

- 1 H), 3.68 (s, 1 H), 2.66 (s, 3 H), außerdem wurde ein Verhältnis von 0.5 Toluolmolekülen pro Molekül **1b** ermittelt; $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR (122 MHz, $[\text{D}_6]\text{Benzol}$, 25 °C, 85 proz. H_3PO_4): $\delta = 27.22$ (d, $^2J_{\text{PP}} = 30.6$ Hz), 13.97 (d, $^2J_{\text{PP}} = 30.6$ Hz); IR (Nujol): $\tilde{\nu}_{\text{N-H}} = 3224$, $\tilde{\nu}_{\text{C=N}} = 1571$, 1594 cm^{-1} .
- [13] Kristallstrukturanalyse von **1b**: Raumgruppe $P\bar{1}$ (Nr. 2), $a = 13.36(1)$, $b = 18.30(2)$, $c = 10.04(1)\text{ Å}$, $\alpha = 103.26(9)^\circ$, $\beta = 91.85(9)^\circ$, $\gamma = 78.32(8)^\circ$, $V = 2339(4)\text{ Å}^3$, $Z = 2$, $\rho_{\text{ber.}} = 1.39\text{ g cm}^{-3}$, $2\theta_{\text{max}} = 50.0^\circ$, $\text{MoK}\alpha$ ($\lambda = 0.71069\text{ Å}$), $\omega - 2\theta$, $8.0^\circ\text{ min}^{-1}$ (in ω), $(1.26 + 0.3\tan\theta)^\circ$, -105°C , 8616 Reflexe, davon 8231 unabhängig. Lorentz- und Polarisationskorrektur wurden durchgeführt, jedoch keine Absorptionskorrektur. Die Struktur wurde mit Direkten Methoden gelöst und mit Fourier-Verfahren unter Verwendung von teXan-Software verfeinert. Zahl der beobachteten Reflexe ($I > 3.00\sigma(I)$) 3147, Zahl der Variablen 577. H-Atome wurden berücksichtigt, jedoch nicht verfeinert. $R = 0.056$, $wR = 0.64$, verfeinert gegen $|F|$. Die kristallographischen Daten (ohne Strukturaktoren) der in dieser Veröffentlichung beschriebenen Struktur wurden als „supplementary publication no. CCDC-101249“ beim Cambridge Crystallographic Data Centre hinterlegt. Kopien der Daten können kostenlos bei folgender Adresse in Großbritannien angefordert werden: CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB21EZ (Fax: (+44)1223-336-033; E-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk).
- [14] P. A. S. Smith, *Derivatives of Hydrazine and other Hydronitrogens Having N-N Bonds*, Benjamin, Reading, MA, **1983**, S. 46.
- [15] M. S. Driver, J. F. Hartwig, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 4206–4207.
- [16] G. Mann, J. Hartwig, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 13109–13110.
- [17] M. S. Driver, J. F. Hartwig, *Organometallics* **1997**, *16*, 5706–5715.
- [18] Dieser Komplex wurde auf ähnliche Weise wie das *p*-*t*-Bu-Analogon hergestellt.
- [19] G. Mann, M. S. Driver, J. F. Hartwig, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 827–828.
- [20] Eine neuere Zusammenfassung dieser Mechanismen und der zugehörigen Daten findet sich in: C. Amatore, F. Pflüger, *Organometallics* **1990**, *9*, 2276–2282.
- [21] J. P. Wolfe, S. L. Buchwald, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 6359–6362.
- [22] B. C. Hamann, J. F. Hartwig, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, im Druck.
- [23] J. March, *Advanced Organic Chemistry*, 3. Aufl., Wiley, New York, **1985**.
- [24] M. Busch, S. Schöffner, *Chem. Ber.* **1923**, *56*, 1612–1616.

