

Untersuchungen von Struktur und Funktion von Proteinen mit einem erweiterten genetischen Code

Virginia W. Cornish, David Mendel und Peter G. Schultz*

Eine allgemeine biosynthetische Methode wurde entwickelt, um ortsspezifisch nichtnatürliche Aminosäuren mit neuartigen sterischen und elektronischen Eigenschaften in Proteine einzuführen. Sie beginnt damit, daß das Codon für die jeweilige Aminosäure durch Oligonucleotid-Mutagenese durch das Nonsense-Codon UAG, ein „Leerzeichen“ des genetischen Codes, ersetzt wird. Für dieses spezielle Codon wird eine Suppressor-tRNA hergestellt und *in vitro* chemisch mit der gewünschten nichtnatürlichen

Aminosäure aminoacyliert. Gibt man diese aminoacylierte tRNA in ein *In-vitro*-Proteinsynthesesystem, das von der mutagenisierten DNA gesteuert wird, wird die gewünschte Aminosäure einheitlich in der angestrebten Stelle im Protein eingebaut. Die Methode wurde jüngst eingesetzt, um die katalytischen Eigenschaften, die Spezifität und die Stabilität einiger Proteine zu untersuchen. Aminosäuren und ihre Analoga mit veränderten Eigenschaften bei der Wasserstoffbrückenbindung, mit verän-

derten sterischen Eigenschaften und mit anderen Konformationen des Rückgrats wurden ebenso ortsspezifisch in Proteine eingebaut wie lichtaktivierbare Aminosäuren und biophysikalische Sonden. Damit sollten weitergehende detaillierte physikalisch-organische Untersuchungen an dieser wichtigen Klasse von Makromolekülen möglich werden.

Stichworte: Aminosäuren · Mutagenese · Proteinsynthese

1. Einleitung

Proteine sind an nahezu allen biologischen Prozessen, einschließlich der Signalübertragung, der Katalyse, der Genregulation und der Immunantwort beteiligt. Bislang verstehen wir allerdings kaum, nach welchen Mechanismen diese Biopolymere, die aus zwanzig einfachen Bausteinen zusammengesetzt sind, ihre bemerkenswert vielfältigen Funktionen ausüben. Ein wichtiges Instrument, um die Faktoren zu untersuchen, die die Proteinstruktur und -faltung, die biomolekulare Erkennung sowie die Katalyse steuern, ist die ortsspezifische Mutagenese. Sie ermöglicht es, eine spezifische Aminosäure in einem Protein gegen jede beliebige der übrigen neunzehn proteinogenen Aminosäuren auszutauschen^[1, 2]. Während bei kleinen Molekülen Analoga mit nahezu allen strukturellen Änderungen synthetisiert werden können, sind die Änderungen an einer bestimmten Stelle eines Proteins auf die herkömmlichen Aminosäuren beschränkt. Idealerweise würde man gerne die sterischen oder elektronischen Eigenschaften einer Aminosäure in einem Protein maßschneidern, um so spezifische Fragen zu Struktur-Funktions-

Beziehungen einzeln beantworten zu können. Die gewünschten Änderungen könnten eine Abwandlung der Acidität, der Nucleophilie, der Wasserstoffbrückenbindungs- oder der hydrophoben Eigenschaften einer Aminosäureseitenkette, eine Änderung oder Einschränkung der Konformation des Protein-Rückgrats oder die Einführung biophysikalischer Sonden sein, z. B. Spin- oder radioaktive Markierungen an einer spezifischen Stelle im Protein. Die Fähigkeit, nichtnatürliche Aminosäuren einzuführen, die nicht durch den genetischen Code spezifiziert werden, würde unsere Möglichkeiten, Struktur und Funktion von Proteinen zu manipulieren und zu untersuchen, erheblich erweitern und die Herstellung neuer Proteine mit neuartigen Eigenschaften ermöglichen.

Es stehen mehrere Methoden zur Verfügung, um nichtnatürliche Aminosäuren in Proteine einzuführen. Durch Festphasen-Peptidsynthese können kleine Proteine (≤ 12 kD) mit neuartigen Aminosäuren in Milligramm-Mengen synthetisiert werden^[4–11], vor allem, seit den jüngsten Fortschritten bei der Segmentsynthese mit anschließender Kondensation^[3]. Auch durch die Protein-Semisynthese, bei der ein synthetisches Peptid unter Bildung eines vollständigen Proteins an ein Proteinfragment gebunden wird, können nichtnatürliche Aminosäuren in Proteine eingebaut werden^[12, 13]. Dieser Ansatz ist kompliziert, weil das Protein an der Einfügungsstelle für das Peptid spezifisch gespalten werden muß und weil die selektive Kopplung der Protein- und Peptidtermini schwierig ist. Auch durch chemische Modifikation der Aminosäureseitenketten ist es möglich, Cofaktoren,

* Prof. P. G. Schultz, V. W. Cornish
Department of Chemistry, University of California
Berkeley, CA 94720 (USA)
Telefax: Int. + 510/643-6890
Dr. D. Mendel
Lilly Research Laboratories
Eli Lilly and Company
Indianapolis, IN 46285 (USA)

Spinmarkierungen und Oligonucleotide in Proteine einzuführen^[14–20]. Dabei sind die Substitutionen allerdings meist auf einfache Derivate reaktiver Aminosäureseitenketten (z. B. Lysin, Cystein, Tyrosin) an der Protein-Oberfläche beschränkt. Alternativ wurden biosynthetische Methoden auf Grundlage chemisch modifizierter Aminoacyl-tRNAs verwendet, um einige biophysikalische Sonden in Proteine zu inkorporieren, die in vitro synthetisiert wurden^[21, 22]. Dies hat jedoch ebenfalls seine Grenzen, da die Mutationen auf Derivate natürlicher Aminosäuren beschränkt sind und die modifizierte Aminosäure an mehreren Stellen eingeführt wird. Außerdem werden an der ausgewählten Stelle sowohl modifizierte als auch natürliche Aminosäuren eingebaut, weil es schwierig ist, die endogenen Aminoacyl-tRNAs aus dem In-vitro-Extrakt vollständig zu entfernen.

Nach einem weiteren biosynthetischen Ansatz ist es auch erstmals möglich, ortsspezifisch mehrere nichtnatürliche Aminosäuren in Proteine einzuführen^[23–25]. In diesem Artikel beschreiben wir die Methode und ihre derzeitigen Möglichkeiten und Grenzen. Darüber hinaus werden Anwendungen beschrieben, bei denen man durch Einbau nichtnatürlicher Aminosäuren mit neuartigen elektronischen, sterischen und biophysikalischen Eigenschaften in Proteine zu neuen Erkenntnissen über die Mechanismen der Enzymkatalyse, die Proteinstabilität und die biomolekulare Erkennung gelangte.

2. Die Methode

2.1. Das Prinzip

Die Möglichkeit, nichtnatürliche Aminosäuren ortsspezifisch in Proteine einzubauen zu können, beruht auf folgenden Befunden: 1) Zwar gibt es drei Stop-Codons (UAA, UAG und UGA), doch wird nur eines für die Beendigung der Proteinsynthese (Schema 1) benötigt, so daß der genetische Code (Schema 2) zwei „Leerzeichen“ hat^[26, 27]. 2) Suppressor-tRNAs, tRNAs also, die als Antwort auf ein Stop-Codon eine der gewöhnlichen

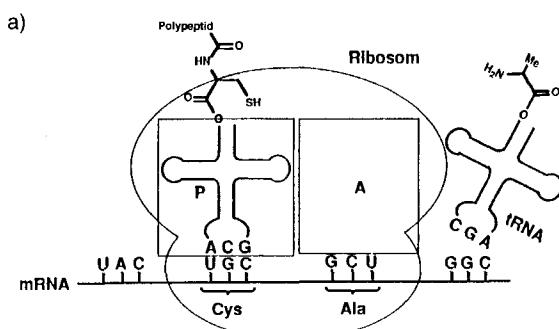
Aminosäuren einbauen, sind in vivo und in vitro effizient^[28]. 3) Die Anticodon-Codon-Erkennung ist unabhängig von der Aminosäure am Acceptorstamm der tRNA (Adapter-Hypothese)^[29, 30]. 4) Der Translationsapparat weist eine relativ breite Substratspezifität auf^[31, 32]. Unter Berücksichtigung dieser Tatsachen wurde die folgende Strategie entwickelt (Schema 3): Das Codon für die zu ersetzende Aminosäure wird durch gängige Oligonucleotid-gerichtete Mutagenese durch das Stop-Codon UAG ersetzt^[33]. Eine Suppressor-tRNA, die dieses Codon erkennt, wird chemisch mit der gewünschten nichtnatürlichen Aminosäure acyliert. Die Zugabe des mutagenisierten Gens oder der mRNA und der aminoacylierten Suppressor-tRNA zu einem In-vitro-Extrakt, der die Proteinsynthese katalysiert, liefert ein mutiertes Protein, das die nichtnatürliche Aminosäure an der gewünschten Stelle trägt^[23, 24]. Für die Ausarbeitung dieser Methode ist Voraussetzung, daß die jeweils erforderliche Suppressor-tRNA hergestellt werden kann, daß es ein allgemein anwendbares Verfahren zur Acylierung der tRNA mit nichtnatürlichen Aminosäuren gibt und daß hinreichende Mengen an Protein in vitro hergestellt werden können, um damit aussagekräftige mechanistische oder Strukturuntersuchungen durchführen zu können.

2.2. Die Suppressor-tRNA

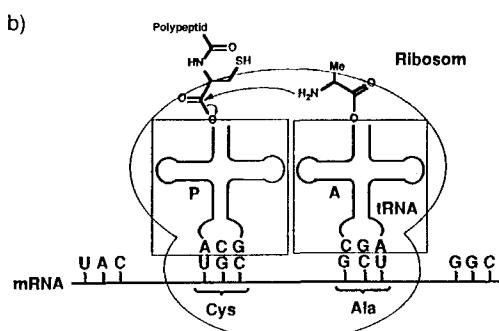
Für den einfachen Einbau einer nichtnatürlichen Aminosäure in ein Protein ist eine tRNA erforderlich, die vom Proteinsyntheseapparat gut genug erkannt wird, um ein Stop-Codon mit hoher Effizienz zu überlesen. Eine solche Suppressor-tRNA kann jedoch kein Substrat für irgendeine der Aminoacyl-tRNA-Synthetasen sein, die im In-vitro-Proteinsyntheseextrakt vorkommen. Wenn die Suppressor-tRNA von einer der Aminoacyl-tRNA-Synthetasen erkannt würde, könnte die tRNA korrekt gelesen (Desacylierung der nichterkannten Aminosäure) und anschließend mit einer der zwanzig natürlichen Aminosäuren aminoacyliert werden. Die Erkennung würde dann dazu führen, daß das Stop-Codon nur mit geringer Effizienz unterdrückt oder außer der gewünschten nichtnatürlichen Amino-

Peter G. Schultz, geboren 1956 in Cincinnati, Ohio, studierte am California Institute of Technology und promovierte über das erste synthetische sequenzselektive DNA-Spaltungsreagens. Nach einem Postdoktorandenfenthalt am Massachusetts Institute of Technology ging er 1985 an die University of California, Berkeley, wo er Professor für Chemie, Principal Investigator am Lawrence Berkeley Laboratory und Investigator am Howard Hughes Medical Institute ist. Seine Forschungsinteressen umfassen die Organische Chemie, die Molekularbiologie sowie die Immunologie und konzentrieren sich auf Mechanismen der molekularen Erkennung, die Katalyse in biologischen Systemen sowie die Isolierung und das Design von Verbindungen mit neuartigen biologischen (und pharmazeutischen) Eigenschaften, wie katalytische Antikörper, DNA-bindende Proteine, Peptide und Oligonucleotide, RNA-Verbindungen sowie nichtnatürliche Biopolymere (z. B. Oligourethane, Oligosulfone). Er entwickelte Verfahren zum Einbau von nichtnatürlichen Aminosäuren in Proteine und zur Manipulation von Enzymspezitäten durch chemische und biologische Mutagenese. Zu seinen Ehrungen zählen der Waterman Award der National Science Foundation, der Pure Chemistry Award der American Chemical Society, der Young Investigator Award der Protein Society sowie der Wolf Prize im Jahr 1994.

