

Inkorporation von *in vitro* synthetisierten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren in ein peptidfixiertes artifizielles Membransystem**

Rudolf Robelek, Eva S. Lemker, Birgit Wiltschi, Vinzenz Kirste, Renate Naumann, Dieter Oesterhelt und Eva-Kathrin Sinner*

Die erfolgreiche Charakterisierung von Membranproteinen hängt stark davon ab, wie gut diese Proteine unter Erhaltung ihrer Funktion für biophysikalische Messmethoden zugänglich gemacht werden können. Anders als im Fall löslicher Proteine, deren Überexpression ohne Verlust ihrer Funktion häufig ohne eine besondere Anforderung an die Umgebung gelingt, erfordert die native Faltung eines Membranproteins eine Lipidmembran.

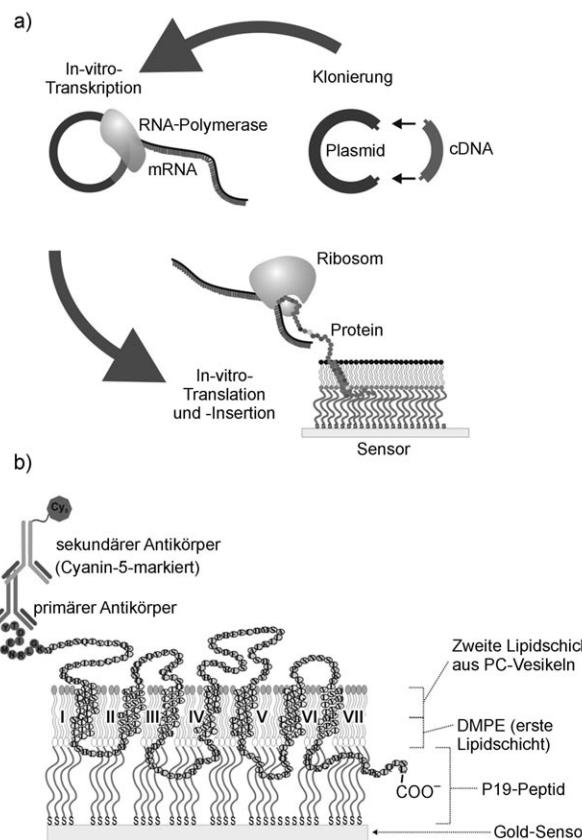
Eine eingehende Untersuchung komplexer Membranproteine, z.B. G-Protein-gekoppelter Rezeptoren (GPCRs), ist entscheidend für das Verständnis ihrer Wechselwirkungen mit Liganden sowie der von ihnen ausgelösten Signalkaskaden, die für ein breites Spektrum physiologischer Prozesse von Bedeutung sind. GPCRs spielen eine signifikante Rolle bei zellulären Wechselwirkungen und zählen daher zu den Haupt-Targets der Wirkstoff-Forschung.^[21]

Die schwierigste Aufgabe bei der Untersuchung von GPCRs ist ihre Isolierung und Inkorporation in nativer Form in Mess-Systeme, ohne dabei ihre Eigenschaften zu verändern. Bei der Isolierung, die meist auf Detergens-vermittelter Solubilisierung basiert, neigen die meisten GPCRs zur Aggregation und verlieren dadurch jegliche an ihre räumliche Struktur gebundene biologische Funktion. Daher lassen sich GPCRs nur äußerst schwer in funktionaler Form isolieren. Wegen der empfindlichen Struktur-Wirkungs-Beziehungen dieser Proteine führt eine Störung der Proteinfaltung zu einer deutlichen Beeinträchtigung der Ligandenerkennung. Die Synthese des korrekt gefalteten Proteins ist daher das Haupthindernis für die Untersuchung von GPCRs.

