

## Bioanalytik

### Ein hochempfindliches Nachweisverfahren für Proteasen basierend auf Fluoreszenzlösung von Peptidsonden durch photoinduzierten Elektronentransfer\*\*

Nicole Marmé, Jens-Peter Knemeyer, Jürgen Wolfrum und Markus Sauer\*

Das Interesse an schnellen und empfindlichen Nachweismethoden für Proteasen – Peptidbindungen hydrolysierende Enzyme – hat in den letzten Jahren beträchtlich zugenommen. Ein Grund ist, dass Proteasen zunehmend mit Krankheiten in Verbindung gebracht werden. Viele Proteasen wie die Matrix-Metalloproteinasen, der Urokinaseplasminogen-aktivator (uPA) und die Kathepsine sind an der Tumorprogression und der Metastasierung beteiligt, sodass sie mittlerweile eine zentrale Rolle in der Krebsdiagnostik und der Verlaufskontrolle von Krebskrankungen spielen.<sup>[1-6]</sup> Daraüber hinaus könnten virale Infektionen, z. B. durch HIV, direkt durch den Nachweis ihrer eigenen viruspezifischen Proteasen diagnostiziert und kontrolliert werden.<sup>[7-11]</sup>

Bislang wurden mehrere Verfahren zum spezifischen Nachweis von Proteasen entwickelt, die auf der Verwendung

[\*] Prof. Dr. M. Sauer  
Fakultät für Physik  
Angewandte Laserphysik und Laserspektroskopie  
Universität Bielefeld  
Universitätsstraße 25, 33615 Bielefeld (Deutschland)  
Fax: (+49) 521-106-2958  
E-mail: sauer@physik.uni-bielefeld.de

Dr. N. Marmé, Dr. J.-P. Knemeyer, Prof. Dr. J. Wolfrum  
Physikalisch-Chemisches Institut  
Universität Heidelberg  
Im Neuenheimer Feld 253, 69120 Heidelberg (Deutschland)

[\*\*] Die Autoren danken K. H. Drexhage für die großzügige Bereitstellung des Oxazinderivats MR121. Für die finanzielle Unterstützung wird dem Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie gedankt.

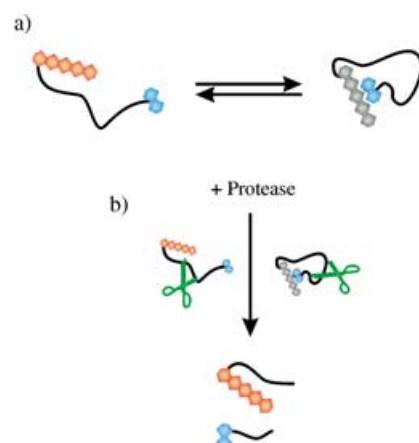
von farbstoffmarkierten Enzymsubstraten beruhen. Üblicherweise werden die Peptidsubstrate (Peptidsonden) hierzu auf beiden Seiten einer spezifischen Schneidesequenz mit zwei Farbstoffkomponenten (einem Donor und einem Acceptor) markiert, die ein Fluoreszenzresonanzenergietransfer (FRET)-System bilden.<sup>[12,13]</sup> Nach der Hydrolyse des Peptidsubstrats durch die Protease geht die Wechselwirkung zwischen Donor und Acceptor verloren, was eine direkte Detektion der Enzymaktivität durch Messung der Fluoreszenzintensität des Donors ermöglicht. Alternativ können auch Peptidsubstrate verwendet werden, die mit zwei gleichen Farbstoffkomponenten markiert sind. Diese Methode beruht darauf, dass in wässrigen Lösungen die hydrophoben Wechselwirkungen der beiden Fluorophore das Peptid in Konformationen zwingen, in denen die Fluorophore nicht oder nur schwach fluoreszierende Dimere bilden.<sup>[14-17]</sup>

Chemische Modifikationen am natürlichen Peptidsubstrat reduzieren die Affinität zwischen Substrat und Enzym und sollten sich auf ein Minimum beschränken, da dies die Nachweisempfindlichkeit verringert. Daneben benötigen doppelt markierte Affinitätssonden zwei spezifische Kupplungsstellen, was ihre Synthese relativ kompliziert und kostspielig macht. Ein weiteres Problem sind Nebenprodukte mit nur einer Fluorophoreinheit, deren Fluoreszenz nicht gelöscht wird, was zu einem höheren Hintergrundsignal führt. Vorteilhaft wäre eine Methode, die zur Fluoreszenzlösung natürlich vorkommende Aminosäuren anstelle eines zweiten Fluorophors verwendet.

