

Ein Antikörper, der die „Base-on“-Form von B₁₂-Coenzymen rekonstituiert**

Renate B. Hannak, Robert Konrat,
Wolfgang Schüler, Bernhard Kräutler,*
Maria-Teresa M. Auditor und Donald Hilvert*

Das Cobalt-koordinierende 5,6-Dimethylbenzimidazol(DMB)-Nucleotid ist ein Strukturmerkmal von Coenzym B₁₂ und Methylcobalamin,^[1,2] das die Reaktivität dieser metallorganischen Cofaktoren kontrolliert.^[3,4] Sowohl das DMB-Nucleotid als auch der funktionalisierte Corrin-Ring spielen eine wichtige Rolle in der selektiven und starken Bindung an B₁₂-Apoenzyme. In letzter Zeit zeigte sich dabei, dass eine Anzahl Coenzym-B₁₂-abhängiger Enzyme den B₁₂-Cofactor in einer unvorhergesehenen „Base-off“/„His-on“-Form binden,^[5–7] wobei das DMB-Nucleotid durch ein Histidin des Proteins vom Cobalt verdrängt wird. Demgegenüber wird in einer 1999 veröffentlichten Kristallstruktur der Base-on-Bindungsmodus von Dioldehydratase an das Coenzym B₁₂ beschrieben.^[8] Wir berichten hier von einem gegen das Coenzym B₁₂ gezüchteten monoklonalen Antikörper, der die Base-on-Form natürlicher B₁₂-Analoga bindet, obwohl diese in Lösung die Base-off-Form bevorzugen. Dieser B₁₂-Antikörper verursacht dementsprechend eine bislang nicht beobachtete „umgekehrte“ koordinative Rekonstitution von der Base-off- zur Base-on-Form, was zu einer signifikanten Änderung der Reaktivität des gebundenen B₁₂-Coenzymes führt.

Während des letzten Jahrzehnts haben sich Antikörper als nützliche Werkzeuge zur Katalyse einer Reihe bemerkenswerter chemischer Reaktionen sowie als Rezeptoren für die Sondierung der Bindungsmechanismen von Liganden herausgestellt.^[9–14] Vielseitige Cofaktoren wie Coenzym B₁₂ bieten beachtliche Möglichkeiten zur Erweiterung der Chemie dieser Systeme. Zur Erforschung der Fähigkeit von Anti-

körpern, corrinoide Coenzyme zu binden und ihre chemische Reaktivität zu beeinflussen, haben wir monoklonale Antikörper gegen Coenzym B₁₂ **1** gezüchtet. Antikörper, die B₁₂-Derivate erkennen, sind zwar bereits bekannt,^[15] ihre Bindungseigenschaften wurden jedoch nicht spektroskopisch untersucht.

Für die Immunisierung wurde Coenzym B₁₂ **1** mit einem Bernsteinsäure-Linker^[16] (48 Haptene/TG) an das Trägerprotein Thyroglobulin (TG) gekoppelt. Es wurde eine Immunantwort gegen das TG-Hapten-Konjugat hervorgerufen und anschließend eine Gruppe monoklonaler Antikörper mit guter Antigen-Erkennung mit herkömmlichen Methoden erzeugt und gereinigt.^[17] Nach einer ersten Selektion von 20 Antigen-bindenden Molekülen durch Kompetitions-ELISA^[18] (enzyme-linked immunosorbent assay) wurde der Antikörper 2C2 für eine detaillierte Charakterisierung ausgewählt, da er sowohl das DMB-Nucleotid als auch den Corrin-Ring zu erkennen schien.

Antikörper 2C2 bindet **1** mit einer geschätzten Dissoziationskonstante (K_d) von $9.8 \pm 2.6 \mu\text{M}$. Wie in Tabelle 1 zusammengefasst wird, werden Vitamin B₁₂ **2** (Schema 1) sowie

Tabelle 1. Scheinbare Ligandendissoziationskonstanten mit Antikörper 2C2.^[a]

Ligand	$K_d [\mu\text{M}]$
Coenzyme B ₁₂ 1	10
Vitamin B ₁₂ 2	65
Dicyanocobinamid 3	740
Pseudocoenzym B ₁₂ 4	68
Adenosylfaktor A 5	29

