

Biotransformation an Polymer-Peptid-Konjugaten – ein universelles Werkzeug zur Mikrostrukturkontrolle**

Hans Kühnle und Hans G. Börner*

Die aktuelle Entwicklung, Peptide und Proteine für materialwissenschaftliche Anwendungen zu instrumentalisieren, hat den Weg zu maßgeschneiderten Polymer-Peptid-Konjugaten geebnet.^[1] Solche Biokonjugate bieten vielversprechende Möglichkeiten, definierte Nano- und Mikrostrukturen zu bilden. Dies könnte die Übertragung des biomimetischen Konzepts „Struktur erzeugt Funktion“ und damit die Realisierung komplexer funktionaler Systeme ermöglichen.^[2,3] Darüber hinaus können Biokonjugate enzymatisch aktiv sein, gerichtete Leitfähigkeit erzeugen oder bioaktive Oberflächen generieren.^[3,4] Des Weiteren eignen sie sich zur Steuerung der Silicatmorphogenese und von Kristallisationsprozessen, sie können transmembrane Kanalsysteme nachahmen, aber auch als Wirkstofftransporter für pharmazeutisch aktive Substanzen dienen.^[5]

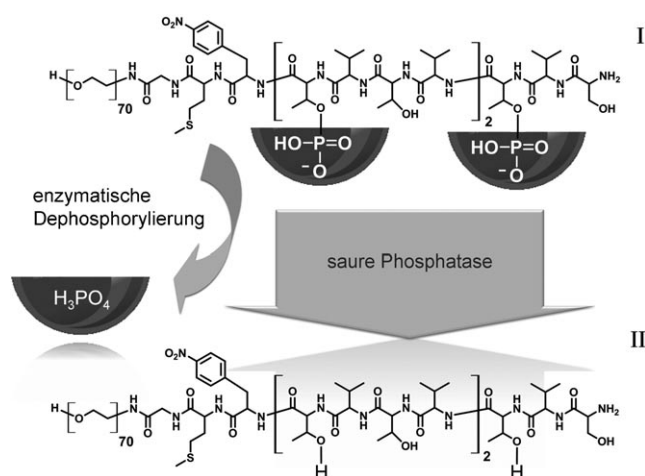
Bisher hat bei Biokonjugaten die Erzeugung spezifischer Funktionen im Vordergrund gestanden, doch nun spielt die Regulierung dieser Funktionen eine zunehmend wichtigere Rolle. So ist bereits eine thermische Steuerung von Protein-Ligand Wechselwirkungen bei Polymer-Protein-Konjugaten gelungen.^[6]

Lynn et al. nutzten als Erste das Aggregationsverhalten des Amyloidpeptids A β 1–42, um Polyethylenoxid(PEO)-Peptid-Konjugate kinetisch kontrolliert in Kern-Schale-Nanofasern zu organisieren.^[7] Diese peptidgeleitete Organisation konnte durch ein geeignetes Schaltkonzept weiterentwickelt werden.^[8,9] Dazu wurden während der Synthese temporäre Strukturdefekte in das Peptidrückgrat eingebaut, die die Selbstorganisation von Peptidaggregationsdomänen im Biokonjugat unterdrückten. Ein pH-kontrollierter Schaltvorgang löste eine O \rightarrow N-Acyl-Umlagerung im „Switch“-Estersegment (Strukturdefekt) aus und stellte das natürliche Peptidrückgrat und damit die Funktion der Aggregationsdomäne wieder her. Mit diesem Schaltprinzip konnte die Kinetik der Selbstorganisation von Biokonjugaten

sowohl in Wasser als auch in einigen organischen Lösungsmitteln gesteuert werden. Somit ließen sich einheitliche Aggregate mit komplexer und hierarchischer Struktur aufbauen.^[9,10]

Für die Entwicklung neuer Regulationsmechanismen haben Prinzipien der posttranslationalen Proteinmodifikation ein enormes Potenzial.^[11] Insbesondere eignen sich die rasch verlaufenden Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen von Serin-, Threonin- oder Tyrosinseitenketten, die in biologischen Systemen Schlüsselschritte z. B. bei der Signalweiterleitung sind.^[12] Erste Studien an Oligopeptiden ergaben, dass der Aufbau von helicalen Bündeln oder Nanoröhren durch enzymatische (De)phosphorylierung kontrolliert werden kann.^[13,14]

