

Systeme des Klasse-II-Typs zu 1090 cm^{-1} ergeben; die Annahme eines Klasse-III-Verhaltens entsprechend dem IR-spektroskopischen Resultat liefert eine Schätzung^[3a] von H_{AB} zu $\tilde{\nu}_{\text{max}}/2 = 2890\text{ cm}^{-1}$.

Wir haben hier für einen weitverbreiteten Typ gemischtvaleenter Verbindungen (π -Ligand-verbrückte Diruthenium-Komplexe)^[1,3,6a] gezeigt, dass ein großer Metall-Metall-Abstand zwar die Coulomb-bestimmte, aus elektrochemischen Potentialdifferenzen ermittelte Komproportionierungskonstante K_c beeinflusst, hingegen die elektronische Wechselwirkung stärker von der Korrelation zwischen den Metallkonfigurationen und den Eigenschaften des Brückenliganden abhängt. Während die hervorragende Eignung Kumulenartiger C_n -Brücken zur Vermittlung elektronischer Wechselwirkungen wohltabliert ist,^[6] bleibt es bemerkenswert, dass eine derartige starke Wechselwirkung durch das polare, wenig kovalente Ru-O-Interface unter Einbeziehung des β -Diketonato-Ligandsystems in einer nicht häufig anzutreffenden^[16] $\text{Ru}_2^{\text{IV,III}}\text{-}(\text{d}^4/\text{d}^5\text{-})$ gemischtvalenten Konfiguration nachweisbar ist. Offenbar können C_n -Spacer mit robusten Koordinationsverbindungen des Werner-Typs kombiniert werden, wobei eine variable, potenziell jedoch auch starke elektronische Kopplung über weite Distanzen auftritt.

Eingegangen am 21. August 2002,
veränderte Fassung am 20. November 2002 [Z50020]

- [1] W. Kaim, A. Klein, M. Glöckle, *Acc. Chem. Res.* **2000**, *33*, 755.
- [2] a) N. S. Hush, *Prog. Inorg. Chem.* **1967**, *8*, 391; b) N. Sutin, *Prog. Inorg. Chem.* **1983**, *30*, 441.
- [3] a) C. Creutz, *Prog. Inorg. Chem.* **1983**, *30*, 1; b) A.-C. Ribou, J.-P. Launay, K. Takahashi, T. Nihira, S. Tarutani, C. W. Spangler, *Inorg. Chem.* **1994**, *33*, 1325; c) C. Patoux, J.-P. Launay, M. Beley, S. Chaodorowski-Kimmes, J.-P. Colin, J. Stuart, J.-P. Sauvage, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 3117.
- [4] D. O. Cowan, F. Kaufmann, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 219.
- [5] Y. Kasahara, Y. Hoshino, M. Kajitani, K. Shimizu, G. P. Satô, *Organometallics* **1992**, *11*, 1968.
- [6] a) M. I. Bruce, P. J. Low, K. Costuas, J.-F. Halet, S. P. Best, G. A. Heath, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 1949, zit. Lit.; b) N. Le Narvor, L. Toupet, C. Lapinte, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 7129; c) M. Brady, W. Weng, Y. Zhou, J. W. Seyler, A. J. Amoroso, A. M. Arif, M. Bohme, G. Frenking, J. A. Gladysz, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 775.
- [7] Kristallisation aus $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (10/1, v/v). Kristalldaten für **1**: $M = 1179.42$, monoklin, Raumgruppe $P2_1/n$, $a = 12.0875(3)$, $b = 29.0406(8)$, $c = 20.8946(7)\text{ \AA}$, $\beta = 106.175(1)^\circ$, $V = 7044.3(4)\text{ \AA}^3$, $T = 293(2)\text{ K}$, $Z = 4$, 7313 unabhängige Reflexe, $R_1 = 0.0884$ und $wR_2 = 0.1864$ für 5144 beobachtete Reflexe [$I > 2\sigma(I)$]. Die meisten Methylgruppen sind fehlgeordnet und wurden mit Teil-Besetzung verfeinert. CCDC-191410 enthält die ausführlichen kristallographischen Daten zu dieser Veröffentlichung. Die Daten sind kostenlos über www.ccdc.cam.ac.uk/conts/retrieving.html erhältlich (oder können bei folgender Adresse in Großbritannien angefordert werden: Cambridge Crystallographic Data Centre, 12 Union Road, Cambridge CB21EZ; Fax: (+44)1223-336-033; oder deposit@ccdc.cam.ac.uk).
- [8] a) Die spektroelektrochemischen Experimente wurden bei tiefen Temperaturen mit einer verbesserten Version der optisch transparenten Dünnschicht-Elektrochemie(OTTLE)-Zelle durchgeführt: F. Hartl, H. Luyten, H. A. Nieuwenhuis, G. C. Schoemaker, *Appl. Spectrosc.* **1994**, *48*, 1522; b) Die Messungen