Ein photochemischer Schalter zur Kontrolle von Protein-Protein-Wechselwirkungen**

Sonia K. Pollitt und Peter G. Schultz*

Kleine Moleküle und Proteine, die durch Lichteinwirkung schnell von einer inaktiven in eine aktive Form umgewandelt werden können, haben sich in der Biologie als äußerst nützliche Werkzeuge erwiesen.^[1] Wenn es gelänge, damit auch Protein-Protein-Wechselwirkungen zu kontrollieren, könnte man mit diesem Ansatz zahlreiche Prozesse innerhalb

der Zelle untersuchen, unter anderem Signaltransduktionswege, Genregulierung und Proteintransport. Bisher wurden hierzu auf chemischem Weg photolabile Gruppen in Proteine eingeführt, was sich jedoch nur dann selektiv durchführen läßt, wenn hierfür eine einzige reaktive Seitenkette auf der Proteinoberfläche zugänglich ist.^[2] Hier beschreiben wir, wie durch den Einsatz nichtnatürlicher Aminosäuren die Wechselwirkung des p21^{ras}-Proteins (Ras) mit seinem Effektor p120-GAP (GAP = GTPase-aktivierendes Protein) durch Lichteinstrahlung „an- und ausgeschaltet“ werden kann. Inaktiviertes („ausgeschaltet“) Ras, bei dem Asp38 durch den β -*o*-Nitrobenzylester der Asparaginsäure (Nb-Asp) ersetzt wurde, behält seine intrinsische GTPase-Aktivität, kann jedoch so lange nicht mit p120-GAP wechselwirken, bis es mit Licht der Wellenlänge 355 nm bestrahlt wird. Dieser Ansatz sollte auf alle Aminosäuren übertragbar sein, deren Seitenketten mit photolabilen Schutzgruppen blockiert werden können, dazu gehören Serin, Threonin, Glutaminsäure und Lysin. Er bietet damit die Möglichkeit, sowohl in vitro als auch in vivo Signaltransduktionswege und andere biologische Prozesse zu studieren, bei denen spezifische Proteinwechselwirkungen identifiziert werden können.

Von *ras*-Genen codierte Säugetierproteine spielen als Regulatoren bei verschiedenen Signaltransduktionsprozessen während des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung eine Schlüsselrolle.^[3] Die Aktivität hängt von Konformationsänderungen ab, die wiederum von den gebundenen Guanin-Nucleotiden bestimmt werden: Der Ras-GTP-Komplex (Ras·GTP) nimmt eine Konformation ein, die eine Wechselwirkung mit den Effektoren ermöglicht, während Ras im Komplex mit GDP inaktiv ist.^[4] Das Verhältnis von Ras·GTP zu Ras·GDP wird bestimmt durch die GTPase-Aktivität des Proteins selbst sowie durch Proteine, die die Geschwindigkeit der Dissoziation von GDP aus dem Komplex (off rate) erhöhen (guanosine nucleotide release factors, GNRFs)^[5] oder die die Hydrolyse von GTP beschleunigen (GAPs).^[6] In dieser Eigenschaft ist p120-GAP ein negativer Regulator der Ras-Funktion;^[7] p120-GAP kann ebenso als Effektor für Ras agieren und so in einigen Systemen einen positiven regulatorischen Effekt auf die Ras-Funktion ausüben.^[5, 8]

Die Wechselwirkung von Ras und p120-GAP wurde durch den Austausch von Asp38 gegen den photolabilen β -*o*-Nitrobenzylester der Asparaginsäure im Ras-Protein unterbunden, hierfür wurde die Technik des Einbaus nichtnatürlicher Aminosäuren verwendet.^[9] Mutagenesestudien^[10] und Strukturuntersuchungen^[11] zeigten, daß die Aminosäuren 30–38 (Schleife 2 oder Schalter I)^[12] und 60–76 (Schleife 4 oder Schalter II)^[13] für die Wechselwirkung von Ras mit seinen Effektorproteinen äußerst wichtig sind. Vor allem die Mutation von Asp38 zu Ala verhindert die Aktivierung der GTPase-Aktivität durch p120-GAP und verringert die Fähigkeit zur Transformation von NIH-3T3-Zellen;^[14] des weiteren wird die Bindung von Ras an andere Effektorproteine wie Raf^[15] oder Phosphatidylinosit-3-Kinase^[16] in vitro außer Kraft gesetzt. Außerdem zeigt die vor kurzem veröffentlichte Kristallstruktur des Ras/p120-GAP-Komplexes,^[11] daß die Seitenkette von Asp38 über ein gebundenes Wassermolekül eine Wasserstoffbrückenbindung mit Lys949 von p120-GAP eingeht.^[17]