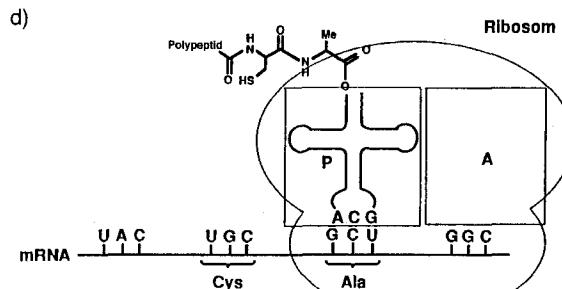
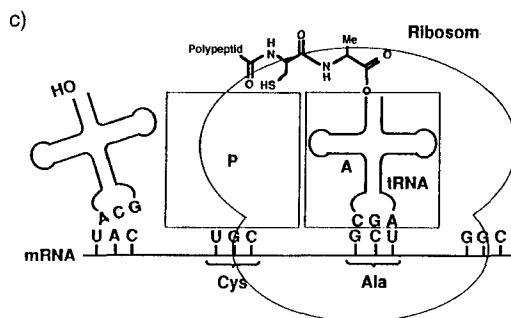




UUU	Phe	UCU	Ser	UAU	Tyr	UGU	Cys
UUC		UCC		UAC		UGC	
UUA	Leu	UCA		UAA	TERM	UGA	TERM
UUG		UCG		UAG		UGG	Trp
<hr/>							
CUU		CCU		CAU	His	CGU	
CUC	Leu	CCC		CAC		CGC	
CUA		CCA		CAA	Gln	CGA	Arg
CUG		CCG		CAG		CGG	
<hr/>							
AUU	Ile	ACU		AAU	Asn	AGU	Ser
AUC		ACC		AAC		AGC	
AUA	Met	ACA		AAA	Lys	AGA	Arg
AUG		ACG		AAG		AGG	
<hr/>							
GUU		GCU		GCA	Ala	GAU	Asp
GUC		GCC		GCA		GAC	
GUA	Val	GCG		GAA	Glu	GAA	
GUG		GCG		GAG		GGA	Gly



Schema 2. Der genetische Code, TERM = Stop-Codon.

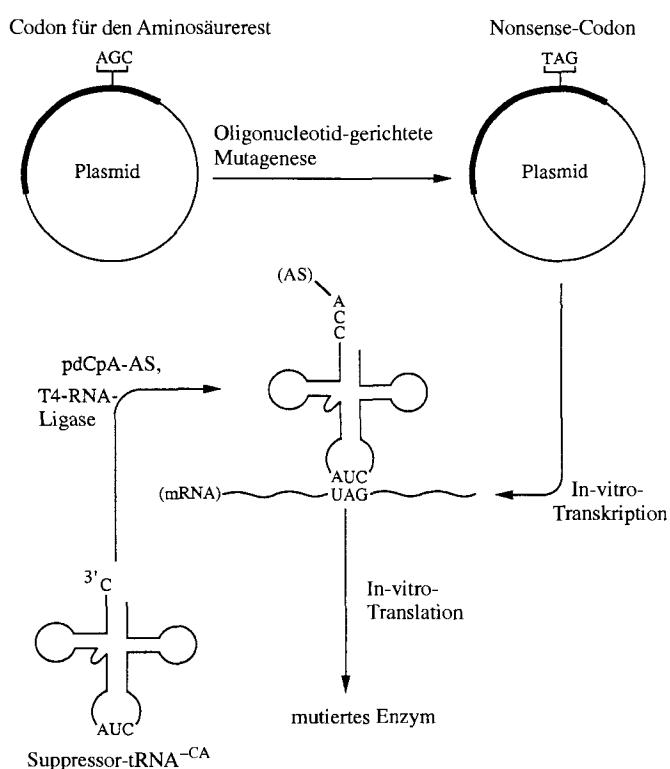


Schema 1. Schematische Darstellung der Proteinbiosynthese; a) Bindung der Aminoacyl-tRNA an den ribosomalen Komplex; b) Knüpfung der Peptidbindung; c) Dissoziation der desacylierten tRNA; d) Translokation des Ribosoms.

säure auch eine der gewöhnlichen Aminosäuren als Antwort auf das Stop-Codon eingebaut wird.

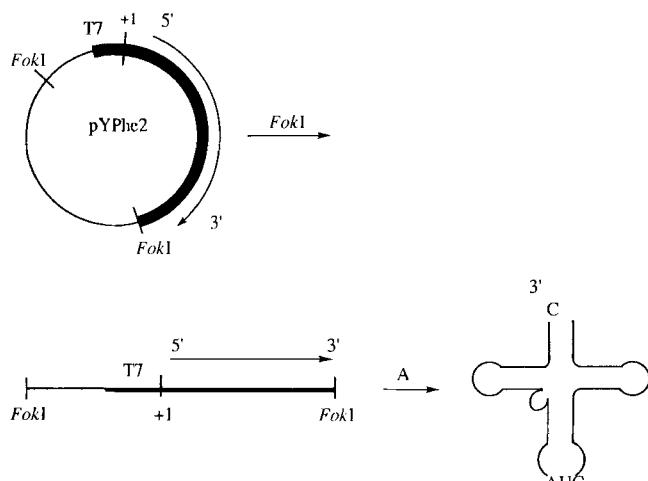
Wir begannen, eine Amber-Suppressor-tRNA (eine tRNA, die das Stop-Codon UAG erkennt) zu konstruieren, die sich dadurch von der Phenylalanyl-tRNA aus Hefe ableitet, daß die Reste 34 bis 37 in Übereinstimmung mit der Regel von Yarus durch 5'-CUAA-3' ersetzt sind^[35-37]. Von dieser Suppressor-tRNA ist bekannt, daß sie in vitro effizient erkannt wird^[34]; außerdem ist

sie wahrscheinlich ein schlechtes Substrat für die Aminoacyl-tRNA-Synthetasen aus *E. coli*^[38]. Weiterhin wurde eine von *E. coli*-tRNA^{Gly}^[39] abgeleitete Suppressor-tRNA verwendet, um UAG-Codons in kurzen Peptiden in einem Translationssystem aus Kaninchen-Reticulocyten zu unterdrücken^[25]. Beide Suppressor-tRNAs können leicht in relativ großen Mengen durch



Schema 3. Methode zur ortsspezifischen Inkorporation nichtnatürlicher Aminosäuren (AS) unter Bildung eines mutierten Enzyms.

Run-off-Transkription hergestellt werden (Schema 4)^[40, 41]. Auch wenn sie in vitro synthetisiert werden und von daher wahrscheinlich keine modifizierten Basen enthalten^[42], bauen sie beide die nichtnatürlichen Aminosäuren effizient ein; außerdem wird bei optimaler Mg²⁺-Konzentration nur wenig überle-

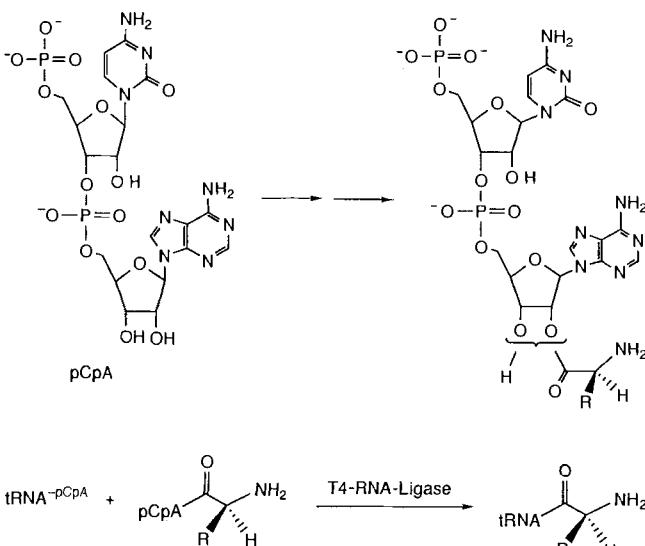


Schema 4. Herstellung von tRNA_{CUA}^{Phe} durch Run-off-Transkription. Stark gezeichnet ist die DNA-Sequenz, die tRNA_{CUA}-^{CA} codiert. A) 1. T7-RNA-Polymerase, NTPs; 2. Enzymextraktion, Fällung mit Ethanol. Es werden 1000 tRNA-Kopien pro DNA-Kopie erhalten, d.h. ca. 1 mg tRNA pro 30 µg verdauter DNA-Matze.

sen, d.h. es werden kaum andere als die gewünschten nichtnatürlichen Aminosäuren als Antwort auf das Codon UAG eingefügt.

2.3. Aminoacylierung der tRNA

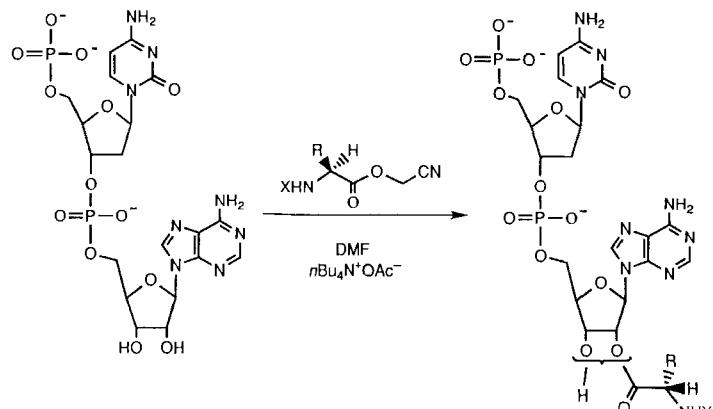
Nun galt es, eine allgemein anwendbare Methode zu entwickeln, nach der die tRNA mit jeder beliebigen nichtnatürlichen Aminosäure acyliert werden kann. Eine enzymatische Aminoacylierung der tRNA mit Aminoacyl-tRNA-Synthetasen ist wegen deren hoher Spezifität nicht allgemein möglich^[43, 44]. Eine direkte chemische Acylierung ist wahrscheinlich nicht praktikabel, weil die tRNA sehr viele reaktive Stellen aufweist. Daher wurde auf eine Variante einer zweistufigen Methode zurückgegriffen, die ursprünglich von Hecht et al.^[45] entwickelt worden war (Schema 5): Das Dinucleotid pCpA wird chemisch mit einer



Schema 5. Strategie für die chemische Aminoacylierung von tRNA_{CUA}^{Phe}. R = Aminosäureseitenkette.

N²-geschützten Aminosäure acyliert und dann enzymatisch an eine um das terminale Dinucleotid pCpA am 3'-Acceptorstamm verkürzte tRNA, tRNA^{-CA}, gebunden^[46]. Die verkürzte Suppressor-tRNA kann direkt durch Run-off-Transkription eines FokI-linearisierten Plasmids, das das tRNA-Gen codiert, gewonnen werden^[41].

Die Acylierung des Dinucleotids wird durch Nebenreaktionen wie Diacylierung und Acylierung der exocyclischen Aminogruppen der Basen erschwert, so daß das gewünschte Produkt nur in geringer Ausbeute entsteht. Darüber hinaus ist die Aminoacyl-tRNA-Bindung bei pH 7–8, dem optimalen pH-Bereich für eine hohe Aktivität der T4-RNA-Ligase, relativ instabil^[47, 48]. Nach unseren Untersuchungen reagiert der Cyanomethylester einer Aminosäure selektiv mit den 2',3'-Hydroxygruppen der Ribose zum monoacylierten Produkt, so daß ein Schutz des Dinucleotids vor der Aminoacylierung überflüssig wird (Schema 6)^[49].



Schema 6. Vereinfachte Acylierung von pdCpA mit einem Aminosäurecyanomethylester. R = Aminosäureseitenkette, X = Schutzgruppe.

Weiterhin wurde Cytidin im Dinucleotid durch Desoxycytidin ersetzt, was die Synthese enorm vereinfacht und wodurch eine 2'-OH-Gruppe entfernt wird, ohne die biologische Aktivität zu beeinflussen. Die α -Aminogruppe der Aminosäure und alle reaktiven Seitengruppen werden vor der Acylierung des Dinucleotids mit der Nitroveratryloxycarbonyl(NVOC)-Gruppe unter Bildung der entsprechenden Carbamate, Ester und Ether geschützt^[50, 51]. Diese Schutzgruppe kann nach der Verknüpfung photochemisch unter schwach sauren Bedingungen glatt von der intakten Aminoacyl-tRNA ohne Desaminoacylierung abgespalten werden^[49]. Für lichtempfindliche Aminosäuren kann die Biphenylisopropoxy carbonyl(BPOC)-Gruppe verwendet werden; diese wird von Aminoacyl-pdCpA vor der Kopplung an tRNA^{-CA} unter schwach sauren Bedingungen abgespalten^[25, 49]. Dieses Verfahren zur Aminoacylierung ist direkt, liefert die Produkte in hohen Ausbeuten (sowohl bei der Aminoacylierung als auch bei der Kopplung von Dinucleotid und tRNA) und ist auf Aminosäuren mit unterschiedlichsten Seitenketten anwendbar^[48, 24]. Nichtsdestoweniger könnte dieser Schritt mit einer nichtspezifischen „Aminoacyl-tRNA-Synthetase“, einer Ligase, einer mutagenisierten Synthetase oder einem katalytischen Antikörper erheblich vereinfacht werden^[52–54].

