

Die Chemie von Antikörpern

Peter G. Schultz,* Jun Yin und Richard A. Lerner*

Traditionell konzentrierte sich die Immunchemie darauf, die molekulare Grundlage der Affinität und Spezifität von Antikörperbindungen zu verstehen, doch in den letzten zwanzig Jahren hat auf diesem Gebiet eine bedeutende Verschiebung stattgefunden. Wir fragen uns nun, wie man die bemerkenswerten Eigenschaften von Antikörpern und der Immunantwort in der Chemie nutzen kann – vom Überprüfen grundlegender Theorien der Enzymkatalyse zur Synthese neuer Katalysatoren. Außerdem wird das Konzept der molekularen Diversität, das diesen Experimenten zu Grunde liegt, nun auf eine große Zahl anderer Probleme angewandt – von Bibliotheken von Biopolymeren bis hin zu solchen von Festkörpermaterialien. Diese Untersuchungen bieten nicht nur fundamentale Einblicke in viele biologische, chemische und physikalische Vorgänge, sondern Chemikern auch einen anderen Zugang zur Synthese neuer molekularer Funktionen.

Mit der Weiterentwicklung von Synthesemethoden wird sich der Schwerpunkt des Interesses immer mehr von der Synthese einer Struktur zur Synthese einer molekularen Funktion verschieben. Leider haben wir Chemiker nicht annähernd so viel Erfahrung, Moleküle mit definierten chemischen, biologischen oder stofflichen Eigenschaften rational zu entwerfen und herzustellen, wie mit der Synthese komplexer Molekülstrukturen. Wie können wir also Synthesestrategien entwickeln, die es uns ermöglichen, Moleküle mit neuen Funktionen effizient herzustellen? Eine Antwort ist die Orientierung an der Biologie. Schließlich ist die Fähigkeit lebender Organismen, molekulare Funktionen hervorzubringen, beispiellos — sie reicht von der molekularen Erkennung durch Antikörper bis zur Energieumwandlung mithilfe des Photosyntheseapparats. Leider lässt sich der Synthesemechanismus der Zelle nicht so einfach wie herkömmliche Synthesemethoden an neue Ziele anpassen. Wenn wir aber natürliche „Synthesestrategien“ und Prozesse mit Methoden und Prinzipien der klassischen Synthese kombinieren, sollte es möglich sein, neue molekulare Funktionen hervorzubringen, die durch ein Verfahren allein nicht zugänglich sind.

1. Einleitung

1.1. Synthese an der Schnittstelle von Chemie und Biologie

Die Synthese war und ist ein Eckpfeiler der Chemie. Sie macht molekulare Strukturen mit neuartigen chemischen, biologischen und physikalischen Eigenschaften zugänglich, die von Antibiotika und Genen bis zu leitfähigen Polymeren und Supraleitern reichen. Die Synthese bietet auch eine einmalige Gelegenheit, Grundprinzipien der Chemie zu prüfen und neue Erkenntnisse über chemische Vorgänge zu gewinnen. Beispielsweise resultiert unser Wissen über reaktive Zwischenstufen großenteils aus iterativen präparativen und mechanistischen Studien.

1.2. Synthese biologischer Katalysatoren

Um diesen chemisch-biologischen Ansatz in der Synthese zu veranschaulichen, betrachten wir die Entwicklung von Enzymkatalysatoren. Enzyme katalysieren biologische Umwandlungen äußerst spezifisch und effizient, wobei sie nur eine begrenzte Zahl funktioneller Gruppen nutzen — ihnen stehen keine lithiumorganischen Reagentien oder Metallhydride zur Verfügung. In Anbetracht ihrer bemerkenswerten katalytischen Wirkung wurden erhebliche Anstrengungen unternommen, mithilfe einer ganzen Reihe spektroskopischer und mechanistischer Methoden die Enzymkatalyse auf molekularer Ebene zu verstehen. Dennoch ist der beste Test unseres Wissens über die Prinzipien der biologischen Katalyse die Synthese neuer Enzyme. Aber wie synthetisiert man etwas so Komplexes wie ein Enzym, wenn wir noch nicht einmal wissen, nach welchen Regeln die Faltung von Aminosäuresequenzen erfolgt?

Die Antwort gibt unser Verständnis des Evolutionsprozesses, über den die Natur Enzyme hervorbringt. Auf der untersten Stufe dieses Prozesses wird durch genetische

[*] Prof. Dr. P. G. Schultz, Prof. Dr. R. A. Lerner, J. Yin
Department of Chemistry and
The Skaggs Institute for Chemical Biology
The Scripps Research Institute
10550 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037 (USA)
Fax: (+1)858-784-9440 (PGS), (+1)858-784-9899 (RAL)
E-mail: schultz@scripps.edu, rlerner@scripps.edu

Rekombination und Mutation eine große, vielfältige Bibliothek molekularer Gerüste geschaffen. Danach werden aus dieser Bibliothek durch natürliche Selektion die Verbindungen mit der benötigten katalytischen Wirkung identifiziert. Weitere Mutations- und Selektionsrunden führen zu einer verbesserten Wirkung.^[1] Diese Methode unterscheidet sich stark von der traditionellen Synthesechemie, bei der die Verbindungen einzeln entworfen, synthetisiert und iterativ durch Verfeinern der Struktur optimiert werden. Leider beträgt der Entwicklungszeitraum bei der natürlichen Evolution im Unterschied zur Laborsynthese bis zu mehrere Milliarden Jahre. Die Herausforderung bei der Synthese neuer biologischer Katalysatoren besteht demnach darin, die Grundzüge der Enzymevolution in einer laborüblichen Zeitspanne zu bewerkstelligen.

Wenn man als Grundprinzip der katalytischen Wirkung annimmt, dass die Bindungsenergie selektiv genutzt wird, um bevorzugt Übergangszustände zu stabilisieren oder Grundzustände zu destabilisieren, vereinfacht sich das Problem auf die Synthese hochselektiver molekularer Rezeptoren.^[2] Während der präparative Aspekt eine große Herausforderung bleibt, gibt es für das Problem der molekularen Erkennung eine biologische Lösung. Es ist eine allgemein bekannte Tatsache in der Immunchemie, dass die Immunantwort zur Bildung eines Antikörpers führen kann, der zu praktisch jeder fremden, ihm präsentierten Molekülstruktur komplementär ist. Der Prozess, durch den diese selektiven, hochaffinen Rezeptoren gebildet werden, erinnert in vielerlei Hinsicht an die natürliche Evolution von Enzymen^[3–5] (Tabelle 1).

Tabelle 1. Gegenüberstellung der Entwicklung von Enzymen und Antikörpern.

Enzyme	Antikörper
Exon-Shuffling	V-D-J-Umordnung
Genduplikation	Sätze von V-, D- und J-Genelementen
Akkumulation von Punktmutationen	Somatische Hypermutation
Natürliche Selektion	Klonale Selektion
Zeitspanne: 10 ¹ –10 ⁸ Jahre	Zeitspanne: Wochen

Das Immunsystem „synthetisiert“ als Erstlösungen für das Erkennungsproblem etwa 10⁸ verschiedene Keimbahn-Antikörper, indem das Antikörpergen in seiner Gesamtlänge aus vier unterschiedlichen Gensegmenten, V (variable), J (joining), D (diversity) und C (constant), zusammengesetzt wird. Wenn jedes Gensegment aus einem beliebigen aus einer Anzahl Gene erhalten werden und bei der Rekombination der Segmente Insertion oder Deletion stattfinden kann, ist die Bildung einer Vielzahl von Antikörpersequenzen möglich (Abbildung 1). Diese spezielle „Synthese“-strategie konzentriert die molekulare Diversität in sechs hypervariablen Schleifen (loops), die die Ligandenbindungsstelle auf einem achtsträngigen antiparallelen β -Faltblattgrundgerüst bilden.^[6] Nachdem ein Keimbahn-Antikörper aufgrund seiner Affinität zum Antigen aus dem Pool ausgewählt wurde, entsteht zusätzliche strukturelle Diversität durch einen Affinitätsreifeprozess, bei dem über die gesamte variable Region somatische Mutationen eingeführt werden. Die Wiederholung dieses Vorgangs führt zu einem hochaffinen Antikörper.

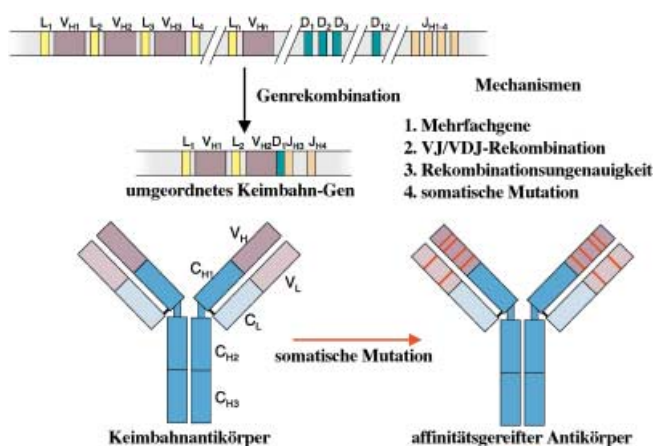


Abbildung 1. Das Hervorbringen immunologischer Diversität durch genetische Rekombination und somatische Mutation.

Die Immunantwort nutzt die gleiche entscheidende „Synthese“-strategie, die auch bei der natürlichen Selektion Verwendung findet: die Bildung molekularer Diversität. Der Hauptunterschied liegt in der Zeitspanne: Während die natürliche Selektion mehrere Millionen Jahre dauert, tritt die Immunantwort innerhalb von Wochen ein. Wenn man daher die immunologische Entwicklung eines Antikörpers genauso steuern kann wie die natürliche Evolution eines Enzyms, sollte man im Prinzip aus Antikörpern Enzym-ähnliche Katalysatoren herstellen können. Dies lässt sich durch Programmieren der Immunantwort mit mechanistischer Information über die interessierende chemische Umsetzung erreichen, auf etwa die gleiche Weise steuern mechanistische Erkenntnisse die Entwicklung von klassischer Synthese und Synthesemethoden. Allerdings werden beim zuerst genannten Verfahren die Prinzipien und Hilfsmittel der Chemie *zusammen* mit der wirkungsvollen biologischen Auffassung von molekularer Diversität genutzt, um eine neue Funktion zu synthetisieren. In diesem Aufsatz beschreiben wir eine Reihe von Versuchen zur Antikörperkatalyse, die dieses neue Konzept veranschaulichen.