Im Folgenden stellen wir das BioSwitch-Konzept vor, bei dem Funktionen von Peptidsegmenten in Polymer-Peptid-Konjugaten durch enzymatische Dephosphorylierung von Phosphothreonin reguliert werden. Als Substrat, das von Phosphatasen erkannt wird, synthetisierten wir ein Polyethylenoxid-*block*-Peptid-Copolymer (PEO-Peptid-Konjugat I, Schema 1), das ein Peptidsegment enthält, dessen Primärstruktur aus fünf Einheiten einer Threonin-Valin-Diade ((TV)₅) besteht. Wegen der ausgeprägten Neigung von Valin und Threonin, β -Faltblattstrukturen zu bilden, und der alternierend hydrophil-hydrophoben Sequenz des Peptidstrangs hat das Peptidsegment eine hohe Tendenz zur Bildung einer β -Faltblattstruktur. Wie Ende der 1990er Jahre beschrieben, sind fünf aufeinander folgende Thr-Val-Bausteine notwendig, um stabile β -Faltblattaggregate in Wasser zu erhalten.^[15] Die Peptidsequenz wurde am C-Terminus mit *para*-Nitrophenylalanin als spektroskopischem Marker versehen und mit



Schema 1. Bedingungen: 0.1 mM Trinatriumcitratpuffer in Millipore-Wasser; pH 4.8–5.0 und ca. 0.5 Einheiten einer sauren Phosphatase.

[*] H. Kühnle, Dr. H. G. Börner
Max-Planck-Institut für Kolloide und Grenzflächen
Wissenschaftspark Golm, 14424 Potsdam (Deutschland)
Fax: (+49) 331-567-9502
E-Mail: hans.boerner@mpikg.mpg.de
Homepage: <http://www.mpikg.mpg.de/kc/boerner/>

[**] Die Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Emmy Noether BO1762/2-3) und der Max-Planck-Gesellschaft unterstützt. Wir danken M. Antonietti, A. Thomas, E. Krause, Welsch & Partner, D. Gebauer, H. Stephanowitz, A. Heilig, R. Pitschke und A. E. F. Wächter, M. Kühnle und Erich C.



Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag (verwendete Materialien, Instrumente, Methoden und die Syntheseprotokolle) sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200805768> zu finden.

Methionin und Glycin verlängert, um ein flexibles Segment zwischen der Aggregationsdomäne und dem PEO-Block zu schaffen.

Die gewählte Peptidsequenz würde in Wasser zweifellos zu kinetisch kontrollierten Aggregaten führen,^[9] doch die hohe Tendenz zur Selbstorganisation konnte vorübergehend durch den Einbau dreier Phosphothreoninreste in die (TV)₅-Aggregationsdomäne unterdrückt werden. Das PEO-Peptid-Konjugat **I** wurde durch inverse Konjugation, mittels semi-automatisierter Festphasenpeptidsynthese unter Verwendung eines PAP-Harzes (PEO-beladenes Polystyrolharz), synthetisiert (Schema S1 in den Hintergrundinformationen): Die Standardaminoäurederivate wurden nach automatisierten Fmoc-Standardprotokollen gekuppelt, und die *O*-Phosphatmodifikationen an Thr³, Thr⁷ und Thr¹¹ mit Fmoc-Thr(PO(OBzl)OH)-OH-Bausteinen eingefügt, wobei manuell im Glasreaktor gekuppelt wurde. Abschließend wurde das vollständig entschiützte PEO-Peptid-Konjugat **I** vom Harz abgespalten und sein chemischer Aufbau durch NMR-Spektroskopie und MALDI-TOF-Massenspektrometrie überprüft (siehe die Hintergrundinformationen).

