# Andreas Plückthun

# Wege zu neuen Enzymen: Protein Engineering und Katalytische Antikörper

Bevor die zahlreichen und noch lange nicht alle überwundenen Probleme auf den Wegen zu neuen Enzymen diskutiert werden, erläutert der Autor, wie ein Enzym funktioniert, genauer: welche Faktoren – denn es sind viele – dafür verantwortlich sind, daß eine enzymatische Reaktion im Extremfall um ca. 20 Zehnerpotenzen schneller abläuft als eine unkatalysierte Reaktion.

Einer der langgehegten Träume der Chemiker ist es, für jede schwierige synthetische Reaktion ein passendes Enzym zur Verfügung zu haben. Dieser Traum ist so alt wie das Wissen über Enzyme und ihre erstaunlichen Fähigkeiten. Bereits der zweite Chemie-Nobelpreisträger, Emil Fischer, zeigte in seinem Nobelpreisvortrag im Jahre 1902 [1] großen Weitblick:

"... wollen wir hier die Natur erreichen, so müssen wir dieselben Mittel anwenden, und ich sehe deshalb die Zeit voraus, wo die physiologische Chemie nicht allein die natürlichen Enzyme in ausgedehntem Maße als Agenzien verwendet, sondern wo sie sich auch künstliche Fermente für ihre Zwecke bereitet."

Diese Sätze sind in vieler Hinsicht bemerkenswert. Zum ersten wissen wir nicht, ob Fischer geahnt hat, daß es fast ein volles Jahrhundert Forschung auf der ganzen Welt bedurfte, um diesem Ziel näher zu kommen. Wahrscheinlich werden noch mindestens ein oder mehrere Jahrzehnte vergehen, bis es tatsächlich erreicht wird. Zum zweiten machte Fischer diese Aussage, ohne im geringsten ahnen zu können, welche Wege die Forschung einschlagen und welche Techniken sie entwickeln würde. Er konnte weder die Bedeutung der Immunologie noch die der Gentechnik vorausahnen. In der Tat ist seine Einschätzung der Möglichkeiten in Anbetracht des geringen Wissensstandes über den Aufbau und die Eigenschaften von Proteinen und Enzymen im Jahre 1902 höchst erstaunlich. Doch auch noch aus einem anderen Grunde

soll Emil Fischer an den Anfang dieses Artikels gestellt werden: Für ihn waren Arbeiten auf dem Grenzgebiet zwischen Biologie und Chemie völlig selbstverständlich. Seine Nachfolger, besonders in Deutschland, sahen und sehen chemische Forschung oft viel puristischer und demgemäß ohne diesen Weitblick. In einer Diskussion über die Bedeutung der Biochemie in der Chemie sollte man häufiger einen Blick auf das wissenschaftliche Werk Fischers werfen.

# Wie funktionieren Enzyme?

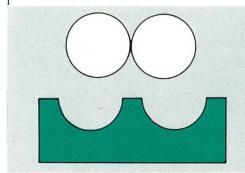
Bei Überlegungen, wie man künstliche Enzyme herstellen könnte, muß man sich zunächst damit auseinandersetzen, wie Enzyme überhaupt funktionieren [2]. Auch diese Betrachtung wollen wir mit Emil Fischer beginnen. Bei seinen Untersuchungen von Enzymen, die Zucker umsetzen, erkannte er die extreme Spezifität vieler Enzyme. Aus diesen Arbeiten leitete er die berühmte Analogie ab, daß das Substrat zum Enzym wie der Schlüssel zum Schloß paßt [3]. Das ist eine sehr wichtige Erkenntnis, die auch heute noch ein gutes Bild für die Substratspezifität abgibt. Viele Röntgenstrukturanalysen von Enzym-Substrat-Komplexen haben die Korrektheit dieses Bildes unmittelbar bestätigt.

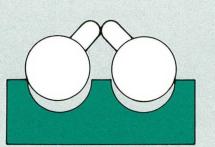
Dieses Bild erklärt allerdings überhaupt nicht, warum ein Enzym irgendeinen chemischen Umsatz bewirken sollte. Im Gegenteil: Ein Enzym, das ein Substrat wirklich perfekt binden würde, sollte es auch dabei belassen. Das Substrat wäre an jeglicher Reaktion gehindert. Ein verfeinerter Vorschlag für das Schlüssel-Schloß-Prinzip, der einen Ausweg aus diesem Dilemma bringt (Abbildung 1), wurde 1930 zum ersten Mal von J. B. S. Haldane formuliert [4]. Danach "paßt der Schlüssel nicht perfekt ins Schloß, sondern das Schloß übt eine gewisse Spannung aus". Wir können das heute besser formulieren mit einem Bild der damals ebenfalls neu aufkommenden Theorie der chemischen Reaktionskinetik, der sogenannten Übergangszu-

stands-Theorie [5, 6]. Der Übergangszustand einer chemischen Reaktion ist zunächst eine Modellvorstellung von einer vorübergehend (transient) existierenden Struktur, die zwischen dem Produkt und dem Reaktanden liegt. Diese Struktur entspricht der Paßhöhe auf dem energetisch günstigsten Reaktionspfad. Man kann nun argumentieren, daß eine Senkung der Energie dieses Übergangszustands natürlich dasselbe ist, wie die Beschleunigung der Reaktion [7]. In der Übergangszustands-Theorie behandelt man den Übergangszustand, als ob er eine stabile Verbindung wäre, formuliert Gleichgewichte mit ihm und führt sogar Rechnungen an ihm aus. Obwohl der Übergangszustand eigentlich nur ein Denkmodell ist, hat sich diese Betrachtungsweise als sehr fruchtbar erwiesen

Haldane meinte also, wenn auch mit anderen Worten, ein Enzym täte besser daran, nicht das Substrat, sondern den Übergangszustand perfekt zu binden, um ihn damit zu stabilisieren. Eine detailliertere Diskussion über die Zusammenhänge lieferte dann 1946 ein anderer Großer der Chemie (der sich übrigens ebenfalls nie um enge Definitionen seines Faches kümmerte): Linus Pauling [8]. Er ging noch einen Schritt weiter und postulierte: Wenn Enzyme den Übergangszustand wirklich besser binden als das Substrat, sollte das auch für solche Verbindungen zutreffen, die dem Übergangszustand ähnlich sind. Diese bezeichnet man als "Übergangszustands-Analoga" [9].

Viel ist darüber diskutiert worden, ob diese Benennung angemessen ist oder ob es nicht besser "Intermediat-Analoga" heißen sollte. Dieser Unterschied ist zwar physikalisch fundamental, aber in der Praxis nur ein semantischer. Nach dem Postulat von G. S. Hammond [10] ist nämlich ein Übergangszustand einem instabilen Intermediat, das sich auf dem Reaktionsweg unmittelbar davor oder dahinter befindet, nicht nur energetisch, sondern auch strukturell ähnlich (Abbildung 2).





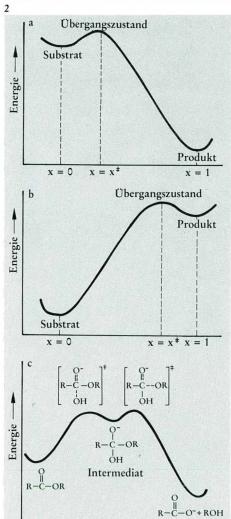


Abb. 1. Haldanes Bild der Enzymkatalyse. Das Enzym paßt weder perfekt zum Substrat noch zum Produkt, sondern zu einem Zustand dazwischen. Dadurch übt das Enzym auf das Substrat (links) und das Produkt (recht) eine gewisse Spannung aus.

Abb. 2. a) Hammonds Postulat:Bei einer exergonischen (energieliefernden) Reaktion wird der Übergangszustand auf der Reaktionskoordinate "früh" erreicht, d.h. der Übergangszustand ähnelt strukturell und energetisch dem Substrat. b) Bei einer endergonischen (energieverbrauchenden) Reaktion ist es umgekehrt: Der Übergangszustand kommt "spät" auf der Reaktionskoordinate, und er ähnelt energetisch und strukturell dem Produkt. c) Hat eine Reaktion eine instabile Zwischenstufe (Intermediat), so sind die Übergangszustände dieser ähnlicher als dem Substrat oder dem Produkt. Unser Beispiel ist eine stark vereinfachte Darstellung einer Ester-Hydrolyse. Die wirkliche Situation ist weitaus komplizierter, da hier keine Protonen-Übertragungen berücksichtigt wurden.

Die Strukturunterschiede sind sicher so klein, daß kein aktives Zentrum eines Enzyms ein Intermediat von dem benachbarten Übergangszustand unterscheiden könnte. Wir benutzen also den Begriff Übergangszustand-Analoga vor allem, weil sich die englische Variante ("transition state analog") eingebürgert hat. Nach diesem Enzymmodell sollte eine solche Verbindung also besser an das Enzym binden als das Substrat. Dies ist in der Tat bei einer ganzen Reihe von Reaktionen und Sub-

Reaktionskoordinate

straten gefunden worden [9] (Abbildung 3), wodurch dieses Modell gestützt wird.

Wir wollen jetzt genauer diskutieren, warum eine Reaktion im aktiven Zentrum eines Enzyms überhaupt schneller abläuft, als im Lösungsmittel. Eine der wichtigen Erkenntnisse der letzten Jahrzehnte ist, daß dafür nicht nur ein Faktor allein verantwortlich ist. Vielmehr scheint sich die enorm erhöhte Geschwindigkeit einer enzymatischen Reaktion aus klei-

neren Beiträgen einzelner Faktoren zusammenzusetzen, die bei verschiedenen Enzymen jeweils unterschiedliche Bedeutung haben und verschieden große Beiträge liefern können [2]. Die einzelnen Faktoren sollen nun vorgestellt werden.

#### Kovalente Katalyse

Die Reaktion im Enzym folgt bei kovalenter Katalyse nicht dem gleichen Mechanismus wie die Reaktion in Lösung. Zum Beispiel können am Enzym kovalente Intermediate entstehen, die aus chemischen oder entropischen Gründen (s. unten) besonders reaktiv sind. Abbildung 4 zeigt dafür zwei Beispiele. Diese Art von Katalyse ist natürlich ein etwas "unfairer" Vergleich zwischen Enzym und Lösung und soll deshalb nicht im Detail ausgeführt werden. Selbstverständlich hat der Chemiker ebenfalls die Möglichkeit, einen kinetisch schwierigen Schritt durch eine Serie von einfacheren zu ersetzen. Auch können sich natürlich weder Enzym noch Chemiker über die Thermodynamik hinwegsetzen. Endergonische Reaktionen müsen in beiden Fällen mit exergonischen Prozessen gekoppelt werden. Bei dem "Engineering" eines Enzyms (z. B. nach einer der weiter unten diskutierten Methoden) muß man also auf jeden Fall darauf achten, daß der beabsichtigte chemische Weg vernünftig ist und daß man möglicherweise zusätzliche chemische Schritte einführen muß.

# Allgemeine Säure/Basen- und Metallionen-Katalyse

Das Enzym kann durch die perfekte Positionierung einer Säure- oder Basengruppe oder eines Metall-Ions (Lewis-Säure) eine chemische Bindung stark polarisieren und sie damit sehr reaktiv machen. Betrachten wir den konkreten Fall einer enzymatischen Säure-Katalyse: Der erste entscheidende Unterschied zur Chemie in Lösung ist, daß diese Säure-Katalyse im Enzym selektiv an einer Stelle im aktiven Zentrum stattfindet, während in 1-molarer Salzsäure alle entsprechend reaktiven Gruppen gleichermaßen angegriffen werden. Der zweite Unterschied ist die hohe lokale Konzentration der Aminosäure-Seitenkette, die im Enzym als Säure fungiert. Diese hohe effektive Konzentration kommt dadurch zustande, daß das Substrat im aktiven Zentrum festgehalten wird (vgl. unten "Entropie-Effekte und geometrische Effekte"). Zudem sind Abstand und Winkel einer protonen-übetragenden Gruppe für die

Reaktion oft optimal. Damit das Substrat bei derselben Reaktion in Lösung eine ähnlich hohe Wahrscheinlichkeit hat, ein Proton zu treffen wie im aktiven Zentrum des Enzyms, müßte die Säure-Konzentration so hoch sein, daß es zu unbeabsichtigten Nebenreaktionen käme.

Durch lokale elektrostatische Effekte im Protein können einzelne Aminosäuren extreme pK<sub>a</sub>-Werte annehmen. Aus diesem Grund (und da das aktive Zentrum, wenn Substrat vorhanden ist, nicht unbedingt mit dem Wasser in der Umgebung in Kontakt stehen muß) können Protonen-Übertragungen, die dem Chemiker auf den ersten Blick eher überraschend erscheinen [2, 11] (Abbildung 5), glatt ablaufen.

Die kinetischen Gesetzmäßigkeiten, die für jede Protonenübertragung zwischen zwei Gruppen mit bekanntem pK<sub>a</sub>-Wert gültig sind, wurden von M. Eigen beschrieben [12] und sie gelten natürlich auch für Enzyme.

# Das Enzym als "Super-Lösungsmittel"

Nicht immer sind die Substrate selbst reaktionsträge. Es kann auch sein, daß die starke Hydrathülle, die sich um ein geladenes Teilchen ausbildet, dessen Nucleophilie merklich herabsetzt. In diesem Fall kann das Enzym allein dadurch die Reaktion erleichtern, daß das Substrat bei der Bindung an das aktive Zentrum "umsolvatisiert" [13] wird, also einige Wassermoleküle durch Atome des Proteins ersetzt werden. Durch die Entfernung der Hydrathülle zwischen zwei Reaktanden können Substrate im aktiven Zentrum eine erhöhte Aktivität zeigen [2]. Ein aktives Zentrum wird außerdem oft auch die elektronische Verteilung im Substrat an der gewünschten Stelle verändern.

