

Ein mithilfe synthetischer GCN4-Leucinzipperarrays aufgedecktes Coiled-Coil-Assoziationsnetzwerk**

Michael Portwich, Sandro Keller, Holger M. Strauss, Carsten C. Mahrenholz, Ines Kretzschmar, Achim Kramer und Rudolf Volkmer*

Das α -helicale Coiled-Coil gehört zu den ersten Proteinmotiven, deren Strukturen im Detail aufgeklärt wurden.^[1] Wie bereits 1953 von Crick beschrieben,^[2] besteht ein Coiled-Coil aus mindestens zwei rechtsgängigen amphipathischen α -Helices, die sich umeinander zu einem linksgängigen Supercoil winden und so ihre hydrophoben Oberflächen miteinander in Kontakt bringen (Abbildung 1 a). Coiled-Coils können bis zu Pentameren assoziieren und bilden homo- oder heteromere, parallele oder antiparallele Komplexe mit unterschiedlichen Stöchiometrien.^[1] Ein Charakteristikum aller Coiled-Coils ist das Vorhandensein heptadischer Wiederholungssequenzen **[abcdefg]_i**, wobei *i* die jeweilige Heptade bezeichnet (Abbildung 1 a). Hydrophobe Aminosäuren finden sich normalerweise an den Kernpositionen **a** und **d** und sind für die Faltung entscheidend.^[3] Die Positionen **b**, **c**, **e**, **f** und **g** bilden die Außenseite der Struktur und werden im Allgemeinen durch hydrophile Reste besetzt. Zusätzlich können sich durch geladene Reste inter- und intrahelicale Salzbrücken bilden, die häufig an den Positionen **b**, **c**, **e** und **g** gefunden werden und die Struktur stabilisieren.^[4] Die „Peptid-Klettverschluss“-Hypothese^[5] fasst diese Erkenntnisse zusammen und postuliert, dass 1) **a** und **d** hydrophob, 2) **e** und **g** geladen und 3) **b**, **c** und **f** hydrophil sind. Obgleich Coiled-Coil-Motive mit einem hohen Maß an Sicherheit vorhergesagt werden können,^[6] ist die Vorhersage ihrer Stöchiometrie und räumlichen Struktur noch immer eine schwierige Aufgabe.

[*] Dr. M. Portwich,^[§] C. C. Mahrenholz, I. Kretzschmar, Prof. Dr. A. Kramer, Dr. R. Volkmer
Institut für Medizinische Immunologie
Charité-Universitätsmedizin Berlin
Campus Charité Mitte
Schumannstraße 20–21, 10117 Berlin (Deutschland)
Fax: (+49) 30-450-524942
E-Mail: rve@charite.de
Homepage: <http://www.charite.de/immunologie/research/agsm/index.html>
Dr. S. Keller,^[§] Dr. H. M. Strauss^{[+] [§]}
Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie FMP
Robert-Rössle-Straße 10, 13125 Berlin (Deutschland)

[+] Aktuelle Adresse:
Max-Planck-Institut für Kolloide und Grenzflächen
Am Mühlenberg 1, 14424 Golm (Deutschland)

[§] Diese Autoren haben gleichrangig zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

[**] Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 449, SFB 498), der Schering-Stiftung, der Jürgen-Manchot-Stiftung und dem Universitätsklinikum Charité für die finanzielle Unterstützung.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

Für das Durchmustern von rekombinant hergestellten Coiled-Coil-Komplexen sind unterschiedliche Herangehensweisen möglich.^[7] Die Arbeitsgruppen von Plückthun und Michnick entwickelten einen eindrucksvollen „library-versus-library“-Ansatz zur Analyse von Polypeptiden, die über ein Coiled-Coil-Motiv interagieren.^[8]

Kürzlich wurde eine Glas-Chip-Technologie angewendet, um ein Interaktionsnetzwerk aus bZIP-Transkriptionsfaktoren auf Proteinniveau sichtbar zu machen.^[9] Hier berichten wir über den Einsatz optimierter synthetischer Peptidarrays^[10] mit dem Ziel, Coiled-Coil-Verbindungen auf Aminosäureebene zu analysieren und zu charakterisieren. Unser Ansatz beruht – im Unterschied zu rationalem Design, das meistens kurze Modellpeptide als Anschauungsobjekte nutzt – auf einem in voller Länge vorliegenden, homodimeren Coiled-Coil, dem GCN4-Leucinzipper (Abbildung 1 a).^[11] Die Einflüsse von Aminosäuresubstitutionen auf die Assoziation werden analysiert, und zusätzlich werden die Stöchiometrien mittels biophysikalischer Methoden überprüft. Es ist zu erwarten, dass die Resultate eine bessere und zuverlässige Voraussagbarkeit von Coiled-Coil-Interaktionen ermöglichen werden.