2.4. In-vitro-Proteinsynthese

Die mutierten Proteine werden *in vitro* synthetisiert, weil es keine allgemein anwendbare Methode gibt, um große Mengen an aminoacylierter Suppressor-tRNA in intakte, sich teilende Zellen einzuführen^[55]. Derzeit verwenden wir ein In-vitro-Transkriptions/Translations-Proteinsynthesesystem aus *E. coli*^[56, 57, 24], in Form eines *E. coli*-S-30-Extrakts, der alle für die Transkription und die Translation erforderlichen Proteine und RNAs enthält. Nucleotid-Triphosphat, bakterielle tRNAs, Phosphoenolpyruvat, Pyrophosphatase, einige Salze (Mg^{2+} - und Ca^{2+} -Konzentrationen können die Proteinausbeuten erheblich beeinflussen) und Cofaktoren sowie die DNA, die das gewünschte Gen codiert, werden zu dem S-30-Extrakt gegeben, um die Proteinsynthese *in vitro* zu rekonstituieren. Typischerweise ist das betreffende Gen mit einem starken T7- oder bakteriellen RNA-Polymerasepromotor verknüpft. Die In-vitro-Reaktion kann in Volumina zwischen 30 µL und 5 mL ausgeführt werden. Der S-30-Extrakt kann ohne größeren Aufwand im 2 L-Maßstab hergestellt werden, die Suppressor-tRNA in 30 mg-, die Aminoacyl-pdCpA in 10 nmol- und das Plasmid in 12 mg-Mengen. Ein Hauptnachteil der In-vitro-Proteinsynthese bleibt die relativ geringe Menge an Protein, die gewonnen werden kann. Unabhängig davon, ob das Protein mit Plasmid-DNA durch ein *E. coli*-Transkriptions/Translationssystem oder ob ein Peptid mit einer mRNA durch ein Kaninchen-Reticulocyten-Translationsystem synthetisiert wurde, wurden Ausbeuten von mehr als 100 µg mL⁻¹ im allgemeinen nicht erreicht^[24]. Die Effizienz der Proteinexpression hängt *in vivo* von vielen Faktoren ab, z. B. von der Stärke des RNA-Polymerasepromoters, von der jeweiligen Ribosomenbindungsstelle, vom Einsatz des Codons und von der Stabilität sowie der Sekundärstruktur der mRNA^[58, 59]. Allerdings korrelieren die Proteinausbeuten *in vitro* nicht notwendigerweise mit denen, die *in vivo* erreicht werden, und wir haben noch keine einfachen und allgemein gültigen Regeln aufstellen können, durch deren Einhaltung hohe Ausbeuten bei der In-vitro-Proteinexpression garantiert werden könnten.

2.5. Möglichkeiten der Methode

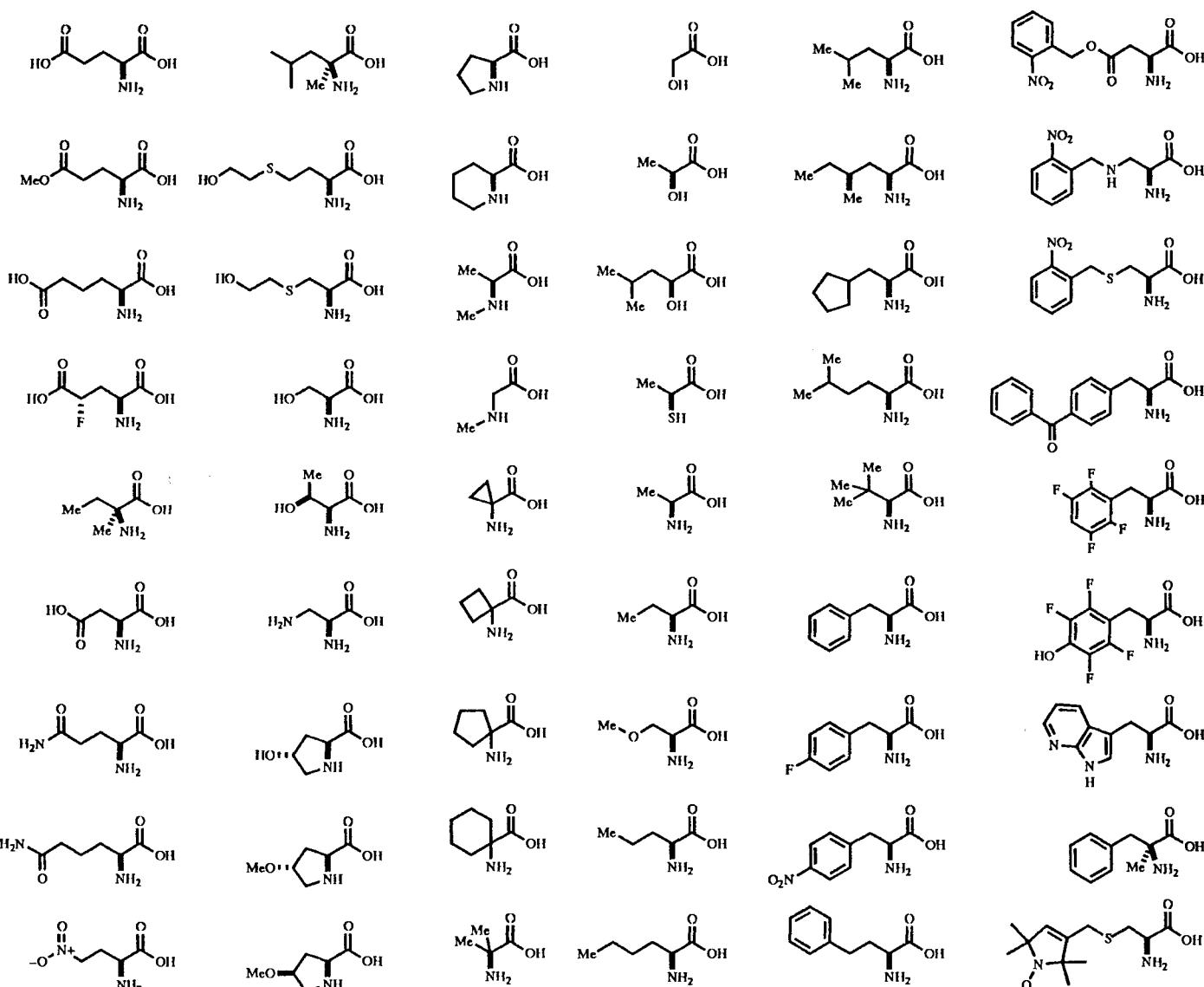
Die relativ breite Substratspezifität der Elongationsfaktoren und der Peptidyl-Transferase lässt erwarten, daß viele unterschiedliche Aminosäuren in Proteine eingebaut werden können^[31, 32]. Dies ist in der Tat der Fall: Über siebzig Säuren (siehe Schema 7) wurden an mehr als zwanzig Stellen mit der beschriebenen Methode in unterschiedliche Proteine eingebaut. Darunter sind in ihrer Konformation eingeschränkte Aminosäuren (z. B. 2,4-Methanoprolin (nicht gezeigt), Cyclopropylglycin und α -Methyl-L-leucin), Aminosäuren mit Spin- oder Photoaffinitätsmarkierungen in der Seitenkette, Aminosäuren mit unterschiedlichen pK_A -Werten und mit anderen Eigenschaften bei der Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen, blockierte Aminosäuren, α -Hydroxysäuren und Aminosäuren mit ungewöhnlichen sterischen Eigenschaften (z. B. *tert*-Butylglycin). Die Effizienz der Suppression hängt in weiten Grenzen von der Aminosäure ab und reicht von 100 % bei der Substitution von Gln 28 durch L-Norleucin im Repressor 434^[60] bis 10 % für den

Einbau von α -Methyl-L-leucin in das T4-Lysozym^[61]. Obwohl die Suppressionseffizienz einer Aminosäure nicht *a priori* vorausgesagt werden kann, werden einige Trends erkennbar, wenn die Eigenschaften der getesteten Aminosäuren mit ihren Suppressionseffizienzen korreliert werden^[61, 62]. Im allgemeinen werden große, hydrophobe Aminosäuren wie *p*-Benzoyl-L-phenylalanin besser eingebaut als kleine Aminosäuren wie Alanin und Glycin oder geladene Aminosäuren wie Homoglutamat und Ornithin. Diese Korrelation stimmt mit dem Befund überein, daß große, hydrophobe Aminosäuren wie Trp und Phe fester an den Elongationsfaktor EF-Tu aus *E. coli* binden als andere natürliche Aminosäuren wie Ala, Glu und Lys^[63].

Die Konfiguration der Aminosäure beeinflußt ebenfalls die Effizienz der Suppression. Während L-Aminosäuren und einige α,α -disubstituierte Aminosäuren wie α -Aminoisobuttersäure (AIB) und α -Aminocyclopentylcarbonsäure in Proteine inkorporiert werden können, werden D-Aminosäuren offenbar vom Translationsapparat nicht umgesetzt^[61]. Diese konfigurativen Erfordernisse stimmen im wesentlichen mit Ergebnissen aus früheren Untersuchungen über die Affinität einiger nichtnatürlicher Aminoacyl-tRNAs zu *E. coli*-EF-Tu und zum Ribosom überein^[31]. Interessanterweise legten schon frühere Experimente, mit denen die Bindung von Aminoacyl-tRNA oder von Aminoacyl-CpA an die A-Bindungsstelle von *E. coli*-Ribosomen und die Beteiligung dieser Verbindungen an der Peptidelongation untersucht wurde, die Vermutung nahe, daß achirale Aminosäuren wie AIB vom *E. coli*-Proteinsyntheseapparat nicht als Substrate genutzt werden können^[64–66].

Einige Mutationen im Gerüst werden vom Translationsapparat akzeptiert^[67]. Anders als *N*-Ethyl-L-alanin werden *N*-Methyl-L-phenylalanin (in Kaninchenreticulocyten), *N*-Methylglycin (in *E. coli*) und *N*-Methyl-L-alanin (in *E. coli*) ortsspezifisch in Proteine eingebaut^[68]. Pipocolinsäure, das sechsgliedrige Analogon des Prolins, wird vom *E. coli*-System akzeptiert, die ringkontrahierten Prolinanaloga Aziridin-2-carbonsäure und Azetidin-2-carbonsäure hingegen nicht. (Dies kann allerdings auch von der chemischen Instabilität herrühren statt von einem Ausschluß durch den Biosyntheseapparat.) Tirell et al.^[69, 70] gelang allerdings die biosynthetische Inkorporation von L-Azetidin-2-carbonsäure in Polypeptide. Auch der Austausch von α -Aminosäuren aus dem Proteintrügrat gegen β - und γ -Aminosäuren wie β -Alanin, γ -Aminobuttersäure und weitere Homologe^[71] sowie gegen Dipeptide und Dipeptidmimetika^[72] wurde beschrieben. Bis heute waren jedoch alle Versuche, diese Aminosäuren durch *E. coli*- oder Kaninchenreticulocyten-Lysate einzubauen, ohne Erfolg.

Die genaue Struktur einer Aminosäure beeinflußt ebenfalls erheblich die Effizienz der Suppression. Obwohl beispielsweise die spinmarkierten Aminosäuren **1** und **2** beide die 1-Oxyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidingruppe enthalten (Schema 8), konnte nur **1** *in vitro* inkorporiert werden^[62]. Außerdem kann die Effizienz der Suppression vom In-vitro-Proteinsynthesesystem (prokaryontisch oder eukaryontisch) abhängen: L-4'-(3-Trifluormethyl-3*H*-diazirin-3-yl)phenylalanin wurde von einem *E. coli*-Transkriptions/Translationsssystem nur zu < 10 % eingebaut^[73], von einem Kaninchenreticulocyten-Extrakt dagegen zu > 40 %^[74]. Im Gegensatz zu den *In-vivo*-Ergebnissen^[35–37] scheint kein wesentlicher Zusammenhang zwischen den Codons, die dem UAG-Codon benachbart sind, und der Suppres-



Schema 7. Beispiele von Aminosäuren und deren Analoga, die mit Erfolg in Proteine eingebaut wurden.

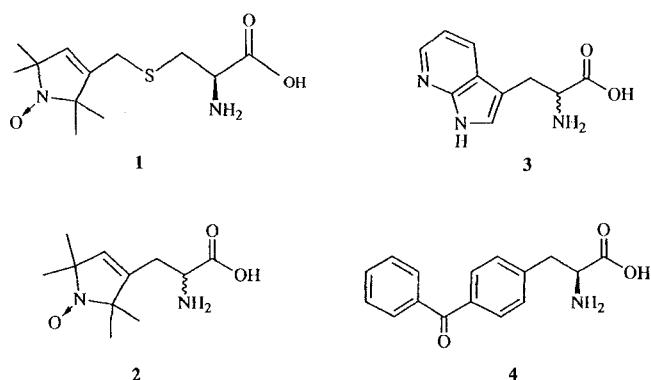
sionseffizienz zu bestehen^[62]. Indem weitere nichtnatürliche Aminosäuren in Proteine eingeführt werden, sollten sich zusätzliche Erkenntnisse zur Spezifität des Translationsapparates

und über die Faktoren, die die In-vitro-Suppressionseffizienz bestimmen, durch die beschriebene Methode gewinnen lassen.

