

## Proteindesign am Schnittpunkt von Biotechnologie, Chemie, Theorie und Evolution<sup>\*\*</sup>

Rainer Jaenicke\* und Reinhard Sternер\*

Die Feststellung, dass der Fortschritt in der Wissenschaft vom Fortschritt in den Methoden vorangetrieben wird, ist in den Biowissenschaften kaum je so zutreffend gewesen wie im Falle von W. Arbers zielgerichteter Mutagenese von Proteinen. Seine Methode ersetzte die bis dahin verwendete spezifische chemische Modifikation durch DNA-basierte Spezifität von Nucleotid- und damit Aminosäureaustauschen und ermöglichte die Entwicklung und Produktion rekombinanter Proteine. Mit der vollständigen Sequenzierung ganzer Genome und dem Aufkommen der strukturellen Bioinformatik<sup>[1]</sup> sieht sich die physikalische Biochemie derzeit mit der Aufgabe konfrontiert, die Beziehung zwischen der DNA-Sequenz einerseits und der räumlichen Struktur, Funktion und Stabilität von Proteinen andererseits zu entschlüsseln. Während der letzten zehn Jahre wurden Methoden entwickelt, die es im Prinzip ermöglichen, Proteinstrukturen vorherzusagen und maßgeschneiderte bessere Proteine mit gewünschten funktionellen und physikalischen Eigenschaften herzustellen. Die Resultate waren jedoch oft enttäuschend, da das derzeitige Wissen über die molekularen Prinzipien der Selbstorganisation, Funktion und Stabilität von Proteinen auch nach der Aufklärung von mehr als 10000 dreidimensionalen (3D) Strukturen und der Herstellung von Millionen detailliert untersuchter Mutanten noch immer unzureichend ist.

Neuartige Methoden zur gerichteten Evolution von Proteinen *in vitro* zeigen hier jedoch vielversprechende Perspek-

tiven.<sup>[2,3]</sup> Um dieses Potenzial sowohl in der angewandten Forschung als auch in der Grundlagenforschung rasch fruchtbar werden zu lassen und eine engere Zusammenarbeit zwischen Theoretikern und Experimentatoren zu fördern, organisierten F. X. Schmid (Bayreuth) und R. Sternér (Köln) eine Titisee-Konferenz des Boehringer-Ingelheim-Fonds, über die hier berichtet wird. Themen waren 1. Strukturvorhersage, Klassifikation und Design von Proteinen, 2. deren Stabilität und Stabilisierung und 3. Protein-Protein- und Protein-Liganden-Wechselwirkungen sowie, damit eng verwandt, die enzymatische Katalyse. Aus Platzgründen können hier nicht alle Beiträge besprochen werden, die ausgewählten spiegeln zwangsläufig die Präferenzen der Verfasser wider. Insgesamt war die Konferenz ein außerordentlicher Erfolg, sowohl aufgrund des wissenschaftlichen Niveaus der Vorträge und der Lebendigkeit der Diskussion als auch Dank der freundschaftlichen Atmosphäre und der Großzügigkeit der ausrichtenden Organisation.

Angesichts des Gesamtthemas der Tagung mag es überraschen, mit der Regulation intramembraner Proteolyse zu beginnen, jedoch machte der Vortrag von R. T. Sauer (Cambridge, MA, USA) die Komplexität der heutigen zellulären Biochemie deutlich, die zur Analyse der strukturellen, energetischen und funktionellen Details das gesamte Methodenspektrum erforderlich macht, um den Stress-induzierten Proteinabbau als grundlegendes Phänomen in der Proteomanalyse zu verstehen.<sup>[4]</sup> S. Benkovic (Pennsylvania State University, PA, USA) erläuterte in seinen Perspektiven der biologischen Katalyse das komplexe kinetische Schema und die zugehörigen strukturellen Details des katalytischen Mechanismus der Dihydrofolatreduktase, die als zentrales Enzym der Folat-Biosynthese ein wichtiges Zielmolekül bei der Behandlung von Infektionskrankheiten und Krebs ist. Die Kombination von Stopped-flow-Kinetik mit

der Strukturaufklärung von Mutanten ermöglicht sowohl die Unterscheidung eines geschlossenen und eines offenen Zustands des aktiven Zentrums als auch die eindeutige Differenzierung zwischen den Geschwindigkeitskonstanten der Konformationsänderung und des Wasserstofftransfers im katalytischen Reaktionsmechanismus. Dabei gelang es auch, für die Katalyse relevante Aminosäurepositionen innerhalb und außerhalb des aktiven Zentrums zu identifizieren.

