tereinheiten bestehende ATPase beschrieben, die Arsenit, Antimonit und Arsenat aus *E. coli* transportiert und die Bakterien gegen diese toxischen Anionen resistent macht. – Wie oben angedeutet, sind die Na^+K^+-ATPasen Bestandteil tierischer Zellmembranen und bilden Na^+K^+-Gradienten als sekundäre Triebkraft für Transportprozesse, während in Pflanzenzellen, Hefen und Pilzen H^+-ATPasen einen H^+-Gradienten bilden. B. Horowitz et al. [J. Biol. Chem. *265*, 4189 (1990)] gelang die Exprimierung und der funktionelle Zusammenbau der beiden Untereinheiten α und β der Na^+K^+-ATPase in Hefezellen. Beide Untereinheiten, nicht jedoch die γ-Untereinheit, sind für die Funktion notwendig. Damit steht zum ersten Mal ein Hybrid-Organismus zur Verfügung, der gleichzeitig tierische und pflanzliche Transport-ATPase enthält.

Zelluläre Signalübertragung

Innerhalb ganz kurzer Zeit ist es möglich, über Signalübertragungsmechanismen auf molekularer Ebene zu diskutieren. Dies gelang durch die Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse von ras p21, einem kleinen, GTP-bindenden und hydrolysierenden Protein, das als Signalüberträger bei der Zellteilung wirkt. [E. F. Pai et al., I. Schlichting et al., s. Abschnitt „Organische Chemie – Enzymologie"]. In der gleichen Arbeitsgruppe wurden auch die dreidimensionalen Strukturen von ras p21-Mutanten bestimmt [U. Krengel et al., Cell *62*, 539 (1990)]: In mutierter Form ist p 21 ein Onkogen, denn durch Bindung des Regulatorproteins GAP an p21-Mutanten wird die GTP-Hydrolyse nicht mehr aktiviert und das Zellteilungssignal nicht mehr abgeschaltet. Als Pendant zum p21-„downregulierenden" GAP wurde von M. West et al. [FEBS Lett. *259*, 245 (1990)] ein Aktivatorprotein (GDP/GTP-Austausch) ähnlicher Größe wie GAP isoliert. Zum Wirkmechanismus von ras p 21 vgl. auch A. Yatani, Cell *61*, 769 (1990); über seine Aktivierung durch ein extrazelluläres Signal berichten erstmals J. Downward et al. [Nature *346*, 719 (1990)].

Auch kleine Moleküle sind Teil intra- und interzellulärer Signalübertragung; ein neuer intrazellulärer Transmitter wurde in der phototaktischen Signalkette der Halobakterien entdeckt: Fumarat oder ein fumaratähnlicher Stoff. Die halophilen Bakterien haben zwei photosensorische Rezeptoren, die über einen Mehrstufensignalweg den Flagellenmotor steuern. In dieser Signalkette bestimmen Methylierungen die Lebensdauer der photosensorischen Signale [E. Hildebrand und A. Schimz, Biochem. Biophys. Acta *1052*, 96 (1990)]. W. Marwan et al. [EMBO J. *9*, 355 (1990)] isolierten eine schwimmfähige Mutante mit einem Defekt im Schalter der Umkehrrichtung des Flagellenmotors und rekonstituierten den photosensorischen Umschalt-Respons mit einem Extrakt aus Wildtyp-Zellen durch eine milde Permeabilisierungs-Resealing-Prozedur bei der Mutante. Die Analyse des Extrakts ergab einen „switching"-Faktor, der, wie oben erwähnt, in allen getesteten Eigenschaften Fumarat gleicht. Einige wenige Moleküle sind für die Vermittlung der Signalantwort erforderlich, wenngleich höhere Totalkonzentrationen (30 μM) in Wildtyp-Zellen gefunden wurden. Die Autoren schließen daher auf ein Fumarat-bindendes Protein in der Plasmamembran der Bakterien, wodurch die cytosolische Fumarat-Konzentration auf etwa 50 Moleküle pro Zelle begrenzt wird. Dieser switching-Faktor (Fumarat) soll nach Photorezeptor-Aktivierung freigesetzt werden, jedoch sind noch mehrere Reaktionsschritte notwendig, bevor die Information den Flagellenmotor erreicht.

□ *Dietrich Kuschmitz, Dortmund*

Proteinforschung

Theoretische Strukturforschung und Vorhersagen

Zu den größten Herausforderungen an die Biochemie gehören sicher die Vorhersage von Proteinstrukturen aus der Sequenzinformation und das Verständnis der Proteinfaltung. Wenngleich sich auf diesem Gebiet noch keinerlei grundlegenden Durchbrüche abzeichnen, so gab es doch im letzten Jahr einige interessante Weiterentwicklungen. Eine Simulation der Protein-Faltung mit Methoden der Moleküldynamik ist heute natürlich noch völlig ausgeschlossen; sie würde nach van Gunsterens Schätzung (bei Verwendung bestehender Verfahren und Computer) immerhin etwa 10^9 Jahre dauern! J. Skolnick und Mitarbeiter haben deshalb untersucht, inwieweit das Problem soweit zu vereinfachen ist, daß derartige Simulationen in bescheideneren Zeiträumen durchgeführt werden können. Die Vereinfachungen bestehen in der Verwendung eines Gittermodells, einer Beschränkung auf C_α-Atome und stark schematisierter Beschreibungen der physikalischen Kräfte. J. Skolnick und A. Kolinski [J. Mol. Biol. *212*, 787, 819 (1989)] untersuchten so die „Faltung" eines β-barrel-Proteins und eines α-Helix-Motivs, ausgehend von einer random-coil-Struktur. In der Simulation ergibt sich, daß die β-Faltblätter nicht in „Fertighaus-Bauweise" aneinandergelagert werden, sondern, beginnend bei einem β-Turn, eher nach einer „Stein-auf-Stein"-Methode entstehen. Das Gleiche wurde für ein Helix-Turn-Helix-Motiv gefunden. Wenn nun in der Simulation berücksichtigt wird, daß die Faltung bereits während der Proteinbiosynthese beginnt – indem in der Simulation ein Ende der Kette an einer Wand festgehalten wird –, findet man, daß die Wand die Faltung unterstützt und die dominanten Faltungswege verändert [A. Sikorski und J. Skolnick, J. Mol. Biol. *215*, 183 (1990)]. Die Wand verkleinert offensichtlich den Konfigurationsraum, der durchsucht werden muß. Ein etwas „realistischeres" Modell mit einem kubischen Gitter, C_β-Atomen und mit verschiedenen Typen von Aminosäuren führt zu ähnlichen Ergebnissen [J. Skolnick und A. Kolinski, Science *250*, 1121 (1990)]. Ähnliche Ansätze mit Gitterbeschreibungen wurden auch von anderen Autoren verwendet [D. G. Coveli und R. I. Jernigan, Biochemistry *29*, 3287 (1990); K. F. Lau und K. A. Dill, Proc. Natl. Acad. Sci. USA *87*, 638 (1990)].