2.6. Zukünftige Aufgaben

Zukünftige Arbeiten werden sich darauf konzentrieren, die Anwendungsmöglichkeiten der Methode dadurch auszuweiten, daß die Proteinausbeuten gesteigert werden, daß der Einfluß der Aminosäure auf die Suppressionseffizienz minimiert wird und daß Verfahren entwickelt werden, um mehr als eine Aminosäure auf einmal in ein Protein einzubauen.

Um die Proteinausbeuten zu erhöhen, muß die In-vitro-Proteinsynthese verbessert werden. Höhere Proteinausbeuten können möglicherweise erzielt werden, wenn In-vitro-Systeme verwendet werden, die aus anderen Quellen stammen^[55], oder wenn auf alternative Ansätze, z. B. In-vitro-Durchflußsysteme, zurückgegriffen wird^[75]. Da das *E.-coli*-Transkriptions/Translationssystem bei 37 °C nur ca. 1 Stunde aktiv ist, können die



Schema 8. Strukturen biophysikalischer Sonden, die für einen Einbau in T4L getestet wurden.

Proteinexpressionsausbeuten vielleicht erhöht werden, wenn man andere Lysate, z. B. lysierte Sphäroplasten, verwendet, in denen die Proteinsynthese über längere Zeit ablaufen kann^[76, 77].

Die Suppressionseffizienzen können verbessert werden 1. durch die Veränderung der Nucleotide im tRNA-Molekül, die an der tRNA-Erkennung durch die Elongationsfaktoren, das Ribosom oder die Aminoacyl-tRNA-Synthetase beteiligt sind; 2. durch Verwendung von Suppressor-tRNAs aus unterschiedlichen Spezies (wobei die tRNA verändert werden muß, so daß sie von der zugehörigen Aminoacyl-tRNA-Synthetase nicht mehr erkannt wird); 3. durch Entfernen des Release-Faktors RF-1 (aus *E. coli*), der mit der Suppressor-tRNA bei der Erkennung des UAG-Codons konkurriert, aus dem In-vitro-Extrakt^[78] oder 4. durch Modifizieren der Spezifität des Elongationsfaktors EF-Tu. Man strebt weiterhin an, Proteine mit mehreren nichtnatürlichen Aminosäuren herstellen zu können. Eine einzelne nichtnatürliche Aminosäure kann an mehr als einer Position in ein Protein eingebaut werden, indem man einfach mehrere UAG-Codons in die codierende Sequenz einführt^[79]. Vorläufige Versuche, unterschiedliche Aminosäuren in ein Protein einzuführen, haben sich darauf konzentriert, auch die anderen Nonsense-Codons^[80], selten vorkommende Codons^[81] oder ein 65. Codon zu verwenden, das sich nicht aus den Standard-Nucleotiden zusammensetzt^[82].

3. Anwendungen

Im folgenden Abschnitt werden einige Anwendungsbeispiele der Methode diskutiert, um einerseits die vielfältigen Möglichkeiten aufzuzeigen und andererseits zu erläutern, welche Art von Fragen angegangen werden können, indem man nichtnatürliche Aminosäuren in Proteine einbaut. Wir behandeln die ortsspezifische Inkorporation biophysikalischer Sonden in Proteine, die Konstruktion von lichtaktivierbaren, blockierten Proteinen und Untersuchungen zur Proteinstabilität, zum Enzymmechanismus und zur Signalübertragung.

3.1. Biophysikalische Sonden

Einige Aminosäuren, die als biophysikalische Sonden dienen können, wurden durch die beschriebene Mutagenese in Proteine eingebaut (Schema 8). Eine neuartige spinmarkierte Aminosäure 1, eine nichtnatürliche fluoreszierende Aminosäure 3 und ein effektives quervernetzendes Reagens 4 wurden ortsspezifisch an unterschiedlichen externen und internen Positionen im T4-Lysozym (T4L) mit guter Ausbeute eingebaut^[62]. Mit der kürzlich entwickelten Loop-Gap-Resonator-Technik wurde das ESR-Spektrum von etwa 10 µL einer 1 µM Lösung von gereinigtem T4L aufgenommen, das die spinmarkierte Aminosäure 1 enthielt. Der Austausch von einem der Tryptophanreste in T4L gegen 7-Azatryptophan 3 führte zu einer Rotverschiebung des Fluoreszenz-Emissionsmaximums. In anderen Fällen wurden Aminosäuren, die aktive Nitren-, Carben- und Ketylradikale bilden, an spezifischen Positionen erfolgreich in das ras-Protein *ras* p21 und in T4L eingebaut^[62, 83]. Prinzipiell können Photoaffinitätssonden benutzt werden, um Schlüsselkomponenten komplexer biochemischer Prozesse, wie der Signalübertragung oder der Genaktivierung, zu identifizieren.

Mit erheblich größerem Aufwand wurde eine ausreichende Menge an gereinigtem T4L hergestellt, das in der Position Ala 82 mit [¹³C]Ala spezifisch markiert war, und die Protonenresonanzen des markierten Restes selektiv im nativen und im denaturierten Zustand ¹³C-entkoppelt gemessen (Abb. 1)^[84]. Auch konnte

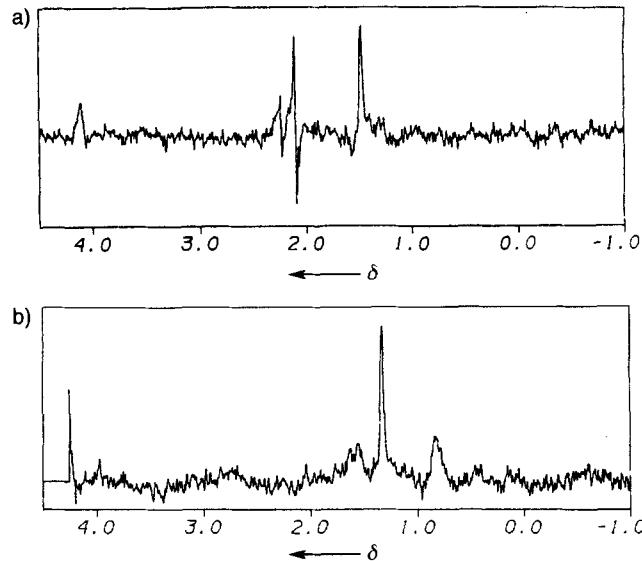


Abb. 1. a) ¹³C-detkoppeltes ¹H-NMR-Spektrum der T4L-Variante Ala 82 → [¹³C]Ala; b) ¹³C-detkoppeltes ¹H-NMR-Spektrum der denaturierten Form der gleiche Probe.

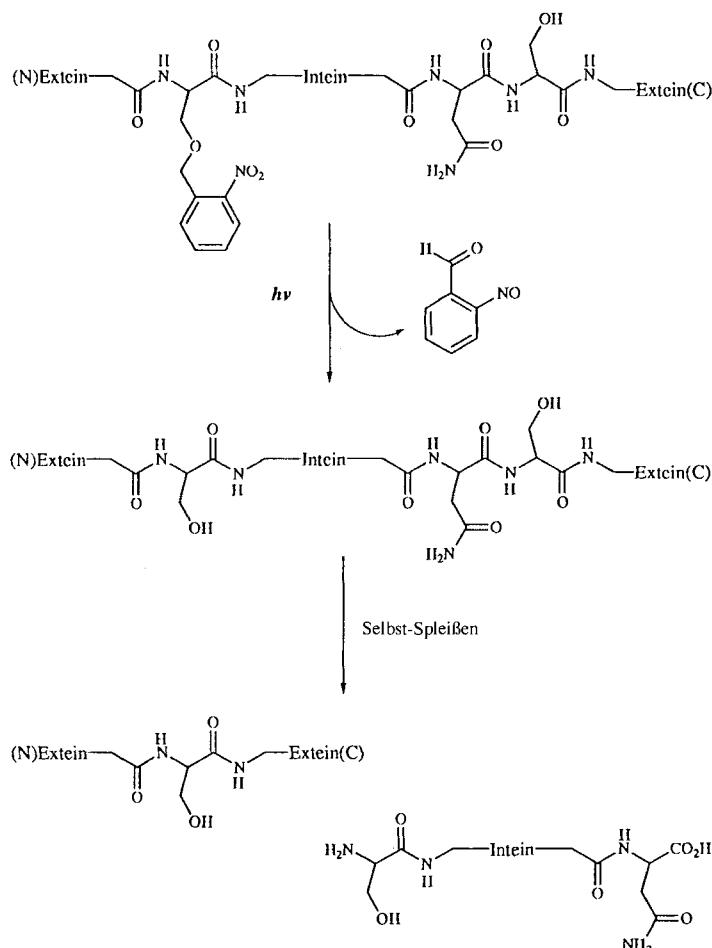
eine ausreichende Menge an Staphylococcus-Nuclease (SNase) erhalten werden, die die nichtnatürliche Aminosäure Homoglutamat statt Glu 43 enthielt, so daß die Proteinstruktur der Mutante mit einer Auflösung von 2.4 Å kristallstrukturanalytisch bestimmt werden konnte^[85]. Dadurch, daß Sonden, die die lokale Struktur und Dynamik erfassen können, ortsspezifisch in Proteine eingebaut werden können, sollte man so zu genaueren Erkenntnissen hinsichtlich der Faltung und der Stabilität von Proteinen, der Änderungen ihrer Konformation und ihrer Wechselwirkungen mit anderen Proteinen, kleinen Molekülen und Membranen gelangen. Es sollte beispielsweise möglich sein, die gefalteten und die ungefalteten Proteinen ortsspezifisch spektroskopisch zu untersuchen, Denaturierungskurven von unterschiedlichen Regionen eines Proteins aufzunehmen oder lokale Strukturveränderungen zu verfolgen, die während der Proteintranslokation stattfinden.

3.2. Blockierte Proteine

Niedermolekulare blockierte Substanzen, also inaktive Vorstufen, die schnell durch Photolyse aktiviert werden können, sind nützliche Werkzeuge für biochemische Untersuchungen^[86, 87]. Die Mutagenese mit nichtnatürlichen Aminosäuren eröffnet eine einzigartige Möglichkeit, lichtaktivierbare blockierte Proteine herzustellen. Beispielsweise wurde Asp 20 im aktiven Zentrum von T4L durch die nichtnatürliche Aminosäure *O*- β -Nitrobenzylaspartat ersetzt^[88]. Da Asp 20 für die katalytische Aktivität unverzichtbar ist, ist das resultierende Protein inaktiv. Durch photolytische Entfernung der Schutzgruppe von dem intakten,

modifizierten Protein erlangt es seine volle katalytische Aktivität zurück.

In einem zweiten Beispiel wurde in der Vent-DNA-Polymerase ein Serinrest, von dem man vermutete, daß er am Selbst-Spleißen des Proteins beteiligt ist, durch *O*-Nitrobenzylserin ersetzt (Schema 9)^[89]. Bei der so modifizierten blockierten Poly-



Schema 9. Lichtinduziertes Selbst-Spleißen der Vent-Polymerase mit einem blockierten Serin-Analogon. Der Mechanismus des Protein-Selbst-Spleißens ist nicht bekannt.

merase trat kein Selbst-Spleißen mehr auf, so daß das Protein vollständig isoliert werden konnte. Durch Photolyse des nichtgespleißen Proteins wird die Nitrobenzyl-Schutzgruppe abgespalten und so das Selbst-Spleißen des Proteins eingeleitet. Dies beweist eindeutig, daß das Protein-Spleißen posttranslational stattfindet.

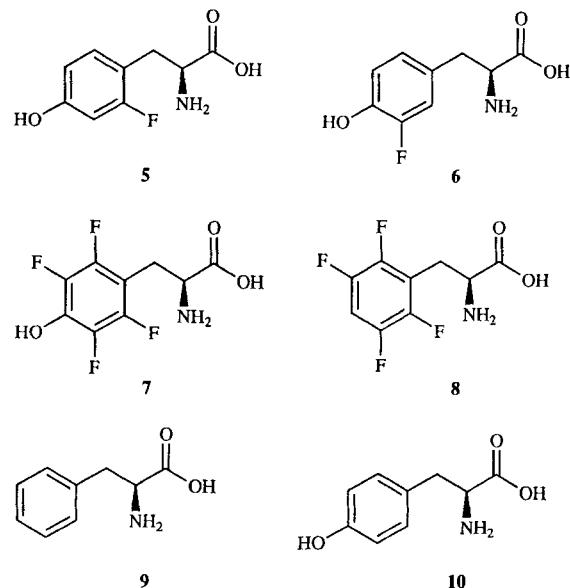
Indem solche blockierten Proteine konstruiert werden können, werden viele zeitlich aufgelöste Experimente möglich, durch die Katalysemechanismen, die biomolekulare Erkennung und die Proteinfaltung untersucht werden können.

