypeptidketten durch senkrecht zu den Ketten stehende Wasserstoffbrücken zusammengehalten, die Winkel Φ und Ψ besitzen entgegengesetzte Vorzeichen (Tab.10-4). Die aus der Falblattebene herausragenden lipophilen Reste R üben zusätzlich eine Anziehungskraft aufeinander aus. Bemerkenswert ist die Tatsache, dass solche Aminosäuren bevorzugt Falblattstrukturen ausbilden, die eine geringe Tendenz zur Helixbildung zeigen (Gly, Ser, Asp). Die Strukturen können innerhalb einer Kette oder auch zwischen verschiedenen Polypeptidketten ausgebildet werden.

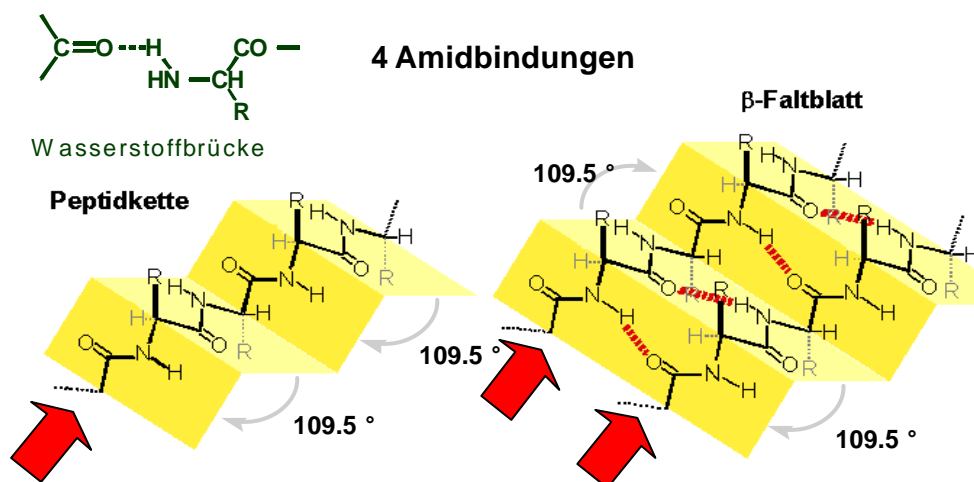


Abb. 11-2. β -Faltblattstruktur von Proteinen, Strangrichtung, Wasserstoffbrücken und Bindungswinkel.

Die Ketten können parallel oder antiparallel nebeneinander angeordnet sein (Abb.11-3). Faltblattstrukturen sind im allgemeinen nicht flach, sondern rechtsgängig verdrillt.

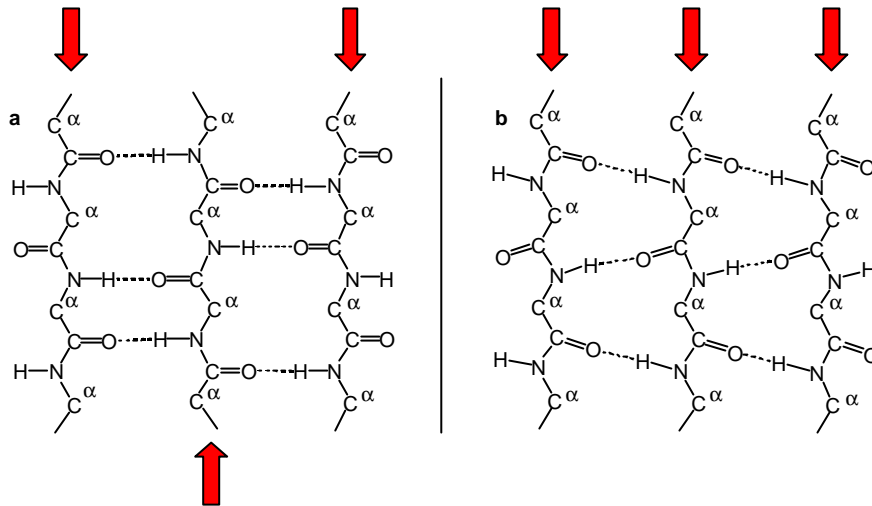


Abb. 11-3. Antiparallele (a) und parallele (b) Faltblattstruktur (nach PAULING und COREY).

11.3.2.2 Helixstrukturen

Die Spiralstruktur der *Helix* kommt dadurch zustande, dass die Winkel F und Y das gleiche Vorzeichen und für jedes C^α -Atom bei einem Helixtyp jeweils den gleichen Wert besitzen.

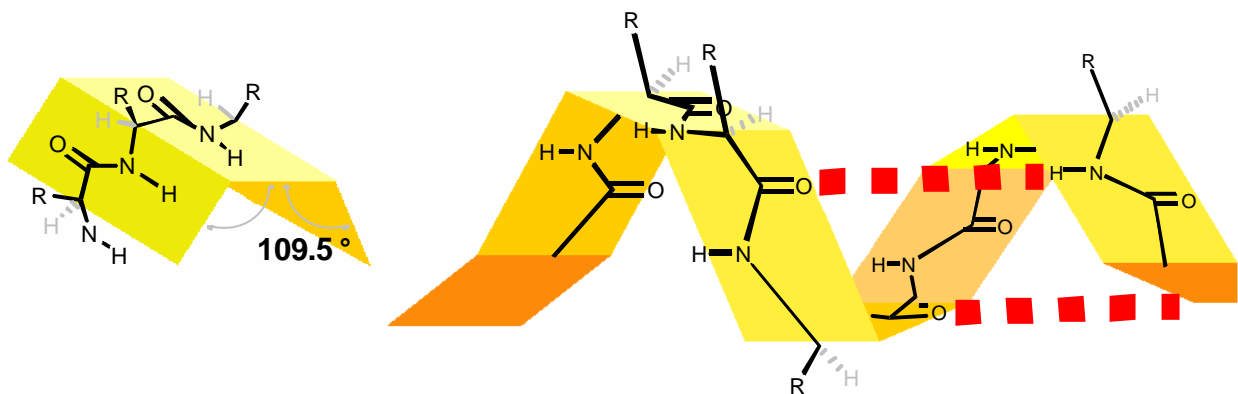


Abb. 11- .

Eine Helix wird durch die Zahl n_r charakterisiert, wobei n die Zahl der Aminosäureeinheiten pro Spiralengang und r die Anzahl der Atome des durch die Wasserstoffbrücke gebildeten Ringes ist. Die intrachainaren Wasserstoffbrücken werden z.B. zwischen der 1. und 3. [3,0₁₀-Helix], 1. und 4. [3,6₁₃-Helix] oder 1. und 5. Peptidbindung [4,4₆-Helix] ausgebildet. Die Höhe h der Spirale pro Windung ergibt sich aus $n \cdot d$, dem Anstieg der Spirale pro Aminosäurerest. Diese Steighöhe pro Windung beträgt bei der 3,6₁₃-Helix 0.54 nm.

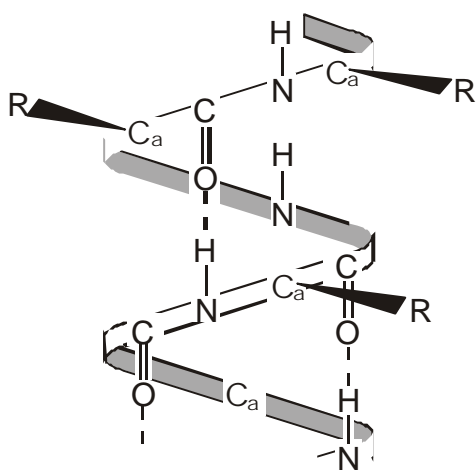
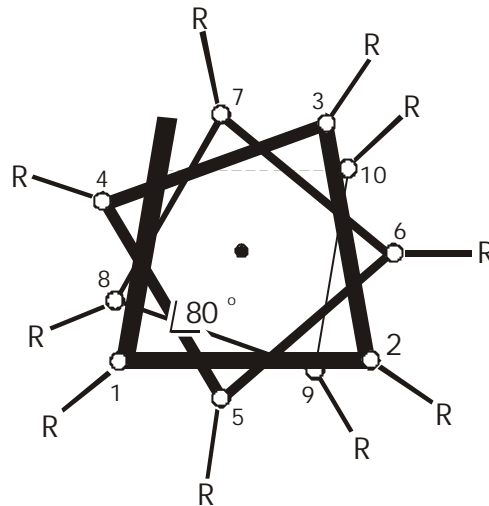


Abb. 11-4. a) Rechtsgängige Helix.



b) Aufsicht auf eine linksgängige α -Helix.

○ C $^{\alpha}$ -Atome, die Striche zwischen ihnen stellen die Peptidbindung dar;

R Seitenketten; \geq Achse der Spirale

Eine Helix kann sowohl von Peptiden aus L- oder von solchen aus D-Aminosäuren gebildet werden, nicht dagegen von Peptiden, die sowohl D- und L-Aminosäuren enthalten. Die Seitenketten R der Aminosäuren stehen radial zur Achse der Schraube. Eine Helix kann rechts- oder linksgängig sein, Parameter der α -Helix sind in Tab. 11-4 angegeben. Am verbreitetsten ist die linksgängige α -Helix.

Die α -Helix ist die energetisch-stabilste Sekundärstruktur, wie von PAULING und COREY postuliert wurde. Die *linksgängige* α -Helix dreht aufwärts im Uhrzeigersinn, beendet nach jeweils 3.6 Aminosäure-Einheiten eine Windung und besitzt eine "Ganghöhe" von 5.4 Å. Rechts- und Linksschraube sind zueinander Enantiomere. Eine vom Beobachter weg rechtsgängige Helix wird nach CAHN-INGOLD-PRELOG als *P-Helix* (*P* für Plus) bezeichnet und besitzt *P*-Konfiguration, die vom Beobachter weg linksgängige Helixschraube entsprechend als *M-Helix* (*M* für Minus) mit *M*-Konfiguration.

Die Tendenz zur α -Helixbildung hängt wesentlich von der Aminosäuren-Zusammensetzung und - Sequenz ab. Nach SCHERAGA lassen sich Aminosäuren in

helixbildende (Val, Gln, Ile, Ala, Trp, Met, Leu, Glu),

indifferente (Lys, Tyr, Asp, Thr, Arg, Cys, Phe) und

helixbrechende Aminosäuren (Gly, Ser, Pro, Asn)

einteilen. Eine Sonderstellung sowohl in der α -Helix- als auch der Faltblattstruktur nehmen Prolin und Hydroxyprolin ein, die als sekundäre Amine Abweichungen von der Idealkonformation induzieren und die Helix-Struktur durch einen Knick in der Peptidkette unterbrechen. Die Tendenz zur Helizität läßt sich am besten an Polyaminosäuren, die nur aus einer Aminosäure bestehen, studieren. Polyalanin bildet bei $p_H = 7$ in wäßriger Lösung spontan eine Helix aus, bei Polylysin entstehen hingegen Zufallsstrukturen, die erst bei $p_H = 12$, wenn die Seitenketten ungeladen sind, spontan Helixbildung geben. Aus Polyisoleucin entsteht aufgrund sterischer Hinderung keine Helix, ebenso nicht aus Polyprolin. Unter der Peptiden besitzen Myosin 90 %, Hämoglobin 60 % und Albumin und Serumprotein 40 % helikale Anordnung.

In den fibrillären Proteinen der Kollagengruppe sind die Polypeptidketten in Form einer *Tripelhelix* angeordnet. Damit zeigen Kollagene ein charakteristisches Röntgenbeugungsmuster, eine Helix aus drei Polypeptidsträngen nach Art eines Seiles verdrillt (γ -Struktur nach RICK und CRICK). Dieser Helixtyp gehört wie die Doppelhelices der Nucleinsäuren zu den mehrsträngigen oder Superhelices. Bei der Tripelhelix winden sich drei linksgängige Polypeptidketten um eine gemeinsame Achse und bilden eine rechtsgängige *Superhelix* (Abb. 10-5). Die Tripelhelix ähnelt ihren Parametern der Polyprolin-Helix (vgl. Tab. 10-4). Wie bei der einsträngigen Helix ragen die Seitenketten der Aminosäuren der Tripelhelix nach außen. Aus Abb. 11-5 ist außerdem ersichtlich, dass für die Aminosäure im Inneren der Tripelhelix (jede 3. Position der Kollagen-Tripelhelix) kein Platz für Seitenketten ist. Diese Position muß also von Glycin (R = H) eingenommen werden. Entsprechend enthält auch das Kollagen ca. 33 % Glycin.

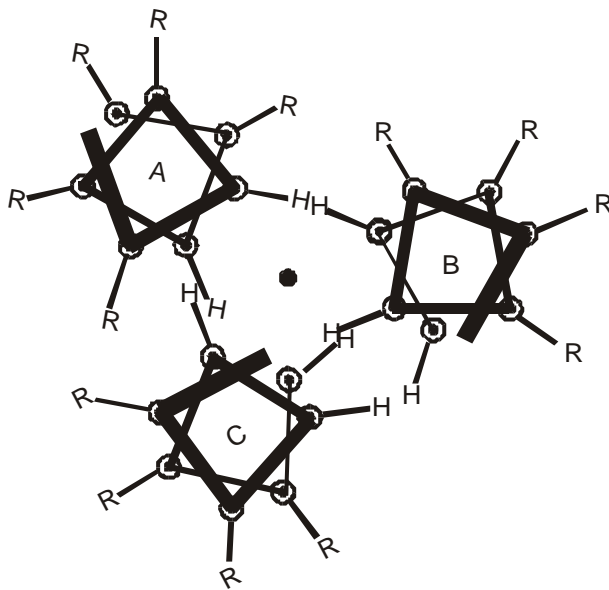


Abb. 11-5. Aufsicht auf eine Tripelhelix (Kollagen). \bullet zentrale Achse der Tripelhelix; A, B, C Achsen der Einzelhelices; \circ C^α -Atome, die Striche zwischen ihnen stellen die Peptidbindungen dar; R Seitenketten der Aminosäuren, H für Glycin

11.3.3 Tertiärstruktur

Die native, biologisch aktive dreidimensionale Struktur und Anordnung einer Peptidkette im Raum bezeichnet man als *Tertiärstruktur*. Nur durch die Ausbildung einer spezifischen Raumstruktur erreicht die Natur die hohe Präzision, mit der unterschiedliche biologische Funktionen der Proteine ablaufen. Daher ist für das Verständnis der Proteinwirkungsweise neben der Kenntnis der Primär- und Sekundärstruktur auch die der Tertiärstruktur von zentraler Bedeutung. Nach thermodynamischen Überlegungen soll die dreidimensionale Struktur eines nativen globulären Proteins im physiologischen Milieu die Konformation des gesamten Systems mit der niedrigsten Freien Energie sein [ANFINSEN]. Die durch Faltung der Peptidkette gebildete dreidimensionale Struktur eines Proteins wird von der Summe der Wechselwirkungen der Aminosäurereste determiniert. Damit charakterisiert die Primärstruktur die Tertiärstruktur vor allem durch Zwänge der Freiheiten der Drehung, die rigide planare Struktur der Peptidbindung, die erlaubten Winkel der C^α -C- und C^α -N-Bindungen aufeinander folgender Reste. Als stabilisierende Faktoren gibt es:

- H-Brücken zwischen Peptidgruppen wie für die Sekundärstruktur,
- H-Brücken zwischen den Seitenketten der Aminosäuren,
- Dipolkräfte zwischen polaren Gruppen und positiven und negativen Ionengruppen wie CO_2^- - und NH_3^+ und
- VAN-DER-WAALS-Kräfte zwischen den unpolaren Seitenketten und hydrophobe Wechselwirkungen

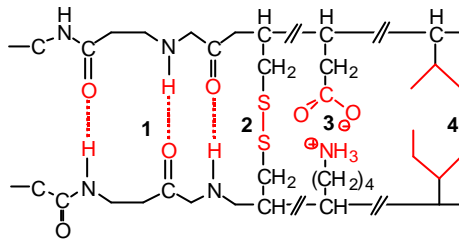


Abb. 11-6. Tertiärstruktur mit Wechselwirkungen zwischen Peptidketten: **1** Wasserstoffbrücke, **2** Disulfidbindung zwischen Cysteinresten, **3** Ionenbeziehung zwischen Asparagin- und Lysin-Seitenkette, **4** hydrophobe Wechselwirkung zwischen einem Valin- und Isoleucinrest.

Nach ihrer äußeren Gestalt lassen sich die Proteine in fibrilläre (faserförmige) und globuläre (kugel- oder ellipsoidförmige) Proteine aufteilen. Die fibrillären Proteine weisen einen hohen und meist einheitlichen Ordnungsgrad auf, sind dadurch meist schwer löslich und dienen vor allem im tierischen Organismus als Strukturbildner. Die meisten Proteine, darunter alle Enzyme, gehören hingegen zu den globulären Proteinen. Während Faserproteine relativ einfache Strukturen besitzen, sind globuläre Proteine weit komplizierter aufgebaut. Mit Kernresonanzspektroskopie und Röntgenstrukturdaten wird die Tertiärstruktur von Polypeptidketten aufgeklärt. Die Analyse globulärer Proteine ist jedoch schwieriger als die der Faserproteine. Früher wurde aus physikalischen Parametern wie der Viskosität, der Sedimentationsgeschwindigkeit und der Diffusion auf die Gestalt globulärer Proteine geschlossen. Ein wichtige Methode zur Bestimmung der Figur von Proteinen ist die Methode der Molekular-Relaxation nach elektrischer Polarisierung oder die Bestimmung der Änderung optischer Eigenschaften wie z.B. der Doppelbrechung in strömendem Medium. Sehr gute Aussagen erhält man auch durch die Elektronenmikroskopie oder durch Licht- oder Röntgenbeugung.

Die Polypeptidketten der globulären Proteine werden sich in wässriger Lösung so anordnen, dass möglichst viel Wechselbeziehungen zwischen den hydrophoben Aminosäureresten eingegangen werden können. Die großen apolaren Gruppen der Aminosäuren Valin, Leucin, Isoleucin, Prolin und Phenylalanin werden sich also bevorzugt im Inneren des Moleküls, die polaren Gruppen aber außen anordnen. Bei den meisten globulären Proteinen haben etwa 40 % der Aminosäurereste hydrophobe Seitenketten. Bei den globulären Proteinen erfolgt also zunächst eine intramolekulare Stabilisierung durch Faltung der Peptidkette. Wegen der heterogenen Aminosäuresequenz können Abschnitte mit geordneten Strukturen [Supersekundärstrukturen] und solche mit ungeordneten Strukturen abwechseln.

Das erste globuläre Protein, das in seiner Struktur durch Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt wurde, war das Myoglobin [PERUTZ und KENDREW, 1959]. Myoglobin enthält 8 Helixbereiche, die mit Großbuchstaben (A - H, Abb. 10-7) bezeichnet werden. Eine bestimmte Aminosäure in diesem Bereich wird mit einem Index angegeben, z.B. His F8 als Ligand der prosthetischen Gruppe. Die einzelnen Helixbereiche werden entweder durch einen Knick an einer Aminosäure oder durch nichthelikale Bereiche abgetrennt. Die prosthetische Porphin-Gruppe ist zwischen zwei Helixbereichen eingebaut (E und F). In diese "Hämtasche" ragen besonders viel hydrophobe Aminosäurereste. Einzelne, kürzere Helixbereiche entsprechen in ihren Parametern nicht mehr denen einer reinen α -Helix. In anderen globulären Proteinen wie z.B. den Immunoglobulinen finden sich da gegen kaum helikale Bereiche.

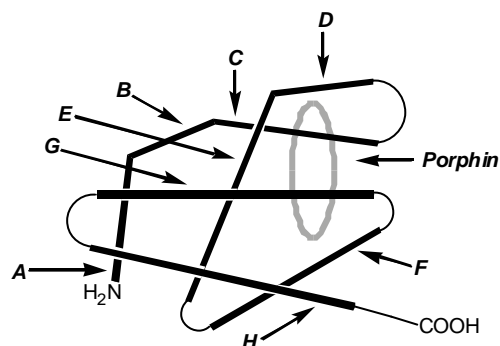


Abb. 11-7. Schematische Darstellung der Tertiärstruktur des Myoglobin mit helikalen (fett) und nichthelikalen Abschnitten und Bezeichnung der helikalen Bereiche.

Ein sehr gut mit Röntgenstrukturanalyse untersuchtes Protein ist die Carboxypeptidase A, ein Zn-haltiges Metalloprotein. Charakteristisch für dieses globuläre Protein ist, daß Helixstrukturen an der Oberfläche und ein größeres Faltblatt aus 8 Elementen im Inneren des Moleküls ausgebildet werden. Auch andere Enzyme wie Lysozym oder Ribonuclease enthalten solche Faltblattstrukturen.

Bei größeren Proteinen mit Ketten aus mehr als 150 Aminosäuren kann es innerhalb der Ketten noch zur Ausbildung von Domänen kommen. Darunter versteht man bestimmte Bereiche innerhalb der Peptidkette mit autonomer Sekundärstruktur und spezifischen Funktionen (vgl. Immunoglobuline, 10.6.2).

11.3.4 Quartärstruktur

Manche globulären Proteine sind oligomer und bestehen aus zwei oder mehr getrennten Untereinheiten [*subunits*], das bedeutet, die native Konformation eines globulären Proteins kann sich weiter durch Zusammenlagern mehrerer Moleküle sowie Metallionen oder prosthetische Gruppen stabilisieren. Die

Assoziation unter Ausbildung der *Quartärstruktur* kann durch Zusammenlagerung von gleichen oder aber in ihrer Größe bzw. Funktion verschiedenen Proteinmolekülen eintreten. Proteine mit ungleichen Untereinheiten werden als *heteropolymere*, solche aus gleichen, meist geradzahligen Untereinheiten als *homopolymere Proteine* bezeichnet. Dazu gehören vor allem die allosterischen Enzyme, daneben aber auch verschiedene aus Haptomer- und Effektoomerprotein bestehende Toxine (vgl. 11.6.3). Hämoglobin war das erste Protein, dessen komplette Tertiär- und Quartärstruktur exakt aufgeklärt wurde [].

Im allgemeinen bestehen alle Proteine mit einer Molmasse über 100.000 aus mehreren Untereinheiten, deren Anzahl zwischen 2 und über 2.000 (z.B. Tabakmosaikvirus-Protein: 2.130) schwanken kann. Durch geeignete Dissoziationsbedingungen läßt sich häufig die Quartärstruktur ohne Zerstörung der Tertiärstruktur abbauen.

Die isolierten Untereinheiten sind meist biologisch inaktiv, können aber durch Rekombination meist wieder spontan zur biologisch aktiven Quartärstruktur assoziieren. Es sind zahlreiche Beispiele bekannt, dass auch Untereinheiten verschiedenener Oligomere zu biologisch aktiven *Hybriden* vereinigt werden können (vgl. Enzymchimäre, 11.).

11.4 Denaturierung, Spaltung der Peptidbindung

11.4.1 Denaturierung

Unter *Denaturierung* versteht man den reversiblen oder irreversiblen Abbau der nativen Struktur eines Proteins, also vor allem der Tertiär- und Quartärstruktur. Bei *irreversiblen Abbau* erfolgt oftmals auch der der Sekundärstruktur. Denaturierung ist an einer Veränderung der biologischen Aktivität, der optischen Eigenschaften, der Löslichkeit (Koagulation) sowie des hydrodynamischen Verhaltens erkennbar. Sie kann physikalisch durch Erhitzen oder chemisch durch Änderung des pH-Wertes, Zusatz von organischen Lösungsmitteln, Zugabe von Harnstoff, Guanidin oder Detergenzien erfolgen (z.B. Natriumdodecylsulfat SDS, Cetyltrimethylammoniumbromid CTAB, oder nichtionische Polyoxyethylenether POE). Bei der *reversiblen Denaturierung* werden nicht-kovalente Bindungen gelöst, bei der *irreversiblen Denaturierung* zusätzlich auch kovalente Bindungen wie Disulfidbrücken. Durch die Lösung nicht-kovalenter Bindungen denaturieren globuläre Proteine mehr oder weniger zu ungefalteten Zufalls-Konformationen [*random coil*-Struktur]. Manche können jedoch ihre ursprüngliche native Konformation wieder zurückgewinnen, da die Tertiärstruktur die thermodynamisch stabilste Konformation darstellt. Die Aufspaltung aller Disulfidbrücken bedingt die Zerstörung der Tertiärstruktur. Doch selbst nach totaler Denaturierung besitzt die Kette aufgrund ihrer Sequenz noch immer die

Information der originären Tertiärstruktur, als Folge können selbst bei der Oxidation mehrerer möglicher Mercaptogruppen zu Disulfidbrücken auch immer die "richtigen" oxidiert werden.