Hier berichten wir über eine neue Fluoreszenzmethode zum hochempfindlichen und spezifischen Nachweis von proteolytischen Enzymen in homogenen Lösungen. Hierbei werden einfach farbstoffmarkierte Peptidsubstrate verwendet, deren Fluoreszenz durch das Substrat selbst gelöscht wird. Die Methode beruht darauf, dass der Aminosäurerest Tryptophan die Fluoreszenz geeigneter Fluorophore effizient durch photoinduzierten Elektronentransfer löscht (Abbildung 1).<sup>[18-23]</sup> Alle anderen Aminosäuren ergeben eine wesentlich ineffizientere Fluoreszenzlösung.<sup>[18-21]</sup>

Im ersten Schritt werden eine geeignete Farbstoffkomponente und ein Tryptophanrest in ein Peptid eingebaut. Fluktuationen des Peptidrückgrats führen zu Konformationen, in denen der Farbstoff und der Tryptophanrest wechselwirken. Nach Anregung des Farbstoffes emittiert dieser entweder ein Fluoreszenzphoton, oder die Fluoreszenz wird durch eine Elektronentransferreaktion mit dem Tryptophanrest gelöscht. In diesem Fall wird die Fluoreszenzquantenausbeute des Peptidkonjugats vermindert. Die Quantenausbeute hängt von der strukturellen Flexibilität und der Zahl der Aminosäurereste zwischen dem Farbstoff und dem Tryptophanrest ab.

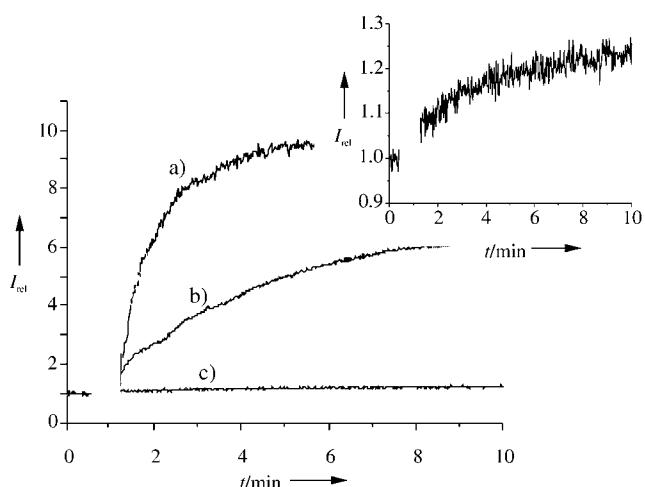
Kürzlich wurden Rot absorbierende Oxazinderivate, deren Fluoreszenz selektiv durch Tryptophan gelöscht wird, zur Bestimmung von Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeiten in flexiblen Peptiden im Nanosekundenbereich auf Einzelmolekülebene verwendet.<sup>[20]</sup> Die Geschwindigkeiten stimmen mit kinetischen Daten unstrukturierter Peptide überein, die mit einer anderen Methode im Ensemble bestimmt wurden.<sup>[24]</sup> Der entscheidende Vorteil der auf Fluoreszenzlösung beruhenden Technik gegenüber früher



