

Prozessive Katalyse

Stijn F. M. van Dongen,* Johannes A. A. W. Elemans, Alan E. Rowan und Roeland J. M. Nolte*

Enzyme · Nichtkovalente Wechselwirkungen · Prozessivität · Supramolekulare Chemie · Wirt-Gast-Systeme

Die Enzyme natürlicher Systeme haben Naturwissenschaftler schon immer inspiriert. Die komplexen Prozesse, auf denen ihre Selektivität und Effizienz beruhen, kommen langsam ans Tageslicht. Viele biomimetische Katalysatoren wurden nach ihrem Vorbild entworfen, allerdings liegt fast immer der Schwerpunkt auf der Umwandlung niedermolekularer Substrate. Die Natur hingegen kennt viele katalytische Systeme, die ganze Polymere modifizieren, replizieren oder abbauen, und das oft in prozessiver Weise. Beispielsweise kann das Anklammern des Katalysators an das Polymersubstrat zu einer solchen Prozessivität führen und, als Folge einer großen effektiven Molarität, die Geschwindigkeit der Katalyse erhöhen. Dieser Kurzaufsatzz stellt verschiedene Strategien der Prozessivität in natürlichen Systemen und deren Eigenschaften vor. Zudem werden die Erfolge beschrieben, die Chemiker bei der Nachahmung eines der großartigsten Tricks der Natur bislang verbuchen konnten.

1. Einleitung

Eine Katalyse kann als prozessiv bezeichnet werden, wenn der Katalysator an sein Substrat assoziiert und anschließend seine katalytische Reaktion mehrmals ausführt, bevor er dissoziert. Nur selten läuft Prozessivität darauf hinaus, dass mehrere Umwandlungen an ein und demselben niedermolekularen Substrat vorgenommen werden. Im Allgemeinen sind prozessive Katalysatoren aber auf polymere Substrate spezialisiert. Diese Spezialisierung ist nicht überraschend: Die sich wiederholenden Monomere in einem Polymer und dessen relativ hoher Ordnungsgrad bieten beste Voraussetzungen dafür, dass ein Katalysator dieselbe Reaktion wiederholt ausführen kann. Ein distributiver Katalysator, der nach dem üblichen Schema aus Assoziation-Umwandlung-Dissoziation vorgeht, gerät in diesem Szenario in Nachteil, denn ein prozessiver Katalysator muss nur ein ein-

ziges Mal assoziieren, um eine Reihe von Umwandlungen auszuführen.

Eine derartige Aufreihung potenzieller Reaktionszentren ruft das Konzept der effektiven Molarität auf den Plan. Da der Katalysator mit dem Polymer, auf dem sich seine potentiellen Reaktionszentren befinden, verbunden ist und an diesem entlang gleiten kann, wird er bereits effektiv für seine nächste Reaktion ausgerichtet.^[1] So wird der dreidimensionale Raum, in dem der Katalysator normalerweise diffundieren würde, auf einen zweidimensionalen reduziert, was die Substratmolarität virtuell erhöht. Es ist daher nicht verwunderlich, dass die meisten künstlichen prozessiven Katalysatoren einen Rotaxan-artigen Wirkmechanismus aufweisen.^[2] Die erhöhte effektive Molarität kommt in einer bemerkenswert hohen Effizienz zum Ausdruck und ebnet den Weg für die sequenzielle Katalyse: die Umwandlung von Substraten nach einer vorher entworfenen Sequenz. Bedenkt man die ausgiebige Nutzung von Polymeren durch den Menschen und die Effizienz der Natur bei ihrer Synthese und selektiven Modifizierung, so sind erst erstaunlich wenige biohybride oder vollsynthetische prozessive Katalysatoren entwickelt worden. Künstliche molekulare Maschinen bieten auf diesem Gebiet hervorragende Erfolgsaussichten.^[3]

Das Ziel dieses Kurzaufsatzzes ist es, die Wirkungsweise natürlicher prozessiver Katalysatoren zu beschreiben und erste Ansätze zur Nachahmung ihres Verhaltens vorzustellen, um Forscher zu weiterführenden Arbeiten anzuregen.

[*] Dr. S. F. M. van Dongen, Dr. J. A. A. W. Elemans, Prof. Dr. A. E. Rowan, Prof. Dr. R. J. M. Nolte
Radboud University Nijmegen
Institute for Molecules and Materials
Heyendaalseweg 135, 6525 AJ Nijmegen (Niederlande)
E-Mail: Science@StijnvanDongen.nl
R.Nolte@science.ru.nl

2. Prozessive Enzyme in der Natur

Ein schnell arbeitendes Enzym muss, um den möglichen hohen Umsatz zu erzielen, leicht in Kontakt mit seinem Substrat kommen. Analog kann ein Enzym mit großer Substrataffinität diesen Vorteil nur dann zum Tragen bringen, wenn es nicht nur einen langsamem Umsatz bewirkt. Diese Einflussfaktoren werden in Enzymkinetikmodellen berücksichtigt. Das Michaelis-Menten-Modell besagt etwa, dass die Effizienz eines Enzyms nicht nur von seiner maximalen Umsatzgeschwindigkeit v_{\max} (in s^{-1}), sondern auch von seiner Affinität für sein Substrat abhängt, die in Form der Michaelis-Konstante K_m (in M) einfießt. K_m ist umgekehrt proportional zur Bindungsaffinität, sodass den meisten effizienten Enzymen eine Kombination aus hohem v_{\max} und niedrigem K_m zu eigen ist. Natürliche prozessive Enzyme sind im Allgemeinen verblüffend effizient. Sie nutzen ihre Prozessivität, um ihre effektiven K_m -Werte zu verbessern und ihre Produktivität zu steigern. Nach dem Ausmaß des Substratumschlusses durch diese Enzyme sind zwei Klassen zu unterscheiden: solche, die

ihr Substrat vollständig umschließen, und solche, die ihr Substrat nur teilweise umfassen.^[1]

In der Natur tritt Prozessivität auch in nichtkatalytischen Motorproteinen^[4] und bei Nicht-Protein-Systemen (Ribosomen)^[5] auf. Für Details verweisen wir auf die zitierten Übersichten.

2.1. Ringförmige Proteine

Wenn ein Enzym ein (bio)polymeres Substrat gänzlich umschließt, sind beide topologisch in einem Rotaxan-artigen Komplex verknüpft. Diese mechanische Verknüpfung macht eine hoch spezifische Wechselwirkung zwischen der Klammer und dem Templat überflüssig. Ringe, die Nucleinsäuren umschließen, tun dies in den meisten Fällen mit nichts weiter als einem positiv geladenen Kanal. Ein Beispiel für diesen Rotaxan-artigen Prozessivitätsmodus ist die Exonuclease von Bakteriophage λ .^[6] Dieses ringförmige Enzym ist ein Homotrimer (Abbildung 1a). Es baut DNA vom 5'- zum 3'-Ende



Stijn van Dongen (Mitte links) fertigte seinen M.Sc. an der ETH Zürich cum laude an und promovierte 2010 unter der Anleitung von Prof. R. J. M. Nolte und Prof. J. C. M. van Hest an der Radboud Universiteit Nimwegen mit einer Arbeit über selbstorganisierte Polymersomnanopartikel für Katalyse und chemische Biologie. Danach wechselte er an die École Normale Supérieure und das Institut Curie in Paris, wo er als Stipendiat bei Dr. C. Tribet und Dr. M. Piel dynamische Oberflächenbeschichtungen für die Zellkultur entwickelte. 2012 kehrte er nach Nimwegen zurück, wo er prozessive proteinbasierte Rotaxane untersucht.

