

vermutet wurde, sind tatsächlich kooperative Wasserstoffbrückennetze beteiligt. Dazu gehören TIM, CS und Chymotrypsin, bei denen von H95, H274 und den NH-Gruppen von G193 und S195 angenommen wird, daß sie jeweils starke Wasserstoffbrückenbindungen mit den Zwischenprodukten bilden. Es ist daher möglich, daß die energetische Stabilisierung von den kooperativen Wasserstoffbrückenbindungen stammt und nicht auf starke Wasserstoffbrückenbindungen allein zurückzuführen ist.

Eingegangen am 24. Februar 1998 [Z11513]

Stichwörter: Dichtefunktionalrechnungen • Enzymkatalyse • Kooperative Effekte • Proteinstrukturen • Wasserstoffbrücken

- [1] A. J. Kirby, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 770–790; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 705–724.
- [2] J. R. Knowles, *Nature* **1991**, *350*, 121–125.
- [3] a) W. G. J. Hol, P. T. van Duijnen, H. J. C. Berendsen, *Nature* **1978**, *273*, 443–446; b) W. G. J. Hol, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **1984**, *45*, 149–195.
- [4] a) J. A. Gerlt, P. G. Gassman, *Biochemistry* **1993**, *32*, 11943–11952; b) W. W. Cleland, M. M. Kreevoy, *Science* **1994**, *264*, 1887–1890; c) P. A. Frey, S. A. Whitt, J. B. Tobin, *Science* **1994**, *264*, 1927–1930; d) J. A. Gerlt, M. M. Kreevoy, W. W. Cleland, P. A. Frey, *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 259–267, zit. Lit.
- [5] a) J. Aqvist, H. Luecke, F. A. Quiocio, A. Warshel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 2026–2030; b) B. Tidor, M. Karplus, *Biochemistry* **1991**, *30*, 3217–3228; c) B. Tidor, *Proteins* **1994**, *19*, 310–323.
- [6] a) J. P. Guthrie, *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 163–170, zit. Lit.; b) C. L. Perrin, J. B. Nielson, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1997**, *48*, 511–544, zit. Lit.; c) A. Warshel, A. Papazyan, P. Kollman, *Science* **1995**, *269*, 102–106.
- [7] a) R. R. Copley, G. J. Barton, *J. Mol. Biol.* **1994**, *242*, 321–329; b) P. Chakrabarti, *J. Mol. Biol.* **1993**, *234*, 463–482.
- [8] M. M. Benning, K. L. Taylor, R. Q. Liu, G. Yang, H. Xiang, G. Wessenberg, D. Dunaway-Mariano, H. M. Holden, *Biochemistry* **1996**, *35*, 8103–8109.
- [9] K. Brady, A. Wei, D. Ringe, R. H. Abeles, *Biochemistry* **1990**, *29*, 7600–7607.
- [10] H. Luecke, F. A. Quiocio, *Nature* **1990**, *347*, 402–406.
- [11] F. A. Quiocio, J. S. Sack, W. K. Vyas, *Nature* **1987**, *329*, 561–564.
- [12] a) G. A. Jeffrey, W. Saenger, *Hydrogen bonding in biological structures*, Springer, Berlin, **1991**; b) H. Guo, M. Karplus, *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 7104–7105, zit. Lit.; c) H. Guo, M. Karplus, *J. Phys. Chem.* **1992**, *96*, 7273–7287; d) B. W. Gung, Z. Zhu, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 2189–2192; e) B. W. Gung, Z. Zhu, B. Everingham, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 3436–3437; f) J. E. Del Bene, *J. Chem. Phys.* **1980**, *73*, 3423–3424.
- [13] a) E. N. Baker, R. E. Hubbard, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **1984**, *44*, 97–179; b) D. Stickle, L. G. Presta, K. A. Dill, G. D. Rose, *J. Mol. Biol.* **1992**, *226*, 1143–1159.
- [14] T. Head-Gordon, M. Head-Gordon, M. J. Frisch, C. Brooks III, J. A. Pople, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 5989–5997.
- [15] J. E. H. Koehler, W. Saenger, B. Lesyng, *J. Comput. Chem.* **1987**, *8*, 1090–1098.
- [16] J. W. Andzelm, M. E. Casida, A. Koester, E. Proynov, A. St-Amant, D. R. Salahub, H. Duarte, N. Godbout, J. Guan, C. Jamorski, M. Leboeuf, V. Malkin, O. Malkina, F. Sim, A. Vela, *deMon Software*, Universität Montreal, **1995**.
- [17] W. Bode, E. Papamokos, D. Musil, U. Seemüller, H. Fritz, *EMBO J.* **1986**, *5*, 813–818.
- [18] J. J. He, F. A. Quiocio, *Protein Sci.* **1993**, *2*, 1643–1647.
- [19] R. C. Davenport, P. A. Bash, B. A. Seaton, M. Karplus, M. G. A. Petsko, D. Ringe, *Biochemistry* **1991**, *30*, 5821–5826.

