

Einzelmolekülexperimente in der synthetischen Biologie – ein Ansatz für das Affinitätsranking DNA-bindender Peptide**

Rainer Eckel, Sven David Wilking, Anke Becker,
Norbert Sewald,* Robert Ros und Dario Anselmetti*

Die Genexpression in Eukaryoten wird auf der Ebene der Transkription durch die spezifische Bindung von Transkriptionsfaktoren an definierte DNA-Sequenzen gesteuert. Auf diese Weise werden Wachstum, Entwicklung und Differenzierung der Zellen reguliert. Die Möglichkeit, mithilfe modifizierter synthetischer Transkriptionsaktivatoren^[1-4] steuernd in den Stoffwechsel eingreifen zu können, bietet interessante Perspektiven für die molekulare Zellbiologie im Rahmen der Biomimetik und synthetischen Biologie.^[5,6] Zum Design biologisch aktiver synthetischer Enzyme und neuer Proteinbasierter Materialien bietet sich die Kombination von bioorganischer Bottom-up-Synthese und Einzelmolekül-Affinitätsspektroskopie an. Gegenstand solcher Untersuchungen sind beispielsweise der Beitrag einer einzelnen erkennenden Helix zur Spezifität der DNA-Bindung eines kompletten Proteins, der Einfluss einer einzelnen punktmutierten Aminosäure auf die biologische Spezifität und Affinität, die minimale Sequenzlänge eines Peptids, die Bindungsspezifität gewährleistet, sowie das Design künstlicher Proteine, die ein synthetisches Helix-Turn-Helix(HTH)-Bindemotiv enthalten.

Eine interessante Fragestellung ist es hierbei, die Spezifität der DNA-Bindung von synthetischen Peptiden mit einer der Bindedomäne eines Transkriptionsfaktors ähnlichen Sequenz aufzuklären. Wir untersuchten ein 20-Peptid mit der nativen Sequenz des bindenden Epitops aus dem Transkriptionsaktivator PhoB (*E. coli*) sowie drei Punktmutanten dieses Peptids.

[*] Dipl.-Chem. R. Eckel, Priv.-Doz. Dr. R. Ros, Prof. Dr. D. Anselmetti
Experimentelle Biophysik und Angewandte Nanowissenschaften
Universität Bielefeld
Universitätsstraße 25, 33615 Bielefeld (Deutschland)
Fax: (+49) 521-106-2959
E-mail: dario.anselmetti@physik.uni-bielefeld.de
Dipl.-Chem. S. D. Wilking, Prof. Dr. N. Sewald
Organische und Bioorganische Chemie
Universität Bielefeld
Universitätsstraße 25, 33615 Bielefeld (Deutschland)
Fax: (+49) 521-106-8094
E-mail: norbert.sewald@uni-bielefeld.de
Priv.-Doz. Dr. A. Becker
Genetik
Universität Bielefeld (Deutschland)

[**] Die Autoren danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 613) für die finanzielle Unterstützung sowie Tanja Beschnitt für Hilfe bei der DNA-Präparation.

PhoB ist ein Transkriptionsaktivator, der nach der Phosphorylierung durch PhoR an die Phosphat-Box in der Promotorregion des Phosphatregulons *pho* bindet und die Expression der Gene des Phosphathaushaltes reguliert.^[7-9] Das Protein^[9] besteht aus einer regulatorischen Phosphorylierungsdomäne im N-terminalen Bereich PhoB(1–127) und einer DNA-bindenden Domäne im C-terminalen Bereich PhoB(128–229). In Deletionsexperimenten wurde nachgewiesen, dass PhoB(139–229) spezifisch an DNA bindet; es erkennt die Sequenz TGTC A in doppelsträngiger DNA. Die NMR-Struktur der regulatorischen Domäne und der DNA-bindenden Domäne PhoB(126–229)^[10] sowie die Kristallstruktur im Komplex mit DNA sind bekannt (Abbildung 1 a).^[11] Strukturell gehört die DNA-bindende Domäne von PhoB zur Familie der „winged helix-turn-helix“-Proteine mit der Topologie $\beta^1\text{-}\beta^2\text{-}\beta^3\text{-}\beta^4\text{-}\alpha^1\text{-}\beta^5\text{-}\alpha^2\text{-}\alpha^3\text{-}\beta^6\text{-}\beta^7$, wobei die starre Biegung (turn) durch eine Schleife (loop) ersetzt ist. Diese Familie ist charakterisiert durch ein N-terminales viersträngiges β -Faltblatt ($\beta^1\text{-}\beta^2\text{-}\beta^3\text{-}\beta^4$), eine α -Helix (α^1), die durch eine kurze β -Faltblatt-Einheit (β^5) mit einer weiteren α -Helix (α^2) verbunden ist, gefolgt von einer dritten α -Helix (α^3) und einer β -Haarnadelschleife ($\beta^6\text{-}\beta^7$). Helix α^3 , die DNA-Erkennungsregion, ist eine amphiphile Helix, die mit α^2 durch eine Schleife verbunden ist.^[12] Die β -Haarnadelschleife ($\beta^6\text{-turn-}\beta^7$) wird auch als „recognition wing“ bezeichnet.^[13]