[*] Prof. P. G. Schultz, S. K. Pollitt
Howard Hughes Medical Institute und
Department of Chemistry
University of California, Berkeley, und
Lawrence Berkeley National Laboratory
Berkeley, CA 94720 (USA)
Fax: (+1) 510-643-6890
E-mail: pgschultz@lbl.gov

[**] Wir danken N. Damrauer und J. McCusker für hilfreiche Diskussionen und für die Bereitstellung ihres Lasers sowie H. Chung für die Spende an p120-GAP-Protein. Diese Arbeit wurde von den National Institutes of Health (Grant No. R02GM49220) gefördert. P.G.S. ist ein Howard Hughes Medical Institute Investigator.

Der *β*-*o*-Nitrobenzylester der Asparaginsäure wurde durch In-vitro-Suppression der Amber-Mutation (Amber-Codon = Terminations-Codon UAG) Asp38 → TAG in das Ras-Protein eingeführt, wobei eine chemisch aminoacylierte Suppressor-tRNA verwendet wurde.^[9, 18] Sowohl der Wildtyp (WT) als auch die Mutante enthalten eine verkürzte Version des *ras*-Gens, bei der die 18 C-terminalen Aminosäuren durch einen Schwanz aus sechs Histidinen (His tag) ersetzt wurden, um die Reinigung zu erleichtern.^[19] Das Aspartat wurde N-terminal mit Chlorameisensäureallylester geschützt und dann mit Dicyclohexylcarbodiimid, 4-Dimethylaminopyridin und 1-Hydroxy-1*H*-benzotriazol in den Bisnitrobenzylester überführt. Anschließend wurde selektiv die *α*-Nitrobenzylestergruppe mit Lithiumhydroxid hydrolysiert.^[20] Das *N*-Allyloxy-carbonyl-*β*-nitrobenzylaspartat wurde aktiviert und an das Dinucleotid pdCpA gekuppelt, dann wurde das aminoacylierte Dinucleotid wie bereits beschrieben mit der Suppressor-tRNA_{CUA} verknüpft.^[18] Die In-vitro-Expression des WT-*ras*-Gens unter Kontrolle des T7-Promotors lieferte eine Proteinausbeute von ca. 20 µg mL⁻¹. Die Suppressionseffizienz der Nb-Asp-acylierten tRNA_{CUA} an Position 38 betrug etwa 60%. Vollständig nichtacylierte Suppressor-tRNA_{CUA} ergab verglichen mit Nb-Asp-acylierter tRNA_{CUA} bei der In-vitro-Proteinsynthese mit dem Gen für die TAG-Mutante weniger als 1% Ras-Protein.^[21] Diese Kontrollreaktion verdeutlicht, daß das so hergestellte inaktivierte Ras-Protein weitgehend frei von unerwünschten Proteinen ist, die durch Ablesen des Amber-Codons durch hierfür nicht spezifische tRNAs entstehen. Der Wildtyp und das mutierte Protein wurden durch Nickel-Affinitätschromatographie gereinigt und beide in ca. 50% Ausbeute mit einer Reinheit > 95% erhalten.^[22]