Hans Elemans (links) promovierte 2001 in der Gruppe von Prof. R. J. M. Nolte an der Radboud Universiteit Nimwegen. Danach rief er eine Kooperation zwischen den dortigen Physik- und Chemie-Instituten ins Leben, um Selbstorganisation und katalytische Prozesse auf der Einzelmolekülebene mit Rastersondenmikroskopie zu untersuchen. 2008 trat er der Gruppe von Prof. Steven De Feyter an der K. U. Leuven bei, kehrte aber nach Nimwegen zurück, um dort seine eigene Forschungsgruppe zu gründen. 2010 erhielt er einen ERC Starting Grant.

Alan Rowan (rechts) studierte an der University of Liverpool (Großbritannien) und promovierte dort in physikalischer organischer Chemie. 1992 schloss er ein Postdoktorat in Neuseeland bei Prof. C. Hunter an. 1994 wechselte er nach Nimwegen, wo er als Marie-Curie-Stipendiat in der Gruppe von Prof. R. J. M. Nolte über hierarchische Materialien forschte. Im Jahr 2005 wurde er zum Professor ernannt. Die jüngste unter seinen zahlreichen Auszeichnungen ist der RSC 2014 Soft Matter and Biophysical Award.

Roeland J. M. Nolte (Mitte rechts) ist Professor für organische Chemie an der Radboud Universiteit Nimwegen. Er ist Mitglied der Königlichen Niederländischen Akademie der Wissenschaften. Seine Interessen umfassen viele Themen an der Grenzfläche zwischen supramolekularer und biomimetischer Chemie. Für seine wissenschaftlichen Arbeiten erhielt er zahlreiche Auszeichnungen, darunter den ersten Lehrstuhl für Chemie der Königlichen Niederländischen Akademie der Wissenschaften und einen Ritterschlag. Er war Mitglied der Redaktionsbeiräte vieler wissenschaftlicher Zeitschriften, darunter auch *Science* und *Chemical Communications*.

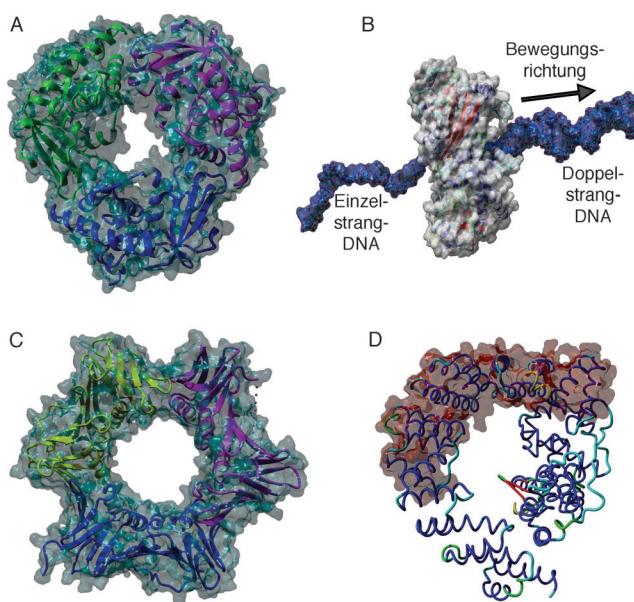


Abbildung 1. Substrate umschließende Proteine. A) Die Exonuclease von Bakteriophage λ ,^[6] ein Homotrimer. Die kleine Öffnung auf der Rückseite ist gerade groß genug für Einzelstrang-DNA (PDB: 1AVQ). B) Illustration der über DNA gleitenden λ -Exonuclease, die nur einen Strang abbaut. C) *S. solfataricus* P2 PCNA,^[9] ein gleitendes Heterotrimer. Die zentrale Öffnung ist größer als bei λ -Exonuclease. (PDB: 2IX2). D) Transglycosylase Slt70 aus *E. coli*,^[10] ein unsymmetrischer Ring. Die Handflächendomäne ist rötlich hervorgehoben; unten links befindet sich der Daumen, rechts die Finger (PDB: 1QSA).

hin ab, und dies erklärt, warum nur einer der beiden durch seinen Hohlraum passierenden Stränge abgebaut wird. Darüber hinaus verjüngt sich der Hohlraum: Sein Eingang ist groß genug für eine Doppelhelix, sein Ausgang lediglich für einen einzelnen Strang.

DNA-Polymerasen erfüllen die entgegengesetzte Funktion, einige von ihnen nutzen aber gleichfalls ringförmige Strukturen. Diese können aus mehreren Komponenten bestehen. Beispielsweise ist die DNA-Polymerase gp43 des Bakteriophagen T4 nicht inhärent prozessiv,^[7] sie kann aber mit dem homotrimeren Klammerprotein gp45 assoziieren. Dieses kann DNA fast vollständig umschließen, wobei es eine C-Form annimmt und nur die Grenzfläche einer einzigen Untereinheit freilässt. Ohne katalytische Funktion gleitet es über die DNA, doch wenn das Ende von gp43 in der Lücke andockt, wird die DNA vollständig umschlossen und die Polymerase mit ihrem Templat verknüpft. Dieses Andocken ist ein dynamischer Vorgang, da weitere Kopien der Polymerase ihre Vorgänger ersetzen können; auf diese Weise könnten Läsionen bei der DNA-Replikation umgangen werden.^[7,8]

Die Rekrutierung mehrerer Enzyme sollte einfacher durch ein Heterotrimer möglich sein, wie es in dem Archaeon *S. solfataricus* P2 auch wirklich der Fall ist.^[9] Sein klammerförmiger Prozessivitätsfaktor mit dem archaischen Namen „proliferating cell nuclear antigen“ (PCNA; Abbildung 1c) besteht aus den Unterfaktoren 1, 2 und 3 im Verhältnis 1:1:1. Das komplette Heterotrimer, nicht aber die einzelnen Untereinheiten, bindet die DNA-Polymerase, die DNA-Ligase I und die 5'-Nuklease von *S. solfataricus*. Dadurch wird eine

vollständige Proteinmaschine zu einer einzigen prozessiven Architektur verbunden.^[9]

Abgesehen von symmetrischen Ringen finden sich für manche prozessiven Enzyme auch unsymmetrische Ringe. Diese Ringe werden oft mit Händen verglichen – mit Handflächen-, Daumen- und Fingerdomänen – wie für die lytische Transglycosylase Slt70 aus *E. coli* in Abbildung 1d gezeigt. Mit dieser Hand verknüpft ist die katalytische Domäne: ein nichtprozessives Lysozym, das wie zufällig am Ring hängt.^[10] Indem das Protein mit seiner Hand Polysaccharidstränge der Zellwand greift, kann es diese prozessiv abbauen, bis es an eine Vernetzungsstelle gelangt. So wird sichergestellt, dass die Polysaccharid-Kettenenden der bakteriellen Zellwand vernetzt sind.

Auch die T7-DNA-Polymerase nutzt einen unsymmetrischen Ring, um DNA zu binden, allerdings können die Fingerdomänen diese nicht vollständig umschließen. Dies ermöglicht ein zusätzlicher Prozessivitätsfaktor (Thioredoxin), der dabei hilft, die Finger zu strecken.^[11] Wie für die T4-Polymerase wird der Ring also auch für die T7-Polymerase geschlossen.