wurden in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/0.1\text{M Bu}_4\text{NPF}_6$ bei -40°C durchgeführt. Höhere Temperaturen oder der Gebrauch von CH_3CN führten zu langsamem Zersetzungreaktionen von **1**²⁻ und **1**²⁺ auf der Zeitskala des Experiments (1–5 Minuten).

- [9] M. B. Robin, P. Day, *Adv. Inorg. Chem. Radiochem.* **1967**, *10*, 247.
- [10] Y. Hoshino, B. Schwederski, B. Sarkar, W. Kaim, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [11] C. E. B. Evans, G. P. A. Yap, R. J. Crutchley, *Inorg. Chem.* **1998**, *37*, 6161.
- [12] a) W. Kaim, *Coord. Chem. Rev.* **2002**, *230*, 127; b) S. Chellamma, M. Lieberman, *Inorg. Chem.* **2001**, *40*, 3177.
- [13] π -Donor-verbrückte $\text{Ru}_2^{\text{III,II}}$ - und $\text{Ru}_2^{\text{III,III}}$ -Systeme: a) V. Kasack, W. Kaim, H. Binder, J. Jordanov, E. Roth, *Inorg. Chem.* **1995**, *34*, 1924; b) A. Dei, D. Gatteschi, L. Pardi, *Inorg. Chem.* **1990**, *29*, 1442.
- [14] D. Lin-Vien, N. B. Colthup, W. G. Fateley, J. G. Grasselli, *The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules*, Academic Press, San Diego, **1991**, S. 95 und 213.
- [15] J. Heck, G. Lange, M. Malessa, R. Boese, D. Bläser, *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 659.
- [16] Oxoerbrückte $\text{Ru}_2^{\text{IV,III}}$ -Systeme: a) J. A. Baumann, T. J. Meyer, *Inorg. Chem.* **1980**, *19*, 345; 1,4-Dicyanamidobenzol-verbrücktes $\text{Ru}_2^{\text{IV,III}}$ -System: b) M. L. Naklicki, C. A. White, V. V. Kondratiev, R. J. Crutchley, *Inorg. Chim. Acta* **1996**, *242*, 63.

Peptide mit D-Aminosäuresequenzen



all-D-Polypeptide: Zielmoleküle für die Semisyntthese**

Nicole Wehofsky, Sven Thust, Jens Burmeister,
Sven Klüssmann und Frank Bordusa*

D-Aminosäuren treten in der Natur zwar nur spärlich auf, spielen aber eine wichtige Rolle für die Struktur und bio-

- [*] Dr. F. Bordusa, Dr. N. Wehofsky
Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung
Weinbergweg 22, 06120 Halle (Deutschland)
Fax: (+49) 345-5511-972
E-mail: bordusa@enzyme-halle.mpg.de
Dr. J. Burmeister, Dr. S. Klüssmann
NOXXON Pharma AG
Max-Dohrn-Straße 8–10, 10589 Berlin (Deutschland)
Dr. S. Thust
Universität Leipzig
Institut für Organische Chemie
Johanniskirche 29, 04103 Leipzig (Deutschland)

- [**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 610 und BO 1770/1-1) und dem Fonds der Chemischen Industrie (Liebig-Stipendium für F.B.) unterstützt. Wir danken Dr. G. Jahreis für seine Hilfe bei der Peptidsynthese und Prof. G. Fischer für die Förderung dieses Forschungsvorhabens.

