

Eine Phospholipase mit einer neuartigen katalytischen Triade**

Dirk W. Heinz*

Nahezu alle chemischen Reaktionen in lebenden Zellen werden durch Enzyme katalysiert. Die enorme Beschleunigung einer chemischen Reaktion, die unter physiologischen Bedingungen nur sehr langsam oder gar nicht ablaufen würde, hängt in kritischem Maße von der genauen Position bestimmter Aminosäuren im aktiven Zentrum des Enzyms ab. Je nach Art der katalysierten Reaktion werden Enzyme häufig in Familien eingeteilt. So widmet mittlerweile jedes moderne Lehrbuch der Biochemie den Serinproteasen ein Kapitel, da sowohl Struktur als auch Mechanismus vieler dieser Enzyme intensiv untersucht wurden und inzwischen gut verstanden werden. Mitglieder dieser Familie, wie Chymotrypsin, Elastase und Subtilisin, spalten Peptidbindungen in Proteinen durch den nucleophilen Angriff eines aktivierten Serinrestes.

Dieses Serin ist Bestandteil der berühmten katalytischen Triade, eines hochkonservierten Strukturelements, welches erstmals für das aktive Zentrum von Serinproteasen beschrieben wurde. Die Triade besteht aus den Aminosäuren Asparaginsäure, Histidin und Serin, die paarweise über Wasserstoffbrückenbindungen miteinander verbunden sind (Abbildung 1). Im Vergleich zur nichtenzymatischen Hydrolyse von Amidbindungen sorgt diese Triade zusammen mit weiteren

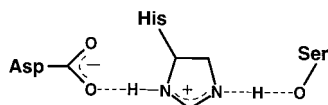


Abbildung 1. Die klassische katalytische Triade der Serinproteasen, die aus Asparaginsäure, Histidin und Serin besteht.

Strukturelementen für eine Beschleunigung der Reaktion um mindestens neun Größenordnungen.^[1] Im Verlauf der Reaktion fungiert das Serin als Nucleophil, wobei es das Carbonyl-Kohlenstoffatom der zu spaltenden Peptidbindung des Substrats angreift. Das Histidin im Zentrum der Triade wirkt als allgemeine Base, indem es das Proton der OH-Gruppe der Serinseitenkette abstrahiert, während das nichtsolvatisierte Aspartat das entstehende Histidin-Imidazoliumion durch Bildung einer Salzbrücke stabilisiert. Als Folge davon wird die Aminofunktion der Abgangsgruppe durch das Histidin protoniert, so daß ein kovalentes Acyl-Enzym-Intermediat entsteht. Das Intermediat wird im zweiten Teil der Reaktion durch ein Wassermolekül hydrolysiert, das durch Wechselwir-

kung mit demselben Histidin aktiviert ist. Ähnliche katalytische Triaden mit einer hohen Konservierung der räumlichen Anordnung der beteiligten Aminosäuren findet man in vielen weiteren Hydrolasen und Esterasen. Darüber hinaus werden aber auch Abweichungen von der klassischen Ser-His-Asp-Triade bei einer wachsenden Zahl hydrolytischer Enzyme beobachtet, wobei Aminosäurevariationen in allen drei Positionen auftreten können. Diese Variationen dienen mit großer Wahrscheinlichkeit der Modulation der katalytischen Aktivität dieser Enzyme.^[2]

In einer kürzlich erschienenen Arbeit beschreiben Kubiak et al. die Entdeckung und Charakterisierung einer neuen und zugleich ungewöhnlichen katalytischen Triade in einer Phosphatidylinosit-spezifischen Phospholipase C (PI-PLC) aus dem Bakterium *Bacillus thuringiensis*.^[3] PI-PLC gehört zur wichtigen Klasse der Phosphodiesterasen, die neben (Desoxy-) ribonucleasen, cAMP- und cGMP-spezifischen Phosphodiesterasen und Restriktionsenzymen auch einige katalytische RNAs (Ribozyme) umfaßt. PI-PLC ist ein ubiquitäres Enzym, das die Spaltung der *sn*-3-Phosphodiesterbindung von Phosphatidylinosit (PI) unter Bildung von lipidlöslichem Diacylglycerin und wasserlöslichem, zyklischem Inosit-1,2-phosphat, das weiter zu Inosit-1-phosphat hydrolysiert werden kann, katalysiert.^[4] In Säugerzellen spielt das Enzym eine zentrale Rolle bei Signaltransduktionsprozessen, während bakterielle PI-PLCs als Virulenzfaktoren bekannt sind. Eine Kristallstrukturanalyse der PI-PLC aus *Bacillus cereus* im Komplex mit dem kompetitiven Inhibitor *myo*-Inosit zeigte, daß der Inhibitor im aktiven Zentrum auf eine ähnliche Weise wie das Substrat bindet (Abbildung 2).^[5]