Restriktions-Modifikations-Systeme sind das wichtigste Werkzeug der rekombinanten Gentechnologie. In vivo dienen sie zum Schutz der Zellen gegen Fremd-DNA, indem sie kurze palindromische DNA-Sequenzen auf konzertierte Weise erkennen und spalten. Bekanntermaßen gehören natürliche Restriktionsenzyme zu den spezifischsten Enzymen überhaupt, da das unspezifische Zerkleinern von DNA für die Zelle tödlich wäre. A. Pingoud (Gießen) berichtete über Versuche, mithilfe von unnatürlichen DNA-Zielsequenzen, rationalem Proteindesign oder gerichteter Evolution die Spezifität von Restriktionsenzymen zu verändern. Die Ab-

sicht seiner laufenden Untersuchungen ist es, programmierbare Restriktionsenzyme zu generieren, welche Sequenzspezifitäten aufweisen, die mithilfe austauschbarer Determinanten verändert werden können. Diese Enzyme könnten Anwendung in der Analyse sehr langer Genome finden.

Die Hoffnung, dass natürliche Proteine ein Potenzial zur funktionalen Verbesserung tragen, speist sich seit Mitte der 90er Jahre des letzten Jahrhunderts hauptsächlich aus der Entdeckung hyperthermophiler Mikroorganismen und ihres Proteinrepertoires. Die aus zahlreichen Untersuchungen gewonnenen Erkenntnisse werden mittlerweile semi-empirisch zur Erhöhung der Stabilität industriell genutzt.<sup>[2,5]</sup> Der Zusammenhang von Struktur, Stabilität und Funktion wurde von M. J. Danson (Bath, Großbritannien) anhand einer

**„[D]ass Methoden des rationalen Proteindesigns und der gerichteten Evolution geeignet sind, [die] Stabilität oder Effektivität [der natürlich vorkommenden Enzyme] zu optimieren oder auch ihre Spezifität zu verändern.“**

[\*] R. Jaenicke  
Birkbeck College, University of London, London (Großbritannien)

R. Sternér  
Institut für Biochemie, Universität Köln, Köln (Deutschland)

[\*\*] 86. Internationale Titisee-Konferenz, Titisee, Schwarzwald, 23.-27. Oktober 2002

systematischen Studie des dimeren Enzyms Citratsynthase aus verschiedenen Organismen mit optimalen Wachstums-temperaturen zwischen 10 und 100 °C erläutert. Er konnte zeigen, dass trotz signifikanter Sequenzvariationen die 3D-Struktur hoch konserviert ist. In Übereinstimmung mit den Untersuchungen von R. Ladenstein (Stockholm, Schweden) weisen Dansons Untersuchungen darauf hin, dass intra- und intermolekulare ionische Wechselwirkungen, vor allem in Form von Netzwerken geladener Aminosäure-Seitenketten, für die extreme Stabilität von Enzymen essenziell sind. Allerdings spielen zweifellos auch andere Arten von schwachen Wechselwirkungen eine Rolle.<sup>[5]</sup> Hier ist es wichtig zu erwähnen, dass Thermostabilität und Thermoaktivität nicht notwendigerweise parallel verlaufen, vielmehr geht die thermische Inaktivierung häufig der thermischen Denaturierung voraus. Auch reflektiert der Proteinbestand eines Organismus nicht unbedingt die Umweltbedingungen; so wird beobachtet, dass Proteine aus ein und derselben Spezies unterschiedlich stabil sein können.

