

Symbiose aus Chemie und Biologie zum Studium von Proteinfunktionen

Daniel Rauh* und Herbert Waldmann

Stichwörter:

Native chemische Ligation · Phosphatasen · Proteine · Proteinmodifikationen · Semisynthese

In den letzten zehn Jahren wurden zahlreiche Methoden zur Aufklärung biologischer Phänomene auf molekularer und zellulärer Ebene entwickelt. Diese basieren auf der gezielten Manipulation der Struktur und somit Aktivität von Proteinen. Die Entdeckung der vielfältigen Funktionen von Proteinen, besonders innerhalb komplexer molekularer Netzwerke, wurde dabei erst durch die Entwicklung genetischer Werkzeuge wie Mutagenese, Knock-out- und Knock-in-Techniken oder den Einsatz molekularer Reporter wie der fluoreszierenden Proteine möglich.

Eine der nächsten großen Aufgaben in der Biologie ist die Erforschung posttranslationaler Modifikationen von Proteinen, die die Funktion von Proteinen z.B. durch eine Veränderung ihrer Stabilität, zellulären Lokalisation, dreidimensionalen Struktur oder Wechselwirkungen mit anderen Molekülen steuern. Die für derart detaillierte Funktionsuntersuchungen benötigten modifizierten Proteinpräparationen sind oftmals mit ausschließlich biologi-

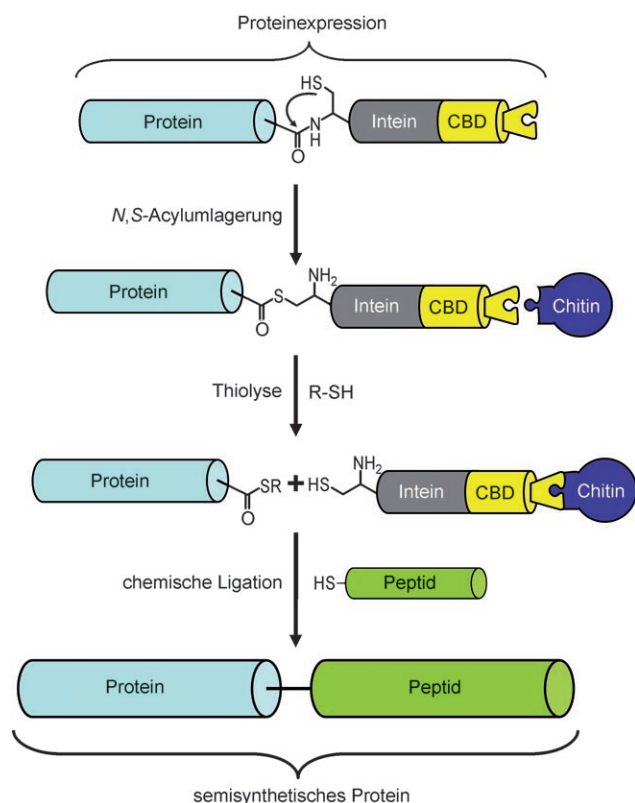
schen Methoden wie der zielgerichteten Mutagenese oder der rekombinanten Proteinexpression gar nicht oder nur sehr schwer zu erhalten. Die Kombination chemischer und biologischer Techniken zur chemoselektiven Modifizierung von Proteinen hat sich hingegen als hervorragendes Hilfsmittel für das Studium von Proteinfunktionen auf molekularer Ebene erwiesen.

Die auf Arbeiten von Wieland et al.^[1] basierende, ursprünglich rein synthetische Methode der nativen chemischen Ligation (NCL) hat sich als äußerst nützlich für die Peptidchemie herausgestellt. Diese Methode ermöglicht die Synthese großer Peptide aus zwei oder mehr kleineren Peptiden durch Kondensation zweier Peptidfragmente, bestehend aus einem C-terminalen Thioester und einem N-terminalen Cystein.^[2] Die semisynthetische Version der NCL kombiniert chemische Synthese mit biologischen Techniken und ist als Ligation exprimierter Proteine (expressed protein ligation, EPL) bekannt.^[3,4] Mit dieser Methode lassen sich synthetisierte Peptide mit rekombinant produzierten Proteinen fusionieren. Die EPL ermöglicht die ortsspezifische Modifizierung von Proteinen mit einer Vielzahl physikalischer Sonden wie Fluoreszenzsonden, Spinmarkern, stabilen Isotopen, unnatürlichen Aminosäuren oder posttranslationalen Modifikationen und wurde bereits erfolgreich bei einer Vielzahl von Fragestellungen des Proteindesigns angewendet (Schema 1).^[5]