Proteine als *Molekularchaperons* ["Protein-Anstandsdamen"] helfen, am Ribosom neusynthetisierte Polypeptidketten in die biologisch funktionelle Konformation zu bringen. Das am besten untersuchte Chaperon-System ist das GroE-System der Prokaryonten. Das Tetradecamer GroEL bindet an die ungefaltete Proteinkette und bewirkt ordnungsgemäßes Falten des Peptid-Substrats. Als Hilfsagenzien dienen ATP, Mg^{2+} - und K^+ -Ionen und in manchen Fällen ein Co-Chaperon wie z.B. das Heptamer GroES.

Durch Aggregation der denaturierten Proteinmoleküle kann Hitzekoagulation irreversibel werden, z.B. kann das Erhitzen bestimmter wasserlöslicher Eiweißstoffe unlösliche Derivate ergeben. Der bei der reversiblen Denaturierung globulärer Proteine auftretende Phasenübergang von einer geordneten in eine weniger geordnete Struktur läßt sich durch Verfolgen spektroskopischer Parameter, sowie der Viskosität, der spezifischen Wärme oder anderer physikalischer Parameter beobachten.

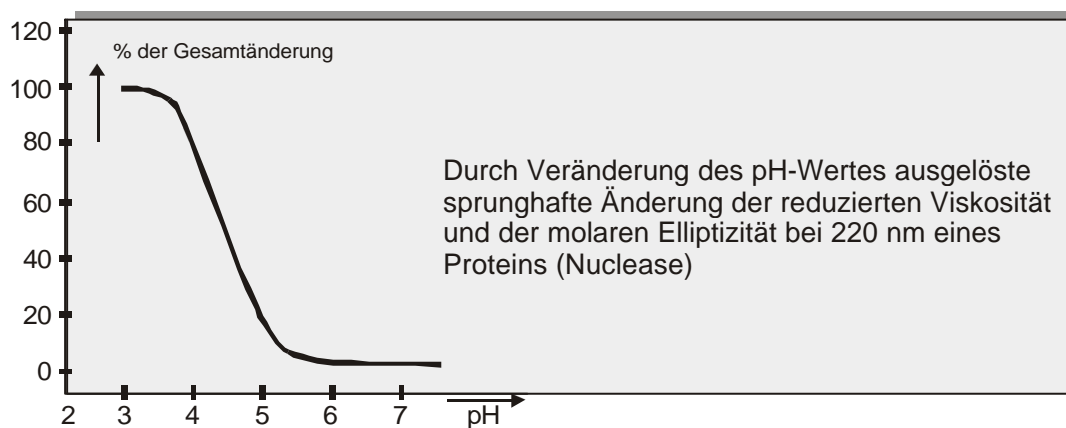


Abb. 11-8. Veränderung der Viskosität und Elliptizität der Nuclease (nach SCHLECHTER, EPSTEIN und ANFINSEN)

11.4.2 Spaltung der Peptidbindung

11.4.2.1 Nicht-enzymatische Methoden

Die Amidgruppe ist gegenüber Alkali relativ stabil, längeres Erhitzen z.B. mit $Ba(OH)_2$ -Lösung im Autoklaven führt jedoch zu vollständig racemisierten Aminosäuren. Wesentlich größere Bedeutung besitzt die *säurekatalysierte Hydrolyse*. Die einzelnen Peptidbindungen unterscheiden sich etwas hinsichtlich ihrer Stabilität in Abhängigkeit der Reste R der beteiligten Aminosäuren. Zuerst werden

Bindungen gespalten, an denen Asparaginsäure, Asparagin, Serin oder Threonin beteiligt sind, am schwersten lassen sich dagegen die Amidbindungen von Isoleucin, Leucin oder Valin spalten. Daher läßt sich säurekatalysierte Hydrolyse partiell, wenn auch recht unspezifisch durchführen. Man kann die Bedingungen jedoch so auswählen, dass hauptsächlich Oligopeptidbruchstücke entstehen. Bei säurekatalysierter Hydrolyse von Proteinen wird Tryptophan meist zerstört, eine *Totalhydrolyse* läßt sich mit halbkonz. Salzsäure bei 105 °C erreichen.

Für eine selektive hydrolytische Spaltung der Peptide wurden spezielle Methoden entwickelt (Abb. 10-9). So wird durch Bromcyan BrCN im sauren Milieu bei Raumtemperatur die Peptidbindung spezifisch hinter Methionin spezifisch gespalten (Formel 10-3). Bei höherer Temperatur reagiert in ähnlicher Weise auch Iodacetamid ICH₂CONH₂. Durch oxidative Bromierung mittels N-Bromsuccinimid [NBS] lassen sich Peptidbindungen hinter Tryptophan und deutlich langsamer hinter Tyrosin und Histidin spalten. Primär erfolgt der elektrophile Angriff des Broms am Indol, anschließend erfolgt auch hier die Hydrolyse über eine durch Cyclisierung entstandene Iminoverbindung.

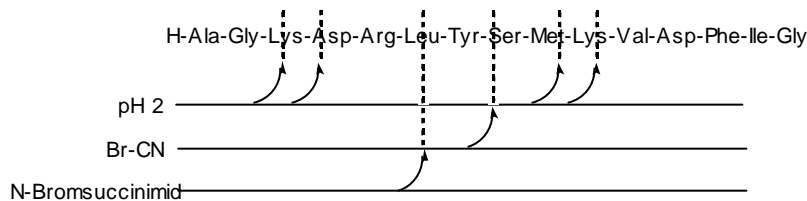


Abb. 11-9. Beispiele für selektive hydrolytische Spaltungen eines Polypeptids.

11.4.2.2 Enzymatische Spaltungen

Proteasen [*Peptidasen*] sind hydrolytisch wirkende Enzyme, die enzymatische Spaltung der Peptidbindungen kann entweder vom Ende der Kette [*Exopeptidasen*, N-terminales Ende mit *Aminopeptidasen*, C-terminales Ende mit *Carboxypeptidasen*] oder selektiv im Inneren des Peptids [*Endopeptidasen*] erfolgen. Die Exopeptidasen haben Bedeutung für die schrittweise Spaltung eines Peptids, der Abbau durch Endopeptidasen führt zu Bruchstücken. Pepsin, Papain und Subtilisin sind relativ unspezifische Endopeptidasen, zum selektiven Abbau der Proteine dienen vor allem Trypsin, Chymotrypsin sowie das bakterielle Thermolysin.

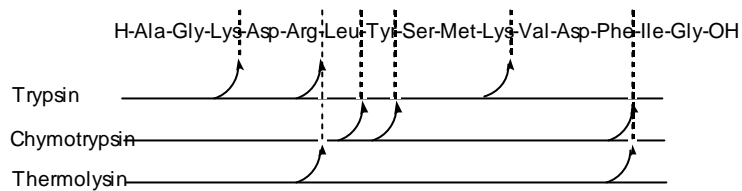


Abb. 11-10. Beispiele für selektive enzymatische Spaltungen eines Polypeptids.

Trypsin (aus Schweinepankreas) spaltet C-terminal ausschließlich nach den basischen Aminosäuren Lysin und Arginin, während durch Chymotrypsin vorzugsweise die Peptidbindungen nach den aromatischen Aminosäuren Tyrosin, Tryptophan und Phenylalanin, daneben aber auch nach Leucin und anderen Aminosäuren gespalten werden. Thermolysin spaltet die Amidbindungen von Leucin und Isoleucin.

11.5 Strukturaufklärung von Peptiden und Proteinen

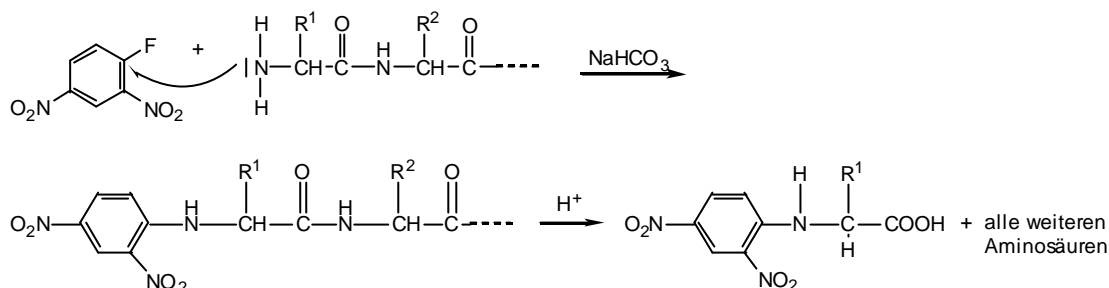
Wegen des komplexen Aufbaus der Proteine sind die Methoden, die zu ihrer *Strukturaufklärung* führen, unterschiedlich. Üblicherweise wird die Strukturaufklärung in drei Stufen durchgeführt: Zunächst erfolgt die Reindarstellung des Peptids oder Proteins, anschließend wird die Aminosäuresequenz durch proteinchemische Untersuchungen oder massenspektrometrisch bestimmt. Auf physikochemischem Weg wird seine Sekundärstruktur ermittelt, und schließlich die Tertiärstruktur und gegebenenfalls die Quartärstruktur bestimmt, bei der vor allem physikalische Methoden angewendet werden.

11.5.1 Sequenzanalyse von Peptiden - Primärstruktur

Die direkte *Sequenzanalyse* oder *Sequenzierung* eines Proteins bedeutet die Ermittlung der Primärstruktur, also der Sequenz der einzelnen Aminosäure-Bausteine in der Polypeptidkette. Die erste vollständige Aufklärung der Primärstruktur eines Proteins gelang F. SANGER [1953], der nach 10jähriger Arbeit mit Hilfe der DNP-Methode [11.5.2.1] die Primärstruktur des Rinderinsulins angeben konnte. Die Sequenzanalyse erfolgt durch wiederholte Endgruppenbestimmung der bei der Hydrolyse anfallenden Oligopeptide, deren Sequenzen sich gegenseitig überlappten. Die Gesamtsequenz ergibt sich durch mosaikartiges Zusammensetzen der erhaltenen Informationen.

10.5.1.1 Identifizierung der N-terminalen Aminosäure

Zur Identifizierung der *N-terminalen Aminosäure* setzt man deren nucleophile α -ständige Aminogruppe zu leicht identifizierbaren Arylderivaten um. Bei der von SANGER [1945] entwickelten *Dinitrophenyl-Methode* [DNP-Methode] wird die endständige Aminosäure mit 2,4-Dinitrofluorbenzol unter milden Bedingungen in einer nucleophilen, aromatischen Substitutionsreaktion in das entsprechende DNP-Derivat überführt. Letzteres ist etherlöslich und kann nach vollständiger Hydrolyse des Peptids aufgrund der gelben Farbe detektiert und chromatographisch identifiziert werden. Dabei werden natürlich auch Derivate von Diaminocarbonsäuren gebildet, die gleichzeitig abgetrennt und identifiziert werden.

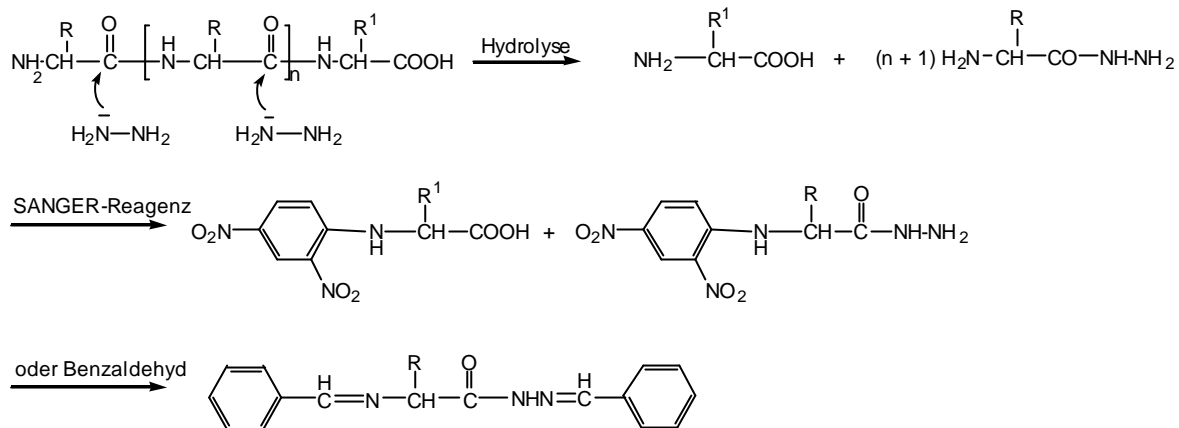


Formel 11-5. DNP-Methode nach SANGER.

Eine gegenüber der SANGER-Methode erhöhte Empfindlichkeit bei der Detektion kann mit der *Dansyl-Methode* [GRAY und HARTLEY, 1963] erreicht werden. Umsetzung des Peptids mit Dansylchlorid [1-Dimethylaminonaphthalin-5-sulfonylchlorid] und anschließende Hydrolyse der Peptidgruppen führt zu Dansyl-Aminosäuren, die bereits in geringsten Konzentrationen fluoreszieren. Ähnlich ist die Umsetzung mit Dabsylchlorid [Dimethylaminoazobenzolsulfonylchlorid] oder mit 9-Fluorenylmethylchloroformiat zu Fluorenaminosäurederivaten [FMOC], die Derivate zur sensitiven Fluoreszenz- oder UV-Detektion von Aminosäuren ergeben (Strukturen und Formeln vgl. 9.3.1).

11.5.1.2 Bestimmung der C-terminalen Aminosäure

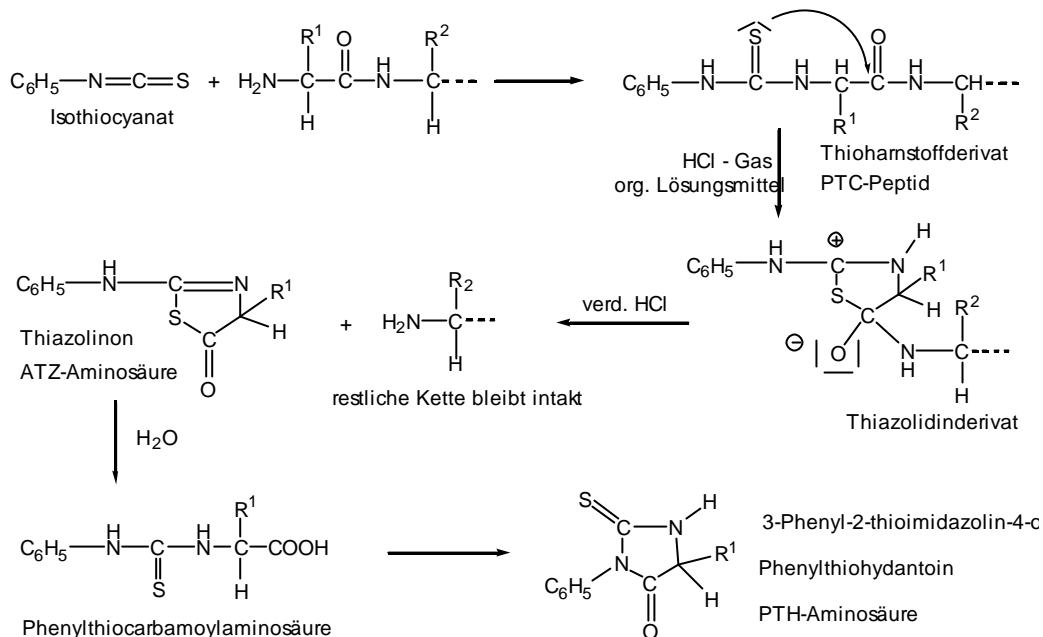
Das wichtigste chemische Verfahren zur Bestimmung der C-terminalen Endgruppe ist die Umsetzung mit wasserfreiem Hydrazin nach AKABORI. Alle Amidbindungen in der Kette werden zu Säurehydraziden gespalten, allein die freie Carboxylgruppe der C-terminalen Aminosäure reagiert wegen Salzbildung nicht mit Hydrazin und bleibt als freie Aminosäure erhalten. Die abschließende Behandlung mit SANGER-Reagenz gibt eine DNP-Aminosäure und sonst DNP-Aminosäurehydrazide, die sich aufgrund unterschiedlicher Ätherlöslichkeiten trennen lassen. Durch Umsetzung mit Benzaldehyd können die Säurehydrazide auch als SCHIFFSche Basen abgetrennt werden.



Formel 11-6. Bestimmung der C-terminalen Aminosäure nach AKABORI

10.5.1.3 Direkte Sequenzanalyse - EDMANN-Verfahren

1950 veröffentlichte PEHR EDMAN das Grundprinzip des nach ihm benannten schrittweisen Abbaus eines Peptides zur Sequenzanalyse. Beim *EDMAN-Abbau* wird die N-terminale Aminosäure mit Phenylisothiocyanat [*PITC*] zu einem Phenylthioharnstoff-Derivat [*PTC-Peptid*] umgesetzt. Dieses cyclisiert zu einem 2-Anilino-4H-thiazolin-5-on-Derivat [*ATZ-Aminosäure*] unter gleichzeitiger Spaltung der nächsten Amidgruppierung. Das dabei anfallende Restpeptid bleibt unversehrt und wird einem neuerlichen Abbauzyklus unterzogen. In wässrigem Milieu wird das instabile Thiazolinon-Derivat über eine offenkettige Phenylthiocarbamoylaminosäure zu einem stabileren Phenylthiohydantoin 3-Phenyl-2-thioimidazolin-4-on [*PTH-Aminosäure*] isomerisiert (Formel 10-7). Dadurch wird die Peptidkette mit jedem Reaktionszyklus um eine Aminosäure verkürzt, die abgespaltenen Aminosäurederivate werden üblicherweise mittels Dünnschichtchromatographie, Gaschromatographie, Massenspektroskopie oder HPLC identifiziert.



Formel 11-7. EDMAN-Abbau von Peptiden.

Durch die Einführung der HPLC können bis zu 5 pmol Peptid bei geeigneter UV-Detektion nachgewiesen werden. Die gesamte Reaktionsfolge des EDMAN-Abbaus wird heute automatisch im Peptid-Analysator durchgeführt (11.5.4).

Zur Aminosäureanalyse im Picomolbereich bedient man sich neben der EDMAN-Methode weiterer Abbaureagenzien, deren Vorteile oft in einer besseren Separierbarkeit bzw. Detektierbarkeit der Produkte liegen. Solche sind z.B. 4-(Dimethylamino)azobenzo-4'-isothiocyanat [DABITC], ein farbiges Derivatisierungsreagenz, das rotgefärbte Aminosäure-Derivate gibt, die selbst in unterem Picomolbereich visuell sichtbar sind und zur Aminosäurecharakterisierung mittels Dünnschichtchromatographie verwendet werden. Andere Reagenzien sind Diphenylindonylisothiocyanat [ITC] oder vor allem ortho-Phthalaldehyd [OPA] in Gegenwart von 2-Thioethanol. Dansylaminoisothiocyanat bildet fluoreszierende Derivate und kann eine enorme Steigerung der Empfindlichkeit bei der Detektion bedeuten.

Abb. 10-11. Typisches Chromatogramm einer Aminosäure-Analyse mit OPA-Derivatisierung und Fluoreszenz-Detektion.

11.6.4 Automatisierte Proteinsequenzierung

PEHR EDMAN legte den Grundstein zur Konstruktion eines automatischen Sequenators, der vor mehr als 30 Jahren zusammen mit G. BEGG in Form eines *Flüssigphasen-Sequenzers* [Sequenzators] realisiert wurde. Alle Reagenzien werden dabei in flüssiger Form dosiert. Dadurch konnte Substanzbedarf und Zeitaufwand für eine Sequenzanalyse wesentlich reduziert werden. Ein dünner Proteinfilm in einem rotierenden Glaszylinder stellt die Reaktionsoberfläche dar, auf der nach Zugabe der flüssigen Agenzien die EDMAN -Reaktion abläuft. Nach der Abspaltung der ATZ-Aminosäure wurde sie mit Lösungsmittel extrahiert, gesammelt, mit methanolischer HCl umgesetzt und die erhaltene PTH-Aminosäure dünnschicht- oder gaschromatographisch identifiziert. Später konnte die Sensitivität durch Einsatz der HPLC bei der PTH-Aminosäureanalyse stark erhöht werden. Die Konvertierung zu den PTH-Aminosäuren erfolgte jedoch noch manuell und wurde erst durch die Entwicklung des sog. *Converters* verbessert. In Automaten dieser Art konnten bis zu 70 Aminosäuren in einem Sequenzlauf vom N-Terminus aus identifiziert werden.

Entscheidend für die Anzahl der möglichen Abbauschritte ist die maximal erreichbare Ausbeute pro Schritt. Bei einer durchschnittlichen Ausbeute von 98 % konnten EDMAN und BEGG vom Myoglobin des Buckelwales die Sequenz der ersten 60 Aminosäuren aufklären. Die Ausbeuten werden jedoch progressiv mit fortschreitendem Abbau geringer, so dass längere Peptidketten vorher selektiv chemisch oder enzymatisch gespalten werden müssen. In der Regel werden Proteinsequenzen von maximal 20 - 40 Aminosäuren analysiert. Aus den sich über lappenden Partialsequenzen muß dann auf die Gesamtsequenz des Peptides geschlossen werden. Für die Ermittlung der Sequenz einer Kette des IgM aus 576 Aminosäuren mußten dazu fast 600 Peptidfragmente untersucht werden.

In den frühen siebziger Jahren wurde ein Sequenzier-Automat nach dem Konzept eines *Festphasen-Proteinsequenzers* [R.A. LAURSEN, 1971] entwickelt. Solcher besitzt als Reaktionsgefäß für die EDMAN -Reaktion eine mit einem speziellen Gelmaterial gefüllte Reaktorsäule, an dem das Protein kovalent gebunden ist und mit den Abbaureagenzien und Lösungsmitteln durchspült wird. Obwohl dieser

Sequenatortyp gegen über dem ersten aufgrund der kovalenten Proteinanbindung einen geringeren Auswaschfehler ergibt, konnte er sich nicht als Standard durchsetzen.

Bei den *Gasphasen-Proteinsequenzern*, einer neuen Generation von Sequenatoren, werden flüchtige Basen (z.B. Triethylamin), welche die Kupplung des Phenylisothiocyanats an den N-Terminus katalysieren, und flüchtige Säuren (Trifluoressigsäure TFA) zur Katalyse der Abspaltungsreaktionen gasförmig in die Reaktionskammer eingeleitet. Die Probe wird auf einem kleinen Glasfaserfilter appliziert. Dieser 1981 kommerziell auf den Markt gebrachte Sequenatortyp löste innerhalb weniger Jahre alle Sequenatoren früherer Art in proteinchemischen Laboratorien ab und erlaubte erstmals Sequenzbestimmungen von Proteinen im Bereich von 100 pmol. Heute lassen sich mit den modernsten Maschinen sowohl Gasphasen- als auch *Pulsed-Liquid-Phase-Sequenzierungen*, bei denen als Weiterentwicklung die Trifluoressigsäure (TFA) flüssig [*pulsed-liquid*] zugegeben wird, im untersten Picomolmaßstab durchführen [*Mikrosequenzierung*]. Es konnten noch PTH-Aminosäuren in Mengen von 200 Femtomol nachgewiesen werden. Schließlich wurde auch der letzte Schritt des Prozesses, nämlich die Identifizierung, simultan durch on-line-Anschluß einer HPLC-Anlage automatisiert. Die in jedem Schritt abgespaltene Aminosäure wird z.B. in ein UV-detektierbares Derivat überführt und mittels HPLC abgetrennt und detektiert. Über die Retentionszeit läßt sich eine Zuordnung zur entsprechenden Aminosäure treffen. Da der Abbau nicht zu 100 % erfolgt, wird in den jeweils folgenden Abbauschritten die Interpretation des Chromatogramms von Schritt zu Schritt schwerer. Moderne Auswertesysteme berücksichtigen jedoch diesen unvollständigen Abbau, Auswertungen von mehr als 60 Abbauszuklen sind heute mit größter Sicherheit möglich geworden.

