

Selbstorganisation von Coiled-Coils in der synthetischen Biologie: Inspiration und Fortschritt

Hana Robson Marsden und Alexander Kros*

Stichwörter:

Coiled-Coils · Molekulare Erkennung ·

Peptide · Supramolekulare Chemie ·

Synthetische Biologie



Die biologische Selbstorganisation ist ein sehr komplexer Vorgang und lässt sich im Grunde als Bottom-up-Synthese verstehen, die biomolekulare Bausteine von präzise festgelegter Form, Größe, Hydrophobie und Funktionalisierung zu Funktionsmaterialien zusammenfügt. Im Bereich der supramolekularen Chemie haben Wissenschaftler von den Selbstorganisationsvorgängen in der Natur gelernt, wie sich das Zusammenspiel vieler kleiner Kräfte beherrschen lässt, um zu komplexen selbstorganisierten Nanomaterialien zu gelangen. Das Coiled-Coil-Motiv ist ein in der Natur weit verbreiteter Baustein, der außerdem ein großes Potenzial in der synthetischen Biologie hat. In diesem Aufsatz untersuchen wir die Rolle des Coiled-Coil-Motivs in der natürlichen Selbstorganisation und fassen zusammen, welche Fortschritte bei der Verwendung dieses Motivs in der Synthese von funktionellen Einheiten, Aggregaten und Systemen erzielt wurden.

1. Einführung

Die synthetische Biologie hat das Ziel, die Eigenschaften komplexer biologischer Systeme zu verstehen und nutzbar zu machen. Wie in diesem Aufsatz erörtert wird, besteht eine hierfür geeignete Strategie in der Verwendung biologischer oder biologisch inspirierter Module zur Selbstorganisation funktioneller synthetischer Systeme. Unser Hauptaugenmerk liegt auf einem der vielseitigsten dieser biologischen Module, der einfachen Coiled-Coil-Struktur („Superhelix“) von Peptiden. Wir fassen die synthetisch-biologischen Ansätze zusammen, die entwickelt wurden, um Coiled-Coil-bildende Peptide zu funktionellen Einheiten, Aggregaten und Systemen zunehmender Komplexität zusammenzufügen (Abbildung 1).

In der Natur wie auch im Labor bilden sich α -helicale Coiled-Coils durch die Bindung von zwei oder mehr α -helicalen Peptiden. Die Bindung erfolgt in einer spezifischen Weise und bringt einen in wässriger Lösung stabilen Komplex hervor. Die Spezifität der Bindung resultiert aus den Aminosäuresequenzen: Die Mehrheit der Coiled-Coils bildenden Peptide ist durch eine Heptade „a-b-c-d-e-f-g“ gekennzeichnet, die in den Positionen a und d zumeist apolare Aminosäurereste aufweist, woraus eine amphiphile Helix resultiert (Abbildung 2). Die Packung der hydrophoben a,d-Fläche des Moleküls mit einem weiteren Coiled-Coil-bildenden Peptid steuert den Hauptteil der Bindungsenergie bei. Die apolare Fläche der Helix liegt nicht parallel zu Helixachse, sondern windet sich alle 15 nm^[2] einmal um die Helix, sodass die gegenseitige Packung der hydrophoben Streifen zur Bildung individueller α -helicaler Spiralen („coils“) führt. In den Positionen e und g sind vielfach Aminosäurereste mit geladenen Seitenketten anzutreffen, die an den hydrophoben Kernbereich angrenzen, wenn die Peptide in der Coiled-Coil-Konformation vorliegen, und zur Spezifität der Bindung beitragen. Coiled-Coils haben eine „Seil-artige“ Struktur, und jede Heptade verlängert den Komplex um ca. 1 nm. Viele Aspekte der Coiled-Coil-Bindung sind durch die Aminosäuresequenz festgelegt, so z.B. der Oligomerisierungszustand (zwei oder

Aus dem Inhalt

1. Einführung	3051
2. Coiled-Coils in der Natur	3052
3. Coiled-Coils in der synthetischen Biologie	3057
4. Zusammenfassung und Ausblick	3065

mehr Peptide), die Länge (2–200 nm), die Bindungsrichtung (parallel oder antiparallel), Homo- oder Heterobindung, die Stabilität und der Stargrad. Die nichtkovalente Assoziation dieser Peptide ist empfindlich gegenüber Veränderungen der Milieubedingungen, die die elektrostatischen und hydrophoben Wechselwirkungen beeinflussen (pH-Wert, Temperatur, Ionenstärke, Metallionen). Die damit verbundene Vielseitigkeit hat in der Natur zu unzähligen Funktionen von

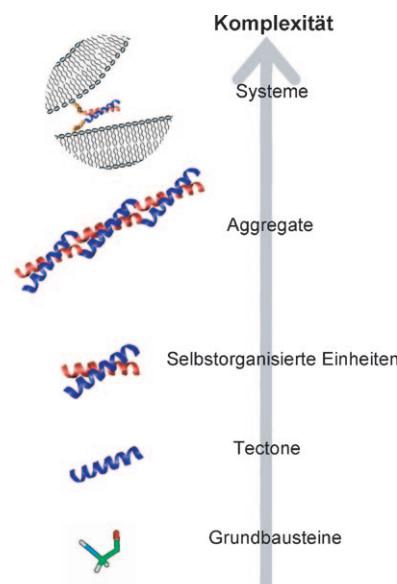


Abbildung 1. Überblick über den Einsatz des Coiled-Coil-Peptidmotivs in der gerichteten Selbstorganisation. In der synthetischen Biologie steht ein breites Spektrum von natürlichen und synthetischen Grundbausteinen zur Verfügung, die eine spezifische Abfolge vom Grundbaustein über Tectone und selbstorganisierte Einheiten bis zu großen Aggregaten durchlaufen. Am Ende der Kette steht der Zusammenschluss mehrerer Aggregate zu einem funktionellen System.^[1]

[*] H. Robson Marsden, Dr. A. Kros
Leiden Institute of Chemistry, Leiden University
P.O. Box 9502, 2300 RA, Leiden (Niederlande)
Fax: (+31) 71-527-4397
E-Mail: a.kros@chem.leidenuniv.nl
Homepage: <http://smc.lic.leidenuniv.nl>

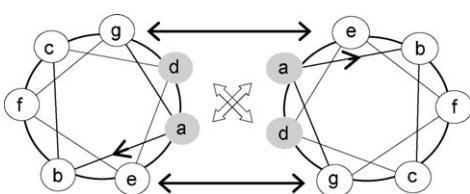


Abbildung 2. Zweidimensionale Helixdarstellung eines parallelen Dimers mit Heptapeptid-Wiederholungseinheiten (Aminosäuren a–g). Die Windung der α -Helices weist in die Papierebene. Die grau unterlegte a,d-Fläche ist überwiegend hydrophob, die Aminosäuren e und g sind oftmals geladen.

Coiled-Coils geführt und auch die synthetische Biologie vielfach inspiriert.^[3]

2. Coiled-Coils in der Natur

Schätzungen, die sich auf die Analyse von Primärstrukturen stützen, haben ergeben, dass 2.5 bis 10 % aller Proteine in Form α -helicaler Coiled-Coil-Motive vorliegen.^[4,5] Bemerkenswert sind α -helicale Coiled-Coils nicht nur wegen ihrer Häufigkeit, sondern auch wegen ihres enormen Spektrums an Funktionen. Die eigentliche Definition der Coiled-Coils (zwei oder mehr α -Helices, die in spezifischer Weise aneinander binden) besagt, dass sie, wo immer man sie antrifft – ob in eukaryotischen oder prokaryotischen Zellen – stets eines gemeinsam haben: Die molekulare Erkennung zwischen zwei oder mehr α -Helices bewirkt, dass die Peptidsegmente als „zellärer Klettverschluss“ wirken, der die Moleküle und subzellulären Strukturen, an die sie kovalent gebunden sind, zusammenhält.^[6] Die Aminosäuresequenz legt die Bindungseigenschaften des „Klettverschlusses“ fest und kann außerdem die anderen, spezifischeren Funktionen der Coiled-Coils modulieren. Kürzere Coiled-Coils fungieren primär als hochspezifische zelluläre Klettverschlüsse, während längere als Bindungsdomänen agieren und meist ein breites Spektrum von Aufgaben in der Zelle wahrnehmen.^[7] Viele der in vivo auftretenden Coiled-Coil-Domänen sind lang und umfassen mehrere hundert Aminosäuren. Proteine enthalten oft eine lange Coiled-Coil-Domäne, die an einem oder beiden Enden von einer globulären Domäne flankiert wird. Im Unterschied zu kurzen Coiled-Coil-Domänen, bei denen es zu einer lateralen Positionierung der Proteingeg-

mente kommt, führen lange Coiled-Coil-Domänen zu stabförmigen supramolekularen Strukturen. Bei Prokaryoten (Organismen ohne Zellkern, z. B. Bakterien) sind nur wenige lange Coiled-Coil-Proteine gefunden worden. Dagegen enthalten Eukaryoten (Organismen mit Zellkern) etliche Arten langer Coiled-Coil-Proteine, darunter Motorproteine, Membranverknüpfungs- und Vesikeltransportproteine, von denen viele eukaryotspezifisch sind.^[6] Obgleich man Tausende von Proteinen kennt, die Coiled-Coil-Domänen aufweisen, ist in der Mehrzahl der Fälle die Funktion der Coiled-Coil-Bereiche nicht bekannt. Die bislang aufgeklärten Funktionen von Coiled-Coil-Domänen sind vornehmlich bindende, strukturelle und dynamische. Alle identifizierten Funktionen werden in den folgenden Abschnitten vorgestellt und an ein oder zwei Beispielen erläutert.

2.1. Proteinbindung

Kurze Coiled-Coil-Domänen finden sich am häufigsten in Form von Oligomerisierungssegmenten, wo sie durch molekulare Erkennung Proteine oder Teile von Proteinen zusammenfügen und so eine große Zahl spezifischer Proteinwechselwirkungen vermitteln.^[7] Diese Coiled-Coil-Domänen können aus nur zwei Heptaden von ca. 2 nm Länge bestehen,^[8] vielfach weisen sie aber sechs oder sieben Heptaden auf (6–7 nm Länge). Die Faltung dieser Domänen zu einem stabilen Komplex kann mit einem intra- oder intermolekularen Bindungsvorgang einhergehen. Ein Beispiel für intramolekulare Bindung ist die Bildung des hydrophoben Kerns bei globulären Proteinen.^[9] Beispiele für intermolekulare Bindung sind die Bildung von Ionenkanal-Signalkomplexen und Transkriptionsfaktoren (Proteine, die an bestimmte Sequenzen eines DNA-Moleküls binden und die Transkription von Genen entweder aktivieren oder reprimieren).^[7,10] Die am ausführlichsten untersuchten Proteine mit Coiled-Coil-Domänen sind die bZIP-Transkriptionsfaktoren. Die Proteine dieser Familie bestehen aus einer „basischen Leucin-Reißverschlussdomäne“ (bZIP; basic region leucine zipper) und einer Aktivierungsdomäne, die das Transkriptionsverhalten eines Gens modifiziert. Die Proteinkomplexe bilden sich durch Dimerisierung der bZIP-Domäne und werden durch eine basische DNA-Sequenz verankert (Abbildung 3). Die Homo- oder Heterodimerisierung von Coiled-Coil-bildenden Domänen in bZIP-haltigen Proteinen bestimmt darüber, welche Aktivierungsdomänen in dem betreffenden



Hana Robson Marsden, geboren 1980 in Neuseeland, studierte Materialwissenschaften an der Victoria University in Wellington (B.Sc. 2001). Danach war sie zwei Jahre bei der Fa. Industrial Research Limited beschäftigt (Hochtemperatursupraleiter), bevor sie sich dem Arbeitskreis Physik neuer Werkstoffe an der Universität Rostock anschloss. Zurzeit promoviert sie bei Alexander Kros über die Selbstorganisation von Coiled-Coil-Peptiden.



Alexander Kros promovierte im Jahr 2000 bei Prof. R. Nolte im Fachbereich physikalische organische Chemie an der Universität Nijmegen (Niederlande). Nach einem Postdoktorat bei Prof. D. A. Tirrell am California Institute of Technology wurde er Assistentenprofessor an der Universität Leiden. Seine Forschungsinteressen gelten der Entwicklung lipidierter Peptide, peptidgestützter Polymere und hydrogelgestützter Wirkstofftransportsysteme sowie, in jüngster Zeit, synthetischen Modellsystemen der Membranfusion.

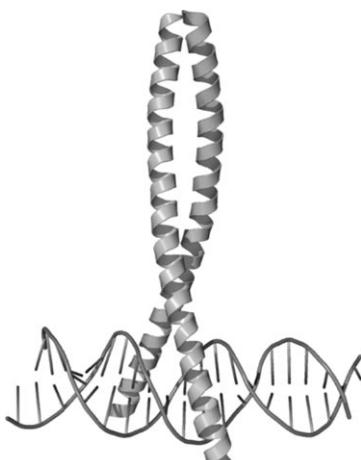


Abbildung 3. Kristallstruktur der heterodimeren bZIP-Domäne des Transkriptionsfaktors c-Fos-c-Jun.^[13,14] Die oberen elf Helixwindungen bilden das Coiled-Coil. Sie sind dafür zuständig, das Protein an den DNA-Strang zu klammern. Die Aktivierungsdomänen sind nicht gezeigt.

Proteinkomplex vorhanden sind, und moduliert so in präziser Weise die Gentranskription.

Die Funktion einer Coiled-Coil-Domäne hängt sehr empfindlich von der Aminosäuresequenz ab. So vermag z. B. die Modifizierung einer einzelnen Aminosäure die Transkriptionsstärke in hohem Ausmaß zu modulieren. In einem Beispiel wurde ein Serylrest in der Position e einer 31 Aminosäuren langen Coiled-Coil-Domäne eines bZIP-Transkriptionsfaktors phosphoryliert, was zu zusätzlichen intra- und interhelicalen elektrostatischen Wechselwirkungen führte. Das Resultat war eine Stabilisierung des Protein-dimers, und infolgedessen band das phosphorylierte Protein mit einer 15fach höheren Affinität an DNA.^[11] Obgleich die Bindung selbst kurzer Coiled-Coils spezifisch ist, ist sie nicht zwangsläufig exklusiv. Es wird z. B. angenommen, dass die Coiled-Coil-Sequenz einiger Signaltransduktionskomplexe in unterschiedlichen Phasen der Signalweiterleitung verschiedene Bindungspartner zulässt.^[12]

2.2. Strukturelle Funktionen

In Anbetracht ihrer stabförmigen Morphologie überrascht es nicht, dass Coiled-Coils eine Funktion als strukturgebende Komponente in der Zelle haben. Bei manchen Proteinen dient die lange Coiled-Coil-Domäne als Abstandhalter, der funktionelle Kopf- und Schwanzdomänen verbindet, räumlich trennt oder exakt positioniert,^[7] sodass etwa bioaktive Komponenten mit Nanometerpräzision angeordnet werden. Ein Beispiel für einen solchen Coiled-Coil-Abstandhalter ist das 8.3 nm lange parallele Homotrimer, dass in *Escherichia coli* die äußere Membran von der Zellwand separiert.^[15] Im Polkörperchen des mitotischen Spindelapparats in Hefezellen wird der Abstand zwischen den Plaques durch die Länge eines parallelen Homodimers innerhalb der Verbindungsproteine festgelegt.^[6,16] Die Aminosäuresequenz der Abstandhalter unterscheidet sich zwischen den Spezies be-

trächtlich, wobei die Positionen a und d noch am ehesten konserviert sind.^[17] Die Sequenzdivergenz ist lediglich dadurch eingeschränkt, dass die Fähigkeit zur Coiled-Coil-Bildung aufrechterhalten bleiben muss, wofür vorrangig die Positionen a und d zuständig sind. Bei den Coiled-Coil-Abstandhaltern handelt es sich oftmals um Homooligomere mit maximierten apolaren und/oder ionischen Wechselwirkungen, die für eine hohe Steifigkeit sorgen.^[18]

Eine bemerkenswert stabile Coiled-Coil-Architektur findet sich an der Oberfläche des Bakteriums *Staphylothermus marinus*, das in marinen Geothermalquellen vorkommt und sein Wachstumsoptimum bei 92°C erreicht.^[19] Das Bakterium ist mit schirmartigen Tetrabrachion-Proteinen überzogen, die aus vier identischen Untereinheiten bestehen und einen 70 nm langen Coiled-Coil-Stiel bilden. Dieser ist über seinen C-Terminus in der Zellmembran verankert und verzweigt sich am N-Terminus zu vier β-Faltblatt-Armen von je 24 nm Länge (Abbildung 4).^[20] Die Arme sind zu einem

