

Kombinatorische Synthese und mehrdimensionale NMR-Spektroskopie: ein Beitrag zum Verständnis von Protein-Ligand-Wechselwirkungen

James K. Chen und Stuart L. Schreiber*

Durch kombinatorische Chemie können natürliche Rekombinations- und Selektionsprozesse im Labor nachgebildet werden. Die Strategie dieser sich rasch entwickelnden Disziplin besteht in der Herstellung von Verbindungsbibliotheken aus unterschiedlichen Molekülen durch kombinatorische Synthese und in der Selektion von Verbindungen mit einer gewünschten Eigenschaft. So können Liganden, die an biologische Rezeptoren binden, leichter identifiziert werden, wodurch unser Wissen um die chemischen Mechanismen zellulärer Pro-

zesse erweitert wird. In diesem Artikel wollen wir zeigen, wie die Zusammenführung von kombinatorischer Synthese, mehrdimensionaler NMR-Spektroskopie und biochemischen Methoden unser Verständnis über einen Proteinrezeptor erweitert hat, der üblicherweise eine Rolle bei der Signalübertragung spielt: die Src-Homologie-3(SH3)-Domäne. Dieser neue Ansatz zur Untersuchung der molekularen Erkennung hat für die Wechselwirkungen zwischen SH-Domänen und ihren Liganden zu einigen Regeln geführt, nach denen Modelle

von Rezeptor-Ligand-Komplexen lediglich aufgrund der Kenntnis der Polypeptidsequenzen konstruiert werden können. Die Verbindung von kombinatorischer Synthese und Methoden zur Strukturaufklärung eröffnet einen neuen leistungsfähigen Zugang zu einem allgemeinen Verständnis der Protein-Ligand-Bindung.

Stichworte: Kombinatorische Chemie · Molekulare Erkennung · NMR-Spektroskopie · Proteine

1. Einleitung

Die Chemie hat die Entwicklung der modernen Biologie tiefgreifend beeinflusst. Seit den bahnbrechenden Arbeiten von Emil Fischer haben Chemiker die molekulare Sphäre des Lebens erforscht und seine grundlegenden Elemente nachgebaut. Biologische Cofaktoren, Stoffwechselprodukte sowie Hormone wurden charakterisiert und mit den Mitteln der Organischen Chemie synthetisiert. Darüber hinaus wurden die Strukturen der wichtigsten Makromoleküle der Natur – Proteine, DNA und RNA – durch Kristallographie und NMR-Spektroskopie aufgeklärt. Diese Fortschritte haben unser Verständnis der Biologie gewandelt, indem sie die Analyse zellulärer Prozesse auf molekularer Ebene ermöglichten.

Umgekehrt sollten aber auch die Einflüsse nicht übersehen werden, die die Biologie auf die Chemie hatte. Viele chemische Strategien sind durch biologische Phänomene inspiriert und geleitet worden. Diese wechselseitige Beziehung zwischen Chemie und Biologie läßt sich anhand jüngerer Fortschritte bei der Entdeckung von Liganden und bei der molekularen Erkennung beispielhaft verdeutlichen. Traditionell hat man sich hier auf die leistungsfähigen Werkzeuge des Computer-Modeling und der

organischen Synthese gestützt, doch wurden diese Ansätze durch unser unvollständiges Verständnis der Wechselwirkungen zwischen Molekülen und durch die mangelnde Effizienz bei der Bewertung von einzelnen Leitstrukturen eingeschränkt. Daher wurden für die Suche nach Liganden neue Strategien entwickelt, die biologische Vorgänge nachbilden. Sie leiten sich von den genetischen Rekombinations- und Selektionsmechanismen ab, die in der Natur spezifische Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen hervorbringen. Ähnliche Mechanismen regulieren die humorale Immunantwort, bei der die antigenbindenden Rezeptoren aus einer großen kombinatorischen Auswahl von Antikörpern selektiert werden. Angeleitet von diesen biologischen Modellen haben Chemiker eine alternative Strategie für die Entdeckung von Liganden entwickelt: Molekülbibliotheken, die durch kombinatorische Synthese hergestellt werden.

Wie ihr biologisches Gegenstück beruht die kombinatorische Chemie auf der effizienten Synthese umfangreicher Verbindungsbibliotheken und der einfachen Selektion von Molekülen mit einer gewünschten Eigenschaft. Ihr erfolgreicher Einsatz als Strategie zur Ligandensuche erfordert darüber hinaus die eindeutige Charakterisierung der selektierten Verbindungen, die oft nur in geringen Mengen verfügbar sind. Gerade während der letzten fünf Jahre sind auf beiden Gebieten bemerkenswerte Fortschritte erzielt worden. Viele der frühen Anwendungen der kombinatorischen Synthese haben sich wie bei der Entwicklung der traditionellen organischen Synthese auf die Suche nach therapeutischen Wirkstoffen konzentriert. Medizinisch wichtige

[*] S. L. Schreiber, J. K. Chen
Howard Hughes Medical Institute, Department of Chemistry
Harvard University
Cambridge, MA 02138 (USA)
Telefax: Int + 617/495-0751

Zielverbindungen, wie der Fibrinogenrezeptor der menschlichen Blutplättchen, wurden mit synthetischen Bibliotheken untersucht, wodurch Leitstrukturen für die Suche nach Wirkstoffen erhalten wurden. Tatsächlich ist eine wichtige Aufgabe für die kombinatorische Chemie, Bibliotheken bereitzustellen, die bioverfügbare Verbindungen enthalten, um diese in der medizinischen Forschung einzusetzen.

Vor allem in Verbindung mit benachbarten Disziplinen hat die kombinatorische Synthese ein enormes Potential, um fundamentale Fragen der Grundlagenforschung zu beantworten. Besonders unser Verständnis zellulärer Prozesse kann durch die kombinatorische Chemie vertieft werden, um so die Synergie von Chemie und Biologie zu verstärken. In diesem Übersichtsartikel stellen wir die jüngste Anwendung der kombinatorischen Chemie bei der Untersuchung der Src-Homologie 3 (SH3)-Domäne vor, einer Familie von Proteinmodulen, die an der intrazellulären Signalübertragung beteiligt ist. Durch die Kombination dieser Methode mit mehrdimensionaler NMR-Spektroskopie und ortsspezifischer Mutagenese konnten Einblicke in die molekulare Erkennung der SH3-Domänen vermittelt werden. Ein einzigartiger biologischer Mechanismus für die Assoziation von Proteinen wurde dabei entdeckt. Diese Fortschritte führten zu einem detaillierten Verständnis der SH3-Ligand-Wechselwirkung, die zwei unterscheidbare Bindungsarten beinhaltet, und machen ein zielgerichtetes Molecular Modeling von SH3-Ligand-Komplexen lediglich auf der Basis der Polypeptidsequenzen möglich.

2. Hintergrund

2.1. Biochemische Studien

SH3-Domänen sind kleine Rezeptoreinheiten, die aus etwa 60 Aminosäuren bestehen^[1,2]. Nachdem diese konservierten Domänen erstmals bei den Tyrosin-Kinasen der Src-Familie entdeckt worden waren, wurden sie in vielen Proteinen gefunden, die an der Signalübertragung – dem Prozeß, durch den

extrazelluläre Moleküle intrazelluläre Abläufe beeinflussen – beteiligt sind. SH3-enthaltende Signalmoleküle unterscheiden sich voneinander in ihrer Struktur und ihrer Funktion: Zu ihnen gehören so unterschiedliche Proteine wie Phospholipase C- γ (PLC- γ) und die p85-Untereinheit der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K). SH3-Domänen wurden auch in Proteinen des Cytoskeletts identifiziert und sind oft mit Rezeptoreinheiten vergesellschaftet, die SH2-Domänen genannt werden; diese erkennen sequenzspezifisch tyrosinphosphorylierte Proteine (Abb. 1). Nach diesen Befunden vermitteln die SH3-Domänen

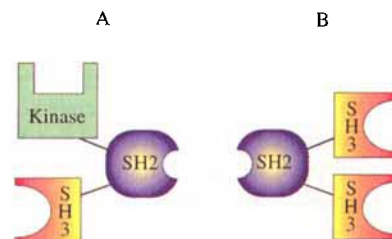


Abb. 1. Schematische Darstellung von zwei Klassen SH3-enthaltender Proteine: A) Proteine mit katalytischen Domänen (z. B. einer Kinase); B) makromolekulare Adapter für die Assoziation von Proteinen.

Protein-Protein-Wechselwirkungen bei Signalübertragungen und in Cytoskelett-Strukturen (Abb. 2). Weitere biochemische Studien haben SH3-Domänen mit der subzellulären Lokalisation^[3], der Enzymregulation^[4], der Substraterkennung^[5] und der Regulation von Guanosintriphosphat(GTP)-bindenden Proteinen^[6] in Verbindung gebracht. Unsere Untersuchungen haben sich auf die molekulare Erkennung von SH3-Domänen konzentriert, wobei der zelluläre Src(c-Src)- und der PI3K-SH3-Rezeptor als Modellsysteme dienten. Src ist eine Tyrosin-Kinase, die nicht zur Klasse der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen gehört; sie enthält eine SH2- und eine SH3-Domäne, die beide für die normale zelluläre Signalweitergabe unverzichtbar sind^[7]. Die Mutation oder Deletion einer jeden der beiden Domänen aktiviert das katalytische und onkogene Po-

Stuart L. Schreiber wurde 1956 geboren und wuchs in Virginia (USA) auf. 1977 schloß er das Studium der Chemie an der University of Virginia ab und promovierte anschließend bei R. B. Woodward und Y. Kishi an der Harvard University. Gegenwärtig ist er Wissenschaftler am Howard Hughes Medical Institute und Professor für Chemie an der Harvard University. Seine Forschungsinteressen umfassen mehrere Fachrichtungen wie synthetische Organische Chemie, Protein- und Strukturbiochemie sowie Molekül- und Zellbiologie. In seiner Arbeitsgruppe werden chemische Methoden angewendet, um Signalübertragungswege zu verstehen und kontrollieren zu können.

James K. Chen wurde 1969 in Rolla, Missouri (USA), geboren. 1991 erhielt er den Grad des Bachelor of Arts der Harvard University.

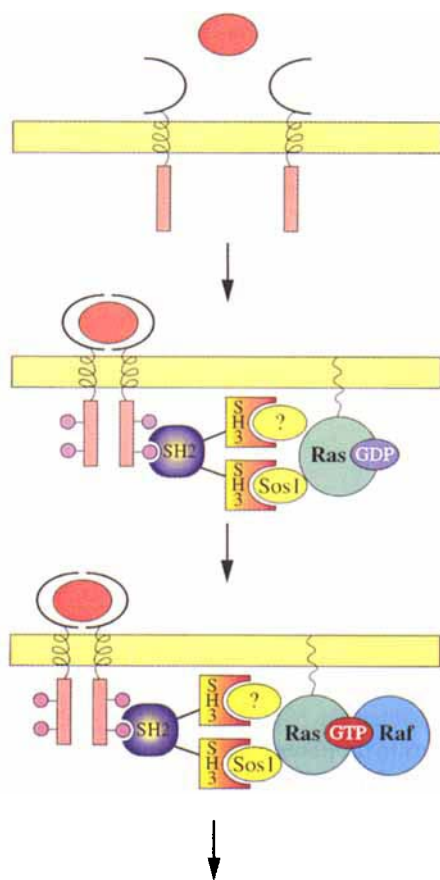
Gegenwärtig arbeitet er als Doktorand in der Gruppe von Stuart L. Schreiber an der Harvard University, wo er sich mit der Chemie und Biologie der Immunsuppression, der molekularen Erkennung von SH3-Domänen sowie der Entwicklung nichtpeptidischer kombinatorischer Bibliotheken beschäftigt.



S. L. Schreiber



J. K. Chen



Proliferation, Differenzierung

Abb. 2. Schematische Darstellung der durch Grb2 vermittelten Aktivierung von Ras, die für Signalkaskaden über SH 3-enthaltende Proteine typisch ist. In ruhenden Zellen ist das Adapter-Protein Grb2, das eine SH2- und zwei SH3-Domänen enthält, an den Guaninnucleotid-Austauschfaktor Sos1 über eine oder beide SH3-Domänen komplexiert. Dieser Komplex wird nach Stimulation durch einen Wachstumsfaktor (rot) an die Zellmembran gebunden und aktiviert dort Ras. Die purpurfarbenen Kreise am aktivierten Rezeptor stellen phosphorylierte Tyrosinreste dar, die potentielle Bindungsstellen für SH2-Domänen sind.

tential von Src und verhindert die Anlagerung von zumindest einem Kinasesubstrat, dem p110^[4a-c, 8]. PI3K ist ein heterodimerer Komplex aus einer 110 kD schweren katalytischen Untereinheit mit einer Lipid-Kinase-Domäne (mit Spezifität für Phosphatidylinositol) und einer 85 kD schweren regulatorischen Untereinheit mit einer SH 3-Domäne, zwei SH2-Domänen und einer Region mit Homologie zu den GTPase-aktivierenden Proteinen (GAPs) Rho/Rac^[9]. Die SH2-Domänen von PI3K wechselwirken mit den phosphorylierten cytoplasmatischen Enden der aktivierten Wachstumsfaktorrezeptoren^[9a-c, 10]; die zelluläre Funktion der SH 3-Domäne ist dagegen nicht bekannt. Die Sequenzen der SH3-Domänen von Src und PI3K unterscheiden sich in ihrer Struktur ebenso wie die der übrigen Teile der jeweiligen Proteine und sind nur zu 21 % identisch^[2c]. Die beiden Proteineinheiten enthalten auch sehr unterschiedliche Regionen, unter anderem einen Einschub von 15 Aminosäuren in p85 von PI3K, der in der SH 3-Domäne des Src-Proteins fehlt. Durch die Untersuchung dieser zwei strukturell einzigartigen Domänen hofften wir, die generellen Prinzipien der SH3-Ligand-Wechselwirkung und den Ursprung der Ligandenspezifität aufzuklären.

Die ersten Einblicke in die molekulare Erkennung der SH3-Domänen wurden von Baltimore et al. eröffnet. Die SH3-bin-

denden Proteine 3BP1 und 3BP2 wurden beim Screening einer cDNA-Expressionsbibliothek mit der an die Glutathion-S-Transferase (GST) fusionierten Abl-SH 3-Domäne als Sonde identifiziert^[11, 12]. Die vergleichende Durchmusterung von Proteinsequenz-Datenbanken ergab, daß 3BP1 eine Homologie zu GAP-Rho aufweist und daß 3BP2 eine SH2-Domäne enthält. Die Fähigkeit von 3BP1 und 3BP2, selektiv an die Abl-SH 3-Domäne zu binden, wurde weiterhin mit Filterbindungstests mit GST-3BP1, GST-3BP2-40 (einem GST-Fusionsprotein, das ein Fragment von 3BP2 aus 40 Aminosäuren enthält) und einigen biotinylierten GST-SH 3-Fusionsproteinen bestätigt. Der colorimetrische Nachweis der 3BP1- und 3BP2-SH 3-Komplexe mit streptavidin-gebundener alkalischer Phosphatase lieferte für die SH 3-Domänen von Abl, Src und Grb2 ähnlich hohe Intensitäten, was auf nahezu gleich große Affinitäten für die SH 3-bindenden Proteine schließen läßt. Im Gegensatz dazu gaben die SH 3-Domänen von neuralem Src, Nck und Crk viel schwächere Signale. Durch analoge Experimente wurden die Sequenzen APTMPPPLPP (3BP1-10) und PPAYPPPPVP (3BP2-10) als SH3-Bindungsstellen von 3BP1 bzw. 3BP2 identifiziert. Der Prolinreichtum dieser Sequenzen war auffällig, gab aber nur wenige Hinweise auf die molekularen Ursprünge der SH3-Ligand-Wechselwirkungen, während das Fehlen konservierter, von Prolin verschiedener Aminosäuren in diesen Sequenzen der Spezifität von 3BP1 und 3BP2 anscheinend widersprach. Eine Mutationsanalyse von 3BP1-10 ergab, daß nur Pro 2, Pro 7 und Pro 10 unverzichtbar für die Bindung von Abl-SH 3 sind, so daß PXXXXPXXP vermutlich das Konsensusmotiv für SH3-Liganden ist. Weiter wurde vorgeschlagen, daß auch von Prolin verschiedene Aminosäurereste für die SH3-Ligand-Bindung wichtig sind, weil die Abl-SH 3-Domäne nicht an Polypeptide aus L-Prolin, z. B. Pro₁₀, binden kann^[12].

Dieses mosaikartige Verständnis der SH3-Ligand-Wechselwirkungen wurde während der letzten beiden Jahre allmählich aufgeklärt. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von G. M. Whitesides führten wir weitergehende Untersuchungen an 3BP1-10 mit Affinitätskapillarelektrophorese durch^[13], einer Technik, mit der die Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen in Lösung quantifiziert werden können. Dabei stellte sich heraus, daß die Substitution von Pro 2 durch Alanin (P2A) und die analogen Mutationen P7A und P10A zwar die Affinität des Peptides zur Abl-SH 3-Domäne signifikant verringern, daß sie jedoch wenig Einfluß auf die Wechselwirkung des Peptides mit der SH 3-Domäne von Src haben. Darüber hinaus wurde erkannt, daß die Sequenz VPPQ am C-Terminus von 3BP1-10 wesentlich für die Src-SH 3-Bindung ist. Daraus folgt, daß 3BP1 mindestens zwei unterschiedliche SH3-Bindungsstellen hat, so daß das PXXXXPXXP-Motiv bei 3BP1 und 3BP2 möglicherweise nicht für alle SH3-Liganden universell gültig ist. Die unterschiedliche Bindung der Abl-SH 3- und der Src-SH 3-Domäne an 3BP1 ist außerdem mit der Hypothese in Einklang, daß die von Prolin verschiedenen Reste wichtige Faktoren für die SH3-Erkennung sind. Diese Überlegungen spielten unter anderem auch bei der Isolierung anderer SH3-bindender Proteine durch Affinitätschromatographie eine Rolle. Das Motor-Protein Dynamamin wurde z. B. aus Zellextrakten mit Affinitätsäulen isoliert, die ein immobilisiertes GST-PI3K-SH3-Fusionsprotein enthielten^[2d, 4d], und das Protein Paxillin aus dem Cytoskelett wurde in ähnlicher Weise mit immobilisiertem GST-Src-SH3

gewonnen^[14]. Beide SH 3-bindenden Proteine enthalten prolinreiche Regionen, womit die allgemeine Präferenz von SH 3-Domänen für solche Motive bestätigt wird. Aus den Sequenzen dieser und anderer beschriebener SH 3-Liganden ließ sich jedoch die optimale Zahl der Prolinreste in den SH 3-bindenden Motiven ebensowenig herausarbeiten wie ihr relativer Abstand zueinander. Die Analyse dieser Regionen wird durch die Vielzahl der Prolinreste erschwert, von denen einige für die SH 3-Bindung offensichtlich unwichtig sind. Da diese Sequenzen repetitiv und prolinreich sind, sollten sie an viele SH 3-Domänen binden können oder zwei oder mehr überlappende Bindungsstellen besitzen. Somit wurde deutlich, daß viele der beschriebenen SH 3-bindenden Proteine in vitro an unterschiedliche SH 3-Domänen binden können. Dynamin weist mehrere überlappende SH 3-bindende Motive auf, von denen mindestens eines mit den SH 3-Domänen von PI3K, PLC- γ und Grb2 wechselwirken kann^[4d].