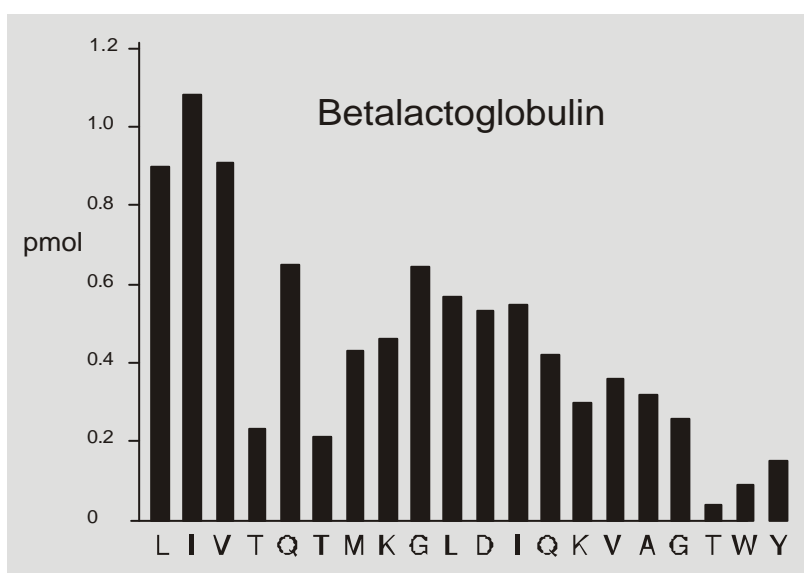
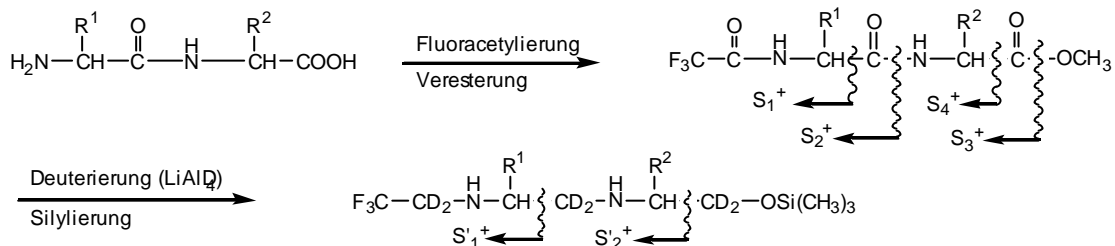


Abb. 11-12. Die Sequenzausbeuten der ersten 20 Aminosäuren des Lactoglobulins. Es wurden 20 pmol auf ein Glasfaser-Filter aufgetragen und sequenziert (nach P. FISCHER, Appl. Biosystems).

Proteinanalytische Mikromethoden sind vor allem dort unverzichtbar, wo nur kleinste Mengen an Substanz identifiziert werden, z.B. bei der Untersuchung von Virusprotein und Proteinen, die an der Genregulierung beteiligt sind.

11.6.5 Massenspektrometrische Sequenzanalyse

Eine Alternative zur klassischen Peptidsequenzierung ist die *massenspektrometrische Sequenzanalyse*. Da zur konventionellen EI- und CI-Massenspektroskopie (1.) flüchtige Derivate benötigt werden, setzt man die Peptide durch Derivatisierung zu flüchtigen Verbindungen um. Die Aufklärung der Sequenz erfolgt anhand charakteristischer Sequenzionen (Formel 10-8), die allerdings neben zahlreichen anderen Ionen anfallen. Durch Reduktion der Carbonylgruppen zu CH_2 - bzw. CD_2 -Gruppen vereinfachen sich die Spektren weiter.



Formel 11-8. Flüchtige Peptidderivate für die massenspektrometrische Sequenzanalyse.

Da größere Peptide zu viele Fragmentionen liefern, werden Polypeptide zuvor durch Hydrolyse in möglichst viele verschiedene Oligopeptide gespalten, deren Trennung zweckmäßig nach Derivatisierung durch Gaschromatographie erfolgt. Die Gesamtsequenz des Polypeptids läßt sich dann nach dem "Domino"-Prinzip aus den ermittelten Sequenzen der kurzen Oligopeptide zusammensetzen.

Trp-Ile
 Trp-Ile-Thr
 Ile-Thr-Lys
 Thr-Lys
 Thr-Lys-Glu
 Lys-Glu
 Glu-Glu
 Glu-Glu-Tyr
 Glu-Tyr
 Glu-Tyr-Asp
 Tyr-Asp
 Tyr-Asp-Glu
 Tyr-Asp-Glu-Ala
 Asp-Glu
 Asp-Glu-Ala

Kombination von Gaschromatographie und Massenspektroskopie aus den Partiaalsequenzen sich überlappender Oligopeptide

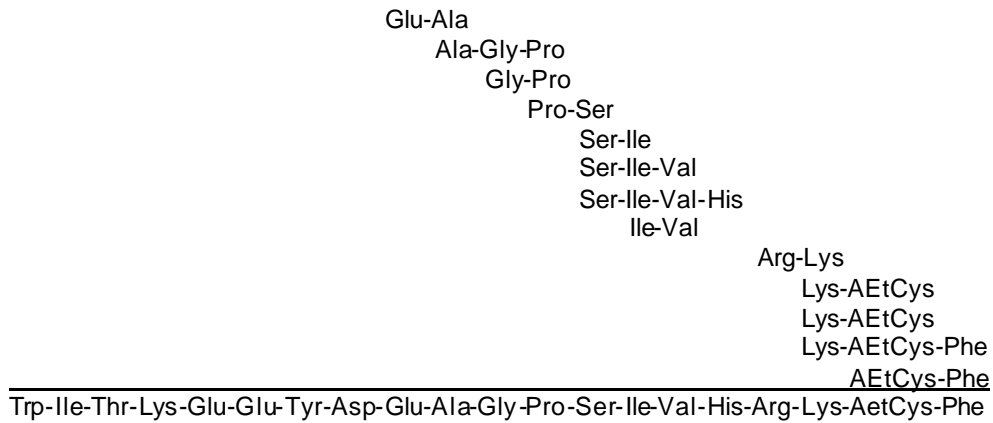


Abb. 11-13. Ermittlung der Sequenz des C-terminalen Eicosapeptids von Actin (nach NAU, KELLEY und BIEMANN).

Mit MS/MS-Experimenten und DADI-Massenspektrometrie [*direct analysis of daughter ions*], die den Nachweis der konsekutiven Bildung von Molekülfragmenten erlauben, kann die Strukturanalyse periodisch aufgebauter organischer Moleküle erfolgen. Durch die Registrierung von Tochterionen läßt sich bei kleineren Oligopeptiden aus dem DADI-Spektrum direkt die Sequenz ableiten.

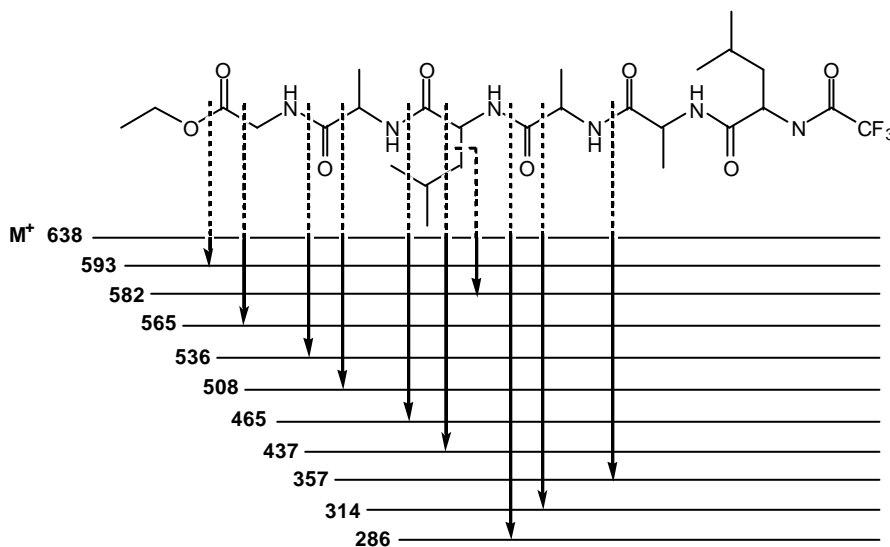


Abb. 11-14. Auswertung des DADI-Spektrums eines Hexapeptid-Derivates (nach U. SCHLUNEGGER).

Durch weiche Ionisierung wie im Falle von FAB [*fast atom bombardment*] wird aus dem Massenspektrum von Oligopeptiden außer den Quasimolekülionen wenig weitere Strukturinformation durch Fragmentierung erhalten. Durch stoßinduzierte Fragmentierung des $(M+H)^+$ -Ions ist jedoch auch die

Sequenzanalyse möglich. (Abb. 10-15 zeigt das Tochterionenspektrum des $(M+H)^+$ -Ions des Tetrapeptids Met-Arg-Phe-Ala).

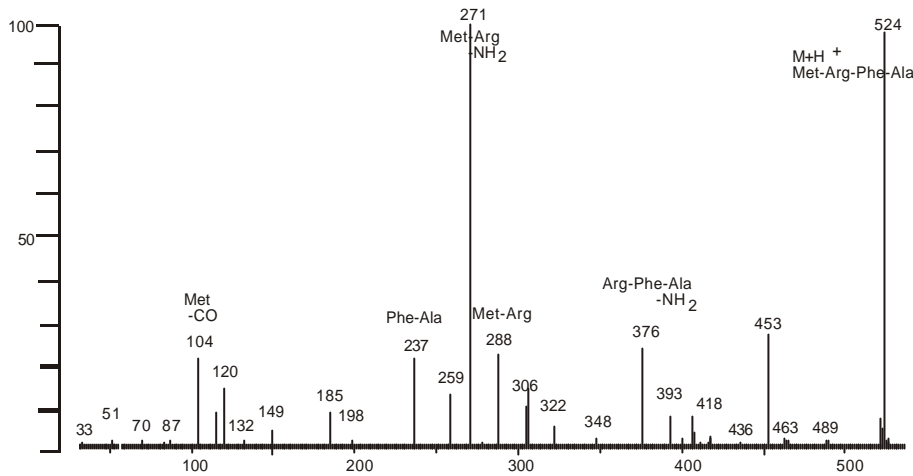
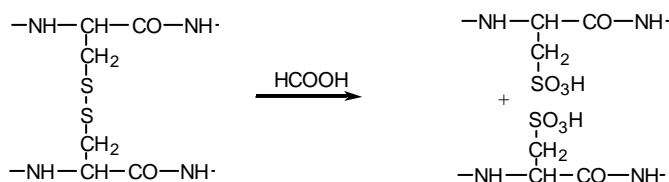


Abb. 10-15. Tochterionenspektrum des $(M+H)^+$ -Ions $m/z = 524$ des Tetrapeptids Met-Arg-Phe-Ala (nach R. SCHUBERT).

Durch Elektrospray- [ESI] oder MALDI-Ionisierung [*matrix assisted laser desorption ionisation*] lassen sich auch Molekülonen höhermolekularer Peptide mit Massen bis zu 100.000 Da nachweisen. Da aufgrund der schonenden Ionisierung bzw. Desorption Ionen-Fragmentierungsprozesse unterdrückt werden, muß durch Stoßaktivierung [*post source decay*], also Fragmentinduktion "hinter der Ionenquelle", erst ein Zerfallsspektrum generiert und damit Strukturaussagen ermöglicht werden. Auch die mehrfach-geladenen intakten Molekülonen aus einer ESI-Quelle lassen sich zum Zerfall anregen und MS/MS-Spektren registrieren. Bei größeren Peptiden führt die *Leitersequenzierung* unter Ausnützung der EDMAN-Chemie zum Erfolg. Es werden Peptidleitern synthetisiert, ein Satz von Peptiden, die jeweils um eine Aminosäure verkürzt sind. Aus den Massendifferenzen läßt sich die Proteinsequenz bestimmen.

10.5.6 Spaltung von Disulfidbrücken

In vielen Peptiden sind jeweils zwei Cystein-Moleküle über eine *Disulfidbrücke* zu Cystin verknüpft. Die Spaltung solcher S-S-Brücken kann reduktiv oder oxidativ erfolgen. Zur reduktiven Spaltung verwendet man Mercaptoethanol oder Thioglykolsäuresalze. Die Reaktion ist reversibel, durch Oxidation mit Luftsauerstoff werden die Disulfidbrücken wiederhergestellt (vgl. Dauerwelle, 9.1.2). Die bei der Reduktion entstandenen SH-Gruppen lassen sich mit Jodessigsäure zu R-S-CH₂-COOH fixieren. Die oxidative Spaltung mit Perameisensäure führt zu Sulfonsäuren.



11.6.7 Proteinfragmentierung, Sequenzstrategien

Relativ kurze Peptide können in der Regel leicht mit HPLC gereinigt und direkt durchsequenziert werden. Längere Polypeptide müssen hingegen fragmentiert und die entstandenen Peptidmischungen getrennt werden. In der Sequenzanalyse werden mit Peptidasen oder säurekatalysiert kleine Bruchstücke hergestellt [*statistische Spaltung*] und miteinander kombiniert. Ob spezifisch spaltende Enzyme oder chemische Spaltung mit Bromcyan oder verdünnten Säuren verwendet werden sollen, wird vom jeweiligen Protein und der Trennbarkeit der entstehenden Peptidfragmente diktiert. Inzwischen sind jedoch auch die Methoden der Sequenzanalyse von Desoxyribonucleinsäuren so weit perfektioniert, dass es bei längeren Proteinen zur Ermittlung der Primärstruktur häufig einfacher ist, das entsprechende Strukturgen des Proteins zu isolieren, dessen Nucleotidsequenz zu ermitteln und daraus die Aminosäuresequenz des Proteins abzuleiten. Auf diese Weise wurde z.B. die Primärstruktur der Interferone bestimmt.

Vielfältige Anwendungen findet die Proteinsequenzierung dennoch noch immer bei der Herstellung neuer Proteine in der Pharmakologie und Biotechnologie. Sie ist unverzichtbar für viele moderne Projekte der Biologie, Biochemie und Medizin. Im "*Atlas of Protein Sequences*" werden seit 1966 jährlich die aufgeklärten Primärstrukturen von Proteinen veröffentlicht. Das bisher größte in seiner Primärstruktur aufgeklärte globuläre Protein ist ein monoklonales IgM-Immunglobulin mit einer Molmasse von 935.000 [HILSCHMANN].

11.6 Biologisch aktive Peptide und Proteine

Proteine haben eine Vielzahl lebenswichtiger Aufgaben zu erfüllen. Als Biokatalysatoren [*Enzyme*, Kap. 11] katalysieren sie Synthese und Aufbau von Zellbestandteilen, als Struktur und Funktionselemente sind sie wesentlicher Bestandteil aller Zellen, der Membranen, des Stütz-, Muskel- und Bindegewebes. Als Regulationsstoffe stimulieren sie wichtige Reaktionsabläufe und spielen eine wesentliche Rolle bei der Zelldifferenzierung. Zahlreiche Proteine und Peptide spielen eine Rolle bei der Genkontrolle und bei neurobiologischen Prozessen. G-Proteine sind für die Signaltransduktion verantwortlich. Die Immunglobuline dienen bei Wirbeltieren zur Abwehr körperfremder Stoffe. Unter den immunologisch wirksamen Proteinen besitzen die Antikörper eine große therapeutische und diagnostische Bedeutung. Bestimmte Proteine ermöglichen den Transport und die Speicherung von Metallen oder Sauerstoff. Strukturgebundene Membranproteine dienen für den aktiven Transport durch biologische Membranen.

Bestimmte Peptide können Krankheitserreger sein oder üben eine toxische Wirkung auf andere Organismen aus. Zu letzteren zählen verschiedene tierische, mikrobielle oder pflanzliche Toxine.

11.6.1 Neuropeptide

Proctolin ist ein aus fünf Aminosäuren bestehendes *Neuropeptid* (Neurotransmitter) aus Insekten, das z.B. bei der Schabe *Periplaneta americana* das Verdauungssystem und verschiedene Muskelsysteme anregt, aber auch bei anderen Wirbellosen und sogar Säugetieren Wirkung zeigt.

Arg-Tyr-Leu-Pro-Thr Proctolin aus der Schabe *Periplaneta americana*

Ein pheromonproduzierendes Neuropeptid [*pheromone producing biologically active neuropeptide, PBAN*] wird bei Insekten in den *Corpora allata* produziert und bewirkt die Produktion und Ausschüttung von Sexualpheromonen.

11.6.2 Immunoglobuline

Immunität ist die spezifische Antwort des Körpers auf das Eindringen körperfremder Substanzen, ein Bestandteil ist die Produktion von Antikörpern. Die Substanzen, die die *Immunantwort* auslösen, bezeichnet man als *Antigene*. Antigene sind körperfremde, natürliche oder synthetische Makromoleküle, vor allem Proteine und Polysaccharide sowie Oberflächenstrukturen von körperfremden Partikeln. Sie lösen *in vivo* eine Immunantwort aus, deren Bestandteil die Produktion von Antikörpern ist. Die erforderliche Mindestmolmasse zur Antigenaktivität hängt stark von der Struktur ab. Synthetische Polypeptide mit einer Molmasse > 4 - 5.000 wirken schon immunogen.

Es lässt sich jedoch auch eine Immunantwort gegen niedermolekulare Verbindungen auslösen, wenn diese an ein Makromolekül gebunden sind. Diese meist kovalent gebundenen niedermolekularen Verbindungen bezeichnet man als *Haptene*. Sowohl gegen die Antigene als auch die freien Haptene werden im Organismus spezifisch reagierende lösliche Proteine, die *Antikörper* [*humorale Immunantwort*] oder aber spezifisch reagierende Zellen mit plasmamembranbeständigen Antikörpern, die sog. *sensibilisierten Lymphozyten* [*zelluläre Immunantwort*], gebildet.

Die *Immunoglobuline* sind spezifische, körpereigene Abwehrproteine, die als Antikörper bezeichnet und von bestimmten Lymphozyten nach Kontakt mit Antigenen gebildet werden. Die Gruppen des Antigenmoleküls, die die spezifische Bindung an die Antikörper- oder antikörperähnlichen Strukturen an der Oberfläche der Lymphozyten bewirken, bezeichnet man als *determinante Gruppen*.

Zwischen den einzelnen Immunoglobulinklassen gibt es weitere Unterschiede in ihren biochemischen Eigenschaften. Lediglich das IgG ist in der Lage, die Placentaschranke zu passieren. Das IgM, das phylogenetisch älteste Immunoglobulin, ist für die frühe Immunantwort verantwortlich. IgA kommt in Sekreten (z.B. Tränenflüssigkeit, Speichel) vor und schützt dort lokal vor Infektionen. Das IgE spielt als *Reagin* eine besondere Rolle bei allergischen Erkrankungen.

11.6.3 Lectine

Lectine sind körpereigene Proteine, jedoch sonst vorwiegend pflanzlicher Herkunft, die spezifisch bestimmte Kohlenhydrate binden können (Tab. 11-8), aber weder Enzyme noch Antikörper sind. Da sie auch an Zellen mit Glykokonjugaten wie z.B. Erythrozyten zu heften und sie zu agglutinieren vermögen, wurden Lectine [lat. *leggere* = auswählen] früher auch als *Phytoagglutinine* oder *Hämagglutinine* bezeichnet. Die meisten Lectine sind Glykoproteine mit ein oder meist mehreren Polypeptidketten, charakteristisch ist der hohe Anteil an Aspartinsäure, Asparagin, Serin und Threonin. Einige Lectine enthalten Metallionen. Lectine wurden ursprünglich in Pflanzen entdeckt, sind jedoch in allen lebenden Organismen weit verbreitet (Tab. 10-8). So kommen agglutinierende Proteine auch in Pilzen, Schnecken, Fischeiern, Amphibien und anderen Tieren vor. 1985 sind Lectine in menschlichen Tumoren nachgewiesen worden.

Tabelle 11-8. Spezifität und Herkunft einiger Lectine

Zuckerspezifität	Blutgruppen-spezifität (S.)	Herkunft des Lectins
α -D-Man, α -D-Glc (GlcNAc)	—	<i>Canavalia ensiformis</i> * (Schwert- oder Madagaskarbohne) <i>Pisum sativum</i> (Erbse) <i>Lens culinaris</i> (Linse)
α -L-Fuc	0	<i>Tetragonolobus purpureus</i> (Spargelerbse) <i>Ulex europeus</i> (Stechginster)
β -D-Gal	—	<i>Ricinus communis</i> <i>Phaseolus vulgaris</i> (Gartenbohne) <i>Arachis hypogaea</i> (Erdnuss)
α -D-Gal	B	<i>Bandeiraea simplicifolia</i>
α -D-GalNAc	A	<i>Glycine max</i> (Sojabohne) <i>Phaseolus lunatus</i> (Limabohne) <i>Helix pomatia</i> (Weinbergschnecke) <i>Dolichos biflorus</i> (Helmbohne)
α -Neu	—	<i>Limulus polyphemus</i> (Pfeilschwanzkrebs)
L-Rha	B	<i>Streptomyces 27 S5</i>

* Name des Lectins: Concanavalin A

In höheren Pflanzen sind Hunderte von Lectinen gefunden worden, lectinhaltig sind viele Fabaceen wie Bohne, Erbse, Linse, Erdnuss, Sojabohne oder Paternostererbse, wo sie vor allem in den Samen lokalisiert

sind. Die Molmasse, der molekulare Aufbau und die Spezifität gegenüber Zuckern der Leguminosen-Lectine können sich erheblich unterscheiden, jedoch sind ihre Aminosäuresequenzen weitgehend homolog. Selbst zwischen taxonomisch entfernt stehenden Familien findet man Homologien, so ist das Ricin homolog mit dem Trichosanthin, dem in der chinesischen Volksmedizin eingesetzten Wirkstoff aus dem Kürbisgewächs *Trichosanthus kirilowii*. Ausserdem ist Ricin mit dem Schleimpilz-Lectin Discoidin homolog.

Das erste Lectin, dessen Sequenz und räumliche Struktur aufgeklärt werden konnte, ist das kohlenhydratfreie Samenprotein *Concanavalin A* [*Con A*] aus der Schwert- oder Madagaskarbohne [*Canavalia ensiformis*, jack bean]. Unter physiologischen Bedingungen existiert das Metalloprotein Concanavalin A als Tetramer, bei einem pH < 6 vorzugsweise als Dimer. Jede Untereinheit besteht aus 237 Aminosäuren und enthält je ein Mn^{2+} , Ca^{2+} -Ion und eine bindende Stelle für Kohlenhydrate. Aufgrund seiner Affinität zu bestimmten Oligosacchariden kann Concanavalin als Hilfsmittel zum Nachweis dieser Kohlenhydrate und zur Affinitätschromatographie eingesetzt werden.

Am längsten bekannt ist das toxische Glykoprotein *Ricin*, das bereits 1888 [H. STILLMARK] aus Ricinus-Samen [*Ricinus communis*] isoliert werden konnte. Es besteht aus zwei Ketten (A-Kette: Molmasse 30.000, B-Kette: Molmasse 35.000), die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Die als Haptomer bezeichnete Untereinheit B ist für die Anlagerung an bestimmte galactosehaltige Glykosidreste an der Zelloberfläche verantwortlich. Dadurch wird es der Untereinheit A [*Effektomer*] ermöglicht, in die Zelle einzudringen und dort die Proteinbiosynthese zu inhibieren. Neben dem toxischen Ricin ist im Ricinussamen noch das ähnlich gebaute, aber untoxische *Ricinus-Agglutinin RCA* enthalten.

Die Lectine besitzen eine große Bedeutung für die Untersuchung dynamischer Prozesse der Zelloberfläche. Durch die Bindung der Lectine an die Lymphozytenoberfläche werden Mitose und Immunglobulinproduktion induziert. Bakterien heften sich über ihre Lectine an Wirtszellen an. Lectinvermittelte Adhäsion scheint auch bei der Symbiosenlenkung bei Mikroorganismen und Pflanzen eine Rolle zu spielen. Auch die Wurzelknöllchenbildung zur N_2 -Fixierung bei Leguminosen läuft unter Beteiligung von Lectinen ab.

Von einigen Autoren werden die Lectine als Speicherprotein angesehen, es ist jedoch auch denkbar, dass sie überhaupt keine Funktion besitzen, da auch lectinfreie Varianten existieren. Viele Lectine sind für höhere Organismen toxisch, auch die Gartenbohne *Phaseolus vulgaris* ist in rohem Zustand giftig.

11.6.4 Ca-Bindende Proteine

In Zusammenhang mit der Rolle der intrazellulären Calciumionen als "*second messenger*" wurden *Ca-bindende Proteine* [intrazelluläre *Ca-Rezeptoren*] interessant. Die wichtigsten Ca-bindenden Proteine sind das Calmodulin in den nicht-muskulären Geweben und das Troponin C in der quergestreiften Muskulatur.