2. Strategien für die Synthese katalytischer Antikörper

2.1. Stabilisierung des Übergangszustands

Eine der ersten Theorien, die zur Erklärung der enzymatischen Katalyse aufgestellt wurde, war Paulings Vorstellung der Stabilisierung von Übergangszuständen: „The assumption that the enzyme has a configuration complementary to the activated complex, and accordingly has the strongest power of attraction for the activated complex, means that the activation energy for the reaction is less in the presence of the enzyme than in its absence, and accordingly that the reaction would be speeded up by the enzyme.“^[7,8] Diese Vorstellung sollte experimentell zu prüfen sein, indem man die Immunantwort mit einem stabilen Molekül chemisch programmiert. Dieses Molekül imitiert die angenommenen strukturellen und elektronischen Merkmale des geschwindigkeitsbestimmenden

Übergangszustands für eine bestimmte Reaktion. Dadurch sollte sich eine Antikörperbindungsstelle entwickeln, deren Komplementarität zum Übergangszustand gegenüber der zum Substrat oder Produkt am höchsten ist. Dieser Antikörper sollte die Reaktion durch selektive Stabilisierung des gebundenen Übergangszustands und damit durch Verringerung der Freien Aktivierungsenergie für die Reaktion katalysieren.

Um zu prüfen, ob man mit dieser Methode eine Enzymwirkung synthetisieren kann, wollten wir Antikörper herstellen, die Acyltransferreaktionen katalysieren. Bei der in Abbildung 2a gezeigten Umesterung entsteht durch Zugabe des Alkohols **1** an den Ester **2** vermutlich ein tetraedrischer Übergangszustand, der die tetraedrische Zwischenstufe **3** bildet, die zum Produkt **4** zerfällt. Der zum Phosphonsäurediester **5** gebildete Antikörper 13D6.1, der die Ladungsverteilung und Konfiguration im Übergangszustand imitiert, katalysiert die Reaktion mit einer effektiven Molarität (EM; Substratkonzentration, die erforderlich ist, um die gleiche Reaktionsgeschwindigkeit ohne Katalysator zu erreichen) von etwa 10^4 – 10^5 M.^[9] Dieser Wert nähert sich dem theoretischen Maximum von 10^8 M, das Page und Jencks für eine

bimolekulare Reaktion berechnet haben, in der alle Translations- und Rotationsmodi entlang der Reaktionskoordinate in einem aktiven Zentrum des Enzyms eingefroren sind.^[10] Aus NMR-spektroskopischen Untersuchungen des Michaelis-Komplexes (Abbildung 2b) geht hervor, dass der Antikörper das Substrat **1** in einer für den Angriff auf den Ester **2** optimalen Anordnung bindet.^[11] Diese antikörperkatalysierte Reaktion ist auch bemerkenswert selektiv: Der Antikörper katalysiert trotz seiner Konzentration (55 M) keine Acylübertragungen auf Wassermoleküle. Ähnliche Selektivität haben Enzyme wie Triosephosphat-Isomerase, das gebundene Zwischenstufen vor Wasser maskieren kann.

Mit dieser Methode lässt sich nicht nur ein Enzym-ähnlicher Katalysator herstellen, man kann auch andere Mechanismen heranziehen, die Enzyme für die Katalyse ähnlicher Reaktionen entwickelt haben. Beispielsweise ist ein gegen den Phosphonsäuremonoester **9** gebildeter Antikörper (Abbildung 3a) ebenfalls ein hochselektiver und effizienter Acyltransfer-Katalysator ($EM = 10^5$ – 10^6 M).^[12] Allerdings verläuft die Reaktion in diesem Fall über die Bildung einer Acyl-Antikörper-Zwischenstufe. Röntgenkristallographische und Mutagenese-Untersuchungen sprechen für einen Mechanismus, bei dem ein Angriff von

Ser98^H des aktiven Zentrums auf den gebundenen Ester erfolgt (Abbildung 3b).^[12, 13] In diesem Beispiel nähert sich die immunologische Entwicklung einem Mechanismus an ähnlich dem, über den Serin-Proteasen und –Esterasen Acylübertragungen katalysieren. Eine Erklärung dieses Phänomens ist, dass es wegen des begrenzten „Reagentienpools“, der Proteinen zur Verfügung steht, nur eine begrenzte Zahl von Möglichkeiten zur Durchführung bestimmter chemischer Umwandlungen gibt.

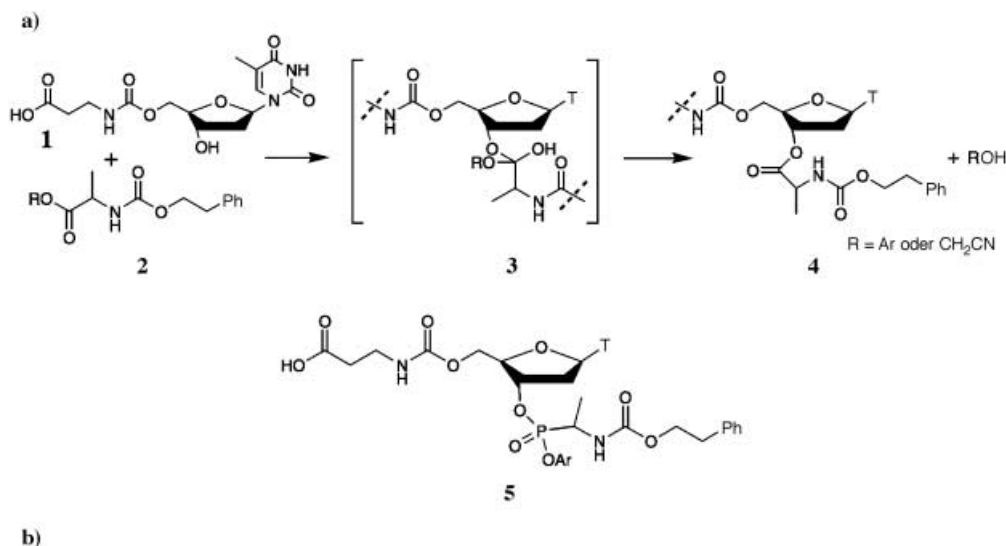


Abbildung 2. a) Acyltransfer vom Ester **2** auf den Alkohol **1** mit dem Antikörperkatalysator 13D6.1, der gegen den Phosphonsäurediester **5** gebildet wurde; b) NMR-spektroskopisch ermittelte Struktur des Michaelis-Komplexes aus dem Alkohol **1** (blau) und dem Ester **2** (orange).

2.2. Verzerrung

Eine andere klassische Theorie der Enzymkatalyse ist die 1930 von Haldane publizierte Vorstellung einer Substratverzerrung.^[14] Danach nutzen Enzyme (z. B. β -Glucosidasen) die Bindungsenergie nicht, um einen Übergangszustand selektiv zu stabilisieren, sondern um das gebundene Substrat zu deformieren oder zu verzerren: „The enzyme would thus tend to pull the salicin molecule apart... (or) push the molecules of glucose and saligenin together. The sa-

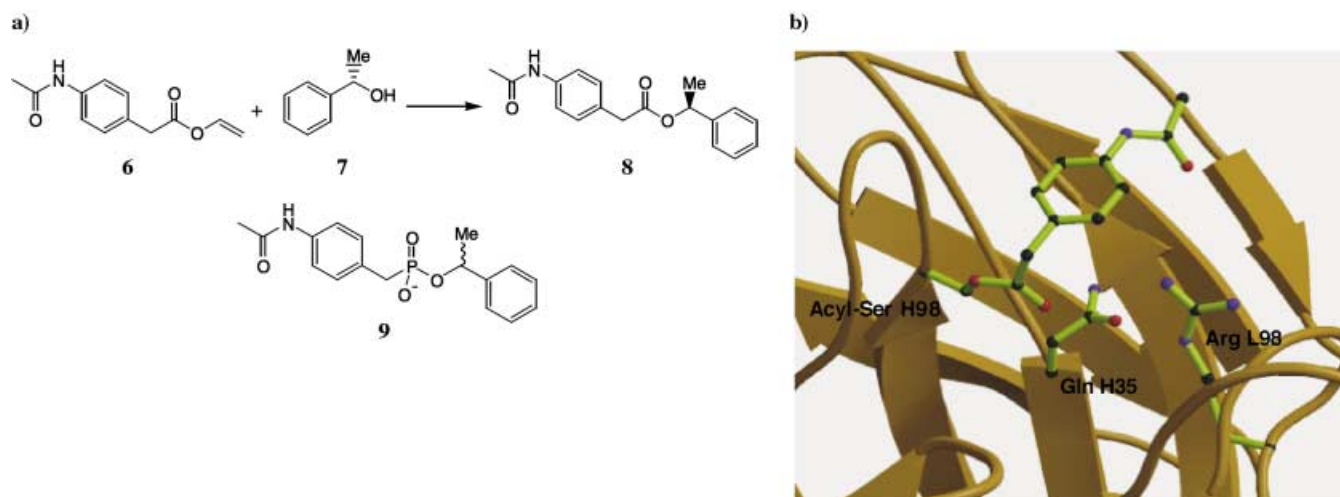


Abbildung 3. a) Acyltransfer vom Ester **6** auf den Alkohol **7** mit dem Antikörperkatalysator 21H3, der gegen das Hapten **9** gebildet wurde; b) modellierte Struktur der Acyl-Antikörper-Zwischenstufe auf der Basis der Struktur des Komplexes aus Antikörper und Hapten **9** im Kristall.

me hypothesis might clearly be applied to other hydrolytic enzymes. Using Fisher's lock and key simile, the key does not fit the lock quite perfectly but exercises a certain strain on it" (Abbildung 4). Diese Theorie war trotz beträchtlicher mechanistischer Bemühungen schwer zu beweisen. Wieder einmal bot die Synthese die Möglichkeit, diesen Gedanken durch immunologische Entwicklung eines katalytischen Antikörpers zu prüfen.