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

logische Aktivität der Polypeptide, in denen sie vorkommen. In Bakterien z. B. wirken D-Aminosäuren als Schlüsselbausteine in der Zellwand oder in antibakteriellen Wirkstoffen,^[1] in Säugetieren sind sie zur Aufrechterhaltung der Aktivität einer Reihe von Hormonen und neuronalen Transmittern essenziell.^[2] Abgesehen von diesen natürlichen Funktionen haben synthetische all-D-Polypeptide eine große Bedeutung als Spiegelmerke, d. h. Proteine, die für das Screening von spezifisch bindenden Liganden an Nucleinsäuren oder genetisch kodierte Proteinbibliotheken verwendet werden.^[3] Diese vielfältigen Funktionen – zusammen mit ihrer Stabilität gegen proteolytischen Abbau – führten zu einem großen Interesse an der Synthese von D-Aminosäure-haltigen Polypeptiden zur Verwendung als langwirkende Therapeutika und als Reagentien für die Wirkstoffsuche.

Gegenwärtig können kurz- oder langkettige D-Aminosäure-haltige Peptide ausschließlich durch chemische Methoden erhalten werden. Gentechnologische oder enzymatische Ansätze hingegen beschränken sich auf die Synthese von all-L- und L,D-Peptiden.^[4] Spärlich beschriebene Ausnahmen hiervon umfassen den Einsatz von D-Aminosäure-spezifischen Peptidasen, Esterasen und Acyltransferasen^[5] sowie Lösungsmittel-modifizierten^[6] oder chemisch veränderten Enzymen.^[7] Solche Enzyme weisen zwar modifizierte Stereospezifitäten auf, ihre Anwendung beschränkt sich aber auf die Verknüpfung einzelner D-Aminosäurereste, während die Ligation entsprechender Peptidfragmente nicht möglich ist.

Wir berichten hier über den ersten biokatalytischen Ansatz zur Synthese von D-Aminosäure-haltigen Peptiden durch die Ligation von all-D-Peptidfragmenten. Die Synthesemethode ist weder durch die Kettenlänge noch durch die Aminosäuresequenz des Acyldonors oder -acceptors beschränkt. Weitere Vorteile sind milde Reaktionsbedingungen, die einfache Durchführbarkeit, die Verwendung von Reaktanten mit ungeschützten Seitenketten sowie die prinzipielle Vermeidung von organischen Lösungsmitteln und künstlich modifizierten Enzymen, anstelle derer eine normale Peptidase, die Cysteinprotease Clostripain, eingesetzt wird. Die Verwendung von Wasser als Reaktionsmedium gewährleistet eine hohe Enzymaktivität und -stabilität während der Synthese. Die Affinität der all-D-Peptid-Donorkomponenten zur inhärent L-Arg-spezifischen Protease wird mithilfe der Substratmimetika-Strategie erzwungen.^[8] Diese Strategie in Verbindung mit der Anwendung von Clostripain, das nur eine geringe Stereospezifität für den Acylacceptor aufweist, ermöglicht die Synthese eines breiten

Spektrums von all-D-Peptiden, Verbindungen also, für die das Enzym an sich völlig unspezifisch ist.

Zunächst wurde allgemein die Reaktivität von Clostripain gegen D-Aminosäure-abgeleitete Acyldonor- und Acylacceptorkomponenten untersucht. Dazu wurden Modellreaktionen mit einfachen D-Aminosäure-4-guanidinophenylestern (OGps) als Acyldonoren und D-konfigurierten Aminosäureamiden und Peptiden als Acylaccepto-