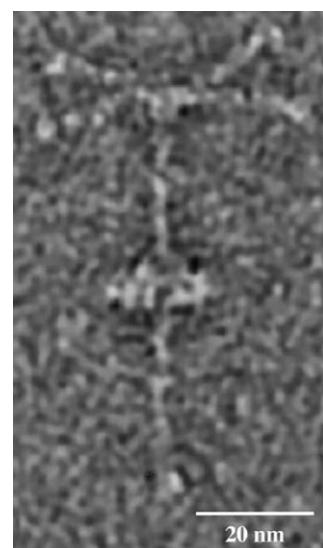


Abbildung 4. Negativ kontrastierte TEM-Aufnahme des Tetrabrachionproteins.^[19] Der 70 nm lange Coiled-Coil-Stiel ist bis 130°C und einer Konzentration von 6 M Guanidinhydrochlorid stabil.^[20] Oberhalb des Coiled-Coil liegen vier β-Faltblattarme. Um die Mitte des Stiels lagern sich in nichtkovalerter Bindung zwei Proteasen.^[21]

Maschenwerk verbunden, das eine halbisolierende Schicht um die Bakterienzelle bildet.^[21] Die Sequenz der Coiled-Coil-Domäne ist so geartet, dass das Tetramer eine bemerkenswerte Stabilität hat und noch bei 130°C oder in Gegenwart stark denaturierender Agentien wie 6 M Guanidiniumhydrochlorid gefaltet bleibt.^[20] Die inneren Bereiche weisen ein beinahe perfektes Muster aus aliphatischen Seitenketten auf – zumeist Leucin oder Isoleucin –, das zur extremen Stabilität beiträgt.^[19] Das Maschenwerk dient vermutlich als eine Art Zytoskelett^[22] und stabilisiert die Lipide und Proteine der Zytosplasmamembran.^[23]

Die Familie der intermediären Filamentproteine zeigt ein hohes Maß an Sequenzdivergenz, allen Strukturen ist aber ein ca. 45 nm langer Coiled-Coil-Abstandhalter gemeinsam.^[24] Intermediärfilamente dimerisieren über die Bildung von

Homo- oder Hetero-Coiled-Coils. Diese parallelen Coiled-Coil-Dimere lagern sich zu ca. 10 nm breiten und mehrere μm langen Filamenten zusammen.^[25] Die Filamente haben eine Persistenzlänge von ca. 1 μm und können bis auf das 3.5fache ihrer Ausgangslänge gedehnt werden. Sowohl die Eigenschaften der Coiled-Coil-Dimere^[24] wie auch die axiale Verschiebung zwischen Dimeren^[26] bedingen die Flexibilität der Intermediärfilamente, und es wird angenommen, dass sie in tierischen Zellen, die keine Zellwand haben, als Spannungs-dämpfer wirken.^[24]

In vielen Coiled-Coil-Proteinen dienen lange Coiled-Coils zum Aufbau von geordneten zweidimensionalen Netzwerken oder dreidimensionalen Gerüsten mit zellstützender Funktion.^[27] Ähnliche wie die Intermediärfilamente können diese zwei- und dreidimensionalen Strukturen mehrere μm lang sein. Ein Beispiel ist das Protein Spektrin, ein Zytoskelettprotein, das eine planare Schicht an der Innenseite der Zellmembran aller tierischer Zellen bildet (Abbildung 5a).^[28]

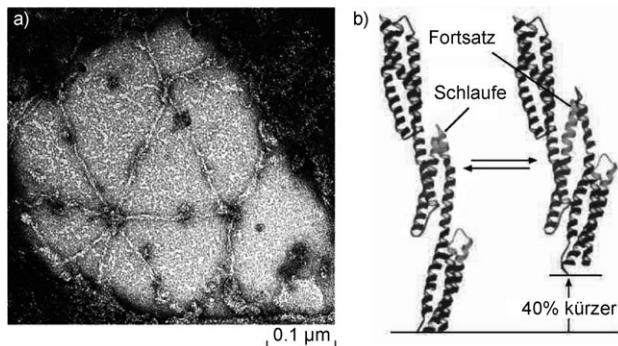


Abbildung 5. a) TEM-Aufnahme eines Membranskeletts. Die Knotenpunkte bestehend aus Actin und das vernetzende Spektringerüst sind deutlich erkennbar. Die dunklen Flecken entlang der Spektrinspeichen kennzeichnen Stellen, an denen das Spektrin mit den Membranproteinen verknüpft ist.^[33] b) Spektrinmosaik bestehen zum großen Teil aus intramolekularen antiparallelen Heterotrimeren. Die Trimerwiederholungen sind dunkelgrau dargestellt; das Segment, das von der Schlaufen- in die α -helicale Konformation umschaltet, ist hellgrau dargestellt.^[30]

Spektrin ist ein Faserprotein, das im Wesentlichen aus mehreren Coiled-Coil-Domänen besteht (je 106 Aminosäuren), die sich zu intramolekularen Coiled-Coil-Trimeren falten (Abbildung 5b). Vier gefaltete Spektrinmoleküle assoziieren end- und seitständig; der Mechanismus dieses Vorgangs ist nicht abschließend geklärt, es scheinen aber keine Coiled-Coil-Wechselwirkungen beteiligt zu sein.^[29] Mehrere Spektrintetramere binden an Verzweigungsstellen des Actins, sodass ein mosaikartiges Membranskelett entsteht (Abbildung 5a), das einerseits mit den Membranproteinen, andererseits mit Proteinen des Zytosplasmas verbunden ist.^[30] Die Bildung der Coiled-Coils ist ein dynamischer Vorgang. Das Protein kann durch Umschalten eines Segments von einer Schlaufen- in eine α -helicale Konformation reversibel seine Form ändern (Abbildung 5b) und beeinflusst so die Assoziation anderer Proteine mit dem Mosaik sowie die lokale Gestalt und Elastizität der Membran.^[30,31] Ein verwandtes Coiled-Coil-Protein wurde in einem Bakterium gefunden, wo

es sich ebenfalls als essenziell für die Gestalt des Zellkörpers erwies.^[32]

Das Protein NuMa enthält die längste bislang bekannte Coiled-Coil-Domäne mit 1485 Aminosäuren und einer Länge von 207 nm. In vitro lagert es sich zu mehrkettigen Oligomeren zusammen, und bei Überexpression in eukaryotischen Zellen bildet es ein dreidimensionales Gerüst mit quasi-hexagonaler Symmetrie, das den gesamten Zellkern ausfüllen kann (Abbildung 6). Dies lässt eine Funktion beim Aufbau der Zellkernmatrix vermuten.^[34]

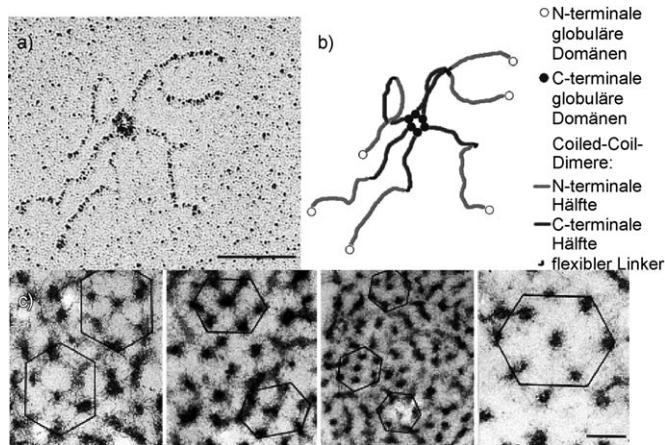


Abbildung 6. a) TEM-Aufnahme und b) schematische Darstellung von mehrarmigen NuMa-Oligomeren, wie sie in vitro erhalten werden. Jeder Arm besteht aus einem homodimeren Coiled-Coil. Maßstab: 100 nm. Die globulären N-terminalen Domänen (Ringe) können an die Zentren benachbarter Oligomere binden, sodass ein Gerüst von Coiled-Coils entsteht. c) Durch Überexpression von NuMa in vivo bildet sich ein dreidimensionales Gerüst, dessen Maschenweite durch die Länge der Coiled-Coil-Domäne festgelegt ist. Maßstab: 200 nm.^[34]

2.3. Dynamische Funktionen

Die zytoskelettalen Motorproteine agieren durch direkte Wechselwirkungen mit dem Zytoskelett. Man unterscheidet drei Klassen zytoskelettaler Motorproteine, die Coiled-Coil-Domänen aufweisen: Myosine, Kinesine und Dyneine.^[7] Die Motorproteine durchlaufen starke Konformationsänderungen, bei denen das dynamische Verhalten der Coiled-Coil-Domänen eine entscheidende Rolle spielt. In jedem Bewegungszyklus des Proteins, der einige 10 ms benötigt,^[35–38] ändert sich die Packung der Coiled-Coil-Bereiche auf die einwirkende Kraft hin.

In Muskelzellen ist das Motorprotein Myosin II für die Erzeugung der kontraktile Kraft an den Actinfilamenten zuständig. Myosin enthält eine globuläre Kopfdomäne und eine ca. 150 nm lange, Coiled-Coil-bildende Schwanzdomäne.^[39] Die Bildung paralleler Homodimere bewirkt, dass die beiden globulären Kopfdomänen, die Motor-Einheiten, assoziieren. Mehrere Coiled-Coil-Schwanzdomänen assoziieren lateral und longitudinal und bilden in einer sehr präzisen Weise dicke Filamente (Myosinfilamente). Die kraftzeugenden Kopfdomänen ragen aus den dicken Filamenten heraus und sind mit einem axialen Abstand von 144 Å helical

um das Filament herum angeordnet (Abbildung 7a). Bei der Aggregation vieler Coiled-Coil-Domänen bestimmen neben der a/d-Grenzfläche auch die äußeren Aminosäuren über die Packung der Moleküle. Tatsächlich sind in Myosin die Positionen b, c, e, f und g stärker konserviert als die Positionen a und d.^[17] Die Aminosäuresequenzen der Coiled-Coil-Domänen von Myosinmolekülen sind so angelegt, dass der N-Terminus des Coiled-Coil-Dimers aus dem Filament herausragt (Abbildung 7b). Die Packung der Coiled-Coil-Domänen

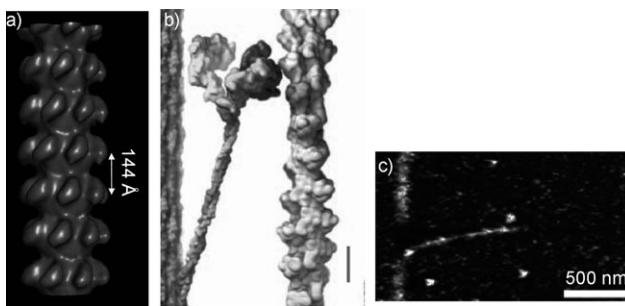


Abbildung 7. a) 3D-Rekonstruktion eines dicken Myosinfilaments (bei entspanntem Muskel) aus elektronenmikroskopischen Einzelpartikelanalysen. Die reguläre Anordnung der Kopfgruppen durch die Packung der Coiled-Coil-Dimere ist deutlich zu erkennen.^[41] b) Modell eines Myosindimers, das aus einem dicken Filament herausragt und an ein Actinfilament (rechts) bindet. Durch die Elastizität der Coiled-Coil-Domäne kann die Kopfgruppe am Actinfilament entlangwandern. Maßstab: 60 Å.^[42] c) Rasterkraftmikroskopie (AFM)-Aufnahme eines Myosinfilaments, das durch lateralen Schub der AFM-Spitze gedehnt und zerriissen wurde.^[40]

sorgt dafür, dass die Myosinkopfgruppen in der richtigen Orientierung und dem richtigen Abstand entlang dem dicken Filament angeordnet werden.^[22] Durch die Flexibilität der Coiled-Coil-Domänen können sich die Kopfgruppen entlang benachbarter Actinfilamente bewegen, wodurch eine Zugspannung erzeugt wird.^[7] In vitro konnte gezeigt werden, dass sich die dicken Myosinfilamente verbiegen und in einem schnellen Vorgang reversibel auf das mehr als 3.5fache ihrer Ursprungslänge ausdehnen (Abbildung 7c).^[39,40] Die Biegebewegung wird von einer Scherung der Coiled-Coil-Dimere innerhalb der dicken Filamente dominiert, während die Streckbewegung mit einer Scherung der Coiled-Coil-Dimere sowie einer Entfaltung der Coiled-Coils und α -Helices erklärt wurde.^[40] Es wurde vorgeschlagen, dass die Speicherung elastischer Energie ein wichtiger Mechanismus für die Minimierung des Energieaufwandes beim Insektenflug ist, und die elastischen Eigenschaften der dicken Myosinfilamente könnten hierbei eine Rolle spielen.^[40]

Beim Myosin muss das Coiled-Coil-Dimer flexibel sein, um sich von den dicken Filamenten wegbiegen zu können. Erst dies macht es den Kopfdomänen möglich, an den Actinfilamenten entlangzuwandern. Beim zweiten Motorprotein, dem Kinesin, spielt das Coiled-Coil eine direktere Rolle. Das Kinesin „schreitet“ sozusagen über die Mikrotubuli der Zelle. Das Kinesinmolekül enthält im Zentrum ein Coiled-Coil mit einer Motordomäne am einen Ende und einer Frachtbindungsdomäne am anderen Ende; es bildet ein

Dimer durch Coiled-Coil-Bindung (Abbildung 8a). Eine kleine Konformationsänderung am vorderen „Fuß“ wird über das als Hebel agierende Coiled-Coil an die hintere Motordomäne übermittelt und dabei verstärkt. Dadurch wird diese

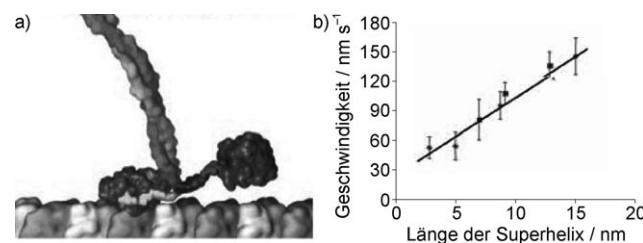


Abbildung 8. a) Konformationswechsel der Kinesin-Motordomäne werden durch das als Hebel agierende Coiled-Coil verstärkt. Der Hebel bewirkt, dass ein zweiter „Fuß“ nach vorn schwingt (die mitgeführte Fracht ist in dieser Darstellung nicht berücksichtigt).^[42] b) Die Geschwindigkeit, mit der sich das Kinesin an einem Mikrotubulus entlangbewegt, hängt von der Länge der Coiled-Coil-Domäne ab.^[43]

nach vorn gezogen, wobei sie die Fracht (z. B. ein Transportvesikel) um 8 nm am Mikrotubulus versetzt.^[42] Die Länge des Coiled-Coil-Hebels legt die Geschwindigkeit der Schreitbewegung fest (Abbildung 8b).^[43] Damit sich die Motordomänen über den Mikrotubulus bewegen können, ist es unabdingbar, dass sich die Stränge des Coiled-Coil-Dimers entwinden können. Um dies nachzuweisen, wurde die natürliche dynamische Domäne gegen ein stabileres Coiled-Coil ausgetauscht: Das Protein wurde praktisch völlig immobil.^[44]

Dyneine, die dritte Klasse von Motorproteinen, enthalten eine ca. 12 nm^[45] lange, antiparallele Coiled-Coil-Domäne in Form eines Stiels, die über eine kleine globuläre Domäne, eine zentrale globuläre Kopfgruppe und einen frachtbindenden Stammbereich an einen Mikrotubulus bindet (Abbildung 9a). Ähnlich wie das Kinesin bewegt sich auch das Dynein in Schritten von 8 nm an den Mikrotubuli entlang.^[46] Die Bewegung des Dyneins ist weniger gut verstanden als die der anderen zytoskelettalen Motorproteine, doch ist bekannt, dass die Mikrotubulusbindedomäne am einen Ende des Coiled-Coil ihre Affinität für Tubulin in Abhängigkeit von Vorgängen an der Kopfgruppe, die sich am anderen Ende des

