

Exogene Wirkstoffe zur Erkennung von Transmembrandomänen von Proteinen

Hang Yin*

Inhibitoren · Membranproteine · Protein-Protein-Wechselwirkungen · Transmembrandomänen · Wirkstoffentwicklung

Ungefähr ein Drittel aller im menschlichen Genom codierten Proteine sind Membranproteine. Funktion und Struktur ihrer Transmembrandomänen sind weitaus weniger gut verstanden als die der wasserlöslichen Regionen. Die größte Hürde bei der Untersuchung dieser Domänen ist der Mangel an geeigneten exogenen Substanzen, die als spezifisch bindende Sonden eingesetzt werden könnten. Trotz dieser Schwierigkeiten ist es in jüngster Zeit mehrfach gelungen, die Transmembrandomänen verschiedener Membranproteine gezielt anzusteuern. In biophysikalischen Modellsystemen, bakteriellen Membranen und Säugerzellen konnten hohe Affinitäten und Selektivitäten erzielt werden.

1. Einleitung

Membranproteine sind an nahezu allen Vorgängen der Zellbiologie und -physiologie beteiligt,^[1] und über 60 % der aktuell am Markt befindlichen Pharmazeutika wirken an Membranproteinen. Membranproteine sind durch Transmembrandomänen (TMs) mit überwiegend α -helicaler Sekundärstruktur in der Membran verankert.^[2] Allerdings sind die Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen den Transmembranhelices bislang nur wenig verstanden, da es an molekularen Sonden von ausreichender Affinität und Spezifität fehlt. Konventionelle Sondenmoleküle, wie sie bei der Untersuchung wasserlöslicher Proteine zum Einsatz kommen (z.B. Antikörper), können in Transmembranregionen nicht angewendet werden. Daher besteht in der Molekularbiologie ein großes Interesse an der Entwicklung endogener oder exogener Sonden, mit denen Strukturen und Prozesse wie die molekulare Erkennung in Membranen, die Faltung von Membranproteinen, die zelluläre Signaltransduktion, Lipid-Rafts oder Protein-Lipid-Wechselwirkungen untersucht werden können. Dieser Kurzaufsatz konzentriert sich auf die

Entwicklung exogener Wirkstoffe zur Untersuchung von Transmembrandomänen.

2. Eigenschaften von Transmembranregionen in Proteinen

Die Zellmembran, auch Plasmamembran genannt, ist eine semipermeable Lipiddoppelschicht, die Bestandteil aller lebenden Zellen ist. Sie dient zur Verankerung des intrazellulären Zytoskeletts und, sofern vorhanden, der Zellwand. Die Zellmembran enthält eine Vielfalt biologischer Moleküle, vor allem Proteine und Lipide (Abbildung 1), die an einer unermesslichen Zahl zellulärer Prozesse beteiligt sind.^[3]

Unsere Modellvorstellungen der zellulären Membran haben sich in den letzten zehn Jahren stark verändert. Fortschritte im Verständnis der zellulären Membranstrukturen und der molekularen Erkennungsmechanismen in der Membranumgebung haben wichtige Erkenntnisse geliefert, die die Entwicklung von Wirkstoffen ermöglicht haben, die spezifisch an Transmembrandomänen ansetzen (TMD-Agentien). Es ist allgemein akzeptiert, dass die Zellmembran ein unsymmetrisches, komplexes und dynamisches System ist, das durch die Membranoberflächen, Kopfgruppenregionen und Phospholipidketten seine charakteristische Eigenschaften erhält. Hinzu kommen integrale Proteine, die Eigenschaften wie die Dicke, Fluidität/Steifigkeit, Oberflächenspannung und Krümmung modulieren. Transmembrandomänen weisen sehr viel mehr Unterscheidungsmerkmale auf als die wasserlöslichen Regionen, die an anderer Stelle bereits umfassend diskutiert wurden.^[4,5] Im Folgenden betrachten wir ei-

[*] Prof. Dr. H. Yin
Department of Chemistry and Biochemistry
University of Colorado at Boulder
215 UCB, Boulder, CO 80309-0215 (USA)
Fax: (+1) 303-492-5894
E-Mail: hang.yin@colorado.edu
Homepage: <http://www.colorado.edu/chem/yinlab/>

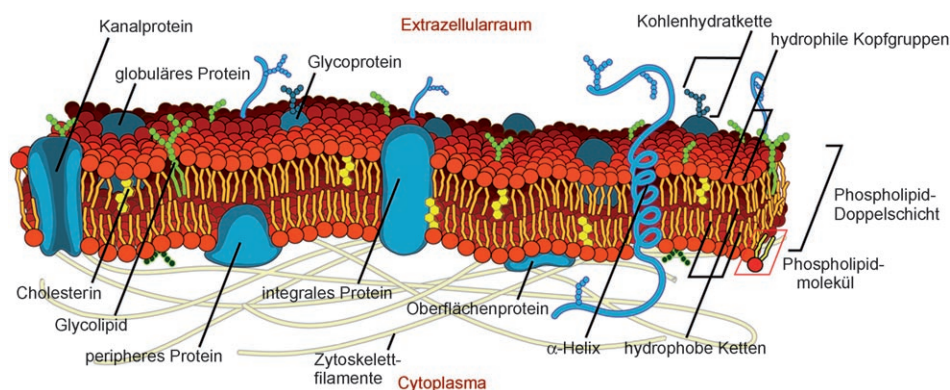


Abbildung 1. Aufbau einer Zellmembran mit den in der Phospholipiddoppelschicht eingebetteten Membranproteinen (Wiedergabe aus <http://de.wikipedia.org/> mit Genehmigung des Autors).

nige Eigenschaften, die beim Entwurf exogener TMD-Agentien entscheidend zu beachten sind.

2.1. Membrandicke

In den meisten Fällen wird angenommen, dass die Dicke einer zellulären Membran der Länge der Transmembrandomänen angepasst ist, weil sowohl der Kontakt hydrophober Regionen mit Wasser als auch der Einschluss hydrophiler Abschnitte im aliphatischen Kern der Lipiddoppelschicht energetisch ungünstig ist.^[6] Um ein geeignetes Modell zu etablieren, das zum Entwurf von Membranproteinen dienen kann, benötigt man gute Abschätzungen der Membrandicke – Literaturwerte schwanken jedoch zwischen 30 und 100 Å.^[3,7] In früheren Studien wurden Phospholipid-Modelle verwendet, um den Einfluss von Cholesterin auf die Dicke der Doppelschicht zu bestimmen;^[8] dies stellt jedoch eine starke Vereinfachung dar. Durch Röntgenstreuung in Lösung (solution X-ray scattering, SXS) untersuchten Engelman und Mitarbeiter den Einfluss von Membranproteinen und Cholesterin auf die Membrandicke von Membranfraktionen aus Ratten-Hepatozyten und *Escherichia coli*.^[9] Die SXS-Technik misst hierbei den Abstand zwischen den elektronenreichen Phosphatgruppen auf beiden Seiten der Doppelschicht. Die Doppelschichtdicken von Membranen des endoplasmatischen Retikulums (ER) und des Golgi-Apparats sowie von basolateralen und apikalen Plasmamembranen (gewonnen

aus Ratten-Hepatozyten) wurden zu (37.5 ± 0.4) , (39.5 ± 0.4) , (35.6 ± 0.6) bzw. (42.5 ± 0.3) Å bestimmt. Interessant ist, dass das Entfernen von 70–90 % des Cholesterins aus den Membranen nur vernachlässigbare Auswirkungen auf die Dicke hatte (< 1 Å), wohingegen ein Entfernen der Membranproteine zu einer Verbreiterung oder Verschmälerung der Membran um 4–5 Å führte. Die Ergebnisse belegen, dass die Hypothese, Cholesterin beeinflusse generell die Dicke biologischer Membranen, nicht stimmt – wenngleich ein lokaler Einfluss durchaus auftreten kann. Die Autoren schlugen ein modifiziertes Modell biologischer Membranen vor, demzufolge Lipidkomponenten und Proteine nicht zwangsläufig aufeinander abgestimmt sind, sodass sich die Membran nicht im energetischen Minimum befindet und auf diese Weise erst Prozesse wie Membranfusion und Proteininsertion ermöglicht.