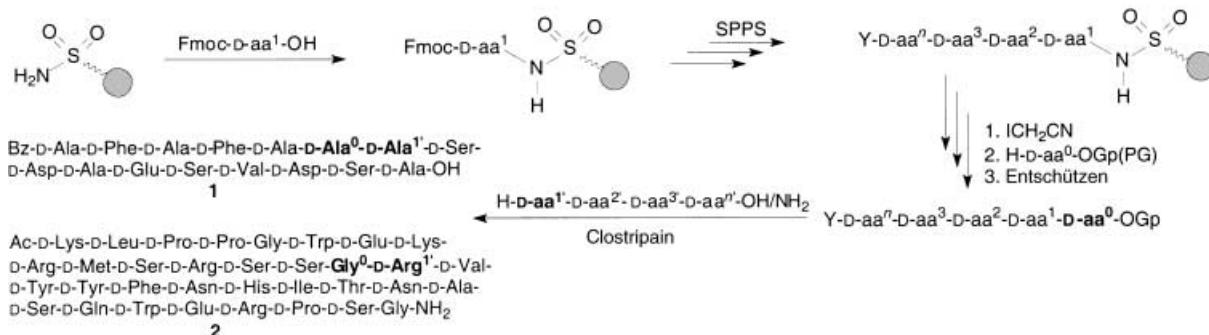
ren ausgeführt. Die OGps wurden wegen ihrer bekannten Spezifitätsvermittelnden Eigenschaft ausgewählt, die Affinität von inhärent unspezifischen Acylresten zu Clostripain erzwingen zu können.^[9] Des Weiteren wurde ein analoger Glycinester umgesetzt, der wegen der Achiralität des Glycins und der damit verbundenen Möglichkeit, sowohl in all-L- als auch in all-D-Peptiden aufzutreten, von speziellem Interesse war.

Die enzymatischen Reaktionen wurden in wässrigen Pufferlösungen beim pH- und Temperaturoptimum des Enzyms ausgeführt.^[10] Die Konzentrationen der Acyldonor- und Acylacceptorkomponenten betragen 2 mM bzw. 10 mM (siehe Hintergrundinformationen). In einigen Fällen wurde 2.5% DMF zugesetzt, um die Reaktanten vollständig zu lösen. Kontrollreaktionen ohne Enzym wurden parallel ausgeführt. Bei einer Enzymkonzentration von 5 µM (Bz-Gly-OGp) oder 20 µM (D-Aminosäureester) genügten laut HPLC Inkubationszeiten von weniger als 60 min zur kompletten Umsetzung des Eduktesters. Eine spontane, nichtenzymatische Synthese wurde in diesem Zeitraum nicht beobachtet, und der Anteil der spontanen chemischen Esterhydrolyse betrug weniger als 5%. Die Ergebnisse der enzymatischen Reaktionen sind in Tabelle 1 zusammengefasst; sie bestätigen, dass Clostripain nicht nur die Verknüpfung des achiralen Glycinesters, sondern auch die der analogen D-Aminosäure-abgeleiteten Ester katalysiert. Wie in früheren Untersuchungen unter Verwendung von L-Arg-Estern bereits festgestellt wurde,^[11] kann das Enzym D-Aminosäureamide und sogar all-D-Peptide acylieren. Bemerkenswerterweise katalysiert das Enzym auch die Umsetzung von H-D-Pro-NH₂, das in Untersuchungen mit L-Arg-Estern als unreaktiv beschrieben wurde.^[11] Dieses überraschende Ergebnis weist darauf hin, dass Substratmimetika nicht nur die Spezifität des Enzyms gegen die Carboxykomponente, sondern auch gegen die Aminokomponente erweitern, ein Befund, der über die Verwendung von D-Aminosäure-haltigen Reaktanten und Clostripain hinaus von allgemeiner Bedeutung sein könnte. Wie sich aus Tabelle 1 weiter ablesen lässt, hängt die Produktausbeute von den Eigenschaften der Acyldonoren und -acceptoren ab. Im Allgemeinen verlaufen die Umsetzungen der D-Aminosäureamide und des Tripeptids H-(D-Ala)₃-OH mit höheren Ausbeuten als die der Dipeptide. Ähnlich geringe Ausbeuten wurden auch bei den analogen all-L-Peptiden beobachtet und auf ungünstige Wechselwirkungen der negativ geladenen Carboxylatgruppe am C-Terminus der Dipeptide zurückge-