Wenngleich die analytische Auswertung dieser Simulationen einige Eigenschaften der Proteinfaltung zutage fördern wird, die aufgrund ganz grundlegender physikalischer Effekte (z. B. des Ausschluß-Volumens-Effekts) durchaus in der Realität vorhanden sein werden, so ist das bei anderen Charakteristika der Protein-Faltung wegen der starken Vereinfachungen doch eher zweifelhaft. Daher erlauben diese Untersuchungen zwar Einsicht in wichtige Gesetzmäßigkeiten, aber keine detaillierten Voraussagen.

Genau das Gegenteil gilt für die Untersuchungen von M. J. Sippl und Mitarbeitern [M. J. Sippl, J. Mol. Biol. *213*, 859 (1990); M. Hendlich et al., J. Mol. Biol. *216*, 167 (1990)]. Diese Autoren benutzten ein effektives Gesamtpotential, das aus der Summe aller bekannten Proteinstrukturen erhalten wird, ohne in irgendeiner Weise physikalische Kräfte zu unterscheiden. Um dieses Potential zu berechnen, wurden, getrennt für jeden Typ von Aminosäure und für jeden Abstand in der Sequenz, alle räumlichen Abstände tabelliert, die in bekannten 3D-Strukturen auftreten. Dieser völlig empirische Ansatz erlaubt bemerkenswert gute Struktur-Vorhersagen in einigen Segmenten; andere Segmente dagegen bevorzugen keine bestimmte Konformation und passen sich letztlich wohl den Gegebenheiten an, wodurch eine Gesamtvorhersage der Struktur unmöglich bleibt. Allerdings ist es möglich, verschiedene Struktur-Modelle des ganzen Proteins auf ihre Wahrscheinlichkeit hin zu überprüfen. Genau dies beabsichtigten auch L. M. Gregoret und F. E. Cohen [J. Mol. Biol. *211*, 959 (1990)] mit einem vereinfachten Proteinmodell, das Packungskriterien überprüft, sowie L. Chiche et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA *87*, 3240 (1990)] durch eine detaillierte Berechnung der Solvatationsenergie, die für Proteine je nach Molekulargewicht typische Werte annimmt.

Experimentelles zur Proteinfaltung

Die Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der Proteinfaltung ist sicher einer der Schlüssel zum Verständnis des Mechanismus dieses Vorgangs. Bereits vor einiger Zeit war, unabhängig voneinander, sowohl von der Gruppe von H. Röder als auch in der von R. L. Baldwin ein Verfahren entwickelt worden, mit dem mit Hilfe der NMR-Technik bei der Faltung derjenige Zeitpunkt bestimmt werden kann, bei dem ein bestimmtes Proton des Proteins nicht mehr mit dem Lösungsmittel in Kontakt ist. Dieses Verfahren wurde nun auf Apomyoglobin [F. M. Hughson et al., Science *249*, 1544 (1990)] und Barnase [M. Bycroft et al., Nature *346*, 488 (1990)] angewandt. Die Untersuchungen

an Barnase wurden durch kinetische Untersuchungen an einer Zahl von Barnase-Mutanten ergänzt [A. Matouschek et al., Nature *346*, 440 (1990)]. Durch den Vergleich des Einflusses einer Mutation auf die Kinetik der Faltung, der Entfaltung und auf die freie Energie des nativen Zustands kann eine Aussage getroffen werden, wann im Faltungsvorgang einige interne Kontakte erstmals auftreten.

Konformationsänderungen

Proteine sind bekanntlich nicht starr. Nur selten kann allerdings die Kristallographie zur Beschreibung von Konformationsänderungen herangezogen werden. Ein solcher Glücksfall ist eine neue Kristallform einer Mutante des T4-Lysozyms [H. R. Faber und B. W. Matthews, Nature *348*, 263 (1990)], bei der im gleichen Kristall mehrere unterschiedliche relative Anordnungen der beiden Domänen gefunden wurden und die Domänenbewegung damit beschreibbar wurde.

Eine noch wesentlich dramatischere Umlagerung, die bei der proteolytischen Spaltung von Protease-Inhibitoren der α-1-Klasse auftritt, konnte nun genauer aufgeklärt werden. H. T. Wright et al. [J. Mol. Biol. *213*, 513 (1990)] zeigten nämlich, daß Ovalbumin, das signifikante Homologien zu diesen Proteaseinhibitoren aufweist, in analoger Weise von Subtilisin gespalten werden kann. Die Lösung der 3D-Struktur des gespaltenen Ovalbumins zeigte, daß – ganz unspektakulär – in diesem Protein die beiden Peptidstränge auf beiden Seiten der Spaltstelle frei bleiben. Im homologen α-1-Inhibitor dagegen lagert sich das durch die Spaltung entstehende neue C-terminale Ende als neuer Mittelstrang mitten in ein bestehendes β-Faltblatt! Es ist sehr bemerkenswert, daß eine Proteinstruktur die Erweiterung eines β-Faltblatts, wohlgemerkt in der Mitte, tolerieren kann.