3.3. Proteininstabilität

Durch Mutagenese mit nichtnatürlichen Aminosäuren wurden definierte Mutationen in Proteine eingeführt, um so eine genauere Vorstellung von den Faktoren zu gewinnen, die die Stabilität der

Proteine bestimmen^[90, 91]. Dabei ist besonders die Rolle der Wasserstoffbrückenbindungen für die Stabilität und die Faltung der Proteine von Bedeutung. Obwohl Wasserstoffbrückenbindungen bei der Bildung der Sekundär- und der Tertiärstruktur der Proteine wichtig sind^[92, 93], war ihr Beitrag zur Proteininstabilität schwer abzuschätzen^[94, 95]. Werte für die Stabilisierung der Struktur durch Wasserstoffbrückenbindungen aus Versuchen mit Mutanten, bei denen ein Partner eines durch Wasserstoffbrückenbindungen verbundenen Paars entfernt wurde, variieren beträchtlich abhängig von Art und der lokalen Umgebung der Wasserstoffbrückenbindung^[90, 96]. Darüber hinaus besteht bei solchen Untersuchungen mit Mutanten immer die Gefahr, daß zusätzliche destabilisierende Wechselwirkungen auftreten, wenn man einen ungepaarten Wasserstoffbrückendor oder -acceptor zurückläßt und/oder die örtliche Solvatation sowie die Packungswechselwirkungen des Proteins ändert (z. B. Glu-Phe statt Glu-Tyr).

An *Staphylococcus-Nuclease* (SNase) wurde versucht, den Beitrag der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Seitenketten zur Stabilisierung der Proteinfaltung zu bestimmen, dabei aber die sterischen und elektronischen Störungen zu minimieren, die entstehen, wenn ein Partner eines durch eine Wasserstoffbrückenbindung verbundenen Paars entfernt wird. Dazu wurde Tyr 27 durch iso-sterische, fluorierte Tyrosinanaloge ersetzt, darunter 2-Fluortyrosin 5, 3-Fluortyrosin 6 und Tetrafluortyrosin 7 sowie 2,3,5,6-Tetrafluorphenylalanin 8 und Phenylalanin 9 (Schema 10)^[97]. Mit diesen Mutanten sollte der



Schema 10. Strukturen der statt Tyr 27 in SNase eingebauten Aminosäuren, die unterschiedlich starke Wasserstoffbrückenbindungen bilden.

Einfluß der Stärke der Tyr 27-Glu 10-Wasserstoffbrückenbindung auf die Proteininstabilität bestimmt werden. Untersuchungen zur Denaturierung der entsprechenden Mutanten ergaben eine lineare Korrelation zwischen der Stabilitätskonstante K_{app} der Mutante ($\alpha = 0.38$) und dem pK_a -Wert der Hydroxygruppe der Tyrosinanaloge in Position 27 (Abb. 2). Tatsächlich wird die Stabilität der SNase durch Einbau von Tetrafluor-L-tyrosin 7 ($pK_a \approx 5$) statt Tyr 10 ($pK_a \approx 10$) um $2.3 \text{ kcal mol}^{-1}$ erhöht.

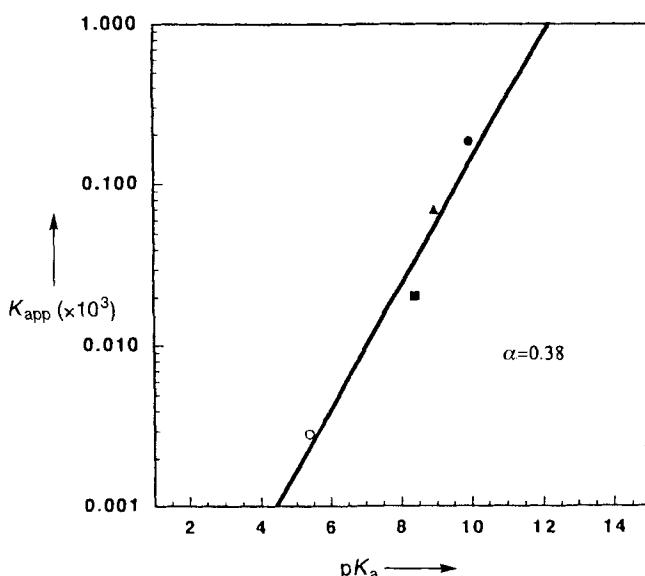
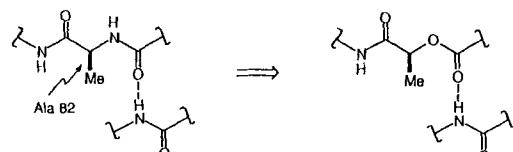


Abb. 2. Relation zwischen den pK_a -Werten von Tyr 10 sowie von den Tyr-Analoga 5–7, die in Position 27 eingebaut wurden, und der Stabilität der SNase (K_{app}). ● = 10, ▲ = 5, ■ = 6, ○ = 7.

Dieses Experiment liefert einen starken Hinweis darauf, daß die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Aminosäureseitenketten in Wasser den gefalteten Zustand eines Proteins stärker als den ungefalteten stabilisieren. Diese Ergebnisse zeigen, daß Substituenteneinflüsse nicht nur an kleinen Molekülen, sondern auch an Proteinen mit physikalisch-organischen Verfahren untersucht werden können.

Auch in T4L wurden Mutationen vorgenommen, hier jedoch, um den Beitrag der Wasserstoffbrückenbindungen des Proteinrückgrats zur Stabilisierung des Proteins zu bestimmen^[68]. Die an der Oberfläche befindliche Aminosäure Ala 82 wurde durch die iso-sterische Milchsäure ersetzt (Schema 11). Ala 82 befindet



Schema 11. Substitution von Ala 82 in T4L durch Milchsäure.

sich in einer Lücke zwischen zwei Helices, an der die NH-Gruppe und die Seitenkette dem Wasser zugewandt sind. Die Ala 82 → Lactat-Mutation ersetzt einen starken Wasserstoffbrückenbindungsacceptor, die Amidcarbonylgruppe, durch einen deutlich schwächeren, die Estercarbonylgruppe^[98]. Weil Ester und Amide beide überwiegend in der *trans*-Konformation vorliegen^[99], weist die deutliche Destabilisierung (Erniedrigung der Schmelztemperatur T_m um 3.7°C , $1.0 \text{ kcal mol}^{-1}$) durch die Mutation darauf hin, daß die Wasserstoffbrückenbindungen über die Amidgruppen des Proteinrückgrats tatsächlich zur Stabilisierung von Proteinen beitragen.

In einer Untersuchung zur Bedeutung der Packungswchselwirkungen im Inneren eines Proteins^[100–103] wurde in T4L die Aminosäure Leu 133 ersetzt, die sich am Rand des größten Hohlraums im Inneren von T4L befindet (Abb. 3)^[104]. Frühere Versuche, T4L zu stabilisieren, indem man die Packungsdichte

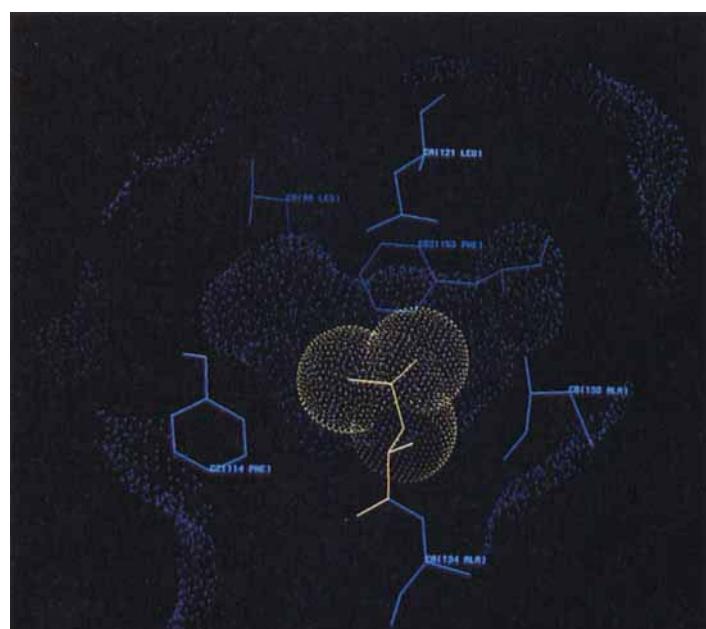
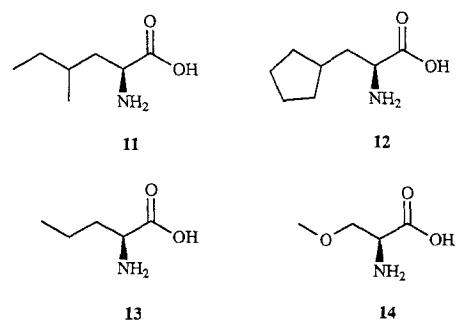


Abb. 3. Graphische Darstellung der van-der-Waals-Oberflächen (gelb) der Seitenketten von Leu 133 in T4L.

des hydrophoben Proteininneren durch die Mutationen Leu 133 → Phe oder Ala 129 → Val erhöhte, scheiterten, weil in beiden Fällen benachbarte Aminosäurereste voneinander getrennt werden^[104]. Der Einbau der nichtnatürlichen Aminosäuren (*S,S*)-2-Amino-4-methylcapronsäure **11** oder (*S*)-2-Amino-3-cyclopentylpropionsäure **12** (Schema 12), die beide so konzipiert



Schema 12. Strukturen der Aminosäuren, durch die Leu 133 in T4L ersetzt wurde.

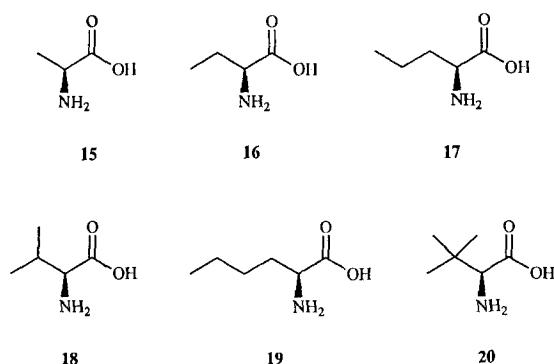
wurden, daß sie den Hohlraum bei minimaler Verzerrung ausfüllen, stabilisiert T4L, so daß die Schmelztemperatur T_m des Proteins um 1.9°C ($0.6 \text{ kcal mol}^{-1}$) bzw. 4.3°C ($1.24 \text{ kcal mol}^{-1}$) erhöht wird^[105]. Daraus folgt, daß Aminosäuren, deren abgeschirmte hydrophobe Reste den Proteininhohlraum besser ausfüllen, ohne gleichzeitig zu Verzerrungen zu führen, Proteine deutlich stabilisieren können. Da sich die Oberflächen von **11** und **12** nur wenig unterscheiden (Δ Oberflächenbedarf = 0.9 \AA^2), spiegelt der Stabilitätsunterschied zwischen den Mutanten wahrscheinlich die Tatsache wider, daß die cyclische Aminosäure **12** bei der Faltung des Proteins weniger Konformationsentropie als die acyclische Aminosäure **11** verliert. Demnach spielt die Konformationsentropie der Seitenketten ebenso eine wichtige Rolle für die Proteinstabilität wie die Packungswchselwirkungen.

In einem zweiten Beispiel konnte nach dem Einbau von Norvalin **13** oder *O*-Methylserin **14** (Schema 12) statt Leu 133

der Einfluß der Hydrophobie der Seitenkette bestimmt werden, ohne dabei die Packungswechselwirkungen oder die Konformationsentropie der Seitenketten zu ändern^[105]. Da die Stabilitätsdifferenzen zwischen den mutierten Enzymen und dem Wildtyp-T4L den Differenzen der Verteilungskoeffizienten der entsprechenden N-Acetylaminid-Derivate in Octanol/Wasser entsprechen, bedeutet dies, daß die Verteilungskoeffizienten ein Maß für die Solvatationseffekte sind.