Die physiologische Bedeutung dieser speziellen SH 3-Ligand-Assoziante ist demzufolge unsicher. Zwar können sie sich in vitro bilden, doch sind häufig prolinreiche Liganden beteiligt, die niedrige Spezifitäten und Affinitäten für ihre mutmaßlichen SH 3-Rezeptoren haben. Von einer SH 3-vermittelten Wechselwirkung konnte allerdings gezeigt werden, daß sie Teil der intrazellulären Signalübertragung ist. In Untersuchungen mehrerer Arbeitsgruppen wurde die Struktur von Grb 2, einem Cytoplasmprotein mit einer SH 2- und zwei SH 3-Domänen, aufgeklärt^[6]. Dieses Signalprotein ist typisch für eine Klasse von SH 3-enthaltenden Proteinen, die keine katalytischen Domänen besitzen, sondern als molekulare Adapter fungieren oder die Dimerisierung von Proteinen vermitteln. Die Entdeckung des zugehörigen physiologischen SH 3-Liganden lieferte das erste zelluläre Modell für SH 3-vermittelte Prozesse und verdeutlicht die Rolle der von Prolin verschiedenen Bausteine für die SH 3-Bindung. Durch Immunpräzipitation und Bindungsstudien konnte nachgewiesen werden, daß eine oder beide Grb 2-SH 3-Domänen an Sos 1 binden, einen Guaninnucleotid-Austauschfaktor für die GTPase Ras. Bei Stimulation durch Wachstumsfaktoren wird dieser cytosolische Komplex durch Grb 2-SH 2-Phosphotyrosin-Wechselwirkungen an aktivierte, membrangebundene Rezeptoren fixiert, wodurch Sos 1 an der Plasmamembran lokalisiert wird. Dort kann der Guaninnucleotid-Austauschfaktor Ras aktivieren und so Signalkaskaden auslösen, die Zellwachstum und -differenzierung verstärken (Abb. 2).

Um die SH 3-Bindungsstellen von Sos 1 zu identifizieren, wurden Fragmente dieses Nucleotid-Austauschfaktors auf ihre Fähigkeit getestet, an das Grb 2-Protein zu binden^[6b, d-f]. Nach diesen Ergebnissen ist die SH 3-bindende Region von Sos 1 am C-terminalen Ende lokalisiert, das mehrere PX(L/V)PPR-Motive enthält. Von Sos 1 abgeleitete Peptide, die diese Reste enthalten, können in vitro die Grb 2-Sos 1-Assoziation hemmen, was ihre Bedeu-

tung für die SH 3-Bindung bekräftigt. Die Gegenwart eines konservierten C-terminalen Argininrestes in diesen Regionen legt zusätzlich nahe, daß die Guanidinium-Seitenkette spezifisch mit den Grb 2-SH 3-Domänen wechselwirkt. Tatsächlich wird durch eine Arginin \rightarrow Lysin-Mutation in einem der prolinreichen Peptide diesem die Fähigkeit zur Bindung an Grb 2 genommen^[6d]. Wie schon bei den bereits beschriebenen SH 3-bindenden Motiven konnten auch aus der C-terminalen Sequenz von Sos 1 nur wenige zusätzliche Rückschlüsse auf die molekulare Grundlage von SH 3-Ligand-Wechselwirkungen gezogen werden. Mehrere Konsensusmotive für SH 3-Liganden wurden vorgeschlagen^[4d, 11], doch die molekulare Erkennung der prolinreichen Sequenzen durch SH 3-Domänen blieb rätselhaft.

2.2. Strukturuntersuchungen

Aus Sequenzvergleichen von SH 3-Domänen wurden erste Hinweise auf deren Sekundärstrukturen abgeleitet (Abb. 3). Besonders leicht war dies beim SH 3-Kerngerüst, da diese Domäne ein unabhängiges Modul ist und sich gelegentlich am äußersten N- oder C-Terminus der Proteine befindet. Konservierte Reste in SH 3-Domänen, darunter ein N-terminales ALYDY-Motiv und einige Gruppen aus hydrophoben Aminosäureresten, sind über die gesamte Primärsequenz verteilt. Da zwischen vielen dieser hydrophoben Aminosäuren hydrophile Reste eingestreut sind, schlugen Musacchio et al. anfänglich vor, daß SH 3-Domänen vorwiegend aus β -Faltblattstrukturen zusammengesetzt seien^[1b]. Darüber hinaus wurden mutmaßliche Schleifenregionen aufgrund der Verteilung von Glycin- und Prolinresten in SH 3-Sequenzen zugeordnet. Andere Versuche, die SH 3-Struktur de novo vorherzusagen, wurden unabhängig voneinander von Benner et al.^[15] sowie von Rost und Sander^[16] unternommen. Zwar kamen beide Gruppen zu dem Schluß, daß die Domäne aus mehreren β -Faltblättern und einer α -Helix besteht, doch schlugen sie unterschiedliche Proteinfaltungen vor.

V Ab1	LFVALYDFVASGDNLTSLTKEKRLVLYGNH	NGEWCEAQTKN GQ GWYPSNYITPVNS
H c-Ab1	LFVALYDFVASGDNLTSLTKEKRLVLYGNH	NGEWCEAQTKN GQ GWYPSNYITPVNS
H c-Fgr	TFIALYDYEARTEDDLTFTKGEKFLHNN	EGDWWEARSLSSGKTGCIPSNYVAPVDS
H c-Fyn	LFVALYDYEARTEDDLTFHKGKFKQILNSS	EGDWWEARSLTTGETGYIPSNYVAPVDS
H Grb2N	EATAKYDFKATADDELSFKRGDILKVLNEEC	DQNWYKAELN GKGDFIPKNYIEMKPH
H Grb2C	YVQALDFDFDQEDGELGFRRGDFIHVMDNS	DPWKKGACH GQTGMFFRNYVTPVNR
H Hck	IVVALYDYEAITHHEDLSFQKGDQMVLEES	GEWWKARSLATKEGYIPSNYVARVDS
H Lck	LVIALHSEYPSHDGDLGFEKGEQLRILEQS	GEWWKAQSLTTGQEGFIPFNFAKANS
H Ncf1	SYRAIDYEKTSGSEMASTGDVVEVVEKS	ESGWWFQMKAKR GWIPASFLEPLDS
H Nck1	VVAKFDYVAQQEQELDIKKNERLWLLDSS	KSWWRVRNSMN KTGFPVSNYVERKNS
H Nck2	PAYVKFNYMAEREDELSLIGTKVIVMEKCS	DGWWRGSYN GQVGFPSNYVTEEGD
H Nck3	VVQALYDFSSSNDDELNFEEKGDVMDIEKPN	DPEWKKCRKIN GMDGLVPKNYVTVMQN
H p67phoxN	AHRVLFYGFVPETKEELQVMPGNIVFVLKGG	NDNWATVMFN GQKGLVPCNYLPELVEL
H p67phoxC	QVEALFSYEATQPEDLEFQEGDILVLVSKV	NEEWLEGECKGV GIFPKVFVEDCAT
H PI3K	QYRALYDYKKEREEDIDLHLGDLITVNGSLVALGFSGQGEARPE	EIGWLNNGYNETTGERGDFPGTYVEYIGR
H PLC	TVKALYDYKAKRSDELSFCRGALHNVSKS	PGGWKKGYGTIRIQ YFPSNYVEDIST
H PLCg	AKVALYDYKAQREDELTFIKSAIIQNVKEQ	EGGWWRGGYGGKQL WFPSNYVEEMVN
H RasGAP	RVRATLPTKVPDDELSFLKGMDFIVHNEI	EDGWMMVNLRTDEQGLIVEDLVEEVGR
Ce Sem5N	EVAEHDFAQSGPDELSFKRGNTLKVLNKDE	DPHWYKAELD GNEGFIIPSNYIRMTFC
Ce Sem5C	FVQALDFDFNPQESGELAFKRGDVITLKNKD	DPNWWEGLQNNRR GIFPSNYCYPNIS
H Spec	RVMALYDFQARSPREVTMKKGDLVTLSSSI	NKDWWKVEA ADHGIVPAAVYVRRLLH
C Spec	LVVALYDYQEKSPREVTMKKGDLTLNLT	NKDWWKVEV NDRQGFVPAAYVKKLDP
V Src	TFVALYDYESWIETDLSEFKGERLQIVNNT	EGNWLAHLSVTTGQTGYIPSNYVAPSDS
C c-Src	TFVALYDYESRTETDLSEFKGERLQIVNNT	EGDWLAHLSLTTGQTGYIPSNYVAPSDS
C n-SrcNI	TFVALYDYESRTETDLSEFKGERLQIVNNT	EGDWLAHLSLTTGQTGYIPSNYVAPSDS
H n-SrcNII	TAKARYDFCARDSELSLKEGDIKILNKKG	EGDWLAHLSLTTGQTGYIPSNYVAPSDS
H Vav	IFVALYDYEARTEDDLSEFKGERFQIINN	QGWWRGEIY GRGVWFPANVVEEDYS
H c-Yes		EGDWWEARSIATGKNGYIPSNYVAPADS

Abb. 3. Sequenzvergleich von SH 3-Domänen. Konservierte Reste in β -Faltblattstrukturen sind grün und die C-terminale 3_{10} -Helixregion violett unterlegt. Die Abkürzungen der Proteine deuten auf ihre Herkunft hin: H: Mensch (human); C: Huhn (chicken); V: Virus; Ce: *Caenorhabditis elegans*.

Durch die ersten Strukturaufklärungen von zwei SH3-Domänen wurden viele dieser Schlußfolgerungen bestätigt, andere entkräftet, was die gegenwärtigen Grenzen der De-novo-Strukturvorhersagen veranschaulicht. Die von Saraste et al.^[2a] bestimmte Struktur von α -Spektrin-SH3 im Kristall und die von Yu et al.^[2b] aufgeklärte Struktur von c-Src-SH3 in Lösung weisen eine konservierte Topologie aus zwei dreisträngigen antiparallelen β -Faltblättern auf, die ungefähr rechtwinklig zueinander gepackt sind (Abb. 4; eine alternative Beschreibung der

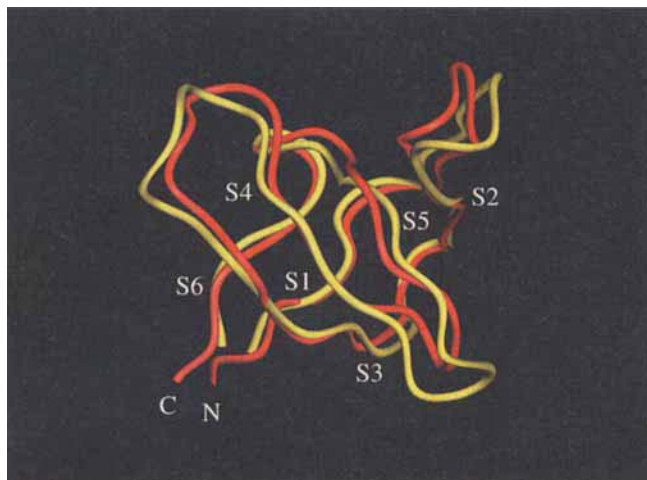


Abb. 4. Überlagerung der Strukturen der SH3-Domänen von Src (gelb) und α -Spektrin (rot). Dargestellt ist jeweils die α -Kohlenstoffspur. Die β -Faltblattstrukturen der konservierten Topologien der SH3-Domänen sind mit S1–6 bezeichnet.

SH3-Faltung wurde von Musacchio et al. vorgeschlagen^[2a], wobei die globalen Strukturen der beiden SH3-Domänen im wesentlichen allerdings gleich sind). Die Berührungsfläche zwischen den beiden β -Faltblattstrukturen wird durch mehrere konservierte hydrophobe Reste gebildet; im Falle von Src sind dies Phe86, Leu100, Phe102, Leu108, Ile110, Ile132 und Val137. Die Schleifen zwischen den β -Strängen sind konformativ flexibel und enthalten bevorzugt geladene Reste. Andere gemeinsame Motive der α -Spektrin- und der Src-SH3-Domäne sind eine TypII- β -Schleife zwischen den Strängen S2 und S3 sowie eine 3_{10} -Helix nach dem Strang S5, die mit einem hochkonservierten Prolinrest (Pro133 bei Src) beginnt. Die allgemeine Topologie der SH3-Domänen besteht also in einer einzigartigen Proteinfaltung, die nicht mit den β -Faltblattstrukturen und den amphipatischen (bifunktionellen) α -Helices der SH2-Domänen verwandt ist^[17]. Allerdings laufen die N- und C-Termini der SH3-Domänen wie die in den SH2-Einheiten auf einer Proteinseite zusammen und sind vergleichsweise ungeordnet. Aufgrund dieser Struktureigenschaften kann die SH3-Domäne in Proteinen als unabhängige Einheit mit minimaler Störung der umgebenden Bereiche existieren.

Durch NMR-Experimente mit ^{15}N -markiertem Src-SH3 wurden weitere Einblicke in die Ligandenbindungsstelle erhalten^[2b]. Dabei verschoben sich die Lagen der ^{15}N - und ^1H -Signale von mehreren Aminosäureresten, wenn von 3BP1 abgeleitete Peptide zugegeben wurden, woraus folgt, daß diese Aminosäuren entweder die Berührungsfläche zwischen Rezeptor und Liganden bilden oder daran grenzen (Abb. 5). Eine

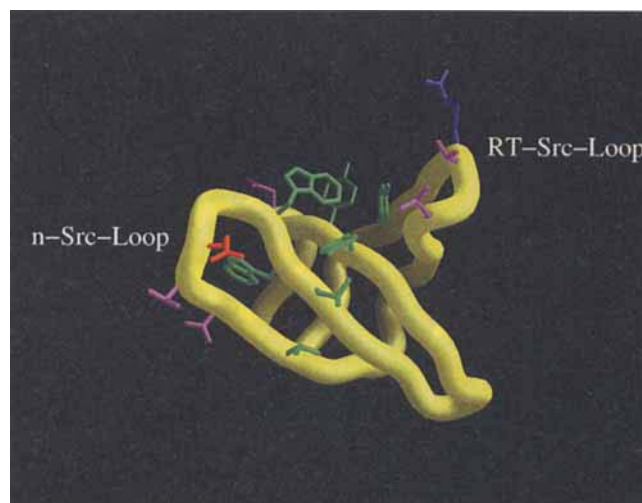


Abb. 5. Die α -Kohlenstoffspur der Src-SH3-Domäne; darüber hinaus sind die Seitenketten der Aminosäurereste abgebildet, bei denen sich nach der Bindung eines von 3BP1 abgeleiteten Peptids die Lage des NMR-Signals des Amid- ^{15}N und/oder des ^1HN verändert hat: Tyr92, Arg95, Thr96, Thr98, Val111, Asn113, Thr114, Glu115, Trp118, Trp119, Leu120, Tyr131, Asn135 und Tyr136 ($\Delta\delta(^1\text{H}) > 0.1$, $\Delta\delta(^{15}\text{N}) > 0.5$ ppm). Hydrophobe Reste sind grün, acide Reste rot, basische Reste blau und neutrale polare Reste purpurfarben dargestellt[51].

Untergruppe dieser Reste (Tyr92, Val111, Trp118, Trp119, Leu120, Tyr131 und Tyr136) bildet einen glatten, hydrophoben Bereich auf der Proteinoberfläche, der von den aromatischen Seitenketten begrenzt wird. Da viele der genannten Aminosäuren hochkonserviert sind, war naheliegend, daß diese aromatische Plattform das Herzstück der Bindungsstelle für SH3-Liganden ist. Andere durch die Wechselwirkung zwischen Rezeptor und Liganden gestörte Seitenketten (Arg95, Thr96, Thr98, Asn113, Thr114 und Glu115) sind in der SH3-Familie nicht konserviert und befinden sich in variablen Schleifenregionen. Eine dieser Regionen, die sich zwischen den Strängen S1 und S2 befindet, wurde RT-Src-Loop (-Schleife) genannt, weil die Mutation von Arg95 und die von Thr96 zur Zelltransformation führen^[4a, b, e]. Die andere Schleife, die mit den Liganden in Berührung kommt, enthält Einschübe aus 6 und 17 Aminosäuren, die in alternativ gespleißten Varianten der neuronalen Src-SH3-Domäne vorkommen^[18, 19]. Diese n-Src-Loop genannte Region liegt zwischen den Strängen S3 und S4.