**Abbildung 1.** Prinzip des spezifischen Nachweises von proteolytischen Enzymen unter Verwendung von Fluorophoren, deren Fluoreszenz durch einen Tryptophanrest gelöscht wird. a) Ein Fluorophor (grau/rot) ist endständig an ein Peptid gebunden. In räumlicher Nähe, z.B. am anderen Ende des Peptids, befindet sich ein Tryptophanrest (blau). Die Beweglichkeit des Peptidrückgrats führt zu Konformationen, in denen die Farbstoffkomponente und der Tryptophanrest wechselwirken. Es resultiert eine effiziente Fluoreszenzlösung durch photoinduzierten Elektronentransfer. b) Eine Protease, die spezifisch die Peptidsequenz zwischen dem Farbstoffteil und dem Tryptophanrest erkennt und hydrolysiert, hebt die Wechselwirkung und somit die Fluoreszenzlösung auf, sodass die Fluoreszenzintensität des Farbstoffes ansteigt.

diskutierten Techniken besteht in der einfachen Detektion in wässriger Umgebung mit Einzelmolekülempfindlichkeit. Wenn die Wechselwirkung zwischen Farbstoffkomponente und Tryptophanrest verhindert wird – weil das Peptid spezifisch an ein Zielprotein, etwa einen Antikörper, bindet oder durch ein proteolytisches Enzym geschnitten wird (Abbildung 1) –, steigt die Fluoreszenzintensität des Farbstoffs an. Dieses Messprinzip kann z.B. zur Detektion des p53-Antikörpers im Serum von Krebspatienten verwendet werden. Hierbei werden zwei fluoreszenzmarkierte Peptidepitope der aminoterminalen Transaktivierungsdomäne von p53 verwendet, die jeweils nur einen Tryptophanrest enthalten. Die Anwesenheit des p53-Autoantikörpers kann durch den Anstieg der Fluoreszenzintensität nachgewiesen werden.<sup>[19]</sup> Um das Potenzial dieses Detektionsprinzips für die Entwicklung schneller und hochempfindlicher Nachweisverfahren für Protease zu demonstrieren, haben wir das einfache Dipeptid Lysin-Tryptophan mit verschiedenen Farbstoffkomponenten markiert und den Fluoreszenzanstieg nach Zugabe von Carboxypeptidase A (CPA) gemessen (Abbildung 2).<sup>[25,26]</sup>

Alle bisher untersuchten Peptidkonjugate fungierten als Substrat für CPA. In Übereinstimmung mit den Konstanten für die intermolekulare Fluoreszenzlösung<sup>[21]</sup> zeigen die mit Oxazinfarbstoff markierten Konjugate MR121-Lys-Trp und ATTO655-Lys-Trp den stärksten Anstieg der Fluoreszenzintensität (Abbildung 2a). Die Fluoreszenzintensität einer  $10^{-7}\text{ M}$  Peptidlösung steigt bei Zugabe von  $10^{-9}\text{ M}$  CPA binnen 4 Minuten um das zehnfache an. Das Bodipy-FL-Konjugat zeigt einen sechsfachen Anstieg (Abbildung 2b), die Fluoreszenzintensität des Cy5-Konjugats steigt dagegen nur leicht. Dies stimmt mit früheren Arbeiten überein, in



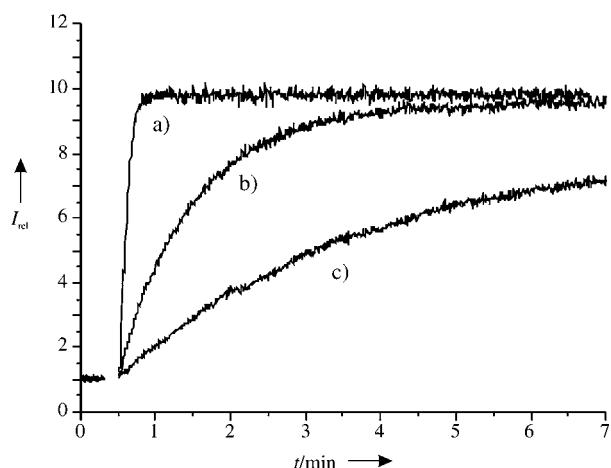
**Abbildung 2.** Relative Fluoreszenzintensität ( $I_{\text{rel}}$ ) von Lösungen ( $10^{-7} \text{ M}$ ) unterschiedlich fluoreszenzmarkierter Dipeptide Lys-Trp gegen die Zeit ( $t$ ) in PBS (phosphatgepufferter NaCl-Lösung) nach Zugabe von  $10^{-9} \text{ M}$  Carboxypeptidase A (pH 7.4,  $25^\circ\text{C}$ ). a) MR121-Lys-Trp (identische Ergebnisse werden mit ATTO655-Lys-Trp erhalten); b) Bodipy-FL-Lys-Trp; c) Cy5-Lys-Trp. Der Einschub zeigt eine vergrößerte Darstellung des Diagramms für Cy5-Lys-Trp. Die Anregung erfolgte am jeweiligen Absorptionsmaximum, die Fluoreszenzintensitäten wurden am jeweiligen Emissionsmaximum aufgenommen. Kontrollexperimente ohne CPA zeigen mehrere Stunden ein stabiles Fluoreszenzsignal.