Ausgehend von der Feststellung, dass enzymatische Prozesse sich – abgesehen von ihrer Reaktions-Spezifität – wegen ihres ökonomischen Wasser-, Energie- und Chemikalien-Verbrauchs für eine industrielle Nutzung anbieten, gab T. V. Borchert (Bagsvaerd, Dänemark) Einblicke in eine Zahl neuartiger Entwicklungen im Bereich der Nahrungs- und Waschmittel-Industrie. Dabei ist von vornherein davon auszugehen, dass natürlich vorkommende Enzyme nicht immer die für industrielle Anwendung benötigten Eigenschaften aufweisen. Das bedeutet, dass Methoden des rationalen Proteindesigns und der gerichteten Evolution notwendig sind, um ihre Stabilität oder Effektivität zu optimieren, oder auch ihre Spezifität zu verändern. Entsprechende Beispiele sind einerseits die Produktion von Cyclodextrin aus Stärke, wofür eine  $\alpha$ -Amylase in eine Cyclodextringlycosyltransferase umgewandelt wurde, und andererseits die Herstellung von thermostabilem Subtilisin mit hoher katalytischer Aktivität in organischen Lösungsmitteln.

Hinsichtlich der enantiomeren Reinheit sind natürlich vorkommende Stoffe

für die pharmazeutische Nutzung in der Regel unzureichend, da die natürliche Enantioselektivität von Enzymen nicht hoch genug ist. K.-E. Jäger (Düsseldorf) machte deutlich, wie die Kombination von verschiedenen Mutagenesetechniken (fehlerbehaftete PCR, DNA-Shuffling, kombinatorische Kassettenmutationen) mit Hochdurchsatz-Screening die natürliche Spezifität von Enzymen verbessern kann. Im Falle der bakteriellen Lipasen ermöglichte die Kombination von Kristallstrukturdaten mit molekularer Modellierung und molekulardynamischen Berechnungen eine Erklärung des Effekts spezifischer Aminosäureaustausche. Damit ist ein erster Schritt zum detaillierten Verständnis der strukturellen Grundlage von Enantioselektivität getan.

Ein neuartiges In-vivo-Screeningsystem, welches eine schnelle Detektion von Proteinfaltungs- und Stabilitätsvarianten im Cytoplasma von *Escherichia coli* ermöglicht, wurde von R. Glocks-huber (Zürich, Schweiz) vorgestellt. Es nutzt den Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) und beruht auf der gleichzeitigen Fusion des grün (GFP) und des blau fluoreszierenden Proteins (BFP) mit den N- bzw. C-terminalen Enden eines beliebigen Proteins X. Hohe FRET-Signale von BFP nach GFP im ternären Fusionsprotein werden nur beobachtet, wenn das Protein X gefaltet vorliegt und so BFP und GFP sich in räumlicher Nähe zueinander befinden. Das FRET-Signal verschwindet, wenn durch Entfaltung oder intrazellulären Abbau des Proteins X die Sonden BFP und GFP voneinander entfernt vorliegen. Dieses System wurde zur Untersuchung von V<sub>L</sub>-Antikörper-Domänen angewendet, wobei sich eine eindeutige Korrelation zwischen thermodynamischer Stabilität und Resistenz gegen intrazelluläre Proteolyse zeigte.

Ein wichtiges Ziel von Proteindesign ist die Erzeugung von Polypeptidketten mit spezifischer Ligandenbindung, z. B. für Metallionen, organische Moleküle und Peptide. In der Natur wurden im Verlauf der Evolution Antikörper mit dieser Eigenschaft optimiert. Durch Proteindesign gelang es, deren Spezifität und Affinität für verschiedene Liganden bis hin zu Dissoziationskonstanten im nm-Bereich zu modifizieren. Allerdings steht deren Anwendung sowohl ihre

Größe im Wege als auch die umständliche Herstellung mit *E. coli* als Wirtszelle für die Genexpression. Daher wurden verschiedene alternative Proteingerüste zu „bindenden Templaten“ umfunktioniert. Wie H. Kolmar (Göttingen) zeigte, können die kleinen und extrem stabilen Cysteinknoten-Mini-protease-Inhibitoren (CMI), die durch drei intramolekulare Disulfidbrücken zusammengehalten werden, als Grundgerüst genutzt werden. In einer Machbarkeitsstudie wurden aus einer CMI-Bank (gewonnen durch Randomisierung der Proteaseinhibitor-Schleife und präsentiert auf der Oberfläche von *E. coli*-Zellen) durch Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung Varianten mit hoher Bindungsaffinität zu einem Antikörper isoliert. A. Skerra (München) fasste Ansätze zusammen, bei denen Lipocaline als Gerüst verwendet wurden, die mithilfe von rationalem Design und gerichteter Evolution zum Zwecke der Ligandenbindung umgebaut wurden. Natürlich vorkommende Lipocaline enthalten ein ringförmig geschlossenes, achtsträngig anti-paralleles  $\beta$ -Faltblatt, welches an einer Seite vier Schleifen aufweist wodurch der Eingang zu einer Bindetasche für den Liganden zustande kommt. In einem ersten, rationalen Ansatz wurde die Zn<sup>2+</sup>-Bindestelle der Carboanhydrase in das Retinol-Bindeprotein transplantiert; das so entstandene Protein zeigte hohe Affinität und Spezifität für Zn<sup>2+</sup>. Im zweiten Ansatz wurden durch gerichtete Evolution 16 Aminosäuren eines Bilin-Bindeproteins randomisiert und Varianten, die zur Fluoresceinbindung oder zur Bindung an ein Modell-Hapten fähig waren, durch Phagen-Display isoliert. Da die 3D-Strukturen verschiedener Lipocaline eine ausgeprägte Plastizität in den Schleifenregionen erkennen lassen, ist anzunehmen, dass die lokale Flexibilität die Bindung chemisch unterschiedlicher Liganden ermöglicht.