Spätere Untersuchungen an anderen SH3-Domänen bestätigten das generelle Vorkommen dieser Strukturelemente^[2c–h]. Alle bekannten SH3-Strukturen weisen eine gemeinsame globale Topologie auf, obwohl zusätzliche β -Stränge oder Helices von der SH3-Faltung toleriert werden. Besonders die Reste, die Tyr90, Tyr92, Trp118 und Tyr136 der Src-SH3-Domäne entsprechen, haben eine konservierte räumliche Anordnung mit ähnlicher Orientierung der Seitenketten. Diese vier Reste sind in fast allen SH3-Domänen erhalten und bilden zusammen eine gewindeähnliche Oberfläche an der Ligandenbindungsstelle. Die RT-Src- und die n-Src-Schleife sind hingegen strukturell unterschiedlich und können sich erheblichen Veränderungen der Proteinarchitektur anpassen. Ein dramatisches Beispiel für diese strukturelle Flexibilität findet sich in der PI3K-SH3-Domäne. Koyama et al. stellten einen Einschub aus 15 Aminosäuren in der n-Src-Schleife dieser Domäne fest, der aus einer α -Helix und zwei 3_{10} -Helices besteht (Abb. 6)^[2c]. Diese SH3-

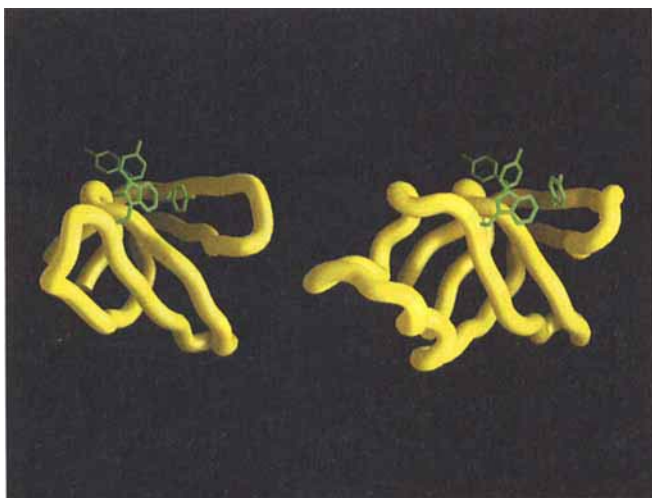


Abb. 6. Vergleich der Strukturen der SH3-Domänen von Src (links) und PI3K (rechts) in Lösung. Die Seitenketten der konservierten aromatischen Reste an der Bindungsstelle sind grün dargestellt[51]. Bei diesen Resten handelt es sich um Tyr90, Tyr92, Trp118 und Tyr136 (Src) bzw. um Tyr12, Tyr14, Trp55 und Tyr73 (PI3K).

Domäne wurde vor und nach der Zugabe eines prolinreichen, von Dynamin abgeleiteten Peptids als Ligand NMR-spektroskopisch untersucht^[24]. Dabei wurden die Signalverschiebungen für die Protonen in den Seitenketten und nicht die für ¹⁵N und ¹H_N im SH3-Rückgrat ermittelt. Danach sind die an der postulierten Bindungsstelle beteiligten Reste von PI3K-SH3 identisch oder analog zu denen, die durch die NMR-Untersuchungen mit Src-SH3 bestimmt worden waren. Dies unterstützt frühere Spekulationen, nach denen die konservierte hydrophobe Oberfläche der SH3-Domänen eine weit verbreitete Plattform für prolinreiche Liganden ist, wobei die Spezifität der Ligandenbindung durch die RT- und die n-Src-Schleife erreicht wird.

Leider warfen diese Untersuchungen nur wenig Licht auf die Strukturen der SH3-Liganden. Die Identifizierung einer potentiellen Bindungsstelle gab zwar Hinweise auf die Topographie, doch die Konformation der gebundenen SH3-Liganden blieb im Dunkeln. Ein Haupthindernis bei weiteren Strukturuntersuchungen war das Fehlen von Peptiden, die SH3 mit hoher Affinität binden. Die Src- und die PI3K-SH3-Domäne wurden daher in Gegenwart von Liganden mit niedriger Spezifität und Affinität für ihre jeweiligen Rezeptoren NMR-spektroskopisch untersucht: So bindet das von Dynamin abgeleitete Peptid an die PI3K-SH3-Domäne mit einer Dissoziationskonstanten K_D von 300 μ M^[26]. Obwohl die Ligandenbindungsstelle mit diesen Peptiden leichter charakterisiert werden konnte (die Strukturuntersuchungen in Lösung wurden bei Konzentrationen von je ca. 2 mM Rezeptor und Ligand durchgeführt), war wegen der niedrigen Affinität und der mangelnden Spezifität eine aussagekräftige Bewertung der SH3-Ligand-Wechselwirkungen nicht möglich. Daher blieben grundlegende Fragen zur molekularen Erkennung der SH3-Domänen unbeantwortet: Wie binden SH3-Domänen prolinreiche Liganden? Warum sind Prolinreste in bestimmten Positionen kritisch für die SH3-Bindung? Welche Strukturelemente in SH3-Liganden vermitteln die Spezifität? Im folgenden werden wir uns auf die Befunde und Erkenntnisse konzentrieren, durch die diese Fragen letztendlich beantwortet

werden konnten. Dabei werden wir besonders die Entdeckung von SH3-Liganden mit Hilfe der kombinatorischen Chemie und die Strukturaufklärung der SH3-Ligand-Komplexe durch NMR-Spektroskopie und Kristallstrukturanalyse diskutieren. Auf der Grundlage der Ergebnisse dieser Untersuchungen werden wir dann ein allgemeines Modell für SH3-Ligand-Wechselwirkungen entwerfen.

3. Kombinatorische Untersuchungen der PI3K- und der Src-SH3-Domäne

Mehrere Strategien für die Entdeckung von Liganden durch kombinatorische Synthese und molekulare Selektion sind in jüngster Zeit entwickelt worden^[20]. Bibliotheken von Peptiden^[21], Oligonucleotiden^[22] und anderen linearen Polymeren^[23] wurden in löslicher Form oder auf festen Trägern synthetisiert. Darüber hinaus wurde die kombinatorische Synthese zur Herstellung von Benzodiazepinen^[24] und Azinomycinanaloge^[20a, 25] angewendet, wodurch gezeigt wurde, daß viele Synthese-Transformationen mit dem Aufbau von Bibliotheken vereinbar sind. In unseren Untersuchungen der PI3K- und der Src-SH3-Domäne haben wir kombinatorische Peptidbibliotheken auf Kügelchen verwendet, wie sie von Lam et al. beschrieben wurden^[21d]. Diese Bibliotheken werden nach einem Split-and-pool (Trennen-und-Vereinigen)-Verfahren synthetisiert^[26], mit dem sehr schnell Millionen unterschiedlicher Peptide so hergestellt werden können, daß an jedem Kügelchen nur eine Sorte von Peptiden kovalent gebunden ist. Kügelchen, die hochaffine Liganden tragen, werden dann anhand ihrer Wechselwirkung mit einem markierten Rezeptor identifiziert. Der Erfolg von Strategien auf der Basis von harzgebundenen Liganden hängt von der sorgfältigen Berücksichtigung mehrerer Faktoren ab: 1) von der Größe und der Grundstruktur der Molekülbibliothek, 2) von der chemischen Zusammensetzung des festen Trägers, 3) von der Derivatisierung (Markierung) des Zielrezeptors, 4) von den Selektionsbedingungen für die Kügelchen und 5) von der Methode zur Charakterisierung der Kügelchen. Die Anwendung kombinatorischer Bibliotheken für das Studium der SH3-Ligand-Wechselwirkungen verdeutlicht die Rolle dieser Faktoren bei der Entdeckung von Liganden.

Bei unseren ersten Versuchen, SH3-Liganden zu finden, verwendeten wir zwei nach dem Zufallsprinzip hergestellte Bibliotheken: Die eine enthielt zwei Millionen unterschiedliche lineare Hexapeptide, die andere dieselbe Zahl unterschiedlicher cyclischer Heptapeptide^[27]. Die allgemeine Struktur der Hexapeptide war XXXXXX, wobei X eine beliebige Aminosäure mit Ausnahme von Cystein bedeutet, während die Heptapeptide die Form CXXXXXC hatten und intramolekular durch Disulfidbindung cyclisiert waren. Die Suche nach geeigneten SH3-Liganden mit diesen Bibliotheken schlug fehl; die Aminosäuresequenzen auf den SH3-bindenden Kügelchen folgten zwar allgemeinen Trends, doch waren eindeutige Konsensussequenzen nicht erkennbar. Darüber hinaus waren die Bindungsaffinitäten von synthetischen, löslichen Versionen dieser Liganden niedrig (> 100 μ M). Diese Ergebnisse waren enttäuschend und verwirrend. Als die Experimente durchgeführt wurden, waren noch keine SH3-Liganden bekannt, und es war unsicher, ob SH3-Domänen überhaupt Polypeptide erkennen. Erst die spä-

tere Entdeckung von 3BP1, 3BP2 und anderen potentiellen SH3-bindenden Proteinen offenbarte die Präferenz der SH3-Domänen für prolinreiche Sequenzen. Zwar blieb das minimale Konsensusmotiv der SH3-Liganden schwer faßbar und umstritten, doch waren diese prolinreichen Regionen der Ausgangspunkt für einen modifizierten Ansatz: *eingeschränkte* kombinatorische Bibliotheken.

Da einige der beschriebenen SH3-Liganden die Sequenz PPXP enthalten, entwarfen und synthetisierten wir eine eingeschränkte kombinatorische Bibliothek der Form XXXPPXPXX^[27, 28]. Durch das einschränkende Element werden die Liganden einheitlich orientiert und die durchschnittliche Affinität der Liganden zum Zielrezeptor erhöht. Cystein wurde auch hier nicht für die variablen Positionen vorgesehen, um die Bildung intra- und intermolekularer Disulfidbrücken zu vermeiden, durch die die Synthese und die Charakterisierung der Bibliotheken erschwert würden. Analog zu unseren früheren Bibliotheken wurden etwa zehn Millionen unterschiedliche Peptide mit dieser Struktureinschränkung über einen Spacer aus β -Alanin, ϵ -Aminocaprönsäure und Ethylendiamin an Polydimethylacrylamid-Kügelchen geknüpft. Dieser feste Träger wurde ausgewählt, weil er sowohl in organischen Lösungsmitteln, die für die Peptidsynthese notwendig sind, als auch in wäßrigen Puffern, in denen biologische Rezeptoren löslich sind, gut solvatisiert wird und chemisch stabil ist. Der Spacer wurde eingeschoben, um sterische Wechselwirkungen zwischen den SH3-Domänen und der Polydimethylacrylamid-Matrix zu minimieren. Die PI3K- und die Src-SH3-Domäne wurden dann ortsspezifisch an ihren N-Termini mit Fluorescein derivatisiert: Diese Gruppe kann in Peptide und Proteine eingeführt werden, indem man N-terminal einen Serinrest anfügt, ihn mit Natriumperiodat zum Glyoxalamid spaltet und dieses mit Fluoresceinthiosemicarbazid kuppelt (Abb. 7)^[29]. Zufällig enthält die PI3K-SH3-Domäne, wenn sie in *E. coli* exprimiert wurde, bereits einen N-terminalen Serinrest, da das N-terminale Methionin post-translational entfernt wird. Dies gilt nicht für die Src-SH3-Domäne, aber hier wurde ein N-terminaler Serinrest einfach durch PCR-Mutagenese und Faktor Xa-Proteolyse in das Protein eingebaut. Dieses selektive und milde Markierungsverfahren wurde gewählt, da N-Terminus und Ligandenbindungsstelle einer

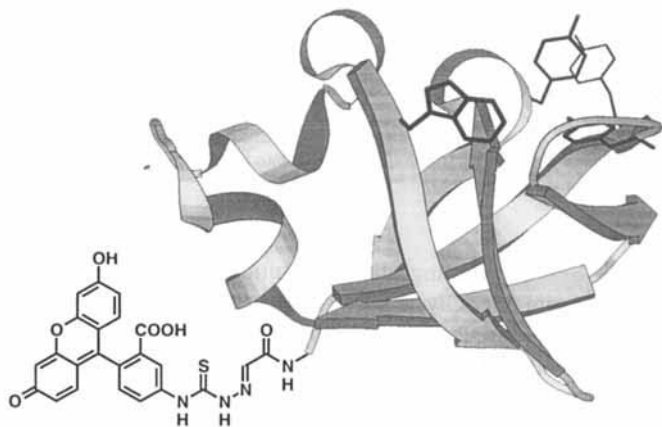


Abb. 7. Band-Darstellung der N-terminal derivatisierten semisynthetischen PI3K-SH3-Domäne, die für das Screening der Peptidbibliotheken verwendet wurde. Die konservierten aromatischen Reste, die die Bindungsstelle bilden, sind ebenfalls eingezeichnet^[52].

SH3-Domäne auf entgegengesetzten Seiten des Rezeptors liegen, so daß es zu keiner Störung der Ligandenbindung durch die Fluoreszenzmarkierung kommen kann. Aliquote von etwa zwei Millionen Kügelchen aus der XXXPPXPXX-Bibliothek wurden mit den fluoresceinmarkierten PI3K- und Src-SH3-Domänen gemischt, so daß es zur Rezeptor-Ligand-Komplexbildung kommen konnte; die Matrix wurde ausgiebig mit detergenshaltigem Puffer hoher Ionenstärke gewaschen, um unspezifische Wechselwirkungen aufzuheben. Die Kügelchen wurden anschließend fluoreszenzmikroskopisch identifiziert. Bei jedem Screening der Bibliothek wurden 60–70 intensiv fluoreszierende Kügelchen gefunden und die am hellsten strahlenden wurden isoliert (Abb. 8). Da jedes Kügelchen einen Durchmesser von etwa 100 μ m hat und mindestens 50 pmol Peptid trägt, können die harzgebundenen Liganden durch automatischen Edman-Abbau sequenziert werden.

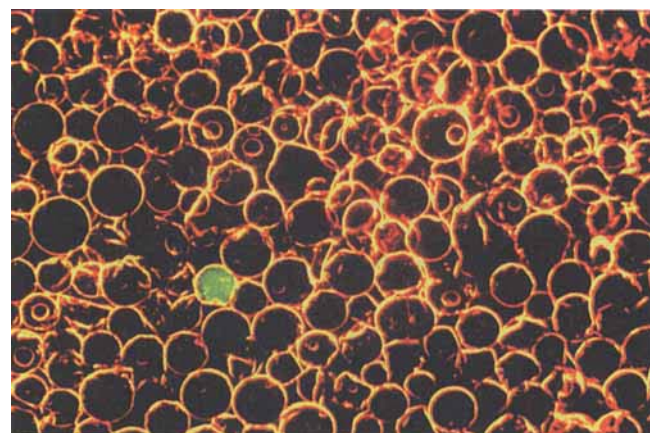


Abb. 8. Zufällig ausgewählter Teil einer harzgebundenen Bibliothek, die mit einer fluoresceinmarkierten SH3-Domäne durchgemustert wurde. Die 100 μ m großen Kügelchen wurden unter dem Mikroskop sowohl mit Durchlicht als auch durch Fluoreszenz sichtbar gemacht.

Zwei Klassen von SH3-Liganden ließen sich aufgrund der Untersuchungen mit dieser kombinatorischen Bibliothek unterscheiden (Tabelle 1). Die meisten Liganden der Klasse I haben die Konsensussequenz RXLPP Φ PXX (Φ bedeutet Arginin im Falle von PI3K-SH3 und Leucin im Falle von Src-SH3; X ist

Tabelle 1. Aminosäuresequenzen von harzgebundenen Peptiden, die an die SH3-Domänen von PI3K und Src binden.

SH3-Domäne	Klasse I	Klasse II
PI3K	RKLPPRPS K	P WHPPLPLR
	RDLP RP A A	V WKPPLPKR
	RYLPPRPMY	L NKPPLPKR
	RRLPPRPR R	N RKPPLPAR
	RLLP RP T F	
	RKLPP RP A F	
	PALPPRPHS	
Src	RALPPLPRA	P YHPPLPRR
	REL PPLPR F	M MAPPLPRL
	RALPPLPRY	A FAPPLPRR
	RNL PPLPR I	
	RALPPLPR W	
	RTL PPLPR F	
	RALPPLPR I	
	RPL PPLPT S	
	RML PPKPR V	
	RP LP PKPK W	

ein nichtkonservierter Aminosäurerest); Liganden der Klasse II haben die Konsensussequenz XXXPPLPXR. Die spektroskopische Analyse von einigen Rezeptor-Ligand-Komplexen ergab, daß sich die Intensität der Tryptophanfluoreszenz der SH 3-Domänen bei Ligandenbindung erhöht und die Fluoreszenzbande zu kürzeren Wellenlängen verschoben wird (Abb. 9). Dies wird

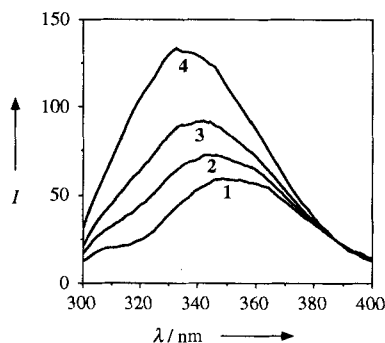


Abb. 9. Einfluß der Ligandenbindung auf das Fluoreszenzspektrum einer SH 3-Domäne. 1: PI3K-SH3 (0.5 μ M); 2, 3 und 4: PI3K-SH3 mit 4.3, 13 bzw. 110 Äquiv. RKLPPRPSK. λ = Emissionswellenlänge [nm], I = Fluoreszenzintensität (in willkürlichen Einheiten).

vermutlich durch die ligandeninduzierte Desolvation eines konservierten Tryptophanrestes in der SH 3-Bindungsstelle verursacht, der dem Trp118 von Src entspricht. In der Folge wurden repräsentative Liganden als Carboxamidpeptide synthetisiert und ihre Affinitäten für die SH 3-Domänen durch Fluoreszenz-Titrations bestimmt (Tabelle 2). Die Dissozia-

Tabelle 2. Affinitäten von Peptidliganden zu den SH 3-Domänen von PI3K und Src. Angegeben sind die Dissoziationskonstanten K_D der Komplexe.

SH3-Domäne	Peptid	K_D [μ M]
PI3K	RKLPPRPS K	9.1
	RKLPPRPA F	11
	RYLPPRPMY	13
	LNKPPLPK R	13
	RALPPLPR Y	17
Src	RALPPLPR Y	7.8
	RELPPLP R F	9.6
	RELPP I P V F	12
	RPLPPTPK Y	13
	AFAPPLPR R	59
	RKLPPRPS K	52

tionskonstanten liegen für beide Ligandklassen im mikromolaren Bereich, wobei die K_D s der Liganden mit den höheren Affinitäten weniger als 10 μ M betragen. Die Peptide binden darüber hinaus selektiv an die jeweiligen Rezeptoren, was auf unterschiedliche Präferenzen für die Reste in einigen variabel besetzten Positionen hindeutet. Beispielsweise bindet der PI3K-SH 3-Ligand RKLPPRPSK (RLP1) an die SH 3-Domänen von PI3K und Src mit K_D = 9.1 bzw. 52 μ M. Der Src-Ligand RALPP-LPRY (RLP2) ist etwas weniger selektiv und bindet an die PI3K- und die Src-SH 3-Domäne mit K_D = 17 bzw. 7.8 μ M. Diese Affinitäten sind ähnlich groß, im allgemeinen sogar größer als die von Peptiden, die von SH 3-bindenden Proteinen abgeleitet wurden. Eine der stärksten SH 3-Peptid-Wechselwirkungen, die bis heute bekannt sind, ist die zwischen der N-terminalen SH 3-Domäne von Grb2 und dem von Sos1 abgeleiteten Peptid VPPPVPPIRR mit K_D = 5.6 μ M (die C-terminale SH 3-Domäne von Grb2 bindet dieses Peptid mit K_D = 39 μ M)^[27]. Im

Vergleich dazu bindet das von 3BP1 abgeleitete Peptid APTMPPLPP an die Abl-SH 3-Domäne mit K_D \approx 37 μ M^[13, 30].