denen für Cy5 nur eine geringe Fluoreszenzlösung durch den Tryptophanrest gemessen wurde.<sup>[21]</sup> Außerdem variiert die Hydrolysegeschwindigkeit erheblich und ist für die Konjugate MR121-Lys-Trp und ATTO655-Lys-Trp am höchsten (Abbildung 2 a).

Die Einflüsse von Farbstoffkomponenten auf die Enzymaktivität sind unbekannt und schwierig abzuschätzen, aber eine direkte Wechselwirkung zwischen Farbstoff und Enzym sollte die Aktivität stark beeinflussen. Unsere Ergebnisse belegen, dass die direkten Wechselwirkungen zwischen MR121 oder ATTO655 und Tryptophan einen schnellen und zuverlässigen Nachweis nanomolarer Konzentrationen von CPA in wässrigen Lösungen zulassen. Aus diesem Grund haben wir MR121 als Farbstoff für die nachfolgend beschriebenen Experimente ausgewählt.

Bei direkter Kupplung von MR121 an das Tryptophan beträgt die relative Fluoreszenzquantenausbeute 0.02.<sup>[21]</sup> Beim Dipeptid MR121-Lys-Trp ist die Quantenausbeute größer (0.10). Deshalb wird erwartet, dass mit größer werdendem Abstand zwischen Farbstoff und Tryptophanrest in längeren Peptiden die Fluoreszenzlösung abnimmt, weil es seltener zu Konformationen kommt, in denen sich Tryptophanrest und Farbstoff annähern. Allerdings wurde sogar bei einem Abstand von neun Aminosäuren zwischen MR121 und Tryptophanrest eine relative Quantenausbeute von nur ca. 0.30 gemessen.<sup>[19,20]</sup>

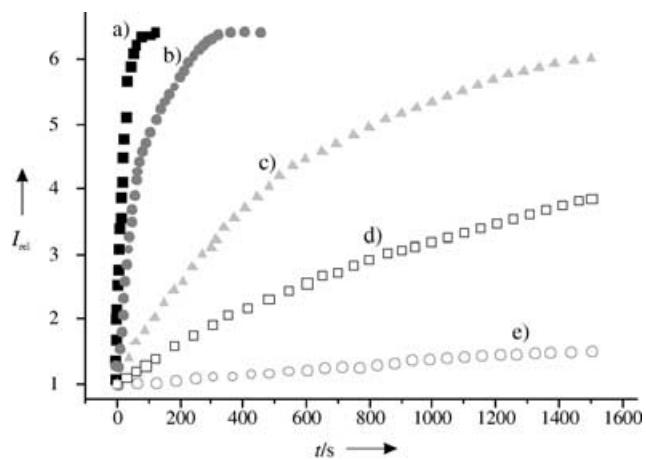
Andererseits kann die Länge und Struktur des Peptids die Enzymaktivität beeinflussen. Abbildung 3 zeigt den zeitabhängigen Anstieg der Fluoreszenz nach Zugabe von  $10^{-7} \text{ M}$  CPA zu drei MR121-Peptid-Konjugaten, die sich in der Zahl