Anhand der Struktur und unterstützender Daten aus Mutagenesestudien, bei denen einzelne Aminosäuren im aktiven Zentrum gezielt durch andere ersetzt wurden,^[5-7] wurde ein katalytischer Mechanismus postuliert, der stark der allgemeinen Säure-Base-Katalyse der Ribonuclease A ähnelt. Ribonuclease A gilt ebenfalls als Lehrbuchbeispiel für ein strukturell und mechanistisch intensiv untersuchtes Enzym.^[8] Ähnlich wie in Ribonuclease A fungieren in PI-PLC zwei Histidinreste, His32 und His82, als allgemeine Base bzw. Säure (Schema 1). Der erste Reaktionsschritt, eine Umesterung, besteht aus einer S_N2 -Reaktion am Phosphoratom. Dabei abstrahiert His32 das Proton der 2-Hydroxygruppe des Inositstrings und erleichtert damit den nucleophilen Angriff auf das Phosphoratom durch das O2-Atom und somit die Bildung eines pentakovalenten, trigonal-bipyramidalen Übergangszustands. Der Zerfall des Übergangszustands wird durch die Protonierung der Abgangsgruppe Diacylglycerin durch His82 eingeleitet. Das dabei gebildete stabile, zyklische Inosit-1,2-phosphat weist, wie erwartet, eine Inversion der Konfiguration am Phosphoratom auf. Die Rolle von His32 als katalytische Base wird durch Asp274 entscheidend verstärkt. Analog zu den Serinproteasen bilden Asp274, His32 und die 2-Hydroxygruppe des Substrats (oder des Inhibitors *myo*-Inosit) eine „klassische“ katalytische Triade im aktiven

[*] Priv.-Doz. Dr. D. W. Heinz
Abteilung Strukturforschung
Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH
Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig
Fax: (+49) 531-6181-763
E-mail: dih@gbf.de

[**] Ich danke Dr. W.-D. Schubert, Dr. U. Wendt und Prof. O. H. Griffith für hilfreiche Kommentare und Anregungen. Die eigenen Arbeiten über Phospholipasen wurden von der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg und von der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Bonn, (Aktenzeichen He 1852/3-1,3-2,3-3) gefördert.