2.2. Wichtige Struktur motive

Man unterscheidet zwei Hauptklassen von Transmembrandomänen: solche mit α -Helices und solche mit β -Fässern als Hauptsekundärstrukturen.^[10] Gemeinsam ist beiden Klassen, dass alle Wasserstoffbrückendonoren und -akzeptoren des Polypeptidrückgrats gesättigt und im Protein eingebettet vorliegen, während unpolare Seitenketten in die Membran ragen. Der α -helicale Typ ist verbreiteter und kommt in Zytoplasmamembranen vor, wogegen β -Fass-Strukturen gewöhnlich in Porinen und anderen transmembranären Proteinen in der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien, Mitochondrien und Chloroplasten vorzufinden sind.^[3]

Seit langem weiß man, dass spezielle Sequenzmotive in Transmembranregionen von Proteinen entscheidend zur Helix-Helix-Packung beitragen. Walters und Degrado fanden bei der Analyse einer Bibliothek von 445 helicalen Transmembranabschnitten aus 31 hoch aufgelösten Strukturen, dass es insgesamt nur sehr wenige Arten von Tertiärstrukturmotiven gibt, die an der Bildung der helicalen Dimere beteiligt sind (Abbildung 2).^[11] Noch wichtiger ist der Befund, dass diese Tertiärstrukturen charakteristische Sequenzmotive haben. So korreliert z.B. ein GXXXG-Motiv, das in Trans-



Hang Yin ist Assistant Professor für Chemie und Biochemie an der University of Colorado in Boulder. Seine Forschungsinteressen liegen an der Schnittstelle zwischen Chemie und Biologie mit Schwerpunkt auf der strukturbasierten Wirkstoffentwicklung und der Regulation von Membranproteinen. Nach dem Chemiestudium an der Universität Peking (Abschluss 1999) wechselte er an die Yale University, wo er 2004 bei Prof. Andrew D. Hamilton promovierte. Es folgte ein Postdoc-Aufenthalt an der University of Pennsylvania bei Prof. William F. DeGrado, bevor er 2007 seine derzeitige Stelle antrat.

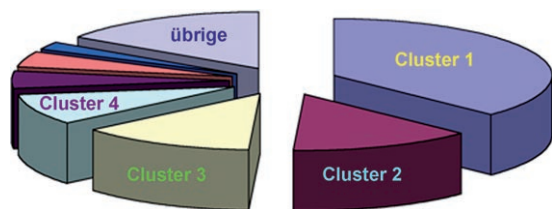


Abbildung 2. Anteil helicaler Paare innerhalb bestimmter Cluster (ein Cluster ist als Gruppe helicaler Dimere mit überlagerbaren Strukturen definiert). Die meisten der helicalen Paare verteilen sich auf eine geringe Zahl wohldefinierter Cluster (29% der Paare auf Cluster 1 und 67,4% auf die Cluster 1–4). Dies lässt vermuten, dass für natürlich vorkommende Helix-Helix-Packungen in Membranen nur wenige Bindungsweisen begünstigt sind.

membrandomänen häufig vorkommt, mit einem Helixpaar, das eine parallele linksgängige Packung in einem Winkel von ungefähr 40° bildet.^[2] In weiterführenden Studien beschrieben Bowie und Mitarbeiter, dass eine Unterklasse von Glycizipper-Proteinen mit (G/A/S)XXXGXXXG- oder GXXXGXXX(G/S/T)-Motiven an der Bildung von Transmembrankanälen beteiligt ist.^[12] Dieser Zusammenhang dient als Ansatzpunkt bei der Entwicklung exogener Wirkstoffe, die an Transmembrandomänen binden. Bowie merkte außerdem an, dass Helix-Helix-Packungen in Transmembrandomänen häufiger antiparallel sind und kleinere Packungswinkel aufweisen (hauptsächlich durch elektrostatische Wechselwirkungen) als lösliche Helixpaare;^[13] dies konnte auch in Computersimulationen bestätigt werden.^[14]

2.3. Molekulare Erkennung in der Membran

Der hydrophobe Effekt ist eine bedeutende Triebkraft bei der Proteinfaltung, er tritt aber bei Transmembranregionen, die in Membranen eingebettet sind, nicht auf (obwohl analoge solvophobe Effekte auch hier eine Rolle bei der Faltung spielen könnten). Außerdem sind die Sekundärstrukturen in Transmembranregionen im Allgemeinen starrer, da zwischen dem Proteinrückgrat und den Phospholipidketten der Umgebung keine Wasserstoffbrücken gebildet werden können und die H-Brücken darum intern abgesättigt werden.^[15] Beide Faktoren haben zur Folge, dass Membranproteine andere Aminosäureverteilungen haben als gewöhnliche Proteine. Zweifelsohne spielen Van-der-Waals-Wechselwirkungen eine wichtige Rolle bei der Assoziation von Transmembrandomänen: Es wurde nachgewiesen, dass Membranproteine eine höhere Packungsdichte aufweisen als lösliche Proteine, was auf mehr Van-der-Waals-Kontakte schließen lässt.^[16] Diese verstärkte Proteinwechselwirkung scheint ein Maß an Stabilität zu erzeugen, welches das Fehlen hydrophober Effekte zu kompensieren vermag. Es wird allgemein angenommen, dass Wasserstoffbrücken sowohl für die Struktur- als auch für die Assoziation von Membranproteinen wichtig sind.^[15,17–19] Studien haben gezeigt, dass die Bildung einer Asn-Asn- oder Asp-Asp-Wasserstoffbrücke einen Transmembranpeptidkomplex um etwa 1 kcal mol^{-1} stabilisiert.^[20]

2.4. Insertion von Aminosäuren

Hydrophobe Komponenten in Transmembransegmenten spielen eine wichtige Rolle bei der Membraninsertion. Hessa et al. haben darum die Insertion von systematisch konzipierten Transmembransequenzen in Membranen untersucht und die Ergebnisse dieser Studien in einer Hydrophobieskala zusammengestellt.^[21] Die Autoren analysierten die Translocon-vermittelte Insertion eines H-Segments mit der Sequenz GGPG(L_nX_{19–n})GPGG ($n = 0–7$, X ist die zu testende Aminosäure) in ER-Membranen. Die „biologische“ Skala der effektiven freien Energie (Abbildung 3) weist einige

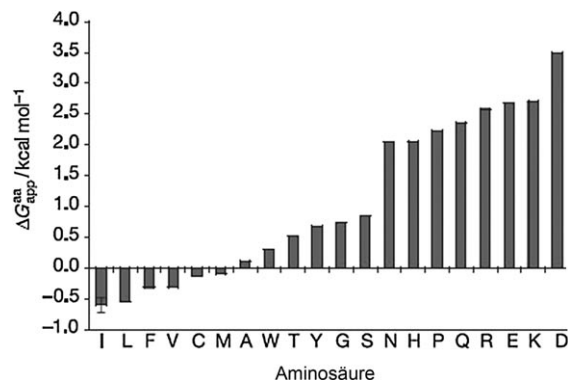


Abbildung 3. C^{aa}_{S} -Skala, abgeleitet aus Studien mit synthetischen Peptidsequenzen; die jeweilige Aminosäure wurde im Zentrum eines 19 Aminosäuren langen hydrophoben Abschnitts platziert.

Gemeinsamkeiten mit anderen Hydrophobieskalen auf, die aus biophysikalischen Messungen und aus statistischen Analysen lipidexponierter Bereiche bekannter Membranproteine erhalten wurden.^[22] Dies lässt den Schluss zu, dass die molekulare Erkennung von Transmembransegmenten durch direkte Wechselwirkung mit den umgebenden Lipidmolekülen zustande kommt.