Zuerst synthetisierten wir ein Peptidarray aus 589 Einzelsubstitutionsvarianten des GCN4-Leucinzippers auf Zellulosemembranen^[12] und prüften deren Fähigkeit, an die native GCN4-Wildtypsequenz (**wt**) zu binden (Tabelle 1, Abbildung 1 b). Die Signalintensitäten der einzelnen Spots wurden gemessen und wie beschrieben ausgewertet.^[13,14] Die Austauschvariabilität jeder Sequenzposition wurde berechnet^[14] (Abbildung 1 c) und als niedrig ($V \leq 20\%$), mittel ($20\% \leq V \leq 50\%$) oder hoch ($V \geq 50\%$) eingestuft. Die im Kern liegenden Leucinreste **d_I-d_{IV}** zeigten erwartungsgemäß sehr geringe Variabilität hinsichtlich einer Substitution; eine Ausnahme bildete das durch Alanin ersetzbare Leu12 (**d_{II}**). Dagegen weisen die Kernpositionen **a_I-a_V** mittlere Variabilität auf; diese Klasse ist durch eine erweiterte physikochemische Ähnlichkeit^[14] der austauschbaren Aminosäuren cha-

Tabelle 1: Sequenzen ausgesuchter GCN4-Varianten.

	g a b c d e f g	a b c d e f g	a b c d e f g	a b c d e f g	a b
	I	II	III	IV	
wt^[a]	R M K Q L E D K V E E L L S K N Y H L E N E V A R L K K L V G				
1	R M K Q L E D K V E E L L S K N Y H L E N E <u>K A R L E</u> K L V G				
2	R M K Q L E D K V E E L L S K <u>Y Y H</u> T E N E V A R L K K L V G				
3	R M K Q L E D K V E E L L S K <u>I Y H</u> N E N E V A R L K K L V G				

[a] Die Sequenz entspricht den Resten 249–279 des Proteins GCN4 aus *Saccharomyces cerevisiae*. Informationen zur Synthese können den Hintergrundinformationen, S1 und S2, entnommen werden.