Neue Proteinmimetika: eingeschlossene Faltungseinheiten (locked-in folds) am Beispiel des $\beta\beta\alpha$ -Zinkfingermotivs**

Gabriele Tuchscherer,* Christian Lehmann und Marc Mathieu

Professor Murray Goodman zum 70. Geburtstag gewidmet

Als herausragendes Ziel des Neuentwurfs von Proteinen steht die Konstruktion von Mimetika im Mittelpunkt, die strukturelle und funktionelle Eigenschaften nativer Proteine aufweisen.^[1–6] Gleichzeitig ist die Komplexität des Faltungsmechanismus wohl die faszinierendste Herausforderung auf diesem rasch expandierenden Gebiet, denn der detaillierte Faltungsprozeß einer linearen Polypeptidkette in eine einzigartige dreidimensionale Struktur ist auch heute noch wenig verstanden. Um dieses bekannte Proteinfaltungsproblem^[7–9] im Design neuer Proteine zu umgehen, wurde vor einigen Jahren das Konzept der Templat-assoziierten synthetischen Proteine (TASP) entwickelt. Hier dienen topologische Templatmoleküle dazu, die Faltung kovalent fixierter Peptidblöcke in eine vorgegebene Packungsanordnung mit verzweigter Kettenarchitektur zu dirigieren.^[3, 10–12]

Durch wesentliche Fortschritte, insbesondere auf dem Gebiet der Synthesemethoden, eröffnet sich jetzt die Möglichkeit, das Potential des TASP-Konzepts auszuschöpfen. Trennt man konzeptionell Struktur- von Funktionsdomänen in nativen Proteinen, so lassen sich z. B. topologische Templatmoleküle als Strukturgerüste zur Fixierung von Rezeptor-Bindungsschleifen verwenden.^[13] Im folgenden wird die Konstruktion von proteinähnlichen Packungstopologien mit mehrfachverzweigter, oligocyclischer Kettenarchitektur („eingeschlossene Faltungseinheiten“) beschrieben, die eine Weiterentwicklung des TASP-Konzepts zum Neuentwurf von Proteinen bildet. Diese nichtnatürlichen Makromoleküle weisen besondere physikochemische Merkmale und Faltungseigenschaften auf und können als vielseitig verwendbare Gerüststrukturen zur Imitation struktureller und funktioneller Eigenschaften von Proteinen eine bedeutende Rolle spielen.

Wie in Abbildung 1 dargestellt, basiert das angestrebte Strukturmotiv auf den Prinzipien eines molekularen Baukastensystems, bei dem die einzelnen Bausteine wie α -Helices, β -Faltblätter oder Schlaufensequenzen über Templat- oder Spacermoleküle zu kovalent vernetzten, mehrfachverbrückten tertären Faltungseinheiten verknüpft werden. Auf diese Weise werden durch die Bildung kovalenter Bindungen intramolekulare Wechselwirkungen zwischen den sekundärstrukturbildenden Peptidblöcken und damit die Faltung in eine vorgegebene räumliche Struktur erzwungen. Gleichzeitig wird der Konformationsraum der entstandenen Tertiärstrukturen erheblich eingeschränkt. Darüber hinaus sollte so die

[*] Dr. G. Tuchscherer, Dr. C. Lehmann, Dr. M. Mathieu
Institut für Organische Chemie, Universität Lausanne
BCH-Dorigny, CH-1015 Lausanne (Schweiz)
Fax: (+41) 21-692-3955
E-mail: gabriele.tuchscherer@ico.unil.ch

[**] Diese Arbeit wurde vom Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung unterstützt.

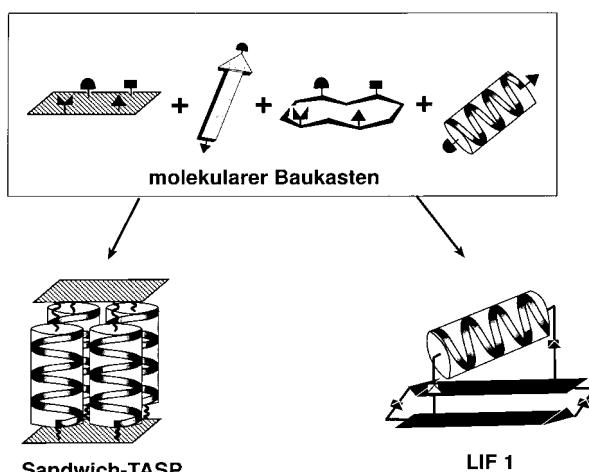


Abb. 1. Das Prinzip eines molekularen Baukastensystems im Protein-de-novo-Design: Helices, β -Faltblätter, Schlaufen und Template mit reaktiven Endgruppen (z.B. Aldehyde und Aminoxygruppen, dargestellt als ausgefüllte Symbole) bilden die einzelnen Bestandteile eines molekularen Baukastens. Eine Vielzahl verschiedener chemoselektiver Verknüpfungsmethoden ermöglicht die Zusammensetzung dieser Bausteine zu „eingeschlossenen Faltungseinheiten“ (locked-in folds, LIF), wobei das Faltungsproblem linearer Peptidketten umgangen wird.

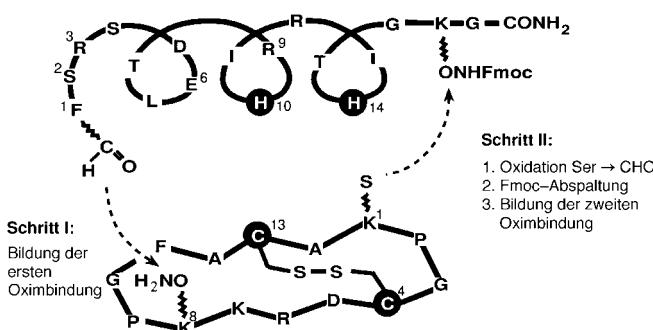
thermodynamische Stabilität dieser Verbindungen erhöht werden.