[a] Bestimmt mit Kompetitions-ELISA.^[18] Auf einer Microtiter-Platte immobilisiertes Coenzym B₁₂, das mit Rinder-Serum-Albumin konjugiert war. Gebundener Antikörper wurde mit einem Konjugat aus Glucoseoxidase und Ziegen-anti-Maus-IgG-Antikörper in Gegenwart und Abwesenheit verschiedener Liganden detektiert. Die Absorption bei 405 nm wurde nach Entwickeln der Platten mit ABTS (2,2'-Azino-di-3-ethylbenzthiazolinsulfonat) bestimmt.

weitere B₁₂-Derivate ähnlich effektiv gebunden. Dicyanocobinamid **3**, ein die Nucleotid-Funktion nicht enthaltendes Analogon von **1** und **2** ist der schwächste der untersuchten corrinoiden Liganden. Weder Benzimidazol noch 2-Amino-isopropylribazolphosphat^[19] für sich allein genommen konkurrieren mit dem Antigen. Diese Resultate deuten darauf hin, dass die Cobalt-koordinierende Nucleotid-Schleife als Ganzes für die Bildung des B₁₂-Antikörper-Komplexes benötigt wird. Als Test dieser Hypothese wurden auch Pseudocoenzym B₁₂ **4**^[20,21] und der Co_β-5'-Desoxyadenosyl-Faktor A **5**^[21,22] als kompetitive Inhibitoren in Betracht gezogen. Diese natürlichen Coenzym-B₁₂-Analoga unterscheiden sich von **1** durch den Ersatz der DMB-Base durch Adenin bzw. 2-Methyladenin (Schema 1). UV/Vis-, CD- und ¹H-NMR-spektroskopische Untersuchungen deuten dabei darauf hin, dass **4** und **5** in wässriger Lösung hauptsächlich in der Base-off-Form vorliegen.^[20,21] Wie angenommen binden diese Base-off-Adenosylcobamide etwa 7- bzw. 3-mal so schlecht wie **1**. Die Konstitution der Nucleotid-Base und ihre intramolekulare Wechselwirkung mit dem Cobalt-Zentrum spielt also offensichtlich eine wichtige Rolle bei der Erkennung von Corrinoiden durch den Antikörper 2C2.