Die einzelnen Aminosäuren DNA-bindender Peptide und Proteine leisten ganz unterschiedliche Beiträge zu Affinität und Spezifität: Während kationische Seitenketten (Lys, Arg) häufig nicht-sequenzspezifische ionische Wechselwirkungen mit dem Phosphat-Rückgrat eingehen, wird die Sequenzinformation der DNA durch Wasserstoffbrücken und Van-der-Waals-Wechselwirkung mit dem Peptid ausgelesen. Die Bindung der Erkennungshelix α^3 von PhoB erfolgt in der großen Furche der DNA;^[11] dabei wechselwirkt Arg201 über eine Wasserstoffbrücke mit dem Carboxy-Sauerstoff eines Guanins, während Arg193, His198, Arg200 und Arg203 über Salzbrücken mit Phosphatgruppen wechselwirken. Des Weiteren sind Van-der-Waals-Kontakte von Thr194 und Val197 an der spezifischen Erkennung beteiligt. Arg219 im „recognition wing“ ist über Wasserstoffbrücken an Desoxyribose-Einheiten gebunden.

In vorliegender Arbeit wurde der Beitrag einzelner Aminosäuren in der DNA-bindenden Helix α^3 zur Affinität auf dem Einzelmolekülniveau untersucht. Dazu wurden Peptide synthetisiert, in denen Aminosäuren, die der Kristallstruktur zufolge Salzbrücken zu Sauerstoffatomen des Phosphat-Rückgrats ausbilden, jeweils einzeln gegen Alanin ausgetauscht waren (Tabelle 1). Synthetisiert wurden die native Sequenz PhoB(190–209) sowie die punktmutierten Peptide PhoB(190–209) R193A, PhoB(190–209) H198A und PhoB(190–209) R203A. Wie durch CD-Spektroskopie gezeigt werden konnte, weisen alle Peptide eine α -helicale Struktur auf. Die Festphasensynthese der N-terminal funk-

