

- [22] C. Valério, J.-L. Fillaut, J. Ruiz, J. Guittard, J.-C. Blais, D. Astruc, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 2588.
- [23] Für andere Familien von Ferrocen-Dendrimeren siehe P. Jutzi, C. Batz, B. Neumann, H.-G. Stammer, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 2272; *Angew. Chem. Int. Engl.* **1996**, *35*, 2118, sowie Lit. [5d, 24, 25].
- [24] a) I. Cuadrado, C. M. Casado, B. Alonso, M. Morán, J. Losada, V. Belsky, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 7613; b) I. Cuadrado, M. Morán, C. M. Casado, B. Alonso, F. Lobete, R. García, M. Ibisate, J. Losada, *Organometallics* **1996**, *15*, 5278.
- [25] a) J. Losada, I. Cuadrado, M. Morán, C. M. Casado, B. Alonso, M. Barranco, *Anal. Chim. Acta* **1997**, *338*, 191; b) I. Cuadrado, M. Morán, J. Losada, C.-M. Casado, C. Pascual, B. Alonso, G. Lobete in *Advances in Dendritic Molecules*, Vol. 3 (Hrsg.: G. R. Newkome), JAI, Greenwich, CT (USA), **1996**, S. 151–195.
- [26] C. Valério, B. Gloaguen, J.-L. Fillaut, D. Astruc, *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1996**, *133*, 10.
- [27] G. R. Newkome, X. Lin, J. K. Young, *Synlett* **1992**, 53.
- [28] A. N. Nesmeyanov, N. A. Vol'kenau, I. N. Bolesova, *Dokl. Akad. Nauk. SSSR* **1967**, *175*, 606; b) D. Astruc, *Top. Curr. Chem.* **1991**, *160*, 47.
- [29] J.-R. Hamon, D. Astruc, P. Michaud, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 758.
- [30] Der bei Zugabe des Anions festgestellte Effekt ist nicht absolut, sondern in Relation zu dem von PF_6^- zu sehen, das als Gegenion des kationischen Dendrimeren fungiert. Der Effekt von PF_6^- ist allerdings gegenüber den kürzlich beschriebenen Effekten anderer Anionen sehr schwach.
- [31] M. J. Hynes, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1993**, 311. Wir danken Dr. Hynes für die Bereitstellung und Erläuterung seines EQ-NMR-Programms zur Bestimmung von Gleichgewichtskonstanten aus ^1H -NMR-Daten.

Konvergenz der Mechanismen eines katalytischen Antikörpers und einer Terpen-Cyclase: eine durch Carbokation- π -Elektronen-Wechselwirkung gesteuerte Polyencyclisierung**

Chiana M. Paschall, Jens Hasserodt, Terri Jones,
Richard A. Lerner, Kim D. Janda und
David W. Christianson*

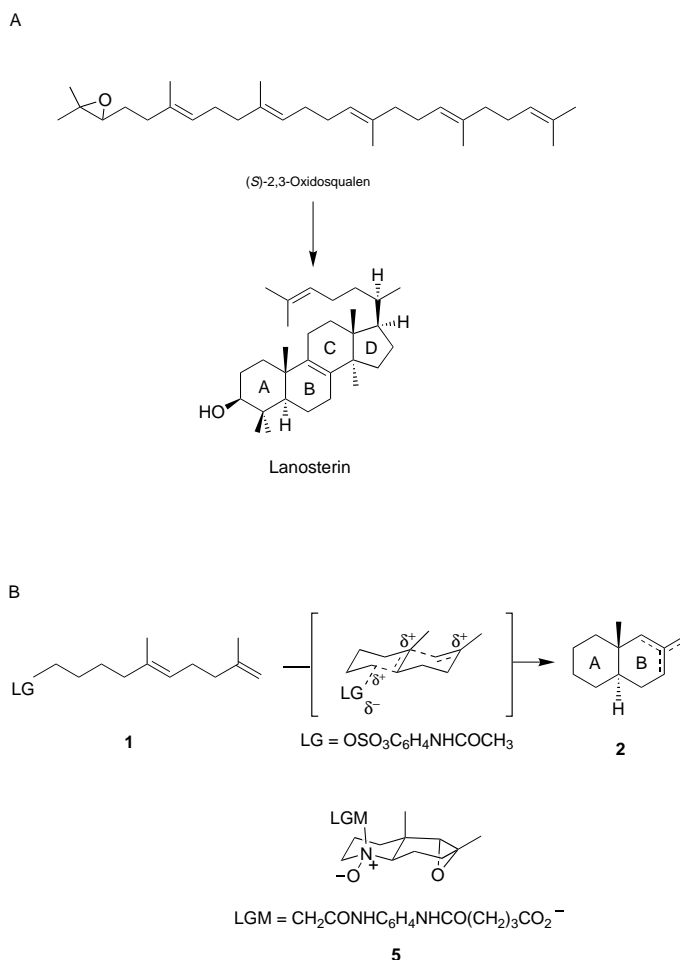
Die über Carbokationen verlaufenden Cyclisierungskaskaden, die von Terpenoid-Cyclasen katalysiert werden, gehören zu den wichtigsten und komplexesten Reaktionen zur Bildung von C-C-Bindungen in Chemie und Biologie.^[1, 2] Ein Beispiel

[*] Prof. Dr. D. W. Christianson, C. M. Paschall
Roy and Diana Vagelos Laboratories
Department of Chemistry
University of Pennsylvania
Philadelphia, PA 19104-6323 (USA)
Fax: (+1) 215-573-2201
E-mail: chris@xtal.chem.upenn.edu

Prof. Dr. J. Hasserodt, T. Jones, Prof. Dr. R. A. Lerner,
Prof. Dr. K. D. Janda
Department of Chemistry und
The Skaggs Institute for Chemical Biology
The Scripps Research Institute
10550 N. Torrey Pines Road
La Jolla, CA 92037 (USA)