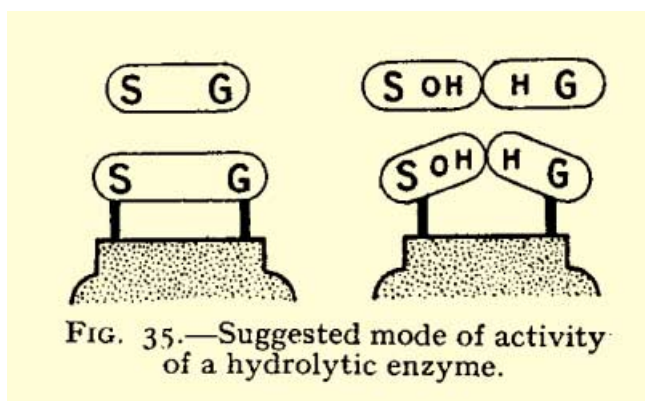


Abbildung 4. Verzerrungstheorie der Enzymkatalyse von Haldane am Beispiel von β -Glucosidase (nach Lit. [14]).

Das Enzym Ferrochelatase katalysiert den letzten Schritt in der Hämbiosynthese, die Insertion eines Metallions in den Porphyrinring. Man nimmt an, dass das Enzym die Reaktion katalysiert, indem es den planaren Porphyrinring verzerrt und die Komplexbildung des Metallions durch die freien Elektronenpaare der Pyrrolstickstoffatome erleichtert.^[15] Wenn das tatsächlich der Fall ist, sollte es möglich sein, eine Ferrochelatase durch Bildung von Antikörpern gegen ein verzerrtes Porphyrin zu synthetisieren. Um diese Annahme zu prüfen, wurde *N*-Methylmesoporphyrin (**12**), ein Mimetikum des verzerrten Substrats **10**, durch Alkylieren eines inneren Stickstoffatoms von Mesoporphyrin synthetisiert und Antikörper gegen **12** gebildet (Abbildung 5a). Der Antikörper 7G12 katalysierte die Metallierung von Mesoporphyrin

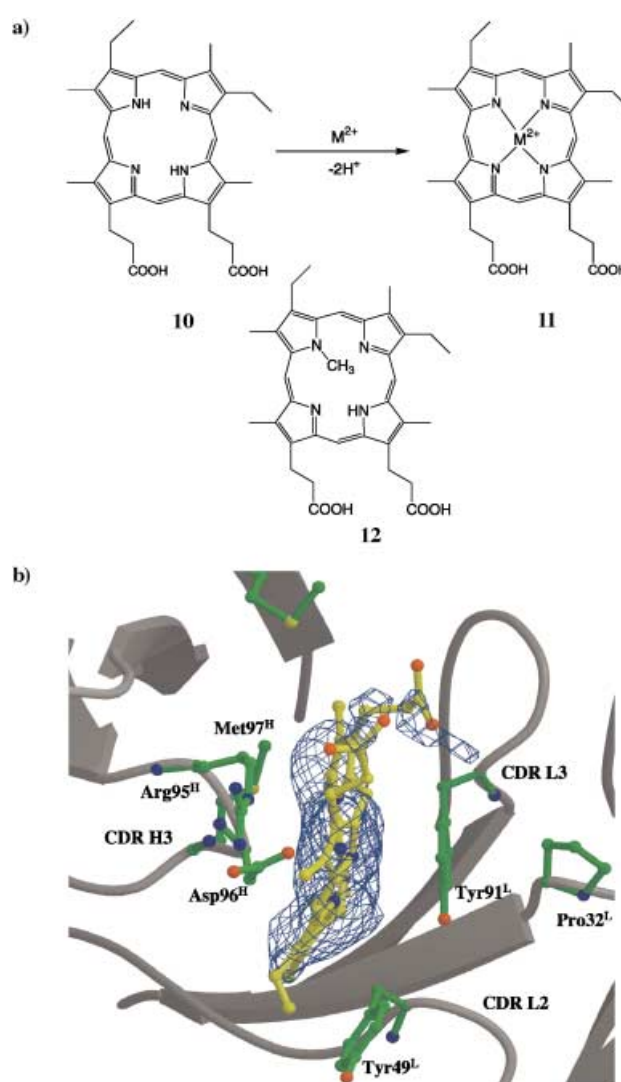


Abbildung 5. a) Metallierung von Mesoporphyrin (**10**) mit dem Antikörperkatalysator 7G12, der gegen *N*-Methylmesoporphyrin **12** gebildet wurde; b) Struktur des Michaelis-Komplexes 7G12-**10** im Kristall mit der bei 2.0 σ konturierten $F_o - F_c$ -Elektronendichte. Die Struktur von **10** ist gelb, Aminosäurereste im Antikörper 7G12 mit wichtigen Packungswechselwirkungen zu **10** sind grün dargestellt.

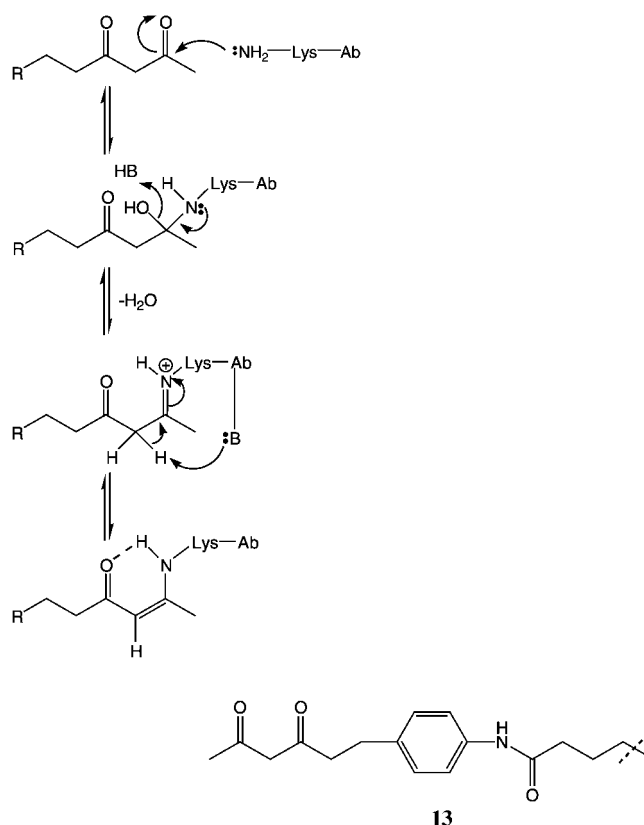
10 durch Zn^{2+} mit einer Geschwindigkeit, die der des natürlichen Biosynthese-Enzyms nahekommt.^[16] Durch Resonanz-Raman-Spektroskopie wurde gezeigt, dass der Porphyrinring aus seiner Ebene abwechselnd nach oben und unten verzerrt ist.^[17] Den direkten Strukturbeweis für diese Verzerrungshypothese liefern die kristallographischen Analysen der Antikörperkomplexe von *N*-Methylmesoporphyrin und Mesoporphyrin: Bei beiden ist das Ringsystem eindeutig verzerrt (Abbildung 5b).^[18, 19] Diese Verzerrung wird durch Packungswchselwirkungen zwischen den Pyrrolringen und Tyr49^L sowie Tyr91^L im aktiven Zentrum vermittelt. Die Synthese katalytischer Antikörper liefert demnach nicht nur neue biologische Katalysatoren, sondern prüft und bestätigt auch Grundprinzipien der Enzymkatalyse.

Der erwähnte Antikörper katalysiert auch die H_2O_2 -abhängige Oxidation organischer Substrate. Uns gelang es kürzlich, die katalytische Effizienz dieses Antikörpers *in vitro* weiterzuentwickeln. Dazu wurde eine Bibliothek aus Wirkstellen-Mutanten an Phagen präsentiert und anhand ihrer Fähigkeit selektiert, an Biotin gebundenes Tyramin als Substrat zu oxidieren. Die Oxidation der Tyramineinheit führt zur kovalenten Bindung von Biotin an den vom Phagen präsentierten Peroxidase-Antikörper, der danach mit Streptavidinkügelchen abgefangen werden kann. Eine einzige, mit dieser Methode selektierte Tyr49^LTrp-Mutante erhöhte die Geschwindigkeit auf das 20fache.^[19] Aktive Mutanten werden derzeit durch „DNA shuffling“ behandelt, um ihre katalytische Wirksamkeit zu verstärken.

2.3. Kovalente Katalyse

Ein weiteres wichtiges Prinzip der Enzymkatalyse ist die kovalente Katalyse, bei der kovalente Zwischenstufen genutzt werden, um die Freie Aktivierungsenergie für eine Reaktion zu senken.^[20–22] Welchen Beitrag leistet die Bildung dieser Zwischenstufen zur katalytischen Effizienz von Enzymen? Um das zu prüfen, sollte ein Antikörper gebildet werden, der die Aldolreaktion katalysiert, eine der wichtigsten Reaktionen zur C-C-Bindungsbildung in der organischen Synthese. Bei der Glycolyse katalysiert eine Aldolase diese Reaktion, indem zunächst mit einem Lysinrest des aktiven Zentrums eine Schiff-Base als Zwischenstufe gebildet wird.^[23] Um die Entwicklung eines Antikörpers mit reaktivem Lysin im aktiven Zentrum chemisch zu programmieren, wurde das β -Diketon **13** als Immunogen verwendet (Schema 1).^[24, 25] Antikörper mit einem geeignet positionierten Lysinrest wurden anhand ihrer Fähigkeit selektiert, eine stabile Schiff-Base mit dem β -Diketon-Protein-Konjugat zu bilden (ein als reaktive Immunisierung bezeichneter Vorgang).

