

Inhibition der Bildung amyloider Aggregate

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)



eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Enrico Brandenburg
aus Nauen (Brandenburg), Deutschland

Mai 2012

1. Gutachterin: Prof. Dr. Beate Korsch
2. Gutachter: Prof. Dr. Wolfram Saenger

Disputation am 11.07.2012

Erklärung

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und Anleitung von Frau Prof. Dr. Beate Koksch in der Zeit von November 2007 bis März 2012 am Institut für Chemie und Biochemie des Fachbereichs Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien Universität Berlin angefertigt.

Hiermit versichere ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel „Inhibition der Bildung amyloider Aggregate“ selbstständig und ohne Benutzung anderer als der zugelassenen Hilfsmittel angefertigt zu haben. Alle aufgeführten Zitate sind als solche kenntlich gemacht. Die vorliegende Arbeit wurde in keinem früheren Promotionsverfahren angenommen oder als ungenügend beurteilt.

Berlin, März 2012

Enrico Brandenburg

Aus dieser Dissertation gingen bisher folgende Veröffentlichungen hervor:

- E. Brandenburg, H.v. Berlepsch, J. Leiterer, F. Emmerling, B. Koksch; **2012**, Manuskript in Bearbeitung.
- H.v. Berlepsch, R. R. Araghi, E. Brandenburg, K. Pagel, J. Leiterer, F. Emmerling, Andrea Schulz, C. Böttcher, B. Koksch; **2012**, Manuskript in Bearbeitung.
- E. Brandenburg, H.v. Berlepsch, B. Koksch; *Mol. Biosyst.* **2012**, 8(2):557-64.
- E. Brandenburg, H.v. Berlepsch, U.I.M. Gerling, C. Böttcher, B. Koksch; *Chemistry - A European Journal*, **2011**, 17(38), 10651–10661
- U.I.M. Gerling, E. Brandenburg, H.v. Berlepsch, K. Pagel, B. Koksch; *Biomacromolecules*. **2011**, 12(8), 2988-96
- A. Kashiwada, M. Tsuboi, N.Takamura, E. Brandenburg, K. Matsuda, B. Koksch; *Chemistry - A European Journal*, **2011**, 17, 6179 – 6186
- H.v. Berlepsch, E. Brandenburg, B. Koksch, C. Böttcher, *Langmuir*, **2010**, 26, 11452-11460

Publikationen

E. Brandenburg, H.v. Berlepsch, J. Leiterer, F. Emmerling, B. Kokschi; Formation of α -Helical Nanofibers by Mixing β -Structured and α -Helical Coiled Coil Peptides

2012, Manuskript in Bearbeitung.

H.v. Berlepsch, R. R. Araghi, E. Brandenburg, K. Pagel, J. Leiterer, F. Emmerling, Andrea Schulz, C. Böttcher, B. Kokschi; The protofilament structure of a designed amyloidogenic peptide: A combined TEM, AFM, and time-resolved WAXS study **2012**, Manuskript in Bearbeitung.

E. Brandenburg, H.v. Berlepsch, B. Kokschi, Specific in situ discrimination of amyloid fibrils versus α -helical fibres by the fluorophore NIAD-4. *Mol. Biosyst.* **2012** Feb; 8(2):557-64.

E. Brandenburg, H. v. Berlepsch, U.I.M. Gerling, C. Böttcher, B. Kokschi, Inhibition of Amyloid Aggregation by Formation of Helical Assemblies. *Chemistry - A European Journal*, **2011**, 17(38), 10651–10661.

U.I.M. Gerling, E. Brandenburg, H.v. Berlepsch, K. Pagel, B. Kokschi, Structure Analysis of an Amyloid-Forming Model Peptide by a Systematic Glycine and Proline Scan. *Biomacromolecules*. **2011**, 12(8), 2988-96.

A. Kashiwada, M. Tsuboi, N.Takamura, E. Brandenburg, K. Matsuda, B. Kokschi, Design and characterization of endosomal-pH-responsive coiled coil for constructing artificial membrane fusion system. *Chemistry - A European Journal*, **2011**, 17, 6179 – 6186.

E. Brandenburg, H. v. Berlepsch, B. Kokschi, Inhibition of amyloid formation in model peptides. *Journal of Peptide Science*, **2010**, 16(1), 117-118.

H.v. Berlepsch, E. Brandenburg, B. Kokschi, C. Böttcher, Peptide adsorption to cyanine dye aggregates revealed by cryo-transmission electron microscopy, *Langmuir*, **2010**, 26, 11452-11460.

Poster

E. Brandenburg, H. v. Berlepsch, B. Kokschi, Inhibition of Amyloid Formation in Model Peptides, *2nd Aymloid Meeting Halle*, **2011**

E. Brandenburg, H. v. Berlepsch, B. Kokschi, Inhibition of Amyloid Aggregation by Formation of Helical Assemblies, *10th German Peptide Symposium*, **2011**

E. Brandenburg, H. v. Berlepsch, B. Kokschi, Inhibition of Amyloid Formation in Model Peptides. *31st European Peptide Symposium*, **2010**

A. Kashiwada, M. Tsuboi, N. Takamura, E. Brandenburg, K. Matsuda, B. Kokschi, Design and characterization of endosomal-pH-responsive coiled coil for constructing artificial membrane fusion system, *Tag der Chemie*, **2010**

E. Brandenburg, H. v. Berlepsch, B. Kokschi, Inhibition of Amyloid Formation in Model Peptides, *1st Amyloid Meeting Halle*, **2009**

H.v. Berlepsch, R. R. Araghi, E. Brandenburg, K. Pagel, J. Leiterer, F. Emmerling, Andrea Schulz, C. Böttcher, B. Kokschi, The Ultrastructure of amyloid fibrils of a de novo designed peptide, *1st Amyloid Meeting Halle*, **2009**

E. Brandenburg, H. v. Berlepsch, B. Kokschi, Inhibition of Amyloid Aggregation by Formation of Helical Assemblies, *Tag der Chemie*, **2009**

E. Brandenburg, H. v. Berlepsch, B. Kokschi, Inhibition of Amyloid Aggregation by Formation of Helical Assemblies, *9th German Peptide Symposium*, **2009**

Danksagung

Frau Prof. Dr. Koksche danke ich die Möglichkeit der Promotion in ihrer Arbeitsgruppe. Ich bedanke mich für das interessante, herausfordernde und ergiebige Thema der Arbeit und für die Freiheit eigene Ideen umsetzen zu können sowie für die Förderung meiner Arbeit durch die Teilnahme an zahlreichen wissenschaftlichen Konferenzen.

PD Dr. Christoph Böttcher und ganz besonders Dr. Hans von Berlepsch danke ich für die Unterstützung bezüglich der strukturellen Charakterisierung der amyloiden Aggregate und für den regen Austausch zur Klärung wissenschaftlicher Fragestellungen. Die gute und enge Zusammenarbeit an dieser Stelle hat maßgeblich zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Prof. Dr. Wolfram Saenger danke ich für die Übernahme der Begutachtung der Dissertation.

Zu guter Letzt bedanke ich mich bei meiner Familie, bei Thomas Grohmann sowie bei Romy für deren Unterstützung und Rückhalt.

Referat

Die Aggregation einer ganzen Reihe von verschiedenen Proteinen steht in einem engen Zusammenhang mit verschiedenen Krankheiten, wie z.B. Alzheimer. Obwohl die dafür verantwortlichen Proteine sich in ihrer Ausgangsstruktur und ihrer Sequenz unterscheiden, zeigen sie alle die strukturelle Veränderung zu β -Faltblatt-reichen fibrillären Aggregaten mit der charakteristischen *cross- β* -Struktur. Der zugrunde liegende Mechanismus verläuft über mehrere Stufen, indem sich instabile präfibrilläre Oligomere über fibrilläre Vorstufen schließlich zu amyloiden Fibrillen zusammenlagern. Die mechanistischen Details sind nur wenig verstanden und viele verschiedene Strategien zur Entwicklung von Inhibitoren gegen die amyloide Aggregation sind bisher verfolgt worden. In den meisten Fällen binden die chemisch diversen Verbindungen an bereits aggregierte Formen des amyloidogenen Proteins in der β -Faltblattkonformation. Das *Screening* von Substanzbibliotheken und das rationale Design führt in den meisten Fällen zu Inhibitoren die an die aggregierte Spezies binden und die weitere Polymerisation durch die Blockierung der Addition weiterer Monomere unterbinden. Zahlreiche Studien in der Entwicklung peptidbasierter Inhibitoren gehen von amyloiden Kernsequenzen der jeweiligen Proteine aus, da sie dafür bekannt sind, an sich selbst zu binden. Peptidbasierte Inhibitoren binden meist an das amyloidogene Peptidrückgrat in β -Faltblattkonformation. Einmal gebunden, blockieren diese Inhibitoren das Fibrillenwachstum durch sterische Effekte, elektrostatische Abstoßung oder durch das Unterbinden der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen. Doch diese Strategie kann möglicherweise die Menge an präfibrillären Oligomeren erhöhen, welche als wesentliche toxische Spezies des Amyloidbildungsprozesses diskutiert werden. Daher sind alternative Ansätze notwendig. Der Übergang vom löslichen Monomer in β -Faltblatt-reiche Spezies ist hierbei der entscheidende Schritt. Einige natürliche amyloidogene Peptidsequenzen bergen ebenfalls Elemente einer α -Helix oder bilden während des Aggregationsprozesses helikale Intermediate. Die Stabilisierung der helikalen Konformation zur Vermeidung des entscheidenden Schritts ist daher ein viel versprechender Ansatz in der Inhibition.

Im Rahmen dieser Arbeit werden Studien beschrieben, die das Potential dieser Strategie anhand von Modellpeptiden demonstrieren. Der Ansatz beruht auf helikalen peptidischen Inhibitoren, die designt worden sind, die amyloidogenen Modellpeptide in einem helikalen Komplex zu stabilisieren und auf diese Weise den Übergang zur β -Faltblattkonformation und daraus folgend die Bildung von amyloiden Fibrillen zu inhibieren. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass helikale peptidische Inhibitoren in der Lage sind, bereits gebildet amyloide Fibrillen wieder aufzulösen.

Abstract

The formation of amyloid aggregates is responsible for a wide range of diseases, for example Alzheimer's disease. Although the amyloid forming proteins have natively different structures and different sequences, all undergo a structural change to form amyloid aggregates that have a characteristic cross- β -structure. The mechanism is a multistep process in which unstable prefibrillar oligomers assemble via fibrillar intermediates into amyloid fibrils. The mechanistic details of this process are poorly understood and different strategies to develop inhibitors of amyloid formation are followed to date. In most cases, chemically diverse compounds bind to an elongated form of the protein in a β -strand conformation and thereby exert their therapeutic effect. The screening of libraries of small molecules and the rational design leads in most cases to inhibitors that bind to aggregated species and prevent further polymerization by blocking the addition of peptide monomers. Numerous studies in the development of peptide based amyloid aggregation inhibitors have taken the core sequence of the target peptide as a lead as it is already known to bind to itself. The peptide based inhibitors were designed to bind to the peptide backbone in β -sheet conformation. They block further elongation by steric effects, electrostatic repulsion, or inhibition of the formation of hydrogen-bonds. However, blocking fibril formation with this strategy could increase the amount of prefibrillar oligomeric forms, which are thought to be the toxic species in the amyloid formation process. Therefore, alternative approaches are necessary.

The conversion from the soluble monomeric form into β -sheet rich aggregated morphologies appears to be the key event. Several naturally occurring amyloidogenic peptides that form β -sheet rich fibrils harbor also an α -helix in the primary structure or appear to form helical intermediates during amyloid formation under certain conditions. Therefore, one promising approach is the stabilization of the helical conformation to prevent the key-event, the conversion to β -sheet and the formation amyloids.

This thesis presents the investigation of the potential of this approach using model peptides. The approach consists of a helical inhibitor peptides which are designed to engage amyloid forming model peptides in a stable helical arrangement, thus to prevent rearrangement into a β -sheet conformation and the subsequent formation of amyloid-like fibrils. Moreover, the helix forming peptide is able to disassemble mature amyloid-like fibrils.

1 EINLEITUNG	3
2 STRUKTUR AMYLOIDER FIBRILLEN	7
2.1 MAKROSKOPISCHE STRUKTUR DER AMYLOIDFIBRILLEN	7
2.2 INTERNE STRUKTUR AMYLOIDER PROTOFILAMENTE	8
2.3 MOLEKULARE GRUNDLAGEN UND INTERNE STRUKTUR AMYLOIDER FIBRILLEN	10
2.3.1 Amyloidogene Kernsequenzen.....	11
2.3.2 Allgemeines Sequenz-Muster amyloidogener Kernsequenzen.....	13
2.3.3 Modell des sterischen Reißverschlusses („steric zipper“)	14
2.3.4 Die Rolle aromatischer Seitenketten	15
3 MECHANISMEN DER BILDUNG AMYLOIDER FIBRILLEN	17
3.1 MODELLE DER GESTEIGERTEN INTERAKTION („GAIN-OF-INTERACTION“)	18
4 KINETIK DER BILDUNG AMYLOIDER FIBRILLEN	21
5 AMYLOIDOGENE OLIGOMERE UND IHRE PATHOLOGISCHE BEDEUTUNG	24
5.1 DIE BEDEUTUNG α -HELIKALER INTERMEDIATE	25
6 EINGRIFF IN DEN PROZESS DER BILDUNG AMYLOIDER AGGREGATE	28
6.1 INHIBITION DER BILDUNG AMYLOIDOGENER PROTEINE UND PEPTIDE.....	30
6.2 FÖRDERUNG DER DEGRADATION AMYLOIDOGENER PROTEINE UND PEPTIDE.....	32
6.3 INHIBITION DER AGGREGATION AMYLOIDOGENER PROTEINE UND PEPTIDE	32
6.3.1 Strategie der Stabilisierung der α -helikalen Konformation	34
6.3.2 Nicht-peptidische Inhibitoren	36
6.3.2.1 Unspezifische Modulatoren der Aggregation	37
6.3.2.2 Natürliche Polyphenole	39
6.3.2.3 Kinetische Stabilisierung des nativen Zustands.....	41
6.3.2.4 Rationales Design und Wirkung von Metall-Chelatoren	42
6.3.2.5 Stabilisierung der α -helikalen Konformation	44
6.3.2.6 Mimetika der β -Faltblattstruktur.....	46
6.3.2.7 Inhibition durch Nanopartikel.....	47
6.3.2.8 Nicht-peptidische Verbindungen in klinischen Studien	47
6.3.3 Peptidbasierte Inhibitoren	50
6.3.3.1 <i>Screening</i> von inhibitorisch wirksamen Peptiden.....	51
6.3.3.2 Rationales Design von peptidbasierten Inhibitoren.....	53
6.3.3.2.1 Austausch von Aminosäuren	54
6.3.3.2.2 Modifikation der Termini.....	57
6.3.3.2.3 Modifikation des Peptidrückgrats	59
6.3.3.2.4 Zyklisierung von Peptiden	70
6.3.3.2.5 Multivalente Inhibitoren	73
6.3.3.2.6 Strukturbasiertes Design.....	74
6.3.3.2.6 Stabilisierung der α -helikalen Konformation	75
6.3.3.2.7 Stabilisierung von β -Faltblatt-Strukturen im nicht amyloiden Zustand.....	79
6.4 KONTROLLE DER PROTEINFALTUNG	82
6.4.1 Proteine und Moleküle mit Chaperone-Funktion	83
6.4.2 Die BRICHOS-Domäne	84
6.5 IMMUNOTHERAPIE	84
6.5.1 Formen der Immunisierung.....	85
6.5.2 Wirkungsmechanismen immunotheapeutischer Ansätze	85
6.5.3 Generierung spezifischer anti-amyloidogener Antikörper	86
6.5.4 Ergebnisse und Studien.....	87
6.6 ZUSAMMENFASSUNG.....	88
7 AMYLOIDE MODELLPEPTIDE	91
7.1 FRAGMENTE AMYLOIDOGENER PEPTIDE UND PROTEINE.....	92
7.2 <i>DE NOVO</i> -DESIGN AMYLOIDOGENER MODELLPEPTIDE	92
7.2.1 Design struktureller Ambivalenz	93
7.2.2 Coiled Coil-basierte Switch-Peptide	95
7.3 AMYLOIDOGENE KERNSEQUENZEN IN KOMBINATION MIT DEM <i>SWITCH</i> -PEPTID-ANSATZ.....	97
8 ZIELE DER ARBEIT	99

9 DESIGN DER VERWENDETEN MODELLPEPTIDE	100
9.1 MODELLPEPTIDE BASIEREND AUF DEM <i>COILED COIL</i> -FALTUNGS-MOTIV	100
9.2 MODELLPEPTIDE AUF BASIS EINER AMPHIPATHISCHEN HELIX	101
10 CHARAKTERISIERUNG DER MODELLPEPTIDE	103
10.1 <i>COILED COIL</i> -BASIERTES MODELLPEPTID VW01	103
10.2 MODELLPEPTID VW01-RAN.....	107
10.3 <i>COILED COIL</i> -BASIERTES MODELLPEPTID VW18	109
10.4 <i>COILED COIL</i> -BASIERTES MODELLPEPTID VW19	114
10.5 <i>COILED COIL</i> -BASIERTES MODELLPEPTID RR01	117
10.5.1 Aufklärung der supramolekularen Struktur des Modellpeptids RR01.....	120
10.6 MODELLPEPTIDE BASIEREND AUF EINER AMPHIPATHISCHEN HELIX.....	131
10.7 NIAD-4 FLUORESCENZ BEI HELIKALEN FASERN UND AMYLOIDEN FIBRILLEN	135
11 INHIBITION DER BILDUNG AMYLOIDER AGGREGATE	143
11.1 MISCHUNGSSYSTEM VW18 UND VW01	143
11.2 MISCHUNGSSYSTEM VW19 UND VW01	150
11.3 MISCHUNGSSYSTEM RR01 UND VW01.....	158
11.4 MISCHUNGSSYSTEM RR01 UND FF03.....	161
11.5 MISCHUNGSSYSTEM α -AH UND β -AH-V	164
11.6 MISCHUNGSSYSTEM PSEUDOPEPTID PP1 MIT VW18 UND RR01	166
11.7 EINFÜHRUNG DES AMYLOIDOGENEN MODELLPEPTIDS VW18 IN EINE ZELLULÄRE UMGEBUNG	170
12 DISKUSSION	176
12.1 DISKUSSION DER INHIBITION DURCH STABILISIERUNG DER α -HELIKALEN KONFORMATION	176
12.2 DISKUSSION DER INHIBITION DURCH PSEUDOPEPTID PP1	187
13 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....	189
14 EXPERIMENTELLE BESCHREIBUNG.....	193
14.1 PEPTID SYNTHESE, REINIGUNG UND CHARAKTERISIERUNG.....	193
14.1.1 Festphasenpeptidsynthese.....	193
14.1.2 Reinigung und Charakterisierung	195
14.1.3 Synthetisierte Peptide.....	196
14.2 FALTUNGSSTUDIEN	197
14.2.1 Allgemeine Bedingungen.....	197
14.2.2 Konzentrationsbestimmung	198
14.2.3 Bestimmung der Nettoladung eines Peptids	199
14.2.4 Probenpräparation	199
14.2.5 CD-Spektroskopie.....	200
14.2.6 Fluoreszenz-Assays	202
14.2.6.1 Thioflavin T	202
14.2.6.2 NIAD-4.....	204
14.2.7 Inhibitionsstudien mit Hilfe der CD-Spektroskopie und Fluoreszenz-Assays.....	205
14.2.8 Größenausschlusschromatographie.....	205
14.2.9 Analytische Ultrazentrifugation	206
14.2.10 Limitierte Proteolyse	208
14.2.11 Computer-Algorithmen zur Vorhersage des Faltungsverhaltens	209
14.2.11.1 AGADIR.....	209
14.2.11.2 TANGO.....	209
14.3 STRUKTURELLE CHARAKTERISIERUNG	210
14.3.1 Elektronenmikroskopie	210
14.3.2 Röntgenbeugung	211
14.3.3 Festphasen-Kernresonanzspektroskopie (ssNMR).....	213
15 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	215
16 LITERATUR	217

1 Einleitung

Die Faltung eines Proteins in eine definierte dreidimensionale Struktur steht in einem engen Zusammenhang mit der Funktion des Proteins. Funktionale Proteine kontrollieren und regulieren lebenswichtige biochemische Prozesse und dienen als Strukturproteine in lebenden Systemen. Bestimmte Umstände können jedoch zu einer Fehlfaltung des Proteins mit dramatischen Folgen für den Organismus führen. Die Fehlfaltung von Proteinen und die anschließende selbstorganisatorische Aggregation zu nichtfunktionalen, unlöslichen, fibrillären Strukturen, welche als Amyloide bzw. als amyloide Aggregate bezeichnet werden, stehen in Verbindung mit einer ganzen Reihe von Erkrankungen. Der Begriff „amyloid“ bedeutet stärkeähnlich und geht auf frühe histologische Untersuchungen von Rudolph Virchow zurück, der 1854 feststellte, dass abnormale Ablagerungen im Gehirn sich ähnlich wie Stärke mit Iod anfärben lassen.^[1] Der Prozess der Anreicherung amyloider Ablagerungen in verschiedenen Geweben wird als Amyloidose bezeichnet. Daraus folgende Erkrankungen beruhen jeweils auf der Fehlfaltung und Aggregation eines spezifischen Proteins. Bisher sind ca. 27 verschiedene Proteine bekannt, deren Aggregation in Verbindung mit entsprechenden Erkrankungen stehen. Dazu gehören neurodegenerative Krankheiten, mit entsprechenden Ablagerungen im Gehirn, lokale Amyloidosen, mit Ablagerungen in unterschiedlichen Geweben und Organen, und systematische Amyloidose, mit Ablagerungen in gleichzeitig verschiedenen Geweben.^[2] Eine Auswahl einiger dieser Krankheiten unterteilt in die verschiedenen Gruppen ist in der Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Erkrankungen, die in Verbindung mit amyloiden Ablagerungen stehen.

Krankheit	Aggregierendes Protein	Anzahl der Aminosäuren
Neurodegenerativ		
Alzheimer-Krankheit	Amyloid- β -Peptid	40 oder 42
Parkinson-Krankheit	α - Synuclein	140
Huntington-Krankheit	Huntington mit Poly-Q Sequenz	3144
Lokale Amyloidose		
Typ II Diabetes	Amylin (Islet Amyloid Polypeptide, IAPP)	37
AE-Amyloidose	z.B. Calcitonin	32
Systematische Amyloidose		
AA-Amyloidose	Serum-Amyloid-A	76-104
AL-Amyloidose	Immunglobulin-Leichtketten	~ 90
ATTR-Amyloidose	Transthyretin	127

Die Aggregation von löslichen, funktionalen Proteinen in schwer lösliche amyloide Fibrillen ist ein außerordentlich komplexer Prozess.^[2] Die Komplexität bezieht sich sowohl auf die Kinetik des Aggregationsprozesses als auch auf die unterschiedlichen Strukturen, die während des Aggregationsprozesses gebildet werden. So ist die funktionale, native Struktur natürlicher amyloidogener Proteine sehr unterschiedlich. Trotz der unterschiedlichen nativen Struktur zeigen natürliche und synthetische amyloidogene Peptide bzw. Proteine im amyloiden Zustand erstaunlicherweise viele übereinstimmende Eigenschaften. Zu diesen Eigenschaften gehören die charakteristische Morphologie der Fibrillen in elektronenmikroskopischen Aufnahmen, ein typisches Röntgenbeugungsmuster, eine rotgrüne Doppelbrechung bei Anfärbung der Fibrillen mit dem Farbstoff Kongorot, eine typische Verschiebung der Fluoreszenz bei der Anfärbung mit dem Farbstoff Thioflavin T sowie eine β -Faltblatt-Signatur in CD-Spektren.^[3, 4] Fibrilläre Ablagerungen, die diese Eigenschaften aufweisen, werden unter dem Begriff Amyloid zusammengefasst. Die gemeinsamen Eigenschaften beruhen dabei auf Gemeinsamkeiten in der Struktur der verschiedenen Proteine im amyloiden Zustand.^[3]

Zahlreiche neurodegenerative Krankheiten, wie z.B. Parkinson, Creutzfeld-Jakob und Alzheimer, stehen in Verbindung mit der Bildung amyloider Aggregate im Gehirn. Morbus Alzheimer gehört zu den häufigsten Formen der neurodegenerativen Erkrankungen und umfasst bis zu 80 % der an Demenz erkrankten Patienten weltweit. Das Ausmaß und die Folgen der Demenz werden in dem jüngsten Welt-Alzheimer-Bericht aus dem Jahre 2010 der Alzheimer Disease International (ADI), einem Zusammenschluss von Alzheimer-Vereinigungen aus der ganzen Welt^[5], deutlich. Dieser Bericht zeigt einen deutlichen Zusammenhang zwischen dem Wohlstand eines Landes und der Zahl der Demenzerkrankungen. Über die Hälfte der Menschen mit Demenz leben in Ländern mit hohem Einkommen, 39 % in Ländern mit mittlerem Einkommen und lediglich 14 % in Ländern mit niedrigem Einkommen.^[6] Der Wohlstand sorgt für ein längeres Leben der Menschen, aber gleichzeitig steigt das Risiko, an Demenz zu erkranken. Heute sind ca. 35 Millionen Menschen weltweit an Demenz erkrankt. Im Jahre 2010 betragen die weltweiten ökonomischen Kosten von Demenz ca. 420 Milliarden Euro, was über den Kosten für Herz- oder Krebserkrankungen liegt. Die Anzahl der Erkrankten und die damit verbundenen Kosten werden nach dem ADI-Bericht bis 2030 auf ca. das Doppelte ansteigen.^[6] Demenz im Allgemeinen und die Alzheimer-Krankheit im Besonderen haben daher eine große gesellschaftliche und wirtschaftliche Bedeutung und die Forschung an Amyloiden und insbesondere die Entstehung und Behandlung der Alzheimerschen Krankheit bildet einen Schwerpunkt in der wissenschaftlichen Forschung.

Alois Alzheimer beschrieb schon 1906 den Zusammenhang zwischen Störungen der Hirnfunktionen und extrazellulären Ablagerungen, den senilen Plaques. So sind im Rahmen histologischer Untersuchungen die senilen Plaques oft von degenerierten Nervenzellen mit abnormalen Axonen und Dendriten umrandet. Mitte der 1980er Jahren konnte man schließlich die amyloidogene Hauptkomponente der senilen Plaques, das Amyloid- β -Peptid ($A\beta$ -Peptid), isolieren. Es lässt sich ebenfalls in den Blutgefäßen im Gehirn und außerhalb des Gehirns nachweisen. In der Forschung geht man davon aus, dass es aus diversen Gründen, wie z.B. durch genetische Disposition, durch den Alterungsprozess oder bedingt durch die Umwelt, zu einer Akkumulation und Aggregation des betreffenden $A\beta$ -Peptids kommt. In der Folge kommt es zu Schädigungen und Verlust von Nervenzellen, was schließlich zur Demenz führt.^[7]

Die wissenschaftliche Forschung beschäftigt sich mit Fragestellungen der strukturellen Charakterisierung sowie der molekularen Grundlagen des Aggregationsprozesses, aber auch mit Möglichkeiten zur Vorhersage, Vorbeugung, Diagnose und Behandlung der Erkrankung. Begrenzte Erfolge lassen sich zwar verzeichnen, jedoch ist der Durchbruch, d.h. eine wirksame Therapie, noch nicht erreicht. Die Entdeckung eines Weges zur Behandlung derartiger Erkrankungen stellt noch immer eine große Herausforderung für die Forschung dar und vielfältige Ansätze werden dabei verfolgt, die von der Entwicklung kleinerer peptid- und nicht-peptidbasierter Verbindungen, von Molekülen, welche die korrekte Faltung des Proteins unterstützen, bis hin zum Design von spezifischen Antikörpern reichen. Grundlegend für die Entwicklung von Therapien ist ein Verständnis des gesamten Prozesses, von der Entstehung bis hin zu den spezifischen Auswirkungen amyloider Aggregate.

Der Aggregation amyloidogener Proteine und Peptide ist ein mehrstufiger Prozess, wobei ausgehend von der nativen Ausgangsstruktur instabile präfibrilläre Oligomere gebildet werden, die über fibrilläre Vorstufen schließlich zu amyloiden Fibrillen aggregieren. In den letzten Jahren hat sich die Sicht auf amyloide Aggregate stark verändert. So ging man zunächst von einer generellen Toxizität der amyloiden Fibrillen aus. Nun stehen jedoch die Intermediate zwischen nativer Ausgangsstruktur und amyloider Fibrille als eigentliche toxische Spezies im Fokus der wissenschaftlichen Forschung. Die Intermediate sind instabil und entziehen sie sich daher der strukturellen Charakterisierung, was das strukturbasierte rationale Design von potentiellen Inhibitoren erschwert. Die Suche nach chemischen Verbindungen mit Hilfe von Substanzbibliotheken und das rationale Design führen häufig zu Inhibitoren, die lediglich den Polymerisationsprozess, d.h. das Wachstum der Fibrillen, inhibieren. Die Bildung von potentiell toxischen Intermediaten wird jedoch dadurch nicht verhindert. Daher müssen alternative Strategien und entsprechende effektive Inhibitoren

entwickelt werden, welche die Bildung von toxischen Intermediaten verhindern bzw. sie in nicht-toxische Formen überführen. Der Übergang von der nativen Struktur des Proteins zu β -Faltblatt-reichen Aggregaten ist hierbei entscheidend. Lässt sich der Übergang durch die Zugabe entsprechender Inhibitoren vermeiden, können die toxischen Intermediate nicht gebildet werden. Ein Ansatzpunkt liegt in der Primärstruktur einiger amyloidogener Peptide, die trotz ihrer Neigung zur Bildung β -Faltblatt-reicher Aggregate helikale Elemente enthalten. Andere amyloidogene Peptide scheinen im Prozess der Bildung amyloider Aggregate helikale Intermediate zu bilden. Eine Strategie ist daher die spezifische Adressierung der molekularen Ambivalenz zwischen β -Faltblatt und α -Helix und die Beeinflussung in Richtung stabiler α -helikaler Strukturen. Auf der Basis *de novo* designter Modellpeptide wurde das Potential dieser Strategie zur Vermeidung des Übergangs von der Konformation der nativen Ausgangsstruktur zu β -Faltblatt-reichen Aggregaten im Rahmen dieser Arbeit untersucht und beschrieben. Modellpeptide sind hierbei aus verschiedenen Gründen vorteilhafter gegenüber natürlichen amyloidogenen Sequenzen. Zum einen ist der Prozess der Aggregation natürlicher Systeme außerordentlich komplex und bis heute nicht vollständig aufgeklärt, und zum anderen sind natürliche amyloidogene Peptide im Vergleich zu Modellsystemen nur schwer synthetisch zugänglich und weisen häufig eine schlechtere Löslichkeit im wässrigen Milieu auf, was ihre experimentelle Verwendung erschwert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden für die jeweiligen Fragestellungen auf bereits in der Arbeitsgruppe etablierte Modellsysteme zurückgegriffen, aber auch neue Modellsysteme entwickelt und charakterisiert.

Der erste Teil der Dissertation beschäftigt sich mit den grundlegenden Eigenschaften und molekularen Grundlagen amyloider Fibrillen, gefolgt von kurzen Erläuterungen verschiedener Mechanismen und der Kinetik der Fibrillenbildung. Aufgrund der enormen Bedeutung der Intermediate des Amyloidbildungsprozesses als toxische Spezies und im Hinblick auf die Inhibition der Bildung amyloider Fibrillen und Reduktion der toxischen Auswirkungen wird anschließend auf die Intermediate eingegangen, gefolgt von einer ausführlichen Darstellung verschiedener Ansätze des Eingriffs in den Amyloidbildungsprozess. Der zweite Teil dient der Beschreibung der experimentellen Arbeit und der Darstellung der Ergebnisse, gefolgt von einer Zusammenfassung und einem Ausblick.

2 Struktur amyloider Fibrillen

Für die strukturelle Charakterisierung von Amyloiden standen in der frühen Phase der Forschung in diesem Feld Methoden, wie z.B. die Transmission Elektron Mikroskopie (TEM), Rasterkraft-Mikroskopie (AFM) und Röntgenbeugungsuntersuchungen (WAXS, SAXS) zur Verfügung.^[2, 8] Die strukturelle Charakterisierung mit atomarer Auflösung, beispielsweise mit Methoden der Kristallographie oder konventioneller lösungsbasierter NMR-Spektroskopie, ist nicht möglich. Der wesentliche Grund liegt in der spezifischen Beschaffenheit amyloider Aggregate. Sie sind zwar unlöslich, lassen sich jedoch nicht kristallisieren. Doch mit der Weiterentwicklung der Festphasen-NMR sowie mit der Möglichkeit, Kristalle aus kleinen amyloidogenen Peptidfragmenten zu bilden, gelang es, einen tieferen Einblick in die Struktur amyloider Fibrillen zu bekommen. Kenntnisse der Struktur der Aggregate sind für die Inhibition des Aggregationsprozesses grundlegend. In den folgenden Ausführungen gehe ich daher auf die makroskopische Struktur und die interne Struktur amyloider Fibrillen ein.

2.1 Makroskopische Struktur der Amyloidfibrillen

Amyloide Fibrillen zeigen eine charakteristische Morphologie. Sie können eine Länge von mehreren μM erreichen. Die Breite beträgt häufig nicht mehr als 25 nm. Sie sind in der Regel gewunden, geradlinig und unverzweigt. Die gereiften Fibrillen bestehen aus einen oder mehreren fibrillären Untereinheiten, die als Protofilamente bezeichnet werden. Mit Kryoelektronenmikroskopie und darauf beruhenden Rekonstruktionsmethoden sowie mit Festphasen-NMR wurden diese Untereinheiten genauer untersucht. Die amyloide Fibrille setzt sich nach diesen Ergebnissen aus ineinander verdrehten Protofilamenten zusammen, wobei die Anzahl der Protofilamente als auch deren Anordnung zueinander variieren kann (Abbildung 1b).^[9] Diese Variabilität führt zu einem strukturellen Polymorphismus, welcher sich mit Hilfe elektronenmikroskopischer Methoden durch Bestimmung der charakteristischen Breite und den Abständen zwischen den Überkreuzungen („*crossover*“) der einzelnen Protofilamente zeigen lässt.^[10-14] Polymorphismus bezieht sich hierbei auf die Variabilität in der Konformation sowie der internen Struktur der verschiedenen Fibrillen und stellt eine bedeutende strukturelle Eigenschaft amyloider Fibrillen und einen entscheidenden Unterschied zur nativen dreidimensionalen Faltung von Proteinen dar, wo es meist nur einen definierten Endzustand gibt.^[15, 16] Drei verschiedene Formen des Polymorphismus lassen sich unterscheiden (Abbildung 1). Polymorphismus kann zum einen auf einer unterschiedlichen

Anzahl der Protofilamente, zum anderen auf unterschiedliche relative Orientierung der Protofilamente zueinander sowie auf eine unterschiedliche interne Struktur der Protofilamente zurückgeführt werden. Die unterschiedliche interne Struktur der Protofilamente beruht auf

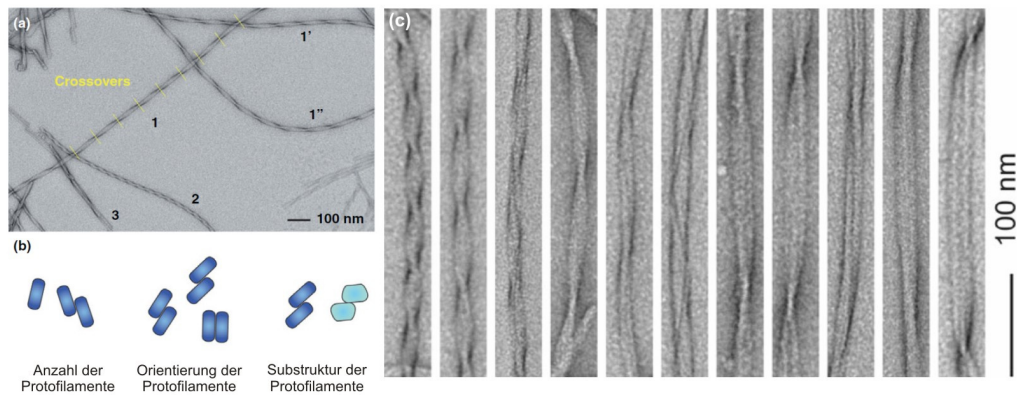


Abbildung 1: (a) Überkreuzende Protofilamente einer amyloiden Fibrillen, (b) Mögliche strukturelle Unterschiede, die dem Polymorphismus zu Grunde liegen können (nach Lit. ^[15] © 2011 Copyright Elsevier Ltd.), (c) Polymorphismus des A β -Peptids (nach Lit. ^[17] © 2007 by The National Academy of Sciences of the USA)

unterschiedlicher Packung der Aminosäureseitenketten und der entsprechenden Aminosäurezusammensetzung der beteiligten Sequenzen^[15, 18] und lässt sich nur mit Methoden der atomaren Auflösung aufklären.^[14, 19]

Struktureller Polymorphismus in verschiedenen Proben kann auf unterschiedliche Vorbehandlungsprotokolle^[20-22], unterschiedliche Bedingung der Inkubation und Lösung amyloidogenen Peptids zurückgehen.^[15, 19, 23] Zu den wesentlichen Bedingungsfaktoren gehören die Anwesenheit von Salz und Metallionen sowie verschiedene Puffersysteme.^[24, 25] Aber auch verschiedene Raten der spontanen Nukleation sowie Fibrillenlänge und Fragmentation können zu unterschiedlichen Morphologien führen.^[14, 19, 26, 27] Der Polymorphismus hat ebenfalls Auswirkungen auf die Inhibition des Aggregationsprozesses und auf die Entwicklung von Medikamenten und Therapien.^[28] So konnte für A β (1-40) gezeigt werden, dass die morphologisch verschiedenen Fibrillen in unterschiedlicher Stärke toxisch auf neuronale Zellen wirken.^[14]

2.2 Interne Struktur amyloider Protofilamente

CD- und FTIR-Spektren zeigen, dass amyloide Fibrillen aus β -Faltblatt-Einheiten aufgebaut sind. Mit Hilfe der Analysen von Röntgenbeugungsmessungen konnte man feststellen, wie β -Faltblatt-Einheiten innerhalb der Protofibrille angeordnet sind. Es wurde die interne Struktur sowohl von *ex vivo* gewonnenen als auch von synthetisierten amyloiden Fibrillen untersucht. Die Analyse der Röntgenbeugungsmuster führte schließlich zu einem Modell der

internen Struktur von Protofilamenten.^[29, 30] Dieses Beugungsmuster besteht aus einer scharfen Reflexion entlang der Fibrillenachse, die einer Länge von 4,6 bis 4,8 Å entspricht, und einer eher diffusen Reflexion senkrecht zur Fibrillenachse, die einer Länge von etwa 10 Å entspricht.^[31] Dieses Muster ist charakteristisch für die *cross-β*-Struktur (Abbildung 2). Die

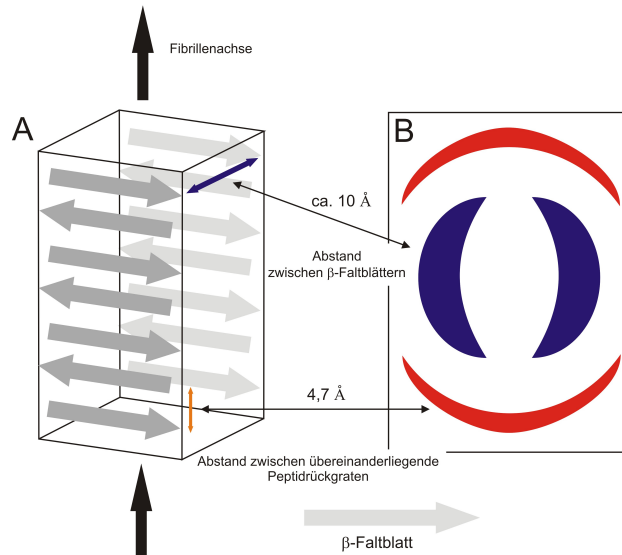


Abbildung 2: (A) Schematische Darstellung der *cross-β*-Struktur, adaptiert nach Lit.^[9] (B) Schematische Darstellung des Röntgenbeugungsmusters einer Amyloidfibrille (adaptiert nach Lit.^[3]).