Insbesondere lässt sich wegen der Einschränkung des Konformationsraumes die große Zahl alternativer Faltungswege und Packungsanordnungen linearer Polypeptidketten drastisch verringern. Das vorgeschlagene Konzept macht sich in hohem Maße neue Synthesemethodologien in der Peptidchemie, z.B. chemoselektive Verknüpfungsmethoden^[14-17] und orthogonale Schutzgruppentechniken,^[12] zunutze; damit lassen sich vollkommen ungeschützte Peptidsegmente als Bausteine zu komplexen Molekülen gemäß den Prinzipien eines molekularen Baukastensystems zusammenfügen.

Der vorliegende Beitrag zielt in erster Linie auf die Imitation einiger struktureller und funktioneller Eigenschaften eines Zinkfingermotivs durch eine „eingeschlossene Faltungseinheit“ (locked-in fold, LIF), die eine dem nativen Molekül entsprechende Faltungstopologie aufweist. Zinkfingervertebrate Proteine bilden ein interessantes Strukturmotiv zur Trennung von Struktur- und Funktionsdomänen^[13] sowie zur Modulierung von DNA-Bindungsspezifitäten.^[18, 19] Es konnte z.B. gezeigt werden, daß die allgemeine Aminosäuresequenz Xaa₂-Cys-Xaa₂₋₄-Cys-Xaa₁₂-His-Xaa₂₋₄-His-Xaa₄ (Xaa steht für variable Aminosäuren)^[20, 21] in Gegenwart von Zn^{II}-Ionen eine charakteristische $\beta\beta\alpha$ -Faltungstopologie einnimmt, die über die helikale Seite an drei Basenpaare der DNA bindet. Multimere Zinkfingervertebrate Proteine, die aus mehreren Zinkfingermotiven bestehen, spielen eine Schlüsselrolle im Kontrollmechanismus der Genexpression.^[18, 19]

Wendet man das Konzept der „eingeschlossenen Faltungseinheiten“ an, legt die zugrundeliegende $\beta\beta\alpha$ -Struktur eines Zinkfingermotivs unmittelbar die Anwendung einer Strategie nahe, die auf den Prinzipien des in Abbildung 1 dargestellten molekularen Baukastens beruht. Die einzelnen Bestandteile setzen sich aus einem cyclischen Template, das als Mimetikum für das β -Strang-Turn- β -Strang-Motiv dient (Strukturteil) und

einem Helixblock (Funktionsteil) zusammen. Um diese Bausteine zu einer verzweigten Faltungseinheit (LIF1; Abb. 1) zusammenzufügen, wird die Helix an beiden Kettenenden über nichtpeptidische Linkergruppen („klebrige Enden“; Schema 1) an ein cyclisches, 14 Aminosäuren umfassendes Template kovalent gebunden. Durch die Einführung von je zwei Cystein- und Histidinresten in das Template bzw. in die Helix wird die Bindungsstelle für die Zinkkomplexierung im LIF1-Molekül untergebracht. Im einzelnen wurde das neu entworfene, vom Zinkfinger abgeleitete Motiv im MAB-Kraftfeld relaxiert,^[22] die Geometrie des tetraedrisch umgebenen Zn^{II}-Ions von der Kristallstruktur eines nativen Zinkfingers (1zaa.pdb) übernommen und während der gesamten Optimierungscyclen konstant gehalten. Der Linker HN(CO)HC=NOCH₂ in dem so konstruierten Molekül ist *trans*-konfiguriert, wie aus der Geometrie einer entsprechenden Untereinheit in einer Reihe hochauflöster Kristallstrukturen abgeleitet wurde. Durch vorgegebene H-Brücken in der α -Helix und im β -Faltblatt wurde die Kettenflexibilität zusätzlich eingeschränkt.



Schema 1. Synthese von LIF1: selektive Verknüpfung des Helixblocks mit dem Template über Oximbindungen.

Abgesehen von der allgemeinen $\beta\beta\alpha$ -Topologie konnten weitere wichtige Merkmale eines nativen Zinkfingermoleküls berücksichtigt werden, z.B. der Einbau einer hydrophoben Tasche, die durch die Seitenkette eines Phenylalaninrestes am N-Terminus der Helix gebildet wird. Wie in Moleküldynamikstudien^[23] gezeigt, erhöht dieser hydrophobe Cluster die thermodynamische Stabilität von LIF1 und spielt offensichtlich eine wichtige Rolle in der Faltung und Stabilität von linearen Zinkfingermolekülen.^[6] Außerdem wurde am C-Terminus eine Thr-Gly-Einheit konserviert (Abb. 2), die sich günstig auf das H-Brücken-Netz in der Helix auswirkt.

Im ersten Schritt der Synthese von LIF1 werden die beiden Bausteine, das Templatmolekül und der Helixblock, durch schrittweise Peptidsynthese an fester Phase hergestellt.^[24] Die Peptide werden vom Harz abgespalten und durch Umkehrphasen-HPLC gereinigt. Anschließend werden die vollkommen ungeschützten Peptide über chemoselektiv zugängliche Gruppen in wässriger Lösung umgesetzt, wobei das helikale 18mer-Peptid in einem Zweistufenprozeß selektiv über Oximbindungen^[14, 15] an das cyclische Templat kondensiert wird: Nach der Oxidation des Serinrestes^[14] am N-terminalen Helixende bildet der daraus resultierende Aldehyd mit der Aminoxyacetylgruppe im Templat die erste Oximbindung.