## Entropie-Effekte und geometrische Effekte

Eine erhebliche Reaktionsbeschleunigung für bimolekulare Reaktionen wird allein dadurch erreicht, daß sich die Partner nicht erst in einer vedünnten Lösung treffen müssen, sondern im aktiven Zentrum bereits im richtigen Abstand und unter dem richtigen Winkel gebunden werden. Man weiß z. B. aus eleganten Untersuchungen über die Bildung von Additionsverbindungen mit Carbonylverbindungen, daß der Angriff des Nucleophils nur innerhalb eines bestimmten kegelförmigen Volumens stattfinden kann [14]. Durch zahllose kinetische Messungen in organischen Mo-

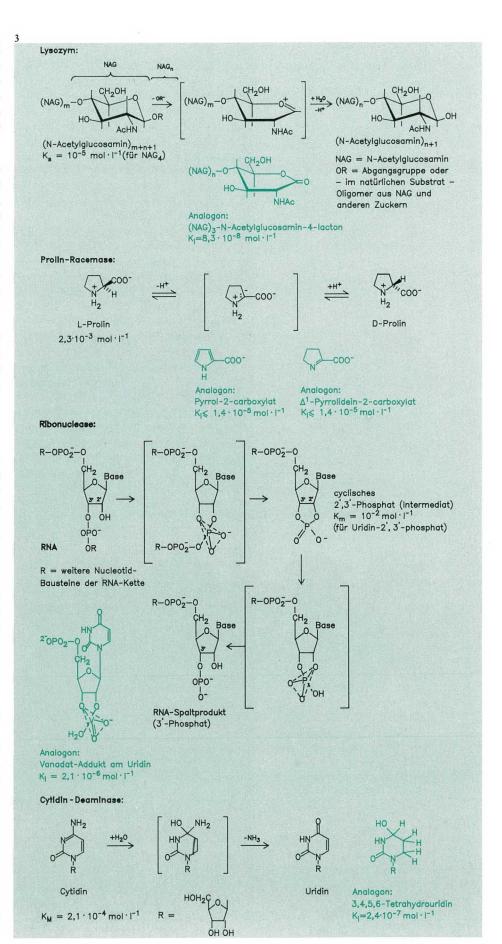
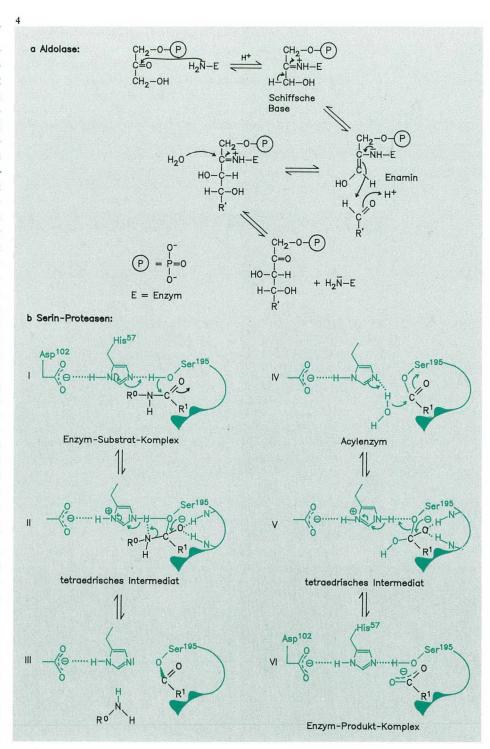


Abb. 3. Beispiele für Übergangszustands-Analoga. Die an den Reaktionen beteiligten Seitenketten der Enzyme sind nicht dargestellt. Die Reaktionsgleichungen wurden vereinfacht (z. B. wurden alle Protonen-Übertragungen weggelassen) und zeigen nicht alle Elementarschritte. Hervorgehoben werden jeweils ein wichtiges Intermediat (oder ein wichtiger Übergangszustand) und die strukturelle Ähnlichkeit mit dem betreffenden Übergangszustands-Analogon. Die Zahlenwerte stammen aus Lit. [9], wo man auch die Originalliteratur sowie viele weitere Beispiele findet. Nicht in allen Fällen sind echte Dissoziationskonstanten Ks der Substrate bekannt. Der KM-Wert - d. h. der Wert der Substratkonzentration, bei der die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht wird - muß nicht unbedingt mit der "echten" Dissoziationskonstante Ks des Substrats identisch sein [2], gibt aber normalerweise die Größenordnung der Affinität gut wieder. K. bezeichnet die Inhibitionskonstante durch den Inhibitor, das Übergangszustands-Analogon. - Der hier dargestellte Mechanismus für Lysozym hat bereits den Namen "Lysozym-Mechanismus" als Reaktionstyp für ähnliche Enzyme erhalten. Dabei ist aber kürzlich angezweifelt worden, ob Lysozym selbst überhaupt dem "Lysozym-Mechanismus" folgt [vgl. C. B. Post und M. Karplus, J. Am. Chem. Soc. 108, 1317 (1986)]. Die Tatsache, daß das halbsesselförmige Analogon das Enzym effizient hemmt, spricht allerdings für eine prominente Stellung eines derartigen Übergangszustands auf dem Reaktionspfad.

Abb. 4. Beispiele für eine kovalente Katalyse. a) Aldolase: Der Aldolkondensation ist die intermediäre Bildung einer Schiffschen Base vorgeschaltet. Die Protonen-Abstraktion zum Enamin wird dadurch erleichtert. b) Serin-Proteasen: Die Numerierung der Aminosäuren ist die aus Trypsin, aber Subtilisin (vgl. unten) folgt demselben Mechanismus. Bei der enzymatischen Reaktion – der Proteinspaltung – greift nicht Wasser an der Peptidbindung an, sondern eine Serin-OH-Gruppe unter Bildung eines kovalenten Acyl-Enzym-Intermediats, das dann in einem zweiten Schritt von Wasser hydrolysiert wird.



dellreaktionen (Abbildung 6) wurde versucht, diesen Effekt quantitativ zu erfassen [2, 15]. Die genaue Quantifizierung des Entropieverlusts durch Annäherung und "Einfrieren" von Rotations-Freiheitsgraden ist zwar immer noch umstritten, sie braucht uns aber für die folgende Diskussion auch nicht im Detail zu beschäftigen.

Nicht nur Nucleophile, sondern auch Elek-

trophile (normalerweise reaktive Gruppen in Coenzymen) oder Säure- und Basen-Gruppen sowie Metall-Ionen müssen geometrisch optimal angeordnet sein, damit die Reaktion sehr schnell ablaufen kann. Beispielsweise wurde beobachtet, daß allein beim Austausch des katalytisch wirksamen Glutamat-Rests durch den etwas kürzeren Aspartat-Rest im Enzym Triosephosphat-Isomerase der k<sub>cat</sub>-Wert um drei Zehnerpotenzen sinkt [16].

# Strukturelle Komplementarität zum Übergangszustand der Reaktion

Diese Theorie und ihr Hintergrund wurden bereits zu Beginn dieses Artikels diskutiert; hier sollen noch einmal zwei Beispiele zur Verdeutlichung angeführt werden. Die Protease Subtilisin ist eine typische Serin-Protease [2]. Ein Serin-Rest im aktiven Zentrum wird intermediär acyliert (vgl. Abbildung 4), unterstützt durch allgemeine Säure-Base-Katalyse eines Histidin-Rests sowie eines Aspartat-Rests, der das protonierte Histidin stabilisiert. Darüber hinaus ist die Struktur des aktiven Zentrums so beschaffen, daß sie komplementär zu dem an dem Serin-Rest intermediär auftretenden tetraedrischen Addukt (vgl. Abbildung 4) ist (man spricht vom "Anionen-Loch" [17]). Wandelt man nun alle drei katalytischen Reste (Ser, His und Asp) durch ortsspezifische Mutagenese in Alanin um, so ist das "Rest-Enzym" immer noch ein wirksamer Katalysator, wenn auch mit stark verminderter Effizienz [18].

Ein zweites Beispiel soll verdeutlichen, daß diese Art von Katalyse bei einigen Enzymen den Hauptbeitrag zur Reaktionsbeschleunigung liefert. Tyrosyl-t-RNA-Synthetase z. B. katalysiert im ersten Schritt die Bildung von Tyrosyl-Adenosinmonophosphat (Tyrosyl-AMP) aus Tyrosin und Adenosintriphosphat (ATP). Eine sorgfältige Untersuchung der Struktur des Enzyms und des Mechanismus durch ortsspezifische Mutagenese zeigte [19], daß keinerlei Säure-Base-Katalyse, sondern spezifische Wechselwirkungen, die nur im Übergangszustand der Reaktion zwischen Substrat und Protein wirksam sind, für die Reaktionsbeschleunigung verantwortlich sind. Enzyme, die eine komplexe Reaktion aus mehreren Einzelschritten katalysieren, müssen dabei unter Umständen ihre Konformation ändern, um für jeden der Einzelschritte die optimale Umgebung zu bieten [20].

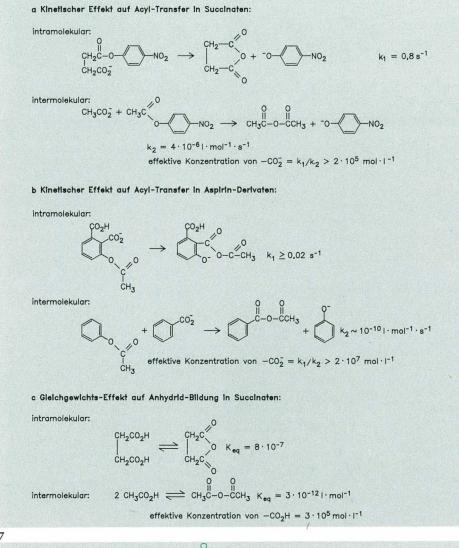
#### Verhinderung von Nebenreaktionen

Viele chemische Reaktionen verlaufen über Intermediate, die prinzipiell zu unterschiedlichen Produkten weiterreagieren können. Ein Problem für den Chemiker entsteht dann, wenn die gewünschte Reaktion nicht die bevorzugte ist. Ein Enzym kann die Richtung der Reaktion manchmal durch eine entsprechende Stereochemie des Substrats im aktiven Zentrum steuern [21] (Abbildung 7). Es wird dabei nicht unbedingt nur der gewünschte

Abb. 5. Beispiele von Protonen-Übertragungen in Enzymen. a) Reaktionsmechanismus der Triosephosphat-Isomerase: Die katalytische Base B ist die Carboxylgruppe eines Glutamat-Rests. Der pK - Wert dieser Carboxylgruppe ist im Enzym ungefähr 7, während der pKa-Wert von freiem Glutamat bei etwa 4,6 liegt. b) Schematische Darstellung des Reaktionsmechanismus der Prolin-Racemase: Der Prolin-Ring ist als schwarzer Balken "von der Seite" gezeigt. Der pK.-Wert der beiden Cystein-Reste in Prolin-Racemase liegt bei etwa 8, während der pK2-Wert des freien Cysteins bei etwa 9,1 bis 9,5 liegt. Der pK2-Wert des CHaciden Protons von Prolin in Wasser beträgt etwa 23, im Enzym dagegen etwa 17,5 (J. R. Knowles, persönl. Mitteilung). Die Racemase erniedrigt den pKa-Wert des Substrats also um ca. sechs Zehnerpotenzen!

Abb. 6. Beispiele für die Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit durch eine hohe effektive Konzentration der Nachbargruppe. Da eine Reaktion erster Ordnung (Geschwindigkeitskonstante k in s<sup>-1</sup>) mit einer Reaktion zweiter Ordnung (k in 1 · mol<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>) verglichen werden muß, gibt man den Quotienten als "effektive Konzentration" an. Eine umfangreiche Liste derartiger Phänomene findet man bei A. J. Kirby [Adv. Phys. Org. Chem. 17, 183 (1980)].

Abb. 7. Im Enzym Triosephosphat-Isomerase liegt das Substrat gestreckt vor. a) Modellstruktur des Substrats Dihydroxyacetonphosphat in der Bindungstasche. Das Endiol-Intermediat (vgl. Abbildung 5a) müßte (nach der Theorie des stereoelektronischen Effekts) vor der Eliminierung durch Torsion in eine Form übergehen, in der – wie in b) – die Bindung zum Brücken-Sauerstoff des Phosphats und die  $\pi$ -Elektronen der Doppelbindung parallel (antiperiplanar) stehen. Dies wird in der Bindungstasche anscheinend verhindert.



b OPO3- HH OOH

Schritt spezifisch katalysiert, sondern vor allem der unerwünschte verhindert.

# Enzyme haben keine Wunderkräfte

Enzyme benutzen also eine Kombination dieser Effekte. Ein künstlicher Katalysator, der sich nur einer dieser Faktoren bedient, wird in der Regel nicht die gleiche Reaktionsbeschleunigung erreichen können. Immer wieder taucht die Frage auf, ob es daneben noch ganz andere Faktoren gibt, die nur bei Enzymen vorkommen. So könnte z. B. die Flexibilität des Enzyms [22] eine besondere Bedeutung für die Effizienz der Katalyse haben [23]. Daneben werden immer wieder "unkonventionelle" Theorien postuliert, z.B. daß Enzyme thermische Energie des Lösungsmittels in gezielte Schwingungen der zu spaltenden Bindung umwandeln können [23]. Die Beweise dafür sind dünn. Wenn solche Faktoren allgemeine Bedeutung hätten, wäre es unmöglich, kleine organische Moleküle mit der katalytischen Effizienz von Enzymen zu synthetisieren [24]. Obwohl Modellenzyme mit echtem, effizienten "Turnover" (bei deren Reaktion es sich also um eine wirkliche Katalyse und nicht nur um eine stöchiometrische Reaktion handelt) sehr selten sind, gibt es doch sowohl unter den "stöchiometrischen Enzymmodellen" [25] als auch unter den wahren Katalysatoren [26] solche mit hoher Effizienz. Das bedeutet aber, daß es keine Anhaltspunkte dafür gibt, daß Enzyme mit geheimnisvollen Kräften operieren, sondern daß diese gelernt haben, mehrere effiziente Katalyse-Mechanismen (manche durchaus mit einer Konformationsänderung verbunden) zu kombinieren.