Die Entdeckung von zwei Ligandenklassen war sehr interessant, da sie darauf hinwies, daß SH 3-Ligand-Wechselwirkungen zwei unterschiedliche Bindungsweisen umfassen. Da es in Liganden der Klasse I ein konserviertes N-terminales und in denen der Klasse II ein konserviertes C-terminales Arginin gibt, haben wir vorgeschlagen, daß diese Peptide in entgegengesetzter Orientierung an SH 3-Domänen binden, auch wenn uns kein Präzedenzfall für ein solches Verhalten an einem Proteinrezeptor bekannt war^[27, 28]. Das Übergewicht der RXL-enthaltenden Liganden spiegelt offenbar eine inhärente Bevorzugung von Liganden der Klasse I wider; der mit hoher Affinität bindende Ligand der N-terminalen Grb2-SH 3-Domäne, VPPPVPPIRR, ähnelt allerdings den Peptiden der Klasse II und wird auch wie diese gebunden^[28, 31]. Diese Aspekte der molekularen Erkennung wurden durch Mutationsanalysen von zwei SH 3-Liganden weiter aufgeklärt (Abb. 10). Das Klasse I-Peptid RLP1^[28] und das Klasse II-Peptid AFAPPLRR (PLR1)^[32] wurden systematisch mutiert, um die relative Bedeutung jedes Aminosäurerestes für die SH 3-Bindung zu bestimmen. Wie erwartet sind die konservierten Reste generell wichtig

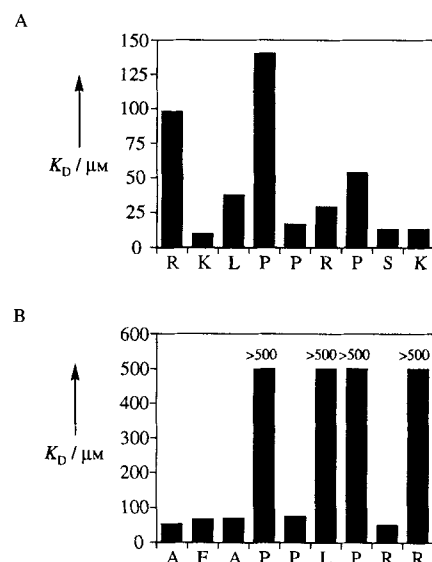


Abb. 10. Mutationsanalyse des Klasse I-Liganden RLP1 und des Klasse II-Liganden PLR1. A) Einfluß der Substitution von einzelnen Aminosäureresten in RLP1 durch Alanin auf die Dissoziationskonstante K_D des PI3K-SH 3-RLP1-Komplexes. Die Werte für die Reste Ser8 und Lys9 beziehen sich auf das verkürzte Peptid RKLPPRP. B) Einfluß der Substitution von einzelnen Aminosäureresten in PLR1 durch Alanin oder Glycin (für ursprünglich vorhandenes Alanin) auf die Dissoziationskonstante K_D des Src-SH 3-PLR1-Komplexes.

für die SH 3-Erkennung; die Substitution dieser Aminosäuren durch Alanin oder Glycin schwächt die SH 3-Bindung deutlich. Nichtkonservierte Reste, die für die SH 3-Ligand-Bindung nicht entscheidend sind, können in zwei Kategorien eingeteilt werden. Eine Gruppe besteht aus Lys2 und Pro5 in RLP1 sowie Pro5 und Arg8 in PLR1, zwischen denen sich konservierte, SH 3-bindende Reste befinden. Die zweite Gruppe umfaßt terminale Aminosäuren in den beiden Peptiden, woraus sich die Vermutung ableiten läßt, daß diese Liganden aus mindestens sieben

Aminosäuren bestehen. Die Lokalisierung dieser für die SH3-Bindung unwesentlichen Reste am C-Terminus der Klasse I-Liganden und am N-Terminus der Klasse II-Liganden stützte unsere Hypothese, daß die Peptide der beiden Klassen bei der Bindung entgegengesetzte Orientierungen einnehmen. Außerdem fanden wir ein Palindrom-Motiv PXXP, das generell konserviert ist: Pro 4 und Pro 7 tragen in beiden Liganden zur SH3-Bindung bei. Im nachhinein läßt sich aufgrund dieses konservierten PXXP-Motivs und des relativen Abstandes der nicht an der Wechselwirkung beteiligten Aminosäuren vermuten, daß die SH3-Liganden hochorganisierte Strukturen mit einer einheitlichen räumlichen Beziehung zwischen den Aminosäuren in den Positionen i und $i + 3$ bilden. Diese Ergebnisse erklären auch, warum unsere ursprünglichen Molekülbibliotheken keine SH3-Liganden enthielten. Nichtcodierte Bibliotheken auf Trägerkügelchen sind aufgrund der Grenzen der Synthese und des Screenings auf Peptide mit fünf oder sechs Aminosäuren beschränkt; SH3-Domänen dagegen benötigen Liganden, die mindestens sieben Aminosäurereste enthalten. Das prolinreiche Teilstück PXXP enthielt also nicht nur ein SH3-bindendes Element, sondern ermöglichte auch die Synthese von Liganden, die aus einer hinreichenden Zahl von Aminosäuren bestehen und daher mit dem Rezeptorprotein stärker wechselwirken.

Durch vergleichende Recherchen in der EMBL/SwissProt-Datenbank mit den Liganden der Klassen I und II wurden ähnliche prolinreiche Regionen in vielen zellulären und viralen Proteinen identifiziert. Peptidsequenzen wie die der Liganden der Klasse I kommen z. B. in der Tyrosin-Kinase v-Fgr^[33], im Protein HK 2 des Kaliumkanals^[34] und im menschlichen Proacrosin^[35] vor. Klasse II-analoge Sequenzen gibt es im Proto-oncogen c-Cbl^[36], in Sos 1^[37] und in der N-terminalen regulatorischen Domäne des Progesteronrezeptors^[38]. Interessanterweise gibt es auch eine Klasse II-ähnliche Sequenz, RPLPVAP, in der p85-Untereinheit von PI3K, ungefähr zehn Aminosäuren hinter der SH3-Domäne^[9a, b]. Nach neueren Untersuchungen wird die Lipid-Kinase-Aktivität von PI3K durch die Bindung der Lyn- oder der Fyn-SH3-Domäne an diese Region ausgelöst^[39]. Außerdem konnten wir zeigen, daß diese Region die Dimerisierung eines rekombinanten p85-Fragmentes *in vitro* vermittelt, indem sie intermolekular mit der SH3-Domäne eines zweiten p85-Fragmentes wechselwirkt^[40]. Die physiologische Bedeutung dieser mutmaßlich SH3-bindenden Motive ist unsicher, da wegen der Länge der PI3K- und der Src-SH3-Liganden die eindeutige Identifizierung endogener Ziele nicht möglich ist. Die Entdeckung dieser SH3-Liganden mit Hilfe der kombinatorischen Chemie war jedoch die Voraussetzung für unsere Strukturuntersuchungen zur Aufklärung der SH3-Ligand-Wechselwirkungen auf molekularer Ebene.

4. Strukturuntersuchungen an SH3-Ligand-Komplexen

Da wir nun über die gesuchten Liganden verfügten, gingen wir als nächstes die Strukturaufklärung einiger SH3-Ligand-Komplexe mit mehrdimensionaler NMR-Spektroskopie an. Yu und Feng aus unserer Arbeitsgruppe untersuchten Komplexe aus der PI3K-SH3-Domäne und RLP1^[28] sowie aus der c-Src-

SH3-Domäne, RLP2 und PLR1^[32]. Sie entdeckten dabei eine neuartige molekulare Architektur für Protein-Ligand-Wechselwirkungen. Diese Untersuchungen veranschaulichen, wie die Art der Ligandenbindung durch einen Proteinrezeptor durch die Anwendung der kombinatorischen Synthese und von Techniken zur Proteinstrukturbestimmung aufgeklärt werden kann. Außerdem publizierten Saraste et al. kürzlich die Kristallstruktur des Abl-SH3-3BP1-10-Komplexes^[30], und Harrison et al. bestimmten die provozierende Struktur eines SH3-SH2-Fragments der Tyrosin-Kinase Lck, in dem die SH2-Domäne mit einem Phosphotyrosinpeptid komplexiert war^[29]. Diese Untersuchungen führten zu wertvollen Einsichten in die molekularen Ursprünge der SH3-Ligand-Wechselwirkungen und in die Strukturvoraussetzungen für die Spezifität. Außerdem führten sie zu grundlegenden Regeln für den strukturorientierten Entwurf von nichtpeptidischen SH3-Liganden, die eine wichtige Rolle in der medizinischen und biologischen Forschung spielen könnten.

4.1. Überblick über die Strukturen von SH3-Ligand-Komplexen

Die Strukturen von vier SH3-Peptid-Komplexen (Abb. 11–16) stimmen im allgemeinen mit früheren Vorschlägen über SH3-Ligand-Wechselwirkungen überein und lassen bemerkenswerte strukturelle Eigenschaften der Protein-Protein-Wechselwirkungen erkennen. Der konservierte hydrophobe Bereich, der von den variablen RT- und n-Src-Schleifen flankiert wird, bildet die Ligandenbindungsstelle der SH3-Domäne, wie dies bereits NMR-spektroskopisch gezeigt wurde. Die Gesamtstruktur der SH3-Domäne ändert sich nur unwesentlich, wenn ein Ligand gebunden wird; beispielsweise weichen die minimierten gemittelten Strukturen der PI3K-SH3-Domäne mit und der ohne gebundenen Liganden im Bereich des Proteintrückgrats im Mittel nur 0.85 Å voneinander ab^[28]. So bilden die hochkonservierten aromatischen Aminosäurereste, die Tyr90, Tyr92, Trp118 und Tyr136 der Src-SH3-Domäne entsprechen, ein präorganisiertes, gewindeähnliches Templat für den SH3-Liganden. Durch diese Aminosäuren und andere benachbarte Reste werden in der SH3-Domäne drei Taschen einheitlicher Größe für spezifische Seitenketten der prolinreichen Liganden gebildet. Diese Bindungstaschen sind in erster Linie hydrophob, wenngleich auch geladene Aminosäurereste peripher liegender Schleifen die Rezeptoroberfläche beeinflussen können. Die Komplexierung der Liganden kann auch die kooperative Entfaltung der SH3-Domäne in Lösung erheblich verlangsamen, was beispielsweise durch den langsamen Austausch von elf Amidprotonen der SH3-Domäne nach der Bindung von RLP2 gezeigt wurde^[32]; im ligandfreien Zustand ist der Austausch nur bei drei dieser Protonen langsam^[2b].

Die Struktur des PI3K-SH3-RLP1-Komplexes in Lösung (Abb. 11) zeigt eindeutig, daß das Peptid eine linksdrehende Helix vom Polyprolintyp II (PPII) bildet, die sich in die Rezeptorbindungsstelle einfügt; diese Art der Bindung wurde auch bei den drei anderen Strukturen von SH3-Peptidkomplexen festgestellt. Zwei vollständige Helixwindungen stehen mit der SH3-Domäne in Kontakt, und im Abl-SH3-3BP1-10-Komplex wird die Helixstruktur durch weitere N-terminale Reste fortgesetzt.

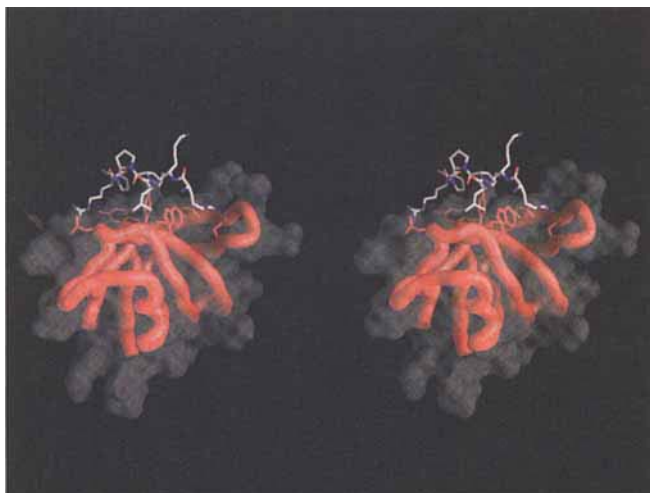


Abb. 11. Stereodarstellung der Struktur des PI3K-SH3-RLP1-Komplexes. Die SH3-Reste, die an der Bindung beteiligt sind, sind in rot gezeigt [51]. C-terminale Reste des Liganden, die nicht mit der SH3-Domäne wechselwirken, wurden weggelassen.

Dieses einzigartige PPII-Helixmotiv ist für die molekulare Erkennung von SH3-Domänen gut geeignet. Polypeptide bilden in dieser Konformation ein gestrecktes Molekülgerüst, das in die lange schmale SH3-Ligand-Bindungsstelle paßt. Im Vergleich dazu sind die rechtsdrehenden α -Helices, die die gleiche Zahl an Aminosäureresten enthalten, nur etwa halb so lang. PPII-Helices in globulären Proteinen sind ebenfalls ideale Mediatoren für Protein-Protein-Wechselwirkungen, da diese Motive im allgemeinen dem Lösungsmittel ausgesetzt sind; da PPII-Helices keine inneren Wasserstoffbrückenbindungen bilden, hängt ihre thermodynamische Stabilität von der Solvation des Rückgrats ab^[41]. Die auffallendsten Eigenschaften der PPII-Helices sind der Drehsinn und die regelmäßige, sich periodisch wiederholende Architektur (Abb. 12). Eine Helixwindung besteht aus drei

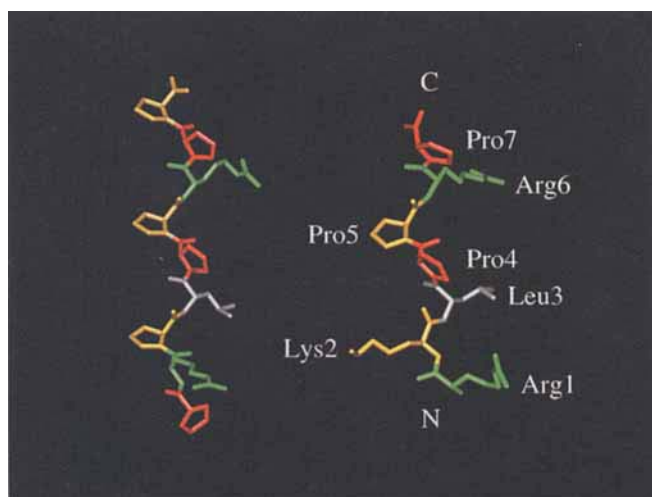


Abb. 12. Vergleich der Konformationen von gebundenem RLP1 (Teilstruktur RKLPPRP, rechts) und von einer gebundenen regelmäßigen PPII-Helix (links), die die für die SH3-Bindung kritischen RLP1-Reste enthält. Prolinreste, die mit der SH3-Domäne in Kontakt stehen, sind rot gekennzeichnet, von Prolin verschiedene Reste, die an der Bindung beteiligt sind, weiß oder grün, und Reste, die nicht direkt mit der SH3-Domäne wechselwirken, gelb.

Aminosäureresten, und die Seitenketten der Reste in den Positionen i und $i + 3$ ragen auf der gleichen Seite der Helix mit nahezu identischer Orientierung heraus. In dieser Konformation weist das Peptid eine gestreckte Struktur auf, in der das Rückgrat und die Seitenketten voneinander gleichmäßig entfernte Furchen bilden und die somit dem Gewinde einer Schraube gleicht. Breite und Tiefe dieser Furchen passen genau zu den van-der-Waals-Oberflächen der aromatischen Seitenketten entlang der SH3-Ligand-Bindungsstelle. Der SH3-Ligand-Komplex ähnelt daher einem mechanischen Schneckenwinde, bei dem das Gewinde einer langgestreckten Schraube in die Zähne eines Zahnrades greift.