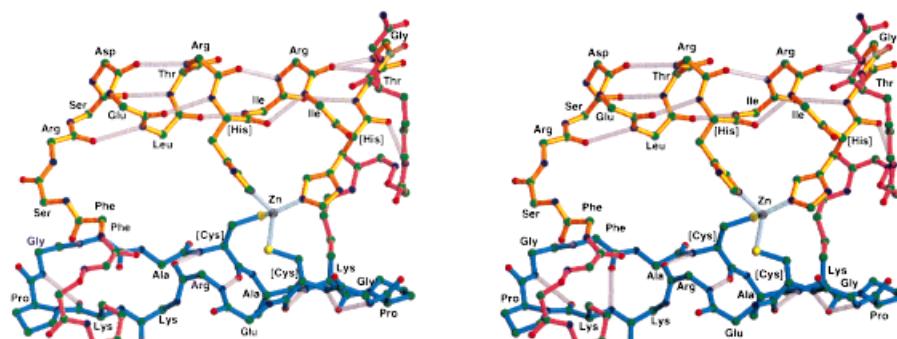


Abb. 2. Stereoprojection einer spannungsfreien, energieminimierten Konformation des eingeschlossenen Faltungsmotivs LIF1, abgeleitet von der Sequenz des Fingers1 von Zif268. Die kovalenten Bindungen zwischen den Helixenden (gelb) und dem darunterliegenden Templat (blau) sind rot eingezeichnet. Nur die Seitenketten der komplexbildenden Aminosäuren sind abgebildet.

Die Reaktion kann durch analytische HPLC verfolgt werden und verläuft innerhalb von 18 Stunden quantitativ (Abb. 3a). Im zweiten Schritt wird der Serinrest an der ϵ -NH₂-Gruppe der Lysinseitenkette oxidiert, die 9-Fluorenylmethoxycarbonyl(Fmoc)-Schutzgruppe der Aminooxyfunktion am C-terminalen Helixende entfernt und die zweite Oximbindung in situ gebildet. Wie bereits früher festgestellt^[13] verläuft die zweite chemoselektive Reaktion – die Fixierung des C-terminalen Endes der Helix auf dem darunterliegenden Templat – sehr schnell und in hohen Ausbeuten.

Wie schon in Molecular-Modeling-Studien angedeutet, können in LIF1 essentielle Struktureigenschaften von nativen Zinkfinger(Zif)-Molekülen erhalten werden. Dies wurde durch Absorptions- und Circulardichroismus(CD)-Spektren sowie durch Untersuchungen der Zinkkomplexierungseigenschaften bestätigt. Wie im CD-Spektrum in Abbildung 3b gezeigt, nimmt der Helixanteil durch Zugabe von Zn^{II}-Ionen infolge der Bildung des Komplexes zu. Im Unterschied zum natürlichen linearen Polypeptid bleiben jedoch in LIF1 die Sekundärstrukturelemente auch in Abwesenheit des Zinkkomplexes weitgehend erhalten (Abb. 3b). Dies spiegelt das Vorhandensein tertärer Wechselwirkungen in LIF1 durch die beidseitige Fixierung der Helix (erzwungenes C- und N-Capping) auf dem Templat wider.

An dieser Stelle ist anzumerken, daß ein vom Zinkfingermolekül abgeleitetes lineares $\beta\beta\alpha$ -Motiv nach mehrmaligem Neuentwurf der nativen Sequenz auch ohne einen Zinkkomplex ähnliche Faltungseigenschaften wie das natürliche Molekül aufwies.^[6] Denaturierungstudien mit LIF1 ergaben, daß die konformativ eingeschränkte Kettenarchitektur zu einer Stabilisierung der Helix und zu einer erhöhten thermodynamischen Stabilität des Zif-Faltungsmotivs führt (Einschub in Abb. 3b).

NMR-Studien sowie Moleküldynamikrechnungen weisen daraufhin,^[25] daß Template dieses Typs vorzugsweise eine antiparallele β -Faltblattstruktur mit räumlich definierter Anordnung der für die Zn^{II}-Komplexierung sowie der Helix-Verknüpfungsstellen notwendigen Seitenketten einnehmen.

Cobaltkomplexe geben charakteristische optische Absorptionsspektren und werden daher häufig zur Charakterisierung von Metallbindungsstellen verwendet. Die Metallbindungs-eigenschaften von LIF1 wurden durch UV/Vis-Absorptions-spektroskopie untersucht; die Spektren deuten darauf hin,

daß sich in Gegenwart von Co^{II}-Ionen eine Zinkfinger-ähnliche Struktur bildet. Das in Abbildung 3c dargestellte UV/Vis-Spektrum von LIF1 zeigt nach Reduktion der Disulfidbrücke und Zugabe von CoCl₂ die für einen tetraedrischen Komplex, wie er in nativen Zinkfingermodulen auftritt, charakteristischen Absorptionsban-den bei 310 und 640 nm sowie eine Schulter bei 580 nm.^[26, 27] Bei Zugabe von 1 Äquivalent Zn^{II} zu LIF1 wird Cobalt aus dem Komplex verdrängt, und es bildet sich der stabilere Zinkkomplex, was durch das Ver-schwinden der Absorptionsmaxima

angezeigt wird (Abb. 3c). Titrationskurven mit CoCl₂ und Zn(BF)₄ ergeben Dissoziationskonstanten im Bereich von 10⁻⁶ M (Co^{II}) und 10⁻⁹ M (Zn^{II})^[28] und liegen damit in der Größenordnung natürlicher Zinkfingerproteine wie des Transkriptionsfaktors IIIA.^[18, 26] Auf der Suche nach Zif-Mimetika mit neuen DNA-Bindungseigenschaften eröffnet der vorliegende Ansatz interessante Möglichkeiten:

1) Konformativ eingeschränkte Templatmoleküle dienen als stabile Grundgerüste, die das β -Strang-Turn- β -Strang($\beta\beta$)-Motiv eines Zinkfingers imitieren.

2) Der variable Helixblock läßt sich problemlos an der festen Phase synthetisieren; durch Einbringung nicht-proteinogener Bausteine eröffnet sich eine breite Palette struk-tureller und funktioneller Modifikationen.

3) Das Zusammenfügen der einzelnen Bausteine zu tertären „eingeschlossenen Faltungseinheiten“ in nur einem Kondensationsschritt sowie die hohe Toleranz in bezug auf Sequenzmutationen ermöglicht die Synthese einer Vielzahl von Analoga einschließlich von LIF-Bibliotheken.

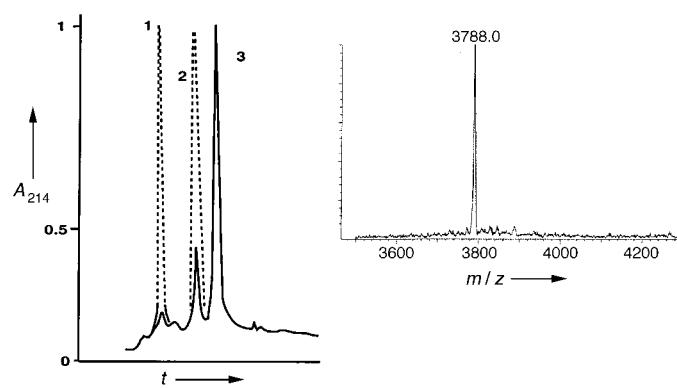
4) Die chemische Synthese von multimeren Zinkfingermimetika mit maßgeschneiderten DNA-Bindungseigenschaften eröffnet ein großes Potential zur Untersuchung von Protein-DNA-Wechselwirkungen.

Durch die Ausschöpfung der heutigen Methoden zur Peptidsynthese wird sich der Umfang der dargelegten Strategie schnell erweitern und die Konstruktion von noch komplexeren Proteinmimetika verwirklichen lassen. Das hier vorgestellte Konzept bietet einen chemischen Weg, das Faltungsproblem im Entwurf künstlicher Proteine vollständig zu umgehen, und eröffnet interessante Perspektiven für die Entwicklung therapeutisch relevanter Moleküle.

Experimentelles

Das $\beta\beta\alpha$ -Zinkfingermimetikum LIF1 basiert auf der allgemeinen Sequenz des Fingers1 von Zif268.^[29] Die einzelnen Bausteine, Helix und Templat, werden gemäß Standardvorschriften für die Synthese von Peptiden an fester Phase^[24] nach der Fmoc-Strategie entweder am Rink-4-Methylbenzhydrylamin(MBHA),^[30] oder am (supersäurelabilen) Sasrin-Harz^[31] aufgebaut. Die chemoselektiv zugänglichen Gruppen werden als orthogonal geschützte Aminooxy-Derivate oder Serinreste eingeführt.^[13-15] So wird nach der schrittweisen Synthese der linearen Templatsequenz Trt-K(Boc-S(*t*Bu))-P-G-C(Trt)-D(*t*Bu)-R(Pmc)-R(Pmc)-K(Dde)-P-G-F-A-C(Trt)-A (Trt = Triphenylmethyl; Boc = *tert*-Butoxycarbonyl; Pmc = 2,2,5,7,8-Penta-methylchroman-6-sulfonyl; Dde = 4,4-Dimethyl-2,6-dioxocyclohexyliden-

a)



b)