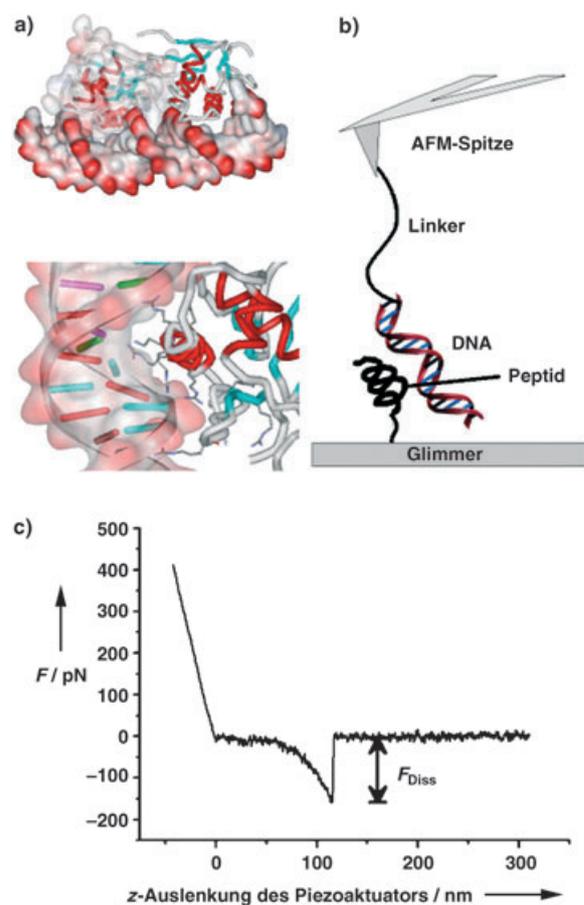


Abbildung 1. a) Oben: Röntgenstruktur des 2:1-Komplexes von PhoB(124–229) mit DNA.^[10] Unten: Ausschnitt aus der Röntgenstruktur, der die Erkennungshelix α^3 zeigt. b) Schema der kraftspektroskopischen Experimente. c) Typische Kraft-Distanz-Kurve (nur retraktiver Teil gezeigt).

Tabelle 1: Synthetisierte Peptide des Epitops PhoB(190–209).

Mutation	Peptidsequenz	$k_{\text{off}} [\text{s}^{-1}]^{\text{[a]}}$	$x_p [\text{\AA}]^{\text{[a]}}$
–	Ac-VEDRTVDVHIRRLRKALEPG-Linker	3.1 ± 2.1	6.8 ± 1.2
R193A	Ac-VEDR A TVDVHIRRLRKALEPG-Linker	0.071 ± 0.053	9.3 ± 2.6
H198A	Ac-VEDRTVDV A IRRLRKALEPG-Linker	49.5 ± 21.2	7.2 ± 3.5
R203A	Ac-VEDRTVDVHIRRL A KALEPG-Linker	keine Bindung	keine Bindung

[a] k_{off} : Geschwindigkeitskonstante für die Dissoziation des DNA-Peptid-Komplexes; x_p : molekulare Reaktionslänge.

tionierten Fragmente der Helix α^3 von PhoB erfolgte am vorher mit einem geeigneten Linker beladenen 2-Chlortritylharz unter Anwendung der Fmoc/*t*Bu-Schutzgruppenstrategie.^[14] Die Peptide wurden durch HPLC mit Acetonitril/Wasser/TFA-Gradienten aufgereinigt. Die Wechselwirkung der einzelnen synthetisierten Peptide mit der DNA wurde mittels AFM-Kraftspektroskopie untersucht.

Bei der Einzelmolekül-Kraftspektroskopie werden spezifische, molekular erkennende Wechselwirkungen zwischen einzelnen Bindungspartnern in einem breiten Affinitätsbereich von $10^{-5} \text{ M}^{\text{[15]}}$ bis $10^{-15} \text{ M}^{\text{[16,17]}}$ untersucht. Detektiert wird die Verbiegung eines mikrogefertigten Kraftsensors (cantile-

ver), was die Messung von Kräften im Piconewton-Bereich ermöglicht. Das AFM-Prinzip ermöglicht die Untersuchung molekularer Bindungskräfte unter physiologischen Bedingungen, und die AFM-Kraftspektroskopie als experimentelle Methode wurde bereits auf eine Vielzahl von spezifisch bindenden biologischen Rezeptor-Ligand-Systemen^[16–22] sowie auf supramolekulare Wirt-Gast-Systeme angewandt.^[15] Insbesondere gelang kürzlich die direkte Untersuchung spezifischer nativer Protein-DNA-Wechselwirkungen.^[23–25]