Die Regulierung der Polymeraseprozessivität sollte etwas näher betrachtet werden. Im Allgemeinen werden klammerförmige Prozessivitätsfaktoren durch zugehörige Ladeproteine aktiv auf ein Templat gepackt.^[12] Sie müssen sich also nicht zum Ende der Nukleinsäurekette bewegen, um ein Pseudorotaxan zu bilden. Geleitet von Erkennungssequenzen ermöglichen diese Ladeproteine die Aggregation des gesamten Replikationskomplexes. Bei der DNA-Replikation bewegen sich die Polymerasen nur vom 3'- zum 5'-Ende entlang eines der Templatstränge. Der andere Strang wird ebenfalls repliziert, jedoch über viele kurze Okazaki-Fragmente (in Eukaryoten ca. 150 Nukleotide lang), die später ligiert werden. Diese Vorgehensweise erfordert zahlreiche Ladeereignisse, und die Prozessivität ist weniger stark ausgeprägt. Studien haben gezeigt, dass einige Polymerasen tatsächlich distributiv vorgehen,^[8,13] sodass die fortschreitende Polymerisation eine kontinuierliche Rekrutierung und Beladung erforderlich macht. Dieser Modus ist offensichtlich ausreichend für die Bildung kurzer DNA-Fragmente.

2.2. Substrat-Bindefurchen

Viele prozessive Enzyme umschließen ihre Template nur teilweise. Dadurch ist die strukturelle Grundlage ihrer Prozessivität weniger offensichtlich. Viele dieser nicht topologisch angeknüpften Enzyme verfügen über eine große Furche oder eine andersartige Bindedomäne für ihr Substrat. Solch eine große Oberfläche hat Vorteile, denn der Katalysator kann Wechselwirkungen mit mehreren benachbarten Zentren auf einem einzigen Polymer eingehen, was die Spezifität erhöht. Wichtiger ist vielleicht aber, dass das Gleiten des Katalysators entlang des Templat erweitert wird, weil die Assoziation auf mehreren mäßig starken Wechselwirkungen beruht und nicht auf wenigen starken.

Die Dynamik des Gleitens sei am Beispiel der Familie-18-Chitininasen illustriert.^[14] Diese Enzyme haben Chitin-Bindefurchen (Abbildung 2a) und depolymerisieren ihre Substrate;

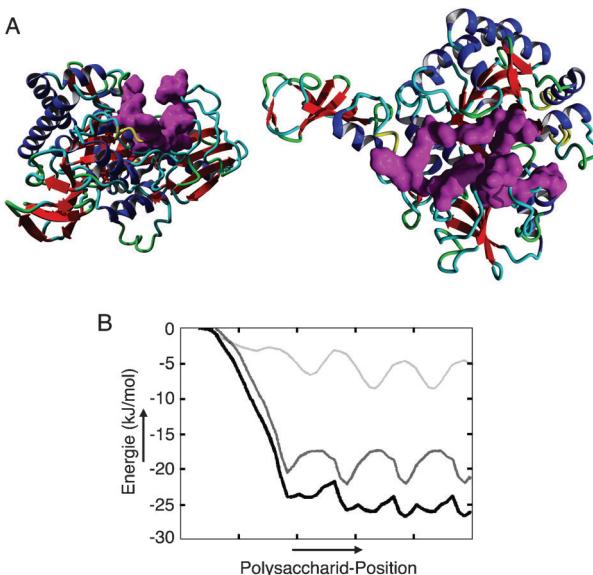


Abbildung 2. Chitinase und ihre Substratbindefurche.^[14] A) Zwei Ansichten von Chitinase B aus *S. marcescens* (PDB: 1E15). An der Chitinbindung beteiligte Reste sind hervorgehoben. B) Energieprofil eines Polysaccharids, das durch ein Protein gleitet. Die Kombination von Arenstapelung (hellgraue Linie) und Wasserstoffbrücken (dunkelgraue Linie) führt zu einem relativ glatten Gesamtenergieprofil (schwarze Linie). Originaldaten aus Lit. [15].

sie sind von großem Interesse für die Aufwertung von Biomasse. Im Fall unlöslicher Substrate wie Chitin ist die Prozessivität notwendig: Kurzzeitig gelöste Chitinketten werden an einer erneuten Assoziation mit dem Feststoff gehindert, und neuerliche Assoziationsschritte nach jeder einzelnen Reaktion werden überflüssig, was dann ein großer Vorteil ist, wenn Substrate umgesetzt werden, bei denen dieser Bindestritt die höchste Energiebarriere darstellt. Hier spielt vermutlich die Tatsache eine Rolle, dass eine Furche leichter zugänglich ist als ein vollständig umschlossener Bereich.

Zwischen dem Enzym und dem Chitin liegen vorrangig hydrophobe Wechselwirkungen vor, wobei Tyrosinreste in der Furche mit beiden Seiten eines Zuckerrings wechselwirken – ein häufiges Motiv der Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkung.^[14] Hydrophobe Wechselwirkungen betreffen ganze Bereiche und nicht einzelne Bindungspartner, wie es etwa bei Wasserstoffbrücken der Fall ist, die auch in der Chitin-Erkennung eine wichtige Rolle spielen. Diese Tatsache erleichtert das Gleiten zusätzlich. Das Gleitenergieprofil in Abbildung 2b zeigt die Beiträge von π - π -Stapelung und Wasserstoffbrücken für eine strukturverwandte Polysaccharide transportierende Pore.^[15] Hier fallen die Minima der π - π -Stapelung mit den Maxima der Wasserstoffbrücken zusammen, sodass sich ein vergleichsweise flaches Gesamtenergieprofil ergibt. Ein entsprechendes Zusammenspiel verschiedener Wechselwirkungen ermöglicht das glatte Gleiten des Chitins.^[14]

Gleiten ist auch für die BamHI-Restriktionsendonuklease von Bedeutung. Sie kann eine spezifische DNA-Sequenz erkennen und anschließend hydrolysieren.^[16] Die katalytischen Reaktionen von BamHI sind schneller als aufgrund von

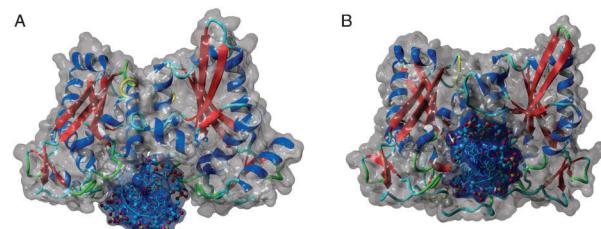


Abbildung 3. Zwei Bindungsmodi für BamHI.^[16] A) Ungezielte Bindung: BamHI setzt sich auf DNA (blau hervorgehoben) und gleitet an dieser entlang (PDB: 1ESG). B) An einer Erkennungssequenz hält eine Konformationsänderung das DNA-Substrat an und öffnet das aktive Zentrum (PDB: 3BAM).

Diffusion zu erwarten, was mit ihrer DNA-Bindefurche erklärt wird (Abbildung 3). BamHI assoziiert unspezifisch mit DNA, auf der sie wie ein Sattel aufsitzt. Dann gleitet sie an der DNA entlang, bis sie auf ihre Zielsequenz trifft. Dies induziert eine Konformationsänderung: Zwei α -Helices entrollen sich undwickeln sich in die kleine Furche der DNA, die dadurch fast vollständig umschlossen wird (Abbildung 3b). Der ungezielte Bindungsmodus – BamHI sucht gleitend nach ihrer Zielsequenz – nutzt nur schwache elektrostatische Wechselwirkungen und keinerlei Basenpaare; er ist sequenzunabhängig. Der gezielte Bindungsmodus wird dagegen durch die Erkennungssequenz induziert und nutzt Protein-Nukleotid-Wechselwirkungen; er führt letztendlich zur Spaltung. Nach der Hydrolyse kann das Enzym auf der Suche nach weiteren Restriktionsstellen weitergleiten. Interessanterweise hilft die Prozessivität in diesem Fall nicht dadurch, dass Substrate aufgereiht werden, sondern dadurch, dass eine dreidimensionale Diffusion auf eine effizientere lineare reduziert wird.^[17] Um den Vorteil zu messen, der durch diese Prozessivität erzielt wird, wurden für bestimmte Systeme die exakten Beiträge der Substrat-Substrat-Abstände und der Polymertemplatlänge ermittelt.^[18] Dank seiner offenen Furche kann das gleitende Enzym an die DNA gebundene Proteine überspringen, was geschlossenen Ringen unmöglich ist.^[19]