Proteine, die Konformationsänderungen durchlaufen, müssen sehr fein ausbalanciert sein, da beide Konformationen ja annähernd gleiche freie Energien haben müssen. Das ist auch im Enzym Chorismat-Mutase ersichtlich [T. Schmidheini et al., Biochemistry *29*, 3660 (1990)]. Dort genügt ein einziger Aminosäure-Austausch, um das Enzym permanent in der einen Konfiguration festzuhalten. Im Enzym Triosephosphat-Isomerase [D. L. Pompliano et al., Biochemistry *29*, 3186 (1990); D. Joseph et al., Science *249*, 1425 (1990)] dient eine Konformationsänderung eines Loops wohl hauptsächlich dazu, die in Lösung bevorzugte Reaktion des Intermediats im Enzym durch eine sterische Hinderung zu unterbinden, da im Enzym das Intermediat in anderer Weise weiterreagieren soll. Auch Reorientierungen ganzer Domänen relativ zueinander können durch die Bindung von Liganden ausgelöst werden [W. F. Mangel et al., Science *248*, 69 (1990)] und zu sehr großen Konformationsänderungen führen, wie z. B. in Plasminogen.

Protein Engineering

Eines der Ziele des Protein-Engineering, das über die Untersuchung der Funktion eines bestimmten Proteins oder Enzyms hinaus geht, ist die Erhöhung der Stabilität. Verschiedene Strategien dazu wurden im vergangenen Jahr genauer analysiert. So fanden A. A. Pakula und R. T. Sauer [Nature *344*, 363 (1990)], daß auch Substitutionen an der Oberfläche eines Proteins merklich zu dessen Stabilität beitragen können. Das ist allerdings nur dann der Fall, wenn ungewöhnlich exponierte hydrophobe Aminosäuren (die allerdings nur selten vorkommen und zudem in manchen Proteinen möglicherweise wichtige Funktionen haben) durch hydrophile Reste ersetzt werden können.

Eine seit mehreren Jahren untersuchte Strategie der Stabilisierung von Proteinen ist der Einbau zusätzlicher Disulfidbrücken. Gleich vier Strukturen von Subtilisin, die verschiedene neu eingeführte Disulfidbrücken enthielten, bestimmten B. Katz und A. A. Kossiakoff [Proteins *7*, 343 (1990)] und beschrieben die geringen Veränderungen im Gerüst des Proteins. P. E. Pjura et al. [Biochemistry *29*, 2592 (1990)] lösten nun die Kristallstruktur einer Variante des T4-Lysozyms, in welche eine deutlich zur Stabilisierung beitragende Disulfidbrücke eingebaut worden war. Ein bemerkenswertes Ergebnis dabei war, daß die kristallographischen Temperatur-Faktoren sich selbst in der Region der Disulfidbrücke kaum vom Wildtyp unterschieden. Das bestärkte die Autoren in der Annahme, daß der stabilisierende Effekt der Disulfidbrücken von einer Einschränkung der Konformationsentropie im *ungefalteten* Zustand herrührt, nicht aber von Veränderungen im nativen Zustand. Eine verwandte Strategie zur Protein-Stabilisierung wurde von C. Ganter und A. Plückthun [Biochemistry *29*, 9395 (1990)] untersucht. Anhand der Glyceraldehyd-phosphat-Dehydrogenase wurde überprüft, ob der geringere Entropieverlust, den Alanin-Reste – verglichen mit Glycin-Resten – bei der Faltung erleiden, ein allgemeingültiges, stabilisierendes Prinzip darstellt. Die Autoren fanden allerdings, daß nur einer der untersuchten Gly → Ala-Austausche stabilisierend wirkt, und zwar ein solcher, bei dem durch die zusätzliche Methylgruppe eine Kavität des Proteins verkleinert wurde. S. Dao-Pin et al. [Proteins *7*, 198 (1990)] zeigten, daß ein (allerdings sehr bescheidener) Stabilitätsgewinn auch zu erreichen ist, wenn solche Seitenketten ersetzt werden, die in ungünstigen Konformeren eingeklemmt sind. Allerdings ändern sich notgedrungen durch einen solchen Aminosäure-Austausch gleichzeitig andere Interaktionen, und diese können den beschriebenen Effekt bei weitem überwiegen.

Die letzten beiden Untersuchungen befaßten sich mit helikalen Regionen in Proteinen. Gleich drei Gruppen suchten mit synthetischen Peptiden eine Antwort auf die Frage, welchen Einfluß einzelne Substitutionen in diesen Peptiden auf die Helix-Stabilität haben [G. Merutka und E. Stellwagen, Biochemistry *29*, 894 (1990); K. T. O'Neill und W. F. DeGrado, Science *250*, 646 (1990); S. Padmanabhan et al., Nature *344*, 268 (1990)]. Die nicht ganz überraschende Schlußfolgerung ist, daß der Einfluß von Substitutionen Kontext-abhängig ist.

Ein anderes Stabilitäts-Problem tritt auf, wenn Untereinheiten eines oligomeren Proteins eine nur schwache Interaktionsenergie haben. Verschiedene Lösungsmöglichkeiten zur Stabilisierung verglichen R. Glockshuber et al. [Biochemistry *29*, 1362 (1990)] an dem F_V-Fragment eines Antikörpers, ein Heterodimer aus zwei verschiedenen Domänen.