[**] Diese Arbeit wurde von den NIH (GM56838, D.W.C.; GM43858, K.D.J.) und vom Skaggs Institute for Chemical Biology gefördert. C.M.P. wird durch ein Fontaine Fellowship der University of Pennsylvania und einen NSF Minority Fellowship Award unterstützt. Wir danken Lisa Kerwin für die Herstellung der Fab-Fragmente sowie J. D. Cox, C. A. Lesburg, T. Stams und R. Stanfield für hilfreiche Diskussionen.

dafür ist die Cholesterin-Biosynthese, in deren Verlauf das offenkettige Polyen Squalenoxid in einer einzigen chemischen Reaktion, die durch das Enzym Lanosterin-Synthase katalysiert wird, zum tetracyclischen Produkt Lanosterin cyclisiert wird (Schema 1 A).^[2] Mehr als ein Drittel der Kohlenstoffatome durchläuft Veränderungen des Bindungs- und/oder



Schema 1. A) Die Cyclisierungsreaktion, die durch die Lanosterin-Synthase katalysiert wird. Die Lanosterinringe sind gemäß der gebräuchlichen Nomenklatur für Steroide bezeichnet. B) Die Polyencyclisierungsreaktion, die durch den Antikörper HA5-19A4 katalysiert wird, führt zum *trans*-Decalingerüst, das zu den Ringen A und B von Lanosterin analog ist. LGM = Abgangsgruppen-Analogon (leaving group mimic) mit einem Linker zum Trägerprotein. Weitere Einzelheiten siehe Text.

Hybridisierungszustandes während der Cyclisierungskaskade, bei der ein Produkt mit sieben präzise konfigurierten Chiralitätszentren entsteht. Es ist bemerkenswert, daß nur eines von 128 möglichen Stereoisomeren entsteht; eine Schlüsselrolle der Cyclase ist es also, die strukturelle und stereochemische Präzision der Cyclisierungsreaktion zu vermitteln. Diese Präzision ist eine charakteristische Eigenschaft der meisten Terpenoid-Cyclasen, die für die Biosynthese von zahlreichen Naturstoffen in allen Lebensformen sorgen.

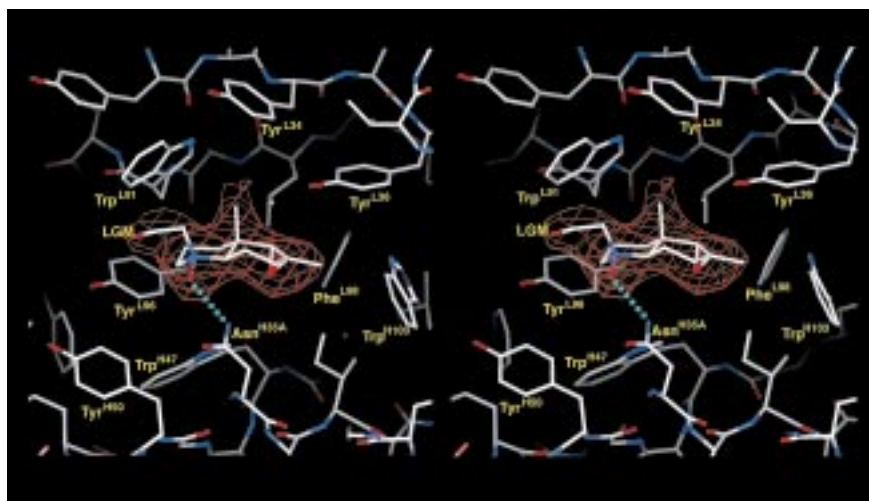
Obwohl man aus vor kurzem veröffentlichten Röntgenstrukturanalysen von Terpenoid-Cyclasen auf eine unabhängige Entwicklung von zwei Cyclaseklassen schließen kann, weisen die Enzyme beider Klassen konvergente Strukturmerkmale auf, die für die Katalyse von Bedeutung sind.^[3] Die

hohlraumförmigen aktiven Zentren sind stets tief in α -helicale Superstrukturen eingebettet, wo zahlreiche hydrophobe Reste die Abschirmung des linearen Polyensubstrats vom Lösungsmittel unterstützen und eine Matrize bilden, die eine einheitliche Substratkonformation und die für die Cyclisierung notwendigen stereochemischen Verhältnisse erzwingt. Außerdem gibt es in jedem der aktiven Zentren aromatische Reste, die dazu dienen, alle carbokationischen Zwischenprodukte der Cyclisierung (und die entsprechenden Übergangszustände) durch Kation- π -Elektronen-Wechselwirkungen zu stabilisieren.^[4] Zusätzliche polare Aminosäurereste in allen aktiven Zentren sind wahrscheinlich an der elektrostatischen Stabilisierung beteiligt und dirigieren die Regiochemie der Deprotonierungs- und/oder Protonierungsschritte, die für den Cyclisierungsmechanismus notwendig sind. Strukturverwandtschaften innerhalb jeder Klasse der Terpenoid-Cyclasen deuten auf eine frühe Divergenz bezüglich der ursprünglichen Vorläufer der Klasse I und Klasse II während der Evolution der Terpenoid-Biosynthesewege hin.^[3] Durch die geschickte Weiterentwicklung der ursprünglichen Terpenoid-Cyclase wurde die Diversität der möglichen Produkte maximiert, die aus einem minimalen Polyensubstrat-Pool entstehen können.