Länge von 4,6 bis 4,8 Å entspricht dem Abstand zwischen den übereinander liegenden β -Faltblättern, der sich aus dem Abstand der Wasserstoffbrückenbindungen von 4,7 Å ergibt, und die Länge von etwa 10 Å geht auf den Abstand zwischen den benachbarten β -Faltblättern zurück und entspricht dem Packungsabstand der Aminosäureseitenketten.^[3] Lange Zeit war neben der *cross-β*-Struktur auf molekularer Ebene nur wenig bekannt über die Struktur amyloider Fibrillen, da sich die Aggregate der Kristallisation und der darauf basierenden strukturellen Charakterisierung entziehen. Jedoch konnte in den letzten Jahren mit Methoden der Festphasen-NMR eine Reihe von Erkenntnissen gewonnen werden.^[32-34] Auf der Basis von Daten aus Festphasen-NMR und elektronenmikroskopischen Untersuchungen schlug die Arbeitsgruppe von Robert Tycko ein Modell für die Struktur der Protofilamente der Fibrillen des $A\beta$ -Peptids vor. Nach diesem Modell ist der N-Terminus, d.h. $A\beta(1-17)$, ungeordnet und $A\beta(18-42)$ befindet sich in der *cross-β*-Struktur in einer β -Strang-Turn- β -Strang-Konformation (Abbildung 3A).^[14, 35, 36] In darauf folgenden Studien gelang es, einen tieferen Einblick in die strukturellen Unterschiede, die dem Polymorphismus zu Grunde liegen, zu gewinnen, wobei die unterschiedliche Assoziation der in Abbildung 3, A gezeigten Struktur zu einem unterschiedlichen dreidimensionalen Aufbau der Fibrille führt.^[19, 26, 37] B.H. Meier und seine Mitarbeiter wendeten Methoden der Festphasen-NMR auf HET-s Prion Protein an,

ein funktionales Prion-Protein eines Pilzes (*Podospora anserina*).^[38-41] Sie entwickelten ein Modell, dass eine große Ähnlichkeit mit β -Helix-Motiven^[42] besitzt (Abbildung 3, B). In einer Folgestudie konnte ein Zusammenhang zwischen der spezifischen Amyloidstruktur und

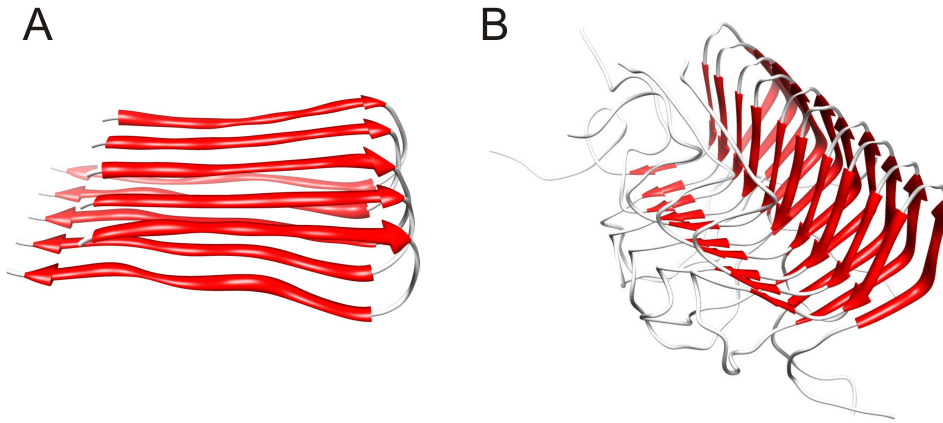


Abbildung 3: (A) Struktur des A β -Peptids im amyloiden Zustand nach Lit.^[36] (PDB ID: 2BEG), wobei der ungeordnete N-Terminus nicht dargestellt ist (B) Struktur von Prion Protein HET-s im amyloiden Zustand nach Lit.^[39] (PDB ID: 2RNM).

der Infektiosität von Prionen aufgezeigt werden.^[41] Darüber hinaus wurde eine Reihe weiterer Strukturmodelle für verschiedene amyloidogene Proteine und Peptide vorgeschlagen, darunter wassergefüllte Nanoröhren.^[43-46] Sie sollen jedoch hier nicht im Einzelnen diskutiert werden. Es wird jedoch in beiden dargestellten Beispielen deutlich, dass nur Teile des amyloidogenen Proteins bzw. Peptids zum Aufbau der *cross- β* -Struktur beitragen. Ein Großteil kann auch im amyloiden Zustand ungeordnet oder in einem anderen Faltungszustand vorliegen.

2.3 Molekulare Grundlagen und interne Struktur amyloider Fibrillen

Zahlreiche Anstrengungen wurden in den vergangenen Jahren unternommen, die molekularen Grundlagen der Fehlfaltung von Proteinen und der Bildung von amyloiden Aggregaten zu verstehen. Man versucht hierbei die Frage zu beantworten, wie zuvor lösliche Proteine sich zu strukturell hoch organisierten amyloiden Fibrillen zusammenlagern können. Amyloidogene Proteine und Peptide in ihrem nativen Zustand zeigen nur wenige Gemeinsamkeiten in der Primärstruktur und in der Sekundärstruktur. Jedoch lassen sich in der aggregierten fibrillären Form erstaunliche strukturelle Gemeinsamkeiten feststellen. Ziel der Forschung ist es, mehr über die grundsätzlichen Antriebskräfte der Bildung amyloider Fibrillen zu erfahren. Darüber hinaus erhofft man sich aus der Forschung Strategien und Möglichkeiten, in diesen Prozess einzugreifen und Grundlagen für die Entwicklung neuer Therapien gegen Amyloidosen.^[47]

Im Allgemeinen geht man in der Amyloidforschung davon aus, dass amyloidogene Proteine und Peptide sich zunächst partiell oder vollständig entfalten müssen, bevor sie amyloide

Fibrillen bilden können.^[48-50] Aber eine Entfaltung führt nicht in jedem Fall zur Bildung von amyloiden Fibrillen. Es müssen zusätzlich weitere Voraussetzungen auf molekularer Ebene erfüllt sein, die eine Aggregation ermöglichen. Die Proteinstabilität und die spezifische Aminosäuresequenz sind dabei die zwei bedeutenden Faktoren, die zur Fehlfaltung von Proteinen und zur Amyloidbildung beitragen können.^[47] Zum Beispiel können genetische Mutationen durch Reduzierung der Proteinstabilität, durch die spezifische Erhöhung der Propensität für β -Faltblattstrukturen und durch die vermehrte Produktion des amyloidogenen Proteins einen erheblichen Einfluss auf das Ausmaß der Bildung von amyloiden Fibrillen haben.^[9] Bezogen auf eine spezifische Aminosäuresequenz weisen zunächst einmal die meisten amyloidogenen Peptide hydrophobe Domänen auf, einige sind jedoch aus polaren Aminosäuren aufgebaut (z.B. poly-Q-Sequenz).^[51] Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass auch nicht natürliche Peptidsequenzen in der Lage sind, amyloide Fibrillen zu bilden, die ähnliche Eigenschaften aufweisen wie die natürlichen amyloidogenen Proteine und Peptide. So konnte man zeigen, dass eine poly-Lysin-Sequenz bei Zufuhr von Hitze von helikaler Konformation zur β -Faltblatt-Konformation übergeht und amyloide Fibrillen bildet.^[52] Dies führte schließlich zu der Ansicht, dass unter bestimmten Bedingungen prinzipiell jedes Peptidrückgrat unter dem Einfluss der Seitenketten in der Lage ist, amyloide Fibrillen zu bilden.^[53] Im Folgenden wird tiefer auf die molekularen Grundlagen sowie auf Eigenschaften der internen Struktur amyloider Fibrillen eingegangen.

2.3.1 Amyloidogene Kernsequenzen

Eine Reihe von Untersuchungen zeigt, dass die Fähigkeit, amyloide Fibrillen zu bilden, vom Vorhandensein kurzer Sequenzabschnitte innerhalb der Primärstruktur des Proteins abhängt. Diese Sequenzabschnitte zeigen eine starke Tendenz zur Bildung von β -Faltblatt-Strukturen und zur Aggregation.^[54-58] Sie sind eine wesentliche Triebkraft für die Auslösung der Aggregation. Diese Hypothese wird als Amyloid-Fragment-Hypothese („*amyloid stretch hypothesis*“) in der wissenschaftlichen Literatur diskutiert.^[47, 59]

Dabei sind häufig nur sechs Aminosäuren eines Proteins zum Aufbau der Fibrille notwendig und Punktmutationen in dieser spezifischen Region haben einen erheblichen Einfluss auf den Aggregationsprozess und können mitunter zum Verlust der Fähigkeit zur Aggregation in amyloide Fibrillen führen.^[58]

Über die Suche nach den kleinsten amyloidbildenden Peptidsequenzen gelang es, diese kurzen, für die Amyloidbildung so bedeutenden Sequenzfragmente zu identifizieren. Dazu gehören z.B. das Fragment ${}_{22}\text{NFGAIL}_{27}$ bzw. das Pentamer ${}_{23}\text{FGAIL}_{27}$ des IAPP (*islet amyloid polypeptide*)^[55], die selbst nicht nur zu amyloiden Fibrillen aggregieren, sondern auch

zytotoxisch sind. Im Fall des Alzheimerpeptids $A\beta$ konnte die Sequenz ${}_{16}\text{KLVFFA}_{21}$ identifiziert werden.^[56, 60] Weitere Sequenzen sind z.B. NFGSVQ für Medin, DFNKF für Calcitonin, VEALYL und LYQLEN für Insulin und VAQKTV für α -Synuclein.^[61] Für das Tau-Protein ist mit VYK zur Bildung von amyloiden Fibrillen lediglich eine Sequenz aus drei Aminosäuren notwendig.^[61]

Esteras-Chopo *et al.* untersuchten die Auswirkungen kurzer amyloidogener Fragmente innerhalb eines nicht amyloidogenen Proteins. Sie führten die hoch amyloidogenen Sequenzen STVIIE^[62]-Sequenz und die KLVFFA-Sequenz des $A\beta$ -Peptids an unterschiedlichen Positionen innerhalb der Primärstruktur des α -SH3-Proteins ein. Dieses Protein ist in seiner ursprünglichen Form nachweislich nicht in der Lage, amyloide Fibrillen zu bilden. Doch durch die Einführung von kurzen, hoch amyloidogenen Sequenzen wurde das α -SH3-Protein in ein amyloidogenes Protein überführt.^[59] Sie konnten damit zeigen, dass lediglich eine kurze amyloidogene Sequenz als Auslöser der Amyloidbildung eines größeren Proteins genügt. Darüber hinaus konnten sie zeigen, dass die Fähigkeit zur Aggregation enorm von der Zugänglichkeit für intermolekulare Wechselwirkungen der amyloidogenen Sequenzen untereinander und damit von der strukturellen Umgebung, in die diese Sequenz eingebettet ist, abhängig ist.^[59]

Weiterführende Arbeiten über das *de novo* designte amyloidogene Peptidhexamer STVIIE^[62, 63] machen deutlich, dass die Aggregation auf einem sensiblen Gleichgewicht aus spezifischen Wechselwirkungen zwischen den Seitenketten beruht. Zum Beispiel führte der Austausch der hydrophoben Aminosäuren Isoleucin mit Leucin zur vollständigen Inhibierung der Amyloidbildung. Daraus folgt, dass die Vorstellung eines hydrophoben Kollaps, der allgemein in der Proteinfaltung eine große Rolle spielt, nicht ausreichend ist, den Amyloidbildungsprozess zu erklären.^[62] Des Weiteren konnte gezeigt, wie elektrostatische Wechselwirkung die Aggregation beeinflussen kann. In den Experimenten konnte nur Variation der STVIIE-Sequenz mit einer Nettoladung von + 1 oder -1 Amyloide bilden. Höhere Nettoladungen führen möglicherweise zu elektrostatischer Abstoßung der einzelnen Moleküle und Inhibierung die Aggregation. Aber die Nettoladung 0 führt ebenfalls nicht zu amyloiden Fibrillen. Dies lässt sich laut der Autoren möglicherweise durch die Konkurrenz der unspezifischen Aggregation zur Fibrillenbildung erklären. Die Kompensation aller Ladungen ermöglicht viele verschiedene Packungen der β -Faltblattstrukturen damit unspezifische Aggregation, die nicht zu hochgeordneten amyloide Fibrillen führen. Unkompensierte Ladungen im Peptid führen zur geordneten Packung der β -Faltblattstrukturen, um einen möglichst maximalen Abstand zwischen gleichen Ladungen zu gewährleisten oder möglicherweise auch stabilisierend wirkende Salzbrücken zwischen

entgegengesetzt geladenen Seitenketten zur ermöglichen. Der unterschiedliche Einfluss der elektrostatischen Wechselwirkung spiegelt sich ebenfalls in der pH-Abhängigkeit der Fibrillenbildung wieder, wie in vielen Beispielen gezeigt werden konnte.^[11, 64-67] Sind jedoch keine Ladungen vorhanden, gehört die Wasserstoffbrückenbindung des Peptidrückgrats nach Meinung der Autoren zu den wesentlichen Triebkräften. Damit lässt sich sagen, dass die Fähigkeit, Amyloide zu bilden, an zwei Voraussetzungen geknüpft ist. Zum einen ist eine passende kurze amyloidogene Sequenz innerhalb der Primärstruktur notwendig. Zum anderen muss diese Sequenz durch partielle Entfaltung für intermolekulare Wechselwirkung zugänglich sein.^[68]

2.3.2 Allgemeines Sequenz-Muster amyloidogener Kernsequenzen

Mit Hilfe des Modellpeptids STVIIIE^[62] wurde durch systematischen Austausch mit allen natürlichen Aminosäuren ein generelles Sequenzmuster eines amyloidogenen Peptidfragments extrahiert.^[63] Diese umfangreiche wissenschaftliche Arbeit ergab, dass in zentralen Positionen innerhalb des Peptidfragments nur wenige Aminosäuren unter Erhalt der amyloiden Aggregation zulässig sind. Dagegen sind die äußeren Positionen relativ tolerant gegenüber einem Austausch mit anderen natürlichen Aminosäuren. Das generelle Sequenz-Muster ist in Abbildung 4 dargestellt. Zu den wenigen erlaubten Aminosäuren in den Positionen im Zentrum (Positionen 3, 4, 5) des Peptidhexamers gehören hauptsächlich hydrophobe und aromatische Aminosäuren mit hoher Tendenz, β -Faltblattstrukturen zu bilden. Im deprotonierten Zustand bei saurem pH-Wert ist auch die Aminosäure Glutamat erlaubt. Die äußeren Positionen (Position 1, 2, 6) erlauben den Großteil des Aminosäurenkanons, jedoch ist neben Lysin, Arginin, Histidin und Tryptophan die strukturbrechende Aminosäure Prolin nicht erlaubt. Auf der Grundlage dieses generellen amyloidogenen Sequenzmusters wurden natürliche amyloidogene Proteine und Peptide



Abbildung 4: Allgemeines Sequenz-Muster amyloidogener Kernsequenzen. (nach Lit. ^[68])

durchsucht. Die identifizierten Peptidabschnitte stimmten mit den experimentell nachgewiesenen amyloidogenen Peptidabschnitten überein und bestätigten die Richtigkeit des generellen amyloidogenen Sequenzmusters.^[63]

Änderungen in der Sequenz führen zu veränderten Aggregationsraten bis hin zur völligen Inhibition der Fibrillenbildung. Die Aggregationsraten korrelieren hierbei mit Änderung der Hydrophobizität, der Tendenz zur Bildung der β -Faltblatt-Konformation und mit der Nettoladung der gesamten Peptidkette.^[69, 70] Erhöhung der Hydrophobizität und der Tendenz zur Bildung der β -Faltblatt-Konformation führen in der Regel zu höheren Aggregationsraten.^[71, 72] Die Erhöhung der Nettoladung hat meist einen gegenteiligen Effekt und führt aufgrund der elektrostatischen Abstoßung häufig zur Verringerung der Aggregationsraten.^[71] Hydrophile Aminosäuren und konformationsbrechende Aminosäuren wie Prolin führen in der Regel ebenfalls zur Verringerung der Aggregationsraten bis hin zur Inhibition.^[72, 73]

2.3.3 Modell des sterischen Reißverschlusses („*steric zipper*“)

Um die Frage zu beantworten, wie diese amyloiden Kernsequenzen interagieren, müssen Amyloide auf atomarer Ebene untersucht werden. Amyloide Fibrillen vollständiger amyloidogener Proteine bzw. Peptide entziehen sich der Kristallisation und können auf diesem Weg nicht strukturell charakterisiert werden. Aber kurze amyloide Kernsequenzen bilden dreidimensionale Mikrokristalle und lassen sich dagegen so auf atomarer Ebene charakterisieren.^[3, 74, 75] Die Arbeitsgruppe von Eisenberg analysierte auf diesen Weg zahlreiche kurze Aminosäuresequenzen natürlicher amyloidogener Proteine und Peptide (z.B. Sup35, Insulin, A β -Peptide, Tau, Amylin und des Prion-Proteins) mit maximal 4 bis 10 Aminosäuren.^[76-80]

Die Ergebnisse führten zu einem Strukturmodell der Organisation der β -Faltblattstrukturen innerhalb der Amyloidfibrille, zum Modell des sterischen Reißverschlusses (*steric zipper*).

So bildet z.B. das amyloidogene Fragment LVEALYL des Insulins (B-Kette) parallele, in-register angeordnete β -Faltblattstrukturen aus.^[80] Jedes β -Faltblatt ist über eine komplett wasserfreie Oberfläche mit einem zweiten β -Faltblatt gepaart. Die in der *cross- β* -Struktur interagierenden β -Faltblattstrukturen greifen hierbei über die Seitenketten komplementär und reißverschlussartig ineinander, was zu der Bezeichnung „*steric zipper*“ geführt hat.^[3] Die gepaarten β -Faltblattstrukturen wiederum treten über eine wasserhaltige Oberfläche in Kontakt, wobei nur wenige Kontakte zwischen dem einzelnen Atomen der Peptide festgestellt wurden.^[75, 80] Auf Basis des Modells des sterischen Reißverschlusses lagern sich amyloidogene Kernsequenzen in der *cross- β* -Struktur zu einem amyloiden Rückgrat („*cross- β -spine*“) zusammen (vgl. Kapitel 3 *Mechanismen der Bildung amyloider Fibrillen*). Sind die Sequenzen jedoch nicht komplementär, können sich nicht miteinander zu einer Fibrillen aggregieren. Dieser Sachverhalt wurde z.B. zur Erklärung von Übertragungsbarrieren des

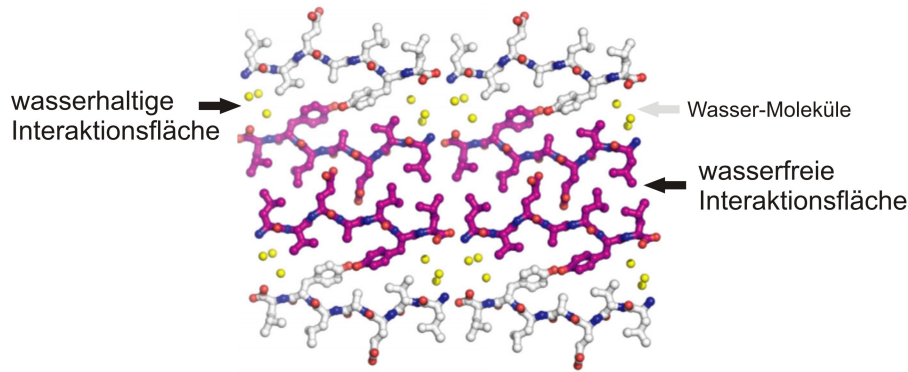


Abbildung 5: Packung von LVEALYL im Kristall (verändert nach Lit. ^[80] © 2009 by The National Academy of Sciences of the USA).

Prion-Proteins zwischen verschiedenen Säugern herangezogen.^[81] Darüber hinaus lassen sich mit diesem Modell erfolgreich zu den amyloidogenen Sequenzen komplementäre, effektive, peptidbasierte Inhibitoren rational designen.^[82] Ein Modell des polaren Reißverschlusses („*polar zipper*“) wurde von M. F. Perutz vorgeschlagen und es berücksichtigt Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Seitenketten in amyloidogenen Sequenzen, die reich an Glutamin und Asparagin sind, was sich als eine Ergänzung zum Modell des sterischen Reißverschlusses verstehen lässt.^[75, 83]

Derartige zu sich selbst komplementäre Sequenzen sind nahezu in allen Proteinen zu finden. Jedoch ist die Anzahl der zur Bildung amyloider Fibrillen fähigen Proteine begrenzt. Man nimmt an, dass eine Reihe von Schutzmechanismen dafür sorgen, dass die Wechselwirkungen dieser Elemente untereinander und die Aggregation verhindert werden und sich das Protein trotz amyloidogener Fragmente korrekt faltet. Zu diesen Schutzmechanismen gehören zum Beispiel *Chaperone*, aber auch Faltungskatalysatoren.^[84] Darüber hinaus sind die so identifizierten amyloidogenen Peptidfragmente häufig von Aminosäuren umgeben, welche die Fähigkeit zur Aggregation dramatisch reduzieren („*amyloid breakers*“).^[57, 69, 85, 86] Dazu gehören z.B. die Aminosäure Prolin oder auch geladene Aminosäuren.

2.3.4 Die Rolle aromatischer Seitenketten

In natürlichen amyloiden Sequenzen befinden sich häufig aromatische Aminosäuren.^[87] Die Annahme, dass sie möglicherweise von hoher Bedeutung bei der Bildung amyloider Fibrillen sind, liegt nahe, jedoch ist deren Rolle noch nicht klar und immer noch Gegenstand wissenschaftlicher Diskussionen.^[88]

Ein systematischer Alanin-Scan eines kurzen amyloidogenen Fragments mit der Sequenz NFGAILSS des IAPP-Proteins, das in Verbindung mit Diabetes Typ 2 steht, sollte einen Einblick in die Rolle des Phenylalanins geben.^[89, 90] Es stellte sich heraus, dass bis auf

Phenylalanin jede andere Aminosäure unter Erhalt der Fähigkeit der Aggregation gegen Alanin ausgetauscht werden konnte. Der Austausch des Phenylalanins gegen Alanin führte zum Verlust der Aggregationsfähigkeit. Der Austausch von Phenylalanin gegen aliphatische Aminosäuren in weiteren Studien führte zu einer signifikanten Reduzierung der Fähigkeit zur Bildung amyloider Fibrillen^[91-93], jedoch zeigte der Austausch gegen die hydrophilere, aber ebenfalls aromatische Aminosäure Tryptophan keinen Unterschied in der Aggregation^[94]. Diese Ergebnisse, unterstützt durch weitere Arbeiten, die aromatischen Aminosäuren eine hohe Bedeutung in der Tendenz zur Bildung von amyloider Fibrillen zuschreiben^[86], führen zum Bild einer zentralen Rolle von aromatischen Aminosäuren im Prozess der Bildung von amyloiden Fibrillen. Diese bedeutende Rolle kann möglicherweise auf π - π -Wechselwirkungen zurückgeführt werden, die bei molekularen Erkennungs- und Assemblierungsprozessen eine wesentliche Rolle spielen und daher auch in der Bildung amyloider Fibrillen von großer Bedeutung sein können.^[87] Die π - π -Wechselwirkungen können hierbei einen thermodynamisch stabilisierenden Beitrag aufgrund der Stapelung der aromatischen Seitenketten leisten und darüber hinaus den Zusammenlagerungsprozess einzelner Peptidstränge durch die spezifische Stapelung der aromatischen Seitenketten zu hoch geordneten amyloiden Fibrillen dirigieren.^[87] Das grundlegende Prinzip ist bereits von anderen biologischen und chemischen supramolekularen Strukturen bekannt.^[95, 96] Dennoch sind einige Arbeiten zu nennen, die keinen besonderen Effekt aromatischer Aminosäuren im Prozess der Bildung amyloider Fibrillen feststellen.^[88, 97] Sie stellen Faktoren wie Größe der Seitenketten, ihre Tendenz zur β -Faltblatt-Konformation und Hydrophobizität in den Vordergrund.

3 Mechanismen der Bildung amyloider Fibrillen

In diesem Abschnitt wird die Frage behandelt, wie die natürlichen amyloidogenen Proteine und Peptide, die eine starke Heterogenität bezüglich der Aminosäurezusammensetzung, der Länge der Sequenz und der Sekundärstruktur aufweisen,^[2] zu amyloiden Fibrillen mit erstaunlich gemeinsamen Eigenschaften aggregieren können. Amyloide gehen entweder auf die Aggregation von ungefalteten, unstrukturierten Proteinen („*natively disordered*“-Modell) oder entsprechenden Fragmenten zurück oder beruhen auf nativ gefalteten Proteinen mit definierter Sekundär- und Tertiärstruktur. Bei gefalteten amyloidogenen Proteinen und Peptiden geht man im Allgemeinen davon aus, dass sie zunächst teilweise („*gain of interaction*“-Modell“) oder vollständig ungefaltet („*refolding*“-Modell) vorliegen müssen, bevor amyloide Fibrillen gebildet werden können. Daraus ergeben sich verschiedene mögliche Mechanismen der Bildung von amyloiden Aggregaten. Eine zuvor ungefaltete Peptidsequenz geht im Prozess der Bildung der amyloiden Fibrille in die β -Faltblatt-

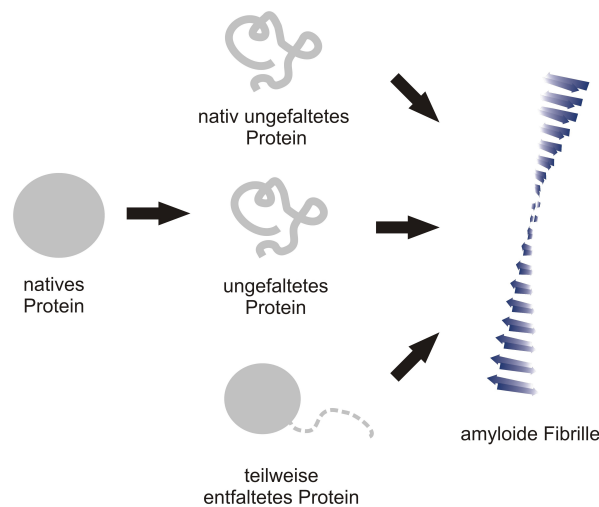


Abbildung 6: Schematische Darstellung verschiedener Mechanismen der Bildung amyloider Fibrillen (adaptiert nach Lit. ^[98]).

Konformation über und aggregiert unter Ausbildung der *cross- β* -Struktur zur amyloiden Fibrille. Dieses Modell wird für eine ganze Reihe von natürlichen amyloidogenen Proteinen und Peptiden angenommen,^[78, 99, 100] u.a. auch für das $A\beta$ -Peptid, Prion HET-s sowie für das N-terminale Segment des Prions Ure2p.

Liegt das native amyloidogene Protein bzw. Peptid nicht ungefaltet vor, entfaltet sich das Protein zunächst vollständig oder teilweise, bevor sich das Peptidrückgrat unter Ausbildung und Zusammenlagerung von β -Faltblatt-Strukturen zur Bildung der amyloiden Fibrillen neu

faltet.^[98] Ein Prozess der Neu-Faltung wurde für die amyloidogenen Proteine Insulin, SH3-Domäne, Myoglobin und das Prion-Protein vorgeschlagen.^[98] Für den Fall, dass lediglich eine teilweise Entfaltung für die Bildung amyloider Fibrillen notwendig ist, wurden verschiedene Modelle der gesteigerten Interaktion („*gain of interaction*“) vorgeschlagen.

3.1 Modelle der gesteigerten Interaktion („*gain-of-interaction*“)

Im Rahmen dieser Modelle findet im Gegensatz zu den zuvor genannten lediglich in einer begrenzten Region des nativen Proteins eine Änderung der Konformation statt. Die Teilsequenz in dieser Region wird dadurch exponiert und für Wechselwirkungen mit anderen Teilsequenzen zugänglich gemacht, wodurch die Möglichkeit der Interaktion einzelner Monomere untereinander gesteigert wird. Durch die Wechselwirkung mit anderen Teilsequenzen und Zusammenlagerung einzelner Monomere werden amyloide Fibrillen gebildet. Auf diese Weise bleibt der überwiegende Teil des Proteins auch im fibrillären Zustand erhalten. Es lassen sich hierbei drei verschiedene Typen unterscheiden: das Modell der direkten Stapelung („*direct stacking*“), das *cross-β*-Rückgrat („*cross-β-spine*“)-Modell, das Domänen-Austausch-Modell („*domain swapping*“). Nach dem Modell der direkten

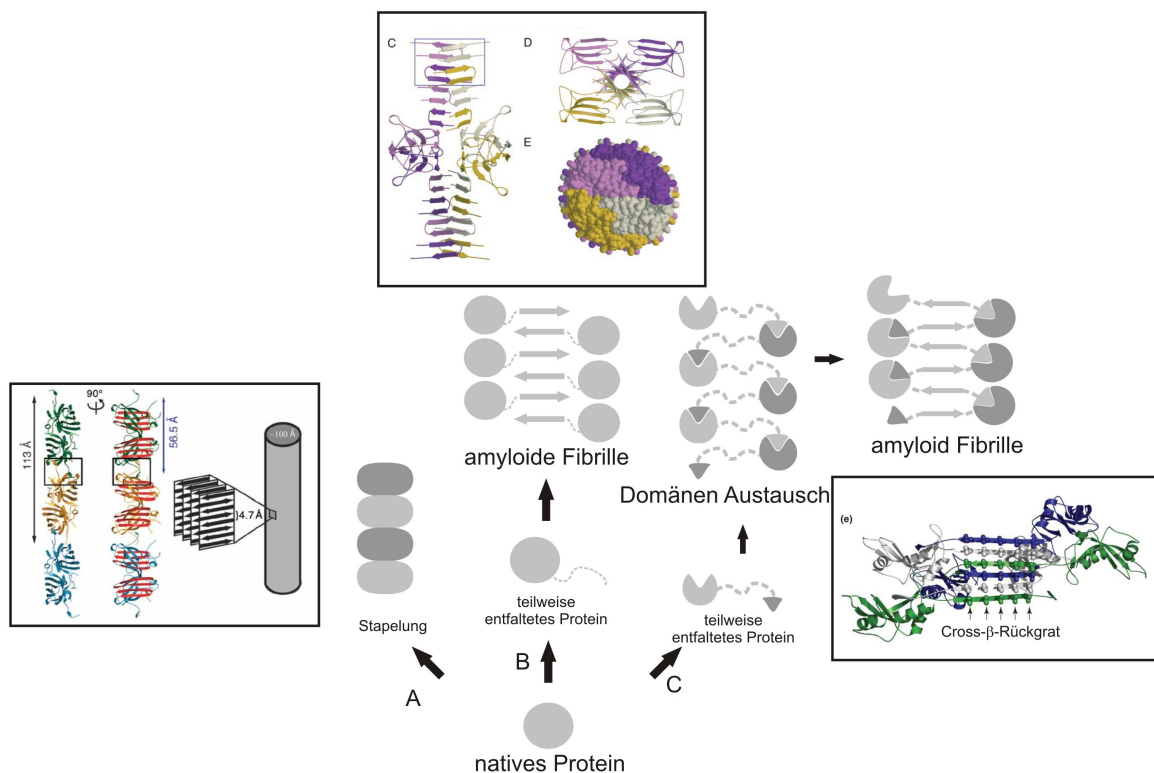


Abbildung 7: Modelle der gesteigerten Interaktion („*gain-of-interaction*“) (A) Modell der direkten Stapelung („*direct stacking*“)^[101] (B) Das *cross-β*-Rückgrat („*cross-β-spine*“) – Modell^[54] (C) Domänen-Austausch-Modell („*domain swapping*“)^[102] (Bild verändert nach Lit. ^[98, 103] © 2006 Copyright Elsevier Ltd.)

Stapelung („*direct stacking*“) interagiert eine durch lokal begrenzte Änderung der Konformation exponierte Teilsequenz des Proteins mit einer komplementären Teilsequenz eines zweiten identischen Proteins. Auf diese Weise stapelt sich jeweils ein Protein auf das andere. Nun führt die Stapelung von Proteinen in den wenigsten Fällen zu einer amyloiden Fibrille mit einer charakteristischen *cross-β*-Struktur. Jedoch liegen im Fall der Superoxidase Dismutase *β*-Faltblatt-Strukturen senkrecht zur Stapelachse vor.^[101] Damit erfüllt dieses Beispiel zumindest teilweise die Voraussetzungen einer *cross-β*-Struktur amyloider Fibrillen. Jedoch lässt sich dieses Modell nicht zu einer allgemeinen Erklärung der Bildung amyloider Fibrillen heranziehen.^[98] Nach dem *cross-β*-Rückgrat („*cross-β-spine*“)-Modell wird eine kurze Teilsequenz mit einer Tendenz, *β*-Faltblattstrukturen zu bilden und zu aggregieren, exponiert. Mit Übereinanderlagerung der einzelnen *β*-Faltblattstrukturen nach dem „*steric zipper*“-Modell zur *cross-β*-Struktur vollzieht sich das Wachstum der amyloiden Fibrille. Zum Beispiel wird für das Wachstum von amyloiden Fibrillen des *β*₂-Mikroglobulins ein derartiger Mechanismus angenommen.^[54] Es konnte gezeigt werden, dass eine kurze Sequenz des *β*₂-Mikroglobulins aus sieben Aminosäuren (QVLHTSN) verantwortlich für die amyloidogene Eigenschaft des *β*₂-Mikroglobulins ist. Diese Sequenz ist nah am C-Terminus des *β*₂-Mikroglobulins. Vor dem Hintergrund des „*cross-β-Spine*“-Modells wird angenommen, dass diese Sequenz ein *β*-Faltblatt bildet und mit anderen *β*-Faltblattstrukturen über eine *turn*-Sequenz mit Prolin eine durch Wasserstoffbrückenbindung stabilisierte *β-hairpin*-Struktur bildet, die entlang der Fibrillenachse angeordnet ist. Innerhalb der Fibrille greifen die Seitenketten der jeweiligen *β-hairpin*-Strukturen reißverschlussartig ineinander. Befindet sich die amyloidogener Teilsequenz am Ende der Primärstruktur eines Proteins, wird schnell deutlich, dass der übrige Teil des Proteins die native Struktur beibehalten werden kann. Befindet sich jedoch die aggregierende Teilsequenz mehr in der Mitte der Primärstruktur, ist das komplexere Domänen-Austausch-Modell zur Beschreibung notwendig.^[104]

Nach dem Domänen-Austausch-Modell („*domain swapping*“) werden Oligomere durch den Austausch von Protein-Domänen zwischen den einzelnen Monomeren gebildet. Die ausgetauschte Domäne kann sowohl eine Helix, ein *β*-Faltblatt als auch eine ganze Tertiärstruktur sein. Die übertragende Domäne bleibt durch eine *loop*-Struktur mit dem Rest des Proteins verbunden. Die *loop*-Struktur kann ferner als Basis für die Ausbildung eines *cross-β*-Rückgrats der amyloiden Fibrille dienen. Diese Erweiterung des Modells ist Ergebnis der Arbeiten an dem durch Domänen-Austausch gebildeten Dimer der RNase. Die *loop*-Struktur wurde durch eine amyloidogene Sequenz, in diesem Fall durch eine G(Q)₁₀G-Sequenz ersetzt. Mit dieser Sequenz bildeten RNase Dimere amyloide Fibrillen.^[102] Auf diese

Weise können auch zur Aggregation neigende Sequenzen, die weiter im Zentrum der Primärstruktur liegen, zum Aufbau einer *cross- β* -Struktur und folglich zur Bildung einer Fibrille herangezogen werden.^[104] Der Mechanismus des Domänen austauschs zur Fibrillenbildung wird für β_2 -Mikroglobulin.^[105, 106], Cystatin C^[107, 108] und für Stefin A und B^[109] diskutiert.

4 Kinetik der Bildung amyloider Fibrillen

Die Bildung von amyloiden Fibrillen ist ein mehrstufiger Prozess und läuft über die Bildung einer Reihe von strukturell unterschiedlichen Multimeren des amyloidogenen Proteins ab, die während der Polymerisation zu amyloiden Fibrillen wieder verbraucht werden.^[8, 85, 110, 111]

Der Prozess geht mit einer Änderung der Konformation zur β -Faltblatt-Struktur und einer Zusammenlagerung amyloidogener Sequenzen zur *cross- β* -Struktur nach verschiedenen, zuvor beschriebenen Mechanismen einher.

In Abhängigkeit vom Faltungszustand des nativen Zustands ist eine temporäre Destabilisierung bzw. Stabilisierung der Ausgangstruktur als erster Schritt im Aggregationsprozess notwendig.^[49, 112] Die Änderung der Konformation hin zur *cross- β* -Struktur im Falle nativer gefalteter Proteine vollzieht sich über Destabilisierung der Proteinstruktur, d.h. durch partielle Entfaltung, da die Änderung der Konformation nicht innerhalb der dicht gepackten nativen Struktur stattfinden kann.^[112, 113] Zahlreiche Untersuchungen an gefalteten Proteinen und Proteinen, die in Zusammenhang mit

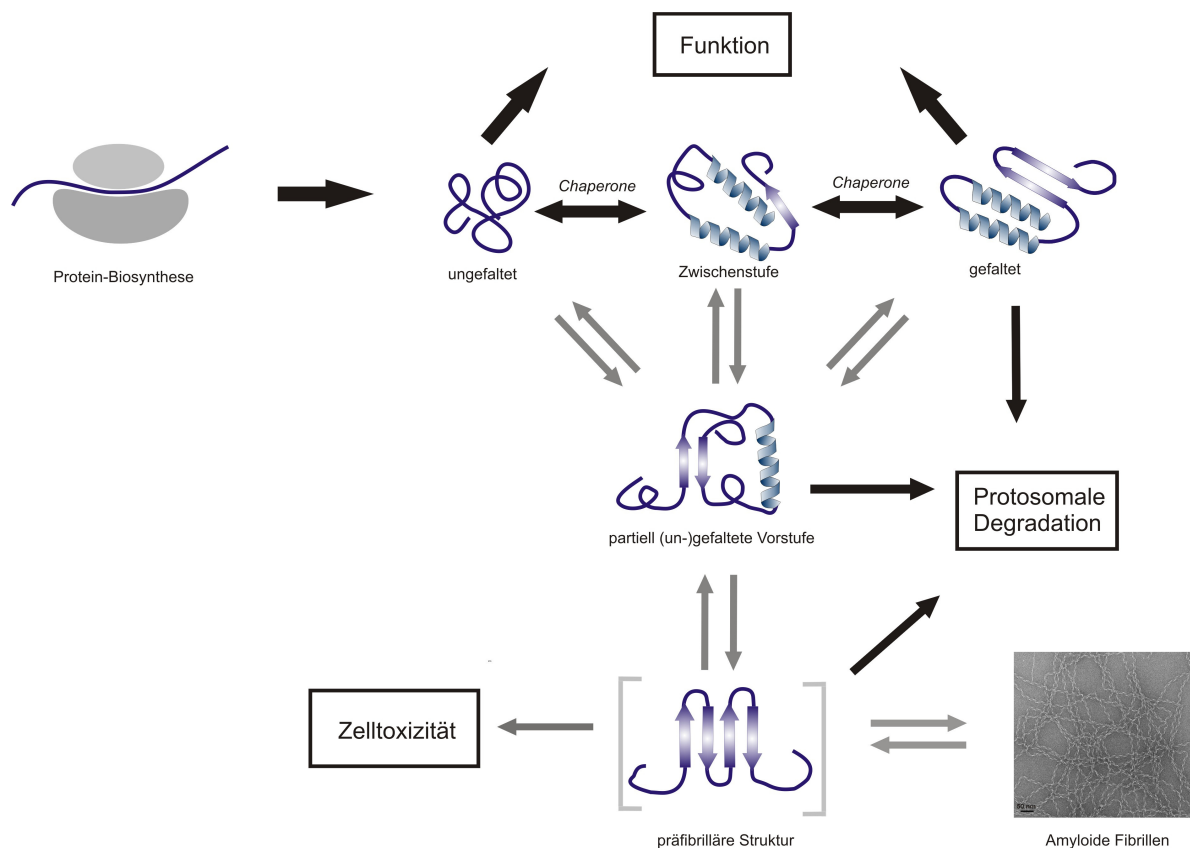


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Proteinfehlfaltung. Schwarze Pfeile geben die physiologischen Prozesse der normalen Protein-Funktionen wieder. Chaperone-Proteine sorgen für die korrekte Faltung der Proteine. Graue Pfeile beziehen sich auf Prozesse der Fehlfaltung und der Bildung von amyloiden Fibrillen. (verändert nach Lit.^[114]).