In einem anderen Experiment führte die systematische Entfernung der Methyl- und Methylengruppen von der Leu133-Seitenkette zu einer schrittweisen Abnahme der Proteinstabilität^[105]. Die Änderung war jedoch nicht linear, wobei $\Delta\Delta G$ mit abnehmendem Oberflächenbedarf der Seitenkette größer wurde. Dieser Trend spiegelt sich exakt in den halbquantitativen Abschätzungen der $\Delta\Delta G$ -Werte wider und entspricht den Nettobeiträgen der Änderungen der Hydrophobie-, Entropie-, Packungs- und Hohlräumenergie.

Die Folgen des Einbaus β -verzweigter Aminosäuren wurden untersucht, indem die Stabilitäten von mutierten Proteinen verglichen wurden, die verzweigte und lineare Aminosäuren, 15–20 (Schema 13), enthalten. Die Aminosäuren wurden dazu an zwei



Schema 13. β -verzweigte und lineare Aminosäuren, die in die Positionen 44 und 68 in T4L inkorporiert wurden.

Stellen an der Oberfläche zwischen zwei α -Helices in T4L eingebaut^[106]. Von den natürlich vorkommenden β -verzweigten Aminosäuren Valin, Isoleucin und Threonin nimmt man an, daß sie α -Helices destabilisieren. Diese Aminosäuren kommen in den α -Helices bekannter Proteine seltener vor als Aminosäuren wie Leucin und destabilisieren α -helicale Peptide und Proteine^[107–113]. Wenn beispielsweise lineare und verzweigte Aminosäuren in ein α -helicales Peptid eingefügt werden, wirken die β -verzweigten Aminosäuren im Vergleich zu den linearen und den γ -verzweigten Aminosäuren destabilisierend^[114]. So wird ein Peptid durch Einbau von *tert*-Butylglycin 20 statt *n*-Butylglycin 19 oder Alanin 15 um 0.9 kcal mol⁻¹ destabilisiert. Allerdings kann dieselbe Mutation T4L entweder destabilisieren (bei Austausch von Ser44 um 0.7 kcal mol⁻¹, $\Delta T_m = -2.6^\circ\text{C}$) oder stabilisieren (bei Austausch von Asn68 um 0.3 kcal mol⁻¹, $\Delta T_m = 1.0^\circ\text{C}$). Dies verdeutlicht, wie schwierig es ist, einfache Regeln dafür abzuleiten, welche Faktoren Proteine stabilisieren oder destabilisieren, wenn gleichzeitig der Einfluß der Umgebung berücksichtigt werden muß. Hier haben die festgestellten Stabilitäten und die simulierten Strukturen der *tert*-Butylglycin-Mutanten zusätzliche Erkenntnisse über die Einflüsse β -ver-

zweigter Aminosäuren auf die Stabilität von α -Helices in Proteinen gebracht.

Die beschriebenen Ergebnisse unterstreichen die Schwierigkeiten bei der Interpretation der Mutagenesedaten, wenn mehr als eine Eigenschaft einer Aminosäure auf einmal geändert wird. Die Möglichkeit, die Struktur einer Aminosäure präzise zu verändern, sollte uns in die Lage versetzen, die individuellen Beiträge der Hydrophobie, der Packung, der Entropie und der Bildung von Hohlräumen auf die Proteinstabilität voneinander zu trennen. Zur Zeit erweitern wir diese Untersuchungen auf Wasserstoffbrückenbindungen sowie π - π - und π -Ionen-Wechselwirkungen im Inneren von Proteinen.

3.4. Enzymmechanismen

Die Mutagenese mit nichtnatürlichen Aminosäuren wird auch genutzt, um die Katalysemechanismen der Staphylococcus-Nuclease, der Aspartat-Aminotransferase, der Methionin-Aminopeptidase und der Ribonucleotid-Reduktase zu untersuchen. Die Staphylococcus-Nuclease (SNase) katalysiert die Hydrolyse der Phosphodiesterbindungen in Nucleinsäuren um etwa den Faktor 10¹⁶ im Vergleich zur nichtkatalysierten Reaktion. Das Enzym ist bis heute Gegenstand vieler Untersuchungen zur Struktur, zum Mechanismus und zur Mutagenese, durch die aufgeklärt werden soll, wie Enzyme die Reaktionsgeschwindigkeit so außergewöhnlich erhöhen können^[115–119]. Aus den Ergebnissen dieser Untersuchungen wurde abgeleitet, daß eine allgemeine Basenkatalyse wesentlich zur katalytischen Aktivität der SNase beiträgt. Im einzelnen geht man davon aus, daß Glu43 in der SNase als generelle Base fungiert und so ein Wassermolekül für den Angriff auf das Phosphodiesterrückgrat der DNA aktiviert. Wird Glu43 durch die natürlichen Aminosäuren Asp und Gln ersetzt, führt dies zu einem erheblichen Aktivitätsverlust^[120].

Überraschenderweise führte jedoch der Austausch von Glu43 gegen Homoglutamat 23 oder gegen das Nitroanalagon (S)-4-Nitro-2-aminobuttersäure 22, das isoelektronisch und iso-sterisch zu Glutamat 21, aber wesentlich schwächer basisch ist, zu Enzymmutanten, die unter normalen Versuchsbedingungen im wesentlichen die gleichen kinetischen Konstanten aufweisen wie die Wildtyp-SNase (Tabelle 1)^[85]. Die pH-Abhängigkeit der ka-

Tabelle 1. Katalytische Aktivität der Wildtyp-Staphylococcus-Nuclease und der Mutanten Glu43 → (S)-4-Nitro-2-aminobuttersäure und Glu43 → Homoglutamat. V_{max} = maximale Reaktionsgeschwindigkeit (gemessen über die Absorption bei 260 nm, A_{260}), K_m = Michaelis-Konstanten.

Aminosäure	V_{max} ($\mu\text{g}^{-1} \text{min}^{-1}$)	$K_m(\text{DNA}) (\mu\text{g mL}^{-1})$	$K_m(\text{Ca}^{2+}) (\mu\text{M})$
21	6.7 ± 0.7	8 ± 3	320 ± 30
22	3.0 ± 0.5	26 ± 8	470 ± 40
23	5.2 ± 0.2	10 ± 2	290 ± 30

talytischen Aktivität dieser Mutanten – aus den pH-Profilen der beiden Mutanten folgt, daß das Nitronat-Ion nicht gebildet wird – und die Kristallstruktur der Homoglutamat 43-Mutante (Abb. 4) ergaben, daß Glu 43 möglicherweise nicht als Base wirkt,

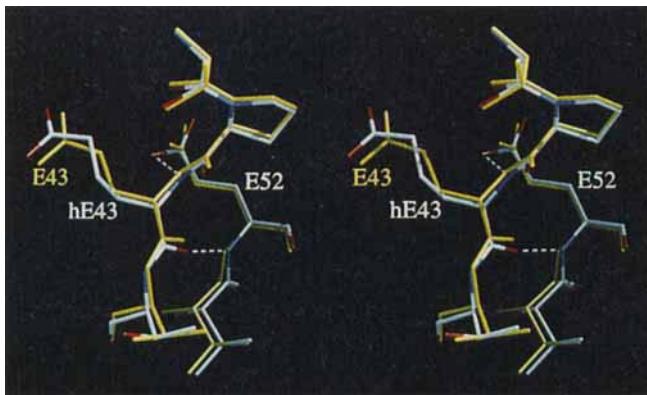


Abb. 4. Vergleich der Positionen der Seitenketten von Glu43 und Homoglutamat43, wie sie durch Kristallstrukturanalyse im Apo-Wildtypprotein und in der Homoglutamat 43-Mutante bestimmt wurden (Stereodarstellung).

sondern eher eine strukturgebende Rolle spielt, indem es als zweizähniger Wasserstoffbrückenbindungsacceptor die Konformation der benachbarten Schleife fixiert. Unabhängige Studien von Gerlt et al.^[121], die die neben Glu43 liegende Schleife aus der SNase entfernten, haben zur gleichen Schlußfolgerung geführt.

3.5. Zelluläre Signalübertragung

Auch die Rolle des Proteins *ras* p21 bei der zellulären Signalübertragung wurde durch Mutagenese mit nichtnatürlichen Aminosäuren untersucht. Säugetier-Proteine, die von den *ras*-Genen codiert werden, fungieren vermutlich als Regulatoren in Signalübertragungsprozessen, die an Zellwachstum und -differenzierung beteiligt sind^[122–125]. Chemisch gesehen wechselt bei der Signalübertragung das *ras*-Protein cyclisch zwischen dem inaktiven Zustand mit gebundenem Guanosindiphosphat (GDP) und dem aktiven Zustand mit gebundenem Guanosintriphosphat (GTP) (Abb. 5). Punktmutationen, die zu einer Abnahme der GTPase-Eigenaktivität des *ras*-Proteins oder der durch das GTPase-aktivierende Protein (GAP) stimulierten GTPase-Aktivität führen, werden mit etwa 30 % der menschlichen Krebserkrankungen in Verbindung gebracht^[123, 126–129]. Um auf molekularer Ebene besser zu verstehen, wie Mutationen im *ras*-Protein zur Inaktivierung des Schaltmechanismus führen, haben wir Aminosäurereste in den Schleifen L4 (Region des Schalters II), L2 (Region des Schalters I) und L1 (Phosphatbindungsregion) durch nichtnatürliche Aminosäuren ersetzt^[130–132].

Mutationen an Gln 61 gehören zu den am häufigsten vorkommenden, die zu einer Beeinträchtigung der GTPase-Eigenaktivität führen. Dieser Aminosäurerest befindet sich in Schleife L4 des *ras*-Proteins, einer Region, deren Konformation sich beim GTP/GDP-Austausch ändert^[133–140]. Biochemische Studien und die Kristallstruktur des *ras*-Proteins mit gebundenem GTP (Abb. 5), Gpp(CH₂)p und Gpp(NH)p ergaben, daß Gln 61 für

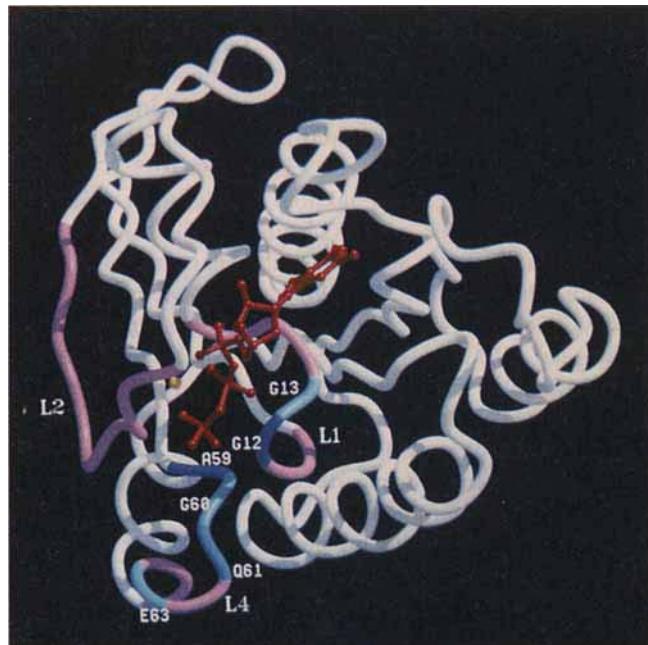
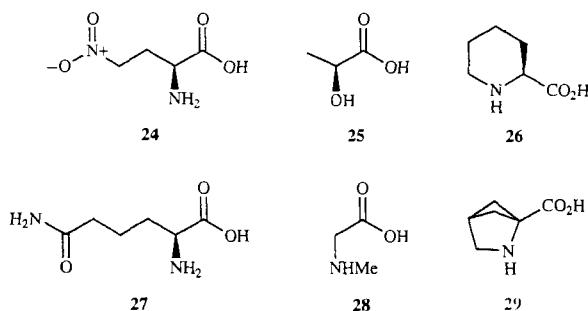


Abb. 5. Modell des *ras*-Proteins mit gebundenem GTP[138].

die Bindung von γ-Pyrophosphat und die Katalyse wesentlich ist^[133–141]. Es wurde vermutet, daß die γ-Carboxamidgruppe von Gln 61 dabei ein Wassermolekül (175) für den Angriff auf das γ-Pyrophosphat polarisiert oder den anfänglichen, fünffach koordinierten Übergangszustand stabilisiert. Um diese mechanistischen Hypothesen zu testen, ersetzten wir Gln 61 durch das isoelektronische, iso-sterische Nitroanalagon **24** sowie durch Homoglutamin **27** (Schema 14)^[130]. Während siebzehn natürl-



Schema 14. Strukturen einiger nichtnatürlicher Aminosäuren, mit denen die Schaltfunktion des *ras*-Proteins getestet wurde.

che Position 61-Mutanten eine reduzierte GTPase-Aktivität aufweisen und nicht durch GAP aktiviert werden, hatten die beiden nichtnatürlichen Mutanten ähnliche GTPase-Aktivitäten wie der Wildtyp und wurden auch durch GAP aktiviert. Dies läßt vermuten, daß der Rest 61 eine andere Funktion bei der Katalyse hat, z. B. könnte er das gebundene GTP bei der Bildung des Übergangszustandes geeignet verzerrn.