Hier wird eine Strategie vorgestellt, die die reproduzierbare Synthese und Charakterisierung eines wichtigen Vertreters der Klasse der GPCRs ermöglicht – des Geruchsre-

zeptors OR5 aus *Rattus norvegicus*, dessen Isolierung und Untersuchung in funktionaler Proteinkonformation bisher nicht möglich war. Zunächst wurde der GPCR dabei *in vitro* in Gegenwart einer artifiziellen Lipidmembran exprimiert, die die Eigenschaften einer natürlichen biologischen Membran nachahmt (Schema 1). Dabei fand eine gerichtete Insertion des Geruchsrezeptors in die peptidfixierte Lipidmembran statt. Alleiniges Ausgangsmaterial dieser Methode ist die cDNA des GPCR, wodurch schwierige Reinigungs- oder Isolierungsprozesse vermieden werden können.

Die Proteinorientierung in der artifiziellen Membran wurde durch eine Kombination von Immunmarkierung und Oberflächenplasmonen-Fluoreszenzspektroskopie (SPFS) untersucht. Die Analyse des *in vitro* exprimierten und in die



Schema 1. a) In-vitro-Synthese eines Membranproteins (z. B. GPCR) in direktem Kontakt mit einer planaren Lipidmembran. b) Schematische Darstellung eines so hergestellten, mit einem VSV-Epitop versehenen OR5-Proteins, das in eine planare Lipidmembran integriert wurde. Die Fluoreszenzanalyse erfolgte durch ein aus zwei Antikörpern bestehendes „Sandwichsystem“.

[*] Dr. R. Robelek, V. Kirste, Dr. R. Naumann, Dr. E.-K. Sinner
Max-Planck-Institut für Polymerforschung
Ackermannweg 10, 55128 Mainz (Deutschland)
Fax: (+ 49) 613-1379-318
E-Mail: sinner@mpip-mainz.mpg.de
Homepage: <http://www.mpip-mainz.mpg.de/~sinner>
Dr. E. S. Lemker, Dr. B. Wiltschi, Prof. Dr. D. Oesterhelt
Max-Planck-Institut für Biochemie
Am Klopferspitz 18, 82152 Martinsried (Deutschland)

[**] Wir danken Prof. Dr. H. Ringsdorf, Prof. E. Sackmann und Prof. L. Moroder für Diskussionen und Unterstützung. Die vorliegende Arbeit wurde durch ein Habilitationsförderstipendium des „Bayerischen Staatsministeriums für Wissenschaft, Forschung und Kunst“ sowie durch den SFB563 finanziert.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

Membran inserierten Rezeptors mithilfe oberflächenverstärkter Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie (SEIRAS) lässt auf eine biologisch aktive Konformation und eine damit einhergehende reversible Ligandenbindung schließen. Mit dem hier vorgestellten Verfahren gelang erstmals die Integration eines GPCR in eine artifizielle, planare Membran aus dem *stata nascendi*, wobei eine gerichtete Insertion des *in vitro* exprimierten Proteins in die peptidfixierte Lipiddoppelschicht erfolgte. Der Einsatz des hier verwendeten Membransystems könnte die Analyse weiterer GPCRs und komplexer Membranproteine, die bisher nicht für eine detaillierte Untersuchung zugänglich waren, ermöglichen.