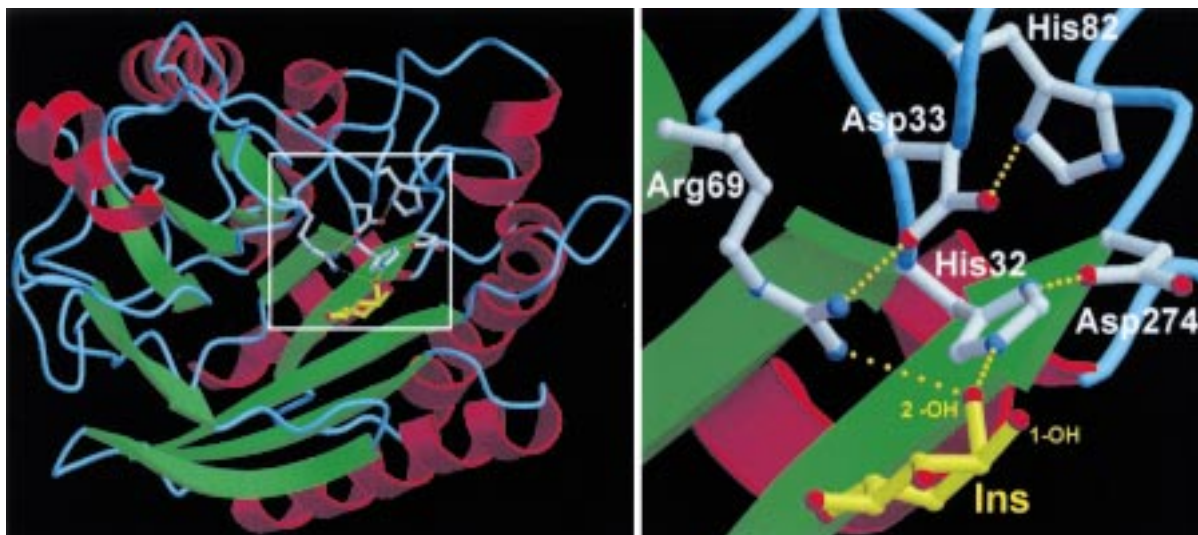
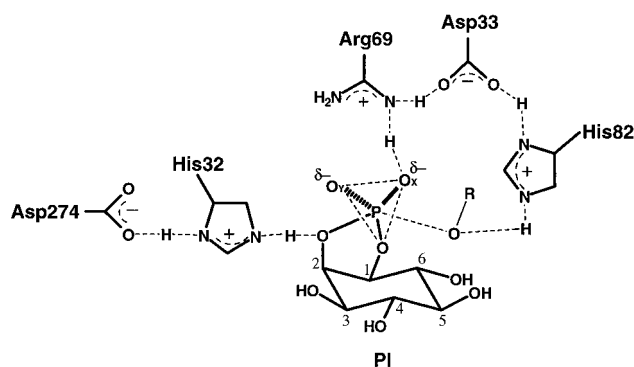


Abbildung 2. Bänderdarstellung der Kristallstruktur der PI-PLC aus *B. cereus* im Komplex mit *myo*-Inositol (linkes Bild). In dieser Abbildung sind α -Helices rot, β -Faltblattstränge grün und Schleifen hellblau gezeichnet. Das aktive Zentrum (weißes Quadrat) ist auf dem rechten Bild vergrößert dargestellt. Gezeigt ist neben den Aminosäureseitenketten, welche die beiden katalytischen Triaden im aktiven Zentrum des Enzyms bilden, auch der gebundene Inhibitor *myo*-Inositol (Ins).



Schema 1. Schematische Darstellung des Übergangszustands bei der Spaltung von PI im aktiven Zentrum von PI-PLC. Gezeigt sind die beiden katalytischen Triaden und ein PI-Molekül ($R = \text{Diacylglycerin}$ für die erste, $R = H$ für die zweite Teilreaktion). Die nichtverbrückenden Sauerstoffatome sind analog zu Schema 2 mit O_x und O_y bezeichnet. (Mit Veränderungen übernommen aus Lit. [3].)

Zentrum von PI-PLC (Abbildung 2).^[5, 6] In einem zweiten und wesentlich langsameren Reaktionsschritt ist die Rolle beider Histidine umgekehrt. Das zyklische Inositolphosphat-Intermediat wird durch ein aktiviertes Wassermolekül, ebenfalls über eine S_N2 -Reaktion, unter erneuter Inversion der Konfiguration zu Inosit-1-phosphat hydrolysiert. Mutagenesestudien und enzymkinetische Experimente unter Verwendung natürlicher und synthetischer Substrate bestätigten die Bedeutung der Aminosäuren His32, Asp33, Arg69, His82 und Asp274 für die Katalyse.^[5–7, 9]

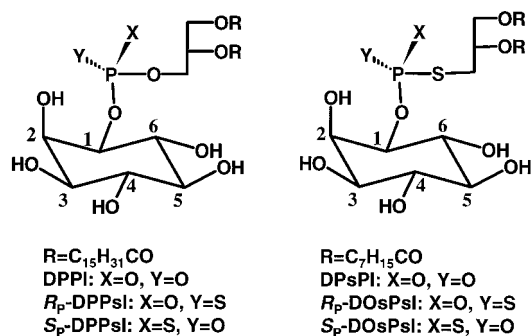
Durch die geschickte Kombination von Mutagenese, enzymkinetischen Messungen und stereochemischer Analyse schwefelhaltiger Substratanaloga haben die Arbeitsgruppen von Tsai und Bruzik in den vergangenen Jahren die Rolle bestimmter Aminosäuren im aktiven Zentrum von PI-PLC systematisch untersucht.^[7, 9, 10] Diese Arbeiten fanden nun in ihrer neuesten Veröffentlichung, in der sie die Existenz einer zusätzlichen und neuartigen katalytischen Triade im aktiven