Calmodulin reguliert die Aktivität zahlreicher Enzyme (Kinasen, Phosphatasen). Aus Rinderhirn isoliertes Calmodulin enthält 148 Aminosäuren, davon ca. 1/3 saure Aminosäuren (Aspartin-, Glutaminsäure). Bemerkenswert ist das Vorkommen der seltenen Aminosäure Trimethyllysin, die terminale Aminogruppe ist acetyliert. Die Flexibilität wird durch Disulfidbrücken nicht eingeschränkt. Calmodulin enthält 4 Ca-bindende Domänen, die Ca-Bindung führt zu Veränderungen der räumlichen Struktur. Hinsichtlich der Struktur (ca. 50% Homologie) und Ca-Bindungsvermögen ist das *Troponin C* dem Calmodulin nahe verwandt.

11.6.5 Proteine als Krankheitserreger - Prionen

Erst im vorigen Jahrzehnt wurde postuliert, dass gewisse schon lange bekannte Gehirnerkrankungen wie z.B. die für Schafe und Ziegen tödliche *Scrapie-Krankheit* und das *Creutzfeldt-Jakob-Syndrom* [CDJ] des Menschen nicht durch die üblichen Krankheitserreger, also Viren, Bakterien und Parasiten, sondern durch proteinartige Erreger, sog. *Prionen* [*proteinaceous infectious particle*], verursacht werden. Auch die *Britische Rinderseuche BSE* [*bovine spongiforme Enzephalopathie*] wird etwas später als Prionen-Krankheit klassifiziert. Maßgeblich zur Formulierung dieses neuen Erregertyps waren die für ein Virus untypische, besonders lange Inkubationszeit ["*slow virus*"], die Kleinheit des Objekts, die eine elektronenmikroskopische Entdeckung verhinderte ["*subviral*"], das Unterbleiben einer Immunantwort und die ausgesprochene Unempfindlichkeit gegenüber chemischer und physikalischer Beeinflussung.

S.B. PRUSINER [Nobelpreis 1997] *et al.* fanden 1991 als Hauptkomponente des Erregerproteins die veränderte Form eines natürlichen zellulären Proteins *PRP-C* [*Prionprotein - zelluläre Form*] mit dem Molekulargewicht 33.000 - 35.000. Mit der Kenntnis der Gensequenz konnte nachgewiesen werden, dass jeder Organismus das Prion-Protein in der ungefährlichen zellulären Form produziert. Chemische Unterschiede in der Aminosäuresequenz konnten nicht gefunden werden, gleich ob das Material aus einem infizierten oder gesunden Organismus stammte. Man geht davon aus, dass das in der zellulären, löslichen PRP-C-Form im Organismus produzierte Protein im Erreger in der unlöslichen sog. *Scrapie-Form PRP-Sc* akkumuliert wird. Die Umwandlung von PRP-C- zur PRP-Sc-Form wird durch Konformations- und Sekundärstrukturänderung und Aggregation zu Oligomeren bewirkt. So besitzt PRP-C 45 % α -Helix-

struktur und praktisch keine Faltblattstruktur, das abnormale PRP-SC hingegen 45 % Faltblatt- und nur noch 30 % α -Helixstruktur. Die infektiöse PRP-Sc-Form kann mit einem natürlichen PRP-C dimerisieren und nachfolgend der zellulären PRP-C-Form ihre eigene Form aufzwingen und so in einem katalytischen Zyklus die infektiösen Partikel vermehren. Diese Reproduktion Protein \Rightarrow Protein verletzt damit das zentrale Dogma der Molekularbiologie, wonach Nucleinsäuren als Matrizen für die Replikation unerlässlich sind. Im Falle der Prionen-Erkrankungen könnte ein einziges Molekül für die erblichen und die spontanen Formen der Krankheiten verantwortlich sein.

10.6.6 Protein- und Peptidtoxine

Eine Vielzahl natürlicher Toxine besitzt Peptidstruktur. Dazu zählen Schlangengifte, Gifte von Weichtieren, Skorpionen, Insektengifte, Toxine mancher Giftpilzarten und bakterielle Toxine. Im folgenden sollen nur einige "klassische" Gifte abgehandelt werden, detaillierte Darstellungen verschiedener Pflanzen- und Tiergifte sind im Kap. 15.(Alkaloide) zu finden.

11.6.6.1 Schlangengifte

Die *Schlangengifte* enthalten neben Enzymen Peptide, die meistens aus etwa 60 bis 75 Aminosäuren bestehen und deren Peptidketten gefaltet und durch Cysteinbrücken fixiert sind. Sie weisen neurotoxische und cardiotoxische Wirkungen auf. Die Ähnlichkeit der Sequenz der *Neurotoxine* und *Cardiotoxine* lässt vermuten, dass sich beide Gruppen aus einem gemeinsamen Vorläufer-Protein entwickelt haben. Chemisch verwandt mit den Cardiotoxinen der Schlangen sind die Gifte der Skorpione. Neben den spezifischen Toxinen sind in den Rohgiften Enzyme enthalten, z.B. Phospholipasen, Peptidasen, Proteasen. Auch sie wirken stark giftig, indem sie zu Blutdruckabfall, Störung der Blutgerinnung oder zur Zerstörung von Blutgefäßen führen.

Die giftigeren *Neurotoxine* werden je nach ihrem Angriffsort in *postsynaptische* (Angriff an der postsynaptischen Membran am Acetylcholin-Rezeptor, α -Typ) und *präsynaptische Neurotoxine* (Angriff an der präsynaptischen Membran, β -Typ) unterteilt. Besonders gut sind die Neurotoxine des α -Typs untersucht, zu denen die Toxine der Giftnattern [*Elapidae*] gehören. Bei diesen Toxinen, die einen N-terminalen Isoleucin- oder Methionin-Rest enthalten, werden aufgrund von Unterschieden in der chemischen Struktur wiederum zwei Typen (I und II) unterschieden [TU, YANG]. Neurotoxine vom Typ I sind Polypeptide der Molmasse 6.700 bis 7.000, die 61 - 62 Aminosäuren mit 4 Disulfidbrücken enthalten. Neurotoxine vom Typ II besitzen eine Molmasse > 7.800 . Sie bestehen aus 71 - 74 Aminosäuren mit 5 Disulfidbrücken. In einer australischen Giftnatter wurde daneben noch ein Neurotoxin

gefunden, das aus 119 Aminosäuren aufgebaut ist. Seeschlangen [*Hydrophidae*] enthalten nur Neurotoxine vom Typ II. Die Peptidgifte der Ottern [*Viperidae*] und Nattern [*Colubridae*] besitzen höhere Molmassen (16.000 - 21.000).

Neurotoxine der Typen I und II verschiedener Tierspezies und verschiedener geographischer Herkunft ähneln sich sehr in ihrer Struktur. Obwohl beim Typ II zwei zusätzliche Cysteinreste vorhanden sind, ist die Lage der anderen Cysteinreste bei Vertretern beider Typen nahezu identisch.

Die β -Neurotoxine besitzen größere Molmassen (20.000 - 22.000) als die α -Neurotoxine. N-terminal befindet sich ein Aspartinsäure- oder Asparagin-Rest.

Die äußerst giftige Giftnatter *Bungarus ulticinctus* [Elapidae] produziert sowohl ein α - als auch ein β -Neurotoxin [α - und β -*Bungarotoxin*]. α -*Bungarotoxin*, dessen Primärstruktur in Abb. 10-18 wiedergegeben ist, lagert sich an den Acetylcholin-Rezeptor an und hemmt die neuromuskuläre Übertragung des Nervenimpulses.

Abb. 10-18. Primärstruktur des α -Bungarotoxins aus der Giftnatter *Bungarus ulticinctus*.

Abb. 10-19 und Abb. 10-20 zeigt die Sequenz des *Cobratoxins* und des α -Toxins aus *Naja nivea*.

Abb. 10-19. Struktur des *Cobratoxins*.

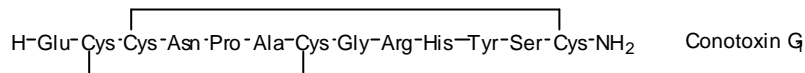
Abb. 11-20. Struktur des α -Toxins aus *Naja nivea*.

Der Hauptbestandteil des Giftes von Klapperschlangen [*Crotalidae*] ist der Polypeptid-Komplex *Crotoxin* mit einem MG von ca. 30.000. Als eigentliche Neurotoxine des *Crotoxins* betrachtet man das *Crotactin* (enzymfrei) und das *Crotamin*, ein Polypeptid vom MG 10.000 - 15.000. Die Vergiftung führt lokal zu Schmerzen, Rötung und Nekrose, systemische Folgen sind Müdigkeit, Kollaps und Schock bis zum Tod.

Erabutoxine sind tödlich giftige Polypeptid-Neurotoxine der Seeschlange *Laticauda semifasciata* mit jeweils 62 Aminosäureeinheiten.

11.6.6.2 Toxine der Kegelschnecken

Conotoxine sind Peptidgifte aus Kegelschnecken [*Conidae*] tropischer und subtropischer Meere. Die Schnecken stechen zum Beutefang mit Hilfe harpunenartiger Giftzähnen, die mit Neurotoxinen beladen sind. Die Stiche sind sehr schmerzhaft, gefolgt von Taubheit, in schweren Fällen tritt Muskellähmung ein. Todesfälle beim Menschen infolge Herzversagen sind für *Conus geographus*, *C. textile* und *C. tulipa* bekannt. Bei den Conotoxinen kennt man über 10 verschiedene Verbindungen mit 13 bis 27 Aminosäuren.



11.6.6.3 Bienengift

Das *Bienengift* enthält verschiedene Enzyme [Hyaluronidase, Phospholipase A] sowie als Hauptbestandteil das basische Polypeptid *Melittin*. Am C-terminalen Ende sind vier von fünf basischen Aminosäuren positioniert, und die meisten Aminosäuren mit hydrophoben Seitenketten sind zentral bzw. am N-terminalen Ende lokalisiert. Durch diese ungleichmäßige Verteilung der Aminosäuren besitzt *Melittin* den Charakter einer oberflächenaktiven Verbindung, die Erythrozyten hämolysieren kann.

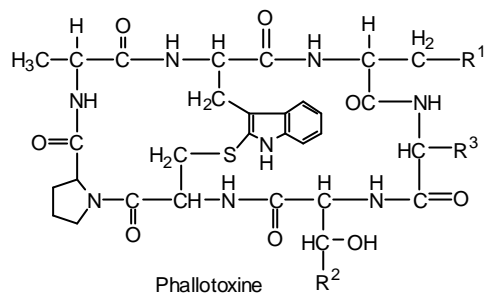
Abb. 11-21. Primärstruktur des Bienengiftes *Melittin*.

11.6.6.4 Peptidtoxine als Pilzgifte

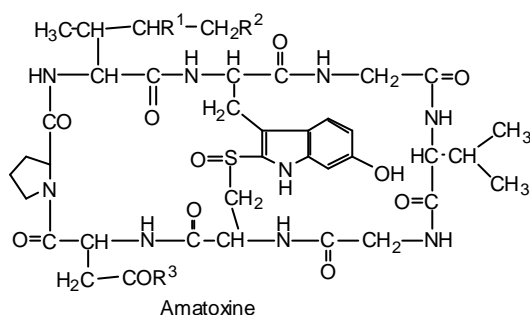
Bei den Giften des Grünen Knollenblätterpilzes *Amanita phalloides* handelt es sich um bicyclische Heptapeptide [Phallotoxine] bzw. Octapeptide [Amatoxine], die sich hinsichtlich ihrer biologischen Wirkung und ihrer chemischen Struktur unterscheiden.

Die *Phallotoxine* wirken bereits nach relativ kurzer Zeit, die Gruppe der *Amatoxine* wirkt erst nach einigen Tagen. Zu letzteren gehört auch die toxischste Verbindung, das α -Amanitin. α -*Amanitin* dringt in die Leberzellen ein und hemmt dort die DNS-abhängige RNS-Polymerase. Amatoxine und Phallotoxine sind kochfest und recht stabil, sie werden auch durch Trocknen der Pilze nicht zerstört und gehen nicht in das Kochwasser über. Ein sehr wirkungsvoller Test zum Erkennen Amatoxin-haltiger Pilze ist der WIELANDSche Zeitungstest. Dabei wird Pilzsaft auf eine unbedruckte Stelle einer Zeitung gebracht und mit Salzsäure befeuchtet. In Gegenwart von wenigen Mikrogramm Amatoxin erscheint nach 5 bis 10 Minuten ein blauer Farbfleck, der das Produkt einer Farbreaktion von Komponenten aus dem Fichtenholz-lignin des Papiers und dem Indolanteil der Pilzgifte darstellt.

Für die Giftwirkung essentiell ist eine Sulfidbrücke, die durch Kupplung der Mercaptogruppe eines Cysteins mit dem Indolrest des Tryptophans gebildet wird. Bei den Amatoxinen ist das S-Atom zum Sulfoxid oxidiert. Wesentlich für die Wirkung der Amatoxine ist die Anwesenheit von γ -hydroxyliertem Isoleucin. *Amanullin* z.B. ist ungiftig.



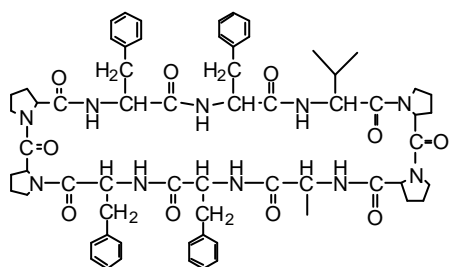
Name	R ¹	R ²	R ³
Phalloin	CH(OH)-CH ₃ CH ₃	CH ₃	CH ₃
Phalloidin	CH(OH)-CH ₂ OH CH ₃	CH ₃	CH ₃
Phallisin	CH(OH)-CH ₂ OH CH ₃	CH ₃	CH ₃
Phallicidin	CH(OH)-CH ₂ OH CH ₃	COOH	CH(CH ₃) ₂



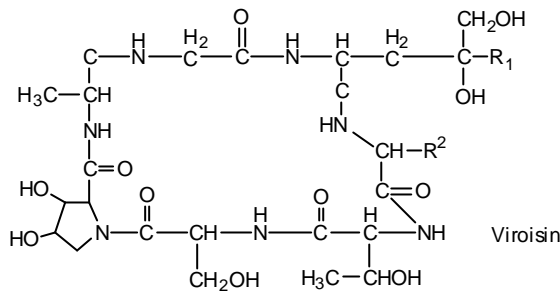
Name	R ¹	R ²	R ³
α -Amanitin	OH	OH	NH ₂
β -Amanitin	OH	OH	OH
γ -Amanitin	OH	H	NH ₂
Amanullin	H	H	NH ₂

Formel 11-8. Phallotoxine und Amatoxine der Knollenblätterpilze.

Aus den Pilzen wurden, insbesondere durch die Arbeitsgruppen H. und Th. WIELAND, zahlreiche Giftstoffe, biologisch inerte Cyclopeptide und das gegen das Gift *Phalloidin* wirkende Cyclodecapeptid *Antamanid* isoliert.



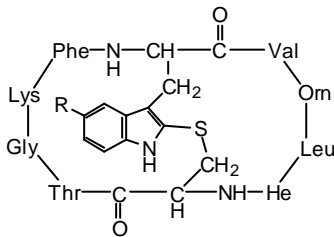
Die *Virotoxine* stellen neben Phallotoxinen und Amatoxinen eine weitere Giftklasse der Knollenblätterpilze dar. Es sind monocyclische Heptapeptide mit dem Haupttoxin *Viroisin*.



Den Peptidtoxinen des Grünen Knollenblätterpilzes ähneln die Gifte der Schleierlinge [Gattung *Cortinarius*], die früher als Speisepilze galten. Vertreter dieser Gifte sind die *Cortinarine A, B* und *C*.

11.6.6.5 Peptidtoxine aus höheren Pflanzen, Thionine

Mit *Viscotoxin* wird das toxische Prinzip aus Misteln [*Viscum album*] bezeichnet. Es zählt zu den *Thioninen*, stark basischen pflanzlichen Polypeptiden, und besteht aus fünf basischen Polypeptiden mit einem MG von ca. 5.000.



11.6.6.6 Bakterielle Toxine

Die *bakteriellen Toxine* werden in Endo- und Exotoxine eingeteilt. Die *Endotoxine* entfalten ihre toxische Wirkung erst nach dem Absterben oder durch Autolyse (z.B. im Darm) der Bakterien. Bei den klassischen Endotoxinen handelt es sich um Lipopolysaccharide (Kap.). Im Unterschied zu den Endotoxinen werden die *Exotoxine* [auch *Enterotoxine* oder *Ektotoxine*] von den Bakterien in die Umgebung abgegeben. Hierbei handelt es sich um toxische Proteine, die vor allem von gram-positiven Bakterien produziert werden und meist die Darmwand angreifen. Häufig entstehen die eigentlichen Toxine erst nach der Einwirkung proteolytischer Enzyme auf Protoxine, wie z.B. bei den hochtoxischen *Botulinustoxinen* von *Clostridium botulinum*. Weitere prominente Vertreter sind u.a. das Tetanustoxin, das Diphtherietoxin sowie die Enterotoxine (25.000 - 30.000 Da) von *Staphylococcus aureus*.

Das *Tetanustoxin* [*Tetanospasmin*] wird von dem grampositiven Stäbchenbakterium *Clostridium tetani* gebildet und verursacht den Wundstarrkrampf [*Tetanus*]. Dieses Toxin, das zweitstärkste bakterielle Gift, ist ein Protein mit 150.000 Da und besteht aus zwei Untereinheiten, von denen sich eine an die Zellmembran bindet und die andere die eigentliche Toxinwirkung entfaltet.

Das *Diphtherietoxin* mit MG = 62.000 Da wird vom Diphtherie-Erreger *Corynebacterium diphtheriae* produziert und besteht aus nur einer Polypeptidkette mit 535 Aminosäuren, die durch proteolytische Enzyme leicht in zwei Fragmente A und B gespalten wird. Das Fragment B bindet an einen Rezeptor in der Zelloberfläche und sorgt für das Eindringen des Fragments A in das Cytoplasma. Das Diphtherietoxin hemmt die Proteinsynthese in der Zelle.

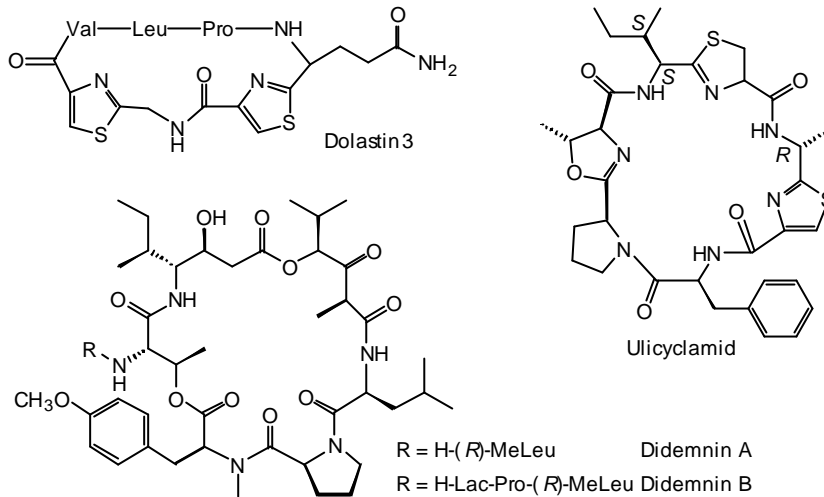
Eine interessante Struktur besitzt das Cholera-Enterotoxin. Das Protein (84.000 Da) besteht aus drei verschiedenen Peptidketten (α , β , γ) und weist die Zusammensetzung $\alpha\beta\gamma_n$ (für $n = 4$ bis 6) auf. Die Peptidketten α und γ sind über eine Disulfidbrücke zur Untereinheit A verbunden, die b -Ketten nicht-kovalent zur Untereinheit B. Die Zusammensetzung der Untereinheit B hängt von pH-Wert, von der Ionenstärke oder der Temperatur ab. Für die Auslösung der Cholera-Symptome ist die α -Kette verantwortlich. Die Untereinheit B ist das Haptomer. Die Bindung des *Cholera*-toxins erfolgt auch an Rezeptoren verschiedener Glykoprotein-Hormone, wahrscheinlich weil die β -Kette des Cholera-Enterotoxins (103 Aminosäuren) bei den ersten 42 N-terminalen Aminosäuren Gemeinsamkeiten mit der α -Kette dieser Hormone aufweist.

Durch Behandlung der Exotoxine mit Formaldehyd geht die toxische, nicht aber die immunogene Wirkung verloren. Derartige Toxoide werden deshalb als Impfstoffe eingesetzt. Auf antibiotisch wirkende mikrobielle Peptide (Peptidantibiotika) wird in Kap. eingegangen.

11.6.6.7 Cyclopeptide und Cyclopeptolide aus niederen Meerestieren

Manteltiere [Tunicata], die einzigen Tiere, die Cellulose aufbauen (für den Mantel) und Schwermetalle akkumulieren können, produzieren eine Reihe ungewöhnlicher Cyclopeptide und Cyclopeptolide mit oft cytostatischer Wirkung. Häufig leben sie mit Algen in Symbiosen, so dass der eigentliche Produzent der biologisch aktiven Inhaltsstoffe nicht entschieden werden kann. Viele dieser Cyclopeptide enthalten anormale optisch-aktive Thiazolin- und Oxazolin-Aminosäuren. 1982 wurden die Struktur des *Dolastin 3* [G.R. PETTIT] aus dem Manteltier *Dolabella auricularia* publiziert, und 5 Jahre später durch Vertauschung zweier Aminosäuren korrigiert. Die cytostatischen Eigenschaften der Syntheseprodukte erwiesen sich als weniger aktiv als ursprünglich berichtet. Weitere Vertreter dieser Klasse wurden später

aus dem Manteltier *Lissoclinum patella* isoliert. Die *Didemnine A* und *B* wurden aus dem Tunicat *Trididemnum solidum* isoliert, wovon *Didemnin B* exzellente cytostatische Eigenschaften besitzt.



11.6.7 Plasmaproteine

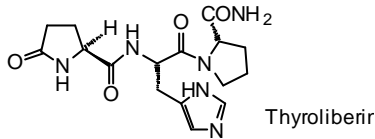
Plasmaproteine sind ein Gemisch von über 100 Proteinen, die zu etwa 7 - 8 % im Blutplasma vorkommen. Unter den Plasmaproteinen des Menschen finden sich Albumine, Transferrin, Globuline, Lipoproteine, Enzyme und die an der Blutgerinnung beteiligten Proteine. Plasmaproteine sind überwiegend Glykoproteine, ihre Zusammensetzung bzw. Konzentration ist oft klinisch-diagnostisch von Bedeutung. Plasmaprotein-Präparate haben auch Eingang in die therapeutische Praxis gefunden. Die Entfernung des Fibrinogens und Prothrombins aus den Plasmaproteinen liefert die *Serumproteine*.

11.6.8 Peptidhormone, Regulations- und Wirkstoffe

Viele Oligopeptide besitzen als Hormone und Regulatoren biochemischer und biologischer Prozesse große Bedeutung. In einem Teil des Zwischenhirns [*Hypothalamus*] wurden die ersten Neurohormone entdeckt, die im tierischen und menschlichen Organismus als *Hypothalamushormone* aufgrund ihrer biologischen Relevanz erwähnenswert sind. Sie steuern die Freisetzung der Hormone des Hypophysenvorderlappens [*HVL*], welche wiederum die Produktion der Geschlechtshormone (5.) regulieren. Man unterscheidet die freisetzenden *Liberine* [*RH, RF*] und die inhibierenden *Statine* [*IR, IF*]. Die Konzentration dieser Peptidhormone ist äußerst gering (ng-Bereich), zur Isolierung des ersten Schafs-LH-RH mußten die Zwischenhirne von 300.000 Schlachtieren aufgearbeitet werden.

Ein Beispiel für diese Neurohormone ist das Tripeptid *Thyroliberin* aus Glu, His und Pro. Dabei liegt die N-terminale Glutaminsäure als Pyroglutaminsäure [Pyrrolid-2-on-5-carbonsäure] und das C-terminale

Prolin als Amid vor. *Gonadoliberin* [Gn-RH] ist ein Decapeptid, das ebenfalls keine N-terminale Amino- und C-terminale Carboxylgruppe besitzt. Bei Gn-RH-Mangel setzt die gonadotrope Hypophysentätigkeit aus, was zu Störungen der Fortpflanzungsfähigkeit führt.



Somatotropin [Wachstumshormon, somatotropes Hormon STH, *human growth hormone* HGH] fördert das Knochenwachstum und den Proteinaufbau (anabole Wirkung) und wird heute gentechnologisch hergestellt. *Prolactin* [PRL, *Luteotropin*, Luteotropes Hormon, LTH, Mamotropes Hormon] ist ein bei manchen Tieren gefundenes Peptidhormon aus dem Hypophysen-Vorderlappen, das im weiblichen Organismus, nach vorhergegangener Konzeption, die Milch-Sekretion anregt, die Gewebevermehrung der Brustdrüsen und die Progesteronproduktion stimuliert. Die Aminosäuresequenz des LTH beim Menschen und anderen Säugern ist bekannt, das Schaf-Prolactin (MG 22.500) besteht aus 199 Aminosäuren und drei Disulfidbrücken.