In einer nachfolgenden Studie wurde die Energiebarriere für die Insertion einer Arg-Seitenkette in das Zentrum einer Transmembranhelix auf ca. $2.2 \text{ kcal mol}^{-1}$ geschätzt.^[23] (Interessant ist, dass polare Aminosäurereste ohne großen Energieaufwand in eine hydrophobe Doppelschicht eindringen können.) Dorairaj und Allen argumentierten dagegen, dass die tatsächliche Energiebarriere viel höher sein kann.^[24] Des Weiteren untersuchten White und von Heijne den Einfluss der Sekundärstruktur bei der Insertion. Aus den Ergebnissen wurde gefolgert, dass die Bildung von interhelicalen Asn- und Asp-Wasserstoffbrücken die Translocon-vermittelte Insertion von Membranproteinen erleichtert.^[20] Erneut Hessa et al. untersuchten Segmente, deren C-terminale Region mit Prolinresten modifiziert war (diese können die Helixstruktur aufbrechen, während N-terminal endständige Proline eine Helix stabilisieren können),^[2] und fanden, dass die Helixbildung ein bedeutender Faktor bei Membraninsertionsprozessen ist. Die Ergebnisse zeigten auch, dass die Einbettung polarer Aminosäurereste in hydrophobe Umgebungen von den lokalen strukturellen Gegebenheiten abhängt.^[21]

3. Neue Techniken zur Entwicklung von TMD-Wirkstoffen

3.1. Screening-Methoden

3.1.1. On-Bead-Screening

Die Methode des partikelbasierten Screening (On-Bead-Screening) wurde auf künstliche Membransysteme wie Tensidmicellen und Phospholipidvesikel angewendet und ermöglicht das Durchmusterung von Transmembranpeptidbibliotheken *in vitro*. In der Standardprozedur wird eine kombinatorische Datenbank aus Peptidsequenzen auf solvenszugänglichen Partikeln (z. B. TentaGel-Granulat) präpariert, wobei jedes Partikel mit einer spezifischen Spezies versehen wird („one bead one species“-Strategie). Durch spezifische Signale, etwa die Fluoreszenzemission bei Ligand-Rezeptor-Bindung, wird eine Leitsequenz identifiziert, die dann mithilfe von Profilierungstechniken mit hoher Genauigkeit sequenziert werden kann. Mit dem gut untersuchten homodimeren Transmembranprotein Glycophorin A (GpA) als Modellsystem entwickelten Ashish und Wimley eine On-Bead-Screeningmethode zur Identifizierung transmembranbindender Substanzen, die auch das Potenzial für Hochdurchsatzanwendungen hat.^[25]

3.1.2. Bioanalytisches Screening

Mehrere bioanalytische Methoden wurden entwickelt, z. B. TOXCAT- und Hefe-Dihybrid(Y2H)-Assays, die das Hochdurchsatz-Screening von Transmembransequenzen ermöglichen.^[26,27] Von Thaminy et al. wurde eine Hochdurchsatzmethode für das Screening von transmembranären Protein-Protein-Wechselwirkungen entwickelt, in der ein modifiziertes Split-Ubiquitin-System Verwendung findet.^[26] Das Verfahren beruht darauf, dass die Rekonstitution zweier Ubiquitinhälften durch eine Protein-Protein-Wechselwirkung vermittelt wird. Es konnte genutzt werden, um *in vivo* die Interaktion der beiden gut charakterisierten Hefe-Transmembranproteine Ost1p und Wbp1p zu detektieren (Abbildung 4).^[28] Die Methode wurde auch eingesetzt, um im großen Maßstab Wechselwirkungen integraler Membranproteine in Hefen zu identifizieren.^[29] Ein möglicher Fallstrick bei der Anwendung des Y2H-Systems ist, dass die beiden Proteinhälften (z. B. Cub und NubG) bereits eine intrinsische Affinität zueinander aufweisen, was die Analyse der Assoziation der untersuchten Transmembranproteine erschweren kann.

Freeman-Cook et al. entwickelten eine Strategie zur Identifizierung neuartiger Transmembransequenzen, die die Transmembrandomäne des β -Rezeptors von PDGF (Blutplättchen-Wachstumsfaktor) erkennen und dessen Aktivierung sowie Zelltransformationen induzieren können.^[27] Ausgangspunkt der Studie war der Befund, dass Rezeptor-Tyrosinkinasen durch virale Transmembranproteine, die mit deren normalen Liganden nicht verwandt sind, aktiviert werden können. Um zu überprüfen, ob laterale Protein-Protein-Wechselwirkungen unter Beteiligung diverser Transmembransegmente zur Aktivierung von Wachstumsfaktoren befähigt sind, wurde das Protein E5 aus dem bovinen Papil-

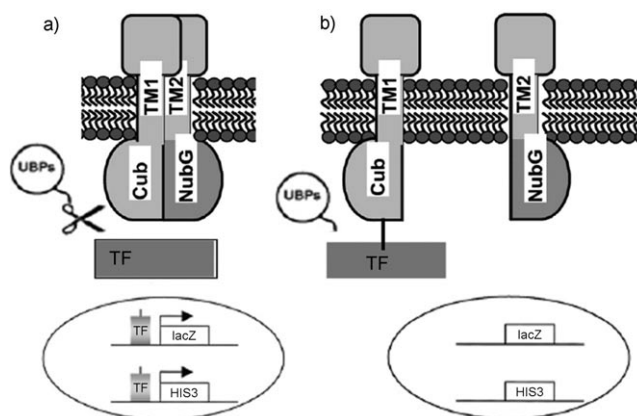


Abbildung 4. Prinzip des Split-Ubiquitin-Membran-Y2H-Systems. a) Eine zu untersuchende Transmembransequenz (TM1) wird mit der Cub-Domäne des Ubiquitins und einem künstlichen Transkriptionsfaktor (TF) fusioniert, während eine andere Transmembransequenz (TM2) mit der NubG-Domäne (Y-NubG) des Ubiquitins fusioniert wird. Bei Assoziation von TM1 und TM2 findet eine Rekonstitution des Ubiquitins statt, die eine proteolytische Spaltung durch eine Ubiquitin-spezifische Protease (UBP) und damit die Abspaltung des Transkriptionsfaktors nach sich zieht. Der TF aktiviert Reportergene, die das Auftreten von $HIS3^+/lacZ^+$ -Hefezellen zur Folge haben. b) Tritt keine Wechselwirkung zwischen TM1 und TM2 auf, findet keine Ubiquitinrekonstitution und damit keine UBP-vermittelte Spaltung statt, sodass $HIS3^-/lacZ^-$ -Hefezellen resultieren.

lomavirus als Matrix für die Identifizierung kleiner Transmembranproteine verwendet, die eine Aktivierung des β -Rezeptors von PDGF vermitteln können. Entscheidend für die Zelltransformation sind hierbei die Gln17-Thr513- und die Asp33-Lys449-Wechselwirkungen zwischen Protein und Rezeptor. Das Protein E5 weist eine sehr hydrophobe Transmembrandomäne auf, in die eine Reihe von Zufallsmutationen eingeführt wurden. Die Mehrheit der randomisierten Sequenzen vermittelte keine Transformation. Diejenigen Sequenzen, die positiv getestet wurden, zeigten aber ein hohes Maß an Varianz. Eine Untersuchung der transformierenden Sequenzen ergab, dass an keiner der zufällig mutierten Positionen die im E5-Wildtyp vorkommende Aminosäure zwingend benötigt wurde; so gut wie jeder hydrophobe Rest wurde an allen Positionen der Transmembrandomäne toleriert. Dennoch existierte eine starke lokale Präferenz für bestimmte Aminosäuren, etwa an den Positionen 18, 20, 24 und 28. Diese Reste fallen gänzlich auf eine Seite der Helix und überlappen mit der Kontaktfläche des E5-Homodimers. Zur Identifizierung einer Konsensus-Sequenz wurde ein Algorithmus verwendet, der die optimale Sequenz Leu18, Val20, Val24, Leu25, Val28, Leu29 ergab.

Mithilfe eines TOXCAT-Assays wurde die Fähigkeit der Transmembransegmente untersucht, in Membranen zu dimerisieren. Man fand heraus, dass sowohl aktive als auch inaktive Proteine in der Lage sind, innerhalb der Membran feste Homooligomere (bevorzugt Dimere) zu bilden. Diese Aktivität wurde um 60 % vermindert, wenn Gln17 zu Leu mutiert wurde. In Simulationen zeigte sich, dass aktive Proteine in den Seitenketten der Kontaktflächen signifikante Ähnlichkeiten zum Wildtyp des Proteins E5 aufweisen und

dass die Salzbrücke zwischen Asp33 und Lys499 essenziell für die Bildung des Heterodimers ist. Diese Ergebnisse bestätigen, dass die Sequenz von E5 bestimmten Randbedingungen unterliegt, trotz einer beachtlichen Sequenzflexibilität sowohl im E5-Homodimer als auch im E5-Heterodimer mit dem PDGF- β -Rezeptor.