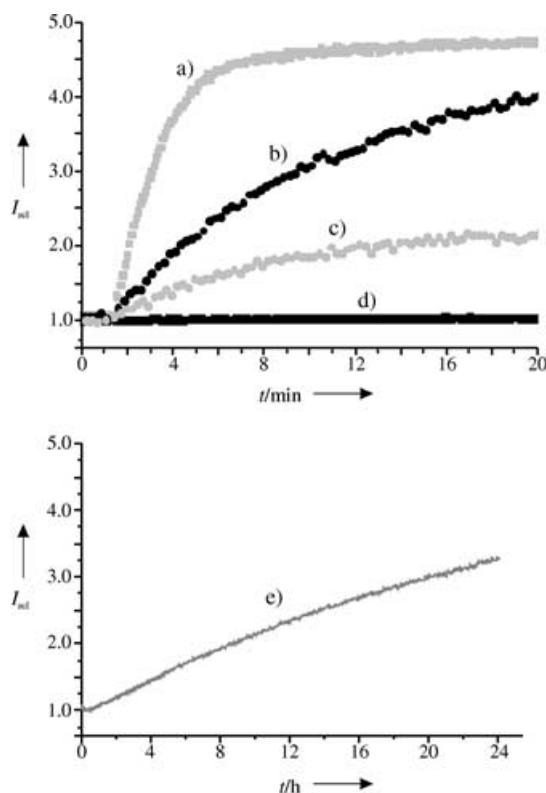
**Abbildung 3.** Zeitlicher Verlauf der relativen Fluoreszenzintensitäten ( $I_{\text{rel}}$ ) ( $\lambda_{\text{ex}} = 640 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 690 \text{ nm}$ ) unterschiedlicher, mit MR121 markierter Peptide ( $10^{-7} \text{ M}$  in PBS, pH 7.4,  $25^\circ\text{C}$ ) nach Zugabe von  $10^{-7} \text{ M}$  CPA. a) MR121-Lys-Gly-Trp, b) MR121-Lys-Gly<sub>2</sub>-Trp, c) MR121-Lys-Gly<sub>3</sub>-Trp.

der Glycinreste zwischen Farbstoffteil und Tryptophanrest unterscheiden. Obwohl die relativen Quantenausbeuten der drei Peptide wegen der hohen Flexibilität der Glycinreste ähnlich sind, unterscheidet sich die Enzymaktivität (Hydrolysegeschwindigkeit) deutlich. Mit zunehmender Zahl von Glycinresten nimmt die Hydrolysegeschwindigkeit ab (Abbildung 3).

Um die Empfindlichkeit der Nachweismethode zu evaluieren, haben wir die Fluoreszenzintensität einer wässrigen MR121-Lys-Trp-Lösung bei variablen CPA-Konzentrationen gemessen (Abbildung 4). Die Messungen wurden in salzfreiem Wasser ausgeführt, um eine unspezifische Adsorption



**Abbildung 4.** Relative Fluoreszenzintensität ( $I_{\text{rel}}$ ) einer  $10^{-7} \text{ M}$  Lösung des Dipeptides MR121-Lys-Trp gegen die Zeit nach Zugabe unterschiedlicher Mengen an CPA. a)  $10^{-6} \text{ M}$  CPA, b)  $10^{-9} \text{ M}$  CPA, c)  $10^{-11} \text{ M}$  CPA, d)  $10^{-13} \text{ M}$  CPA, e)  $10^{-15} \text{ M}$  CPA. Die Messungen wurden in reinem Wasser bei  $25^\circ\text{C}$  durchgeführt ( $\lambda_{\text{ex}} = 640 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 690 \text{ nm}$ ). Die Datenpunkte wurden je nach Probe alle 5 bis 20 Sekunden aufgenommen.