Amyloidosen stehen, sind in der Lage, amyloide Fibrillen erst bei Bedingungen zu bilden, die eine partielle Entfaltung ermöglichen, wie z.B. bei niedrigem pH-Wert^[115, 116], hoher Temperatur^[117, 118], hohem Druck^[119, 120] und in Gegenwart chemischer Denaturierungsmittel^[121, 122].^[112] Teilweise Entfaltung ist in vielen Beispielen natürlicher amyloidogener Proteine und Peptide, wie z. B. im Falle von Transthyretin, dem Prion-Protein PrP^C, der SH3-Domäne von Rinderphosphatidylinositol-3-kinase oder auch des β_2 -Mikroglobulins zur Fibrillenbildung notwendig.^[8] So konnte gezeigt werden, dass durch die Destabilisierung der nativen Struktur die Geschwindigkeit der Fibrillen signifikant erhöht wird.^[113]

Eine ganze Reihe von amyloidogenen Proteinen ist im nativen Zustand unstrukturiert. Bei der Bildung von amyloiden Fibrillen aus nativ ungefalteten Proteinen und Peptiden ist hierbei keine Destabilisierung, sondern vielmehr eine Stabilisierung einer partiell gefalteten Struktur als erster Schritt notwendig.^[8, 113]

Zusammenfassend ermöglicht das partiell gefaltete bzw. partiell ungefaltete Intermediat intermolekulare Wechselwirkungen, z.B. elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen sowie Wasserstoffbrückenbindung, die zur Bildung von Oligomeren als Zwischenstufen im Prozess der Amyloidbildung und schließlich zur Bildung amyloider Fibrillen führen.^[49, 50, 123]

Darüber hinaus sind eine Reihe von Modellen zur Beschreibung der amyloiden Aggregation verschiedener amyloidogener Proteine vorgeschlagen worden.^[85, 124] Die meisten lassen sich unter dem Begriff der Nukleation-basierten Modelle zusammenfassen. Da es für die Inhibition der amyloiden Aggregation von Bedeutung ist, werde ich ein *off-pathway*-Modell näher beschreiben, das die wesentlichen Ereignisse des Aggregationsprozess umfasst.^[85, 125, 126] Nach diesem Modell findet zunächst eine Umfaltung des nativen Monomers in eine weniger

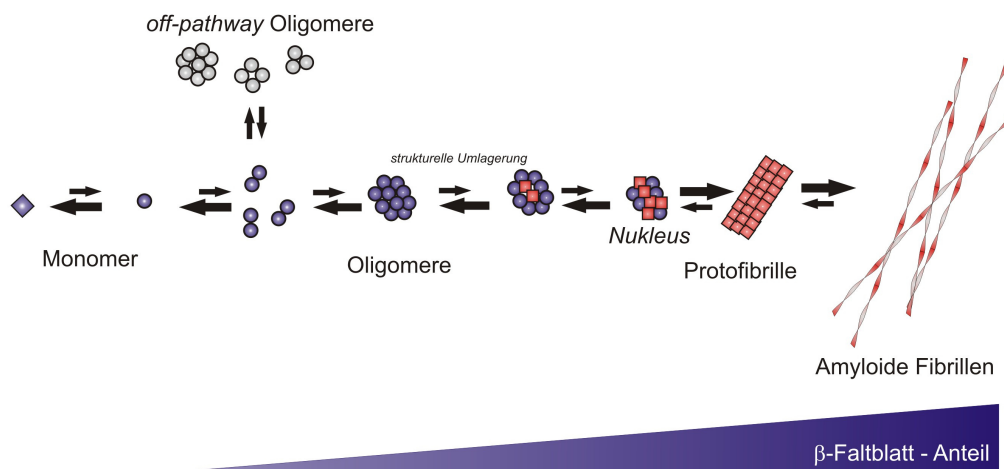


Abbildung 9: Schematische Darstellung eines nukleationsabhängigen Modells der Aggregation zu amyloiden Fibrillen (verändert nach Lit.^[85])

stabile partielle ungefaltete Vorstufe statt, die sich zu stabileren Multimeren zusammenlagert. Dabei können Oligomere entstehen, die nicht mehr Teil des Prozessweges der Aggregation sind, so genannte *off-pathway* Oligomere. Sie können die Notwendigkeit einer besonders hohen kritischen Konzentration erklären und spielen auch bei der Inhibition der Aggregation eine besondere Rolle. Zur Entstehung des Nukleus ist eine konformationelle Umlagerung der (*on-pathway*) Oligomere notwendig. Ist der Nukleus gebildet, beginnt der Polymerisationsprozess unter Verbrauch von Monomeren. Es entstehen Protofibrillen, die sich schließlich zu amyloiden Fibrillen zusammenlagern.

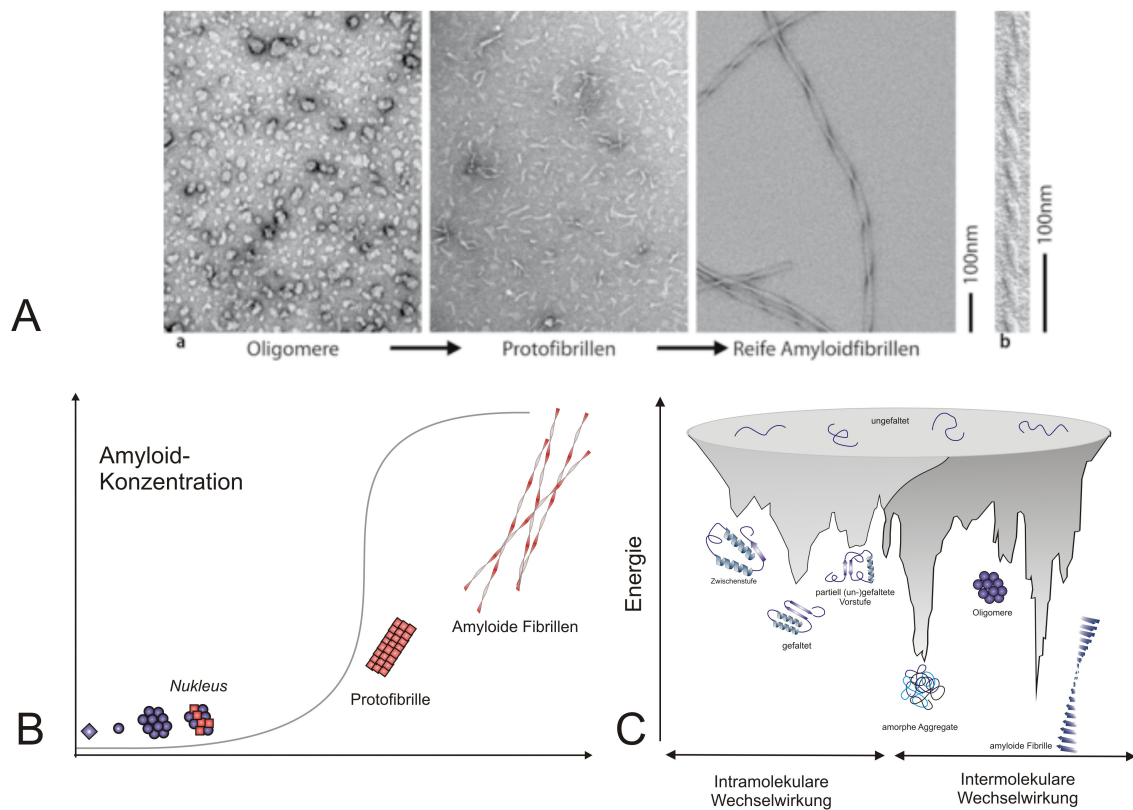


Abbildung 10: (A) Morphologie oligomerer, präfibrillärer und fibrillärer Amyloidstrukturen (oben) (Lit.^[3] © Springer Medizin Verlag 2009); (B) Schematische Darstellungen des kinetischen Verlaufs der amyloiden Aggregation; (C) Schematische Darstellungen der Energie-Landschaft möglicher Konformationen der einzelnen Spezies (nach Lit.^[621]).

5 Amyloidogene Oligomere und ihre pathologische Bedeutung

Diverse Oligomere mit unterschiedlicher Struktur und unterschiedlichem Oligomerisierungsgrad sind bisher für das A β -Peptid aber auch für andere amyloidogene Proteine und Peptide beschrieben worden.^[127-130] Dazu gehören z.B. Dimere, Trimere, Paranuclei, ring- oder porenförmige Oligomere oder auch helikale Intermediate.^[131, 132] Sie unterscheiden sich in ihrer Morphologie, in ihrer biologischen Aktivität bzw. Neurotoxizität sowie im Entstehungsprozess, d.h. sie können zu amyloiden Fibrillen führen (*on pathway*) oder nicht (*off pathway*) bzw. sind Teil von verschiedenen Prozesswegen^[128, 131] zu amyloiden Fibrillen, so dass der Begriff Oligomere nur ein unspezifischer Sammelbegriff ist.^[133] In welche Art und Weise verschiedene Oligomere eines amyloidogenen Proteins in einem mechanistischen Zusammenhang stehen, ist bisher nur wenig verstanden. Nachdem man zu Beginn der Amyloidforschung noch glaubte, dass amyloide Fibrillen die toxische Spezies ist, fand in den letzten Jahren ein Paradigmenwechsel statt. Zu diesem Paradigmenwechsel haben auch die zahlreichen Arbeiten über funktionale amyloide Fibrillen beigetragen.^[134, 135] Nun werden die Intermediate als die eigentliche toxische Spezies diskutiert und deren strukturelle Charakterisierung und der Mechanismus der toxischen Wirkung sind aktuelle Fragestellung.^[129-131, 136-140] Nach der Amyloid-Kaskaden-Hypothese geht man davon aus, dass es aus unterschiedlichen Gründen zu einem Ungleichgewicht zwischen der Produktion und dem Abbau des amyloidogenen Proteins bzw. Peptids kommt, was zu einer Akkumulation der oligomeren Spezies und schließlich zur Aggregation führt. In der Folge kommt es zu Schädigungen der betroffenen Zellen und des Gewebes.^[7] Verschiedenste Einflussfaktoren können diesen Prozess begünstigen. Dazu gehören eine genetische Disposition^[141, 142], eine Beeinträchtigung des Kontrollsystems der Proteinfaltung, verschiedene Metallionen^[143], Oberflächen, wie die Zellmembran, die als Templat dienen können,^[144] eine posttranslationale Modifikation, wie die Phosphorylierung beim Tau-Protein^[145] und α -Synuclein^[146] und andere physiologische Faktoren.^[147, 148]

Der Mechanismus der toxischen Wirkung amyloidogener Oligomere wird hierbei zumeist auf die Generierung einer toxischen Funktion („*gain of toxic function*“), die mit der Fehlfaltung einhergeht, zurückgeführt. Jedoch sind detaillierte Mechanismen Gegenstand kontroverser Diskussion. Es werden Effekte auf Zellorganellen und die zelluläre Selbstregulation, wie z.B. mitochondriale Dysfunktion und Aufbrechen von Lysosomen, beschrieben. Eine Hypothese, wie diese Effekte erklärt werden können, besteht in einer generellen Schädigung der Integrität

der Membran^[149-152] oder der Bildung von Poren in der Zellmembran^[127, 153, 154], wodurch die Selbstregulation der Zelle gestört wird, was schließlich zum Zelltod führt. Eine zweite Hypothese im Bezug auf das A β -Peptid ist die Generierung einer ungewöhnlich hohen Konzentration an reaktiven und toxischen Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS), vermittelt durch die Interaktion des A β -Peptids mit Metallionen.^[155]

Es gibt aber auch experimentelle Hinweise darauf, dass in einigen Fällen der Verlust funktionaler Proteine aufgrund der Aggregation toxisch wirken kann („*loss of physiological function*“). So haben das Prion Protein PrP^C^[156] oder α -Synuclein^[157] in ihrem nativen Zustand eine neuroprotektive Wirkung, wobei die Aggregation zum Verlust dieser physiologischen Funktion und zur Neurogeneration führt.^[158]

5.1 Die Bedeutung α -helikaler Intermediate

Wie bereits beschrieben, werden im Rahmen der Bildung amyloider Fibrillen unter bestimmten Bedingungen metastabile partiell gefaltete Übergangstrukturen gebildet, die durch intermolekulare Wechselwirkungen im Prozess der Oligomerisierung stabilisiert werden. Einige dieser noch löslichen Intermediate der verschiedenen amyloidogenen Proteine und Peptide wurden *in vitro* und *in vivo* identifiziert und charakterisiert. Mit Blick auf die eigenen Ergebnisse, die im Rahmen dieser Arbeit beschrieben werden, soll hier auf helikale Intermediate im Prozess der Bildung amyloider Fibrillen besonders eingegangen werden.

Eine Reihe von Untersuchungen zur Charakterisierung der Intermediate deutet darauf hin, dass während des Prozesses der Bildung amyloider Aggregate möglicherweise helikale Intermediate, d.h. Oligomere mit teilweise helikaler Struktur gebildet werden.^[159, 160] Systematische Studien zeigen, dass das A β -Peptid^[161-166], IAPP^[167, 168], das Tau-Protein^[169], α -Synuclein (α S)^[170], Glutamin- bzw. Asparagin-reiche Prionproteine^[171], das durch poly-Glutamin erweiterte Huntington-Protein^[171, 172] sowie einige *de novo* designte Peptidfragmente natürlicher globulärer Proteine^[173, 174] helikale Intermediate bilden. Diese Eigenschaft kann durch die Untersuchung der Faltungstendenz der jeweiligen amyloidogenen Sequenzen begründet werden, die zeigen, dass einige natürliche amyloidogene Proteine und Peptide trotz ihrer Eigenschaft, β -Faltblatt-reiche Fibrillen zu bilden, auch Elemente einer α -Helix in ihrer Primärstruktur aufweisen. Diese Sequenzen werden in der Literatur als α/β -diskordante Helices beschrieben.^[165, 175]

Die meisten experimentellen Daten für helikale Intermediate gibt es für das A β -Peptid. Mit Hilfe von CD-Spektroskopie konnten z.B. Kirkidatze *et al.* einen Anstieg der Helizität feststellen, bevor schließlich das CD Spektrum einer β -Faltblattstruktur detektiert wurde.^{[161,}

^{162]} NMR-Studien am A β -Peptid im wässrigen Medium mit membranähnlichen Oberflächen oder Medien, die extrazelluläre Bedingungen imitieren, zeigen, dass die zentrale Region, d.h. Position 13 bis 26, die auch die amyloidogene Kernsequenz KLVFF enthält, eine konformationelle Änderung von α -Helix zur β -Faltblattstrukturen durchläuft, sofern sie z.B. das A β -Peptid Membranoberfläche verlässt.^[164] Der Austausch der Position V₁₈, F₁₉ und F₂₀ gegen Alanin führt zu Erhöhung der Helizität, begleitet von einer Reduzierung der Aggregationstendenz.^[164, 175, 176]

Eine Reihe von Studien weist darauf hin, dass bei der Aggregation von hIAPP ebenfalls helikale Intermediate eine wichtige Rolle spielen. NMR-Untersuchungen an hIAPP deuten an, dass die Sequenz von Position 8 bis 20 die Eigenschaft besitzt, übergangsweise helikale Konformation einnehmen zu können.^[177-179] Die Tendenz zur Helix in dieser Region lässt sich durch die Zugabe von Hexafluoroisopropanol (HFIP) stabilisieren.^[180] Knight und Miranker entwickelten ein Modell zum Mechanismus der Aggregation von IAPP, wobei der entscheidende Schritt der Nukleation durch die Bindung von IAPP an die Zellmembran über die Positionen 1-20 vermittelt wird.^[181] Weiterführende Studien zeigten, dass die Region des IAPP von Position 5-19 durch die Interaktion mit der Membran eine helikale Konformation einnimmt.^[167, 182-185]

Aggregationsexperimente mit florierten Alkoholen, wie Hexafluoroisopropanol (HFIP) und Trifluoroethanol (TFE), führen bei geeigneter Konzentration zu einer Beschleunigung der Aggregation.^[186] Da diese Lösungsmittel bekannt dafür sind, bei Peptiden die Bildung einer helikalen Konformation zu fördern, steht dies im Einklang mit der Vorstellung der Bildung von helikalen Intermediaten während des Aggregationsprozesses.

Aus den vorangegangenen Darstellungen wird ersichtlich, dass eine Reihe von amyloidogenen Peptiden eine Tendenz zeigen, helikale Übergangsstrukturen zu bilden. Diese können durch Peptid-Peptid-Wechselwirkungen oder Peptid-Membran-Wechselwirkungen^[187] stabilisiert werden.^[159] Nach der in Abbildung 11 skizzierten stark vereinfachten Vorstellung geht man davon aus, dass nicht das gesamte amyloidogene Peptid eine helikale Konformation annimmt, sondern nur lokal begrenzt. Über lokale helikale Elemente können dann mehrere Peptidstränge miteinander interagieren, was zu einer hohen lokalen Konzentration von amyloidogenen Peptid-Sequenzen führt. Dies kann zur Bildung von intermolekularen β -Faltblatt-Strukturen führen und schließlich die Kinetik der amyloiden Aggregation beschleunigen. Die Stabilität der helikalen Strukturen ist hierbei sehr entscheidend. Eine hohe Stabilität kann zur Verlangsamung der Rate bis hin zur völligen Inhibition der amyloiden Aggregation führen. Sicherlich sind derartige helikale Strukturen

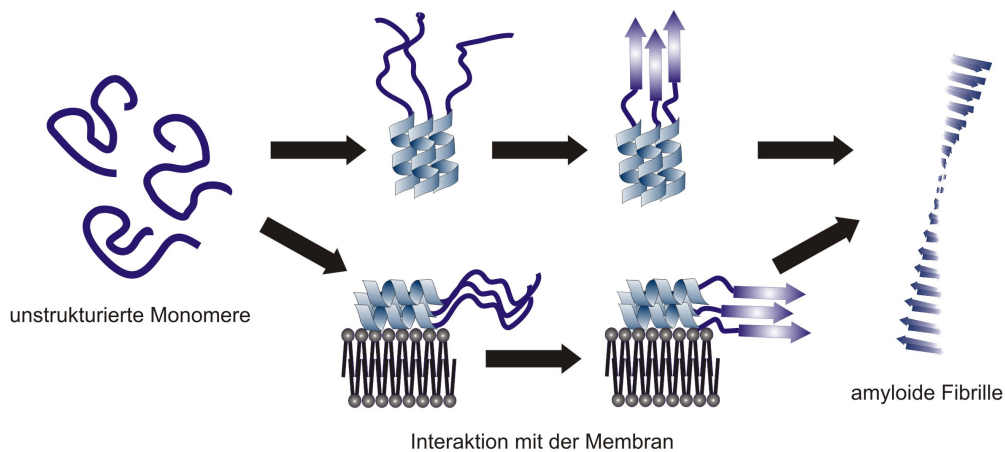


Abbildung 11: Ein schematisches Diagramm, wie α -helikale Intermediate die Amyloidbildung fördern (verändert nach Lit. ^[159])

nicht thermodynamisch stabiler als β -Faltblatt-reiche amyloide Aggregate.^[188] So kann man hier von einer kinetischen Stabilität sprechen bzw. von einer Metastabilität.^[160] Dieser Sachverhalt bildet eine Grundlage für eine Strategie zur Inhibition der Aggregation. So lässt sich über die Stabilisierung helikaler Übergangstrukturen durch geeignete Liganden der Übergang zur β -Faltblattstrukturen und folglich die Bildung von amyloiden Aggregaten verhindern. Auf diesen Sachverhalt wird in einem gesonderten Kapitel im Rahmen der Ausführungen zur Inhibition der amyloiden Aggregation ausführlicher eingegangen.

6 Eingriff in den Prozess der Bildung amyloider Aggregate

Zahlreiche Krankheiten stehen im Zusammenhang mit dem pathologischen Prozess der Amyloidose. Verschiedene amyloidogene Proteine und Peptide bilden unlösliche Aggregate im Gehirn oder anderen Teilen des Körpers. Dieser Prozess stellt eine lange Kette von Ereignissen von der Bildung von verschiedenen Oligomeren bis zur Bildung charakteristischer Fibrillen dar, wobei die Verbindung zwischen einer amyloidogenen Spezies und der eigentlichen Krankheit noch nicht vollständig aufgeklärt ist (siehe Kapitel 5 *Amyloidogene Oligomere und ihre pathologische Bedeutung*).

Ziel der wissenschaftlichen Forschung ist es, in den Prozess der Bildung amyloider Aggregate einzugreifen und die pathologischen Auswirkungen zu unterbinden. Das Ergebnis der bisherigen Anstrengungen ist eine Reihe von verschiedenen Strategien, die an unterschiedlichen Schlüsselstellen des Prozesses der Bildung von amyloiden Aggregaten ansetzen (Abbildung 12).^[189] Zu den Schlüsselstellen gehören:

1. Inhibierung der Expression von amyloidogenen Proteinen
2. Stabilisierung der nativen Struktur des amyloidogenen Proteins
3. Inhibierung der Abspaltung eines amyloidogenen Peptids vom ursprünglichen Protein (sofern dies zur Bildung von amyloiden Fibrillen notwendig ist, z.B. A β -Peptid)
4. Förderung der Degradation von amyloidogenen Proteinen und Peptiden
5. Inhibierung der Aggregation
6. Inhibierung der Auswirkungen der jeweiligen Erkrankung

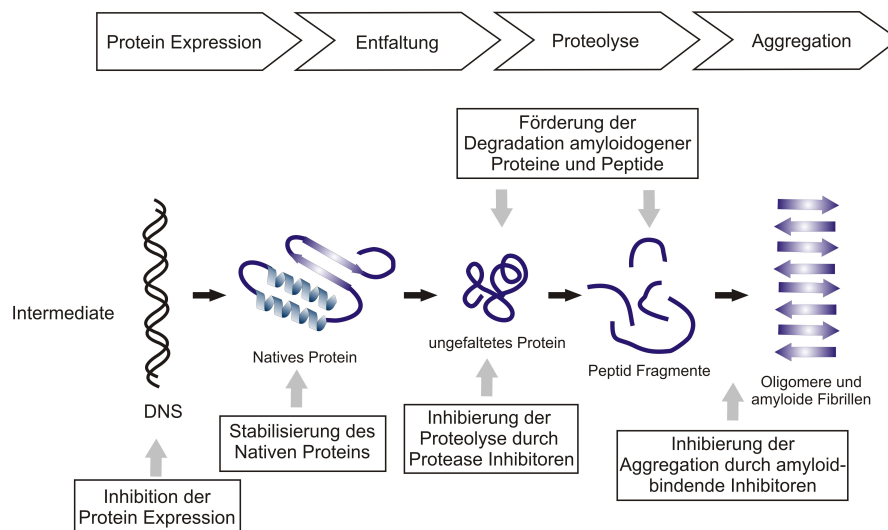


Abbildung 12: Darstellung verschiedener Schlüsselstellen zur Inhibierung der amyloiden Aggregation (adaptiert nach^[189])

Ein Großteil der wissenschaftlichen Anstrengungen zur Inhibierung amyloider Aggregation konzentriert sich auf die Alzheimersche Krankheit, da Alzheimer in den westlichen Gesellschaften weit verbreitet ist und bisher noch keine effektive Therapie zur Verfügung steht. Bisherige verfügbare Therapien gegen Alzheimer konzentrieren sich auf die Behandlung der Symptome und weniger auf die eigentlichen Ursachen.^[190, 191] Die Entwicklung von Verbindungen, die in der Lage sind, die Bildung toxischer Spezies und die Bildung von Fibrillen zu verhindern, stellt immer noch eine Herausforderung dar. Ausgehend von der Hypothese, dass die Akkumulation verschiedener Spezies des amyloidogenen Peptids, d.h. kleine Oligomere, Protofibrillen und Fibrillen, die Ursache für die pathologischen Folgen sind (*amyloid cascade hypothesis*) und dieser Prozess schon lange vor dem ersten Auftreten klinischer Symptome beginnt, ist es Ziel der Forschung, den Start dieses Prozesses möglichst früh zu erkennen und Wirkstoffe als Grundlage für Therapien zu entwickeln, die mit den entsprechenden Spezies des amyloidogenen Peptids interagieren und den pathologischen Prozess verlangsamen können.^[139, 192] Im Fall von Alzheimer ist diese Strategie in Abbildung 13 dargestellt. Ziel in der Entwicklung von therapeutischen

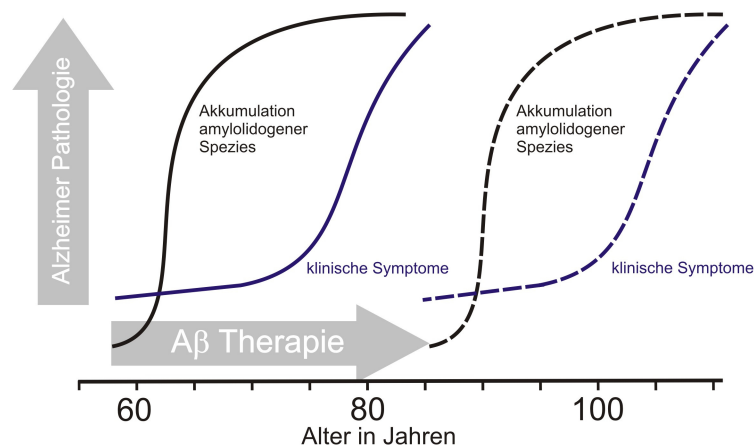


Abbildung 13: Hypothetisches Schema zur Darstellung des Effekts eines potentiellen Therapieansatzes.

Wirkstoffen sind Verbindungen, die möglichst oral anwendbar sind und eine akzeptable Bioverfügbarkeit, hohe Selektivität (geringe Nebenwirkungen), hohe Aktivität (geringe Dosis) und ausreichende metabolische Stabilität aufweisen.^[193] Darüber hinaus sollten sie keine ernsthaften Nebenwirkungen zeigen. Die Entwicklung eines Wirkstoffs und einer entsprechenden Therapie muss daher eine Reihe von Entwicklungsschritten durchlaufen. Zunächst werden potentielle Verbindungen im Rahmen von experimentellen Nachweisen *in vitro* auf positive Effekte hin überprüft. Die nächste Stufe sind weitere experimentelle Nachweise der Wirkung *in vivo*, d.h. in lebenden Modellsystemen, wie z.B. APP-transgene Mäuse^[194], welche die A β -Peptide überexprimieren, oder andere *in vivo*-Modellsysteme, wie

Caenorhabditis elegans^[195] oder auch *Drosophila melanogaster*^[196, 197]. Liegt eine ausreichende Basis an vielversprechenden Ergebnissen aus *in vitro* und *in vivo*-Experimenten vor, können klinische Studien mit menschlichen Probanden begonnen werden. Sie unterteilen sich in mehrere Phasen, die in Tabelle 2 mit entsprechen Zielen dargestellt sind.

Potentielle Medikamente müssen klinische Studien der Phase III positiv abschließen, um die Marktzulassung zu bekommen. Aufgrund der Komplexität der menschlichen Physiologie erweisen sich die meisten Wirkstoffe und therapeutischen Ansätze, die außerordentlich überzeugende Ergebnisse aus vorangegangenen *in vitro* und *in vivo*-Studien zeigten, in klinischen Studien als nicht wirksam oder weisen nicht zu vertretende Nebenwirkungen auf.

Tabelle 2: Phasen klinischer Studien

Phase	Anzahl d. Probanden	Dauer	Ziele
0	ca. 10-15	Wochen	Pharmakokinetik, Pharmakodynamik, (subtherapeutischen Dosen)
I	ca. 20-80	Wochen, Monate	Pharmakokinetik, Pharmakodynamik, Verträglichkeit und Sicherheit
II	ca. 50-200	Monate	Überprüfung des Therapiekonzepts, Findung der geeigneten Therapiedosis
III	ca. 200-10000	Monate bis Jahre	Signifikanter Wirkungsnachweis und Marktzulassung der Therapie
IV	ca. ab 1000 bis Millionen	Jahre	Feststellung sehr seltener Nebenwirkungen

In den folgenden Kapiteln werden verschiedene Ansätze zur Entwicklung von therapeutischen Wirkstoffen, die in den Prozess der Bildung amyloider Aggregate verschiedenster amyloidogener Proteine und Peptide eingreifen, entsprechend der Schlüsselstellen des Amyloidbildungsprozesses beschrieben.

6.1 Inhibition der Bildung amyloidogener Proteine und Peptide

Der naheliegendste Ansatz ist die Inhibition der Bildung amyloidogener Proteine und Peptide. So lässt sich theoretisch die Expression von Genen, die das amyloidogene Protein codieren, z.B. durch RNA-Interferenz^[198] stilllegen. Jedoch besitzen die verschiedenen amyloidogenen Proteine in ihrem nativen Faltungstand auch physiologische Funktionen, was zu nicht zu vertretenden Nebenwirkungen führen würde.

Sofern Proteasen durch Modifikation eines Proteins zur Produktion von amyloidogen Peptidsequenzen beitragen, ist die Beeinflussung ihrer Wirkung eine Möglichkeit zur Reduktion von amyloidogenen Spezies.^[189] Proteasen spielen vor allen Dingen in der Genese des A β -Peptids eine entscheidende Rolle. Das A β -Peptid wird durch zwei Proteasen, der β -Sekretase (auch BACE1, *β -site of APP Cleaving Enzyme*) und der γ -Sekretase aus einem

Vorläufer-Protein, dem Amyloid-Precursor-Protein (APP), gespalten. Die α -Sekretase konkurriert mit der β -Sekretase um das Substrat APP, wobei ihr Wirken zu ungefährlichen Produkten führt. Daraus folgend sind die Inhibition von β - und γ -Sekretase sowie die Stimulierung der α -Sekretase mögliche Strategien zur Behandlung von Alzheimer.^[199, 200] In der Pharmaindustrie konzentrierte man sich früh zunächst auf die Entwicklung von Protease-Inhibitoren, da man auf dem Gebiet der Inhibition von Enzymen bereits ein umfangreiches Wissen besaß und der Prozess der amyloiden Aggregation und die entsprechenden Zielstrukturen aus der Sicht der pharmazeutischen Industrie und der übrigen wissenschaftlichen Forschung noch weitestgehend unbekannt waren

Bei Mäusen führte die genetische Abschaltung der Aktivität der β -Sekretase zu einer vollständigen Vermeidung der Produktion des $A\beta$ -Peptids ohne wesentliche weitere Veränderung im Phänotyp der Tiere^[201, 202], was darauf hindeutet, dass die Inhibition hier möglicherweise kaum mit Nebenwirkungen verbunden ist.^[203] Die Entwicklung von Inhibitoren führte zu einer Reihe verschiedener, kleiner, nicht-peptidischer und selektiver Verbindungen, die zur Reduktion von $A\beta$ -Produktion führten und vor dem Verlust kognitiver Fähigkeiten in transgenen Mäusen schützten.^[203] Klinische Studien der Phase I zeigten ebenfalls eine Reduktion von $A\beta$ im menschlichem Plasma. Die Inhibierung der β -Sekretase wird daher als vielversprechende Strategie angesehen, jedoch müssen vorhandene Inhibitoren bezüglich ihrer pharmakokinetischen Eigenschaften optimiert und noch in klinischen Studien der Phase II und Phase III getestet werden.^[203]

Im Gegensatz zur β -Sekretase hat die γ -Sekretase viele weitere physiologische Funktionen. Daher sind viele der bisher entwickelten Inhibitoren (GSIs, *γ secretase inhibitors*) toxisch.^[203, 204] Aus diesem Grunde änderte sich die Zielstellung in Richtung auf die Entwicklung von Verbindungen, welche die Funktion des Enzyms nicht inhibieren, sondern lediglich modulieren. Das bedeutet, dass die γ -Sekretase durch diese Verbindung kürzere, nicht-toxische Fragmente von $A\beta$ produziert ohne Beeinträchtigung der anderen physiologischen Funktionen.^[204] Diese Selektivität ist die größte aktuelle Herausforderung in der Forschung in diesem Bereich.

Die Förderung der Aktivität der α -Sekretase führt zum einen zur Reduzierung der Menge an toxischen $A\beta$ -Peptid und zum anderen zur Erhöhung der Menge an APPS α , das neuroprotektiv wirkende Produkt der Spaltung von APP durch die α -Sekretase.^[205] Dies konnte man anhand transgener Mäuse, die α -Sekretase im hohen Maße exprimieren, zeigen.^[206] Verschiedene Verbindungen, die als pharmakologische Aktivatoren fungieren, wurden bereits in vorklinischen Studien und bei Alzheimer-Patienten getestet mit z.T.

positiven Ergebnissen.^[207, 208] Man geht bisher davon aus, dass eine moderate Förderung der α -Sekretase nur geringe Auswirkung auf die restliche Physiologie hat und somit als Therapieansatz denkbar ist, jedoch sind noch weitere Studien notwendig.^[205, 209]

Die beschriebenen Sekretasen sind zwar entscheidend in der Genese des $A\beta$ -Peptids, aber sie haben z.T. noch andere wichtige physiologische Funktionen, so dass identifizierte Inhibitoren möglicherweise einige Nebenwirkungen zeigen können.^[189] Darüber hinaus ist die Strategie der Modulation von Sekretasen nicht auf Erkrankungen wie z.B. Parkinson und Huntington sowie Prionenerkrankungen oder Diabetes Typ II anwendbar, da hier keine Proteolyse eines Vorläuferproteins zur Genese des amyloidogenen Proteins bzw. Peptids notwendig ist.^[189]

6.2 Förderung der Degradation amyloidogener Proteine und Peptide

Vor dem Hintergrund der Tatsache, dass die Menge an amyloiden Aggregaten Ergebnis eines Gleichgewichts aus Biosynthese und metabolischer Degradation ist, ist auch die Förderung der Degradation ein möglicher Ansatz zur Reduzierung amyloider Aggregate.^[210] Das $A\beta$ -Peptid stellt das bevorzugte Ziel dieser wissenschaftlichen Forschung dar und es sind bisher eine ganze Reihe von Enzymen (ADEs, *amyloid-degrading-enzymes*) identifiziert worden, die in der Lage sind, das $A\beta$ -Peptid abzubauen, wie z.B. NEP (Neprilysin) und IDE (*insulin-degrading-enzyme*).^[211, 212] Mögliche Wege zur Erhöhung der Aktivität dieser Enzyme sind z.B. der virale Gentransfer oder die Applizierung von pharmakologisch wirksamen Verbindungen.^[210] Bisher konnten zahlreiche Studien in Tiermodellen zeigen, dass die Aktivierung von entsprechenden Enzymen zur Reduktion der Menge an $A\beta$ und zu positiven Effekten bezüglich der Kognition führen kann.^[213-215] Ähnlich wie beim Einfluss auf die Aktivität der verschiedenen Sekretasen lässt sich aber auch hier sagen, dass diese Enzyme ebenfalls andere Aufgaben übernehmen und die Einflussnahme zu Nebenwirkungen führen kann. Dieser Strategie wird jedoch einiges therapeutisches Potential zugesprochen. Aber es sind noch weitere vor-/klinische Studien notwendig und die bisherige Forschung konzentriert sich hauptsächlich auf das $A\beta$ -Peptid.^[210]

6.3 Inhibition der Aggregation amyloidogener Proteine und Peptide

Der Eingriff in den Prozess der Bildung der Fibrillen durch Inhibierung bzw. Beeinflussung der Aggregation amyloidogener Proteine bzw. Peptide stellt eine vielversprechende Strategie zur Entwicklung neuer Therapien dar. Es stellt sich jedoch die Frage nach den Zielstrukturen. Eine Reihe aktueller wissenschaftlicher Arbeiten zeigt, dass möglicherweise die Akkumulation der diversen intermediären Oligomere im Prozess der Bildung amyloider Fibrillen die eigentliche toxische Spezies darstellen und nicht die amyloiden Fibrillen

selbst.^[140, 216, 217] Einige Studien konnten zeigen, dass der Grad der Erkrankung nicht mit der Menge an amyloiden Fibrillen, sondern eher mit der Menge an löslichen Oligomeren korreliert.^[218-220] Zudem eröffnen die zahlreichen Arbeiten über funktionale amyloide Fibrillen einen völlig neuen Blickwinkel auf amyloide Fibrillen.^[221, 222] Möglicherweise sind amyloide Ablagerung im Rahmen der Amyloidose eine physiologische Form der Speicherung und Entsorgung von toxischen Proteinspezies.^[135]

Der Mechanismus, wie eine spezifische Spezies des Fibrillenbildungsprozesses schließlich zur Degeneration der Zelle führt, ist noch unklar und es ist möglicherweise etwas verfrüht, amyloide Fibrillen generell als toxische Spezies auszuschließen.^[51] Darüber hinaus können Inhibitoren, welche die Elongation der Fibrillen inhibieren, sich auch an Intermediate des gesamten Prozesses binden, was möglicherweise schwer vorsehbare Folgen haben kann.^[51] Es ist möglich, dass sie zum einen zur Degradation der mitunter toxischen Intermediate beitragen oder aber zum anderen auch zu einer vermehrten Bildung von toxischen Intermediaten führen.