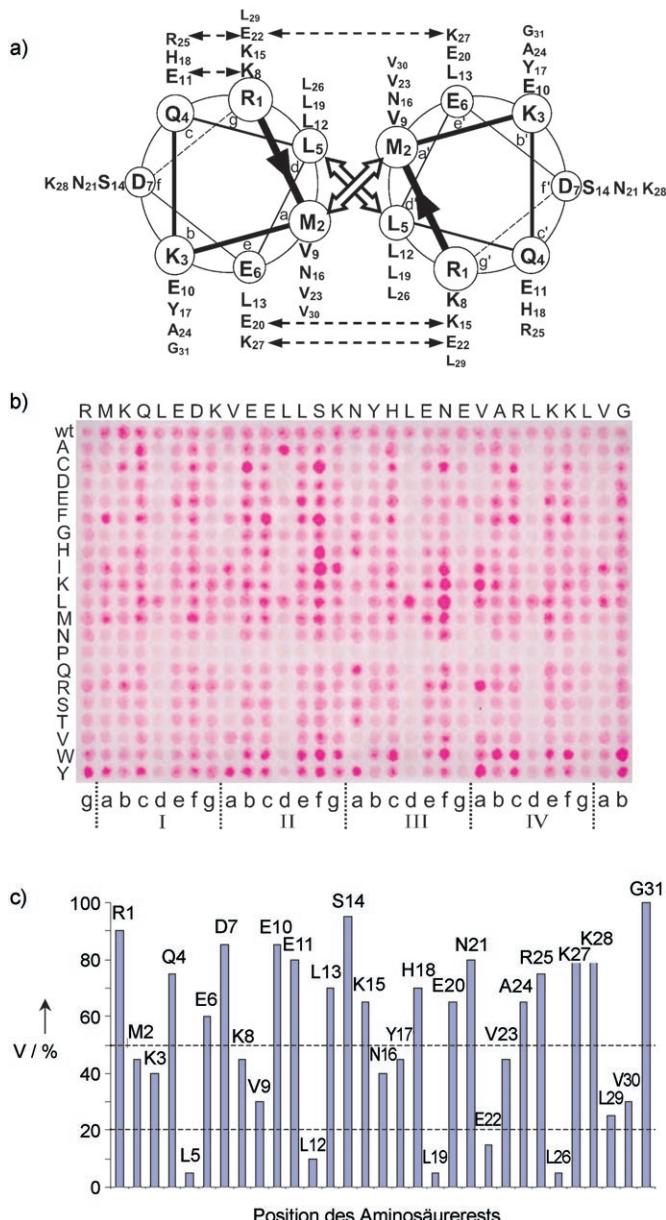


Abbildung 1. a) Das Helixrad-Diagramm mit der Blickrichtung vom N-Terminus aus beschreibt den homodimeren Leucinzipper (Coiled-Coil) des bZIP-Transkriptionsfaktors GCN4 aus Hefe. Diejenigen Reste (Ein-Buchstaben-Code für Aminosäuren), die sich in der Nähe des Betrachters befinden, sind durch Kreise markiert. Sich kreuzende Pfeile zeigen Interaktionen im hydrophoben Kern an. Gestrichelte Pfeile repräsentieren inter- und intrahelikale Salzbrücken, die typisch für diese Struktur sind.^[11] b) Die komplette Einzelpunkt-Substitutionsanalyse der GCN4-Leucinzippersequenz. Rosa Punkte zeigen eine Interaktion zwischen den cellulosegebundenen Varianten und den mit Farbstoff markierten wt-GCN4-Leucinzipperpeptiden an, die mittels Standard-Festphasenpeptidsynthese synthetisiert und N-terminal mit Tetramethylrhodamin (Tamra) markiert wurden (siehe Hintergrundinformationen, S1 und S2). Jeder Punkt entspricht einer Variante, in der ein Baustein der wt-Sequenz, gezeigt in der obersten Reihe, gegen eine der 20 kanonischen Aminosäuren ausgetauscht wurde. Diese werden auf der linken Seite spezifiziert. Die Punkte in der ersten Reihe stellen Wiederholungen der wt-Sequenz dar. c) Prozentuale Häufigkeit der Austauschvariabilität (V) jeder einzelnen Sequenzposition. Alle punktförmigen Signale auf dem in (b) gezeigten Array wurden quantitativ vermessen, und erfolgreiche Austausche (zählbare Bindungsereignisse) wurden bestimmt (siehe Hintergrundinformationen, S4 und S5). V wurde berechnet ($V = \text{Anzahl der Bindungsereignisse} / 20 \times 100^{[14]}$) und gegen die GCN4-Leucinzippersequenz aufgetragen.

arakterisiert. Die dem Lösungsmittel exponierten Positionen **f**, **b** und **c** werden alle als hochvariabel eingestuft, wobei das Muster für die an den Kern angrenzenden Positionen **e** und **g** komplexer ist. Da die Position **e** in hohem Grade variabel ist, vermuteten wir ein ähnliches Verhalten der **g**-Position; wir fanden allerdings, dass die Substitutionsvariabilität der **g**-Position eine deutliche Abhängigkeit von der Heptadenzugehörigkeit zeigt: Sie variiert von niedrig ($g_{III} = \text{Glu}22$) über mittel ($g_I = \text{Lys}8, g_{IV} = \text{Leu}29$) bis hin zu hoch ($g_{II} = \text{Lys}15$). Diese Diskrepanz zwischen den Positionen, die den Kern begrenzen, wurde auch durch die Arbeitsgruppen von Matthews und Vinson beschrieben.^[15]