Oberflächengebundene, planare Membransysteme, die die Phospholipid-Architektur von Zellmembranen imitieren, wurden aus zahlreichen Gründen für die Inkorporation von Membranproteinen eingesetzt:^[1-3] Zunächst bewahrt die hydrophobe Matrix der Lipidschicht die hydrophobe Domänenstruktur des rekonstituierten Proteinmoleküls. Zudem ist die Charakterisierung solcher oberflächengebundener Membransysteme mit einer Vielzahl an biophysikalischen Methoden möglich, z.B. mit Elektrochemie, optischer Spektroskopie und Mikroskopie sowie Rasterkraftmikroskopie.^[4-8] Eine peptidfixierte Membran ist ein Anwendungsbeispiel solcher oberflächengebundener Membranmodelle, das sich als geeignete Plattform für die native Inkorporation zahlreicher Membranproteinen erwiesen hat.^[4,9,10] Eine Peptid-Monoschicht bindet dabei über starke Gold-Schwefel-Wechselwirkungen an eine Metalloberfläche. Durch die Verknüpfung der aktivierte C-Termini der Peptide in dieser Monoschicht mit einem Amino-funktionalisierten Lipid wird zunächst eine Lipidmonoschicht und durch anschließende Vesikelfusion eine bimolekulare Lipidmembran erzeugt. Wir verwendeten Vesikel aus Phosphatidylcholin (PC aus Sojabohnen) zur Herstellung proteinfreier Phospholipid-Membranen, die ein Membransystem repräsentieren, dem jegliche natürlichen Komponenten für die Proteintranslokation fehlen.

In-vitro-Systeme bieten eine leistungsstarke Methode für die Synthese von GPCRs, durch die eine Expression innerhalb der komplexen zellulären Umgebung vermieden werden kann.^[11] Eine In-vitro-Expression mit anschließender Rekonstitution bakterieller Membranproteine in Lipidvesikel wurde bereits demonstriert.^[12,13] Das Vesikel-System hat jedoch erhebliche Nachteile: Der Aufbau der Lipidvesikel lässt es nicht zu, dass Komponenten in einfacher Weise zum inneren Vesikelkompartment zugegeben oder aus diesem entfernt werden können. Zudem stehen wesentlich weniger experimentelle Techniken zur Untersuchung von Vesikeln zur Verfügung als zur Untersuchung planarer Systeme.

Nach dem Aufbau der Lipiddoppelschicht erfolgte die In-vitro-Expression des OR5-Proteins in direktem Kontakt mit der peptidfixierten Membran, um so eine unmittelbare post-transkriptionale Integration des Rezeptors in die Membranoberfläche zu bewirken. Dazu wurde ein Zellextrakt aus Kaninchen-Retikulozyten^[14] (Promega) zusammen mit der cDNA von OR5 auf die Oberfläche der Lipidmembran pipettiert.

Die cDNA von OR5 wurde mit einer Kozak-Konsensus-Sequenz^[15] versehen und in Kombination mit einem Epitop des Virus der vesikulären Stomatitis (VSV)^[16] in das Ex-

pressionsvektorsystem pTNT (Promega) kloniert. Alle In-vitro-Reaktionen wurden entsprechend den Herstellerangaben (Promega) durchgeführt. Proteingröße und Expressionseffizienz wurden mit einem Standard-Western-Blot analysiert (siehe Hintergrundinformationen). Für die Bestimmung der Orientierung, in der die resultierenden OR5-Proteine in die Membran inseriert wurden, klonierten wir cDNA-Konstrukte mit unterschiedlichen Positionen der VSV-Epitop-Sequenz: ein Konstrukt mit C-terminaler und ein Konstrukt mit N-terminaler VSV-Sequenz.

Durch die oberflächenempfindliche SPFS lassen sich Fluoreszenzsignale oberflächenspezifisch detektieren. Damit konnten wir eine Bindung von Anti-VSV-Antikörpern an Komponenten des Membransystems, wie dem *in vitro* synthetisierten OR5, in sehr kleiner Entfernung zur Messoberfläche nachweisen (Abbildungen 1 und 2). Wie aus früheren Arbeiten bekannt, entstehen diese Signale nur, wenn sich ein Fluorophor sehr nahe (< 150 nm) an der Sensoroberfläche befindet^[4] und nicht etwa frei in der Lösung diffundiert. Die hier gezeigten SPFS-Daten stammen von zeitabhängigen Messungen bei einem festen Einfallwinkel. Der Anstieg der Fluoreszenz zeigt dabei die Wechselwirkung eines fluoreszenzmarkierten Anti-VSV-Antikörper-Sandwichs aus der Lösung mit entsprechenden OR5-Rezeptoren an der Oberfläche, wie es auch von ELISA (Enzyme Linked Immuno-Sorbed Assay) bekannt ist. Für den hier vorgestellten SPFS-ELISA wurde ein monoklonaler Antikörper aus der Maus (Chemicon), der spezifisch das VSV-Epitop erkennt, auf der Oberfläche inkubiert. Nach dem Entfernen des Antikörper-überschusses wurde ein mit dem Farbstoff Cyanin 5 (Cy5) markierter polyklonaler Zweitantikörper (ein IgG gegen Maus, gewonnen aus Ziege (Chemicon)) auf die Oberfläche gegeben.