3.2. Computersimulationen

3.2.1. Vorhersage von Transmembranstrukturen

Eine Membran ist ein für die Modellentwicklung am Computer günstiges System, da weder Wassermoleküle noch hydrophobe Wechselwirkungen vorkommen. Eine Vielzahl von Methoden zur computerunterstützten Analyse von Membranen wurde beschrieben, z. B. durch Kombination der Van-der-Waals-Energiefunktion mit Mutationsdaten zur Strukturvorhersage helicaler Dimere.^[30] In einem anderen Fall gelang es, das Transmembrandimer von GpA mithilfe einer Energiefunktion bestehend aus der Summe nur zweier Terme vorherzusagen: eines negativen Terms für den Kontakt zweier Seitenketten mit bekannter Tendenz zur Helixbildung und eines positiven Terms für die Einbettung sterisch anspruchsvoller Seitenketten.^[31] Unlängst entwickelten Baker und Mitarbeiter ein atomgenaues physikalisches Modell, das für einige Transmembrandomänen Vorhersagen von nahezu atomarer Auflösung ($< 2.5 \text{ \AA}$) ermöglicht.^[32]

Diverse Methoden, die statistische und physikalische Energiefunktionen kombinieren, sind auch für die Vorhersage komplexerer Membranproteinstrukturen eingesetzt worden.^[33–35] Als besonders nützlich erwies sich die Homologiemodellierung zur Vorhersage von Membranproteinstrukturen, insbesondere wenn keine hochauflösenden Strukturen für Transmembranproteine verfügbar sind.^[36]

3.2.2. Tiefenabhängige Potentiale

Senes et al. entwickelten ein empirisches, tiefenabhängiges Potential für die Insertion von Seitenketten in eine Membran.^[37] Insertionstiefen und Insertionswahrscheinlichkeiten einzelner Aminosäuren wurden mithilfe von Strukturdaten helicaler Transmembrandomänen (aus der Proteindatenbank) berechnet. Vergleiche von Asp mit Asn und von Glu mit Gln ergaben, dass die freien Carboxygruppen der Seitenketten von Asp und Glu diese aus den unpolaren Regionen der Doppelschicht ausschließen. Aus den Daten ist ersichtlich, dass langkettige polare Reste tiefer in die Membran eindringen können als polare Seitenketten von geringerer Länge.^[38] Vergleicht man die Wechselwirkung von Membranen mit sauren (Asp und Glu) und basischen (Arg und Lys) Aminosäuren, so stellt sich heraus, dass zwar der Transfer basischer Aminosäuren von Wasser in das Zentrum der Doppelschicht energetisch ungünstiger ist, sie tatsächlich aber 4–5 \AA tiefer in die Membran eindringen als die entsprechenden sauren Aminosäuren. Diese Erkenntnisse sind in Einklang damit, dass die Seitenketten von Lys und Arg länger und flexibler sind und darum leichter in die Membran eindringen. Darüber hinaus führt auch die negative Ladung der Phosphatgruppen dazu, dass basische Aminosäuren tiefer

in die Doppelschicht eindringen als saure Aminosäuren, was einem intuitiven Verständnis der Membraninsertion entgegenkommt. Mithilfe eines tiefenabhängigen Potentials ist man in der Lage, die Orientierung eines Transmembranpeptids in der Membran vorherzusagen, was sich besonders bei der Analyse und dem gezielten Entwurf von Bindungspartnern als nützlich erweist.

3.2.3. Simulation der Insertion synthetischer Foldamere

Ein effizientes grobkörniges Computermodell zur Beschreibung von Lipidmolekülen wurde von Klein und Mitarbeitern entwickelt.^[39] Tew et al. führten eine atomar vollständige Moleküldynamik(MD)-Simulation durch, in der die Konformation synthetischer Foldamere an der Wasser-Lipid-Phasengrenze in Abhängigkeit von der Sequenz und den chemischen Eigenschaften des Monomers untersucht wurde.^[40] Solche Simulationen helfen beim gezielten Entwurf exogener Wirkstoffe zur Bindung an Transmembrandomänen, indem sie Substanzen mit höchsten Tendenzen zur Membraninsertion identifizieren.^[41] Allerdings ist die Frage, ob Simulationen von Membranstrukturen von der Größe des Systems beeinflusst werden, Gegenstand umfangreicher Diskussionen. Die Abmessungen der in den Simulationen verwendeten Membranmodelle sind begrenzt, sodass Artefakte möglich sind. So haben die planaren Doppelschichtanordnungen und Vesikel, wie sie typischerweise experimentell genutzt werden, Abmessungen im Bereich von Mikrometern, während derzeitige Rechenleistungen nur die Simulation von Membranflecken im Nanometerbereich erlauben. Tobias und Mitarbeiter untersuchten in MD-Simulationen den Einfluss der Systemgröße auf die Struktur einer Doppelschicht aus 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DOPC) unter periodisch veränderlichen Grenzbedingungen.^[42] Ein Vergleich mit Röntgen- und Neutronenbeugungsdaten zeigte, dass in diesem Fall die Auswirkungen einer begrenzten Systemgröße vernachlässigbar waren.

4. Exogene Agentien zur Regulation der Funktion von Transmembrandomänen

Transmembranregionen werden gewöhnlich als bloße Ankerstellen für die Verankerung integraler Membranproteine in der Phospholipiddoppelschicht betrachtet (mit Ausnahme etwa von Transmembranregionen in Ionenkanälen). Dennoch wurde gefunden, dass laterale transmembranäre Protein-Protein-Wechselwirkungen neuartige Möglichkeiten für die funktionelle Regulation von Membranproteinen bieten. Im Folgenden werden aktuelle Fortschritte bei der Entwicklung exogener Agentien zur Erkennung von Transmembrandomänen als potenzielle pharmakologische Zielstrukturen beschrieben.

Die Kristallisation und Expression von Membranproteinen ist experimentell schwierig. Mithilfe von synthetischen Peptiden gelingt es dennoch gut, das Verhalten von Membranproteinen zu studieren. Zum Beispiel existiert eine Fülle an Daten über Peptidmimetika viraler Fusionsproteine.^[43] Diese inserieren in membranähnliche Umgebungen wie un-

polare Lösungsmittel, Tensidmicellen und Phospholipidopelschichten und nehmen leicht Sekundärstrukturen ein.^[44–46]

4.1. Kernpeptide an T-Zell-Antigenrezeptoren

Manolios et al. beschrieben eine neuartige Methode zur Inhibierung von T-Zellen durch synthetische Peptide, die von der Transmembransequenz der α -Kette des T-Zell-Antigenrezeptors (TCR) abgeleitet waren.^[47] Das in vitro und in vivo wirkungsvollste Peptid zur Modulation der T-Zell-Funktion war ein 9-meres Kernpeptid (CP), GLRILLKLV-OH, das der zuvor bestimmten Assemblierungssequenz von murinem TCR- α entspricht. Interessant ist, dass das Peptid zwei basische Seitenketten im Abstand von vier Aminosäuren enthält. Natürlich vorkommende Peptide und Proteindomänen mit amphipathischen Sequenzen spielen eine entscheidende Rolle bei Membranumbildungsprozessen wie Fusion, Auflösung und Porenbildung.^[48] In einer hieran anschließenden Studie wurde gefunden, dass die Mutation einer oder beider basischer Seitenketten zum vollständigen Verlust der Kernpeptid-Bindung an unilamellare Vesikel führt, was eine wichtige Rolle in der Membranerkennung vermuten lässt.^[49] Die Kernpeptide sind in der Lage, sowohl in T-Zellen als auch in andere Zellen einzudringen. Sie inhibieren T-Zellen, indem sie mit den Transmembrandomänen des CD3-Komplexes wechselwirken und so die Signalübermittlung zwischen dem TCR und CD3 unterbrechen. Ein über Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris) verbundenes Konjugat aus dem Kernpeptid und Palmitinsäure bewirkte eine stärkere Hemmung der T-zellulären Interleukin-2(IL2)-Produktion als das Peptid allein.^[50] Ein ähnlicher Effekt konnte auch nach Konjugation mit einem Zuckermolekül (1-Aminoglucosesuccinat) beobachtet werden,^[51] was eine mögliche Anwendung der Kernpeptide als Wirkstofftransporter nahelegt. In vivo wirkte das Kernpeptid bei drei T-Zell-vermittelten Krankheitsmodellen entzündungshemmend: bei adjuvansinduzierter Arthritis, bei experimenteller allergischer Neuritis und bei cyclophosphamidinduzierter Diabetes in NOD/Lt(F)-Mäusen. Ähnliche Wirkungen konnten auch mit Peptiden beobachtet werden, die zu den δ -, ϵ - und γ -Transmembransequenzen des CD3-Komplexes komplementär sind.^[52]

Die Verwendung von D-Aminosäuren ist ein verbreiteter Ansatz bei der Entwicklung von Peptidanaloga. D-Aminosäuren enthaltende Peptide bilden wohldefinierte Sekundärstrukturen und sind gegen enzymatischen Abbau resistent. Diese Strategie kam auch bei der Entwicklung nichtnatürlicher Transmembranfoldamere zur Anwendung. Hierbei zeigten Shai und Mitarbeiter, dass ein diastereomeres Analogon der GpA-Transmembranhelix (2D-GpA), in der zwei L-Val-Reste durch das entsprechende D-Enantiomer ersetzt waren, in zellulären Membranen Heterodimere mit Wildtyp-GpA bildet.^[53] Gerber et al. machten sich diese Strategie bei Kernpeptiden zu Nutze und identifizierten eine Reihe von Antagonisten D-Aminosäure-haltiger Transmembranpeptide (D-CPs).^[54] Die Ergebnisse dieser Studie stellten die konventionelle Sichtweise in Frage, dass zwischen D- und L-Isomeren keine sequenzspezifischen Wechselwirkungen auftreten.