Das Biokonjugat **I** ließ sich leicht in 0.1 mM Citratpuffer (pH 5.0) lösen. Das auch noch nach sieben Tagen unveränderte Circular dichroismus (CD)-Spektrum bestätigte zum einen eine Knäuelkonformation mit statistischer Kettensegmentverteilung des phosphorylierten Peptidsegments (siehe Abbildung 2 und Abbildung S2 in den Hintergrundinformationen) und deutete zum anderen darauf hin, dass der Aufbau einer β -Faltblattstruktur durch die drei Phosphothreoninreste in der (TV)₅-Aggregationsdomäne effektiv unterdrückt wird. Mikroskopisch wurde die Unterdrückung der Selbstorganisation durch den (TV)₅^{BioSwitch}-Block durch Rasterkraftmikroskopie (AFM) nachgewiesen, mit der selbst nach sieben Tagen keine fibrillären Strukturen zu beobachten waren (Abbildung S2 in den Hintergrundinformationen).

Um den BioSwitch-Prozess zu aktivieren, wurde saure Phosphatase als ein Enzym verwendet, das die Hydrolyse der Phosphatester an den Phosphothreonineinheiten von **I** katalysiert. Die enzymatische Dephosphorylierung des (TV)₅^{BioSwitch}-Segments erzeugt im Biokonjugat das ungestörte

(TV)₅-Segment (Schema 1 und Abbildung 1, **I**→**II**). Die nun aktive Aggregationsdomäne bewirkt die Selbstorganisation des PEO-Peptid-Konjugats. Die aus Kartoffeln gewonnene saure Phosphatase ist eine Orthophosphorsäuremonoesterhydrolase, ein preisgünstiges Gebrauchsenzym mit großer Substrattoleranz und einem Aktivitätsmaximum im sauren Milieu (pH 4–5). Nach der Zugabe des Enzyms zur Lösung von **I** änderte sich die Sekundärstruktur des Peptidsegments rasch. Mit zeitabhängiger CD-Spektroskopie wurde der Übergang von einer statistischen Konformation der Ketensegmente (Knäuel) zur β -Faltblattstruktur untersucht (Abbildung 2).^[13] Für β -Faltblattstrukturen charakteristische

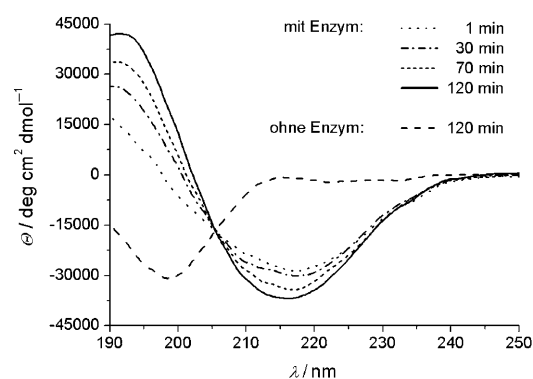


Abbildung 2. Enzymatisch geschalteter Übergang des Peptidsegments von der Knäuel- zur β -Faltblattstruktur, untersucht mit dynamischer CD-Spektroskopie; Bedingungen: **I** in 0.1 mM Citratpuffer ($c[\text{I}]_0 = 0.33 \text{ mg mL}^{-1}$) ohne und mit zugesetztem Enzym ($c[\text{Phosphatase}]_0 = 0.1 \text{ mg mL}^{-1}$ (0.5 U)).

Cotton-Effekte entwickelten sich bei $\lambda = 195$ (+) und 216 nm (–). Dabei stellte sich nach 120 min, ohne erkennbare Inhibitionsphase, eine konstante molare Elliptizität ein. Das Auftreten eines isodichroitischen Punktes in den CD-Spektren verweist auf einen definierten Strukturübergang zwischen zwei diskreten Motiven. Die CD-Spektroskopie deutet also auf einen effektiven BioSwitch-Prozess hin.