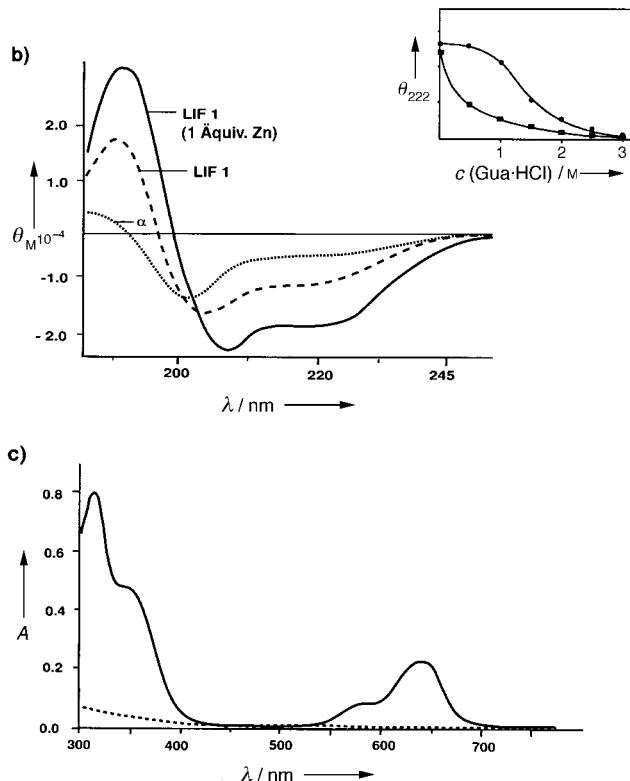


Abb. 3. Charakterisierung von LIF1. a) Links: Umkehrphasen-HPLC-Chromatogramm nach dem ersten Kondensationsschritt; die Peaks der Ausgangsverbindungen (Templat (1) und Helix (2)) sind gestrichelt dargestellt; der Peak 3 entspricht dem Kondensationsprodukt LIF1 nach 18 h Reaktionszeit. Rechts: zugehöriges ESI-Massenspektrum (m/z 3788.0). b) Circulardichroismus(CD)-Spektren von LIF1 mit reduzierter Disulfidbrücke ohne Metall (---) und nach Zugabe von stöchiometrischen Mengen an Zn^{II} -Ionen (—). Wie angegeben nimmt der Helixanteil infolge der Komplexierung mit Zink etwas zu; das CD-Spektrum der völlig entschützten Einzelhelix mit N-terminalem Serinrest (****) deutet auf eine überwiegend ungeordnete Konformation hin. Die Spektren wurden in 5 mM Tris-Puffer (pH 7) bei einer Konzentration von 10^{-5} M aufgenommen und zu mittleren Elliptizitäten pro Aminosäurerest (Θ_M) normalisiert. Einschub: chemische Denaturierung (Gua·HCl) von LIF1 (•; $c = 0.25$ mg Peptid pro mL; Θ_M bei $\lambda = 222$ nm) sowie der Einzelhelix α (■; $c = 0.25$ mg mL $^{-1}$). c) UV/Vis-Spektren von LIF1 ($c = 150$ μ M), nach Zugabe von 150 μ M $CoCl_2$ (—) sowie nach Zugabe von 150 μ M $ZnCl_2$ (---).

ethyl) am Sasrin-Harz das Peptid mit 1proz. Trifluoressigsäure (TFA) abgespalten und mit PyBOP (Benzotriazol-1-yloxytrispyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat) in Dimethylformamid (DMF) cyclisiert. Nach selektiver Abspaltung der Dde-Schutzgruppe mit 10proz. $H_2NNH_2 \cdot H_2O$ in DMF (20 min) wird Boc-Aminoxyessigsäuresuccinimidester (Boc-

$NHOCH_2COOSu$) an die ϵ -NH₂-Gruppe des Lysinrestes gekuppelt. Anschließend werden alle säurelabilen Schutzgruppen mit TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5; TIS = Triisopropylsilan) entfernt und die Disulfidbrücke geschlossen. Das Templat wird durch Umkehrphasen-HPLC gereinigt (67% Ausbeute) und durch Elektrosprayionisierungs-Massenspektrometrie (ESI-MS) charakterisiert (m/z 1647).

Der Helixblock Boc-S(tBu)-F-S(tBu)-R(Pmc)-S(tBu)-D(OtBu)-E(OtBu)-L-T(tBu)-R(Pmc)-H(Trt)-I-H(Trt)-T(tBu)-G-K(Dde) wird schrittweise am Rink-MBHA-Harz aufgebaut. Die Dde-Schutzgruppe wird selektiv mit 10proz. Hydrazin (20 min) entfernt und die entschützte ϵ -NH₂-Gruppe des C-terminalen Lysinrestes mit Fmoc-HNOCH₂COOSu funktionalisiert. Nach der Abspaltung der Helix vom Harz und dem gleichzeitigen Entfernen aller säurelabilen Schutzgruppen (95proz. TFA, 1.5 h) führt die milde Oxidation des N-terminalen Serinrestes mit NaIO₄ (5 Äquiv., 5 min) zum Aldehyd. Die Helix wird durch Umkehrphasen-HPLC gereinigt (53% Ausbeute) und durch ESI-MS charakterisiert (m/z 2458).

Zur Bildung der ersten Oximbindung zwischen dem N-Terminus der Helix und der Aminoxyfunktion in der Lysiseitenkette im Templat werden 1.1 Äquiv. der Helix in Natriumacetatpuffer (10 mM, pH 4) gelöst und tropfenweise zu einer Lösung des Templates in Acetatpuffer (pH 7.5) gegeben. Die Kondensationsreaktion wurde durch analytische HPLC verfolgt und war nach 18 h vollständig abgelaufen.

Im zweiten Schritt wird der Serinrest in der ϵ -Position des Lysinrestes im Templat zum Aldehyd oxidiert (fünffacher Überschuss an NaIO₄, 5 min) und das Peptid durch Umkehrphasen-HPLC gereinigt (56%). Anschließend wird die Fmoc-Schutzgruppe an der Aminoxygruppe am C-terminalen Lysin mit 20proz. Piperidin in DMF entfernt. Nach Ausfällen mit Diethylether wird das Peptid in 10 mM Acetatpuffer (pH 4) gelöst, was zur raschen Bildung der zweiten Oximbindung führt (>90%). Das erhaltene LIF1 wird durch Umkehrphasen-HPLC gereinigt und durch ESI-MS charakterisiert (m/z 3788).