2.3. Nichtpolymere Substrate

Prozessivität ist nicht auf polymere Substrate beschränkt. Beispielsweise hat Schweinepankreas-Phospholipase A₂ (PLA2) eine hydrophobe Seite für die Katalyse auf Membrangrenzflächen. Das aktive Zentrum ist von dieser Seite aus durch einen Ring aus kationischen Resten zugänglich, welche das Herauslösen der anionischen Lipidsubstrate aus der Membran unterstützen.^[20] Die Membran schirmt ihrerseits die hydrophobe Seite der PLA gegen das Lösungsmittel ab. Dadurch wird sichergestellt, dass das Enzym mit der Membran assoziiert bleibt: Wurde eine Suspension von Lipidvesikeln, die mit PLA2 beladen sind, mit frischen Vesikeln versetzt, so wechselte PLA2 nicht auf die neuen Vesikel. PLA2 arbeitet also prozessiv auf einer Membran.

Die Vitamin-K-abhängige Carboxylase (VKDC) aktiviert mehrere Glutamate seiner Substratproteine durch Carboxy-

lierung, sodass sie z.B. als Bausteine für Proteinmatrices dienen können.^[21] Untercarboxylierte Substrate werden als nachteilig für die Matrixbildung angesehen, was die Bedeutung einer vollständigen Carboxylierung der einzelnen Proteine erklären würde. Da VKDC prozessiv vorgeht, kommt es selten zu einer vorzeitigen Dissoziation der Proteinsubstrate vom Enzym. Seine Prozessivität unterscheidet sich von allem bisher Diskutierten: VKDC verfügt über ein Exozentrum, das eine spezifische Proteinsequenz – ein so genanntes Propeptid – erkennt (Abbildung 4). Das Propeptid bindet fest an das Exozentrum, und das Substratprotein erhält dadurch genügend Zeit, um alle seine Glutamatreste durch das aktive Zentrum der VKDC carboxylieren zu lassen, bevor das Propeptid schließlich dissoziert.

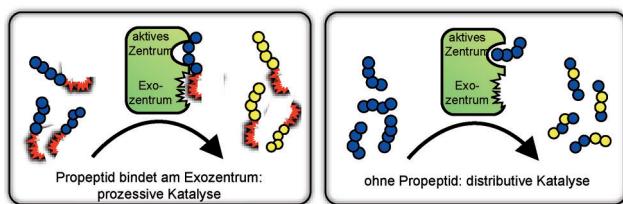


Abbildung 4. Die Grundlage der Prozessivität von VKD-Carboxylase.^[21] A) Eine Sequenz in den Substratproteinen (das Propeptid) bindet an das Exozentrum in VKDC. Daraufhin wandelt das Enzym alle Glutamatreste des Substrats um. B) Werden Substrate ohne Propeptid angeboten, so arbeitet VKDC distributiv. Die dabei beobachtete Steigerung der Katalysegeschwindigkeit deutet an, dass seine Prozessivität den Umsatz hemmt.

Studien an Peptiden mit mehreren Glutamatresten, aber ohne Propeptid, und VKDC ergaben schnellere Umsetzungen, allerdings ohne Prozessivität. Dies spricht dafür, dass das Propeptid die Umsetzung durch die Carboxylase verlangsamt, vielleicht indem es stärker bindet als unbedingt erforderlich und den Zugang zum aktiven Zentrum nach erfolgter Umsetzung des Substrats blockiert. Die Prozessivität von VKDC wäre demzufolge in Zusammenhang mit einem ausgewogenen Verhältnis von Bindungsaffinität zum Substrat und Umsatzgeschwindigkeit zu sehen. Der Mechanismus könnte aber auch komplizierter sein: Die fortschreitende Carboxylierung des Substrats könnte zu einer sich verstärkenden Ladungsabstoßung zwischen Substrat und Enzym führen, sodass ein vollständig carboxyliertes Substrat viel schneller vom Enzym dissoziiert würde als ein frisches. Überdies wurden basische Bereiche in der Umgebung des aktiven Zentrums ausgemacht. Carboxylierte Substratpositionen könnten an diese Bereiche binden und gemeinschaftlich eine Konformationsänderung des Exozentrums von VKDC auslösen, als deren Folge das Propeptid dissoziiert – allerdings erst, nachdem das Protein weitestgehend carboxyliert wurde.^[21] Der genaue Mechanismus der Prozessivität von VKDC ist noch nicht aufgeklärt, aber die Vorstellung einer derart ausgelösten Substratfreisetzung nach prozessiver Umsetzung ist faszinierend.

Eine letzte Art der Prozessivität findet sich schließlich in der Cytochrom-P450-Familie. Man kann die Cytochrome zwar nur mit viel gutem Willen als wirklich prozessiv be-

zeichnen, aber auf einigen ihrer Pfade zeigen sie ein entsprechendes Verhalten. So katalysiert Cytochrom P45011B2 die dreistufige Umwandlung von Desoxycorticosteron in Aldosteron, während der das Substratmolekül nicht dissoziiert.^[22] Andere Cytochrome vermitteln dieselben Reaktionen, sie tun dies aber distributiv. Das Auftreten von Prozessivität in P450-Cytochromen lässt sich folglich nicht vorhersagen,^[23] sodass sie sich als Vorbilder für künstliche prozessive Katalysatoren nicht unbedingt aufdrängen. Dennoch ist ihre Prozessivität nicht ohne Bedeutung: Medizinalchemiker, die Wirkstoffe gegen Cytochrom-Pfade entwerfen, müssen wissen, ob es sich bei dem Molekül, das sie als Angriffspunkt wählen, um ein Substrat oder um die Zwischenstufe einer prozessiven Katalysesequenz handelt. Davon abgesehen wird prozessive Katalyse nur selten für niedermolekulare Substrate beobachtet.

2.4. Bindungsmodi in der Natur

Natürliche prozessive Enzyme verknüpfen sich entweder mechanisch mit ihren biopolymeren Substraten oder stellen für diese eine große Bindefurche bereit.^[1] Im Allgemeinen scheint die Substraterkennung nichtspezifisch zu sein, was das Gleiten des Katalysators begünstigt. Furchen bilden leicht Komplexe, was vorteilhaft für schlecht definierte Substrate ist (wie hydrophobe Materialien^[14] oder Fremdplasmide).^[16] Mechanische Verknüpfungen ergeben eine höhere Prozessivität, erfordern aber eine vermittelte Komplexierung; sie eignen sich für lebensnotwendige Prozesse wie die DNA-Replikation.^[7]

Nichtbiopolymere Substrate scheinen nicht in dieses allgemeine Muster zu passen. Sie haben entweder die Form aggregierter Membranen, an die Enzyme assoziieren können,^[20] oder sie enthalten spezielle Erkennungseinheiten, die an Exozentren eines Enzyms binden.^[21] Sie können auch dermaßen hydrophob sein, dass sie so lange an das aktive Zentrum assoziiert bleiben, bis ein bestimmtes Ausmaß an Hydroxylierung erreicht ist.^[22] Bei der Evolution prozessiver Enzyme geht die Natur also sowohl mit System als auch mit Einfallsreichtum vor.

3. Künstliche Prozessivität

Die Nachahmung der natürlichen Prozessivität ist ein junges Forschungsgebiet. Es wurden aber bereits Erfolge erzielt, die einen Einblick in zahlreiche Aspekte des Phänomens geben.