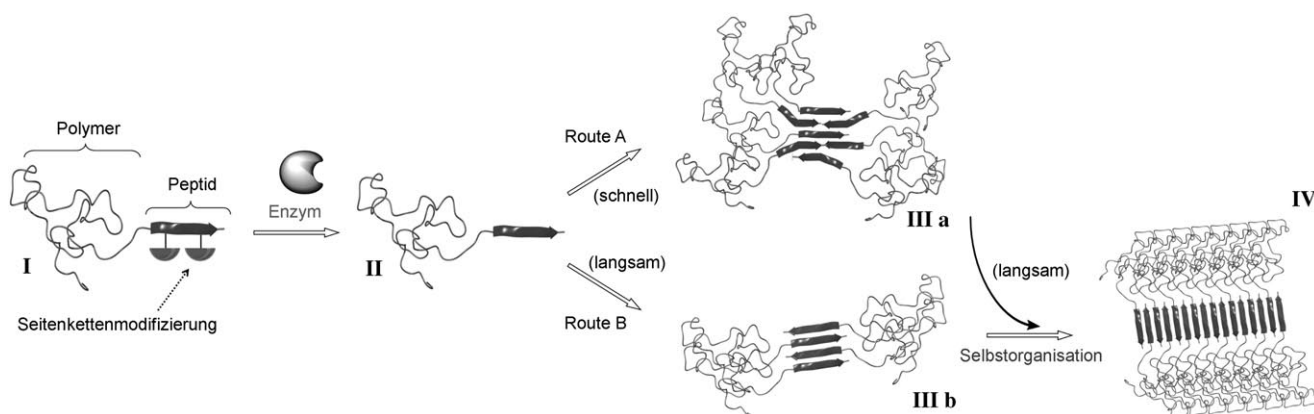


Abbildung 1. Schema des BioSwitch-Prozesses (**I**→**II**) und vorgeschlagener Mechanismus für die Selbstorganisation des aktivierten Biokonjugats (**III**→**IV**). Der Selbstorganisationsprozess teilt sich in zwei mechanistisch differierende Routen A und B auf. Dabei verläuft Route A über partiell ungeordnete Strukturen, wohingegen Route B zur Bildung definierter β -Faltblattstrukturen führt.

Die Biotransformation des PEO-Peptid-Konjugats kann auf molekularer Ebene durch ^{31}P -NMR-Spektroskopie verfolgt werden. Die Dephosphorylierung wurde durch das Verschwinden der für Threonin-*O*-Phosphatester charakteristischen Signale und das gleichzeitige Auftreten des für freie Phosphorsäure typischen Signals bei 0 ppm belegt (Abbildung S4 in den Hintergrundinformationen). Die Menge an freigesetzter Phosphorsäure wurde kolorimetrisch mit dem Molybdat/Malachitgrün-Nachweis bestimmt (Abbildung S5 in den Hintergrundinformationen). Abbildung 3 zeigt einen

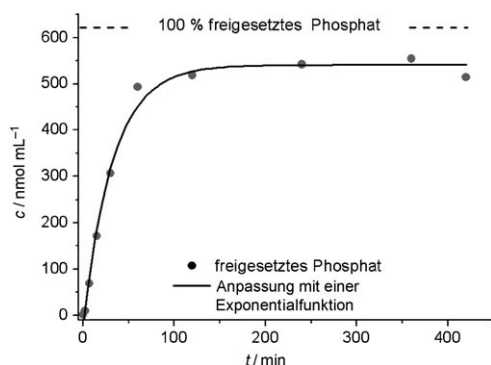


Abbildung 3. Kolorimetrische Bestimmung der freien Phosphorsäure als Indikator für den BioSwitch-Prozess bei der enzymatischen Umwandlung von **I** in **II** ($c[\text{I}]_0 = 1 \text{ mg mL}^{-1}$ in 0.1 mM Citratpuffer (H_2O), $c[\text{Phosphatase}]_0 = 0.1 \text{ mg mL}^{-1}$ (0.5 U)).

sprunghaften Anstieg der Phosphorsäurekonzentration direkt nach Zugabe der Phosphatase und spricht für ein Ende der Reaktion nach etwa 120 min. Die Geschwindigkeit der Dephosphorylierung verringert sich ab einem Umsatz von etwa 82 %. Dies ist möglicherweise auf eine Aggregation des PEO-Peptid-Konjugats zurückzuführen, die den Zugang zu den verbleibenden Phosphatesterresten erschwert. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass das Enzym das Biokonjugat trotz des Polymersubstrats sauber und ohne Inhibitionsphase umsetzt. Zudem korreliert die Dephosphorylierung von **I** direkt mit der Strukturänderung des Peptids, da beide Prozesse innerhalb von rund zwei Stunden ablaufen.