^[51] Bei der Suche nach Inhibitoren werden unterschiedliche Strategien bezüglich der Ausgangstruktur der Inhibitoren verfolgt. Einerseits werden *Screening*-Methoden angewendet, andererseits verfolgt man die Strategie des gezielten rationalen Designs von Inhibitoren. Die strukturelle Charakterisierung der Zielstruktur ist Voraussetzung für ein rationales Design von Inhibitoren. Der gesamte Prozess der Bildung amyloider Fibrillen ist jedoch sehr komplex und gerade die strukturelle Charakterisierung der Intermediate gestaltet sich nicht zuletzt aufgrund der Instabilität der Intermediate oft als schwierig.^[133, 162, 223, 224]

Identifizierte Inhibitoren können an verschiedenen Intermediaten binden, deren Struktur verändern und deren toxische Wirkung reduzieren oder gänzlich zur Auflösung der Oligomere und Fibrillen führen. Darüber hinaus ist auch die native Struktur des amyloidogenen Peptids als Zielstruktur denkbar. Gelingt es durch entsprechende Liganden, die native Struktur ausreichend zu stabilisieren, so lässt sich auch auf diesem Weg die Bildung von toxischen Oligomeren und ferner die Bildung von amyloiden Fibrillen verhindern. Zusammenfassend gehören zu den möglichen Strategien der Inhibition der Aggregation durch Zugabe von Inhibitoren die Stabilisierung des nativen Zustands des amyloidogenen Proteins bzw. Peptids, die Stabilisierung nicht-toxischer Oligomere, die nicht mehr Teil des amyloiden Aggregationsprozesses sind (*off-pathway*) sowie die Inhibierung der Fibrillen-Elongation (Abbildung 14). Wie bereits beschrieben, zeigen zahlreiche Arbeiten, dass möglicherweise die Oligomere die eigentliche toxische Spezies sind. Daher kann es auch Ziel sein, die Bildung von amyloiden Fibrillen durch entsprechende Modulatoren zu fördern, so dass die Konzentration potentiell toxischer Oligomere reduziert wird.^[225] Daran schließt sich eine weitere Strategie an. So ist es denkbar, die Aggregationstendenz zu nutzen, aber den Prozess

der Aggregation durch entsprechende Modulatoren ähnlich zur Polymerchemie so zu verändern, dass nicht amyloide Fibrillen, sondern z.B. amorphe Aggregate oder auch α -helikale Aggregate entstehen.^[226] Man geht davon aus, dass nicht-toxische Komplexe aus Inhibitor und amyloidogenen Peptid durch vorhandene Degradationsmechanismen in der Zelle abgebaut werden.^[227-231]

Zahlreiche Verbindungen und Substanzen haben Potential, in den komplexen Prozess der

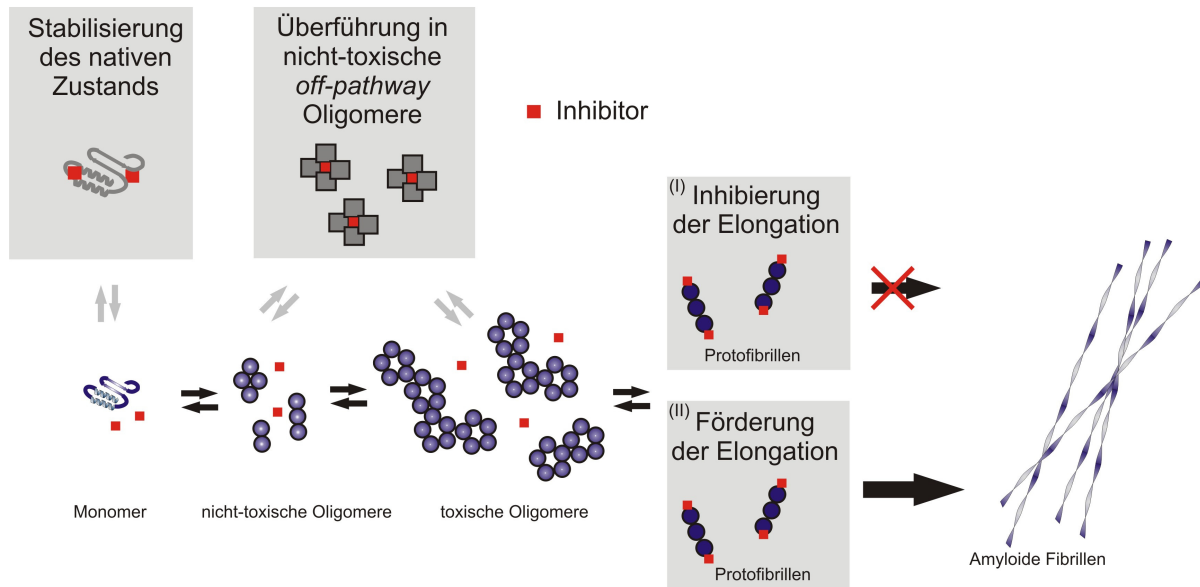


Abbildung 14: Schematische Darstellung verschiedener Inhibitionsstrategien.

Bildung von amyloiden Aggregaten einzugreifen. Die grundlegende Struktur der Inhibitoren, so zeigt die bisherige Inhibitionsforschung, kann sehr divers sein. Dazu gehören kleine, oft aromatische Moleküle, peptidbasierte Verbindungen und *Chaperone*-Proteine oder auch Antikörper.^[51, 189] Einige wurden bereits in klinischen Studien getestet oder befinden sich zurzeit in solchen. Auf die wesentlichen Verbindungen, aber vor allen Dingen auf die Ansätze des rationalen Designs und verschiedene Mechanismen der Inhibition wird in den folgenden Kapiteln eingegangen. Zuvor soll jedoch insbesondere auf die Strategie der Stabilisierung der α -helikalen Konformation zur Inhibition der amyloiden Aggregation eingegangen werden, da diese von besonderer Bedeutung für die im Rahmen die Arbeit durchgeführten Experimente ist.

6.3.1 Strategie der Stabilisierung der α -helikalen Konformation

Wie bereits im Kapitel 5.1 *Die Bedeutung α -helikaler Intermediate* beschrieben, werden bei einigen amyloidogenen Proteinen und Peptiden im Prozess der Aggregation ausgehend von unstrukturierten Monomeren durch Peptid-Peptid-Wechselwirkungen oder Peptid-Membran-

Wechselwirkungen helikale Intermediate gebildet. Einige amyloidogene Proteine sind bereits im nativen Zustand α -helikal gefaltet, wie z.B. α -Synuclein^[232], oder bergen in ihrer Primärstruktur eine α -Helix, wie z.B. das Prion Protein (helix 2, Position 179-191) und das A β -Peptid (Position 16-23), die als $\alpha\beta$ -diskordante Helices beschrieben werden.^[165]

Basierend auf MD-Simulationen der zentralen Region des A β -Peptids von Position 13 bis 26 wurde für den Prozess der konformationellen Änderungen von α -Helix zu β -Faltblatt und zu amyloiden Aggregaten ein dreistufiger Mechanismus vorgeschlagen.^[164] (I) Zunächst müssen ausreichend interne Wasserstoffbrückenbindungen in der α -Helix aufgelöst werden. Anschließend müssen starke hydrophobe Wechselwirkungen zwischen unpolaren Seitenketten (II) und starke hydrophile Wechselwirkungen zwischen polaren Seitenketten für eine konformationelle Änderung vorhanden sein (III). Werden diese Bedingungen nicht erfüllt, findet keine Aggregation zu amyloiden Fibrillen statt. Durch geeignete Liganden, die in der Lage sind, die helikale Struktur zu stabilisieren und ausreichend interne Wasserstoffbrückenbindungen in der α -Helix zu erhalten, lässt sich die Aggregation zu β -Faltblatt-reichen amyloiden Fibrillen inhibieren. Eine vielversprechende Strategie besteht im Design eines stabilen helikalen Liganden, der in der Lage ist, spezifisch mit den helikalen Elementen innerhalb der amyloidogenen Sequenz zu interagieren und die helikale

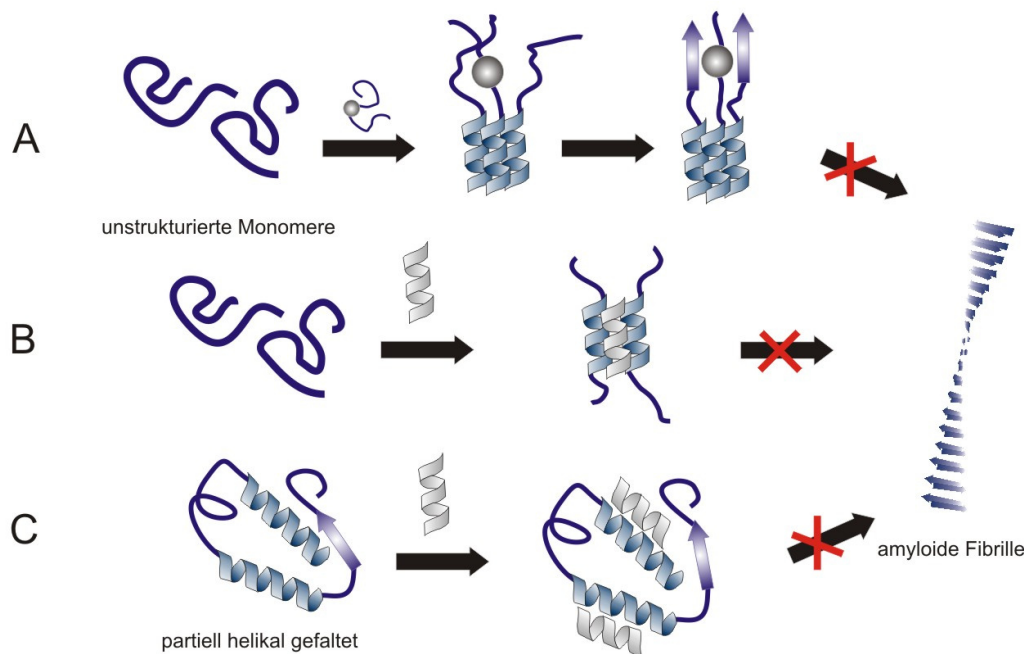


Abbildung 15: Ein schematisches Diagramm, wie ein potentieller helikaler Inhibitor bzw. ein Inhibitor, der die helikalen Elemente in einer amyloidogenen Sequenz unterstützt, die Aggregation zu amyloiden Fibrillen verhindern kann (erweitert nach Lit.^[160]).

Konformation zu stabilisieren (Abbildung 15, B). Ein Ligand, bestehend aus einer

Erkennungsdomäne, die spezifisch mit den helikalen Elementen innerhalb der amyloidogenen Sequenz interagiert und einer zusätzlichen Einheit, die den Übergang zu β -Faltblatt-reichen Oligomeren verhindert, ist ebenfalls vorstellbar (Abbildung 15, A).^[160] Ausgehend von nativ partiell helikal gefalteten amyloidogenen Proteinen und Peptiden ist auch eine Stabilisierung der nativen Struktur denkbar, was zusätzlich das Risiko der Stabilisierung toxischer Oligomere, das bei der Inhibition zu bedenken ist, möglicherweise völlig ausschließen kann (Abbildung 15, C). Die Stabilität der helikalen Oligomere aus Inhibitor und amyloidogenem Protein bzw. Peptid ist entscheidend. Sind sie nicht ausreichend stabil, kann der Inhibitor durch die Bildung helikaler Übergangsstrukturen möglicherweise als Nukleus für die amyloide Aggregation fungieren und sie entsprechend beschleunigen. Bei ausreichender Stabilität sollte durch die Bildung helikaler Oligomere aus Inhibitor und amyloidogenem Protein bzw. Peptid die Rate der amyloiden Aggregation verlangsamt werden bis hin zur völligen Inhibition der Aggregation. Derartige helikale Strukturen sind nicht thermodynamisch stabiler als β -Faltblatt-reiche amyloide Aggregate.^[188, 233] So kann man hier von einer kinetischen Stabilität sprechen bzw. von einer Metastabilität.^[160, 233]

6.3.2 Nicht-peptidische Inhibitoren

Mit Hilfe einfacher *in vitro* Testreihen und *Screening*-Methoden gelang es, zahlreiche Verbindungen zu identifizieren, welche die Bildung von amyloiden Fibrillen verhindern oder sogar bereits gebildete Fibrillen wieder auflösen können.^[61, 189, 234] Die meisten der Verbindungen sind Inhibitoren der Aggregation des A β -Peptids. Jedoch bleiben die mechanistischen Details oft unklar. Viele der Inhibitoren können verschiedene amyloidogene Proteine inhibieren, was die Spezifität in Frage stellt. Darüber hinaus werden unterschiedliche Spezies des gesamten Prozesses der Bildung amyloider Aggregate adressiert.^[235] Zu den identifizierten Verbindungen mit inhibitorischer Wirkung gehören z.B. Rifampicin^[236, 237], Melatonin^[238], Glykosaminoglykane^[239], Fullerene^[240], Apomorphinderivate^[241], Indolderivate^[242], Detergentien^[243], Curcumin^[244], Aminopyrazol^[245], Inositol^[246], Polyphenole^[247-249], 3-Amino-1-Propansulfonsäure (AlzhemedTM oder Tramiprosat)^[250], Salvianolische Säure B^[251] und Kongorot^[252] sowie Memoquin^[253], aber auch nicht-steroidale Antirheumatika wie z.B. Nanoproxen (NSAR engl. NSAID)^[254-256]. Im Folgenden sollen ausgewählte Beispiele einen kurzen Einblick in verschiedene Mechanismen der Inhibition durch nicht-peptidische Inhibitoren geben. Darüber hinaus wird auf die neueste Entwicklung von bereits in klinischen Studien befindlichen Verbindungen eingegangen.

6.3.2.1 Unspezifische Modulatoren der Aggregation

Eine Reihe von nicht peptidbasierten meist kleinen, aromatischen Verbindungen sind bisher als Inhibitoren identifiziert worden, wie z.B. Kongorot. Kongorot [Dinatrium-3,3'-((1,1'-biphenyl)-4,4'-diylbis(azo))bis-(4-aminonaphthalin-1-sulfonat)] ist ein hydrophiler, symmetrisch sulfonierter Azofarbstoff, der spezifisch an amyloide Fibrillen bindet und daraufhin eine charakteristische apfelgrüne Doppelbrechung unter polarisiertem Licht zeigt.^[257] Neben der Funktion in der Analyse amyloider Aggregate wird von Kongorot berichtet, dass zum einen die Bildung von Fibrillen von $A\beta(1-40)$ inhibiert und zum anderen durch das Binden an bereits gebildete amyloide Fibrillen deren Toxizität reduziert wird.^[200, 258, 259] Darüber hinaus konnte in einer weiteren Studie gezeigt werden, dass Kongorot das $A\beta$ -Monomer/Oligomer-Verhältnis in Zellkulturen erhöht, indem es die $A\beta$ -Monomere stabilisiert.^[200, 260] Weiterhin wurde berichtet, dass Kongorot *in vitro* und *in vivo* zur Auflösung von amyloiden Polyglutamin-Aggregaten, die u.a. mit der Huntingtonschen Krankheit in Zusammenhang stehen, beiträgt.^[189, 261] Weitere Derivate von Kongorot und anderen Farbstoffen wurden ebenfalls als Inhibitoren der Aggregation zu amyloiden Fibrillen identifiziert.^[189, 262, 263]

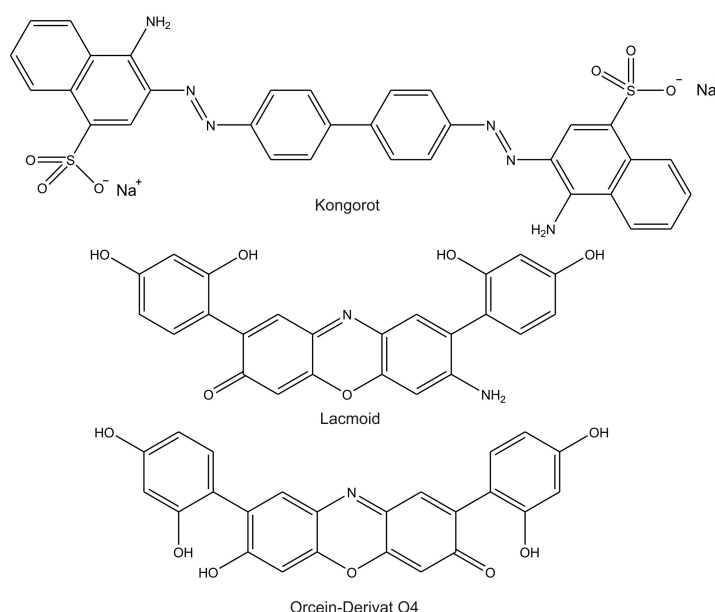


Abbildung 16: Chemische Struktur von Kongorot, Lacmoid^[270] und Orcein-Derivat O4^[225].

ails des Mechanismus wie bei vielen anderen Verbindungen nicht vollständig aufgeklärt. Kürzlich berichtete Ergebnisse über die Inhibition der Aggregation des $A\beta$ -Peptids und des α -Synucleins durch Kongorot und Lacmoid unterscheiden sich von den zuvor beschriebenen, geben jedoch einen Einblick in den Mechanismus der Inhibition. Es ist bekannt, dass

Kongorot oberhalb einer Konzentration von 5 μM zu Mizellen-ähnlichen supramolekularen Komplexen aggregiert.^[264-266] Lendel *et al.* stellte hierbei einen Zusammenhang zwischen der Eigenschaft der Selbst-Assoziation und der Wirkung auf den Prozess der amyloiden Aggregation her, was möglicherweise als genereller Mechanismus der Inhibition und Reduktion der Toxizität durch eine ganze Reihe nicht-peptidischer Inhibitoren herangezogen werden kann.^[258, 266-269] Darüber hinaus konnte man feststellen, dass trotz der Ähnlichkeit im Bindungsmechanismus beider Verbindungen, sie jedoch zu unterschiedlichen Effekten führen. Kongorot induzierte die Bildung von amorphen Aggregaten, Lacmoid dagegen inhibierte die Aggregation vollständig.^[267] Kongorot zeigte in Gegenwart von $A\beta$ einen ähnlichen Bindungsmechanismus wie kleinere Konzentrationen von Natriumlaurylsulfat (SDS, *sodium dodecyl sulfate*), einem anionischen Detergens. Ähnlich zum Einfluss von anionischen Detergentien^[271, 272] auf amyloide Aggregate vermögen nicht-peptidische Verbindungen mit einer Tendenz zur Selbstassoziation, wie z.B. Kongorot, den Prozess der Aggregation zu verändern und die toxischen Eigenschaften zu reduzieren.^[235, 252] Obwohl die Anwesenheit von Kongorot β -Faltblattstruktur bei $A\beta$ induziert, fördert es die Bildung von bestimmten Aggregaten, deren toxische Eigenschaft reduziert ist.^[252, 267] Möglicherweise wird durch die Eigenschaft, als Detergens zu wirken, die Eigenschaft der Oberfläche der amyloiden Aggregate verändert.^[252] Die negativen Ladungen von Kongorot ermöglichen womöglich über elektrostatische Wechselwirkung die Stabilisierung nicht-toxischer Oligomere, wie es z.B. für einen *Protein-Engineering*-Ansatz berichtet worden ist.^[273] In einer weiteren Studie mit Lacmoid in Gegenwart des $A\beta$ -Peptids konnte man wiederum mit Hilfe von NMR zeigen,

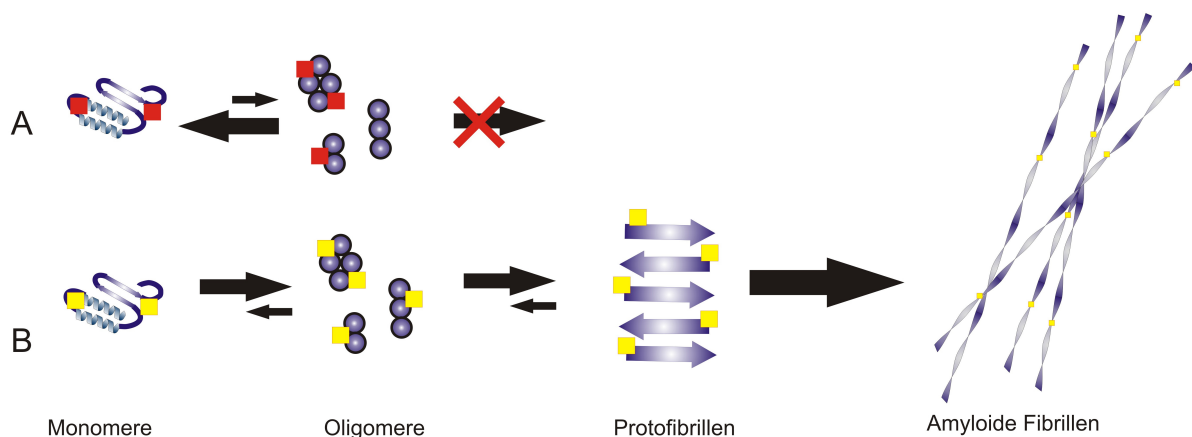


Abbildung 1: Vereinfachte schematische Darstellung der Wirkung unspezifischer Modulatoren auf das $A\beta$ -Peptid. (A) Unspezifische Bindung von Lacmoid (rot) reduziert die Wechselwirkungen, die zur Aggregation von amyloiden Fibrillen führen (B) Kongorot, Ocerin-Derivat O4 induziert die Bildung von β -Faltblatt-Strukturen und fördert die Bildung von amyloiden Fibrillen (nach Lit.^[225, 270])

dass der Bindungsmechanismus von Lacmoid und Kongorot ähnlich ist, jedoch wie im Falle des zuvor beschriebenen α -Synucleins zu unterschiedlichen Effekten führt. Lacmoid ist im Gegensatz zu Kongorot in der Lage, die Bildung von jeglichen Aggregaten zu verhindern.^[270] Da jedoch auch die Förderung der Bildung amyloider Fibrillen eine Strategie sein kann, die Konzentration potentiell toxischer Oligomeren zu reduzieren, kann auch die Entwicklung entsprechender Modulatoren ein Ziel der Forschung sein. Bieschke *et al.* zeigten, dass ein Orcein-Derivat mit einer zu Lacmoid sehr ähnlicher Struktur an die hydrophoben Aminosäuren des A β -Peptids bindet und die Nukleation und die Bildung von Protofibrillen und amyloiden Fibrillen fördert.^[225]

Man kann feststellen, dass viele der identifizierten Inhibitoren im Allgemeinen hydrophob sind und entsprechend in wässrigen Lösungen zur Selbst-Assoziation neigen. Die Hydrophobizität ist ebenfalls die hauptsächliche Triebkraft beim Prozess der Aggregation von Peptiden und Proteinen zu amyloiden Fibrillen. Diese Studien deuten darauf hin, dass die hydrophoben Inhibitoren unspezifisch ähnlich wie Detergentien an die hydrophobe Oberfläche der amyloidogenen Peptide und Proteine binden, was zu einer Veränderung bis hin zur vollständigen Inhibition des Prozesses der Aggregation führen kann.^[270] Darüber hinaus können derartige Liganden die konformationelle Eigenschaften verändern, das den entscheidenden Schritt, d.h. den strukturellen Übergang zu Amyloiden, stark beeinflusst.^[270] Beide Effekte in Abhängigkeit von der Verbindung und von der Konzentration können ganz unterschiedliche Folgen haben, von der Inhibition bis hin zu Induzierung der Aggregation.

6.3.2.2 Natürliche Polyphenole

Eine Reihe von Studien konnte zeigen, dass viele Formen natürlicher Polyphenole in der Lage sind, die Bildung von amyloiden Fibrillen zu inhibieren. Dazu gehören Polyphenole, die z.B. in Wein oder in Grünem bzw. Schwarzem Tee zu finden sind.^[274-277] So inhibieren Polyphenole wie (-)-Epicatechin, (-)-Epigallocatechingallat (EGCG), Tannine, Theaflavine, Resveratrol sowohl die Bildung als auch das Wachstum der Fibrillen und vermögen bereits gebildete Fibrillen wieder aufzulösen.^[248, 274, 275, 277-280] Es konnte gezeigt werden, dass Polyphenole einerseits vor der toxischen Wirkung durch amyloide Aggregation induzierter Akkumulation freier Radikale schützen^[274, 277, 281] und zum anderen direkt über ihre Struktur mit β -Faltblattstrukturen interagieren^[91] und die Bildung von toxischen Oligomeren und ferner die Bildung von amyloiden Fibrillen verhindern. Ausführliche Studien zur Bildung von amyloiden Fibrillen amyloidogener Proteine bzw. Peptide in Gegenwart von EGCG ergaben ein hohes Potential dieser Verbindung zur Inhibition der amyloiden Aggregation. Es

inhibiert die Aggregation und reduziert die Toxizität von vielen verschiedenen amyloidogenen Proteinen, wie z.B. das A β -Peptid, das Huntington Protein, α -Synuclein oder das Prion-Protein.^[158, 247-249, 276, 277, 280, 282, 283] Dabei verändert EGCG den Reaktionsweg der amyloiden Aggregation und fördert die Bildung von nicht-toxischen Oligomeren.^[248, 276, 282]



Abbildung 18: Polyphenole mit inhibitorischer Wirkung: A: (-)-Epigallocatechingallat (EGCG); B: Resveratrol; C: Theaflavin.

EGCG bindet an das ungefaltete Protein über Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophoben Wechselwirkungen.^[248, 284] Darüber hinaus wurde von einer kovalenten Bindung von EGCG an Lysinseitenketten über die Bildung einer Schiffischen Base berichtet.^[285] Porat *et al.* stellen ferner eine Verbindung zwischen den aromatischen Ringen der Polyphenole und der relativen Häufigkeit von aromatischen Aminosäuren wie Phenylalanin und Tryptophan in den amyloidogenen Kernsequenzen verschiedener Proteine^[86] her und schlagen eine spezifische aromatische Wechselwirkung vor, unterstützt durch Wasserstoffbrückenbindung vermittelt durch die zahlreichen Hydroxylgruppen als mechanistische Grundlage der Bindung von Polyphenolen, aber auch von Farbstoffen wie Kongorot an β -Faltblattstrukturen und der daraus folgenden Störung der Aggregation zu amyloiden Fibrillen.^[91, 283, 286] NMR-Experimente mit EGCG in Gegenwart des amyloidogenen Proteins Calcitonin deuten hier ebenfalls auf eine Wechselwirkung zwischen den aromatischen Ringen des EGCG und den aromatischen Seitenketten.^[287] Ehrnhöfer *et al.* schlagen im Rahmen ihres Modells zur Inhibition der Aggregation von α -Synuclein vor, dass EGCG an einem frühen Punkt im Prozess der Bildung amyloider Aggregate mit dem amyloidogenen Protein interagiert und den nativ ungefalteten Zustand stabilisiert und intramolekulare Wechselwirkung unterstützt.^[248] Als Folge werden in Gegenwart von EGCG stabile Oligomere gebildet, die nicht Teil des Bildungsprozesses amyloider Fibrillen sind („*off-pathway*“ Oligomere).^[248] Die bisher berichteten Ergebnisse machen deutlich, dass die Klasse der Polyphenole vielversprechende Verbindungen birgt, welche als Grundlage für neue Therapien zur Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen wie der Alzheimerschen und

Parkinsonschen Krankheit dienen können.^[288, 289] Jedoch sind noch einige Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit und pharmakokinetischen Eigenschaften an Zellen und transgenen Tiermodellen notwendig.

6.3.2.3 Kinetische Stabilisierung des nativen Zustands

J. W. Kelly aber auch anderen Wissenschaftlern gelang es, durch einen strukturbasierten Ansatz Inhibitoren gegen die Aggregation des Transthyretin Protein, kurz TTR, zu entwickeln.^[288, 290, 291] TTR ist ein homotetrameres, 127 Aminosäuren langes Protein mit β -Faltblatt-reichen Domänen. Über mehrere Bindungsstellen erfüllt es seine Funktion als Transportprotein für das Schilddrüsenhormon Thyroxin. Die Verschiebung des thermodynamischen Gleichgewichts in Richtung des amyloidogenen ungefalteten Monomers führt zur Bildung von amyloiden Aggregaten.^[290, 292] In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass kleine organische Moleküle an den unbesetzten Bindungsstellen des tetrameren TTR binden und kinetisch stabilisieren.^[292-295] Die Dissoziation des Proteins in vier Monomere wird durch diese Inhibitoren unterbunden und die Aggregation zu potentiell toxischen Oligomeren und amyloiden Fibrillen wird verhindert.^[290] Eine ganze Reihe von verschiedenen Inhibitoren, die an den Bindungsstellen für Thyroxin binden, wurden bisher meist auf Grundlage von Kristallstrukturen synthetisiert.^[296-302] Sie zeigen eine große strukturelle Ähnlichkeit. So bestehen sie zumeist aus zwei aromatischen Ringen, die jeweils zwei Bindungsstellen im tetrameren TTR-Protein besetzen. Diese beiden Ringe können direkt miteinander verbunden werden^[298], z.B. zu Biphenylen, oder über kurze hydrophobe Linker^[301, 302]. Die verschiedenen Liganden binden zum einen über hydrophobe und zum

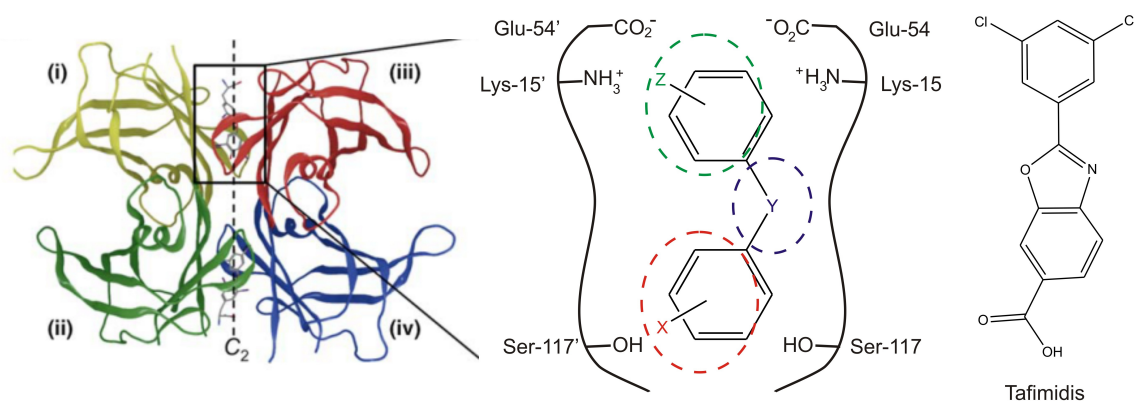


Abbildung 19: Komplex aus dem tetrameren TTR-Protein und Inhibitor (links). Schematische Bindungsstelle des tetrameren TTR-Proteins, besetzt durch einen Inhibitor (Mitte), wo das Y für einen Linker, X und Z für verschiedene substituierte Aryl-Reste stehen (verändert nach Lit. ^[290] © 2010 Copyright Elsevier Ltd.). Chemische Struktur von Tafimidis (links).

anderen über elektrostatische Wechselwirkungen.^[290] Zur Optimierung dieser

Wechselwirkungen müssen entsprechende Substituenten an den beiden Aryl-Resten und ein passender Linker gewählt werden. Polare Substituenten wirken durch die Wechselwirkung mit den Lysin- und Glutamatseitenketten an Position 15 bzw. 54 des TTR-Proteins stabilisierend.^[303] Darüber hinaus unterstützen Wasserstoffbrückenbindungen die Bindung zwischen Inhibitor und Tyrosin- und Serinseitenketten in Position 116 bzw. 117 des TTR-Proteins.^[290] Die systematische Optimierung beider Aryl-Reste und des Linkers auf der Basis von Kristallstrukturen führten bei diesem Beispiel zu einer Reihe von potentiellen und hochselektiven Inhibitoren, die den tetrameren Proteinkomplex kinetisch stabilisieren.^[288, 290, 300-302, 304] Die Verbindung Tafimidis wurde bereits in im Jahr 2011 beendeten klinischen Studien der Phase II und Phase III getestet und man erwartet die Zulassung.^[305] Dies wäre die erste wirkstoffbasierte Therapie gegen eine Form der Amyloidose.

6.3.2.4 Rationales Design und Wirkung von Metall-Chelatoren

Das A β -Peptid besitzt Bindungsstellen für Cu²⁺ und Zn²⁺ Ionen und es gibt mehr und mehr Hinweise, dass die Cu²⁺- und Zn²⁺-Ionen mit A β -Peptiden interagieren und sowohl einen Einfluss auf die Bildung der amyloiden Fibrillen besitzen als auch auf die Toxizität.^[306-308] Cu²⁺- und Zn²⁺-Ionen sind in hoher Konzentration im Bereich der Synapsen im Gehirn vorhanden und spielen auch bei anderen neurologischen Erkrankungen eine Rolle.^[309] Möglicherweise gibt es einen Zusammenhang zwischen einem im hohen Alter auftretenden Ungleichgewicht dieser Metallionen und der Alzheimerschen Krankheit. So ist es nachvollziehbar organische Verbindungen zu testen, die als Chelatoren für die entsprechenden Metallionen fungieren können. In *in vitro*-Studien konnte gezeigt werden, dass einige Chelatoren die durch Cu²⁺ bzw. Zn²⁺ ausgelöste Aggregation von A β (1-40) und A β (1-42) inhibieren.^[306, 307, 310] Clioquinol [5-chloro-7-iodo-8-hydroxyquinon] ist einer dieser wirksamen Chelatoren (Abbildung 20). Es bindet Cu²⁺- bzw. Zn²⁺-Ionen mit höherer Affinität als Ca²⁺ und Mg²⁺, ebenfalls biologisch relevante Ionen. In einer Studie mit transgenen Mäusen wurde eine ca. 50%-ige Reduktion von A β -Ablagerung bei oraler Zugabe (ca. 20 mg/Kg/d) von Clioquinol festgestellt.^[310] Die Wirkung von Clioquinol wurde schließlich auf der Ebene klinischer Studien untersucht. Man konnte einige signifikante Effekte bei an Alzheimer erkrankten Patienten feststellen, was sich u.a. in einer Verbesserung der kognitiven Fähigkeiten und Reduzierung der A β -Konzentration im Plasma zeigte.^[311, 312] Aufgrund von Schwierigkeiten in der Herstellung, die zu Unreinheiten durch zweifache Iodierung führten und den damit gestiegenen Risiko von Nebenwirkungen, wurde sowohl die Produktion als

auch weitere klinische Studien der Phasen II und III eingestellt.^[312] In der Folge konzentrierte man sich schließlich auf PBT2, ein 8-hydroxy-Chinolin Derivat, das nicht iodiert ist.

Es wird angenommen, dass PBT2 zu einen $A\beta$ - Cu^{2+} (oder Zn^{2+})-Komplex bindet und auf diese Weise mögliche zelltoxische oxidative Reaktionen unterbindet. PBT2 zeigt ebenfalls inhibitorische Wirkung auf durch Cu^{2+} bzw. Zn^{2+} ausgelöste Aggregation von $A\beta$, ist jedoch effektiver als PBT1 und besitzt eine größere Fähigkeit, die Blut-Hirn-Schranke zu durchdringen.^[313] PBT2 inhibiert die Bildung von $A\beta$ -Oligomeren, löst vorhandene $A\beta$ -Oligomere wieder auf, reduziert die Konzentration von interstitiellem $A\beta$ im Gehirn und erhöht die kognitiven Fähigkeiten transgener Alzheimer-Mäuse in vorklinischen Studien.^[313]

Eine Phase II-Studie mit männlichen und weiblichen Patienten, die über 55 Jahre alt waren und an einer milden Form von Alzheimer erkrankt sind, zeigte eine generelle gute Verträglichkeit von PBT2 und, in Abhängigkeit von der Konzentration, verschiedene positive Effekte, wie die Reduzierung von $A\beta(1-42)$ in der Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit (*Cerebrospinal fluid, CSF*) und eine Verbesserung der kognitiven Fähigkeiten in neuropsychologischen Tests.^[314] Weitere Studien sind geplant.^[312]

Eine Phase II-Studie mit männlichen und weiblichen Patienten, die über 55 Jahre alt waren und an einer milden Form von Alzheimer erkrankt sind, zeigte eine generelle gute Verträglichkeit von PBT2 und, in Abhängigkeit von der Konzentration, verschiedene positive Effekte, wie die Reduzierung von $A\beta(1-42)$ in der Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit (*Cerebrospinal fluid, CSF*) und eine Verbesserung der kognitiven Fähigkeiten in neuropsychologischen Tests.^[314] Weitere Studien sind geplant.^[312]

In einer Reihe von weiteren Arbeiten gelang es durch die Kombination von amyloid-

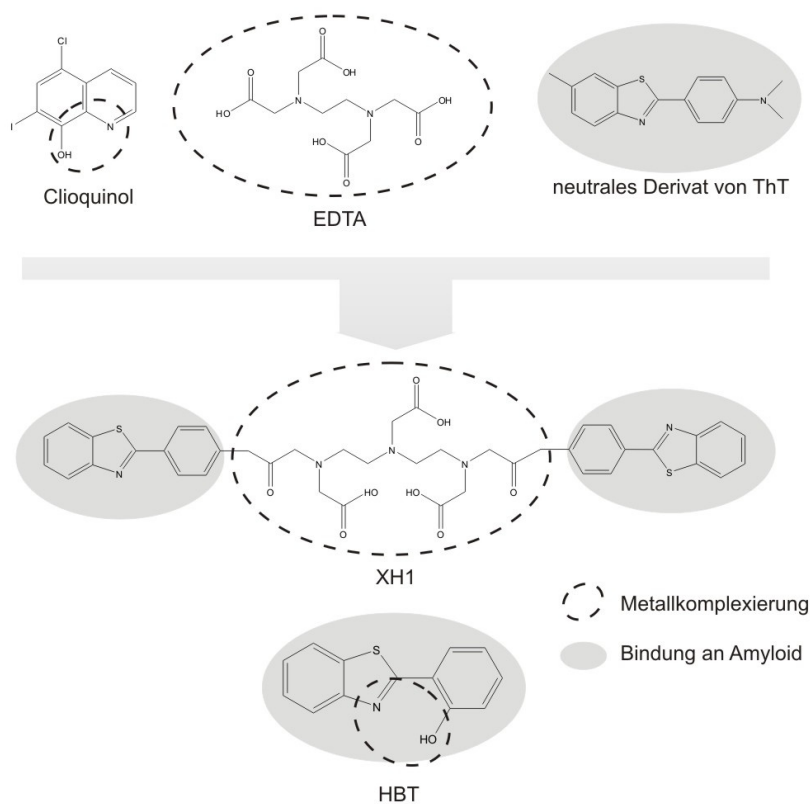


Abbildung 20: Überblick über die zwei rationalen Ansätze des struktur-basierten Designs von Inhibitoren der Metall-induzierten amyloiden Aggregation (verändert nach Lit. ^[320]). Inhibitor XH1 aus Lit. ^[318] und Inhibitor HBT aus Lit. ^[317].

bindenden Molekülen mit Metall-komplexierenden Einheiten *in vitro* und *in vivo*, vielversprechende Inhibitoren der Metall-induzierten amyloiden Aggregation zu entwerfen.^[315-320] Als Ausgangspunkt für amyloid-bindenden Einheit dienten häufig chromophore Moleküle, die zur Analyse amyloider Aggregate eingesetzt werden oder auch die amyloide Kernsequenz KLVFF des A β -Peptids, da sie an amyloide Aggregate binden. Als Vorbild für die Metall-komplexierende Einheit diente u.a. das zuvor beschriebene Clioquinol oder EDTA sowie Cyclen.^[320] Zwei verschiedene Ansätze wurden bisher umgesetzt. Zum einen wurden die Metall-komplexierenden Moleküle und amyloid-bindenden Moleküle durch eine kovalente Bindung verbunden und zum anderen wurde die Metall-komplexierende Funktion in das amyloid-bindende Molekül eingefügt.^[320] Diese bifunktionalen Moleküle zeigten bisher vielversprechende Ergebnisse, jedoch stehen noch ausführlichere *in vivo* Untersuchungen zur Optimierung der Permeabilität durch die Blut-Hirn-Schranke, zur metabolischen Stabilität und zur Toxizität aus.^[320]

6.3.2.5 Stabilisierung der α -helikalen Konformation

Mit unterschiedlichen methodischen Ansätzen zeigten verschiedene Arbeitsgruppen, dass z.B. mit Insulin die Aggregation hIAPP über die Stabilisierung helikaler Intermediate inhibiert werden kann.^[179, 321-323] Die Stabilisierung der α -helikalen Intermediate muss jedoch nicht durch Peptid-Peptid-Wechselwirkungen vermittelt werden. Saraogi *et al.* verwendeten zur Inhibition von IAPP ein synthetisches *Foldamer*, das Seitenketten von Aminosäuren in α -helikalen Konformation imitiert.^[324, 325] In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass derartige Verbindungen in der Lage sind, als α -Helix mit Proteinen zu interagieren und als Inhibitor für Helix-Protein-Wechselwirkungen eingesetzt werden können.^[326-328] In der Arbeit von Saraogi *et al.* übertrug man dieses Konzept auf die Aggregation von IAPP und adressierte die helikalen Intermediate im Aggregationsprozess von IAPP mit einer Oligopyridylamid-Gerüststruktur, die durch intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert wird und polare Seitenkettenfunktionen analog zur einer peptidischen α -Helix präsentiert.^[329, 330] Wie in Kapitel 5.1 *Die Bedeutung α -helikaler Intermediate* beschrieben, bindet IAPP an Lipidmembranen unter Ausbildung von helikalen Intermediaten und bildet schließlich amyloide Fibrillen. Saraogi *et al.* testeten Variationen der in Abbildung 21 dargestellten Verbindung als Inhibitor der Aggregation von IAPP in Gegenwart von Liposomen, bestehend aus einer Mischung aus anionischen Dioleoylphosphatidylglycerol (DOPG) und zwitterionischen Dioleoylphosphatidylcholin (DOPC). Der ThT-Assay ergab eine Reduktion der Rate der Lipid-vermittelten Aggregation

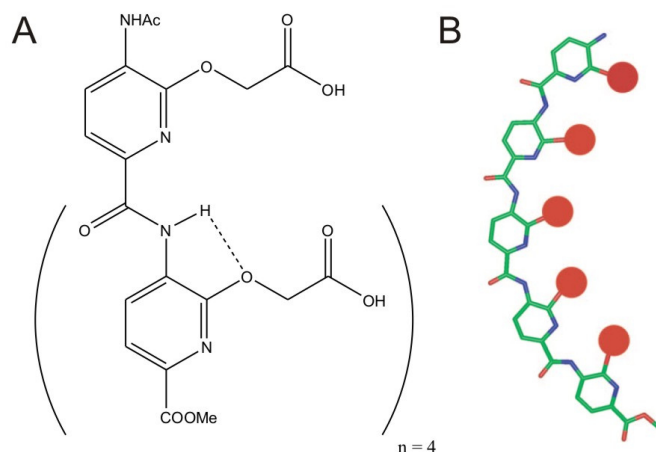


Abbildung 21: (A) Chemische Struktur eines als Inhibitor wirksamen Oligopyridylamids (B) Kristallstruktur des Rückgrats (Seitenketten sind als rote Kreise dargestellt) (nach Lit. ^[324] © 2010 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co)

von IAPP in Gegenwart der verschiedenen Inhibitoren. Die Wirkung ist abhängig von der Länge sowie von der Anzahl und Orientierung der Ladung an den imitierten Seitenketten. Die in Abbildung 22 gezeigte Struktur gehörte zu den effektivsten Verbindungen.

