

Gleichzeitige Bindung beider Enantiomere eines racemischen Wirkstoffs durch das aktive Zentrum eines Enzyms**

Matthias Mentel, Wulf Blankenfeldt* und Rolf Breinbauer*

Professor Herbert Waldmann gewidmet

Seitdem Pasteur das Prinzip der Chiralität und seine Auswirkungen auf Wechselwirkungen in biologischen Systemen entdeckt hat,^[1] wird die Rolle chiraler Wirkstoffe intensiv untersucht. Der am häufigsten beobachtete Fall ist der, dass nur ein Enantiomer eines racemischen Gemisches an einen biologischen Rezeptor bindet, während das andere als „isomerer Ballast“ angesehen werden kann (Abbildung 1 a). Es gibt aber auch Fälle, in denen das andere Enantiomer ein unterschiedliches Verhalten zeigt, das von agonistischer oder antagonistischer Bindung zum gleichen Rezeptor bis hin zur Wechselwirkung mit anderen biologischen Zielproteinen reicht. Dies kann zu kooperativen, Neben- oder sogar gegensätzlichen Effekten führen.^[2] Konsequenterweise verlangen gesetzliche Vorschriften, dass nur enantiomerenreine Medikamente auf den Markt gebracht werden dürfen.^[3,4] Während die letzten Schritte des Entwicklungsprozesses eines Medikaments also definitiv einen enantiomerenreinen Wirkstoff zum Ziel haben müssen, werden racemische Mi-

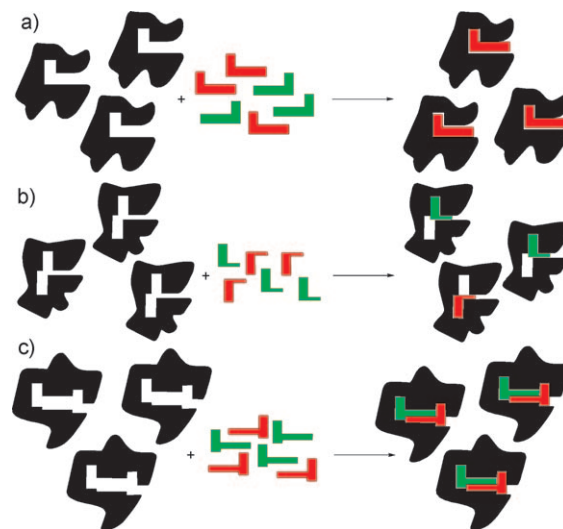


Abbildung 1. Drei Arten der Erkennung von chiralen Wirkstoffen durch einen Proteinrezeptor: a) Das Zielprotein bindet selektiv nur ein Enantiomer einer racemischen Mischung; b) die Proteinbindungstasche ist in der Lage, jedes Enantiomer jeweils einzeln aufzunehmen; c) die Bindungstasche des Proteins kann beide Enantiomere gleichzeitig binden.

[*] Dr. W. Blankenfeldt

Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie
Otto-Hahn-Straße 11, 44227 Dortmund (Deutschland)
Fax: (+49) 231-133-2399
E-Mail: wulf.blankenfeldt@mpi-dortmund.mpg.de

Prof. Dr. R. Breinbauer
Institut für Organische Chemie
Technische Universität Graz
Stremayrgasse 16, 8010 Graz (Österreich)
Fax: (+43) 316-873-8740
E-Mail: breinbauer@tugraz.at

Dr. M. Mentel, Prof. Dr. R. Breinbauer
Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie, Dortmund

Dr. M. Mentel, Prof. Dr. R. Breinbauer
Institut für Organische Chemie, Universität Leipzig
Johannisallee 29, 04103 Leipzig (Deutschland)

Dr. M. Mentel
Europäisches Laboratorium für Molekularbiologie (EMBL)
Meyerhofstraße 1, 69117 Heidelberg (Deutschland)

[**] Diese Arbeit wurde unterstützt von der Max-Planck-Gesellschaft, dem Bioband der TU Dortmund (R. B. und W. B.), der Deutschen Forschungsgemeinschaft (BL587 für W. B.) und der Universität Leipzig (R.B.). W.B. dankt Roger S. Goody für seine Unterstützung. Die Autoren bedanken sich bei Dmitri V. Mavrodi und Linda S. Thomashow für das Expressionsplasmid sowie bei Isha Himani Jain für Kristallisationsexperimente. Für ihre Hilfe bei der Datensammlung sei den Kristallographen an den MPIs für Molekulare Physiologie und für Medizinische Forschung sowie den Mitarbeitern der Beamline X10SA der Swiss Light Source gedankt.



Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200902997> zu finden.

schungen noch immer bevorzugt beim primären Screening eingesetzt. Dies liegt hauptsächlich darin begründet, dass es einerseits einen beträchtlichen Aufwand erfordert, enantiomerenreine Verbindungen herzustellen, und es andererseits bei pragmatischer Betrachtungsweise als Vorteil angesehen werden kann, gleichzeitig zwei Substanzen in einem Experiment auf ihre biologische Wirkung hin zu testen.^[5] Wird bei einem In-vitro-Screening mit einem definierten Zielprotein für ein Racemat Aktivität gefunden, so ermöglicht die isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) oder eine Cokristallisation mit dem Racemat die Bestimmung der Bindungseigenschaften der beiden Enantiomere.^[6] Unseres Wissens haben derartige Experimente bisher immer zu dem Schluss geführt, dass nur ein einziges Enantiomer im Proteinrezeptor vorhanden ist. In seltenen Fällen konnte gezeigt werden, dass beide Enantiomere jeweils einzeln in der Bindungstasche binden können, aber niemals zur gleichen Zeit (Abbildung 1 b).^[7] Hier berichten wir über einen zuvor noch nicht beobachteten Fall von chiraler Erkennung: Wir stellen die erste Kristallstruktur eines Proteins vor, in dessen aktivem Zentrum beide Enantiomere eines Liganden gleichzeitig gebunden sind. Damit zeigen wir ein neuartiges Verhalten von Enantiomeren, das große Bedeutung für die Wirkstoffsuche haben könnte (Abbildung 1 c).

Im Zuge unserer jüngsten Untersuchungen zur Rolle des homodimeren PhzA/B-Enzyms aus *Burkholderia cepacia* R18194 in der Biosynthese von Phenazinen^[8] haben wir eine Reihe von achiralen Liganden synthetisiert, die an das Protein banden. Kristallstrukturen der Protein/Ligand-Komplexe wiesen auf zusätzliche Wechselwirkungsstellen hin, die mit geeigneten chiralen Verbindungen angesprochen werden könnten. In der Tat zeigte sich, dass sich nur ein Enantiomer im aktiven Zentrum befand, wenn PhzA/B-Kristalle mit racemischen Mischungen dieser verbesserten Liganden inkubiert wurden. Diese Verbindungen imitieren ein Intermediat der vom Enzym katalysierten zweifachen Kondensationsreaktion. Ihre Bindung ist durch polare Wechselwirkungen ihrer Carboxylatgruppen mit dem von Y120/Q147/R160* (* zeigt das zweite Monomer an) gebildeten Motiv und mit R41/S77 sowie einer Wasserstoffbrücke zwischen dem katalytischen Rest E140 und dem Anilin-N-Atom charakterisiert (Abbildung 2 a).

Überraschend verhielt sich die Verbindung *rac-1* – obwohl von ähnlicher Größe und funktioneller Ausstattung – jedoch ganz anders: Die Kristallstrukturanalyse zeigte, dass die aktive Tasche in diesem Fall zwei wechselwirkende Ligan-

denmoleküle mit entgegengesetzter Chiralität enthält ((*R*)-**1** und (*S*)-**1**; Abbildung 2 b). Die beiden Moleküle binden in einer Orientierung, die sich von jener aller bisher untersuchten Liganden unterscheidet (repräsentiert durch das Beispiel in Abbildung 2 a). In diesem speziellen Fall ist die Carboxygruppe des *R*-Enantiomers zwischen den Guanidineinheiten von R38 und R41 eingebettet. Das Stickstoffatom der Piperidineinheit, die eine äquatoriale Sesselkonformation einnimmt, wechselwirkt mit E140 und der Carboxygruppe des *S*-Enantiomers.