In vorliegender Arbeit wurde die AFM-Kraftspektroskopie zur Untersuchung der spezifischen Bindung zwischen den in Tabelle 1 aufgeführten Peptiden und ihrer DNA-Zielsequenz angewandt. Das jeweilige Peptid wurde über den kurzen C-terminalen Linker 1,8-Diamino-3,6-dioxaoctan und den Crosslinker BS³ [Bis(sulfosuccinimidyl)suberat] auf aminofunktionalisiertem Glimmer kovalent und gerichtet immobilisiert (Abbildung 1b). Durch diese Immobilisierung wird die Denaturierung des Peptids durch Physisorption an der Oberfläche vermieden. PCR-amplifizierte genomische DNA aus *E. coli*, die das PhoB-Bindemotiv enthält (Länge: 600 bp), wurde als Bindungspartner über einen bifunktionellen Polyethylenglycol(PEG)-Linker (molare Masse: 3400 g mol⁻¹, entsprechend einer mittleren Länge von etwa 30 nm) an eine AFM-Spitze gebunden.^[26] Der PEG-Linker dient verschiedenen Zwecken. Zum einen erhöht er die sterische Flexibilität des Systems und stellt sicher, dass die Bindung in räumlicher Entfernung zur Oberfläche erfolgt. Zum anderen vereinfacht er die Unterscheidung zwischen einzelnen und multiplen Dissoziationsereignissen und verringert unspezifische Adhäsion. Darüber hinaus bewirkt die elastische Dehnung des Linkers einen graduellen Anstieg der Kraft bis zum Bindungsbruch, was die präzise Messung der molekularen Elastizität des Komplexes ermöglicht (Abbildung 1c). Da die Elastizität für jedes Dissoziationsereignis einzeln bestimmt wird, werden Variationen im entropischen Anteil der Dissoziationspeaks berücksichtigt und beeinflussen nicht die statistische Interpretation.

Die Zusammenstellung der gemessenen Dissoziationskräfte zu Histogrammen und die statistische Analyse der resultierenden Kraftverteilung liefert die wahrscheinlichste Dissoziationskraft bei einer gegebenen Rückzieh-Geschwindigkeit des Kraftsensors. Für jedes Histogramm wurden typischerweise etwa 2000 Kraft-Distanz-Kurven analysiert; die in den Histogrammen (Abbildung 2 sowie Hintergrundinformationen) angegebenen Bindewahrscheinlichkeiten beziehen sich dabei auf den Quotienten aus der Zahl der Dissoziationsereignisse und der Zahl der insgesamt aufgenommenen Kraft-Distanz-Kurven (so ergeben z. B. 300 Dissoziationsereignisse aus 2000 Kurven eine Bindewahrscheinlichkeit von 15 %). Das Maximum der Kraftverteilung lieferte die wahrscheinlichste Dissoziationskraft.

Um zu entscheiden, ob die Peptide spezifisch an die DNA-Zielsequenz binden, wurden Konkurrenzexperimente durchgeführt. Die Basisequenz und jede Mutante wurden in einer Serie von Kraftspektroskopie-Experimenten im Standardpuffer (100 mM Na₂HPO₄, 50 mM NaCl, pH 7.4) untersucht, gefolgt von einer Serie von Experimenten mit einem Überschuss an freiem Bindungspartner (Peptid oder DNA) als Kompetitor, gefolgt vom Waschen der Probe mit Stan-