Insbesondere strukturbiochemische Arbeiten an posttranslational modifizierten Proteinen werden oft durch heterogene Proteinpräparationen erschwert. Durch Anwendung der EPL

zur Produktion lipidierter und phosphorylierter Proteine als Basis für eine detaillierte Röntgenstrukturanalyse konnte dieses grundlegende Problem überwunden werden.^[6] Durch einen kombinierten biologisch-chemischen Ansatz konnten präparative Mengen mono- und diprenylierter Varianten der Rab-GTPase Ypt1 erhalten werden, wodurch erstmals deren Kristallisation und Strukturbestimmung im Komplex mit dem physiologischen Modulator RabGDP-Dissoziations-Inhibitor (RabGDI) möglich wurde.^[7–9] Rab-Proteine sind wichtige Regulatoren des vesikulären Membrantransports und vermitteln zahlreiche Ereignisse wie das Andocken und Verbinden von Membranen sowie deren intrazelluläre Mobilität. Posttranslationale Modifikationen sind dabei essenziell für die Proteinfunktion. Die Röntgenkristallstruktur des Ypt1:RabGDI-Komplexes zeigte eine durch Bindung des prenylierten Ypt1 induzierte Konformationsänderung von RabGDI und die damit verbundene Bildung einer hydrophoben Bindungstasche, die zur Aufnahme der Prenylseitenkette von Ypt1 dient. Im unkomplexierten Zustand ist dieser Prenylrest in der Plasmamembran verankert (Abbildung 1). Die Arbeiten von Goody et al. deckten erstmals die tatsächliche Position der Prenylbindungstasche auf und führten zur Aufklärung des molekularen Mechanismus des Membraneinbaus bzw. -ausbaus von Rab-Proteinen durch Effektoren wie GDI oder REP (Rab-Escort-Protein). Man vermutet, dass Mutationen von RabGDI beim Menschen geistige Behinderung verursachen. Durch diese umfangreichen biophysikalischen und strukturbiochemischen Studien konnte der Wirk-

[*] Dr. D. Rauh
Chemical Genomics Centre
der Max-Planck-Gesellschaft
Otto-Hahn-Straße 15
44227 Dortmund (Deutschland)
Fax: (+49) 231-9742-6479
E-Mail: daniel.rauh@cgc.mpg.de
Prof. Dr. H. Waldmann
Max-Planck-Institut für molekulare
Physiologie
Otto-Hahn-Straße 11
44227 Dortmund (Deutschland)
und
Fachbereich Chemie
Universität Dortmund
Fax: (+49) 231-133-2499
E-Mail: herbert.waldmann@mpi-
dortmund.mpg.de



Schema 1. Ligation exprimierter Proteine (EPL): Ein Proteinspleißelement (Intein) wird zusammen mit einer Affinitätsmarkierung wie der Chitinbindungsdomäne (CBD) als Fusionat mit dem C-Terminus des Zielproteins rekombinant überexprimiert. Das N-terminale Cystein der Intein-domäne initiiert eine N,S-Acylumlagerung durch einen nucleophilen Angriff an das Carbonylkohlenstoffatom. Exogen zugeführte Thiole bilden durch Thiolyse den rekombinanten Thioester des Zielproteins und bewirken die Abspaltung des Inteins. Das finale, semisynthetische Zielprotein wird durch Reaktion des C-terminalen Thioesters mit dem N-terminalen Cystein des synthetischen Peptids über Ligrationsreaktionen gebildet. Trägerpartikel mit immobilisiertem Chitin ermöglichen die leistungsfähige Abtrennung und Reinigung des gebildeten Konstrukts. Für die inteinvermittelte Reinigung durch immobilisiertes Chitin wurden bereits kommerzielle Systeme entwickelt.^[31]

mechanismus dieser Mutationen aufgeklärt werden: Sie bewirken, dass Rab-Proteine wie das prenylierte Ypt1 schlechter aus Membranen extrahiert werden, womit letztlich ein gestörter Membrantransport die molekulare Ursache dieser Erbkrankheit ist.^[8,10]

Unter einer Vielzahl posttranslati-onaler Modifikationen ist die Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Proteinen die wichtigste Modifikation zur zellulären Regulation biologischer Prozesse. Durch die Übertragung von Phosphatgruppen werden Funktionen zellulärer Proteine kontrolliert und Informationen zwischen verschiedenen Kompartimenten innerhalb einer Zelle durch Signaltransduktion ausgetauscht.