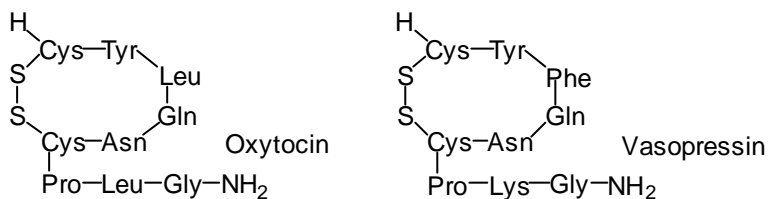
Corticotropin [Adrenocorticotropes Hormon, ACTH] regt die Nebennieren zur Produktion und Sekretion der Corticoide an, ist ein stark basisches Polypeptid und besteht aus 39 Aminosäuren. *Melanotropin* [Melanozyten-stimulierendes Hormon, MSH] wird bei Tieren im Hypophysen-Mittellappen gebildet und reguliert die Pigmentbildung der Haut. Von Bedeutung für die biologische Wirkung des Corticotropins sind die basischen Aminosäuren in den Positionen 15 bis 18 (Lys-Lys-Arg-Arg), Speziesunterschiede treten in den Positionen 25 bis 33 auf (Formel 11-9). Für die biologische Aktivität ist nur ein Teil des Moleküls erforderlich, sie tritt bereits vom N-terminalen Tridecapeptid an auf und steigt mit wachsender Peptidkette.

Zwei verschiedene Melanotropine werden im Hypophysenmittellappen gebildet, α -Melanotropin ist ein Tridecapeptid, Speziesunterschiede wurden nicht gefunden. Beim β -Melanotropin wurden sowohl Speziesunterschiede in der Kettenlänge (Mensch: 22, Schwein: 18 Aminosäuren) als auch in der Sequenz gefunden.

— Asn—Gly—Ala—Glu—Asp—Glu—Ser—Ala—Glu—	Mensch
— Asn—Gly—Ala—Glu—Asp—Glu—Leu—Ala—Glu—	Schwein
— Asp—Gly—Ala—Ala—Ala—Asp—Ser—Ala—Gln—	Rind
— Ala—Gly—Glu—Asp—Asp—Glu—Ala—Ser—Gln—	Schaf

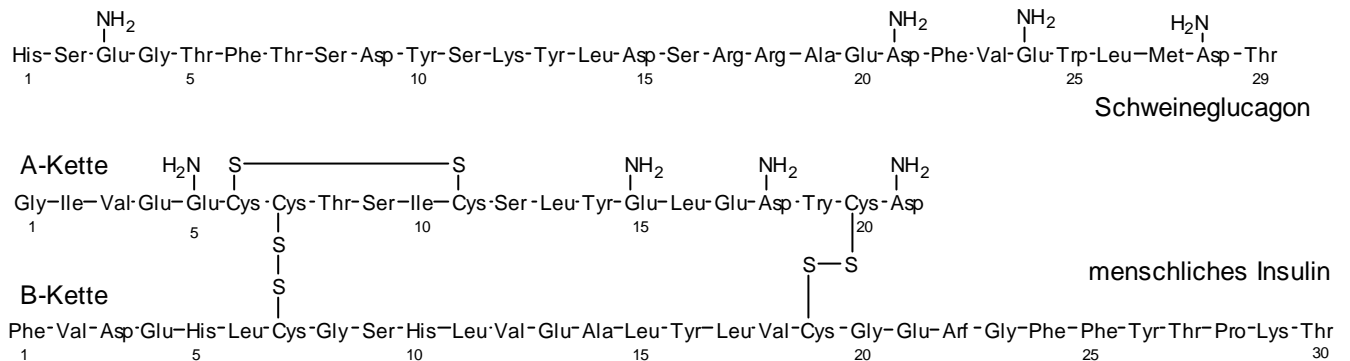
Formel 11-10. Speziesunterschiede des Corticotropins.

Im Hypothalamus gebildet und im Hypophysenhinterlappen freigesetzt werden beim Menschen die Cyclopeptide Oxytocin und Vasopressin, die man ebenso als Neurohormone bezeichnen kann. Beide gehören zu einer Nonapeptidfamilie, deren Vertreter von allen Wirbeltierklassen gebildet werden. *Oxytocin* bewirkt am Säugetier während der Geburt die Kontraktion der Uterusmuskulatur und stimuliert als Stillhormon gleichzeitig die Mammmuskulatur zur Milchejektion. Die Funktion beim Mann bzw. männlichen Tier ist nicht bekannt. *Vasopressin* wird durch den Blutkreislauf zu den Nieren transportiert, wo es seine hormonelle Wirkung entfaltet. Es unterscheidet sich vom Oxytocin nur in den Aminosäuren der Position 3 und 8. Es besitzt antidiuretische Wirkung [früher *Adiuretin*] Wirkung, die auf einer Steigerung der Rückresorption von Wasser in den Nieren beruht und zur Konzentrierung des Harn führt. Für diese Wirkung auf den Wasser- und Elektrolythaushalt ist eine basische Aminosäure (Arg oder Lys) in 8-Stellung notwendig. In hohen Dosen steigert es den Blutdruck.



Endorphine [endogene *Morphine*] sind kurzkettige Peptide, die an Schmerzrezeptoren des Zentralnervensystems ZNS angreifen [*Opioid*], und auf der Suche nach den körpereigenen Liganden für den tierischen Opiatrezeptor entdeckt wurden. Säugetiere werden ohne Zweifel ohne Morphin geboren, besitzen aber dafür spezifische Rezeptoren. Man unterscheidet drei Kategorien dieser Peptide, die pentapeptidischen Enkephaline, die Endorphine (von denen das längste β -Endorphin aus 31 Aminosäuren besteht) und die Dynorphine. Die ersten aus Hirnen von Säugern isolierten waren die *Enkephaline* Methionin-Enkephalin [*Met-Enkephalin*] und Leucin-Enkephalin [*Leu-Enkephalin*, KOSTERLITZ und HUGHES, 1975]. Eine Vielzahl anderer Opioidpeptide sind seitdem charakterisiert worden. Offensichtlich ist für die Wirkung von Enkephalinanalogen die phenolische OH-Gruppe des Tyrosins essentiell. Dieses Phänomen wird auch mit Morphin und seinen Analogen beobachtet. Ende der 70er Jahre waren ebenso bereits mehrere spezifische Opiatrezeptoren bekannt (μ -Opiatrezeptor, κ -Rezeptor, σ -Rezeptor) und dafür auch endogene Liganden isoliert wie z.B. das *Dynorphin* für den κ -Rezeptor.

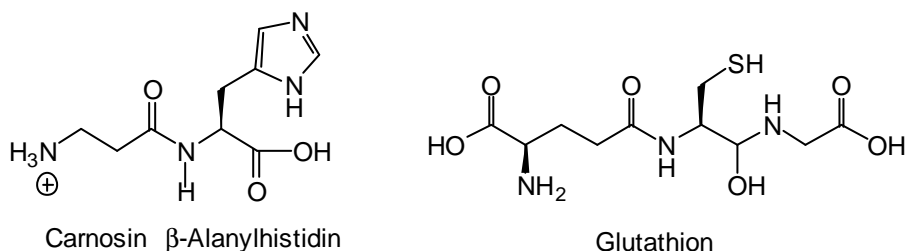
In den Langerhans'schen Inseln der Bauchspeicheldrüse [*Pankreas*] wird in den α -Zellen *Glucagon* gebildet und in den β -Zellen *Insulin* (vgl.), beide werden jedoch auch aus Hypothalamus-Neuronen sekretiert. Schweineglucagon ist ein lineares Polypeptid aus 29 Aminosäuren, das die Gluconeogenese und den Blutzuckerspiegel steigert, während Insulin ihn senkt. Insulin besteht aus zwei Ketten, wovon die A-Kette aus 21, die B-Kette aus 30 Aminosäuren besteht (Molekulargewicht von menschlichem Insulin $M = 5.743$). Die beiden Peptidketten sind über zwei Disulfidbrücken miteinander verbunden.



Formel 11-11. Glucagon aus Schwein und menschliches Insulin.

Die von den Zellen nach aussen abgegebenen Proteine werden meist unmittelbar nach der Biosynthese durch ein sog. Protein-Processing enzymatisch verkürzt, wobei im ersten Schritt aus Präpro-Proteinen (z.B. Präprohormonen) durch Abspaltung von Extensionspeptiden (Signalpeptide, bestehen aus ca. 20 Aminosäuren) die meist noch biologisch unwirksamen Proproteine (z.B. Prohormone) gebildet werden, aus denen durch weitere Verkürzung die eigentlich funktionsfähigen Proteine entstehen. Biosynthetisch entsteht Insulin durch enzymatische Abspaltung einer Schleife aus *Proinsulin*.

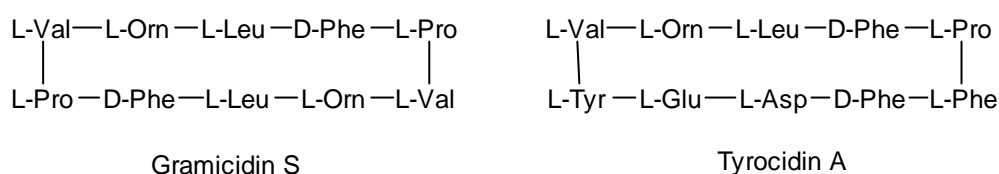
Carnosin [β -Alanyl-histidin] ist ein Dipeptid, das im Muskel vorkommt und dessen Bedeutung noch nicht eindeutig geklärt ist. *Glutathion* spielt als Coenzym in biologischen Redox-Systemen eine wichtige Rolle.



11.6.8 Peptidantibiotika

Peptidantibiotika (vgl. 17.) unterscheiden sich von den meisten anderen Peptiden in ihrer Struktur. Viele sind cyclisch aufgebaut oder enthalten seltene nichtproteinogene Aminosäuren. Die meisten Peptidantibiotika werden in Bakterien, aber auch in Streptomyceten gefunden.

Typische Vertreter cyclischer Peptidantibiotika sind die von *Bacillus brevis* produzierten cyclischen Peptide *Gramicidin S* und *Tyrocidin A* [], weitere Beispiele sind in 17. zu finden.



Depsipeptide sind Metaboliten aus Bakterien und Pilzen, die sich alternierend aus Aminosäuren und Hydroxycarbonsäuren aufbauen und meist cyclische Struktur besitzen.

11.6.9 G-Proteine

M. RODBELL und A.G. GILMAN [Medizin-Nobelpreis 1994] konnten das G-Protein, ein GTP-bindendes, regulatorisches Protein, das G-Protein, isolieren, das eine fehlende Komponente an der intrazellulären Wirkung des extrazellulären Adrenalin-Hormonsignals darstellte. Mehrere Grundtypen von G-Proteinen [*Gs*, *Gi*, *GP*, *Go*, *Transducin*, *ras-Proteine*] sind bekannt. Sie sind nicht nur an der Freisetzung von cAMP, sondern auch an der Produktion anderer sekundärer Signalstoffe beteiligt. Bakterielle Infektionskrankheiten wie Cholera und Keuchhusten sind mit chemischen Veränderungen von G-Proteinen verbunden, auch Erbkrankheiten sind bekannt, die mit defekten G-Proteinen einhergehen.

11.7 Skleroproteine

Die *Skleroproteine* oder Gerüsteiweiße gehören zu den fibrillären Proteinen und haben vor allem im tierischen Organismus Schutz- und Stützfunktionen zu erfüllen. Die bevorzugte Ausrichtung in der Längsrichtung (Faserbildung) bedingt die große mechanische Festigkeit und geringe Löslichkeit. In vielen Fällen sind die Polypeptidketten durch Disulfidbrücken (Keratine), Amidgruppen der Seitenketten (Fibrin) oder verschiedene Strukturen, die von Lysinresten ausgehen (Formel 10-10), quervernetzt. Die typischen Skleroproteine (Kollagengruppe, Keratine) sind enzymatisch sehr schwer abbaubar. Die meisten weichen in ihrer Aminosäurezusammensetzung auch deutlich von der anderer Proteine ab. So kann das Keratin der Haare bis zu 20 % Cystein (Keratin der Haare) enthalten, Kollagen ist besonders

reich an Glycin (27 %), Prolin (15 %) und Hydroxyprolin (14 %), und das Fibroin der Seide besteht hauptsächlich aus Glycin, Alanin und Serin.

Nach der vorherrschenden Sekundärstruktur bzw. ihren röntgenographischen Identitätsperioden werden die Skleroproteine in drei Gruppen eingeteilt:

	Identitätsperiode	Sekundärstruktur
Kollagen-Gruppe	0.28 - 0.29 nm	Tripelhelix
α -Keratin, Myosin, Fibrinogen, Epidermitin	0.51 - 0.54 nm	α -Helix, z.T. als Superhelix
β -Keratin, Seiden-Fibroin	0.65 - 0.70 nm	Faltblattstruktur

10.7.1 Kollagengruppe

Kollagen und das ähnlich aufgebaute Elastin sind neben verschiedenen Proteoglykanen (vgl. Kap.) die Grundbausteine des tierischen Bindegewebes. Das faserartige *Kollagen* ist in Haut, Knochen, Knorpeln, Sehnen und Bindegewebe enthalten und die im menschlichen und tierischen Organismus am häufigste vorkommende Proteinklasse. Allen 17 bekannten Kollagentypen ist ein tripelhelicaler Aufbau gemeinsam. Drei Polypeptidketten, von denen mindestens zwei identisch sind, bilden eine Tripelhelix in Form eines starren Seils (Abb. 10-5). Die Länge der Tripelhelix sowie Art und Lage nichthelicaler Bereiche variieren zwischen den einzelnen Kollagentypen, häufig wiederkehrende Sequenzen sind $-(\text{Gly-AS-Pro})_n-$ und $-(\text{Gly-AS-4Hyp})_n-$.

Kollagen wird durch Erwärmen mit Wasser denaturiert und ist dann enzymatisch abbaubar. Längeres Kochen oder chemisch-thermische Verfahren bewirken die Bildung von *Gelatine*. Dies ist ein als Nahrungsmittel ungeeignetes Protein, da die essentiellen Aminosäuren fehlen. Gelatine bildet in Konzentrationen über 0.4 % ein Gel, das durch die Ausbildung lokaler Tripelhelix-Strukturen [*junction zones*] zustande kommt und beim Erwärmen in eine viskose Lösung übergeht. Gelatinehaltige Produkte kommen als kalorienreduzierte Nahrungsmittel in den Handel und als Bindemittel in Lebensmittel. Gelatine verleiht z.B. Gummibärchen den spezifischen Biss. Sie wird als geschmacksneutrales Hüllmaterial für Pharmaka verwendet, in der Photographie diente Gelatine als Matrix für lichtempfindliche Silbersalze.

11.7.2 Keratine

Die *Keratine* stellen bei den Wirbeltieren die Gerüstsubstanz der Haare, Wolle, Hörner, Nägel und Federn dar. Man unterscheidet Keratine vom α - und β -Typ, die des α -Typs liegen vorwiegend als Helices, β -

Keratine hingegen in Faltblattstrukturen vor. Beide Typen können ineinander übergehen. Das Dehnen des Haares z.B. bewirkt einen Übergang von α -Keratin \Rightarrow β -Keratin). Zu den auch als harte Keratine bezeichneten β -Keratinen gehören vor allem die Keratine der Nägel, Federn und Schuppen.

Zu den α -Keratinen gehört das Keratin der Wolle. Die aus α -Helices gebildeten Fasern sind bis auf ihre doppelte Länge ausdehnbar und ungewöhnlich elastisch, reißen aber relativ rasch. Mehrere α -Helices des Wollkeratins bilden eine Protofibrille. Aus (9+2) solcher Protofibrillen sind dann die Mikrofibrillen zusammengesetzt, von denen wiederum viele eine Makrofibrille bilden (Abb. 10-24).

11.7.3 Fibrilläre Proteine der Muskelzellen

Die *Myofibrillen* der Muskelzellen enthalten in Wasser unlösliche Proteine, die sich aufgrund unterschiedlicher Löslichkeit in Salzlösungen in Myosin, Actin und Tropomyosin auftrennen lassen.

Myosin ist ein fibrilläres Protein mit einem Molgewicht von ca. 500 kDa, das aus zwei schweren (200 kDa) und vier leichten Polypeptidketten (ca. 20 kDa) besteht. Die schweren Ketten bilden eine Superhelix in Form eines langen α -helikalen Stabes und zwei kugelförmige Köpfe, an die jeweils zwei unterschiedliche leichte Ketten gebunden sind. Es handelt sich um die längsten bekannten Polypeptidketten, zusammen mit Actin bewirkt Myosin die Kontraktion der Muskeln.

Actin ist das zweite wichtige Muskelprotein und ein in der Natur weit verbreitetes Proteine. Es kommt aber auch in fast allen eukaryotischen Nichtmuskelzellen vor, macht dort bis zu 10 % der löslichen Proteine aus und ist an Bewegungsvorgängen und der Stabilisierung zellulärer Strukturen beteiligt. Darüber hinaus konnte Actin in pflanzlichen Zellen und in Prokaryoten nachgewiesen werden. Es besteht aus einer Polypeptidkette mit 375 Aminosäuren (MG 42 kDa). Die Aminosäure-Sequenzen verschiedener Actine stimmen weitgehend miteinander überein. Actin kann als monomeres *G-Actin* (globuläres Actin) und als filamentäres *F-Actin* (fibrilläres oder fädiges Actin in Gestalt einer langen Spirale) vorliegen. Monomeres G-Actin (MG = 42.000 Da) polymerisiert zum F-Actin, welches einen Komplex mit dem Myosin eingeht [Actomyosin]. Im Muskel bildet Actin die dünnen Filamente, die gemeinsam mit den dicken Myosin-Filamenten die Muskelkontraktion bewirken.

Actomyosin, der Komplex aus Actin und Myosin, ist das eigentlich kontraktile Protein des Muskels. In Gegenwart von ATP tritt eine Verkürzung der Actomyosin-Fäden ein. Im entspannten Zustand ist die Bildung des Actomyosins und damit der ATP-Verbrauch durch Regulatorproteine gehemmt, die sich bei

quergestreifter [*Troponin C*, *Calmodulin*] und glatter Muskulatur [*Caldesmon*, *Calmodulin*] in Zusammensetzung, Lokalisation und Wirkungsmechanismus unterscheiden.

11.7.4 Seiden-Fibroin

Die typischen Vertreter der Skleroproteine in der Faltblattstruktur sind die *Seidenfibroine*. Der kristalline Teil des Seidenfibroins besteht aus sich wiederholenden Hexapeptideinheiten der Struktur $-(\text{Glu-Ser-Gly-Ala-Gly-Ala})_n-$, die eine antiparallele Faltblattstruktur ausbilden. Die Abstände zwischen den Schichten betragen 0.57 bzw. 0.35 nm, je nachdem, ob die Glycin- oder Alanin- bzw. Serinreste zusammenliegen (Abb. 10-25). Durch die Faltblattstruktur sind die Seiden sehr reißfest, aber nur wenig dehnbar. Einzelne Seiden unterscheiden sich in der Größe ihrer kristallinen Bereiche. Bei der bekannten Seide des Maulbeerseidenspinners [*Bombyx mori*] liegen etwa 60 % des Proteins in der Faltblattstruktur vor.

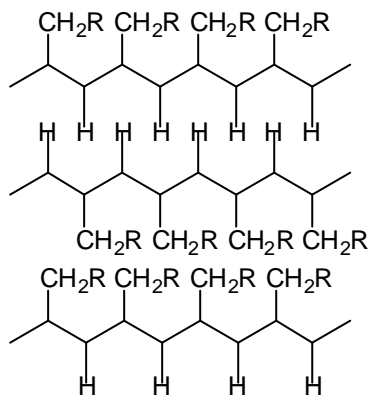


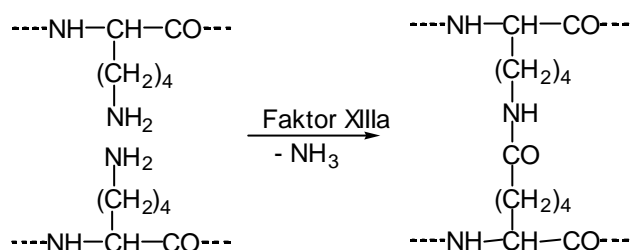
Abb. 10-25. Faltblattstruktur des Seidenfibroins.

11.7.5 Fibrinogen-Fibrin, Blutgerinnung und Fibrinolyse

Fibrinogen ist ein lösliches Protein der Molmasse 340.000 und wird aus drei Paaren nicht identischer Polypeptidketten gebildet. Im Verlauf der *Blutgerinnung* wird das zu 3 - 4 % im Blutplasma enthaltene Fibrinogen in das unlösliche polymere Proteingel *Fibrin* durch das *Thrombin* [*Fibrinogenase*, eine Serin-Protease], umgewandelt. Der erste Schritt ist die Verkürzung zweier Polypeptidketten des Fibrinogens unter Abspaltung der *Fibrinopeptide A* und *B*. Die Fibrinopeptide bestehen bei den niederen Wirbeltieren aus 40 - 45 Aminosäuren und bei den Säugern aus 13 - 21 Aminosäuren.

Frisch entstandenes Fibrin ist praktisch unlöslich. Die Fibrinmonomeren werden durch Wasserstoffbindungen zu Fibrinfasern zusammengehalten, die einen hohen Grad an α -Helixstrukturen enthalten.

Die letzte Phase der Blutgerinnung ist die Quervernetzung der Fibrinmonomeren durch den aktiven *Faktor XIII* (= XIIIa). Der Faktor XIIIa ist eine Aminoacyltransferase, die die Bildung einer Amidbindung aus der ϵ -Aminogruppe eines Lysinrestes und der Amidgruppe eines Glutaminrestes unter Abspaltung von Ammoniak katalysiert.



Bei der *Fibrinolyse* wird das Fibrin durch die Protease Plasmin enzymatisch zu Polypeptiden und Aminosäuren abgebaut.

10.8 Konjugierte Proteine - Proteide

Einige Proteine enthalten nicht-aminosäureartige Bausteine, die für die biologische Aktivität dieser Proteine essentiell sind. Bei diesen Strukturuntereinheiten, die kovalent oder nicht-kovalent gebunden vorliegen, kann es sich um Phosphorsäure, um Kohlenhydrate, ein komplex gebundenes Metallatom, Nucleinsäuren, Lipide oder verschiedene Chromophore handeln. Solche Proteine werden *als konjugierte Proteine* oder *Proteide* bezeichnet (Tab. 11-9).

Tab. 11-9. Konjugierte Proteine oder Proteide

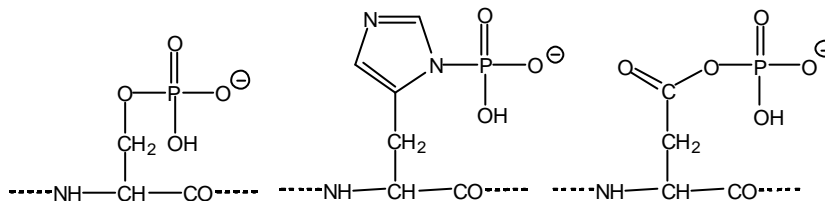
Gruppe	Nichtprotein- Bestandteil	Bindung	
Phosphoproteine	Phosphorsäure	kovalent an Hydroxy-, Carboxyl- oder Imidazolreste	Kap.
Metalloproteine	Metall	Ionenbeziehungen, Komplexbindung	Kap.
Glycoproteine	Kohlenhydrate	N- oder O-glykosidisch	Kap.
Nucleoproteine	Nucleinsäuren	Ionenbeziehungen	S.

Lipoproteine	Lipide	nicht-kovalent	Kap.
Chromoproteine	verschiedene Chromophore	verschieden	Sehpigmente (S.), Flavoproteine (S.), Hämoglobine (S.), Cytochrome (S.), Carotinoide (S.), Phycobiliproteine (S.)

11.8.1 Phosphoproteine

Zahlreiche Proteine, Glykoproteine als auch Lipoproteine enthalten kovalent gebundene Phosphorsäure oder Pyrophosphorsäure. Es lassen sich drei Bindungstypen unterscheiden,

- eine esterartige Bindung von Phosphorsäure oder Pyrophosphorsäure an Hydroxygruppen, insbesondere des Serins,
- eine amidartige Bindung der Phosphorsäure an die Imidazolreste des Histidins sowie
- die gemischte Anhydridbildung zwischen Phosphorsäure und der Carboxylgruppen von Aminodicarbonsäuren.