Da die Seitenketten einer PPII-Helix nach jeweils 120° (Blick entlang der Achse der Helix) aus dem Peptidrückgrat ragen, setzt sich jede Helixwindung aus einem dem Lösungsmittel zugewandten Rest und zwei benachbarten Resten, die mit der SH3-Domäne wechselwirken, zusammen (Abb. 13). Die dem Lösungsmittel ausgesetzten Aminosäuren sind also der SH3-Ligand-Bindungsstelle abgewandt und tragen daher nicht zur Bindungsenthalpie der SH3-Ligand-Wechselwirkung bei. Es handelt sich dabei um die Aminosäurereste (Lys2 und Pro5 in RLP1 sowie Pro5 und Arg8 in PLR1), die zu Alanin mutiert werden können, ohne daß die Bindungsaffinität merklich ab-

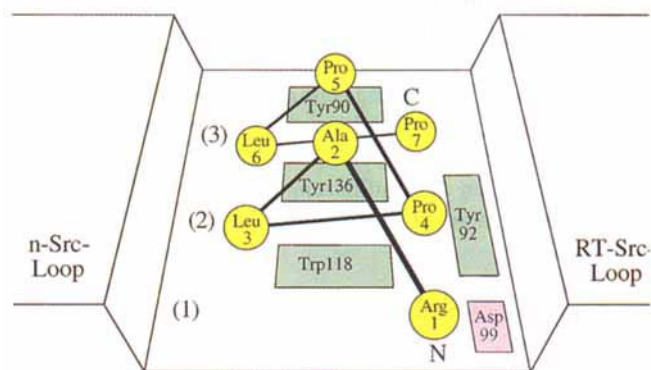
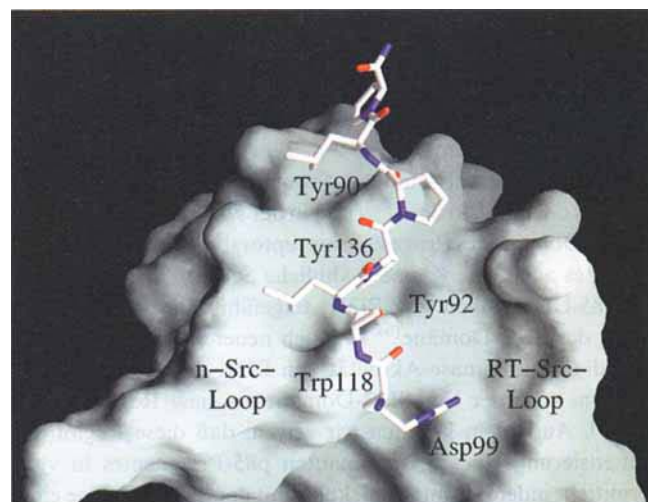


Abb. 13. Detaillierte Ansicht eines repräsentativen SH3-Ligand-Komplexes. Oben: Moleküloberfläche der Src-SH3-Domäne mit dem gebundenen Peptid RLP2 [51]. Aminosäurereste der Src-SH3-Domäne, die für die Bindung kritisch sind, sind bezeichnet; C-terminale Reste des Liganden, die nicht mit der SH3-Domäne wechselwirken, wurden weggelassen. Unten: Schematische Darstellung des Src-SH3-RLP2-Komplexes. Die Zahlen in Klammern stehen für die drei hydrophoben Taschen in der SH3-Bindungsstelle.

nimmt. Es werden jedoch Prolinreste in diesen Positionen bevorzugt, wie sich anhand der leichten Zunahme der PI3K-SH 3-Bindungsaffinität für eine Mutante von RLP1 zeigen läßt, die in Position 2 statt Lysin Prolin enthält (K2P-Mutante von RLP1, RPLPPRPSK)^[28]. Obwohl Prolinreste in diesen Positionen keinen Kontakt mit der SH 3-Domäne haben, tragen sie zur SH 3-Bindung bei, indem sie die konformative Beweglichkeit des Peptids einschränken und so die Bildung der PPII-Helix fördern. Die übrigen Aminosäurereste der PPII-Helix wechselwirken intensiv mit dem Rezeptor, indem sie die drei hydrophoben Taschen der Ligand-Bindungsstelle besetzen. Für die erste Tasche ist die argininbindende Spalte im Src-SH 3-RLP2-Komplex ein Beispiel (siehe Abb. 15, Mitte). Sie wird vom Indolring des Trp118 und benachbarten hydrophoben Elementen gebildet und beherbergt die aliphatische Kette des Argininrestes von einem Ende der PPII-Helix. (Eine Diskussion der guanidiniumbindenden Komponente dieser Tasche folgt in Abschnitt 4.2.) Die zweite und dritte Bindungstasche setzen sich ebenfalls aus hydrophoben Resten der SH 3-Domäne zusammen; diese entsprechen den Resten Tyr 90, Tyr 92, Trp 118, Pro 133 und Tyr 136 von Src. Jede dieser aus aromatischen Elementen gebildeten Taschen bindet ein XP-Dipeptidylelement der PPII-Helix. Eine außerhalb der Bindungsstelle liegende Aminosäure X verbindet diese beiden XP-Bausteine zur Konsensussequenz des SH 3-bindenden Motivs **XPXXP**. Die zuvor erhaltenen Befunde, daß das PXXP-Motiv für SH 3-Liganden wesentlich ist, können nun mit den beiden aromatischen Taschen und ihren Dipeptidyliganden auf struktureller Grundlage erklärt werden.

Die molekulare Grundlage für die Erkennung von XP-Elementen ist aus den Strukturen der SH 3-Ligand-Komplexe klar ersichtlich. Die Alkylsubstituenten dieser beiden Reste sind direkt benachbart, da die C_α - C_β -Bindung von X und die N - C_δ -Bindung des Prolins nur zwei Rückgratbindungen voneinander entfernt sind (Abb. 14). Die Kompaktheit dieser XP-Elemente und ihre räumliche Beziehung zueinander in der PPII-Helix machen es möglich, daß sie sich zwischen die aromatischen Reste in der SH 3-Bindungsstelle einlagern, wodurch die hydrophoben Wechselwirkungen an der Grenzfläche zwischen Protein und Ligand maximiert werden. Im Vergleich dazu sind andere Dipeptidylreste wie XX und PX für die Bindung an SH 3 weniger geeignet, weil ihre größeren van-der-Waals-Oberflächen nicht komplementär zu den Bindungstaschen des Rezeptors sind. Die Alkylsubstituenten in diesen Dipeptidyleinheiten sind über die beiden C_α - C_β -Bindungen angeknüpft und somit drei statt nur

zwei Rückgratbindungen voneinander entfernt. XX- und PX-Elemente sind außerdem konformativ flexibler als XP-Dipeptidylreste, deren konformative Beweglichkeit durch 1,3-Wechselwirkungen zwischen der N - C_δ -Bindung des Pyrrolidinylrings und der C_α - C_β - oder der N - C_α -Bindung von X eingeschränkt wird. Damit in Einklang ist der Befund, daß Peptide, die von RLP2 und PLR 1 abgeleitet wurden, indem die XP- durch PX-Strukturelemente ersetzt wurden, deutlich niedrigere Affinitäten für die Src-SH 3-Domäne aufweisen^[32]. Es gibt allerdings auch Fälle, in denen eine oder beide der mit der SH 3-Domäne wechselwirkenden Dipeptidyleinheiten aus der Sequenz PP bestehen, wie im Abl-SH 3-3BP1-10-Komplex. Die C_α - C_β -Bindung des N-terminalen und die N - C_δ -Bindung des C-terminalen Prolinrestes sind über zwei Rückgratbindungen verbunden, und dieses steife Dipeptidylelement wird von der SH 3-Bindungsstelle toleriert. Tatsächlich konnten Rickles et al. kürzlich mit Phagen-Display-Untersuchungen zeigen, daß die zweite hydrophobe Bindungstasche der Abl-SH 3-Domäne selektiv PP-Elemente bindet, während die dritte (I/V)P-Motive bevorzugt^[42]. Unsere Untersuchungen der Src- und der PI3K-SH 3-Domäne ergaben, daß deren zweite und dritte Bindungstaschen bevorzugt XP-Sequenzen binden, wobei X für einen acyclischen aliphatischen Aminosäurerest steht. Diese Vorliebe für von Prolin verschiedene Reste erklärt sich möglicherweise dadurch, daß eine N-terminale acyclische Aminosäure und C-terminales Prolin zusammen eine Bindungsoberfläche bilden können, die zu optimalen anziehenden Wechselwirkungen in den SH 3-Ligand-Komplexen führt.

Die SH 3-Ligand-Komplexbildung ist aus diesen Gründen eine außergewöhnliche biologische Methode zur Assoziation von Proteinen. Indem die Natur aromatische und Pyrrolidinylreste iterativ kombinierte, hat sie ein in Funktion und Struktur elegantes Element geschaffen. Besonders für die Liganden der SH 3-Domänen sind die besonderen molekularen Eigenschaften des Prolins, seine kompakte Struktur und seine stark eingeschränkte Konformation von Nutzen. Durch mehrere dieser einmaligen cyclischen Aminosäure wird eine für das Lösungsmittel zugängliche hydrophobe Ligandenoberfläche gebildet, und durch die starre Konformation der PPII-Helix, die durch diese Aminosäurereste erzwungen wird, werden potentiell SH 3-bindende Elemente orientiert und gestaffelt. Diese mit der SH 3-Domäne wechselwirkenden Elemente weisen Oberflächen auf, die aufgrund der N - C_δ -Seitenketten der Prolinbausteine räumlich kompakt sind und eine starre Konformation haben. Die Pyrrolidinylringe sind offenbar auch ideale Einheiten für die Wechselwirkung mit aromatischen Gruppen, was anhand der Zahl der Prolin-Aren-Wechselwirkungen in Proteinstrukturen^[43] und der selektiven Bindung von Prolinresten durch synthetische Rezeptoren mit aromatischen Gruppen gezeigt wurde^[44]. Diese bemerkenswerte Optimierung von Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen ist das Ergebnis von Evolutionsprozessen auf molekularer Ebene, durch die biologische Systeme verändert werden. Wahrscheinlich basiert die Erkennung von Poly-L-prolin(PLP)-Sequenzen durch den multifunktionalen Rezeptor Profilin auf ähnlichen Struktureigenschaften. Analog zu SH 3-Domänen enthält dieses strukturell unterschiedliche Protein ebenfalls eine Region mit konservierten aromatischen Resten, die erst kürzlich mit der Bindung von PLP in Verbindung gebracht wurden^[45].

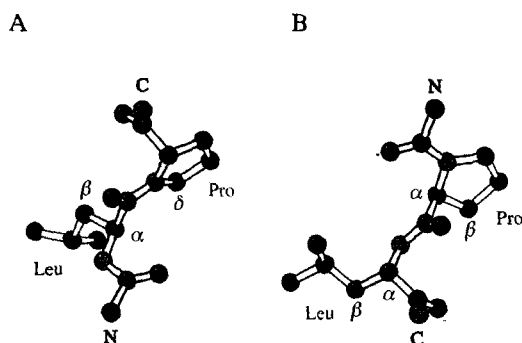


Abb. 14. Vergleich der Dipeptidylreste XP (A) und PX (B) (X = Leucin). Die Orientierung des Peptidrückgrats ist durch C und N (rot) hervorgehoben. Kohlenstoffatome: schwarz, Stickstoffatome: blau, Sauerstoffatome: rot^[52].

4.2. Ligandenspezifität

Das Haupterkennungsmotiv von SH3-Liganden ist die Sequenz XPXXP, die funktionell dem Phosphotyrosinrest bei SH2-Ligand-Wechselwirkungen äquivalent ist. Durch diese wesentlichen Erkennungselemente werden die Liganden an den Bindungsstellen des Rezeptors verankert, wobei die Spezifität der Bindung durch die benachbarten Aminosäuren vermittelt wird. In SH2-Phosphopeptid-Komplexen ragen die dem Phosphotyrosin benachbarten Aminosäurereste über die Rezeptoroberfläche hinaus und wechselwirken mit spezifischen hydrophoben und polaren Regionen [2g, 17a, d–f, 46]. Auf ähnliche Weise wird die Spezifität der SH3-Ligand-Wechselwirkung durch die variablen Aminosäurereste im und um das XPXXP-Teilstück erreicht. Die Unterschiede bei den Resten, die mit dem Rezeptor wechselwirken, entsprechen dabei den durch die variablen RT- und n-Src-Schleifen hervorgerufenen Änderungen der topographischen und elektrostatischen Eigenschaften der SH3-Bindungsstellen.

Die drei hydrophoben Taschen der SH3-Domäne weisen Strukturmodifikationen auf, durch die die Präferenz für Liganden festgelegt werden (Abb. 15). Mit unseren kombinatorischen Studien haben wir gezeigt, daß die erste Bindungstasche in der PI3K- und der Src-SH3-Domäne selektiv Argininreste von prolinreichen Liganden bindet. Die Methylengruppen der Argininseitenkette schmiegen sich dabei in die an der Oberfläche der SH3-Domäne exponierte Spalte zwischen den hydrophoben Resten (einschließlich Trp 118 in Src und Trp 55 in PI3K), während die Guanidiniumgruppe mit einem hochkonservierten aciden Rest (Asp 99 in Src, Asp 21 in PI3K) in der Tasche in Kontakt tritt. Die Existenz einer Salzbrücke, an der Asp 99, das sich am Ende der RT-Src-Schleife befindet, beteiligt ist, wurde durch NMR-Messungen und ortsspezifische Mutagenese bestätigt: Die chemische Verschiebung des Amidprotons von Asp 99 wird durch die Ligandenbindung stark beeinflusst, und die D99N-Mutante der Src-SH3-Domäne bindet an RLP2 und PLR1 mit stark verringerter Affinität [32]. Ähnliche Ergebnisse wurden mit der PI3K-SH3-Domäne und RPL1 erhalten [28]. Experimente mit Phagen-Display [42] und cDNA-Expressionsbibliotheken [11, 12] ergaben hingegen, daß in der analogen Bindungstasche der Abl-SH3-Domäne bevorzugt hydrophobe Reste wie Tyrosin und Methionin gebunden werden. Diese unterschiedliche Ligandenspezifität geht auf den relativ hydrophoben Charakter des Thr 100 zurück, das strukturell Asp 99 von Src entspricht [2c]. Tatsächlich ist die Abl-SH3-Domäne hinsichtlich der elektronischen Eigenschaften der ersten Bindungstasche einmalig: Da ein negativ geladener Rest an dieser Stelle fehlt und das elektrostatische Potential dementsprechend verändert ist, kann die Abl-SH3-Domäne hier aliphatische und aromatische Seitenketten binden. Diese Art, Liganden zu unterscheiden, erinnert an die Substratspezifität der Bindungstaschen von Serin-Proteasen, in denen Ser189 und Asp189 die Präferenz für bestimmte Seitenketten von Chymotrypsin bzw. Trypsin modulieren [47].

Durch Variationen in der Architektur der zweiten und dritten SH3-Bindungstasche werden andere Aspekte der Ligandenspezifität beeinflusst. So ergaben unsere Untersuchungen, daß die PI3K- und die Src-SH3-Domäne in ihren zweiten Bindungstaschen LP-Dipeptidylreste bevorzugen, und ergänzende Experi-

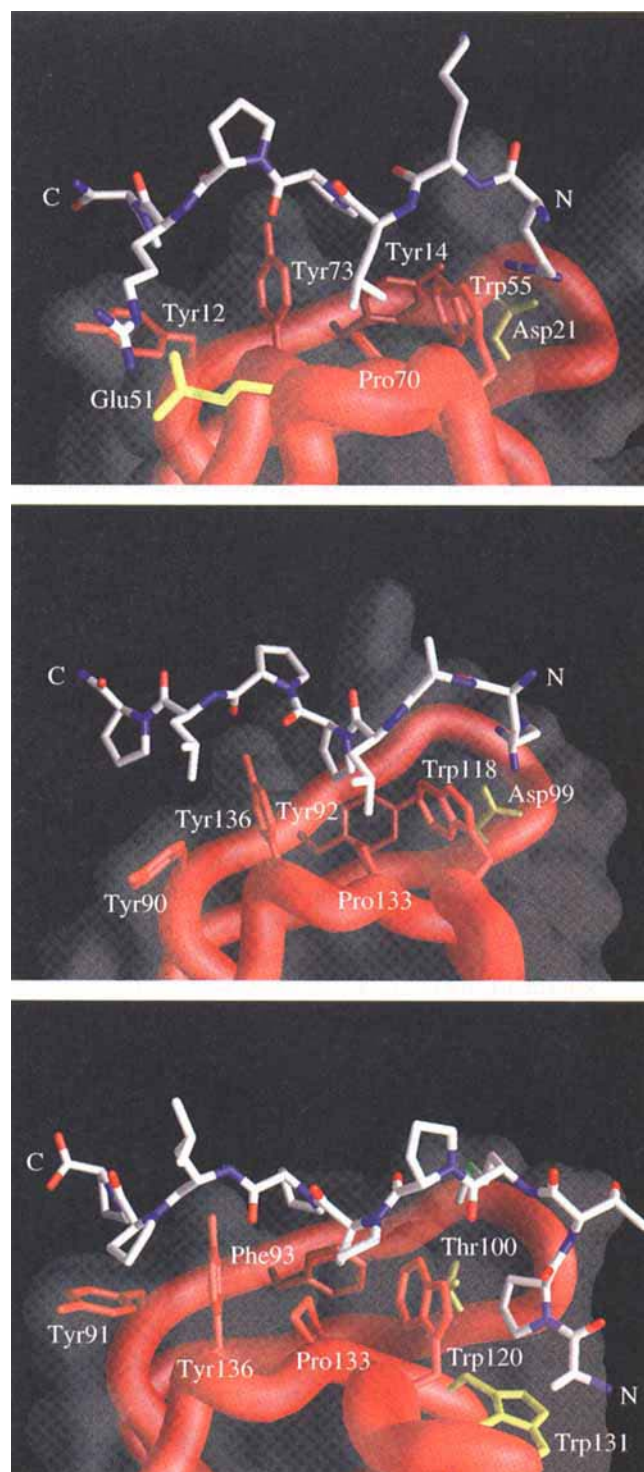


Abb. 15. Spezifität der Rezeptor-Ligand-Bindung in den Komplexen PI3K-SH3-RLP1 (oben), Src-SH3-RLP2 (Mitte) und Abl-SH3-3BP1-10 (unten). Die SH3-Reste, die die konservierten Kontakte herstellen, sind in rot und Reste, die für die Ligandenspezifität wesentlich sind, in gelb gezeigt [51]. C-terminale Reste des Liganden, die nicht mit der SH3-Domäne wechselwirken, wurden weggelassen.

mente mit Phagen-Display-Bibliotheken, daß die Abl-SH3-Domäne an dieser Stelle PP-Sequenzen erkennt. Die Strukturvoraussetzung für diese Selektivität ist nicht offensichtlich, da die SH3-Reste in dieser Region konserviert sind. Es ist daher wahrscheinlich, daß diese Bindungsspezifitäten subtile topographische Unterschiede in den SH3-Domänen widerspiegeln, wobei

vielleicht Variationen in den Aminosäuren der benachbarten n-Src-Schleife eine Rolle spielen. So sind die aromatischen Reste Trp120 und Tyr136, die die zweite Bindungstasche der Abl-SH3-Domäne bilden, ein wenig weiter voneinander entfernt als die entsprechenden Reste in PI3K und Src, und die n-Src-Schleifen der Abl- und der Src-SH3-Domäne haben unterschiedliche Konformationen, obwohl sie etwa gleich lang sind. Die mögliche Rolle dieser variablen Schleifen bei der Unterscheidung von Liganden läßt sich anhand von SH3-Ligand-Wechselwirkungen kurz darstellen, bei denen auch die dritten Bindungstaschen der PI3K- und der Src-SH3-Domäne einbezogen werden. Liganden der Klasse I, die in kombinatorischen Experimenten mit der PI3K-SH3-Domäne selektiert wurden, weisen in der variablen Position X zwischen den Prolinresten (PPXP) bevorzugt Argininreste auf. Dagegen erkennt die Src-SH3-Domäne Liganden mit Leucin in dieser Position. Dies kann auf den 15 Aminosäuren langen Einschub in der n-Src-Schleife in PI3K-SH3 zurückgeführt werden, der in der Src-SH3-Domäne fehlt. Dieser acide helicale Einschub liegt am Rande der dritten Bindungstasche, so daß Glu 51 an deren Ende positioniert wird. Dadurch bindet die Dipeptidyl-Erkennungsstelle selektiv RP-Sequenzen in Liganden der Klasse I; der aliphatische Teil der Argininseitenkette wechselwirkt dabei mit den hydrophoben Elementen der Ligandenbindungsstelle und die Guanidiniumgruppe bildet mit der Carbonsäuregruppe eine Salzbrücke. Die Bedeutung dieser elektrostatischen Wechselwirkung für die Ligandenerkennung wird anhand der Mutante E51Q von PI3K-SH3 klar, denn diese bindet RLP1 nur noch mit einem Drittel der Wildtyp-Affinität^[28]. Weil die Src-SH3-Domäne diesen aciden Einschub nicht enthält, ist die dritte Bindungstasche in erster Linie hydrophob und bindet daher LP-Motive in Liganden der Klasse I. Im Vergleich dazu enthalten die SH3-Domänen der neuronalen Src-Varianten basische Einschübe in den n-Src-Schleifen und bevorzugen daher wahrscheinlich Liganden mit XP-Motiven, in denen X für Asparaginsäure oder Glutaminsäure steht. Ein möglicher Ligand für diese neuronalen Src- und für strukturverwandte SH3-Domänen ist Burtons Tyrosin-Kinase (Btk), die die prolinreichen Sequenzen KPLPPTP und KPLPPEP in direkter Nachbarschaft enthält. Die KPLPPTP-Region bindet selektiv, das KPLPPEP-Motiv dagegen nur schwach an die SH3-Domänen von Fyn, Lyn und Hck^[48]. Die KPLPPEP-Region enthält eine acide EP-Dipeptidyleinheit, die spezifisch mit den basischen Resten in den n-Src-Einschüben wechselwirken könnte.