Die Verwendung katalytischer Antikörper^[5] eröffnet eine alternative Möglichkeit, die Diversität der Cyclisierungsprodukte ausgehend von einem Polyensubstrat zu maximieren. Dabei ist es von Bedeutung, daß katalytische Antikörper mit Cyclaseaktivität nicht auf wenige, natürlich vorkommende Polyensubstrate beschränkt sind, so daß die potentielle Diversität ihrer Produkte sogar größer ist als die von natürlich vorkommenden Terpenoid-Cyclasen. Bislang sind mehrere Antikörper hergestellt worden, die kationische Cyclisierungsreaktionen katalysieren,^[6] und vor allem katalysiert einer davon eine Cyclisierungsreaktion, die der von Terpenoid-Cyclasen ähnelt.^[7] Der Antikörper HA5-19A4 katalysiert die kationische Tandemcyclisierung des Polyensubstrats **1** zum an der Brücke methylierten *trans*-Decalingerüst **2** (Schema 1B). Dieses bicyclische Produkt ist den Ringen A und B des Steroidgerüsts von Lanosterin analog, das durch Cyclisierung von Squalenoxid entsteht (Schema 1A). Die Geschwindigkeitskonstante der Antikörper-katalysierten Reaktion ($k_{\text{cat}} = 0.021 \text{ min}^{-1}$)^[7] kommt dem katalytischen Umsatz vieler Terpenoid-Cyclasen nahe; die absolute Geschwindigkeitserhöhung gegenüber der nichtkatalysierten Reaktion ist, genau wie für eine Terpenoid-Cyclase, unmeßbar groß. Der Antikörper HA5-19A4 wurde gegen das Hapten **5** gebildet, das teilweise die produktive Sessel-Sessel-Konformation nachahmt, die für die Polyencyclisierung zum *trans*-Decalin erforderlich ist (Schema 1B). Als Teil einer Strategie des „Köderns und Austauschs“ („bait-and-switch“; das spe-

zifisch entworfene Hapten ist der Köder, der später im aktiven Zentrum des Antikörpers durch das Substrat ersetzt wird)^[6–8] wurde beim Entwurf des Haptens auch ein N-Oxidrest eingefügt, der den verstärkten Einbau funktioneller Gruppen, die die Abspaltung der Abgangsgruppe erleichtern sollten, in die Bindungsstelle des Antikörpers bewirken sollte.

Wir haben die Struktur des Fab-Fragmentes des katalytischen Antikörpers HA5-19A4 im Komplex mit Hapten **5** durch eine Röntgenstrukturanalyse bestimmt. Die Struktur des Komplexes belegt, daß das bicyclische Hapten tief im Inneren der Antikörper-Bindungsstelle eingebettet ist und daß durch intermolekulare Wechselwirkungen kritische strukturelle Einflüsse auf den Mechanismus der Polyencyclisierung entstehen (Abbildung 1). Die Bindungsstelle des Antikörpers



ist hydrophob und enthält zahlreiche aromatische Reste in enger Nachbarschaft zum Hapten und dessen Linker. Zusammen mit den aliphatischen Resten in der Bindungsstelle des Antikörpers bilden sie eine Tasche, die hochkomplementär zum gebundenen Hapten ist. In Übereinstimmung mit den Theorien, die dem Entwurf des Haptens zugrundeliegen,^[7] dient der katalytische Antikörper als präzise Matrice für die Katalyse: Das aktive Zentrum hat eine spezifische Form, durch die das Polyensubstrat in einer produktiven Sessel-Sessel-Konformation gebunden wird, aus der heraus die Reaktion entlang der Reaktionskoordinate unter Bildung einer Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindung fortschreitet, sobald die Bildung des Carbokations erfolgt ist (Abbildung 2). Dies erniedrigt die konformationsbedingte Entropiebarriere für die Katalyse^[9] und beschleunigt die Polyencyclisierungsreaktion.

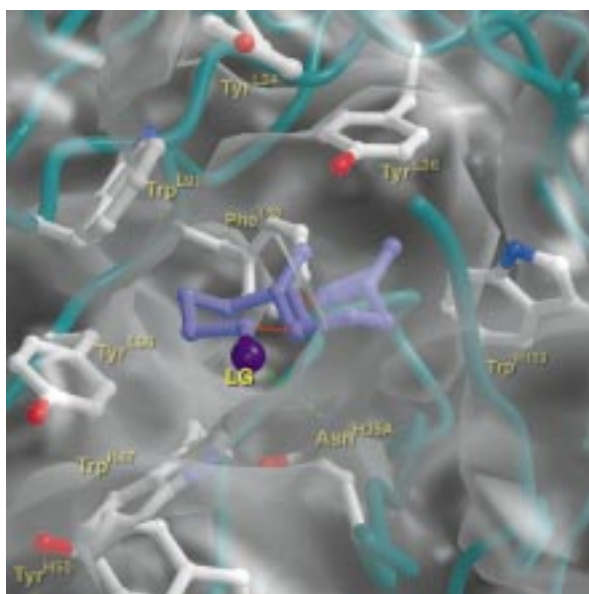


Abbildung 2. Modell des in der produktiven Sessel-Sessel-Konformation gebundenen Polyensubstrates **1** (lila), das anhand der Struktur des Komplexes aus Fab und **5** erstellt wurde; die Reaktionskoordinaten der Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungsbildung sind durch rote gestrichelte Linien angezeigt.^[21] Ausgewählte aromatische Reste sind dargestellt, die zur Bildung der Matrice für die Substratbindung im aktiven Zentrum beitragen. Außerdem ist der Rest Asn^{H35A} dargestellt, von dem angenommen wird, daß er daran beteiligt ist, die Abspaltung der Abgangsgruppe (LG = leaving group) auszulösen, indem er eine Wasserstoffbrückenbindung mit der Sulfonatgruppe des Substrates bildet (grüne gestrichelte Linie; zur besseren Übersicht ist die Abgangsgruppe als einfacher violetter Kreis dargestellt).