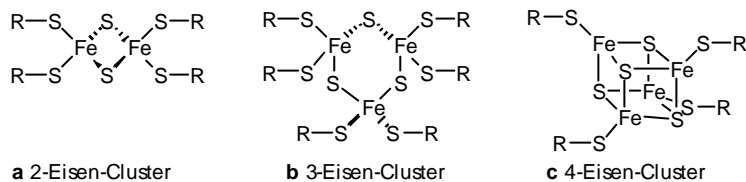


Das wichtigste esterartig an Serin gebundene Phosphoprotein ist das *Casein* der Milch. Bei den Caseinen (α -, β - und κ -Casein) handelt es sich eigentlich um Phosphoglykoproteine. Die Bindungen sind relativ leicht spaltbar, Serinester werden im Alkalischen unter β -Eliminierung gespalten. Im Hühnereiweiß kommt vor allem *Ovalbumin* und *Phosvitin*, ebenfalls ein Phosphoglykoprotein vor. Es enthält mehrere (Ser-P)_n-Sequenzen (n < 8).

11.8.2 Metalloproteine

Zahlreiche Proteine, darunter viele Enzyme (vgl. Kap. 12.) enthalten komplexartig gebundene Metalle, die für die biologische Aktivität essentiell sind (Tab. 11-10). Viele dieser *Metalloproteine* haben ungewöhnliche physikalische Eigenschaften (Elektronenspektren, magnetische Eigenschaften), die auf außergewöhnliche Bindungslängen und -winkel zurückgeführt werden (vgl. Abb. 11-27). Die essentielle Rolle der Metalle für die biologische Aktivität vieler Proteine kann u.a. auch auf einer Beeinflussung der Sekundär- oder Tertiär- bzw. Quartärstruktur der Proteine beruhen.

Als *Liganden* der komplexbildenden Metalle wirken z.B. die Mercaptogruppe des Cysteins, der Imidazolrest des Histidins oder Carboxyl- und Aminogruppen sowie nicht-proteinartige Komponenten wie Porphinderivate (Kap.) oder sog. "labiler" Schwefel. *Ferredoxine* sind Proteine mit einer geraden Anzahl von Eisen und "labilen" Schwefelatomen (2, 4, 6 oder 8 Atome). Sie dienen in Pflanzen und Bakterien als Elektronenüberträger, z.B. bei der Stickstofffixierung oder der Photosynthese (S.) und sind wahrscheinlich phylogenetisch sehr alte Strukturen. Die Ferredoxine haben ein niedriges Redox-Potential und geben ein charakteristisches EPR-Spektrum. Sie werden nach der Anzahl der Eisenatome pro Cluster in 2-, 3-, 4-Eisen-Cluster-Proteine eingeteilt (vgl. Strukturen a, b und c). Die biologische Aktivität wird durch die Reduktion des Fe(III)- zu einem Fe(II)-Atom erklärt. Bei den Fe_4S_4 -Ferredoxinen liegt die $(-\text{Cys}-\text{S}-\text{Fe})_4\text{S}_4$ -Gruppe cubanartig vor (c).



10-19

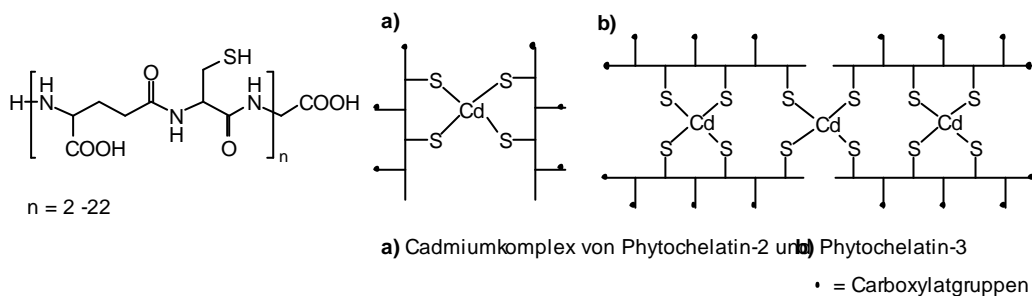
Zu den elektronenübertragenden Metalloproteinen gehören die "blauen" Kupferproteine *Azurine*, darunter das *Plastocyanin* (S.), und die mikrobiellen *Rubretoxine* (Abb. 10-27). Eine besondere Bedeutung haben Metalloproteine als Sauerstoffüberträger [Oxidoreduktasen, Kap. Enzyme], so z.B. die verschiedenen Fe-, Mo- und Mn-haltigen Enzyme (Tab. 10-10). Andere Metalloproteine dienen als Speicher- und Transportformen für bestimmte Metalle, wie das Ferritin und Hämosiderin als Speicherformen für Eisen.

Tab. 10-10. Metalloproteine und ihre biologische Funktion

Metall	Metalloprotein	Funktion
Fe	Häm-Proteine:	O ₂ -Transport
	Hämoglobin, Myoglobin	
	Peroxidasen, Cytochrome, Cytochrom-Oxidase	Enzyme
	Nicht-Häm-Proteine:	O ₂ -Transport bei Invertebraten
	Hämerythrin	
	Ferretin, Hömosiderin	Fe-Speicher
	Transferrin	Fe-Transport
	Ferredoxin	Elektronenüberträger
Nitrogenase	Enzym (N ₂ -Fixierung)	

Cu	Hämocyanin, Cytochrom c Caeruloplasmin, Hepatocuprein Superoxid-Dismutase (Cuprein) Plastocyanin Azurin Tyrosinase Lysin-Oxidase	O ₂ -Transport bei Invertebraten Cu-Transport und -Speicher Enzym Elektronenüberträger in Pflanzen Elektronenüberträger in Bakterien Enzym (Phenoloxidase) Enzym (führt zu Quervernetzung von Kollagen)
Zn	Carboxypeptidase, Thermolysin, Carboanhydrase, Alkohol-Dehydrogenase, Phosphoglyceraldehyd- Dehydrogenase,	Enzyme
Co	Vitamin B ₁₂ -enthaltende Enzyme (Kap.) β-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase	Enzym
Mo	Nitrogenase (auch Fe), Nitrat-Reduktase, Xanthin- Oxidase, Aldehyd-Oxidase	Enzym
Mn	Photosyntheseenzym, Malat-Enzym, Isocitrat- Dehydrogenase Concanavalin A (auch Ca)	Enzym Lectin

Für Organismen ist es lebenswichtig, toxische Schwermetallionen oder Schwermetallüberschuss abzuführen. Pflanzen lösen diese Aufgabe u.a., indem sie sog. *Phytochelatine* bilden, spezielle Peptide, die zahlreiche Metallionen komplexieren können. Phytochelatine enthalten 2- bis 11mal die γ-Glutamylcysteinyl-Sequenz der Stammverbindung Glutathion.



Chromoproteine besitzen farbige Strukturelemente, dazu gehören vor allem Hämoglobin () und Myoglobin ().

11.7.6 Lipoproteine

Lipid-Protein-Wechselwirkungen spielen eine besondere Rolle in den Lipoproteinen der biologischen Membranen (Kap. 2.). Membrangebundene Enzyme sind häufig nur bei Anwesenheit von Lipiden

biologisch aktiv. Die durch Detergentien, Lipasen oder organischen Lösungsmitteln von den Lipiden befreiten Enzyme zeigen oft keine Aktivität mehr, können aber durch Zugabe von Lipiden wieder aktiviert werden. Die Membranlipide sind also gewissermaßen essentielle Cofaktoren dieser Enzyme. Wahrscheinlich bewirken Lipide die Ausbildung einer bestimmten, für die biologische Aktivität erforderliche räumliche Struktur dieser Proteine. Für eine bestimmte membrangebundene (Ca^{2+} - Mg^{2+})-ATPase wurde z.B. eine Abhängigkeit der biologischen Aktivität vom Phasenübergang der gebundenen Phospholipide festgestellt.

Ein wichtiger Risikofaktor zur Entstehung der Artherosklerose ist die Hyperlipidämie, eine zu hohe Lipidenkonzentration (Triacylglycerine und Cholesterin) im Blut. Diese Lipide sind im Blutplasma an bestimmte Proteine gebunden. Die *Plasma-Lipoproteine* dienen zum Transport der Lipide und sind trotz des hohen Lipidgehalts in Wasser löslich. Es wird angenommen, dass die weniger polaren Lipide (Triacylglycerine, Cholesterinester) einen inneren, hydrophoben Bereich mit Teilen des Proteins bilden, während die hydrophileren Bereiche des Proteins oder hydrophile Gruppierungen der Lipide an der Oberfläche angeordnet sind. Die menschlichen Plasma-Lipoproteine sind in 5 Hauptklassen aufgeteilt, in *Chylomicron*, *very-low-density-Lipoproteine*, *low-density-Lipoproteine*, *high-density-Lipoproteine* und *very-high-density-Lipoproteine*. Jede dieser Klassen stellt ein heterogenes, polydisperses System dar.

11.7.7 Glykoproteine - Nucleoproteine - Protamine

Glykoproteine enthalten Kohlenhydratbestandteile, die Hypophysenvorderlappenhormone Thyrotropin und Gonadotropin. Die postsynaptische Organisation der Muskelzelle hinsichtlich Dichte und Zusammensetzung der Acetylcholinrezeptoren wird durch das 200 kDa große Glykoprotein *Argin* organisiert, das das Motoneuron ausschüttet, nachdem es mit der Muskelzelle Kontakt aufgenommen hat.

Nucleoproteine enthalten Nucleinsäuren und sind Zellmembranbausteine. Proteinbestandteile sind die Histone.

Protamine finden sich u.a. im Sperma verschiedener Fischarten, sind stark basisch, da sie bis zu 90 % Arginin enthalten. Sie sind einfache Proteine des Zellkerns und mit Desoxyribonucleinsäuren assoziiert.

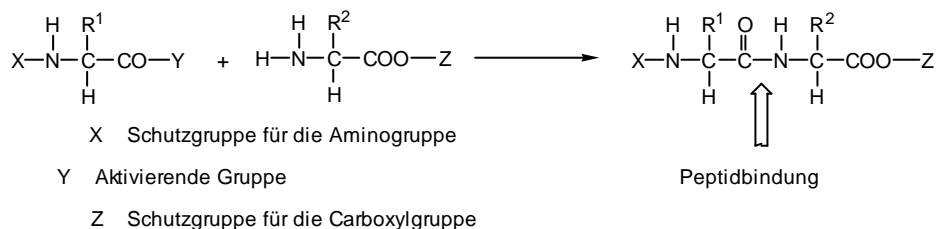
11.8 Peptidsynthesen

11.8.2 Allgemeines

Synthetische Peptide sind wichtige Werkzeuge der Biowissenschaften und besitzen Bedeutung in der Immunologie. Struktur-Aktivitätsbeziehungen und die chemische Modifizierung (10.9.11) biologisch aktiver Peptide stellen weitere Anwendungsgebiete dar.

Die *Totalsynthese* von Peptiden ist die wiederholte Verknüpfung der α -Aminogruppe einer Aminosäure mit der Carboxylfunktion einer anderen Aminosäure unter Bildung der Peptidbindung. *Partialsynthese* bedeutet die synthetische Veränderung und chemische Modifizierung bereits bestehender Proteine. Bei der Protein-*Semisynthese* (10.9.9) geht man von natürlichen Proteinen bzw. Proteinfragmenten aus, die durch Kettenverlängerung oder Verknüpfung zu neuen Proteinen umgewandelt werden. Durch *Kombinatorische Synthese* (10.9.8) lassen sich ganze Bibliotheken von Peptiden synthetisieren und für Wirkstoff-Screenings einsetzen. Getrennt von diesen chemischen Methoden sind Synthesen anzusehen, die auf Prinzipien der Molekularbiologie beruhen.

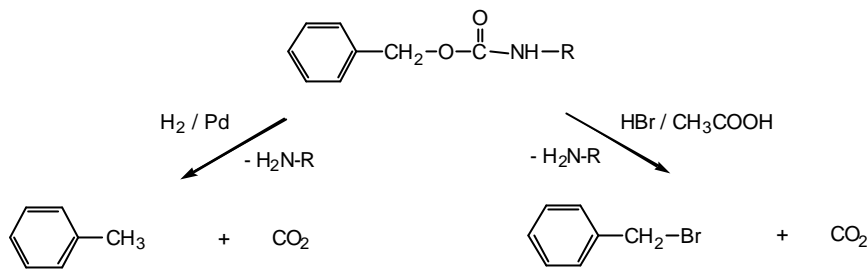
Die Bildung der Amidfunktion erfolgt durch den nucleophilen Angriff der Aminogruppe einer Aminosäure mit dem C-Atom der Carboxylgruppe einer zweiten Aminosäure. Erschwerend ist, dass jeweils zwei Amino- bzw. Carboxylgruppen in den Reaktanden vorliegen, von denen nur je eine an der Reaktion beteiligt sein darf. Ausserdem muss die Carboxylgruppe für den Angriff eines Nucleophils durch geeignete Substituenten aktiviert werden. Dies führte zur Entwicklung spezieller Schutzgruppen und Verknüpfungstechniken für die Peptidsynthese.



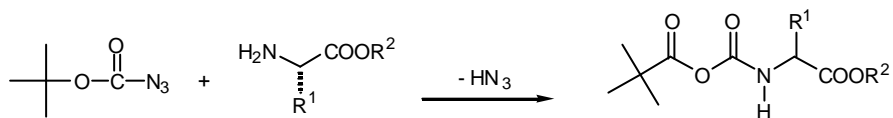
Im allgemeinen erfolgt die Synthese eines Peptids durch a) Einführung entsprechender Schutzgruppen in die Aminosäurebausteine, b) Aktivierung der Carboxylatgruppe, c) Kupplungsreaktion sowie d) abschließende Abspaltung der Schutzgruppen.

11.8.3 Schutzgruppen

Um die Reihenfolge der Verknüpfung der Aminosäuren eindeutig zu determinieren, müssen alle unbeteiligten funktionellen Substituenten durch geeignete Schutzgruppen blockiert werden. Diese Schutzgruppen müssen

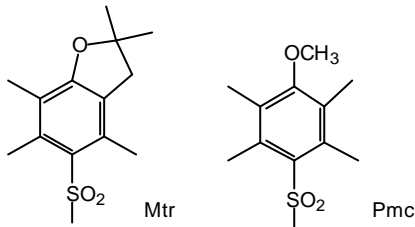


Noch leichter als die Benzylloxycarbonylgruppe ist die *tert*-Butyloxycarbonylgruppe [Boc oder *t*Boc] durch säurekatalysierte Hydrolyse abspaltbar. Zu ihrer Anbringung wird die Aminogruppe einer Aminosäure mit *t*-Butyloxycarbonylazid umgesetzt, bzw. der entsprechende Pentachlorphenylester, das Fluorid oder der N-Hydroxysuccinimidester oder die Natriumsalze der Aminosäuren mit 1-Boc-4-dimethylaminopyridiniumchlorid. Die Boc-Gruppe kann bereits unter Bedingungen abgespalten werden, unter denen die Cbz-Gruppe noch erhalten bleibt. Auf diese Weise kann z.B. Cbz an der permanent zu schützenden ϵ -Aminogruppe des Lysins verbleiben, während Boc als temporäre Schutzgruppe nach jedem Reaktionsschritt von den Aminogruppen entfernt werden kann. Beide Alkyloxycarbonylgruppen haben den Vorteil, dass praktisch keine Racemisierung auftritt.

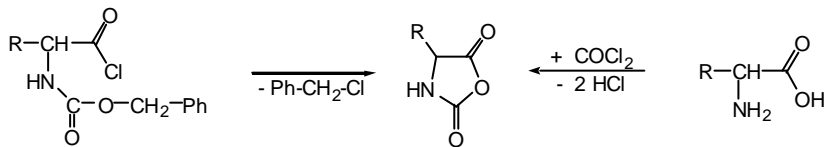


Weitere Urethanschutzgruppen sind die *Cyan-tert*-butyloxycarbonyl- [CyOC] und die *3,5-Dimethoxybenzyloxycarbonyl-Gruppe* [DIMOZ], die sich bei Bestrahlung mit UV-Licht abspalten läßt. Eine ähnliche photolabile Schutzgruppe wäre die *Nitroveratryloxycarbonyl-Gruppe* [NVOC]. Ein N-Acylderivat stellt die von WEYGAND [1952] eingeführte *Trifluoracetylgruppe* [Tfac] dar, die sich infolge des starken -I-Effektes der Fluoratome unter sehr schonenden Bedingungen auch im Alkalischen abspalten läßt, ebenso der *Phthaloylrest* [Phth], der durch Umsetzen mit N-Ethoxycarbonylphthalimid entsteht. Die Schutzgruppe kann durch Hydrazinolyse in Chloressigsäure entfernt werden. Durch schwache Säuren wie z.B. Trifluoressigsäure lassen sich *Biphenylisopropylloxycarbonyl-Gruppe* [Bpoc] und die *Dimethoxydimethylbenzyloxycarbonylgruppe* [Ddz], durch schwache Basen die *9-Fluorenylmethyloxycarbonylgruppe* [Fmoc] abspalten. Die Löslichkeitseigenschaften der *3-(3-Pyridyl)allyloxycarbonylgruppe* [PALOC] erlauben es, Peptidverknüpfungen sowohl in organischen Medien als auch in Wasser durchzuführen. Mit Zn und Eisessig läßt sich der *Trichlorethoxycarbonylrest* [TCIOC] ablösen. Die *p-Toluolsulfonylgruppe* [Tosylgruppe, Tos] ist leicht durch Umsetzen der Aminkomponente mit *p*-Toluolsulfonsäurechlorid einzuführen, sie läßt sich allerdings schwer wieder entfernen (Natrium in flüssigem Ammoniak, DU VIGNEAUD, 1937) und dient höchstens zum Schutz der ϵ -Aminogruppe des Lysins. Der *2-Nitrophenylsulfenyl-Rest* [NPS] kann - neben der *2,4-Dinitrophenylsulfenyl-Gruppe*

[DNPS] - mit den Spaltreagenzien Thiophenol, Thioglykolsäure und Mercaptoethanol selektiv abgespalten werden. Die 4-Methoxy-2,3,6-trimethylbenzolsulfonyl- [Mtr] und die 2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6-sulfonylgruppe [Pmc] dient vorwiegend zum Schutz von Arginin (Tab. 10-11 gibt die chemische Struktur der Amino-Schutzgruppe, das eingesetzte Reagenz und die Spaltbedingungen).



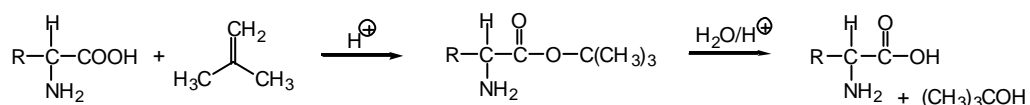
N-Carboxyaminosäureanhydride [Oxazolidindione, LEUCHSSche Anhydride] entstehen aus den Säurechloriden der *N*-Alkoxycarbonylamino-säuren bzw. bei der Umsetzung von Aminosäuren mit Phosgen. Sie besitzen sowohl eine geschützte Aminogruppe als auch eine aktivierte Carboxylgruppe. *N*-Carboxyaminosäureanhydride wurden von LEUCHS bereits zur Synthese von Polyaminosäuren eingeführt und von HIRSCHMANN in größerem Umfang zur Synthese der Fragmente der Ribonuclease eingesetzt [1967].



11.9.2.2 Schutzgruppen für die Carboxylfunktion

Die Hauptaufgabe dieser Schutzgruppen besteht eigentlich darin, durch Substitution die Ammoniumsalzbildung an der Carboxylgruppe durch die zweite Aminosäure zu verhindern. Als einfachste "Schutzgruppe" kann daher schon die Bildung des Carboxylatanions angesehen werden.

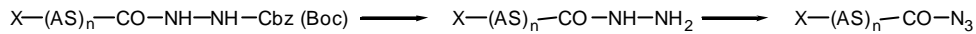
Als Säureschutzgruppen kommen nur Substituenten in Frage, die nicht zu einer Aktivierung der Carboxylgruppe führen und gleichzeitig auch wieder leicht abgespalten werden können. Praktische Bedeutung haben daher nur verschiedene Ester wie z.B. *t*-Butylester, Benzylester und andere. Die *tert*-Butylgruppe wird durch sauer katalysierte Hydrolyse, die Benzylgruppe durch katalytische Hydrierung abgespalten. 4-Nitrobenzylester bieten den Vorteil leichter Kristallisierbarkeit. Auch 4-Methoxybenzylester finden in der Peptidchemie Anwendung.



Tab. 11-11. Schutzgruppen für die Aminofunktion

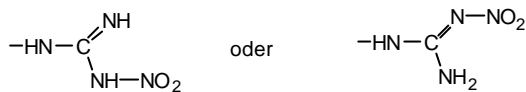
Name	Abk.	Struktur	Abspaltung
Benzoyloxycarbonyl, Carbobenzoxy	Cbz, Z, CbO		Katalytische Hydrierung, HF, HBr/Eisessig, Na/NH3 fl.
t-Butyloxycarbonyl	Cbz, Z, CbO		CF3COOH/CHCl3, HBr/AcOH, HF/H2O
Dimethoxybenzyloxy- carbonyl	DIMOZ		UV-Licht/H2O
Cyan-t-butyloxy carbonyl	CyOC		K2CO3/H2O, Triethylamin
Trifluoracetyl	Tfac, TFA		NH3/H2O, HCl/H2O, NaBH4/CH3OH
Phthaloyl	Phth		N2H4/H2O, N2H4/ClCH2COOH, HBr/AcOH
2-Biphenyl-4-isoprop- oxy-carbonyl	Bpoc		milde säurekatalysierte Hydrolyse, ClCH2COOH/CH2Cl2
3,5-Dimethoxyphenyl- isopropoxy-carbonyl	Ddz		milde säurekatalysierte Hydrolyse
Fluorenyl-9-methoxy- carbonyl	Fmoc, FMOC		milde alkalische Hydrolyse, fl. NH3, Ethanolamin, Morpholin
3-(3-Pyridyl)allyloxy- carbonyl	PALOC		Pd(0)-katalysierte Allyl- übertragung auf Nucleophile Zn/HOAc, Zn/CH3OH
Trichlorethoxycarbonyl	TCIOC		
p-Toluolsulfonyl	Tos		Na/fl NH3
2-Nitrophenylsulfenyl	NPS		$\left\{ \begin{array}{l} \text{HCl/C}_2\text{H}_5\text{OH, Raney Nickel} \\ \text{Thiophenyl,} \\ \text{HSCH}_2\text{COOH} \\ \text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{COOH} \end{array} \right.$
2,4-Dinitrophenylsulfenyl	DNPS		

Unter den Bedingungen der Peptidsynthese dürfen die Carboxyschutzgruppen nicht zu einer Acylierung führen, da es sonst zu unerwünschten Nebenreaktionen (Selbstkondensation) kommt. Bei der *backing-off-Methode* [10.9.4] werden Carboxyschutzgruppen eingesetzt, die unter den Bedingungen der Kupplungsreaktion (z.B. mittels der Methode der gemischten Anhydride) nicht acylierend wirken, aber unter anderen Bedingungen unmittelbar oder nach chemischer Umwandlung mit Aminogruppen reagieren können. So läßt sich z.B. ein Cbz- oder Boc-geschützter Hydrazidrest nach Abspaltung der Schutzgruppe in einen sehr reaktiven Azidrest umwandeln.

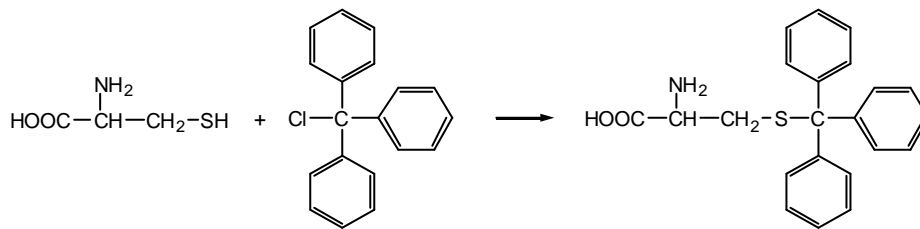


11.9.2.3 Schutz funktioneller Gruppen der Seitenketten

Diese Schutzgruppen sollen meist einen permanenten Schutz während der gesamten Peptidsynthese gewähren. Die stark basische *Guanidgruppe* des Arginins läßt sich bereits durch Protonierung schützen. Der basische Charakter der Gruppe kann durch Überführung in die Nitroguanidinogruppe reduziert werden, die Abspaltung erfolgt hydrogenolytisch, durch Zn/H⁺ oder durch elektrolytische Reduktion.