Das 5-Brombenzoatfragment des *S*-Enantiomers geht ähnliche Wechselwirkungen ein wie der in Abbildung 2 a gezeigte Ligand, allerdings ist der Piperidinring auf die andere Seite der Brombenzoateinheit gedreht, um in einer ebenfalls äquatorialen Sesselkonformation mit C80 zu wechselwirken. Dabei wird die Seitenkette von W76 verlagert, was eine Umorientierung der Seitenkette von H73 und eine Unordnung des C-Terminus des zweiten Monomers bei den Resten nach Position G162* zur Folge hat (Abbildung 2 b).

Um zu überprüfen, ob diese unerwartete gleichzeitige Bindung des Racemats von einem kooperativen Verhalten der beiden Enantiomeren herrührt, haben wir Soaking-Ex-

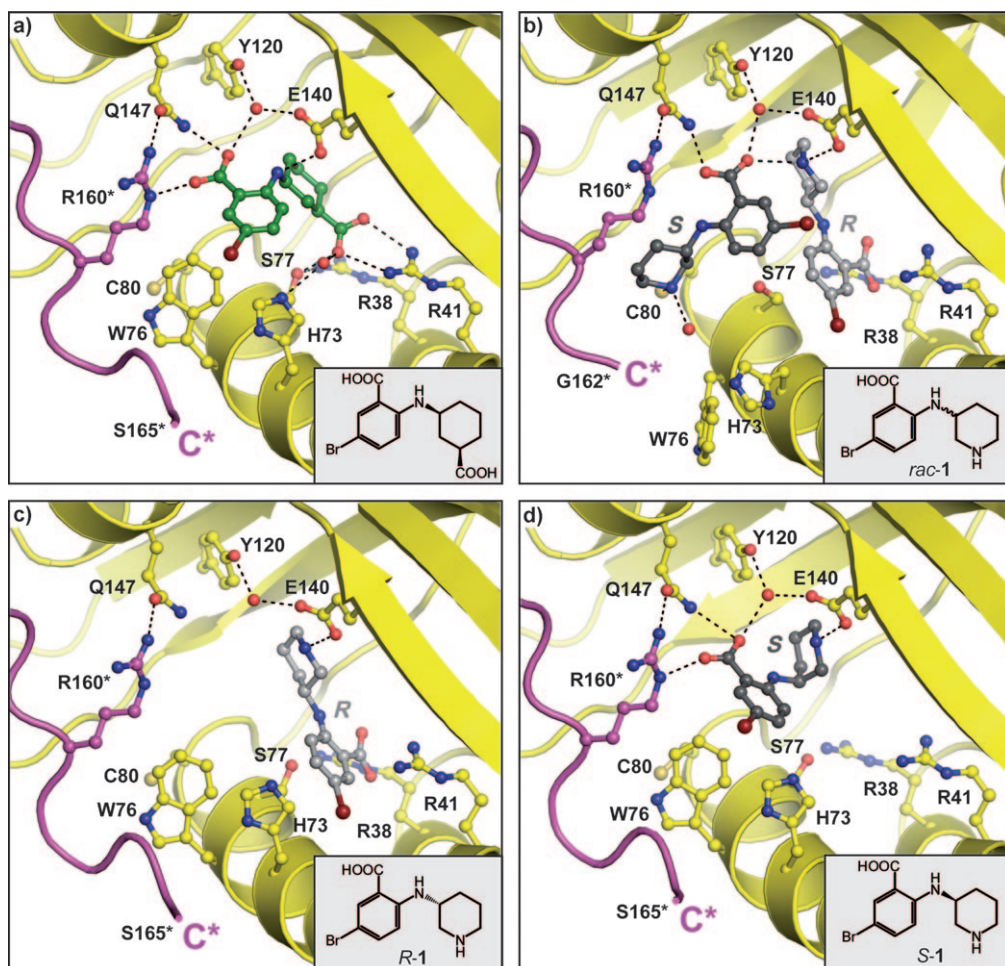


Abbildung 2. Bindung von synthetischen Liganden an das aktive Zentrum von PhzA/B von *Burkholderia cepacia* R18194. Reste des zweiten Monomers sind in Violett dargestellt und mit einem Stern (*) markiert. a) Bindungsmodus, wie er für die meisten Liganden beobachtet wird (dunkelgrün Ligand, blau N, rot O, dunkelrot Br). b) Simultane Bindung von *rac-1* (dunkel- und hellgrau). Teile des C-Terminus des zweiten Monomers sind ungeordnet. c) Bindung des reinen *R*-Enantiomers (hellgrau). d) Bindung des reinen *S*-Enantiomers (dunkelgrau).