Das Vorhandensein von Wasserstoffbrückenbindungen im Komplex aus Fab und dem Hapten **5** bedeutet die erste Bestätigung für die „Bait-and-switch“-Strategie beim Entwurf des Haptens. Dies hebt einen subtilen, aber dennoch wichtigen Punkt hervor: Das Hapten kann nicht nur Struktureigenschaften haben, die für den Übergangszustand während der Katalyse erwartet werden, es kann auch zusätzliche funktionelle Gruppen enthalten, die in der Bindungsstelle des Antikörpers den Einbau entsprechender komplementärer funktioneller Gruppen bewirken, die dann an einem bestimmten Teilschritt der Katalyse beteiligt sind. Die Seitenkette von Asn^{H35A} ist Donor in einer Wasserstoffbrückenbindung zum negativ geladenen Sauerstoffatom des N-Oxid-

restes, und das positiv geladene Stickstoffatom des N-Oxidrestes (das zum C1-Atom des Substrates isoster ist) geht mit den π -Elektronenwolken von Trp^{L91} und Tyr^{L96} und, in geringerem Umfang, von Tyr^{H50} eine Wechselwirkung ein (Abbildung 3a). Daher wird die anfängliche Bildung des

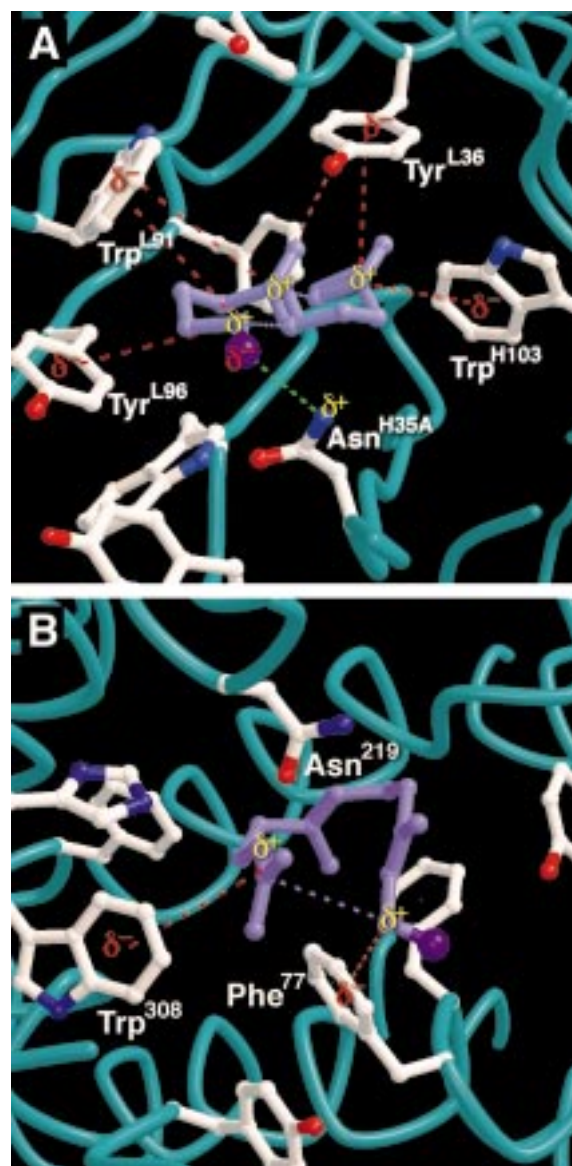
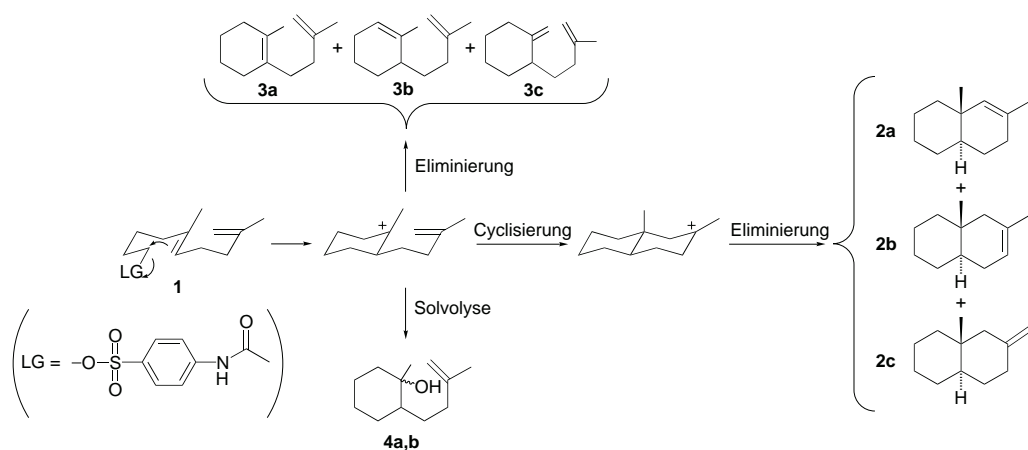


Abbildung 3. Vergleich des katalytischen Antikörpers HA5-19A4 mit Polye-Cyclaseaktivität, der ein Faltungsmuster aus β -Faltblättern einnimmt (A), und der Pentalenen-Synthese, die ein Faltungsmuster aus α -Helices einnimmt (B).^[21] In beiden Modellen für den Enzym-Substrat-Komplex sind die Reaktionskoordinaten der Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungsbildung durch gestrichelte lilafarbene Linien angedeutet, die Abgangsgruppen sind durch violette Kreise symbolisiert. Die Abspaltung der Sulfonat-Abgangsgruppe des Polyens **1** scheint zum Teil durch die Wasserstoffbrückenbindung mit Asn^{H35A} im katalytischen Antikörper ausgelöst zu werden (A); die Metallkoordination löst die Abspaltung der Diphosphat-Abgangsgruppe von Farnesylidiphosphat bei der Pentalenen-Synthesereaktion aus (B). Aromatische Reste im aktiven Zentrum jeder Cyclase stabilisieren die Stellen, an denen positive Ladungen entstehen, durch elektrostatische Wechselwirkungen mit den aromatischen π -Elektronenwolken (rote gestrichelte Linien). Weitere aromatische Reste in jedem aktiven Zentrum sind Bestandteil der Matrice der Bindungsstelle, die die Einnahme der produktiven Konformation des flexiblen Polyensubstrats bei der Bindung erzwingt.