Optische Absorptionspektren des Peptid-Cobaltkomplexes wurden mit einem Beckmann-Spektrophotometer gemessen. Vor der Komplexbildung wurde die Disulfidbrücke in LIF1 mit Dithiothreitol (DTT) bei Raumtemperatur reduziert (10 h). Nach der Lyophilisation wurden 150 μ M LIF1 in Tris(hydroxymethyl)aminomethan(Tris)·HCl-Puffer (mit Helium entgast, pH 7) aufgenommen und 150 μ M $CoCl_2$ zugefügt. Bei Zugabe einer äquimolaren Menge an $ZnCl_2$ zu dieser Lösung wird das Cobaltion aus dem Komplex verdrängt.

CD-Spektren wurden mit einem Jobin-Yvon-Marck-VI-Circular-Dichrometer in Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 0.1 cm aufgenommen. Vor der Aufnahme der Spektren wurde die Disulfidbrücke in LIF1 wie oben beschrieben reduziert; LIF1 wurde in Tris·HCl-Puffer aufgenommen, und sowohl vor als auch nach Zugabe von äquimolaren Mengen an $ZnCl_2$ wurden Messungen durchgeführt.

Eingegangen am 14. April 1998 [Z11719]

Stichwörter: Chemoselektivität • Proteine • Proteinmimetica • Zinkfinger

- [1] J. S. Richardson, D. C. Richardson, *Trends Biochem. Sci.* **1989**, *14*, 304.
- [2] J. W. Bryson, S. F. Betz, H. S. Lu, D. J. Suich, H. X. Zhou, K. T. O'Neil, W. F. DeGrado, *Science* **1995**, *270*, 935.
- [3] a) S. Vuilleumier, M. Mutter, *Angew. Chem.* **1989**, *101*, 653; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1989**, *28*, 535; b) M. Mutter, G. Tuchscherer, *Cell. Mol. Life Sci.* **1997**, *53*, 851.
- [4] S. Kamtekar, J. M. Schiffer, H. Xiong, J. M. Babik, H. M. Hecht, *Science* **1993**, *262*, 1680.
- [5] S. Olofsson, L. Baltzer, *Fold. Design* **1996**, *1*, 347.
- [6] M. D. Struthers, R. P. Cheng, B. Imperiali, *Science* **1996**, *271*, 342.
- [7] R. T. Sauer, *Fold. Design* **1996**, *1*, R27.
- [8] B. Nolting, R. Golbik, A. R. Fersht, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 10668.
- [9] E. Shakhnovich, V. Abkevich, O. Ptitsyn, *Nature* **1996**, *379*, 96.

- [10] a) M. Mutter, G. Tuchscherer, *Makromol. Chem. Rapid Commun.* **1988**, *9*, 437; b) G. Tuchscherer, C. Servis, G. Corradin, U. Blum, J. Rivier, M. Mutter, *Protein Sci.* **1992**, *1*, 1377.
- [11] a) M. Mutter, G. Tuchscherer, C. Miller, K.-H. Altmann, R. I. Carey, D. F. Wyss, A. M. Labhardt, J. E. Rivier, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 1463; b) G. Tuchscherer, L. Scheibler, P. Dumy, M. Mutter, *Biopolym. Pept. Sci.* **1998**, *47*, 63.
- [12] P. Dumy, I. M. Eggleston, S. E. Cervigni, U. Sila, X. Sun, M. Mutter, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 1255.
- [13] M. Mutter, P. Dumy, P. Garrouste, C. Lehmann, M. Mathieu, C. Peggion, S. Peluso, A. Razanane, G. Tuchscherer, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 1587; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 1482.
- [14] K. Rose, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 30.
- [15] a) G. Tuchscherer, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 8419; O. Nyanguile, M. Mutter, G. Tuchscherer, *Lett. Pept. Sci.* **1994**, *1*, 9.
- [16] P. E. Dawson, S. B. H. Kent, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 7263.
- [17] C. F. Liu, J. P. Tam, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 6584.
- [18] S. F. Michael, V. J. Kilfoil, M. H. Schmidt, B. T. Amann, J. M. Berg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 4796.
- [19] E. Rebar, C. O. Pabo, *Science* **1994**, *263*, 671.
- [20] J. Miller, A. D. McLachlan, A. Klug, *EMBO J.* **1985**, *4*, 1609.
- [21] R. S. Brown, C. Sanders, P. Argos, *FEBS Lett.* **1985**, *186*, 271.
- [22] P. R. Gerber, K. Müller, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1995**, *9*, 251C.
- [23] D. Grell, C. Lehmann, M. Mathieu, G. Tuchscherer, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [24] J. M. Stewart, J. D. Young, *Solid Phase Peptide Synthesis*, Pierce Chemical, Rockford, IL, **1984**.
- [25] a) P. Dumy, I. M. Eggleston, G. Esposito, S. Nicula, M. Mutter, *Biopolymers* **1996**, *39*, 297; b) G. V. Nikiforovich, C. Lehmann, M. Mutter, *Biopolymers*, im Druck.
- [26] J. M. Berg, D. L. Merkle, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 3759.
- [27] I. Bertini, C. Luchinat, *Adv. Inorg. Biochem.* **1984**, *6*, 71.
- [28] B. Rohwedder, Dissertation, Universität Lausanne (Schweiz), **1997**.
- [29] N. P. Pavletich, C. O. Pabo, *Science* **1991**, *252*, 809.
- [30] H. Rink, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 3787.
- [31] M. Mergler, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 4005.