Zentrum des Enzyms postulieren, einen vorläufigen Höhepunkt.^[3] Die Triade, bestehend aus den Aminosäuren Arg69, Asp33 und His82, ist bifunktionell, da sie sowohl die Phosphatgruppe des Substrates aktiviert als auch die Diacylglycerin-Abgangsgruppe protoniert. Obwohl die genannten Aminosäuren über H-Brücken miteinander verbunden sind, wie aus der Kristallstruktur des Enzyms ersichtlich ist (Abbildung 2), ist unklar, ob diese Wechselwirkungen lediglich der Stabilisierung der Struktur im aktiven Zentrum dienen oder ob sie auch von funktioneller Bedeutung sind.

Diese Frage wurde nun von den Autoren durch Verwendung eines „Matched-mutation“-Ansatzes in eleganter Weise angegangen. Dieser Ansatz umfaßt die gleichzeitige Veränderung von Protein (durch Mutagenese) und Substrat (durch Substitution von Sauerstoff- gegen Schwefelatome), worauf sich eine enzymkinetische Analyse anschließt. Die Substitution verbrückender oder nichtverbrückender Sauerstoffatome in Phosphodiestern gegen Schwefel ist eine etablierte Methode zur Untersuchung des katalytischen Mechanismus von Phosphodiesterasen.^[11] Phosphorothioatdiester sind wegen ihres stereogenen Phosphorzentrums ideale Verbindungen, um den sterischen Verlauf von S_N2 -Reaktionen am Phosphorzentrum zu untersuchen. Wegen des im Vergleich zu Sauerstoff wesentlich geringeren Vermögens von Schwefel, H-Brücken zu bilden, sind Phosphorothioate im allgemeinen reaktionsträger und werden daher auch enzymatisch langsamer gespalten. Im Unterschied dazu sind Phosphorothioate, in denen das verbrückende Sauerstoffatom durch Schwefel ersetzt ist, chemisch reaktiver, was sowohl auf die schwächere P-S-Bindung als auch auf den niedrigeren pK_a -Wert der stabileren Thiolat-Abgangsgruppe zurückzuführen ist. Als Thioeffekt wird das Verhältnis der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten k_O/k_S bezeichnet, wobei sich O und S auf das Substrat bzw. das Thio substrat beziehen. Die Autoren definierten den Thioeffekt von Phosphorothioaten als Typ I, den von Phosphorothiolaten als

Typ II^[10] und verglichen beide Thioeffekte für das Wildtyp-Enzym und dessen Mutanten.

Durch Verwendung einer 1:1-Mischung beider DPPsI-Diastereomere (Schema 2) und ³¹P-NMR-Spektroskopie zur Verfolgung der Reaktion wurde gezeigt, daß das Wildtyp-Enzym eine äußerst hohe Stereoselektivität für das R_p-Stereoisomer aufweist ($k_{R_p}/k_{S_p} = 10^5$). Diese bemerkenswerte



Schema 2. Strukturformeln der Thioanaloga von PI. (Mit Veränderungen übernommen aus Lit. [3].)

Eigenschaft geht durch Mutation von Arg69 größtenteils verloren, selbst wenn man Arg69 konservativ durch die ebenfalls basische Aminosäure Lysin ersetzt ($k_{R_p}/k_{S_p} = 16$). Dies ist hauptsächlich auf eine Aktivitätsabnahme um den Faktor 10^4 gegenüber dem R_p-Isomer zurückzuführen, während die Umsetzung des S_p-Isomers durch die Mutante ähnlich schnell wie beim Wildtyp-Enzym abläuft. Die Autoren ziehen den Schluß, daß die Guanidiniumgruppe von Arg69 spezifisch mit dem *pro-S*-Sauerstoffatom der Phosphatgruppe im Übergangszustand wechselwirkt. Dies führt zu einer Aktivierung der Phosphatgruppe für den nucleophilen Angriff durch die ebenfalls aktivierte 2-OH-Gruppe – ein von den Autoren postulierter direkter Protonentransfer von Arg69 zur Phosphatgruppe ist aber eher unwahrscheinlich. Vielmehr handelt es sich bei der Aktivierung der Phosphatgruppe durch Arg69 um eine Polarisierung über eine H-Brücke.