Schema 2. Nach dem Mechanismus der Cyclisierung des Polyens **1**, die durch den Antikörper HA5-19A4 katalysiert wird, entstehen die *trans*-Decalin-Regioisomere **2a–c** als Hauptprodukte. Weitere Einzelheiten siehe Text.

Carbokationen durch mindestens eine Wasserstoffbrückenbindung mit der austretenden Sulfonatgruppe und durch die elektrostatische Stabilisierung der entstehenden positiven Ladung am C1-Atom durch aromatische π -Elektronenwolken ausgelöst. Durch den konzertierten Angriff der π -Bindung zwischen C5 und C6 wird eine nennenswerte Bildung eines energetisch ungünstigen, primären Carbeniumions an C1 vermieden und statt dessen der sechsgliedrige Ring A des *trans*-Decalins gebildet, wobei ein Zwischenprodukt mit einem bevorzugten tertiären Carbeniumion an C5 entsteht (Schema 2).^[7] Dabei ist bemerkenswert, daß die π -Elektronenwolken von Tyr^{L36}, Trp^{L91} und, in geringerem Maß, von Tyr^{L34} für eine optimale elektrostatische Stabilisierung des C5-Carbokations richtig orientiert sind (Abbildung 3a). Diese Reaktionsfolge ist dem ersten Schritt des Mechanismus der Lanosterin-Synthase analog, bei dem die Bildung des Ringes A von Lanosterin gleichzeitig mit der Öffnung des Epoxidrings von Squalenoxid verläuft.^[10]

Der nächste Schritt im Cyclasemechanismus des katalytischen Antikörpers ist der Angriff der C9-C10- π -Bindung auf das intermediäre tertiäre Carbeniumion an C5 unter Bildung des Ringes B des *trans*-Decalins. Die Identifizierung der in geringen Mengen gebildeten Nebenprodukte **3a–c** und **4a, b**, die durch einen unvollständigen Schluß von Ring B entstehen (Schema 2),^[7] lassen vermuten, daß dieser Schritt nicht gleichzeitig mit der Bildung von Ring A abläuft. Dies stimmt mit dem Mechanismus der Cyclisierung bei tetracyclischen Triterpenen überein.^[2] Beim Ringschluß von Ring B entsteht ein Zwischenprodukt mit einem tertiären Carbeniumion an C9, und aus der Struktur des Komplexes zwischen Fab und **5** läßt sich ableiten, daß die Anordnung der π -Elektronenwolken von Tyr^{L36} und Trp^{H103} dazu geeignet ist, das Carbokation an C9 zu stabilisieren (Abbildung 3a). Die Tatsache, daß bei der kationischen Tandemcyclisierung nur das *trans*-Decalin-gerüst **2** entsteht, deutet darauf hin, daß der Antikörper effektiv als Chaperon (Faltungshelfer) fungiert, das die Konformationen von Substrat und Zwischenprodukt während der Cyclisierungskaskade so kontrolliert, daß ein Produkt mit einer einzigartigen und vorherbestimmten Konfiguration entsteht. Es ist faszinierend, daß eine solch ausgedehnte

Konstellation aromatischer Reste im aktiven Zentrum in geeigneter Weise orientiert ist, um die entstehenden positiven Ladungen an den Kohlenstoffatomen 1, 5 und 9 des Polyensubstrates elektrostatisch zu stabilisieren (Abbildung 3a). Neben den aromatischen Resten, die direkt mit diesen Substratomen wechselwirken, gibt es weitere aromatische Reste am Rand des aktiven Zentrums, die möglicherweise zu einer schwachen Stabilisierung der carbokationischen Intermediate über größere Entfernung beitragen. Die Stabilisierung von carbokationischen Zwischenstufen durch Punktladungen ist eine bekannte Strategie zur Beschleunigung von Polyencyclisierungsreaktionen.^[11] Die Stabilisierung durch zahlreiche Partialladungen sollte solche Reaktionen ebenfalls beschleunigen, was für natürlich vorkommende Terpenoid-Cyclasen auch postuliert wurde.^[3] So haben also die „unnatürlich entstandene“ Antikörpercyclase und die aus der natürlichen Evolution hervorgegangenen Terpenoid-Cyclasen zu identischen Strategien konvergiert, um mit Carbokationen in komplexen Cyclisierungsreaktionen umgehen und sie manipulieren zu können.

Eine carbokationische Cyclisierungskaskade wird durch die Addition eines Nucleophils (z. B. des Lösungsmittels) oder die Eliminierung eines Protons beendet. Als Teil der „Bait-and-switch“-Strategie zum Entwurf des Haptens wurde in das Hapten **5** ein Oxiranrest eingebaut, um Antikörper mit solchen Resten im aktiven Zentrum zu erhalten, die einen von zwei möglichen Terminationswegen erleichtern sollten:^[12] a) Das Epoxid-Sauerstoffatom könnte den Einbau eines polaren Restes bewirken, der durch Wechselwirkung mit einem Wassermolekül zur Umwandlung des C9-Carbokations in einen Alkohol führen würde; b) der dreigliedrige Epoxidring fixiert den Ring B des Haptens in einer Halbsessel-Konformation, die die Eliminierung von Protonen aus dem C9-Carbokation begünstigen könnte, wobei olefinische Produkte mit der entsprechenden Halbsessel-Konformation von Ring B entstehen würden. Der zweite Terminationsweg ist begünstigt, denn man erhält überwiegend olefinische Produkte.^[7] Bei der Analyse dieser olefinischen Produkte wurde jedoch ein Gemisch der drei möglichen Eliminierungsprodukte identifiziert (die eng verwandten,

regioisomeren *trans*-Decaline **2a–c**), deren Mengenverhältnisse ihren angenommenen thermodynamischen Stabilitäten entsprachen (Schema 2).^[7] Aus der Fab-Struktur ist ersichtlich, daß es keine katalytische Base gibt, die die regiochemischen Verhältnisse dieses letzten Eliminierungsschritts so dirigieren könnte, daß ausschließlich eines dieser Olefine gebildet wird.