Diese Versuche lieferten einen Antikörper (38C2), der Aldolreaktionen mit ausgezeichneter Spezifität und ähnlichen Geschwindigkeiten wie das natürliche Biosynthese-Enzym katalysiert. Tatsächlich verfügt dieser Antikörper über ein breites Substratspektrum und kann zahlreiche Aldolreaktionen mit sehr hohen Enantioselektivitäten (>98% *ee*) katalysieren (Abbildung 6a).^[26–28] Der Antikörper 38C2 wurde auch zur Racematspaltung von β -Hydroxyketonen im Gramm-Maßstab^[29] und zur selektiven Aktivie-



Schema 1. Bildung eines Aldolase-Antikörpers durch reaktive Immunisierung mit dem β -Diketon-Hapten **13**.

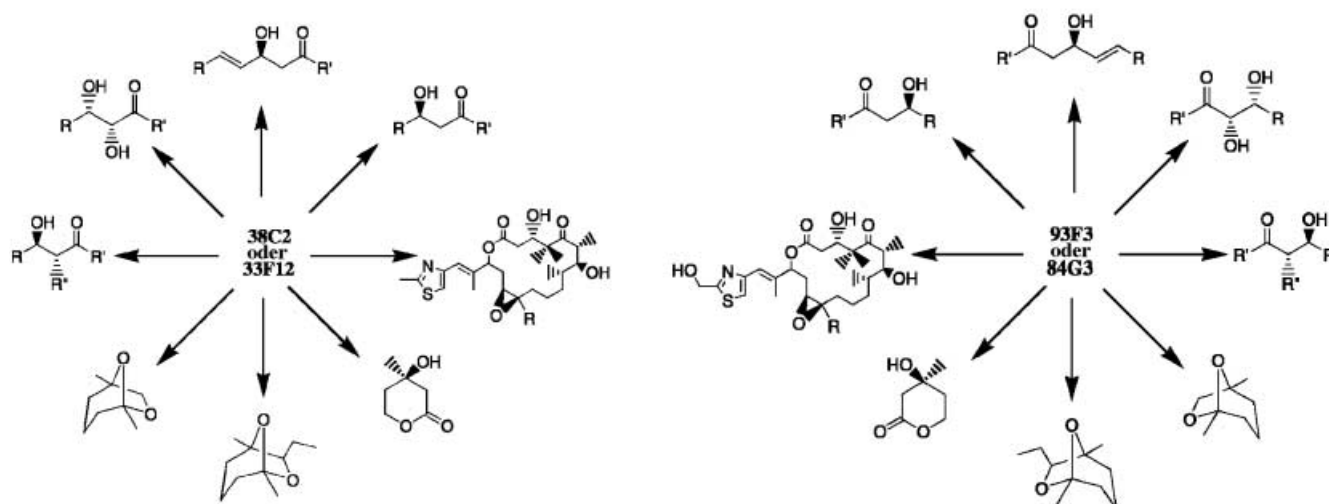
rung von „Prodrugs“ eingesetzt. Ferner wurden katalytische Antikörper (93F3 und 84G3) hergestellt, die Aldolreaktionen mit entgegengesetzter, ebenfalls hoher Enantioselektivität katalysieren.^[30]

Die Strukturen dieser Antikörper im Kristall ließen eine tiefe hydrophobe Tasche mit einem innen liegenden Lysinrest erkennen (Abbildung 6b).^[26] Diese Struktur gleicht in vieler Hinsicht der des entsprechenden Enzyms, trotz der völlig unterschiedlichen Gerüste dieser Proteine – ein weiteres Beispiel für konvergente Evolution. Diese Versuche zeigen erneut, dass man durch Kombinieren von immunologischer Diversität mit chemischen Grundprinzipien effiziente Katalysatoren herstellen kann, die Enzymen gleichkommen.

2.4. Selektive Stabilisierung von Übergangszuständen bei ungünstigen Reaktionen

Man kann nicht nur Antikörper „synthetisieren“, die einen geschwindigkeitsbestimmenden Übergangszustand stabilisieren, sondern auch solche, die zwei konkurrierende Übergangszustände unterschiedlich stabilisieren, sodass das kinetisch ungünstige Reaktionsprodukt entsteht, das dem Übergangszustand höherer Energie entspricht. Ein Beispiel hierfür ist eine antikörperkatalysierte Eliminierung, bei der der Antikörper 1D4 bevorzugt den ungünstigen Übergangszustand stabilisiert, der zur *syn*-Eliminierung von HF aus dem β -Fluorketon **14** führt (Schema 2).^[31] Für diesen Übergangszustand wurde eine etwa 5 kcal mol⁻¹ höhere Energie als für den

a)



b)

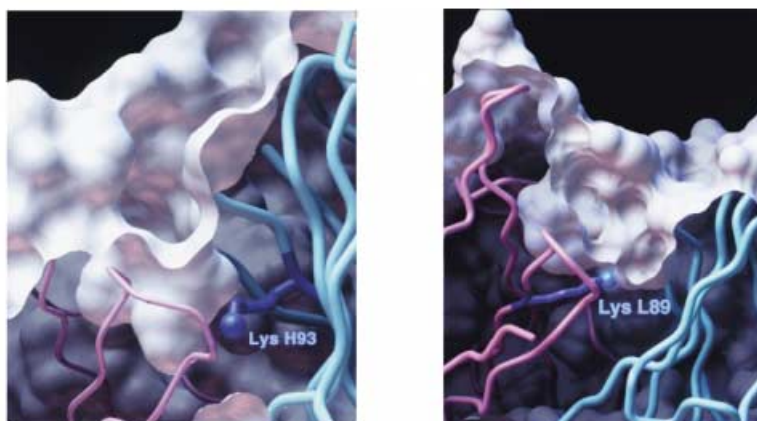
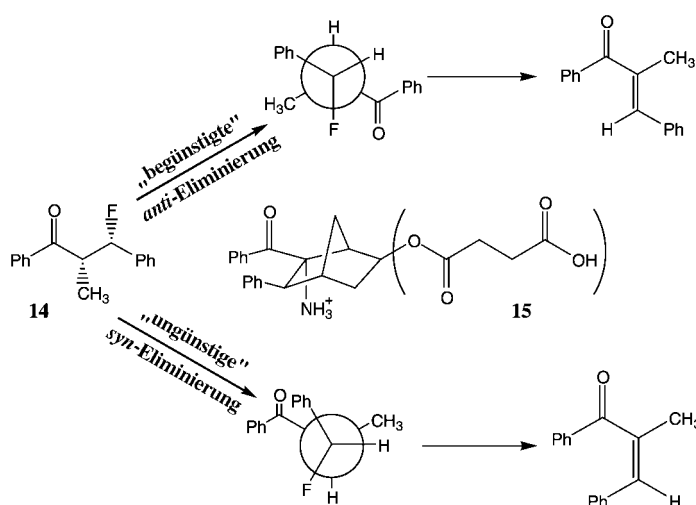


Abbildung 6. a) Breites Substratspektrum von antikörperkatalysierten Aldolreaktionen. Die beiden Antikörper haben Antipodenwirkung; b) Substratbindende Taschen der Antikörper 33F12 (links) und 93F3 (rechts). Die leichte Kette ist rosa, die schwere blau dargestellt, ferner ist der Lysinrest im aktiven Zentrum angegeben.



Schema 2. Ungünstige *syn*-Eliminierung mit dem Antikörperkatalysator 1D4, der gegen das Hapten **15** gebildet wurde.

der begünstigten *anti*-Eliminierung berechnet. Tatsächlich katalysiert der Antikörper ausschließlich die Bildung des ungünstigen Produkts. Die kristallographische Analyse des Antikörperkomplexes des Haptens **15** liefert die strukturelle Basis für den *syn*-Bindungsmodus des Substrats und die periplanare basenkatalysierte Eliminierung.^[32] Eine Reihe anderer ungünstiger Reaktionen wurde ebenfalls durch Antikörper katalysiert, darunter Epoxidöffnungen,^[33] Diels-Alder-Reaktionen^[34, 35] und kationische Umlagerungen.^[36–38] Mithilfe der Antikörperbindungsenergie lassen sich demnach Übergangszustandsenergien in einer Art und Weise steuern, die durch klassische Synthese nur schwer zu erreichen wäre.

2.5. Kombination von Antikörperbindungsenergie mit Reaktionen angeregter Zustände

Bei den vorangegangenen Beispielen wurde die Antikörperbindungsenergie genutzt, um die relativen Energien ver-

schiedener Spezies entlang einer thermisch besetzten Reaktionskoordinate zu beeinflussen. Es gab aber auch Versuche, die Photophysik und Photochemie der Energieflächen angeregter Zustände über die Antikörperbindungsenergie zu steuern.^[39] Beispielsweise wurde gegen das *trans*-Stilbenhapten **16** eine Reihe monoklonaler Antikörper gebildet, die bei der Bindung an **16** unterschiedliche fluoreszenzspektroskopische Eigenschaften zeigen (Abbildung 7a). So lieferte der