Bemerkenswert ist, dass trotz der raschen Biotransformation des PEO-Peptid-Konjugats und des damit verbundenen simultanen Strukturübergangs im Peptid die Selbstorganisation des Biokonjugats zwar kontrolliert, jedoch wesentlich langsamer abläuft. Die ersten anisotropen Objekte mit Längen von ca. 100 nm wurden durch AFM nach etwa einem Tag beobachtet. Nach etwa fünf Tagen wurden Fasern mit rund 300 nm Länge gefunden. Diese wuchsen innerhalb der folgenden Tage weiter bis zu 2 μm Länge (Abbildung 4 und Abbildung S11 B in den Hintergrundinformationen).

Die Feinstruktur der selbstorganisierten Fasern wurde an Strukturen untersucht, die mindestens sieben Tage nach dem Schaltvorgang erhalten wurden, weil zuvor die Koexistenz von unstrukturiertem Material und Fasern eine exakte Strukturanalyse behinderte. Abbildung 4 zeigt links steife unverzweigte Nanobänder mit Längen bis 500 nm und einheitlichen Höhen von ca. $(2.9 \pm 0.3) \text{ nm}$ (Abbildung S6 in den Hintergrundinformationen). Durch Transmissionselektro-

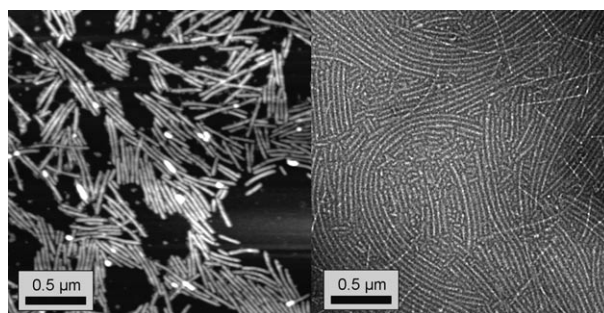


Abbildung 4. Mikrostrukturbildung durch enzymatisch ausgelöste Selbstorganisation von PEO-Peptid-Konjugaten. AFM-Aufnahme nach sieben Tagen (links, Höhenbild, $z = 10 \text{ nm}$) und TEM-Bild nach zehn Tagen (rechts, Strukturen mit Uranylacetat negativ angefärbt).

nenmikroskopie (TEM) wurden die Strukturen bestätigt, wobei als Breite ca. $(16.9 \pm 2) \text{ nm}$ ermittelt wurde (Abbildung S8 in den Hintergrundinformationen). Die dicht gepackten Strukturen weisen zwei Strukturattribute auf (Abbildung 4, rechts): 1) eine kontrastreiche Schale von $2 \times (4.3 \pm 1) \text{ nm}$, die den dicht gepackten PEO-Ketten entspricht, und 2) einen kontrastarmen Kern von $(8.3 \pm 1) \text{ nm}$, der von Uranylacetat nicht angefärbt wird. Analoge Strukturmerkmale wurden bereits bei recht ähnlichen PEO-Peptid-Bändern beobachtet, für die ein hydrophober β -Faltblatt-Peptidkern vorgeschlagen wurde.^[16]