Das Fehlen eines geeigneten basischen Restes in Fab HA5-19A4, der die carbokationische Cyclisierungskaskade beenden könnte, erinnert an die Triterpen-Cyclase Squalen-Hopen-Cyclase aus *Alicyclobacillus acidocaldarius*, die die pentacyclischen Produkte Hopen (90 %, entsteht durch Protoneneliminierung) und Hopan-22-ol (10 %, entsteht durch Addition eines Nucleophils aus dem Lösungsmittel) synthetisiert.^[13] Wie beim katalytischen Antikörper hat auch bei der Squalen-Hopen-Cyclase das Fehlen einer geeigneten katalytischen Base die Entstehung eines Produktgemischs zur Folge. Man sollte allerdings berücksichtigen, daß andere Terpenoid-Cyclasen wie die Pentalenen-Synthase oder die *epi*-Aristolochen-Synthase im aktiven Zentrum Reste enthalten, die offenbar die Regiochemie der Protonenübertragungsschritte steuern,^[3] so daß solche Reste wahrscheinlich auch in jedes andere aktive Zentrum von Cyclasen eingefügt werden können – entweder auf natürlichem Wege oder durch Protein-Engineering.

Insgesamt ist es lehrreich, die allgemeinen Merkmale der konvergenten Evolution in den aktiven Zentren des katalytischen Antikörpers mit Cyclaseaktivität, HA5-19A4, und der Pentalenen-Synthase,^[3] einer bakteriellen Terpenoid-Cyclase, zu vergleichen (Abbildung 3). Jede Cyclase weist eine signifikant andere Proteinfaltung auf: Der Antikörper nimmt das aus β -Faltblättern bestehende Faltungsmuster eines Immunglobulins ein, die Terpenoid-Cyclase nimmt eine α -helicale Konformation ein. Jedoch hat jede Cyclase einen tiefen, hydrophoben Hohlraum, der das aktive Zentrum bildet; er wird von mehreren Schleifen flankiert, die die hochreaktiven carbokationischen Zwischenprodukte vom Lösungsmittel abschirmen. Außerdem enthält jede Cyclase zahlreiche aromatische Reste, die nicht nur eine Matrize bilden, um die produktive Konformation eines flexiblen Polyensubstrates zu binden, sondern mit ihren π -Elektronenwolken auch die carbokationischen Zwischenprodukte elektrostatisch stabilisieren. Dies ist eine sehr effiziente chemische Strategie für die Katalyse.^[4] Die elektrostatische Stabilisierung kann ohne die Gefahr erreicht werden, daß das Carbokation abgefangen und der Proteinkatalysator blockiert wird, wie dies für ein polares Atom im Protein der Fall wäre. Bemerkenswert ist, daß für die Entwicklung dieser mechanistischen Strategie bei der natürlich vorkommenden Terpenoid-Cyclase Millionen von Jahren notwendig waren, während der katalytische Antikörper dies innerhalb von Wochen erreichte – die Beschleunigung der konvergenten Evolution unterstreicht den Vorteil der Verwendung katalytischer Antikörper. Die weitere Erforschung und Optimierung des katalytischen Antikörpers HA5-19A4 verspricht neue Erkenntnisse über carbokationische Cyclisierungsreaktionen mit diversen Polyensubstraten zur Herstellung neuer Produktgruppen, die weit über das hinausgehen, was mit natürlich vorkommenden Terpenoid-Cyclasen erreicht werden kann.

Experimentelles

Das Fab-Fragment HA5-19A4 wurde durch die Spaltung des Immunglobulins IgG HA5-19A4 mit Papain (Pierce Nr. 44885) nach einer Standardvorschrift hergestellt. Der Antikörper selbst wurde nach einer Standard-Hybridomatechnik gewonnen, die in den Hintergrundinformationen von Hasserodt et al.^[6] beschrieben ist. Zur Sequenzbestimmung wurde die Gesamt-RNA von 1×10^7 Hybridomazellen mit Tri-Reagens nach Angaben des Herstellers (Molecular Research Center, Cincinnati, Ohio) präpariert. Die reverse Transkription und die PCR-Amplifikation der leichten Kette und der Fd-Fragment-Sequenzen wurden wie in Lit. [14] beschrieben durchgeführt. Das 5'-Ende der Fd-Fragment-Sequenz wurde unter Verwendung des Primers 5'-GAYGTNCARCTCGAGGAGTCAG-GACCT-3' amplifiziert. Die Fragmente mit den Sequenzen für die leichte Kette und den Fd-Teil wurden mit den Restriktionsendonucleasen *Sac*I/*Xba*I bzw. *Xho*I/*Spe*I geschnitten und in den Phagemid-Vektor pComb3H ligiert.^[15] Nach Elektrottransformation in *E. coli*-XL1-Blue-Zellen wurden nach Induktion der Proteinexpression mit Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid Klone zufällig ausgewählt.^[16] Fab-Fragmente, die spezifisch für das HA5-BSA-Antigen sind, wurden durch einen ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) mit Anti-Maus-F(ab')₂-Antikörpern aus Ziege (Pierce) als sekundärem Antikörper nachgewiesen, die mit alkalischer Phosphatase markiert waren. Die Plasmid-DNA aus ELISA-positiven Klonen wurde sequenziert, um die Sequenzen der leichten Kette und des Fd-Fragments zu bestimmen.