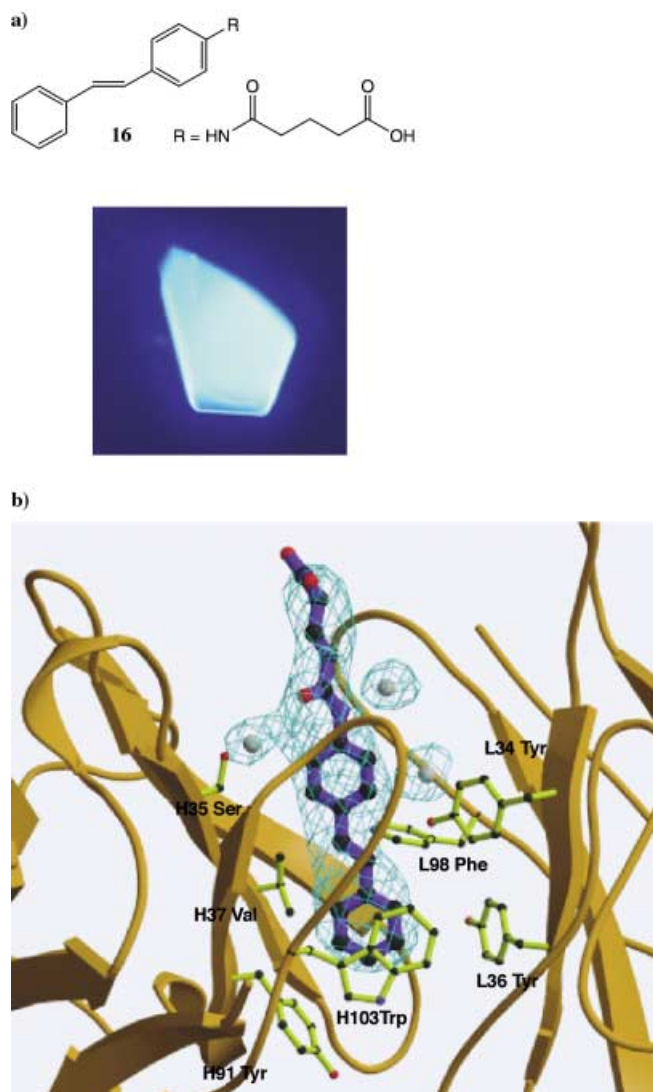


Abbildung 7. a) Struktur des *trans*-Stilbens **16** und ein Kristall des Fab 19G2-**16**-Komplexes unter UV-Licht (Fab = Antigen-bindendes Fragment eines Antikörpers); b) Struktur des Fab 19G2-**16**-Komplexes im Kristall. Das Hapten **16** ist blau dargestellt, die F_o-F_c -Elektronendichte wurde bei 2.0 σ eingezeichnet.

Antikörper 19G2 eine blaue Fluoreszenz mit der Quantenausbeute $\phi_f \approx 0.80$ und einer Strahlungsdauer von > 30 ns, die auf einen Anregungskomplex (excited-state complex, „Exciplex“) zwischen *trans*-Stilben und dem Antikörper schließen lässt. Die Reaktion des blau fluoreszierenden Antikörpers erinnert an das Verhalten von *trans*-Stilbenlösungen bei sehr tiefen Temperaturen, welche die Isomerisierung im angeregten Zustand einschränken und dadurch die Fluoreszenzquantenausbeute erhöhen. Beim Abkühlen eines blau fluoreszie-

renden Antikörperkomplexes unter eine kritische Temperatur (250 K) verschwand aber überraschend die blaue Emission, und es entstand ein purpurroter Komplex. Der Antikörper 19G2 steuert also nicht nur die Isomerisierungs-koordinate von *trans*-Stilben, sondern verknüpft diese Kombination auch dynamisch mit den Resten aktiver Zentren (Abbildung 7b). Diese und andere Versuche über Photospal-tungen angeregter Zustände^[40] bieten ein einzigartiges experi-mentelles Verfahren, die Energetik und Umwandlung kurzlebiger angeregter Zustände ineinander zu kontrollieren.

2.6. Endogene Antikörperkatalyse

Könnten in Anbetracht des erwiesenen katalytischen Potenzials des Antikörpermoleküls im menschlichen Körper endogene katalytische Antikörper existieren? Paul et al. haben berichtet, dass im Serum von Patienten mit Auto-immunerkrankungen Antigen-spezifische autokatalytische Antikörper vorkommen.^[41] Insbesondere wurden Antikörper nachgewiesen, die das vasoaktive Intestinalpeptid (VIP) effizient hydrolysieren. Der Mechanismus, über den diese endogenen katalytischen Antikörper entstehen, ist noch nicht bekannt, er könnte aber mit der Bildung von antiidiotypischen Antikörpern zusammenhängen. Diese Methode wurde im Labor zur Herstellung von Antikörper-Esterasen und -Phosphodiesterasen eingesetzt.^[42] Alternativ kann auch eine ausschließlich auf der Bindungsaffinität basierende Selektion in manchen Fällen zur Katalyse führen. Tatsächlich hydrolysierten monoklonale Antikörper, die unabhängig von einem VIP-Proteinträger-Konjugat gebildet wurden, VIP mit einer katalytischen Effizienz (k_{kat}/K_m) von $6 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$.^[41] Molecular-Modeling- und Mutagenese-Untersuchungen zufolge haben diese Antikörper eine katalytische Dyade (Ser-His) im aktiven Zentrum. Eine ähnliche katalytische Dyade wurde kristallographisch in einem Phosphonat-spezifischen estero-lytischen Antikörper nachgewiesen.^[43]

3. Die Evolution von Bindungsenergie und Katalyse

Die Antikörperkatalyse bietet nicht nur die Möglichkeit, Grundvorstellungen über die Enzymkatalyse durch „Syn-these“ zu prüfen, sondern auch die einmalige Gelegenheit, die Evolution von Bindungsenergie und katalytischer Wirkung in Proteinen zu untersuchen. Wie bereits erwähnt, gleichen kombinatorische und Mutationsvorgänge des Immunsystems in vieler Hinsicht denen, die während der natürlichen Evolution von Enzymen stattfinden (Tabelle 1 und Abbildung 1). Da die Immunantwort aber in Echtzeit erfolgt, besteht die Möglichkeit, die gesamte immunologische Entwicklung eines katalytischen Antikörpers – von der Keimbahnvorstufe bis zum affinitätsgereiften Katalysator – ebenso zu analysieren wie die mutmaßlichen Zwischenstufen auf diesem Weg. Eine derartige Analyse wurde bisher für fünf katalytische Anti-körper durchgeführt und hat eine Reihe fundamentaler Erkenntnisse erbracht.

Betrachten wir beispielsweise die Entwicklung des Ferro-chelatase-Antikörperkatalysators 7G12. Wie in Abschnitt 2.2

beschrieben, hat dieser Antikörper einen ähnlichen Katalysemechanismus wie das natürlich vorkommende Enzym. Der Keimbahnantikörper akkumuliert während seiner Affinitätsreife fünf somatische Mutationen (zwei in der leichten und drei in der schweren Kette).^[18] Diese Mutationen bewirken eine 100-fache Steigerung der Bindungsaffinität mit gleichzeitiger Zunahme der katalytischen Effizienz. Die Strukturen von Keimbahn- und affinitätsgereiften Antikörpern im Kristall (jeweils Hapten-gebunden und frei) wurden röntgenographisch bestimmt (Abbildung 8).^[18, 19] Der affinitätsgereifte Antikörper bindet *N*-Methylmesoporphyrin nach dem

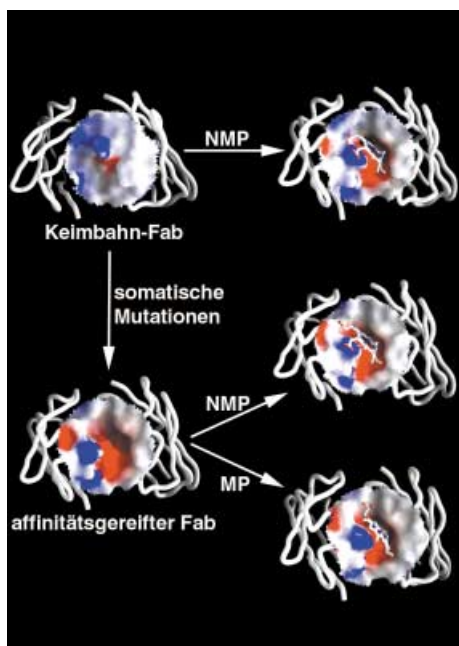


Abbildung 8. Unterschiede im elektrostatischen Oberflächenpotential der Antikörper-Bindungsstelle (combining site) des Keimbahn-Fab und des affinitätsgereiften Fab von Antikörper 7G12 und ihre unterschiedlichen Antworten auf die Bindung des Haptens *N*-Methylmesoporphyrin (NMP) **12** und des Substrats Mesoporphyrin **10** (MP). Negatives (rot) und positives Potential (blau).

„Schlüssel-Schloss“-Prinzip von Fischer,^[44] wie für eine hochaffine Bindungsstelle mit präorganisierter Konformation im aktiven Zentrum zu erwarten ist. Dagegen erfährt der Keimbahnantikörper eine signifikante Konformationsänderung bei der Bindung des Haptens, besonders in der CDR-H3-Schleife. Diese durch angepasste Bindung induzierte Konformation wird durch somatische Mutation gesichert, insbesondere durch eine Ser^{97H}-Met-Mutation, die einen Knick im Gerüst der CDR-H3-Schleife hervorruft. Außerdem verstärkt eine somatische Ala^{32L}-Pro-Mutation die Packungswechselwirkung mit Tyr^{91L}, die offenbar den gebundenen Porphyrinring verzerrt.^[18]

Eine konformative Flexibilität wie bei den Ferrochelatasen-Keimbahnstrukturen mit und ohne Ligand tritt auch bei drei der vier anderen strukturell charakterisierten Keimbahnantikörper auf: einem hydrolytischen Antikörper (48G7),^[45, 46] einem Oxy-Cope-Katalysator (AZ28)^[47, 48] und einem redoxaktiven Antikörper (28B4).^[49, 50] In allen Fällen erfolgt bei der Bindung des Liganden eine deutliche Reorganisation der

Seitenkette im aktiven Zentrum der Keimbahnantikörper, während zwischen der ligandengebundenen und der freien Form des affinitätsgereiften Antikörpers keine signifikanten Strukturunterschiede bestehen. Für die Fixierung der optimalen Wirkstellenkonformation sind somatische Mutationen von entscheidender Bedeutung.^[18, 46, 48, 50, 51] Lediglich bei dem Keimbahnantikörper für einen Diels-Alder-Katalysator tritt diese Strukturänderung nicht auf; in diesem Fall ist die leichte Keimbahnkette polyspezifisch.^[52]

Vor mehr als fünfzig Jahren gab es erhebliche Diskussionen über den Mechanismus, mit dem das Immunsystem selektive, hochaffine Rezeptoren für beinahe unendlich viele Liganden entwickeln kann. Nachdem feststand, dass das Immunsystem zahlreiche Antikörper mit unterschiedlichen Sequenzen durch Rekombination und somatische Mutation herstellen kann, wurde diese Sequenzdiversität allgemein als Grund für das riesige Bindungspotenzial des Antikörperrepertoires angesehen.^[3–5] Haurowitz und Pauling et al. argumentierten aber, dass das praktisch unendliche Bindungspotenzial des Antikörpermoleküls auch auf der Konformationsdiversität beruhen könnte.^[53, 54] So wie die menschliche Hand zahlreiche Strukturen erfassen und sich ihrer Form anpassen kann, so könnte ein aktives Zentrum des Antikörpers seine Form ändern, um komplementär zu praktisch unendlichen vielen Liganden zu sein. Dieses Modell wurde als chemische Instruktionstheorie bezeichnet (Abbildung 9).