Tabelle 1: Produktausbeuten bei der Clostripain-katalysierten Synthese von all-D-Peptiden.^[a]

Acylacceptor	Bz-Gly-OGp	Bz-D-Ala-OGp	Bz-D-Leu-OGp ^[b]	Bz-D-Phe-OGp ^[b]
H-D-Pro-NH ₂	72.6	60.7	46.2	44.0
H-D-Leu-NH ₂	99.1	89.7	65.7	61.9
H-D-Phe-NH ₂	98.4	90.5	66.3	67.4
H-(D-Met) ₂ -OH	43.6	43.1	37.3	38.1
H-(D-Leu) ₂ -OH	45.8	55.2	41.9	41.6
H-(D-Ala) ₃ -OH	62.4	64.8	45.8	46.6

[a] Synthesebedingungen: 0.1 M HEPES-Puffer (4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure), 0.1 M NaCl, 0.01 M CaCl₂, pH 8.0, 25 °C. Konzentrationen: [Donor] = 2 mM, [Acceptor] = 10 mM, [Clostripain] = 5 µM (Bz-Gly-OGp) oder 20 µM (Bz-D-Xaa-OGp). [b] Reaktionsansätze enthielten 2.5 Vol.-% DMF.



Schema 1. Synthese des all-D-Hexadecapeptids **1** und der all-D-Form der WW-Domäne von hPin1 (**2**) unter Anwendung eines kombinierten Ansatzes aus Substratmimetika-Strategie und Safety-Catch-Festphasenpeptidsynthese (SPPS). Fmoc=9-Fluorenylmethoxykarbonyl.

führt.^[12] Der Einfluss des Acylacceptors auf die Syntheseausbeute korreliert mit dem Platzbedarf der Aminosäureseitenkette. Demnach bevorzugt das Enzym Aminosäuren ohne oder mit kleinen Seitenketten, sodass die Reaktionen mit den sterisch anspruchsvolleren Estern Bz-D-Leu-OGp und Bz-D-Phe-OGp mit niedrigeren Ausbeuten verlaufen. Aber selbst in diesen Fällen wird nur eine geringfügig kleinere Ausbeute erhalten als in Reaktionen mit spezifischen L-Arg-Estern und H-D-Leu-NH₂ oder H-D-Phe-NH₂.^[11]

Des Weiteren untersuchten wir die Anwendbarkeit des Syntheseansatzes für die Ligation von längeren all-D-Peptidfragmenten. Als Targets wählten wir das Modellpeptid **1** und die all-D-Form der trifunktionellen, aus 34 Aminosäuren aufgebauten WW-Domäne der humanen Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase hPin1 (**2**; Schema 1). Die biologische Relevanz von hPin1 beruht auf dem Befund, dass WW-Domänenhaltige Proteine u.a. eine Rolle bei der Alzheimerkrankheit, bei Chorea Huntington und dem Liddle-Syndrom spielen.^[13] **1** und **2** wurden durch eine einstufige Enzymligation der N- und C-terminalen Fragmente synthetisiert. Die C-terminalen Fragmente waren durch Festphasenpeptidsynthese am Wang-Harz, die N-terminalen Fragmente am 4-Sulfamylbutyrylaminomethyl-Safety-Catch-Harz erhalten worden (Schema 1; Details siehe Hintergrundinformationen). Die nach Peptidabspaltung, Entschützung und Reinigung erhaltenen Peptidfragmente wurden zur enzymatischen Ligation unter den oben beschriebenen Bedingungen und Konzentrationen eingesetzt (mit Ausnahme der Synthese von **2**, bei der aus Gründen der Syntheseökonomie die Esterkonzentration von 2 mM auf 5 mM erhöht wurde; um zu untersuchen, ob die Synthese von **2** auch mit niedrigeren Reaktantenkonzentrationen gelingt, wurde eine analoge Umsetzung mit 2.5 mM Acyldonor und 5 mM Acylacceptor ausgeführt). Nach 1 h und vollständigem Esterumsatz wurden die Reaktionen angehalten und die Produkte mit HPLC und Massenspektrometrie analysiert (siehe z.B. Abbildung 1). Die Ausbeuten betragen 58% (**1**) und ca. 50% (**2**) und waren unabhängig von der Reaktantenkonzentration. Mit Ausnahme der hydrolysierten Peptidester wurden keine Nebenprodukte gefunden, was darauf schließen lässt, dass konkurrierende proteolytische Spaltungen nicht auftreten.