Man fand heraus, dass sowohl das D- als auch das L-Kernpeptid in der Membran mit dem TCR colokalisiert vorliegen und die TCR-CD3-Wechselwirkung mit vergleichbarer Wirkung unterbrechen. Dieses Ergebnis lässt auf eine Reorientierung des Moleküls in der Membran schließen, so dass transmembranäre Protein-Protein-Wechselwirkungen ähnlich wie im nativen Zustand ermöglicht werden. In Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass das D-Kernpeptid mit ähnlicher Effizienz wie das L-Isomer gegen Arthritis in Lewis-Ratten wirkt (durch Autoimmunsuppression) und zudem eine verstärkte Resistenz gegen enzymatischen Abbau aufweist.

4.2. Transmembranregionen von ErbB1 und ErbB2

Gerber et al. untersuchten die Homo- und Heterodimerisierung von Transmembrandomänen der ErbB-Rezeptorfamilie mithilfe exogener Peptide, die die Transmembransequenz aus ErbB1 enthalten.^[55] Die ErbB-Rezeptorfamilie spielt eine wichtige Rolle bei der Proliferation und Differenzierung von Krebszellen.^[56] ErbB-Rezeptoren können durch Transmembranassoziation Homo- oder Heterodimere bilden; dies ist ein für die Signaltransduktion entscheidender Vorgang.^[57] Die Transmembrandomänen von ErbB enthalten zwei GXXXG-Motive, die als Bindestellen I (N-terminal) und II (C-terminal) bezeichnet werden. Die Autoren schlugen vor, dass die jeweilige Homodimerisierung von ErbB1 und ErbB2 an der Bindestelle II und die Heterodimerisierung an der Bindestelle I stattfindet. Ein synthetisches Peptid des Transmembransegments aus ErbB1, das lediglich die Bindestelle I enthielt, wurde als molekulare Sonde hergestellt, zusammen mit zwei mutierten Kontrollpeptiden; die Mutationen im G⁸⁰XXXG⁸³-Motiv der Bindestelle I waren M81V und G83I. Das Transmembranpeptid des ErbB1-Wildtyps bildet selektiv ein Heterodimer mit ErbB2, indem es das bestehende ErbB2-Homodimer verdrängt. Die Mutation M81V zeigte eine dem Wildtyp ähnliche Affinität zu ErbB2, während die Affinität von G83I, bei dem der offenbar entscheidende Gly-Rest ersetzt ist, deutlich verringert ist. Diese interessante Entdeckung lässt den Schluss zu, dass eine einzelne Transmembrandomäne, namentlich ErbB1, zwei Erkennungsmotive enthält: Bindestelle II zur Homodimerisierung und Bindestelle I zur Heterodimerisierung.

4.3. D-Aminosäure-Peptide als Inhibitoren von gp41

Die N-terminale Fusionsdomäne des Glycoproteins gp41 aus der Hülle des humanen Immundefizienzvirus 1 (HIV-1) initiiert die Fusion der viralen mit einer zellulären Membran, was unmittelbar zur Infektion der Wirtszelle mit HIV-1 führt.^[58] Ein 33 Aminosäuren langes Fusionspeptid, das dem N-terminalen Segment von gp41(WT) entspricht, inhibiert die gp41-vermittelte Zellfusion, indem es an die N-terminale Domäne von gp41 bindet und so die Bildung inaktiver Heteroaggregate bewirkt.^[59] Pritsker et al. fanden heraus, dass das D-Aminosäuren enthaltende Peptidmimetikum des Wildtyps (D-WT) ebenfalls die gp41-vermittelte Zellfusion

inhibiert^[60] und zudem resistent gegen proteolytische Spaltung ist. Mit Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie wurde nachgewiesen, dass WT und D-WT in einem Trifluoethan/Wasser-Gemisch spiegelbildlich zueinander auftreten, während mit ATR-IR-Spektroskopie (ATR = abgeschwächte Totalreflexion) für beide Enantiomere ähnliche Strukturen und Orientierungen in der Membrandoppelschicht nachgewiesen wurden. Dieses Ergebnis macht deutlich, dass die Chiralität des Wildtyps bei der Erkennung der N-terminalen Domäne von gp41 in der Membrenumgebung keine Rolle spielt. Es ist zu erwarten, dass weitere Studien Kriterien für die Entwicklung proteaseresistenter antiviraler Therapeutika liefern könnten.

4.4. Transmembrandomänen von GPCRs

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) bilden eine Überfamilie von Transmembranproteinen, die an der Erkennung extrazellulärer Signale, der Aktivierung interner Signaltransduktionswege und letztendlich der Zellantwort beteiligt sind.^[61] GPCRs sind Zielstruktur von 50% aller aktuell am Markt befindlichen Pharmazeutika, obwohl sie nur die viertgrößte Proteinüberfamilie im menschlichen Proteom stellen (ca. 3% des Genoms).^[62] GPCRs sind durch sieben Transmembrandomänen charakterisiert (Abbildung 5). Bouvier und Mitarbeiter verwendeten ein von der sechsten Transmembrandomäne (Position 276–296) abgeleitetes Peptid des β_2 -adrenergen Rezeptors (β_2 -AR), das ein dimerisierungsinduzierendes GXXXG-Motiv aufweist, zur Inhibierung der β_2 -AR-Dimerbildung.^[63] Die Autoren fanden, dass die meisten der dimeren β_2 -ARs in Sf9-Zellmembranen und Micellen in Gegenwart des Transmembranpeptids VI in die

Momomere überführt werden. Dagegen erwies sich die inhibitorische Wirkung eines vom Transmembranpeptid VII des β_2 -AR abgeleiteten Peptids als vernachlässigbar gering. Tarasova et al. fanden beim Screening der Peptide aus allen sieben Transmembrandomänen des CXC-Chemokinrezeptors (CXCR4), dass die Transmembranpeptide mit der Sequenz der zweiten und sechsten Transmembrandomäne die SDF-1-induzierte Signaltransduktion durch den CXC-Rezeptor aufhebt.^[64] Am wirksamsten war das Peptid CXCR4-2-2 (ein aus der zweiten Transmembrandomäne des CXCR4 abgeleitetes, 24 Aminosäuren langes Peptid), das bereits bei 0.2 μM jegliche Signaltransduktion blockierte. Weiter wurde gezeigt, dass auch andere Analoga von Transmembrandomänen in der Lage sind, die Aktivität ihrer zugehörigen GPCRs aufzuheben (z.B. von CCR5 und CCKAR), was vermuten lässt, dass dieser Ansatz allgemein zum gezielten Entwurf modulierender Peptide der GPCR-Überfamilie angewendet werden kann.