[*] Prof. Dr. B. Kräutler, Dr. R. B. Hannak, Prof. Dr. R. Konrat,

Dr. W. Schüler

Institut für Organische Chemie

Universität Innsbruck

Innrain 52a

6020 Innsbruck (Österreich)

Fax: (+43) 512-507-2892

E-mail: bernhard.kraeutler@uibk.ac.at

Prof. Dr. D. Hilvert, Dr. R. B. Hannak

Laboratorium für Organische Chemie

ETH Hönggerberg

8093 Zürich (Schweiz)

Fax: (+41) 1-632-1486

E-mail: hilvert@org.chem.ethz.ch

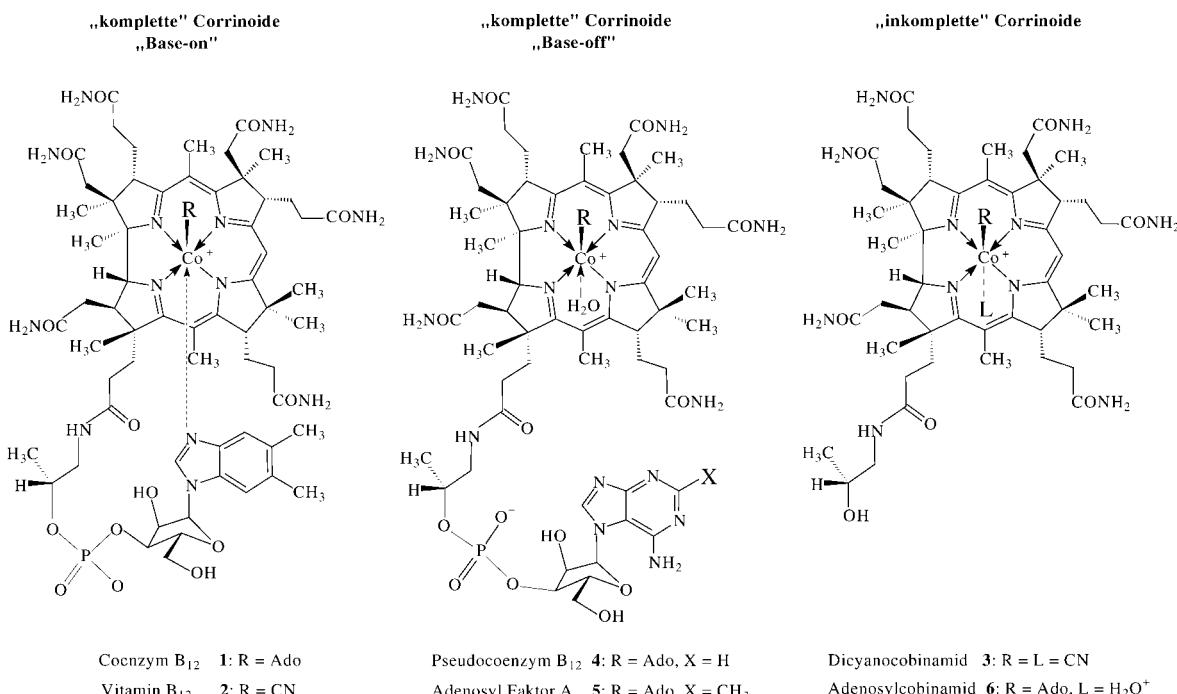
M.-T. M. Auditor

Departments of Chemistry and Molecular Biology

The Scripps Research Institute

La Jolla, CA 92037 (USA)

[**] Wir danken Dr. Wolfgang Fieber für die Bereitstellung von Grapiken, Prof. Paul Renz (Universität Stuttgart) für ein großzügiges Geschenk an Faktor A und Dr. Frederik Deroose für die Herstellung der Protein-Hapten-Konjugate. Wir bedanken uns außerdem beim österreichischen Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (FWF, Projekt-Nr. 13595, an B.K., Schrödinger-Stipendium an R.H.), bei der Europäischen Kommission, der ETH Zürich und Novartis Pharma für die Unterstützung dieser Arbeit.



Schema 1. Strukturformel von Vitamin B₁₂-Derivaten. Links: „komplette Corrinoide“ in ihrer Base-on-Form mit einer DMB-Basis und verschiedenen Liganden R. Mitte: Die vorherrschende Base-off-Konstitution der „kompletten Corrinoide“ mit einer Adenin-Basis. Rechts: Cobinamide als „inkomplette Corrinoide“ (Ado = 5'-Desoxy-5'-adenosyl).

Die Erkennungsfähigkeiten von 2C2 wurden in weiteren spektroskopischen Analysen untersucht. B₁₂-Derivate zeigen oberhalb von 300 nm charakteristische Absorptionen,^[21,22] die sich in Anwesenheit des farblosen Antikörpers leicht verfolgen lassen. Zugabe von 2C2 zu **1** verursachte eine kleine Verschiebung im sichtbaren Bereich des UV/Vis-Spektrums (von 524 nach 536 nm) sowie eine Abnahme des Extinktionskoeffizienten um 8 %. Ähnliche Änderungen wurden bereits bei anderen B₁₂-Protein-Komplexen^[23] beobachtet und deuten darauf hin, dass sich das Koordinationsmuster am Co^{III}-Corrin durch die Bindung von **1** an den Antikörper nur unsignifikant ändert. Demgegenüber ließen sich bei der Bindung von **4** und **5** an den Antikörper drastische Änderungen beobachten. In diesen Fällen verursachte die Zugabe von 2C2 einen markanten Abfall der Absorption bei 463 nm sowie eine Zunahme bei 529 nm (Abbildung 1a). Die Spektren der an 2C2 gebundenen **4** und **5** stimmen erstaunlich gut mit dem des (Base-on) Coenzym B₁₂ **1** überein (Abbildung 1b). Demgegenüber hatte weder die Anwesenheit von 2C2 (52 μM) einen Einfluss auf das Spektrum von 5'-Desoxyadenosylcobinamid **6** noch Rinder-Serum-Albumin auf dasjenige von **4** und **5**.