Studien zur Totalsynthese von Himastatin: Korrektur der stereochemischen Zuordnung**

Theodore M. Kamenecka und Samuel J. Danishefsky*

Professor Elias J. Corey gewidmet

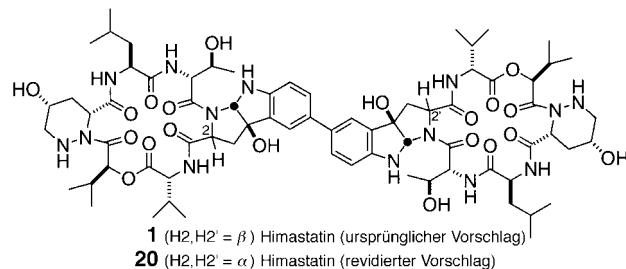
Auf der Suche nach neuen Antibiotika und Cytostatika untersuchten Wissenschaftler von Bristol Myers Squibb den Actinomyceten-Stamm ATCC 53653 aus dem indischen Bundesstaat Himachal Pradesh. Dabei stießen sie auf eine neue Verbindung mit der Summenformel $C_{72}H_{104}N_{14}O_2$, die sie

[*] Prof. S. J. Danishefsky,^[+] T. M. Kamenecka
Laboratory for Bioorganic Chemistry
Sloan-Kettering Institute for Cancer Research
1275 York Avenue, Box 106, New York, NY 10021 (USA)
Fax: (+1) 212-772-8691
E-mail: c-kandell@ski.mskcc.org

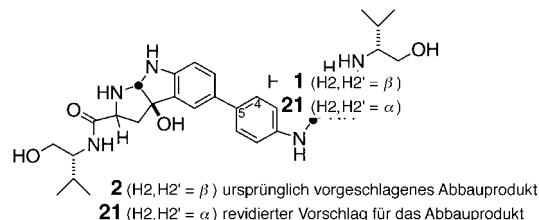
[+] Weitere Adresse:
Department of Chemistry, Columbia University
Havemeyer Hall, New York, NY 10027 (USA)

[**] Diese Arbeit wurde von den National Institutes of Health unterstützt (Förder-Nr.: CA-28824 (SSD) und CA-08748 (SKI Core Grant)). T.M.K. dankt den NIH für ein Postdoktorandenstipendium (Förder-Nr.: AI-09355). Wir danken Bristol Myers Squibb für eine authentische Probe von Himastatin und Dr. George Sukenick sowie dem NMR Core Facility Laboratory, Sloan-Kettering Institute for Cancer Research, für die Durchführung von MS- und NMR-Analysen.

Himastatin nannten.^[1] Nach ausgiebigen Optimierungsarbeiten mit dem Stamm wurde Himastatin in ausreichenden Mengen erhalten, um chemische und biologische Untersuchungen durchzuführen zu können. Himastatin hat zwar noch nicht das Stadium der klinischen Forschung erreicht, aber seine Wirkung gegen Gram-positive Mikroorganismen und in einer Reihe von Tumor-Testsystemen ist beeindruckend. Nach Ergebnissen spektroskopischer Untersuchungen und gestützt auf einige Abbaustudien wurde **1** als Struktur von



Himastatin vorgeschlagen. Dementsprechend wurde ein Abbauprodukt von Himastatin, das vom Peptidteil nur noch einen D-Valinol-Baustein enthält, als **2** formuliert.



Unser Interesse an Himastatin wurde zunächst durch die Herausforderung geweckt, die die chemische Synthese stellt. Lösungen von Problemstellungen dieser Komplexität gehen üblicherweise mit einem Lernprozeß einher, der von weitergehendem Nutzen sein kann. Darüber hinaus hatten wir auch eine klare biologische Fragestellung im Auge: Wir hofften, Monomere wie **17** untersuchen zu können, um festzustellen, ob die dimere Struktur für den Mikroorganismus irgendeinen identifizierbaren biologischen Vorteil hat.

Eine der vielen strukturellen Herausforderungen von **1** ist eine 2,3,3a,8a-Tetrahydropyrrolo[2,3-*b*]indol-Einheit mit einer eliminierbaren benzylischen Hydroxygruppe an Position 3a. Beschränkt man sich nur auf das System, in dem die beiden Fünfringe *cis*-verknüpft sind, so gibt es zwei mögliche relative Anordnungen des Tryptophan-Carboxy-Äquivalents an C2 und der Ringverknüpfung. Unter der Annahme, daß Himastatin die Struktur **1** hat, konzentrierten wir uns auf die Klasse mit einer *anti*-Anordnung dieser Carboxygruppe.

Die prinzipielle Möglichkeit der oxidativen Cycloaromatierung verschiedener Tryptophanderivate (siehe Verbindung **4**) ist seit den Pionierarbeiten von Witkop et al. bekannt.^[2] Für unsere Synthese erwies sich die *N*_b-Anthracensulfonyl-Schutzgruppe am Tryptophan-*tert*-butylester (**3**, Schema 1)^[3] als sehr vorteilhaft.^[4] Die Umsetzung von **3** zu **4** erfolgte ebenso problemlos wie die von **4** zu **5**. Zur weiteren Bestätigung der Struktur wurde **5** in **6** überführt. Diese Verbindung korreliert mit einer zuvor der *anti-cis*-Reihe zugeordneten Substanz.^[5]