Von besonderer Bedeutung ist der Schutz der stark nucleophilen und leicht zu oxidierenden *Mercaptogruppe* des Cysteins. Schutzgruppe der Wahl ist die *Benzylthiogruppe* [DE VIGNEAUD, 1930], die durch Natrium in flüssigem Ammoniak abgespalten werden kann. Diese drastische Methode führt jedoch auch zu teilweiser Aufspaltung der Peptidbindungen. Insbesondere durch die Probleme, die durch die Synthese polycyclischer heterodeter Peptide (Insulinsynthese, Abb.) auftraten, wurden über 40 Schutzgruppen für die Mercaptogruppe in die Peptidsynthese eingeführt, so die *Tryl-*, *Benzhydryl-*, *Benzoyl-* oder *Acetamidomethylgruppe* -S-CH₂-NH-CO-CH₃. Die Trylgruppe läßt sich mit H⁺/Hg²⁺/I₂ wieder abspalten. Die gebräuchliche *2,2-Diethoxycarbonyl-ethylgruppe* [DCE] wird über den Methylene-malonsäurediethylester eingeführt und läßt sich mit verdünntem Alkali wieder abspalten. Weitere Schutzgruppen sind die *1-Phenylcyclohexyl-* [PCH] und die *Ethylmercaptogruppe* (SEt).



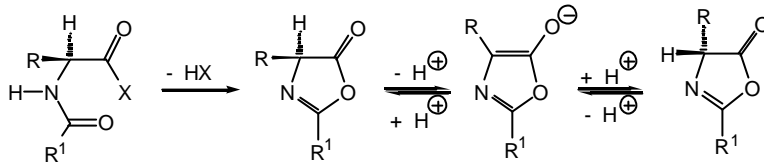
Die *Methylthiogruppe* des Methionins wird mit H₂O₂ zum Sulfoxid oxidiert und zur Wiederherstellung letzteres mit Thioessigsäure reduziert. Zum Schutz der ϵ -*Aminogruppe* des Lysins acyliert man mit 1-Isopropyl-isobutylchloroformiat und spaltet den entstandenen Kohlensäureester wieder mit HF/Anisol. Die zweite *Carboxylgruppe* von Asparaginsäure wird zweckmäßigerweise als *t*-Butylester geschützt, Serin wird üblicherweise mit Benzylbromid zum Benzylether umgesetzt.

Zur Blockierung der *Imidazolgruppe* und der *Iminogruppe* des Histidins werden neben dem Benzylrest die *2,2,2-Trifluor-1-benzylloxycarbonylaminoethyl-* [Z-TFA] und die *2,2,2-Trifluor-1-tert-*

butyloxycarbonylaminoethylgruppe [BOC-TFA] verwendet. Die Amidfunktion des Asparagins und Glutamins kann durch die *2,4-Dimethoxybenzyl-* [DMB] und die *2,4,6-Trimethoxybenzylgruppe* [TMB] vor unerwünschten Reaktionen bewahrt werden.

10.9.3 Aktivierung der Carboxylgruppe, Knüpfung der Peptidbindung

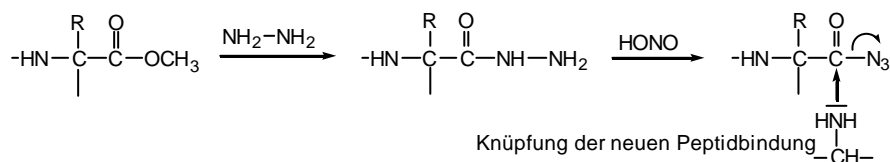
Bei der Peptidverknüpfung kommt es häufig durch die als Zwischenstufen auftretenden N-Acylamino-säuren zur Azlactonbildung und damit zur Racemisierung. Im Azlacton [Oxazolone] ist das α -H-Atom acid, durch Deprotonierung entsteht ein planares aromatisches π -System, das bei Reptonierung zu racemischen Produkten führt.



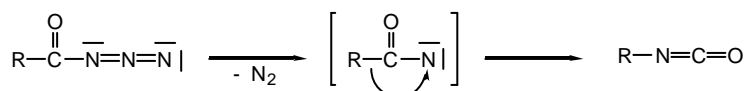
Unter den Methoden, die eine racemisierungsarme Aktivierung der Carboxylgruppe und Knüpfung der Peptidbindung ermöglichen, hat sich besonders der Einsatz von Aziden, Imidazolen, aktivierten Estern, gemischten Anhydriden und die Carbodiimid-Methode bewährt.

10.9.3.1 Azid-Technik

Die *Azid-Technik* [CURTIUS, 1902] ist wohl die älteste Methode einer racemisierungsarmen Peptid-synthese. Carbonylazide zeigen eine geringe Tendenz zur Racemisierung und sind leicht über die Hydrazide und Reaktion mit salpetriger Säure erhältlich. Da mit wachsender Kettenlänge des Peptids die Umsetzungsgeschwindigkeit des Esters mit dem Hydrazin immer geringer wird, wird in solchen Fällen oft mit dem *backing-off*-Verfahren [10.9.2.2] gearbeitet.

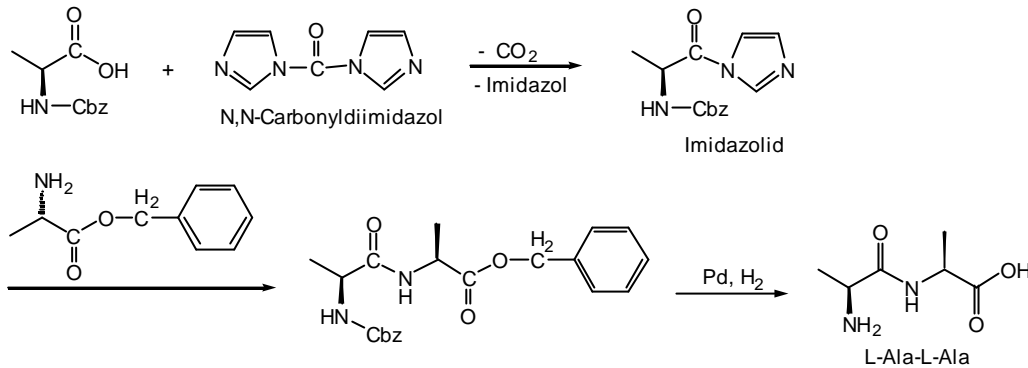


Nachteilig ist, dass Säureazide thermisch nicht sehr stabil sind und zur CURTIUS-Umlagerung neigen. Unter Abspaltung von N_2 zum Nitren lagern sie sich leicht zu Isocyanaten um, die wiederum mit Aminosäuren reagieren.



11.9.3.2 Imidazol-Methode

Die Umsetzung einer N-geschützten Aminosäure mit N,N-Carbonyldiimidazol führt zu einem Carbonsäureimidazolid, das in seiner Reaktivität den Säurechloriden ähnelt. Das Imidazolid reagiert mit einem Aminosäureester zum Dipeptid.

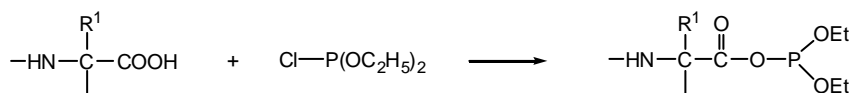


11.9.3.3 Aktivierte Ester

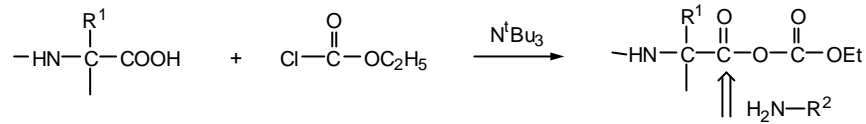
Die Reaktivität der Carbonylgruppe einer Estergruppierung läßt sich durch elektronenziehende bzw. leicht polarisierbare Gruppen in der Alkohol- bzw. Phenolkomponente des Esters erhöhen. Solcherart aktivierte Ester können durch Aminolyse leicht in die entsprechenden Säureamide überführt werden. Diese Kupplungsmethode wurde mit den Thiophenylestern durch TH. WIELAND 1951 in die Peptidsynthese eingeführt. Bedeutung in der Peptidsynthese haben neben S- und Se-Arylestern verschiedene O-Arylester (z.B. 4-Nitrophenyl- oder Pentachlorphenylester), O-Alkylester (Cyanomethylester) oder Hydroxylaminderivate (N-Hydroxysuccinimidester) erlangt.

11.9.3.4 Gemischte Anhydride

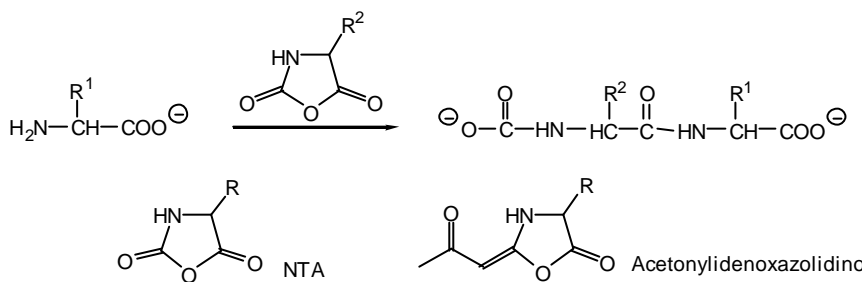
Gemischte Anhydride aus geschützten Aminosäuren oder Peptiden und Kohlensäurehalbestern lassen sich durch Umsetzen von Aminosäuren mit Chlorameisensäureester darstellen. Der Angriff der Aminogruppe einer zweiten, N-geschützten Aminosäure erfolgt an dem C-Atom des Anhydrids, das die geringste Elektronendichte besitzt und sterisch am wenigsten gehindert ist. Der Vorteil dieser sowohl bei der Peptidsynthese als auch bei der Modifizierung von Proteinen häufig angewandten Methode [WIELAND, BOISSONNAS, VAUGHAN] ist die Bildung von leicht abtrennbaren Nebenprodukten (CO₂ und Ethanol).



Ähnlich reagiert ein gemischtes Anhydrid aus der entsprechenden Aminosäure und Phosphorigsäurediethylester.

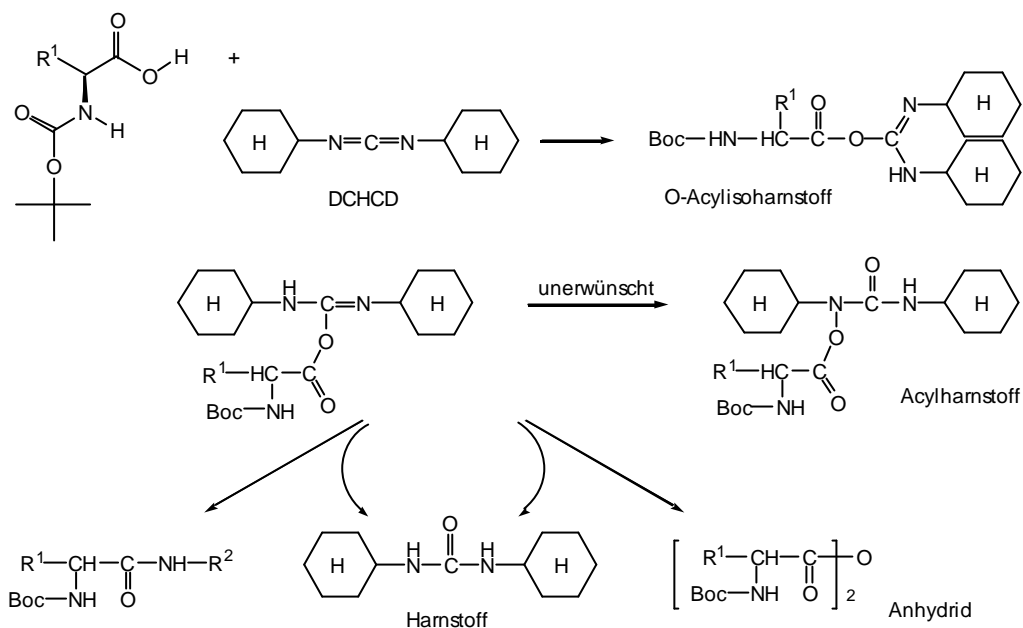


Als "intramolekulare" gemischte Anhydride sind die N-Carboxyaminosäureanhydride [NCA, LEUCHSsche Anhydride] aufzufassen, die aus Aminosäure und Phosgen dargestellt werden. Durch Zugabe von NCA zur wässrigen Lösung eines Salzes einer Aminosäure lässt sich durch aminolytische Ringöffnung und Decarboxylierung eine Kettenverlängerung um eine Aminosäure-Einheit erreichen. Ähnliche Bedeutung haben die S-analogen N-Thiocarboxyaminosäureanhydride [Thiazolidin-dione-(2,5), NTA] und die 2-Acetylidoxazolidin-5-one.

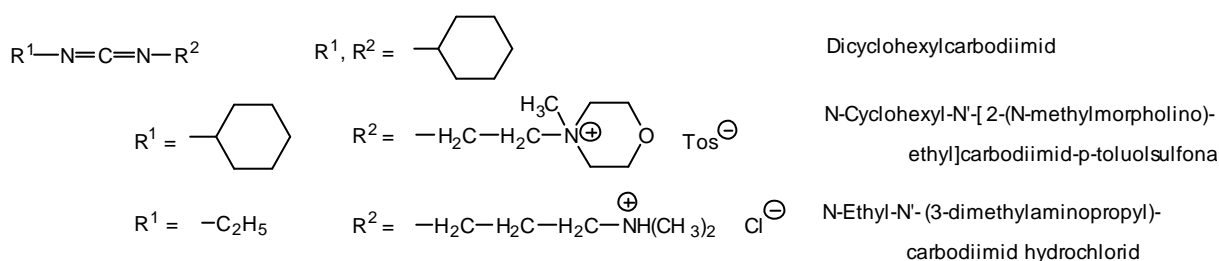


11.9.3.5 Carbodiimid-Methode

Bei der Carbodiimid-Methode [SHEENAN und HESS 1955] bildet sich aus Dicyclohexylcarbodiimid [DCC, DCHCD] und einer N-Acylaminosäure ein reaktionsfähiger O-Acylisoharnstoff. Der reagiert entweder direkt mit einer zweiten Aminkomponente oder zunächst mit einem weiteren Molekül Carbonsäure unter Bildung eines symmetrischen Anhydrids, das dann mit einem Amin zum Amid reagiert. Als Nebenprodukt wird der entsprechende Harnstoff gebildet, der sich oft schwer abtrennen lässt. Unerwünscht ist die Umlagerung des O-Acylisoharnstoffs zum Acylharnstoff, der nicht mehr acylierend wirkt.

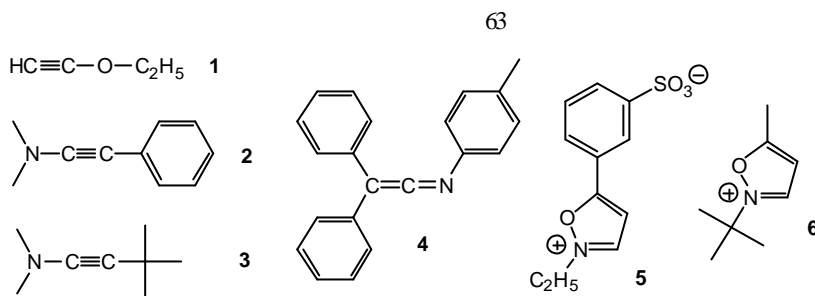


Für Umsetzungen in wässrigen Lösungsmitteln werden wasserlösliche Carbodiimide wie N-Cyclohexyl-N'-[2-(N-methylmorpholino)ethyl]carbodiimid-p-toluolsulfonat oder N-Ethyl-N'-(3-dimethylamino-propyl)carbodiimid-hydrochlorid verwendet.

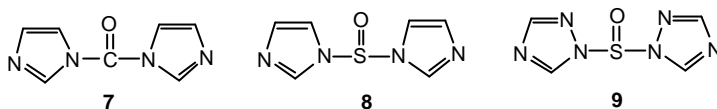


11.9.3.6 Weitere Kupplungsreagenzien

Weitere Kupplungsreagenzien, die die Carboxyl-Komponente durch Bildung einer Zwischenverbindung aktivieren, sind z.B. Ethoxyacetylen **1**, die Imine Dimethylaminophenylacetylen **2** und Dimethylamino-*tert*-butylacetylen **3**, sowie Diphenyl-N-*p*-tolylketimin **4**. Von WOODWARD *et al.* stammen die beiden Isoxazoliumsalze **5** und **6**, die sich in der Peptidchemie bewährt haben.

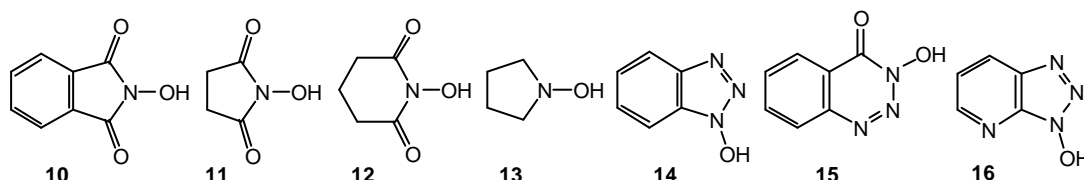


Auch Carbonyldiimidazol **7**, Thionyl-diimidazol **8** und Carbonyl-di-1,2,4-triazol **9** eignen sich gut als Kondensationsreagenzien.



11.9.3.7 O-Acylierte Hydroxylamine

Esterartige Produkte aminogeschützter Aminosäuren mit N-Hydroxyphthalimid **10**, N-Hydroxysuccinimid **11**, N-Hydroxyglutaramid **12** und N-Hydroxypiperidin **13** werden mit Erfolg in der Peptidsynthese zur Kupplung verwendet. Neueren Datums ist der Einsatz von N-Hydroxybenzotriazol **14**, 3-Hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-1,2,3-benzotriazin **15** oder 1-Hydroxy-7-azabenzotriazol **16** als Additiva gemeinsam mit Dicyclohexylcarboimid oder aktiven Estern zur Peptidkupplung.

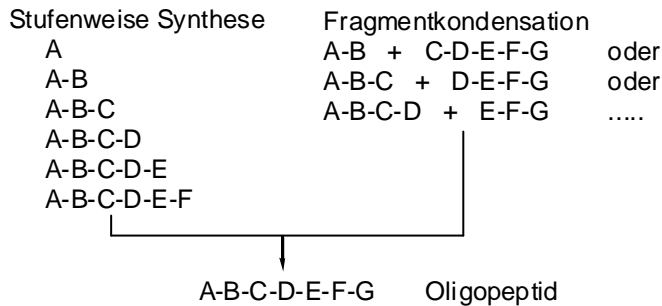


11.9.4 Taktik und Strategie

Unter der *Taktik* der Peptidsynthese versteht man die Auswahl der optimalen Schutzgruppen und Kupplungsmethoden. Dabei dienen *temporäre Schutzgruppen* zum vorübergehenden Schutz einer ϵ -Amino- bzw. Carboxylgruppe und müssen nach jedem Kupplungsschritt wieder selektiv entfernt werden. Daneben gibt es *permanente Schutzgruppen*, die funktionelle Gruppen während der ganzen Peptidsynthese blockieren und erst am Ende entfernt werden. Dies muß unter Bedingungen möglich sein, die eine Racemisierung oder Spaltung der Peptidbindung ausschließen. So können z.B. säurelabile Gruppen als temporäre Schutzgruppen für die ϵ -Aminogruppe und säurestabile Gruppen für den permanenten Schutz von ϵ -Aminogruppen eingesetzt werden. Bei der *Orthogonaltechnik* werden Schutzgruppen eingesetzt, die selektiv unter jeweils anderen Bedingungen (z.B. durch milde

säurekatalysierte oder alkalische Hydrolyse, durch milde Reduktion oder photolytisch) abgespalten werden können.

Unter den für die Peptidsynthese entwickelten *Strategien* kann man zunächst zwischen einem *stufenweisen Aufbau* der Peptidkette und einer *Fragmentkondensation* nach stufenweisem Aufbau dieser Fragmente unterscheiden.



Die Synthese erfolgt dabei im Unterschied zur Biosynthese fast ausschließlich vom C-terminalen Ende her. Die Synthese kann in homogener (konventionelle Synthese) oder in heterogener Phase (Festphasensynthese, z.B. MERRIFIELD-Strategie) durchgeführt werden. Eine Übersicht über die wichtigsten Strategien gibt die Tab. 10.12. Die Abb. 10-27 zeigt in einer gebräuchlichen schematischen Darstellung **a)** eine stufenweise Synthese und **b)** eine Fragmentkondensation am Beispiel der Synthese des Peptidhormons Oxytocin.

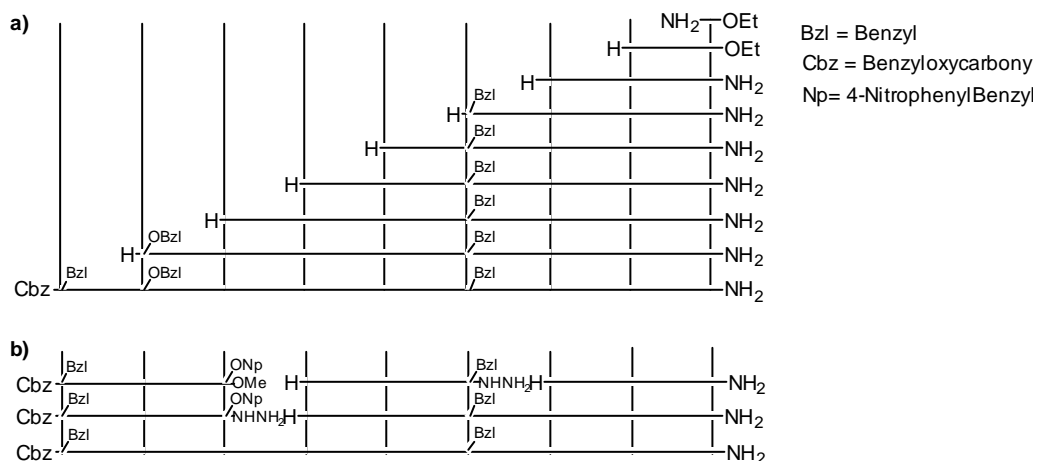


Abb. 11-27. Schematische Darstellung **a)** einer stufenweisen Synthese (nach BODANSZKY und DU VIGNEAUD) und **b)** einer Synthese durch Fragmentkondensation nach der Variante 3 + (3 + 3) (nach BOISSONAS) des geschützten acyclischen Oxytocin.

Tab. 11-12. Wichtigste Strategien zur Synthese von Peptiden (nach WÜNSCH)

Strategie	Charakteristika	Vorteile	Nachteile
1. Konventionelle Synthese mit globaler Schutzgruppentechnik			
1.1 BODANSZKY-Strategie	Stufenweiser Aufbau	Eindeutiger Verlauf der Synthese, Möglichkeit der Reinigung nach jedem Schritt.	Sehr aufwendig, nicht automatisierbar, durch Schutzgruppen Verringerung der Löslichkeit mit steigender Peptidkette.
1.2 SCHWYZER-WÜNSCH-Strategie	Fragment-Kondensation	wie 1.1	wie 1.1, günstige Gesamtausbeute
2. Konventionelle Synthese mit Minimum an Schutzgruppen			
2.1 HIRSCHMANN-Strategie	Fragment-kondensation	Bessere Löslichkeit der Fragmente als nach 1., wie 1.1	Nicht so nebenproduktfrei wie nach 1., Beschränkung auf Azid-Methode
3. Synthese unter Einsatz polymerer Träger			
3.1 MERRIFIELD-Technik	Verwendung unlöslicher Träger (solid phase), stufenweiser Aufbau oder Fragment-kondensation	Abtrennung des wachsenden Peptids durch Filtration, dadurch automatisierbar	Da Ausbeute < 100 % Bildung von Fehl- und Rumpfsequenzen ohne Möglichkeit der Reinigung, Probleme bei Spaltung vom Träger
3.2 BAYER-Strategie	Verwendung hochmolekularer löslicher Träger (liquid phase)	Im Unterschied zu 3.1 Umsetzung in homogener Phase, Trennung durch Ultrafiltration oder Kristallisation	wie 3.1
4. Synthese unter Einsatz polymerer Reagenzien			
KATCHALSKI-WIELAND-FRANKEL-Strategie		Physikalische Abtrennung des Peptids wie bei 3., Möglichkeit der Reinigung des Peptids wie bei 1.1	Grenzen aufgrund sterischer Hinderung

11.9.4.1 Globale Schutzgruppentechnik

Bei der konventionellen Synthese nach der *globalen Schutzgruppentechnik* wird ein möglichst umfassender Schutz [*Maximalschutztaktik*] angestrebt, um Nebenreaktionen an den funktionellen Gruppen der Seitenketten einzuschränken. Dabei treten mit steigender Kettenlänge der Peptide Probleme aufgrund verringerter Löslichkeit und vermehrter Raumbeanspruchung auf. Aus diesem Grunde ist auch die Gesamtausbeute nach der Fragmentkondensation höher als nach der stufenweisen Synthese. Die Grenzen liegen beim stufenweisen Aufbau bei 20 - 30 Aminosäuren und bei der Fragmentkondensation bei 40 - 50 Aminosäuren. Bei der stufenweisen Synthese kommt erschwerend hinzu, dass die analytisch erfaßbaren Unterschiede zwischen den einzelnen Peptidzwischenstufen mit steigender Kettenlänge immer geringer werden. Die schrittweise Methode wird daher vor allem zur Synthese der für die Fragmentkondensation erforderlichen Partialsequenzen herangezogen.