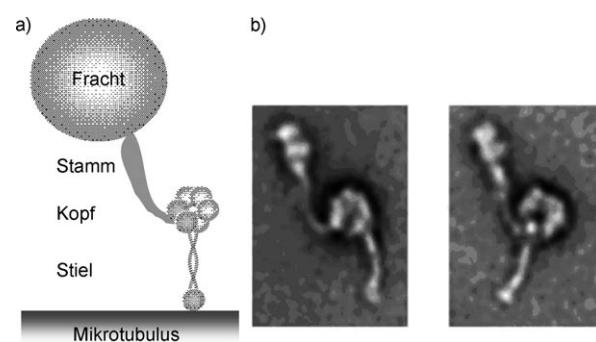


Abbildung 9. a) Das Motorprotein Dynein befördert Fracht entlang von Mikrotubuli. b) Darstellungen von Dynein, rekonstruiert aus negativ-kontrastierten TEM-Aufnahmen. Der Coiled-Coil-Stiel ist vor der Kraftanwendung stabiler (links) als nach der Kraftanwendung (rechts).^[49]

Coiled-Coil befindet, ändert (und umgekehrt). Die strukturellen Veränderungen müssen daher über die ganze Länge des Coiled-Coil-Bereichs als Signal übermittelt werden, was wiederum dynamische Änderungen der Helix-Helix-Wechselwirkungen impliziert.^[47] In jüngerer Zeit wurde gefunden, dass ein Versatz der Coiled-Coil-Stränge um vier Aminosäuren die Mikrotubulusbindung mit der Aktivität der Kopfgruppen verknüpft.^[48] Weiterhin wurde beobachtet, dass vor der Bewegungsphase jedes Zyklus – wenn das Dynein stark an den Mikrotubulus gebunden ist – der Coiled-Coil-Stiel flexibler ist als nach der Kraftausübung. Am Ende des Zyklus ist der Coiled-Coil-Bereich gerader und zeigt eine geringere Standardabweichung seiner relativen Lage, weshalb angenommen wurde, dass er in dieser Phase stabiler ist (Abbildung 9b). Es wurde vorgeschlagen, dass diese Flexibilität das Coiled-Coil in die Lage versetzt, elastische Energie zu speichern, wenn das Molekül Kraft gegen einen Widerstand aufbietet.^[49] Die Länge der Coiled-Coil-Domäne ist hoch konserviert und man nimmt an, dass sie für ihre Funktion zur Kraftweiterleitung optimiert ist.^[22]

Die vorstehend diskutierten Motorproteine dienen sämtlich dem Transport von molekularer Fracht entlang intrazellulärer „Kabel“. Eine weitere Form des intrazellulären Transports, der sich in allen eukaryotischen Zellen findet, ist der vesikuläre Transport. SNARE-Proteine sind Schlüsselkomponenten des vesikulären Transports, da die dynamischen Coiled-Coils, die sich zwischen SNARE-Proteinen bilden, das Andocken der Vesikeln und deren Fusion mit Organellen oder der Zellmembran vermitteln. Die SNARE-Proteine bilden eine große Familie, und man hat in einer einzelligen Parasitenart 27 verschiedene SNARE-Proteine gefunden.^[50] Obgleich die Strukturen und Molekülgrößen der SNARE-Proteine beträchtlich streuen, sind ihre Coiled-Coil-Domänen stark konserviert, und es wird angenommen, dass sie alle nach dem gleichen Mechanismus operieren. Die am besten charakterisierten SNARE-Proteine sind die an der exozytischen Transmitterfreisetzung aus Neuronen beteiligten Vertreter. Eine Art von SNARE-Protein ist mit der Transportvesikelmembran verbunden, ein zweiter Typ mit der Membran der Zielstruktur (hier die Plasmamembran des Neurons), und ein dritter Typ befindet sich frei im Cytoplasma. Zwischen diesen drei Proteinen bildet sich ein sehr stabiler Coiled-Coil-Komplex, der die Membranen zueinander hin zieht (Abbildung 10).^[51] Die Aggregation beginnt mit kaum strukturierten Monomeren (einzelnen Polypeptiden) und ergibt ein Coiled-Coil-Heterotetramer von 6.5 nm Größe.^[18,52,53] Die Energie, die bei der Bildung des stabilen Vierhelixbündels frei wird, reicht aus, um die energetische Barriere des Fusionsvorgangs zu überwinden. Sie liefert genügend Kraft, um die Lipiddoppelschichten zu öffnen und die Membranfusion zu vermitteln, der exakte Mechanismus dieses Vorgang ist aber unbekannt.^[18,53] Nach der Fusion wird das Vierhelixbündel unter Beteiligung von vier Proteinen (und ATP-Energie) wieder gespalten, sodass die SNARE-Proteine erneut verwendet werden können.^[54]

Eine andere Gruppe von Proteinen, die Rab-Proteine, agieren zeitlich vor der Komplexbildung der SNARE-Proteine.^[56] Unter Konformationsänderung wechseln Rab-Proteine zwischen aktiven und inaktiven Konformationen; der

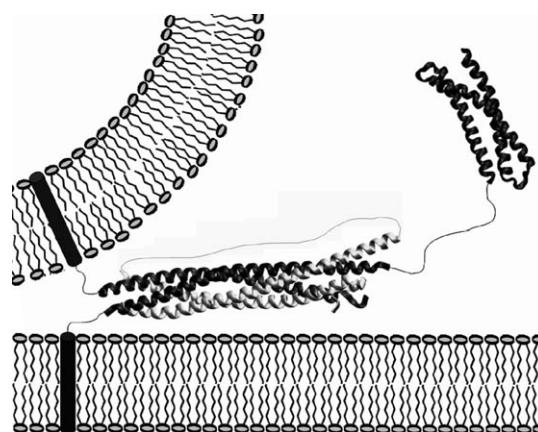


Abbildung 10. Kristallstruktur eines SNARE-Proteinkomplexes^[55] bestehend aus einem Coiled-Coil-Tetramer, das ein Transportvesikel an der Zielmembran verlässt und die zur Freisetzung des Vesikelinhalts führende Membranfusion vermittelt.

Konformationswechsel wird durch spezifische Guaninnukleotidaustauschfaktoren (GEFs) katalysiert. Kürzlich wurden Coiled-Coil-Proteine gefunden, die als GEF-Katalysatoren fungieren, eine Rolle, die für gewöhnlich von strukturell viel komplexeren Proteinen wahrgenommen wird. Die Sec2p-GEF-Domäne bildet ein 22 nm langes, paralleles Coiled-Coil-Homodimer, das zur Katalyse auf eine sehr simple Weise von seinem Coiled-Coil-Motiv Gebrauch macht. Ein kleiner, mittiger Abschnitt des Coiled-Coil bestehend aus 25 Aminosäuren wird gespalten, und dieses Segment bindet dann spezifisch an ein Rab-Protein (Abbildung 11). Die Kontakt-



Abbildung 11. Kristallstruktur der homodimeren Coiled-Coil-Domäne des GEF Sec2p im Komplex mit dem Rab-Protein Sec4p.^[57]

fläche ist hochgradig hydrophob und bedeckt ca. 30 nm² an lösungsmittelzugänglicher Fläche. Die Wechselwirkung induziert durchgreifende Strukturumlagerungen des Rab-Proteins, die das Protein aktivieren. Die Aminosäuren beider Sec2p-Helices, die zur Kontaktfläche beitragen, sind in anderen GEFs stark konserviert, was auf eine ähnliche Wirkungsweise wie von Sec2p hindeutet.^[57]

Auch Viren nutzen das dynamische Verhalten von Coiled-Coils bei ihrem Durchtritt durch Zellmembranen. Die Mechanismen der Coiled-Coil-Bildung sind dabei recht verschieden. Hüllviren (die von einer Lipidmembran umgeben sind) wie das Grippevirus, das Ebolavirus und das Humanimmundefizienzvirus (HIV) fusionieren ihre Membranhülle mit der Plasmamembran von Zellen, um ihr Genom durch pH-abhängige Membranspreizung in die Wirtzelle zu importieren.^[58,59] Ein ausführlich untersuchtes Beispiel ist der

Zellimport des Influenzavirus, das ein paralleles, von globulären Kopfdomänen umgebenes Coiled-Coil-Trimer aufweist, das bei physiologischem pH-Wert in Form 8 nm langer Sporne auf der Oberfläche der Virushülle sitzt (Abbildung 12a). Internalisierte Viren gelangen zunächst in die

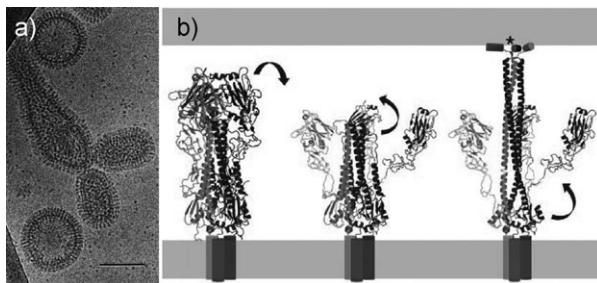


Abbildung 12. a) Kryo-TEM-Aufnahme von Influenzaviren bei 30°C und pH 7.4. Die Coiled-Coils enthaltenden Proteinkomplexe sind als Sporne auf der Oberfläche der Viruspartikel zu erkennen.^[61] b) Wenn ein Virus in ein Endosom eingeschleust wird, sinkt dessen pH-Wert, und die globulären Kopfdomänen dissoziieren vom Coiled-Coil (links). Es bildet sich eine Schlaufenregion (Mitte), wodurch sich das Coiled-Coil streckt und ein Fusionspeptid hin zur Membran des Endosoms schiebt (rechts). Die kristallographisch aufgeklärten Komponenten sind in Bänderdarstellung gezeigt.^[62]

Endosomen, deren interner pH-Wert während der Reifung auf ca. 5 sinkt. Die pH-Änderung führt dazu, dass sich die globulären Kopfgruppen vom Sporn ablösen. Dabei geht eine Schlaufenregion in eine Coiled-Coil-Konformation über, und der Coiled-Coil-Sporn wird irreversibel auf eine Länge von 13.5 nm gedehnt (Abbildung 12b).^[60-62] Die Faltung des Coiled-Coil bewegt ein hydrophobes Fusionspeptid aus einer vergraben, basalen Position um 10 nm in Richtung der Zielmembran,^[60] was die Membranfusion und die Freisetzung der viralen RNA in die Zelle bewirkt.^[63] Man könnte sagen, dass der mittlere Coiled-Coil-Bereich wie ein gespanntes Federgelenk agiert, das durch den pH-Abfall losgelassen wird.

Neuere Ergebnisse deuten darauf hin, dass auch bei anderen als Hüllviren ein solches „Coiled-Coil-Gelenk“, das eine Fusionssequenz nahe an die Zielmembran heranführt, am Zellimport beteiligt ist. Durch welchen Mechanismus in diesen Fällen die Feder ausgelöst wird (d.h. das Coiled-Coil gebildet wird), ist jedoch unbekannt.^[64]

Eine andere Klasse von Proteinen macht sich die temperaturabhängige Spaltung der Coiled-Coils zunutze. Virulente Bakterien registrieren auf ihrer „Invasionsroute“ viele Veränderungen des pH-Werts, der Temperatur und der Osmolarität des Mediums.^[65] Da Coiled-Coils auf Veränderungen ihrer Umgebung reagieren, können sie als Sensoren für Schwankungen des intrazellulären Milieus dienen. Bakterien der Gattung *Salmonella* enthalten das Protein TlpA, das eine N-terminale DNA-Bindungsregion und eine Coiled-Coil-Domäne mit 250 Aminosäuren aufweist.^[65] Diese Domäne hat eine gewisse Ähnlichkeit mit den bZIP-Domänen von Transkriptionsfaktoren, außer dass die TlpA-Domäne nicht nur zur molekularen Erkennung, sondern darüber hinaus auch zur Temperaturwahrnehmung dient. Bei Temperaturen

unter 37°C bildet TlpA ein Homodimer, das sequenzspezifisch an DNA bindet und die Genaktivität unterdrückt (Repressorprotein). Wenn das Bakterium in einen warmen Körper gelangt (d.h. mit einer Temperatur von über 37°C), wird das Homodimer destabilisiert.^[66] Die reprimierende Wirkung entfällt, und die bakterielle DNA ist frei für die Replikation.^[67] Circular dichroismusmessungen haben gezeigt, dass der temperaturinduzierte Dimer-Monomer-Übergang von TlpA reversibel ist: Beim Abkühlen unter die kritische Temperatur erlangt das Protein seine volle α -Helizität und auch seine Repressorfunktion zurück.^[67]

Es ist offenkundig, dass durch ein Modulieren der Wechselwirkungsflächen von α -Helices (durch Ändern ihrer Aminosäuresequenz) ein bemerkenswertes Eigenschaftsspektrum zungänglich ist, und Coiled-Coils werden in Zellen auf zahlreiche Weise genutzt. Coiled-Coils bilden ein-, zwei- und dreidimensionale mechanisch stabilisierende Strukturen im Zellinnern und an der Oberfläche in Form von Stäben, Mosaiken und Gerüsten. Diese supramolekularen Strukturen nehmen auch an Bewegungsvorgängen teil, die eine besonders ausgeprägte Flexibilität erfordern. Manchmal ist es die extreme thermische Stabilität der Coiled-Coils, die sich die Natur zunutze macht, in anderen Fällen kann es ein labiler Strukturwechsel in Abhängigkeit von Temperatur- oder pH-Änderungen sein. Darüber hinaus wirken Coiled-Coils als molekulares Erkennungssystem, das zelluläre Aktivitäten katalysiert. Bei vielen anderen Proteinen ist die biologische Funktion des Coiled-Coil-Motivs nicht klar, und von daher ist zu erwarten, dass in der Zukunft noch diverse weitere Funktionen hinzukommen werden.

3. Coiled-Coils in der synthetischen Biologie

Die Funktionen der oben diskutierten natürlichen Coiled-Coils haben sich im Laufe der letzten 3.8 Milliarden Jahre entwickelt.^[68] Seit den 50er Jahren beschäftigen sich Wissenschaftler damit, die Natur nachzubilden: Indem man die Struktur und Funktion von Proteinen auf die Aminosäuresequenz zurückverfolgt, lassen sich die Regeln für ihre Selbstorganisation ableiten,^[69,70] was den De-novo-Entwurf von Peptiden ermöglicht und so wiederum zu neuen Strukturen und Funktionen führt. Aus Sicht der Synthese besteht die Aufgabe in der Entwicklung von Molekülen, die sich zu wohldefinierten Gebilden mit spezifischen Funktionen organisieren.

Coiled-Coils bieten sich aus vielen Gründen als Kandidaten für die Selbstorganisation zu biosynthetischen Nanogebilden an: 1) Sie haben genau festgelegte Größen, Formen (d.h. Stäbchen von 2 nm Durchmesser mit ca. 1 nm messenden Heptaden) und Oberflächenfunktionalitäten. 2) Die intra- und interhelicalen, nichtkovalenten Wechselwirkungen sind verhältnismäßig gut verstanden. 3) Sie können sich in niedriger Konzentration (sub-nanomolar)^[71] durch Selbstorganisation zu stabilen Strukturen zusammenlagern. 4) Sie können am N- oder am C-Terminus oder über lösungsmittelexponierte Aminosäurereste funktionalisiert werden. 5) Ihre Bindungsaffinitäten und -spezifitäten hängen sehr empfindlich von der Aminosäuresequenz ab. Dieses reiche

Repertoire an kontrollierbaren Eigenschaften bedeutet, dass es einen passenden Coiled-Coil-Baustein für praktisch jede supramolekulare Struktur geben könnte.

Im Kontext der synthetischen Biologie diskutieren wir die Selbstorganisation α -helicaler Coiled-Coils als eine Abfolge von Prozessen, angefangen von der kovalenten Verknüpfung von Grundbausteinen zu Tektonen, über deren hierarchische Selbstorganisation zu aggregierten, funktionellen Einheiten bis hin zur Kombination mit anderen funktionellen Aggregaten zu komplexen Systemen.^[1,72] Die Grundbausteine sind Aminosäuren, die sich in Sequenzen zu Tektonen, den α -Helices, verbinden. Die α -Helices verbinden sich auf nicht-kovalente Weise zu den funktionellen Einheiten – den Coiled-Coils –, die sich dann zu Aggregaten und schließlich zu Systemen zusammenlagern. Im Folgenden fassen wir den Stand der Forschung auf dem Gebiet der synthetischen Biologie von Coiled-Coils zusammen. Wir beginnen mit funktionellen Einheiten, fahren fort mit Aggregaten und stellen schließlich erste Anwendungen von Coiled-Coils in Systemen vor. Dabei behalten wir stets die Parallelen zwischen diesen Fortschritten und den natürlichen Coiled-Coil-Motiven im Auge.