Nerelius *et al.* gingen bei ihrem Design von Inhibitoren der Aggregation des A β -Peptids von der zentralen Region $_{13}\text{HQKLVFFAEDVGS}_{26}$ des A β -Peptids aus, das unter bestimmten Bedingungen eine Tendenz zur helikalen Konformation besitzt (siehe Kapitel 5.1 Die Bedeutung α -helikaler Intermediate). Sie entwarfen Inhibitoren, die in der Lage sind, mit dieser Region zu interagieren und sie in der helikalen Konformation zu stabilisieren.^[166] Das Fragment weist mit $_{17}\text{LVFFA}_{21}$ eine größere hydrophobe Domäne und mit $_{22}\text{ED}_{23}$ eine anionische Domäne auf. Beim Design des Inhibitors kombinierten sie daher eine hydrophobe Alkylkette mit einer kationischen Funktion, um eine optimale Bindung an diese Region zu erreichen. Das Design resultierte in die Verbindung Dec-DETA (Abbildung 22). Bei *in vitro*-Experimenten führte die Anwesenheit dieses Inhibitors zu einer Zunahme der helikalen Konformation.^[166] Die Autoren konnten darüber hinaus zeigen, dass dieser Inhibitor den

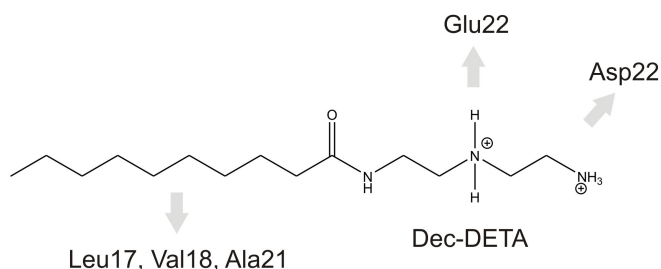


Abbildung 22: Struktur des Inhibitors Dec-DETA und Interaktionen mit Positionen des zentralen Peptidfragmentes des A β -Peptids (nach Lit. ^[166])

Prozess der Aggregation von $A\beta(1-42)$ verändert, die Toxizität sowohl in Zell-Tests als auch im *in vivo*-Modell *Drosophila melanogaster* reduziert.^[166]

6.3.2.6 Mimetika der β -Faltblattstruktur

Die Darstellung nicht-peptidischer β -Faltblattstrukturen, die in der Lage sind, an β -Faltblatt-reiche Strukturen amyloidogener Sequenzen zu binden, stellt einen weiteren Ansatz des rationalen Designs von Inhibitoren der Amyloidbildung dar.^[51] Schrader und seine Mitarbeiter entwickelten nicht-peptidische, oligomere Aminopyrazole, die das komplementäre Donor-Akzeptor-Donor-Muster der Wasserstoffbrückenbindungen von β -Faltblattstrukturen imitieren.^[245] Man konnte zeigen, dass diese selektiv an das Peptidrückgrat amyloidogener Sequenzen mit charakteristischer *cross- β* -Struktur binden^[331] und im Falle des Aminopyrazolcarboxylat-Trimers bereits gebildete amyloide Fibrillen von $A\beta(1-42)$ wieder auflösen.^[332] Studien zur Wirkung von verschiedenen Derivaten des Aminopyrazolcarboxylat-Trimers auf die Aggregation von $A\beta(1-42)$ führten zu einer Reihe von wirksamen Inhibitoren, welche die Bildung von amyloiden Aggregaten inhibieren und die Toxizität im Zell-Assay reduzieren.^[333, 334] Mit Hilfe von MD-Simulationen konnte man zeigen, welche Derivate an die $A\beta(1-42)$ in dem fibrillären Zustand binden und in der Lage

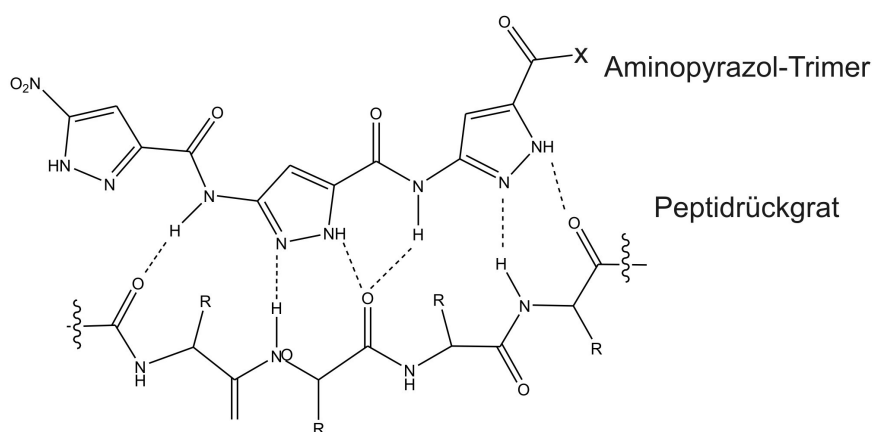


Abbildung 23: Struktur des Aminopyrazolcarboxylat-Trimers in Interaktion mit einem Peptidrückgrat nach Lit.^[334] ($X = C$ -terminale Gruppe, z.B. TEG-KKKKG).

sind, die Struktur der Fibrille zu verändern.^[334] Zum Beispiel vermag das Aminopyrazolcarboxylat-Trimer mit über TEG C-terminal gebundenen Lysinresten durch Interaktion mit Glutamat an Position 22 von $A\beta(1-42)$ die *cross- β* -Struktur der Fibrille aufzulösen.^[334] Man konnte ferner zeigen, dass der TEG-Linker die *turn*-Struktur des $A\beta(1-42)$ im fibrillären Zustand destabilisiert.^[334] Zusätzliche strukturelle Daten durch 2D-Festphasen-NMR-Studien oder Kristallographie sollen die Ergebnisse weiter unterstützen.^[334]

6.3.2.7 Inhibition durch Nanopartikel

In den letzten Jahren gelangten Nanopartikel für den gezielten Einsatz in der Medizin in den Fokus der wissenschaftlichen Forschung, so auch als Grundlage für neue therapeutische Ansätze gegen neurodegenerative Krankheiten wie Alzheimer. Nanopartikel weisen ein extremes Oberflächen-Volumen-Verhältnis auf, das eine hohe Absorption von Proteinen und Peptiden möglich macht. Die Absorption und Wechselwirkung der Nanopartikel mit einem Protein bzw. Peptid lässt sich durch die Modifikation der Oberfläche und Größe der Nanopartikel kontrollieren.^[335, 336] Nanopartikel sind in der Lage, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden; so können Nanopartikel u.a. als Transportsystem für pharmazeutische Wirkstoffe verwendet werden oder selbst als Wirkstoff fungieren. Es lassen sich anorganische und polymere Nanopartikel unterscheiden, wobei beide Formen auf ihre Fähigkeit, in den Prozess der amyloider Fibrillen einzugreifen, getestet wurden.^[337, 338] Die Bindung des Proteins an Nanopartikel kann zu Änderungen in der Konformation und zu einer stark erhöhten Konzentration des Proteins an der Oberfläche führen. Beide Faktoren können die Aggregation begünstigen.^[339] Ziel ist es jedoch, spezifisch die amyloidogene Spezies an der Oberfläche dauerhaft zu binden und sie in einer nicht-toxischen Konformation zu stabilisieren. In den bisherigen experimentellen Arbeiten konnte sowohl eine inhibitorische Wirkung^[340, 341] als auch die Fähigkeit zur Nukleation der Fibrillenbildung^[342] gezeigt werden. Die gleiche Art polymerer Nanopartikel kann zum Teil gegenteilige Effekte in Abhängigkeit vom amyloidogenen Protein bzw. Peptid zeigen.^[343] Cabaleiro-Lago *et al.* kommen in der Arbeit zur Wechselwirkung von amyloidogenen Monellin und polymerer Nanopartikel zu dem Schluss, dass die Funktionalisierung der Oberfläche sowie die intrinsische Stabilität des amyloidogenen Proteins darüber entscheiden können, ob die Aggregation gefördert oder inhibiert wird.^[344]

6.3.2.8 Nicht-peptidische Verbindungen in klinischen Studien

Einige nicht-peptidische Verbindungen wurden bereits in klinischen Studien bezüglich ihrer Wirkung auf Alzheimer getestet. Dazu gehören Dimebon, AlzhemedTM, AZD-103. Die Verbindung, der Inhibitionsmechanismus sowie die Ergebnisse der klinischen Studien dieser Verbindungen werden an dieser Stelle kurz beschrieben.

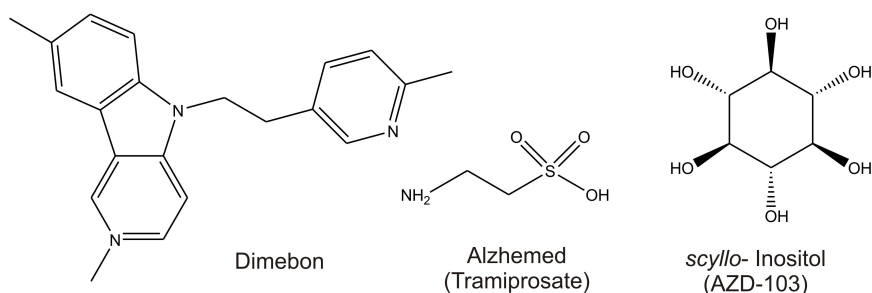


Abbildung 24: Eine Auswahl von Verbindungen, die bereits in klinischen Studien getestet wurden (Lit. [155]).

Alzhemed™ (Tramiprosate)

Tramiprosate (3-Amino-1-propansulfonsäure, 3-APS, NC531, Alzhemed™) gehört zu ersten Generation von Inhibitoren der amyloiden Aggregation, die im Rahmen klinischer Studien getestet wurden (Abbildung 24).^[312] Es hat ein geringes Molekulargewicht und ist oral applizierbar. Es bindet und stabilisiert lösliche Formen von $A\beta$ und verhindert die Bildung von amyloiden Fibrillen. Das Molekül imitiert Glykosaminoglykane (GAG), saure Polysaccharide, die den Prozess der amyloiden Aggregation $A\beta$ fördern.^[345-347] Glykosaminoglykane binden über negative geladene Sulfatreste an die ${}_{13}\text{HHQK}_{16}$ -Region des $A\beta$ -Peptids.^[312] Tramiprosate bindet ebenfalls über elektrostatische Wechselwirkung an das $A\beta$ -Peptid, wodurch die Interaktion mit Glykosaminoglykanen inhibiert wird.^[348, 349] Tramiprosate zeigte in vorklinischen Studien positive Ergebnisse *in vitro* und *in vivo*.^[345, 350] In einer Phase II-Studie an Patienten mit einer milden Form von AD führte es zur Reduzierung von $A\beta$ in der Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit. Es konnten im getesteten Zeitraum aber keine positiven Effekte bezüglich der Kognition festgestellt werden.^[250, 351] Man nahm an, dass Tramiprosate erst über einen längeren Zeitraum wirken kann.^[312] Ergebnisse der klinischen Studie der Phase III ließen jedoch keinen endgültigen Schluss über die Wirksamkeit von Tramiprosate zu.^[312]

AZD-103

AZD-103 (*scyllo*-Cyclohexanhexol) von Transition Therapeutics ist in der Lage, die Geschwindigkeit des Krankheitsverlaufs von Alzheimer zu verlangsamen und kognitive Funktionen zu verbessern. Man nimmt an, dass AZD-103, ähnlich wie die zuvor beschriebenen Inhibitoren, den Prozessweg der Aggregation verändert und die Aggregation zu toxischen Oligomeren verhindert.^[352] Die Anwendung von AZD-103 an Mäusen führte zu einer signifikanten Reduktion von löslichem und unlöslichem $A\beta(1-40)$ und $A\beta(1-42)$ sowie

der Anzahl und der Größe der Ablagerung.^[353, 354] Die inhibitorische Wirkung scheint von der Stereochemie abhängig zu sein, da das Stereoisomer *chiro*-Inositol wenig bis keine Effekte zeigte.^[155, 312]

Klinische Studien der Phase I mit AZD-103 ergaben günstige pharmakokinetische Eigenschaften für die Anwendung als therapeutischer Wirkstoff. Es kann oral eingenommen werden und ist in der Lage, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden. Darüber hinaus weist es eine gute Verträglichkeit auf.^[312] AZD-103 wurde im Rahmen von klinischen Studien der Phase II getestet.^[246] Untersucht wurden die Sicherheit und die Effektivität der Wirkung mit Hilfe von Biomarkern und *Imaging*-Methoden. Der Wirkstoff zeigt keine negativen Effekte bezüglich der Sicherheit, jedoch waren die klinischen Effekte nicht signifikant verschieden im Vergleich zum Placebo.^[246] Jedoch wurde die $A\beta(1-42)$ -Konzentration in der Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit im Vergleich zum Placebo signifikant reduziert.^[246] Die Autoren sehen die Ergebnisse der Studie als Grundlage zur Optimierung der Dosis in notwendigen weiteren Studien und erwarten gute Ergebnisse, wenn man den Wirkstoff in einem frühen Stadium der Alzheimer-Krankheit appliziert.^[246]

Dimebon®

Dimebon® oder Dimebolin ist ein Antihistamin-Medikament, zu dem es zwar kaum vorklinische Studien bezüglich der Wirkung auf die Aggregation des $A\beta$ -Peptids gibt, jedoch zeigte es in kleineren klinischen Studien mit Patienten mit einer milden Form von Alzheimer positive Effekte bezüglich der Kognition.^[355, 356] Eine darauf folgende, erst kürzlich durchgeführte klinische Studie der Phase III mit 598 Personen zeigte überraschenderweise keine signifikanten Verbesserungen im Vergleich zur Placebo-Gruppe.^[357] Weitere klinische Studien werden durchgeführt, u.a. mit einer kombinierten Applikation mit ARICEPT® (Donepezil HCl).^[357, 358] Jedoch spricht man beim Beispiel Dimebon® schon von einem kostspieligen Fehler, da klinische Studien durchgeführt wurden, ohne dass es verlässliche Ergebnisse aus vorklinischen Studien gibt und der Mechanismus der Wirkung völlig unbekannt ist.^[359] Erste vorklinische Studien werden nun veröffentlicht, jedoch sind noch weitere Studien notwendig, um eine klare Aussage zur Wirkung von Dimebon machen zu können.^[357, 360, 361] Dimebon® wurde ebenfalls zur Behandlung der Huntingtonschen Krankheit angewendet und erste klinische Studien der Phase II zeigten positive Ergebnisse bezüglich kognitiver Funktionen der Patienten.^[362] Eine klinische Studie der Phase III wird zurzeit durchgeführt.^[357]

6.3.3 Peptidbasierte Inhibitoren

Peptide und Proteine sind bedeutende Vermittler verschiedenster biologischer Funktionen. Sie regulieren physiologische Prozesse und können sowohl als endokrine oder parakrine Signale als auch als Neurotransmitter sowie als Wachstumsfaktoren agieren. Sie weisen im Allgemeinen eine geringe Toxizität auf, zeigen gleichzeitig aber eine hohe Spezifität. Die molekulare Erkennung von Peptiden und Proteinen ist daher auch Grundlage für die Entwicklung von pharmazeutischen Wirkstoffen. Peptide und Proteine zeichnen sich durch ihren modularen Aufbau und ihre große Variabilität ihrer Funktionalitäten aus. Einige kleinere Peptide sind in der Lage, die Zellmembran zu überwinden, was im Hinblick auf den medizinischen Einsatz von Vorteil ist.

Sie lassen sich mit Hilfe der Festphasensynthese oder durch biologische Synthese mit entsprechenden Expressionssystemen leicht herstellen.^[193] Darüber hinaus lassen sie sich durch Konjugation mit anderen kleineren organischen Molekülen erweitern und durch den Einbau von nicht natürlichen Aminosäuren modifizieren, wodurch die Einsetzbarkeit erhöht und die Funktionalität erweitert werden kann.^[363] Peptide gewinnen daher in der Entwicklung von wirkstoffbasierten Therapien immer mehr an Bedeutung.^[193, 363] Das therapeutische Potential wird bei der Behandlung von Erkrankungen wie AIDS, Krebs, Alzheimer oder Malaria deutlich.^[363]

Peptide als therapeutische Ausgangssubstanzen bergen jedoch auch einige Nachteile.^[363] Im Allgemeinen wird es als Nachteil angesehen, dass aus L-Aminosäuren aufgebaute Peptide eine geringe metabolische Stabilität *in vivo* zeigen, denn sie werden schnell durch Proteasen abgebaut. Jedoch kann es auch von Vorteil sein, wenn der Wirkstoff schnell abgebaut wird, sofern man dies bei der Dosierung berücksichtigt. Häufig lassen sich Peptide wirksam nur über Injizierung applizieren, da die pharmakokinetischen Eigenschaften sowie die Bioverfügbarkeit für eine medizinische Anwendung nicht optimal sind. Darüber hinaus sind Peptide potentiell immunogen, d.h. sie können als Antigen wirken und eine unerwünschte Immunantwort auslösen.

Aber es gibt zahlreiche synthetische Lösungsansätze, die helfen, derartige Nachteile zu überwinden.^[363] So kann die Stabilität gegen Proteasen durch Glykosylierung^[364], PEGylierung^[365] und durch den Austausch der L-Aminosäuren gegen D-Aminosäuren bzw. gegen nicht kanonische Aminosäuren^[366] erhöht werden. Darüber hinaus lassen sich Peptidsequenzen z.B. durch die Modifikation des Peptidrückgrats durch N-Methylierung, durch α,α -disubstituierte Aminosäuren oder durch die Verwendung von β - bzw. γ -Aminosäuren optimieren.

peptidbasierte Inhibitoren stellen zusammenfassend eine Alternative zu den nicht-peptidischen organischen Verbindungen dar. Da man bereits weiß, dass amyloidogene Kernsequenzen im Prozess der Aggregation sich zur *cross-β*-Struktur zusammen lagern, gehen viele Ansätze des rationalen Designs von den entsprechenden amyloiden Kernsequenzen aus, die zur Optimierung ihrer Eigenschaften weiter modifiziert werden.^[51] Im Folgenden werden verschiedene Ansätze der Entwicklung peptidbasierter Inhibitoren beschrieben, wobei der Schwerpunkt auf das rationale Design gelegt wurde.

6.3.3.1 *Screening* von inhibitorisch wirksamen Peptiden

Wie bereits in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben, treten bei dem Prozess der Bildung amyloider Fibrillen eine Reihe bezüglich der Struktur und der Stabilität sehr unterschiedlicher Spezies auf. Dies erschwert die genaue Charakterisierung, so dass das direkte rationale Design eines pharmazeutischen Wirkstoffs sich oft schwierig gestaltet. Daher werden auch peptidbasierte Inhibitoren mit Hilfe von *Screening*-Methoden gesucht. Ein *Screening*-System zur Identifizierung von peptidbasierten Inhibitoren der amyloiden Aggregation muss folgende Voraussetzungen erfüllen:^[51]

- I. Einfache, schnelle, sensitive Detektion der Blockierung der Polymerisation
- II. Möglichkeit zur Synthese großer Mengen an verschiedenen Peptidsequenzen
- III. Möglichkeit zur Analyse der Bindung des Inhibitors an das amyloidogene Protein/Peptid zur strukturgesteuerten Optimierung des Inhibitors

Eine Möglichkeit, schnell und einfach eine große Menge von Peptidsequenzen herzustellen und nach bestimmten Gesichtspunkten zu selektieren, bietet die Methode des Phagen-*Displays*.^[367, 368] Das generelle Prinzip beruht auf der Verbindung des Genotyps (Variationen der Nukleotidsequenz) mit dem Phänotyp (Variation in der Aminosäuresequenz). Der Phagen-*Display* ermöglicht kurz gesagt die schnelle und einfache Darstellung einer Bibliothek aus verschiedenen Peptidsequenzen, die an der Oberfläche eines Phagen präsentiert wird. Der Inhibitor wird anhand der Affinität gegenüber dem Zielpeptid, d.h. dem amyloidogenen Protein/Peptid aus der Bibliothek selektiert. Aufgrund der Verknüpfung mit dem codierenden Gen kann die Sequenz des selektierten Peptids mit Hilfe der üblichen Technologie eines molekular-biologischen Labors identifiziert werden.

Nagai *et al.* gelang es mit der Erstellung einer Peptid-Bibliothek, die an der Oberfläche eines M13 pIII Phagen präsentiert wurde, sechs Peptidsequenzen zu selektieren.^[369] Das QBP1

(*polyQ Binding Protein*) SNWKWWPGIFD bzw. das ohne Funktionsverlust weiter verkürzte WKWWPGIF binden an die pathologische Polyglutamin-Domäne (Huntington) und reduzieren die Aggregation und Toxizität.^[369] In einer nachfolgenden Studie konnte die Gruppe zeigen, dass der peptidbasierte Inhibitor auch *in vivo* im *Drosophila*-Modell wirksam ist.^[370] Es ist auffällig, dass 5 von 6 selektierten Peptidsequenzen reich an Tryptophan sind. Meist weisen die Peptide einen Cluster von 3 Tryptophanresten auf, wobei zwei als Paar auftreten.^[369] Man nimmt an, dass diese eine wichtige Rolle bei der Bindung an die amyloidogene Sequenz und bei der Entfaltung der inhibitorischen Aktivität spielen (siehe Kapitel 2.3.4 *Die Rolle aromatischer Seitenketten*).

Wie in der Einleitung zu peptidbasierten Peptiden erwähnt, haben D-Peptide aufgrund der größeren metabolischen Stabilität gegenüber den natürlichen L-Peptiden gerade im Hinblick auf ihre medizinische Anwendung einige Vorteile.^[371] Für das *Screening* von D-Peptiden, die spezifisch an eine Zielstruktur binden, bietet sich die Methode des *Mirror Image Phage Display* an. Im Gegensatz zur Methode des *Phage Displays* dient hier das Spiegelbild der Zielstruktur, vollständig aus D-Aminosäuren aufgebaut, als Grundlage für den Selektionsprozess, der schließlich zu L-enantiomeren Liganden führt. Das Peptid der Wahl wird schließlich in die D-enantiomere Form übersetzt.^[371] Ergebnis ist ein D-Peptid als Ligand für eine L-enantiomere Zielstruktur. Diese Strategie wurde von Willbold und

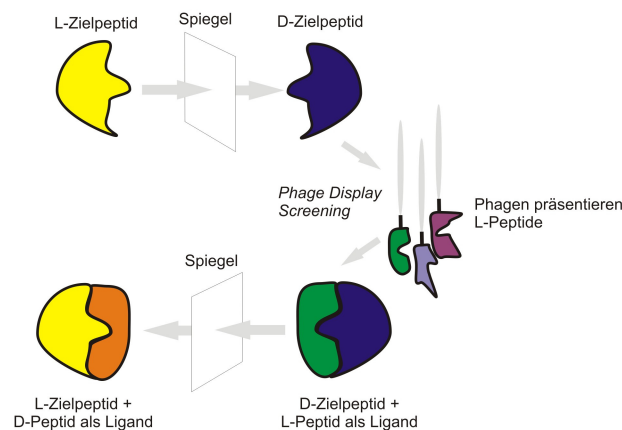


Abbildung 25: Das Prinzip des Mirror Image Phagen-Displays (nach Lit.^[371]).

Mitarbeiter auf das Alzheimerpeptid $A\beta(1-42)$ angewendet und führte zur Identifizierung eines D-Peptids mit Namen D3 bei Bedingung des *Mirror Image Phagen-Display*, wo man von Monomere des $A\beta(1-42)$ ausgegangen ist. Es besteht aus 12 Aminosäuren und hat die Sequenz RPRTRLHTRNR.^[372-375] Die hohe Anzahl an positiv geladenen Argininresten ist auffällig und hat u.a. zur Folge, dass dieses Peptid in der Lage ist, durch die Membran zu

diffundieren. Das D-Peptid inhibiert die Bildung von Fibrillen *in vitro* und reduziert die Toxizität. Es reduziert das Ausmaß der Plaquebildung und der Entzündungserscheinungen im Gehirn bei direkter Applizierung in das Gehirn von transgenen Mäusen.^[375] In einer weiteren Studie konnte man *in vivo* zeigen, dass dieses Peptid auch bei oraler Applizierung die Plaquebildung reduziert und positiv auf die kognitiven Fähigkeiten wirkt.^[372] Darüber hinaus konnte man *in vitro* demonstrieren, dass es mit den toxischen Oligomeren interagiert und sie in größere, nicht-toxische, ThT negative, amorphe Aggregate überführt.^[372] Mit Hilfe von Computersimulation konnte man einen Einblick die Funktionsweise des Inhibitors D3 gewinnen. Demnach kompensiert D3 die negative Ladung an der Seitenkette des Glutamats an Position 22 des A β -Peptids, die aufgrund der Aneinanderlagerung in einer Reihe angeordnet sind. Dadurch wird zum einen die Löslichkeit des A β -Peptids-D3 Komplex reduziert und zum anderen werden die zusammengelagerten A β -Peptide gegeneinander verschoben. Die charakteristische *cross- β* -Struktur wird gestört und es erfolgt die Aggregation in größere nicht-amyloidogene amorphe Aggregate.

Zusammenfassend zeigen diese Arbeiten einen neuen Mechanismus der Inhibition der Bildung von toxischen Oligomeren und darüber hinaus demonstrieren sie das Potential von peptidbasierten Inhibitoren.

6.3.3.2 Rationales Design von peptidbasierten Inhibitoren

Den meisten bisher in der wissenschaftlichen Literatur beschriebenen peptidbasierten Inhibitoren liegt ein rationales Design zu Grunde. Oft wird hierbei vom Zielpeptid selbst ausgegangen, da man weiß, dass dieses Peptid im Prozess der Aggregation mit sich selbst interagiert (siehe Kapitel 2.3.1 *Amyloidogene Kernsequenzen*, Abbildung 26).^[189] *In vitro*-Studien an amyloidogenen Fragmenten und der systematische Austausch von Aminosäuren (*mutational analysis*) haben gezeigt, dass eine kurze amyloidogene Kernsequenz eine wesentliche Voraussetzung für die Bildung von amyloiden Fibrillen ist (siehe Kapitel 2.3.1 *Amyloidogene Kernsequenzen*). Diese kurzen Sequenzen bilden daher häufig den Ausgangspunkt für die Entwicklung von peptidbasierten Inhibitoren.^[51, 61, 376, 377] Sie lassen sich durch experimentelle Methoden identifizieren und inzwischen durch Algorithmen^[79, 86, 378] bestimmen. Die experimentelle Analyse verschiedener kurzer Fragmente des A β -Peptids ergab, dass das Pentapeptid KLVFF, die amyloidogene Kernsequenz des A β -Peptids, spezifisch an das vollständige A β -Peptid bindet.^[56] Die ersten peptidbasierten Inhibitoren auf der Basis von amyloidogenen Kernsequenzen zeigten zwar einen inhibitorischen Effekt auf die Aggregation, jedoch bildeten sie mitunter selbst Fibrillen.^[56, 379-381] Die folgenden

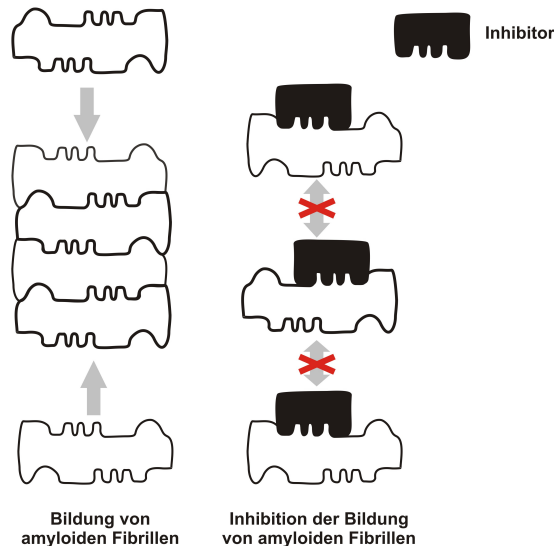


Abbildung 26: Wechselwirkung des Inhibitors (amyloidogene Kernsequenz) mit dem vollständigen amyloidogenen Protein bzw. Peptid (nach Lit. ^[56]).

Arbeiten konzentrierten sich daher auf verschiedene Modifikationen der Ausgangssequenz mit dem Ziel, einerseits die Bindung an das amyloidogene Protein bzw. Peptid zu gewährleisten und die weitere Anlagerung von amyloidogenen Monomeren zu verhindern, andererseits aber auch Eigenschaften wie die Aggregationstendenz des Inhibitors selbst zu verändern und das Potential der Peptide als Inhibitor zu erhöhen. Zu den häufigsten Modifikationen gehören der Austausch von einzelnen Aminosäuren, die Modifikation der Aminosäureseitenketten, die Modifikation der Peptidtermini sowie die Modifikation des Peptidrückgrats.

6.3.3.2.1 Austausch von Aminosäuren

Man kann zusammenfassend drei wesentliche Ziele, die mit Hilfe des Austauschs von Aminosäuren erreicht werden sollen, herausheben. Dazu gehören die Inhibition durch die Einführung von polaren Aminosäuren, die Inhibition durch die Einführung sekundärstrukturbrechender Aminosäuren wie Prolin sowie die Erhöhung der metabolischen Stabilität durch eine Einführung von D-Aminosäuren.

Erhöhung der Polarität

Sowohl die experimentelle Analyse als auch verschiedene Algorithmen zur Vorhersage amyloidogener Regionen zeigten, dass die Sequenz $_{17}\text{KLVFF}_{21}$ die amyloidogene Kernsequenz des $\text{A}\beta$ -Peptids ist. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass das entsprechende Pentapeptid KLVFF an das vollständige $\text{A}\beta$ -Peptid bindet.^[56] Des Weiteren

konnte gezeigt werden, dass kurze Peptidfragmente QKLVFF, LVFFA, LPFFD und FFVLK als Inhibitor der Aggregation des vollständigen A β -Peptids wirken. Es wird deutlich, dass die Aminosäure Phenylalanin sowohl in der Aggregation des vollständigen A β -Peptids eine wichtige Rolle spielt als auch die Bindung von kurzen inhibitorisch wirkenden Peptiden vermittelt. Sie treten signifikant häufig in amyloidogenen Kernsequenzen auf und sind wichtiger Bestandteil der Kernsequenz $_{17}\text{KLVFF}_{21}$ des A β -Peptids oder auch der Kernsequenz $_{22}\text{NFGAIL}_{27}$ des hIAPP (siehe Kapitel 2.3.4 *Die Rolle aromatischer Seitenketten*).^[91, 382] Ausgehend von der $_{17}\text{KLVFFAE}_{23}$ -Sequenz konnte aber auch mit dem Peptid QKLVTTAE gezeigt werden, dass der Austausch von Phenylalanin gegen Threonin die Bildung von amyloiden Fibrillen verhindert wird.^[383] Auf der Basis der amyloidogenen Kernsequenz des hIAPP $_{22}\text{NFGAILSS}_{29}$ konnte mit dem Peptid NYGAILSS gezeigt werden, dass der Austausch von Phenylalanin gegen Tyrosin die Bildung von Fibrillen verhindert. Das Peptid NYGAILSS war ebenfalls in der Lage, der Änderung in der Konformation von hIAPP entgegenzuwirken und die Bildung amyloider Fibrillen zu inhibieren.^[91] Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die aromatische Seitenkette von großer Bedeutung für die Bindung des Inhibitors an das amyloidogene Peptid oder Protein ist, sie jedoch durchaus durch Seitenketten mit einer höherer Polarität zur Optimierung der Eigenschaften des Inhibitors und unter Erhalt der inhibitorischen Wirkung ersetzt werden können.

Einführung der Aminosäure Prolin

Die Verwendung von Prolin in Kombination mit amyloidogenen Kernsequenzen führte zu einer Klasse von peptidbasierten Inhibitoren amyloider Aggregation, die als „ *β -sheet breaker*“ bezeichnet wird. Prolin „bricht“ die Sekundärstruktur. Es weist eine sehr starre Struktur auf, wobei die φ und ψ Winkel der Peptidbindung außerhalb des Bereichs für β -Faltblattstrukturen liegen. Zudem fehlt dem Prolin das Amid-Proton, wodurch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen, wie z.B. in β -Faltblattstrukturen, ausgeschlossen wird. Die Aminosäure Prolin wurde in zahlreichen *Scanning*-Studien verwendet, wobei die Aminosäuren systematisch gegen Prolin ausgetauscht werden, um den Einfluss auf die Aggregationstendenz zu untersuchen.^[73, 384-388] Der Austausch gegen Prolin führt an unterschiedlichen Positionen zur Reduktion der Aggregationstendenz, was den Schluss zulässt, dass diese Positionen für die Eigenschaft, amyloide Aggregate zu bilden, von Bedeutung sind.^[388] Hat der Austausch gegen Prolin nur geringen Einfluss auf die Aggregationstendenz bzw. führt er sogar zu einer Erhöhung, lässt dies auf unstrukturierte

Bereiche oder *turn*-Strukturen schließen. Die Ergebnisse dieser Studien lassen sich daher in Überlegung zur internen Struktur amyloider Fibrillen mit einbeziehen.^[73, 385, 387]

Auf der Basis der amyloiden Kernsequenz ${}_{17}\text{KLVFFAE}_{23}$ des $A\beta(1-40)$ Peptids wurde durch die Verwendung von Prolin ein Inhibitor mit Namen $iA\beta 5p$ und der Sequenz LPFFD

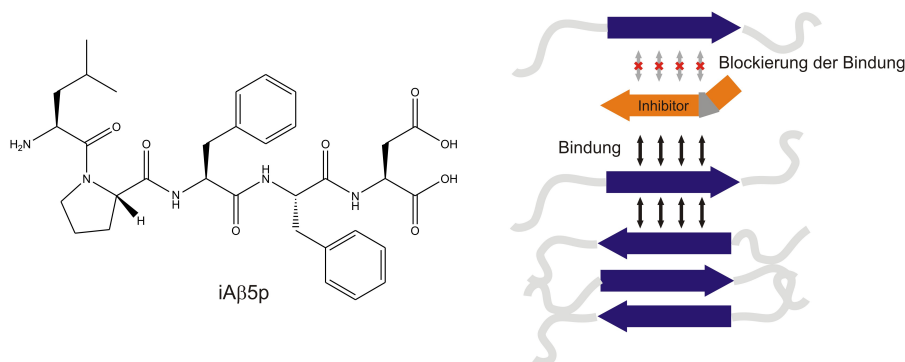


Abbildung 27: Die chemische Struktur vom Inhibitor $iA\beta 5p$ (links) und schematischer Mechanismus der Inhibition (rechts).

synthetisiert (Abbildung 27). Der Inhibitor $iA\beta 5p$ ist in der Lage, die Bildung von amyloiden Aggregaten von $A\beta(1-40)$ und von $A\beta(1-42)$ *in vitro* zu inhibieren und amyloide Ablagerung und Schäden im Gehirn von transgenen Alzheimer-Mäusen zu reduzieren.^[389, 390] MD-Simulationsstudien konnten zeigen, dass $iA\beta 5p$ die Hydrophobizität des C-Terminus von $A\beta(1-42)$ reduziert und die konformationelle Änderung zu β -Faltblattstrukturen inhibiert.^[391]

Der Austausch gegen D-Aminosäuren

Die Bildung von Amyloiden ist stereospezifisch, so dass ein D-Peptid im Fall der Bindung an Intermediate des Prozesses in der Lage ist, in gewisser Weise die Chiralität der amyloiden Spezies mit L-Konformation zu brechen und so die Aneinanderlagerung und Aggregation zu verhindern.^[63, 392] D-Peptide sind stabiler gegenüber Proteasen und weniger immunogen als die entsprechenden L-Enantiomere. Daher sind sie für den Einsatz *in vivo* besser geeignet. Chailfour *et al.* konnten zeigen, dass die D-Enantiomere der inhibitorisch wirkenden Peptide KLVFFA, KKLVFFA, KFVFFA, KIVFFA, und KVVFFA auf Basis der amyloiden Kernsequenz des $A\beta$ -Peptids sogar effektiver bezüglich der Inhibierung der Aggregation und der Reduzierung des Toxizität sind, als die entsprechenden L-Enantiomere.^[393] So gehört die Einführung von D-Enantiomeren zu den generellen Strategien zur Optimierung peptidbasierter Inhibitoren und spiegelt sich in vielen weiteren Ansätzen der Entwicklung peptidbasierter Inhibitoren in dieser Arbeit wieder.

6.3.3.2 Modifikation der Termini

Die amyloidogene Kernsequenz wird bei diesem Ansatz als Erkennungsdomäne verwendet, welche die Bindung des Inhibitors zur wachsenden Fibrille vermitteln soll. Modifikationen an den Termini der amyloidogenen Kernsequenz sollen die Bindung weiterer Monomere an die wachsende Fibrille verhindern.^[51] Die Modifikationen können dabei ihre Wirkung z.B. über sterische Effekte entfalten. Auf diese Weise können z.B. sperrige Gruppen die Aneinanderlagerung stören. Aber auch polare und geladene Gruppen können die Packung zur *cross-β*-Struktur verhindern und das Wachstum der Fibrille blockieren (Abbildung 28). Gleichzeitig erhöhen polare Gruppen die Löslichkeit des Inhibitors.