Das Binden der Coenzym B₁₂-Analoga **4** und **5** an 2C2 scheint dementsprechend von einer Koordination eines N-Liganden an das Cobalt begleitet zu sein. UV/Vis-Spektren können jedoch nicht zuverlässig zwischen der Koordination der internen Nucleotid-Basis und der eines externen Histidins unterscheiden. Nicht zuletzt der Unfähigkeit dieser Methoden, die axialen N-Liganden in Adenosyl-Cobamiden zu identifizieren, ist die späte Entdeckung der jetzt wohlbekannten Base-off/His-on-Form von Protein-gebundenem **1** in Enzymen wie Methylmalonyl-CoA-Mutase^[6] und Glutamatmutase^[7,24] zuzuschreiben.

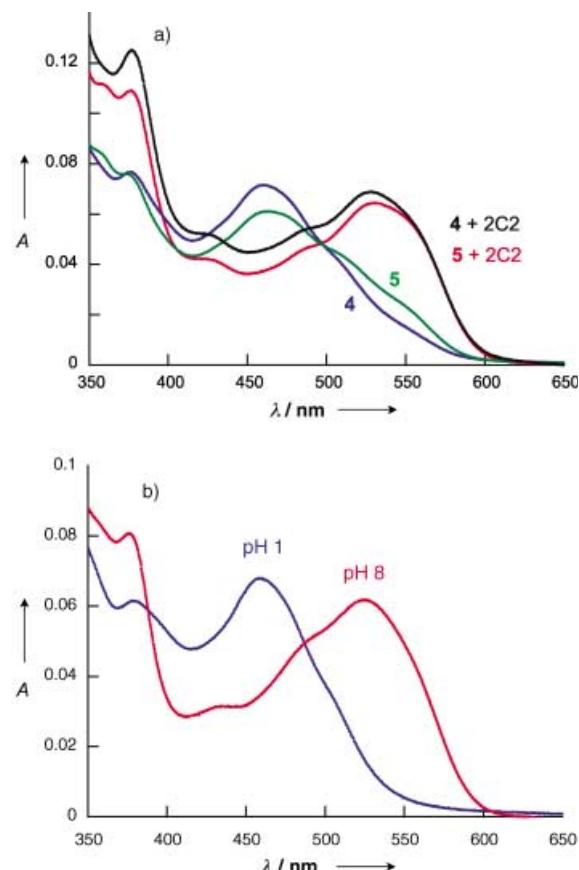


Abbildung 1. a) UV/Vis-Spektren von Pseudocoenzym B₁₂ **4** und von dem 5'-Desoxyadenosyl-Faktor A **5** in wässrigem Puffer (10 mM Phosphat, 160 mM NaCl), pH 7.4; blau, bzw. grün) und in der Gegenwart von ca. 20 μM Antikörper 2C2 (schwarz bzw. rot). b) UV/Vis-Spektren wässriger Lösungen von Coenzym B₁₂ **1** bei pH 8 (Base-on-Form von **1**; rote Kurve) und bei pH 1 (protonierte Base, Base-off-Form von **1**; blaue Kurve).

Basierend auf der Annahme, dass 2C2 die stabile Base-on-Form von Coenzym B₁₂ **1** erkennt, erschien es nun plausibel, dass der Antikörper die Adenin-Base von Pseudo-coenzym B₁₂ **4** und 2-Methyladenin im Adenosyl Faktor A **5** zur Cobalt-Koordination zwingen könnte. Die Base-on-Form (**4b** und **5b**) dieser Coenzym B₁₂-Analoga wurde zwar bisher noch nicht beobachtet, ist jedoch für die Fälle der entsprechenden Cyano-Co^{III}-Corrine, Pseudovitamin B₁₂ und Faktor A bekannt.^[25] Die Verwendung von Bindungsenergie zur Verschiebung der in Lösung auf Seite des Base-off-Form liegenden Gleichgewichts würde die im Vergleich mit **1** geringeren Affinitäten von **4** und **5** gegenüber 2C2 zumindest teilweise erklären.