3.1. Funktionelle Coiled-Coil-Einheiten

Das ursprüngliche Ziel bei der Erforschung von Coiled-Coils war, die Strukturen und das Bindungsverhalten natürlicher Coiled-Coils zu verstehen. Beispielsweise wurden von Transkriptionsfaktoren abgeleitete Peptide und andere natürlich auftretende Coiled-Coils mutiert, um ihre Bindungseigenschaften auszuloten. Die Regeln, nach denen die Peptidprimärstrukturen mit den intermolekularen Wechselwirkungen korreliert sind, wurden allmählich sichtbar, und man ging nun vom Austausch einzelner Aminosäuren in natürlichen Sequenzen zum Entwurf völlig neuer, synthetischer Sequenzen über. Die verwendeten Bausteine haben sich dabei immer weiter von den natürlichen Formen und Funktionen entfernt. Viele Coiled-Coil-Bausteine sind auf eine bestimmte Eigenschaft hin entworfen worden, z.B. Länge, Stabilität, Spezifität der molekularen Erkennung, Oligomerisierungsvermögen, Strangorientierung und -konformation. Einige besonders interessante Beispiele werden im Folgenden beleuchtet.

Die meisten der Peptideinheiten, deren Sequenz-Struktur-Beziehungen bislang untersucht wurden, sind kurz mit typischerweise drei bis fünf Heptaden. Im Allgemeinen gilt, dass Peptide mit einer größeren Zahl von Heptaden stabilere Coiled-Coil-Komplexe bilden. Durch Optimieren der Entwurfskriterien (d.h. durch Verstärken der hydrophoben Packung, der Neigung zur α -Helix-Bildung und durch Einsatz geeigneter Endgruppen) konnten sehr kurze Homodimere mit nur zwei Heptaden erzeugt werden.^[73,74] Die kürzesten in der Natur aufgefundenen Coiled-Coils enthalten ebenfalls zwei Heptaden.^[8] Dies scheint die untere Grenze für die Größe dieser funktionellen Einheiten zu sein.

Ein häufiges Ziel ist der Entwurf von Coiled-Coils mit höherer Bindungsstabilität bei sonst gleichbleibenden Eigenschaften des Coiled-Coil. Der häufigste Ansatz hierfür ist

das Optimieren der Primärstruktur. Zum Beispiel führten Aminosäuresubstitutionen der 37 Reste langen Coiled-Coil-Domäne des Transkriptionsfaktors c-Jun^[75] zu einem Anstieg der Schmelztemperatur des Heterodimers Fos/Jun um 37 K. Durch die Analyse unterschiedlicher Aminosäuresequenzen gelangte man zu dem Schluss, dass Mutationen, die das hydrophobe Areal vergrößern und die Stabilität der Helix erhöhen, die Bildung partiell gefalteter, dimerer Intermediate beschleunigen können, und dass nach der Bildung dieses Intermediats verbesserte Coulomb-Wechselwirkungen die thermodynamische Stabilität der gebildeten Coiled-Coil-Struktur erhöhen.^[76] In einem anderen Beispiel verminderte der Ersatz von zwei Aminosäuren an der Position a der 34 Aminosäuren langen Coiled-Coil-Domäne eines DNA-bindenden Proteins die Dissoziationskonstante der Homodimere um einen Faktor 10⁵.^[77]

Künstliche, fluorierte Aminosäuren, die ein großes hydrophobes Areal aufweisen, wurden in rekombinante Coiled-Coil-Peptide eingebaut, was zu einer erhöhten Stabilität bei minimaler struktureller Störung des entstehenden Komplexes führte.^[78,79] Zum Beispiel wurden Isoleucinreste an Kernpositionen eines Peptids, das sich von der bZIP-Domäne des Transkriptionsfaktors GCN4 ableitet, durch 5,5,5-Trifluor-isoleucylreste ersetzt, woraus ein Anstieg der Schmelztemperatur von 27 K resultierte. Affinität und Spezifität der DNA-Bindung waren mit denen des hydrierten Coiled-Coil vergleichbar.

Ein weiterer „künstlicher“ Ansatz zur Erhöhung der Coiled-Coil-Stabilität ist die Modifizierung von Aminosäuren. Ein Beispiel ist die Anbringung der Azobenzolgruppe als intramolekulare Brücke zwischen zwei Aminosäuren in der Position f eines Heterodimers (d.h. lösungsmittelexpansiert und parallel zur Helixlängsachse). Bestrahlen des Peptids führte zu einer Isomerisierung der *trans*- in die *cis*-Form, wodurch die Länge des Peptids auf die der natürlichen helicalen Repeatlänge verkürzt wurde und eine Verstärkung der Helicität gleichbedeutend mit einer verstärkten Coiled-Coil-Faltung stattfand.^[80]

Die Bindung von Metallen an Histidinyl- und Cysteinylreste kann ebenfalls die Stabilität von Coiled-Coils beeinflussen. Eine divalente Bindung von Metallionen an den Positionen *i* und (*i*+4) kann zur Stabilisierung von Coiled-Coils eingesetzt werden, wohingegen eine Bindung an *i* und (*i*+2) destabilisierend wirkt. Die koordinative Bindung von zwei Peptiden an ein einzelnes Metallion kann die Bildung des Coiled-Coil-Komplexes induzieren.^[81]

Coiled-Coil-Komplexe sind spezifisch in Bezug auf die Aminosäuresequenzen der Peptide, die Zahl der assoziierenden Stränge und die Orientierung der Bindungspartner. Ein eindrucksvolles Beispiel für den hohen Grad an Bindungsspezifität, der sich gezielt erreichen lässt, ist die Bildung von drei Heterodimeren in einer Lösung von sechs Peptiden.^[82,83] In einem Fall beruhten die Vier-Heptaden-Peptide auf natürlichen Coiled-Coil-Domänen von Transkriptionsfaktoren, und die Selektivität wurde durch Substitution einer einzelnen Aminosäure in einer Kernposition eingeführt. Neben dem Austausch gegen natürliche (biogene) Aminosäuren kamen auch künstliche, Harnstoff-derivatisierte Seitenketten zum Einsatz, um die Selektivität zu verbessern.^[82]

Aminosäuren mit geladenen Seitenketten sind ganz entscheidende Strukturparameter für die Bildung von Coiled-Coil-Komplexen, und durch Kontrolle der inter- oder intramolekularen Coulomb-Wechselwirkungen über den pH-Wert oder die Zugabe von Salzen lässt sich die Coiled-Coil-Bindung durch die Destabilisierung bestimmter Komplexe modulieren. Viele Hetero-Coiled-Coils erhalten ihre Spezifität aus dem Vorhandensein geladener Streifen, die so entlang dem hydrophoben Kern aufgereiht sind, dass die eine Helix positiv und die andere negativ geladen ist. Die Bildung des Homo-Coiled-Coil wird damit verhindert. Auf diese Weise kann der pH-Wert herangezogen werden, um Coulomb-Wechselwirkungen so zu beeinflussen, dass sich bei neutralem pH-Wert Hetero- und bei niedrigen^[84] und hohen pH-Werten^[85] Homo-Coiled-Coils bilden.

Dieses Konzept des pH-gesteuerten Strangtauschs wurde durch iterative Zyklen, die in spezifischer Weise einen, zwei oder alle drei Helices eines Coiled-Coil-Trimmers ersetzen, weiterentwickelt.^[86] Der Strangtausch kann außerdem so programmiert werden, dass er durch ein Umkippen eines parallelen Trimmers in ein antiparalleles begleitet wird.^[87]

Als Alternative zur elektrostatischen Destabilisierung bestimmter Helixkombinationen kann auch die Zahl der α -Helices in einem Coiled-Coil-Bündel durch den stabilisierenden Effekt der sterischen Packung im hydrophoben Kern, der die treibende Kraft für die Coiled-Coil-Bildung ist, verändert werden. So ist beispielsweise die synthetische Form eines natürlichen Coiled-Coil überwiegend zweisträngig; wird jedoch ein Benzolmolekül in den hydrophoben Kern gebunden, so wird das Coiled-Coil-Trimer zur stabilsten Anordnung, da das Benzolmolekül die innere hydrophobe Oberfläche vergrößert.^[88]

Der Oligomerisierungsgrad kann über die Hydrophobie verändert werden, indem man Aminosäuren an Positionen des hydrophoben Coiled-Coil-Kerns substituiert. Dieser Effekt wurde durch systematische Substitution der 20 natürlichen Aminosäuren in den zentralen a- und d-Positionen eines Homo-Coiled-Coils bildenden Fünf-Heptaden-Peptids untersucht. Die β -verzweigten Aminosäuren Isoleucin, Valin und Threonin mit ihren großen hydrophoben Arealen fördern die Trimerbildung, wohingegen Aminosäuren mit geladenen Seitenketten die Bildung zweisträngiger Coiled-Coils begünstigen.^[89,90] Der Austausch von Aminosäuren mit unterschiedlichen hydrophoben Seitenketten kann ebenfalls über den Oligomerisierungsgrad entscheiden. Der Coiled-Coil-Bereich von GCN4 wurde selektiv mit Valin, Isoleucin und Leucin in den Positionen a und d der Heptaden substituiert. Die Substitutionen führen zu zwei-, drei- und viersträngigen Coiled-Coils, was auf eine sich verändernde Form der hydrophoben Seitenketten und eine dadurch bedingte Veränderung der Packung im Coiled-Coil-Kern zurückgeführt wurde.^[91]

Kleine Veränderungen der Peptidsequenz können auch zu einer unterschiedlichen Orientierung der Coiled-Coil-Bindung führen. So binden beispielsweise die fünf Heptaden der Coiled-Coil-Domäne eines osmosensorischen Transporterproteins in Form eines antiparallelen Homodimers aneinander. Werden zwei geladene Aminosäuren in der Position a der Heptaden durch Isoleucylreste ersetzt, verändert sich die

hydrophobe Packung, Salzbrücken zwischen den Molekülen verschwinden, und die Orientierung des Dimers wechselt von antiparallel zu parallel, was *in vivo* die Inaktivierung des Proteins zur Folge hat.^[92] Eine einzelne Aminosäuresequenz kann ebenfalls dazu gebracht werden, sich zu entweder einem parallelen oder antiparallelen Coiled-Coil zu falten. Zum Beispiel wurde ein intramolekulares antiparalleles Dimer durch eine Disulfidbrücke stabilisiert, und durch chemische Reduktion der Disulfidbildung wurde ein Umlaufen des Peptids in einen parallelen Coiled-Coil ausgelöst.^[93]

Mit Blick auf die Verbreitung und Funktionsvielfalt von Coiled-Coils in Zellen sind viele Wege vorstellbar, um durch gezielte Kontrolle eines Coiled-Coil dessen Funktion *in vivo* zu beeinflussen. In einigen Forschungsgruppen untersucht man z.B. die spezifische Bindung Coiled-Coil-bildender Peptide an Coiled-Coil-Bündel, die für den Viruseintritt in Zellen essenziell sind. Das Ziel dieser Studien ist die Inhibition des Viruseintritts in Zellen.^[94,95] Andere Gruppen befassen sich mit dem Entwurf von Coiled-Coil-Peptiden, die an spezifische Transkriptionsfaktoren binden, um auf diese Weise die DNA-Replikation zu modulieren.^[96]

Ein weiterer Aspekt ist das Umschalten der Sekundärstruktur der Peptide, die so programmiert werden können, dass sie in unterschiedlichen Umgebungen unterschiedliche Strukturen einnehmen.^[97] Der häufigste Konformationswechsel (abgesehen vom Übergang Coiled-Coil \rightarrow Zufallsknäuel) ist der Übergang zwischen Coiled-Coil und β -Faltblatt, der im Allgemeinen durch den Einbau von Aminosäuren mit hoher Neigung zur β -Faltblatt-Bildung in lösungsmittelexponierten f-Positionen erreicht wird. Beim Erwärmen lagern die α -Helices in β -Faltblätter um, die anschließend zu amyloiden Fasern aggregieren.^[98–100] In einem anderen Ansatz wurde ein Peptid, das bei neutralem pH-Wert Homodimere bildet, in der Weise moduliert, dass ein Lysyl- oder Glutamatrest neben dem hydrophoben Kern des Coiled-Coil-Komplexes positioniert wurde. Durch Verändern des pH-Wertes werden diese Reste geladen, wodurch das Coiled-Coil destabilisiert wird und sich in ein Zufallsknäuel oder eine β -Faltblattstruktur umlagert.^[101] Ein reversibler Typ von Sekundärstrukturschalter beruht auf der Umschaltung von Coiled-Coils zu Zinkfingermotiven. Durch Einbringen von Motiven beider Faltungsformen in eine einzelne Sequenz falten stabile Coiled-Coils bei der Bindung eines Metalls in die stärker globuläre Zinkfingerkonformation.^[97,102]

Ein letztes Beispiel von Coiled-Coil-Bausteinen belegt, dass diese Einheiten auch in nichtaggregierter Form hochgradig funktionell sein können. Es wurden selbstreplizierende Molekülkomplexe entwickelt, in denen eine Coiled-Coil-Faltung die Bildung von Peptidbindungen katalysiert und so Replikate der Coiled-Coil-bildenden Peptide erzeugt. Zwei Peptide falten an einer Peptidmatrize, und über einen Cysteinylthioester als Zwischenstufe bildet sich eine Amidbindung zwischen den beiden Fragmenten (Abbildung 13).^[103] Zu den Weiterentwicklungen dieser Methode zählen eine verbesserte Katalyse bei verringertem pH-Wert^[104] oder hoher Ionenstärke,^[105] die Bildung heterodimerer Komplexe,^[106–108] ein Hyperzyklus, in dem zwei selbstreplikationsfähige Peptide wechselseitig die Replikation des anderen ka-

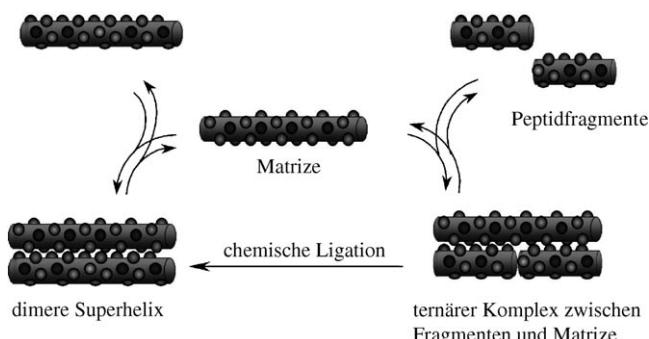


Abbildung 13. Prinzip des autokatalytischen Selbstreplikationszyklus von Coiled-Coils. Peptidfragmente binden an eine Matrize und werden ligiert, was zur Bildung weiterer Matrizen führt und die Replikation katalysiert.^[112]

talysieren,^[109] sowie ein chiralitätsabhängiger Selbstreplikationszyklus. Damit der zyklische Prozess forschreiten kann, müssen die Peptide dissoziieren, nachdem die chemoselektive Ligation erfolgt ist. Um dies zu beschleunigen, wurden um eine Heptade kürzere Peptide eingesetzt.^[110] Eine Alternative ist die Einführung eines Prolyl-Knicks zur Destabilisierung des Coiled-Coil-Komplexes.^[111,112] Ein interessanter Fortschritt ist ein System mit zwei selbstorganisierenden Gruppen: Peptide mit Nucleobasen als Seitenketten. Die Wechselwirkung der komplementären Nucleobasen über Wasserstoffbrücken hatte hier eine Verstärkung der Peptidselbstreplikation zur Folge.^[113]

Die oben skizzierten Beispiele haben gezeigt, wie Forscher das Coiled-Coil-Motiv als natürliche Baueinheit nutzen, um feinste Details der Coiled-Coil-Bindung aufzuklären. Dabei wurde eine große Zahl von Funktionen entdeckt, die chemisch in Coiled-Coil-Einheiten einprogrammiert werden können. Vom Standpunkt des Synthesechemie haben „geplante“ gegenüber natürlichen Peptiden den Vorteil, dass die chemischen, physikalischen und biologischen Eigenschaften des Komplexes über einen weiteren Bereich präzise festgelegt werden können. Aus diesem Grund sind es vornehmlich synthetische Peptide, die beim Aufbau von Strukturen und Systemen höherer Ordnung zum Einsatz kommen. Die folgenden Abschnitte geben eine Übersicht über die Verwendung funktionellen Coiled-Coil-Bausteine zum Aufbau ein-, zwei- und dreidimensionaler Aggregate.