Kristalle des Komplexes aus HA5-19A4-Fab und **5** wurden erhalten, indem 5 μ L Proteinlösung (11.4 mg mL⁻¹ Fab, 10 mM CdCl₂, 10 mM **5**, 50 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris), pH 7.0) mit 5 μ L Fällungspuffer (30 % (w/v) Polyethylenglycol (*M*_w = 6000), 100 mM 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethansulfonsäure (HEPES), pH 7.9) in einem hängenden Tropfen über einem Reservoir von 1 mL Fällungspuffer bei Raumtemperatur äquilibriert wurden. Innerhalb von drei Tagen erschienen kleine rechteckige Platten. Diese Kristalle beugten Röntgenstrahlen bis zu einer Auflösung von 2.7 Å (93.5 % Vollständigkeit, *R*_{merge} = 0.088). Kristallabmessungen 0.6 \times 0.1 \times 0.05 mm³, Raumgruppe C2, *a* = 101.3, *b* = 70.3, *c* = 96.9 Å, β = 114.2°, ein Molekül in der asymmetrischen Einheit. Die Struktur wurde mit der Methode des molekularen Ersatzes aufgeklärt, indem die Atomkoordinaten von Fab D2.3^[17] zur Konstruktion eines Polyalanin-Modells für die Berechnung der Rotations- und Translationsfunktionen mit dem Programm AmoRe^[18] benutzt wurden. Verfeinerung und Neubau des Modells wurden mit den Programmen X-PLOR^[19] und O^[20] durchgeführt; die Verfeinerung konvergierte stetig bis zu einem kristallographischen *R*-Faktor von *R* = 0.165 (*R*_{free} = 0.257). Zwei Cd²⁺-Bindungsstellen wurden identifiziert: eine zwischen Glu^{L187} und Glu^{L213} und eine zweite zwischen Asp^{H173} und Glu^{L81} von symmetrieverwandten Molekülen im Kristallgitter. Das endgültige Modell weist ausgezeichnete stereochemische Parameter auf (Root-mean-square(rms)-Abweichungen von den idealen Bindungslängen und -winkeln 0.011 Å bzw. 1.7°). Im Ramachandran-Diagramm liegen 318 Reste im am meisten bevorzugten, 49 Reste im zusätzlich erlaubten und 3 Reste im nur bedingt erlaubten Bereich der Rückgratkongformationen; nur 4 Reste liegen im Bereich verbotener Rückgratkongformationen, und sie befinden sich in schlecht aufgelösten Schleifenregionen. Die Atomkoordinaten des Komplexes aus Fab und **5** wurden in der Protein Data Bank, Brookhaven National Laboratory, USA (<http://www2.ebi.ac.uk/pdb>), unter der Codenummer 1CF8 hinterlegt.

Eingegangen am 18. Januar 1999 [Z12925]

International Edition: *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 1743–1747

Stichwörter: Carbokationen • Cyclasen • Katalytische Antikörper • Proteinstrukturen • Terpenoide

- [1] a) L. Ruzicka, *Experientia* **1953**, 9, 357–367 (Einer der sechs Abschnitte dieser Veröffentlichung trägt den Titel „Biogenesis of Steroids and Terpenic Compounds“. Darunter hat Ruzicka die Bemerkung „(together with A. Eschenmoser and H. Heusser)“ zusammen mit einem Verweis auf die Dissertation von Eschenmoser (ETH Zürich, **1952**) eingefügt.); b) J. W. Cornforth, *Angew. Chem.*

- 1968, 80, 977–985; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1968**, 7, 903–911; c) W. S. Johnson, *Acc. Chem. Res.* **1968**, 1, 1–8; d) D. Arigoni, *Pure Appl. Chem.* **1975**, 41, 219–245; e) D. E. Cane, *Chem. Rev.* **1990**, 90, 1089–1103; f) D. McCaskill, R. Croteau, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **1997**, 55, 107–146.
- [2] a) I. Abe, M. Rohmer, G. D. Prestwich, *Chem. Rev.* **1993**, 93, 2189–2206; b) C. Pale-Grosdemange, C. Feil, M. Rohmer, K. Poralla, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 2355–2358; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 2237–2240.
- [3] a) C. A. Lesburg, G. Zhai, D. E. Cane, D. W. Christianson, *Science* **1997**, 277, 1820–1824; b) C. M. Starks, K. Back, J. Chappell, J. P. Noel, *Science* **1997**, 277, 1815–1820; c) K. U. Wendt, K. Poralla, G. E. Schulz, *Science* **1997**, 277, 1811–1815; d) K. U. Wendt, G. E. Schulz, *Structure* **1998**, 6, 127–133; e) C. A. Lesburg, J. Caruthers, C. M. Paschall, D. W. Christianson, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1998**, 8, 695–703.
- [4] a) S. K. Burley, G. A. Petsko, *Adv. Protein Chem.* **1988**, 39, 125–189; b) D. A. Dougherty, *Science* **1996**, 271, 163–168; c) C. Jenson, W. L. Jorgensen, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 10846–10854; d) J. C. Ma, D. A. Dougherty, *Chem. Rev.* **1997**, 97, 1303–1324.
- [5] a) P. G. Schultz, R. A. Lerner, *Science* **1995**, 269, 1835–1842; b) T. Li, R. A. Lerner, K. D. Janda, *Acc. Chem. Res.* **1997**, 30, 115–121.
- [6] a) T. Li, K. D. Janda, J. A. Ashley, R. A. Lerner, *Science* **1994**, 264, 1289–1293; b) T. Li, S. Hilton, K. D. Janda, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 3308–3309; c) T. Li, K. D. Janda, R. A. Lerner, *Nature* **1996**, 379, 326–327; d) J. Hasserodt, K. D. Janda, R. A. Lerner, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 11654–11655.
- [7] J. Hasserodt, K. D. Janda, R. A. Lerner, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 5993–5998.
- [8] a) K. D. Janda, M. I. Weinhouse, D. M. Schloeder, R. A. Lerner, S. J. Benkovic, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 1274–1275; b) K. D. Janda, M. I. Weinhouse, T. Danon, K. A. Pacelli, D. M. Schloeder, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 5427–5434.
- [9] M. I. Page, W. P. Jencks, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1971**, 68, 1678–1683.
- [10] E. J. Corey, H. Cheng, C. H. Baker, S. P. T. Matsuda, D. Li, X. Song, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 1277–1288.
- [11] a) W. S. Johnson, S. J. Telfer, S. Cheng, U. Schubert, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 2517–2518; b) W. S. Johnson, S. D. Lindell, J. Steele, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 5852–5853.
- [12] J. Hasserodt, K. D. Janda, *Tetrahedron* **1997**, 53, 11237–11256.
- [13] B. Seckler, K. Poralla, *Biochim. Biophys. Acta* **1986**, 881, 356–363.
- [14] W. D. Huse, L. Sastry, S. A. Iverson, A. S. Kang, M. Alting-Mees, D. R. Burton, S. J. Benkovic, R. A. Lerner, *Science* **1989**, 246, 1275–1281.
- [15] D. Radar, C. F. Barbas, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1997**, 8, 503–508.
- [16] C. F. Barbas, A. S. Kang, R. A. Lerner, S. J. Benkovic, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, 88, 7978–7982.
- [17] B. Gigant, J.-B. Charbonnier, Z. Eshhar, B. S. Green, M. Knossow, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, 94, 7857–7861.
- [18] J. Navaza, *Acta Crystallogr. Sect. A* **1994**, 50, 157–163.
- [19] A. T. Brünger, J. Kuriyan, M. Karplus, *Science* **1987**, 235, 458–460.
- [20] T. A. Jones J.-Y. Zou, S. W. Cowan, M. Kjeldgaard, *Acta. Crystallogr. Sect. A* **1991**, 47, 110–119.
- [21] Die Abbildungen wurden mit folgenden Programmen erstellt: MOLSCRIPT: P. Kraulis, *J. Appl. Crystallogr.* **1991**, 24, 946–950; Raster3D: D. J. Bacon, W. F. Anderson, *J. Mol. Graphics* **1988**, 6, 219–220; E. A. Merritt, M. E. P. Murphy, *Acta Crystallogr. Sect. D* **1994**, 50, 869–873; BOBSCRIPT: R. M. Esnouf, *J. Mol. Graphics* **1997**, 15, 132–134; GRASP: B. Honig, A. Nicholls, *Science* **1995**, 268, 1144–1149.