Das Peptidorganisationsmotiv konnte durch TEM-Elektronenbeugung (selected-area electron diffraction, SAED) direkt mit der beobachteten Mikrostruktur korreliert werden. Dabei wurde ein Abstand d von 4.77 \AA gefunden, wie er charakteristisch für den Wiederholungsabstand von Peptid- β -Strängen in einer ausgedehnten β -Faltblattstruktur ist (Abbildung S7 in den Hintergrundinformationen). Das IR-Spektrum stützt diesen Befund mit den für eine β -Faltblattstruktur typischen Amid-I- und Amid-II-Schwingungsbanden (Abbildung S9 in den Hintergrundinformationen). Diese Beobachtungen stimmen mit Beschreibungen der Selbstorganisation von β -Faltblattpeptiden und Peptid-Polymer-Konjugaten in der Literatur überein.^[2,16] Daher schlagen wir eine peptidgeleitete Organisation des Biokonjugats vor, die von der gerichteten Selbstorganisation der Peptidaggregationsdomäne getrieben wird, die ein β -Faltblattmotiv annimmt und die Bildung der faserartigen Nanostrukturen steuert. Frühere Untersuchungen verwandter Systeme haben gezeigt, dass die Breite der Nanobänder durch vollständig gestreckte Peptid- β -Stränge entsteht. Dabei zwingt die antiparallele Anordnung der Peptidstränge die PEO-Ketten zu einer lateralen Packung.^[10,16,17] Die Höhe der Nanobänder von etwa 2.9 nm deutet auf eine Stapelung dieser Kern-Schale-Nanobänder zu Bündeln (doppelten β -Faltblattbändern) hin, wie es bereits bei analogen PEO-Peptid-Konjugaten gefunden wurde.^[9,16] Die gerichtete Stapelbildung von $(\text{TV})_x$ - β -Faltblättern ist vermutlich auf die faciale Amphiphilie von β -Faltblättern zurückzuführen.

Um die Diskrepanz zwischen der Schaltgeschwindigkeit und dem Verlauf der Selbstorganisation zu klären, wurde die Enzymkonzentration von 0.03 über 0.1 auf 0.3 mg mL^{-1} geändert, während alle anderen Parameter konstant gehalten

wurden. Erwartungsgemäß ergab die CD-Spektroskopie eine eindeutige Korrelation der Enzymkonzentration mit der Geschwindigkeit des Knäuel \rightarrow β -Faltblatt-Strukturübergangs (Abbildung S10 in den Hintergrundinformationen): Bei der niedrigsten Enzymkonzentration lief die β -Faltblattbildung innerhalb von 320 min ab, bei der mittleren Konzentration benötigte sie 100 min und bei der höchsten Konzentration 30 min.

Obwohl die Faserbildung wesentlich langsamer ist als der Strukturübergang im Peptidsegment, beeinflusst die Enzymkonzentration den Selbstorganisationsprozess erheblich. Die AFM-Aufnahmen der nach einem, fünf und zehn Tagen entstandenen Mikrostrukturen (Abbildung S11 in den Hintergrundinformationen) belegen, dass die Selbstorganisationsprozesse bei der niedrigsten und der mittleren Enzymkonzentration ähnlich sind: Kleine Faserobjekte mit Längen von rund 100 nm konnten nach einem Tag beobachtet werden, und zwar zusammen mit einer großen Menge polydisperser, globulärer Strukturen, die vermutlich aus ungeordneten Aggregaten von **II** bestehen. Nach fünf Tagen hatten die Faserstrukturen an Länge und Anteil deutlich zugenommen und zeigten in den Folgetagen weiteres Längenwachstum. Die Erhöhung der Enzymkonzentration auf 0.3 mg mL^{-1} beschleunigte den Strukturübergang, doch selbst nach zehn Tagen konnten durch AFM nur ungeordnete Strukturen und keine Fasern gefunden werden.

Diese Ergebnisse können erklärt werden, indem die Selbstorganisation des PEO-Peptid-Konjugats mit der Organisation fehlgefalteter Proteine zu Amyloidfibrillen verglichen wird.^[18] Abbildung 1 fasst den vorgeschlagenen Mechanismus zusammen, der zwei nebeneinander auftretende Organisationswege umfasst. Der BioSwitch-Prozess transformiert das PEO-Peptid-Konjugat von einem Zustand mit unterdrückter Aggregation (**I**) in einen aktiven Zustand mit hoher Aggregationstendenz (**II**). Die aktivierten Biokonjugate können nun entweder zu partiell ungeordneten β -Faltblattstrukturen aggregieren (Route A, **IIIa**) oder, Route B folgend, sich zu definierten β -Faltblattnanostrukturen zusammenfinden (**IIIb**). Während **IIIa** als kinetisch kontrollierter, metastabiler Zustand betrachtet werden kann, verläuft Route B vermutlich thermodynamisch kontrolliert.