3.2. Coiled-Coil-Aggregate

1997 wurde erstmals über die Selbstorganisation von Coiled-Coil-Bausteinen zu größeren Strukturen berichtet,^[114] was ein völlig neues Forschungsfeld eröffnete. Wie bei den oben besprochenen Coiled-Coil-Einheiten kommen auch bei der Bildung von Coiled-Coil-Aggregaten meist kurze Peptide von drei bis sechs Heptaden Länge zum Einsatz. Zur Untersuchung isolierter Coiled-Coil-Einheiten verwendet man am einfachsten kleine Moleküle; diese sind durch Festphasensynthese rasch zugänglich, und die Auswirkungen, die ein Austausch einzelner Aminosäuren hat, sind leichter auszumachen. Was die Coiled-Coil-Aggregate betrifft, so ist es

wahrscheinlich, dass der Trend hin zu längeren Coiled-Coils und De-novo-Proteinen mit Coiled-Coil-Domänen geht. In diesem Abschnitt geben wir einen Überblick über Coiled-Coil-Aggregate, wobei wir die Strukturen danach unterteilen, ob die Coiled-Coil-Bildung die einzige Triebkraft der Strukturorganisation ist oder ob zwei Selbstorganisationsmotive beteiligt sind.

3.2.1. Bildung von Strukturen durch Coiled-Coil-Faltung

Die ersten Beispiele, die wir betrachten, sind Materialien, die ausschließlich aus Coiled-Coils bestehen. Anschließend beschreiben wir Beispiele von Aggregaten aus Coiled-Coil-Hybriden, die ihren höheren Ordnungsgrad dennoch aus der Coiled-Coil-Faltung ableiten. Eine gut untersuchte Form derartiger Aggregate sind Fasern und Fibrillen.^[1,115–120] Das Feld ist stark von der Natur inspiriert, wo Coiled-Coil-Proteine vielfach die Form von Fasern aufweisen. Beispiele sind die oben beschriebenen Abstandhalter und Intermediärfilamente (siehe Abschnitt 2.2). Eine Methode zum Aufbau langer Coiled-Coil-Stäbe ist die kovalente Verknüpfung mehrerer Coiled-Coil-bildender Peptide, sodass bei der Komplexbildung größere Aggregate resultieren.^[121,122] Helix-Schlaufe-Helix-Peptide wurden durch Disulfidbrücken zwischen Cysteinylresten des Schlaufenbereichs in vierarmige Dendrimere eingefügt. Diese lagern sich zu Fasern mit Durchmessern von nur 5 nm zusammen, die, so wurde postuliert, die Breite eines Komplexes aufweisen und mehrere µm lang sind. In Abhängigkeit von den ionischen Gruppen in der Peptidstruktur (pH-Wert) können Hetero- und Homofasern gebildet werden (Abbildung 14).^[122]

Die stabförmige Struktur langer natürlicher Coiled-Coils wurde auch durch Verwendung von kurzen Homo- oder Hetero-Coiled-Coil-bildenden Peptiden nachgebildet. Die Peptide assoziieren lateral und versetzt, sodass jedes Peptid gleichzeitig an zwei Coiled-Coil-Wechselwirkungen teilnehmen kann. Die entstehenden Fasern sind bis zu mehrere 100 µm lang.^[123–125] Sie bestehen im Allgemeinen aus Coiled-Coil-Bündeln infolge der Wechselwirkungen zwischen den Aminosäuren auf den Außenseiten der Coiled-Coils. Obgleich die natürliche Stabstruktur nachgeahmt werden kann, ist die Nachbildung der Funktionen bislang weitgehend erfolglos geblieben. Mit Blick hierauf richten sich die derzeitigen

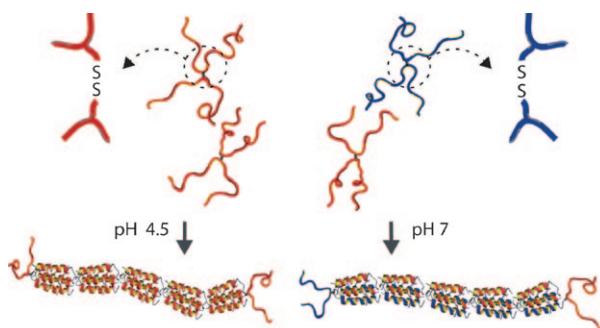


Abbildung 14. Zwei Helix-Schlaufe-Helix-Peptide sind über Cysteinylreste dimerisiert und schließen sich je nach pH-Wert bei der Faltung zu homo- oder heteroassoziierten Fasern zusammen.^[122]

gen Forschungen auf den gezielten Entwurf der Fasermorphologie (z.B. von dünneren und flexibleren Peptidfasern) und den damit im Zusammenhang stehenden Eigenschaften (Abbildung 15a).^[126] Die Funktionalität der Fasern wurde durch Konjugation der Coiled-Coil-bildenden Peptide mit zusätzlichen Molekülen erhöht. So wurden z.B. Fasern mit Rekrutierungsagentien erhalten, die in der Lage sind, in Lösung Proteine zu binden und so gezielt zu lokalisieren (Abbildung 15b).^[127] Eine zusätzliche Funktionalität kann in Form von Knicken und Verzweigungen in die Fasern eingeführt werden (Abbildung 15c).^[128,129] Diese Coiled-Coil-Fasern wurden als Träger für die Abscheidung von Siliciumdioxidschichten bei moderater Temperatur und physiologischem pH-Wert eingesetzt. Nach Entfernen der Peptide (am effektivsten durch eine Protease) blieben hohle, mikrome-

terlange Siliciumdioxidröhren mit Weiten im Nanometerbereich zurück. Die Röhren können je nach Trägerpeptid in gerader, geknickter oder verzweigter Form hergestellt werden.^[130] Die Fibrillen lassen sich auch dazu bringen, bei neutralem pH-Wert in kugelförmige Gebilde überzugehen^[131] oder bei niedrigem pH-Wert zu dissoziieren.^[132]

Führt man spezifische Aminosäuren an exponierten b-, c- und f-Positionen so ein, dass alle in kooperativer Weise an bindenden Wechselwirkungen zwischen Coiled-Coils beteiligt sind, erhält man dreidimensionale Netzwerke. Die physikalischen Eigenschaften der Hydrogele konnten durch den gezielten Entwurf der Gelbildungsmechanismen an den b-, c- und f-Positionen moduliert werden. Wurden Alanylreste in jede der benannten Positionen eingeführt, bildete sich das Netzwerk durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Fibrillen, und das Gel war bis wenigstens 95 °C stabil. Wurden dagegen Glutaminylreste in die genannten Positionen eingebaut, aggregierten die Coiled-Coils über Wasserstoffbrücken, und das resultierende Gel schmolz bereits bei Zimmertemperatur.^[133]

Die meisten der hierarchischen Coiled-Coil-Strukturen sind faserartig.^[134] Eine Variante ist die Verwendung von Dendrimeren, die zu dreidimensionalen Aggregaten führen. Mit Coiled-Coil-Dendrimeren gelangen verhältnismäßig komplexe Selbstorganisationen: Jedes Peptid eines dreiarmigen Dendrimers bildete ein Dimer mit einem komplementären Peptidmonomer, und das Sechs-Helix-Bündel band anschließend durch elektrostatische Wechselwirkungen drei weitere Dendrimerkomplexe. Auf diese Weise lagerten sich supramolekulare, poröse Kugeln von Submikro- bis Mikrometergröße zusammen. Diese „Nanoreaktoren“ wurden zur Bildung von Silberkolloiden verwendet, deren Durchmesser der Porengröße entsprach (Abbildung 16). Da bekannt ist, dass Thiole eine größtenstabilisierende Wirkung auf metallische Kolloide haben, wurde in der f-Position ein Cysteinylrest in die Coiled-Coils eingebaut, und zwar in der Weise, dass die Cysteinylreste in die Hohlräume der Kugeln hineinragten.^[134] Dieser Fall zeigt gewisse Parallelen zum Coiled-Coil-Protein NuMa, das ebenfalls Dendrimeren bildet, die sich zu wohldefinierten dreidimensionalen Netzwerken zusammenschließen und so eine poröse Stützstruktur bilden (Abbildung 6, Abschnitt 2.2)^[34] (obgleich NuMa das längste bekannte Coiled-Coil enthält und das genannte Aggregat aus dem kürzesten bekannten Hetero-Coiled-Coil aufgebaut ist).

Die meisten Selbstorganisationsstrategien unter Verwendung von Coiled-Coils zielen auf die Einflussnahme auf den hydrophoben Kern und die an den Kern angrenzenden, geladenen Aminosäuren. Das obige Beispiel ist insofern abweichend, als die geladenen Aminosäuren für intermolekulare Coiled-Coil-Wechselwirkungen ausgelegt waren. Ein völlig anderes Konzept leitet sich von der Entdeckung amphiphiler Coiled-Coil-bildender Peptide an Wasser-Luft-Grenzflächen ab. Die hydrophobe Fläche der Helix ragt dabei in die Luft, und intra- und intermolekulare Vernetzungen zwischen Histidinylresten stabilisieren die Helices, die an der Grenzfläche einen Film bilden und so den Schaum verstärken. Die Filme werden durch Zusatz eines Chelatbildners oder durch Änderung des pH-Werts (beides löst die Peptid-Metall-Bindung auf) zerstört.^[135] Hier existiert eine Parallele zu den

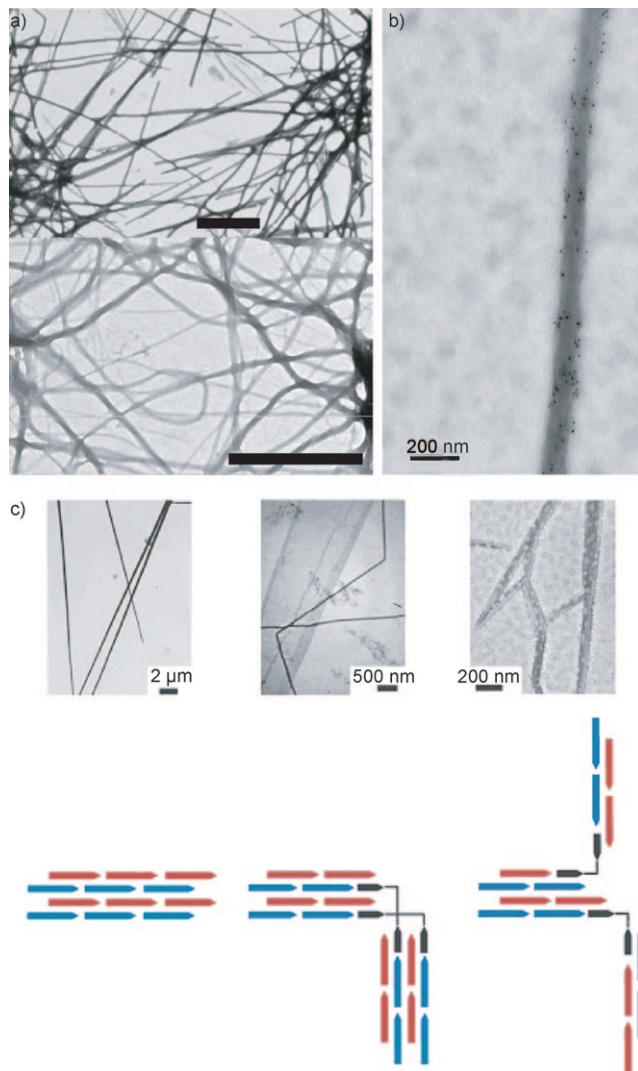


Abbildung 15. a) Die Steifigkeit von Coiled-Coil-Fasern lässt sich in die Aminosäuresequenz einprogrammieren. Negativ-kontrastierte TEM-Aufnahmen; Maßstab: 1 μm.^[126] b) TEM-Mikrophotographie einer Peptidfaser, die mit rekrutierten Proteinen überzogen ist. Zur Visualisierung wurden die Proteine mit Goldpartikeln (5 nm) belegt.^[127] c) TEM-Aufnahmen gerade, geknickter und verzweigter Coiled-Coil-Fasern mit schematischer Darstellung der Aggregationsformen.^[120]

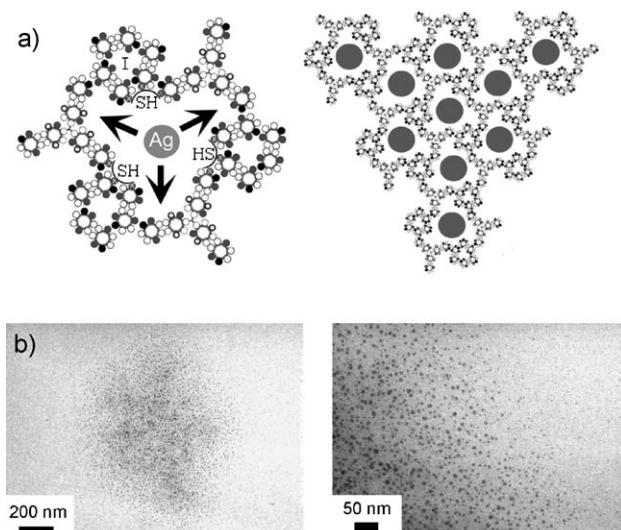


Abbildung 16. a) Coiled-Coil-Dendrimere, die mesoskopische sphärische Partikel bilden, deren Porenräume als Reaktionskammern für nanoskopische Silberpartikel dienen. b) TEM-Aufnahmen der kolloidalen Silberatomcluster, die in den Hohlräumen der Coiled-Coil-Assoziate gebildet wurden.^[134]

kürzlich entdeckten Coiled-Coil-Katalysatoren der GEF-Klasse, bei denen die hydrophobe Coiled-Coil-Grenzfläche zeitweilig gestört wird und an eine hydrophobe Stelle eines Rab-Proteins bindet (siehe Abbildung 11, Abschnitt 2.3).^[57] Ein bedeutsamer Unterschied besteht darin, dass die Protein-Protein-Grenzflächen im Unterschied zum synthetischen Beispiel eine hohe Spezifität beibehalten.

Die weiteren Aggregate, von denen in diesem Abschnitt die Rede sein wird, bestehen aus Coiled-Coil-Hybridien. Die biologische Funktion der Coiled-Coils zur Verknüpfung großer Moleküle und subzellulärer Gebilde wurde durch Coiled-Coil-induzierte Aggregation von Nanopartikeln vielfach nachgeahmt. Das erste Beispiel für eine solche Verwendung von Coiled-Coils war die Dekoration von Goldnanopartikeln mit zwei verschiedenen Dreifachheptaden. Der Zusatz einer komplementären Sechsachseptade zur Lösung führte zur Coiled-Coil-Bildung und Bildung eines reversiblen Netzwerks aus Goldnanopartikeln.^[136] In einem anderen Fall machte man sich die empfindliche Abhängigkeit der Coiled-Coils von den Umgebungsbedingungen zu Nutze, um die Aggregation von Nanopartikeln zu untersuchen. Mit Coiled-Coil-bildenden Peptiden überzogene Goldpartikel vermochten nur bei niedrigem pH-Wert oder in Gegenwart von Metallionen zu aggregieren. Beides vermindert die Ladung an mehreren Glutaminsäureseitenketten (durch Protonierung oder Chelatisierung), wodurch die Bildung von Homo-Coiled-Coils ermöglicht wird.^[137–139] Das gleiche Peptid bildete mit einem komplementären Peptiddendrimer auch ein Hetero-Coiled-Coil, das in Lösung gebracht die Aggregation von Goldpartikeln in wohldefiniertem Abstand induzierte (Abbildung 17). Das vierarmige Dendrimer-Zwischenstück enthält eine zentrale Disulfidbrücke, deren chemische Reduktion in Lösung zur Redispersion der Goldpartikel führt.^[138]

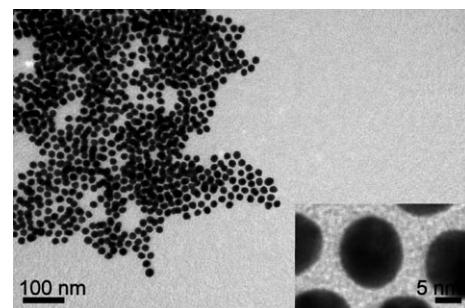


Abbildung 17. Die Aggregation von Goldnanopartikeln lässt sich durch Assoziation/Dissoziation von Coiled-Coils steuern.^[138]

Das Ansprechverhalten von Coiled-Coil-Aggregaten resultiert am häufigsten aus einer direkten Spaltung von Bindungen. Ein jüngeres Beispiel umfasst die Verwendung eines Hetero-Coiled-Coil (mit $T_m > 85^\circ\text{C}$), das an Goldnanokapseln angeheftet ist, die infolge der Coiled-Coil-Bildung aggregieren. Beim Bestrahlen mit Infrarotlicht heizen sich die photothermisch reaktiven Goldnanoschalen auf, die Coiled-Coil-Komplexe denaturieren und die Nanoschalen werden getrennt. Einzelne Nanoschalen, die in gleicher Weise mit Quantenpunkten dekoriert wurden, zeigten beim Bestrahlen eine starke Zunahme der Quantenpunktfluoreszenz, die von einer einzelnen Nanokapsel erzeugte Wärme führte aber nicht zur Dissoziation des Coiled-Coil (Abbildung 18).^[140] Eine solche indirekte photothermische Steuerung der Coiled-Coil-Aggregation kommt in der Natur nicht vor.