Die intrinsische GTPase-Aktivität des Wildtyps und des mutierten Proteins wurden durch Messung der GTP-Hydrolysegeschwindigkeit in einem Experiment mit einmaligem Umsatz (single-turnover) in Gegenwart von [γ -³²P]GTP bestimmt.^[23] Die Reaktionsprodukte wurden chromatographisch an Polyethylenimin getrennt und anhand ihrer Radioaktivität quantifiziert. Die Katalysegeschwindigkeiten k_{cat} des Ras-Wildtyps und der Mutante unterscheiden sich nur geringfügig voneinander.^[24] Ihre intrinsischen GTPase-Aktivitäten bleiben bei Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 355 nm (frequenzverdreifachter Neodym-YAG-Laser) unverändert (Tabelle 1).^[25] Im Unterschied zum Ras-Wildtyp weist das modifizierte Protein unter Single-turnover-Bedingungen und in Gegenwart eines 100fachen Überschusses an p120-GAP

keine p120-GAP-vermittelte GTPase-Aktivität auf.^[26] Diese Ergebnisse zeigen, daß die *o*-Nitrobenzylgruppe eine produktive Assoziation von Ras und p120-GAP effizient verhindert.

Bei Bestrahlung zersetzen sich *o*-Nitrobenzylester schnell in die freie Säure und Nitrosobenzaldehyd.^[27] Durch Photolyse des modifizierten Ras-Proteins wurden ca. 50% der GAP-abhängigen GTPase-Aktivität des Wildtyps wiederhergestellt (Tabelle 1).^[25, 26] Die Umwandlung wurde außerdem durch denaturierende Polyacrylamidgel-Elektrophorese des mit [³⁵S]Methionin markierten Proteins verfolgt (Abb. 1). Das modifizierte Protein hat eine etwas geringere elektrophoretische Mobilität als der Wildtyp. Nach der Photolyse zur Entfernung der *o*-Nitrobenzylestergruppe entsteht aus etwa 50% des mutierten Proteins ein Produkt mit der gleichen Mobilität wie die des Ras-WTs. Die Ähnlichkeit bezüglich des Ausmaßes der wiederhergestellten p120-GAP-vermittelten GTPase-Aktivität und des Ausmaßes der photolytischen Umwandlung in ein Produkt mit der gleichen elektrophoretischen Mobilität wie die des Ras-WTs weisen darauf hin, daß

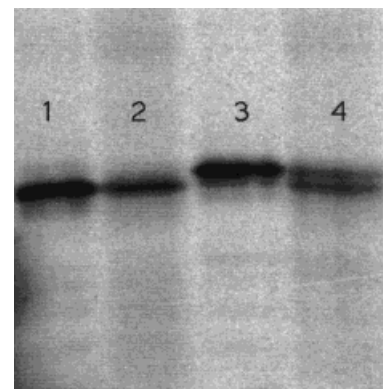


Abb. 1. Autoradiogramm eines SDS-Polyacrylamidgels (16%) mit den gereinigten, [³⁵S]Methionin-markierten Produkten der In-vitro-Translation, WT-Ras und Nb-Asp-Mutante, vor und nach der Bestrahlung. Das modifizierte Protein (Bahn 3) hat eine etwas geringere elektrophoretische Mobilität als der Wildtyp (Bahn 1). Nach der photolytischen Abspaltung der *o*-Nitrobenzylestergruppe weisen etwa 50% der Mutante eine veränderte elektrophoretische Mobilität auf (Bahn 4), während die Mobilität des Wildtyps unverändert bleibt (Bahn 2).

das nichtmodifizierte Protein eine p120-GAP-abhängige GTPase-Aktivität hat. Eine längere Bestrahlung der inaktiven Mutante hatte keine erhöhte Umwandlung in den Ras-WT zur Folge. Dies könnte daran liegen, daß der Asparaginsäurenitrobenzylester mit den im In-vitro-Syntheseansatz vorhandenen Aminosäuren (300 µM) reagiert und dabei eine inaktive Amid-Seitenkette entsteht. Vielleicht wird Ras aber auch durch den als Nebenprodukt der Photolyse entstehenden *o*-Nitrosobenzaldehyd modifiziert.^[28]

Diese Ergebnisse zeigen, daß durch Einführung von Nb-Asp an Position 38 von Ras ein modifiziertes Protein entsteht, das zwar die volle intrinsische Katalyseaktivität aufweist, jedoch nicht an der Signaltransduktion über sein Effektorprotein p120-GAP teilnehmen kann. Nach Bestrahlung der Mutante entsteht daraus wieder das Wildtyp-Protein, und die Fähigkeit zur Wechselwirkung mit dem Effektor ist wiederhergestellt.