Dennoch ist es verblüffend, wie groß Enzyme im Verhältnis zu ihrem Substrat sind. Wir wissen allerdings viel zu wenig über die evolutionäre Herkunft der Proteinstrukturen sowie über den Mechanismus der Proteinfaltung [27], um abschätzen zu können, ob nicht eine gegebene Proteinstruktur schon allein dafür notwendig ist, daß die wenigen Aminosäuren des aktiven Zentrums exakt in die richtige Position gelangen. Dazu kommen natürlich zusätzliche Anforderungen durch die Regulation des Enzyms (z.B. allosterische Effekte) und Multifunktionalität [2], welche die Enzymgröße notwendigerweise erhöhen. Auch nehmen manche Autoren an, daß die Hauptkette (d. h. die durch Faltung des Polypeptid-Rückgrats erzeugten Strukturen) als solche zumindest in einigen Fällen an

der Substratbindung beteiligt sein kann. Dazu könnten z. B. die durch ganze Helices erzeugten Dipole genutzt werden [28] - und damit wäre ein Teil der notwendigen Proteinstruktur bereits festgelegt. All dies besagt aber nicht, daß ein neu konstruiertes Enzym (betrachtet man nur seine Funktion als Katalysator in vitro) so groß sein muß. Es gibt wohl durchaus unterschiedliche Anforderungen an einen optimalen Protein-Katalysator im Reagenzglas und in der Zelle [29]. Einige Enzyme haben die Reaktionsbeschleunigung so perfektioniert, daß der chemische Umsatz gar nicht mehr schneller werden kann [30]. Die gesamte Reaktion kann nämlich nicht unendlich schnell ablaufen, sondern höchstens mit der Geschwindigkeit, mit der neues Substrat durch Diffussion an das aktive Zentrum des Enzyms nachgeliefert wird (diffusionskontrollierte Reaktion). Auf einem solchen Enzym lastet kein evolutionärer Druck mehr, die Katalyse noch weiter zu verbessern: Die Diffusion des Substrats limitiert die Geschwindigkeit. Andere Enzyme arbeiten dagegen wesentlich gemächlicher, entweder weil die Synthese eines wenig gebrauchten Metaboliten nicht besonders eilt und deshalb die Evolution das Enzym nicht verbessern muß oder weil die betreffenden chemischen Reaktionen eben nicht schneller ablaufen können - auch im Enzym nicht [30, 31].

# Katalysierte Reaktion, unkatalysierte Reaktion – wie werden sie verglichen?

Bevor wir uns über Wege zu neuen Enzymen Gedanken machen, muß noch ein Punkt geklärt werden: Wie gut arbeitet ein Katalysator im Vergleich zur entsprechenden unkatalysierten Reaktion? Mit anderen Worten: Was muß eigentlich verglichen werden (Abbildung 8)? Bereits bei einer basen-katalysierten Reaktion eines einzelnen Substrats mit Wasser ist diese Frage nicht trivial. Die Reaktion des Substrats mit Wasser ist ja pseudo-erster Ordnung (da sich die Konzentration des Wassers dabei praktisch nicht ändert) und wird charakterisiert durch den Wert der Geschwindigkeitskonstante  $k_{uncat}$ , der u. a. vom pH-Wert und der Temperatur abhängt. Die Reaktion am Enzym dagegen besteht aus (mindestens) drei Schritten: der (bimolekularen) Bindung des Substrats an das Enzym, der (in diesem Beispiel nach pseudo-erster Ordnung verlaufenden) Katalyse sowie der (unimolekularen) Dissoziation des Produkts vom Enzym. Kinetisch vergleichbar ist nur der

"produktive Zerfall" des Enzym-Substrat-Komplexes (ES-Komplex) zu Enzym und Produkt - ebenfalls ein Prozeß pseudo-erster Ordnung. Diese "produktive Zerfallsgeschwindigkeit" des ES-Komplexes ist genau die Wechselzahl (engl.: turnover number, k<sub>cat</sub>), also die maximale Reaktionsgeschwindigkeit, wenn das Enzym völlig gesättigt ist (ausgedrückt in Mol Substrat pro Mol Enzym und Zeit, d.h. in der Einheit Zeit-1). In beiden Fällen muß jetzt auch (da wir ja eine basen-katalysierte Reaktion betrachten) bei gleichem pH-Wert und gleicher Temperatur gearbeitet werden. Ist das nicht möglich, weil die unkatalysierte Reaktion zu langsam ablaufen würde, muß umgerechnet werden. Dieses Vorgehen enthält die implizite Annahme eines konstanten Reaktionsmechanismus bei verschiedenen pH- oder Temperaturwerten - eine Annahme, die durchaus falsch sein kann. Das so erhaltene Verhältnis kgar/ k<sub>uncat</sub> gibt den Faktor an, um den die Reaktion im Enzym schneller abläuft.

Was ist dagegen zu tun, wenn man die Wirksamkeit eines Enzyms mit der eines niedermolekularen Katalysators C vergleichen will? In diesem Fall ist die nicht-enzymatische Reaktionsgeschwindigkeit der Konzentration von C direkt proportional, also zweiter Ordnung. Ein "fairer" Vergleich dazu ist die ebenfalls bimolekulare Reaktion zwischen Substrat und Enzym. Dem entspricht die enzymatische Reaktionsgeschwindigkeit extrapoliert auf unendliche Verdünnung des Substrats, mit der Geschwindigkeitskonstante k<sub>cat</sub>/k<sub>M</sub>, die ebenfalls zweiter Ordnung ist (Abbildung 8).

Die Reaktionsbeschleunigung durch Enzyme ist sehr unterschiedlich und kann extrem hoch sein. J. P. Guthrie schätzte ab [32], daß zwischen dem k<sub>cat</sub>-Wert der alkalischen Phosphatase und der Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung der unkatalysierten Hydrolyse von Methylphosphat unter gleichen Reaktionsbedingungen etwa 17 Größenordnungen liegen. Zwischen der Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung des Angriffs vom Wasser und der des Enzym-Nucleophils auf dieses Substrat liegen gar 21 Zehnerpotenzen! Die meisten Enzyme erreichen allerdings nicht diese gewaltigen Beschleunigungen. Außerdem sind diese Vergleiche etwas "unrealistisch", da in der Praxis fast immer eine allgemeine Säure/Basen-Katalyse durch den Puffer stattfindet, so daß die tatsächlich beobachtete "nicht-enzymatische" in Wirklichkeit keine "unkatalysierte" Reaktion ist.

Enzymatische Reaktion  $E+S \xrightarrow{k_{t_{a}}} E \cdot S \xrightarrow{k_{cat}} E+P$   $-\frac{d[S]}{dt} = [E_0] \cdot \frac{k_{cat} \cdot [S]}{K_M + [S]}, \text{ wobei } K_M = \frac{k_{cat} + k_{-1}}{k_1}$  a) Grenzfall für  $[S] \to \infty$  (gesättigtes Enzym)  $-\frac{d [S]}{dt} = [E_0] k_{cat}$  vergleichbar mit unkatalysierter Reaktion  $S \xrightarrow{k_1} P$   $-\frac{d [S]}{dt} = [S] \cdot k_1$  Vor allem wenn sich bei der Reaktion die Substratkonzentration  $S_0$  kaum ändert, sieht man die Analogie:

$$-\frac{\Delta [S]}{\Delta t} = [S_0] k_1$$

b) Grenzfall für [S]  $\rightarrow$  0 (ungesättigtes, freies Enzym)  $-\frac{d [S]}{dt} = [E_0] \cdot \frac{k_{cat}}{K_M} \cdot [S]$ 

vergleichbar mit einem Katalysator C, der keine Bindung zeigt

$$S + C \xrightarrow{k_2} P + C$$
$$-\frac{d[S]}{dt} = [C] \cdot k_2 \cdot [S]$$

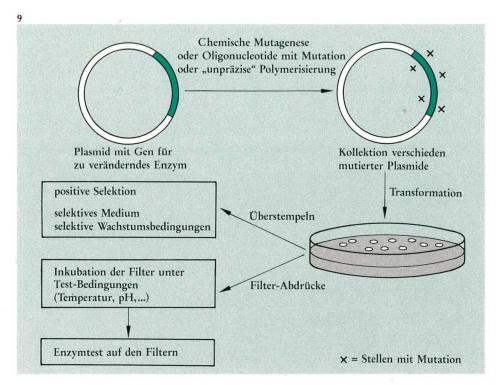
Einheiten:	$\frac{d[S]}{dt}$	$mol \cdot l^{-1}s^{-1}$
	$K_{M}$	mol ⋅ 1 <sup>-1</sup>
	k <sub>cat</sub>	s <sup>-1</sup>
	k <sub>cat</sub>	1 · mol <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>
	K <sub>M</sub>	

Abb. 8. Vergleich der Kinetik enzymatischen mit der von nicht-enzymatischen Reaktionen.

# Wege zu neuen Enzymen

Nach diesen allgemeinen Betrachtungen können wir uns jetzt den verschiedenen Strategien zuwenden, mit denen man nach neuen Enzymen sucht. Gegenwärtig sind es folgende vier Varianten:

- Das "Screening" nach neuen Enzymaktivitäten in bisher nicht untersuchten Organismen (meist Mikroorganismen),
- die Veränderung eines bekannten Enzyms durch Zufallsmutagenese und "screening" nach verbesserten Eigenschaften,
- das (mehr oder minder) rationale "Engineering" eines bekannten Enzyms mit dem



Ziel, dessen Eigenschaften zu verbessern, und

• die "Neuerzeugung" eines Enzyms aus Antikörpern mit katalytischer Aktivität.

Im Folgenden werden die Chancen und die Probleme dieser Strategien diskutiert.

### Screening von Mikroorganismen

Die Suche nach neuen Mikroorganismen, die aufgrund ihrer Lebensbedingungen ein gewünschtes Enzym produzieren könnten, ist der traditionelle Weg zu neuen Enzym-Aktivitäten [33]. Dieser Weg ist auch heute noch in der Praxis der wichtigste, weil die anderen Methoden erst völlig am Anfang stehen. Diese Strategie erfordert allerdings ein gutes Prüfsystem für Rohextrakte, da natürlich nicht auf Verdacht und ohne Wissen über die Eigenschaften der zu isolierenden Proteine Enzyme aus vielen Stämmen gereinigt werden können. Dies ist kein einfaches Problem, denn die gewünschte Aktivität kann im Rohextrakt durch vielerlei Phänomene maskiert sein.

Beispielsweise könnte das Produkt mit einem anderen Enzym gleich weiterreagieren oder das Substrat in einer anderen Reaktion wesentlich schneller umgesetzt werden als durch das zu untersuchende Enzym. Das Enzym kann auch in sehr geringen Mengen vorkommen und deshalb unentdeckt bleiben,

obwohl es vorhanden ist und kloniert werden könnte.

Die ungeheure Vielfalt und Anpassungsfähigkeit des mikrobiellen Metabolismus hat eine entsprechende Vielfalt von Enzymen hervorgebracht, die sehr unterschiedliche Nahrungsquellen umsetzen und für sehr unterschiedliche Lebensbedingungen optimiert sind [2, 33]. Deshalb können Mikroorganismen oft auch als Quelle für Enzyme bekannter Spezifität dienen, die sich zum Beispiel an besonders hohe Salzkonzentrationen (Halophile) oder hohe Temperaturen (Thermophile) angepaßt haben [34].

Durch das Studium solcher Enzyme hofft man, die Gesetzmäßigkeiten zu verstehen, mit denen die Natur Enzyme an bestimmte Lebensbedingungen angepaßt hat, und damit auf lange Sicht (durch Protein Engineering) selbst andere Enzyme in rationaler Weise an neue Reaktionsbedingungen anpassen zu können [35]. Gerade im Fall der Thermophilie sind die Gründe für die erhöhte Stabilität der Enzyme aber sehr komplex. Bei einem Vergleich des gleichen Enzyms aus mesophilen (also bei normaler Temperatur lebenden) und thermophilen Organismen findet man meist große Sequenzunterschiede. Viele der Differenzen lassen sich einer normalen genetischen Variation zuschreiben. Sie haben auf die Funktion des Enzyms keinen Einfluß und sind wohl zufällig oder aus ganz anderen Gründen in dem betreffenden Organismus

Abb. 9. Strategie für die Zufallsmutagenese eines klonierten Gens.

bevorzugt worden. Man möchte aber die die Thermophilie verursachenden Unterschiede herausfinden. Sie einzugrenzen ist jedoch ein schwieriges Unterfangen, denn ob ein Aminosäurerest oder eine Proteinschleife im Vergleich zu einer anderen Variante stabilisierend oder destabilisierend wirkt, hängt vom Kontext des betreffenden Proteins ab. Dieses Problem läßt sich deshalb nur durch den analytischen Einsatz des Protein Engineering lösen und nicht durch einfache Sequenzvergleiche.