Ein neuer und vielversprechender Ansatz zur Semisynthese von D-Aminosäure-haltigen Peptiden wurde entwickelt, der auf der Ligation von all-D-Peptidfragmenten beruht. Vorteile dieser Methode sind die breite Akzeptanz von unterschiedlich langen und sequenziell unterschiedlichen Acyldonor- und Acylacceptorkomponenten, milde Reaktionsbedingungen, die Vermeidung organischer Lösungsmittel sowie die Verwendung hochaktiver Wildtyp-Enzyme als Katalysatoren und ungeschützter Peptide als Reaktanten. Anders als bei der Verwendung von Proteasen zur Synthese von konventionellen L-Peptiden treten keine proteolytischen Nebenreaktionen auf. Der daraus resultierende irreversible Syntheseverlauf führt kurioserweise dazu, dass all-D-Peptide bessere Synthesetargets sind als die all-L-Analoga, obwohl die eingesetzten Proteasen in der Natur selektiv für all-L-Peptide sind. Dieser Befund lässt hoffen, dass der hier vorgestellte Ansatz auch zur Herstellung von noch längeren all-D-Proteindomänen eingesetzt werden kann.

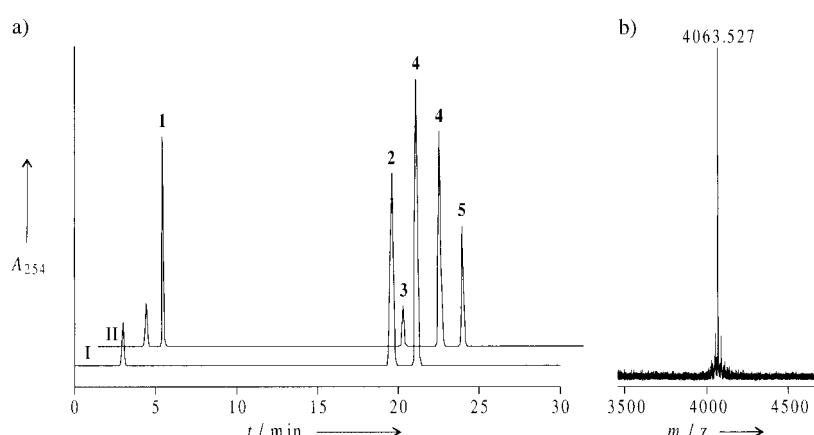


Abbildung 1. Analyse der Produkte der Clostripain-katalysierten Synthese (0.1 M HEPES-Puffer, 0.1 M NaCl, 0.01 M CaCl₂, pH 8.0, 2.5 Vol.-% DMF, 25 °C, [Donor]=5 mM, [Acceptor]=10 mM, [Clostripain]=20 μM) der WW-Domäne von hPin1 durch HPLC (a) und MALDI-TOF-MS (b). a) Vor der Enzymzugabe, all) nach 60 min Inkubationszeit; 1: abgespaltenes OGp, 2: Ac-klppgwekrmsrsg-OGp, 3: Ac-klppgwekrmsrsg-OH, 4: H-rvyfhnitnasqwerpsg-NH₂, 5: Ac-klppgwekrmsrsgrvyyfnhitnasqwerpsg-NH₂; A₂₅₄=Absorbanz bei 254 nm. b) Ber. Molekulargewicht: 4062.02.