Tabelle 1. Intrinsische und p120-GAP-vermittelte GTPase-Aktivitäten des Wildtyps und der Mutante des Ras-Proteins vor und nach der Bestrahlung.

Protein	k_{cat} [$\text{s}^{-1} \times 10^4$] ^[a] (– GAP)	spez. Aktivität		Verhältnis ^[d]
		[% GTP min ⁻¹ × 10 ³] ^[b] (– GAP)	(+GAP) ^[c]	
Nb-Asp ^[e]	1.6 ± 0.02	7.6 ± 0.3	8.0 ± 0.08	1.1
Nb-Asp ^[f]	1.5 ± 0.2	6.9 ± 0.6	24 ± 2	3.5
WT ^[e]	1.7 ± 0.1	7.8 ± 0.2	57 ± 0.4	7.2
WT ^[f]	1.6 ± 0.4	7.2 ± 1	56 ± 3	7.8

[a] Lit. [22, 23]. [b] Die Aktivität wurde als initiale Geschwindigkeit des Umsatzes von GTP zu GDP berechnet. [c] Lit. [25]. [d] Verhältnis der Aktivitäten ohne und mit p120-GAP.^[29] [e] Vor der Bestrahlung. [f] Nach der Bestrahlung.

Eingegangen am 3. Dezember 1997,
veränderte Fassung am 14. April 1998 [Z11227]

Stichwörter: Aminosäuren • Mutagenese • Photochemie • Ras-Proteine • Signaltransduktion