3.1. Makrocyclische Katalysatoren

Wie in Lit. [2] dargelegt, wurde der erste katalytisch aktive makrocyclische Wirt, der als prozessives Enzymmimetikum anzusehen ist, kurz nach der Jahrtausendwende entwickelt. Seine Struktur vereint einen starren U-förmigen Rezeptorhohlraum mit einem Durchmesser von ungefähr 9 Å und einen kovalent angeknüpften Mangan(III)-Porphyrin-

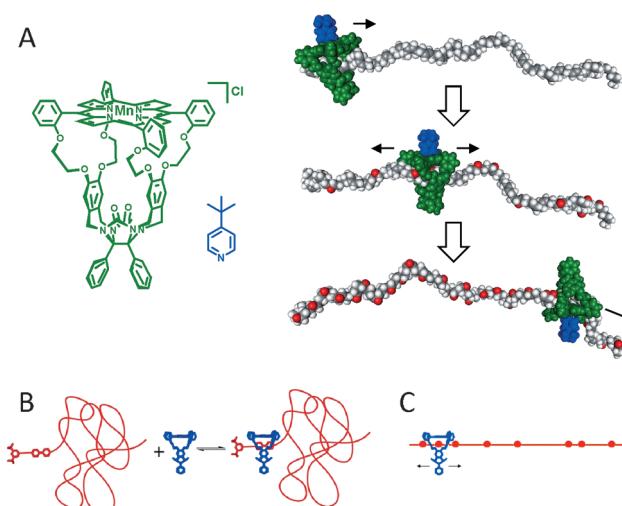


Abbildung 5. Prozessive Epoxidierung von Polybutadien durch einen katalytischen Makrocyclus.^[24] A) Links: Struktur des Makrocyclus (grün) und des sperrigen axialen Liganden (blau). Rechts: Gleiten des Makrocyclus-Ligand-Komplexes entlang der Polymerkette von einer Seite zur anderen und Epoxidierung der Doppelbindungen. B) Einfädeln eines auf einer Seite blockierten Polymers; der Makrocyclus (blau) muss die ganze Polymerkette entlangwandern, bis er seine Viologen-Bindestation erreicht. C) Nichtsequenzielle prozessive Epoxidierung der Polymerkette. Siehe Lit. [2], zit. Lit.

Deckel. Dieser Katalysator wurde auf ein polymeres Alken gefädelt, das er prozessiv epoxidierte (Abbildung 5a). Um sicherzustellen, dass die Katalyse ausschließlich im Inneren des Hohlraums abläuft, wurde ein sperriger axialer Ligand (*4-tert-Butylpyridin*) an das Manganzentrum koordiniert, der nicht in den Hohlraum passt. Axial koordinierende Substituenten am Porphyrinsystem erfüllten denselben Zweck.^[24] In Gegenwart einer Sauerstoffatom-Quelle wandelte der Katalysator Polybutadien (M_n 300 000, 98 % *cis*) binnen zwei Stunden vollständig in das entsprechende Polyepoxid um. Diese Effizienz spricht stark dafür, dass die Katalyse in einer Pseudorotaxan-artigen Topologie verläuft, wobei der Makrocyclus über die Polymerkette gleitet und diese in prozessiver Manier epoxidiert. Dieser Mechanismus wurde durch Kontrollexperimente bewiesen: Blockieren des Hohlraums durch den hoch affinen Gast *N,N'*-Dimethylviologen verhinderte das Einfädeln des Polymers und verlangsamte die Epoxidierung drastisch. Der stereochemische Verlauf der durch den Wirt katalysierten Reaktion (20 % *cis* und 80 % *trans*) wurde umgekehrt, wenn ein entsprechender Manganporphyrin-Katalysator ohne Rezeptorhohlraum eingesetzt wurde. Diese Stereoselektivität wurde dem Einfluss des engen Hohlraums zugeschrieben: In seinem Inneren wird der Übergangszustand mit dem geringeren Raumbedarf bevorzugt, und es resultiert das *trans*-Epoxid.

Diese Ergebnisse sprachen für eine prozessive Reaktion. Nun war noch die Möglichkeit auszuschließen, dass die Polymerkette nur Schleifen durch den Hohlraum des makrocyclischen Katalysators wirft und nicht in diesen einfädelt. Außerdem war fraglich, ob die Epoxidierung des Polymers sequenziell oder in zufälliger Folge verläuft. Diese Aspekte wurden in systematischen Untersuchungen zum Einfädeln

einer Reihe definierter Ketten mit einer Viologen- und einer blockierende Gruppe an einem Ende in metallfreie und Zinkanaloga des makrocyclischen Wirts geklärt.^[25] Der Makrocyclus konnte die Viologeneinheit dabei nur erreichen, indem er am offenen Ende einfädelte und die gesamte Kette bis zu dieser hinabglitt (Abbildung 5b). Dieser Prozess lief auf der Minutenstufe ab und war mit NMR- und Fluoreszenzspektroskopie zu verfolgen. Die Experimente bewiesen den Mechanismus des Einfädelns und etablierten das System als die erste synthetische prozessive (Pseudo)Rotaxan-Katalyse.

Ein weiterer künstlicher Katalysator mit Rotaxan-Wirkmodus wurde von Haradas Gruppe beschrieben.^[26] Bei der prozessiven Polymerisation von δ -Valerolacton (δ -VL) dienen Cyclodextrine (CDs) sowohl als Katalysator als auch als gleitende Klammer. β -CDs können Lactone einschließen, aktivieren und öffnen und auf diese Weise die δ -VL-Polymerisation katalysieren. Einfache β -CDs erzeugen allerdings nur Oligomere. Um eine Polymerisation zu erzielen, wurde eine zweite CD-Gruppe, ein kleineres α -CD, an das aktive β -CD angeknüpft (Abbildung 6). Diese zweite CD-Gruppe

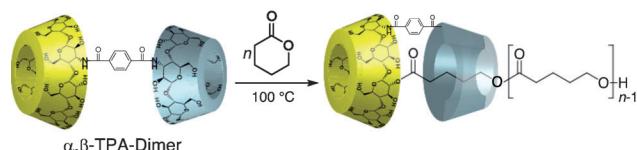


Abbildung 6. Prozessive Polymerisation von δ -Valerolacton durch einen Klammerkatalysator. Die Klammer (stahlblau, α -Cyclodextrin) ist über eine Terephthalimid-Brücke an das aktive Zentrum geknüpft (gelb, β -CD). Wiedergabe mit Genehmigung aus Lit. [26].

umschließt die Polymerkette als gleitende Klammer und erhält so den Kontakt zwischen wachsender Kette und Katalysator aufrecht. Dieser künstliche Klammerkatalysator erreichte Umsätze bis 95 % und lieferte Polylactone mit M_n bis 16 500. Die Brückenlänge erwies sich als wichtiger Parameter: Kurze Brücken erschwerten die Monomererkennung durch das aktive CD, während lange Brücken das Anklammern des als Prozessivitätsfaktor wirkenden CD an die wachsende Polymerkette erschwerten. Die optimale Brückenlänge betrug etwa 7 Å, was einer Terephthalsäure-Einheit entspricht.