Die Natur nutzt dabei oft das Prinzip der räumlichen Trennung durch Kom-

partmentierung, um die für eine optimale Modulation der Enzymaktivität in der Signaltransduktion erforderliche Spezifität von Proteinkinasen und Phosphatasen zu erreichen. Das balancierte Zusammenspiel von Proteinkinasen und Phosphatasen ist hierfür wesentlich. Als zwei der größten Enzymfamilien in Eukaryoten sind Kinasen und ihre physiologischen Gegenstücke, die Phosphatasen, an der Kontrolle sowohl normaler zellulärer als auch fehlregulierter Prozesse beteiligt. Eine Fehlregulation kann zu vielfältigen Erkrankungen wie Krebs, Diabetes, neurologischen Defekten oder Autoimmundefekten führen. Wegen ihrer zentralen Rolle gelten diese signaltransduzierenden Proteine für nahezu alle Krankheitsformen als vielversprechen-

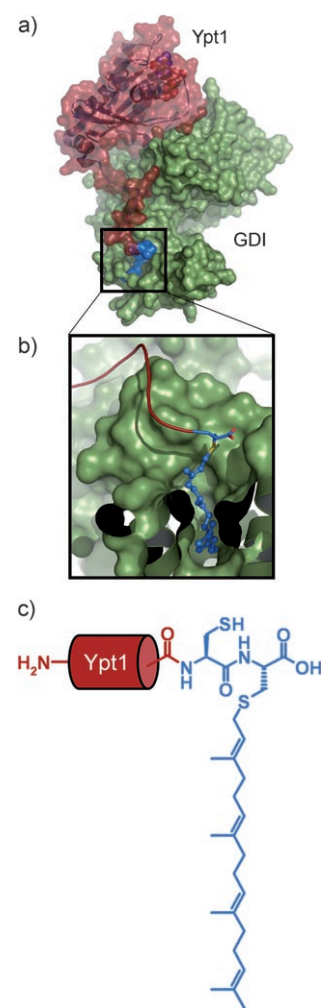


Abbildung 1. Struktur des monopenylierten Ypt1:RabGDI-Komplexes (PDB-Eintrag: 1ukv^[9]): a) Oberflächen- und Sekundärstrukturdarstellung des an RabGDI (grün) gebundenen Ypt1 (rot) mit Prenyleinheit (blau). b) Vergrößerte Oberflächenendarstellung der durch die Bindung des prenylierten Ypt1 gebildeten lipophilen Bindungstasche von RabGDI. c) Schematische Darstellung von monopenyliertem Ypt1. Das prenylmodifizierte, synthetische Dipeptid (blau) ist mit dem C-Terminus von Ypt1 (rot) ligiert.

de Zielproteine der modernen Wirkstoffforschung.^[11] Das detaillierte Verständnis von Proteinphosphorylierung und -dephosphorylierung bildet dabei die Grundlage in der Entwicklung innovativer Therapieansätze.^[12]

Die Anwendung von EPL-Techniken auf In-vivo-Systeme gelang Cole und Mitarbeitern erstmals mit der Mikroinjektion der durch Semisynthese hergestellten und mit nichthydrolysierbaren Phosphotyrosinresten ausgestat-