Nicht nur die Stabilität eines Proteins *in vitro* ist von allgemeinem Interesse, auch der proteolytische Abbau *in vivo* ist von großer praktischer Bedeutung in der Proteinforschung. Viele Autoren haben über den erhöhten proteolytischen Abbau von Proteinmutanten berichtet, und J. F. Reidhaar-Olson et al. [Biochemistry *29*, 7563 (1990)] suchten nun bei Mutanten des λ-Repressors nach einigen der Ursachen. Sie fanden (wie viele andere Autoren vor ihnen), daß genetische Defekte in einigen der bekannten *E.coli*-Proteasen keinen Effekt haben, interessanterweise wohl aber die *dna*J$^-$-Mutation. Die thermodynamische Stabilität einer proteolyse-sensitiven Mutante des λ-Repressors wurde untersucht und war, wie erwartet, geringer als die des Wildtyps. Die Ursache für die Proteolyse-Sensitivität, so vermuten die Autoren, dürfte aber in veränderten Eigenschaften des *denaturierten* Proteins liegen, das wahrscheinlich das Substrat der Proteasen darstellt. E. S. Johnson et al. [Nature *346*, 287 (1990)] fanden, daß die Identität der N-terminalen Aminosäure zusammen mit der Anwesenheit eines kritischen internen Lysinrests ein Signal für einen schnellen proteolytischen Abbau sein kann. Interessanterweise können diese Determinanten auch auf unterschiedlichen Untereinheiten eines oligomeren Proteins liegen.

Untersuchungen zum „De-novo-Design" von Proteinen sind ja keineswegs unumstritten, da bisher nur in sehr seltenen Fällen eine eindeutige Strukturinformation erhalten werden konnte, die irgendwelche Rückschlüsse auf die Korrektheit des Designs erlauben würde. Das erst würde einen wissenschaftlichen Fortschritt bedeuten. Ein positives Beispiel auf diesem Gebiet ist „Felix", ein 4-Helix-Bündel [M. H. Hecht et al., Science *249*, 884 (1990)]. Zwar konnte auch für dieses Protein bisher keine Kristallstruktur oder NMR-Struktur bestimmt werden, aber es konnte gezeigt werden, daß das in Lösung monomere Protein – wie von der Struktur zu erwarten – eine intramolekulare Disulfidbrücke ausbildet. Designer von Helix-Bündeln können sich bei C. Cohen und D. A. D. Parry [Proteins *7*, 1 (1990)] einen Überblick verschaffen, bei K. W. Hahn et al. [Science *248*, 1544 (1990)] nachlesen, wie katalytische Gruppen am N-terminalen En-

de der Helices zum Aufbau eines katalytischen Zentrums genutzt werden können, sowie sich bei L. Regan und N. D. Clarke über den Einbau einer Zn-Bindungsstelle informieren [Biochemistry *29*, 10878 (1990)].
Eine bemerkenswert weitgehende Umgestaltung eines Proteins ist auch die Verwandlung des Hormons Prolactin in eine Variante, die an den Rezeptor für menschliches Wachstumshormon bindet [B. C. Cunnigham et al., Science *247*, 1461 (1990)]. Dabei dienten die 3D-Struktur des Prolactins und zahllose andere Austausche einzelner Aminosäuren sowie ganzer Regionen als Grundlage. In zwei Enzymen wurde dagegen die Vorliebe für die Art des Nicotinamid-Cofaktors verändert. Glutathion-Reductase wurde von $NADP^+$ auf NAD^+ umgestellt [N. S. Scrutton et al., Nature *343*, 38 (1990)] und eine bakterielle Glyceraldehyd-phosphat-Dehydrogenase von NAD^+ zu einer Indifferenz gegenüber NAD^+ oder $NADP^+$ [C. Corbier et al., Biochemistry *29*, 7101 (1990)]. Y. H. Chang et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA *87*, 2823 (1990)] gelang die Verwandlung einer β-Lactamase in eine D-Ala-D-Ala-Carboxypeptidase durch Einbau eines entsprechenden Segments. Obwohl diese Proteine homolog sind, zeigt β-Lactamase keinerlei Carboxypeptidase-Aktivität. Zusammengenommen zeigen diese Experimente, daß in vielen Proteinen strukturelle Regionen von funktionellen getrennt werden können.

Metallionen

Der Einbau von Metallen in Proteine beschäftigte ebenfalls eine Reihe von Autoren im vergangenen Jahr. Als Grundlagen sollen zunächst einige nützliche Tabellierungen genannt werden, die aufzeigen, in welcher Weise Metalle in natürlichen Proteinen gebunden werden. Die radiale Verteilung verschiedener Atome um Metalle stellten M. M. Yamashita et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA *87*, 5648 (1990)] zusammen. Geometrische Anordnungen tabellierte P. Chakrabarti [Biochemistry *29*, 651 (1990); Protein Eng. *4*, 49; 57 (1990)] sowie B. L. Vallee und D. S. Auld [Biochemistry *29*, 5647 (1990)]. J. N. Higaki et al. [Biochemistry *29*, 8582 (1990)] benutzten diese Erkenntnisse, um einen „Metall-Schalter" in Trypsin einzubauen. Durch den Einbau einer Metallbindungsstelle an der Oberfläche kann der katalytische Histidinrest dann nicht an der Reaktion teilnehmen, wenn er an der Bindung eines Metall-Ions beteiligt wird. Aber auch diese Idee ist bereits von der Natur vorweggenommen: In Matrix-Metalloproteinasen scheint ein Cystein-Rest des Pro-Peptids so an das katalytische Zn-Atom zu binden, daß der Vorläufer der Proteinase inaktiv ist [H. E. Van Wart und H. Birkedal-Hansen, Proc. Natl. Acad. Sci. USA *87*, 5578 (1990)]. Auch in einem Antikörper wurden nun Metallbindungsstellen eingebaut [B. L. Iverson et al., Science *249*, 659 (1990); V. A. Roberts et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA *87*, 6654 (1990)]. Die Hoffnung dabei ist, daß derartige Metallionen in katalytischen Antikörpern hydrolytische oder Redox-Reaktionen katalysieren können. Dies wird allerdings eine extrem genaue geometrische Passung zwischen Antigen und Metall erfordern.