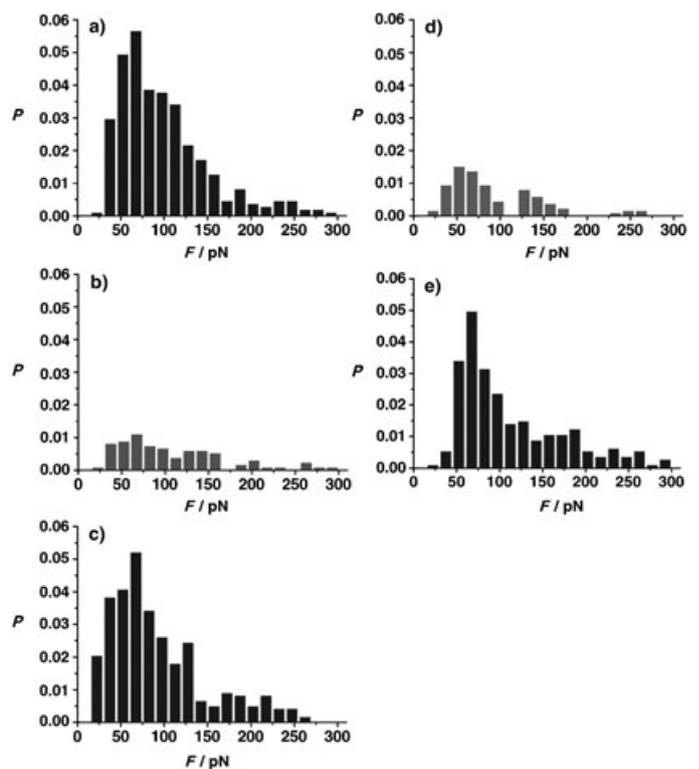


Abbildung 2. Kraftspektroskopische Konkurrenzexperimente mit der nativen Peptidsequenz (P = Wahrscheinlichkeit, F = Kraft). a) In Pufferlösung (100 mM NaH₂PO₄, 50 mM NaCl, pH 7.4) ohne Kompetitor; b) in Pufferlösung mit Überschuss an freiem Peptid als Kompetitor; c) nach Waschen der Probe mit Pufferlösung; d) in Pufferlösung mit Überschuss an freier DNA als Kompetitor; e) nach Waschen der Probe mit Pufferlösung.

dardpuffer und einer weiteren Serie von Experimenten im Standardpuffer. Abbildung 2 zeigt die Ergebnisse dieses Konkurrenzexperimentes für das nicht-mutierte Peptid mit der nativen Sequenz: In (a) ist die Kraft-Verteilung für das Experiment in Standardpuffer mit einer Gesamt-Bindewahrscheinlichkeit von etwa 33 % gezeigt; (b) zeigt die Konkurrenz mit freiem Peptid, die zu einem signifikanten Rückgang in der Gesamt-Bindewahrscheinlichkeit führt; (c) zeigt, wie die ursprüngliche Bindewahrscheinlichkeit und Aktivität der Wechselwirkung nach dem Waschen mit Standardpuffer wieder erreicht wird; (d) zeigt die analoge Verdrängung mit einem Überschuss an freier DNA in der Pufferlösung und (e) die erneute Reaktivierung der Wechselwirkung. In zusätzlichen Kontrollexperimenten mit EBNA-DNA-Fragmenten (EBNA = Epstein-Barr virus nuclear antigen), die keine PhoB-Bindesequenz aufweisen, konnte keine Bindung festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse belegen deutlich, dass das Peptid mit der nativen Sequenz tatsächlich spezifisch an die Bindesequenz der DNA bindet.

Die gleiche Schlussfolgerung lässt sich auch aus den Resultaten der Konkurrenzexperimente mit den Mutanten R193A und H198A ziehen. Auch in diesen Fällen war die Verdrängung sowohl mit freiem Peptid als auch mit freier DNA als Kompetitor erfolgreich (siehe Hintergrundinformationen). Im Falle von H198A war allerdings die Gesamt-Bindewahrscheinlichkeit etwas geringer als bei den Experi-

menten mit dem nativen Peptid und der Mutante R193A. Im Unterschied zu diesen Ergebnissen ergaben die Experimente mit der Mutante R203A eine äußerst geringe Zahl an Bindeereignissen, was eine statistische Analyse unmöglich machte. Zusammenfassend lässt sich also festhalten, dass die spezifische Erkennung der PhoB-Zielsequenz durch die native Sequenz sowie die beiden Mutanten R193A und H198A nachgewiesen werden konnte. Angesichts der Tatsache, dass jüngst in Frage gestellt wurde, ob kurze Peptidsequenzen mit nur einer α -Helix überhaupt zur spezifischen DNA-Bindung befähigt sind,^[1] sind unsere Resultate bemerkenswert, insbesondere, wenn man berücksichtigt, dass die Peptide mit einer Länge von 20 Aminosäuren nur ein relativ kleines Epitop aus der Bindedomäne des Proteins darstellen.

Um Informationen über die Dissoziationskinetik und die Energiehyperflächen zu erhalten, wurden dynamische Kraftspektroskopie-Experimente mit der nativen Sequenz und den Mutanten R193A und H198A durchgeführt. Bei der kraftinduzierten thermischen Dissoziation eines metastabilen molekularen Komplexes^[27–29] hängen die gemessenen Dissoziationskräfte von der zeitlichen Kraftentwicklung auf den Komplex ab, die als Belastungsrate (loading rate) bezeichnet wird. Diese ist gegeben durch das Produkt aus der molekularen Elastizität und der Rückzieh-Geschwindigkeit des Kraftsensors. In unseren Experimenten wurde die molekulare Elastizität durch Anpassung der letzten 20 Datenpunkte vor dem Bindungsbruch in der Kraft-Distanz-Kurve ermittelt. Die Rückzieh-Geschwindigkeit wurde im Bereich von 10 bis 6000 nm s^{-1} variiert.