Diese drei Bindungstaschen und ihre Peptidyliganden sind die Haupterkennungselemente bei der SH3-Ligand-Komplexbildung. Einige Untersuchungen ergaben jedoch, daß es zu weiteren Kontakten kommen kann, die die Affinität und die Spezifität der Wechselwirkung erhöhen. Frühe Mutageneseexperimente am Peptid 3BP1-10 ergaben, daß Pro2 in der Sequenz APTMPPLPP für die Bindung an die Abl-SH3-Domäne unverzichtbar ist^[12]; an der Struktur des Abl-SH3-3BP1-10-Komplexes (Abb. 15, unten) ist dies auf molekularer Ebene deutlich zu erkennen. Während die Reste Met4–Pro10 eine PPII-Helikonformation einnehmen, knickt das Peptid bei Thr3 ab, so daß Pro2 in eine kritische Tasche plaziert wird, die von Trp120 und Trp131 gebildet wird. Die Aminosäurereste in der SH3-Familie, die Trp131 oder benachbarten Aminosäureresten entsprechen, unterscheiden sich meist in ihrer Struktur, was vermuten läßt, daß diese Region im allgemeinen eine Rolle bei der Ligandenspezifität

spielt. Phagen-Display-Experimente an mehreren SH3-Domänen weisen außerdem darauf hin, daß weitere N-terminale Reste in Klasse I-ähnlichen Liganden zur SH3-Bindung beitragen können^[42]. Auf der Grundlage der bekannten Strukturen von SH3-Ligand-Komplexen muß man annehmen, daß Spezifität hauptsächlich durch diese N-terminalen Reste bestimmt wird, da sie aus dem konservierten aromatischen Zentrum der SH3-Domäne herausragen und die variablen Schleifen flankieren. Die SH3-Domäne enthält also möglicherweise eine vierte Bindungstasche, die für die Ligandenselektivität wichtig ist.

4.3. Ligandenorientierung

Die Entdeckung von zwei SH3-Ligand-Klassen mit Hilfe der kombinatorischen Synthese gab die ersten Hinweise auf zwei Bindungsarten. Wegen der Strukturähnlichkeiten zwischen den beiden Ligandengruppen schlugen wir zunächst vor, daß SH3-Domänen prolinreiche Peptide in zwei entgegengesetzten Orientierungen binden können. Die Strukturen der SH3-Ligand-Komplexe bestätigen und verdeutlichen diese erstmalig gefundene Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung. Die erste Orientierung des Peptids bei SH3-Ligand-Wechselwirkungen findet sich beispielsweise im Src-SH3-RLP2-Komplex, in dem das Peptid die Ligandenbindungsstelle mit seinem N-Terminus neben Trp118 und mit seinem C-Terminus neben Tyr90 überspannt (Abb. 16, oben, siehe auch Abb. 13). Das N-terminale Arg1 von RLP2 befindet sich dabei in der ersten SH3-Bindungstasche und bildet mit Asp99 der Src-SH3-Domäne eine Salzbrücke. Die verbleibenden beiden hydrophoben Taschen der Rezeptorbindungsstelle binden LP-Dipeptidylreste des prolinreichen Liganden, so daß die Leucinseitenketten an die n-Src-Schleife und die Prolin-Pyrrolidinyllringe an die RT-Src-Schleife der Domäne grenzen. Diese Orientierung wird generell von Liganden der Klasse I angenommen, wie sich anhand der PI3K-SH3-RLP1- und Abl-SH3-3BP1-10-Komplexe zeigen ließ; die Peptidrückgrate weisen in beiden Komplexen die gleiche Ausrichtung auf, und im PI3K-SH3-RLP1-Komplex sind die XP-Strukturelemente ähnlich orientiert.

Die zweite Orientierungsmöglichkeit wurde von Feng in unserer Arbeitsgruppe entdeckt, als er die Struktur der Src-SH3-Domäne im Komplex mit dem Klasse II-Liganden PLR1 bestimmte (Abb. 16, unten). Die Peptide PLR1 und RLP2 wechselwirken mit denselben drei Bindungstaschen der Src-SH3-Domäne, allerdings mit unterschiedlicher Orientierung des Peptidrückgrats. SH3-Domänen können PPII-Helices also in zwei Orientierungen erkennen, so wie ein Zahnrad mit einer Schraube in zwei Richtungen verzahnt werden kann. Der C-terminale Rest Arg9 von PLR1 besetzt die erste Bindungsspalte und bildet eine Salzbrücke mit Asp99 des Rezeptors; dies wurde durch Mutagenese und Bindungsstudien abgesichert^[32]. Die zweite und die dritte SH3-Bindungstasche wechselwirken mit XP-Sequenzen in PLR1, wobei allerdings die relativen Positionen der Prolin- und der von Prolin verschiedenen Aminosäurereste in diesen Bindungsstellen wegen der umgekehrten Orientierung des Liganden vertauscht sind. Dementsprechend befinden sich im Src-SH3-PLR1-Komplex die acyclischen Seitenketten der XP-Elemente neben der RT-Src- und die Pyrrolidinyllringe neben der n-Src-Schleife, während es im Src-SH3-RLP2-Komplex gerade umgekehrt ist. Die Fähigkeit der SH3-Domäne, sich

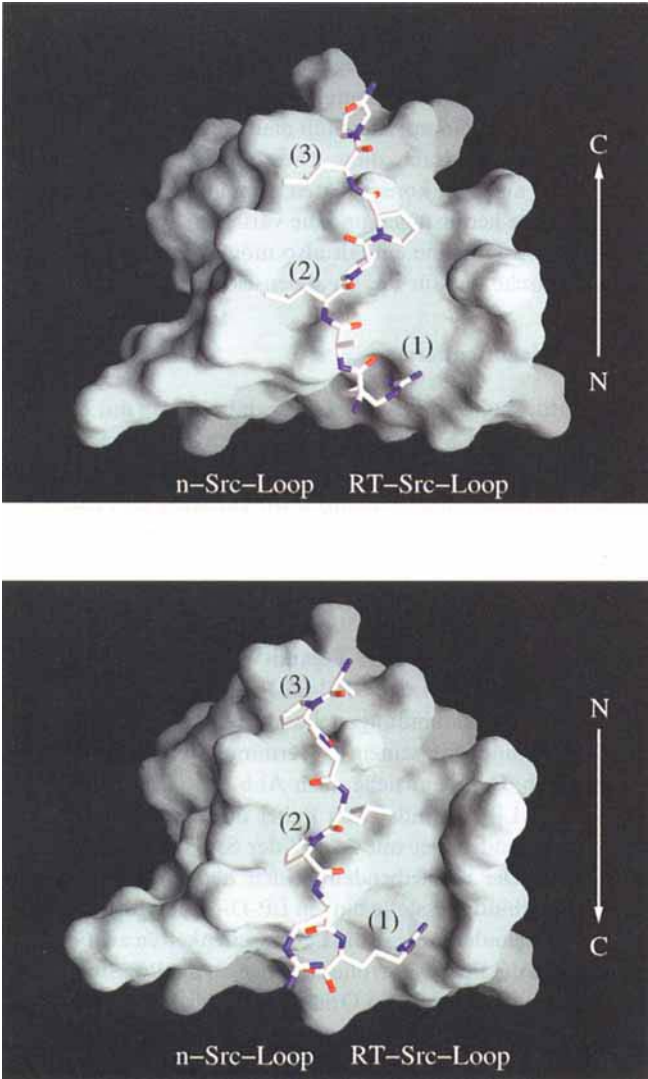


Abb. 16. Zwei Bindungsarten bei der SH 3-Ligand-Wechselwirkung: oben: der Src-SH 3-RLP 2-Komplex; unten: der Src-SH 3-PLR 1-Komplex[51]. Die Orientierung des Peptidrückgrats der Liganden ist durch die Pfeile angegeben. Die Zahlen auf der SH 3-Domäne stehen für die drei hydrophoben Taschen in der Ligandenbindungsstelle. N- und C-terminale Reste des Liganden, die nicht mit der SH 3-Domäne wechselwirken, wurden weggelassen.

beiden Orientierungen anzupassen, weist auf zwei wichtige Aspekte der SH 3-Ligand-Erkennung hin: Erstens erkennen die zweite und die dritte Bindungstasche der SH 3-Domäne die gemeinsame van-der-Waals-Oberfläche der XP-Dipeptidymotive und nicht nur die des Prolinrestes. Zweitens ist wegen der Strukturtoleranz der SH 3-Domänen gegenüber beiden Orientierungen der XP-Sequenz ein Mechanismus erforderlich, durch den die Ausrichtung des Ligandenrückgrats bestimmt wird. Die Spezifität der Bindungsart wird offensichtlich durch Asymmetrien in der Struktur der SH 3-Bindungsstelle hervorgerufen. Beispielsweise werden die argininhaltigen Liganden RLP 2 und PLR 1 durch Asp 99 in der ersten SH 3-Bindungstasche ausgerichtet. Die Orientierung des Rückgrats des von 3BP1 abgeleiteten Liganden APTMPPPLPP wird in ähnlicher Weise durch spezifische Wechselwirkungen zwischen der Abl-SH 3-Domäne und Aminosäureresten des Liganden festgelegt, die sich N-terminal von den PP-Erkennungselementen befinden, z. B. Pro 2 und Met 4.

Es ist unklar, ob SH 3-Domänen aufgrund ihrer Struktur inhärente Präferenzen für eine der beiden Bindungsarten haben. Eine Vorliebe für Liganden der Klasse I ist wegen der unterschiedlichen Affinitäten von RLP 2 und PLR 1 für die Src-SH 3-Domäne und aus der überwiegenden Zahl RXL-enthaltender Liganden in unseren kombinatorischen Untersuchungen anzunehmen. Darüber hinaus wurden basierend auf den intermolekularen Abständen zwischen potentiellen Wasserstoffbrückenbindungen im Abl-SH 3-3BP1-10-Komplex vorgeschlagen: eine zwischen dem Carbonylsauerstoffatom von Met 4 (im Liganden) und dem Indol-NH von Trp 120 sowie eine zweite zwischen dem Carbonylsauerstoffatom von Pro 7 und der NH₂-Gruppe der Asn 135-Seitenkette. Wenn sich diese Bindungen tatsächlich bilden, sollten sie eine Rolle bei der Orientierung des Liganden spielen; ihr relativer Beitrag zu den SH 3-Ligand-Wechselwirkungen ist allerdings noch unbekannt. Sicher ist, daß beide Klassen von Liganden in der Natur vorkommen. Bei Sequenzvergleichen von beschriebenen SH 3-bindenden Proteinen wurden Regionen identifiziert, die den Klassen I und II entsprechen und die vermutlich in unterschiedlichen Orientierungen gebunden werden (Tabelle 3)^[4d, 6e, 11, 12, 48, 49]. Um unsere Voraus-

Tabelle 3. Sequenzvergleich von SH 3-bindenden Motiven[a].

Klasse I-Motiv	Z	Z	X ₁	p	X ₂	P	p	X ₃	P	Klasse II-Motiv	X ₃ '	P	p	X ₂ '	P	p	X ₁ '	Z	Z
Konsensussequenz der PI3K-Bibliothek			R	X	L	P	P	R	P	Konsensussequenz der PI3K-Bibliothek	X	P	P	L	P	X	R		
Konsensussequenz der Src-Bibliothek			R	X	L	P	P	L	P	Konsensussequenz der Src-Bibliothek	X	P	P	L	P	X	R		
3BP1 (267–275) (Maus)	P	T	M	P	P	P	L	P	P	C3G (608–616) (Mensch)	P	P	A	L	P	P	K	K	R
3BP2-40 (2–10) (Maus)	P	A	Y	P	P	P	P	V	P	Dynamin (812–820) (Mensch)	A	P	P	V	P	S	R	P	G
Btk (184–192) (Mensch)	T	K	K	P	L	P	P	T	P	p47 ^{phox} (362–370) (Mensch)	Q	P	A	V	P	P	R	P	S
Btk (198–206) (Mensch)	L	K	K	P	L	P	P	E	P	Sos 1 (1153–1161) (Maus)	P	P	P	V	P	P	R	R	R
CDC42GAP (250–258) (Mensch)	A	P	K	P	M	P	P	R	P	Sos 1 (1214–1222) (Maus)	P	P	L	L	P	P	R	E	P
Dynamin (781–789) (Mensch)	P	Q	R	R	A	P	A	V	P	Sos 1 (1292–1300) (Maus)	G	P	P	V	P	P	R	Q	S
p22 ^{phox} (151–159) (Mensch)	P	P	S	N	P	P	P	R	P										
PI3K p85 (91–99) (Mensch)	P	P	R	P	L	P	V	A	P										
PI3K p85 (303–311) (Mensch)	P	A	P	A	L	P	P	K	P										
YAP65 (239–247) (Huhn)	V	K	Q	P	P	P	L	A	P										

[a] Die Großbuchstaben X und Z kennzeichnen Aminosäurereste in den SH 3-Bindungsmotiven: X₁ und X₃' sind Reste, die mit SH 3 in Berührung stehen und für die Ligandenspezifität verantwortlich sein können, Z sind flankierende Reste, die an zusätzlichen SH 3-Ligand-Wechselwirkungen beteiligt sind. p steht für einen strukturgebenden Aminosäurerest, meist Prolin. Die hochkonservierten Prolinreste sind umrahmt. Bei 3BP1 entsprechen die Positionsnummern der Aminosäurereste dem Beginn der cDNA-Partialsequenz, die von Cicchetti et al. beschrieben wurde[11].

sage zu prüfen, daß das von Sos1 abgeleitete Peptid VPPVPVPRRR in einer der Klasse II entsprechenden Orientierung bindet, untersuchten wir die Fähigkeit von VPPVPVPRRR-Mutanten, an die N-terminale SH3-Domäne von Grb2 zu binden^[32]. Analog zu Arg9 von PLR1 ist Arg8 dieses von Sos1 abgeleiteten Peptides wesentlich für die Bindung an die Grb2-SH3-Domäne^[64]. Dieses C-terminale Arginin sollte eine Salzbrücke zu Glu16 der Grb2-SH3-Domäne bilden, das Asp99 von Src entspricht^[31]. Unsere weiteren Bindungsexperimente ergaben, daß auch Pro3 und Pro6 dieses Peptides für die Grb2-SH3-Bindung kritisch sind; Pro4 und Pro7 können dagegen zu Alanin mutiert werden, wobei die Affinität um weniger als 50% abnimmt^[32]. Diese Ergebnisse stützen die Annahme einer KlasseII-artigen Bindung, da Pro3 und Pro6 in dieser Orientierung das kritische PXXP-Motiv aufbauen und Pro4 und Pro7 den an der Wechselwirkung nicht direkt beteiligten, von der SH3-Domäne weg weisenden Prolinresten entsprechen (Abb. 17). Der geringe Einfluß der P4A- und

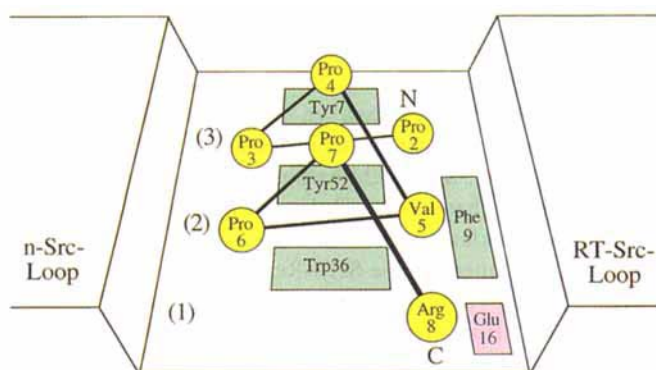


Abb. 17. Schematische Darstellung des von Sos1 abgeleiteten Peptids VPPVPVPRRR, eingebettet in die N-terminale SH3-Domäne von Grb2 in der Orientierung von Liganden der KlasseII. Die Zahlen in Klammern stehen für die drei hydrophoben Taschen in der SH3-Bindungsstelle.

P7A-Mutationen auf die SH3-Bindungsaffinität ist charakteristisch für die Prolinreste des Liganden, die bei der Komplexbildung die PPII-Helix-Konformation stabilisieren, ohne mit dem Rezeptor direkt zu wechselwirken^[28, 32]. Arg9 und Arg10 des Sos1-stämmigen Peptides wechselwirken ebenfalls mit der Grb2-SH3-Domäne, was sich in einer schrittweisen Abnahme der Bindungsaffinität bei der Entfernung dieser Reste niederschlägt^[32]. Die C-terminalen Reste der KlasseII-Konsensussequenz können also ebenso zur SH3-Bindungsaffinität beitragen wie die N-terminalen Reste der KlasseI-Konsensussequenz. Auf Grundlage der Strukturen der SH3-Peptid-Komplexe ist anzunehmen, daß die zusätzlichen N- und C-terminalen Aminosäuren wahrscheinlich von der PPII-Helix-Konformation abweichen, um den Kontakt mit der SH3-Oberfläche aufzunehmen. Analoge Reste in bekannten SH3-Liganden sind nicht hochkonserviert und können möglicherweise wichtig für die Ligandenspezifität sein.