Zufalls-Mutagenese und Evolution

Die Methoden der Gentechnologie erlauben nicht nur, gezielte Veränderungen in Proteine einzubauen, sondern auch die zufälligen Veränderungen im Laufe der Evolution nachzuahmen, wenngleich in ungleich beschränkterem Maße. J. D. Hermes et al. [Proc Natl. Acad. Sci. USA *87*, 696 (1990)] wandten eine sehr effiziente Methode der Zufalls-Mutagenese und einen Selektionsdruck auf eine katalytisch recht ineffiziente Mutante der Triosephosphat-Isomerase an. Dadurch fanden sie eine Reihe erheblich verbesserter Varianten, die sich von der Sequenz des Wildtyps unterscheiden. Einige der so erzeugten Austausche waren nicht in direktem Kontakt mit dem aktiven Zentrum, und ihre erhöhte Effizienz wäre wohl kaum vorherzusagen gewesen.
In diesen Untersuchungen wurde *in vivo* Selektionsdruck auf die Katalyse angewandt. Das ist bei bloßer Bindung eines Liganden an ein Protein nicht ohne weiteres möglich. Eine ganze Reihe verschiedener Gruppen benützte das Hüllprotein pIII von filamentösen Phagen, um an dessen N-Terminus Insertionen vorzunehmen. G. P. Smith beschrieb bereits 1985, daß dieses Protein Insertionen verträgt, ohne den Infektionsvorgang des Phagen zu verhindern. Solcherart modifizierte Phagen können an ein Protein gebunden werden, das ein inseriertes Peptid erkennt. J. K. Scott und G. P. Smith [Science *249*, 386 (1990)] und S. E. Cwirla et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA *87*, 6378 (1990)] inserierten Zufallspeptide, um eine Epitop-Bibliothek für Peptide herzustellen, die an einen Antikörper binden. J. J. Devlin et al. [Science *249*, 404 (1990)] taten das Gleiche, um Peptide zu definieren, die an Streptavidin binden. J. McCafferty et al. [Nature *348*, 552 (1990)] fanden, daß auch die variablen Domänen eines Antikörpers an diese Stelle des pIII-Proteins eingebaut werden können und das Antigen erkennen. S. Bass et al. [Proteins *8*, 309 (1990)] benutzten die Methode, um Wachstumshormon auf der Oberfläche von M 13 zu exprimieren, und sie konnten Mutanten anreichern, die besser an den Hormonrezeptor binden. Die funktionellen Anforderungen an das pIII-Protein wurden schließlich von I. Stengele et al. [J. Mol. Biol. *212*, 143 (1990)] genauer untersucht.
Auch die Toleranz der Stabilität eines Proteins gegenüber Aminosäure-Austauschen im Inneren des Proteins wurde durch Zufalls-Mutagenese untersucht und zusammengefaßt [J. U. Bowie et al., Science *247*, 1306 (1990)]. Ein natürliches System dieser Art ist die Gesamtheit der Globin-Sequenzen, die von D. Bordo und P. Argos [J. Mol. Biol. *211*, 975 (1990)] statistisch analysiert wurden.
Proteinstrukturen und Proteinfaltung können gar nicht ohne Einbeziehung der Evolution gesehen werden. Gerade die moderne Proteinforschung mit der Untersuchung unzähliger Mutanten hat zu einem Bild von Proteinen geführt, welches einer fein abgestimmten, aber enorm empfindlichen Maschine entspricht. Die für das Verständnis der Evolution entscheidende, völlig ungeklärte Frage dabei ist, welcher Prozentsatz aller denkbaren Protein-Sequenzen zu etwas Nützlichem führt. E. I. Shakhnovich und A. M. Gutin [Nature *346*, 773 (1990)] haben sich an dieses Thema gewagt und unter Verwendung statistischer Verfahren, die zur Beschreibung von einem Spin-Glas Verwendung finden, vorausgesagt, daß ein signifikanter Prozentsatz aller Sequenzen eine thermodynamisch stabile Struktur hat. Allerdings impliziert diese Betrachtung, daß der native Zustand der thermodynamisch stabilste ist, was wahrscheinlich unbeweisbar ist und von J. D. Honeycutt und D. Thirumalai [Proc. Natl. Acad. Sci. USA *87*, 3526 (1990)] angezweifelt wird.