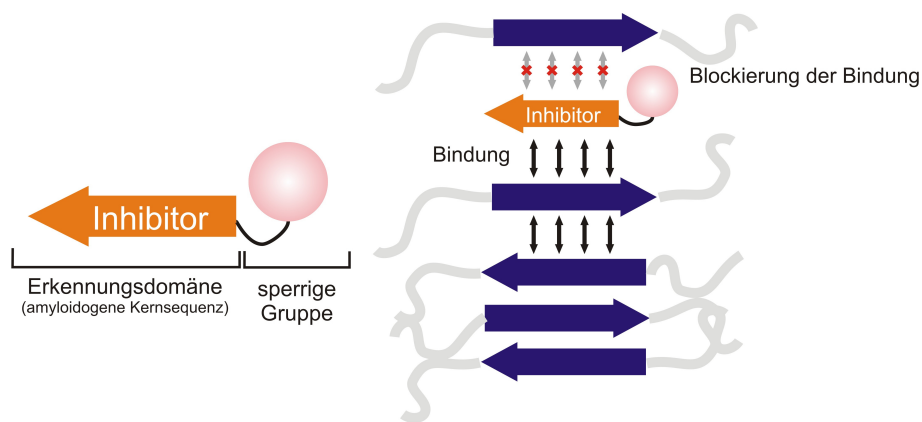


Abbildung 28: Prinzip der Wirkung von Inhibitoren, basierend auf der amyloiden Kernsequenz als Erkennungsdomäne mit terminalen Modifikationen.

Modifikationen des C-Terminus

In einer der ersten Arbeiten wurde die Oligolysin-Sequenz als geladene Gruppe verwendet. Ein Vergleich der Wirkung der Erkennungssequenz VFFAEDVG mit der Kombination aus Erkennungssequenz und Oligolysin-Sequenz am C- und N-Terminus zeigte, dass nur das Peptid GQKLVFFAEDVGGaKKKKKK mit der Oligolysin-Sequenz am C-Terminus die Aggregation im ThT Assay und Toxizität mit MTT Assay mit PC12 Zellen hemmt.^[394, 395] In folgenden Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Erkennungssequenz KLVFF in Kombination mit wenigstens drei Lysinresten oder aber auch Glutamat-Resten effektiv in der Reduzierung der Toxizität im Zell-Assay ist. Jedoch wurde die Aggregation des A β -Peptids selbst nicht verhindert.^[395] Die Ergebnisse wurden daher weiterhin kontrovers diskutiert und möglicherweise führte der MTT Assay mit dem Inhibitor zur falschen Schlussfolgerung.^[396] Neben der Einführung von geladenen Aminosäuren ist auch die PEGylierung eine Möglichkeit, die Eigenschaften eines peptidbasierten Inhibitors zu optimieren. Die PEGylierung ist eine etablierte Methode in der Herstellung von biopharmazeutischen

Wirkstoffen zur Verringerung der Immunogenität sowie zur Erhöhung der Proteasestabilität.^[397] Burkoth *et al.* beschrieben die Aggregation des Fragments des A β -Peptids A β (10-35), ergänzt durch eine PEG-Einheit am C-Terminus des Peptids.^[398] Das Peptid A β (10-35)-PEG₃₀₀₀ bildete trotz PEG-Einheit amyloide Fibrillen, nachgewiesen durch das Binden von Kongorot. Es bildeten sich jedoch strukturell verschiedene, stark unterschiedliche Fibrillen mit verlangsamer Kinetik im Vergleich zum A β (10-35) ohne PEG-Einheit.^[398] Die PEG-Einheiten des A β (10-35)-PEG₃₀₀₀ scheinen die einzelne Fibrille zu ummanteln und so die Wechselwirkung zwischen den Fibrillen zu verhindern. PEG-Einheiten alleine scheinen aber nicht in der Lage zu sein, die Aggregation vollständig zu verhindern, vielmehr zeigte sich, dass sie mitunter die Aggregation beschleunigen können.^[399]

Watanabe *et al.* verbanden das A β 16KLVFF₂₀ Motiv mit [2-[2-(Amino)-ethoxy]-ethoxy]-Essigsäure (AEEA).^[400] In einer weiteren Variation wurden zusätzliche zwei Aspartat-Reste zur Steigerung der Löslichkeit hinzugefügt (Abbildung 29). Im Gegensatz zu dem Peptid

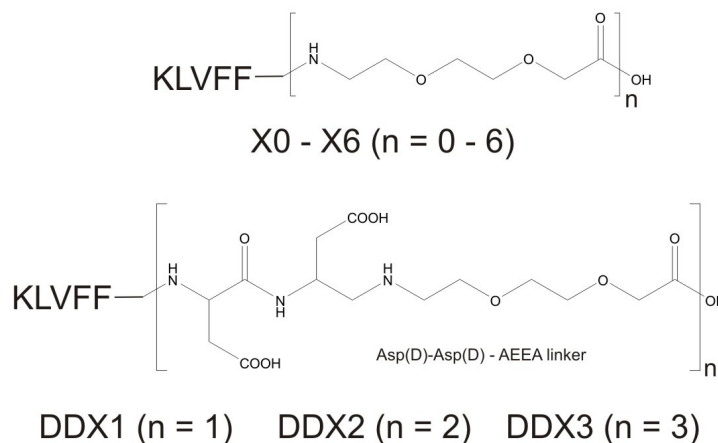


Abbildung 29: Strukturen der Inhibitoren (nach Lit.^[400]).

KLVFF-[K]₆^[401] zeigte gerade der Inhibitor KLVFF-DD-[AEEA-linker]₃, bezeichnet als DDX3, eine effektive Inhibierung der Aggregation von A β im ThT- und Kongorot-Assay.^[400] Darüber hinaus konnte eine reduzierte Toxizität in Gegenwart von DDX3 *in vitro* im MTT-Zell-Assay mit IMR-32 Neuroblastoma-Zellen nachgewiesen werden.^[400]

Modifikationen des N-Terminus

Eine ganze Reihe von N-terminalen Modifikationen von internen Fragmenten des A β -Peptids wurde von Findeis *et al.* untersucht.^[402] Der vielversprechendste Inhibitor dieser Studie war das Peptid Cholyl-LVFFA (PPI-368). Voraussetzung für die hohe Effektivität ist die Kombination der Cholyl-Komponente mit der 18LVFFA₂₂ Sequenz des A β -Peptids, da die

Cholyl-Komponente keine inhibitorische Wirkung und die ${}_{18}\text{LVFFA}_{22}$ Sequenz nur eine geringe Aktivität *in vitro* aufweisen. Der systematische Austausch der Aminosäuren der ${}_{18}\text{LVFFA}_{22}$ Sequenz gegen Alanin, der mit einem Verlust der Wirksamkeit verbunden ist, macht deutlich, dass die Bindung an $A\beta$ durch die Peptid-Komponente vermittelt wird.

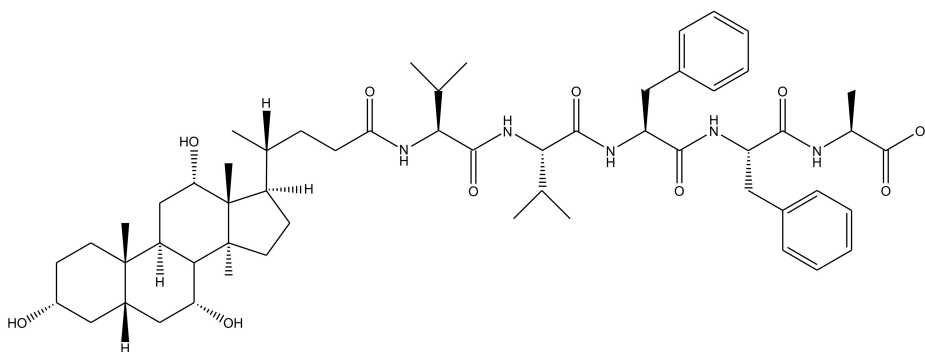


Abbildung 30: Chemische Struktur von Cholyl-LVFFA-OH nach Lit. ^[403].

Jedoch zeigte der Inhibitor eine verringerte Stabilität gegenüber Proteasen, was möglicherweise durch die Cholyl-Komponente, die Grundstruktur von Steroiden, begründet ist. Das entsprechende D-Peptid Cholyl-lvffa zeigte die gleiche Wirkung in der Inhibition der Aggregation, ist jedoch weit aus stabiler gegenüber Proteasen (Abbildung 30).^[402]

6.3.3.2.3 Modifikation des Peptidrückgrats

Wie bereits in der Beschreibung der Struktur amyloider Fibrillen erläutert (Kapitel 2 Struktur amyloider Fibrillen), interagieren die amyloidogenen Peptide in der *cross-β*-Struktur entlang der Fibrillenachse über Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Peptidketten. Senkrecht zur Fibrillenachse interagieren die Seitenketten der Aminosäuren miteinander. Die zuvor beschriebenen Strategien im rationalen Design peptidbasierter Inhibitoren konzentrieren sich hauptsächlich auf die Wechselwirkung der Seitenketten. Durch die nun folgenden Strategien sollen vor allen Dingen die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den β -Faltblattstrukturen verhindert werden. In der Entwicklung von Inhibitoren konzentriert man sich hierbei zumeist auf die Modifikation oder Substitution des Amid-Stickstoffs bzw. des α -Kohlenstoffs.

N-Alkylierung

Die Alkylierung des Amid-Stickstoffs entfaltet die inhibitorische Wirkung in verschiedener Art und Weise.^[51] Zunächst wird durch die Alkylierung (überwiegend Methylierung) am Amid-Stickstoff das Proton, welches stabilisierende Wasserstoffbrückenbindungen zwischen

den β -Faltblattstrukturen bildet, ersetzt. Zusätzlich wird die Aneinanderlagerung der Peptidstränge durch die im Vergleich zum Proton größere Alkyl- bzw. Methylgruppe aufgrund der sterischen Hinderung erschwert. Darüber hinaus fördert N-Alkylierung die Trans-Konformation, wodurch derartig modifizierte Peptide in eine sehr stabile β -Faltblatt-Konformation gezwungen werden und die Interaktion mit den β -Faltblattstrukturen amyloider Fibrillen ermöglicht wird.

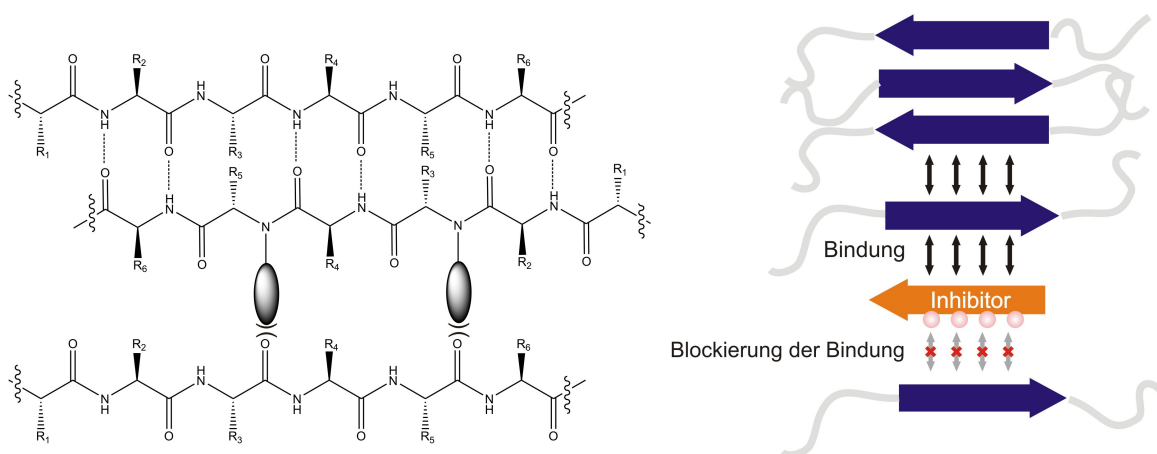


Abbildung 31: Design-Prinzip peptidbasierter N-alkylierter Inhibitoren (nach Lit.^[404]).

Hughes *et al.* synthetisierten $A\beta(20-35)$ Fragmente, wobei lediglich der Amid-Stickstoff einzelner Aminosäuren methyliert wurde und testeten sie als Inhibitoren der Aggregation des hoch toxischen $A\beta(20-35)$ -Fragments.^[405] Einige derartig modifizierte $A\beta(20-35)$ Fragmente, z.B. NMe-Leu34- $A\beta(20-35)$, waren nur in der Lage, die Morphologie der Fibrillen des $A\beta(20-35)$ zu verändern. Andere, wie z.B. NMe-Gly33- $A\beta(20-35)$, zeigten inhibitorische Wirkung und waren in der Lage, die Aggregation des $A\beta(20-35)$ -Fragments zu verhindern und die Toxizität in MTT-Assay mit PC12 Zellen zu reduzieren. Die Position der Methylierung ist somit sehr entscheidend für die inhibitorische Wirkung. So zeigten $A\beta(20-35)$ -Fragmente mit der Methylierung in der β -Faltblattdomäne den größten Effekt in der Inhibition der Aggregation. Ein ähnlicher Ansatz führte zu einem Inhibitor des amyloidogenen und toxischen α -Synuclein(68-78)-Fragments.^[406] NMe-Gly73- α -Synuclein(68-78) konnte in äquimolarer Mischung mit α -Synuclein(68-78) sowohl die Bildung der Fibrillen als auch die Toxizität reduzieren.

Madine *et al.* identifizierten mit Hilfe von ssNMR zunächst die Positionen 77-82 als die amyloidogene Kernsequenz von α -Synuclein und synthetisierten auf Basis dieser Sequenz

kurze, einfache N-methylierte Peptidsequenzen und testeten deren Wirkung als Inhibitoren der Aggregation des vollständigen α -Synucleins. Auch bei diesem Beispiel ist die Position der Methylierung entscheidend, da nur die Methylierung der C-terminalen Positionen der Peptidsequenz α -Synuclein(77-82) zu wirksamen Inhibitoren führte und nicht die Methylierung im N-terminalen Bereich.^[407]

Der nächste Entwicklungsschritt N-alkylierter Inhibitoren war die Verwendung N-methylierter Aminosäuren in alternierenden Positionen amyloider Kernsequenzen. Auf diese Weise werden die Methylgruppen nur auf einer Seite präsentiert und es entsteht ein zweiseitiger Inhibitor, wobei die Seite ohne Methylgruppen der Bindung an den β -Faltblattstrukturen der wachsenden Fibrille dient und die Seite mit Methylgruppen keine weitere Anlagerung von amyloidogenen Sequenzen erlaubt (Abbildung 31).^[51]

Meredith und Mitarbeiter wendeten diese Strategie auf die amyloidogene Kernsequenz A β (16-22) an.^[408, 409] Die mit dieser Strategie synthetisierten Verbindungen inhibierten die Aggregation von A β (1-40). Darüber waren die Inhibitoren auch in der Lage, bereits gebildete Fibrillen von A β (1-40) aufzulösen. MD-Simulationen konnten einen Einblick in den Mechanismus der Inhibition der Aggregation durch den N-methylierten Inhibitor Ac-K-(N-Me-)LV(N-Me-)FF-NH₂ bei Protofilamenten einer verkürzten Modellsequenz A β (16-22) geben.^[410] Nach diese Studie interagieren N-methylierte Inhibitoren sowohl mit der Wachstumsseite der Protofibrille als auch lateral, wodurch sowohl das Wachstum als auch die laterale Aneinanderlagerung verhindert wird. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass N-methylierte Inhibitoren in die Struktur der Protofibrille eindringen und zur Abspaltung von A β (16-22) führen.

In der Arbeitsgruppe von A.J. Doig wurde eine Reihe von verschiedenen N-methylierten peptidbasierten Inhibitoren gegen A β (1-42) basierend auf der amyloiden Kernsequenz ₁₆KL₂₀VFF entwickelt und getestet. Es wurden ausführlich verschiedene Parameter des Inhibitors getestet. Dazu gehören die Peptidlänge, Position der N-Methylierung, Acetylierung und Amidierung des N- und C-Terminus sowie verschiedene Seitenketten und Chiralität.^[411] Nach diesen Ergebnissen sollte der Inhibitor vollständig D-chiral sein und einen freien N-Terminus, einen amidierten C-Terminus und große verzweigte hydrophobe Seitenketten an den ersten vier Positionen besitzen. Die fünfte Position erschien als weniger wichtig. Der effektivste Inhibitor war das D-Peptid SEN304, chG-Y-chG-chG-(N-Me)L-NH₂, wo schließlich jede Seitenkette verändert und die Chiralität umgekehrt wurde (Abbildung 32). Auch die besten Inhibitoren in dieser Studie führten immer noch nur zur einer 60%igen Reduzierung der ThT-Fluoreszenz und die Morphologie der Fibrillen wurde in vielen Fällen,

auch bei SEN304, lediglich verändert. Jedoch wurde die Toxizität von A β (1-42) im MTT-Zelltest reduziert. Die Autoren diskutierten einen Mechanismus, nach dem SEN304 und

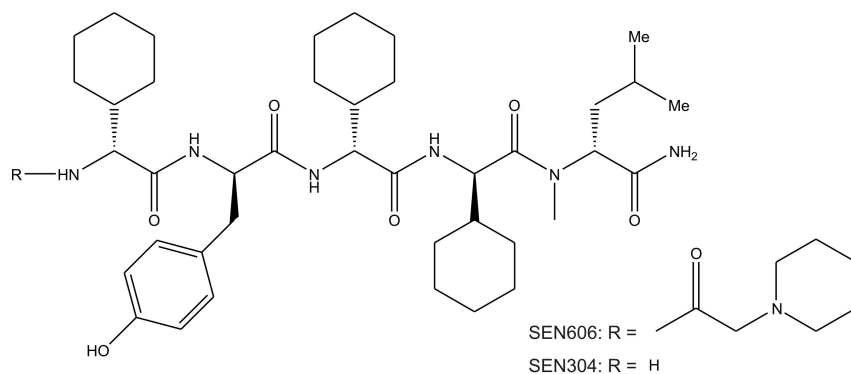


Abbildung 32: Struktur der N-methylierten Inhibitoren SEN304, und SEN606.

andere Inhibitoren an toxische Oligomere binden und die Aggregation von anderen, nicht-toxischen Fibrillen, an denen ThT nur schwach bindet, fördert. In einer Weiterentwicklung von SEN304, dem Inhibitor SEN606, wurde der N-Terminus modifiziert. SEN606 erwies sich als ein effektiver Inhibitor bei nanomolarer Konzentrationen und besitzt ein noch größeres Potential für die Entwicklung eines therapeutischen Ansatzes.^[411, 412]

In einer weiteren Studie wurde der Ansatz der N-Alkylierung erfolgreich zur Inhibierung von hIAPP genutzt. Zunächst wurde ebenfalls von der amyloidogenen Kernsequenz $_{22}\text{NFGAIL}_{27}$ des hIAPP ausgegangen und N-methylierte Analoga von Glycin und Isoleucin eingefügt. Das synthetisierte Hexapeptid NF-(N-Me)-GA(N-Me)-IL bindet mit einer hohen Affinität an hIAPP, ist jedoch nicht in der Lage, die Aggregation von IAPP vollständig zu inhibieren.^{[413-}

^{415]} In einem weiteren Ansatz synthetisierte die Arbeitsgruppe von Kapurnitou das Peptid IAPP-GI mit der Primärstruktur von hIAPP, wobei für Position 24 und an Position 26 innerhalb der amyloidogenen Kernsequenz $_{22}\text{NFGAIL}_{27}$ ebenfalls N-methylierte Analoga von Glycin und Isoleucin eingefügt wurden. Dies erhöhte die Löslichkeit von IAPP-GI um das 100fache, reduzierte deutlich die amyloidogene Aggregationstendenz und führte zum Verlust der toxischen Eigenschaften im Vergleich zu hIAPP. Darüber hinaus führte dies zu einer 10fachen Erhöhung der Affinität im Vergleich zum vorher beschriebenen N-methylierten Hexapeptid. IAPP-GI ist im Gegensatz zum Hexapeptid in der Lage, die Aggregation von hIAPP vollständig mit hoher Effektivität zu inhibieren. Dies gilt gleichermaßen für die Phasen vor und nach der Nukleation. Selbst bereits gebildete Fibrillen von hIAPP lassen sich mit diesem Inhibitor wieder auflösen. Bezüglich des Mechanismus der Inhibition gehen die Autoren davon aus, dass IAPP-GI aufgrund der hohen Affinität an verschiedene Spezies, d.h.

nicht-toxische und toxische Oligomere, bindet und durch kinetische Stabilisierung das Gleichgewicht in Richtung nicht-toxischer Oligomere verschiebt.^[416]

Diese Klasse von peptidbasierten Inhibitoren zeigt eine ganze Reihe von für ihre intendierte Aufgabe günstigen Eigenschaften. Die CD-Spektren zeigen ein einziges Minimum, das im Vergleich zu Peptiden in β -Faltblattkonformation (218 nm) etwas in Richtung höherer Wellenlängen verschoben ist (225-226nm). Das Spektrum ist in einem Temperaturbereich von 0° bis 90°, in einem pH-Bereich von 2-11 und selbst bis zu einer Harnstoff-Konzentration von 8 M stabil. Sie sind sehr gut löslich in wässrigen Medien und bilden selbst keine größeren Aggregate oder Fibrillen.^[408] Darüber hinaus sind sie aber auch in organischen Lösungsmitteln, wie DMSO, DCM oder DMF, sehr gut löslich. Sie vermögen durch eine Doppellipidmembran zu diffundieren, wie man an POPC-Vesikeln und COS-Zellen zeigen konnte^[409] und zeigen eine größere Stabilität gegenüber Proteasen.^[417]

Die positiven Ergebnisse der *in vitro*-Studien und die pharmakologisch vielversprechenden Eigenschaften N-methylierter Inhibitoren ermutigten zu Tests der Wirksamkeit in einem *in vivo*-System. Die Applikationen des Inhibitors Ac-K-(N-Me)-LV(N-Me)-FF(N-Me)-AE-NH₂ in APP transgenen Mäusen, die das Vorläuferprotein des A β -Peptids exprimieren und an Alzheimer erkranken, führten jedoch zu einem Anstieg der amyloiden Aggregate im Gehirn der Mäuse. Möglicherweise führte der Inhibitor zu Veränderung der Zellumgebung der Nervenzellen bzw. veränderte den Prozess der A β -Produktion.^[418] Die enttäuschenden Ergebnisse machen deutlich, dass weitere Entwicklungsarbeit notwendig ist und wie wichtig die Evaluation der Wirkung *in vivo* ist.

Peptoide

Durch die Verschiebung der Seitenketten der Aminosäuren am α -Kohlenstoff um eine Position im Peptidrückgrat auf das Stickstoffatom, erhält man Polymere mit N-substituierten Glycinen. Diese Strukturen werden als Peptoide bezeichnet und zeigen für die Verwendung in der Pharmazie günstige Eigenschaften. Dazu gehören Stabilität gegenüber Proteasen, hohe Variabilität der funktionellen Gruppen, die einfache chemische Synthese (SPPS) sowie hohe

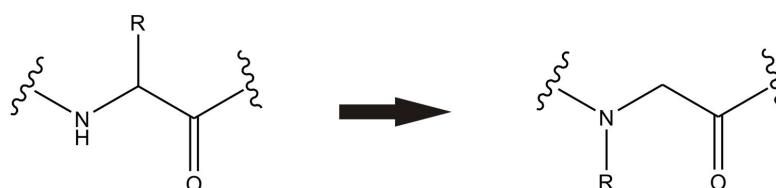


Abbildung 33: Vergleich der Ausschnitte von einer Peptid- und einer Peptoidkette.

Flexibilität und ein damit verbundener variabler Konformationsraum ohne zusätzliche Einschränkung durch die Chiralität am α -C-Atom.^[193, 419] Peptide lassen sich als Inhibitoren der Aggregation amyloider Fibrillen verwenden, da durch sterische Hinderung als auch durch die Eliminierung des wichtigsten Donors für die Ausbildung von Wasserstoffbrücken die charakteristischen intermolekularen Wechselwirkungen zwischen den β -Faltblattstrukturen gestört werden.^[420]

Ein erstes Beispiel für einen Inhibitor mit Peptidcharakter gegen die Bildung von amyloiden Fibrillen wurde von Rijkers *et al.* beschrieben.^[404] Hier wurde ein N-butylierter Serinrest an die Position 28 der erweiterten amyloiden Kernsequenz des hIAPP(20-29) eingeführt. Der Inhibitor mit der Sequenz $\text{NH}_2\text{-SNNFGAIL-nButS-S-CONH}_2$ bildet zwar selbst unstrukturierte Aggregate, wie EM-Untersuchungen zeigen, jedoch wurden die Aggregation IAPP inhibiert. In darauf folgenden Arbeiten wurde die hoch amyloidogene Sequenz hIAPP(20-29) vollständig in das entsprechende Peptoid überführt und weiter in ein *retro*-Peptoid, wobei die relative Orientierung der Carbonyl-Funktionen gegenüber den Seitenketten im Vergleich zur Peptidsequenz gewahrt bleibt.^[420] Die dem hIAPP(20-29) entsprechende Peptoid-Sequenz bildete keine amyloiden Aggregate und war in der Lage, die Aggregation des hIAPP(20-29) in einer äquimolaren Mischung zu inhibieren. Das *retro*-Peptoid bildete trotz fehlender Donatoren für Wasserstoffbrückenbindung selbst nicht-amyloidogene bänderartige Aggregate. Die Tendenz wurde auf die der amyloidogenen Sequenz vergleichbaren Orientierung der Carbonyl-Funktion relativ zu den Seitenketten zurückgeführt. Das *retro*-Peptoid zeigte eine geringere inhibitorische Wirkung, was möglicherweise auf die Aggregationstendenz des *retro*-Peptoids zurückgeführt werden kann. Diese Arbeiten zeigen, dass Peptide das Potential als Inhibitoren der amyloiden Aggregation besitzen und synthetisch zugänglich sind.^[420-422]

Austausch der Peptid-Bindung gegen Ester- und Olefinbindung

Eine weitere Möglichkeit der Inhibition der Aggregation ist die Vermeidung der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindung des Peptidrückgrats. Verschiedene Arbeiten setzten diesen Ansatz durch die Einführung von Esterbindung und Olefinbindung anstelle der Peptidbindung um. Die Esterbindung führt zur Eliminierung des Donors und Schwächung des Akzeptors von Wasserstoffbrückenbindungen, wohingegen die Olefinbindung zur Eliminierung des Akzeptors und des Donors führt (siehe Abbildung 34). Gordon und Meredith synthetisierten auf der Basis der amyloiden Kernsequenz A β (16-20), ähnlich wie beim N-methylierten Inhibitor Ac-K₁₆-(Me)L₁₇-V₁₈-(Me)F₁₉-F₂₀-NH₂, ein Depsi-Peptid mit Esterbindungen in

alternierenden Positionen.^[424] Dieses Peptid zeigte ähnlich zu den N-methylierten Beispielen eine gute Löslichkeit in Wasser und bildet keine Fibrillen. ThT Assay und EM-Studien zeigten eine vergleichbare inhibitorische Wirkung gegen die Bildung amyloider Fibrillen. Es konnte aber auch gezeigt werden, dass die Esterbindung erwartbar labil gegenüber Basen ist. Innerhalb von 24 h wurde die Esterbindung bei einem schwach basischen pH-Wert von 7.4 hydrolysiert. Man nimmt an, dass ein solcher Inhibitor über die fehlende Möglichkeit zur Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen seine Wirkung entfaltet.

Bieschke *et al.* modifizierte das Peptidrückgrat des A β (1-40) Peptids zwischen den Phenylalaninresten an den Positionen 19 und 20 innerhalb der amyloiden Kernsequenz zu einer Esterbindung, wodurch die Amino-Funktion als Donor eliminiert und die Carbonyl-Funktion als Akzeptor im Vergleich zu Peptidbindung geschwächt wird, sowie zu einer Olefinbindung, was sowohl Donor als auch Akzeptor der Wasserstoffbrücken eliminiert.^[423, 425, 426] Der Austausch der Peptidbindung gegen eine Esterbindung führte lediglich zu einer Reduktion der Geschwindigkeit der Aggregation. Die Einführung der Olefinbindung in das A β (1-40) dagegen verhinderte die Bildung von Fibrillen, führte jedoch zur Bildung amorpher Aggregaten, welche die Autoren auf eine Störung der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zurückführen.^[423, 425, 426] Diese amorphen Aggregate waren

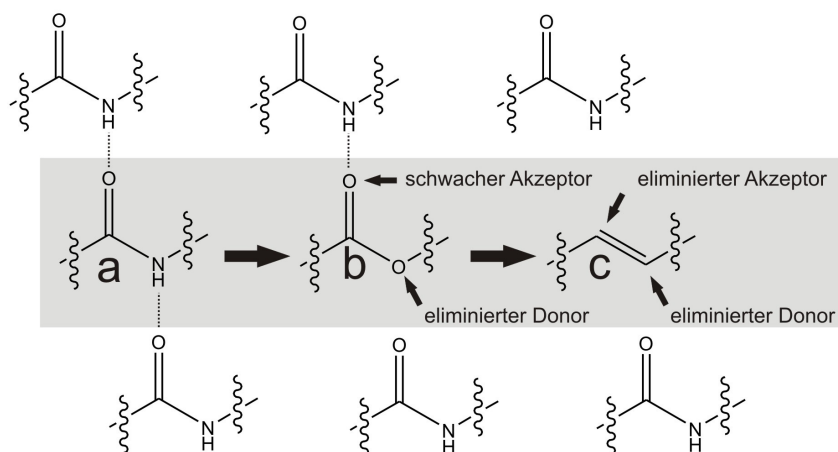


Abbildung 34: Modifikationen des Peptidrückgrats zur Verhinderung von Wasserstoffbrückenbindungen, a) Peptidbindung b) Esterbindung c) Olefinbindung (nach Lit.^[423]).

jedoch in der Lage, die Fibrillenbildung des unveränderten A β (1-40) Peptids zu induzieren. Alle veränderten A β (1-40) Peptide waren im PC12-Zelltest toxisch innerhalb einer Inkubationszeit von 18 Stunden, was darauf hindeutet, dass es möglicherweise eine gemeinsame toxische Quartärstruktur gibt, welche die Grundlage für die Toxizität bildet.^[423] Zusammenfassend lässt sich sagen, dass derartige Veränderungen im Peptidrückgrat die

Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindung stören und den Prozess der Aggregation zu amyloiden Fibrillen verändern. Jedoch wurde dieses Konzept über die hier beschriebenen Arbeiten hinaus in der Entwicklung peptidbasierter Inhibitoren meines Wissens nicht mehr weiterverfolgt.

Verwendung von α,α -disubstituierte Aminosäuren

Peptidbasierte Inhibitoren mit einer zusätzlichen Seitenkette am α -C-Atom der Peptidbindung entfalten ihre Wirkung durch sterische Effekte und durch die Begrenzung des Konformationsraums. Eine ganze Reihe peptidbasierter Inhibitoren verwenden α -Aminoisobuttersäure (kurz: Aib, 2-Methylalanin) im Austausch gegen die Aminosäuren

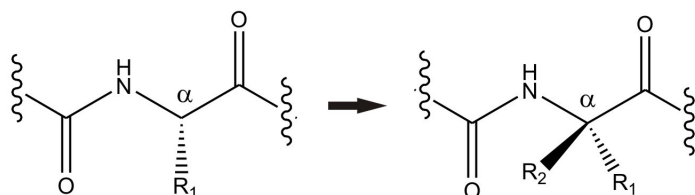


Abbildung 35: Modifikation des α -Kohlenstoffs.

Alanin und Leucin.^[51] Der Einfluss von Aib auf die Konformation wurde anhand einer Reihe von Modellpeptiden studiert. Aib besitzt eine große Tendenz zur α -helikalen Helix und verhält sich wie die Aminosäure Prolin als Sekundärstrukturbrecher bezüglich β -Faltblattstrukturen.^[427-430] Zwar besitzen Alanin und Leucin ebenfalls eine hohe Helix-Propensität, jedoch sind die Torsionswinkel φ und ψ im Fall von Aib noch stärker auf den α -helikalen Bereich beschränkt.

Auf der Basis der amyloidogenen Kernsequenz des hIAPP $_{13}\text{ANFLVHSS}_{20}$ wurde eine Reihe von peptidbasierten Inhibitoren synthetisiert, wobei Alanin und Leucin gegen Aib ausgetauscht wurden.^[431] Dazu gehörten die Sequenzen Aib-NF-Aib-VHSS, Aib-NF-Aib-VH sowie Aib-NF-Aib-V. Das Peptid Aib-NF-Aib-VH zeigte den größten inhibitorischen Effekt auf die Aggregation von hIAPP. Die Wirkung ist jedoch vergleichbar mit den bisher schon beschriebenen Strategien zur Darstellung peptidbasierter Inhibitoren. Die Autoren schlagen abschließend in ihrer Arbeit vor, die sekundärstrukturbrechenden Eigenschaften von Aib mit aromatischen Aminosäuren mit kurzen peptidbasierten Inhibitoren zu kombinieren, da gerade aromatische Aminosäuren in der Bildung von amyloiden Aggregaten eine entscheidende Rolle spielen (Kapitel 2.3.4 *Die Rolle aromatischer Seitenketten*).^[382, 431, 432] In weiteren Studien der Arbeitsgruppe von Gazit wurde aufbauend auf diesem Konzept die Wirkung von D-Trp-Aib-OH untersucht.^[433] Dieses Peptid stellt eine Kombination aus einem

Indol zur Bindung an aromatischen Seitenketten von $A\beta$ ^[434] und der Aminosäure Aib zur Störung der β -Faltblattstruktur dar. Dieses Dipeptid hat bezüglich des pharmakologischen Einsatzes einige günstige Eigenschaften. Dazu gehören die geringe Größe, eine gute Löslichkeit, eine hohe metabolische und chemische Stabilität sowie die Möglichkeit der

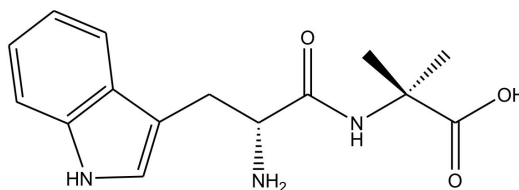


Abbildung 36: Struktur des Inhibitors D-Trp-Aib-OH.

oralen Applikation und eine geringe Toxizität.^[433] Mit Hilfe eines speziellen Protokolls^[435] zur Isolierung von Oligomeren des vollständigen $A\beta$ -Peptids konnte gezeigt werden, dass D-Trp-Aib-OH die Bildung von toxischen Oligomeren verhindert und frühe nicht-toxische Oligomere stabilisiert. Die Reduzierung der Toxizität konnte im MTT-Zell-Assay mit PC12 Zellen gezeigt werden. Die durch das Design intendierte Bindung an die zentrale aromatische Region des $A\beta$ -Peptids konnte durch NMR-Studien bestätigt werden. Die Bindung beruht hierbei auf hydrophoben Wechselwirkungen zwischen D-Trp-Aib-OH und den mit Phenylalanin besetzten Positionen 19 und 20 des $A\beta$ -Peptids.^[433] Der Inhibitor wurde schließlich noch *in vivo* an einer transgenen Maus getestet, die das Vorläuferprotein des humanen $A\beta$ -Peptids, hAPP, überexprimiert. Es konnte eine signifikante Reduzierung von amyloiden Ablagerungen und eine verbesserte kognitive Leistung der mit D-Trp-Aib-OH behandelten Mäuse festgestellt werden. In den folgenden Untersuchungen wurden α,α -disubstituierte Aminosäuren in alternierenden Positionen (i, i+2, i+4) in amyloide Kernsequenzen $A\beta$ (16-21) eingeführt, so dass sie in β -Faltblattkonformation ausschließlich auf einer Seite präsentiert werden und durch sterische Hinderung die weitere Anlagerung von amyloidogenen Sequenzen verhindern.^[418, 436, 437]

Wie zuvor beschrieben, ist bereits eine zusätzliche Methylgruppe am α -C-Atom ausreichend, um β -Faltblattstrukturen zu brechen. Etienne *et al.* verwendeten α,α -disubstituierte Aminosäuren mit größeren Seitenketten, die wiederum eine gestreckte Konformation bevorzugen, in der Annahme, eine gute Affinität des Inhibitors zu den β -Faltblattstrukturen bei gleichzeitiger Inhibition der Aggregation zu erreichen.^[438] In TEM- und SFM-Studien konnte man zeigen, dass der Inhibitor AMY1 die Aggregation von $A\beta$ bei äquimolarer Mischung vollständig blockieren kann. Selbst bei fünfzigfachem Überschuss an $A\beta$ wurden nur wenige amyloide Aggregate beobachtet.^[436] In der Arbeit von Bett *et al.* wurden

aufbauend auf den Inhibitor AMY1 beim Inhibitor AAMP sowohl Anzahl als auch Position der α,α -disubstituierten Aminosäuren variiert.^[437] Grundsätzlich, so konnte herausgefunden werden, ist die Wechselwirkung zwischen den Seitenketten bedeutend für die Inhibition,

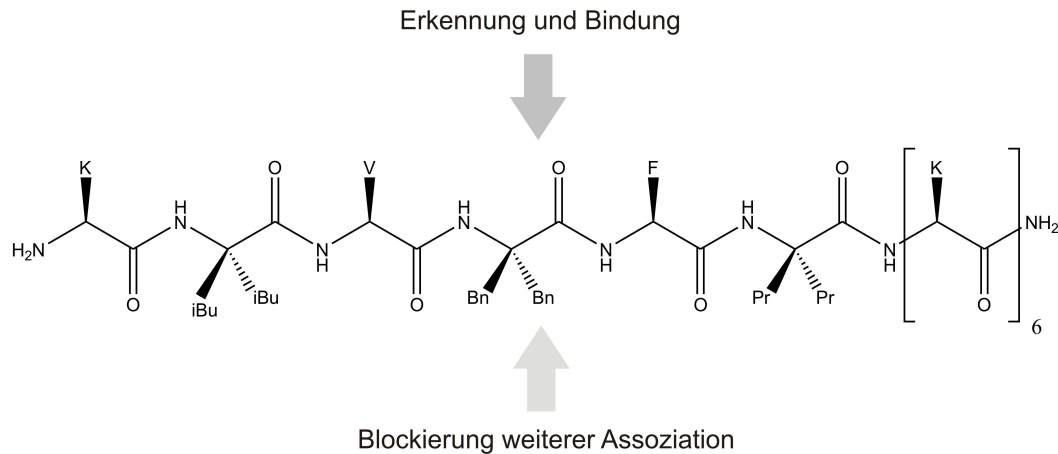


Abbildung 37: Struktur des Inhibitors AAMP-1 mit α,α -Disubstitution in alternierenden Positionen, so dass sie nur auf einer Seite des Inhibitors präsentiert werden und die Assoziation weitere Peptidstränge blockiert (nach Lit.^[437]).

wobei aber eine α,α -disubstituierte Aminosäure genauso effektiv ist wie zwei oder drei. Das Molekulargewicht kann also möglicherweise reduziert werden, um die Bioverfügbarkeit zu verbessern, wie beim zuvor beschriebenen Beispiel D-Trp-Aib-OH der Arbeitsgruppe Gazit. Die vielversprechenden Ergebnisse gaben Anlass, die Inhibitoren auch *in vivo* zu testen.^[418] Tests zur Effektivität des Inhibitors mit APP transgenen Mäusen zeigten einen leichten Trend zur Reduzierung von amyloiden Aggregaten im Gehirn der Mäuse. Höhere Konzentrationen des Inhibitors zeigten jedoch toxische Wirkung.