4.5. αIIb -Transmembranpeptide

Der Thrombozyten-Fibrinogenrezeptor $\alpha\text{IIb}\beta_3$ liegt im Gleichgewicht zwischen einer inaktiven und einer aktiven Konformation vor. Man geht davon aus, dass sich die Transmembranhelices der α - und β -Untereinheiten dieses Integrins in ruhenden Thrombozyten heteromer zusammenlagern und als Folge einer Thrombozytenaktivierung dissoziieren.^[36,66,67] Der αIIb -Transmembrandomäne entsprechende Peptide bilden in vitro und in bakteriellen Membranen ebenfalls Homodimere, wobei die an der Wechselwirkung beteiligte Kontaktfläche mit der transmembranären αIIb - β_3 -Bindestelle überlappt.^[68] Das αIIb - αIIb -Homoassoziat ist relativ stark gebunden, sodass dessen Bildung die heterodimere αIIb - β_3 -Wechselwirkung zu unterbrechen vermag. Entsprechend wurden Peptide der αIIb -Transmembrandomäne zur Aktivierung des $\alpha\text{IIb}\beta_3$ -Integrins verwendet.^[69] Hierzu wurden jeweils aus 23 Aminosäuren bestehende Peptide, die der αIIb - und der β_3 -Transmembrandomäne entsprechen, durch Festphasensynthese hergestellt. Zur Verbesserung der Wasserlöslichkeit und zur Erleichterung der Membraninsertion wurden Lysinreste an beide Termini angefügt. Mit beiden Peptiden konnte die αIIb - β_3 -Wechselwirkung unterbrochen und so Thrombozytenaggregation induziert werden. Ein nicht verwandtes Kontrollpeptid, die Modell-Transmembrandomäne MS-1, zeigte keinen Effekt. Ebenfalls gering war die Wirkung eines αIIb -Transmembranpeptids, dessen Glycine 972 und 975 (entsprechend der ersten und letzten Position des GXXXG-Motivs) durch Leucin ersetzt waren. Yin et al. stellten fest, dass ein mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) markiertes αIIb -Transmembranpeptid in einer Größenausschlussfiltration mit aufgereinigtem $\alpha\text{IIb}\beta_3$ coeluiert, wodurch die Bindung des αIIb -Transmembranpeptids an $\alpha\text{IIb}\beta_3$ bestätigt wurde. Die Selektivität dieser Peptide wurde in einem TOXCAT-Assay untersucht,^[70] der aufzeigte, dass das αIIb -Transmembranpeptid spezifisch die Transmembrandomänen der αIIb -Untereinheit des Integrins $\alpha\text{IIb}\beta_3$ erkennt, nicht aber andere homologe Transmembrandomänen in der inneren Membran von *E. coli*.

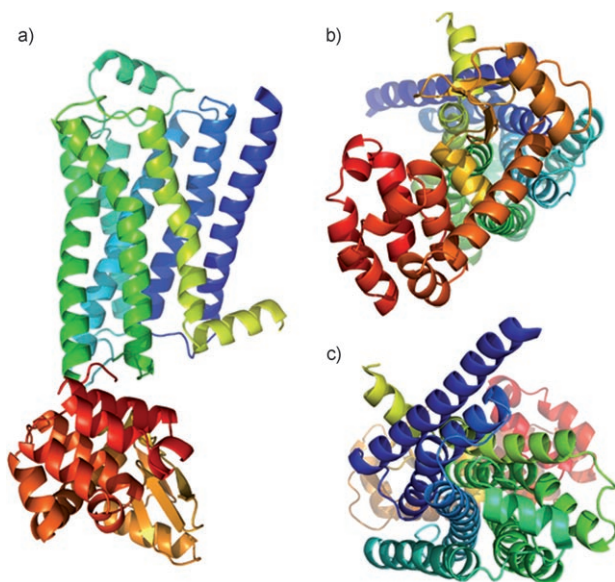


Abbildung 5. Verschiedene Ansichten des humanen β_2 -adrenergen G-Protein-gekoppelten Rezeptors, fusioniert mit T4-Lysozym (rot), das die Bildung von qualitativ hochwertigen Kristallen ermöglicht: a) seitlich, b) „von unten“ (aus Richtung des Zytoplasmas) und c) „von oben“ (aus extrazellulärer Richtung).^[65]

4.6. CHAMP-Peptide

Für den gezielten Entwurf von Proteinen, die wasserlösliche Regionen eines Zielproteins erkennen, steht eine Fülle rechnergestützter Methoden zur Verfügung,^[71–74] während für Transmembranregionen nur wenige Verfahren bekannt sind. DeGrado und Mitarbeiter beschrieben eine allgemeine Strategie für den rechnergestützten Entwurf von Anti-TMD-Peptiden auf der Grundlage tiefenabhängiger Kraftfelder (siehe Abschnitt 3.2.2). Die hiermit erhaltenen CHAMP-Peptide (CHAMP = calculated helical anti-membrane protein) erkennen Transmembranhelices auf sequenzspezifische Weise. Yin et al. nutzten die Methode zum Entwurf eines Peptids, das die Transmembranhelix der α -Untereinheit des Thrombozytenintegrins α IIB β 3 spezifisch erkennt.^[75] Ein für die Erkennung der α IIB β 3-Transmembranhelix entwickeltes Peptid induzierte durch Unterbrechung der heterodimeren α IIB β 3-Helix-Helix-Wechselwirkung die Aktivierung des Integrins (Abbildung 6).

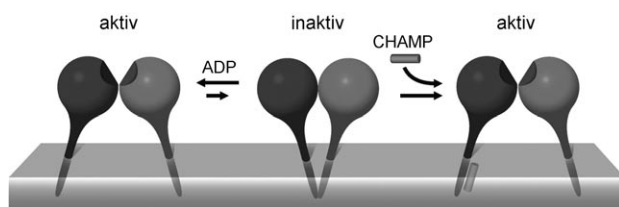


Abbildung 6. Regulation des Integrins α IIB β 3. Da die Transmembrandomänen der α - und β -Untereinheit im inaktiven Zustand des Integrins interagieren, führt jede Destabilisierung dieser Wechselwirkung zu einer Dissoziation der Transmembrandomänen und damit zur Aktivierung des Integrins. Dies geschieht in Thrombozyten bei Stimulation durch Agonisten wie ADP. CHAMP-Peptide destabilisieren diese Wechselwirkung, indem sie die Interaktion zwischen den Transmembranhelices der α - und β -Untereinheiten blockieren.

Der gezielte Entwurf von CHAMP-Peptiden zur Erkennung der α IIB-Transmembranhelix begann mit dem Absuchen der helicalen Sequenz nach Motiven, die eine hohe Wahrscheinlichkeit für die Beteiligung an Protein-Protein-Wechselwirkungen aufweisen. Im nächsten Schritt wurde basierend auf den bekannten Strukturpräferenzen der in der Helix gefundenen Motive eine Rückgratkonformation des erwarteten α IIB-CHAMP-Komplexes ausgewählt. Abschließend wurde die Sequenz der bindenden Helix mithilfe eines Algorithmus, der die Packung der Seitenketten beschreibt, entworfen. Die nach der Methode entwickelten Peptide binden in Micellen an die α IIB-Transmembransequenz und zeigen in Säugerzellen eine starke Aktivierung nativer α IIB β 3-Rezeptoren. Diese Ergebnisse verdeutlichen, welches Potenzial die CHAMP-Methode für die Entwicklung hochaffiner Moleküle zur Modulation von Membranproteinen birgt.

Mit dem entworfenen α IIB-Peptid war es außerdem möglich, den Mechanismus der Integrinaktivierung zu untersuchen. Hierbei wurde gefunden, dass ein Blockieren der Bindestelle an der α IIB-Transmembranhelix, die den Kontakt zur β 3-Transmembranhelix herstellt, zur Aktivierung des In-

tegrins führt. Dieses Ergebnis bestätigte die Hypothese, dass eine Aktivierung die Trennung der Helices erfordert.^[36]

Der CHAMP-Ansatz steht folglich als allgemeine Methode für die Untersuchung von Mechanismen, Strukturen und Funktionen von Membranproteinen zur Verfügung. Darüber hinaus bietet er einen allgemeinen Zugang zu Peptiden, die an die Transmembranregionen beliebiger Zielstrukturen binden können. Die CHAMP-Methode ergänzt daher das Spektrum konventioneller antikörperbasierter Methoden, die derzeit nur auf wasserlösliche Proteinregionen anwendbar sind.