- [1] S. R. Adams, J. P. Y. Kao, G. Gryniewicz, A. Minta, R. Y. Tsien, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 3212–3220; S. R. Adams, J. P. Y. Kao, R. Y. Tsien, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 7957–7968; M. R. Blatt, G. Thiel, D. R. Trentham, *Nature* **1990**, *346*, 766–769; d) A. D. Turner, S. V. Pizzo, G. Rozakis, N. A. Porter, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 244–250; N. A. Porter, K. A. Bush, K. S. Kinter, *J. Photochem. Photobiol. B* **1997**, *38*(1), 61–69; D. Mendel, J. A. Ellman, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 2758–2760.
- [2] G. Marriott, M. Heidecker, *Biochemistry* **1996**, *35*, 3170–3174; C. H. Self, S. Thompson, *Nature Medicine* **1996**, *2*, 817–820.
- [3] L. Weismuller, F. Wittinghofer, *Cell. Signalling* **1994**, *6*, 247–267.
- [4] M. Barbacid, *Annu. Rev. Biochem.* **1987**, *56*, 779–827.
- [5] J. Downward, *Curr. Opin. Genet. Dev.* **1992**, *2*, 13–18.
- [6] H. R. Bourne, D. A. Sanders, F. McCormick, *Nature* **1990**, *348*, 125–132.
- [7] K. Tanaka, M. Nakafuku, T. Satoh, M. S. Marshall, J. B. Gibbs, K. Matsumoto, Y. Kaziro, A. Tohe, *Cell* **1990**, *60*, 803–807; R. Ballester, T. Michaeli, K. Ferguson, H. P. Xu, F. McCormick, M. Wigler, *Cell* **1989**, *59*, 681–686; J. Downward, J. D. Graves, P. H. Warne, S. Rayter, D. A. Cantrell, *Nature* **1990**, *346*, 719–723; K. Zhang, J. E. De Clue, W. C. Vass, A. G. Papageorge, F. McCormick, D. R. Lowy, *Nature* **1990**, *346*, 754–756.
- [8] R. H. Medema, W. L. de Laat, G. A. Martin, F. McCormick, *J. L. Mol. Cell Biol.* **1992**, *12*(8), 3425–3430; D. R. Kaplan, D. K. Morrison, G. Wong, F. McCormick, L. T. Williams, *Cell* **1990**, *61*, 125–133; Y. Kaziro, H. Itoh, T. Kozasa, M. Nakafuku, T. Satoh, *Annu. Rev. Biochem.* **1991**, *60*, 349–400; M. Duchesne, F. Schweighoffer, F. Parker, F. Clerc, Y. Frobert, M. N. Thang, B. Tocque, *Science* **1993**, *259*, 525–528; J. McGlade, B. Brunkhorst, D. Anderson, G. Mbamalu, J. Settleman, S. Dedhar, M. Rozakis-Adcock, L. B. Chen, T. Pawson, *EMBO J.* **1993**, *12*, 3073–3081; G. A. Martin, A. Yatani, R. Clark, L. Conroy, P. Polakis, A. M. Brown, F. McCormick, *Science* **1992**, *255*, 192–194; A. Yatani, K. Okabe, P. Polakis, R. Halenbeck, F. McCormick, A. M. Brown, *Cell* **1990**, *61*, 769–776.
- [9] C. J. Noren, S. J. Anthony-Cahill, D. J. Suich, K. A. Noren, M. C. Griffith, P. G. Schultz, *Nucleic Acids Res.* **1989**, *18*, 83–88; S. A. Robertson, C. J. Noren, S. J. Anthony-Cahill, M. C. Griffith, P. G. Schultz, *Nucleic Acids Res.* **1989**, *17*, 9649–9660; J. A. Ellman, D. Mendel, S. J. Anthony-Cahill, C. J. Noren, P. G. Schultz, *Methods Enzymol.* **1991**, *202*, 301–336; J. S. Thorson, V. W. Cornish, J. E. Barrett, S. T. Cload, Y. Yano, P. G. Schultz, *A Biosynthetic Approach for the Incorporation of Unnatural Amino Acids into Proteins*, Humana Press, Clifton, NJ, im Druck.
- [10] B. M. Willumsen, A. G. Papageorge, H. Kung, E. Bekesi, T. Robins, M. Johnson, W. C. Vass, D. R. Lowy, *Mol. Cell Biol.* **1986**, *6*, 2646–2654; J. C. Stone, W. C. Vass, B. M. Willumsen, D. R. Lowy, *Mol. Cell Biol.* **1988**, *8*, 3565–3569; I. S. Sigal, J. B. Gibbs, J. S. D'Alonzo, E. M. Scolnick, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, *83*, 4725–4729.
- [11] K. Scheffzek, M. R. Ahmadian, W. Kabsch, L. Weismuller, A. Lautwein, F. Shmitz, A. Wittinghofer, *Science* **1997**, *277*, 333–338; I. Schlichting, S. C. Almo, G. Tapp, K. Wilson, K. Petratos, A. Lentfer, A. Wittinghofer, W. Kabsch, E. F. Pai, G. A. Petsko, R. S. Goody, *Nature* **1990**, *345*, 309–315.
- [12] H. R. Bourne, D. A. Sanders, F. McCormick, *Nature* **1991**, *349*, 117–127; C. Cales, J. F. Hancock, C. J. Marshall, A. Hall, *Nature* **1988**, *332*, 548–550.
- [13] M. S. A. Nur-E-Kamal, A. Sizeland, G. D'Abaco, H. Maruta, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 1415–1418; X. F. Zhang, J. Settleman, J. M. Kyriakis, E. Takeuchi-Suzuki, S. J. Elledge, M. S. Marshall, J. T. Bruder, U. R. Rapp, J. Avruch, *Nature* **1993**, *364*, 308–313.
- [14] H. Adari, D. R. Lowy, B. M. Willumsen, C. J. Der, F. McCormick, *Science* **1988**, *240*, 518–521.
- [15] P. H. Warne, P. R. Viciano, J. Downward, *Nature* **1993**, *364*, 352–355.
- [16] P. Rodriguez-Viciano, P. H. Warne, R. Dhand, B. Vanhaesebroeck, I. Gout, M. J. Fry, M. D. Waterfield, J. Downward, *Nature* **1994**, *370*, 527–532.
- [17] Aus der Kristallstruktur ergibt sich, daß ebenso Asp33 modifiziert werden könnte, um die Wechselwirkung von p120-GAP und Ras photoabhängig zu machen. Die In-vitro-Suppression mit Nb-Asp an Position 33 war jedoch weniger effizient (20%) als mit Nb-Asp an Position 38 (60%).