Transfer-NOE-Experimente mit **5** und 2C2 wurden durchgeführt, um den Bindungsmodus des Corrinoids in der aktiven Tasche des Antikörpers zu bestimmen. Die Messungen der Kreuz-Relaxationen liefern Informationen über den Spin-Transfer zwischen gebundenen und freien Protonen durch schnellen chemischen Austausch.^[26,27] Das NOESY-Spektrum von **5** in Gegenwart von 2C2 zeigt eine allgemeine Zunahme der NOE-Intensitäten, sowie spezifische Zunahmen der Kreuzpeaks zwischen dem heteroaromatischen Proton H(8N) der 2-Methyladenin-Base und den Corrin e- und f-Seitenketten von **5** (Abbildung 2). Die letzteren Protonen stehen in der Base-off-Form in Lösung nicht räumlich nah zueinander, sind jedoch anscheinend in der Antikörper-gebundenen Form so nah bei einander, wie man es von einer Base-on-Konstitution des Corrinoids erwartet (Abbildung 2).

Alle experimentellen Daten unterstützen also die Folgerung, dass der B₁₂-Antikörper 2C2 vorzugsweise Adenosyl-Corrinoide in einer Base-on-Konstitution bindet, was der Programmierung durch das Hapten entspricht. Eine derartige Bindung von Pseudocoenzym B₁₂ **4** und seines Homologen **5** bedarf der Bildung einer Cobalt-Stickstoff-Bindung sowie (nach gängigen Vorstellungen^[3,4]) des Ersatzes eines Cobalt-gebundenen Wasser-Moleküls. Die hier beobachtete Restrukturierung Base-off zu Base-on, ist die Umkehr jener, die beim Binden von Coenzym B₁₂ im Base-off/His-on-Modus der Kohlenstoffgerüst-Mutassen beobachtet wird.^[6,7,24]

Der durch den Antikörper hervorgerufene Base-off/Base-on-Wechsel beeinflusst die chemische Reaktivität des Corrinoids. Zum Beispiel hängt die Umsatzrate von Adenosylcobamiden (wie etwa **1**, **4** und **5**) zu Dicyanocobamiden von der Koordination der Nucleotid-Base ab.^[22] In Gegenwart eines 2.5-fachen Überschusses an Antikörper wurde die Reaktion