4.4. Erkenntnisse aus dem SH3-SH2-Fragment von Lck

Seit der Entdeckung von 3BP1 und 3BP2 konzentrierten sich die meisten Untersuchungen zur SH3-Erkennung auf lineare,

benachbarte Epitope in Polypeptidliganden. Die hier beschriebenen Strukturen zeigen zwar, daß einzelne Peptidketten optimale SH3-Liganden sind, doch könnten auch nichtbenachbarte Epitope in einem SH3-Protein die hydrophoben und polaren Elemente eines prolinreichen Peptids nachahmen. Hinweise auf solche Wechselwirkungen ergeben sich aus der Struktur der Lck-Regulatordomänen im Kristall: Das bivalente SH3-SH2-Fragment bildet hier Kopf-Schwanz-Dimere. Die SH3- und die SH2-Domänen in diesem aufschlußreichen Komplex treten dabei in intensive intermolekulare Wechselwirkungen, an denen die SH3-Bindungstaschen und die SH2-Reste beteiligt sind, die der Phosphopeptid-Erkennungsregion benachbart sind (Abb. 18). So bindet die zweite Bindungsspalte der Lck-SH3-

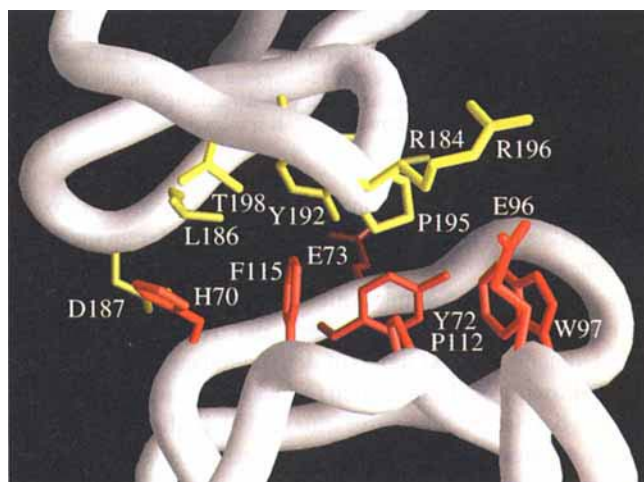


Abb. 18. Die intermolekulare Grenzfläche des dimerisierten SH3-SH2-Fragments von Lck. Die α -Kohlenstoffspuren der SH3- und der SH2-Domäne sind weiß dargestellt, die SH3- und die SH2-Aminosäurereste, die zu hydrophoben oder elektrostatischen Wechselwirkungen beitragen, rot bzw. gelb^[51].

Domäne den Aminosäurerest Pro195, der aus der SH2-Oberfläche herausragt. Der Pyrrolidinyrings dieses Restes ahmt einen Teil der XP-Einheit in PPII-Helix-Liganden nach, obwohl er im Vergleich zu analogen Prolinresten in SH3-Peptid-Komplexen um 90° verdreht ist. Leu186 und Thr198 der SH2-Domäne imitieren ein weiteres XP-Element und wechselwirken mit der dritten SH3-Bindungstasche, während der SH2-Rest Tyr192 zusätzliche hydrophobe Wechselwirkungen mit aromatischen Resten der SH3-Domäne eingeht. Andere SH2- und SH3-Reste, wie Glu73, Glu96, Asp187, Arg184 und Arg196 sind an Salzbrücken beteiligt, die die Dimergrenzfläche stabilisieren. Im Gegensatz dazu beschränken sich intramolekulare Kontakte zwischen der SH3- und der SH2-Domäne auf eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen der α -Aminogruppe von Lys118 in der SH3-Domäne und der Seitenkette von Glu204 in der SH2-Domäne sowie auf hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Leu69, Ala117 und Pro200.

Die Struktur des mit einem Phosphotyrosylpeptid komplexierten SH3-SH2-Fragmentes (Sequenz TEGQ[pY]QPQA; pY = Phosphotyrosin) im Kristall weist eine ähnliche Anordnung der Domänen auf, wobei der Peptidligand an der Grenzfläche zwischen SH2 und SH3 gebunden wird (Abb. 19). Dieses phosphorylierte Peptid entspricht einer Region im regulatori-

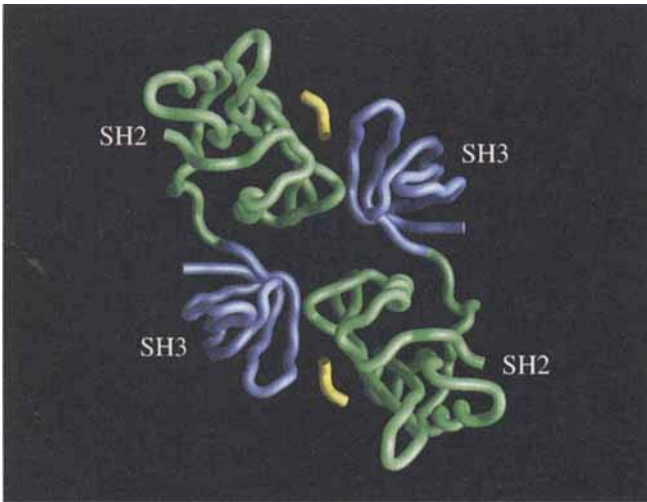


Abb. 19. Das mit einem Phosphotyrosylpeptid komplexierte Lck-SH3-SH2-Dimer. Die α -Kohlenstoffspuren der SH2-Domänen sind grün, die der SH3-Domänen blau und die des Phosphopeptids gelb dargestellt [51]. Die N-terminal zum Phosphotyrosin liegenden Reste des Peptids wurden weggelassen.

schen C-terminalen Ende von Lck, die vermutlich die Tyrosin-Kinase-Aktivität hemmt, indem sie intramolekular an die SH2-Domäne bindet^[4e, 50]. Durch die Bindung des C-terminalen Endes wird der dimere Komplex offenbar stabilisiert, da das Peptid zu beiden Domänen einschließlich der RT-Src-Schleife der SH3-Domäne Kontakt hat. Auf der Grundlage dieser Befunde haben Harrison et al. ein Modell für die Regulation der Tyrosin-Kinasen der Src-Familie vorgeschlagen^[2e]. In diesem Strukturmodell entspricht das mit der C-terminalen Region von Lck komplexierte SH3-SH2-Dimer dem „geschlossenen“, katalytisch inaktiven Zustand von Tyrosin-Kinasen. Die Bindungsstellen der SH3- und der SH2-Domäne sind dabei verdeckt und nicht in der Lage, heterologe Zielstrukturen zu erkennen. Durch Ereignisse auf molekularer Ebene kann diese dimere Struktur aufgebrochen und so ein „offener“ Zustand herbeigeführt werden. Dadurch wird die Kinasedomäne aktiviert und in der Folge eine Signalübertragungskaskade ausgelöst. Mögliche aktivierende Ereignisse sind z. B. die Dephosphorylierung des regulatorischen C-terminalen Endes, die Bindung der SH3- oder der SH2-Domäne an andere endogene Liganden sowie Mutationen in einer der Domänen, die die „geschlossene“ Konformation der Tyrosin-Kinasen destabilisieren. Die Aussagekraft dieses mechanistischen Modells muß noch mit biochemischen Methoden getestet werden, denn es ist auch möglich, daß die Bildung des SH3-SH2-Dimers nur das Ergebnis von Packungskräften im Kristall ist. In Lösung oder in Zellsatzen konnte bislang noch keine Assoziation der beiden Domänen nachgewiesen werden. Die Proteindimerisierung kann aber möglicherweise in intakten Zellen stattfinden, denn die Tyrosin-Kinasen der Src-Familie sind an der Membran lokalisiert.

5. Ein allgemeines Modell für SH3-Ligand-Wechselwirkungen

Wie durch kombinatorische Synthese und Methoden der Strukturaufklärung gezeigt wurde, gibt es in SH3-Domänen und ihren prolinreichen Liganden wiederkehrende Struktur-

merkmale. Auf der Grundlage dieser konservierten Strukturelemente und der an der Struktur orientierten Analyse potentiell SH3-bindender Sequenzen gelangte man zu einem detaillierten Verständnis der SH3-Ligand-Wechselwirkungen. Die molekulare Erkennung von SH3-Domänen läßt sich demnach durch folgendes generelle Modell beschreiben:

1) Die SH3-Domäne enthält drei Bindungstaschen, die durch konservierte hydrophobe Aminosäurereste gebildet werden; diese entsprechen Tyr90, Tyr92, Trp118, Pro133 und Tyr136 von c-Src-SH3. Aminosäurereste in den Regionen der RT- und der n-Src-Schleife tragen zu der zusammengesetzten Oberfläche der Bindungsstelle bei und sind demnach für die Bindungsspezifität entscheidende Strukturelemente.

2) SH3-Domänen erkennen PPII-Helices auf zwei Bindungsarten, die sich in der Orientierung des Peptidrückgrats unterscheiden. In erster Linie sind hydrophobe Wechselwirkungen die treibende Kraft für die Komplexbildung; aber auch spezifische ionische und Wasserstoffbrückenbindungen können zur Ligandenbindung beitragen.

3) Das Hauptkonsensusmotiv für Liganden der Klasse I lautet X_1 -p- X_2 -P-p- X_3 -P; das Konsensusmotiv der Klasse II ist X_3 '-P-p- X_2 '-P-p- X_1 ' (Tabelle 3; X_i und X_i' stehen für Aminosäuren, die mit SH3 wechselwirken und möglicherweise zur Ligandenspezifität beitragen; p steht für eine strukturbestimmende Aminosäure, die SH3 nicht berührt, – bei der Stabilisierung von PPII-Helices handelt es sich hierbei meist um Prolin). Bei beiden Ligandenklassen lagert sich eine für die Bindung kritische XPPXP-Sequenz in die SH3-Rezeptorregion. Weitere N- oder C-terminale Aminosäurereste in den Liganden der Klasse I bzw. der Klasse II können ebenfalls zur SH3-Bindung beitragen und eine Rolle bei der Rezeptor-Ligand-Spezifität spielen.

Mit diesen allgemeinen Richtlinien kann man die Molekülstruktur eines SH3-Ligand-Komplexes vorhersagen und dabei nur auf die Primärstruktur von Rezeptor und Ligand zurückgreifen. Beispielsweise sind zwei Komponenten des NADPH-Oxidase-Komplexes aus Phagocyten, p67^{phox} und p47^{phox}, über eine SH3-Domäne assoziiert^[49d]. Die C-terminale SH3-Domäne von p67^{phox} bindet spezifisch an eine prolinreiche Region in p47^{phox} (QPAVPPRPS, Reste 362–370). Auf der Grundlage der Sequenzen dieses SH3-bindenden Motivs und der p67^{phox}-SH3-Domäne kann man folgendes vorhersagen (Abb. 20): Die prolinreiche Region in p47^{phox} bindet an die p67^{phox}-SH3-Domäne als PPII-Helix, deren N-Terminus dem Phe466 des Rezeptors

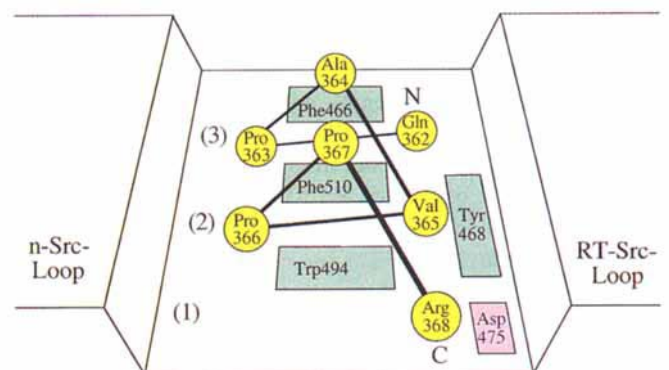


Abb. 20. Schematische Darstellung des von p47^{phox} abgeleiteten Peptids QPAVPPRPS, eingebettet in die C-terminale SH3-Domäne von p67^{phox}. Die Zahlen in Klammern stehen für die drei hydrophoben Taschen in der SH3-Bindungsstelle.

und deren C-Terminus dem Trp 494 benachbart ist. Arg 368 des Liganden befindet sich in der ersten Bindungstasche und bildet eine Salzbrücke zu Asp 475, während die Dipeptidylreste Val 365-Pro 366 und Gln 362-Pro 363 mit der zweiten bzw. dritten Bindungsspalte wechselwirken. Wie in dem Sos 1-stämmigen Liganden VPPPVPPIRRR bilden auch hier die beiden äußersten C-terminalen Reste Pro 369 und Ser 370 zusätzliche Kontakte mit der SH 3-Oberfläche und erhöhen so die Affinität und die Spezifität des Liganden. Andere Reste des Liganden wie Ala 364 und Pro 367 weisen von der SH 3-Ligand-Kontaktfläche weg und stehen möglicherweise mit der Oberfläche von p47^{phox} in Kontakt. Die Genauigkeit dieser Strukturvorhersage spiegelt unseren derzeitigen, hohen Kenntnisstand hinsichtlich der SH 3-Ligand-Wechselwirkungen wider. Sie unterstreicht außerdem die Leistungsfähigkeit der Verknüpfung von kombinatorischer Synthese und Methoden zur Strukturaufklärung bei der Untersuchung von Rezeptoren und ihren Liganden.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Mit der Bestimmung der dreidimensionalen Strukturen von Komplexen aus SH 3-Domänen und Liganden, die durch kombinatorische Synthese gefunden wurden, wurde ein bemerkenswert klares Bild der SH 3-Erkennung entwickelt. Innerhalb kurzer Zeit hat sich unser Wissen über diesen Rezeptoren insofern gewandelt, als daß es nun spezifische molekulare Wechselwirkungen zwischen einer PPII-Helix und einer räumlich exakt angeordneten Gruppe aromatischer SH 3-Reste umfaßt. Dieses globale Verständnis der SH 3-Ligand-Wechselwirkungen ist das Ergebnis einer zweistufigen Forschungsstrategie. Die kombinatorische Synthese lieferte zwei Familien von Peptidliganden, wodurch wir wesentliche Aspekte der SH 3-Erkennung verstehen lernten. Durch die mehrdimensionale NMR-Spektroskopie gelangten wir dann zu einem tiefgreifenden Verständnis der SH 3-Ligand-Komplexe auf molekularer Ebene, das breite Möglichkeiten der Strukturvorhersage eröffnet. Die Kombination dieser beiden Techniken verkörpert einen neuen Ansatz zum Studium von Protein-Ligand-Wechselwirkungen, der auch auf andere Systeme anwendbar sein sollte.

Die Erkenntnisse, die wir durch kombinatorische Synthese und NMR-Spektroskopie gewonnen haben, führten uns aber auch zu einer Reihe grundlegender Fragen zur SH 3-Ligand-Wechselwirkung: Warum sollte beispielsweise die Natur einen Mechanismus für die Protein-Protein-Assoziation erfinden, der zwei Orientierungen umfaßt? Nutzen einzelne SH 3-Domänen in zellulären Systemen beide Bindungsarten oder hat jede eine spezifische Präferenz für eine Ligandenklasse? Diese Fragen zur Biologie müssen mit traditionellen Strategien beantwortet werden, mit denen auch die molekularen Komponenten der zahlreichen Signalübertragungswege schrittweise aufgeklärt wurden. Grundsätzliche Aspekte der molekularen Erkennung konnten durch die Strukturaufklärung der SH 3-Ligand-Komplexe ebenfalls herausgestellt werden. In vieler Hinsicht ist die PPII-Helix ein ideales SH 3-Erkennungsmotiv, das durch zahllose Evolutionscyclen optimiert wurde. Darüber sind Selektionsprozesse in Erwägung zu ziehen, bei denen man sich nicht auf natürliche Aminosäuren beschränkt und so zu interessanten Ergebnissen gelangen könnte. Können Kombinationen anderer

funktioneller Gruppen zu tauglichen SH 3-Liganden führen? Werden solche nichtpeptidischen Liganden die Strukturelemente der PPII-Helix nachbilden oder gibt es auch andere einzigartige Möglichkeiten, SH 3-Domänen zu binden? Antworten auf diese Fragen können durch den strukturorientierten Entwurf von nichtpeptidischen Liganden oder – noch besser – von neuen kombinatorischen Bibliotheken, einschließlich solchen, in denen das Peptidrückgrat vollständig ersetzt wurde, gefunden werden. Die Strategien zur Herstellung von Verbindungen mit Leitstrukturen, die Aufklärung dieser Strukturen durch NMR-Spektroskopie oder Kristallstrukturanalyse und der darauf aufbauende Entwurf von neuen Liganden oder Verbindungsbibliotheken bilden zusammen einen iterativen Entdeckungsprozeß, durch den wir die molekulare Erkennung und die von ihr gesteuerten biologischen Prozesse immer besser verstehen werden.

Wir möchten unseren Freunden und Kollegen danken, die zu unseren Untersuchungen der SH 3-Domänen beigetragen haben. Unser Erfolg bei der kombinatorischen Synthese wäre ohne die Geduld und die Bemühungen von Andrew Brauer (ARIAD Pharmaceuticals), Bill Lane (Harvard Microchemistry Facility) und Akito Tanaka aus unserer Arbeitsgruppe nicht möglich gewesen. Die Struktur der SH 3-Ligand-Komplexe wurden von Hongtao Yu, Sibao Feng und Satoshi Koyama aus unserer Arbeitsgruppe sowie David Dalgarno (ARIAD Pharmaceuticals) aufgeklärt. Wir danken Professor George M. Whitesides und Frank Gomez (Harvard University) für ihre Unterstützung bei unseren ersten Untersuchungen zu SH 3-Ligand-Wechselwirkungen durch Affinitätskapillarelektrophorese. Dank gilt auch H. Y., S. F. und Tae Bum Shin für die kritische Durchsicht des Manuskripts, Professor Stephen Harrison (Harvard Molecular and Cellular Biology Department) für die Kristallstrukturkoordinaten des Lck-SH 3-SH 2-Fragmentes und Andrea Musacchio (EMBL) für die Koordinaten des Abl-SH 3-3BP1-10-Komplexes. Schließlich sind wir unseren Kollegen von ARIAD Pharmaceuticals, vor allem Ricky Rickles und Joan Brugge, sowie allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Schreiber zu Dank verpflichtet, besonders T. B. S. und Julian Simon, deren Begeisterung und hilfreiche Diskussionen das SH 3-Projekt aufregend und erfolgreich gemacht haben. J. K. C. wurde von der National Science Foundation, der American Chemical Society Division of Organic Chemistry und Zeneca mit Graduiertenstipendien unterstützt. Die SH 3-Forschung in der Arbeitsgruppe von S. L. S. wird vom National Institute of General Medical Sciences (GM-44993) und dem Howard Hughes Medical Institute gefördert.