Die Ergebnisse der dynamischen Experimente sind in Abbildung 3 gezeigt. Die aus der Analyse der entsprechenden Krafthistogramme resultierenden Abrisskräfte sind halb-logarithmisch gegen die Belastungsrate aufgetragen. Eine lineare Regression der Daten liefert zwei wichtige Parameter: Erstens ergibt die Extrapolation zu verschwindender äußerer Kraft $F=0$ die Geschwindigkeitskonstante der thermischen Dissoziation, k_{off} . Im Falle der nativen Sequenz ist $k_{\text{off}} = (3.1 \pm 2.1) \text{ s}^{-1}$ (Tabelle 1), was einer Zeitkonstanten für die Dissoziation (Lebensdauer) des Komplexes von $\tau = (320 \pm 220) \text{ ms}$ entspricht. Interessanterweise dissoziiert der Komplex aus der DNA und der Mutante R193A langsamer mit $k_{\text{off}} = (0.071 \pm 0.053) \text{ s}^{-1}$, was eine längere Lebensdauer von $\tau =$

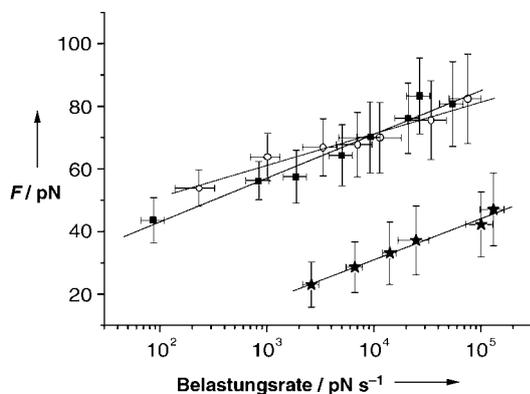


Abbildung 3. Dynamische Kraftspektroskopie. ■ = native Sequenz, ○ = R193A, * = H198A.

(14.1 ± 10.5) s bedeutet. Demgegenüber zeigt die Mutante H198A eine viel höhere Dissoziationsgeschwindigkeit mit $k_{\text{off}} = (49.5 \pm 21.2) \text{ s}^{-1}$, entsprechend einer kürzeren Lebensdauer von $\tau = (20 \pm 8) \text{ ms}$. Dies ist nicht überraschend, da in der Mutante H198A die basische Aminosäure His198 der nativen Sequenz durch Alanin ersetzt wurde. Der ladungskontrollierte Beitrag zur Affinität und damit zur Bindung des Peptids an die DNA sollte also herabgesetzt sein. Überraschenderweise zeigt die Mutante R193A, in der Arg193 durch Alanin ersetzt wurde, eine langsamere Dissoziation und damit eine längere Lebensdauer des Komplexes als die native Sequenz. Dieses Ergebnis könnte mit einer besser vorgebildeten α -helicalen Konformation des Peptids in Lösung erklärt werden, was in zukünftigen Experimenten weiter untersucht werden soll. Im Vergleich zu jüngst publizierten Einzelmolekülexperimenten mit kompletten Transkriptionsaktivatoren mit einem HTH-Bindemotiv, die kleinere Dissoziationskonstanten (2×10^{-4} bis $1.3 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ ^[23]) und somit längere Lebensdauern (100–1000 s) ergeben, deuten unsere Ergebnisse auf die Existenz und die Bedeutung kooperativer Bindeeffekte hin – ein wichtiger Punkt, der ebenfalls Gegenstand weiterer Untersuchungen sein wird.

Die Affinität eines Liganden zu seinem Rezeptor, die im Falle einer 1:1-Kinetik durch die Gleichgewichtskonstante der Dissoziation $K_D = k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ gegeben ist, wird von k_{off} dominiert.^[22] Unter der Annahme einer diffusionskontrollierten Assoziation mit einer typischen Geschwindigkeitskonstante von $k_{\text{on}} = 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ^[24,30–32] für die Bindung eines Peptids an DNA können Gleichgewichtskonstanten von $K_D = 3 \times 10^{-6} \text{ M}$ (native Sequenz), $K_D = 7 \times 10^{-8} \text{ M}$ (Mutante R193A) und $K_D = 5 \times 10^{-5} \text{ M}$ (Mutante H198A) abgeschätzt werden. Gemäß $\Delta G^\circ = RT \ln K_D$ lassen sich somit die entsprechenden Differenzen in der freien Reaktionsenthalpie unter Standardbedingungen für die Komplexbildung zu $\Delta G^\circ = -31 \text{ kJ mol}^{-1}$ (native Sequenz), $\Delta G^\circ = -41 \text{ kJ mol}^{-1}$ (Mutante R193A) sowie $\Delta G^\circ = -25 \text{ kJ mol}^{-1}$ (Mutante H198A) abschätzen.