Die ersten Strukturuntersuchungen an Keimbahnantikörpern lassen erkennen, dass die Konformationsdiversität tatsächlich eine Schlüsselrolle für das Keimbahnbindungspotenzial spielt und dem Keimbahnantikörper viele verschiedene Strukturen (und Arten der Ligandenbindung) ermöglicht.^[18, 46, 48, 50] Diese Konformationsdiversität erhöht die Zahl möglicher Strukturen der Keimbahn-Bindungsstelle (combining site) drastisch. Die Konformation des aktiven Zentrums im affinitätsgereiften Antikörper (der optimale Komplementarität zum gebundenen Liganden hat) wird nicht durch Faltung des übrigen Antikörpermoleküls festgelegt (wie Pauling angenommen hat), sondern vielmehr durch somatische Mutationen. Von Bedeutung ist auch, dass den Untersuchungen zufolge die somatische Mutation entweder im aktiven Zentrum oder deutlich entfernt davon stattfinden kann und die Ligandenbindung über damit verbundene räumliche Sekundärwechselwirkungen beeinflusst.

Diese Arbeiten bieten nicht nur grundlegend neue Einblicke in die Immunantwort auf molekularer Ebene, sie sind auch für die Entwicklung der bindenden und/oder katalytischen Wirkung anderer Proteine von Bedeutung. Beispielsweise stellte sich heraus, dass viele Rezeptoroberflächen für Proteinliganden ebenfalls konformativ amorph sind und so zahlreiche verschiedene Proteinliganden und kleine Moleküle mit derselben molekularen Oberfläche binden können.^[55] Mutationsstudien an Enzymen lassen zudem den vorläufigen Schluss zu, dass man bindende und katalytische Eigenschaften von Enzymen durch Mutationen außerhalb des aktiven Zentrums erheblich beeinflussen kann; auf ungefähr gleiche Weise wirken sich somatische Mutationen in der variablen Region des Antikörpers auf die Reifung der Bindungsaffinität aus.^[56] Diese Erkenntnis ändert derzeitige Mutagenesestrategien für die In-vitro-Entwicklung von Enzymen deutlich, da

Oct., 1940

A THEORY OF THE FORMATION OF ANTIBODIES

2645

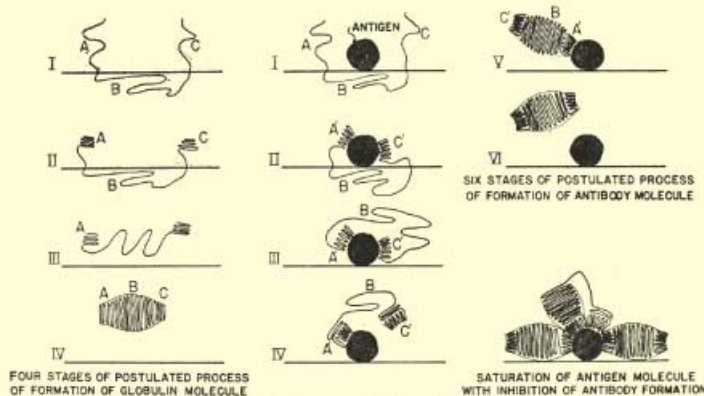
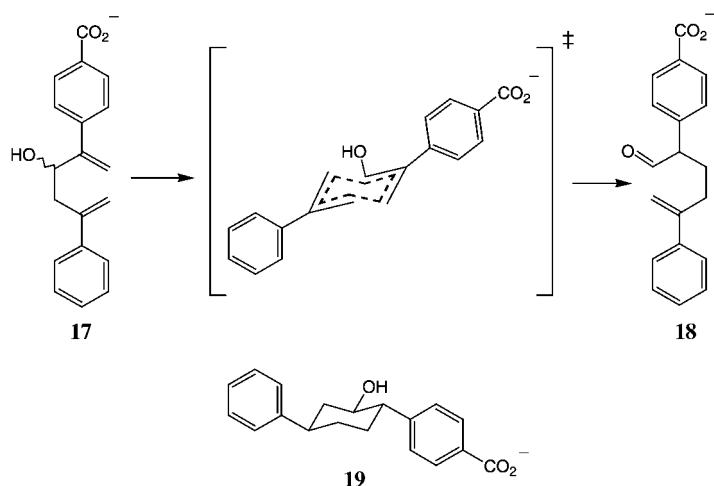


Abbildung 9. Die „Theorie der chemischen Instruktion“ von Pauling (nach Lit. [54]).

nun die vom Immunsystem genutzten Methoden berücksichtigt werden.^[57]

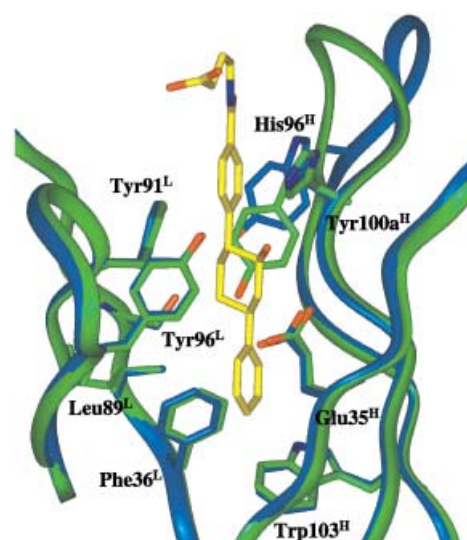
Ähnliche Untersuchungen zur immunologischen Entwicklung des Antikörpers AZ28, der eine Oxy-Cope-Umlagerung katalysiert, lassen darauf schließen, dass die Konformationsdiversität des Keimbahnrepertoires auch eine dynamische Wirkung bei der Katalyse haben kann. Man ging davon aus, dass ein zum sesselförmigen Hapten **19** gebildeter Antikörper die zugehörige Oxy-Cope-Umlagerung katalysieren könnte (Schema 3), indem er das acyclische Substrat **17** in einer cyclischen Konformation mit bevorzugter Orientierung der π -Orbitale bindet.^[58] Derartige stereoelektronische Effekte sollen bei der Enzymkatalyse eine entscheidende Rolle spielen.^[59, 60] Überraschenderweise beschleunigte der Keimbahnantikörper die Reaktion auf das 3×10^5 -fache (und damit auf das Dreifache des entsprechenden Enzyms Chorismat-Mutase), während der affinitätsgereifte Antikörper von AZ28 etwa 100-fach weniger wirksam war. Strukturuntersuchungen am affinitätsgereiften Antikörper belegten, dass auch in

Schema 3. Übergangszustandsanalogon **19** und Oxy-Cope-Umlagerung mit dem Antikörperkatalysator AZ28.

diesem Fall das Hapten in einer Schlüssel-Schloss-Konformation gebunden ist und Packungswchselwirkungen zwischen dem Antikörper und den Arylsubstituenten in 2,5-Position des Substrats in der gewünschten cyclischen Konformation festhalten (in Einklang mit NMR-spektroskopischen Untersuchungen des Michaelis-Komplexes).^[47]

Zu der Geschwindigkeitserhöhung scheint auch ein Effekt des anionischen Substituenten beizutragen. Allerdings steht der 2-Arylring von gebundenem **19** orthogonal zum Sechsen- π -Elektronensystem, was zu einer geringen Orbitalüberlappung im Übergangszustand führt.^[47] Eine Erklärung für die trotz der geringeren Affinität zum Hapten **19** erhöhte Geschwindigkeit mit diesem Antikörper bieten die Strukturen der ligandengebundenen und der freien

Form des Keimbahnantikörpers (Abbildung 10). Auch dieser Keimbahnantikörper scheint konformativ flexibel zu sein, sodass hier der 2-Arylring in die Planarität rotieren kann, was zu größerer Überlappung der π -Orbitale und damit zur Verringerung der Aktivierungsenergie führt.^[47, 48, 61] Auch wenn dies ein statisches Bild ist und NMR-spektroskopisch bestätigt werden muss, so ist es doch ein deutlicher Hinweis darauf, dass die Konformationsdiversität des Keimbahnrepertoires auch eine dynamische Funktion bei der Katalyse haben kann. Dies ist ähnlich zu der heutigen Erkenntnis, dass die Dynamik der Seitenkette eine entscheidende Rolle bei der Enzymkatalyse spielt. Außerdem könnten die induzierten Anpassungsmechanismen von Enzymen Überreste früherer konformativer Flexibilität sein, die aufgrund eines katalytisch-selektiven Vorteils während der Evolution beibehalten wurde.

Abbildung 10. Überlappung der aktiven Zentren in den Strukturen des Keimbahnantikörpers AZ28 mit Hapten **19** (blau) und ohne Hapten (grün). Das Hapten ist gelb dargestellt.