Die oben diskutierten Ergebnisse legen nahe, dass unter den gewählten Bedingungen, Route A den frühen Selbstorganisationsprozess dominiert. Wird **I** bei geringer Enzymkonzentration aktiviert – also verhältnismäßig langsam –, wird das zusätzliche Auftreten von Route B plausibel. Als Konsequenz bilden sich geringe Mengen energieärmerer β -Faltblattnanostrukturen (**IIIb**). Diese könnten als Nucleationskeime dienen und die Fibrillogenese induzieren. Das Wachstum der Fasern (**IV**) verläuft unter Verbrauch der partiell ungeordneten β -Faltblattaggregate. Dieser Mechanismus ist in Einklang mit der Beobachtung, dass Route A bei hoher Enzymkonzentration exklusiv favorisiert ist. Es scheint verständlich, dass eine schnelle Aktivierung von **I** Route B vollständig unterdrückt, was die Bildung von Nucleationskeimen verhindert und das Ausbleiben der Faserbildung erklärt. Weitere Studien, z. B. zeitabhängige Lichtstreuung und analytisches Ultrazentrifugieren in Kombination mit Nucleationsexperimenten, sind notwendig, um den vorgeschla-

genen Mechanismus zu bestätigen. Dennoch ist die Analogie zur Amyloidbildung bereits deutlich erkennbar, bei der „infektiöse“ Proteinaggregate diskutiert werden, die die Bildung ausgedehnter β -Faltblattstrukturen induzieren oder katalysieren.

Wir haben hier eine Strategie vorgestellt, um spezifische Funktionen von Peptidsegmenten in Polymer-Peptid-Konjugaten mit Enzymen zu aktivieren oder zu regulieren. Hierzu wurde ein Polyethylenoxid-Peptid-Konjugat mit einer (Thr-Val)₅-Aggregationsdomäne hergestellt. Die Phosphorylierung von drei Threoninseitenketten unterdrückte effizient die Selbstorganisation des Biokonjugats, die durch Hydrolyse der Threoninphosphatester mit dem Enzym Phosphatase aktiviert wurde. Damit konnte ein effizienter Schalter entwickelt werden, mit dem sich Mikrostrukturbildung enzymatisch kontrollieren lässt.

Während die vorliegende Studie die Wichtigkeit von regulatorischen Strategien verdeutlicht, weist die molekulare Biochemie ein großes Repertoire an hochspezifischen Enzymen auf, die zur Funktionskontrolle, Transformation, Modulation oder Vernetzung von Peptiddomänen genutzt werden können. Um dieses Ziel zu erreichen, werden gegenwärtig Enzyme bezüglich ihrer Eignung zur Steuerung von Aggregationszuständen, Bioaktivität, Adsorptions- und Bindungseigenschaften getestet.

Eingegangen am 27. November 2008

Online veröffentlicht am 8. Juli 2009

Stichwörter: Amyloidpeptide · Biokonjugate · Enzyme · Nanofasern · Signaltransduktion