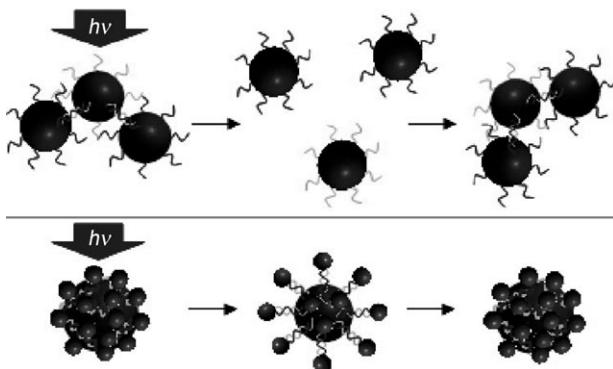


Abbildung 18. Dissoziation von Coiled-Coils, ausgelöst durch beim Bestrahlen von Goldnanoschalen freigesetzte Wärme.^[140]

Coiled-Coils können auch genutzt werden, um andere Objekte miteinander zu verknüpfen. So wurden z.B. Kohlenstoffnanoröhren mit Goldnanopartikeln verknüpft, indem die Partikel mit komplementären, Heterodimere bildenden Peptiden funktionalisiert wurden (Abbildung 19). Daneben waren die Dimere auch in der Lage, Cobalt mithilfe von Histidinylresten zu chelatisieren.^[71] Das Ziel solcher Studien ist die Erzeugung einer Schnittstelle bestehend aus elektrisch leitfähigen Kohlenstoffnanoröhren, die lösliche biomolekulare Analyte detektieren können.

Aggregate aus Coiled-Coils mit großen wasserlöslichen Polymerblöcken sind seit 1998 Gegenstand der Forschung.^[141]

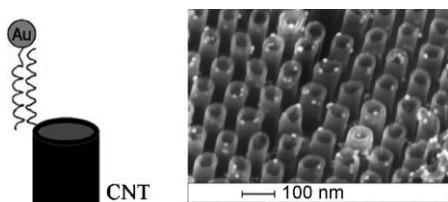


Abbildung 19. Reversible Beschichtung von Kohlenstoffnanoröhren mit Goldnanopartikeln durch Coiled-Coil-Wechselwirkungen; Aufbauprinzip (links) und rasterelektronenmikroskopische Aufnahme (rechts).^[7]

Auch diese Materialien weisen Parallelen zur strukturellen Funktion der zyto- und nukleoskelettalen Coiled-Coil-Netzwerke auf. Die Coiled-Coil-Motive flankieren ein wasserlösliches Protein oder Polymersegment, und die Coiled-Coil-Wechselwirkung erzeugt ein statistisch verknüpftes Netzwerk. Im ersten Beispiel dieser Art wurden zwei Coiled-Coil-bildende Peptide durch ein langes gentechnisch erzeugtes Polypeptid mit Zufallsknäuelstruktur verknüpft.^[141] Diese künstlichen Proteine bilden durch Homodimerisierung Hydrogele.^[141–143] Ein Konstrukt mit starker synthetischem Charakter wurde in einer Folgestudie beschrieben: ein Peptid-Poly(ethylenglycol)-Peptid-Hybrid, das durch Homodimerisierung ein Hydrogel bildet.^[144] Die Reaktion des Coiled-Coil auf Änderungen der Temperatur, des pH-Werts und der Metallionenkonzentration ermöglicht die Phasenumschaltung des Dreiblock-Hybrids zwischen Lösung und Gelzustand. In einer anderen Studie wurden Coiled-Coil-vermittelte Hydrogele aus dem wasserlöslichen Polymer *N*-(2-Hydroxypropyl)methacrylamid erzeugt. Die Coiled-Coils liegen dabei parallel^[145] oder antiparallel zueinander, wobei in letzterem Fall die sterische Häufung der Polymerarme vermindert ist.^[146] Weitere Einzelheiten zur peptidgesteuerten Selbstorganisation von Hydrogelelen können einem kürzlich erschienenen Übersichtsartikel entnommen werden.^[147]

Im Unterschied zu den Coiled-Coil-Netzwerken in der Natur, in denen Coiled-Coils das Strukturgerüst oder die „Arme“ des Netzwerks bilden (z.B. beim Protein Spektrin, siehe Abschnitt 2.2), dienen in den obigen Beispielen synthetischer Netzwerke die Coiled-Coils dazu, die Arme des Netzwerks miteinander zu verbinden. Es gibt nur ein Beispiel, bei dem die synthetische Biologie in dieser Hinsicht der Natur nahekommt. Hierbei wurde eine lange α -Helix des Proteins Keratin (ein Coiled-Coil-Faserprotein) mit einer globulären Zellbindungsdomäne fusioniert und zur Expression gebracht. Das Hybridmolekül wurde mit extrahierten Keratinen, die durch intermolekulare Coiled-Coil-Assoziation α -helicaler Segmente Hydrogele bilden, assembliert (Abbildung 20). Es wurde gefunden, dass neurosphärenbildende Zellen in spezifischer Weise an das modifizierte Keratinhydrogel binden und sich mit einer hohen Überlebensrate vermehren.^[148]

3.2.2. Coiled-Coil-Aggregate mit orthogonaler Selbstorganisation

Proteine, die selbst als Hybride aus zahlreichen selbstorganisierten Baueinheiten aufzufassen sind, operieren nicht isoliert voneinander, denn sie sind in Zellen eingebettet, die aus selbstorganisierten Lipidkompartimenten, selbstorgani-

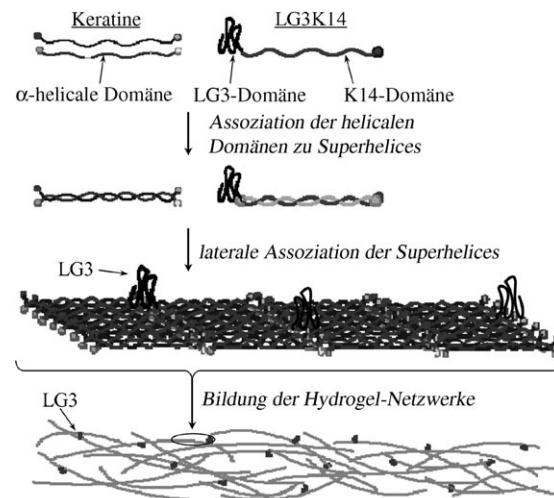


Abbildung 20. Durch die Fusion eines natürlichen Keratinpeptids mit einer Zellbindungsdomäne lassen sich die Eigenschaften eines Keratinhydrogels modifizieren.^[148]

sierten Nucleotiden usw. bestehen. In der synthetischen Biologie der Coiled-Coils lässt sich die Komplexität von Strukturen durch hierarchische Selbstorganisation „intelligenter“ Nanostrukturen erhöhen, wobei sowohl Coiled-Coil-Bildung als auch die Eigenschaften der übrigen Bausteine eine essenzielle Rolle spielen.

Ein interessantes Hydrogel wurde erzeugt, das aus sternförmigem, mit einem lysinreichen Peptid funktionalisiertem Poly(ethylenglycol) (PEG) besteht. Das Peptid faltet zu einem Coiled-Coil-Homodimer, das seinerseits durch elektrostatische Wechselwirkungen an ein Polysaccharidsegment (Heparin) eines zweiten sternförmigen PEG bindet, sodass ein Hydrogel resultiert (Abbildung 21). Dies ist eines der wenigen Beispiele, bei denen Coiled-Coils auf anderem Weg als durch Coiled-Coil-Bildung eine Selbstorganisation vermitteln.^[149]

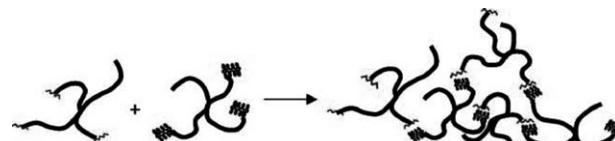


Abbildung 21. Bildung eines Hydrogels durch Coiled-Coil-Polysaccharid-Bindung.^[149]

Es wurden Hydrogele konstruiert, in denen polypeptidische Abstandhalter durch zwei Arten von Knotenpunkten miteinander verbunden sind: durch Coiled-Coil-bildende Peptide oder durch ein dimerisierendes Enzym (hier: SLAC-Protein). Die proteinbasierten Knotenpunkte haben eine zusätzliche Funktion, nämlich die Coiled-Coils über Histidinylreste mit Osmium-Einheiten zu chelatisieren, die die Hydrogele leitfähig machen. In seiner dimeren Form zieht das Enzym Elektronen für die bioelektrokatalytische Reduktion von Disauerstoff zu Wasser heran, mit möglichen Anwendungen in Brennstoffzellen (Abbildung 22).^[150]

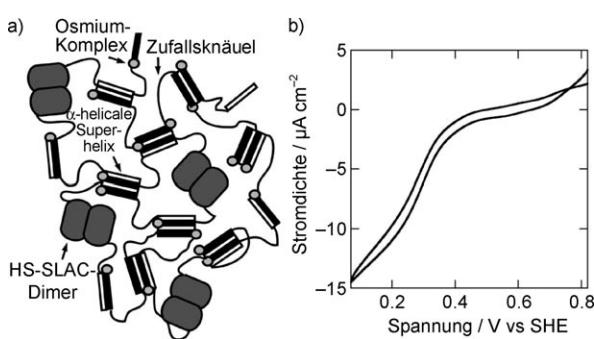


Abbildung 22. a) Aufbau eines supramolekularen Hydrogels, dessen Gelbildung durch Coiled-Coil-Faltung und Enzymdimerisierung vermittelt wird.^[150] b) Das gemischte Hydrogel erzeugt eine katalytische Umgebung für die Reduktion von Disauerstoff zu Wasser.

Die Triebkraft für die Selbstorganisation von Coiled-Coils und auch für die im vorangegangenen Absatz beschriebene Enzymdimerisierung ist die dadurch erfolgende Abschirmung von hydrophoben Aminosäuren. Dennoch sind diese amphiphilen Blöcke noch immer wasserlöslich und beeinflussen sich gegenseitig nicht. Die Enzymbindung verläuft auf gleiche Weise wie in Abwesenheit des Coiled-Coil und umgekehrt. Rund zehn Jahre, nachdem erstmals die Verknüpfung eines synthetischen Polymers mit einem Coiled-Coil beschrieben wurde,^[144] hat man erstmals untersucht, ob auch Coiled-Coils mit hydrophoben Polymerblöcken verbunden werden können.^[151] In diesem Fall beeinflussen sich die Selbstorganisation des Coiled-Coil und des hydrophoben Blocks gegenseitig. Ein heterodimeres Peptid wurde mit Polystyrol und ein zweites mit Poly(ethylenglycol) gekuppelt, und ihre Coiled-Coil-Bildung führte zu einem nichtkovalenten, amphiphilen Dreiblock-Copolymer, das weiter zu stabförmigen Micellen aggregierte, die sich als temperaturabhängig erwiesen (Abbildung 23).

3.3. Coiled-Coil-Systeme

Das Ziel der synthetischen Biologie ist die Erschaffung funktioneller Systeme, und dies erfordert die Wechselwirkung mehrerer selbstorganisierter Komponenten. Die Aufgabe besteht also darin, Bausteine oder Aggregate, wie die in den obigen Abschnitten beschriebenen, mit anderen selbstorganisierten Strukturen so zu verbinden, dass sich die Eigenschaften der Komponenten zu einem funktionellen System kombinieren. Alle bislang entwickelten Systeme sind relativ einfach, denn sie basieren zumeist auf Coiled-Coil-Einheiten, kaum jedoch auf Aggregaten. Zudem zielen die bisher entwickelten Systeme lediglich auf die Modifizierung oder Modellierung natürlicher Vorgänge ab: Es existiert noch kein synthetisch-biologisches System, das einen originären Zweck hätte.

Wissenschaftler machen sich die synthetische Biologie der Coiled-Coils seit einiger Zeit zu Nutze. Eine Technik zur Visualisierung von Proteinkomplexen in lebenden Zellen ist die biomolekulare Fluoreszenzkomplementation, die darauf beruht, dass spezifisch assoziierende chemische Einheiten an Proteinfragmente fusioniert werden und die Wechselwirkung

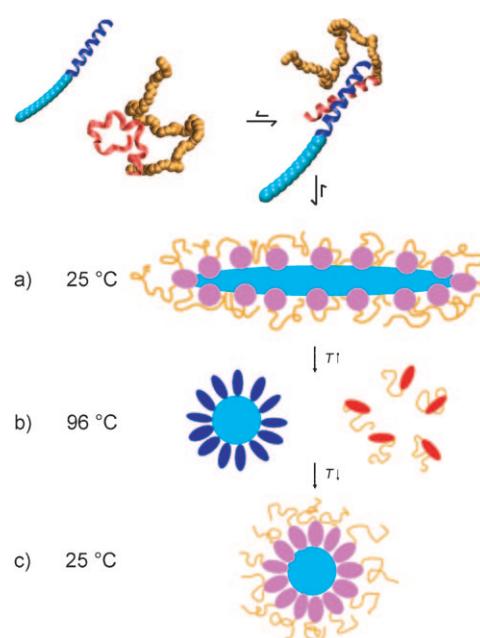


Abbildung 23. Hierarchische Selbstorganisation eines Blockcopolymers auf der Basis von Coiled-Coils. Die Coiled-Coil-Faltung erzeugt ein amphiphiles, nichtkovalentes Blockcopolymer (hellblau: Polystyrol, rot und blau: Coiled-Coil-bildende Peptide, gelb: PEG). Die Faltung der Peptide geht mit der Aggregation des hydrophoben Polymerblocks unter Bildung stabförmiger Micellen einher (a). Erwärmen führt zur Dissoziation des Coiled-Coil und zum Morphologiewechsel zu einer kugelförmigen Micelle (b), die nach der Rückfaltung des Coiled-Coil (durch Abkühlen) bestehen bleibt (c).^[151]

dieser Einheiten in der Zelle dann die Proteinfragmente zu einem funktionellen, fluoreszierenden Komplex verbindet. Coiled-Coil-Peptide, die in spezifischer und stabiler Weise binden (z. B. der Coiled-Coil-Bereich des Transkriptionsfaktors GCN4), und gentechnisch entwickelte Peptide wurden für diesen Zweck eingesetzt.^[152–154] Alternativ können auch die Wechselwirkungen natürlicher Coiled-Coil-Proteine visualisiert werden, indem man diese mit Fragmenten kleiner, fluoreszierender Proteine fusioniert.^[155] In einem Beispiel für eine solche Strategie wurde ein dimeres Hetero-Coiled-Coil zur Markierung von Proteinen in lebenden Zellen eingesetzt. Eines der Peptide wurde rekombinant an den oberflächenexponierten Terminus eines transmembranären Rezeptorproteins geknüpft. Das entsprechende Peptid wurde mit der fluoreszierenden Markierung versehen und dem Kulturmedium zugesetzt. Innerhalb einer Minute hatte das fluoreszenzmarkierte Peptid durch Bildung von Hetero-Coiled-Coils die Zelloberflächen überzogen. Die Funktion des Rezeptors blieb von der Bildung der Coiled-Coils unbeeinflusst (Abbildung 24).^[156]