4. Erweiterung der Vorstellung von biologischer Diversität

Die kombinatorischen Strategien, die in der Immunantwort zum Ausdruck kommen und Immunchemikern gut bekannt sind, werden inzwischen von Chemikern auf zahlreiche Syntheseprobleme angewendet.^[62] Dieser Ansatz lässt sich auf jede Molekülstruktur, die schrittweise oder konzertiert aus einem Satz von Molekülvorstufen aufgebaut werden kann, anwenden. Weiterhin muss es einen Screening- oder Selektionsprozess für die gewünschte Funktion geben. Beispielsweise werden synthetische Protein- und Nucleinsäurebibliotheken auf neue Katalyse- und Bindungseigenschaften durchsucht. Auch kleine synthetische Moleküle können zur Erzeugung chemischer Diversität kombinatorisch aus Bausteinen zusammengesetzt und auf selektive Bindung an biologische Rezeptoren (die Umkehr der Immunantwort) gescreent werden. Kombinatorische Methoden wurden sogar genutzt, um das gesamte Periodensystem erfolgreich nach Elementkombinationen zu durchsuchen, die Materialien mit neuartigen elektronischen, katalytischen, strukturellen, magnetischen und optischen Eigenschaften liefern (Abbildung 11).^[63, 64] Die Charakterisierung der Eigenschaften dieser neuen Verbindungen liefert neue physikalische, chemische und biologische Erkenntnisse, die das theoretische Wissen über die Beziehung zwischen Molekülstruktur und Wirkung erweitern. Der Einblick in diese Mechanismen führt wiederum dazu, eine molekulare Funktion besser synthetisieren zu können.

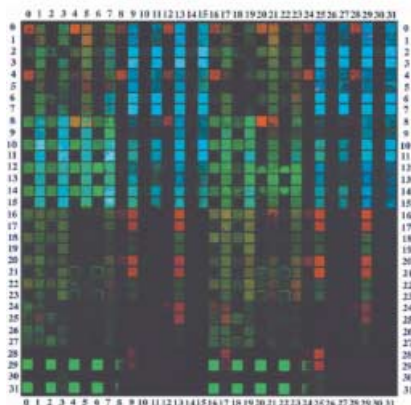
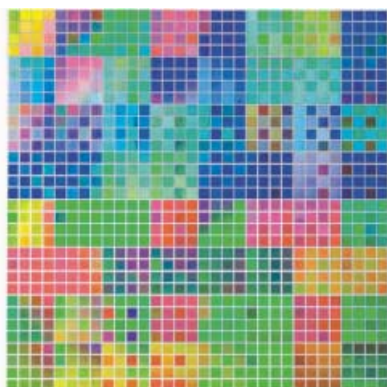


Abbildung 11. Bibliothek aus Metalloxiden mit neuen fluoreszierenden Stoffen unter Umgebungslicht (oben) und UV-Bestrahlung (unten).

5. Alle Antikörper sind katalytisch – ein neues Paradigma

Die beschriebenen Beispiele für die Antikörperkatalyse unterstreichen das enorme chemische Potenzial, das die natürliche molekulare Diversität zur Herstellung selektiver Katalysatoren hat, wenn sie von Chemikern mit dem passenden chemischen Befehl programmiert wird. Es gibt bisher mehr als hundert katalysierte Reaktionen, darunter C-C-Bindungsbildungen (z. B. Diels-Alder- und Aldolreaktionen), Redoxreaktionen (z. B. Heteroatom-, Kohlenstoff- und H₂O-Oxidation), Umlagerungen (z. B. sigmatrope Umlagerungen und kationische Cyclisierungen) sowie hydrolytische Reaktionen (z. B. Hydrolyse von Ester-, Amid-, Phosphodiester- und Glycosidbindungen). Die Anwendungsbreite der Antikörperkatalyse wirft zwangsläufig die Frage auf, ob die natürliche Antikörperkatalyse eine intrinsische Komponente der Immunantwort ist, die entweder toxische Produkte in unschädliche Stoffe umwandelt oder sogar toxische Stoffe bildet, um Infektionserreger abzutöten. Der Nachweis einer derartigen Wirkung würde einen wesentlichen Einfluss auf die allgemein akzeptierte Auffassung haben, dass die Bindung von Antikörpern an Zielantigene lediglich dazu dient, die Zerstörung durch Effektorsysteme zu initiieren, die nicht Teil des Antikörpermoleküls sind.

Bemerkenswerterweise scheinen inzwischen alle Antikörper ungeachtet ihrer Herkunft oder antigenen Spezifität selbst Katalysatoren zu sein, mit dem Potenzial zur Herstellung einer beachtlichen Reihe hochtoxischer Oxidantien, die Antigene zerstören können.^[65–68] Einige dieser Oxidantien gleichen denen, die von Phagozyten gebildet werden, während andere in der Biologie bisher nicht nachgewiesen wurden. Diese Ergebnisse könnten zu einer wesentlichen Änderung unseres Wissens über die Wirkungsweise der humoralen Komponente des Immunsystems führen.

Die Arbeit des vergangenen Jahrhunderts führte zu einem Konsens darüber, wie die humorale Komponente des Immunsystems organisiert ist (Abbildung 12). Der Hauptgedanke ist, dass Antikörper, anders als Enzyme, keine differenzierten chemischen Funktionen haben. Sie dienen lediglich als Signalmoleküle, die bei der Bindung eines Antigens Effektorsysteme aktivieren. Diese Effektorsysteme, z. B. die Komplementkaskade und phagozytische Zellen, werden im Ge-

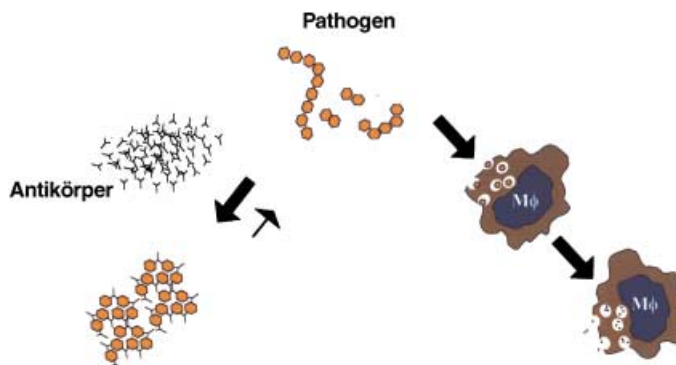
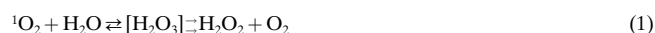


Abbildung 12. Konventionelle Auffassung über die Aufgaben von Antikörpern im humoralen System: Antikörper binden die Pathogene, während Phagozyten sie vernichten.

gensatz zu Antikörpern als äußerst raffinierte chemische Kaskaden angesehen, die unter Bildung reaktiver Proteine bzw. chemischer Oxidantien verlaufen, mit denen Infektionserreger abgetötet werden können. Wenn aber der Antikörper selbst ein Katalysator ist, der die Bildung von Oxidantien katalysiert, werden Erkennung und Abtötung im Antikörpermolekül selbst vereinigt, und die Aufgabe des Antikörpers bei der Abwehr geht weit über eine einfache Signalgebung hinaus. Neben der Änderung unserer Vorstellungen über die Aufgabe von Antikörpern in der Immunabwehr könnten wir auch neue Erkenntnisse über ihre Rolle bei Erkrankungen gewinnen. Die von ihnen gebildeten Oxidantien haben bisher unbekannte Auswirkungen auf das Krankheitsbild, das auftritt, wenn dieses Abwehrsystem nicht perfekt geregelt ist.

Untersuchungen an dem in Abschnitt 2.5 erwähnten blau fluoreszierenden Antikörper^[39] ergaben, dass dieser und alle bisher charakterisierten Antikörper aus Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) ohne Schädigung des Proteinkatalysators H_2O_2 herstellen können. Metalle oder Cl^- konnten dabei als Elektronenquelle ausgeschlossen werden. Auf der Grundlage von Isotopeneinbauversuchen und kinetischen Daten nahm man an, dass die Antikörper H_2O als Elektronenquelle nutzen und dadurch seine Anlagerung an $^1\text{O}_2$ unter Bildung von H_2O_3 als Zwischenstufe erleichtern [Gl. (1)]



Röntgenkristallographische Untersuchungen mit Xenon deuten auf mutmaßliche konservierte Sauerstoffbindungsstellen innerhalb der Antikörperwindung hin, die diese Umsetzung initiieren könnten. Die genaue Beschaffenheit der Oxidantien, die durch die antikörperkatalysierte Wasser-oxidationskaskade produziert werden, wird zwar noch untersucht, dennoch haben Goddard et al. eine Reihe energetisch plausibler Reaktionswege berechnet, nach denen H_2O_3 unter Bildung von H_2O_2 kollabieren kann.^[67, 68] Viele dieser Mechanismen bilden vermutlich hochreaktive Oxidantien, die in der Biologie bisher noch nicht beobachtet wurden.

Eine häufig gestellte Frage betrifft den Zugang von Antikörpern zum Substrat $^1\text{O}_2$, das sie für die Initiierung der Oxidationskaskade benötigen. Interessanterweise bilden sie $^1\text{O}_2$ durch Reaktion von H_2O_2 mit HOCl zu HO_2Cl , das unter Bildung von $^1\text{O}_2$ weiterreagiert, wenn die Antikörperbindung an den Infektionserreger signalisiert, die zellulären Effektorsysteme in den weißen Blutkörperchen zu aktivieren. Diese Signalgebung durch den Antikörper bewirkt, dass dessen eigenes Substrat gebildet wird, sodass genau der Antikörper, der den Prozess in Gang gebracht hat und noch an den Infektionserreger gebunden ist, seine eigenen Oxidantien herstellen kann. Diese Kaskade erscheint zwar kompliziert, man sollte aber nicht vergessen, dass es die Aufgabe des Systems ist, hochtoxische Substanzen zu produzieren, deren Herstellung strikt reguliert werden muss, um einen Kollateralschaden für den Wirt zu vermeiden. Da das Antikörpermolekül dem Infektionserreger am nächsten kommt, könnte man erwarten, dass das von ihm gebildete Oxidans das wirksamste ist und gleichzeitig den Kollateralschaden minimiert. Dies hat besondere Bedeutung, wenn die Oxidantien kurzlebig sind. Auf dem Gebiet der Antikörperkatalyse

überrascht vielleicht am meisten, dass man die selektive Bindungsenergie des Antikörpermoleküls für die Katalyse nutzen wollte und schließlich entdeckte, dass diese Proteine schon immer Enzyme waren.