Es ist bekannt, dass Mehrfachsubstitutionen einen Wechsel von einer dimeren Coiled-Coil-Struktur zu einer trimeren oder tetrameren Struktur bewirken können.^[3a, 16] Daher erweiterten wir den Peptidarray-Ansatz um Doppelsubstitutionsanalysen, wobei wir uns auf die Positionen in Kernnähe konzentrierten (siehe Hintergrundinformationen, Tabelle S4.1). Die Synthese aller dieser Doppelsubstitutionsvarianten der **a/d**-, **a/e**- und **d/g**-Positionen des GCN4-Leucinzipper ergab einen Peptidarray mit 4320 Varianten, die auf ihre Bindungseigenschaften zur nativen Sequenz des GCN4-wt untersucht wurden (Abbildung 2a,b). Insgesamt wurden 933 heteromere Assoziationsereignisse beobachtet, die in abstrahierter Form in Abbildung 2c dargestellt sind. In allen Doppelsubstitutionsfällen zeichnet sich Heptade I durch die höchste Substitutionstoleranz aus, wohingegen die Toleranzreihenfolge der Heptaden II–IV für die einzelnen Doppelsubstitutionen unterschiedlich ist (I > III > II > IV für **a/d**, I > III > IV > II für **a/e** und I > II > III > IV für **d/g**). Da die Positionen **a** und **e** als moderat bzw. hoch variabel erkannt wurden (Abbildung 1c), war zu erwarten, dass auch die Doppelsubstitutionen **a/e** die höchste Zahl an Assoziationsereignissen aufweisen. Dass sich diese Erwartung erfüllte (Abbildung 2c), impliziert ein additives Verhalten der Positionen **a** und **e** im Falle des gleichzeitigen Austausches. Der **d/g**-Ersatz wurde überraschenderweise ebenso schlecht toleriert wie die Doppelsubstitution **a/d**. Dies lässt darauf schließen, dass außer den allgemein bekannten Kernpositionen **a** und **d** auch der Kern-angrenzenden Position **g** eine wichtige Rolle bei der Bildung von Coiled-Coil-Domänen zukommt. Der besondere Status der Position **g**, der sich bereits bei den Einfachsubstitutionen angedeutet hatte, konnte also in den Doppelsubstitutionsexperimenten bestätigt werden.

Um zu untersuchen, ob vorteilhafte oder ungünstige Paarungen existieren, unterteilten wir die Aminosäuren in zwei Gruppen: in einen hydrophilen Satz (ξ) aus Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, His, Lys, Ser und Thr und in einen hydrophoben Satz (Φ) aus Ala, Gly, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Trp, Val und Tyr. Anschließend analysierten wir, in welchem Ausmaß die einzelnen Heptaden der GCN4-Leucinzippersequenz