Die Autoren zeigten außerdem, daß die aktivierende Wirkung von Arg69 eng mit Asp33 verknüpft ist.^[3] So führt die Mutation von Asp33 zu Alanin oder Asparagin, in sehr ähnlicher Weise wie bei der Mutante Arg69 → Lys, zu einem stark verringerten R_p/S_p-Verhältnis, was auf eine funktionell wichtige Wechselwirkung zwischen diesen beiden Aminosäureresten schließen läßt.

Die katalytische Rolle von His82 und Asp33 wurde durch Verwendung des Substrates DPsPI untersucht, das ein Schwefelatom an Stelle des verbrückenden Sauerstoffatoms in der Abgangsgruppe enthält (Schema 2).^[9] Die Freisetzung der Thiolat-Abgangsgruppe wurde mit einem kontinuierlichen Test verfolgt, bei dem das freie Thiolat durch Reaktion mit 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) abgefangen wird. Das Wildtyp-Enzym spaltet DPsPI langsamer als das natürliche Substrat, PI ($k_O/k_S = 24$), vermutlich wegen des Verlusts oder der Schwächung der Abgangsgruppenstabilisierung durch die allgemeine Säure His82. Für die beiden Mutanten Asp33 → Ala und His82 → Ala wurde jeweils ein reverser Thioeffekt

vom Typ II ($k_O/k_S = 0.1$) beobachtet. Die höhere Aktivität beider Mutanten gegenüber dem Substratanalogon mit verbrückendem Schwefelatom wird den Unterschieden in den pK_a-Werten des freien Thiols von DPsPI (ca. 10) und der Alkoxyabgangsgruppe von Diacylglycerin (ca. 16) zugeschrieben. Unter dieser Annahme kompensiert der niedrigere pK_a-Wert des Thiols teilweise den Verlust der allgemeinen Säure in beiden Mutanten. Diese Ergebnisse legen nahe, daß die Diade Asp33-His82 als allgemeine Base in PI-PLC fungiert.

Auf Grund der oben geschilderten gegenseitigen Abhängigkeiten zwischen Arg69, Asp33 und His82 wird postuliert, daß diese Aminosäurereste eine neuartige, bifunktionelle katalytische Triade bilden (Schema 1).^[3] Die entscheidende Frage, ob die Wechselwirkungen zwischen diesen Resten lediglich von struktureller oder in der Tat auch von funktioneller Bedeutung ist, wurde von den Autoren durch Untersuchung der Kommunikation zwischen Arg69 und His82 unter Verwendung der Diastereomere von DOsPsI als Substrat (Schema 2) bearbeitet. Interessanterweise führt die Einführung des verbrückenden Schwefelatoms im Vergleich zu DPPsI zu einer drastischen Abnahme des R_p/S_p-Verhältnisses, und dies fast ausschließlich durch einen Aktivitätsanstieg gegenüber S_p-DOsPsI. Für die Mutante Asp33 → Ala wird dagegen ein ähnliches R_p/S_p-Verhältnis für DPPsI und DOsPsI, d.h. ein ähnlicher Typ-I-Thioeffekt gefunden. Für DPsPI und S_p-DOsPsI wird ein nahezu identischer Typ-II-Thioeffekt beobachtet, was einer Entkopplung beider Thioeffekte für diese Mutante entspricht. Diese Daten sprechen dafür, daß Asp33 eine „Kommunikation“ zwischen dem Typ-I-Thioeffekt (d.h. der Funktion von Arg69) und dem Typ-II-Thioeffekt (d.h. der Funktion von His82) ermöglicht. Während die Daten klare Hinweise auf den postulierten Effekt geben, können kooperative Änderungen der Seitenkettenkonformationen der katalytischen Reste, ausgelöst durch die Bindung von DOsPsI, nicht ausgeschlossen werden. Diese sterischen Effekte könnten beispielsweise zu einer geringfügigen Positionsänderung von Arg69 führen und damit die beobachtete Abnahme der Stereoselektivität verursachen. Für alle PI-Thioanaloga wurden im Vergleich zum natürlichen Substrat (PI) sehr ähnliche Dissoziationskonstanten (ausgedrückt in der Michaelis-Konstante, K_M) ermittelt, so daß auf einen ähnlichen Bindungsmodus zumindest im Grundzustand geschlossen werden kann.^[9] Analog dazu kann die berechnete Frage gestellt werden, ob die Mutationen im aktiven Zentrum möglicherweise zu Änderungen in der Tertiärstruktur des Enzyms führen könnten. Dieser Einwand konnte durch den Vergleich von Circular dichroismus- und NMR-Spektren des Wildtyp-Enzyms und der Mutanten, die sehr ähnlich waren, entkräftet werden.^[9] Diese Daten werden auch durch die Kristallstrukturanalysen von PI-PLC-Varianten mit Mutationen im aktiven Zentrum bekräftigt, die außer dem Aminosäureaustausch eine unveränderte Tertiärstruktur bestätigen.^[6] Es darf daraus geschlossen werden, daß der Aminosäureaustausch im aktiven Zentrum keine globalen Änderungen in der Tertiärstruktur des Enzyms hervorruft.