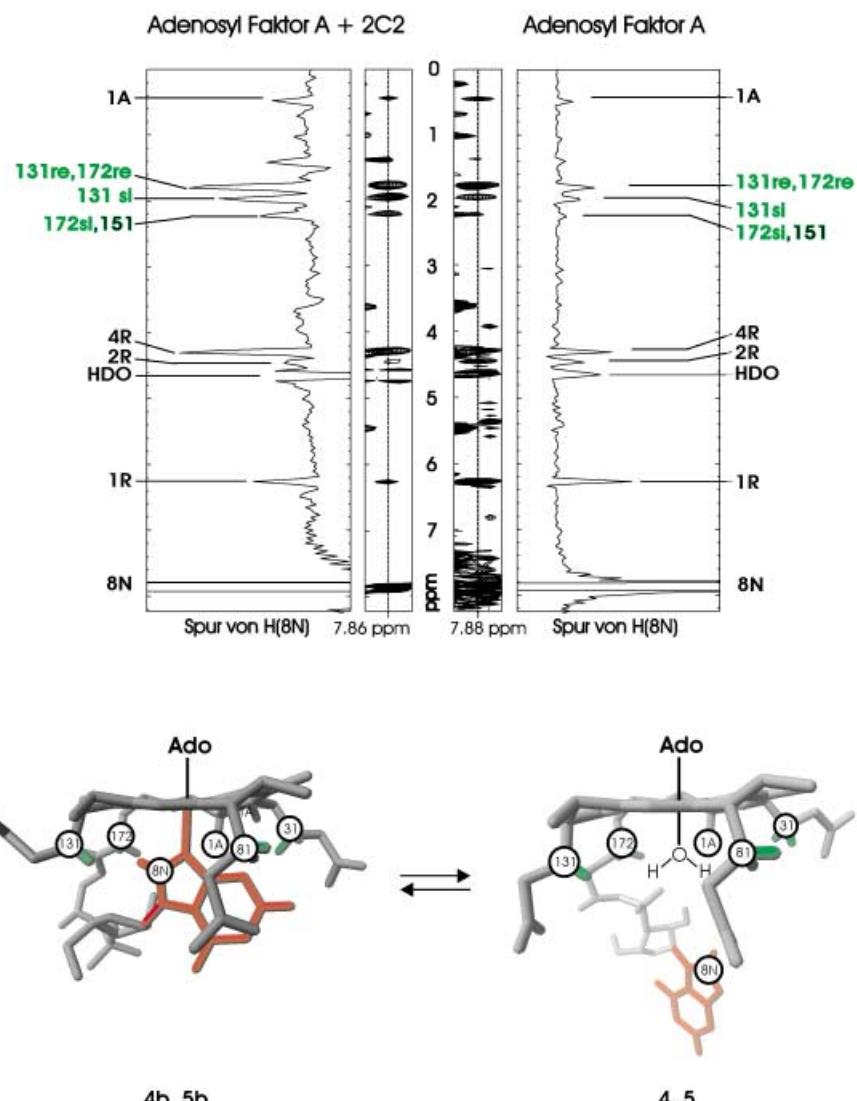


Abbildung 2. Oben: Ausschnitte von 500 MHz ¹H-NMR-Spektren von **5** in Gegenwart (links, NOESY-Spektrum) und Abwesenheit des Antikörpers 2C2 (rechts, ROESY-Spektrum) mit NOE-Korrelationen des H(8N)-Signals (bei δ = 7.86 und 7.88 ppm). Die Spektren wurden in einer 50 mM Kaliumphosphat-Puffer-Lösung aufgenommen, 100 mM NaCl bei pH 7.5 und 26 °C; [5] = 1.5 mM und [2C2] = 50 μ M. Das NOESY-Spektrum von **5** ohne 2C2 zeigt nur sehr schwache Signale, da sich die Korrelationszeit des B₁₂-Derivates und die kritische Korrelationszeit bei 500 MHz gleichen. H(8N) der Cobalt-koordinierten DMB-Base in **1** ist weniger als 3.5 Å („through space“) von den H-Atomen an den Positionen 1A, 131(H_r und H_s), 172(H_d) des Corrin-Rings und 4R des Ribose-Segments entfernt. (Bemerkung: Das Signal bei δ = 1.5 ppm ist ein Artefakt). Unten: Der konstitutionelle Base-off/Base-on-Übergang „kompletter“ Cobamide durch (de)-Koordination ihrer Nucleotid-Base am Corrin-gebundenen Cobalt-Zentrum.

mit Cyanid gegenüber derjenigen in Abwesenheit des Proteins um über 90 % verlangsamt (Bedingungen: 15 μ M 2C2, 6 μ M B₁₂, 4 mM KCN in Phosphatpuffer, pH 7.5; T = 25 °C; spektrophotometrische Beobachtung bei 368 nm: relative Raten: $k_{4+2C2}/k_{4-2C2} = 0.096$; $k_{5+2C2}/k_{5-2C2} = 0.040$). Der Base-off/Base-on-Wechsel dieser B₁₂-Derivate beeinträchtigt also die Fähigkeit der Metallzentren, mit dem Cyanid-Nucleophil zu reagieren. Folglich befindet sich diese Beobachtung im Einklang mit dem bereits bekannten „trans-Effekt“ der Nucleotid-Koordination auf die metallorganische Reaktivität „vollständiger“ Corrine.^[3,4,22]

Eine 1994 veröffentlichte Kristallstruktur eines Aptamers^[28] für Vitamin B₁₂ zeigte, dass die RNA-Struktur (aus-

schließlich) den Corrin-Ring von Cobalamin bindet.^[29] In dieser Arbeit haben wir Coenzym B₁₂ **1** zur Bildung eines Antikörpers verwendet, der selektiv die Base-on-Form von **1** und anderer B₁₂-Coenzyme erkennt. Die Nucleotid-Schleife, ein den Base-on-Formen vollständiger Cobamide vorbehaltenes Strukturmotiv, steuert die Reaktivität der Cobalt-Corrine^[3,4] und dient außerdem als bisher kaum untersuchtes Erkennungsmerkmal der selektiven Interaktion mit B₁₂-bindenden Proteinen.^[8] Der Antikörper 2C2 erkennt die intakte DMB-Nucleotid-Schleife und bewirkt die Bildung der Base-on-Form von Coenzym B₁₂-Analoga, deren Strukturen in Lösung überwiegend Base-off sind. Es kann sich dabei um ein funktionales Modell für natürliche B₁₂-bindende Proteine, beispielsweise den (menschlichen) Intrinsischen Faktor und Transcobalamin handeln.^[23] Diese wichtigen B₁₂-Rezeptoren binden vorzugsweise Cobamide mit einem DMB-Nucleotid^[23,30] und sind selektiv bezüglich strukturell verwandter B₁₂-Derivate, die auch in Lösung eine Base-on-Konstitution vorziehen.