perimente (Einlegen der Proteinkristalle in eine Ligandlösung) mit den jeweils reinen Enantiomeren von **1** durchgeführt. Während dabei das *R*-Enantiomer denselben Bindungsmodus wie im Racematkomplex zeigt (Abbildung 2c), bindet die *S*-Form interessanterweise in einer anderen Orientierung (Abbildung 2d). Dabei nimmt sie eine ähnliche Position wie das in Abbildung 2a gezeigte Analogon ein, mit dem Unterschied, dass der Piperidinring in einer axialen Sesselkonformation vorliegt, die eine Wasserstoffbrücke zwischen dem Stickstoffatom und der Seitenkette von E140 ermöglicht. Dementsprechend ist auch der C-Terminus in diesem Komplex nicht ungeordnet. Der Bindungsmodus von (*S*)-**1** ist hier somit vollkommen anders als im Racematkomplex.

Um auszuschließen, dass die oben beschriebenen Strukturen Artefakte sind, die durch das Behandeln der Kristalle mit hohen Konzentrationen der Liganden (4 mM) zustande gekommen sind, haben wir eine Reihe von Cokristallisationsexperimenten durchgeführt. Diese Versuche bestätigten die Komplexe der enantiomerenreinen Verbindungen (wie in Abbildung 2c,d), führten aber auch zu der Beobachtung, dass die gleichzeitige Bindung von (*R*)-**1** und (*S*)-**1** konzentrationsabhängig ist: Bei 1 mM wird nur das *S*-Enantiomer beobachtet; bei 2 mM zeigt die Elektronendichte, dass etwa 50 % der PhzA/B-Moleküle mit dem *S*-Enantiomer allein und die andere Hälfte mit dem Racemat bindet (Abbildung S2 in den Hintergrundinformationen); unter Sättigungskonzentrationen (> 10 mM beim Kristallisationsansatz) schließlich wird ausschließlich simultane Bindung des Racemats wie in Abbildung 2b gefunden. Dies deutet darauf hin, dass die Bindung von *rac*-**1** unterschiedlichen Gleichgewichten unterliegt.

Die Ligandenbindung wurde ferner mithilfe der ITC untersucht. Die einzelnen Enantiomere wiesen hier eine 1:1-Protein/Ligand-Stöchiometrie auf, wobei (*S*)-**1** etwa dreimal stärker bindet als das *R*-Enantiomer. Im Unterschied dazu zeigte die Titration mit dem Racemat eine 1:1.5-Stöchiometrie mit einer geringeren Affinität als mit den reinen Enantiomeren (Tabelle 1, Abbildung 3). Diese Abweichung vom erwarteten 1:2-Komplex und das offensichtlich unkooperative Verhalten bei der Ligandenbindung interpretieren wir anhand von teilweise konkurrierenden Bindungsgleichgewichten: Zu Beginn der Titration sind alle aktiven Zentren frei, und Proteinmoleküle werden nach und nach mit (*R*)-, (*S*)- und *rac*-**1** besetzt. Im Laufe des Experiments wird das *S*-Enantiomer teilweise (*R*)-**1** in einigen der Protein:((*R*)-**1**)-Komplexe verdrängen und in anderen den Protein:((*R*)-**1**)-

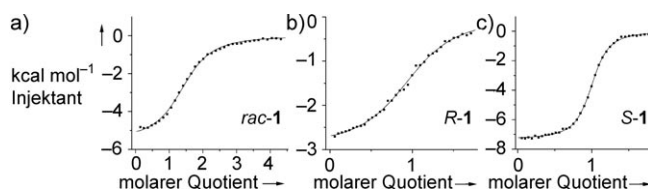


Abbildung 3. Titrations von PhzA/B mit a) *rac*-**1**, b) (*R*)-**1** und c) (*S*)-**1**. Die unterschiedlichen Stöchiometrien bei der Bindung des Racemats und bei Bindung der einzelnen Enantiomere werden durch den molaren Quotienten beim Wendepunkt der Kurve angezeigt (siehe Tabelle 1, Zahl der Zentren).