Im Extremfall kann die Suche nach stabilen Enzymen in thermophilen Organismen auch mit einer Enttäuschung enden. Es sind Fälle bekannt, in denen das aus einem thermophilen Organismus [36] gewonnene Enzym in isolierter Form gar nicht stabiler ist als die Variante aus einer mesophilen Spezies [34]. Die Enzymstabilität in vivo beruht in diesen Fällen auf den besonderen Bedingungen des intrazellulären Milieus [34, 36] (zum Beispiel Salzkonzentration, Anwesenheit von bestimmten Metall-Ionen oder besonderen niedermolekularen Verbindungen, die das Protein stabiliseren). Ob diese Reaktionsbedingungen für den Chemiker, der ein solches Enzym einsetzen möchte, akzeptabel sind oder nicht, wird vom Einzelfall abhängen.

# Zufallsmutagenese eines klonierten Enzyms und Screening auf verbesserte Eigenschaften

Eine logische Erweiterung der oben beschriebenen Screening-Methode ist durch den Einsatz der Gentechnik möglich geworden. Dabei wird das Gen des zu untersuchenden Enzyms einer Zufallsmutagenese unterworfen und anschließend nach Mutanten mit verbesserten Eigenschaften gesucht. Eine solche Verbesserung könnte z.B. eine Änderung der Substratspezifität oder der Stabilität sein. Die folgende Strategie könnte zwar prinzipiell auf jeden Mikroorganismus angewandt werden [37]; in der Praxis ist sie jedoch besser für klonierte Gene in genetisch gut charakterisierten Wirtsstämmen, wie Escherichia coli, Bacillus subtilis und Hefe geeignet: Das Gen, das für das betreffende Enzym codiert und meist auf einem Plasmid angeordnet sein wird, wird selektiv mutiert. Dazu behandelt man das Plasmid z. B. mit hohen Dosen mutagener Substanzen [38] oder mutiert die einzelsträngige Form des Plasmids mit Oligonucleotiden, in die durch Synthese eine vorausberechnete Zahl zufälliger Veränderungen eingebaut wurden [39] (Abbildung 9). In der Nachkommenschaft müssen nun diejenigen Klone gefunden werden, welche die gewünschten Eigenschaften tragen. Dies ist meistens das schwierigste Problem. Da die Ausbeute bei dieser Methode schon aus theoretischen Gründen sehr klein ist, muß eine gewaltige Zahl von Kolonien der Mikroorganismen getestet werden. Dazu braucht man einen Wachstums- oder Farbtest, mit dessen Hilfe man direkt auf den Kolonien feststellen kann, ob es Mutanten gibt, die das gewünschte Derivat des Substrats umsetzen können, oder solche, die stabiler sind.

Das Problem besteht also darin, einen solchen Test direkt auf den Kolonien durchzuführen. Subtilisin, eine Protease, die von Bacillus subtilis sezerniert wird, ist ein Enzym, das diesem Verfahren unterworfen wurde [40]. Man stellte dafür zunächst Filterabdrücke der Kulturplatten her. An die Filter wurden sowohl die Bakterien-Kolonien als auch das in die Umgebung der Kolonie sezernierte Protein- als "Hof" gebunden. Nach Inkubation dieser Filter bei der gewählten Temperatur oder unter anderen gewählten Bedingungen (z.B. alkalischer pH-Wert) konnten mit Hilfe eines Farbtests für Protease-Aktivität direkt auf dem Filter solche Mutanten erkannt werden, die nach der entsprechenden Inkubation noch aktiv waren (vgl. auch [41]). Ein ähnliches Verfahren kann auch für ein verändertes Substrat eingesetzt werden [42].

Diese Methode hat nur dann Aussicht auf Erfolg, wenn wahrscheinlich ist, daß bereits durch sehr wenige Veränderungen (meist Austausch von ein bis zwei Aminosäuren) eine Variante gefunden werden kann, welche die gewünschten Eigenschaften besitzt. Die gewünschte Änderung der Substratspezifität wird also sehr klein sein müssen, und der Anspruch an Stabilitätsgewinn eher moderat. Allerdings kann diese Methode prinzipiell in einem zweiten Cyclus auf die verbesserte Variante angewandt und beliebig oft wiederholt werden. Voraussetzung für einen Erfolg ist nur, daß überhaupt solche Varianten mit den gewünschten Eigenschaften existieren und sich nur in wenigen Aminosäuren von der Start-Struktur unterscheiden. Erst die Erfahrung der Zukunft wird zeigen, ob ein Erfolg dieser Strategie die Ausnahme oder die Regel sein wird.

#### Protein Engineering

Natürlich kann im Rahmen dieses Artikels nur ein grober Abriß des gegenwärtigen Standes dieser Technik gegeben werden [43]. Voraussetzung für alle rationalen Veränderungen der Aminosäuresequenz eines Proteins ist die genaue Kenntnis der drei-dimensionalen Proteinstruktur. Dazu ist in aller Regel die Aufklärung der Kristallstruktur mit röntgenographischen Methoden Voraussetzung [44]. In letzter Zeit hat aber auch die Strukturaufklärung in Lösung mit Hilfe der NMR-Spektroskopie gewaltige Fortschritte gemacht [45], doch ist der technische Aufwand zur Lösung einer Proteinstruktur dem Aufwand bei der Röntgen-Strukturanalyse vergleichbar. Nur mit noch größerem Aufwand (d.h. meist nach einer biosynthetischen Markierung mit stabilen Isotopen) kann derzeit an die Strukturbestimmung eines Proteins mit mehr als hundert Aminosäuren gedacht werden. Außerdem entspricht die Genauigkeit der so bestimmten Struktur nur selten der einer hochaufgelösten Röntgenstrukturanalyse, selbst im günstigsten Fall die Konformationen der Seitenketten nur zum Teil bestimmt werden können. Allerdings sind mit NMR-Untersuchungen noch andere Informationen, z.B. über dynamische Prozesse im Protein, zugänglich. Außerdem ist die Struktur nicht wie im Kristall durch Kontakte zwischen benachbarten Molekülen beeinflußt. Die beiden Methoden sind daher eher komplementär als konkurrierend.

Oft sind gentechnische Methoden allerdings bereits für die Strukturaufklärung hilfreich, da sie die Gewinnung des Enzyms in großen Mengen durch Überexpression\* erleichtern. Außerdem ist es möglich, nur einen Teil des Proteins (z. B. eine Domäne) herzustellen, der manchmal leichter als das komplette Protein kristallisiert werden kann oder durch seine geringe Größe für NMR-Untersuchungen geeignet ist.

Aus der Betrachtung der dreidimensionalen Proteinstruktur lassen sich oft unmittelbar Arbeitshypothesen ableiten, durch Substitution welcher Aminosäuren (mit gentechni-

schen Methoden) ein bestimmter Effekt erzielt werden könnte. Der Austausch könnte z. B. zu einer Änderung der Substratspezifität, des pH-Optimums oder zu einer Verbesserung der Stabilität des Enzyms führen. Dabei muß man jedoch den Aufwand, der zum Testen der Hypothesen notwendig ist, abwägen und z. B. entscheiden, ob man sofort mit der Herstellung der entsprechend veränderten Proteine und deren Charakterisierung beginnt oder ob vor der Herstellung des veränderten Proteins eine genauere theoretische Analyse sinnvoll ist. Offensichtlich unterscheiden sich auch die Forderungen des Praktikers, der nur an dem verbesserten Enzym interessiert ist, von denen des Grundlagenforschers, der die Ursachen solcher Veränderungen aufklären möchte, um langfristig Regeln für ein rationaleres Vorgehen zu erarbeiten.

Molekülmodellierung (molecular modelling)

Mit moderner Graphik-Software kann eine Aminosäure-Substitution in Sekunden auf dem Bildschirm sichtbar gemacht werden, aber das entstandene Bild ist zunächst ein reines Phantasieprodukt. Die Seitenkette jeder Aminosäure ist um mehrere Torsionswinkel mehr oder weniger frei drehbar. Welche Konformationen werden die neue Seitenkette und ihre alten Nachbarn annehmen? Schlimmer noch: Es ist nicht einmal sicher, daß die Substitution einer Aminosäure ein rein lokaler Effekt ist. Es könnten durchaus auch Konformationen anderer, weiter entfernter Seitenketten verändert werden, im Extremfall sogar der Verlauf der Hauptkette.

Ein ganz besonderes Problem entsteht, wenn sich die Kettenlänge des "mutierten" Proteins von der des ursprünglichen Proteins unterscheidet. Meist beruht das darauf, daß eine Kettenschleife des neuen Proteins eine andere Länge hat als die des ursprünglichen Proteins. Die definitive Antwort auf die Frage, wie die Konformation dieser neuen Schleife aussieht, kann derzeit nur mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse des veränderten Proteins gegeben werden. Dabei spielt die Qualität der Röntgenstrukturanalyse eine große Rolle. Subtile Veränderungen sind nur analysierbar (und sinnvolle Arbeitshypothesen nur dann daraus abzuleiten), wenn die Auflösung entsprechend hoch ist. Das bedeutet auch, daß im Idealfall die Kristallstruktur des Proteins, das man zu verändern plant, bekannt sein sollte. Zwar kann prinzipiell durch wiederholte Anwendung der "graphischen" Substitution ein Modell eines verwandten Proteins aufgebaut

<sup>\*</sup> Unter Überexpression versteht man die Amplifizierung des Gens auf einem Plasmid, das in zahlreichen Kopien vorliegt. Meist wird bei dieser Gelegenheit das Gen auch unter die Kontrolle eines effizienten Promotors und effizienter Translationssignale gebracht.

werden, doch geht durch die Anhäufung von Fehlern bei der Festlegung der Konformationen der Seitenketten die Qualität mit wachsender Entfernung von der Proteinsequenz mit bekannter Struktur schnell verloren. Mit solchen "groben" Computermodellen können sehr wohl sinnvolle Veränderungen geplant werden [43] – man sollte sich nur immer der Problematik bewußt sein.

## Kraftfeldrechnungen

Diese Situation wurde schon vor mehreren Jahren von den Theoretikern (allerdings weniger bei uns, sondern hauptsächlich in USA und anderen europäischen Ländern) als Herausforderung verstanden. Man entwickelte eine Strategie zur Konformations-Vorhersage, indem man empirische Kraftfelder formulierte, um jeder beliebigen Lage der Atome des Proteins (d.h. jeder Konformation) eine potentielle Energie zuordnen zu können [46]. Die Kräfte, die auf die Atome eines Proteins wirken, setzen sich aus vielen Beiträgen zusammen: Die chemische Bindung hat eine Ruhelänge, und jede Abweichung davon führt zu einer Rückstellkraft in Richtung auf diese Ruhelänge. Genauso verhält es sich mit den Bindungswinkeln und den Torsionswinkeln. Im Protein wirken anziehende und abstoßende elektrostatische Kräfte, die ebenfalls die Lage aller Atome beeinflussen. Schließlich ziehen sich alle Atome gegenseitig an (durch van-der-Waals-Kräfte), stoßen sich aber ab, wenn sie sich zu nahe kommen. Mehrere Arbeitsgruppen haben in den letzten Jahren solche empirischen Kraftfelder formuliert, mit denen alle diese Kräfte beschrieben werden können.

Man kann nun von einer Modellstruktur ausgehen (z. B. nach einer Aminosäure-Substitution) und diese nach einem bestimmten Algorithmus so verändern, bis die potentielle Energie ein Minimum erreicht ("Energieminimierung"). Der Nachteil aller bekannten Algorithmen ist jedoch, daß sie im ersten Minimum, das sie finden, verweilen. Das muß aber in keiner Weise dem "globalen Minimum" entsprechen. Da ein komplexes Molekül wie ein Protein eine ungeheure Zahl von Freiheitsgraden hat, wird es in jedem Fall ein lokales Minimum in der Nähe der Ausgangsstruktur geben, d. h. das Protein sieht nach der Minimierung fast genauso aus wie vorher.

Eine andere Methode wurde ebenfalls unabhängig in verschiedenen Arbeitsgruppen entwickelt: Man definiert einen Teil des Proteins,

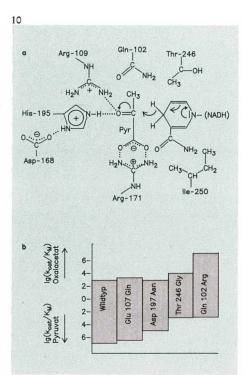


Abb. 10. a) Schematische Darstellung der Bindungstasche der Lactat-Dehydrogenase. b) Einfluß einzelner Mutationen auf die bimolekulare Geschwindigkeitskonstante k<sub>cat</sub>/K<sub>M</sub> der Reduktion von Pyruvat und Oxalacetat. (Asp = Asparaginsäure, His = Histidin, Arg = Arginin, Gln = Glutamin, Thr = Threonin, Ile = Isoleucin, Pyr = Pyruvat, NADH = Nicotinamid-adenindinucleotid, reduzierte Form)

dessen Struktur man variieren möchte, und gewinnt entweder systematisch oder mit einem Zufallsgenerator eine große Zahl von möglichen Konformationen [47]. Von allen wird dann die potentielle Energie berechnet und schließlich eine Konformation anhand der niedrigsten Energie ausgewählt. Dabei bleibt natürlich immer die Frage offen, ob die Zahl der untersuchten Konformationen wirklich ausreichend war.

Eine dritte Methode, die ebenfalls auf diesen Kraftfeldern beruht, aber zu komplex ist, um hier im Detail diskutiert zu werden, ist die "Molekulardynamik" [48]. Dabei werden den Atomen zunächst zufällige Geschwindigkeiten zugeordnet und deren zeitliches Verhalten wird berechnet. Alle Atome folgen dann den Kräften des Kraftfeldes gemäß der Newtonschen Bewegungsgleichung (Kraft = Masse · Beschleunigung). So entsteht eine Bewegungssimulation des Proteins, die prinzipiell den Vorteil hat, die Beweglichkeit be-

stimmter Aminosäurereste direkt widerzuspiegeln. Diese Methode ist allerdings mit gewaltigem Computeraufwand verbunden, und selbst dann werden nur wenige 10<sup>-11</sup> Sekunden im Leben eines Proteins erfaßt. In dieser kurzen Zeit passiert zwar nicht viel, was den Chemiker direkt interessiert, aber zur Zeit werden große Anstrengungen unternommen, um aus dieser Talsohle herauszukommen [49].