Als weiteren Parameter erhält man aus der inversen Steigung der Regressionsgeraden (Abbildung 3) eine molekulare Reaktionslänge x_β , die $6.8 \pm 1.2 \text{ \AA}$ für das native Peptid und $7.2 \pm 3.5 \text{ \AA}$ für die Mutante H198A beträgt (Tabelle 1). Für das Peptid R193A, das auch die längste Lebensdauer aufweist, wird interessanterweise ein größerer Wert von $x_\beta = 9.3 \pm 2.6 \text{ \AA}$ erhalten. Dieses Ergebnis passt zu den vorherigen Resultaten, denn es deutet darauf hin, dass sich die letzte Aktivierungsbarriere im Falle dieses Komplexes verhältnismäßig spät auf der Reaktionskoordinaten befindet; der Komplex hat somit über eine größere Distanz auf der Reaktionskoordinate die Möglichkeit, erneut zu assoziieren (unter der Annahme mikroskopischer Reversibilität). Dies ist im Einklang mit der größeren Lebensdauer des Komplexes.

Zusammenfassend ist es zum ersten Mal gelungen, auf Einzelmolekülniveau die spezifische Bindung von Peptiden, die einen Sequenzausschnitt aus der Bindesequenz eines Transkriptionsaktivators repräsentieren, an DNA nachzuweisen. Die molekularen Dissoziationskräfte einzelner Peptid-DNA-Komplexe wurden durch AFM-Kraftspektroskopie quantitativ untersucht. In Konkurrenzexperimenten konnte außerdem die Spezifität der DNA-Bindung zweier

Peptid-Mutanten belegt werden. Dynamische Kraftspektroskopie-Experimente ergaben eine Abhängigkeit der Bindungskräfte von der äußeren Beladung, was auf eine thermisch getriebene Dissoziation schließen lässt. Es wurden Werte für die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten der einzelnen Komplexe erhalten, die ein direktes Affinitätsranking der Peptide mit einzelnen Punktmutationen ermöglichen. Unsere Resultate unterstreichen die Bedeutung der Peptidlänge und kooperativer Effekte sowie den Beitrag einzelner Punktmutationen zur spezifischen Bindung synthetischer Peptide an DNA. Darüber hinaus belegen sie das Potenzial, das die Kombination von chemischer Synthese zur Nachahmung biologischer Systeme (synthetische Biologie) mit der hohen Sensitivität der AFM-Kraftspektroskopie an einzelnen Molekülen als Methode zur Untersuchung, zum Affinitätsranking und zur Steuerung der Mechanismen und Eigenschaften molekularer Erkennungsprozesse (molekulare Nanotechnologie) bietet.

Eingegangen am 14. Januar 2005,
veränderte Fassung am 3. März 2005
Online veröffentlicht am 20. Mai 2005

Stichwörter: Einzelmolekül-Untersuchungen · Kraftspektroskopie · Molekulare Erkennung · Peptide · Punktmutationen