Komplex vervollständigen. Gegen Ende der Titration wird eine Sättigung der Bindungsstellen erreicht, und der Protein:((*rac*-**1**)-Komplex, auf den die Kristallstruktur als die stabilste Anordnung hindeutet, wird überwiegen. Idealerweise sollte sich ein derartiges Szenario in Abweichungen einer sigmoidalen Titrationskurve manifestieren, wie es in Studien von racemischen Proteaseinhibitoren durch Fokkens und Klebe beschrieben wurde.^[6] Für eine Auflösung durch ITC dürften jedoch signifikant höhere Unterschiede zwischen den Affinitäten der Enantiomere und wahrscheinlich auch des Racemats (50- bis 200-fach)^[6] als in dem von uns beschriebenen System erforderlich sein. Aus diesem Grunde konnten mithilfe der ITC-Experimente weder die Affinitäten von (*S*)-**1** gegenüber dem *R*-Enantiomer-Komplex zur Vervollständigung des Protein:((*rac*-**1**)-Komplexes noch die von *rac*-**1** zum nicht komplexierten Protein bestimmt werden.

Unsere Beobachtungen liefern einen wichtigen Beitrag zur Diskussion der Wirkung von chiralen Verbindungen auf primäre Zielproteine wie Enzyme, Ionenkanäle oder G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die aufgrund der Art ihrer Funktion definierte und spezifische Bindungstaschen enthalten müssen. Unsere Beobachtungen für ein spezifisches Enzym der Biosynthese eines Sekundärmetaboliten gehen über jüngste Befunde hinaus, in denen über die mehrfache Bindung von Liganden in promiskuitiven Transporterproteinen oder P450-Enzymen berichtet wurde; diese Proteine haben große Bindungstaschen, um möglichst unterschiedliche Substrate prozessieren zu können.^[9] Gegenwärtig gibt es wohl noch keine Alternative zur Verwendung racemischer Mischungen beim primären Screening, allerdings sollten nach den hier vorgestellten Erkenntnissen die so erhaltenen Bindungsdaten mit großer Vorsicht interpretiert werden. Die Aufnahme eines Racemats in eine Proteinbindungstasche könnte neue Chancen für die Wirkstoff-Forschung bieten, besonders im Rahmen Fragment-basierter Ansätze.^[10]

Tabelle 1: Bindungsparameter gemäß ITC.

	$K_D^{[a]}$ [μ M]	Zahl der Zentren ^[b]	$\Delta H^{[a]}$ [kcal mol ⁻¹]	$-T\Delta S^{[a]}$ [kcal mol ⁻¹]
<i>rac</i> - 1 ^[c]	12.4 ± 0.82	1.53 ± 0.13	-5.01 ± 0.78	-1.7 ± 0.8
(<i>R</i>)- 1	8.55 ± 2.6	1.02 ± 0.01	-2.09 ± 0.83	-4.8 ± 1
(<i>S</i>)- 1	2.63 ± 1.1	1.00 ± 0.02	-6.13 ± 1.0	-1.5 ± 0.8

[a] Thermodynamische Werte werden als Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei Titrationsen angegeben. [b] Die Zahl der Bindungszentren im Makromolekül bezieht sich auf eine monomere Untereinheit. [c] Die thermodynamischen Werte beziehen sich auf ein einzelnes Ligandmolekül.

Experimentelles

(*R*)-**1** und (*S*)-**1** wurden gemäß einer Standard-Ullmann-Kondensationsvorschrift^[11] aus 2-Brombenzoesäure (Aldrich) und *R*- bzw. *S*-Piperidin-3-amin (CNH Technologies) hergestellt. Eine genaue Beschreibung der Synthese soll an anderer Stelle erfolgen. Analysespektren sind in den Hintergrundinformationen abgebildet. ¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ = 8.00 (d, ⁴*J* = 2.5 Hz, 1H, Ar-H), 7.51 (dd, ³*J* = 9.0 Hz, ⁴*J* = 2.5 Hz, 1H, Ar-H), 6.74 (d, ³*J* = 9.2 Hz, 1H, Ar-H), 3.85 (dddd, ³*J* = 8.7, 8.9, 3.7, 4.0 Hz, 1H, CH), 3.46 (dd, ²*J* = 13 Hz, ³*J* = 3.2 Hz, 1H, CHH_{eq}NH), 3.30 (ddd, ²*J* = 13 Hz, ³*J* = 4.6, 4.6 Hz, 1H,