In einem Kontrollexperiment untersuchten wir zunächst die unspezifische Bindung des Antikörper-Sandwichs an eine OR5-freie Membranoberfläche. Zu diesem Zweck wurde ein In-vitro-Reaktionsansatz ohne die notwendige OR5-cDNA auf die peptidfixierte Membran aufgetragen. Bei diesem Versuch wurde kein signifikanter Anstieg des SPFS-Fluoreszenzsignals bei Zugabe des Anti-VSV-Antikörper-Sandwichs festgestellt (Abbildung 1).

Anschließend überprüften wir Vorhandensein und Zugänglichkeit der beiden Epitop-Sequenzen für die Antikörperbindung. Dazu wurde eine In-vitro-Expression für N- und für C-terminal markiertes OR5 durchgeführt. Die Reaktionsmischungen wurden dabei zunächst ohne Membran inkubiert und erst nach Ende der In-vitro-Expression auf die peptidfixierte Membran gegeben. Bei dieser „nachträglichen Inkubation“ stieg das Fluoreszenzsignal bei der Zugabe des Antikörper-Sandwichs in ähnlicher Weise für beide cDNA-Konstrukte. Die vergleichbaren Fluoreszenzsignale belegen eine erfolgreiche Expression von N- und C-terminal markiertem OR5-Rezeptor, aber auch eine völlig unspezifische Oberflächenanlagerung der derart synthetisierten Proteine, bei der beide Termini für die Antikörperwechselwirkung zugänglich sind (Abbildung 1).

Befand sich die In-vitro-Expressionsmischung hingegen während des gesamten Expressionsvorgangs in direktem Kontakt mit der peptidfixierten Membran, unterschieden sich

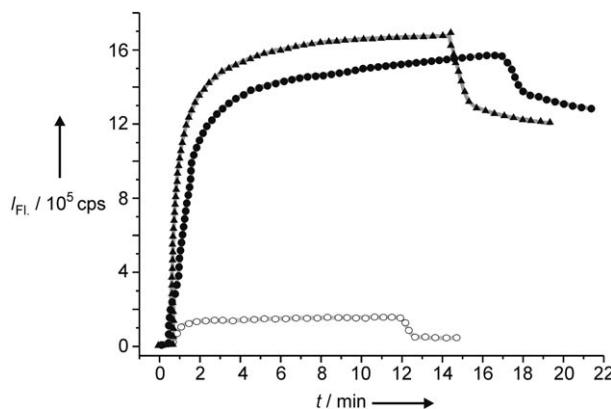


Abbildung 1. SPFS-Spektren der Wechselwirkung zwischen einem Cy5-markierten Anti-VSV-Antikörper-Sandwich und OR5, das N-terminal (▲) oder C-terminal (●) mit einem VSV-Epitop markiert ist. OR5 wurde in Abwesenheit der peptidfixierten Membran *in vitro* exprimiert; anschließend wurde die gesamte Reaktionsmischung mit dem peptidfixierten Membransystem inkubiert. Als Negativkontrolle wurde eine In-vitro-Expressionsmischung auf dem Membransystem inkubiert, die kein cDNA-Konstrukt enthielt (○).