Verwendung von β - und γ -Aminosäuren

Eine weitere Möglichkeit, das Peptidrückgrat zu verändern und so die hydrophobe Wechselwirkung oder die Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen zu verhindern, ist die Verwendung von β - bzw. γ -Aminosäuren. Auf diese Weise wird das Peptidrückgrat um ein oder zwei Methyleinheiten verlängert (Abbildung 38), wodurch möglicherweise das charakteristische Muster der Wasserstoffbrückenbindung in der β -Faltblattstruktur gestört, aber auch nicht völlig unterbunden wird, so dass eine Bindung an die Zielstruktur immer noch möglich ist. Der Einbau wirkt sich auch auf die Struktur der Peptide aus. So erhöht sich z.B. durch den Einbau von β -Aminosäuren die Tendenz der Peptide zur Bildung α -helikaler Strukturen.^[439, 440] Darüber hinaus erhöht sich die Stabilität gegenüber Proteasen.^[440, 441]

Madine *et al.* konnten mit Hilfe von ssNMR die amyloidogene Kernsequenz ${}_{77}\text{VAQTV}_{82}$ innerhalb des α -Synucleins identifizieren und bereits erfolgreich für die Synthese von N-methylierten Analoga als Inhibitoren der Aggregation des α -Synucleins verwenden.^[407] In einer weiteren Studie wurden verschiedene Analoga der Kernsequenz ${}_{77}\text{VAQTV}_{82}$ durch den Austausch von Alanin durch β -Alanin oder γ -Aminobuttersäure hergestellt und ebenfalls als

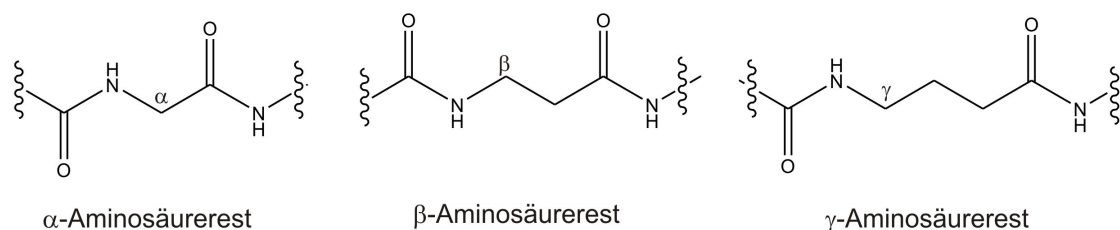


Abbildung 38: Struktur von α -, β - und γ -Aminosäureresten zur Verdeutlichung der Ausdehnung des Peptidrückgrats.

Inhibitoren der Aggregation des vollständigen amyloidogenen Proteins α -Synuclein getestet.^[442] Da gerade im Hinblick auf die therapeutische Anwendung und die Verwendung als pharmazeutischer Wirkstoff die Größe sehr wichtig ist, wurden ebenfalls noch kürzere Varianten hergestellt. Schließlich identifizierte man zwei Peptidtrimere, die β -Alanin anstelle von Alanin enthielten und die in der Lage waren, die Aggregation von α -Synuclein zu inhibieren. Das Peptidtrimer (β -Ala)QK ist darüber hinaus gegen die Aggregation von $A\beta(1-40)$ und Amylin wirksam.^[442]

Castelletto *et al.* veränderten die amyloide Kernsequenz ${}_{17}\text{KLVFF}_{21}$ des $A\beta$ -Peptides durch die N-terminale Addition von zwei β -Alaninresten. Die Aggregation dieses Peptids selbst wurde nicht inhibiert, aber die Struktur der Aggregate wurde stark verändert.^[443, 444] Dieses Peptid aggregierte zu helikalen Bändern, die alle Charakteristika amyloider Aggregate aufzeigten. In einer weiterführenden Studie wurde das $\beta A\beta A$ -KLVFF Peptid als Inhibitor der Aggregation des $A\beta(1-42)$ Peptids getestet. Es konnte gezeigt werden, dass $\beta A\beta A$ -KLVFF an $A\beta(1-42)$ bindet und die Morphologie der Aggregate zu kurzen Ketten verändert. Der Thioflavin-T-Assay deutet jedoch auf eine gesteigerte Aggregation in Gegenwart von $\beta A\beta A$ -KLVFF hin und die Toxizität im MTT-Zell-Assay konnte nicht reduziert werden. Man kommt zu dem Schluss, dass $\beta A\beta A$ -KLVFF zwar die Aggregation zu den typischen langen Fibrillen blockiert, jedoch nicht die Bildung toxischer Aggregate verhindert.^[445] Dieser Ansatz in der Entwicklung peptidbasierter Inhibitoren wurde in der nächsten Studie durch die Verwendung von verschiedenen γ -Aminosäuren und von vollständig aus D-Aminosäuren bestehender KLVFF-Sequenz erweitert und an $A\beta(1-42)$ getestet.^[446] In Übereinstimmung mit

den zuvor gemachten Studien führte das entsprechende Peptid $\beta\beta\text{A-klvff}$ sowie das mit γ -Aminobuttersäure modifizierte klvff -Peptid ebenfalls nicht zu einer Reduzierung der Zelltoxizität. Analoga mit jeweils zwei γ -Aminosäuren mit Phenylalanin-, Tyrosin- und Leucinseitenketten am γ -C-Atom waren dagegen erfolgreich in der Reduzierung der Toxizität im MTT-Zell-Assay, wobei die Verbindung mit 2 [(R)-(4-amino-5-phenyl)]pentanoyl-Resten am D-Peptid klvff (Abbildung 39) den stärksten positiven Effekt auf die Viabilität der Zellen

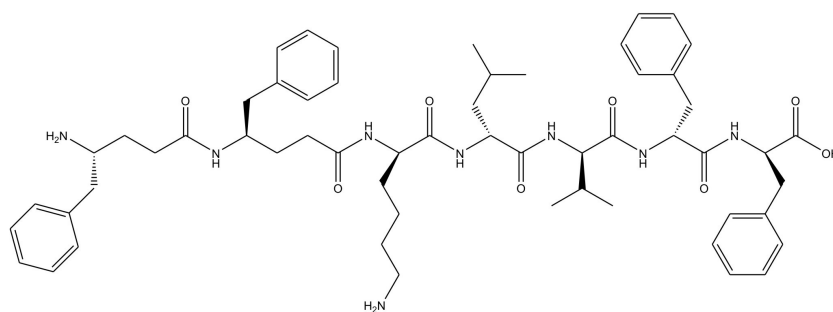


Abbildung 39: $\text{A}\beta(1-42)$ Inhibitor, bestehend aus dem D-Peptid klvff mit zwei N-terminal gekuppelten γ -Aminosäuren ([[(R)-(4-amino-5-phenyl)]pentanoyl-Rest).

hatte. Jedoch bilden diese Verbindungen allein fibrilläre Aggregate, die im MTT-Zell-Assay keine toxische Wirkung zeigen. Die Verbindung mit der größten Wirkung zeigte die stärkste Aggregationstendenz zu Fibrillen mit β -Faltblattstruktur, wobei in Strukturuntersuchungen mit Röntgenbeugung die γ -Aminosäure mit dem [(R)-(4-amino-5-phenyl)]pentanoyl-Rest im Gegensatz zu den anderen zwei Verbindungen nicht das charakteristische Muster der Wasserstoffbrückenbindungen einer β -Faltblattstruktur zu stören scheint, was dem generellen Konzept widerspricht.^[446] Möglicherweise ist jedoch die Wirkung dieser Verbindung nur auf diese besonderen Eigenschaften dieser Verbindung zurückzuführen. Schließlich muss noch bemerkt werden, dass die Aggregationstendenz des Inhibitors aus pharmakologischer Sicht eher von Nachteil ist, jedoch sind *in vivo*-Experimente noch abzuwarten.

6.3.3.2.4 Zyklisierung von Peptiden

Durch die Zyklisierung von Peptiden lässt sich dem wesentlichen Nachteil der medizinischen Anwendung von peptidbasierten Inhibitoren, der geringen metabolischen Stabilität, entgegenwirken.^[51]

Kapurnitou *et al.* synthetisierten ein zyklisches $\text{A}\beta(1-28)$ Analogon mit einer kovalenten Bindung zwischen dem Lysin an Position 17, das gegenüber der Sequenz $\text{A}\beta(1-28)$ gegen ein Leucin ausgetauscht worden ist, und dem Aspartat an Position 21. Das zyklisierte $[\text{Lys}_{17}\text{-Asp}_{21}]\text{A}\beta(1-28)$ bildet im Gegensatz zu $\text{A}\beta(1-28)$ keine Fibrillen und inhibiert die

Fibrillenbildung von $A\beta(1-28)$ und $A\beta(1-40)$. Die Zyklisierung durch die kovalente Verbindung zwischen Lys17 und Asp21 entspricht einer Bindung zwischen der Position i und $i+4$, was die Bildung helikaler Strukturen fördert. CD Spektroskopie-Studien zeigen eindeutig eine Steigerung der helikalen Propensität des zyklisierten $[Lys_{17}-Asp_{21}]A\beta(1-28)$ gegenüber dem $A\beta(1-28)$. Diese Eigenschaft scheint für die inhibitorische Wirkung sehr entscheidend zu sein, denn im Vergleich dazu führte ein früherer Zyklisierungsansatz zwischen Asp₂₃ und Lys₂₈ im $A\beta(1-40)$ zu einer beschleunigten Aggregation^[447], so dass man nicht schließen kann, dass generell eine Zyklisierung einer amyloidogenen Peptidsequenz zum entsprechenden Inhibitor führt.

In einem weiteren Ansatz wurde das Peptid LPFFD, das *in vitro* die Aggregation des $A\beta$ -Peptids inhibiert^[390], durch Einführung von Cystein am N- und C-Terminus und der anschließenden Bildung von Disulfidbrücken ebenfalls zyklisiert. Jedoch verlor die Sequenz ihre inhibitorische Wirkung.^[417]

James S. Nowick synthetisierte auf der Basis der amyloiden Kernsequenz ${}_{306}VQIVYK_{311}$ des Tau-Proteins verschiedene makrozyklische peptidbasierte Inhibitoren mit β -Faltblattstruktur, um zum einen die Aggregation der amyloiden Kernsequenz zu untersuchen und zum anderen die Aggregation zu inhibieren.^[448] Er verwendete nicht das vollständige Tau-Protein, sondern ein auf die amyloide Kernsequenz verkürztes Modell-Peptid Ac-VQIVYK-NH₂ (AcPHF6). Zengh *et al.* synthetisierten verschiedene Makrozyklen, bestehend aus einem Pentapeptid (R1-R5) im oberen Strang und einem Templat Hao und zwei weiteren Aminosäuren (R6, R7) im unteren Strang.^[448] Das Templat Hao bildet einen Ersatz für drei Aminosäurereste im unteren Strang, das als Templat für die Faltung des oberen Stranges dient und gleichzeitig die

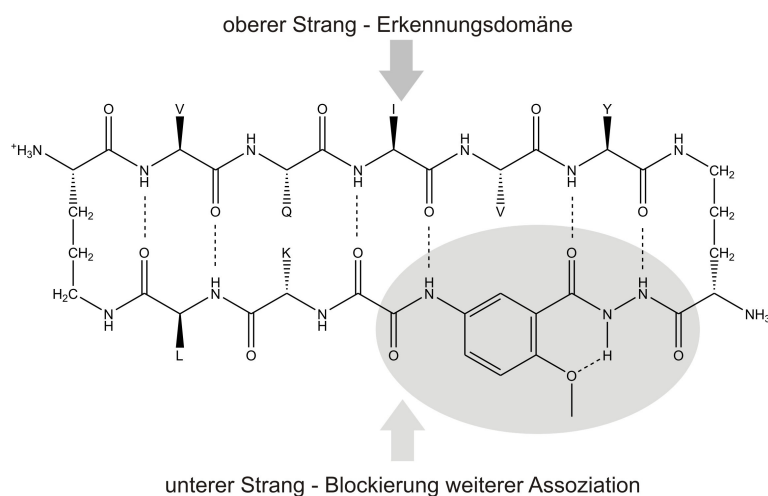


Abbildung 40: Struktur des Makrozyklus VQIVY-KL. Das Hao-Templat ist grau unterlegt (nach Lit.^[448]).

Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen am unteren Strang und damit die Assoziation weiterer Peptidstränge unterbindet. Der untere und obere Strang sind über Aminofunktion am δ -C-Atom des Ornithins miteinander verbunden, die eine β -turn-Struktur imitieren. Zheng *et al.* verwendeten die Pentapeptide ${}_{306}\text{VQIVY}_{310}$ und ${}_{307}\text{QIVYK}_{311}$ für den oberen Strang, der die Erkennungsdomäne bildet. Das Hao-Templat im unteren Strang blockiert die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen und die weitere Assoziation.

Die Aminosäuren im unteren Strang erlauben die Veränderung der Löslichkeit des gesamten Moleküls. *In vitro*-Tests in verschiedenen Variationen führten schließlich zum optimalsten Inhibitor, wie in Abbildung 40 dargestellt. Darüber hinaus zeigte sich ein nicht-lineares Verhältnis zwischen der Konzentration des Inhibitors und der Verlängerung der zur Nukleation der Aggregation notwendigen Zeit (*lag-time*), was auf eine kooperative Inhibition durch den Makrozyklus hindeutet.^[448] Das vorgeschlagene Modell des

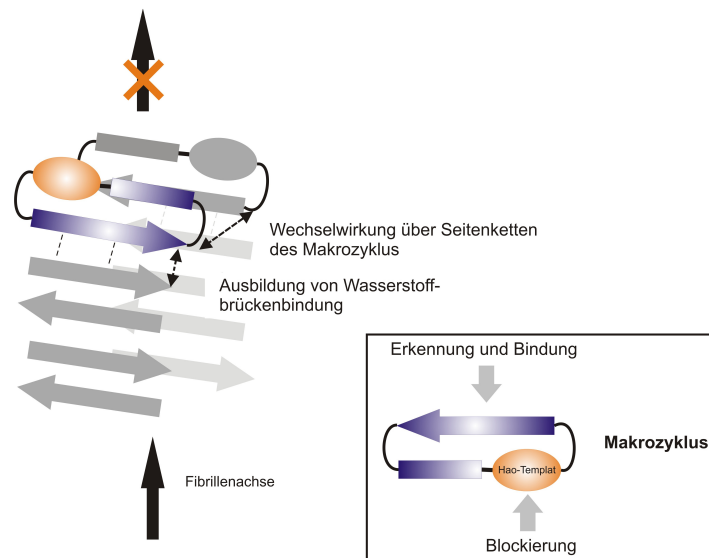


Abbildung 41: Schematische Darstellung des Modells des Inhibitionsmechanismus (nach Lit.^[448])

Inhibitionsmechanismus geht von einer synchronen Bindung zweier Makrozyklen zur vollständigen Inhibierung des Wachstums der Fibrille aus.^[448] Im ersten Schritt bindet zunächst der obere Strang des Makrozyklus über die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen an die amyloidogene Sequenz. Im zweiten Schritt bindet ein zweiter Makrozyklus ebenfalls mit dem oberen Strang an die darunter liegende amyloidogene Sequenz, so dass nun zwei Makrozyklen nebeneinander liegen und ebenfalls über die Seitenketten aneinander binden. Die Wachstumsseite der Fibrille wird auf diese Weise durch zwei Makrozyklen besetzt, wobei das Hao-Templat die Assoziation weiterer amyloidogener Sequenzen unterbindet.^[448] Dieses Modell des Inhibitionsmechanismus eröffnet neue Möglichkeiten für die Entwicklung peptidbasierter Inhibitoren.

6.3.3.2.5 Multivalente Inhibitoren

Die Realisierung von vielen, gleichzeitig stattfindenden spezifischen Bindungsereignissen zur Erhöhung der Affinität ist ein in der Biologie weit verbreitetes Konzept, welches als Multivalenz bezeichnet wird. In Bezug auf das Design von peptidbasierten Inhibitoren wird ein Vielfaches der entsprechenden amyloidogenen Kernsequenz an eine mehrfach verzweigte Gerüststruktur gebunden. Das Ziel ist es, die Affinität der Bindung an amyloidogene Proteine und Peptide und folglich auch das inhibitorische Potential zu erhöhen.

Zhang *et al.* wendeten bei der Umsetzung dieses Prinzips in der Entwicklung eines peptidbasierten Inhibitors das retro-inverse Peptid ffvlk, d.h. das D-Peptid der umgekehrten amyloidogenen Kernsequenz KLVFF des A β -Peptids, an.^[449] Die Autoren stellten fest, dass dieses Peptid mit eher durchschnittlicher Affinität an Fibrillen A β (1-40) bindet. Die Kombination aus sechs ffvlk Peptiden verbunden über einen verzweigten PEG-Linker verbesserte jedoch die Affinität der gesamten Verbindung um das 10000fache. Im Vergleich führte diese Modifikation zu einer entsprechend effektiveren Inhibition der Aggregation.^[449] Chafekar *et al.* verwendeten die amyloidogene Kernsequenz KLVFF des A β -Peptids.^[450] Dieses Motiv wurde vierfach durch Native Chemische Ligation an ein Dendrimer der ersten Generation gebunden. Die so geschaffene Verbindung bildete keine ThT-positiven Aggregate, woraus die Autoren schlossen, dass dendritische KLVFF Verbindungen keine amyloiden Aggregate bilden, sondern lediglich andere amorphe Aggregate mit hohem Anteil an β -Faltblattstrukturen. Im ThT-Assay sowie in den elektronenmikroskopischen Studien erwies

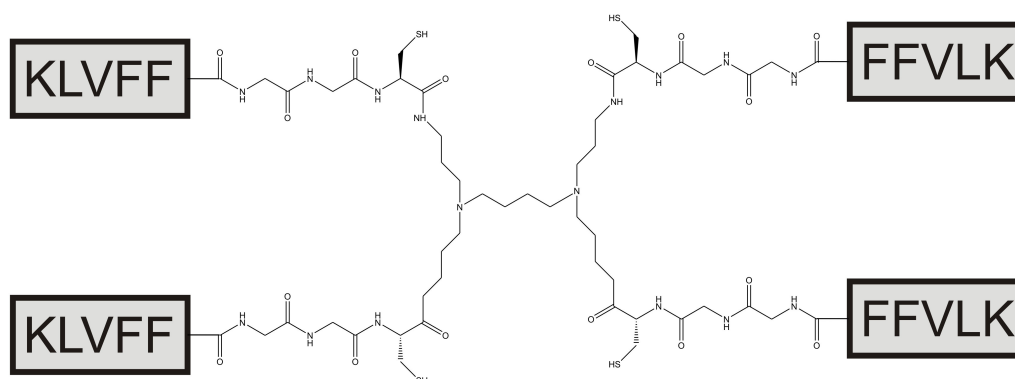


Abbildung 42: Struktur des Inhibitors. Das KLVFF-Motiv ist vierfach jeweils über zwei Glycin-Reste an ein Cystein-Dendrimer gebunden (nach Lit.^[450])

sich die dendritische Verbindung als der deutlich effektivere Inhibitor, da im Vergleich mit der unmodifizierten KLVFF Sequenz für die gleiche inhibitorische Wirkung deutlich niedrigere Konzentrationen notwendig waren.^[450] Der Inhibitor war darüber hinaus auch in

der Lage, bereits gebildete amyloide Fibrillen wieder aufzulösen. Durch Vergleichsexperimente mit dem Dendrimer ohne KLVFF Motiv und dem Dendrimer mit einem poly-Glycin-Analogon, die keine bis geringe inhibitorische Wirkung zeigten, bestätigte man die Grundannahme der Potenzierung der Wirkung durch Multivalenz.^[450]

6.3.3.2.6 Strukturbasiertes Design

Einen ersten Ansatz des strukturbasierten Designs wurde von Smith und Mitarbeitern berichtet. In dieser Arbeit ging man davon aus, dass die parallel und in-register angeordneten β -Faltblattstrukturen in der *cross- β* -Struktur an der Oberfläche „Wölbungen“ und „Einkerbungen“ durch unterschiedlich große und kleine Seitenketten aufweisen.^[451] Auf dieser Grundlage wurden komplementäre kleine peptidbasierte Inhibitoren aus Aminosäuren mit abwechselnd großen und kleineren Seitenketten designt. Die Inhibitoren waren in der Lage, die Bildung der Fibrillen zu inhibieren und bereits gebildete Fibrillen wieder aufzulösen.

Eisenberg und Baker *et al.* verwendeten einen strukturbasierten und computergestützten Ansatz für das Design einer neuen Klasse von peptidbasierten Inhibitoren. Die strukturelle Grundlage bildete das Modell des „sterischen Reißverschlusses“, ein Paar dicht gepackter β -Faltblattstrukturen mit komplementären und ineinander verzahnten Seitenketten (Kapitel 2.3.3 *Modell des sterischen Reißverschlusses* („*steric zipper*“)). Beim Design des spezifischen Inhibitors wurde das Ziel verfolgt, die Kontaktfläche zwischen Inhibitor und amyloidogener Sequenz möglichst komplementär und optimal ineinander verzahnt zu gestalten, so dass der Inhibitor optimal an die amyloidogene Sequenz am Ende der wachsenden Fibrille bindet und die Elongation inhibiert. Das Inhibitorpeptid bindet über eine möglichst große Anzahl an Wasserstoffbrücken und über hydrophobe Wechselwirkung an das amyloidogene Peptid. Wenn der Inhibitor über die Kontaktfläche gebunden ist, wird die Aneinanderlagerung von weiteren amyloidogenen Sequenzen durch sterische Hinderung der Seitenketten unterbunden. Als erstes Templat diente das Hexapeptidsegment ${}_{306}\text{VQIVYK}_{311}$ des Tau-Proteins, das eine entscheidende Rolle bei der Aggregation des vollständigen Tau-Proteins bildet. Das D-Peptid *tlkivw* zeigte die größte inhibitorische Wirkung und inhibiert die Aggregation des Hexapeptids VQIVYK sowie die Aggregation zweier Tau-Fragmente mit 130 und 150 Aminosäuren. Das entsprechende L-Peptid *TLKIVW* zeigte dagegen keine inhibitorische Wirkung und das D-Peptid *tlkivw* zeigte darüber hinaus keine Wirkung auf die Aggregation des A β -Peptids. Das macht deutlich, dass die inhibitorische Wirkung des D-Peptids *tlkivw* auf dem spezifischen Design für das VQIVYK-Segment basiert. Lange Zeit

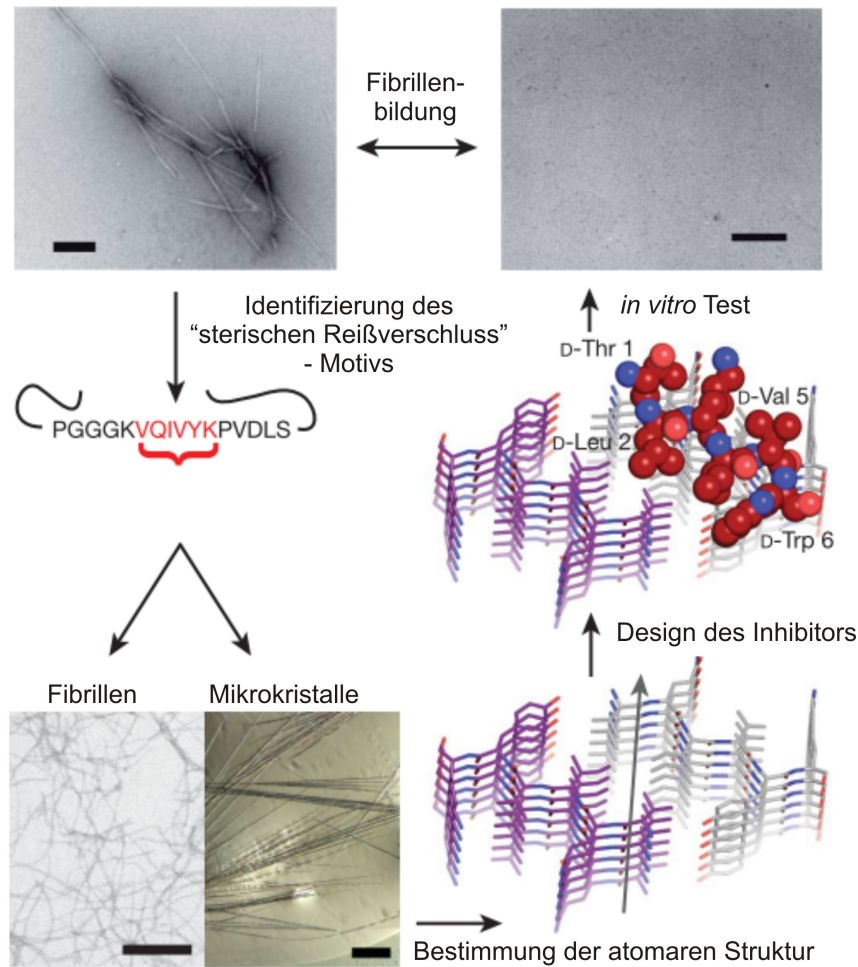


Abbildung 43: Prinzip des struktur-basierten Designs (verändert nach Lit. ^[82] © 2011 Macmillan Publishers Limited)

war das strukturbasierte Design von Inhibitoren eine große Herausforderung, da notwendige strukturelle Informationen auf atomarer Ebene nicht zur Verfügung standen.^[82] Dieser Ansatz demonstriert eindrucksvoll das Potential des computergestützten Designs von peptidbasierten Inhibitoren auf der Basis der Strukturaufklärung kristalliner Aggregate amyloider Kernsequenzen.

6.3.3.2.6 Stabilisierung der α -helikalen Konformation

Wie bereits im Rahmen der Erläuterung zu den Inhibitionstrategien beschrieben, bilden einige amyloidogene Proteine und Peptide helikale Intermediate stabilisiert durch Peptid-Peptid-Wechselwirkungen oder Peptid-Membran-Wechselwirkungen im Rahmen des Aggregationsprozesses. Mit Hilfe von peptidbasierten Verbindungen lassen sich diese stabilisieren und so die Bildung von β -Faltblatt-reichen Aggregaten verhindern.

Mit unterschiedlichen methodischen Ansätzen zeigten verschiedene Arbeitsgruppen, dass z.B. mit Insulin die Aggregation hIAPP über die Stabilisierung helikaler Intermediate inhibiert

werden kann.^[179, 321-323] NMR-Studien als auch *Docking*-Studien ergaben, dass Insulin über eine helikale Domäne des IAPP miteinander interagieren.^[322] Darüber hinaus konnten Gilead *et al.* die Interaktionsdomäne des Insulins identifizieren.^[321] Sie liegt im Zentrum der helikalen B-Kette des Insulins und umfasst die Positionen 9 bis 20 und interagiert mit der Domäne des IAPP von Position 7 bis 19. Diese helikale Domäne bildet somit den idealen Ansatzpunkt für die Stabilisierung der helikalen Struktur durch peptidbasierte Liganden, wobei z.B. eine amphipathische Helix als Ligand denkbar ist.

Nerelius *et al.* gingen beim Design eines peptidbasierten Inhibitors der Aggregation des A β -Peptids von der zentralen Region $_{13}\text{HQKLVFFAEDVGS}_{26}$ des A β -Peptids aus. Diese Sequenz zeigt unter bestimmten Bedingungen eine Tendenz zur helikalen Konformation, die sich mit einer entsprechenden Verbindung adressieren und stabilisieren lässt.^[166] Sie designten einen peptidbasierten Inhibitor, der in der Lage ist, mit der zentralen Region $_{13}\text{HQKLVFFAEDVGS}_{26}$ zu interagieren und sie in der helikalen Konformation zu stabilisieren.^[166] Die zentrale Region des A β -Peptids besteht aus einer größeren hydrophoben Domäne $_{17}\text{LVFFA}_{21}$ und mit $_{22}\text{ED}_2$ aus einer anionischen Domäne. Das Design des peptidbasierten Inhibitors weist mit einem Argininrest zwei positive Ladungen auf, die mit der negativ geladenen Glutamatseitenkette an Position 22 und der Aspartatseitenkette an Position 23 interagieren können. Zusätzlich ermöglicht die negative geladene Carboxyl-Funktion die Interaktion mit dem teilweise protonierten Histidin an Position 13 und der positiv geladenen Seitenkette des Lysins an Position 16. Für die Realisierung von hydrophoben Wechselwirkungen wurde D-Tryptophan im Zentrum des Inhibitors platziert, das mit den hydrophoben Seitenketten des Phenylalanins an Position 20 interagiert. CD-Spektren der äquimolaren Mischung von A β (12-28) mit dem Inhibitor in Phosphat-Puffer mit 20% TFE zeigten die Stabilisierung der helikalen Konformation in Gegenwart des Inhibitors. Der Inhibitor greift so in den Prozess der Aggregation von A β (1-42) ein und reduziert die

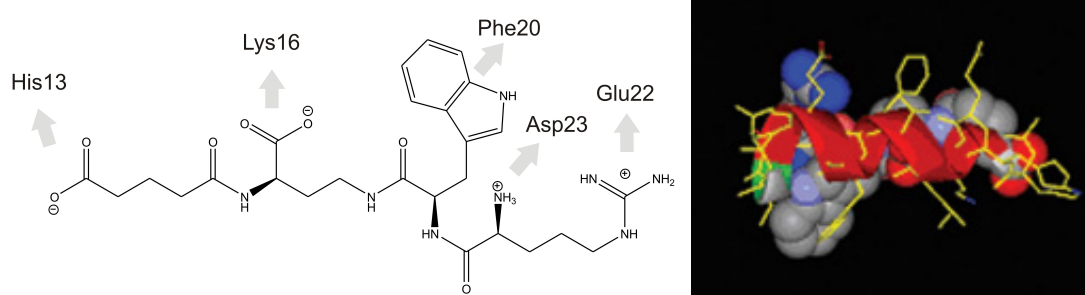


Abbildung 44: (links) Struktur und des Inhibitors pep1b und Interaktionen mit Positionen des zentralen Peptidfragments des A β -Peptids (rechts) MD Simulation der Stabilisierung des helikalen A β -Peptids durch pep1b (nach Lit.^[166] © 2009 by The National Academy of Sciences of the USA).

Toxizität in Zell-Tests sowie im *in vivo*-Modell *Drosophila melanogaster*.^[166] Da man ebenfalls einen nicht peptidbasierten Inhibitor auf der Basis der gleichen rationalen Überlegung synthetisierte und dieser ebenso erfolgreich war, lässt sich die inhibitorische Wirkung eindeutig auf die durch das Design intendierten Wechselwirkungen zurückführen.^[166]

Die Strategie der Stabilisierung der helikalen Konformation zur Inhibition der Aggregation lässt sich auch auf amyloidogene Proteine bzw. Peptide anwenden. Einige aktuelle Arbeiten weisen darauf hin, dass der 17 Aminosäuren lange N-Terminus der poly-Q Sequenz des Huntington-Proteins, bezeichnet als htt^{NT} und mit großer Tendenz zur helikalen Konformation, eine entscheidende Rolle im Aggregationsprozess spielt (siehe Kapitel 5 *Amyloidogene Oligomere und ihre pathologische Bedeutung*). Im Prozess der Aggregation entstehen zunächst Oligomere, in denen mehrere amyloidogene Sequenzen über eine stabile helikale Struktur am N-Terminus miteinander agieren. Dies führt in der Folge aufgrund der erhöhten lokalen Konzentration zur Nukleation der Aggregation und zu der Bildung von amyloiden Fibrillen.^[172] Im Unterschied zu dem von Abedini und Raleigh^[159, 160] vorgeschlagenen einfachen mechanistischen Modell des Einflusses helikaler Strukturen auf die Bildung amyloider Aggregate bleiben die helikalen Elemente jedoch auch im amyloiden Zustand erhalten.^[172, 452, 453] Die zur Bildung einer Helix befähigte htt^{NT}-Sequenz wurde von Wetzel und Mitarbeiter als Basis zur Entwicklung von neuen peptidbasierten Inhibitoren verwendet. Ihnen gelang das rationale Design von Inhibitoren, wobei der inhibitorische Effekt stark von der Fähigkeit abhängt, amphipathische Helices zu bilden. Sie testeten verschiedene Analoga der htt^{NT}-Sequenz als Inhibitoren der Aggregation des amyloidogenen Peptids htt^{NT}Q₃₀P₆K₂. Dazu gehören u.a. das entsprechende D-Peptid, die retro-inverse Sequenz von htt^{NT} sowie die htt^{NT}-Sequenz, ergänzt durch die Prolin und Glycin modifizierte poly-Q-Sequenz htt^{NT}PGQ₉P_(1,2,3). Schon die htt^{NT}-Sequenz selbst zeigte inhibitorische Wirkung und war in der Lage, die Nukleation zu verzögern. Auf der Basis von einigen Vorarbeiten der Gruppe^[385, 454] wurde ein Inhibitor, bestehend aus der N-terminalen htt^{NT}-Sequenz und der poly-Q-Sequenz, ergänzt durch *turn*-induzierende Prolin/Glycin-Abfolge und 3 Prolin-Resten in den jeweiligen Q₉-Sequenzen. Das Peptid htt^{NT}PGQ₉P_(1,2,3) zeigte einen konzentrationsabhängigen inhibitorischen Effekt und war in der Lage, die Aggregation von htt^{NT}Q₃₀P₆K₂ vollständig in äquimolarer Mischung zu inhibieren.^[452] Größenaustauschchromatografie, Trp-Fluoreszenz und FTIR-Experimente unterstützen einen Inhibitionsmechanismus, nach dem der Inhibitor mit der htt^{NT}- Domäne von htt^{NT}Q₃₀P₆K₂ gemischte, helikale Oligomere bilden. Dadurch wird die lokale Konzentration an freien poly-Q-Segmenten reduziert und die Interaktion und die Bildung von amyloiden Aggregaten erschwert. Sowohl das D-Peptid als auch die retro-

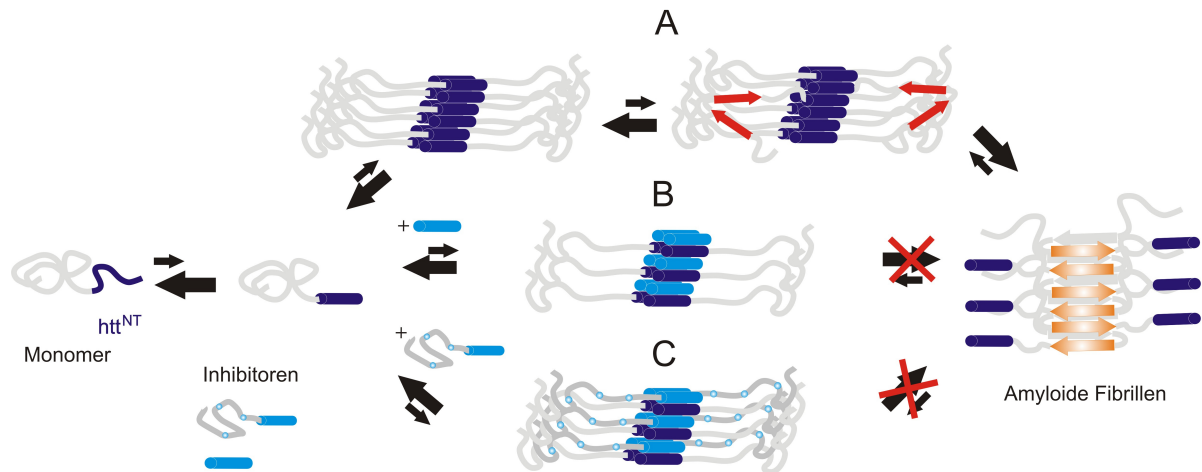


Abbildung 45: Einfluss der htt N-terminalen Domäne im Prozess der Aggregation und Inhibition von htt^{NT}Q₃₀P₆K₂. (A) Die Bildung von helikalen Oligomeren führt zur Förderung der Aggregation zu amyloiden Fibrillen. (B) Amphipathische Helices führen zur Reduktion der lokalen Konzentration der poly-Q Domäne und Verringerung der Aggregation. (C) Amphipathische Helices, kombiniert mit mutierter poly-Q Domäne, führt zur Inhibition der Aggregation amyloider Fibrillen (nach Lit. ^[172, 452, 453])

inverse htt^{NT}-Sequenz, bestehend aus D-Aminosäuren mit umgekehrter Primärstruktur zur Bewahrung der Orientierung der Seitenketten im Vergleich zum entsprechenden L-Peptid, erwiesen sich als ebenso wirksame Inhibitoren. FTIR-Spektren weisen auf die Bildung gemischter helikaler Oligomere hin. Mit dem Ziel, die Hypothese gemischter helikaler Oligomere als Grundlage für die Inhibition der Aggregation zu unterstützen, wurden verschiedene Sequenzen aus Kombinationen der Aminosäuren der htt^{NT}-Sequenz getestet. Die Ergebnisse zeigten einen klaren Zusammenhang zwischen der inhibitorischen Effektivität und der Fähigkeit, eine Helix zu bilden.^[452]

Darüber hinaus versuchte man ebenfalls Problemen von peptidbasierten Inhibitoren, wie der Weg der Applizierung und die metabolische Stabilität, zu begegnen. Sie konnten zum einen zeigen, dass der vollständige Austausch der einzelnen L-Aminosäuren gegen entsprechende D-Enantiomere zu einer vergleichbaren inhibitorischen Wirkung führt. Zum anderen zeigte die Ergänzung durch poly-Lysin-Sequenz mit dem Ziel, die Permeabilität durch die Zellmembran zu erhöhen und pharmakokinetische Eigenschaften zu optimieren, zusätzlich eine Erhöhung der inhibitorischen Aktivität.

Zusammenfassend zeigen diese Arbeiten, dass Peptide, die fähig sind, die helikalen Elemente in einer amyloidogenen Sequenz anzusprechen und zu stabilisieren, bestehend aus D-Aminosäuren bzw. ergänzt durch poly-Lysin-Sequenz, ein Potential als Ausgangsverbindung in der Entwicklung von Therapien gegen die Huntingtonsche Krankheit besitzen.^[452]

6.3.3.2.7 Stabilisierung von β -Faltblatt-Strukturen im nicht amyloiden Zustand

Unabhängig von den jeweiligen amyloiden Kernsequenzen, die häufig als Ausgangspunkt für das rationale Design von peptidbasierten Inhibitoren dienen, gibt es einige Ansätze strukturell gut definierter β -Faltblatt-Strukturen, die an amyloidogene Proteine und Peptide binden und die Fibrillenbildung inhibieren.