Die Autoren bewiesen die postulierte Wirkungsweise durch Zusatz von Adamantan als Inhibitor. Das hoch affine Adamantan wurde in das aktive β -CD eingeschlossen, wodurch die Polymerisation zum Erliegen kam. Interessanter war die Untersuchung des Prozessivitätsfaktors (das nicht-katalytische α -CD). Weil die wachsende Kette an eine Hydroxygruppe von β -CD bindet, konnte ein Klammerkatalysator isoliert werden, der ein kurzes Oligomer trug. Zweidimensionale ROESY-NMR-Experimente belegten, dass die wachsende Kette durch das α -CD gefädelt war. Ein neuerlicher Start der Polymerisation ausgehend von diesem Komplex führte zu Umsätzen von 95 %. Wurde das Oligomer aber – durch Auflösen des Komplexes in DMSO – vom α -CD abgefädelt, so ergaben Versuche, die Polymerisation aufs Neue zu starten, Umsätze von maximal 3,5 %. Die Beobachtung,

dass der Zustand des Oligomers – eingefädelt oder nicht – die Effizienz der Katalyse in diesem Maß beeinflusst, belegt elegant die Prozessivität des künstlichen Klammerkatalysators.^[26] Dieses Konzept erinnert an DNA-Polymerasen, die ein Enzym mit einem separaten, eigens für diese Aufgabe bestimmten Prozessivitätsfaktor kombinieren können, der das Substrat vollständig umschließt.^[7]

Das letzte hier besprochene Ringsystem wurde 2013 von Leighs Gruppe vorgestellt.^[27] Ihr Rotaxan besteht aus einem Makrocyclus mit einem reaktiven Arm und einer Templat-Achse mit in vorgegebener Sequenz über schwache Phenol-estergruppen angebundenen Aminosäuren (Abbildung 7).

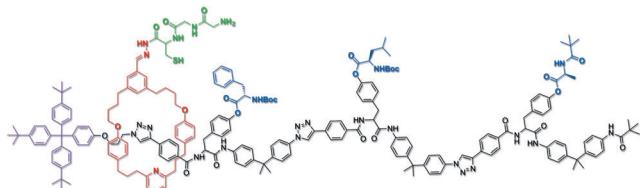


Abbildung 7. Ein prozessiver Rotaxan-Katalysator bahnt sich seinen Gleitweg, indem er labil angeknüpfte Aminosäuren auf ein wachsendes Oligopeptid überträgt.^[27] Gleitender Makrocyclus (rot), aktives Zentrum (grün), Achse (schwarz), Stopper (magenta), Aminosäurereste (blau).

Der Makrocyclus wird durch eine große Endgruppe auf einer und die Aminosäuren auf der anderen Seite auf der Achse fixiert. Mit seinem reaktiven Thiolarm kann er die Aminosäuren der Achse aufheben und an ein wachsendes Peptid anfügen, um dieses in prozessiver Manier sequenziell um bis zu drei Reste verlängern. Vor kurzem wurde eine verbesserte Synthese eines solchen funktionellen Rotaxans beschrieben,^[28] das nunmehr auch einen vierten Rest anfügen kann. Eine der wichtigsten Verbesserungen beruhte darauf, dass der Makrocyclus in der ursprünglichen Synthese durch Konjugieren des gesamten sequenztragenden Templatzs fixiert wurde. Im kniffligen Einfädelschritt wurden somit vergleichsweise teure Reaktanten eingesetzt. Bei der verbesserten Synthese wurde der Makrocyclus schon im Vorfeld auf ein kürzeres Templat aufgefädelt, das nur die erste Aminosäure als Stopper trug. Die übrige Sequenz wurde nachträglich angefügt, als sich der Makrocyclus bereits an seinem Platz befand.

Diese Peptidsynthesemaschine erinnert entfernt an das Ribosom. Bezuglich ihrer Prozessivität ist sie aber der λ -Exonuclease ähnlicher (Abbildung 1).^[6] Wie diese ist sie mechanisch mit ihrem Templat verknüpft und kann ihren Weg erst fortsetzen, nachdem ein Rest katalytisch umgesetzt wurde, der anderenfalls ihren Fortschritt blockieren würde. Diese niedermolekulare Maschine kombiniert somit zwei Strategien der Natur.

3.2. Nicht gebundene Katalysatoren

Wie zuvor beschrieben, können distributive Enzyme durch Assoziation mit Prozessivitätsfaktoren prozessiv wer-

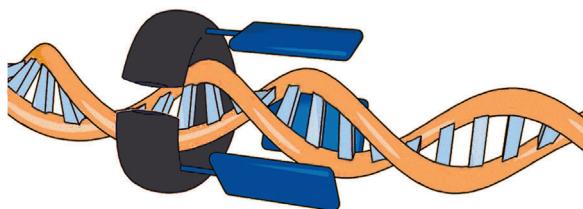
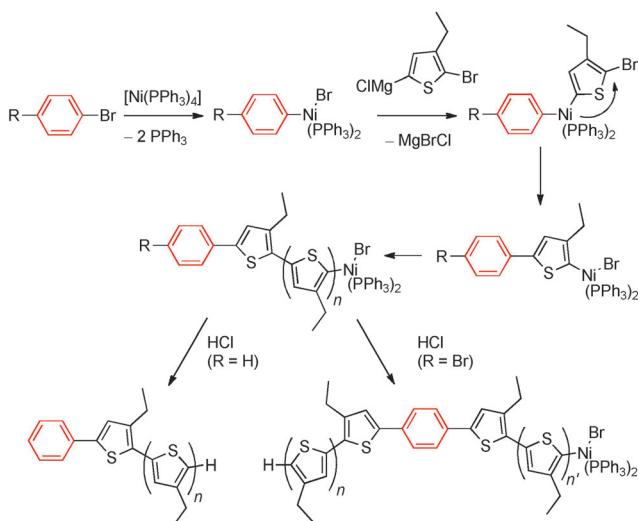


Abbildung 8. Das ungezielt an DNA gebundene Klammerprotein des T4-Bakteriophagen (schwarz). Die Klammer ist ein Trimer; jedes Monomer ist mit einem Mangantritypyridylporphyrin (blau) konjugiert, das die DNA an Positionen mit AAA-Sequenz einkerbkt. Die natürliche Prozessivität der Klammer-DNA-Wechselwirkung wird dabei auf den andernfalls distributiven Porphyrinkatalysator übertragen.^[29]

den. Van Dongen und Clerx et al. nutzten dies in einem künstlichen DNA-Einkerbungskatalysator, indem sie ein Mangantritypyridylporphyrin an das schon vorgestellte T4-Klammerprotein konjugierten (Abbildung 8).^[29] Der resultierende Hybridekatalysator verhielt sich – abgesehen vom Katalysevermögen – gerade so wie die natürliche Klammer: Ladeproteine setzen die Klammer aktiv an bestimmten Positionen auf DNA, und er konnte entlang der DNA gleiten. Das konjugierte Porphyrin interkaliert in die DNA und kerbt diese an AAA-Sequenzen ein; durch die gleitende Klammer wirkt es als prozessiver Katalysator. In seinem ungezielten Gleiten auf der Suche nach potenziellen reaktiven Positionen ähnelt der Klammerkatalysator stark der BamHI-Endonuklease.^[16] Die Reaktion des angeknüpften Katalysators wird aber nicht durch eine Konformationsänderung des Proteins ausgelöst, sondern durch Interkalation in eine AAA-Sequenz, also durch eine gezielte Bindung. Nach erfolgtem Einkerbken des Rückgrats kann der Katalysator frei weitergleiten.

Die verwendete T4-Klammer rekrutiert in ihrer natürlichen Funktion ihre Polymerase, indem sie deren C-Ende an die Grenzfläche ihrer offenen Untereinheit dockt (siehe Abschnitt 2.1). Dieses Andocken stabilisiert den Komplex der Klammer mit der DNA. Der Versuch, diesen Prozess mithilfe eines Peptidanalogons des Polymeraseendes nachzuahmen, führte zum entgegengesetzten Resultat: Das Peptid schloss zwar die Lücke, doch tat es dies bereits, während die Klammer noch in Lösung war. So entstand ein geschlossener Proteinring, der nicht mehr auf die DNA geladen werden konnte. Der Klammerkatalysator wirkte somit nur noch distributiv.^[29] Die gewünschte Stabilisierung des Klammer-DNA-Komplexes wurde zwar nicht erreicht, das beobachtete Schalten zwischen prozessivem und distributivem Katalysemodus ist aber bemerkenswert.