Allen diesen Methoden ist ein Kraftfeld gemeinsam, dessen Genauigkeit nicht bekannt ist und von dem deshalb verschiedene Varianten benutzt werden. Da es bisher viel zu wenig Rückkoppelung zu experimentellen Daten gibt (und auch keineswegs Einigkeit darüber herrscht, was letztlich verglichen werden sollte), ist es heute noch nicht möglich, die Qualität dieser Berechnungen abzuschätzen. Auch wenn die Pionierleistungen der an diesen Entwicklungen beteiligten Theoretiker gewürdigt werden müssen, sind diese Strategien derzeit noch als Forschungsprojekte mit unbekanntem Ausgang und nicht als etablierte Vorhersagemethoden zu betrachten.

Das Fazit aus dieser Situation für alle Protein-Engineering-Projekte ist also, daß in jedem Fall eine gewisse Unsicherheit über die tatsächliche Struktur des veränderten Proteins besteht, wenn diese nicht experimentell bestimmt wurde. Mehrere Arbeitsgruppen haben deshalb begonnen, eine große Zahl veränderter Proteine kristallographisch zu untersuchen [50, 51], um zu systematischen Aussagen zu kommen.

# Verbesserte Enzyme – einige Beispiele aus der Grundlagenforschung

Protein Engineering, d. h. die gezielte Veränderung eines Proteins bekannter Struktur (überwiegend durch gentechnische Methoden), hat als analytische Technik bereits einen festen Platz in der Proteinforschung und Enzymologie [43]. Hier sollen aus der sich explosionsartig vermehrenden Literatur wenige Beispiele herausgegriffen werden, die zwar zur Grundlagenforschung gehören, aber bereits einen Weg zu Anwendungen weisen.

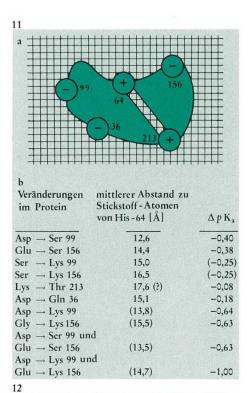
Das erste Beispiel betrifft die Änderung der Substratspezifität eines Enzyms. J. J. Holbrook et al. [52] beschreiben die erfolgreiche Umwandlung der Lactat-Dehydrogenase in Malat-Dehydrogenase (Abbildung 10). Das Ziel dabei war, das aktive Zentrum des Enzyms so umzugestalten, daß es statt der Verbindungen mit der Methylgruppe (in Lactat und Pyruvat) die Substrate mit der Carboxymethylgruppe (in Malat oder Oxalacetat) bevorzugt umsetzt. Die Voraussetzung für einen Erfolg ist, daß der unveränderte Teil des Substrats in den veränderten Enzymen an der gleichen Stelle gebunden wird, damit die Reaktion mit dem Co-Enzym Nicotinadenindinucleotid (NAD) nach wie vor stattfinden kann. Es wurden zunächst in getrennten Versuchen zwei saure Seitenketten (Glu-107 und Asp-197) in der Nähe der Bindungstasche gegen die entsprechenden Säureamide (Gln und Asn) ausgetauscht, um eine Abstoßung der negativ geladenen Seitenkette des Malats zu vermeiden. Die geringe, ohnehin vorhandene Malat-Dehydrogenase-Aktivität der Lactat-Dehydrogenase wurde dadurch zwar nicht erhöht, wohl aber die Lactat-Dehydrogenase-Aktivität erniedrigt! Nicht anders verlief das Experiment nach Austausch von Thr-246 gegen Gly, um für die sperrigere Carboxymethylgruppe mehr Platz zu schaffen. Erst der Austausch Gln-102 gegen Arg brachte den Durchbruch, wohl weil die Ladung der Carboxymethylgruppe jetzt komplexiert werden kann. Es ist sicher verfrüht, schon aus diesem Beispiel allgemeine Prinzipien über Änderungen der Substratspezifität herzuleiten. Die Veränderung war sehr klein - die Einführung einer zusätzlichen Carboxylgruppe -, es konnte aber immerhin gezeigt werden, daß ein solcher Ansatz prinzipiell möglich ist.

Im zweiten Beispiel geht es um die Änderung des pH-Optimums eines Enzyms. Eine solche Veränderung kann z.B. sinnvoll sein, wenn in gekoppelten enzymatischen Reaktionen ein gemeinsamer optimaler pH-Wert für mehrere Enzyme gefunden werden muß. Die Modelluntersuchungen wurden an der Protease Subtilisin durchgeführt [53]. Diese Serin-Protease besitzt einen katalytisch essentiellen Histidin-Rest in Position 64 (His-64, s. oben). Eine Titrationskurve der Aktivität gegen den pH-Wert reflektiert den pK3-Wert dieses Imidazolrings. A. R. Fersht und seine Mitarbeiter erwarteten nun, daß sich durch elektrostatische Effekte - hervorgerufen durch Veränderungen von Oberflächenladungen auf dem Protein - die Leichtigkeit der Protonierung von His-64 ändern sollte. Dies konnte in der Tat experimentell bestätigt werden (Abbildung 11). Es wurden dabei nur solche polaren Reste auf der Oberfläche ausgetauscht, die weder für die Struktur noch für die Substratbindung wichtig sind, sondern

Kontakt zum umgebenden Wasser haben. Ein interessantes Ergebnis dieser Arbeiten ist übrigens, daß die scheinbare Dielektrizitätskonstante innerhalb des Proteins unerwartet hoch liegt – bei etwa 50 [53].

In unserem letzten Beispiel geht es um das Problem, durch Protein Engineering stabilere Proteine zu erzeugen. Um die dazu konzipierten Strategien zu verstehen, müssen wir zunächst das Phänomen der Proteinstabilität genauer betrachten. Dieses Problem ist äußerst komplex und zur Zeit Gegenstand intensiver Forschung. Es kann hier nur in Grundzügen diskutiert werden. Der native (gefaltete) Zustand ist bei den meisten Proteinen nur um etwa 5 bis 15 kcal · mol<sup>-1</sup> stabiler als der denaturierte (ungefaltete) [27]. Obwohl an der Stabilität der Proteinstruktur eine Vielzahl von Wechselwirkungen beteiligt ist, kann fast jede dieser intramolekularen Wechselwirkungen auch im ungefalteten Zustand mit dem Lösungsmittel Wasser wirksam sein. Im ungefalteten Zustand ist zwar die Entropie der Proteinkette wesentlich höher als im gefalteten Zustand, doch ist die Entropie des Lösungsmittels durch die Vergrößerung der ihm zugänglichen hydrophoben Oberfläche im ungefalteten Zustand niedriger [27]. Es müssen jeweils die Summen dieser vielen Wechselwirkungen, die innerhalb des Proteins und zwischen Protein und Lösungsmittel auftreten, im gefalteten und ungefalteten Zustand verglichen werden. Diese Differenz ist die freie Energie der Stabilisierung des nativen Zustands, und sie ist eigentlich bemerkenswert gering.

Dennoch gibt es viele rühmliche Ausnahmen. Phospholipase A, beispielsweise, ein Protein aus etwa 120 Aminosäuren mit (meistens) sieben Disulfidbrücken, kann ohne Beinträchtigung der spezifischen Aktivität lange gekocht und in organischen Lösungsmitteln gelagert werden [54]. Ähnlich verhält es sich mit Superoxid-Dismutase, einem Enzym, das in normalerweise denaturierenden Detergentien (z. B. SDS) oder in 6-molarem Harnstoff noch enzymatisch aktiv ist [55]. Keines dieser Proteine entstammt übrigens einem thermophilen Organismus, und die Liste derart stabiler Proteine kann beliebig verlängert werden. Das zeigt, daß Proteine offensichtlich zumindest prinzipiell - dramatisch stabilisiert werden können und weckt zunächst große Hoffnungen. Den Praktiker interessiert aber eigentlich gar nicht die freie Energie der Stabilität des nativen Zustands. Ihm kommt es vielmehr auf die Lebensdauer des



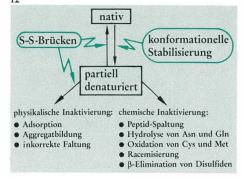


Abb. 11. a) Schematische Darstellung der Lage wichtiger ionischer Wechselwirkungen in Subtilisin und b) deren Effekt auf den pK<sub>2</sub>-Wert von His-64.

Abb. 12. Schematische Darstellung der denkbaren Schritte bei der Inaktivierung eines Enzyms. Die relative Bedeutung dieser Schritte ist bei jedem Protein individuell verschieden. Die grün umrahmten Stabilisierungsstrategien greifen bevorzugt bei den Reaktionsschritten an, an deren Pfeile sie eingetragen sind.

Enzyms unter den Reaktionsbedingungen (oder in der Vorratsflasche) an. Das ist nicht unbedingt dasselbe und die Ursachen für beide Phänomene können durchaus verschieden sein.

Der native Zustand geht unter "denaturierenden Bedingungen" (z. B. bei hoher Tempera-

tur, bei unangemessenen Salzkonzentrationen, bei extremem pH-Wert oder in Gegenwart eines Denaturierungsmittels wie Harnstoff oder Guanidiniumhydrochlorid) über eine Serie von Intermediaten in eine mehr oder weniger ungeordnete Kettenform über [27]. Ein solches Faltungs-Intermediat kann nun auf unterschiedlichste Art weiterreagieren. Nur unter bestimmten Bedingungen (meist: niedrige Proteinkonzentration, "richtiger" pH-Wert, "richtige" Salzbedingungen, geringe Mengen von Harnstoff oder Guanidiniumhydrochlorid, um Aggregations-Reaktionen zu vermeiden) kann das Intermediat zum nativen Zustand zurückreagieren. In den meisten Fällen wird etwas anderes passieren (Abbildung 12): Das Intermediat wird chemisch inaktiviert [56], es aggregiert, es adsorbiert an die Gefäßwand oder es faltet sich in eine Form, die verschieden von der nativen ist. Damit wird die Inaktivierung irreversibel. An dieser Betrachtung werden sofort zwei Punkte deutlich. Erstens: Will man ein Enzym stabilisieren, muß man die Ursache des Aktivitätsverlusts kennen [56]. Nur durch die Behebung der eigentlichen Ursache kann die Stabilität erhöht werden. Zweitens: Es gibt dafür zwei Ansatzpunkte: an dem reversiblen Schritt zwischen nativer Struktur und einem partiell denaturierten Intermediat oder an dem anschließenden, für dieses Enzym relevanten irreversiblen Schritt.

Der Versuch einer Stabilisierung der reversiblen Schritte, hier "konformationelle Stabilisierung" genannt, trifft genau ins Herz des Unwissens über Proteinfaltung und Proteinstrukturen. Dennoch haben sich, durch Anstrengungen vieler Arbeitsgruppen, zumindest einige für die Stabilität von Proteinstrukturen wichtige Aspekte herauskristallisiert:

- die optimale Packung innerhalb des hydrophoben Kerns eines Proteins [57]; dort dürfen weder gegenseitige sterische Behinderungen noch Löcher vorkommen;
- elektrostatische Effekte, wie z. B. geladene Aminosäure-Seitenketten, die mit Helix-Dipolen interagieren und damit das Protein stabilisieren [58];
- Netzwerke aus Wasserstoffbrücken-Bindungen [59];
- der Effekt der konformationellen Entropie: B.W. Matthews und seine Mitarbeiter [60] postulierten, daß eine Aminosäure mit vielen Freiheitsgraden im ungefalteten Zu-

stand bei der Faltung mehr Entropie verliert als eine Aminosäure, die im ungefalteten Zustand ohnehin weniger Freiheitsgrade zur Verfügung hat. Er schlug deshalb vor und belegte dies auch mit Experimenten, daß der Austausch von Glycin gegen Alanin oder Alanin gegen Prolin stabilisierend wirken kann, wenn enthalpische Gründe nicht dagegen sprechen, d. h. wenn der neue Rest nicht mit anderen Teilen des Proteins kollidiert.

Ein Test dieser Hypothese im Labor des Autors [61] soll die Problematik verdeutlichen. Im Enzym Glyceraldehydphosphat-Dehydrogenase (GAPDH, einem Tetramer aus vier identischen Untereinheiten) wurden in getrennten Experimenten alle in Helices vorkommenden Glycin-Reste durch Alanin-Reste ersetzt. Nur ein derartiger Austausch brachte in der Tat eine merkliche Stabilisierung, und zwar sowohl bei der irreversiblen Denaturierung (d. h. der Lebensdauer bei hohen Temperaturen) als auch bei der durch Harnstoff induzierten reversiblen Entfaltung und Faltung. Eine genaue Analyse zeigte allerdings, daß der Verlust der Aktivität nicht mit der Entfaltung der betreffenden Helix korreliert. Vielmehr scheint eine imperfekte Packung des hydrophoben Kerns der Untereinheiten im Wildtyp durch diesen Austausch verbessert worden zu sein. Dies zeigt, daß es sorgfältiger Analysen bedarf, um auf diesem Gebiet Erkenntnisse für zukünftige rationale Ansätze sammeln zu können.

Die irreversiblen Schritte waren ebenfalls bereits das Objekt von Protein-Engineering-Anstrengungen. So konnte z.B. Subtilisin, das durch den Methionin-Rest in Position 222 (Met-222) merklich oxidationsempfindlich ist, durch dessen Substitution robuster gemacht werden [62]. Die Forschungsgruppe der Firma Genentech ging das Problem pragmatisch an: Sie brachte gleich alle anderen 19 Aminosäuren in diese Position und testete das Verhalten der entsprechenden Proteine. Auf diese Art wurden mehrere geeignete Enzym-Varianten gefunden.