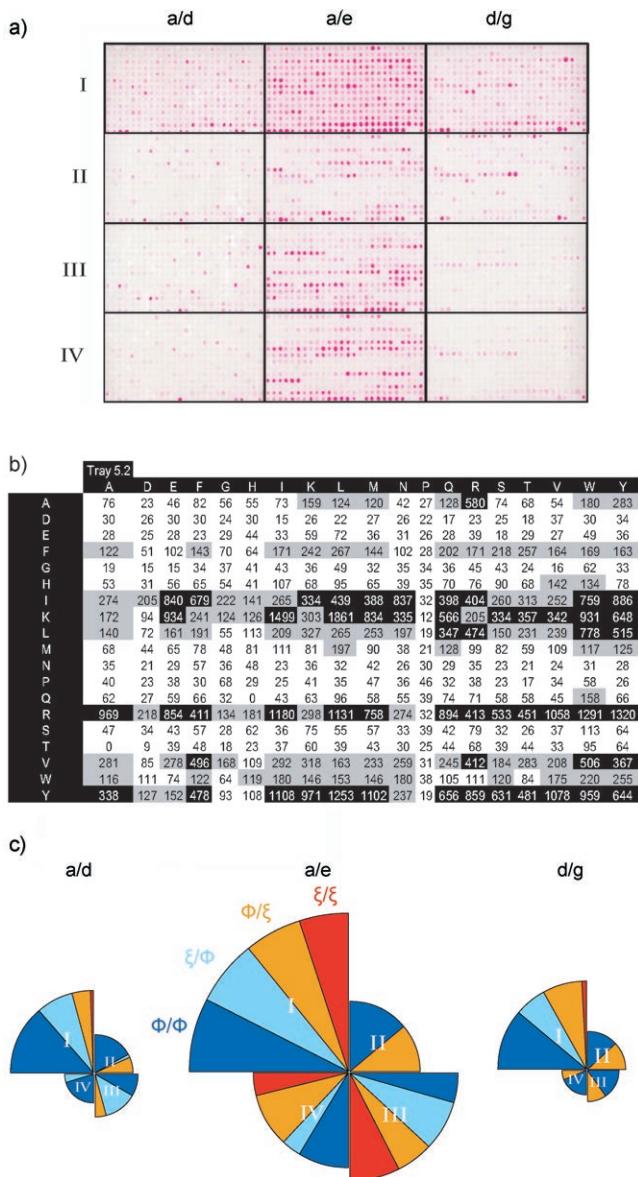


Abbildung 2. a) Ein synthetischer Peptidarray, der alle GCN4-Leucinzippersequenzen enthält, die durch Doppelsubstitutionen von zwei Positionen durch alle kanonischen Aminosäuren (außer Cys) in den Heptadenpositionen **a/d**, **a/e** und **d/g** der Heptaden I–IV erzeugt wurden. Aus praktischen Gründen wies jede Zusammenstellung 26×14 Syntheseorte auf, was die Einführung von zusätzlichen Kontrollen ermöglichte. Jeder farbige Punkt repräsentiert eine Variante, die heterospezifisch mit dem N-terminal mit Tamra markierten Wildtyp-Peptid assoziiert ist (siehe Hintergrundinformationen, S2). b) Doppelsubstitutionen der Positionen **a_{IV}/e_{IV}** (V23/K27). Die Arrays wurden mithilfe eines Lumi-Imagers analysiert, und die Signalintensitäten wurden in „Boehringer light units“ (BLUs) übersetzt, tabelliert und für eine bessere Auswertbarkeit in Graustufen überführt (siehe Hintergrundinformationen, S4 und S5). Einzelne Reihen spiegeln die Position **a_{IV}** wider, Spalten die Position **e_{IV}**. Beide wurden mit den 19 gezeigten Aminosäuren getestet. Graue und schwarze Zellen zeigen assoziierende bzw. stark assoziierende Varianten. Alle Tabellen finden sich in den Hintergrundinformationen, S5. c) Kreisdiagramme der **a/d**-, **a/e**- und **d/g**-Substitutionen und ein Überblick der in (a) zu beobachtenden Heteroassoziationen. Jedes Diagramm zeigt einen Doppelsubstitutionstypus für alle vier Heptaden, dargestellt als Viertel I–IV. Der Radius eines Viertels korreliert mit der Anzahl möglicher Substitutionen in der entsprechenden Heptade. Die Oberfläche jeder Scheibe ist als Funktion der Anzahl von Substitutionen skaliert, die zusätzlich als hydrophob/hydrophob (Φ/Φ ; dunkelblau), hydrophil/hydrophob (ξ/Φ ; hellblau), hydrophob/hydrophil (Φ/ξ ; orange) oder hydrophil/hydrophil (ξ/ξ ; rot) gruppiert wurden.

Kombinationen aus Φ/Φ -, ξ/Φ -, Φ/ξ - und ξ/ξ -Substitutionen ermöglichen. Die Ergebnisse sind als farbige Segmente in Abbildung 2c dargestellt. Im Falle der **a/e**-Doppelauftausche sind alle Kombinationen zulässig, mit Ausnahme der zweiten Heptade, die nur Φ/Φ - und Φ/ξ -Substitutionen erlaubt. Im Falle der **a/d**- und **d/g**-Substitutionen wurden nur sehr wenige hydrophile Kombinationen (ξ/ξ) gefunden, die zudem auf die erste Heptade beschränkt blieben. Überraschenderweise war zu beobachten, dass Φ/ξ -Substitutionen in den Positionen **a/d** erlaubt waren. Mit Ausnahme der vierten Heptade war es überall möglich, die hydrophobe Aminosäure an Position **d** durch eine hydrophile zu ersetzen, wenn gleichzeitig in Position **a** eine hydrophobe Aminosäure eingeführt wurde. In den Fällen der **d/g**-Doppelsubstitutionen konnte kein vergleichbarer Effekt beobachtet werden: Mit Ausnahme der ersten Heptade wurde gefunden, dass Position **d** nur durch eine hydrophobe Aminosäure ersetzt werden kann, und zwar unabhängig von den Substitutionsverhältnissen an Position **g**. Interessanterweise scheint die vierte Heptade – besonders bei den **a/d**- und **d/g**-Paarungen – entscheidenden Einfluss auf das Assoziationsverhalten zu haben.