Die Autoren danken Tanya Gresham, Coran Watanabe und Andrew Martin für ihre wertvolle Mitarbeit, die diesen Kurzaufsatz ermöglichte. Dieser Beitrag hat die Publikationsnummer 14904-CH des Scripps Research Institute.

Eingegangen am 2. April 2002 [M1561]

- [1] M. Eigen, *Steps Towards Life, a Perspective on Evolution*, Oxford University, Oxford, **1992**.
- [2] W. P. Jencks, *Catalysis in Chemistry and Enzymology*, McGraw-Hill, New York, **1969**.
- [3] F. M. Burnet, *The Clonal Selection Theory of Acquired Immunity*, Cambridge University, Cambridge, **1959**.
- [4] D. W. Talmage, *Science* **1959**, 129, 1643.
- [5] S. Tonegawa, *Nature* **1983**, 302, 575.
- [6] D. R. Davies, S. Chacko, *Acc. Chem. Res.* **1993**, 26, 421.
- [7] L. Pauling, *Chem. Eng. News* **1946**, 24, 1375.
- [8] L. Pauling, *Am. Scient.* **1948**, 36, 51.
- [9] J. R. Jacobsen, J. R. Prudent, L. Kochersperger, S. Yonkovich, P. G. Schultz, *Science* **1992**, 256, 365.
- [10] M. I. Page, W. P. Jencks, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1971**, 68, 1678.
- [11] E. M. Driggers, C. W. Liu, D. E. Wemmer, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 7395.
- [12] P. Wirsching, J. A. Ashley, S. J. Benkovic, K. D. Janda, R. A. Lerner, *Science* **1991**, 252, 680.
- [13] R. C. Stevens, persönliche Mitteilung.
- [14] J. B. S. Haldane, *Enzymes*, Longmans Green, London, **1930**.
- [15] M. J. Bain-Ackerman, D. K. Lavalley, *Inorg. Chem.* **1979**, 18, 3358.
- [16] A. G. Cochran, P. G. Schultz, *Science* **1990**, 249, 781.
- [17] M. E. Blackwood, Jr., T. S. Rush III, F. Romesberg, P. G. Schultz, T. G. Spiro, *Biochemistry* **1998**, 37, 779.
- [18] F. E. Romesberg, B. D. Santarsiero, B. Spiller, J. Yin, D. Barnes, P. G. Schultz, R. C. Stevens, *Biochemistry* **1998**, 37, 14404.
- [19] J. Yin, A. E. Beuscher III, S. Andryski, R. C. Stevens, P. G. Schultz, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [20] E. E. Snell, S. J. Di Mari in *The Enzymes*, Vol. 2 (Hrsg.: P. D. Boyer), Academic Press, New York, **1970**, S. 335.
- [21] G. A. Hamilton, F. H. Westheimer, *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, 81, 6332.
- [22] O. Tsolas, B. L. Horecker in *The Enzymes*, Vol. 7 (Hrsg.: P. D. Boyer), Academic Press, New York, **1972**, S. 259.
- [23] A. Heine, G. DeSantis, J. G. Luz, M. Mitchell, C. H. Wong, I. A. Wilson, *Science* **2001**, 294, 369.
- [24] J. Wagner, R. A. Lerner, C. F. Barbas III, *Science* **1995**, 270, 1797.
- [25] P. Wirsching, J. A. Ashley, C. H. Lo, K. D. Janda, R. A. Lerner, *Science* **1995**, 270, 1775.
- [26] C. F. Barbas III, A. Heine, G. Zhong, T. Hoffmann, S. Gramatikova, R. Bjornstedt, B. List, J. Anderson, E. A. Stura, I. A. Wilson, R. A. Lerner, *Science* **1997**, 278, 2085.
- [27] T. Hoffmann, G. Zhong, B. List, D. Shabat, J. Anderson, S. Gramatikova, R. A. Lerner, C. F. Barbas III, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 2768.
- [28] S. C. Sinha, C. F. Barbas III, R. A. Lerner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 14603.
- [29] G. Zhong, D. Shabat, B. List, J. Anderson, S. C. Sinha, R. A. Lerner, C. F. Barbas III, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 2609; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 2481.
- [30] G. Zhong, R. A. Lerner, *Angew. Chem.* **1999**, 111, 3957; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 3738.
- [31] B. F. Cravatt, J. A. Ashley, K. D. Janda, D. L. Boger, R. A. Lerner, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 6013.
- [32] N. A. Larsen, A. Heine, L. Crane, B. F. Cravatt, R. A. Lerner, I. A. Wilson, *J. Mol. Biol.* **2001**, 314, 93.
- [33] K. D. Janda, C. G. Shevlin, R. A. Lerner, *Science* **1993**, 259, 490.
- [34] A. C. Braisted, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 7430.

- [35] V. E. Gouverneur, K. N. Houk, B. de Pascual-Teresa, B. Beno, K. D. Janda, R. A. Lerner, *Science* **1993**, 262, 204.
- [36] K. D. Janda, C. G. Shevlin, R. A. Lerner, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 2659.
- [37] L. Ma, E. H. Sweet, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 10227.
- [38] P. G. Schultz, R. A. Lerner, *Acc. Chem. Res.* **1993**, 26, 391.
- [39] A. Simeonov, M. Matsushita, E. A. Juban, E. H. Thompson, T. Z. Hoffman, A. E. Beuscher IV, M. J. Taylor, P. Wirsching, W. Rettig, J. K. McCusker, R. C. Stevens, D. P. Millar, P. G. Schultz, R. A. Lerner, K. D. Janda, *Science* **2000**, 290, 307.
- [40] J. R. Jacobsen, A. G. Cochran, J. C. Stephans, D. S. King, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 5453.
- [41] M. Sun, Q. S. Gao, L. Kirnarskiy, A. Rees, S. Paul, *J. Mol. Biol.* **1997**, 271, 374.
- [42] A. V. Kolesnikov, A. V. Kozyr, E. S. Alexandrova, F. Koralewski, A. V. Demin, M. I. Titov, B. Avale, A. Tramontano, S. Paul, D. Thomas, A. G. Gabibov, A. Friboulet, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 13526.
- [43] G. W. Zhou, J. Guo, W. Huang, R. J. Fletterick, T. S. Scanlan, *Science* **1994**, 265, 1059.
- [44] E. Fischer, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1894**, 27, 3189.
- [45] P. A. Patten, N. S. Gray, P. L. Yang, C. B. Marks, G. J. Wedemayer, J. J. Boniface, R. C. Stevens, P. G. Schultz, *Science* **1996**, 271, 1086.
- [46] G. J. Wedemayer, P. A. Patten, L. H. Wang, P. G. Schultz, R. C. Stevens, *Science* **1997**, 276, 1665.
- [47] H. D. Ulrich, E. Mundorff, B. D. Santarsiero, E. M. Driggers, R. C. Stevens, P. G. Schultz, *Nature* **1997**, 389, 271.
- [48] E. C. Mundorff, M. A. Hanson, A. Varvak, H. Ulrich, P. G. Schultz, R. C. Stevens, *Biochemistry* **2000**, 39, 627.
- [49] L. C. Hsieh-Wilson, P. G. Schultz, R. C. Stevens, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 5363.
- [50] J. Yin, E. C. Mundorff, P. L. Yang, K. U. Wendt, D. Hanway, R. C. Stevens, P. G. Schultz, *Biochemistry* **2001**, 40, 10764.
- [51] P. L. Yang, P. G. Schultz, *J. Mol. Biol.* **1999**, 294, 1191.
- [52] F. E. Romesberg, B. Spiller, P. G. Schultz, R. C. Stevens, *Science* **1998**, 279, 1929.
- [53] F. Breinl, F. Haurowitz, *Z. Physiol. Chem.* **1930**, 192, 45.
- [54] L. Pauling, *J. Am. Chem. Soc.* **1940**, 62, 2643.
- [55] W. L. DeLano, M. H. Ultsch, A. M. de Vos, J. A. Wells, *Science* **2000**, 287, 1279.
- [56] M. C. Orenica, J. S. Yoon, J. E. Ness, W. P. Stemmer, R. C. Stevens, *Nat. Struct. Biol.* **2001**, 8, 238.
- [57] W. P. Stemmer, *Nature* **1994**, 370, 389.
- [58] A. C. Braisted, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 2211.
- [59] D. R. Storm, D. E. Koshland, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, 94, 5805.
- [60] A. J. Kirby, *Crit. Rev. Biochem.* **1987**, 22, 283.
- [61] E. M. Driggers, H. S. Cho, C. W. Liu, C. P. Katzka, A. C. Braisted, H. D. Ulrich, D. E. Wemmer, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 1945.
- [62] D. R. Liu, P. G. Schultz, *Angew. Chem.* **1999**, 111, 36; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 36.
- [63] X.-D. Xiang, X. Sun, G. Briceno, Y. Lou, K.-A. Wang, H. Chang, W. G. Wallace-Freedman, S.-W. Chen, P. G. Schultz, *Science* **1995**, 268, 1738.
- [64] J. Wang, Y. Yoo, C. Gao, I. I. Takeuchi, X. Sun, H. Chang, X. Xiang, P. G. Schultz, *Science* **1998**, 279, 1712.
- [65] A. D. Wentworth, L. H. Jones, P. Wentworth, Jr., K. D. Janda, R. A. Lerner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 10930.
- [66] 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.
- [67] D. Datta, N. Vaidehi, X. Xu, W. A. Goddard III, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 2636.
- [68] X. Xu, R. P. Muller, W. A. Goddard III, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 3376.