Eingegangen am 2. April 2002 [Z19024]

- [1] P. G. Lenhert, D. C. Hodgkin, *Nature* **1961**, *192*, 937–938.
- [2] J. Pickworth-Glusker in *B₁₂, Vol. I* (Hrsg.: D. Dolphin), Wiley, New York, **1982**, S. 24–106.
- [3] B. Kräutler in *Vitamin B₁₂ and B₁₂ Proteins* (Hrsg.: B. Kräutler, B. T. Golding, D. Arigoni), Wiley-VCH, Weinheim, **1998**, S. 3–43.
- [4] J. M. Pratt in *B₁₂, Vol. I* (Hrsg.: D. Dolphin), Wiley, New York, **1982**, S. 325–392.
- [5] a) C. L. Drennan, S. Huang, J. T. Drummond, R. G. Matthews, M. L. Ludwig, *Science* **1994**, *266*, 1669–1674; b) M. L. Ludwig, P. R. Evans in *Chemistry and Biochemistry of B₁₂* (Hrsg.: R. Banerjee), Wiley, New York, **1999**, S. 217–226.
- [6] F. Mancia, N. H. Keep, A. Nakagawa, P. F. Leadlay, S. McSweeney, B. Rasmussen, P. Bösecke, O. Diat, P. R. Evans, *Structure* **1996**, *4*, 339–350.
- [7] R. Reitzker, K. Gruber, G. Jogl, U. G. Wagner, H. Bothe, W. Buckel, C. Kratky, *Structure* **1999**, *7*, 891–920.
- [8] N. Shibata, J. Masuda, T. Tobimatsu, T. Toraya, K. Suto, Y. Morimoto, N. Yasuoka, *Structure* **1999**, *7*, 997–1008.
- [9] R. A. Lerner, S. J. Benkovic, P. G. Schultz, *Science* **1991**, *252*, 659–667.
- [10] P. G. Schultz, R. A. Lerner, *Science* **1995**, *269*, 1835–1842.
- [11] D. Hilvert, *Topics stereochem.* **1999**, *22*, 83–135.
- [12] D. Hilvert, *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 751–793.
- [13] *Catalytic Antibodies* (Hrsg.: D. J. Chadwick, J. Marsh), Wiley, Chichester, **1991** (Ciba Foundation Symposium 159).
- [14] P. Wentworth, Jr., L. H. Jones, A. D. Wentworth, X. Zhu, N. A. Larsen, I. A. Wilson, X. Xu, W. A. Goddard III, K. D. Janda, A. Eschenmoser, R. A. Lerner, *Science* **2001**, *293*, 1806–1811.
- [15] a) H. Gershman, N. Nathanson, R. Abeles, L. Levine, *Arch. Biochem. Biophys.* **1972**, *153*, 407–409; b) D. F. M. Van De Weil, W. T. Goedemans, M. G. Woldring, *Clin. Chim. Acta* **1974**, *56*, 143–149; c) S. S. Ahrenstedt, J. I. Thorell, *Clin. Chim. Acta* **1979**, *95*, 417–423; d) J. J. O'Sullivan, R. J. Leeming, S. S. Lynch, A. Pollock, *J. Clin. Pathol.* **1992**, *45*, 328–331; e) S. C. J. Meskers, P. J. M. Dekkers, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 6413–6414.
- [16] T. Toraya, K. Ohashi, H. Ueno, S. Fukui, *Bioinorg. Chem.* **1975**, *4*, 245–255.
- [17] E. Harlow, D. Lane, *A Laboratory Manual*, Cold Springs Laboratories, New York, **1988**.
- [18] B. R. Clark, E. Engvall, *Enzyme-Immunoassay*, CRC, Boca Raton, FL, **1980**, S. 167–179.
- [19] A. Eschenmoser, *Angew. Chem.* **1988**, *100*, 5–40; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, *27*, 5–40, zit. Lit.
- [20] H. A. Barker, H. Weissbach, R. D. Smyth, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1958**, *44*, 1093–1097.
- [21] W. Fieber, B. Hoffmann, W. Schmidt, E. Stupperich, R. Konrat, B. Kräutler, *Helv. Chim. Acta* **2002**, *85*, 927–944.