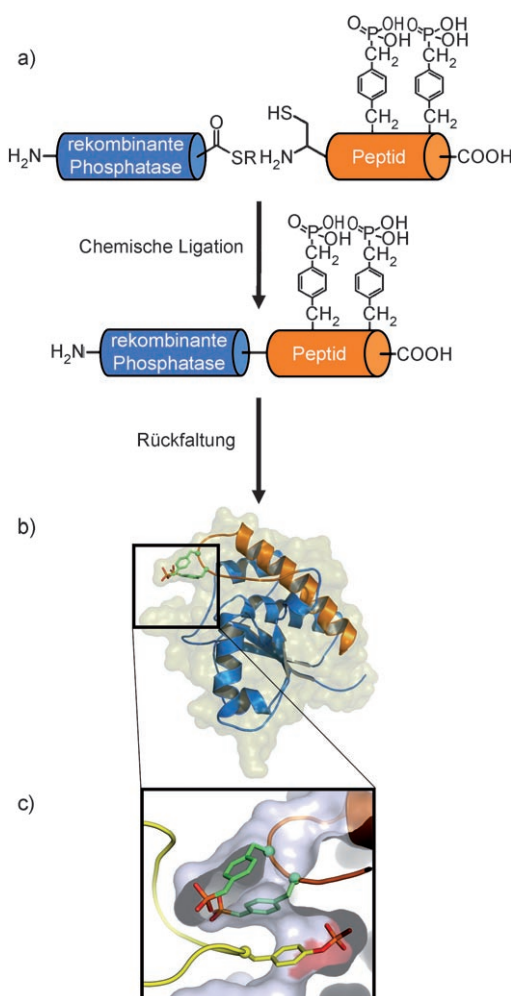
teten Tyrosinphosphatase SHP-2 in lebenden Zellen. Diese Studien ermöglichen die grundlegende Untersuchung von Phosphorylierungen an SHP-2 und der damit verbundenen Aktivierung des bei der Tumorentstehung wichtigen MAP-Kinase-Signaltransduktionswegs.^[13] In einem kürzlich erschienenen Beitrag untersuchte dieselbe Arbeitsgruppe den Einfluss von Phosphorylierungen auf die enzymatische Aktivität und Funktion der Protein-Tyrosinphosphatase LMW-PTP (low molecular weight protein tyrosine phosphatase).^[14] Bei diesem Enzym handelt es sich um ein 18 kDa leichtes Protein, das eine zentrale Rolle bei der zellulären Signaltransduktion, der Mitose, der fokalen Adhäsion sowie der Zellmobilität spielt.^[15] Die Aktivität von LMW-PTP hängt dabei in erster Linie von der wachstumsfaktorstimulierten Phosphorylierung an zwei C-terminalen Tyrosinseitenketten (Tyr 131 und Tyr 132) ab. Die Rezeptor-Tyrosinkinase von PDGF (platelet-derived growth factor) sowie die Src-Kinase werden als die für die Phosphorylierung verantwortlichen Kinasen diskutiert.

Die detaillierte, biochemische Charakterisierung des Einflusses von Phosphorylierungsmustern auf die Funktion von Tyrosinphosphatasen erweist sich wegen der Tendenz der Phosphatasen zur Autodephosphorylierung, besonders unter physiologischen Bedingungen, als äußerst schwierig. Die Autoren konnten dieses Hindernis bei der Produktion homogener Proteinpräparationen durch den Einbau von Phosphonomethylen-L-phenylalanin (Pmp) als bekanntem, nicht hydrolysierbarem Phosphotyrosinmimetikum elegant umgehen. Die Phosphonate imitieren dabei die funktionalen Phosphorylierungen an den zuvor diskutierten essenziellen Positionen im C-terminalen Bereich der Protein-Tyrosin-Phosphatase (PT-Phosphatase). Die N-terminale Domäne der PT-Phosphatase konnte als rekombinantes Fusionsprotein mit einem modifizierten Intein, an das sich eine Chitinbindungsdomäne (CBD) anschließt, in *Escherichia coli* überexprimiert und als C-terminaler Thioester gereinigt werden. Die Synthese des modifizierten C-Terminus und der Einbau der artifiziellen Aminosäure Pmp erfolgten als Peptid mit N-terminalem Cystein an der