Isomerisierung der Peptidbindung

Die Peptidbindung besitzt aufgrund der Delokalisierung der beteiligten π-Elektronen einen partiellen Doppelbindungscharakter. Aus sterischen Gründen ist die *trans*-Anordnung der C_α-Atome stark begünstigt. Stellt Prolin allerdings die Amidfunktion der Peptidbindung, sind die sterischen Begebenheiten in *cis*- und in *trans*-Orientierung sehr ähnlich. D. E. Stewart et al. [J. Mol. Biol. *214*, 253 (1990)] tabellierten das Vorkommen von *cis*-Peptiden in der Brookhaven Data Base. In der Tat sind in der Datenbank nur 0,05 % aller Amidbindungen *cis*, wogegen 6,5 % aller X-Pro-Imidbindungen in der *cis*-Konfiguration vorkommen. Dabei ist zu beachten, daß die eine oder andere Bindung bei zunehmender Verfeinerung und Auflösung der Struktur sicher noch „isomerisiert" werden muß, denn besser aufgelöste Strukturen enthalten mehr *cis*-Bindungen!
Natürlich wird schon seit langem die Frage kontrovers diskutiert, wie diese Peptidbindungen in die *cis*-Form gelangen. Die implizite Annahme dabei ist, daß die Proteinbiosynthese nur *trans*-Bindungen knüpft. Obwohl dies unbewiesen ist, erscheint es doch plausibel, da das Vorkommen der *cis*-Bindung eine Konsequenz der 3D-Struktur zu sein scheint. Diese Isomerisierung ist bei der Rückfaltung vieler Proteine *in vitro* der langsamste Schritt. Neuere Untersuchungen belegen dies an Carbo-Anhydrase [G. V. Semisotnov et al., J. Mol. Biol. *213*, 561 (1990)], Ribonuclease A [K. Lang und F. X. Schmid, J. Mol. Biol. *212*, 185 (1990); M. Adler und H. A. Scheraga, Biochemistry *29*, 8211 (1990)], Ribonuclease T_1 [T. Kiefhaber et al., Biochemistry *29*, 3053, 3061 (1990)] und T4-Thioredoxin [K. L. B. Borden und F. M. Richards, Biochemistry *29*, 3071, 8207 (1990)]. Richards Gruppe zeigte bereits vor einigen Jahren an Thioredoxin, daß die

langsamste Faltungsphase verschwindet, wenn der Prolin-Rest ersetzt wird. Ein ähnliches Ergebnis wurde nun auch bei Ribonuclease T_1 gefunden [T. Kiefhaber et al., Biochemistry *29*, 6475 (1990)].

Vor einigen Jahren beschrieb G. Fischer aus Halle erstmals eine Enzym-Aktivität, die in der Lage war, diese Reaktion *in vitro* zu katalysieren. Erstaunlicherweise sind viele Vertreter dieser Protein-Klasse durch Immunsuppresiva wie z. B. Cyclosporin und FK506 inhibierbar. Mehrere neue Vertreter wurden im letzten Jahr kloniert, und es scheint sich ein Bild einer ubiquitären Verbreitung dieser Proteine abzuzeichnen, wobei man von mindestens zwei nicht verwandten Klassen ausgehen muß [R. K. Harrison und R. L. Stein, Biochemistry *29*, 3813 (1990)]. Besonders bemerkenswert ist die Charakterisierung und Klonierung eines periplasmatischen *E. coli*-Proteins [J. Liu und C. T. Walsh, Proc. Natl. Acad. Sci. USA *87*, 4028 (1990)], weil sich damit (und mit den in Arbeit befindlichen cytoplasmatischen Homologen aus *E. coli*) die wahre Funktion dieser sonderbaren Proteine in vivo am ehesten aufklären lassen dürfte.

Signifikante Fortschritte konnten im letzten Jahr allerdings bei der Aufklärung des Mechanismus der Isomerisierung erzielt werden. Die ursprüngliche Idee [G. Fischer at al., Nature *337*, 476 (1989)] einer nucleophilen Katalyse durch einen Cystein-Rest (unter Bildung eines tetraedrischen Addukts) kann als widerlegt gelten. J. Liu et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA *87*, 2304 (1990)] zeigten, daß alle Cystein-Reste ohne nachteilige Folgen ausgetauscht werden können. Ebenso sprechen für eine nicht-kovalente Katalyse die genaue Untersuchung verschiedener Isotopeneffekte [R. K. Harrison und R. L. Stein, Biochemistry *29*, 1684 (1990)]. Das Immunsuppressivum FK506 bindet ebenfalls nicht-kovalent an die „Rotamase", wie durch ^{13}C-NMR gezeigt werden konnte, obwohl es eine sehr reaktive Carbonyl-Gruppe besitzt [M. K. Rosen et al., Science *248*, 863 (1990)]. Interessanterweise besitzt Cyclosporin selbst eine *cis*-Peptidbindung im ungebundenen Zustand, die bei der Bindung an Cyclophilin in *trans* übergeht [S. W. Fesik et al., Science *250*, 1406 (1990)].

Streß-Proteine („molekulare Anstandsdamen")

Auch bei den Streßproteinen gab es Fortschritte. Allerdings sollen von diesem explodierenden Gebiet nur einige der Punkte herausgegriffen werden, die die Proteinfaltung zumindest tangieren. Dabei ist zunächst natürlich die Lösung der 3D-Struktur eines Fragments eines Proteins zu nennen, das dem 70K-Hitzeschock-Protein verwandt ist, die „clathrin uncoating ATPase" [K. M. Flaherty et al., Nature *346*, 623 (1990)]. Das kristallisierte 44K-Fragment hat ATPase-Aktivität, aber enthält nicht die Substrat-Protein bindende Domäne. Die Topologie ist ähnlich der Hexokinase, bei der eine große Konformationsänderung durch Glucose-Bindung induziert wird. Diese Tatsache lädt zu Spekulationen darüber ein, ob eine vom Substrat-Protein induzierte ATP-Hydrolyse wiederum durch eine Konformationsänderung auf das Substrat-Protein übertragen werden kann und somit einen Einfluß auf die Faltung hat. Damit verwandte 70K-Proteine scheinen beim Transport eines Proteins in Mitochondrien auf beiden Seiten der Membran eine Rolle zu spielen [P. J. Kang et al., Nature *348*, 137 (1990)]. Auch der Transport von schlecht transportierbaren LamB-LacZ-Fusionsproteinen in *E. coli* wird sowohl von dem cytoplasmatischen Hsp70-Homologen DnaK als auch von GroEL (siehe unten) erleichtert [G. J. Phillips und T. J. Silhavy, Nature *344*, 882 (1990)].