Auch Mutationen an Gly 12 des *ras*-Proteins beeinträchtigen die GTPase-Eigenaktivität und gehen im allgemeinen mit einer

Oncogenaktivierung einher^[123, 142]. Gly12 liegt in einem hochkonservierten β -Faltblatt vom Typ II [Gly11-X-X-X-Gly-Lys-(Ser oder Thr)] vor, einer phosphatbindenden Schleife, die in vielen Nucleotidbindenden Proteinen vorkommt^[143, 144]. Ein Austausch von Gly12 durch jede beliebige Aminosäure außer Prolin verringert die GTPase-Aktivität^[142]. Um die Rolle von Gly12 in der Funktion des Schalters besser zu verstehen, haben wir einige nichtnatürliche Aminosäuren und Analoga an dieser Stelle eingeführt, darunter Milchsäure **25** (Lac), Pipocolinsäure **26** (Pip) und *N*-Methylglycin **28** (MeGly) (Schema 14)^[130]. Sowohl Pipocolinsäure als auch infolge des *N*²-Methylsubstituenten *N*-Methylglycin haben Torsionswinkel ϕ mit sehr viel negativeren Werten, und die entsprechenden Mutanten weisen GTPase-Aktivitäten auf, die der des Wildtyp-ras-Proteins entsprechen. Während die Ala12-Mutante eine verringerte GTPase-Aktivität hat, war diese in der Mutante, die die iso-sterische Milchsäure **25** enthielt – in der die Amidbindung des Peptidrückgrats also durch eine Esterbindung ersetzt ist – normal. Daß nur Mutanten, die ungewöhnliche Rückgratkonformationen einnehmen können, aktiv sind, legt nahe, daß ungünstige Seitenketten-Wechselwirkungen an Position 12 im Übergangszustand durch einen Konformationswechsel in Schleife L1 vermieden werden können. Die Varianten Pro12, Pip12, Lac12 und MeGly12 haben zwar ähnlich große GTPase-Eigenaktivitäten wie das Wildtyp-ras-Protein, werden aber nicht durch GAP aktiviert. Dies gilt auch für die Gly13 → Thr-, Gly13 → Allothreonin- und Gly13 → Ser-Proteine, deren GTPase-Eigenaktivitäten zwei- bis dreimal höher sind als die des Wildtyps (was auf die Hydroxygruppe zurückgeführt werden kann); außerdem sind sie nicht in der Lage, den Abbau des Keimbläschens in *Xenopus laevis*-Oocyten auszulösen. Eine Deutung dieser Ergebnisse besteht darin, daß die Schleife L1 in Lösung zwei oder mehr Konformationen einnehmen kann und daß durch Fixierung einer bestimmten Konformation durch ein oder mehrere Effektorproteine die GTPase-Aktivität und die oncogene Aktivierung beeinflußt werden. Die ungewöhnlichen Strukturen des Rückgrats der Gly12- und Gly13-Mutanten verhindern möglicherweise die Schaltfunktion.

In einem dritten Mutageneseexperiment wurde die Rolle von Pro 34 für die Funktion der Schleife L2 untersucht. Die größten Unterschiede zwischen den GTP- und GDP-bindenden Formen des ras-Proteins bestehen in dieser Region (Reste 32–40)^[133–140]. Man nimmt an, daß Pro34, das im ras-Protein konserviert ist und sich in der Nähe des aktiven Zentrums befindet, möglicherweise durch eine *cis/trans*-Isomerisierung der Pro 34-Amidbindung^[137] die Konformation der Schleife L2 kontrolliert. Um die Bedeutung des Aminosäurerestes für die Struktur und seine Funktion im Mechanismus genauer zu untersuchen, wurde Pro34 gegen 2,4-Methanoprolin **29** (Schema 14) ausgetauscht; dieses liegt bedingt durch die C_α-Substitution überwiegend *trans*-konfiguriert vor^[131]. Da die Mutante jedoch eine dem Wildtyp entsprechende GTPase-Eigenaktivität und eine GAP-aktivierbare GTPase-Aktivität aufweist, spielt die *cis/trans*-Isomerisierung von Pro 34 höchstwahrscheinlich keine zentrale Rolle bei der Signalübertragung. Ähnliche Variationen des Substituenten könnten hilfreich sein, um die Rolle der Rückgratisomerisierung bei der Proteinfaltung zu untersuchen.

4. Schlußfolgerung

Die Fähigkeit, nichtnatürliche Aminosäuren ortsspezifisch in Proteine einzubauen, macht es möglich, diese wichtige Klasse von organischen Verbindungen detailliert mit physikalischen Verfahren zu untersuchen. Durch Mutationen kann die Art des Beitrags einer individuellen Aminosäure zur Proteinstruktur oder -funktion oft ohne dramatische Aktivitätsverluste genau getestet werden. Diese Methode sollte helfen, zu neuen Erkenntnissen hinsichtlich der Struktur und der Funktion von Proteinen zu gelangen. Außerdem sollte es möglich sein, mutierte Proteine mit neuartigen Eigenschaften und Funktionen herzustellen. Was zu tun bleibt, ist, die Mengen an verfügbarem Protein zu steigern und die Spezifität des Proteinbiosyntheseapparates zu umgehen, so daß auch Aminosäuren mit noch stärker unterschiedlichen Strukturen eingebaut werden können, um so die Möglichkeiten dieses Ansatzes zu erweitern.

Die Arbeiten wurden vom Office of Naval Research, von den National Institutes of Health und vom Department of Energy gefördert. V. W. C. dankt der National Science Foundation für ein Promotionsstipendium.

Eingegangen am 6. April 1994 [A 61]
Übersetzt von Dr. Burkard Neuß, Jülich

- [1] M. J. Zoller, M. Smith, *Methods Enzymol.* **1983**, *100*, 468.
- [2] J. R. Knowles, *Science* **1987**, *236*, 1252.
- [3] D. Y. Jackson, J. Burnier, C. Quan, M. Stanley, J. Tom, J. A. Wells, *Science* **1994**, *266*, 243.
- [4] E. Bayer, *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 117; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 113.
- [5] T. Nakatsuka, T. Sasaki, E. T. Kaiser, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 3808.
- [6] F. M. Richards, H. W. Wyckoff in *The Enzymes*, Vol. IV (Hrsg.: P. D. Boyer), Academic Press, New York, 1971.
- [7] K. Hofmann, H. Bohn, *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 5914.
- [8] E. T. Kaiser, D. S. Lawrence, *Science* **1984**, *226*, 505.
- [9] E. T. Kaiser, *Acc. Chem. Res.* **1989**, *22*, 47.
- [10] K. Rose, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 30.
- [11] M. Schnolzer, S. B. H. Kent, *Science* **1992**, *256*, 221; P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. B. H. Kent, *ibid.* **1994**, *266*, 776.
- [12] R. E. Offord, *Protein Eng.* **1987**, *1*, 151.
- [13] I. M. Chaiken, *Crit. Rev. Biochem.* **1981**, *11*, 255.
- [14] E. T. Kaiser, D. S. Lawrence, S. E. Rokita, *Annu. Rev. Biochem.* **1985**, *54*, 565.
- [15] D. S. Wuttke, H. B. Gray, S. L. Fisher, B. Imperiali, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 8455.
- [16] K. E. Neet, A. Nanci, D. E. Koshland, *J. Biol. Chem.* **1968**, *243*, 6392.
- [17] L. Polgar, M. L. Bender, *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 3153.
- [18] *Spin Labeling, Theory and Applications* (Hrsg.: L. Berliner), Academic Press, New York, 1976.
- [19] S. J. Pollack, G. Nakayama, P. G. Schultz, *Science* **1988**, *242*, 1038.
- [20] D. R. Corey, P. G. Schultz, *Science* **1987**, *233*, 1401.
- [21] U. C. Krieg, P. Walter, A. E. Johnson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, *83*, 8604.
- [22] J. Brunner, *Annu. Rev. Biochem.* **1993**, *62*, 483.
- [23] C. J. Noren, S. J. Anthony-Cahill, M. C. Griffith, P. G. Schultz, *Science* **1989**, *244*, 182.
- [24] J. A. Ellman, D. Mendel, S. Anthony-Cahill, C. J. Noren, P. G. Schultz, *Methods Enzymol.* **1992**, *202*, 301.
- [25] J. D. Bain, C. G. Glabe, T. A. Dix, A. R. Chamberlin, E. S. Diala, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8013.
- [26] F. H. C. Crick, L. Barrett, S. Brenner, R. Watts-Tobin, *Nature (London)* **1961**, *192*, 1227.
- [27] A. Brenner, A. O. W. Stretton, S. Kaplan, *Nature (London)* **1965**, *206*, 994.
- [28] L. Bossi, J. R. Roth, *Nature (London)* **1980**, *286*, 123.
- [29] F. H. C. Crick, *Symp. Soc. Exp. Biol.* **1958**, *12*, 138.
- [30] F. Chapeville, F. Lipmann, G. von Ehrenstein, B. Weisblum, W. J. Ray, S. Benzer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1962**, *48*, 1086.