Ein neuer Weg zu Intercalaten aus Vanadumpentoxid und Pyridinen: $(4\text{-H}_2\text{N-C}_5\text{H}_5\text{NH})\text{V}_2\text{O}_5^{**}$

Yongkui Shan, Rui H. Huang und Songping D. Huang*

Intercalationsschichtverbindungen werden zunehmend stärker untersucht, da sie vielfach verwendet werden: in wieder-aufladbaren Batterien, bei der heterogenen Katalyse und in Ionenaustauschern.^[1] Besonders interessant sind aus Schichtstrukturen bestehende Wirtverbindungen, in die organische Gastverbindungen eingeschoben werden, um organisch-anorganische Kompositmaterialien mit definierten Stöchiometrien und Strukturen zu erhalten.^[2–7] Solche Materialien könnten Hybrideigenschaften haben, die synergistisch aus den Eigenschaften von Wirt und Gast folgen.^[3, 8] Pyridin und seine Derivate sind die für Einlagerungen in Schichtverbindungen am intensivsten untersuchten organischen Lewis-Basen. Unter den Wirtmaterialien sind Übergangsmetallchalkogenide,^[4] Metallphosphortrisulfide,^[9] Metalloxide^[10, 11] und Metallphosphate.^[12, 13]

Der konventionelle Weg zur Einlagerung von Molekülen in Schichtverbindungen ist die direkte Reaktion zwischen Gast und Wirt.^[1e] Derartige heterogene Reaktionen führen normalerweise zu unzureichend kristallinen Produkten. Als Folge davon lassen sich genaue Informationen über die Anordnung der organischen Moleküle in den Zwischenschichträumen kaum erhalten. So wurden auf der Grundlage von Röntgenpulverdiagrammen teilweise sich widersprechende Strukturmodelle für dieselben Wirt-Gast-Systeme postuliert.^[14] Vor kurzem wurde gezeigt, daß die Hydrothermalsynthese eine Möglichkeit ist, Intercalationsverbindungen, die auf organischen Verbindungen basieren, leichter herzustellen und zu kristallisieren.^[15] Beispielsweise wurden α - und β -(enH₂)_{0.5}V₂O₅ (en = Ethylendiamin)^[16] sowie (DABCOH₂)₂V₆O₁₄ (DABCO = 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan)^[17] hydrothermal hergestellt und durch Einkristallstrukturanalysen charakterisiert.

Wir interessieren uns für die Synthese neuartiger mikroporös-mesoporöser Kompositmaterialien, wobei wir Schichtverbindungen und kleine intercalierende Moleküle (z.B. Pyridine, Alkylamine und Alkalimetallionen) in Flüssigkri-

[*] Prof. S. D. Huang,^[+] Dr. Y. Shan
Department of Chemistry and
Center for Materials Research and Characterization
University of Puerto Rico
P.O. Box 23346, San Juan, PR 00931 (USA)
Dr. R. H. Huang
Department of Chemistry and
Center for Fundamental Materials Research
Michigan State University
East Lansing, MI 48824 (USA)

[+] Ständige Anschrift:
Department of Chemistry, Kent State University
Kent, OH 44242 (USA)
Fax: (+1) 330-672-3816
E-mail: shuang1@kent.edu

[**] Diese Arbeit wurde von der National Science Foundation und dem Department of Energy der Vereinigten Staaten unterstützt (OSR-9452893 und DE-FC0291ER75674). S.D.H. dankt für einen NSF Career Award (1998–2002, DMR-9733275).