CHH_{eq}CHH), 3.05 (ddd, $^2J = 13$ Hz, $^3J = 9.9$, 3.3 Hz, 1 H, CH_{ax}CHH), 2.98 (dd, $^2J = 13$ Hz, $^3J = 8.8$ Hz, 1 H, CH_{ax}HNH), 2.19–2.09 (m, 2 H, CHH), 2.08–1.98 (m, 2 H, CHH), 1.91–1.79 (m, 1 H, CHH), 1.74–1.63 ppm (m, 1 H, CHH). ^{13}C -NMR (75 MHz, [D₆]DMSO): $\delta = 168.8$ (COOH), 148.3 (C_{Ar}-NH), 136.8 (CH, C_{Ar}), 133.6 (CH, C_{Ar}), 113.9 (CH, C_{Ar}), 112.3 (C_{Ar}-Br), 105.4 (C_{Ar}-COOH), 46.0 (CH₂N), 45.7 (CHN), 42.8 (CH₂N), 28.5 (CH₂), 20.9 ppm (CH₂). HR-MS (ESI⁺): m/z : ber. für C₁₂H₁₆BrN₂O₂⁺ [M+H]⁺: 299.0390; gef. 299.0389. UV (MeCN/H₂O, 0.05% Trifluoressigsäure): $\lambda_{\text{max}} = 222$, 262, 359 nm. Schmp. 106°C (subl.). $[\alpha]_{\text{D}}^{22}((R)\text{-1}) = -11^\circ$ ($c = 0.48$ g cm⁻³, H₂O). $[\alpha]_{\text{D}}^{22}((S)\text{-1}) = +12^\circ$ ($c = 0.32$ g cm⁻³, H₂O).

Expression und Reinigung des N-terminal Hexahistidin-modifizierten PhzA/B aus *Burkholderia cepacia* R18194 erfolgten wie vorher beschrieben.^[8] Reines Protein wurde in 20 mM Tris-HCl pH 8.0 (Tris: Tris(hydroxymethyl)aminomethan) und 150 mM NaCl konzentriert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt. Eine ITC wurde^[8] nach Bestimmung der Proteinkonzentration durch UV-Absorption bei 280 nm nach dem Lambert-Beerschen Gesetz durchgeführt, wobei 1 mM ((R)-1, (S)-1) oder 2 mM Lösungen (rac-1) der Liganden in 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl und 0.1 mM PhzA/B im selben Puffer verwendet wurden. Kristallisation des nativen PhzA/B wurde durch die Dampfdiffusionsmethode mit hängenden Tropfen erzielt.^[8] Kristalle der Komplexe wurden durch Einlegen der nativen PhzA/B-Kristalle über Nacht in Mutterlauge, der 4 mM des entsprechenden Liganden zugesetzt waren, oder durch Cokristallisation des Proteins nach Vorkubation mit 1, 2 und 40 mM Ligand durchgeführt. Details sind in den Hintergrundinformationen angegeben. Kristalle wurden mit einer Kühltischflüssigkeit gewaschen, der die gleiche Konzentration an Ligand zugesetzt wurde. Diffraktionsdaten wurden bei 100 K an Beamline X10SA der Swiss Light Source (Villigen, Switzerland) gesammelt. Die Verfeinerung der Struktur erfolgte wie in Lit. [8] beschrieben, $|F_{\text{O}} - F_{\text{C}}|$ -Elektronendichtedifferenzen der Liganden vor Integration in das Modell sind in Abbildungen S1 und S2 der Hintergrundinformation gezeigt. Die vollständige Datensammlung und Verfeinerungsstatistiken sind in Tabelle S1 aufgeführt.^[12]

Eingegangen am 3. Juni 2009,

veränderte Fassung am 28. August 2009

Online veröffentlicht am 28. Oktober 2009

Stichwörter: Chiralität · Medizinische Chemie · Biosynthese · Proteinstrukturen · Wirkstoff-Design

- [1] a) L. Pasteur, *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci.* **1858**, 46, 615–618; b) J. Gal, *Chirality* **2008**, 20, 5–19.
[2] a) E. J. Ariens, *Med. Res. Rev.* **1986**, 6, 451–466; b) M. Simonyi, *Med. Res. Rev.* **1984**, 4, 359–413.