Im Vergleich zur klassischen katalytischen Triade der Serinproteasen hat die neue Triade völlig andere Eigenschaften. Während erstere ein hochreaktives Nucleophil bildet, fungiert die neue Triade als allgemeine Säure, welche

die Abgangsgruppe und möglicherweise auch ein nichtverbrückendes Sauerstoffatom der Phosphatgruppe protoniert. Innerhalb der Triade wird die Acidität von His82 über Asp33 durch die Lage des Protons von Arg69 beeinflusst und umgekehrt. Bisher wurden jedoch weder Angaben über den pK_A -Wert von Asp33 noch die geometrischen Erfordernisse der neuen Triade gemacht.

Interessant ist auch die Frage, ob die katalytische Triade der bakteriellen PI-PLC auch in den interessanteren PI-PLCs aus Säugerzellen, die eine wichtige Rolle bei vielen Signaltransduktionsprozessen spielen, zu finden ist. Innerhalb der bakteriellen PI-PLCs sind alle katalytisch wichtigen Aminosäuren hochkonserviert. Zwischen bakteriellen und Säuger-PI-PLCs sind lediglich die beiden katalytischen Histidine konserviert, während an den Positionen, die Arg69 und Asp33 entsprechen, Asparaginsäure bzw. Asparagin zu finden sind.^[12] Beide Reste sind Liganden eines fest gebundenen Calciumions, dessen Position mit der Guanidiniumgruppe von Arg69 im bakteriellen Enzym überlagert werden kann. Analog zu Arg69 wird dem Metallion eine Rolle bei der Stabilisierung oder Aktivierung des Übergangszustands zugewiesen.^[13] Die beiden verschiedenen Modi elektrophiler Katalyse (H-Brücke oder Metallion) entwickelten sich sehr wahrscheinlich durch divergente Evolution.

Zusammenfassend bleiben einige wichtige Fragen offen: Nach welchem Mechanismus erfolgt beispielsweise die Katalyse durch die katalytische Triade? Die Protonierung oder Polarisierung eines nichtverbrückenden Sauerstoffatoms durch Arg69 erleichtert sicher entscheidend den nucleophilen Angriff des negativ geladenen O2-Atoms auf das Phosphoratom. Im weiteren Verlauf der Reaktion wäre eine deprotonierte Phosphatgruppe in der Lage, die sich aufbauende negative Ladung der Abgangsgruppe abzustößen. Die zentrale Frage ist jedoch, ob Arg69, Asp33 und His82 in der Tat als katalytische Triade angesehen werden können. In der klassischen katalytischen Triade der Serinproteasen agieren die individuellen Reste auf konzertierte Weise, was sich darin widerspiegelt, daß die Mutation einer einzelnen Aminosäure bei unveränderter „Reststruktur“ die gesamte Triade zerstört.^[1] Obwohl Punktmutationen auch bei der neuen katalytischen Triade zu drastischen Aktivitätsverlusten um Faktoren von 10^3 (für Mutationen von Asp33) bis 10^6 (für Mutationen von Arg69 oder His82) führen,^[6, 7, 9] könnten diese Mutationen dennoch geringfügige sterische Effekte verursachen, die zu Konformationsänderungen der Seitenketten benachbarter Aminosäuren und damit zu einer leicht unterschiedlichen Bindung der konformativ flexiblen Substratanaloga führen könnten. Die Aufklärung von Kristallstrukturen der PI-PLC