Der erwähnte 60K-Faltungsmodulator in *E. coli*, GroEL, benötigt K^+-Ionen für seine Aktivität [P. V. Viitanen et al., Biochemistry *29*, 5665 (1990)]. Wenngleich für die Zusammenlagerung oligomerer Proteine (wie z. B. Rubisco) auch die kleine Untereinheit GroES unbedingt erforderlich ist, ist das bei der ATP-abhängigen Faltungsmodulation des Vorläufers der monomeren β-Lac-

Alle Biochemica für Forschung und Industrie aus einer Hand!

Biochemie und Lebensmittelanalytik

- Enzyme, Substrate, Cofaktoren
- Test-Combinationen für die enzymatische Analyse
- DIG-System: Nachweis und Charakterisierung von Glycokonjugaten
- Sequencing grade Proteasen

Molekularbiologie

- über 100 Restriktionsenzyme
- DNA/RNA modifizierende Enzyme
- DIG-System: Nichtradioaktive Markierung und Nachweis von Nukleinsäuren

Immunologie

- über 300 Antikörper und Reagenzien für Immunocytologie, Histologie und FACS
- Streptavidin-Biotin Reagenzien

Zellbiologie

- Seren und Medien
- Wachstumsfaktoren und Cytokine
- Hybridomareagenzien zur serumfreien Kultivierung
- Enzyme für die Gewebedesintegration

BOEHRINGER MANNHEIM

Boehringer Mannheim GmbH
Biochemica
Sandhofer Straße 116
D-6800 Mannheim 31

tamase nicht der Fall [A. A. Laminet et al., EMBO J. 9, 2315 (1990)]. Für die Interpretation des Mechanismus der Faltungsmodulation wichtig ist der Befund, daß das GroEL Protein dabei keinen Faltungs-beschleunigenden Effekt zu haben scheint. Der Zusammenbau des oligomeren Zustands von GroEL selbst ist offensichtlich ATP-abhängig und läuft autokatalytisch ab [N. M. Lissin et al., Nature *348*, 339 (1990)].

Bei weiteren Streßproteinen ist allerdings völlig offen, inwieweit diese etwas mit Proteinfaltung zu tun haben. Auch Kälte ist für *E. coli* ein Streßfaktor, und die Zelle antwortet mit der Produktion eines kleinen, hydrophilen 7,4 kD-Proteins im Cytoplasma [J. Goldstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA *87*, 283 (1990)]. Verschiedene Arten von Streß, insbesondere eine Infektion mit filamentösen Phagen, führen zu einer Induktion eines 25K-Proteins in *E. coli* [J. L. Brissette, Proc. Natl. Acad. Sci. USA *87*, 862 (1990)]. Die wichtige Frage, wie die *E. coli*-Zelle eigentlich das Vorhandensein von Kälte und Hitze überhaupt detektiert, war bisher allerdings kaum untersucht worden. R. A. Van Bogelen und F. C. Neidhardt schlagen nun vor, daß der Temperatursensor die Ribosomen sind [Proc. Natl. Acad. Sci. USA *87*, 5589 (1990)].

Methoden und Sonstiges

Auch einige methodische Fortschritte auf dem Gebiet der Proteinforschung sollen kurz angesprochen werden. Ein lästiges Problem bei der Sequenzierung von Proteinen ist, daß bei vielen Proteinen der N-Terminus blockiert ist und deshalb der Edman-Abbau nicht durchgeführt werden kann. Handelt es sich beim N-Terminus um Acetyl-Serin oder Acetyl-Threonin, ist das Problem durch eine einfache säurekatalysierte N →O-Umlagerung lösbar [D. Wellner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA *87*, 1947 (1990)]. Die Vermessung extrem starker Interaktionen zwischen Protein-Untereinheiten kann durch Differential Scanning Calorimetry geschehen [J. F. Brandts und L. N. Lin, Biochemistry *29*, 6927 (1990)], aber die Auswertung der Primärdaten ist keineswegs trivial und bedarf großer Vorsicht. Die methodischen Probleme, die bei der Bestimmung von Sekundärstruktur mit Circulardichroismus auftreten, wurden von W. C. Johnson [Proteins *7*, 205 (1990)] zusammengefaßt und sind für Anwender dieser Methodik nützlich.

Proteine werden, insbesondere in höheren Zellen, in verschiedenster Weise posttranslational modifiziert. Relativ neu ist die Entdeckung, daß auch Mevalonsäure-Derivate, als Thioether gebunden, in Proteinen enden können. Durch Behandlung mit Raney-Nikkel und GC/MS konnten Isoprenoid- und Diterpenoid-Modifikationen identifiziert werden [C. S. Farnsworth et al., Science *247*, 320 (1990); H. C. Rilling et al., Science *247*, 318 (1990)]. In einigen Proteinen wird auch eine Myristoyl-Gruppe an die Amino-Gruppe eines N-terminalen Glycin-Rests transferiert. R. J. Duronio et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA *87*, 1506 (1990)] konnten zeigen, daß die in *E. coli* exprimierte Myristoyl-Transferase ein in *E. coli* co-exprimiertes Substrat-Protein derivatisieren kann. Damit ergeben sich vielfältige Möglichkeiten zur vereinfachten Herstellung solch modifizierter Proteine.