Protein-Protein- und Biopolymer-Protein-Wechselwirkungen gehören zu den klassischen Fragestellungen der Biochemie und Biophysik; seit der Aufklärung vollständiger Genome sind sie zu einer biologischen Kernfrage geworden. Dass sie auch pharmakologische Relevanz haben, wurde aus den Beiträgen von A. Beck-Sickinger (Leipzig) und H. Lilie (Halle) deutlich. A. Beck-

Sickinger beschrieb den Nutzen von Fluoreszenzmethoden bei der Analyse der Interaktion von Neuropeptid Y mit seinen verschiedenen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Durch systematischen Austausch aller Aminosäuren gegen L-Alanin wurden einige für die Rezeptorbindung wichtige Reste identifiziert. Dabei wurde ein eleganter Ansatz benutzt, der auf induzierter Expression des GFPs und der Methode der Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung beruht. H. Lilie stellte Systeme vor, bei denen für die gentherapeutische Anwendung bestimmte, mit Therapeutika beladene, virusartige Kapsidpartikel zu spezifischen Tumorzellen geleitet werden. Dabei ist die Idee, die Wechselwirkung zwischen Kapsid und Tumorzelle durch Fusion des Augenlinsenproteins  $\gamma$ -Kristallin mit dem Kapsidhüllprotein zu bewerkstelligen. Die vier  $\beta$ -Stränge des  $\gamma$ -Kristallins werden durch Protein-Design so moduliert, dass eine optimale Bindung an tumorspezifische Markerproteine zustande kommt. In einer Machbarkeitsstudie wurde aus einer  $\gamma$ -Kristallin-Bank (hergestellt durch Randomisierung von acht Aminosäuren) eine Variante mit einer extrem hohen Affinität zu IgG-Antikörpern isoliert.

Die Frage der Sequenz-Struktur-Funktions-Beziehung von Proteinen ist, auch nach 30 Jahren intensiver Bemühungen, noch immer ungeklärt; damit ist und bleibt rationales Design von Proteinen bis dato auf Empirie gegründet („Knowledge-based“). Immerhin wurden Fortschritte erzielt, die nun in Computerprogramme integriert werden können, um die Planung und Analyse von Proteindesign-Experimenten zu unterstützen. Vor allem Algorithmen, die Aminosäure-Konformationen durch Vergleich mit Rotamer-Datenbanken modellieren, führten in jüngster Zeit zu vielversprechenden Ergebnissen. Diese wurden in den Vorträgen von H. W. Hellinga (Durham, NC, USA), S. L. Mayo (Pasadena, CA, USA) und W. Hähnel (Freiburg) deutlich. H. W. Hellinga gab einen Überblick über die computergesteuerte Rekonstruktion eines periplasmatischen Bindeproteins, die zu hoch affiner und selektiver Bindung verschiedener Neurotransmitter, Metabolite, Medikamente, gefährlicher Chemikalien und sogar des Sprengstoffs TNT führte. S. L. Mayo beschrieb die