In anderen Beispielen, die stärker synthetischen Charakter haben, wurden Coiled-Coil-Einheiten und Lipidaggregate kombiniert. In einem Fall wurden unterschiedliche Coiled-Coil-bildende Peptide Lösungen von Liposomen zugesetzt. Die positiv geladenen Peptide adsorbieren an die Liposomoberflächen und bewirken eine Aggregation der Vesikel (Abbildung 25). Obwohl die Lipidpackung gestört wird, bleiben Fusion oder Leckage der Liposomen aus. Dieses

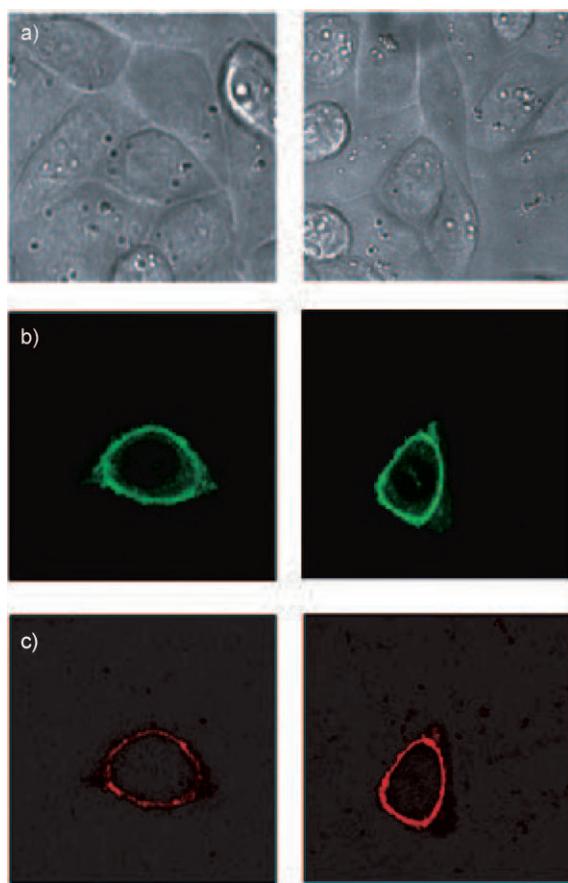


Abbildung 24. Visualisierung von Coiled-Coil-Wechselwirkungen: a,b) Expressierung von Zellen mit Coiled-Coil-markierten Oberflächenproteinen (grün). Nach Zugabe des komplementären Peptids (links drei Heptaden; rechts vier Heptaden) wird die spezifische molekulare Wechselwirkung an der Oberfläche nachgewiesen (rot, c). Das Sondenpeptid mit vier Heptaden erwies sich als die effektivere Markierung.^[156]

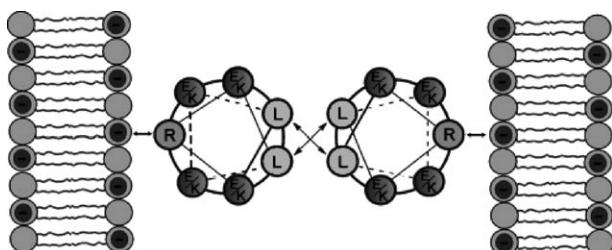


Abbildung 25. Vesikelaggregation durch Coiled-Coil-Faltung und Wechselwirkung des kationischen Coiled-Coil mit negativ geladenen Membranlipiden.^[157]

Modellsystem könnte eingesetzt werden, um die gegenseitigen Effekte von Lipidmembranen und Coiled-Coil-Peptiden experimentell zu untersuchen.^[157]

Wie in Abschnitt 2.3 beschrieben wurde, dringen Hüllviren in Zellen ein, indem sie eine pH-abhängige Konformationsänderung unter Beteiligung eines Coiled-Coil-Komplexes auslösen. Peptide, die mit viralen Hüllproteinen einen extrem stabilen Komplex bilden, könnten eine Möglichkeit bieten, die Infektionsrate durch Viren zu vermindern.

Zum Screening solcher Inhibitoren benötigt man eine effiziente Sensorplattform. In diesem Zusammenhang wurde ein Coiled-Coil-Trimer basierend auf einem natürlichen Virusprotein an trägerfixierten Lipiddoppelschichten verankert und die Peptidbindung an das Coiled-Coil verfolgt. Das Konzept wurde anhand von zwei bekannten Inhibitorpeptiden demonstriert, wobei der Bindungsvorgang mit AFM und Ellipsometrie verfolgt wurde. Um zu einem funktionstüchtigen System zu gelangen, ist es aber noch ein weiter Weg.^[158]

Ein anderes synthetisch-biologisches System wurde entwickelt, das nicht auf die Hemmung der viralen Membranfusion, sondern auf deren Nachahmung abzielt. Ein Peptid, das bei niedrigem pH-Wert ein α -helicales Trimer bildet, wurde über seinen C-Terminus in einer liposomalen Doppelschicht verankert. Am N-Terminus exponierte es einen Tryptophylrest. Bei niedrigem pH-Wert, wenn das Peptid eine helicale Konformation einnimmt, kommt es zur Fusion der Liposomen (wenn auch nur langsam und unter Freisetzung des Vesikelinhals) durch Tryptophanyleinschub in benachbarte Liposomen. Dieser Vorgang ist analog zur Fusionssequenz viraler Fusionsproteine.

Das letzte Beispiel, das wir hier vorstellen, basiert auf der molekularen Erkennung der im Zusammenhang mit den Zellmarkierungsexperimenten erwähnten Peptide, die hier aber nicht als Sensoren eingesetzt werden, sondern um starke Veränderungen an einem System zu bewirken. Die Peptide wurden über einen kurzen flexiblen Abstandhalter an ein membranverankertes Phospholipid gebunden. Strukturell sind die Lipopeptide vereinfachte Versionen der SNARE-Proteine, die an der Fusion der Lipidmembran in vivo beteiligt sind. Die Lipopeptide wurden in Liposomen eingebaut (siehe Abbildung 11, Abschnitt 2.3), und die Bildung von Hetero-Coiled-Coils zwischen Liposomen führte zur Liposomenfusion; der Prozess zeigte die Schlüsselmerkmale natürlicher Membranfusionsvorgänge (Abbildung 26). Weil dieses synthetische System einfacher ist als natürliche Systeme, sind keine lange Coiled-Coils notwendig, damit die Peptide ihre Funktion erfüllen: Der SNARE-Komplex (vier Helices mit jeweils sechs oder sieben Heptaden) und der Lipopeptidkomplex (zwei Helices mit je drei Heptaden) induzieren beide die Fusion. Das beschriebene Fusionssystem ermöglicht es, einen in eukaryotischen Zellen ablaufenden Vorgang – die Fusion membranumgrenzter Organellen – nachzubilden und so besser zu verstehen. Es ebnet auch den Weg zu neuen Funktionen, z.B. zur Vektorisierung von Wirkstofftransportliposomen.^[159]

4. Zusammenfassung und Ausblick

Der gezielte Aufbau von Coiled-Coil-Sequenzen durch spezifische Auswahl ihrer Bausteine – der Aminosäuren – öffnet den Zugang zu einer erstaunlichen Vielfalt an Coiled-Coil-Einheiten, -Aggregaten und -Systemen. Der Austausch von nur zwei Aminosäuren in einer Sequenz kann eine drastische Änderung z.B. der Bindungsstärke oder der hierarchischen Aggregation des Coiled-Coil bewirken. Diese extreme Variabilität hat im Verlauf langer Evolutionszeiträume Coiled-Coils hervorgebracht, die ein enorm breites Spektrum

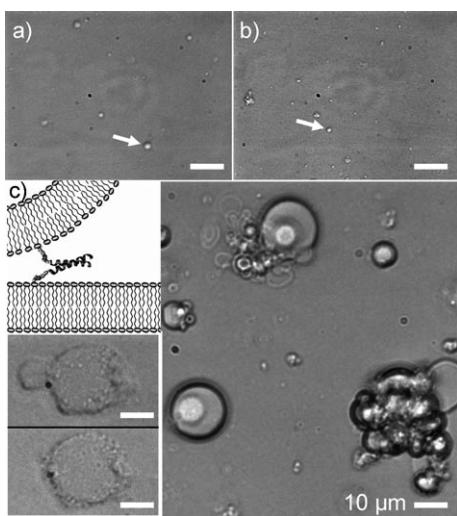


Abbildung 26. Vereinfachte Versionen von SNARE-Proteinen werden in Liposomen eingebettet, und die Bildung des Hetero-Coiled-Coil löst die Liposomenfusion aus. a,b) Lichtmikroskopische Aufnahmen zweier Chargen großer Liposomen, die jeweils mit einer Sorte eines Lipopeptids funktionalisiert wurden. Die Pfeile markieren Beispiele zweier Liposomen. c) Beim Vermischen wird die Bildung von Riesenliposomen beobachtet. Oben) Fusion zweier Lipiddmembranen durch Coiled-Coil-Komplexierung. Einschub unten) Die Fusion zellgroßer Liposomen. Maßstab: 10 µm.^[159]

von Funktionen in allen Arten von Zellen ausüben. Coiled-Coils steuern unter anderem die Bindung von Zellbestandteilen, sie bilden Strukturen verschiedenster Größenordnungen, und sie haben dynamische Funktionen wie Hebel, Kraftübermittler, Gelenke und Klemmen.

Diese zahlreichen Funktionen bieten eine ausgezeichnete Grundlage für die Erschaffung synthetisch-biologischer Systeme – mit dem wichtigen Vorteil, dass die Korrelation zwischen Aminosäuresequenzen und Coiled-Coil-Aggregaten relativ gut verstanden ist. Es sind zahlreiche Studien beschrieben, in denen die Bindungsspezifitäten und -stabilitäten von Coiled-Coils ausgelotet wurden. Basierend auf diesen Erkenntnissen hat man die Selbstorganisation von Coiled-Coil-Einheiten zu Strukturen höherer Ordnung untersucht, wobei reine Coiled-Coil-Aggregate wie auch Coiled-Coil-Hybride erzeugt wurden. Auch das Ansprechverhalten von Coiled-Coils auf die Umgebungsbedingungen wurde studiert. Am Ende der Entwicklung steht ein Bereich, der noch weitgehend unerforscht ist: die Kombination von Coiled-Coils oder Coiled-Coil-Hybriden mit anderen selbstorganisierten Gebilden zum Aufbau funktioneller Systeme.

Natürliche Selbstorganisationsprozesse sind hoch ausgereifte und funktionell vielseitige Vorgänge, bieten aber nicht immer die beste Lösung für ein spezifisches Problem. Durch Aufschlüsseln der Natur gelangen wir zu neuen Methoden und Ansätzen, mit deren Hilfe wir Strukturen konstruieren können, die eine größere Bandbreite von Funktionen als natürliche biologische Systeme haben. Wir können Coiled-Coil-Hybride aufbauen, die in der Natur nicht vorkommen, und die Selbstorganisation über Wege untersuchen, die in natürlichen Prozessen ebenfalls nicht realisiert sind. Wir

können die Aggregation von Coiled-Coils, die von der Evolution im Verlauf von Jahrtausenden hervorgebracht wurde, als „Sprungbrett“ in neue Gebiete der synthetischen Biologie nutzen.

Wir danken Dr. Herman Spaink für wertvolle Hinweise.

Eingegangen am 3. September 2009
Übersetzt von Dr. Thomas Lazar, Paderborn

- [1] E. H. C. Bromley, K. Channon, E. Moutevelis, D. N. Woolfson, *ACS Chem. Biol.* **2008**, 3, 38.
- [2] D. A. D. Parry, J. M. Squire in *Fibrous Proteins: Coiled-Coils, Collagen and Elastomers*, Vol. 70 (Hrsg.: D. A. D. Parry, J. M. Squire), Elsevier, San Diego, **2005**, S. 1–10.
- [3] 60 Jahre lang, seit den frühen 1930er Jahren, ist die Forschung zu natürlichen Coiled-Coils mit einer bescheidenen Publikationsrate von etwa fünf Veröffentlichungen pro Jahr nur sehr langsam vorangeschritten (W. T. Astbury, A. Street, *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. A* **1931**, 230, 75; W. T. Astbury, H. J. Woods, *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. A* **1933**, 232, 333). In den 90er Jahren kam es dann zu einer regelrechten Explosion, und seit etwa 2000 liegt die Rate bei etwa 500 Veröffentlichungen pro Jahr. Dieser plötzliche Anstieg ging mit der allgemeinen Verbreitung Fmoc-geschützter Aminosäuren und der Festphasenpeptidsynthese einher. Der Fokus der Coiled-Coil-Forschung liegt immer noch auf dem Verständnis der natürlichen Coiled-Coil-Bindung, es gibt jedoch ein wachsendes Interesse an der Verwendung gezielt entwickelter Coiled-Coils in der synthetischen Selbstorganisation.
- [4] E. Wolf, P. S. Kim, B. Berger, *Protein Sci.* **1997**, 6, 1179.
- [5] E. Moutevelis, D. N. Woolfson, *J. Mol. Biol.* **2009**, 385, 726.
- [6] A. Rose, S. J. Schraegle, E. A. Stahlberg, I. Meier, *BMC Evol. Biol.* **2005**, 5, 66.
- [7] A. Rose, I. Meier, *Cell. Mol. Life Sci.* **2004**, 61, 1996.
- [8] W. D. Kohn, C. T. Mant, R. S. Hodges, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 2583.
- [9] R. D. Blake, *Informational Biopolymers of Genes and Gene Expression: Properties and Evolution*, University Science Books, Sausalito, **2005**, S. 778.
- [10] H. C. Hurst, *Protein Profile* **1995**, 2, 105.
- [11] L. Szilak, J. Moitra, C. Vinson, *Protein Sci.* **1997**, 6, 1273.
- [12] K. E. Gottschalk, *Structure* **2005**, 13, 703.
- [13] en.wikipedia.org/wiki/AP-1_transcription_factor. Das Modell wurde mit dem frei zugänglichen Programm PYMOL unter Verwendung des PDB-Codes 1FOS erzeugt.
- [14] J. N. M. Glover, S. C. Harrison, *Nature* **1995**, 373, 257.
- [15] W. Shu, J. Liu, H. Ji, M. Lu, *J. Mol. Biol.* **2000**, 299, 1101.
- [16] N. Zizlsperger, V. N. Malashkevich, S. Pillay, A. E. Keating, *Biochemistry* **2008**, 47, 11858.
- [17] G. E. White, H. P. Erickson, *J. Struct. Biol.* **2006**, 154, 111.
- [18] D. A. D. Parry, R. D. B. Fraser, J. M. Squire, *J. Struct. Biol.* **2008**, 163, 258.
- [19] J. Peters, W. Baumeister, A. Lupa, *J. Mol. Biol.* **1996**, 257, 1031.
- [20] J. Peters, M. Nitsch, B. Kuhlmann, R. Golbik, A. Lupa, J. Kellermann, H. Engelhardt, J. P. Pfander, S. Müller, K. Goldie, A. Engel, K. O. Stetter, W. Baumeister, *J. Mol. Biol.* **1995**, 245, 385.
- [21] J. Stetefeld, M. Jenny, T. Schulthess, R. Landwehr, J. Engel, R. A. Kammerer, *Nat. Struct. Biol.* **2000**, 7, 772.
- [22] P. Burkhard, J. Stetefeld, S. V. Strelkov, *Trends Cell Biol.* **2001**, 11, 82.
- [23] H. Engelhardt, *J. Struct. Biol.* **2007**, 160, 115.
- [24] H. Herrmann, H. Bar, L. Kreplak, S. V. Strelkov, U. Aebi, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, 8, 562.