- [1] a) J.-F. Lutz, H. G. Börner, *Prog. Polym. Sci.* **2008**, *33*, 1; b) H.-A. Klok, *J. Polym. Sci. Part A* **2005**, *43*, 1; c) J. C. M. van Hest, *Polym. Rev.* **2007**, *47*, 63.
- [2] a) G. M. Whitesides, *Small* **2005**, *1*, 172; b) H. G. Börner, H. Schlaad, *Soft Matter* **2007**, *3*, 394; c) S. Förster, T. Plantenberg, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 712; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 688; d) J. C. M. van Hest, D. A. Tirrell, *Chem. Commun.* **2001**, 1897.
- [3] a) H. Frauenrath, E. Jahnke, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 2942; b) E.-K. Schillinger, E. Mena-Osteritz, J. Hentschel, H. G. Börner, P. Bäuerle, *Adv. Mater.* **2009**, *21*, 1562.
- [4] a) H.-A. Klok, H. Schlaad, *Adv. Polym. Sci.* **2006**, *202*, 160; b) S. Tugulu, P. Silacci, N. Stergiopoulos, H. A. Klok, *Biomaterials* **2007**, *28*, 2536; c) J. Hentschel, K. Bleek, O. Ernst, J.-F. Lutz, H. G. Börner, *Macromolecules* **2008**, *41*, 1073.
- [5] a) S. Kessel, A. Thomas, H. G. Börner, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 9181; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 9023; b) M. G. Page, N. Nassif, H. G. Börner, M. Antonietti, H. Cölfen, *Cryst. Growth Des.* **2008**, *8*, 1792; c) J. Couet, J. D. Jeyapakash, S. Samuel, A. Kopyshev, S. Santer, M. Biesalski, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 3361; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 3297; d) L. Hartmann, S. Häfele, R. Peschka-Süss, M. Antonietti, H. G. Börner, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 2025.
- [6] P. S. Stayton, T. Shimoboji, C. Long, A. Chilkoti, G. H. Chen, J. M. Harris, A. S. Hoffman, *Nature* **1995**, *378*, 472.
- [7] T. S. Burkoth, T. L. S. Benzinger, V. Urban, D. G. Lynn, S. C. Meredith, P. Thiyagarajan, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 7429.
- [8] a) M. Mütter, A. Chandravarkar, C. Boyat, J. Lopez, S. Dos Santos, B. Mandal, R. Mimna, K. Murat, L. Patiny, L. Saucedo, G. Tuchscherer, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 4267; *Angew.*

- Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 4172; b) Y. Sohma, M. Sasaki, Y. Hayashi, T. Kimura, Y. Kiso, *Chem. Commun.* **2004**, 124.
- [9] J. Hentschel, E. Krause, H. G. Börner, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 7722.
- [10] J. Hentschel, H. G. Börner, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14142.
- [11] a) P. M. Gallop, M. A. Paz, *Physiol. Rev.* **1975**, *55*, 418; b) R. B. Rucker, C. McGee, *J. Nutr.* **1993**, *123*, 977; c) J.-H. Kim, S. Lee, K. Park, H. Y. Nam, S. Y. Jang, I. Y. K. Kim, H. Jeon, R.-W. Park, I.-S. Kim, K. Choi, I. C. Kwon, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 5881; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 5779.
- [12] a) A. C. A. Roque, C. R. Lowe, *Biotechnol. Bioeng.* **2005**, *91*, 546; b) M. Gallego, D. M. Virshup, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2005**, *17*, 197.
- [13] R. S. Signarvic, W. F. DeGrado, *J. Mol. Biol.* **2003**, *334*, 1.
- [14] a) Z. M. Yang, G. L. Liang, L. Wang, X. Bing, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 3038; b) R. J. Mart, R. D. Osborne, M. M. Stevens, R. V. Ulijn, *Soft Matter* **2006**, *2*, 822.
- [15] K. Janek, J. Behlke, J. Zipper, H. Fabian, Y. Georgalis, M. Beyermann, M. Bienert, E. Krause, *Biochemistry* **1999**, *38*, 8246.
- [16] a) D. Eckhardt, M. Groenewolt, E. Krause, H. G. Börner, *Chem. Commun.* **2005**, 2814; b) A. Agelli, I. A. Nyrkova, M. Bell, R. Harding, L. Carrick, T. C. B. McLeish, A. N. Semenov, N. Boden, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 11857.
- [17] M. S. Lamm, K. Rajagopal, J. P. Schneider, D. J. Pochan, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 16692.
- [18] a) J. D. Harper, P. T. Lansbury, *Annu. Rev. Biochem.* **1997**, *66*, 385; b) F. E. Cohen, K. M. Pan, Z. Huang, M. Baldwin, R. J. Fletterick, S. B. Prusiner, *Science* **1994**, *264*, 530.