**Abbildung 5.** Relative Fluoreszenzintensität ( $I_{\text{rel}}$ ) des fluoreszenzmarkierten Peptids MR121-Arg<sub>3</sub>-Trp ( $10^{-7}$  M) gegen die Zeit nach Zugabe unterschiedlicher Mengen Trypsin. a)  $10^{-9}$  M, b)  $10^{-10}$  M, c)  $10^{-11}$  M, d)  $10^{-12}$  M. e) Fluoreszenzanstieg nach Zugabe von  $10^{-12}$  M Trypsin auf einer längeren Zeitskala. Die Messungen wurden in 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7.0) mit 1 mM Calciumchlorid bei 25 °C durchgeführt ( $\lambda_{\text{ex}} = 640$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 690$  nm).

der CPA-Moleküle an den Glaswänden der Küvette zu minimieren. Nach Zugabe eines Überschusses an CPA wird in reinem Wasser ein ca. 6.5facher Anstieg der Fluoreszenz gemessen. Bei einer Konzentration von  $10^{-6}$  M CPA (zehnfacher Überschuss) wird der maximale Wert innerhalb von Sekunden erreicht (Abbildung 4a). Selbst bei einer CPA-Konzentration von  $10^{-13}$  M, was einem Enzymmolekül pro  $10^6$  Substratmolekülen entspricht, wird nach nur 10 Minuten eine 2.5fache Fluoreszenzintensität gemessen (Abbildung 4d). Für eine weitere Erhöhung der Empfindlichkeit müssen derzeit längere Messzeiten in Kauf genommen werden. Wie unsere Daten belegen, kann aber selbst eine CPA-Konzentration von  $10^{-15}$  M innerhalb von 25 Minuten durch einen 1.5fachen Fluoreszenzanstieg detektiert werden (Abbildung 4e).

Um die allgemeine Anwendbarkeit des Nachweisverfahrens zu demonstrieren, haben wir ein Peptidsubstrat für eine Endopeptidase synthetisiert. Wir wählten Trypsin als Modellprotease, da dieses gut verfügbar ist und oft als Standard in anderen Testverfahren eingesetzt wird. Trypsin schneidet Peptidbindungen auf der carboxyterminalen Seite von Lysin- oder Argininresten.<sup>[27]</sup> Als Peptidsubstrat wurde MR121-Lys-Arg<sub>3</sub>-Trp mit einer relativen Fluoreszenzquantenausbeute von 0.20 in 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7.0) mit 1 mM

Calciumchlorid verwendet. Abbildung 5 belegt, dass eine Trypsin-Konzentration von  $10^{-11}$  M innerhalb von Minuten anhand des Fluoreszenzanstiegs nachgewiesen werden kann. Um niedrigere Konzentrationen zu detektieren, muss das Fluoreszenzsignal mehrere Stunden aufgezeichnet werden (Abbildung 5e).

Wir haben eine Methode zum Nachweis von proteolytischen Enzymen beschrieben, die auf der Verwendung von farbstoffmarkierten Peptidsubstraten beruht, deren Fluoreszenzintensität durch einen photoinduzierten Elektronentransfer zwischen Chromophor und Tryptophanrest in einer Wechselwirkungskonformation vermindert wird. Gegenüber anderen Testverfahren bieten sich etliche Vorteile: Erstens ist die Synthese großer Mengen an Peptidsubstrat billiger und unkomplizierter als die Verwendung doppelt markierter Peptidsonden. Zweitens ist durch die Markierung mit nur einem Farbstoffmolekül pro Peptid die Störung des Peptidsubstrats auf ein Minimum reduziert, was eine genauere Bestimmung der Enzymaktivität ermöglichen kann. Die Aufzeichnung der zeitabhängigen Fluoreszenzintensität ist gleichbedeutend mit einer Echtzeitanalyse des Proteolysevorgangs. Drittens ermöglicht die Methode einen schnellen, spezifischen und hochempfindlichen Nachweis von proteolytischen Enzymen über eine große Konzentrationsspanne (mehr als sechs Größenordnungen) mit einer Nachweisgrenze unterhalb von pm. Unsere Ergebnisse lassen hoffen, dass solche einfach markierten gelöschten Peptide zur Entwicklung neuer, schneller und hochempfindlicher fluoreszenzgestützter Nachweisverfahren für spezifische Proteasen in der Krebsdiagnostik und Verlaufskontrolle genutzt werden können.