- [18] S. A. Robertson, J. A. Ellman, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 2722–2729; S. T. Cload, D. R. Liu, W. A. Froland, P. G. Schultz, *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 1033–1038.
- [19] Um die TAG-Mutante zu erzeugen, wurde das vollständige *ras*-Gen des Vektors pGATp durch eine Polymerasekettenreaktion (PCR) vervielfältigt (H. Chung, Dissertation, University of California at Berkeley, **1993**). Dabei kam ein 5'-Primer zum Einsatz, der am Startcodon eine Schnittstelle für *Nde*I einfügte. Das vollständige Gen wurde in einen anderen Vektor zwischenklontiert und dann mit *Nde*I/*Hind*III verdaut. Die Schnittstelle für *Hind*III befindet sich innerhalb des *ras*-Gens, so daß man ein verkürztes, aus den ersten 171 Aminosäuren bestehendes Ras-Protein erhält. Das verkürzte *ras*-Gen wurde in den Expressionsvektor pAED4 zwischen die *Nde*-I- und die *Eco*-RI-Schnittstelle inseriert. Der hierzu verwendete *Hind*-III/*Eco*-RI-Linker fügte gleichzeitig einen für sechs Histidine codierenden DNA-Abschnitt (His tag) sowie die Stop-Codons TAA und TGA an.
- [20] J. M. Davey, A. H. Laird, J. S. Morley, *J. Chem. Soc. C* **1966**, 555–566.
- [21] Gemessen durch Quantifizierung des Einbaus von [³⁵S]Methionin in das vollständige Ras-Protein anhand der Radioaktivität.
- [22] E. Hochuli, H. Dobeli, A. Schacher, *J. Chromatogr.* **1987**, *411*, 177–184.
- [23] Zur Bestimmung der intrinsischen GTPase-Aktivität wurden ca. 10 nM WT- oder mutiertes Ras-Protein mit 10 μM [^γ-³²P]GTP (3000 Ci mmol⁻¹, Amersham) bei 4 °C in insgesamt 400 μL einer Lösung aus 50 mM 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethansulfonsäure (HEPES) (pH 7.5), 100 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 10 mM Ethylen-diamintetraacetat (EDTA), 1 mM 1,4-Dithiothreitol (DTT) und 1% Rinderserumalbumin (BSA) inkubiert. Nach 30 min wurde diese Austauschreaktion durch Zugabe von MgCl₂ bis zu einer Endkonzentration von 25 mM abgebrochen und der Enzym-Substrat-Komplex (E·S) durch Reinigung an einer PD10-Säule isoliert. Der gereinigte E·S-Komplex wurde auf unterschiedliche Reaktionsansätze von 150 μL Volumen aufgeteilt, und ribo(r)GTP wurde bis zu einer Endkonzentration von 50 μM zugegeben. Die Reaktionsansätze wurden bei 30 °C inkubiert, und nach unterschiedlichen Zeiten wurden 7.5-μL-Proben entnommen, die mit derselben Menge einer Stop-Lösung (100 μM rGTP, 100 μM rGDP, 250 mM EDTA, 0.5% Natriumdodecylsulfat (SDS)) versetzt wurden. Die Umwandlung von GTP in GDP wurde durch Chromatographie an Polyethylenimin (0.3 M KH₂PO₄, 1 M LiCl₂, pH 3.5) verfolgt.
- [24] Für *k*_{cat}-Berechnungen, die auf der Verfolgung des einmaligen Umsatzes des E·S-Komplexes in Gegenwart von freiem, nichtmarkiertem rGTP im Überschuß basieren, gilt die folgende Beziehung: $[P]/[E \cdot S]_0 = k_{cat}/(k_{cat} + k_{off}) \exp[-(k_{cat} + k_{off})t]$. Hierbei ist [P] die Konzentration des Produkts GDP, *t* die Zeit und *k*_{off} die Geschwindigkeit der Dissoziation von GTP aus dem E·S-Komplex. Diese Beziehung beruht auf folgenden Annahmen: Der E·S-Komplex bildet entweder das Produkt oder zerfällt in freies Enzym und freies Substrat; die beobachtete Reaktion verläuft streng unter einmaligem Umsatz, da das markierte Substrat, nachdem es vom Enzym dissoziiert ist, mit dem im Überschuß vorliegenden unmarkierten Substrat um die Bindungsstelle des Enzyms konkurriert und sich daher wahrscheinlich nicht wieder anlagert. Die Dissoziation des Produkts ist dabei nicht geschwindigkeitsbestimmend, da der E·P-Komplex durch Zugabe der Stop-Lösung zerstört wird.
- [25] Der Wildtyp und das modifizierte Protein wurden bis zu 5 min mit einem Laser (verdreifachte Frequenz, ca. 100 mJ bei 355 nm, nominale Pulsdauer 7 ns; Spectra Physics, Modell GCR-150-10) bestrahlt. Eine längere Photolyse führt nicht zu vermehrter Umsetzung. Die Reaktionslösungen wurden in Quarz-Küvetten bestrahlt und dabei gerührt, um eine gleichmäßige Bestrahlung zu gewährleisten. Um eine Überhitzung zu vermeiden, wurden sie vor der Bestrahlung auf 4 °C gekühlt. 500 μL Reaktionslösung enthielten 10 nM WT- oder modifiziertes Ras-Protein in 50 mM HEPES, (pH 7.5), 1 mM MgCl₂, 200 mM NaCl, 1 mM DTT, 0.1% BSA und 10 μM Semicarbazid·HCl, um das als Nebenprodukt gebildete Nitrosobenzaldehyd abzufangen.
- [26] Der p120-GAP-Assay wurde durch Isolierung des E·S-Komplexes wie in Lit. [23] beschrieben durchgeführt, außer daß ein mehr als 100facher Überschuß von p120-GAP gegenüber Ras nach der Auf-