-
- [1] M. E. Vázquez, A. M. Caamano, J. L. Mascarenas, *Chem. Soc. Rev.* **2003**, 32, 338–349.
- [2] M. E. Vázquez, A. M. Caamaño, J. Martínez-Costas, L. Castedo, J. L. Mascarenas, *Angew. Chem.* **2001**, 113, 4859–4861; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 4723–4725.
- [3] A. M. Caamaño, M. E. Vázquez, J. Martínez-Costas, L. Castedo, J. L. Mascarenas, *Angew. Chem.* **2000**, 112, 3234–3237; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 3104–3107.
- [4] C. Melander, R. Burnett, J. M. Gottesfeld, *J. Biotechnol.* **2004**, 112, 195–220.
- [5] P. Ball, *Nanotechnology* **2005**, 16, R1–R8.
- [6] S. A. Benner, *Nature* **2003**, 421, 118.
- [7] S.-K. Kim, S. Kimura, H. Shinagawa, A. Nakata, K.-S. Lee, B. L. Wanner, K. Makino, *J. Bacteriol.* **2000**, 182, 5596–5599.
- [8] K. Makino, H. Shinagawa, M. Amemura, A. Nakata, *J. Mol. Biol.* **1986**, 190, 37–44.
- [9] K. Makino, M. Amemura, T. Kawamoto, K. Kimura, H. Shinagawa, A. Nakata, M. Suzuki, *J. Mol. Biol.* **1996**, 259, 15–26.
- [10] Brookhaven Data Base: 1QQI. 2004.
- [11] A. G. Blanco, M. Sola, F. X. Gomis-Rüth, M. Coll, *Structure* **2002**, 10, 701–713.
- [12] H. Okamura, S. Hanaoka, A. Nagadoi, K. Makino, Y. Nishimura, *J. Mol. Biol.* **2000**, 295, 1225–1236.
- [13] E. Martínez-Hackert, A. M. Stock, *J. Mol. Biol.* **1997**, 269, 301–312.
- [14] S. D. Wilking, N. Sewald, *J. Biotechnol.* **2004**, 112, 109–114.
- [15] R. Eckel, R. Ros, B. Decker, J. Mattay, D. Anselmetti, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 489–492; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 484–488.
- [16] E.-L. Florin, V. T. Moy, H. E. Gaub, *Science* **1994**, 264, 415–417.
- [17] G. U. Lee, D. A. Kidwell, R. J. Colton, *Langmuir* **1994**, 10, 354–357.
- [18] U. Dammer, O. Popescu, P. Wagner, D. Anselmetti, H.-J. Güntherodt, G. N. Misevic, *Science* **1995**, 267, 1173–1175.
- [19] T. Strunz, K. Oroszlan, R. Schäfer, H.-J. Güntherodt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 11277–11282.
- [20] R. Ros, F. Schwesinger, D. Anselmetti, M. Kubon, R. Schäfer, A. Plückthun, L. Tiefenauer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 7402–7405.
- [21] U. Dammer, M. Hegner, D. Anselmetti, P. Wagner, M. Dreier, W. Huber, H.-J. Güntherodt, *Biophys. J.* **1996**, 70, 2437–2441.
- [22] F. Schwesinger, R. Ros, T. Strunz, D. Anselmetti, H.-J. Güntherodt, A. Honegger, L. Jeremius, L. Tiefenauer, A. Plückthun, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 9972–9977.
- [23] F. W. Bartels, B. Baumgarth, D. Anselmetti, R. Ros, A. Becker, *J. Struct. Biol.* **2003**, 143, 145–152.
- [24] B. Baumgarth, F. W. Bartels, D. Anselmetti, A. Becker, R. Ros, *Microbiology* **2005**, 151, 259–268.
- [25] F. Kühner, L. T. Costa, P. M. Bisch, S. Thalhammer, W. M. Heckl, H. E. Gaub, *Biophys. J.* **2004**, 87, 2683–2690.
- [26] P. Hinterdorfer, W. Baumgartner, H. Gruber, K. Schilcher, H. Schindler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 3477–3481.
- [27] G. I. Bell, *Science* **1978**, 200, 618–627.
- [28] E. Evans, K. Ritchie, *Biophys. J.* **1997**, 72, 1541–1555.
- [29] R. Merkel, P. Nassoy, A. Leung, K. Ritchie, E. Evans, *Nature* **1999**, 397, 50–53.
- [30] M. Schlosshauer, D. Baker, *Protein Sci.* **2004**, 13, 1660–1669.
- [31] M. Vijayakumar, K.-W. Wong, G. Schreiber, A. R. Fersht, A. Szabo, H.-X. Zhou, *J. Mol. Biol.* **1998**, 278, 1015–1024.
- [32] O. G. Berg, R. B. Winter, P. H. von Hippel, *Biochemistry* **1981**, 20, 6929–6948.