Strategie, mit deren Hilfe er das katalytisch inerte Proteingerüst von Thioredoxin in ein Enzym transformierte, das die nucleophile Hydrolyse eines *p*-Nitrophenylesters beschleunigt. Dabei wurden mithilfe eines virtuellen kombinatorischen „Scans“ 1. eine optimale Position für das katalytische Histidin und 2. notwendige Mutationen für die Erkennung und Bindung des Substrats identifiziert. Die zwei besten Thioredoxinvarianten, die auf diesem Wege identifiziert wurden, enthielten zwei oder drei Aminosäureaustausche. Sie wurden experimentell hergestellt und zeigten signifikante Esteraseaktivität. In diesem Zusammenhang berichtete W. Hähnel von erfolgreichen Versuchen zur Generierung funktioneller 4-Helix-Bündelproteine durch kombinatorische Peptidsynthese. Die Peptidbanken wurden an spezifische Stellen eines Templaats gekoppelt, welches an eine Cellulosemembran gebunden war. Durch die Analyse der immobilisierten Peptide mithilfe der UV/Vis-Spektroskopie konnten einerseits Proteine mit einer His-gebundenen Hämgruppe identifiziert werden, welche ein erhöhtes Redoxpotential und eine enzymatische Hämoxigenaseaktivität zeigten, und andererseits neuartige Proteine mit Cys-gebundenen Kupferzentren. In einem De-novo-Design-Ansatz wurde eine Rotamerselektion angewandt, um den hydrophoben Kern eines Proteins mit einer  $\beta$ -Sandwich-Struktur Computer-gestützt zu assemblieren. Die tatsächliche Bildung dieser Struktur wurde durch FTIR-Spektroskopie verifiziert.

Viele der heute vorkommenden Enzyme zeigen signifikante Ähnlichkeiten bezüglich ihrer Sequenzen, Strukturen und katalytischen Mechanismen.<sup>[6]</sup> Dies weist auf evolutionäre Verwandtschaft hin. Ein gutes Beispiel sind Enzyme mit einer  $(\beta\alpha)_8$ -Fass-Struktur, eine häufig vorkommende und katalytisch vielseitige Faltung.  $(\beta\alpha)_8$ -Fass-Strukturen eignen sich gut für das Enzymdesign, da die für die Katalyse und die für die Stabilität wichtigen Bereiche der Struktur räumlich voneinander getrennt sind. J. Gerlt (Urbana, IL, USA) und R. Sterner

(Köln) zeigten in ihren Vorträgen, wie In-vitro-Evolutionsexperimente Einblicke in die natürliche Evolution des  $(\beta\alpha)_8$ -Fasses geben können. Durch die Anwendung ähnlicher Ansätze, nämlich die Kombination von Zufallsmutagenese in vitro mit genetischer Selektion in vivo, konnten die katalytischen Aktivitäten von zwei  $(\beta\alpha)_8$ -Fass-Enzymen durch die Aktivitäten anderer evolutio-när verwandter Enzyme ersetzt werden.

D. Hilvert (Zürich, Schweiz) demonstrierte, wie die genetische Selektion elegant genutzt werden kann, um die minimalen Anforderungen für eine funktionelle Faltung zu bestimmen.<sup>[7]</sup> Dazu wurden große degenerierte Genbanken hergestellt, wobei die Sekundärstrukturen in einer dimeren, rein  $\alpha$ -helikalen Chorismatsynthase durch einfache binäre Module ersetzt wurden.

Die Basis dieser Module bildete ein limitiertes Set von vier polaren und vier unpolaren Aminosäuren. Die zweistufige Selektion in vivo führte zu katalytisch aktiven Varianten mit bio-physikalischen und kinetischen Eigenschaf-ten, die typisch für natürliche Enzyme sind, obwohl ca. 80% des Pro-

**„Dies sind die Fragen, an denen der Chemiker im elfenbeinernen Turm der molekularen Prinzipien der Struktur und Stabilität von Molekülen seine Freude hat.“**

teins aus vereinfachten Modulen und > 90% des Proteins aus nur acht verschiedenen Aminosäuren bestehen. So konnte die Anzahl der Sequenzen, die mit einer funktionellen Faltung kompatibel sind, quantitativ abgeschätzt werden. Diese Strategie, chemische Information mit genetischer Selektion zu kombinieren, könnte generell nützlich sein, um Proteingerüste mit maßgeschneiderten Aktivitäten zu entwickeln.