die resultierenden Fluoreszenzsignale des C- und des N-terminal markierten Konstruktes stark voneinander (Abbildung 2). In diesem Fall war nur dann ein deutlicher Fluoreszenzanstieg zu verzeichnen, wenn die In-vitro-Reaktionsmischung mit dem cDNA-Konstrukt für das N-terminal VSV-markierte OR5 versetzt wurde. Der Einsatz des Konstruktes für das C-terminal VSV-markierte OR5 ergab hingegen keinen erkennbaren Fluoreszenzanstieg. Der $\Delta_{\text{Fluoreszenz}}$ -Wert zwischen den Fluoreszenzkurven in Abbildung 2 zeigt also 1) die erfolgreiche Inkorporation von OR5, wobei der N-Terminus des Proteins für die Antikörperbindung zugänglich ist, und 2) die gerichtete Insertion des Proteins in die Membran, weil der Antikörper gegenüber der C-terminalen VSV-Markierung ein vernachlässigbares Fluoreszenzsignal liefert, da dieser Terminus durch die Membran „maskiert“ wird. Die endgültige Ausrichtung des Proteins, bei der der N-Terminus der wässrigen Umgebung auf der Membranoberseite zuge-

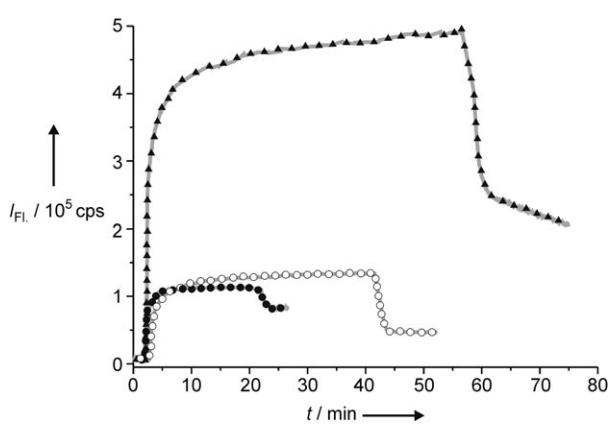


Abbildung 2. SPFS-Spektren der Wechselwirkung zwischen einem Cy5-markierten Anti-VSV-Antikörper-Sandwich und N-terminal (▲) oder C-terminal (●) VSV-markiertem OR5-Protein, das in eine peptidfixierte Membran inseriert war. Die In-vitro-Expression von OR5 wurde in direktem Kontakt mit der peptidfixierten Membran vorgenommen. Negativkontrolle: In-vitro-Reaktionsmischung ohne cDNA (○).

wandt ist, entspricht der Orientierung von OR5 im endoplasmatischen Retikulum intakter Zellen. OR5 wird, wie von anderen Mitgliedern der GPCR-Familie bekannt, über den Golgi-Apparat zur Zellmembran transportiert und fusioniert anschließend derart mit dieser, dass der N-Terminus sowie die mutmaßliche Bindedomäne des Geruchsrezeptors zur extrazellulären Seite in den Cilien der Geruchsneuronen orientiert sind. Abbildung 2 zeigt eine repräsentative SPFS-Messung von fluoreszenzmarkiertem Anti-VSV-Antikörper-Sandwich, der an die OR5-funktionalisierte Membranoberfläche der Messanordnung bindet.

In der Folge wurde das cDNA-Konstrukt für das N-terminal markierte OR5 verwendet, um die Membraninsertion und die Ligandbindung dieses Proteins zu untersuchen. Zur Überprüfung der vollständigen Membranintegration des OR5-Proteins wurde es mit $^{[35]\text{S}}$ Methionin radioaktiv markiert und anschließend enzymatisch verdaut. Die resultierenden Proteinfragmente wurden hinsichtlich ihrer Größe analysiert (siehe Hintergrundinformationen). Dabei wurden Proteinfragmente mit Massen zwischen 5.5 und 7 kDa detektiert, was der Massenverteilung von Fragmenten aus zwei benachbarten Transmembranhelices sowie deren Verbindungsdomäne entspricht. Im Referenzexperiment (In-vitro-Synthese von OR5 ohne planare Membran) wurden wegen fehlender Membranintegration deutlich kleinere Proteinfragmente gefunden.