Insgesamt beobachteten wir drei Substitutionseffekte: Erstens wurden etliche Kombinationen von vorher tolerierten Einzelmutationen (Abbildung 1b) gleichfalls in den doppelt substituierten Varianten akzeptiert (Additionseffekt). Beispielsweise enthält Variante **1** an Position **a_{IV}** ein basisches Lys anstelle des ursprünglichen Val und gleichzeitig an Position **e_{IV}** ein saures Glu anstelle eines Lys (Tabelle 1). Zweitens wurden einige der vorher nicht tolerierten Substitutionen akzeptiert, wenn sie gleichzeitig mit einer zuvor tolerierten Substitution kombiniert wurden (Übergangseffekt). So wurde in Variante **2** ein hydrophiles Thr an Position **d_{III}** anstatt des normalerweise sehr empfindlichen Leu akzeptiert, wenn sich gleichzeitig ein Tyr in räumlicher Nähe an Position **a_{III}** befand. Drittens wurde beobachtet, dass einige vorher nicht tolerierte Einzelsubstitutionen toleriert wurden, wenn sie gleichzeitig in Kombination in der GCN4-Sequenz aufraten (Umschwungeffekt). Zum Beispiel enthält die Variante **3** Ile an Position **a_{III}** und Asn an Position **d_{III}**, obwohl keine dieser beiden Substitutionen toleriert wurde, wenn sie alleine auftrat (Abbildung 1b).

Die beschriebenen Peptidarray-Experimente eignen sich insbesondere zur Detektion heterospezifischer Assoziationen, weshalb wir für die Untersuchung der homospezifischen Interaktionen der GCN4-Varianten einen anderen Ansatz wählten. Hierfür wurden die synthetischen GCN4-Varianten **1–3** jeweils als Triplikat auf Zellulose-Membranen immobilisiert (siehe Hintergrundinformationen, S3).^[17] Je ein Array wurde anschließend mit einer der Varianten auf Assoziation getestet, wobei sich ein Muster von homo- und heteromeren Assoziationen ergab (Abbildung 3). Die Variante **1** zeigte keine

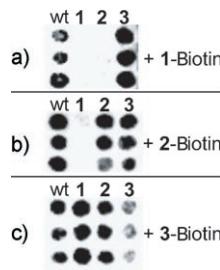


Abbildung 3. Arrayanalyse der homo- und heterospezifischen Assoziationen der GCN4-Leucinzippervarianten **1–3** (Tabelle 1). Auf einer Zellulosemembran wurden mittels Immobilisierung der synthetischen Peptide **wt** und **1–3** drei identische Arrays a)–c) hergestellt (siehe Hintergrundinformationen, S1 und S3). Jedes Array enthielt die Varianten **1–3** in dreifacher Ausfertigung und als Kontrolle den nativen GCN4-Leucinzipper **wt**. Die Arrays wurden mit je einer der biotinylierten Varianten **1–3** auf Interaktion getestet (rechts gezeigt), wobei die Assoziationsereignisse über Inkubation mit peroxidasemarkiertem Streptavidin visualisiert wurden (siehe Hintergrundinformationen, S2 und S4).

Tendenz zur homospezifischen Assoziation, wohingegen **2** und **3** deutlich homoassoziierten. Weiterhin wurden heterospezifische Assoziationen für die Varianten **2** und **3** beobachtet, während **1** nur mit **3** heterospezifisch assoziierte. Durch Circulardichroismus-Spektroskopie wurde der Coiled-Coil-Charakter dieser Assoziationen bestätigt, der sich in einer Steigerung der Helizität nach Mischung zweier assoziierender Varianten ausdrückte (siehe Hintergrundinformationen, S6).

Für die Charakterisierung der homospezifischen Assoziationsprozesse wurde analytische Ultrazentrifugation eingesetzt. Sowohl **2** (Abbildung 4a) als auch **3** ergaben stabile homotrimere Strukturen (als **2₃** und **3₃** bezeichnet), während **1** hauptsächlich monomer vorlag (siehe Hintergrundinformationen, S7). Isotherme Titrationskalorimetrie gab einen tieferen Einblick in die heterospezifischen Assoziationsprozesse. Nach Mischen reorganisierten sich **2₃** und **3₃** zu einem heteromeren Coiled-Coil mit einer 1:1-Stöchiometrie (Abbildung 4b und Hintergrundinformationen, S7). Das ursprüngliche Monomer **1** bildete mit **3₃** ebenfalls einen 1:1-Komplex; hingegen wurde keine heterospezifische Interaktion zwischen **1** und **2₃** beobachtet. Weitere Ultrazentrifugationsexperimente ergaben, dass alle gebildeten heteromeren Komplexe als Dimere vorlagen, und bestätigten zudem die Abwesenheit einer Heteroassoziation zwischen den Varianten **1** und **2** (siehe Hintergrundinformationen, S7). Abbildung 4c fasst alle Interaktionen und Stöchiometrien der durch die drei Varianten gebildeten Coiled-Coil-Strukturen zusammen.