4.7. Inhibitoren von ABC-Transportern

Tarasova et al. entwickelten eine Reihe peptidischer Inhibitoren des P-Glycoproteins (P-gp), eines ABC-Transporters.^[76,77] ABC-Transporter vermitteln den ATP-abhängigen Intermembrantransport vieler Substanzen, die für die Zellfunktion unentbehrlich sind. Der Strukturkern der ABC-Transporter besteht aus zwei Membrandomänen aus jeweils sechs helicalen Transmembransegmenten. Basierend auf der erfolgreichen Entwicklung von GPCR-abgeleiteten Peptiden synthetisierten Tarasova et al. Derivate aller zwölf Transmembranhelices von P-gp mit einem monoterminal eingebauten Asp-Asp-Dipeptid. Mit der Modifizierung war beabsichtigt, die Membraninsertion zu erleichtern. Das Inhibitorvermögen der Peptide wurde mit einem Tüpfelplatten-Assay untersucht, der auf dem Efflux des fluoreszierenden P-gp-Substrats 3-Ethyl-2-[3-(3-ethyl-2(3H)-benzoxazolyliden)-1-propenyl]benzoxazoliumiodid (DiOC₂) beruht. Die Untersuchungen ergaben, dass die getesteten Transmembranpeptide potente und selektive Inhibitoren des ABC-Transporters sind, indem sie die transmembranäre Assemblierung von P-gp unterbrechen. Interessant ist, dass die Mindestlänge eines Peptids mit detektierbarer Aktivität 15 Aminosäuren beträgt, was darauf hindeutet, dass keine membrandurchspannenden Peptid-Target-Komplexe gebildet wurden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die P-gp-Inhibition nicht von der Chiralität der Transmembranpeptide abhängt. So inhibierte das 25 Aminosäuren lange retroinverse Peptid retro-MDR-1-5-4 (all-D), das der fünften Transmembrandomäne von P-gp entspricht, den Efflux des fluoreszierenden P-gp-Substrats mit einem IC₅₀-Wert von (0.5 ± 0.2) μ M. Zum Vergleich ergab das entsprechende all-L-MDR-1-5-4 einen IC₅₀-Wert von (1.1 ± 0.3) μ M. All-D-Peptide sind resistent gegen enzymatischen Abbau und können daher auch in vivo als P-gp-Inhibitoren verwendet werden. Die an P-gp antagonistisch wirkenden Transmembranpeptide waren in der Lage, resistente Krebszellen in vivo effizient gegen Doxorubicin zu sensibilisieren, ohne dabei selbst zytotoxisch zu sein. Eine Weiterentwicklung dieser Peptide als Resistenzinhibitoren scheint daher aussichtsreich.

5. Ausblick

Die Regulation von Protein-Protein-Wechselwirkungen durch niedermolekulare Substanzen gilt als eine große Her-

ausforderung im Bereich der Wirkstoffentwicklung.^[78] Mehr noch ist die Wechselwirkung zwischen Transmembranproteinen ein praktisch unberührtes Feld innerhalb der chemischen Biologie. Kürzliche Studien von Matile und Mitarbeitern, die synthetische Oligophenylenderivate zum Aufbau membran-durchspannender Poren in lebenden Zellen einsetzten, bieten aber erste vielversprechende Perspektiven.^[79] Oligophenylene war bereits als Mimetikum α -helicaler Proteinregionen genutzt worden,^[80–82] sodass nun eine Strategie zur Regulation von Protein-Protein-Wechselwirkungen in Membranen zur Verfügung steht.

Die hier besprochenen Studien belegen, wie exogene Wirkstoffe, vor allem Peptide, für die hochaffine und spezifische Erkennung von Zielstrukturen eingesetzt werden können. Die Methoden ergänzen die bekannten antikörperbasierten Verfahren, die nicht in zellulären Membranen angewendet werden können. Angesichts der Tatsache, dass die Assoziation lateraler Transmembranhelices als zunehmend wichtig für die Faltung, Assemblierung und Signaltransduktion von Membranproteinen erkannt wird,^[2] könnten sich derartige exogene Substanzen als geeignete Reagentien zur Untersuchung dieser Prozesse erweisen.^[47,54] Trotz zahlreicher Hürden, die mit den physikalischen Eigenschaften von Peptiden verbunden sind, steht in Aussicht, dass solche exogenen Wirkstoffe letztlich Anwendung in der medizinischen Diagnostik oder Therapie finden könnten. Mit der zunehmenden Übertragung von „wässrigen“ Techniken auf Membransysteme (z. B. das bei der Wirkstoffentwicklung verwendete Tethering)^[83] könnten wir in naher Zukunft einen raschen Anstieg der Zahl an TMD-Agentien erleben.

Ich danke der University of Colorado und der Colorado Initiative of Molecular Biotechnology für die finanzielle Unterstützung.

Eingegangen am 16. Oktober 2007

Online veröffentlicht am 3. März 2008

Übersetzt von Florian Buhr, Frankfurt

- [1] A. A. Spector, M. A. Yorek, *J. Lipid Res.* **1985**, 26, 1015–1035.
- [2] A. Senes, D. E. Engel, W. F. DeGrado, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2004**, 14, 465–479.
- [3] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemistry*, 5. Aufl., Freeman, New York, **2002**.
- [4] T. Hessa, H. Kim, K. Bihlmaier, C. Lundin, J. Boekel, H. Andersson, I. Nilsson, S. H. White, G. von Heijne, *Nature* **2005**, 433, 377–381.
- [5] S. C. Li, C. M. Deber, *Nat. Struct. Biol.* **1994**, 1, 368–373.
- [6] O. G. Mouritsen, M. Bloom, *Biophys. J.* **1984**, 46, 141–153.
- [7] A. Chen, V. T. Moy, *Biophys. J.* **2000**, 78, 2814–2820.
- [8] A. M. Smondyrev, M. L. Berkowitz, *Biophys. J.* **1999**, 77, 2075–2089.
- [9] K. Mitra, I. Ubarretxena-Belandia, T. Taguchi, G. Warren, D. M. Engelman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, 101, 4083–4088.
- [10] G. E. Schulz, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2002**, 1565, 308–317.
- [11] R. F. Walters, W. F. DeGrado, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, 103, 13658–13663.
- [12] S. Kim, T. J. Jeon, A. Oberai, D. Yang, J. J. Schmidt, J. U. Bowie, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, 102, 14278–14283.
- [13] J. U. Bowie, *J. Mol. Biol.* **1997**, 272, 780–789.
- [14] E. Sparr, W. L. Ash, P. V. Nazarov, D. T. Rijkers, M. A. Hemminga, D. P. Tieleman, J. A. Killian, *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 39324–39331.
- [15] S. H. White, *Adv. Protein Chem.* **2005**, 72, 157–172.
- [16] M. Eilers, S. C. Shekar, T. Shieh, S. O. Smith, P. J. Fleming, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 5796–5801.
- [17] F. X. Zhou, H. J. Merianos, A. T. Brunger, D. M. Engelman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, 98, 2250–2255.
- [18] H. Gratkowski, J. D. Lear, W. F. DeGrado, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, 98, 880–885.
- [19] C. Choma, H. Gratkowski, J. D. Lear, W. F. DeGrado, *Nat. Struct. Biol.* **2000**, 7, 161–166.
- [20] N. M. Meindl-Beinker, C. Lundin, I. Nilsson, S. H. White, G. von Heijne, *EMBO Rep.* **2006**, 7, 1111–1116.
- [21] T. Hessa, H. Kim, K. Bihlmaier, C. Lundin, J. Boekel, H. Andersson, I. Nilsson, S. H. White, G. von Heijne, *Nature* **2005**, 433, 377–381.
- [22] S. H. White, W. C. Wimley, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1999**, 28, 319–365.
- [23] T. Hessa, S. H. White, G. von Heijne, *Science* **2005**, 307, 1427.
- [24] S. Dorairaj, T. W. Allen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, 104, 4943–4948.
- [25] Ashish, W. C. Wimley, *Biochemistry* **2001**, 40, 13753–13759.
- [26] S. Thaminy, D. Auerbach, A. Arnoldo, I. Stagljar, *Genome Res.* **2003**, 13, 1744–1753.
- [27] L. L. Freeman-Cook, A. M. Dixon, J. B. Frank, Y. Xia, L. Ely, M. Gerstein, D. M. Engelman, D. DiMaio, *J. Mol. Biol.* **2004**, 338, 907–920.
- [28] I. Stagljar, C. Korostensky, N. Johnsson, S. te Heesen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 5187–5192.
- [29] J. P. Miller, R. S. Lo, A. Ben-Hur, C. Desmarais, I. Stagljar, W. S. Noble, S. Fields, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, 102, 12123–12128.
- [30] D. G. Metcalf, P. B. Law, W. F. DeGrado, *Proteins Struct. Funct. Genet.* **2007**, 67, 375–384.
- [31] S. J. Fleishman, N. Ben-Tal, *J. Mol. Biol.* **2002**, 321, 363–378.
- [32] P. Barth, J. Schonbrun, D. Baker, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, 104, 15682–15687.
- [33] V. Yarov-Yarovoy, J. Schonbrun, D. Baker, *Proteins Struct. Funct. Genet.* **2006**, 62, 1010–1025.
- [34] Y. Zhang, J. Skolnick, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, 101, 7594–7599.
- [35] Y. Zhang, M. E. Devries, J. Skolnick, *PLoS Comput. Biol.* **2006**, 2, e13.
- [36] W. Li, D. G. Metcalf, R. Gorelik, R. H. Li, N. Mitra, V. Nanda, P. B. Law, J. D. Lear, W. F. DeGrado, J. S. Bennett, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, 102, 1424–1429.
- [37] A. Senes, D. C. Chadi, P. B. Law, R. F. Walters, V. Nanda, W. F. DeGrado, *J. Mol. Biol.* **2007**, 366, 436–448.
- [38] A. K. Chamberlain, Y. Lee, S. Kim, J. U. Bowie, *J. Mol. Biol.* **2004**, 339, 471–479.
- [39] C. F. Lopez, P. B. Moore, J. C. Shelley, M. Y. Shelley, M. L. Klein, *Comput. Phys. Commun.* **2002**, 147, 1–6.
- [40] G. N. Tew, D. Liu, B. Chen, R. J. Doerksen, J. Kaplan, P. J. Carroll, M. L. Klein, W. F. DeGrado, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 5110–5114.
- [41] I. Ivanov, S. Vemparala, V. Pophristic, K. Kuroda, W. F. DeGrado, J. A. McCammon, M. L. Klein, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 1778–1779.
- [42] F. Castro-Roman, R. W. Benz, S. H. White, D. J. Tobias, *J. Phys. Chem. B* **2006**, 110, 24157–24164.
- [43] R. M. Epan, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2003**, 1614, 116–121.
- [44] J. Ren, S. Lew, Z. Wang, E. London, *Biochemistry* **1997**, 36, 10213–10220.