In dem abschließenden Vortrag erläuterte A. Plückthun (Zürich, Schweiz) drei Ansätze zur Entwicklung neuartiger Proteine, die in den letzten Jahren in seinem Labor erarbeitet wurden. Zur Selektion von Proteinen und zur Steigerung ihrer Affinität und Stabilität dient das Ribosomen-Display, wobei die Darwinsche Evolution in einem zellfreien System imitiert wird: Je nach den verwendeten Selektionsbedingungen können die molekularen Eigenschaften in eine gewünschte Richtung verändert werden. In Experimenten mit syntheti-

schen Antikörpern, deren Strukturen nach dem Evolutionsprozess geklärt wurden, konnten die molekularen Ursachen ihrer verbesserten Bindungsaffinität und biophysikalischen Eigenschaften identifiziert werden; dies ermöglicht nun das rationale Design der verbesserten Eigenschaften. In einem zweiten Ansatz konnten neuartige Cystein-freie antikörperähnliche Moleküle entwickelt werden, welche natürliche Antikörper in ihrer Stabilität und Expressionsausbeute in *E. coli* weit übertreffen. Diese neu entwickelten Antikörper bieten vielversprechende Perspektiven für intrazelluläre Anwendungen, z.B. als stabile und selektive Inhibitoren von Proteinen. Sie basieren auf synthetischen Genbanken mit entweder Ankyrin- oder Leucin-reichen Wiederholungen, welche natürlicherweise an hoch affinen Protein-Protein-Wechselwirkungen beteiligt sind. Bei den Arbeiten mit synthetischen Ankyrin-Banken konnte eine schnelle Anreicherung durch Ribosomen-Display gegen eine Vielzahl von Zielproteinen beobachtet werden, vermutlich wegen der effizienten Faltung des Proteingerüsts. So wurden funktio-

nelle Inhibitoren des Kanamycinresistenzproteins erhalten, welches strukturell homolog zu eukaryontischen Kinasen ist. Die Erfolge beim Design synthetischer Banken wurden durch Kristallstrukturanalysen dokumentiert, welche auch eine Vorstellung darüber ermöglichen, wie synthetische Moleküle die natürlichen „Wiederholungsproteine“ in ihren biophysikalischen Eigenschaften übertreffen. Im dritten Teil des Vortrags wurden Versuche zur Generierung neuartiger Proteine ohne Orientierung an einem existierenden Proteingerüst diskutiert. In diesem Ansatz werden Polypeptide aus ca. 100 Aminosäuren hergestellt, indem Kassetten miteinander verbunden werden, die jeweils für Sekundärstrukturen kodieren. Solche Experimente könnten dabei helfen zu klären, warum die bekannten Genome nur für eine relativ geringe Zahl verschiedener Proteinfaltungen kodieren.

Dies sind die Fragen, an denen der Chemiker im elfenbeinernen Turm der molekularen Prinzipien der Struktur und Stabilität von Molekülen seine Freude hat. Jedoch bleibt das ultimative Ziel des Proteindesign die Entwicklung

„besserer Proteine“ mit maßgeschneiderten Eigenschaften. Um dieses Ziel zu erreichen, bleibt noch viel an Grundlagenforschung und Entwicklung zu tun. Die 86. Titisee-Konferenz hat hier nicht nur einen Überblick über die aktuellen methodischen Werkzeuge und Trends vermittelt, sondern den Teilnehmern auch genügend Zeit zum Austausch von Ideen und Gedanken über deren Anwendung gelassen. Es war in der Tat der Mühe wert.

- 
- [1] A. N. Lupas, R. B. Russel, A. Engel (Hrsg.), *Structural Bioinformatics*, *J. Struct. Biol.* **2001**, *134*, 93–282.
  - [2] F. H. Arnold (Hrsg.), *Adv. Prot. Chem.* **2001**, *55*, 1–450.
  - [3] S. Brakmann, K. Johnsson (Hrsg.), *Directed Molecular Evolution of Proteins*, Wiley-VCH, Weinheim, **2002**.
  - [4] F. Lottspeich, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 2630–2647; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 2476–2492.
  - [5] M. W. W. Adams, R. M. Kelly (Hrsg.), *Methods Enzymol.* **2002**, *334*, 283–478.
  - [6] J. A. Gerlt, P. C. Babbitt, *Annu. Rev. Biochem.* **2001**, *70*, 209–246.
  - [7] S. V. Taylor, P. Kast, D. Hilvert, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 3408–3436; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3310–3335.