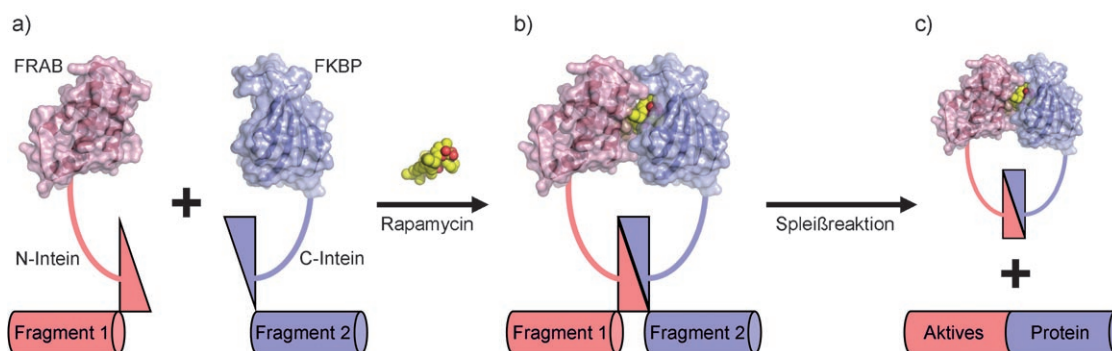
festen Phase. Die chemoselektive Verknüpfung des rekombinant hergestellten N-terminalen Peptidfragments und des synthetisierten C-terminalen Polypeptids wurde mithilfe präparativer Ligationsreaktionen durchgeführt. Die Rückfaltung des Ligationsprodukts über Dialyse und die anschließende chromatographische Reinigung führten zu korrekt gefalteter und enzymatisch aktiver PT-Phosphatase (Schema 2). Die biochemische Charakterisierung der semisynthetischen LMW-PTP-Varianten ergab eine unerwartete Verringerung anstelle einer zuvor postulierten Erhö-

hung^[16,17] der Enzymaktivität, wenn von mutmaßlichen zellulären Substraten (PDGF und p190RhoGap) abgeleitete Phosphopeptide verwendet wurden. Somit konnte erstmals ein Beispiel für eine Tyrosinphosphatase, die selbst durch Phosphorylierung inhibiert wird, beschrieben werden; dies lieferte ein neues Modell der komplexen Regulation von Protein-Tyrosinphosphatasen und ihrer Rolle bei der zellulären Signalübertragung.

Die Beiträge von Cole und Mitarbeitern haben überzeugend die Leistungsfähigkeit der Semisynthese zum



Schema 2. Semisynthese von LMW-PTP-Konstrukten durch chemische Ligation: a) Der rekombinante Thioester der Phosphatase (blau) wird mit dem synthetischen Peptid ligiert (orange). Das Peptid ist mit dem nichthydrolysierbaren Phosphotyrosinmimetikum Pmp dekoriert (Austausch des Phenolsauerstoffatoms von Phosphotyrosin gegen eine Methylengruppe). b) Die Rückfaltung des semisynthetischen Ligationsprodukts führt zu korrekt gefalteter und enzymatisch aktiver LMW-PTP. c) Vergrößerte Oberflächendarstellung der Substratbindungstasche der Phosphatase mit eingepasstem, phosphoryliertem Substrat (gelb). Das katalytische Zentrum (rot) des Enzyms befindet sich am Ende der Bindungstasche. Die beiden für die Funktion der Phosphatase wichtigen Phosphorylierungsstellen (grün) sind am Rand der Bindungstasche lokalisiert. Die modellierte Struktur basiert auf LMW-PTP im Komplex mit Phosphat (PDB-Eintrag: 1pnt^[32]). Die Abbildungen wurden mit PyMol erstellt.^[33]



Schema 3. Konditionales Proteinspleißen: a) Inaktive Fragmente (1 und 2) des Zielproteins liegen als Fusionat eines gespaltenen Inteins (N-Intein und C-Intein) und Rapamycin-bindender Proteine (FRAB und FKBP) vor; FRAB = FKBP-Rapamycin-assoziiertes Protein, FKBP = FK506-bindendes Protein. Die fusionierten Konstrukte werden in Zellen exprimiert. b) Bei Zugabe der niedermolekularen, zellpermeablen Verbindung Rapamycin (gelb C, rot O) kommt es durch eine Wechselwirkung mit den Rapamycin bindenden Domänen zu einer Dimerisierung der beiden Konstrukte und einer damit verbundenen Rekonstitution des Inteins. c) Das funktionale Intein initiiert die Spleißreaktion der beiden Proteinfragmente 1 und 2 zum nativen Zielprotein.