Nach diesem Beispiel, in dem ein künstlicher Katalysator an ein ansonsten natürliches System angesetzt wurde, kommen wir jetzt zu einem rein künstlichen System. Verschiedene Polymerisationen nutzen Kondensationskatalysatoren, die während der Polymerisation mit der Kette verbunden bleiben. Dieser Aspekt war unerforscht, bis die Gruppe von Kiriy über die Prozessivität eines Nickelkatalysators berichtete,^[30] mit dessen Hilfe 3-Alkylthiophene durch Katalysatortransfer-Kumada-Polykondensation polymerisiert wurden. Der Kettenfortpflanzungsmechanismus umfasst Transmetallierung,



Schema 1. Eine prozessive Kumada-Polykondensation durch einen Nickel(0)-Katalysator. Nach der Kondensation der Thiophenemonomere nach einer Seite des 1,4-Dibrombenzol-Initiators kann der Katalysator über die Polymerkette gleiten und auch auf der anderen Seite Monomere anfügen.^[31]

reduktive Eliminierung und oxidative Addition (Schema 1). Der Nickelkatalysator kann als prozessiv bezeichnet werden, denn er wird zwar zwischen den Katalysezyklen eliminiert, aber er dissoziert weder von der Kette, noch reagiert er mit anderen Monomeren. Statt dessen addiert er oxidativ eine C-Br-Bindung derselben Kette. Diese Prozessivität gab sich zuerst in folgendem Experiment zu erkennen: Durch Eintauchen einer Oberfläche in eine Monomerlösung wurden Polymerbürsten an immobilisierten Katalysatoren erzeugt. Die Polymerisation der Bürsten verlief wie geplant, und es gab keine Hinweise auf gelöste Polymere. Daraus kann man schließen, dass alle Nickelkatalysatoren mit der Oberfläche assoziiert bleiben und die an ihnen wachsenden Ketten nicht verlassen, obwohl diese Möglichkeit bestünde.

Einen sichereren Beweis, und eine Demonstration dieses minimalistischen Katalysatorgleitens, lieferten später Tka-chov und Mitarbeiter.^[31] Da der Nickelkatalysator sich über jedes einzelne Monomer bewegen muss, das er an die wachsende Kette anfügt, nutzten sie einen Initiator mit einem p-Bromphenyl-Ring anstelle des Phenylrings, an dem Polymere ausgehend von beiden halogenierten Positionen wachsen konnten (Schema 1). Wurde der Polymerisationsgrad (D_p) sehr niedrig gehalten, so befand sich dieser Bromphenylring am Kettenende, ebenso wie der gewöhnliche Phenylring. Mit zunehmendem D_p rückte dieser Ring immer häufiger in das Innere der Polymerkette; Polythiophen wuchs also ausgehend von beiden halogenierten Positionen. Da kein intermolekularer Katalysatortransfer stattfindet, muss der Nickelkatalysator am Polymer entlang gleiten, um die Polymerisation am entgegengesetzten Ende auszulösen.^[31]

Stojanovics Gruppe liefert unser letztes Beispiel für einen künstlichen prozessiven Katalysator, der wiederum einen anderen Typ darstellt.^[32] Sie erhielten einen sternförmigen Katalysator, indem sie mehrere DNA-Oligomere an ein zentrales Protein kuppelten. Jedes Oligomer war ein kurzes

Desoxyribozym, das mit bestimmten komplementären kürzeren Ketten hybridisieren konnte. Diese Erkennungsstellen wurden durch die Ribozymaktivität des „Beins“ dann gespalten. Der vierbeinige Katalysator band multivalent an eine dreidimensionale Matrix, die mit solchen Substraten überzogen war. Seine Diffusion verlief wie folgt: Jedes Bein war durch Substrathyridisierung an die Matrix gebunden, doch die Affinität sank nach Spaltung des Substrats drastisch, und das entsprechende Bein bewegte sich zu einem intakten Substrat. So konnten die einzelnen Beine ihre Schritte ausführen, ohne dass der Katalysator als Ganzes von der Matrix dissoziierte. Statt dessen durchschritt er die Matrix, wobei er die Substrate entlang seines Wegs spaltete. Um diesen Mechanismus zu bestätigen, wurde das System einem Flüssigkeitsstrom ausgesetzt: Monovalente Beine wurden rasch von der Matrix gelöst, während mehrbeinige Konstrukte sich dort hielten und weiterhin aktiv blieben. Dieses prozessive Konstrukt erinnert grundsätzlich an eine Phospholipase, die über eine Membran diffundiert und dabei Substrate spaltet, auch wenn der Reaktionsmechanismus gänzlich verschieden ist.^[20]

Die Forscher untersuchten ferner den Einfluss der Beinlänge auf die Dissoziation. Erwartungsgemäß ergaben längere Beine fester gebundene Katalysatoren, deren Umsatz allerdings niedriger war, weil neue Substrate weniger schnell mit dem Katalysator assoziierten. Dadurch diffundiert auch der Katalysator langsamer, was den Effekt noch verstärkt. Ein erfolgreicher Ansatz war das Anfügen weiterer Beine: Sechsbeinige Moleküle waren in gleichem Maße katalytisch aktiv, sie wurden aber weniger leicht vom Substrat fortgespült.^[32]

4. Ausblick: Fortschritte der Prozessivität

Prozessivität ohne Katalyse ist zwar nicht das Thema dieses Kurzaufsatzen, einige Informationen über die chemische Nachahmung der Bewegung von Motorproteinen könnten aber von Interesse für die Leser sein. Neben anderen hat die Gruppe von Seeman die DNA-Origami-Technik genutzt, um einen zweibeinigen Läufer zu entwickeln, der einen wohlorganisierten DNA-Weg beschreitet.^[33] Von Delius et al. wählten einen chemischeren Ansatz zu solchen Läufern:^[34] Ihr 21-atomiges zweibeiniges Molekül ging auf einem molekularen Weg mit vier Schritten hin und her. Jeder Fuß war entweder säure- oder baselabil. Diese Differenzierung ermöglichte separate Schritte: Ausgelöst durch den Bruch einer kovalenten Bindung setzte eine Bewegung zur nächsten verfügbaren reaktiven Position ein, um dort zu binden. Wechselwirkungen zwischen Fuß und Weg beruhten entweder auf Hydrazon-Aldehyd-Umwandlungen oder auf Disulfidbrücken. Ein Folgemodell nutzte Metallionen als Füße und eine Umkomplexierung als Triebkraft des Schreitens.^[35] Ein thermodynamisches Minimum leitete die Schritte anderer Zufallsläufer.^[36]

Auch sequenzielle Prozesse verdienen Beachtung. Das einzige künstliche prozessive System, für das die Abfolge der katalytischen Ereignisse belegt ist, ist die Peptid-Synthesemaschine von Leigh und Mitarbeitern.^[27] Viele natürliche prozessive Systeme arbeiten sequenziell – ansonsten könnte

beispielsweise die DNA-Polymerisation keine Information replizieren. Dadurch sind Templatprozesse interessant für die prozessive Katalyse. Ein Beispiel stammt aus der Gruppe von O'Reilly.^[37] Sie beschrieben die Polymerization von Vinylmonomeren mit anhängenden Nucleobasen, bei der komplementäre Polymere als Templat wirkten. Die Tochterpolymere wurden dabei mit extrem geringer Polydispersität (≤ 1.08) gebildet. Hier wurde einzig Information bezüglich der Polymerlänge übertragen, und nicht bezüglich der Anordnung der Nucleobasen, dennoch ist das Ergebnis beachtenswert – nicht nur, weil eine verbesserte Kontrolle der Monomersequenz einen Informationstransfer ermöglichen könnte, sondern auch weil sich dadurch eine Möglichkeit auftäte, verschiedene makroskopische Eigenschaften zu beeinflussen. Leitfähigkeit, Elastizität, Steifigkeit und biologische Abbaubarkeit hängen von der Monomersequenz ab, insbesondere, wenn Wasser das Lösungsmittel ist. Eine ausführliche Diskussion zur sequenziellen Polymerisation geben Lutz et al.^[38] Das volle Potenzial einer effizienten sequenziellen Katalyse ist nicht abzusehen, aber eines scheint sicher: Die Kombination von Templatisierung und Prozessivität könnte zu spektakulären Ergebnissen führen.