Die vorgestellten synthetischen Peptidarrays eignen sich zur Untersuchung von Coiled-Coil-Assoziationen, lassen jedoch keine Aussagen über Stöchiometrie und Topologie der Coiled-Coil-Strukturen zu. Unsere Experimente führen zu einer Neubewertung der Heptadenposition **g**. Das Verhalten von **g** gegenüber einem Austausch zeigt eine deutlich höhere Empfindlichkeit als das der formal gleichwertigen Position **e**. Die simultanen Doppelsubstitutionen können einen Addi-

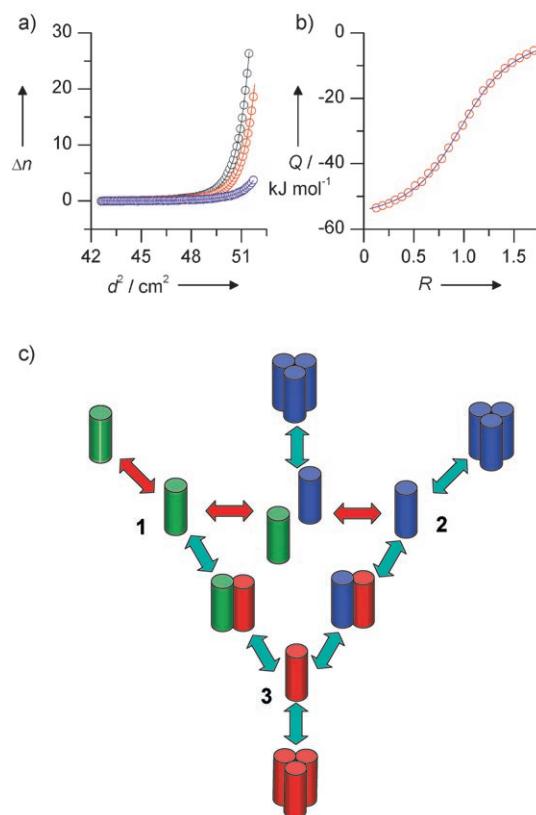


Abbildung 4. a) Untersuchung zur Homoassoziation von Variante **2** durch analytische Ultrazentrifugation. Einzelne Peptidproben mit Konzentrationen von 3 mg mL^{-1} (schwarze Kreise), 1.5 mg mL^{-1} (rote Kreise) und 0.3 mg mL^{-1} (blaue Kreise) ergaben die lokalen Unterschiede im Brechungsindex Δn als Funktion des quadrierten Abstands vom Rotormittelpunkt (d^2) im chemischen und Sedimentationsgleichgewicht bei 50 krpm. Der Übersichtlichkeit halber ist lediglich jeder zehnte Datenpunkt gezeigt. Die besten Kurvenanpassungen (durchgezogene Linien) wurden für ein nichtideales Monomer-Dimer-Trimer-Modell erhalten (siehe Hintergrundinformationen, S7). b) Heteroassoziation der Varianten **2** und **3**, untersucht durch isotherme Titrationskalorimetrie. Proben (10 μL) einer 1.08 mM Lösung von **3** wurden bei 25°C in eine $124 \mu\text{M}$ Lösung von **2** injiziert. Die beste Kurvenanpassung (blaue Linie) an die normierten Reaktionswärmen Q (rote Kreise) ergab eine Assoziationskonstante von $1.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ bei einer Stöchiometrie von 1:1. R ist das molare Verhältnis von **3** zu **2**. c) Netzwerk der Assoziationen zwischen den freien Varianten **1–3**, das sich aus den biophysikalischen Experimenten **a** und **b** ergibt (siehe Hintergrundinformationen, S7).

tions-, Übergangs- oder Umschwungeffekt bewirken, was uns ermöglichte, ein aus drei Sequenzvarianten des GCN4-Leucinzipper bestehendes Interaktionsnetzwerk vorzuschlagen. Dieses setzt sich aus einem helicalen Monomer sowie zwei homotrimeren und zwei heterodimeren Coiled-Coil-Strukturen zusammen. Die Positionen **a_{III}** und **d_{III}** fungieren als Schalter für den Übergang zwischen dem nativ homodimären Coiled-Coil und homotrimären Strukturen. Demnach kann die native Funktion des GCN4-Leucinzipper, also die Bildung eines homodimären Proteins, durch lediglich zwei Substitutionen fundamental verändert werden. Es ist denkbar, dass es diese supramolekulare Flexibilität ist, die das Coiled-

Coil-Motiv zu einem so vielgestaltigen Akteur in der Natur macht.