im Komplex mit Übergangszustandsanaloga würde sicher einige dieser Fragen beantworten können.

Insgesamt können die oben vorgestellten Ergebnisse als Musterbeispiel für eine erfolgreiche Synergie zwischen der Strukturbiochemie auf der einen und der organischen Synthesechemie und Enzymologie auf der anderen Seite angesehen werden, wobei das Ziel war, neuartige Konzepte der enzymatischen Katalyse ausfindig zu machen. Während die Kristallstrukturanalyse von PI-PLC die notwendige Voraussetzung für die Identifikation katalytisch wichtiger Aminosäuren lieferte und als Grundlage für Mutageneseexperimente diente, blieb die genaue Bedeutung einiger dieser Aminosäuren und besonders ihre Kommunikation während der Katalyse unklar. Der vorgestellte „Matched-mutation“-Ansatz unter Verwendung von PI-PLC-Mutanten und Thioanaloga von PI ist eine sehr gut geeignete Methode zur Beantwortung dieser Fragen. Man darf davon ausgehen, daß sie auch bei anderen Phosphodiesterasen, z.B. Ribonucleasen, angewendet werden könnte, deren Katalysemechanismen auch heutzutage noch stark diskutiert werden.^[14–16]

International Edition: *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 2348–2351

Stichwörter: Enzymkatalyse • Mutagenese • Phospholipasen • Phospholipide • Proteinstrukturen

- [1] P. Carter, J. A. Wells, *Nature* **1988**, 332, 564–568.
- [2] G. Dodson, A. Wlodawer, *Trends Biochem. Sci.* **1998**, 23, 347–352.
- [3] R. J. Kubiak, R. J. Hondal, X. Yue, M.-D. Tsai, K. S. Bruzik, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 488–489.
- [4] K. Bruzik, M.-D. Tsai, *Bioorg. Med. Chem.* **1994**, 2, 49–72.
- [5] D. W. Heinz, M. Ryan, T. L. Bullock, O. H. Griffith, *EMBO J.* **1995**, 14, 3855–3863.
- [6] C. S. Gässler, M. Ryan, T. Liu, O. H. Griffith, D. W. Heinz, *Biochemistry* **1997**, 36, 12802–12813.
- [7] R. J. Hondal, S. R. Riddle, A. V. Kravchuk, Z. Zhao, H. Liao, K. S. Bruzik, M.-D. Tsai, *Biochemistry* **1997**, 36, 6633–6642.
- [8] F. M. Richards, H. W. Wyckoff in *The enzymes* (Hrsg.: P. D. Boyer), Academic Press, New York, **1971**, S. 647–806.
- [9] R. J. Hondal, Z. Zhao, A. V. Kravchuk, H. Liao, S. R. Riddle, X. Yue, K. S. Bruzik, M.-D. Tsai, *Biochemistry* **1998**, 37, 4568–4580.
- [10] R. J. Hondal, K. S. Bruzik, Z. Zhao, M.-D. Tsai, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 5477–5478.
- [11] P. A. Frey, *Adv. Enzymol.* **1989**, 62, 119–201.
- [12] L.-O. Essen, O. Perisic, R. Cheung, M. Katan, R.-L. Williams, *Nature* **1996**, 380, 595–602.
- [13] D. W. Heinz, L.-O. Essen, R.-L. Williams, *J. Mol. Biol.* **1998**, 275, 635–650.
- [14] D. Herschlag, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 11631–11635.
- [15] D. M. Perreault, E. V. Anslyn, *Angew. Chem.* **1997**, 109, 470–490; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 432–450.
- [16] J. Steyaert, *Eur. J. Biochem.* **1997**, 247, 1–11.