Prozessive Katalyse und Prozessivität im Allgemeinen sind wichtige Prinzipien der Natur. Wie wir gezeigt haben, befindet sich ihre chemische Nachahmung noch weitgehend in der konzeptuellen Phase. Wenn weitere Fortschritte folgen, wird die Prozessivität, die heute noch ein Forschungsziel an sich darstellt, aber eine Alternative beim Entwurf von Katalysatoren bieten können. Synthese, Modifizierung und Abbau von Polymeren wären in viel effizienterer Weise möglich, und viele Teilgebiete der Chemie könnten profitieren.

Eingegangen am 30. April 2014

Online veröffentlicht am 22. September 2014

Übersetzt von Dr. Volker Jacob, Hirschberg an der Bergstraße

- [1] W. A. Breyer, B. W. Matthews, *Protein Sci.* **2001**, *10*, 1699–1711.
- [2] S. F. M. van Dongen, S. Cantekin, J. A. A. W. Elemans, A. E. Rowan, R. J. M. Nolte, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 99–122.
- [3] A. Coskun, M. Banaszak, R. D. Astumian, J. F. Stoddart, B. A. Grzybowski, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 19–30.
- [4] C. Veigel, C. F. Schmidt, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2011**, *12*, 163–176.
- [5] J. Frank, R. L. Gonzalez, *Annu. Rev. Biochem.* **2010**, *79*, 381–412.
- [6] R. Kovall, B. W. Matthews, *Science* **1997**, *277*, 1824–1827.
- [7] J. Yang, Z. Zhuang, R. M. Roccasecca, M. A. Trakselis, S. J. Benkovic, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 8289–8294.
- [8] R. J. Bauer, I. D. Wolff, X. Zuo, H. K. Lin, M. A. Trakselis, *J. Mol. Biol.* **2013**, *425*, 4820–4836.
- [9] I. Dionne, R. K. Nookala, S. P. Jackson, A. J. Doherty, S. D. Bell, *Mol. Cell* **2003**, *11*, 275–282.
- [10] A. M. W. Thunnissen, H. J. Rozeboom, K. H. Kalk, B. W. Dijkstra, *Biochemistry* **1995**, *34*, 12729–12737.
- [11] N. Q. Tran, S. J. Lee, B. Akabayov, D. E. Johnson, C. C. Richardson, *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 39732–39741.
- [12] A. Chakraborty, D. Wang, Y. W. Ebright, Y. Korlann, E. Kortkhonja, T. Kim, S. Chowdhury, S. Wigneshweraraj, H. Irschik, R. Jansen, B. T. Nixon, J. Knight, S. Weiss, R. H. Ebright, *Science* **2012**, *337*, 591–595.
- [13] Z. Hu, S. K. Perumal, H. Yue, S. J. Benkovic, *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 38442–38448.
- [14] M. Sørlie, H. Zakariassen, A. L. Norberg, V. G. H. Eijsink, *Biocatal. Biotransform.* **2012**, *30*, 353–365.
- [15] J. E. Meyer, G. E. Schulz, *Protein Sci.* **1997**, *6*, 1084–1091.
- [16] H. Viadiu, A. K. Aggarwal, *Mol. Cell* **2000**, *5*, 889–895.
- [17] N. Shimamoto, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 15293–15296.
- [18] M. A. Surby, N. O. Reich, *Biochemistry* **1996**, *35*, 2201–2208.
- [19] M. Hedglin, P. J. O'Brien, *ACS Chem. Biol.* **2010**, *5*, 427–436.
- [20] F. Ramirez, M. K. Jain, *Proteins Struct. Funct. Bioinf.* **1991**, *9*, 229–239.
- [21] M. A. Rishavy, K. L. Berkner, *Adv. Nutr.* **2012**, *3*, 135–148.
- [22] T. Imai, T. Yamazaki, S. Kominami, *Biochemistry* **1998**, *37*, 8097–8104.
- [23] F. P. Guengerich, C. D. Sohl, G. Chowdhury, *Arch. Biochem. Biophys.* **2011**, *507*, 126–134.
- [24] C. Monnereau, P. H. Ramos, A. B. C. Deutman, J. A. A. W. Elemans, R. J. M. Nolte, A. E. Rowan, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 1529–1531.
- [25] A. B. C. Deutman, C. Monnereau, J. A. A. W. Elemans, G. Ercoleani, R. J. M. Nolte, A. E. Rowan, *Science* **2008**, *322*, 1668–1671.
- [26] Y. Takashima, M. Osaki, Y. Ishimaru, H. Yamaguchi, A. Harada, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 7666–7670; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 7524–7528.
- [27] B. Lewandowski, G. De Bo, J. W. Ward, M. Papmeyer, S. Kuschel, M. J. Aldeguende, P. M. E. Gramlich, D. Heckmann, S. M. Goldup, D. M. D'Souza, A. E. Fernandes, D. A. Leigh, *Science* **2013**, *339*, 189–193.
- [28] G. De Bo, S. Kuschel, D. A. Leigh, B. Lewandowski, M. Papmeyer, J. W. Ward, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 5811–5814.
- [29] S. F. M. van Dongen, J. Clerx, K. Nørgaard, T. G. Bloemberg, J. J. L. Cornelissen, M. A. Trakselis, S. W. Nelson, S. J. Benkovic, A. E. Rowan, R. J. M. Nolte, *Nat. Chem.* **2013**, *5*, 945–951.
- [30] V. Senkovskyy, N. Khanduyeva, H. Komber, U. Oertel, M. Stamm, D. Kuckling, A. Kiriy, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 6626–6632.
- [31] R. Tkachov, V. Senkovskyy, H. Komber, J. U. Sommer, A. Kiriy, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 7803–7810.
- [32] R. Pei, S. K. Taylor, D. Stefanovic, S. Rudchenko, T. E. Mitchell, M. N. Stojanovic, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 12693–12699.
- [33] T. Omabegho, R. Sha, N. C. Seeman, *Science* **2009**, *324*, 67–71.
- [34] M. von Delius, E. M. Geertsema, D. A. Leigh, *Nat. Chem.* **2010**, *2*, 96–101.
- [35] J. E. Beves, V. Blanco, B. A. Blight, R. Carrillo, D. M. D'Souza, D. Howgego, D. A. Leigh, A. M. Z. Slawin, M. D. Symes, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 2094–2100.
- [36] A. G. Campaña, D. A. Leigh, U. Lewandowska, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 8639–8645.
- [37] R. McHale, J. P. Patterson, P. B. Zetterlund, R. K. O'Reilly, *Nat. Chem.* **2012**, *4*, 491–497.
- [38] J. F. Lutz, M. Ouchi, D. R. Liu, M. Sawamoto, *Science* **2013**, *341*, 1238149.