- [25] H. Herrmann, U. Aebi, *Annu. Rev. Biochem.* **2004**, *73*, 749.
- [26] N. Mücke, L. Kreplak, R. Kirmse, T. Wedig, H. Herrmann, U. Aebi, J. Langowski, *J. Mol. Biol.* **2004**, *335*, 1241.
- [27] N. Ausmees, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *11*, 152.
- [28] W. Margolin, *Curr. Biol.* **2004**, *14*, R242.
- [29] C. Antoniou, V. Q. Lam, L. W. M. Fung, *Biochemistry* **2008**, *47*, 10765.
- [30] M. A. De Matteis, J. S. Morrow, *J. Cell Sci.* **2000**, *113*, 2331.
- [31] M. Salomao, X. H. Zhang, Y. Yang, S. Lee, J. H. Hartwig, J. A. Chasis, N. Mohandas, X. L. An, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 8026.
- [32] N. Ausmees, J. R. Kuhn, C. Jacobs-Wagner, *Cell* **2003**, *115*, 705.
- [33] H. Lodish, A. Berk, L. S. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore, J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 4. Aufl., W. H. Freeman, New York, **2000**.
- [34] J. Harborth, J. Wang, C. Gueth-Hallonet, K. Weber, M. Osborn, *EMBO J.* **1999**, *18*, 1689.
- [35] T. P. Burghardt, J. Y. Hu, K. Ajtai, *Biophys. Chem.* **2007**, *131*, 15.
- [36] A. Ciudad, J. M. Sancho, G. P. Tsironis, *J. Biol. Phys.* **2006**, *32*, 455.
- [37] T. Q. P. Uyeda, H. M. Warrick, S. J. Kron, J. A. Spudich, *Nature* **1991**, *352*, 307.
- [38] S. Toba, T. M. Watanabe, L. Yamaguchi-Okimoto, Y. Y. Toyoshima, H. Higuchi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 5741.
- [39] I. Schwaiger, C. Sattler, D. R. Hostetter, M. Rief, *Nat. Mater.* **2002**, *1*, 232.
- [40] L. Kreplak, L. R. Nyland, J. L. Contompasis, J. O. Vigoreaux, *J. Mol. Biol.* **2009**, *386*, 1403.
- [41] H. A. Al-Khayat, E. P. Morris, J. M. Squire, *J. Struct. Biol.* **2009**, *166*, 183.
- [42] R. D. Vale, R. A. Milligan, *Science* **2000**, *288*, 88.
- [43] N. F. Endres, C. Yoshioka, R. A. Milligan, R. D. Vale, *Nature* **2006**, *439*, 875.
- [44] A. M. Lauzon, P. M. Fagnant, D. M. Warshaw, K. M. Trybus, *Biophys. J.* **2001**, *80*, 1900.
- [45] N. Mizuno, A. Narita, T. Kon, K. Sutoh, M. Kikkawa, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 20832.
- [46] H. Sakakibara, H. Kojima, Y. Sakai, E. Katayama, K. Oiwa, *Nature* **1999**, *400*, 586.
- [47] S. A. Burgess, P. J. Knight, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2004**, *14*, 138.
- [48] T. Kon, K. Imamura, A. J. Roberts, R. Ohkura, P. J. Knight, I. R. Gibbons, S. A. Burgess, K. Sutoh, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2009**, *16*, 325.
- [49] S. A. Burgess, M. L. Walker, H. Sakakibara, P. J. Knight, K. Oiwa, *Nature* **2003**, *421*, 715.
- [50] S. Besteiro, G. H. Coombs, J. C. Mottram, *Bmc Genomics* **2006**, *7*, 250.
- [51] R. C. Lin, R. H. Scheller, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2000**, *16*, 19.
- [52] D. Fashauer, R. B. Sutton, A. T. Brunger, R. Jahn, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 15781.
- [53] J. Rizo, X. C. Chen, D. Araç, *Trends Cell Biol.* **2006**, *16*, 339.
- [54] J. Malsam, S. Kreye, T. H. Sollner, *Cell. Mol. Life Sci.* **2008**, *65*, 2814.
- [55] PDB-Codes 1sfc und 1br0.
- [56] C. Ungermann, D. Langosch, *J. Cell Sci.* **2005**, *118*, 3819.
- [57] G. Dong, M. Medkova, P. Novick, K. M. Reinisch, *Mol. Cell* **2007**, *25*, 455.
- [58] J. J. Skehel, P. M. Bayley, E. B. Brown, S. R. Martin, M. D. Waterfield, J. M. White, I. A. Wilson, D. C. Wiley, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1982**, *79*, 968.
- [59] I. A. Wilson, J. J. Skehel, D. C. Wiley, *Nature* **1981**, *289*, 366.
- [60] C. M. Carr, P. S. Kim, *Cell* **1993**, *73*, 823.
- [61] T. Shangguan, D. P. Siegel, J. D. Lear, P. H. Axelsen, D. Alford, J. Bentz, *Biophys. J.* **1998**, *74*, 54.
- [62] S. C. Harrison, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2008**, *15*, 690.
- [63] A. Lupas, *Trends Biochem. Sci.* **1996**, *21*, 375.
- [64] P. R. Dormitzer, E. B. Nason, B. V. V. Prasad, S. C. Harrison, *Nature* **2004**, *430*, 1053.
- [65] R. Hurme, K. D. Berndt, E. Namork, M. Rhen, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 12626.
- [66] R. R. Naik, S. M. Kirkpatrick, M. O. Stone, *Biosens. Bioelectron.* **2001**, *16*, 1051.
- [67] R. Hurme, K. D. Berndt, S. J. Normark, M. Rhen, *Cell* **1997**, *90*, 55.
- [68] S. J. Mojzsis, G. Arrhenius, K. D. McKeegan, T. M. Harrison, A. P. Nutman, C. R. L. Friend, *Nature* **1996**, *384*, 55.
- [69] A. O. W. Stretton, *Genetics* **2002**, *162*, 527.
- [70] F. H. C. Crick, *Nature* **1952**, *170*, 882.
- [71] M. R. Contarino, M. Sergi, A. E. Harrington, A. Lazareck, J. Xu, I. Chaiken, *J. Mol. Recognit.* **2006**, *19*, 363.
- [72] K. Channon, E. H. C. Bromley, D. N. Woolfson, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2008**, *18*, 491.
- [73] P. Burkhard, S. Ivaninskii, A. Lustig, *J. Mol. Biol.* **2002**, *318*, 901.
- [74] H. Dong, J. D. Hartgerink, *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 691.
- [75] J. N. M. Glover, S. C. Harrison, *Nature* **1995**, *373*, 257.
- [76] J. M. Mason, U. B. Hagemann, K. M. Arndt, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 23015.
- [77] N. Jean-François, G. Frederic, W. Raymund, C. Benoit, P. Lavigne, *J. Mol. Biol.* **2003**, *326*, 1577.
- [78] Y. Tang, G. Ghirlanda, N. Vaidehi, J. Kua, D. T. Mainz, W. A. Goddard, W. F. DeGrado, D. A. Tirrell, *Biochemistry* **2001**, *40*, 2790.
- [79] S. Son, I. C. Tanrikulu, D. A. Tirrell, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1251.
- [80] J. R. Kumita, D. G. Flint, G. A. Woolley, O. S. Smart, *Faraday Discuss.* **2003**, *122*, 89.
- [81] K. Pagel, B. Koks, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12*, 730.
- [82] M. L. Diss, A. J. Kennan, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 3797.
- [83] E. H. C. Bromley, R. B. Sessions, A. R. Thomson, D. N. Woolfson, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 928.
- [84] B. Apostolovic, H. A. Klok, *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 3173.
- [85] Unveröffentlichte Daten.
- [86] N. A. Schnarr, A. J. Kennan, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13046.
- [87] N. A. Schnarr, A. J. Kennan, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 395.
- [88] L. Gonzalez, J. J. Plecs, T. Alber, *Nat. Struct. Biol.* **1996**, *3*, 510.
- [89] K. Wagschal, B. Tripet, P. Lavigne, C. Mant, R. S. Hodges, *Protein Sci.* **1999**, *8*, 2312.
- [90] B. Tripet, K. Wagschal, P. Lavigne, C. T. Mant, R. S. Hodges, *J. Mol. Biol.* **2000**, *300*, 377.
- [91] P. B. Harbury, T. Zhang, P. S. Kim, T. Alber, *Science* **1993**, *262*, 1401.
- [92] Y. Tsatskis, S. C. Kwok, E. Becker, C. Gill, M. N. Smith, R. A. B. Keates, R. S. Hodges, J. M. Wood, *Biochemistry* **2008**, *47*, 60.
- [93] M. J. Pandya, E. Cerasoli, A. Joseph, R. G. Stoneman, E. Waite, D. N. Woolfson, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 17016.
- [94] I. J. Liu, C. L. Kao, S. C. Hsieh, M. T. Wey, L. S. Kan, W. K. Wang, *Antiviral Res.* **2009**, *81*, 82.
- [95] B. Tripet, D. J. Kao, S. A. Jeffers, K. V. Holmes, R. S. Hodges, *J. Struct. Biol.* **2006**, *155*, 176.
- [96] E. M. Jouaux, B. B. Timm, K. M. Arndt, T. E. Exner, *J. Pept. Sci.* **2009**, *15*, 5.
- [97] X. I. Ambroggio, B. Kuhlman, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 1154.
- [98] R. A. Kammerer, M. O. Steinmetz, *J. Struct. Biol.* **2006**, *155*, 146.
- [99] B. Ciani, E. G. Hutchinson, R. B. Sessions, D. N. Woolfson, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 10150.
- [100] H. Dong, J. D. Hartgerink, *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 617.

- [101] K. Pagel, S. C. Wagner, R. R. Araghi, H. von Berlepsch, C. Böttcher, B. Koksch, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 11442.
- [102] E. Cerasoli, B. K. Sharpe, D. N. Woolfson, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15008.
- [103] D. H. Lee, J. R. Granja, J. A. Martinez, K. Severin, M. R. Ghadiri, *Nature* **1996**, *382*, 525.
- [104] S. Yao, I. Ghosh, R. Zutshi, J. Chmielewski, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 10559.
- [105] S. Yao, I. Ghosh, R. Zutshi, J. Chmielewski, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 489; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 478.
- [106] A. J. Kennan, V. Haridas, K. Severin, D. H. Lee, M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1797.
- [107] K. Severin, D. H. Lee, A. J. Kennan, M. R. Ghadiri, *Nature* **1997**, *389*, 706.
- [108] S. Yao, J. Chmielewski, *Biopolymers* **1999**, *51*, 370.
- [109] D. H. Lee, K. Severin, Y. Yokobayashi, M. R. Ghadiri, *Nature* **1997**, *390*, 591.
- [110] R. Issac, J. Chmielewski, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6808.
- [111] X. Q. Li, J. Chmielewski, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11820.
- [112] R. Issac, Y. W. Ham, J. Chmielewski, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2001**, *11*, 458.
- [113] S. Matsumura, T. Takahashi, A. Ueno, H. Mihara, *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 4829.
- [114] S. Kojima, Y. Kuriki, T. Yoshida, K. Yazaki, K. Miura, *Proc. Jpn. Acad. Ser. B* **1997**, *73*, 7.
- [115] S. K. Gunasekar, J. S. Haghpanah, J. K. Montclare, *Polym. Adv. Technol.* **2008**, *19*, 454.
- [116] R. Fairman, K. S. Åkerfeldt, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2005**, *15*, 453.
- [117] T. O. Yeates, J. E. Padilla, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2002**, *12*, 464.
- [118] C. E. MacPhee, D. N. Woolfson, *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* **2004**, *8*, 141.
- [119] R. V. Ulijn, A. M. Smith, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 664.
- [120] D. N. Woolfson, M. G. Ryadnov, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 559.
- [121] M. Zhou, D. Bentley, I. Ghosh, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 734.
- [122] D. Aili, F. I. Tai, K. Enander, L. Baltzer, B. Liedberg, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 5636; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 5554.
- [123] D. E. Wagner, C. L. Phillips, W. M. Ali, G. E. Nybakken, E. D. Crawford, A. D. Schwab, W. F. Smith, R. Fairman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 12656.
- [124] K. L. Lazar, H. Miller-Auer, G. S. Getz, J. Orgel, S. C. Meredit, *Biochemistry* **2005**, *44*, 12681.
- [125] H. Dong, S. E. Paramonov, J. D. Hartgerink, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13691.
- [126] D. Papapostolou, E. H. C. Brornley, C. Bano, D. N. Woolfson, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5124.
- [127] M. G. Ryadnov, D. N. Woolfson, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 7454.
- [128] M. G. Ryadnov, D. N. Woolfson, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 3129; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 3021.
- [129] M. G. Ryadnov, D. N. Woolfson, *Nat. Mater.* **2003**, *2*, 329.
- [130] S. C. Holmstrom, P. J. S. King, M. G. Ryadnov, M. F. Butler, S. Mann, D. N. Woolfson, *Langmuir* **2008**, *24*, 11778.
- [131] S. A. Potekhin, T. N. Melnik, V. Popov, N. F. Lanina, A. A. Vazina, P. Rigler, A. S. Verdini, G. Corradin, A. V. Kajava, *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 1025.
- [132] Y. Zimenkov, S. N. Dublin, R. Ni, R. S. Tu, V. Breedveld, R. P. Apkarian, V. P. Conticello, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 6770.
- [133] E. F. Banwell, E. S. Abelardo, D. J. Adams, M. A. Birchall, A. Corrigan, A. M. Donald, M. Kirkland, L. C. Serpell, M. F. Butler, D. N. Woolfson, *Nat. Mater.* **2009**, *8*, 596.
- [134] M. G. Ryadnov, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 987; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 969.
- [135] A. F. Dexter, A. P. J. Middelberg, *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 10484.
- [136] M. G. Ryadnov, B. Ceyhan, C. M. Niemeyer, D. N. Woolfson, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9388.
- [137] D. Aili, K. Enander, J. Rydberg, I. Nesterenko, F. Bjorefors, L. Baltzer, B. Liedberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5780.
- [138] D. Aili, K. Enander, L. Baltzer, B. Liedberg, *Nano Lett.* **2008**, *8*, 2473.
- [139] M. M. Stevens, N. T. Flynn, C. Wang, D. A. Tirrell, R. Langer, *Adv. Mater.* **2004**, *16*, 915.
- [140] J. M. Slocik, F. Tam, N. J. Halas, R. R. Naik, *Nano Lett.* **2007**, *7*, 1054.
- [141] W. A. Petka, J. L. Harden, K. P. McGrath, D. Wirtz, D. A. Tirrell, *Science* **1998**, *281*, 389.
- [142] C. Wang, J. Kopeček, R. J. Stewart, *Biomacromolecules* **2001**, *2*, 912.
- [143] M. M. Stevens, S. Allen, M. C. Davies, C. J. Roberts, J. K. Sakata, S. J. B. Tendler, D. A. Tirrell, P. M. Williams, *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 1266.
- [144] C. Wang, R. J. Stewart, J. Kopeček, *Nature* **1999**, *397*, 417.
- [145] J. Y. Yang, C. Y. Xu, P. Kopečková, J. Kopeček, *Macromol. Biosci.* **2006**, *6*, 201.
- [146] J. Y. Yang, C. Y. Xu, C. Wang, J. Kopeček, *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 1187.
- [147] J. Kopeček, J. Yang, *Acta Biomater.* **2009**, *5*, 805.
- [148] T. Nakaji-Hirabayashi, K. Kato, H. Iwata, *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 1411.
- [149] L. Zhang, E. M. Furst, K. L. Kiick, *J. Controlled Release* **2006**, *114*, 130.
- [150] I. R. Wheeldon, J. W. Gallaway, S. C. Barton, S. Banta, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 15275.
- [151] H. Robson Marsden, A. V. Korobko, E. N. M. van Leeuwen, E. M. Pouget, S. J. Veen, N. Sommerdijk, A. Kros, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 9386.
- [152] T. J. Magliery, C. G. M. Wilson, W. L. Pan, D. Mishler, I. Ghosh, A. D. Hamilton, L. Regan, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 146.
- [153] T. K. Kerppola, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2006**, *7*, 449.
- [154] T. Mizuno, K. Murao, Y. Tanabe, M. Oda, T. Tanaka, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 11378.
- [155] C. D. Hu, T. K. Kerppola, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 539.
- [156] Y. Yano, A. Yano, S. Oishi, Y. Sugimoto, G. Tsujimoto, N. Fujii, K. Matsuzaki, *Acs Chem. Biol.* **2008**, *3*, 341.
- [157] T. Vagt, O. Zschornig, D. Huster, B. Koksch, *ChemPhysChem* **2006**, *7*, 1361.
- [158] S. Schuy, E. Schafer, N. C. Yoder, S. Hobe, K. Kumar, R. Vogel, A. Janshoff, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 765; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 751.
- [159] H. Robson Marsden, N. A. Elbers, P. H. H. Bomans, N. Sommerdijk, A. Kros, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 2366; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 2330.