Studium des Einflusses von Phosphorylierungen auf die Proteinfunktion demonstriert. Typischerweise umfasst die Aufklärung der biologischen Funktion von Enzymen wie den besprochenen Phosphatasen die Verwendung genetischer Techniken wie des Knock-outs und Knock-ins ganzer Gene und der Verwendung von Enzyminhibitoren (chemische Genomik). Beide Ansätze wären jedoch für die vorgestellten Studien zur Funktion von LMW-PTP nicht geeignet gewesen, da sie keine direkte Kontrolle über die regioselektive posttranslationale Modifikation des zu untersuchenden Proteins ermöglichen.^[18–20] Die Konstruktion einer semisynthetischen Phosphatase mithilfe der Ligation exprimierter Protein erlaubte es somit, Proteinfunktionen zu studieren, die sonst nicht zugänglich gewesen wären. Außer den hier vorgestellten Beispielen über die Anwendung der Semisynthese zum Studium der Lipidierung und Phosphorylierung wurden auch Ligationstechniken weiterer posttranslatieller Modifikationen z.B. zur Aufklärung der überaus komplexen Glycosylierungsmuster entwickelt.^[21,22]

NCL und EPL haben allerdings noch eine Reihe von Einschränkungen. Insbesondere die Notwendigkeit eines N-terminalen Cysteinrests erweist sich oft als problematisch, da nicht bei jedem Konstrukt oder jeder Designstrategie ein Cysteinrest an der Ligationsstelle vorhanden sein darf. Dies macht die Entwicklung flexibler Ligationstechniken erforderlich, mit denen eine Verknüpfung der Peptidfragmente über

andere Aminosäuren möglich ist. Die Verwendung von Auxiliaren, die N-terminale Cysteinreste chemisch imitieren und somit neue Ligrationsreaktionen ermöglichen,^[22,23] sowie die Verwendung von Enzymen^[24] zur Knüpfung der Peptidbindung könnten sich hierbei als hilfreich erweisen. Zudem ist es erforderlich, die oftmals geringen Ausbeuten der Ligationsschritte zu verbessern und eine Denaturierung der hergestellten Proteinkonstrukte unter den gewählten Reaktionsbedingungen zu verhindern. Zwar konnten bereits kleinere Proteine mit Ligationstechniken z.B. an wasserträglichen Harzen^[25] synthetisiert werden, allerdings ist die sequenzielle Ligation von Peptiden zur Bildung größerer Proteine immer noch eine schwierige Aufgabe.

Weiterentwicklungen der Proteineligation^[26,27] gehen in Richtung minimal invasiver Techniken, mit denen die Zielproteine im komplexen Zusammenspiel der Gesamtheit aller Proteine in vivo analysiert werden können. In diesem Zusammenhang entwickelten Mootz, Muir et al. das konditionale Proteinspleißen, das als In-vivo-Technik unter der Kontrolle eines zellpermeablen, niedermolekularen Liganden die Rekonstitution zweier inaktiver Proteinfragmente zum funktional aktiven Zielprotein ermöglicht (Schema 3).^[28–30] Die Methode des konditionalen Proteinspleißens basiert auf der Fusion inaktiver Domänen des Zielproteins mit den beiden Proteinfragmenten eines gespaltenen Inteins. Die beiden Inteinhälften liegen wiederum als Fusionat entweder

mit dem Rapamycinrezeptor oder mit der Rapamycinbindedomäne vor. Unter dem Einfluss von Rapamycin erfolgt die Dimerisierung der beiden Rapamycin bindenden Proteine. Die sich anschließende Komplexbildung der Inteinfragmente initiiert die autokatalytische Spleißreaktion zum funktional rekonstituierten und aktiven Zielprotein. Diese elegante Methode bietet die Möglichkeit, Proteinfunktionen unter der Kontrolle kleiner organischer Moleküle in In-vivo-Systemen anzuschalten anstatt sie zu inhibieren, und steht stellvertretend für die Weiterentwicklung von Ligationstechniken in Richtung der chemischen Genomik. Die hier vorgestellten Ligationsmethoden bieten innovative Hilfsmittel für das Studium von Proteinen in lebenden Zellen und ermöglichen es, die Funktion von Proteinen innerhalb der dynamischen und variablen Natur biologischer Prozesse zu verfolgen und besser zu verstehen.

Online veröffentlicht am 29. Dezember 2006

- [1] T. Wieland, E. Bockelmann, L. Bauer, H. U. Lang, H. Lau, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1958**, 583, 129.
- [2] P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. B. Kent, *Science* **1994**, 266, 776.
- [3] T. C. Evans, Jr., J. Benner, M. Q. Xu, *Protein Sci.* **1998**, 7, 2256.
- [4] T. W. Muir, D. Sondhi, P. A. Cole, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 6705.
- [5] T. W. Muir, *Annu. Rev. Biochem.* **2003**, 72, 249.
- [6] J. W. Wu, M. Hu, J. Chai, J. Seoane, M. Huse, C. Li, D. J. Rigotti, S. Kyin, T. W.