Eingegangen am 30. August 2002,
veränderte Fassung am 14. November 2002
[Z50072]

-
- [1] G. Mignogna, M. Simmaco, D. Barra in *D-Amino Acids in Sequences of Secreted Peptides of Multicellular Organisms* (Hrsg.: P. Jolles), Birkhäuser, Basel, **1998**, S. 29–36.
- [2] a) E. C. Jimenez, B. M. Olivera, W. R. Gray, L. J. Cruz, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 28002–28005; b) G. Kreil, *Annu. Rev. Biochem.* **1997**, *66*, 337–345.
- [3] a) T. N. M. Schumacher, L. M. Mayr, D. L. Minor, Jr., M. A. Milhollen, M. W. Burgess, P. S. Kim, *Science* **1996**, *271*, 1854–1857; b) D. M. Eckert, V. N. Malashkevich, L. H. Hong, P. A. Carr, P. S. Kim, *Cell* **1999**, *99*, 103–115; c) B. Wlotzka, S. Leva, B. Eschgfäller, J. Burmeister, F. Kleinjung, C. Kaduk, P. Muhn, H. Hess-Stumpp, S. Klussmann, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 8898–8902.
- [4] a) C.-H. Wong, *Science* **1989**, *244*, 1145–1152; b) V. Schellenberger, H.-D. Jakubke, *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 1440–1452; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 1437–1449; c) F. Bordusa, *Chem. Rev.*, im Druck.
- [5] a) A. Sugihara, Y. Shimada, S. Sugihara, T. Nagao, Y. Watanabe, Y. Tominaga, *J. Biochem.* **2001**, *130*, 119–126; b) A. Sugihara, Y. Shimada, S. Sugihara, T. Nakai, T. Kakuno, T. Nagao, Y. Watanabe, Y. Tominaga, *J. Biochem.* **2002**, *131*, 247–254, zit. Lit.
- [6] a) J. B. West, C.-H. Wong, *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 2728–2735; b) A. L. Margolin, D.-F. Tai, A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 7885–7887; c) C. F. Barbas III, J. R. Matos, J. B. West, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 5162–5166.
- [7] a) K. Matsumoto, B. G. Davis, J. B. Jones, *Chem. Commun.* **2001**, 903–904; b) K. Khumtaveeporn, A. Ullmann, K. Matsumoto,
- B. G. Davis, J. B. Jones, *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, *12*, 249–261.
- [8] a) V. Schellenberger, H.-D. Jakubke, N. P. Zapevalova, Y. V. Mitin, *Biotechnol. Bioeng.* **1991**, *38*, 104–108; b) H. Sekizaki, K. Itoh, E. Toyota, K. Tanizawa, *Chem. Pharm. Bull.* **1996**, *44*, 1585–1587; c) F. Bordusa, D. Ullmann, C. Elsner, H.-D. Jakubke, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 2583–2585; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 2473–2475; d) M. Thormann, S. Thust, H.-J. Hofmann, F. Bordusa, *Biochemistry* **1999**, *38*, 6056–6062.
- [9] a) R. Günther, A. Stein, F. Bordusa, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 1672–1679; b) R. Günther, F. Bordusa, *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 463–467.
- [10] D. Ullmann, F. Bordusa in *Handbook of Proteolytic Enzymes* (Hrsg.: A. J. Barrett, N. D. Rawlings, J. F. Woessner), Academic Press, London, **1998**, S. 759–762.
- [11] a) W. M. Mitchell, *Science* **1968**, *162*, 374–375; b) G. Fortier, S. L. MacKenzie, *Biotechnol. Lett.* **1986**, *12*, 873–876; c) D. Ullmann, H.-D. Jakubke, *Eur. J. Biochem.* **1994**, *223*, 865–872.
- [12] V. Schellenberger, U. Schellenberger, Y. V. Mitin, H.-D. Jakubke, *Eur. J. Biochem.* **1990**, *187*, 163–167.
- [13] a) P. W. Faber, G. T. Barnes, J. Srinidhi, J. Chen, J. F. Gusella, M. E. MacDonald, *Hum. Mol. Genet.* **1998**, *7*, 1463–1474; b) T. Russo, R. Faraonio, G. Minopoli, P. De Candia, S. De Renzis, N. Zambrano, *FEBS Lett.* **1998**, *434*, 1–7; c) S. Rentschler, H. Linn, K. Deininger, M. T. Bedford, X. Espanol, M. Sudol, *Biol. Chem.* **1999**, *380*, 431–442.