## Experimentelles

Die N-terminale Markierung der Peptide mit Fluoreszenzfarbstoffen wurde mithilfe klassischer Succinimidylester(NHS-Ester)-Chemie unter Verwendung von Standardlösungsmitteln (Merck) durchgeführt. Das Oxazinderivat MR 121 wurde uns freundlicherweise von Prof. Dr. K. H. Drexhage (Universität-Gesamthochschule Siegen) zur Verfügung gestellt. Die Farbstoffe ATTO 655 (ATTO-TEC), Bodipy-FL (Molecular Probes) und Cy5 (Amersham Pharmacia Biotech) wurden in Form der NHS-Ester bezogen. Die Farbstoffe ( $1 \mu\text{mol mL}^{-1}$ ) und die synthetischen Peptide ( $1 \mu\text{mol mL}^{-1}$ ) wurden in Dimethylformamid (DMF) gelöst.  $100 \mu\text{L}$  (100 nmol, 10facher Überschuss) der Peptidlösung und  $2 \mu\text{L}$  Diisopropylethylamin (DIPEA) wurden jeweils mit  $10 \mu\text{L}$  (10 nmol) der Farbstofflösung versetzt, und die Lösung wurde drei Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Das aminoterminale Konjugat wurde durch Umkehrphasen-HPLC (Hypersil-ODS-Säule, Agilent Technologies) gereinigt, wobei ein linearer Gradient von 0–75% Acetonitril in 0.1 M Triethylammoniumacetat verwendet wurde. Die Molekulargewichte wurden massenspektrometrisch bestimmt. Die farbstoffmarkierten Peptide sind bei  $-20^{\circ}\text{C}$  einige Monate stabil.

Die Absorptionsspektren wurden mit einem Cary-UV-vis-NIR-Spektrometer (Varian) bei Raumtemperatur, die Emissionspektren mit einem Cary-Eclipse-Fluoreszenzspektrometer aufgenommen. Alle Messungen wurden in PEG-beschichteten Glasküvetten durchgeführt. Die Konzentrationen wurden unter  $1 \mu\text{M}$  gehalten, um Reabsorptionsprozesse und Reemissionseffekte zu vermeiden. Die relativen Fluoreszenzquantenausbeuten wurden relativ zur Fluoreszenzintensität des freien Farbstoffs gemessen.

Carboxypeptidase A (CPA) ist eine zinkhaltige Exopeptidase, die vom Pankreas sekretiert wird. Sie hydrolysiert vorzugsweise Peptidbindungen in Nachbarschaft zum C-Terminus von Aminosäureresten mit aromatischen oder verzweigten Seitenketten bei pH 7–8. Peptidbindungen zu Glycin, Asparaginsäure oder Glutaminsäure werden nur langsam hydrolysiert, solche zu Arginin, Prolin und Hydroxyprolin werden nicht hydrolysiert.<sup>[25,26]</sup>

Trypsin ist ein Verdauungsenzym, das einen Serinrest im aktiven Zentrum enthält. Es hydrolysiert Peptidbindungen auf der Carboxyseite der basischen Aminosäuren Lysin und Arginin (pH 7–9).<sup>[27]</sup> Das Enzym wird in 0.0046 M Tris-HCl-Puffer mit 0.0115 M Calciumchlorid bei pH 8.0 aufbewahrt. Für die Verdauungsexperimente werden 1 µL des Enzyms mit 600 µL einer 10<sup>-7</sup> M Lösung des Peptidsubstrats in PBS-Puffer (pH 7.4) gemischt.