Ebenfalls von der Firma Genentech stammt ein interessantes Experiment zur Beantwortung der Frage, durch welchen mechanistischen Effekt Disulfide die Stabilität eines Proteins beeinflussen [63]. In verschiedene Mutanten des T4-Lysozyms, die sich in ihrer Stabilität unter reversiblen Denaturierungsbedingungen unterscheiden, wurden die gleichen stabilisierenden Disulfide eingebaut. Es wurde gezeigt, daß dadurch (zumindest in

diesem Protein) die reversible Reaktion gar nicht beeinflußt wird, sondern daß die S-S-Brücken offensichtlich eine Aggregation oder Miß-Faltung der partiell entfalteten Intermediate verhindern und damit deren irreversiblen Abgang vermeiden. Allerdings haben Proteine eine gewisse Individualität, und es ist noch unklar, wie weit diese Ergebnisse auf andere Proteine übertragbar sind. Intramolekulare [64] oder intermolekulare [65] Disulfid-Brücken wurden zur Stabilisierung bereits in mehrere Proteine eingebaut.

Dieser kurze Abriß sollte den gegenwärtigen Stand der Technik des Protein-Engineering demonstrieren und dabei vor allem die Möglichkeiten, wie man zu neuen oder verbesserten Enzymen gelangen könnte, an Beispielen erläutern. Selbst wenn bis heute noch keines dieser veränderten Proteine zur Marktreife entwickelt wurde, ist dieses Ziel bei der rasanten Entwicklung doch bereits abzusehen. Es bleibt allerdings fraglich, ob die ersten Erfolge dann wirklich "rational" geplant sein werden. Der Weg zu einem Routine-Einsatz solcher Engineering-Methoden ist noch weit und wird noch gewaltige Anstrengungen von der Grundlagenforschung fordern.

# Katalytische Antikörper

Eine vierte Methode, wie man zu neuen Enzymen gelangen könnte, ist schließlich die völlige Neukonstruktion eines Enzyms. Es soll hier aber nicht um Science Fiction gehen, denn der "Neuentwurf eines Enzyms auf dem Reißbrett" wäre momentan nichts anderes. Vielmehr soll eine völlig empirische Strategie vorgestellt werden, die uns zum Anfang des Artikels zurückbringt: Die Verwendung von Antikörpern zur Katalyse.

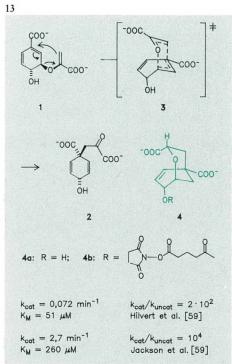
Die Idee wurde zum ersten Mal im Jahr 1969 in schriftlicher Form von W. P. Jencks [66], übrigens in einem Lehrbuch, geäußert. Wenn ein Enzym wirklich so gebaut ist, daß sein aktives Zentrum strukturell dem Übergangszustand der zu katalysierenden Reaktion komplementär ist, so meinte Jencks, müßte man dieses Konzept auch umdrehen können: Ein Protein mit einer entsprechenden Struktur sollte dann ebenfalls diese Reaktion katalysieren. Nun ist das Immunsystem in der Lage, Antikörper gegen prinzipiell jede chemische Verbindung zu erzeugen. Es sollte also auch möglich sein, gegen Übergangszustands-Analoga gerichtete Antikörper herzustellen. Die Frage ist, ob ein solcher Antikörper katalytische Aktivität hat.

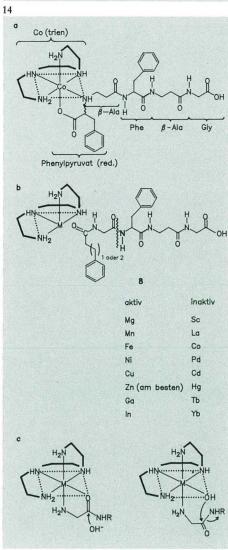
Bereits wenige Jahre später wurde diese Idee von mehreren Arbeitsgruppen unabhängig voneinander, aber in allen Fällen mit nur mäßigem Erfolg getestet [67]. Der Mißerfolg beruhte wahrscheinlich darauf, daß die durch Antikörper verursachte Reaktionsbeschleunigung sehr klein ist. Im polyklonalen Antiserum machen, selbst nach gezielter Immunisierung, spezifische Antikörper nur einen Bruchteil der Immunglobuline aus. Zudem waren einige der ersten Versuche sehr ehrgeizig und wollten hohe Energiebarrieren bezwingen, so daß nicht jede moderate Reaktionsbeschleuigung entdeckt worden wäre, weil die Reaktion dann immer noch zu langsam abgelaufen wäre. Ein Durchbruch gelang erst, als monoklonale Antikörper\* zugänglich wurden [68]. Erst damit hatte man Proteinkonzentrationen zur Verfügung, mit denen auch geringe katalytische Aktivitäten nachgewiesen werden konnten. Seit etwa 1986 wurden z. B. in den Labors von R. Lerner, P. G. Schultz und anderen monoklonale Antikörper gegen Übergangszustands-Analoga hergestellt [69]. Zur gleichen Zeit wurden im Labor des Autors Verfahren entwikkelt, die das Antikörpermolekül selbst der Veränderung durch Protein Engineering zugänglich machen. Damit werden die Möglichkeiten, zu katalytischen Antikörpern zu gelangen, erheblich erweitert [70-72].

Die Strategie, durch Immunisierung einer Maus katalytische Antikörper zu erzeugen, soll an einigen Beispielen demonstriert werden. Gleich von zwei Arbeitsgruppen wurden Antikörper hergestellt, die eine Claisen-Umlagerung katalysieren [73]. Beide Gruppen wählten die Umlagerung der Chorisminsäure zur Prephensäure (Abbildung 13), die als Teil der Biosynthese der aromatischen Aminosäuren in Bakterien- und Pflanzenzellen abläuft und dort vom Enzym Chorismat-Mutase katalysiert wird [74]. Über den Mechanismus der nicht-enzymatischen Reaktion ist bekannt, daß der Übergangszustand Sesselform hat und daß im Übergangszustand die C-O-Bindung vor der Bildung der neuen

C-C-Bindung zum größten Teil gebrochen ist. Auch die enzymatische Reaktion (etwa 106-fach schneller) verläuft über einen sesselförmigen Übergangszustand. Es wurde daher von beiden Arbeitskreisen ein stabiles Analogon dieses sesselförmigen Übergangszustands synthetisiert (4 in Abbildung 13) und über einen Anker an ein immunogenes Protein gekoppelt. (Ohne eine Kopplung an ein Makromolekül lassen sich normalerweise keine Antikörper erzeugen.) Dieses Übergangszustands-Analogon hemmt die Chorismat-Mutase mit einer Dissoziationskonstante von etwa 0,15 µmol·l-1, während das Substrat mit einer Dissoziationskonstante von nur etwa 41 μmol·l<sup>-1</sup> bindet. Beide Gruppen konnten jeweils einen Antikörper finden, der nicht nur das Antigen bindet, sondern tatsächlich auch die Umlagerungs-Reaktion beschleunigt, wenn auch weit weniger als das Enzym. Dies ist ein weiterer Beweis für die Korrektheit des Modells der Komplementarität des Übergangszustands [4, 8]. Vor allem ist interessant, daß durch die Antikörper die Aktivierungsenthalpie der Reaktion im Vergleich zur unkatalysierten Reaktion nur wenig (von 20,7 kcal·mol<sup>-1</sup> auf 18,3 kcal·mol<sup>-1</sup>) gesenkt wird, aber die Aktivierungsentropie immerhin von -12,85 cal·K<sup>-1</sup>·mol<sup>-1</sup> auf -1,2cal·K-1·mol-1 sinkt [69]. Die Abwesenheit von Lösungsmittel-Isotopeneffekten macht es wahrscheinlich, daß dieser Antikörper ausschließlich durch seine dem Übergangszustand komplementäre Umgebung die Reaktion beschleunigt. Dagegen benutzt das Enzym möglicherweise eine kovalente Katalyse [74] und führt deshalb zu höheren Beschleunigungen.

Eine etwas abgewandelte Strategie wurde benutzt, um einen Antikörper als Katalysator für die  $\beta$ -Eliminierung  $5 \rightarrow 6$  zu gewinnen [75]. Bei enzymatischen Reaktionen werden





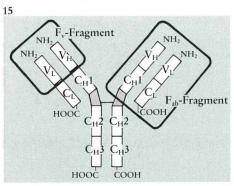
<sup>\*</sup> Unter monoklonalen Antikörpern versteht man Antikörper, die nur aus einer molekularen Spezies bestehen, im Gegensatz zum polyklonalen Antiserum, das eine Mischung vieler Spezies enthält. Durch Immunisierung erhält man ein polyklonales Antiserum, wogegen monoklonale Antikörper durch die sogenannte Hybridromzellen-Technik hergestellt werden.

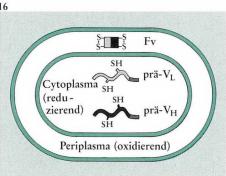
Abb. 13. Reaktion der Chorismat-Mutase. Chorismat 1 geht über einen sesselförmigen Übergangszustand 3 in Prephenat 2 über. Das Übergangszustands-Analogon 4 wurde zur Messung der Bindung an den katalytischen Antikörper in der freien Form 4a eingesetzt, zur Derivatisierung eines immunogenen Proteins dagegen mit entsprechendem Verbindungsstück 4b. Die Werte k<sub>cat</sub> und K<sub>M</sub> bezeichnen die katalytischen Konstanten der Antikörper, die von zwei verschiedenen Arbeitsgruppen gemessen wurden [59].

Abb. 14. a) Als Immunogen wurde das Tetrapeptid β-Ala-Phe-β-Ala-Gly mit Phenylpyruvat verknüpft, reduziert und mit einem Cobalt-Trien-Komplex (Trien = H,N-CH,-CH,-NH-CH,-CH,-NH-CH,-CH2-NH2) zusammengegeben, um einen stabilen Komplex zu erhalten. (Die kovalente Bindung an ein immunogenes Protein ist hier nicht gezeigt.) b) Als Substrat für den erhaltenen peptid-spaltenden Antikörper wurden das mit Phenylpropionsäure oder Phenylbuttersäure derivatisierte Tetrapeptid 8 sowie verschiedene Metall-Trien-Komplexe eingesetzt. c) Die beiden prinzipiellen Möglichkeiten, wie ein Metall-Ion in der Bindungstasche die Peptid-Hydrolyse beschleunigen könnte: links als Lewis-Säure, rechts als allgemeine Base.

Abb. 15. Schematische Darstellung eines Antikörpers und der relevanten antigenbindenden Fragmente. Das F<sub>v</sub>-Fragment ist das Heterodimer aus den variablen Domänen der schweren (V<sub>H</sub>) und der leichten Kette (V<sub>H</sub>). Als F<sub>ab</sub>-Fragment bezeichnet man das Heterodimer aus der gesamten leichten Kette und dem Fragment der ersten beiden Domänen der schweren Kette.

Abb. 16. Schematische Darstellung der Strategie, Antikörper-Fragmente in  $E.\ coli$  zu produzieren. Im Cytoplasma werden die Vorläufer-Proteine für die variablen Domänen  $V_H$  und  $V_L$  jeweils mit einer bakteriellen Signal-Sequenz fusioniert, in reduzierter Form am Ribosom synthetisiert. Dabei werden die Signal-Sequenzen abgespalten, die Domänen falten sich, die Disulfid-Bindungen bilden sich aus (Oxidation), und die beiden Ketten lagern sich zum funktionellen  $F_V$ -Fragment zusammen. Eine völlig analoge Strategie führt zum  $F_{ab}$ -Fragment.





solche Prozesse meist durch Basen katalysiert. Das Antigen 7 sollte also solche Antikörper selektieren, die an der gewünschten Stelle eine Aminosäure enthalten, welche bei neutralem pH-Wert als allgemeiner Basen-Katalysator fungieren kann (z. B. Glutamat oder Aspartat). Dazu wurde im Antigen 7 genau an dieser Stelle ein positiv geladenes Ammonium-Ion eingebaut, um Antikörper mit einer Ladungskomplementarität zu erzeugen. Diese Strategie führte ebenfalls zum Erfolg, d. h. zu einer mäßigen, aber meßbaren Katalyse.

Ein drittes Beispiel soll zeigen, daß durch entsprechendes Design des Immunogens prinzipiell auch anspruchsvolle Reaktionen katalysiert werden können, z. B. die Spaltung einer Peptidbindung. B. L. Iverson und R. A. Lerner [76] versuchten, einen Antikörper dazu zu bringen, ein Metall-Ion direkt an der zu spaltenden Peptidbindung zu binden. Dazu wurde ein Antigen synthetisiert (Abbildung 14), das ein Derivat eines Tetrapeptids darstellt, welches über ein Amin und eine Carboxylgruppe einen Cobalt-Trien-Komplex (Trien = Triethylentetramin) bindet. In die eigentliche Reaktion wurden dann das Tetrapeptid, ein separates Trien-Molekül sowie verschiedene Metall-Ionen gemeinsam mit dem Antikörper eingesetzt. Die Idee war, den Antikörper dazu zu bringen, eine Bindungstasche sowohl für das Peptid als auch für den Metall-Trien-Komplex auszubilden. diese Weise sollte das Metall in Nachbarschaft

der zu spaltenden Bindung sitzen und dort entweder als Lewis-Säure eine Carbonylgruppe polarisieren oder als Base ein Wasser-Molekül deprotonieren, das dann als Hydroxid-Ion die Peptidbindung angreifen kann (Abbildung 14). In der Tat führte diese Strategie zu einem Antikörper, der mit einer Wechselzahl von 10<sup>-4</sup> s<sup>-1</sup> eine Peptidbindung spaltet.