- teilung des E·S-Komplexes auf getrennte Reaktionsansätze zugegeben wurde. Das p120-GAP-Protein war eine Spende von H. Chung^[19] und wurde durch Überexpression von einem pUC18-Abkömmling erhalten, in dem das Gen für p120-GAP aus Rind unter Kontrolle des *trp*-Promotors enthalten ist: M. S. Marshall, W. S. Hill, A. S. Ng, U. S. Vogel, M. D. Schaber, E. Scolnick, R. A. F. Dixon, I. S. Sigal, J. B. Gibbs, *EMBO J.* **1989**, *8*, 1105–1110.
- [27] H. Schupp, W. K. Wong, W. Schnabel, *J. Photochem.* **1987**, *36*, 85–97.
- [28] Die Entschützung verläuft effizienter, wenn die *o*-Nitrobenzylgruppe an der α -benzyli-schen Position substituiert ist: Bei der Photolyse dieser Verbindungen entstehen als Nebenprodukte die weniger reaktiven Nitrosoketone. Versuche, die Ausbeute der Photolyse durch den Einsatz von β -1-(3,4-Methylenedioxy-6-nitrobenzyl)ethylaspartat zu erhöhen, führten zu einer geringeren Ausbeute an mutiertem Protein.
- [29] Bei vollständiger Sättigung kann p120-GAP die Geschwindigkeit der GTP-Hydrolyse von Ras auf das 10⁵-fache beschleunigen;^[30] die Katalysegeschwindigkeit wird dabei jedoch durch die Verfügbarkeit von Ras limitiert, das in einer Konzentration von ca. 10 nM vorliegt, aber einen K_d -Wert von etwa 17 μ M für die Bindung an p120-GAP aufweist.^[31]
- [30] P. Gideon, J. John, M. Frech, A. Lautwein, R. Clark, J. E. Scheffler, A. Wittinghofer, *Mol. Cell. Biol.* **1992**, *12*, 2050–2056.
- [31] J. F. Eccleston, K. J. M. Moore, L. Morgan, R. H. Skinner, P. N. Lowe, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 27012–27019.