- [31] S. Chladek, M. Sprinzl, *Angew. Chem.* **1985**, *97*, 377; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1985**, *24*, 371.
- [32] S. M. Hecht, *Acc. Chem. Res.* **1992**, *25*, 545.
- [33] J. R. Sayers, W. Schmidt, F. Eckstein, *Nucleic Acids Res.* **1988**, *16*, 791.
- [34] A. Bruce, J. Atkins, N. Wills, O. Uhlenbeck, R. Gesteland, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1982**, *79*, 7127.
- [35] D. Ayer, M. Yarus, *Science* **1986**, *231*, 393.
- [36] L. Bossi, *J. Mol. Biol.* **1983**, *164*, 73.
- [37] A. Miller, A. Albertini, *J. Mol. Biol.* **1983**, *164*, 59.
- [38] Y. Kwok, J. T. Wong, *Can. J. Biochem.* **1980**, *58*, 213.
- [39] J. W. Roberts, J. Carbon, *J. Biol. Chem.* **1975**, *250*, 5530.
- [40] J. F. Milligan, D. R. Groebe, G. W. Withersell, O. C. Uhlenbeck, *Nucleic Acids Res.* **1987**, *15*, 8783.
- [41] C. J. Noren, S. J. Anthony-Cahill, D. J. Suich, K. A. Noren, M. C. Griffith, P. G. Schultz, *Nucleic Acids Res.* **1990**, *18*, 83.
- [42] K. M. Harrington, I. A. Nazarenko, D. B. Dix, R. C. Thompson, O. C. Uhlenbeck, *Biochemistry* **1993**, *32*, 7617.
- [43] R. Giege, J. D. Puglisi, C. Florentz, *Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.* **1993**, *45*, 129.
- [44] P. Schimmel, *Annu. Rev. Biochem.* **1987**, *56*, 125.
- [45] T. G. Heckler, L. H. Chang, Y. Zama, T. Naka, M. S. Chorghade, S. M. Hecht, *Biochemistry* **1984**, *23*, 1468.
- [46] S. A. Robertson, C. J. Noren, S. J. Anthony-Cahill, M. C. Griffith, P. G. Schultz, *Nucleic Acids Res.* **1989**, *17*, 9649.
- [47] D. Hentzen, P. Mandel, J. P. Garel, *Biochim. Biophys. Acta* **1972**, *281*, 228.
- [48] M. C. Griffith, Dissertation, University of California, Berkeley, **1990**.
- [49] S. A. Robertson, J. A. Ellman, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 2722.
- [50] A. Patchornik, B. Amit, R. B. Woodward, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 6333.
- [51] S. R. Adams, J. P. Y. Kao, R. Y. Tsien, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 7957.
- [52] D. Kern, R. Giege, J. P. Ebel, *Eur. J. Biochem.* **1972**, *31*, 148.
- [53] N. Chinsky, A. L. Margolin, A. M. Klipanov, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 386.
- [54] P. Kast, H. Hennecke, *J. Mol. Biol.* **1991**, *222*, 99.
- [55] *Transcription and Translation: A Practical Approach* (Hrsg.: B. D. Hames, S. J. Higgins), IRL, Oxford, **1984**.
- [56] J. Pratt in Lit.[55], S. 179.
- [57] G. Zubay, *Annu. Rev. Genet.* **1973**, *7*, 267.
- [58] D. V. Goeddel, *Methods Enzymol.* **1990**, 185.
- [59] *Maximizing Gene Expression* (Hrsg.: W. Rezenikoff, L. Gold), Butterworth, Boston, **1986**.
- [60] D. Suich, Dissertation, University of California, Berkeley, **1993**.
- [61] D. Mendel, J. Ellman, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4359.
- [62] V. W. Cornish, D. R. Benson, C. A. Altenbach, K. Hideg, W. L. Hubbell, P. G. Schultz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 2910.
- [63] A. Louie, F. Jurnak, *Biochemistry* **1985**, *24*, 6433.
- [64] K. Quiggle, G. Kumar, T. W. Oh, E. K. Ryu, S. Chladek, *Biochemistry* **1981**, *20*, 3480.
- [65] A. Bhuta, *Biochemistry* **1981**, *20*, 8.
- [66] P. Bhuta, *Biochemistry* **1982**, *21*, 899.
- [67] S. Fahnestock, H. Neumann, V. Shashoua, A. Rich, *Biochemistry* **1970**, *9*, 2477.
- [68] J. A. Ellman, D. Mendel, P. G. Schultz, *Science* **1992**, *255*, 197.
- [69] M. M. Grant, A. S. Brown, L. M. Corwin, R. F. Troxler, C. Franzblau, *Biochim. Biophys. Acta* **1975**, *404*, 180.
- [70] D. A. Tirrell, T. J. Deming, persönliche Mitteilung.
- [71] D. Mendel, J. A. Ellman, P. G. Schultz, unveröffentlicht.
- [72] J. D. Bain, D. A. Wacker, E. E. Kuo, A. R. Chamberlin, *Tetrahedron* **1991**, *47*, 2389.
- [73] D. Benson, J. A. Ellman, P. G. Schultz, unveröffentlicht.
- [74] G. Baldwin, A. Martoglio, C. Zuglian, J. Brunner, *Biochemistry* **1988**, *27*, 7951.
- [75] A. S. Spirin, V. I. Baranov, L. A. Ryabova, S. Y. Ovodov, Y. B. Alahhov, *Science* **1988**, *242*, 1162.
- [76] O. Landman, S. Spiegelman, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1955**, *41*, 698.
- [77] M. Nomura, J. Hosoda, S. Nishimura, *Biochim. Biophys. Acta* **1958**, *29*, 161.
- [78] L. G. Kleina, J. M. Masson, J. Normanly, J. Abelson, J. H. Miller, *J. Mol. Biol.* **1990**, *213*, 705.
- [79] V. W. Cornish, P. G. Schultz, unveröffentlicht.
- [80] D. Mendel, P. G. Schultz, unveröffentlicht.
- [81] M. Chunhua, W. Kudlicki, O. W. Odom, G. Kramer, B. Hardesty, *Biochemistry* **1993**, *32*, 7939.
- [82] J. Bain, C. Switzer, A. Chamberlin, S. Benner, *Nature (London)* **1992**, *356*, 537.
- [83] J. A. Ellman, D. R. Benson, P. G. Schultz, unveröffentlicht.
- [84] J. A. Ellman, B. F. Volkman, D. Mendel, P. G. Schultz, D. E. Wemmer, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 7959.
- [85] J. K. Judice, T. R. Gamble, E. C. Murphy, A. M. de Vos, P. G. Schultz, *Science* **1993**, *261*, 1578.
- [86] B. L. Stoddard, J. L. Bruhnke, D. Koenigs, N. Porter, D. Ringe, G. A. Petsko, *Biochemistry* **1990**, *29*, 8042.
- [87] M. Wilcox, R. W. Viola, K. W. Johnson, A. P. Billington, B. C. Carpenter, J. A. McCray, A. P. Guzikowski, G. P. Hess, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 1585.
- [88] D. Mendel, J. A. Ellman, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 2758.
- [89] X. Xiong, S. N. Cook, W. E. Jack, L. E. Danley, J. A. Ellman, P. G. Schultz, C. J. Noren, *Cell*, eingereicht.
- [90] K. A. Dill, *Biochemistry* **1990**, *29*, 7133.
- [91] B. W. Matthews, *Annu. Rev. Biochem.* **1993**, *62*, 139.
- [92] L. Pauling, R. B. Corey, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1951**, *37*, 729.
- [93] L. Pauling, R. B. Corey, H. R. Branson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1951**, *37*, 205.
- [94] G. A. Jeffrey, W. Saenger, *Hydrogen Bonding in Biological Molecules*, Springer, New York, **1991**.
- [95] G. D. Rose, R. Wolfson, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1993**, *22*, 381.
- [96] A. R. Fersht, *Trends Biochem. Sci.* **1987**, *12*, 301.
- [97] J. Thorson, E. Chapman, E. C. Murphy, P. G. Schultz, J. K. Judice, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 1157.
- [98] M. J. Kamlet, J. L. M. Abboud, M. H. Abraham, R. W. Taft, *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 2877.
- [99] K. B. Wiberg, K. E. Laidig, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 5935.
- [100] K. Yutani, K. Ogasahara, T. Tsugita, Y. Sugino, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 4441.
- [101] M. Matsumura, W. J. Becktel, B. W. Matthews, *Nature (London)* **1988**, *334*, 406.
- [102] J. J. T. Kellis, K. Nyberg, D. Sali, A. R. Fersht, *Nature (London)* **1988**, *333*, 784.
- [103] W. A. Lim, R. T. Sauer, *Nature (London)* **1989**, *339*, 31.
- [104] M. Karpusas, W. A. Baase, M. Matsumura, B. W. Matthews, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 8237.
- [105] D. Mendel, J. A. Ellman, Z. Chang, D. L. Veenstra, P. A. Kollman, P. G. Schultz, *Science* **1992**, *256*, 1798.
- [106] V. W. Cornish, M. I. Kaplan, D. Veenstra, P. A. Kollman, P. G. Schultz, *Biochemistry* **1994**, *33*, 12022.
- [107] P. Y. Chou, G. D. Fasman, *Annu. Rev. Biochem.* **1978**, *47*, 251.
- [108] K. T. O'Neil, W. F. DeGrado, *Science* **1990**, *250*, 646.
- [109] S. Padmanabhan, S. Marqusee, T. Ridgeway, T. M. Laue, R. L. Baldwin, *Nature (London)* **1990**, *344*, 268.
- [110] P. C. Lyu, M. I. Liff, L. A. Marky, N. R. Kallenbach, *Science* **1990**, *250*, 669.
- [111] M. Blaber, X.-J. Zhang, B. W. Matthews, *Science* **1993**, *260*, 1637.
- [112] M. Blaber, X.-J. Zhang, J. D. Lindstrom, S. D. Deprot, W. A. Baase, B. W. Matthews, *J. Mol. Biol.* **1994**, *235*, 600.
- [113] A. Horowitz, J. M. Matthews, A. R. Fersht, *J. Mol. Biol.* **1992**, *227*, 560.
- [114] P. C. Lyu, J. C. Sherman, A. Chen, N. R. Kallenbach, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 5317.
- [115] F. A. Cotton, E. E. J. Hazen, M. J. Legg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1979**, *76*, 2551.
- [116] P. J. Loll, E. E. Lattman, *Proteins* **1989**, *5*, 183.
- [117] D. J. Weber, A. K. Meeker, A. S. Mildvan, *Biochemistry* **1991**, *30*, 6103.
- [118] D. J. Weber, E. H. Serpersu, D. Shortle, A. S. Mildvan, *Biochemistry* **1990**, *29*, 8632.
- [119] P. W. Tucker, J. E. E. Hazen, F. A. Cotton, *Mol. Cell. Biochem.* **1979**, *23*, 3.
- [120] D. W. Hibler, N. J. Stolowich, M. A. Reynolds, J. A. Gerlt, J. A. Wilde, P. H. Bolton, *Biochemistry* **1987**, *26*, 6278.
- [121] S. P. Hale, L. B. Poole, J. A. Gerlt, *Biochemistry* **1993**, *32*, 7479.
- [122] M. Barbacid, *Annu. Rev. Biochem.* **1987**, *56*, 779.
- [123] J. L. Bos, *Cancer Res.* **1989**, *49*, 4682.
- [124] J. A. Glomset, M. H. Gelb, C. C. Fransworth, *Trends Biochem. Sci.* **1990**, *15*, 139.
- [125] D. Spandidos, *Ras Oncogenes*, Plenum, New York, **1989**.
- [126] M. Trahey, M. Trahey, G. Wong, R. Halenbeck, B. Rubinfield, G. A. Martin, M. Ladner, C. M. Long, W. J. Crosier, K. Watt, K. Kothe, F. McCormick, *Science* **1988**, *242*, 1697.
- [127] M. Trahey, F. McCormick, *Science* **1987**, *238*, 542.
- [128] G. A. Martin, D. Viskochil, G. Bollag, P. C. McCabe, W. J. Crosier, H. Haubruck, L. Conroy, R. Clark, P. O'Connell, R. M. Cawthon, M. A. Innis, F. McCormick, *Cell* **1990**, *63*, 843.
- [129] G. Xu, B. Lin, K. Tanaka, D. Dunn, D. Wood, R. Gesteland, R. White, R. Weiss, F. Tamanoi, *Cell* **1990**, *63*, 835.
- [130] H. H. Chung, D. R. Benson, P. G. Schultz, *Science* **1993**, *259*, 806.
- [131] H. H. Chung, D. R. Benson, V. W. Cornish, P. G. Schultz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 10145.
- [132] H. H. Chung, D. R. Benson, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 6414.

- [133] A. M. d. Vos, L. Tong, M. Milgurn, P. Matias, J. Jancarik, S. Noguchi, S. Nishimura, K. Miura, E. Ohtsuka, S.-H. Kim, *Science* **1988**, *239*, 888.
- [134] E. F. Pai, W. Kabsch, U. Krengel, K. C. Holmes, J. John, A. Wittinghofer, *Nature (London)* **1989**, *341*, 209.
- [135] L. Tong, M. V. Milburn, A. M. d. Vos, S.-H. Kim, *Science* **1989**, *245*, 244.
- [136] M. V. Milburn, L. Tong, A. M. de Vos, A. Brunger, Z. Yamaizumi, S. Nishimura, S.-H. Kim, *Science* **1990**, *247*, 939.
- [137] E. F. Pai, U. Krengel, G. A. Petsko, R. S. Goody, W. Kabsch, A. Wittinghofer, *EMBO J.* **1990**, *9*, 2351.
- [138] G. G. Prive, M. V. Milburn, L. Tong, A. M. de Vos, Z. Yamaizumi, S. Nishimura, S.-H. Kim, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 3649.
- [139] U. Krengel, I. Schlichting, A. Scherer, R. Schumann, M. Frech, J. John, W. Kabsch, E. F. Pal, A. Wittinghofer, *Cell* **1990**, *62*, 539.
- [140] I. Schlichting, S. C. Almo, G. Rapp, K. Wilson, A. Petras, A. Lentfer, A. Wittinghofer, W. Kabsch, E. F. Pai, G. A. Petsko, R. S. Goody, *Nature (London)* **1990**, *345*, 309.
- [141] C. J. Der, T. Finkel, G. M. Cooper, *Cell* **1986**, *44*, 167.
- [142] P. H. Seburg, W. W. Colby, D. J. Capon, D. V. Goeddel, A. D. Levison, *Nature (London)* **1986**, *312*, 71.
- [143] N. J. Gay, J. E. Walker, *Nature (London)* **1983**, *301*, 262.
- [144] R. K. Wierenga, P. Terpstra, W. G. Hol, *J. Mol. Biol.* **1986**, *187*, 101.

Seit diesem Jahr: Keywords in der „Angewandten“

Seit Januar 1995 werden zu jedem Beitrag Keywords gedruckt, die dann auch die Basis für das Stichwortjahresregister bilden. Autoren werden deshalb gebeten, ihre Manuskripte mit Keywords (zwischen Haupttext und Literaturverzeichnis) zu versehen und dabei folgende Punkte zu beachten:

1. Die Jahresregister in den Dezemberheften der vergangenen Jahre geben einen Eindruck von der Art der verwendeten Stichwörter.
2. Es sollten maximal fünf Keywords sein, darunter möglichst mehr allgemeine als spezielle (z. B. 2 + 1).
3. Bitte keine „Komma-Versionen“ verwenden, d.h. „chemische Sensoren“, nicht „Sensoren, chemisch“ als Stichwort.
4. Bitte „... verbindungen“ in Kombination mit Elementnamen verwenden, also „Eisenverbindungen“, „Bromverbindungen“ und nicht „Eisenkomplexe“.
5. Bitte Komplexe nach dem koordinierenden Atom („Komplexe mit Stickstoffliganden“) oder nach der koordinierenden Verbindung („Arenkomplexe“, „Carbenkomplexe“) klassifizieren, wenn die Eintragung unter dem Elementnamen nicht als ausreichend erachtet wird.

Die Redaktion wird sich bemühen, ein möglichst einheitlich gestaltetes Jahresregister sicherzustellen.