Schließlich untersuchten wir die Ligandenerkennung des in vitro synthetisierten Geruchsrezeptors mit SEIRAS (Abbildung 3).^[17] Dies ist eine geeignete Methode zur Charakterisierung oberflächengebundener Monoschichten durch Detektion von Absorptionsdifferenzen.^[18] Bei Zugabe von Lilial, einem kleinen, hydrophoben Molekül, das als Ligand des OR5-Rezeptors beschrieben wurde,^[22] stieg die Absorption der Amid-I-Bande im SEIRAS-Differenzspektrum deutlich an. Im Kontrollexperiment, bei dem eine reine Membranschicht mit einem In-vitro-Reaktionsansatz in Kontakt gebracht wurde, der keine kodierende cDNA enthielt, zeigte sich kein derartiger Absorptionsanstieg. Für die

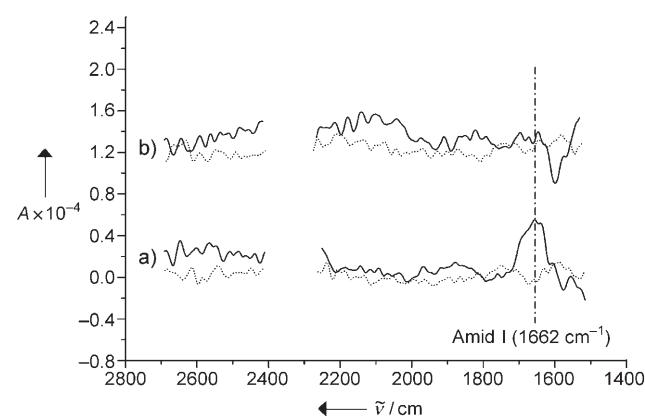


Abbildung 3. a) SEIRAS-Differenzspektrum eines Membransystems, das mit einem In-vitro-Expressionsansatz inkubiert wurde, der die cDNA für N-terminal VSV-markiertes OR5-Protein enthält; (----) vor der Zugabe von Lilial, (—) nach der Zugabe von Lilial. b) Referenzexperiment: Membransystem, das mit einem In-vitro-Expressionsansatz inkubiert wurde, der keine cDNA enthält; (----) vor der Zugabe von Lilial, (—) nach der Zugabe von Lilial.

In-situ-Messung der Bindung von Lilial an den OR5-Rezeptor wurde SEIRAS in der Attenuated-total-Reflection-(ATR)-Konfiguration^[19,20] angewendet. Der Membranaufbau auf der Goldoberfläche sowie die Membraninsertion von OR5 wurden in der gleichen Weise vorgenommen wie für die SPFS-Messungen beschrieben. Durch die Aufnahme zeitabhängiger Differenzspektren wurde der Effekt der einzelnen Bestandteile der wässrigen Phase vollständig kompensiert, sodass die Absorptionsänderungen in den einzelnen Schichten exklusiv verfolgt werden konnten. Referenz- und Probenmessungen erfolgten so, dass eine peptidfixierte Membran, die mit In-vitro-Reaktionsmischungen ohne cDNA (Referenz) oder mit einer OR5-kodierenden cDNA-Sequenz (Probe) versehen war, mit Lilial in Kontakt gebracht wurde. Die einzelnen Messungen wurden dabei sowohl vor als auch unmittelbar nach dem Austausch des Laufpuffers (Standard-PBS) in der Proben- und Referenzzelle durch 50 µm Lilial-Lösung (99.5 % PBS/0.5 % DMSO; v/v) durchgeführt (PBS = phosphatgepufferte Kochsalzlösung). Aus den Messungen ergab sich ein starker Hinweis auf eine Wechselwirkung der Ligandmoleküle mit OR5, da die gefundenen Absorptionsänderungen der Amid-I-Bande charakteristisch für Änderungen der α -Helixkonformation von Membran-inserierten OR5-Proteinen sind. Die hohe Konzentration an Lilial wurde gewählt, um eine maximale Signalstärke zu erzielen.