11.9.4.2 Minimum an Schutzgruppen

HIRSCHMANN hat die Taktik des *minimalen Schutzes der funktionellen Gruppen* der Seitenketten entwickelt, durch die die Löslichkeit der Fragmente erhöht werden sollte. Es gelang nach dieser Methode Ribonuclease S durch Fragmentkondensation (Abb. 10-28) zu synthetisieren.

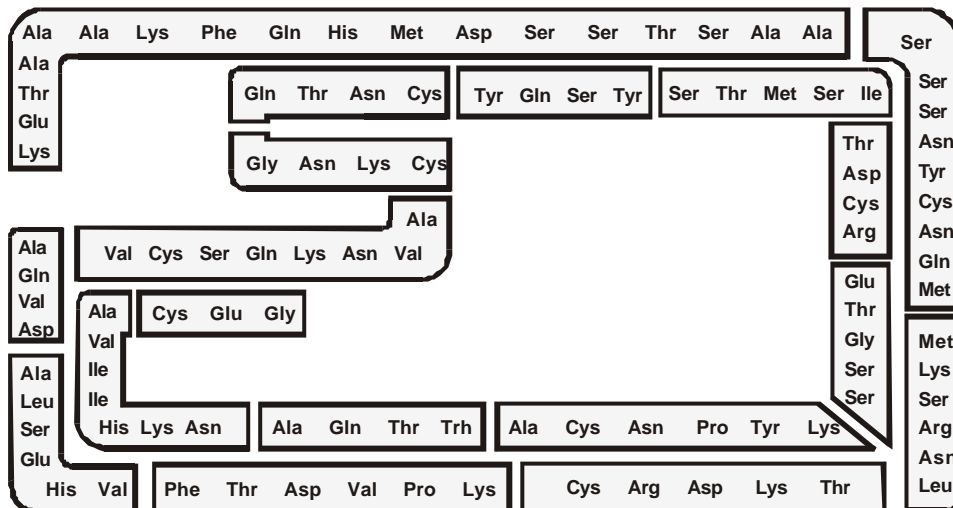


Abb. 11-28. Von HIRSCHMANN ausgewählte Fragmente zur Synthese der Rinderpankreas-Ribonuclease S (vgl. Abb. 10.30).

Die Synthese der Fragmente erfolgte weitgehend unter Einsatz der Aminosäure-N-Carboxy-Anhydride sowie der N-Hydroxysuccinimid-Ester. Die Verknüpfung der Fragmente erfolgte nach der Azid-Methode. Geschützt wurden lediglich die ϵ -Aminogruppe des Lysins und die Mercaptogruppe des Cysteins. Der sparsame Einsatz der Schutzgruppen und die Beschränkung auf die Azid-Methode bieten allerdings die Möglichkeit für störende Nebenreaktionen.

Der Nachteil der konventionellen Methode besteht darin, dass nach jedem Syntheseschritt eine aufwendige Abtrennung des Reaktionsprodukts von Ausgangs- und Nebenprodukten erfolgen muß und sich die Synthese nicht automatisieren läßt. Diese Probleme lassen sich umgehen, wenn der Aufbau des Peptides an einem hochmolekularen unlöslichen (10.9.4.2) oder löslichen (10.9.4.3) Träger vorgenommen wird.

11.9.4.2 MERRIFIELD-Methode, Festphasensynthese

Die *Festphasensynthese* [solid phase method] wurde 1963 von MERRIFIELD [Nobelpreis 1984] in die Peptidsynthese eingeführt. Nach der MERRIFIELD-Technik wird zuerst die am Stickstoff geschützte C

terminale Aminosäure kovalent an einen unlöslichen Träger gebunden. Nach Abspaltung der N-Schutzgruppe wird schrittweise in heterogener Phase die nächste Aminosäure gekuppelt. Die Kupplung erfolgt gewöhnlich mit Carbodiimid oder nach der Methode der aktivierten Ester. Nach jedem Syntheseschritt wird das am Träger gebundene Peptidprodukt durch Filtrieren abgetrennt und gewaschen. Zum Abschluß wird das Endprodukt durch Behandlung mit HBr in Trifluoressigsäure vom Träger gelöst.

Als klassischer Träger dient mit Divinylbenzol quervernetztes Polystyrol, zunehmend werden heute Harze auf der Basis von Polyethylenglycol verwendet, die Reaktionsbedingungen erlauben, unter denen Polystyrol nicht stabil ist. Das Harz wird chlormethyliert; die Bindung der Aminosäure an den so aktivierten Träger erfolgt durch längeres Erhitzen mit der Acylaminosäure in Gegenwart von Triethylamin. Weitere Ankergruppen für die Anbindung der ersten Aminosäure an den Träger wurden entwickelt, die vor allem ein vorzeitiges Ablösen des Peptids vom Träger während der Abspaltung der Schutzgruppen ausschließen sollen.

Die einzelnen Reaktionsschritte sind

1. Anhängen der Aminosäure am Harz
2. Ablösen der Schutzgruppe und Blockierung der NH_2 -Gruppe der nächsten Aminosäure
3. Kondensation mittels Dicyclohexylcarbodiimid DCHCD
4. Neuerliche Entfernung der Schutzgruppe
5. Kondensieren der nächsten BOC-Aminosäuren mit DCHCD

Der letzte Schritt ist das Ablösen des Peptids vom Harz.

MERRIFIELD hatte zuerst das Nonapeptid Bradykinin in 85 % Ausbeute und 27 Stunden synthetisiert, für die beiden Ketten des Insulins, die A-Kette (21 Aminosäuren) und die B-Kette (30 Aminosäuren) wurden 8 bzw. 11 Tage benötigt. 1969 gelang mit einem Syntheseautomaten innerhalb weniger Wochen in 18 % Ausbeute die Totalsynthese des Enzyms Ribonuclease (124 Aminosäuren und 369 chemische Reaktionen).

Ein Vorteil dieser Methode basiert auf der Möglichkeit der automatischen Syntheseführung, indem man den Träger auf einem Filter vorlegt und die anzuknüpfende Aminosäure und die einzelnen Reagenzien computergesteuert hinzufügt. Ein Nachteil liegt in der komplizierten Aufreinigung des synthetischen Peptids. Bei nicht 100 %iger Umsetzung oder nicht vollständigen Entschützungs-Reaktionen kommt es zur Bildung von Rumpf- und Fehlsequenzen. Die Gesamtausbeute hängt stark von der Einzelausbeute nach jedem Reaktionsschritt ab, bei langen Peptidketten liefert die Festphasensynthese infolge Fehlsequenzen keine sehr sauberen Produkte. Sie wird daher meist zur Synthese von Oligopeptiden

Im Unterschied zur Ribonuclease besteht Insulin aus zwei Ketten, die über zwei Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Die A-Kette enthält zusätzlich noch eine weitere Disulfidbrücke. In diesem Falle erfolgt die Oxidation der 6 Mercaptogruppen statistisch. Neben Insulinisomeren mit falscher Stellung der Disulfidbrücken entstehen intramolekulare Disulfide der A sowie der B-Kette (Abb. 10-30).

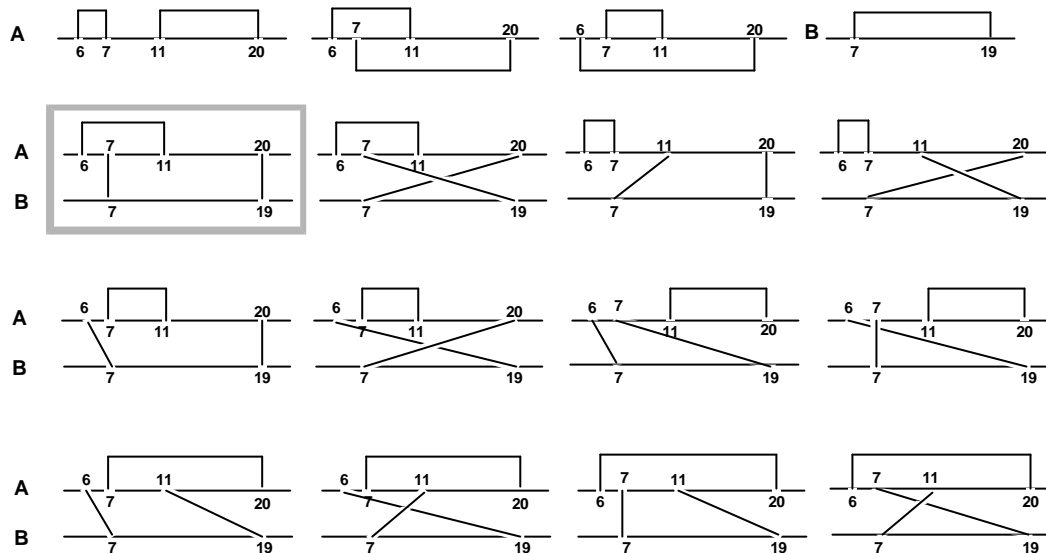
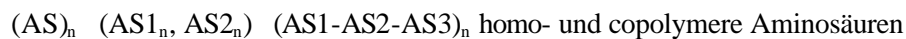


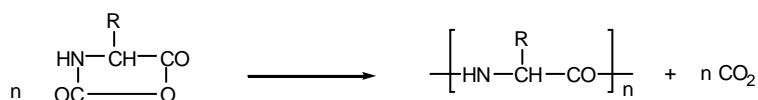
Abb. 11-30. Produkte der Oxidation einer äquimolaren Mischung der A- und B-Kette des Insulins (nach KLOSTERMEYER und HUMBEL). Das eingeraumte Produkt stellt das natürliche Insulin dar.

10.9.6 Synthese von Polyaminosäuren und sequentiellen Polypeptiden

Für viele Untersuchungen sind einfacher zu synthetisierende homo- oder copolymerer Aminosäuren erforderlich, die z.B. als Modellantigene oder Modellverbindungen für physikalisch-chemische Studien dienen.



Die gebräuchlichste Methode zur Darstellung von Homopolymeren ist die Polykondensation von N-Carboxyaminosäure-Anhydriden. Die Reaktion wird durch Alkohole oder Amine eingeleitet. Durch Polykondensation verschiedener Aminosäure-N-carbonsäure-Anhydride entstehen Copolymere mit einer statistischen Verteilung der Aminosäuren. Allerdings hängt die Verteilung von der Reaktivität der eingesetzten Anhydride ab.



Eine Polykondensation der freien Aminosäuren durch Erhitzen führt zu proteinähnlichen Verbindungen (Proteinoide). Erste Sequenzpolymere wurden bereits von E. FISCHER durch Kondensation von Tripeptid-alkylestern erhalten.

11.9.8 Kombinatorische Peptidsynthese

Eine der innovativsten Entwicklungen der letzten Jahre ist die *Kombinatorische Synthese*, die eine drastische Verkürzung der Entwicklungszeiten für neue Wirkstoffkandidaten darstellt. Gegenüber dem früheren überaus langsamen und kostenintensiven rationalen Planen, Synthetisieren und Austesten einzelner Abkömmlinge von Leitstrukturen versucht man heute, eine große Anzahl potentieller Screeningsubstanzen gleichzeitig darzustellen und für die Selektion der aktiven Komponenten als *Verbindungsbibliothek* zur Verfügung zu stellen.

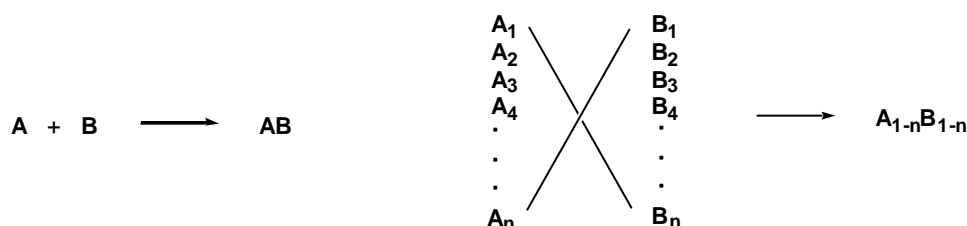


Abbildung 11-31. Synthesestrategie der Kombinatorischen Synthese

Das Synthesekonzept sieht multiple *Parallelsynthese* oder *Kombinatorische Synthese* vor und bedarf einer räumlichen Kompartimentierung und zeitlichen Trennung der einzelnen Reaktionen, die durch mitsynthetisierte *Codierung* für den späteren Bioassay festgehalten bzw. bekannt sein muß. Kombinatorische Synthesen lassen sich auf Mikrotiterplatten durchführen und damit Bibliotheken mit 100 bis zu Tausenden von Verbindungen herstellen, während Gemische an Trägern in Form von Polymerkügelchen oder polymeren Matrizenfeldern bis zu einer Million Verbindungen umfassen können. Da in den Anfängen der kombinatorischen Synthese im wesentlichen Festphasensynthesen angesetzt wurden, ist verständlicherweise gerade die Peptidsynthese (neben der Polynucleotidsynthese) eine Domäne der Kombinatorischen Chemie.

Anfang der 90er Jahre wurde ein Verfahren eingeführt, bei dem der Träger nach jedem Reaktionsschritt gemischt und für die Folgeumsetzungen wieder auf die einzelnen Reaktionsgefäße verteilt wird (*Mix and split*-Verfahren, Abb. 11-32).

Die Parallelsynthese tausender Substanzen und die Durchführung verschiedenster Testverfahren auf biologische Aktivität erfordert die Entwicklung neuer Syntheseroboter, die die Übertragung einzelner Synthesevorgänge auf eine Vielzahl von Reaktionsräumen und eigenständiger Syntheseschritte erlauben.

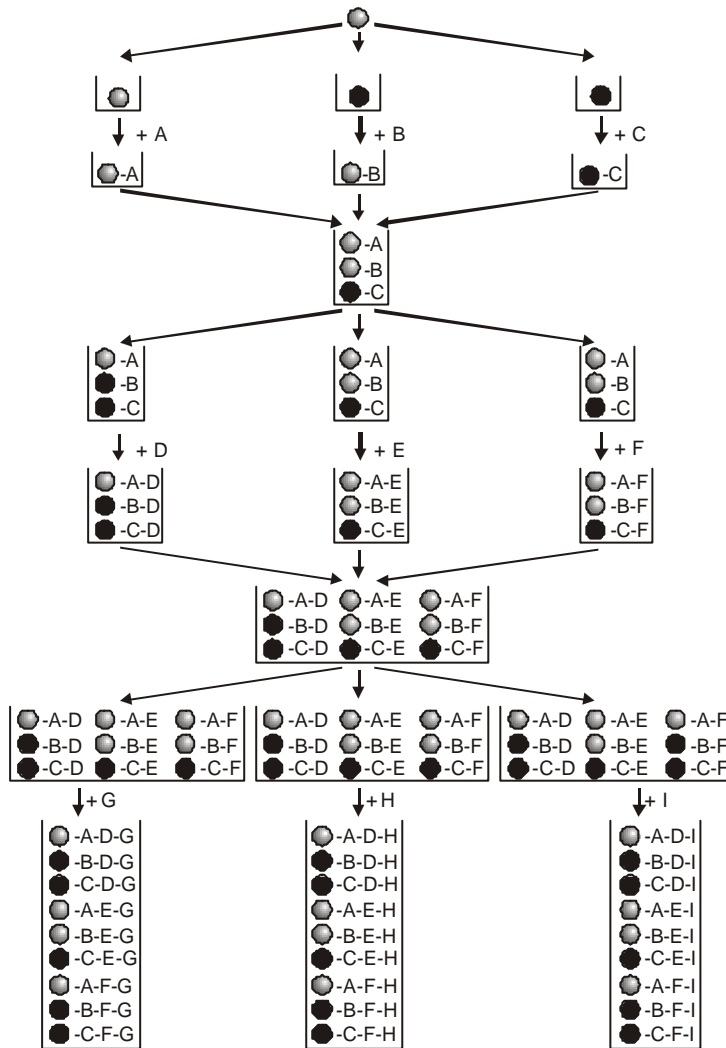


Abbildung 11- . "Mix-and-split"-Verfahren zur Herstellung komplexer Gemische. Im Beispiel werden in 9 Umsetzungen (A-I) 27 Verbindungen in drei Produktgemischen von je neun Komponenten synthetisiert.

11.9.9 Proteinsemisynthese

Unter *Proteinsemisynthese* versteht man die enzymatische oder chemische Insertion oder Excision kleiner Peptidfragmente in oder aus bereits vorliegendem Protein. Dadurch kann z.B. eine Änderung des aktiven Zentrums eines Enzyms oder eines Enzyminhibitors ermöglicht werden und zu Verbindungen mit neuen und anderen biologischen Eigenschaften führen.

11.9.10 Biotechnologische Verfahren zur Peptidsynthese - Proteindesign

Im Mittelpunkt des Interesses steht heute die gentechnologische Expression von menschlichem Protein durch Bakterien wie z.B. *Escherichia coli*, durch Hefezellen oder anderen Mikroorganismen, in die ein menschliches Genom eingeschleust wurde [*Clonierung*]. Seit mehreren Jahren wird menschliches Insulin gentechnologisch aus *E. coli* hergestellt und ist damit billiger und unbegrenzt verfügbar im Vergleich zu Schweine- oder Rinderinsulin. Außerdem bringt ein solcherart produzierter Wirkstoff weniger Applikationsprobleme als tierischen Ersatzprodukte. Plasminogen-Aktivator ist ein weiterer, gentechnologisch hergestellter Eiweißstoff und möglicherweise ein wichtiges Medikament gegen Durchblutungsstörungen. Auch menschliches Interferon, ein Protein des Immunsystems, wird heute aus *E. coli* oder Hefe produziert und kann Bedeutung als potentiell Medikament in der Behandlung von Krebs- und Viruserkrankungen oder Erkrankungen des Immunsystems erlangen. Weitere Beispiele sind Enzyme, Impfstoffe und andere nützliche Proteine.

Das gezielte Verändern von körpereigenen Proteinen mit dem Ziel, maßgeschneiderte Pharmaproteine mit verbesserten Eigenschaften gegenüber den natürlichen Proteinen zu erzeugen, ist Aufgabe des *Proteindesign*. Häufig haben körpereigene Proteine Eigenschaften wie geringe Löslichkeit oder Stabilität, die bei einem Pharmawirkstoff unerwünscht sind. Mit der Information aus der Genomsequenzierung und der Strukturaufklärung von Proteinen sowie den Fortschritten der Computertechnologie zur Analyse und Visualisierung von biologischer Information ist es nun möglich, die späteren Eigenschaften solcher veränderter neuer Proteine vorherzusagen.

11.9.11 Chemische Modifizierung von Proteinen

Unter der *chemischen Modifizierung* versteht man Reaktionen bzw. Derivatisierung an den Seitenketten der Aminosäuren von Proteinen, durch die die physikochemischen Parameter und biologischen Eigenschaften der Proteine verändert werden. Natürlich vorkommende chemisch modifizierte Proteine entstehen z.B. durch Bindung von Cofaktoren an Proteine und liegen in verschiedenen konjugierten Proteinen vor. Durch den Einbau nichtnativer und ungewöhnlicher Aminosäuren können Peptide mit vielfältigen biologischen Eigenschaften konstruiert werden.

11.10 Molekulargewicht von Proteinen.

Die *Molekulargewichte von Proteinen* schwanken zwischen wenigen Tausend Daltons für Oligopeptide (ca. 100 Da/Aminosäure), oberhalb von 10.000 Da für aus 100 - 150 Aminosäuren zusammengesetzte Peptide und liegen bei mehreren Millionen für aus mehreren Untereinheiten zusammengesetzte Proteine. So besitzt menschliches Insulin ein Molekulargewicht von 5.743 Da, das Enzym Ribonuklease eines von 13.500 Da. Die Verdauungsfermente Trypsin und Pepsin haben ein MG von 24.500 Da bzw. 35.000 Da, das aus 4 Untereinheiten zusammengesetzte Hämoglobin, das Atmungsprotein in den roten Blutkörperchen, eines von 64.500. Die Lactat-Dehydrogenase besitzt ein Molekulargewicht von 150.000, M-Globulin ein solches von 900.000 Da. Eines der Spitzen-Molekulargewichte mit 41.000.000 besitzt der Tabakmosaikvirus, ein Pflanzenvirus, der die Infektion von Tabak- und Tomatenpflanzen bewirkt.

Eine der klassischen *Molekulargewichtsbestimmungen* beruht auf der Bestimmung der *Sedimentationsgeschwindigkeit* in der Ultrazentrifuge und Berechnung aufgrund der Zentrifugengleichung nach SVEDBERG. Die Geräte arbeiten bei etwa 60.000 UpM und erreichen einige 100.000 g Erdbeschleunigung, die Sedimentation wird mit optischen Methoden bestimmt. Eine andere Methode zur Molekulargewichtsbestimmung von Molekülen mit 10.000 - 600.000 Da ist die *Streulicht-Messung* [TYNDALL-Effekt]. Andere Techniken sind die Messung der Diffusionsgeschwindigkeit und Vermessung im Elektronenmikroskop. Aufgrund der Strukturkenntnis aus *Röntgenstrukturanalysen* ergibt sich natürlich automatisch auch das Molekulargewicht. Voraussetzung ist natürlich eine kristalline Analysenprobe und eine genügend hohe Auflösung. So stand z.B. bei der Strukturaufklärung von Myoglobin zuerst nur Auflösung von 6 Å zur Verfügung, die nur die Strukturbestimmung der Peptidkette erlaubte. Spätere Aufnahmen mit Auflösungen von 2 Å erlaubten bereits die Erkennung einzelner Aminosäuren und Wassermoleküle.

Peptide kleinerer bis mittlerer Molekulargewichte lassen sich mittels *Massenspektroskopie* ermitteln. Während konservative EI-Ionisation das Verdampfen des Analyten erfordert und daher nur für sehr kleine und derivatisierte Oligopeptide geeignet ist, sind neue Ionisier- und Trenntechniken gut bis sehr gut zur Molekulargewichtsbestimmung von Peptiden geeignet. Mit weicher FAB-Ionisation lassen sich Quasimolekülonen $(M+H)^+$ bis zur Größe $m/z \sim$ einiger Tausend generieren und mittels Sektorfeldgeräten zur genauen Massenbestimmung hochauflösen. Die Kopplung LC-MS/MS erlaubt die Molekulargewichtsbestimmung von Peptiden mit hoher Massengenauigkeit. Neben der Molekulargewichtsbestimmung gelingt mit LC-MS/MS die Zahl der Cysteineinheiten, der Disulfidbrücken und freien SH-Gruppen in einem Protein festzulegen. Mit TOF-Spektrometern lassen sich Molekülmassen über 100.000 Da bestimmen, wenn eine für Peptide geeignete Ionisationstechnik gewählt wird. ESI-Ionisation erfolgt in einem Lösungsmittelpasma und ergibt nach Desolvatisierung vielfach geladene Molekülonen. Da im Spektrometer das Masse/Ladungsverhältnis m/z gemessen wird, kann bei mehrfach-

geladenen Molekülen auch das Molekulargewicht bestimmt werden, wenn es weit außerhalb des Meßbereichs des Instrumentes liegt. Mit dieser Technik wurde das Molekulargewicht von Proteinen bis zu 200.000 Da mit hoher Genauigkeit bestimmt.

Bei Biomolekülen erhebt sich oft die Frage nach dem eigentlichen Molekulargewicht, da viele Proteine in der nativen und biologisch aktiven Form aus mehreren Untereinheiten bestehen und damit Dimere, Trimere, *etc.*, darstellen.