- [45] J. A. Killian, *Biochim. Biophys. Acta Rev. Biomembr.* **1998**, 1376, 401–415.
- [46] Y. P. Zhang, R. N. Lewis, R. S. Hodges, R. N. McElhaney, *Biochemistry* **1992**, 31, 11572–11578.
- [47] N. Manolios, S. Collier, J. Taylor, J. Pollard, L. C. Harrison, V. Bender, *Nat. Med.* **1997**, 3, 84–88.
- [48] A. Tossi, L. Sandri, A. Giangaspero, *Biopolymers* **2000**, 55, 4–30.
- [49] V. Bender, M. Ali, M. Amon, E. Diefenbach, N. Manolios, *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 54002–54007.
- [50] M. Ali, M. Amon, V. Bender, N. Manolios, *Bioconjugate Chem.* **2005**, 16, 1556–1563.
- [51] M. A. Amon, M. Ali, V. Bender, Y. N. Chan, I. Toth, N. Manolios, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **2006**, 1763, 879–888.
- [52] S. Collier, A. Bolte, N. Manolios, *Scand. J. Immunol.* **2006**, 64, 388–391.
- [53] D. Gerber, N. Sal-Man, Y. Shai, *J. Mol. Biol.* **2004**, 339, 243–250.
- [54] D. Gerber, F. J. Quintana, I. Bloch, I. R. Cohen, Y. Shai, *FASEB J.* **2005**, 19, 1190–1192.
- [55] D. Gerber, N. Sal-Man, Y. Shai, *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 21177–21182.
- [56] E. Hurwitz, L. N. Klapper, M. Wilchek, Y. Yarden, M. Sela, *Cancer Immunol. Immunother.* **2000**, 49, 226–234.
- [57] P. J. Brennan, T. Kumagai, A. Berezov, R. Murali, M. I. Greene, *Oncogene* **2000**, 19, 6093–6101.
- [58] C. P. Jaroniec, J. D. Kaufman, S. J. Stahl, M. Viard, R. Blumenthal, P. T. Wingfield, A. Bax, *Biochemistry* **2005**, 44, 16167–16180.
- [59] Y. Kliger, A. Aharoni, D. Rapaport, P. Jones, R. Blumenthal, Y. Shai, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 13496–13505.
- [60] M. Pritsker, P. Jones, R. Blumenthal, Y. Shai, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 7287–7292.
- [61] C. D. Strader, T. M. Fong, M. R. Tota, D. Underwood, R. A. F. Dixon, *Annu. Rev. Biochem.* **1994**, 63, 101–132.
- [62] D. Salom, D. T. Lodowski, R. E. Stenkamp, I. Le Trong, M. Golczak, B. Jastrzebska, T. Harris, J. A. Ballesteros, K. Palczewski, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, 103, 16123–16128.
- [63] T. E. Hebert, S. Moffett, J. P. Morello, T. P. Loisel, D. G. Bichet, C. Barret, M. Bouvier, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 16384–16392.
- [64] N. I. Tarasova, W. G. Rice, C. J. Michejda, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 34911–34915.
- [65] V. Cherezov, D. M. Rosenbaum, M. A. Hanson, S. G. Rasmussen, F. S. Thian, T. S. Kobilka, H. J. Choi, P. Kuhn, W. I. Weiss, B. K. Kobilka, R. C. Stevens, *Science* **2007**, 318, 1258.
- [66] A. W. Partridge, S. C. Liu, S. Kim, J. U. Bowie, M. H. Ginsberg, *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 7294–7300.
- [67] B. H. Luo, T. A. Springer, J. Takagi, *PLoS Biol.* **2004**, 2, 776–786.
- [68] R. Li, R. Gorelik, V. Nanda, P. B. Law, J. D. Lear, W. F. DeGrado, J. S. Bennett, *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 26666–26673.
- [69] R. I. Litvinov, G. Vilaire, W. Li, W. F. DeGrado, J. W. Weisel, J. S. Bennett, *Biochemistry* **2006**, 45, 4957–4964.
- [70] H. Yin, R. I. Litvinov, G. Vilaire, H. Zhu, W. Li, G. A. Caputo, D. T. Moore, J. D. Lear, J. W. Weisel, W. F. DeGrado, J. S. Bennett, *J. Biol. Chem.* **2006**, 281, 36732–36741.
- [71] T. Kortemme, D. Baker, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, 8, 91–97.
- [72] J. M. Shifman, S. L. Mayo, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 13274–13279.
- [73] J. Reina, E. Lacroix, S. D. Hobson, G. Fernandez-Ballester, V. Rybin, M. S. Schwab, L. Serrano, C. Gonzalez, *Nat. Struct. Biol.* **2002**, 9, 621–627.
- [74] N. L. Ogiwara, G. Ghirlanda, J. W. Bryson, M. Gingery, W. F. DeGrado, D. Eisenberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, 98, 1404–1409.
- [75] H. Yin, J. S. Slusky, B. W. Berger, R. S. Walters, G. Vilaire, R. I. Litvinov, J. D. Lear, G. A. Caputo, J. S. Bennett, W. F. DeGrado, *Science* **2007**, 315, 1817–1822.
- [76] C. J. Michejda, N. I. Tarasova, G. Amadei, R. Seth, *Eur. J. Cancer* **2002**, 38, S120–S120.
- [77] N. I. Tarasova, R. Seth, S. G. Tarasov, T. Kosakowska-Cholody, C. A. Hrycyna, M. M. Gottesman, C. J. Michejda, *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 3768–3775.
- [78] H. Yin, A. D. Hamilton, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 4200–4235; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 4130–4163.
- [79] S. Bhosale, A. L. Sisson, P. Talukdar, A. Fürstenberg, N. Banerji, E. Vauthey, G. Bollot, J. Mareda, C. Röger, F. Würthner, N. Sakai, S. Matile, *Science* **2006**, 313, 84–86.
- [80] H. Yin, G. I. Lee, H. S. Park, G. A. Payne, J. M. Rodriguez, S. M. Sebt, A. D. Hamilton, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 2764–2767; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 2704–2707.
- [81] H. Yin, G. I. Lee, K. A. Sedey, O. Kutzki, H. S. Park, B. P. Orner, J. T. Ernst, H. G. Wang, S. M. Sebt, A. D. Hamilton, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 10191–10196.
- [82] H. Yin, G. I. Lee, K. A. Sedey, J. M. Rodriguez, H. G. Wang, S. M. Sebt, A. D. Hamilton, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 5463–5468.
- [83] L. Cristian, J. D. Lear, W. F. DeGrado, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 14772–14777.