Wir haben hier demonstriert, dass komplexe, in vitro synthetisierte Säugerproteine gerichtet und in nativer Konformation in oberflächengebundene, peptidfixierte Membranen inseriert werden können. Wir konnten hier zwar nur ein ausgewähltes Beispiel zeigen, sind aber zuversichtlich, dass sich unser Konzept auf weitere Membranproteine übertragen lässt, deren Gewinnung durch konventionelle Expressions- und Reinigungsstrategien bisher noch nicht möglich war. Wir präsentieren daher nicht nur eine neue experimentelle Strategie für die Untersuchung von GPCRs in Membranen, sondern demonstrieren auch eine reproduzierbare, generische und vektoriell-gerichtete Membranproteinsynthese z. B. für Fragestellungen zur Proteininsertion.

Experimentelles

In-vitro-Expression von OR5-VSV: Für die In-vitro-Expressionsexperimente wurde ein „T7 TNT Quick in vitro Expression System“ (Promega) verwendet. Die Reaktionsmischungen wurden gemäß den Herstellerangaben hergestellt. Die Inkubation der Reaktionsmischungen erfolgte extern in einem Heizblock oder – für die spontane Insertion des Proteins in die Membran – unmittelbar auf der oberflächengebundenen, peptidfixierten Doppel lipidmembran.

Aufbau der peptidfixierten Lipidmembran auf einer planaren Goldoberfläche: Die planaren Goldoberflächen wurden durch thermisches Aufdampfen von 99.99 % Gold (Unaxis) auf LaSFN9-Glassubstrate (Hellma) bis zu einer Dicke von 50 nm in einem Edwards-Auto-306-Aufdampfsystem (Edwards) bei 5.0×10^{-6} mbar hergestellt.

Zur Herstellung einer geordneten Peptid-Monoschicht wurde eine Lösung von 0.1 mg mL⁻¹ des Peptids CSRARKQAA-SIKVAVSADR (P19) aus der α -Laminin-Untereinheit (Sigma-Aldrich) in MilliQ-Wasser auf der Goldoberfläche unter Bildung einer selbstorganisierten Monoschicht inkubiert. Der Überschuss an ungebundenem Peptid wurde mit MilliQ-Wasser abgespült. Anschließend wurde eine Mischung aus 150 µL 400 mM N-Dimethylamino-propyl-N'-ethylcarbodiimid (EDC; Fluka) und 150 µL 100 mM N-Hydroxysuccinimid (NHS; Fluka) 10 min lang auf die peptidbedeckte Goldoberfläche gegeben, um den Carboxy-Terminus der Laminin-Ketten zu aktivieren. Die NHS/EDC-Mischung wurde durch eine Lösung von 0.2 mg mL⁻¹ Dimyristoylphosphatidylethanolamin, DMPE (Sigma), in PBS mit 0.003 % (w/v) Triton X-100 (Roth) ersetzt. Nach einer Reaktionszeit von 60 min wurde der Überschuss an NHS, EDC und DMPE durch Waschen mit PBS entfernt.