- [22] W. Friedrich in *Fermente, Hormone, Vitamine, Vol. III/2* (Hrsg.: R. Ammon, W. Dirscherl), Thieme, Stuttgart, **1975**, S. 10–152.
- [23] E. Nexø in *Vitamin B₁₂ and B₁₂ Proteins* (Hrsg.: B. Kräutler, D. Arigoni, B. T. Golding), Wiley-VCH, Weinheim, **1998**, S. 461–471.
- [24] E. N. G. Marsh, D. E. Holloway, H.-P. Chen in *Vitamin B₁₂ and B₁₂ Proteins* (Hrsg.: B. Kräutler, D. Arigoni, B. T. Golding), Wiley-VCH, Weinheim, **1998**, S. 253–264.
- [25] B. Hoffmann, M. Oberhuber, E. Stupperich, H. Bothe, W. Buckel, R. Konrat, B. Kräutler, *J. Bacteriology* **2000**, *182*, 4773–4782.
- [26] A. P. Campbell, T. M. Tarasow, W. Massefski, P. E. Wright, D. Hilvert, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 8663–8667.
- [27] A. Bax, G. W. Vuister, S. Greziesek, F. Delaglio, R. Tschudin, G. Zhu, *Methods Enzymol.* **1994**, *239*, 79–105.
- [28] J. R. Lorsch, J. W. Szostak, *Biochemistry* **1994**, *33*, 973–982.
- [29] D. Sussman, J. C. Nix, C. Wilson, *Nat. Struct. Biol.* **2000**, *7*, 53–57.
- [30] B. Elsenhans, I. H. Rosenberg, *Biochemistry* **1984**, *23*, 805–808.

Festphasensynthese und biologische Evaluierung einer Pepticinamin-E-Bibliothek**

Michael Thutewohl, Lars Kissau, Boriana Popkirova, Ionna-Maria Karaguni, Thorsten Nowak, Michael Bate, Jürgen Kuhlmann, Oliver Müller und Herbert Waldmann*

In ca. 30 % aller menschlichen Tumoren sind die kodierenden Gene der Ras-Proteine mutiert.^[1,2] Ihre korrekte biologische Funktion hängt entscheidend von ihrer posttranslationalen Modifizierung mit Lipidresten ab. Oncogenes Ras wirkt nur dann als molekularer Schalter beim Weiterleiten wachstumsfördernder Signale, wenn es am C-Terminus S-farnesyliert und nachfolgend an der Plasmamembran lokalisiert wird. Daher sind Inhibitoren der Proteinfarnesytrans-

[*] Prof. Dr. H. Waldmann, Dipl.-Chem. M. Thutewohl, Dipl.-Chem. L. Kissau
Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie
Abt. Chemische Biologie
Otto-Hahn-Straße 11, 44227 Dortmund (Deutschland)
und
Fachbereich 3, Organische Chemie
Universität Dortmund (Deutschland)
Fax: (+49) 231-133-2499
E-mail: herbert.waldmann@mpi-dortmund.mpg.de
Dipl.-Biochem. B. Popkirova, Dipl.-Biol. I.-M. Karaguni,
Dr. J. Kuhlmann, Priv.-Doz. Dr. O. Müller
Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie
Abt. Strukturelle Biologie
Otto-Hahn-Straße 11, 44227 Dortmund (Deutschland)

Dr. T. Nowak, M. Bate
AstraZeneca, Mereside, Alderley Park, Macclesfield,
Cheshire SK10 4TG (Großbritannien)

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft, AstraZeneca (Case Award für M.T.) und dem Fonds der chemischen Industrie (Kekulé-Stipendium für M.T. und L.K.) unterstützt. Wir danken Helmut Kipp für die Bereitstellung des Fluoroscan-Plate-Readers und Christine Nowak für die Isolierung der Ratten-PFT.

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