Eingegangen am 9. August 2006
Online veröffentlicht am 9. Januar 2007

Stichwörter: Helicale Strukturen · Peptidarrays · Peptide · Proteinstrukturen · Spot-Synthese

-
- [1] a) J. M. Mason, K. M. Arndt, *ChemBioChem* **2004**, 5, 170; b) A. N. Lupas, M. Gruber, *Adv. Protein Chem.* **2005**, 70, 37.
 - [2] F. H. S. Crick, *Acta Crystallogr.* **1953**, 6, 689.
 - [3] a) P. B. Harbury, T. Zhang, P. S. Kim, T. Alber, *Science* **1993**, 262, 1401; b) P. B. Harbury, P. S. Kim, T. Alber, *Nature* **1994**, 371, 80; c) D. L. Akey, V. N. Malashkevich, P. S. Kim, *Biochemistry* **2001**, 40, 6352; d) B. Tripet, K. Wagschal, P. Lavigne, C. T. Mant, R. S. Hodges, *J. Mol. Biol.* **2000**, 300, 377.
 - [4] a) N. E. Zhou, C. M. Kay, R. S. Hodges, *J. Mol. Biol.* **1994**, 237, 500; b) D. Krylov, I. Mikhailenko, C. Vinson, *EMBO J.* **1994**, 13, 2849; c) W. D. Kohn, C. M. Kay R. S. Hodges, *J. Mol. Biol.* **1998**, 283, 993; d) R. A. Kammerer, D. Kostrewa, P. Progias, S. Honnappa, D. Avila, A. Lustig, F. K. Winkler, J. Pieters, M. O. Steinmetz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, 102, 13891.
 - [5] E. K. O'Shea, K. J. Lumb, P. S. Kim, *Curr. Biol.* **1993**, 3, 658.
 - [6] a) MULTICOIL: E. Wolf, P. S. Kim, B. Berger, *Protein Sci.* **1997**, 6, 1179; b) SOCKET: J. Walshaw, D. N. Woolfson, *J. Mol. Biol.* **2001**, 307, 1427; c) COILS: A. Lupas, M. van Dyke, J. Stock, *Science* **1991**, 252, 1162; d) PAIRCOIL: B. Berger, D. B. Wilson, E. Wolf, T. Tonchev, M. Milla, P. S. Kim, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, 92, 8259; e) J. M. Mason, M. A. Schmitz, K. M. Müller, K. M. Arndt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, 103, 8989.
 - [7] J. C. Hu, E. K. O'Shea, P. S. Kim, R. T. Sauer, *Science* **1990**, 250, 1400.
 - [8] J. N. Pelletier, K. M. Arndt, A. Plückthun, S. W. Michnick, *Nat. Biotechnol.* **1999**, 17, 683.
 - [9] J. R. Newman, A. E. Keating, *Science* **2003**, 300, 2097.
 - [10] R. Frank, *J. Immunol. Methods* **2002**, 267, 13.
 - [11] E. K. O'Shea, J. D. Klemm, P. S. Kim, T. Albert, *Science* **1991**, 254, 539.
 - [12] Details zur Synthese und Reinheit von Spot-synthetisierten, an Zellulosemembranen gebundenen Peptidarrays werden in den Hintergrundinformationen, S1, näher erläutert.
 - [13] A. A. Weiser, M. Or-Guil, V. Tapia, A. Leichsenring, J. Schuchhardt, C. Frömmel, R. Volkmer-Engert, *Anal. Biochem.* **2005**, 342, 300.
 - [14] J. Przdezdiak, S. Tremmel, I. Kretzschmar, M. Beyermann, M. Bienert, R. Volkmer-Engert, *ChemBioChem* **2006**, 7, 780.
 - [15] a) B. Ibarra-Molero, J. A. Zitzewitz, C. R. Matthews, *J. Mol. Biol.* **2004**, 336, 989; b) C. Vinson, A. Acharya, E. J. Taparowsky, *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, 1759, 4.
 - [16] X. Zeng, H. Zhu, H. A. Lashuel, J. C. Hu, *Protein Sci.* **1997**, 6, 2218.
 - [17] H. K. Rau, N. DeJonge, W. Haehnel, *Angew. Chem.* **2000**, 112, 256; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 250.