300 µL einer Lösung aus 1 % Phosphatidylcholin (PC) aus Sojabohnen (Fluka) in PBS wurden mithilfe eines Vesikel-Extruders (LiposoFast; Avestin) mit einem Polycarbonatfilter (Porendurchmesser 50 nm) extrudiert, um unilamellare Vesikel zu erzeugen. Alternativ dazu verwendeten wir 300 µL Mikrosomen-Lösung aus Hunde-Pankreasgewebe (Promega), die vor dem Extrusionsprozess 1:5 mit PBS verdünnt wurde. Die resultierende Vesikel-Emulsion wurde direkt auf die Oberfläche gegeben und nach 90-minütiger Inkubation bei 37°C durch Waschen mit PBS entfernt.

Eingegangen am 4. Juni 2006,
veränderte Fassung am 11. Juli 2006
Online veröffentlicht am 7. Dezember 2006

Stichwörter: Bioorganische Chemie · Fluoreszenzspektroskopie · In-vitro-Synthesen · Membranen · Membranproteine

- [1] W. Knoll, H. Park, E. K. Sinner, D. F. Yao, F. Yu, *Surf. Sci.* **2004**, 570, 30.
- [2] M. Tanaka, E. Sackmann, *Nature* **2005**, 437, 656.
- [3] E. Li, K. Hristova, *Langmuir* **2004**, 20, 9053.
- [4] E. K. Sinner, F. N. Kok, B. Sacca, L. Moroder, W. Knoll, D. Oesterhelt, *Anal. Biochem.* **2004**, 333, 216.
- [5] G. Wiegand, N. Arribas-Layton, H. Hillebrandt, E. Sackmann, P. Wagner, *J. Phys. Chem. B* **2002**, 106, 4245.
- [6] S. Terrettaz, H. Vogel, *MRS Bull.* **2005**, 30, 207.
- [7] R. Naumann, T. Baumgart, P. Gruber, A. Jonczyk, A. Offenhausser, W. Knoll, *Biosens. Bioelectron.* **2002**, 17, 25.
- [8] A. Janshoff, C. Steinem, *ChemBioChem* **2001**, 2, 799.
- [9] W. Knoll, K. Morigaki, R. Naumann, B. Sacca, S. Schiller, E. K. Sinner, *Ultrathin Electrochem. Chemo- Biosens.* **2004**, 2, 239.
- [10] B. Wiltschi, M. Schober, S. D. Kohlwein, D. Oesterhelt, E. K. Sinner, *Anal. Chem.* **2006**, 78, 547.
- [11] W. R. Leifert, A. L. Aloia, O. Bucco, R. V. Glatz, E. J. McMurchie, *J. Biomol. Screening* **2005**, 10, 765.
- [12] V. Noireaux, A. Libchaber, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, 101, 17669.
- [13] C. Klammt, F. Lohr, B. Schafer, W. Haase, V. Dotsch, H. Ruterjans, C. Glaubitz, F. Bernhard, *Eur. J. Biochem.* **2004**, 271, 568.
- [14] H. R. Pelham, R. J. Jackson, *Eur. J. Biochem.* **1976**, 247–250.
- [15] M. Kozak, *Nucleic Acids Res.* **1987**, 15, 8125.
- [16] T. E. Kreis, H. F. Lodish, *Cell* **1986**, 46, 929.
- [17] R. M. Nyquist, K. Ataka, H. Joachim, *ChemBioChem* **2004**, 5, 431.
- [18] A. Dong, P. Huang, W. S. Caughey, *Biochemistry* **1990**, 29, 3303.
- [19] H. Miyake, S. Ye, M. Osawa, *Electrochem. Commun.* **2002**, 4, 973.
- [20] K. Ataka, F. Giess, W. Knoll, R. Naumann, S. Haber-Pohlmeier, B. Richter, J. Heberle, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 16199.
- [21] M. D. Thompson, W. M. Burnham, D. E. C. Cole, *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **2005**, 42, 311.
- [22] K. Raming, J. Krieger, J. Strotmann, I. Boekhoff, S. Kubick, C. Baumstark, H. Beer, *Nature* **1993**, 361, 353.