- [3] I. Agranat, H. Caner, J. Caldwell, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2002**, 1, 753–768.
[4] <http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm122883.htm>.
[5] a) P. Beroza, M. J. Suto, *Drug Discovery Today* **2000**, 5, 364–372; b) W. H. Brooks, K. G. Daniel, S.-S. Sung, W. C. Guida, *J. Chem. Inf. Model.* **2008**, 48, 639–645.
[6] J. Fokkens, G. Klebe, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 1000–1004; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 985–989.
[7] Über Röntgenkristallstrukturen von Proteinkomplexen, bei denen die Bindungstasche von beiden Enantiomeren jeweils allein besetzt werden kann, wurde berichtet: a) A. Mezzetti, J. D. Schrag, C. S. Cheong, R. J. Kazlauskas, *Chem. Biol.* **2005**, 12, 427–437; b) M. Bocola, M. T. Stubbs, C. Sottriffer, B. Hauer, T. Friedrich, K. Dittrich, G. Klebe, *Protein Eng.* **2003**, 16, 319–322; c) I. Petitpas, A. A. Bhattacharya, S. Twine, M. East, S. Curry, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 22804–22809; d) B. P. Klaholz, A. Mitschler, M. Belema, C. Zusi, D. Moras, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 6322–6327; e) C. R. D. Lancaster, H. Michel, *J. Mol. Biol.* **1999**, 286, 883–898; f) V. S. Stoll, B. T. Eger, R. C. Hynes, V. Martichonok, J. B. Jones, E. F. Pai, *Biochemistry* **1998**, 37, 451–462; g) D. A. Lang, M. L. M. Mannesse, G. H. de Haas, H. M. Verheij, B. W. Dijkstra, *Eur. J. Biochem.* **1998**, 254, 333–340; h) M. T. Stubbs, R. Huber, W. Bode, *FEBS Lett.* **1995**, 375, 103–107; i) M. Cygler, P. Grochulski, R. J. Kazlauskas, J. D. Schrag, F. Bouthillier, B. Rubin, A. N. Serreqi, A. K. Gupta, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 3180–3186; j) R. Raag, H. Li, B. C. Jones, T. L. Poulos, *Biochemistry* **1993**, 32, 4571–4578; k) M. Karpusas, D. Holland, S. J. Remington, *Biochemistry* **1991**, 30, 6024–6031.
[8] E. G. Ahuja, P. Janning, M. Mentel, A. Graebisch, R. Breinbauer, W. Hiller, B. Costisella, L. S. Thomashow, D. V. Mavrodí, W. Blankenfeldt, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 17053–17061.
[9] a) S. G. Aller, J. Yu, A. Ward, Y. Weng, S. Chittaboina, R. Zhuo, P. M. Harrell, Y. T. Trinh, Q. Zhang, I. L. Urbatsch, G. Chang, *Science* **2009**, 323, 1718–1722; b) M. Ekroos, T. Sjögren, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, 103, 13682–13687.
[10] Übersichtsartikel: a) „Methods and Principles of Medicinal Chemistry“: *Fragment-Based Approaches in Drug Discovery*, Vol. 34 (Hrsg.: W. Jahnke, D. A. Erlanson, R. Mannhold, H. Kubinyi, G. Folkers), Wiley-VCH, Weinheim, **2006**; b) D. C. Rees, M. Congreve, C. W. Murray, R. Carr, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2004**, 3, 660–672.
[11] S. V. Ley, A. W. Thomas, *Angew. Chem.* **2003**, 115, 5558–5607; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 5400–5449; Berichtigung: S. V. Ley, A. W. Thomas, *Angew. Chem.* **2004**, 116, 1061; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 1043.
[12] Koordinaten und Strukturdaten wurden in der Protein Data Bank unter den Zugriffscodes 3JUM, 3JUN, 3JUO, 3JUP und 3JUQ deponiert.