Dieses letzte Beispiel stellt eine große Pionierleistung dar, zeigt aber auch, wie weit diese Technik noch vom "Enzym nach Maß" entfernt ist. Die hier vorgestellten Beispiele sind nur eine Auswahl (neuere Übersichtsartikel vgl. [69]), demonstrieren aber den Stand der Möglichkeiten, durch Immunisierung zu neuen Katalysatoren zu gelangen. Das Besondere an dieser Technik ist, daß ohne irgendwelche Kenntnisse über die Proteinstruktur eine spezifische Bindungsstruktur geschaffen werden kann, denn der immunologische Ansatz ist völlig empirisch.

Wenn das breite Spektrum der bereits realisierten Katalysereaktionen auch Hoffnungen weckt, so muß das Potential dieser Strategie doch kritisch analysiert werden. Zweifellos lassen sich mit dem schier unerschöpflichen Antikörper-Repertoir für zahlreiche Substrate potentielle Katalysatoren entwickeln.

Allerdings ist fraglich, ob die bisher erreichten doch recht geringen Aktivitäten noch wesentlich gesteigert werden können. Das Immunsystem ist nicht auf die Ausbildung von Nucleophilen eingerichtet, da die Selektion ausschließlich durch die Bindung des Antigens bestimmt wird. Die Bindung von Metall-Ionen kann wohl auch nur dadurch erreicht werden, daß ein Chelat-Molekül Teil des Immunogens bei der Immunisierung ist und dieses Chelat dann Co-Substrat wird. Schließlich wird maximale Reaktionsgeschwindigkeit dann erreicht, wenn der pK,-Wert einer katalytischen Gruppe etwa dem pH-Wert während der Reaktion entspricht also für Enzyme meist in der Nähe des Neutralpunkts liegt. Durch Ladungskomplementarität werden jedoch im Antikörper starke Säuren und Basen bevorzugt, die als allgemeine Säure/Base-Katalysatoren weniger geeignet sind. Ein weiteres Problem, das ebenfalls mit den geringen Aktivitäten der katalytischen Antikörper zusammenhängt, ist die Schwierigkeit, die katalytische Aktivität nachzuweisen, wenn im Überstand der antikörper-produzierenden Hybridom-Zellen gleichzeitig Spuren von Enzymen zugegen sind, welche die gleiche Reaktion katalysieren. Dieses Problem ist besonders bei Nucleasen und Proteasen sehr störend.

Aufgrund dieser Überlegungen entstand vor einigen Jahren im Labor des Autors das Projekt, mit den Methoden des Protein Engineering den katalytischen Antikörper selbst zu verändern [70-72]. Während die Techniken zur Veränderung von DNA-Sequenzen wohlbekannt sind, war die Expression (also die Biosynthese des Proteins aus dem rekombinanten Gen) für gentechnisch veränderte Antikörperproteine nur mit großem Aufwand und geringen Ausbeuten möglich. Es wurde deshalb im Labor des Autors eine Technik entwickelt, mit der zum ersten Mal in Bakterien (Escherichia coli) die F<sub>v</sub>- oder F<sub>ab</sub>-Fragmente eines Antikörpers in funktionaler Form hergestellt werden konnten (Abbildung 15 und 16) [70-72]. Das Verfahren beruht auf der gemeinsamen Expression beider Ketten in der gleichen Zelle und der Sekretion beider Proteine in den Raum zwischen den beiden Membranen der Bakterienzelle (Periplasma). Dort bilden sich im oxidierenden Milieu die Disulfidbrücken aus, und die beiden Domänen  $V_L$  und  $V_H$  können sich zusammenlagern. Das Protein kann in einem einzigen Schritt durch Affinitäts-Chromatographie mit dem immobilisierten Hapten (Antigen) gereinigt werden.

Für diese Untersuchungen wurde der phosphorylcholin-bindende Antikörper mit der Bezeichnung McPC603 benutzt, dessen dreidimensionale Struktur mit gebundenem Hapten schon 1974 aufgeklärt wurde [77]. Die beiden Gene für das F<sub>v</sub>-Fragment konnten synthetisiert werden [70], da die Aminosäuresequenz bekannt war. In detaillierten Untersuchungen wurde nachgewiesen, daß das F<sub>v</sub>-Fragment dieses Antikörpers aus *E. coli* die gleiche Affinität zu Phosphorylcholin besitzt wie der gesamte Antikörper aus der Maus [71, 72]. Mit dieser Erkenntnis war es möglich, das für die Antigen-Bindung notwendige Protein drastisch zu verkleinern.

Da dieser Antikörper Phosphorylcholin bindet, lag es nahe zu vermuten, daß er auch eine Esterbindung spalten kann (Abbildung 17). Bei der Spaltung eines entsprechenden Esters durch Wasser (oder ein Hydroxid-Ion) wird nämlich ein tetraedrisches Intermediat durchlaufen. Der Übergangszustand zu diesem Intermediat wird nach dem oben erwähnten Postulat von Hammond ebenfalls in etwa tetraedrisch sein (Abbildung 2c), also

b Glu-35H Tyr-33H

Asn-101H  $H_3$ C  $H_3$ C  $H_4$ C  $H_5$ C

dem Phosphorylcholin ähnlich. Wenn nun der Antikörper eine solche Struktur besser bindet als das Substrat, sollte er diese Hydrolysereaktion katalysieren.

Es konnte in der Tat nachgewiesen werden, daß das rekombinante F.-Fragment aus E. coli dazu in der Lage ist [72]. Die beobachtete Katalyse ist zwar nur moderat, aber dieses Modellsystem bietet die Möglichkeit, die Sequenz dieses Antikörpers beliebig zu verändern und auf diese Weise Einflüsse der Struktur auf die Katalyse systematisch zu untersuchen. Außerdem ist es vor kurzem gelungen, die rekombinante V<sub>L</sub>-Domäne aus E. coli [78] zu kristallisieren, und Arbeiten mit dem F.-Fragment sind im Gang. Auch die Struktur der veränderten Fragmente sollte dann durch Kristallstrukturanalyse direkt bestimmbar sein. Hinzu kommt, daß das Fragment in einem Größenbereich liegt, in dem Strukturuntersuchungen mit Hilfe der NMR-Spektroskopie möglich sein sollten. Schließlich erAbb. 17. a) Stereo-Darstellung der Bindungstasche des Antikörpers McPC603 mit gebundenem Hapten Phosphorylcholin (Sauerstoff und Stickstoff schwarz, Kohlenstoff weiß und Phosphor größer und grau). Die Aminosäurereste sind von links nach rechts: AspL97, TrpH107, AsnH101, Phosphorylcholin, GluH35, TyrH33 und ArgH52. b) Schematische Darstellung der Komplexierung des tetraedrischen Intermediats bei der Esterhydrolyse in der Bindungstasche des Antikörpers. c) Verwendetes Sübstrat und sein tetraedrisches Intermediat.

laubt die Expression im nativen Faltungs-Zustand prinzipiell eine metabolische Selektion oder ein Screening (wie oben beschrieben) nach optimaler Aktivität. Viele der dabei gewonnenen Erkenntnisse werden allgemein auf katalytische Antikörper anwendbar sein. Es ist durchaus denkbar, daß mit dieser hier entwickelten Methode [71] das gesamte immunologische Repertoire der Maus oder des Menschen in Bakterien exprimiert werden könnte (erste Vorversuche wurden bereits gemacht) [79], um auf diese Weise zukünftig katalytische Antikörper zu selektieren, ohne den Umweg über die Immunisierung einer Maus zu gehen.

Es ist wahrscheinlich, daß auf dem Weg zu neuen Enzymen langfristig alle diese Strategien kombiniert werden müssen. Der interdisziplinäre Charakter dieser Forschung, an der Enzymologie, Gentechnik, Immunologie, organische Chemie, theoretische Chemie und Strukturforschung beteiligt sind, ist offensichtlich. Die Enzyme haben bei weitem noch nicht alle ihre Geheimnisse preisgegeben – aber zumindest einige. Deren Nutzung in verbesserten Katalysatoren sollte die Chemie der Zukunft entscheidend beeinflussen.

#### Literatur

- [1] E. Fischer: "Nobel Lectures Chemistry 1901–1921", Elsevier Publ. Comp., Amsterdam 1966; S 34 ff.
- [2] A. Fersht: "Enzyme Structure and Mechanism". Freeman and Co., San Fransisco 1985; C. Walsh: "Enzymatic Reaction Mechanisms". Freeman and Co., San Francisco 1979; G. G. Hammes: "Enzyme Catalysis and Regulation". Academic Press, Orlando 1982; W. P. Jencks: "Catalysis in Chemistry and Enzymology". McGraw-Hill, New York 1969; R. D. Gandour und R. L. Schowen (Hrsg.): "Transition States of Biochemical Processes". Plenum Press, New York 1978; M. L. Bender, R. J. Bergeron und M. Komiyama: "The Bioorganic Chemistry of Enzymatic Catalysis". Wiley and Sons, New York 1984; H. Dugas: "Bioorganic Chemistry". Springer Verlag, Berlin 1981; J. Kraut, Science 242, 533 (1988).
- [3] E. Fischer, Ber. deutsch. Chem. Ges. 27, 2985 (1894).
- [4] J. B. S. Haldane: "Enzymes". Longman, Green and Co., London 1930, MIT Press, Cambridge, USA 1965.
- [5] H. Pelzer und E. Eigner, Z. Phys. Chem. B15, 445 (1932); H. Eyring, Chem. Rev. 17, 65 (1935); M. G. Evans und M. Polanyi, Trans. Faraday Soc. 31, 875 (1935).
- [6] W. J. Moore: "Physical Chemistry". Prentice Hall, Englewood Cliffs 1972; K. J. Laidler: "Chem-

- ical Kinetics". McGraw-Hill, New York 1965; L. P. Hammet: "Physical Organic Chemistry". McGraw-Hill, New York 1970; T. H. Lowry und K. S. Richardson: "Mechanism and Theory in Organic Chemistry". Harper and Row, New York 1976.
- [7] Die Diskriminierung des Übergangszustands als wesentliches Element jeglicher Katalyse wurde noch früher erkannt: M. Polanyi, Z. Elektrochem. 27, 143 (1921).
- [8] L. Pauling, Chem. Eng. News 24, 1375 (1946).
- [9] R. Wolfenden, Annu. Rev. Biophys. Bioeng. 5, 271 (1976).
- [10] G. S. Hammond, J. Am. Chem. Soc. 77, 334 (1955).
- [11] S. C. Blacklow, J. D. Hermes und J. R. Knowles, in E.-L. Winnacker und R. Huber (Hrsg.): 39. Mosbacher Colloquium; S. 59 ff.; W. J. Albery und J. R. Knowles, Biochemistry 25, 2572 (1986) sowie die sechs Artikel von Knowles et al.. unmittelbar davor.
- [12] M. Eigen, Angew. Chem. 75, 489 (1963).
- [13] A. Warshel, J. Åqist und S. Creighton, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 5820 (1989); für eine gegenteilige Ansicht vgl.: M. J. S. Dewar und D. M. Storch, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 2225 (1985).
- [14] A. B. Bürgi und J. D. Dunitz, Acc. Chem. Res. 16, 153 (1983).
- [15] F. M. Menger, Acc. Chem. Res. 18, 128 (1985);
  W. P. Jencks, Adv. Enzymol. 43, 219 (1975);
  A. J. Kirby, Adv. Phys. Org. Chem. 17, 183 (1980);
  T. C. Bruice, A. Brown, und D. O. Harris, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68, 658 (1971);
  D. R. Storm und D. E. Koshland jr., J. Am. Chem. Soc. 94, 5805 (1972).
- [16] R. T. Raines, E. L. Sutton, D. R. Straus, W. Gilbert und J. R. Knowles, Biochemistry 25, 7142 (1986).
- [17] J. Kraut, Ann. Rev. Biochem. 46, 331 (1977).
- [18] P. Carter und J. A. Wells, Nature 332, 564 (1988)
- [19] A. R. Fersht, R. J. Leatherbarrow und T. N. C. Wells, Trends Biochem. Sci. 11, 321 (1986).
- [20] G. Wiegand und S. J. Remington, Annu. Rev. Biophys. Chem. 15, 97 (1986).
- [21] T. Alber, D. W. Banner, A. C. Bloomer, G. A. Petsko, D. Phillips. P. S. Rivers und I. A. Wilson, Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B **293**, 159 (1981); D. G. Gorenstein, Chem. Rev. **87**, 1047 (1987).
- [22] R. Huber und W. S. Bennett, Biopolymers 22, 261 (1983).
- [23] D. B. Kell, Trends Biochem. Sci. 7, 349 (1982); G. R. Welch, B. Somogyi und S. Damjanovich, Progr. Biophys. Mol. Biol. 39, 109 (1982); P. A. Srere, Trends Biochem. Sci. 9, 387 (1984).
- [24] R. Breslow, Science 218, 532 (1982); R. Breslow, Adv. Enzymol. 58, 1 (1986); F. P. Schmidt-