Eingegangen am 23. Januar 2004 [Z53835]

**Stichwörter:** Analytische Methoden · Elektronentransfer · Enzyme · Fluoreszenzspektroskopie · Proteasen

- 
- [1] O. Simonetti, G. Lucarini, D. Brancorsini, P. Nita, M. L. Bernardini, G. Biagini, A. Offidani, *Cancer* **2002**, *95*, 1963–1970.
  - [2] A. Franchi, M. Santucci, E. Masini, I. Sardi, M. Paglierani, O. Gallo, *Cancer* **2002**, *95*, 1902–1910.
  - [3] A. Kugler, *Anticancer Res.* **1999**, *19*, 1589–1592.
  - [4] Y. Mochizuki, S. Tsuda, H. Kanetake, S. Kanda, *Oncogene* **2002**, *21*, 7027–7033.
  - [5] N. Harbeck, R. E. Kates, M. P. Look, M. E. Meijer-Van Gelder, J. G. Klijn, A. Kruger, M. Kiechle, F. Janicke, M. Schmitt, J. A. Foekens, *Cancer* **2002**, *15*, 4617–4622.
  - [6] K. Bajou, J. M. Lewalle, C. R. Martinez, C. Soria, H. Lu, A. Noel, J. M. Foidart, *Int. J. Cancer* **2002**, *100*, 501–506.
  - [7] C. Jumper, E. Cobos, C. Lox, *Anticancer Res.* **2002**, *22*, 2073–2076.
  - [8] O. D. Liang, T. Chavakis, S. M. Kanse, K. T. Preissner, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 28946–28953.
  - [9] M. R. Gyetko, S. Sud, G. H. Chen, J. A. Fuller, S. W. Chensue, G. B. Toews, *J. Immunol.* **2002**, *168*, 801–809.
  - [10] J. E. Koblinski, M. Ahram, B. F. Sloane, *Clin. Chim. Acta* **2000**, *291*, 113–135.
  - [11] G. Berchem, M. Glondu, M. Gleizes, J. P. Brouillet, F. Vignon, M. Garcia, E. Liaudet-Coopman, *Oncogene* **2002**, *21*, 5951–5955.
  - [12] E. D. Matayoshi, G. T. Wang, G. A. Krafft, J. Erickson, *Science* **1990**, *247*, 954–958.
  - [13] M. Cavrois, C. de Noronah, W. C. Greene, *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 1151–1154.
  - [14] M. J. Blackman, J. E. Corrie, J. C. Croney, G. Kelly, J. F. Eccleston, D. M. Jameson, *Biochemistry* **2002**, *41*, 12244–12252.
  - [15] B. Z. Packard, A. Komoriya, V. Nanda, L. Brand, *J. Phys. Chem.* **1998**, *102*, 1820–1827.
  - [16] B. Z. Packard, D. D. Toptygin, A. Komoriya, L. Brand, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 11640–11645.
  - [17] B. Z. Packard, D. D. Toptygin, A. Komoriya, L. Brand, *Methods Enzymol.* **1997**, *278*, 15–23.
  - [18] R. M. Watt, E. W. Voss, *Immunochemistry* **1977**, *14*, 533–541.
  - [19] H. Neuweiler, A. Schulz, A. C. Vaiana, J. C. Smith, S. Kaul, J. Wolfrum, M. Sauer, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 4964–4068; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 4769–4773.
  - [20] H. Neuweiler, A. Schulz, M. Böhmer, J. Enderlein, M. Sauer, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 5324–5330.
  - [21] N. Marmé, J. P. Knemeyer, M. Sauer, J. Wolfrum, *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 1133–1139.
  - [22] M. Sauer, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 1834–1837; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 1790–1793.
  - [23] A. Vaiana, H. Neuweiler, A. Schulz, J. Wolfrum, M. Sauer, J. C. Smith, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14564–14572.
  - [24] L. J. Lapidus, W. A. Eaton, J. Hofrichter, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 7220–7225.
  - [25] W. Lipscomb, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1973**, *70*, 3797–3801.
  - [26] R. H. Bradshaw, L. H. Ericsson, K. A. Walsh, H. Neurath, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1969**, *63*, 1389–1394.
  - [27] W. Brown, F. Wold, *Biochemistry* **1973**, *12*, 835–840.