Eingegangen am 6. Oktober 1994 [A 90]
Übersetzt von Dr. Burkard Neuß, Jülich

- [1] Übersichtsartikel: a) C. A. Koch, D. Anderson, M. F. Moran, C. Ellis, T. Pawson, *Science* **1991**, 252, 668–674; b) A. Musacchio, T. Gibson, V.-P. Lehto, M. Saraste, *FEBS Lett.* **1992**, 307, 55–61; c) T. Pawson, J. Schlessinger, *Curr. Biol.* **1993**, 3, 434–442; d) C. J. Morton, I. D. Campbell, *ibid.* **1994**, 4, 615–617.
- [2] Strukturen von SH 3-Domänen: a) α -Spectrin: A. Musacchio, M. Nobel, R. Pauptit, R. Wierenga, M. Saraste, *Nature* **1992**, 359, 851–855; b) c-Src: H. Yu, M. K. Rosen, T. B. Shin, C. Seidel-Dugan, J. S. Brugge, S. L. Schreiber, *Science* **1992**, 258, 1665–1668; c) PI3K: S. Koyama, H. Yu, D. C. Dalgarno, T. B. Shin, L. D. Zydowsky, S. L. Schreiber, *Cell* **1993**, 72, 945–952; d) PI3K: G. W. Booker, I. Gout, A. K. Downing, P. C. Driscoll, J. Boyd, M. D. Waterfield, I. D. Campbell, *ibid.* **1993**, 73, 813–822; e) PLC- γ : D. Kohda, H. Hatanaka, M. Odaka, V. Mandiyan, A. Ullrich, J. Schlessinger, F. Inagaki, *ibid.* **1993**, 72, 953–960; f) Fyn: M. E. M. Noble, A. Musacchio, M. Saraste, S. A. Courtneidge, R. K. Wierenga, *EMBO J.* **1993**, 12, 2617–2624; g) Lck: M. J. Eck, S. K. Atwell, S. E. Shoelson, S. C. Harrison, *Nature* **1994**, 368, 764–769; h) Csk: T. V. Borchert, M. Mathieu, J. Ph. Zeelen, S. A. Courtneidge, R. K. Wierenga, *FEBS Lett.* **1994**, 341, 79–85.
- [3] D. Bar-Sagi, D. Rotin, A. Batzer, V. Mandiyan, J. Schlessinger, *Cell* **1993**, 74, 83–91.

- [4] a) J.-Y. Kato, T. Takeya, C. Grandori, H. Iba, J. B. Levy, H. Hanafusa, *Mol. Cell. Biol.* **1986**, 6, 4155–4160; b) W. M. Potts, A. B. Reynolds, T. J. Lansing, J. T. Parsons, *Oncog. Res.* **1988**, 3, 343–355; c) S. P. Nemeth, L. C. Fox, M. DeMarco, J. S. Brugge, *Mol. Cell. Biol.* **1989**, 9, 1109–1119; d) I. Gout, R. Dhand, I. D. Hiles, M. J. Fry, G. Panayotou, P. Das, O. Truong, N. F. Totty, J. Hsuan, G. W. Booker, I. D. Campbell, M. D. Waterfield, *Cell* **1993**, 75, 25–36; e) G. Superti-Furga, S. Fumagalli, M. Koegl, S. A. Courtneidge, G. Draetta, *EMBO J.* **1993**, 12, 2625–2634.
- [5] C. Seidel-Dugan, B. E. Meyer, S. M. Thomas, J. S. Brugge, *Mol. Cell. Biol.* **1992**, 12, 1835–1845.
- [6] a) M. A. Simon, G. S. Dodson, G. M. Rubin, *Cell* **1993**, 73, 169–178; b) J. P. Olivier, T. Raabe, M. Henkemeyer, B. Dickson, G. Mbamalu, B. Margolis, J. Schlessinger, E. Hafen, T. Pawson, *ibid.* **1993**, 73, 179–191; c) L. Buday, J. Downward, *ibid.* **1993**, 73, 611–620; d) S. E. Egan, B. W. Giddings, M. W. Brooks, L. Buday, A. M. Sizeland, R. A. Weinberg, *Nature (London)* **1993**, 363, 45–51; e) M. Rozakis-Adcock, R. Fernley, J. Wade, T. Pawson, D. Bowtell, *ibid.* **1993**, 363, 83–85; f) N. Li, A. Batzer, R. Daly, V. Yajnik, E. Skolnik, P. Chardin, D. Bar-Sagi, B. Margolis, J. Schlessinger, *ibid.* **1993**, 363, 85–88; g) N. W. Gale, S. Kaplan, E. J. Lowenstein, J. Schlessinger, D. Bar-Sagi, *ibid.* **1993**, 363, 88–92.
- [7] Übersichtsartikel: J. T. Parsons, M. J. Weber, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **1989**, 147, 79–127.
- [8] D. S. Wages, J. Keefe, T. B. Rall, M. J. Weber, *J. Virol.* **1992**, 66, 1866–1874.
- [9] a) J. A. Escobedo, S. Navankasattusas, W. M. Kavanaugh, D. Milfay, V. A. Fried, L. T. Williams, *Cell* **1991**, 65, 75–82; b) E. Y. Skolnik, B. Margolis, M. Mohammadi, E. Lowenstein, R. Fischer, A. Drepps, A. Ullrich, J. Schlessinger, *ibid.* **1991**, 65, 83–90; c) M. Otsu, I. Hiles, I. Gout, M. J. Fry, F. Ruiz-Larrea, G. Panayotou, A. Thompson, R. Dhand, J. Hsuan, N. Totty, A. D. Smith, S. J. Morgan, S. A. Courtneidge, P. J. Parker, M. D. Waterfield, *ibid.* **1991**, 65, 91–104; d) I. D. Hiles, M. Otsu, S. Volinia, M. J. Fry, I. Gout, R. Dhand, G. Panayotou, F. Ruiz-Larrea, A. Thompson, N. F. Totty, J. J. Hsuan, S. A. Courtneidge, P. J. Parker, M. D. Waterfield, *ibid.* **1992**, 70, 419–429.
- [10] a) L. Varticovski, B. Druker, C. Morrison, L. Cantley, T. Roberts, *Nature (London)* **1989**, 342, 699–702; b) C. J. McGlade, C. Ellis, M. Reedijk, D. Anderson, G. Mbamalu, A. D. Reith, G. Panayotou, P. End, A. Bernstein, A. Kazlauskas, M. D. Waterfield, T. Pawson, *Mol. Cell. Biol.* **1992**, 12, 991–997; c) A. Klippel, J. A. Escobedo, W. J. Fantl, L. T. Williams, *ibid.* **1992**, 12, 1451–1459.
- [11] P. Cicchetti, B. J. Mayer, G. Thiel, D. Baltimore, *Science* **1992**, 257, 803–806.
- [12] R. Ren, B. J. Mayer, P. Cicchetti, D. Baltimore, *Science* **1993**, 259, 1157–1161.
- [13] F. A. Gomez, J. K. Chen, A. Tanaka, S. L. Schreiber, G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 2885–2886.
- [14] Z. Weng, J. A. Taylor, C. E. Turner, J. S. Brugge, C. Seidel-Dugan, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 14956–14963.
- [15] a) S. A. Benner, M. A. Cohen, D. Gerloff, *Nature (London)* **1992**, 359, 781; b) S. A. Benner, M. A. Cohen, D. Gerloff, *J. Mol. Biol.* **1993**, 229, 295–305.
- [16] B. Rost, C. Sander, *Nature (London)* **1992**, 360, 540.
- [17] Strukturen von SH2-Domänen: a) v-Src: G. Waksman, D. Kominos, S. C. Robertson, N. Pant, D. Baltimore, R. B. Birge, D. Cowburn, H. Hanafusa, B. J. Mayer, M. Overduin, M. D. Resh, C. B. Rios, L. Silverman, J. Kuriyan, *Nature (London)* **1992**, 358, 646–653; b) PI3K, N-terminal: G. W. Booker, A. L. Breeze, A. K. Downing, G. Panayotou, I. Gout, M. D. Waterfield, I. D. Campbell, *ibid.* **1992**, 358, 684–687; c) Abl: M. Overduin, C. B. Rios, B. J. Mayer, D. Baltimore, D. Cowburn, *Cell* **1992**, 70, 697–704; d) Lck: M. J. Eck, S. E. Shoelson, S. C. Harrison, *Nature (London)* **1993**, 362, 87–91; e) PLC- γ 1: S. M. Paeal, A. U. Singer, G. Gish, T. Yamazaki, S. E. Shoelson, T. Pawson, L. E. Kay, J. D. Forman-Kay, *Cell* **1994**, 77, 461–472; f) Syt: C.-H. Lee, D. Kominos, S. Jacques, B. Margolis, J. Schlessinger, S. E. Shoelson, J. Kuriyan, *Structure* **1994**, 2, 423–438.
- [18] a) J. B. Levy, T. Dorai, L.-H. Wang, J. S. Brugge, *Mol. Cell. Biol.* **1987**, 7, 4142–4145; b) R. Martinez, B. Mathey-Prevot, A. Bernards, D. Baltimore, *Science* **1987**, 237, 411–415.
- [19] J. M. Pyper, J. B. Bolen, *Mol. Cell. Biol.* **1990**, 10, 2035–2040.
- [20] Übersichtsartikel: a) R. M. Baum, *Chem. Eng. News* **1994**, 72, 20–26; b) M. A. Gallop, R. W. Barrett, W. J. Dower, S. P. A. Fodor, E. M. Gordon, *J. Med. Chem.* **1994**, 37, 1233–1251.
- [21] a) H. M. Geysen, R. H. Meloen, S. J. Barteling, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, 81, 3998–4002; b) S. F. Parmley, G. P. Smith, *Gene* **1988**, 73, 305–318; c) S. P. A. Fodor, J. L. Read, M. C. Pirrung, L. Stryer, A. T. Lu, D. Solas, *Science* **1991**, 251, 767–773; d) K. S. Lam, S. E. Salmon, E. M. Hersch, V. J. Hruby, W. M. Kazmierski, R. J. Knapp, *Nature (London)* **1991**, 354, 82–84; e) R. A. Houghten, C. Pinilla, S. E. Blondelle, J. R. Appel, C. T. Dooley, J. H. Cuervo, *ibid.* **1991**, 354, 84–86; f) M. G. Cull, J. F. Miller, P. J. Schatz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, 89, 1865–1869; g) A. G. Jung, G. Beck-Sickinger, *Angew. Chem.* **1992**, 104, 375–391; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, 31, 367–383.
- [22] a) C. Tuerk, L. Gold, *Science* **1990**, 249, 505–510; b) L. C. Bock, L. C. Griffin, J. A. Latham, E. H. Vermaas, J. J. Toole, *Nature (London)* **1992**, 355, 564–566; c) M. Famulok, J. W. Szostak, *Angew. Chem.* **1992**, 104, 1001–1011; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, 31, 979–998; d) M. Sassanfar, J. W. Szostak, *Nature (London)* **1993**, 364, 550–553; e) R. D. Jenison, S. C. Gill, A. Pardi, B. Polisky, *Science* **1994**, 263, 1425–1429.
- [23] a) R. J. Simon, R. S. Kania, R. N. Zuckermann, V. D. Huebner, D. A. Jewell, S. Banville, S. Ng, L. Wang, S. Rosenberg, C. K. Marlowe, D. C. Spellmeyer, R. Tan, A. D. Frankel, D. V. Santi, F. E. Cohen, P. A. Bartlett, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, 89, 9367–9371; b) C. Y. Cho, E. J. Moran, S. R. Cherry, J. C. Stephens, S. P. A. Fodor, C. L. Adams, A. Sundaram, J. W. Jacobs, P. G. Schultz, *Science* **1993**, 261, 1303–1305.
- [24] a) B. A. Bunin, J. A. Ellman, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 10997–10998; b) S. H. Dewitt, J. S. Kiely, C. J. Stankovic, M. C. Schroder, D. M. R. Cody, M. R. Pavia, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 6909–6913.
- [25] A. P. Combs, Dissertation, University of California, Los Angeles, **1994**.
- [26] Á. Furka, F. Sebestyén, M. Asgedom, G. Dibó, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1991**, 37, 487–493.
- [27] J. K. Chen, W. S. Lane, A. W. Brauer, A. Tanaka, S. L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 12591–12592.
- [28] H. Yu, J. K. Chen, S. Feng, D. C. Dalgarno, A. W. Brauer, S. L. Schreiber, *Cell* **1994**, 76, 933–945.
- [29] K. F. Geoghegan, J. G. Stroh, *Bioconjugate Chem.* **1992**, 3, 138–146.
- [30] A. Musacchio, M. Saraste, M. Wilmanns, *Nat. Struct. Biol.* **1994**, 1, 546–551.
- [31] W. A. Lim, F. M. Richards, *Nat. Struct. Biol.* **1994**, 1, 221–225.
- [32] S. Feng, J. K. Chen, H. Yu, J. A. Simon, S. L. Schreiber, *Science* **1994**, 266, 1241–1247.
- [33] G. Naharro, K. C. Robbins, E. P. Reddy, *Science* **1984**, 223, 63–66.
- [34] M. M. Tamkun, K. M. Knoth, J. A. Walbridge, H. Kroemer, D. M. Roden, D. M. Glover, *FASEB J.* **1991**, 5, 331–337.
- [35] T. Baba, K. Watanabe, S. Kashiwabara, Y. Arai, *FEBS Lett.* **1989**, 244, 296–300.
- [36] T. J. Blake, M. Shapiro, H. C. Morse, W. Y. Langdon, *Oncogene* **1991**, 6, 653–657.
- [37] E. Hafen, K. Basler, J. E. Edstroem, G. M. Rubin, *Science* **1987**, 236, 55–63.
- [38] P. Kastner, A. Krust, B. Turcotte, U. Stropp, L. Torn, H. Gronemeyer, P. Cambon, *EMBO J.* **1990**, 9, 1603–1614.
- [39] C. M. Pleiman, W. M. Hertz, J. C. Cambier, *Science* **1994**, 263, 1609–1612.
- [40] J. K. Chen, S. L. Schreiber, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, 4, 1755–1760.
- [41] A. A. Adzhubei, M. J. E. Sternberg, *J. Mol. Biol.* **1993**, 229, 472–493.
- [42] R. J. Rickles, M. C. Botfield, Z. Weng, J. A. Taylor, O. M. Green, J. S. Brugge, M. J. Zoller, *EMBO J.* **1994**, 13, 5598–5604.
- [43] Beispiele: a) Trypsin-Inhibitor aus Rinderpankreas: W. Bode, P. Schwager, R. Huber, *J. Mol. Biol.* **1978**, 118, 99–112; b) menschliche Carboanhydrase II: A. E. Eriksson, T. A. Jones, A. Liljas, *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **1988**, 4, 274–282; c) menschliches retinoblastisches Protein: G. Zanotti, S. Ottonello, R. Berni, H. Monaco, *J. Mol. Biol.* **1993**, 230, 613–624.
- [44] A. Borchardt, W. C. Still, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 7467–7468.
- [45] a) C. Björkregren, M. Rozycki, C. E. Schutt, U. Lindberg, R. Karlsson, *FEBS Lett.* **1993**, 333, 123–126; b) W. J. Metzler, A. J. Bell, E. Ernst, T. B. Lavoie, L. Mueller, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 4620–4625; c) S. J. Archer, V. K. Vinson, T. D. Pollard, D. A. Torchia, *FEBS Lett.* **1994**, 337, 145–151.
- [46] G. Waksman, S. E. Shoelson, N. Pant, D. Cowburn, J. Kuriyan, *Cell* **1993**, 72, 779–790.
- [47] a) B. W. Matthews, P. B. Sigler, R. Henderson, D. M. Blow, *Nature (London)* **1967**, 214, 652–664; b) R. M. Stroud, L. M. Kay, R. E. Dickerson, *J. Mol. Biol.* **1974**, 85, 185–208.
- [48] G. Cheng, Z.-S. Ye, D. Baltimore, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, 91, 8152–8155.
- [49] a) E. T. Barford, Y. Zheng, W.-J. Kuang, M. J. Hart, T. Evans, R. A. Cerione, A. Ashkenazi, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 26059–26062; b) R. Kapeller, K. V. S. Prasad, O. Janssen, W. Hou, B. S. Schaffhausen, C. E. Rudd, L. C. Cantley, *ibid.* **1994**, 269, 1927–1933; c) S. Tanaka, T. Morishita, Y. Hashimoto, S. Hattori, S. Nakamura, M. Shibuya, K. Matuoka, T. Takenawa, T. Kurata, K. Nagashima, M. Matsuda, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, 91, 3443–3447; d) P. Finan, Y. Shimizu, I. Gout, J. Hsuan, O. Truong, C. Butcher, P. Bennett, M. D. Waterfield, S. Kellie, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 13752–13755; e) K. Seedorf, G. Kostka, R. Lammers, P. Bashkin, R. Daly, W. H. Burgess, A. M. van der Bliek, J. Schlessinger, A. Ullrich, *ibid.* **1994**, 269, 16009–16014; f) H. Sumimoto, Y. Kage, H. Nunoi, H. Sasaki, T. Nose, Y. Fukumaki, M. Ohno, S. Minakami, K. Takeshige, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, 91, 5345–5349; g) M. Sudol, *Oncogene* **1994**, 9, 2145–2152.
- [50] a) L. C. Cantley, K. R. Auger, C. Carpenter, B. Duckworth, A. Graziani, R. Kapeller, S. Soltoff, *Cell* **1991**, 64, 281–302; b) R. R. Roussel, S. R. Broderick, D. Shalloway, A. P. Laudano, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, 88, 10696–10700.
- [51] Die Abb. 5, 6, 11, 13, 15, 16, 18 und 19 wurden mit dem Programm GRASP erstellt: A. Nicholls, K. A. Sharp, B. Honig, *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **1991**, 11, 282–293.
- [52] Die Abb. 7 und 14 wurden mit dem Programm MOLSCRIPT erstellt: P. J. Kraulis, *J. Appl. Crystallogr.* **1991**, 24, 946–950.