- chen, Top. Curr. Chem. 132, 101 (1986); J. Rebek, Science 235, 1478 (1987); D. J. Cram, Angew. Chem. 100, 1041 (1988); J.-M. Lehn, Angew. Chem. 100, 92 (1988); F. Diederich, Angew. Chem. 100, 372 (1988).
- [25] Das ist eigentlich ein Widerspruch in sich. Da viele Enzymmodelle zwar keinen "Turnover" katalysieren, aber dennoch wichtige Einblicke in Enzymmechanismen gewähren und in der Literatur als Modellenzyme bezeichnet werden, sollen sie auch hier mit diesem Begriff bezeichnet werden.
- [26] W. L. Mock, T. A. Irra, J. P. Wepsiec und M. Adhya, J. Org. Chem. 54, 5302 (1989).
- [27] C. B. Anfinsen, Science 181, 223 (1973); T. E. Creighton, Prog. Biophys. Mol. Biol. 33, 231 (1978); R. Jaenicke, Prog. Biophys. Mol. Biol. 49, 117 (1987).
- [28] W. G. J. Hol, Prog. Biophys. Mol. Biol. 45, 149 (1985).
- [29] D. K. Srivasta und S. A. Bernhard, Ann. Rev. Biophys. Biophysical Chem. 16, 175 (1987).
- [30] W. J. Albery und J. R. Knowles, Angew. Chem. 89, 295 (1977); J. J. Burbaum, R. T. Raines, W. J. Albery und J. R. Knowles, Biochemistry 28, 9 293 (1989).
- [31] Die Frage, ob Enzyme wirklich kinetisch optimiert sind, ist z. B. von Bedeutung, wenn man den Selektionsdruck auf den Reaktionsmechanismus und auf die Stereochemie verstehen will: S. A. Benner, Chem. Rev. 89, 789 (1989).
- [32] J. P. Guthrie, J. Am. Chem. Soc. 99, 3991 (1977).
- [33] K. Kieslich: "Microbial Transformations". Georg Thieme, Stuttgart 1976; M. Luckner: "Secondary Metabolism in Microorganisms, Plants, and Animals". Springer Verlag, Berlin 1984.
- [34] R. Jaenicke, Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 10, 1 (1981); R. Jaenicke, Forum Mikrobiol. 10, 435 (1988).
- [35] Zur Stabilität von Proteinen vgl. auch: R. L. Baldwin und D. Eisenberg, in D. L. Oxender und C. F. Fox (Hrsg.): "Protein Engineering". Alan Liss, New York 1987; S. 127–148.
- [36] R. A. Herbert und G. A. Codd (Hrsg.): "Microbes in extreme environments". Academic Press, London 1986; T. D. Brock (Hrsg.): "Thermophiles". Wiley-Interscience, New York 1986.
- [37] M. Matsumura und S. Aiba, J. Biol. Chem. 260, 15298 (1985); P. H. Clarke und R. Drew, Bioscience Reports 8, 103 (1988); L. B. Evnin und C. S. Craik, Ann. N. Y. Acad. Sci. 542, 61 (1988).
- [38] J. H. Miller: "Experiments in Molecular Genetics". Cold Spring Harbor, New York 1972; M. Smith, Ann. Rev. Genet. 19, 423 (1985).
- [39] S. A. Goff, S. R. Short-Russell und J. F. Dice, DNA 6, 381 (1987); P. Hübner, S. Iida und W.Arber, Gene 73, 319 (1988); S. S. Ner, D. B. Goodin und M. Smith, DNA 7, 127 (1988); J. D. Hermes, S. M. Parekh, S. C. Blacklow, H. Köster und J. R. Knowles, Gene 84, 143 (1989).

- [40] B. C. Cunningham und J. A. Wells, Protein Eng. 1, 319 (1987).
- [41] H. Liao, T. McKenzie und R. Hageman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 576 (1986); T. Alber und J. A. Wozniak, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 747 (1985); P. Bryan, M. Rollence, J. Wood, S. Dodd, M. Whitlow, K. Hardman und M. Pantoliano, J. Cell. Biochem. 13A, 66 (1989); A. A. Pakula und R. T. Sauer, Proteins 5, 202 (1989).
- [42] A. Hall und J. R. Knowles, Nature **264**, 803 (1976).
- [43] W. V. Shaw, Biochem. J. **246**, 1 (1987); J. R. Knowles, Science **236**, 1252 (1987); R. J. Leatherbarrow und A. R. Fersht, Protein Eng. 1, 7 (1986); R. Wetzel, Protein Eng. 1, 3 (1986); J. A. Gerlt, Chem. Rev. **87**, 1079 (1987).
- [44] T. L. Blundell und L. N. Johnson: "Protein Crystallography". Academic Press, New York 1976.
- [45] K. Wüthrich: "NMR of Proteins and Nucleic Acids". Wiley Interscience, New York 1986.
- [46] J. A. McCammon und S. C. Harvey: "Dynamics of Proteins and Nucleic Acids". Cambridge University Press 1987; J. Hermans: "Molecular Dynamics and Protein Structure". Polycrystal Book Service, Western Springs, Illinois 1985.
- [47] C. Chothia, A. M. Lesk, M. Levitt, A. G. Amit, R. A. Mariuzza, S. E. V. Phillips und R. J. Poljak, Science 233, 755 (1986); R. M. Fine, H. Wang, P. S. Shenkin, D. L. Yarmush und C. Levinthal, Proteins 1, 342 (1986); P. S. Shenkin, D. L. Yarmush, R. M. Fine, H. Wang und C. Levinthal, Biopolymers 26, 2053 (1987); R. E. Bruccoleri und M. Karplus, Biopolymers 26, 137 (1987).
- [48] W. F. van Gunsteren, Protein Eng. 2, 5 (1988); P. Kollman und W. F. van Gunsteren, Meth. Enzymol. 154, 430 (1987).
- [49] Beispielsweise können die kurzen Simulationen durchaus ausreichen, um mit Hilfe eines geeigneten thermodynamischen Cyclus grob die Unterschiede der freien Energie zwischen zwei (sehr ähnlichen) Zuständen abzuschätzen, wie z.B. den Unterschied der Bindungsenergie zweier sehr ähnlicher Varianten eines Inhibitors am Enzym. Eine Zusammenfassung verschiedener Ansätze findet sich z.B. in W. F. van Gunsteren und P. K. Weiner: "Computer Simulations of Biomolecular Systems". Escon Science Publishers, Leiden 1989.
- [50] R. Bott, M. Ultsch, J. Wells, D. Powers, D. Burdick, M. Struble, J. Burnier, D. Estell, J. Miller und T. Graycar, ACS Symp. Series 334, 139 (1987).
- [51] B. W. Matthews, Biochemistry 26, 6885 (1987); T. Alber, Annu. Rev. Biochem. 58, 765 (1989).
- [52] H. M. Wilks, K. W. Hart, R. Feeney, C. R. Dunn, H. Muirhead, W. N. Chia, D. A. Barstow, T. Atkinson, A. R. Clarke und J. J. Holbrook, Science 242, 1541 (1988).

- [53] A. J. Russel, P. G. Thomas, und A. R. Fersht, J. Mol. Biol. 193, 803 (1987); A. J. Russell und A. R. Fersht, Nature 328, 496 (1987).
- [54] E. A. Dennis, in P. D. Boyer (Hrsg.): "The Enzymes". 3. Aufl., Bd. 16., Academic Press, New York 1983; S. 307 ff.; E. A. Dennis, P. L. Darke, R. A. Deems, C. R. Kensil und A. Plückthun, Mol. Cell. Biochemistry 36, 37 (1981).
- [55] H. J. Forman und I. Fridovich, J. Biol. Chem. 248, 2645 (1973); D. P. Malinowski und I. Fridovich, Biochemistry 18, 5055 (1979).
- [56] T. J. Ahern und A. M. Klibanov, Science 228, 1280 (1985).
- [57] M. Matsumura, W. J. Becktel und B. W. Matthews, Nature 334, 406 (1988); J. T. Kellis, N. Nyberg, D. Sali und A. R. Fersht, Nature 333, 784 (1988); vgl. auch: J. W. Ponder und F. M. Richards, J. Mol. Biol. 193, 775 (1987).
- [58] H. Nicholson, W. J. Becktel und B. W. Matthews, Nature 335, 651 (1988); D. Sali, M. Bycroft und A. R. Fersht, Nature 336, 740 (1988).
- [59] T. Alber, S. Dao-pin, K. Wilson, J. A. Wozniak, S. P. Cook und B. W. Matthews, Nature 330, 41 (1987).
- [60] B. W. Matthews, H. Nicholson und W. J. Becktel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 6663 (1987); vgl. auch: M. H. Hecht, J. M. Sturtevant, und R. T. Sauer, Proteins 1, 43 (1986).
- [61] C. Ganter und A. Plückthun, Biochemistry, im Druck (1990).
- [62] D. A. Estell, T. P. Graycar und J. A. Wells, J. Biol. Chem. 260, 6518 (1985).
- [63] R. Wetzel, L. J. Perry, W. A. Baase und W. J. Becktel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 401 (1988);R. Wetzel, Trends Biochem. Sci. 12, 478 (1987).
- [64] C. Mitchinson und J. A. Wells, Biochemistry 28, 4807 (1989); J. A. Wells und D. B. Powers, J. Biol. Chem. 261, 6564 (1986); M. W. Pantoliano, R. C. Ladner, P. N. Bryan, M. L. Rollence, J. F. Wood und T. L. Poulos, Biochemistry 26, 2077 (1987); L. J. Perry und R. Wetzel, Science 226, 555 (1984).
- [65] R. Glockshuber, M. Malia, I. Pfitzinger und A. Plückthun, Biochemistry 29, 1362 (1990); R. T. Sauer, K. Hehir, R. S. Stearman, M. A. Weiss, A. Jeitler-Nilsson, E. G. Suchanek und C. O. Pabo, Biochemistry 25, 5992 (1986).
- [66] W. P. Jencks: "Catalysis in Chemistry and Enzymology", McGraw-Hill, New York 1969; S. 288.
- [67] L. I. Slobin, Biochemistry 5, 2836 (1966); V. Raso und B. D. Stollar, Biochemistry 14, 584 (1975); V. Raso und B. D. Stollar, Biochemistry 14, 591 (1975); F. Kohen, Z. Hollander, J. F. Burd und R. C. Boguslaski, FEBS Lett. 100, 137 (1979); F. Kohen, J. B. Kim, H. R. Lindner, Z. Eshhar und B. Green, FEBS Lett. 111, 427 (1980); F. Kohen, J. B. Kim, G. Barnard und H. R. Lindner, Biochim. Biophys. Acta 629, 328 (1980).
- [68] G. Köhler und C. Milstein, Nature **256**, 495 (1975).

- [69] R. A. Lerner und S. J. Bencovic, Bioessays 9,
  107 (1988); P. G. Schultz, Science 240, 426 (1988);
  P. G. Schultz, Angew. Chem. 101, 1336 (1989); M. J. Powell und D. E. Hansen, Prot. Eng. 3, 69 (1989);
  G. M. Blackburn, A. S. Kang, G. A. Kingsbury und D. R. Burton, Biochem. J. 262, 381 (1989).
  [70] A. Plückthun, R. Glockshuber, I. Pfitzinger,
- A. Skerra und J. Stadlmüller, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 52, 105 (1987). 240 [71] A. Skerra und A. Plückthun, Science 242, 1038 (1988); A. Plückthun und A. Skerra, Meth. Enzymol. 178, 497 (1989).
- [72] A. Plückthun, R. Glockshuber, A. Skerra und J. Stadlmüller, Behring Inst. Mitt., im Druck.
  [73] D. Y. Jackson, J. W. Jacobs, R. Sugasawara, S. A. Reich, P. A. Bartlett und P. G. Schultz, J. Am. Chem. Soc. 110, 4841 (1988): D. Hilvert, S. H. Cartellon, P. M. Bartlett und P. G. Schultz, J. Am.

Chem. Soc. 110, 4841 (1988); D. Hilvert, S. H. Carpenter, K. D. Nared, M. T. M. Auditor, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 4953 (1988).

- [74] S. D. Copley und J. R. Knowles, J. Am. Chem. Soc. 107, 5306 (1985); K. Addadi, E. K. Jaffe und J. R. Knowles, Biochemistry 22, 4494 (1983); R. M. Coates, B. D. Rogers, S. J. Hobbs, D. R. Peck, D. P. Curran, J. Am. Chem. Soc. 109, 1160 (1987); S. G. Sogo, T. S. Widlanski, J. H. Hoare, C. E. Grimshaw, G. A. Berchtold und J. R. Knowles, J. Am. Chem. Soc. 106, 2701 (1984); W. J. Guilford, S. D. Copley und J. R. Knowles, J. Am. Chem. Soc. 109, 5013 (1987).
- [75] K. M. Shokat, C. J. Leumann, R. Sugasawara und P. G. Schultz, Nature 338, 269 (1989).
- [76] B. L. Iverson und R. A. Lerner, Science 243, 1184 (1989).
- [77] D. M. Segal, E. A. Padlan, G. A. Cohen, S. Rudikoff, M. Potter und D. R. Davies, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 4298 (1974); Y. Satow, G. H. Cohen, E. A. Padlan und D. R. Davies, J. Mol. Biol. 190, 593 (1986).
- [78] R. Glockshuber, B. Steipe, R. Huber und A. Plückthun, J. Mol. Biol., im Druck.
- [79] W. D. Huse, L. Sastry, S. A. Iverson, A. S. Kang, M. Alting-Mees, D. R. Burton, S. J. Bencovic und R. A. Lerner, Science 246, 1275 (1989); E. S. Ward, D. Güssow, A. D. Griffiths, P. T. Jones und G. Winter, Nature 341, 544 (1989).

Dr. A. Plückthun, geb. 1956 in Heidelberg, Studium der Chemie in Heidelberg. Promotion 1982 bei Ed Dennis an der University of California at San Diego (La Jolla). Von 1982 bis 1985 Postdoctoral Fellow an der Harvard University bei Jeremy Knowles. Seit 1985 Leiter einer selbständigen Arbeitsgruppe am Genzentrum der Universität München im Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried. Habilitation 1989. Arbeitsgebiet: Protein Engineering.