□ *Andreas Plückthun, München*

Neue Proteinstrukturen

Bis vor kurzem wurde von den meisten Proteinkristallographen das ungeschriebene Gesetz akzeptiert, daß die – oft Jahre in Anspruch nehmende – Röntgenstrukturanalyse eines bestimmten Proteins exklusiv für die Arbeitsgruppe reserviert war, welche erstmals über die erfolgreiche Kristallisation berichtete. In allerjüngster Zeit allerdings haben die steigende Zahl der proteinkristallographischen Forschergruppen, die Beschleunigung der Technik durch apparative und methodische Neuerungen und nicht zuletzt das wachsende Interesse der pharmazeutischen Industrie praktisch zur Aufgabe dieses Prinzips geführt. Dies hat sicherlich Vorteile für die „scientific community", beschleunigt doch der seitdem herrschende Konkurrenzdruck viele Projekte ungemein und garantiert so eine schnellere Zugänglichkeit der Ergebnisse. Andererseits führt er aber auch dazu, daß zunehmend teilweise fehlerhafte Proteinstrukturen in Eile publiziert werden (wiewohl die meisten dann von konkurrierenden Forschergruppen innerhalb kürzester Zeit korrigiert werden) – vor Jahresfrist war an dieser Stelle davon die Rede. Angesichts der im letzten Jahr geleisteten und publizierten Doppelarbeit (siehe unten) muß die Frage erlaubt sein, ob nicht doch irgendeine Art der Koordinierung der nach wie vor aufwendigen und oft langwierigen proteinkristallographischen Projekte sinnvoll wäre: Schließlich sind von ca. 20 000 Proteinen die Sequenzen bestimmt worden – und täglich werden es mehr –, während wir von nur knapp 400 davon die dreidimensionalen Strukturen kennen.

Besonders kompetitiv sind natürlich so hochaktuelle Strukturaufklärungen wie die retroviraler und HIV-relevanter Proteine (vgl. den Abschnitt über AIDS-Chemotherapie). Die Kristallstruktur des wichtigsten zellulären HIV-Rezeptors wurde von zwei Gruppen in derselben Ausgabe von „Nature" publiziert: [J. Wang et al., Nature *348*, 411 (1990); S.-E. Ryu et al., Nature *348*, 419 (1990)]. Die HIV-Infektion wird eingeleitet durch die Bindung des viralen Hüllproteins gp 120 an CD4, ein monomeres Glykoprotein, welches vor allem an der Oberfläche einer Klasse von T-Lymphocyten auftritt. Zu seinen „normalen" Aufgaben gehört die Bindung von Histokompatibilitätsantigenen der Klasse II (MHC class II), T-Zell-Rezeptoren und einer zellulären Tyrosinkinase. CD4 besteht aus einem cytoplasmatischen Segment, einer Transmembran-Domäne und vier extrazellulären, Immunoglobulin-ähnlichen Domänen (V1 bis V4). Kristalle des gesamten extrazellulären, wasserlöslichen Fragments sind schlecht geordnet, wahrscheinlich wegen hoher Flexibilität des Linkers zwischen den Domänen V2 und V3 [P. D. Kwong et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA *87*, 6423 (1990)]; ein verkürztes, nur aus den Domänen V1 und V2 bestehendes, rekombinantes Fragment liefert dagegen gut diffraktierende Kristalle. Die V1-Domäne enthält die gp120-Bindungsstelle, während sowohl V1 als auch V2 zur Erkennung von MHC class II-Antigenen notwendig sind. Die Röntgenstrukturanalysen zeigten, daß jede der beiden Domänen aus einem antiparallelen „β-Barrel" aufgebaut ist, wie es für die variablen Domänen von Immunglobulinen typisch ist. Die Verbindung zwischen V1 und V2 ist ungewöhnlich rigide: Sie besteht aus einem langen β-Strang, der Bestandteil beider „Barrels" ist. Der wichtigste Teil der gp120-Bindungsstelle scheint auf ein exponiertes Segment von etwa 15 Aminosäureresten beschränkt zu sein, dessen Struktur eine taschenartige komplementäre CD4-Bindungsstelle auf dem gp120-Hüllprotein nahelegt – dies sollte das Design von kompetitiven Inhibitoren erleichtern.

Die Reverse Transcriptase (RT) von HIV ist ein attraktives Target für antivirale Wirkstoffe. Trotz aller Anstrengungen einer großen Zahl von Gruppen ist es bisher aber – soweit bekannt – nicht gelungen, geeignete Kristalle des Enzyms zu erhalten. Dies ist desto bedauerlicher, als retrovirale Reverse Transcriptasen in der C-terminalen Domäne eine RNase-H-Aktivität tragen, die einen weiteren Angriffspunkt für antivirale Strategien darstellen könnte. Diese RNase H ist nämlich absolut essentiell für die Replikation von HIV, da sie die RNA aus dem von der Polymerase-Domäne der RT synthetisierten RNA-DNA-Hybrid abbaut und so den komplementären DNA-Strang freisetzt, der dann als Template für die plus-Strang-Synthese dient. Glücklicherweise sind retrovirale RNase-H-Domänen mit der RNase H aus *E. coli* verwandt, so daß aus den Röntgenstrukturanalysen des letzteren Enzyms – wiederum fast simultan durch zwei unabhängige Arbeitsgruppen [W. Yang et al., Science *249*, 1398 (1990); K. Katayanagi et al., Nature *347*, 306 (1990)] – wichtige Rückschlüsse gezogen werden können. Die dreidimensionale Struktur der *E. coli*-RNase H ist aus je fünf α-Helices und β-Strängen aufgebaut und läßt eine Verwandtschaft zur Tertiärstruktur von DNase I [D. Suck et al., Nature *332*, 464 (1988)] erkennen. Wie bei jenem Enzym hängt auch die Aktivität der RNase H von der Gegenwart zweiwertiger Kationen ab, und eine (das aktive Zentrum markierende) Mg^{2+}-Bindungsstelle konnte in einer der beiden Röntgenstrukturanalysen identifiziert werden. Die andere Arbeitsgruppe konnte dafür eine Sulfat- oder Phosphat-Bindungsstelle in ca. 14 Å Entfernung vom aktiven Zentrum charakterisieren und auf dieser Basis ein grobes Modell für die Wechselwirkung mit einem RNA-DNA-Hybrid entwickeln. Die beiden Kristallstruktu-