- Muir, R. Fairman, J. Massague, Y. Shi, *Mol. Cell* **2001**, 8, 1277.
- [7] L. Brunsveld, J. Kuhlmann, K. Alexandrov, A. Wittinghofer, R. S. Goody, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 6774; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 6622; M. H. Gelb, L. Brunsveld, C. A. Hrycyna, S. Michaelis, F. Tamanoi, W. C. Van Voorhis, H. Waldmann, *Nat. Chem. Biol.* **2006**, 2, 518.
- [8] O. Pylypenko, A. Rak, T. Durek, S. Kushnir, B. E. Dursina, N. H. Thomae, A. T. Constantinescu, L. Brunsveld, A. Watzke, H. Waldmann, R. S. Goody, K. Alexandrov, *EMBO J.* **2006**, 25, 13.
- [9] A. Rak, O. Pylypenko, T. Durek, A. Watzke, S. Kushnir, L. Brunsveld, H. Waldmann, R. S. Goody, K. Alexandrov, *Science* **2003**, 302, 646.
- [10] R. S. Goody, A. Rak, K. Alexandrov, *Cell. Mol. Life Sci.* **2005**, 62, 1657.
- [11] L. Bialy, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 3880; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 3814.
- [12] A. Östman, C. Hellberg, F. D. Bohmer, *Nat. Rev. Cancer* **2006**, 6, 307.
- [13] W. Lu, D. Gong, D. Bar-Sagi, P. A. Cole, *Mol. Cell* **2001**, 8, 759.
- [14] D. Schwarzer, Z. Zhang, W. Zheng, P. A. Cole, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 4192.
- [15] G. Rauei, G. Ramponi, P. Chiarugi, *Cell. Mol. Life Sci.* **2002**, 59, 941.
- [16] M. Bucciantini, P. Chiarugi, P. Cirri, L. Taddei, M. Stefani, G. Rauei, P. Nordlund, G. Ramponi, *FEBS Lett.* **1999**, 456, 73.
- [17] P. Tailor, J. Gilman, S. Williams, C. Couture, T. Mustelin, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 5371.
- [18] K. Hinterding, A. Knebel, P. Herrlich, H. Waldmann, *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, 6, 1153.
- [19] M. A. Shogren-Knaak, P. J. Alaimo, K. M. Shokat, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2001**, 17, 405.
- [20] D. P. Walsh, Y. T. Chang, *Chem. Rev.* **2006**, 106, 2476.
- [21] L. Liu, C. S. Bennett, C. H. Wong, *Chem. Commun.* **2006**, 21.
- [22] B. Wu, J. Chen, J. D. Warren, G. Chen, Z. Hua, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 4222; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 4116.
- [23] J. Offer, C. N. Boddy, P. E. Dawson, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 4642.
- [24] Z. Machova, R. von Eggelkraut-Gottanka, N. Wehofsky, F. Bordusa, A. G. Beck-Sickinger, *Angew. Chem.* **2003**, 115, 5065; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 4916.
- [25] E. C. Johnson, T. Durek, S. B. Kent, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 3361; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 3283.
- [26] C. Ludwig, M. Pfeiff, U. Linne, H. D. Mootz, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 5343; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 5218.
- [27] V. Muralidharan, T. W. Muir, *Nat. Methods* **2006**, 3, 429.
- [28] H. D. Mootz, E. S. Blum, T. W. Muir, *Angew. Chem.* **2004**, 116, 5301; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 5189.
- [29] H. D. Mootz, E. S. Blum, A. B. Tyszkiewicz, T. W. Muir, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 10561.
- [30] H. D. Mootz, T. W. Muir, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 9044.
- [31] S. Chong, F. B. Mersha, D. G. Comb, M. E. Scott, D. Landry, L. M. Vence, F. B. Perler, J. Benner, R. B. Kucera, C. A. Hirvonen, J. J. Pelletier, H. Paulus, M. Q. Xu, *Gene* **1997**, 192, 271.
- [32] M. Zhang, M. Zhou, R. L. Van Etten, C. V. Stauffacher, *Biochemistry* **1997**, 36, 15.
- [33] W. L. DeLano, <http://www.pymol.org> **2002**.