Die Arbeitsgruppe von Ghosh nutzte die sehr stabile B1 Domäne des Protein G, HTB1, als Ausgangspunkt für die Entwicklung eines Inhibitors.^[455-457] Mit Hilfe der Methode des Phage Displays und der Selektion einiger Positionen gegen die Sequenz von $A\beta(1-40)$ wurde die Sequenz modifiziert, so dass der Inhibitor gut an das $A\beta(1-40)$ -Peptid bindet. Interessanterweise ergab der Selektionsprozess den Austausch von polaren gegen aromatische Aminosäuren ($K \rightarrow W$, $G \rightarrow W$, $K \rightarrow Y$, und $E \rightarrow Y$) in einer neuen, 23 Aminosäuren langen Peptidsequenz namens TJ10. Dies erhöht generell die Propensität für β -Faltblattstrukturen, zudem werden sie an der exponierten Seite präsentiert, womit TJ10 möglicherweise an $A\beta(1-40)$ bindet. Das Peptid TJ10 war in äquimolarer Mischung in der Lage, die Aggregation von $A\beta(1-40)$ zu inhibieren, wie ThT-Assay und TEM-Untersuchungen zeigten. Die Autoren gehen davon aus, dass TJ10 das Peptid $A\beta(1-40)$ in einen β -Faltblatt-reichen Zustand festhalten kann und auf diesem Weg keine Fibrillen mehr gebildet werden können. Toxizitätstests sind gerade aufgrund der Tatsache, dass $A\beta$ -Oligomere stabilisiert werden, entscheidend, aber in diesem Fall noch nicht berichtet worden. Mit dem Ziel, Inhibitoren zu entwickeln, die über β -Faltblattstrukturen mit amyloidogene Proteine und Peptide interagieren wollen, bieten sich *de novo* designte Modelle von β -hairpin-Strukturen an. Huggins *et al.* berichteten über β -hairpin-Peptide, die ebenfalls Trp und Tyr enthielten und in der Lage

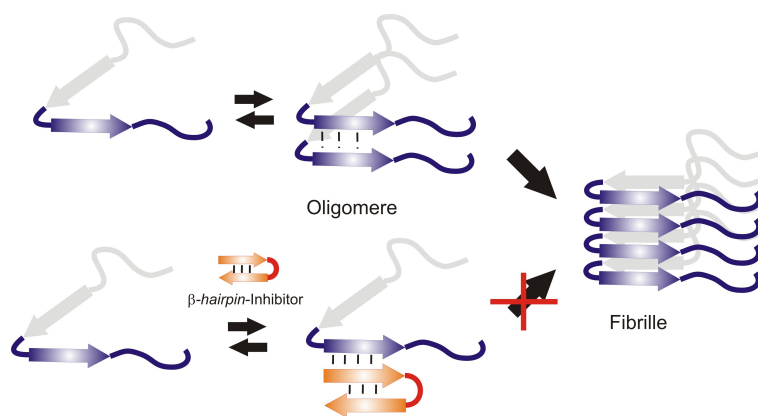


Abbildung 46: Schematische Darstellung des Modells der Inhibition der Aggregation zu amyloiden Fibrillen durch β -hairpin-Inhibitoren (nach Lit.^[457]).

waren, die Fibrillenbildung von hAM (*human pancreatic amylin*) zu inhibieren.^[458] Diese β -*hairpin*-Peptide zeigten ebenfalls keine Ähnlichkeit in der Sequenz im Vergleich zu hAM und exponieren Tryptophan- und Tyrosinreste. In einer weiterführenden Studie untersuchten Huggins *et al.*, ob dieser Ansatz generalisiert werden kann.^[457] Sie testeten eine Reihe von *de novo* designten β -*hairpin*-Peptiden, die Tryptophan- und Tyrosinreste enthielten^[459], als Inhibitoren der Aggregation des amyloidogenen α -Synucleins. Die effektivsten Inhibitoren der amyloiden Aggregation hatten die Sequenzen KKLTVW-lpGK-WITVSA (WW2) bzw. KKLTVY-lpGK-YITVSA (YY2)^[459], in denen sich die aromatischen Reste nahe an der *turn*-Sequenz befinden. TEM-Untersuchungen von α -Synucleins in Gegenwart der Inhibitoren WW2 und YY2 zeigten entweder keine oder nur sehr wenige Fibrillen, jedoch sind mindestens äquimolare Konzentrationen notwendig. Die Inkubation mit dem Inhibitor YY2 führte zur Bildung von amorphen Aggregaten. Durch die Bindung des Inhibitors entstehen möglicherweise zunächst Oligomere, die nicht mehr Teil des Prozessweges der amyloiden Aggregation sind (*off-pathway*).^[457]

Die aromatischen Reste in den β -*hairpin*-Peptiden sind nicht nur wesentlich für die Bildung der β -*hairpin*-Struktur, sondern auch für eine stabile Bindung an die amyloidogene Sequenz. Diese Funktion von z.B. Tryptophan ist auch von anderen Beispielen peptidbasierten Inhibitoren bekannt.^[460]

Härd und seine Mitarbeiter verwendeten einen Protein-Engineering-Ansatz, einen *Affibody* zur Stabilisierung des monomeren A β -Peptids in einer β -*hairpin*-Struktur, wodurch die Bildung von amyloiden Fibrillen inhibiert wurde.^[273] Die speziell designten *Affibodies* zeigen vergleichbar zu Antikörpern eine hohe Affinität zu ihrer Zielstruktur, jedoch ist z.B. die Größe und der Einfluss auf das gesamte Immunsystem im Falle einer medizinischen Anwendung geringer als bei einem Antikörper. Sie stellen somit eine Alternative zu Antikörpern in biotechnologischer, diagnostischer und medizinischer Anwendung dar.^[461, 462]

Das von Härd und Mitarbeiter verwendete Protein basiert auf der 58 Aminosäuren langen und aus drei Helices bestehenden Z-Domäne des Staphylokokken-Proteins A. Mit Hilfe der *Phage-Display*-Methode wurden 13 Positionen in zwei der drei Helices, die Teil der Bindungsfläche sind, mit dem Ziel der Bindung an A β variiert.^[463] Diese Arbeiten führten schließlich zum *Affibody* Z_{A β 3}, das in der Sequenz eines helikalen Abschnitts durch die Veränderung in der Primärstruktur nun β -Faltblatt-Konformation zeigt und ein über Disulfidbrücken verbundenes Dimer bildet.

NMR-Studien, Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC), CD-Spektroskopie und Fluoreszenz-Assays zeigten, dass Z_{A β 3} mit hoher Affinität mit dem β _Z-Abschnitt in

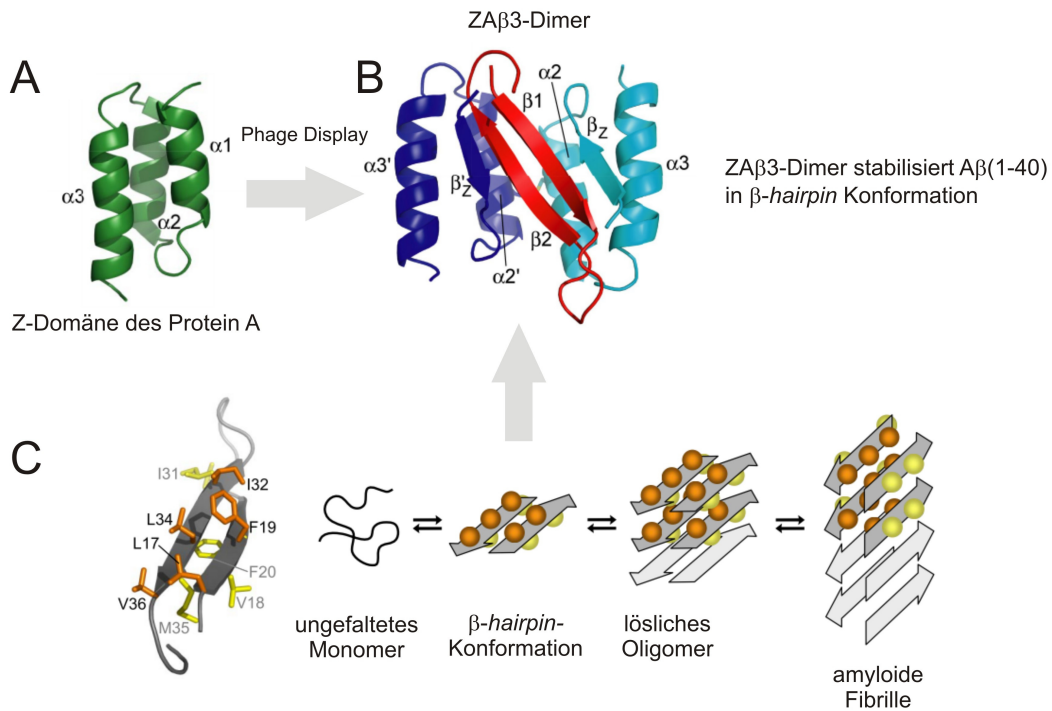


Abbildung 47: (A) Z-Domäne des Staphylokokken-Proteins A als Ausgangspunkt für Phage Display. (B) Über Disulfidbrücken verbundenes Affibody $Z_{A\beta_3}$ -Dimer mit dem β_2 -Abschnitt in β -Faltblattkonformation, stabilisiert $A\beta(1-40)$ in β -hairpin-Konformation. (C) Hypothetischer Aggregationsmechanismus inklusive des $A\beta(1-40)$ in β -hairpin-Konformation (nach Lit.^[273] © 2008 by The National Academy of Sciences of the USA)

β -Faltblattkonformation an $A\beta(1-40)$ in der β -hairpin Konformation (Abbildung 47) bindet und die Bildung von Oligomeren sowie die Aggregation zu amyloiden Fibrillen verhindert und die Toxizität *in vivo* reduziert.^[273, 464]

Diese Arbeiten zeigen, dass die β -hairpin-Konformation des $A\beta$ -Peptids innerhalb des Aggregationsprozesses des $A\beta$ -Peptids zum einen eine wichtige Rolle einnimmt und zum anderen durch entsprechende Liganden adressiert werden kann.^[273]

Auf der Basis des Proteins Domäne B1 des IgG bindenden Proteins G einwickelte man in der Arbeitsgruppe von Avijit Chakrabarty die Hypothese, dass eine amphipathische Helix das $A\beta$ -Peptid in eine lösliche, zur nativen Struktur ähnliche Form überführen und die Bildung von Oligomeren und amyloiden Fibrillen inhibieren kann.^[465] Wie in der Abbildung 48 gezeigt, besteht die Protein-Domäne B1 aus vier antiparallelen β -Faltblatt-Strängen, worauf eine amphipathische Helix gelagert ist. Die hydrophobe Oberfläche der amphipathischen Helix bindet an die β -Faltblatt-Stränge, und die hydrophile Oberfläche gewährleistet die Wasserlöslichkeit der gesamten Struktur.^[466] Ohne die amphipathische Helix bildet die Domäne B1 amyloide Fibrillen mit charakteristischer Ultrastruktur.^[466] Es wird also deutlich, dass die amphipathische Helix die entscheidende Komponente darstellt. Sie ist aufgrund ihres amphipathischen Charakters besonders dazu geeignet, einerseits an die vorwiegend

hydrophoben, amyloidogenen Sequenzen zu binden und andererseits die Löslichkeit des gesamten Komplexes zu erhöhen. Ähnlich zur Protein-Domäne B1 stellte man sich die Aufgabe, eine amphipathische Helix zu generieren, die speziell an das A β -Peptid in β -Faltblatt-Konformation bindet und in eine lösliche Form überführt. Dazu verwendeten Arslan *et al.* eine 17 Aminosäuren lange Sequenz mit dem Ziel einer möglichst kleinen Sequenz

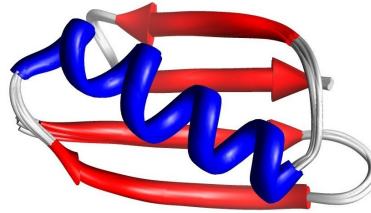


Abbildung 48: Struktur der B1-Domäne des Proteins G (*Streptococcus*) (nach Lit. ^[467]).

unter Gewährleistung der Fähigkeit zur Einnahme einer stabilen helikalen Konformation zu generieren. Diese Sequenz wurde mit dem Ziel der maximalen inhibitorischen Wirkung mit Hilfe einer speziellen, auf dem GFP (*green fluorescent protein*) beruhenden Screening-Methode^[468] optimiert. Das Peptid mit der Sequenz DKAGAEVLAAVKAIKEK wurde als effektivster Inhibitor identifiziert. Mit Hilfe von CD-Spektren konnte die Tendenz zur helikalen Konformation des Inhibitors gezeigt werden. Mit Hilfe von ThT Fluoreszenz-, Kongorot-Bindungs- und Trübungsstudien sowie durch Elektronenmikroskopie konnte die inhibitorische Wirkung *in vitro* nachgewiesen werden und die Hypothese bestätigt werden.^[465] Obwohl es sicher nicht wahrscheinlich ist, dass eine ähnliche amphipathische Helix die Blut-Hirn-Schranke überwindet, ist jedoch ein Effekt auf so genannte periphere A β -Spezies im übrigen Teil des Körpers denkbar.

6.4 Kontrolle der Proteinfaltung

Grundsätzlich ist die korrekte Faltung eines jeden Proteins in der Primärstruktur angelegt und in den meisten Fällen sind neu synthetisierte Peptide und Proteine in der Lage, innerhalb der Zelle spontan die richtige Konformation anzunehmen. Doch gerade im Rahmen der Forschung an amyloidogenen Sequenzen wird sehr schnell deutlich, dass es in einigen Fällen ein empfindliches Gleichgewichts zwischen korrekt gefalteten Proteinen und der Fehlfaltung sowie Aggregation eines Proteins gibt. Daher ist es nicht weiter verwunderlich, dass die Evolution ein komplexes Regulationssystem hervorgebracht hat, das die biosynthetische Generierung von funktionsfähigen Proteinen gewährleisten soll.^[289, 469] Dieses System reicht von der Synthese und Faltung der Proteine bis hin zur Degradation von Proteinen. Proteinfehlfaltungen und Aggregation von Proteinen sowie die damit verbundenen

Erkrankungen können dabei als Folge einer unzureichenden Proteinqualitätskontrolle verstanden werden, wobei das komplexe Regulationssystem durch genetische Defekte oder schlicht durch Prozesse des Alterns aus dem Gleichgewicht gerät. Ein Teil dieses Systems besteht aus *Chaperonen* (aus den engl.: Anstands dame). Es handelt sich hierbei um Proteine, die an synthetisierte Proteine binden und sie bei der korrekten Faltung unterstützen und Phänomene, wie die Fehlfaltungen und Aggregation von Proteinen verhindern.^[470] Darüber hinaus sind sie in der Lage, bereits fehlgefaltete Proteine zu erkennen und deren Degradation einzuleiten.^[470] Aus diesem Grund bilden *Chaperone* auch einen Ansatzpunkt, der amyloiden Aggregation entgegenzuwirken.

6.4.1 Proteine und Moleküle mit *Chaperone*-Funktion

Zahlreiche Studien haben bereits gezeigt, dass *Chaperone* in Lage sind, in den Prozess der Bildung von amyloiden Fibrillen verschiedenster amyloidogener Proteine und Peptide einzugreifen.^[470] Zu einer ganzen Reihe anti-amyloidogen wirkender *Chaperone* gehört die Klasse der Hitzeschockproteine (Hsp, *heat shock protein*). Ihr Name rührt von der Tatsache her, dass sie in der Zelle bei Stressfaktoren, wie z.B. Hitze, im erhöhten Maße gebildet werden und die Faltung als Erhaltung der Sekundärstruktur unter extremen Bedingungen gewährleisten sollen. Die Hitzeschockproteine Hsp20 und HspB8 wurden zum Beispiel ebenfalls in amyloiden Ablagerungen gefunden, die im Zusammenhang mit Alzheimer und anderen neurodegenerativen Erkrankungen stehen.^[471] Man kann daraus ableiten, dass das Kontrollsystem auf den Aggregationsprozess reagiert und versucht, die Akkumulation von Aggregaten zu verhindern.^[471, 472]

Die intrazellulären Hitzeschockproteine Hsp70, Hsp90 und Hsp104, wobei die unterschiedlichen Zahlen die Molekülmasse des jeweiligen Hitzeschockproteins widerspiegeln, sind in der Lage, in den Prozess der Fibrillenbildung A β (1-42) einzugreifen.^[470, 471] Für Hsp70 und Hsp104 wurde ebenfalls gezeigt, dass sie in den Aggregationsprozess von α -Synuclein und des Hefe Prion Protein Sup35 eingreifen.^[470, 471] Die meisten amyloiden Ablagerungen befinden sich im extrazellulären Raum, der mit den Proteinen Clusterin, Haptoglobulin und α_2 -Macroglobulin über ein eigenes Kontrollsystem verfügt, das ebenfalls in amyloiden Ablagerungen gefunden wurde und in der Lage ist, mit amyloidogenen Oligomeren zu interagieren und die Bildung von Fibrillen zu inhibieren.^[470, 471] Es wird deutlich, dass *Chaperone* eine wichtige Rolle in der Verhinderung von amyloiden Aggregaten spielen und die Erforschung der zu Grunde liegenden Mechanismen möglicherweise neue Wege für therapeutische Ansätze eröffnet.^[470] Ein interessantes Beispiel

dieser Forschung ist die BRICHOS-Domäne, ein Proteinabschnitt, der bis heute in 12 verschiedenen Protein-Familien gefunden wurde und neben anderen Funktionen auch als *Chaperone* fungieren kann.^[470, 471]

6.4.2 Die BRICHOS-Domäne

Die BRICHOS-Domäne zeigte anti-amyloidogene Wirkung gegen verschiedene amyloidogene Proteine und Peptide, wie z.B. SP-C, A β (1-40) und Medin.^[471] Neueste Ergebnisse ergaben, dass BRICHOS-Domänen aus zwei verschiedenen Proteinen die Fibrillenbildung von A β (1-40) in geringeren stöchiometrischen Konzentrationen vollständig inhibieren können.^[473-475] Für die BRICHOS-Domäne des SP-C Proteins konnte gezeigt werden, dass die BRICHOS-Domäne eine Affinität zu Sequenzabschnitten aufweist, die Leucin, Isoleucin, Valin und Phenylalanin enthalten. Diese Aminosäuren bilden zum einen die molekulare Grundlage für die amyloide Aggregation und zum anderen ermöglichen sie das Eindringen von helikalen Transmembransegmenten eines Proteins in die Membran.^[470, 475] Aus diesen Ergebnissen schlussfolgerten die Autoren, dass die BRICHOS-Domäne nicht mehr in der Membran lokalisierte, ungefaltete, hydrophobe und amyloidogene Transmembransegmente erkennt und deren Aggregation zu amyloiden Fibrillen verhindert.^[470] Dieses Beispiel zeigt, dass im *Chaperone*-Ansatz viel Potential für einen therapeutischen Ansatz steckt. Darüber hinaus ist bereits eine Reihe von chemischen bzw. pharmakologischen Molekülen mit *Chaperone*-Funktion identifiziert und entwickelt worden, die ebenfalls fähig sind, in den Faltungsprozess unterstützend einzugreifen und z.T. bereits ihre medizinische Anwendung gefunden haben.^[476]

6.5 Immunotherapie

Die körpereigene Immunabwehr gegen die Oligomerisierung und Aggregation des A β -Peptids zu nutzen, ist eine weitere sehr bedeutende Strategie in der Entwicklung von therapeutischen Ansätzen gegen Alzheimer und andere Amyloidosen.^[477] Die Anreicherung des A β -Peptids, die Oligomerisierung sowie die Bildung charakteristischer Ablagerung geht mit einer inflammatorischen Immunabwehr einher und führt u.a. zur Aktivierung von Mikrogliazellen (mononukleare Phagozyten), welche die Hauptform der Immunabwehr im Gehirn bilden, da Antikörper die Bluthirnschranke nicht überwinden können. Darüber hinaus ernähren und schützen Astrogliazellen die Neuronen.^[478, 479] Man konnte zeigen, dass gesunde Menschen eine Reihe von natürlichen Antikörpern gegen toxische Oligomere des A β -Peptids besitzen, die als Folge des Alterns in der Menge abnehmen und so die Entwicklung von Alzheimer

begünstigen.^[480] Eine Reihe von Arbeiten konnte darüber hinaus zeigen, dass spezifische Antikörper gegen amyloide Aggregate verschiedenster amyloidogener Proteine *in vitro* und im Fall des A β -Peptids *in vivo* in APP-transgenen Mäusen auflösen bzw. deren Struktur verändern und deren Toxizität reduzieren können.^[478, 481-488] Spezifische Antikörper sind darüber hinaus in der Lage, zwischen verschiedenen Intermediaten des Aggregationsprozesses zu unterscheiden.^[484, 485] Trotz vieler positiver Ergebnisse bezüglich amyloidogener Peptide und trotz jahrzehntelanger Erfahrung im Bereich der Immunisierung ist die Einflussnahme auf das Immunsystem riskant, da das A β -Peptid keinen Fremdkörper darstellt und eine Immunisierung gegen dieses Peptid mit Nebenwirkungen verbunden sein könnte. Der Ansatz der Immunotherapie gehört aber auch zu den vielversprechendsten Ansätzen in der Entwicklung von Therapien gegen Amyloidosen.^[477]

6.5.1 Formen der Immunisierung

Bei immunotherapeutischen Ansätzen lassen sich zwei Formen unterscheiden, die aktive und die passive Immunisierung. Bei der aktiven Immunisierung im Rahmen der Bekämpfung von Amyloidosen wird das vollständige oder Teile des synthetischen amyloidogenen Peptids über verschiedene Wege verabreicht mit dem Ziel der Aktivierung der körpereigenen Immunabwehr und der erhöhten Produktion von körpereigenen Antikörpern gegen verschiedene Spezies des amyloidogenen Peptids.^[478] Die Wirksamkeit dieses Ansatzes konnte zunächst in zahlreichen Arbeiten für APP-transgene Mäuse nachgewiesen werden und führte zu ersten Ergebnissen in klinischen Studien, welche im folgenden noch erläutert werden sollen.^[489] Bei der Methode der passiven Immunisierung hingegen werden direkt für einen amyloidogene Sequenzabschnitt spezifische monoklonale Antikörper (mAb) und Fragmente eines Antikörpers verabreicht. Auch in diesem Fall wurden bereits zahlreiche Arbeiten veröffentlicht, die zeigen, dass dieser Ansatz im Mausmodell zur Reduktion von amyloiden Ablagerungen führt.

6.5.2 Wirkungsmechanismen immunotherapeutischer Ansätze

Für die Wirkungsweise von anti-amyloidogenen Antikörpern werden verschiedene Mechanismen diskutiert.^[478, 490]

(I) Durch Antikörper vermittelte Phagozytose amyloider Ablagerung:

Der spezifische Antikörper bindet an amyloide Aggregate und vermittelt die körpereigene Phagozytose, d.h. den Abbau amyloider Aggregate innerhalb phagozytotischer Zellen, wie z.B. Mikrogliazellen.

(II) Periphere Senke:

Der spezifische Antikörper bindet an amyloide Aggregate außerhalb des Gehirns und verschiebt das Gleichgewicht bezüglich der amyloidogenen Spezies zwischen Gehirn und dem übrigen Blutkreislauf in Richtung des übrigen Blutkreislauf, was zu einer Reduktion der Menge der amyloidogenen Spezies im Gehirn führt.^[491, 492]

(III) Direkter Abbau amyloider Aggregate:

Durch die Bindung des spezifischen Antikörpers an die amyloidogene Sequenz wird die Aggregation zu Fibrillen, Akkumulierung in amyloide Ablagerungen verhindert und bereits gebildete fibrilläre Aggregate werden wieder abgebaut.

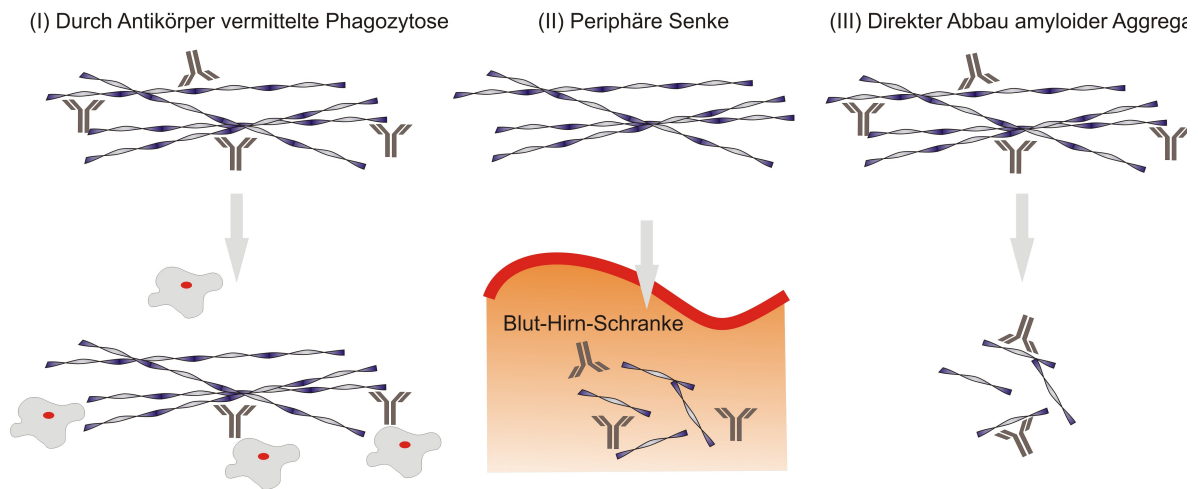


Abbildung 49: Denkbare Mechanismen des Abbaus amyloider Aggregate durch anti-amyloidogene Antikörper (verändert nach Lit.^[478]).

6.5.3 Generierung spezifischer anti-amyloidogener Antikörper

Mit *Display*-Techniken, wie z.B. Phagen-*Display*, lassen sich für amyloidogene Peptide spezifische Antikörperdomänen auf Basis einer synthetischen Bibliothek verschiedener Antikörperdomänen generieren. Eine synthetische Bibliothek aus Einzeldomänenantikörper, z.B. V_HH-Domänen (*Camelidae*)^[493] oder V_{NAR}-Fragmente (*Chondrichthyes*)^[494], bietet sich an, da sie im Vergleich zum klassischen Antikörper neben der schweren Kette keine leichte Kette aufweisen, so dass nur eine Polypeptidsequenz die Grundlage für die Bibliothek bildet, was der Methode des Phagen-*Displays* entgegenkommt.^[17, 495]

Die Anwendung von V_HH-Domänen ist aufgrund der Homologie zwischen V_HH-Fragmenten der Kamele und V_H-Fragmenten des Menschen unproblematisch. Aber auch scFv-Fragmente (*single chain variable fragment*), d.h. künstlich hergestellte Antikörperfragmente mit kovalent verbundenen Antigen-erkennenden variablen Domänen der leichten und der schweren Kette eines klassischen Antikörpers, können als Basis dienen.^[496-498] Mit Hilfe des Phagen-*Displays*

lassen sie sich schließlich bezüglich der Spezifität und Affinität zu den entsprechenden amyloidogenen Sequenzen die optimalsten Domänen selektieren und z.B. in *E. coli* exprimieren. Prinzipiell kann jeder Sequenzabschnitt als Epitop, der Sequenzabschnitt des Antigens, der von den Antikörpern erkannt wird, dienen. Bezüglich des A β -Peptids hat sich herausgestellt, dass der N-Terminus, speziell die Sequenz $_3\text{EFRHD}_7$, das dominante Epitop, zu sein scheint. Neben dieser Sequenz dient auch die zentrale Domäne A β (13-26) (Solanezumab, LY2062430) oder der C-Terminus (Ponezumab, PF-04360365) als Epitop. Die Bindung kann jedoch auf unspezifischen elektrostatischen Wechselwirkungen, wie zum Beispiel auf hoch organisierten anionischen Oberflächen, beruhen.^[499, 500]

6.5.4 Ergebnisse und Studien

Zahlreiche Arbeitsgruppen konnten bereits die Wirksamkeit der aktiven und passiven Immunisierung in Bezug auf amyloidogene Peptide unter Beweis stellen. Ein bekanntes Beispiel des Ansatzes der aktiven Immunisierung ist der Impfstoff AN-1792 von Elan Pharmaceuticals. Hierbei handelt es sich um das synthetische A β (1-42) Peptid, gebunden an ein Saponin. Die Ergebnisse der Studien an APP-transgenen Mäusen waren umfangreich und sehr vielversprechend, jedoch führte der Impfstoff in der ersten großen klinischen Studie 2001 bei 6% der Patienten zu Meningoenzephalitis und anderen Entzündungserscheinungen im Gehirn.^[501, 502] Die Studie wurde daraufhin abgebrochen. Folgestudien konnten aber zeigen, dass die Immunisierung mit AN-1792 zur Reduzierung von amyloiden Ablagerungen und Reduzierung von neuronalen Schäden führte, ohne jedoch die Demenzercheinungen zu verhindern.^[503, 504] Bapineuzumab (AAB-001, ELN115727) ist ein Beispiel für den Ansatz der

Tabelle 3: Therapeutische Wirkstoffe in der Entwicklung (nach Lit.^[505])

	Epitop	Klinische Studien	Applikation
aktiv:			
AFFITOPE AD02	Synthetisches Peptid, das den N-Termin von A β imitiert.	II	subkutan
ACC-001	A β (1-7)	II	intramuskulär
passiv:			
Solanezumab (LY2062430)	A β (13-28)	III	intravenös
Ponezumab (PF-04360365)	A β (33-40)	II	intravenös
Bapineuzumab (AAB-001, ELN115727)	A β (1-5)	III	intravenös

passiven Immunisierung, für die ebenfalls Nebenwirkungen, wie die Entstehung von Hirnödemen und intrazerebrale Blutungen, festgestellt wurden.^[505] Möglicherweise ist einer der Gründe für die bisher eher enttäuschenden Ergebnisse neben der Feststellung einiger Nebenwirkungen, dass die Konzentration auf das A β -Peptid zu kurz greift, da Entzündungserscheinungen oder auch das Entstehen von amyloiden Aggregaten des Tau-Proteins außer Acht gelassen werden.^[477] Zurzeit befindet sich eine weitere Reihe von immunotherapeutischen Ansätzen in klinischen Studien, wobei die Ergebnisse noch abzuwarten sind (siehe Tabelle 3).^[505] Doch nicht zuletzt das Beispiel AN-1792 zeigt, dass der Weg zu einem Impfstoff gegen Alzheimer noch weit ist.^[477]

6.6 Zusammenfassung

Die Diversität zuvor beschriebener nicht-peptidischer Verbindungen ist auffallend, was darauf hindeutet, dass diese Inhibitoren an unterschiedlichen Stellen und durch verschiedene Mechanismen an das amyloidogene Protein bzw. Peptid binden und ihre Wirkung entfalten.^[61] Die Spezifität der einzelnen Verbindungen ist fragwürdig. Die fehlende strukturelle Ähnlichkeit organischer Verbindungen zur Inhibition der Aggregation amyloider Fibrillen erschwert es zudem Schlussfolgerungen zur Beziehung zwischen Struktur des Inhibitors und dessen Aktivität zu treffen und allgemeine Grundlagen eines rationalen Designs von organischen Verbindungen zur Inhibition der Fibrillenbildung zu erschließen.^[61, 189] Aus der Enzymforschung hat man gelernt, dass Inhibitoren in der Interaktion mit größeren Proteinen sehr effektiv sein können. Jedoch scheint es bei der Inhibierung der amyloiden Aggregation ungleich schwerer zu sein, ähnlich effektive Inhibitoren zu entwickeln. Oft sind im Vergleich zu anderen medizinischen Wirkstoffen hohe Konzentrationen notwendig, um einen Effekt zu erzielen. Dies lässt sich möglicherweise auf das Fehlen eines aktiven Zentrums wie bei Enzymen oder Rezeptoren zurückführen. Die Natur des Aggregationsprozesses zu Amyloide ist dagegen eher mit Polymerreaktionen vergleichbar.^[226] Vor diesem Hintergrund scheint es sinnvoll, sich auf die Entwicklung von Modulatoren zu konzentrieren, welche die Aggregation so beeinflussen, dass keine toxischen amyloiden Aggregaten entstehen.^[226] Wie verschiedene Beispiele zeigen, lässt sich auch auf diesem Weg das Ausmaß toxischer Oligomere reduzieren.^[225] Das Beispiel TTR-Inhibitoren und u.a. die Metall-Chelatoren zeigen, dass Ansätze des rationalen Designs möglich sind, jedoch sind sie am wirkungsvollsten, wenn sie mit dem amyloidogenen Proteinen nicht im amyloiden Zustand, sondern im nativen Zustand interagieren und sie stabilisieren. So lässt sich der

schwierige polymere Charakter der amyloiden Aggregation umgehen und gleichzeitig die Bildung toxischer Oligomere verhindern.

Die zahlreichen Ansätze der Entwicklung peptidbasierter Inhibitoren machen deutlich, dass sie sich eher für ein rationales Design eignen. Primärer Ansatz ist die Vermittlung der Bindung und Inhibition durch amyloidogene Kernsequenzen, die auf vielfältige Weise modifiziert werden. Nachteile, wie eine geringe metabolische Stabilität und Bioverfügbarkeit, lassen sich durch diverse Modifikation optimieren. Doch in diesem Ansatz liegt *per se* schon die Zielstruktur im amyloiden Zustand als Ausgangspunkt begründet. Auch der im Kapitel 6.3.3.2.6 *Strukturbasiertes Design* beschriebene Ansatz von J. W. Kelly geht von amyloiden Kernsequenzen im aggregierten Zustand aus. Möglicherweise können so identifizierte Inhibitoren die Bildung von toxischen Oligomeren nicht nur nicht verhindern, sondern sie sogar begünstigen. Ansätze, die speziell die Konformation im nicht-amyloiden Zustand ansprechen, sind daher besser geeignet, die Bildung toxischer Oligomere zu verhindern.

Alle Beispiele geben einen Einblick in die Diversität der Inhibitionsmechanismen und deuten die Möglichkeit des rationalen Designs von Inhibitoren an, das jedoch durch ausreichende vorklinische Studien bestätigt werden muss. Zum Beispiel eröffnet die Kombination von amyloid-bindenden Molekülen mit Metall-komplexierenden Einheiten zu bifunktionalen Inhibitoren der Metall-induzierten amyloiden Aggregation ein neues Feld des struktur-basierten Designs von nicht-peptidischen Inhibitoren.

Die naturwissenschaftliche Forschung bringt immer wieder potentielle Inhibitoren hervor. Jedoch müssen sie die Anforderungen eines pharmazeutisch nutzbaren Wirkstoffes erfüllen. Die Ergebnisse der bereits in klinischen Studien getesteten Verbindungen sind gemischt und die Entwicklung von nicht-peptidischen Inhibitoren für die verschiedenen Amyloidosen ist und bleibt eine Herausforderung. Zudem stehen Erkrankungen wie die Alzheimer-Krankheit am Ende einer langen Reihe von verschiedenen Ereignissen und die verbindenden Elemente sind z.T. unbekannt. In der Wissenschaft ist man sich daher nicht einig, welches dieser Elemente den entscheidenden Ansatzpunkt zur Therapie ermöglicht. Möglicherweise greift die Konzentration auf das amyloidogene Protein bzw. Peptid zu kurz. Der komplexe Zusammenhang zwischen amyloidogener Spezies und Entwicklung der Toxizität und anderer begleitender Prozesse, wie z.B. Entzündungsreaktionen und Phänomene der gegenseitigen Beeinflussung (*cross seeding*) verschiedener amyloidogener Proteine werden oft vernachlässigt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass es zahlreiche, verschiedene und durchaus erfolgreiche Ansätze gibt. Jedoch gestaltet sich die Übertragung der erforschten Prinzipien, die der inhibitorischen Wirkung zu Grunde liegen, in entsprechende Therapien schwierig.

Trotz der Identifikation zahlreicher Verbindungen, die in der Lage sind, in den Prozess der Aggregation einzugreifen, führte dies bisher nicht zu einer entsprechenden wirkstoffbasierten Therapie. Es wird deutlich, dass die Entwicklung von neuen Strategien mit entsprechenden Wirkstoffen noch immer eine bedeutende Aufgabe der wissenschaftlichen Forschung darstellt.

7 Amyloide Modellpeptide

Zahlreiche Studien ergaben, dass auch Peptide, die in keinem Zusammenhang mit Erkrankungen stehen und z.B. auf *de novo*-Design beruhen, in der Lage sind, amyloide Fibrillen zu bilden. Sie besitzen die gleichen charakteristischen Eigenschaften, wie Peptide, die in Verbindung mit Amyloidosen stehen. Zur Unterscheidung werden amyloide Fibrillen, die auf nicht natürlichen Sequenzen beruhen, als amyloid-ähnlich^[506] beschrieben. Jedoch wird in der wissenschaftlichen Literatur häufig nicht klar zwischen beiden Formen getrennt.^[4] Diese Peptide können als Modellpeptide des Amyloidbildungsprozesses dienen und sind eine sinnvolle Alternative zu den natürlichen amyloidogenen Peptiden und Proteinen, die mit einer Reihe von Nachteilen verbunden sind. Zu den Nachteilen gehören die allgemeine schlechte Löslichkeit, die erschwerte Synthese mit bekannten Peptidsyntheseverfahren aufgrund des starken Aggregationsverhaltens sowie komplexe Aggregationsmechanismen. In Kapitel 2.3 *Molekulare Grundlagen und interne Struktur amyloider Fibrillen* wurde deutlich, dass die Fibrillenbildung u.a. auf einer empfindlichen Balance zwischen den spezifischen Wechselwirkungen zwischen den Seitenketten in kurzen Peptidfragmenten beruht. In größeren Proteinen kann dies durch verschiedene andere Wechselwirkungen überlagert werden. Die Fähigkeit, amyloide Fibrillen zu bilden, kann darüber hinaus auf kurze amyloidogene Abschnitte in der Primärsequenz natürlicher Proteine, den amyloidogenen Kernsequenzen, zurückgeführt werden. Diese kurzen amyloidogenen Abschnitte zeigen ähnlich toxische Eigenschaften wie die vollständigen amyloidogenen Proteine und Peptide.^[507]

Einfache Modellpeptide können helfen, diese Nachteile zu überwinden. Sie sind synthetisch leicht zugänglich und lassen sich für verschiedenste spezifische Fragestellungen modifizieren. Der Vorteil und die Nützlichkeit kleinerer einfacher Modellsysteme liegt daher in der Möglichkeit, die zum komplexen Prozess der Amyloidbildung beitragenden spezifischen Wechselwirkungen zu untersuchen. Modellsysteme bieten außerdem die Möglichkeit, sowohl die Inhibition der Aggregation zu untersuchen als auch die Inhibierung der Toxizität und sie können zur Beschleunigung der Suche nach therapeutischen Ansätzen beitragen.^[68, 508] Darüber hinaus lassen sich die gewonnenen Erkenntnisse zur Entwicklung von Peptidsequenzen zur Bildung von supramolekularen Aggregaten nutzen. Sie bieten z.B. die Möglichkeit der Konstruktion von Materialien im Nanometerbereich. Solche Materialien können Anwendung in der Biotechnologie und synthetischen Biologie (*tissue engineering*)

finden^[509-513] oder auch als Grundlage anderer Technologien^[89] ohne biologischen Hintergrund dienen.

7.1 Fragmente amyloidogener Peptide und Proteine

Kurze amyloidogene Peptidfragmente bilden eine Grundlage für die Amyloidbildung. Daher sind kleinere Modellpeptide möglicherweise besser geeignet als die vollständigen Peptide und Proteine, die molekularen Grundlagen der amyloiden Aggregation und deren Inhibition zu untersuchen.^[47] So würden Mutationen in der amyloiden Kernsequenz in kurzen entsprechen Modellpeptiden lediglich die Aggregationseigenschaften verändern. Im vollständigen Peptid und Protein führt dies möglicherweise zur Destabilisierung des gesamten Peptids bzw. Proteins, was die Ableitung von Schlussfolgerungen verkompliziert.^[47] Die Arbeit über das *de novo* designte Hexapeptid STVIIIE konnte einen Einblick in das sensible Gleichgewicht zwischen den spezifischen Wechselwirkungen der Seitenketten und den elektrostatischen Wechselwirkungen ergeben (siehe Abschnitt 2.3.1 *Amyloidogene Kernsequenzen*). Das daraus abgeleitete strukturelle Modell steht dabei im Einklang mit der strukturellen Organisation von natürlichen amyloidogenen Peptiden und Proteinen. Darüber hinaus zeigen zahlreiche Arbeiten, dass Untersuchungen an Peptidfragmenten, die über die amyloidogene Kernsequenz hinausgehen wie z.B. A β (25-35)^[405], A β (16-28)^[514] und IAPP(17-29)^[515], ebenfalls wertvolle Einblicke in den Aggregationsprozess und die Mechanismen der Inhibition erlauben.

7.2 *De novo*-Design amyloidogener Modellpeptide

Das *de novo* Design amyloidogener Modellpeptide geht von unterschiedlichen Grundstrukturen aus, zum einen von der β -Faltblattstruktur und zum anderen von der α -Helix.^[516] Ein wesentliches Strukturmerkmal amyloider Aggregate ist die β -Faltblattstruktur. Aber nicht jede β -Faltblattstruktur führt zu amyloiden Aggregaten. Es gibt strukturelle Unterschiede, die auf die Orientierung der Seitenketten zueinander beruhen. Und trotzdem ist es nachvollziehbar, dass eine ganze Reihe von Ansätzen des Designs amyloidogener Modellpeptide von der β -Faltblattstruktur ausgeht. Zu den grundlegenden Designregeln gehört die Verwendung von Aminosäuren, welche die β -Faltblatt-Konformation bevorzugen. Eine grundsätzliche Strategie bei der Anordnung der Aminosäuren innerhalb einer Primärstruktur ist ein sich wiederholendes Muster von abwechselnd hydrophoben (H) und polaren (P) Aminosäureresten. Die einzelnen konkreten Ansätze sind z.B. in der Dissertation von Dr. Kevin Pagel beschrieben und sollen hier nicht diskutiert werden.^[516] Wesentliche Grundlage dieser Arbeit sind amyloidogene Modellpeptide, die von der α -Helix

ausgehen und Einblick in den konformationellen Übergang von der α -Helix zur β -Faltblattstruktur sowie der anschließenden Aggregation zu amyloiden Fibrillen geben können. Grundlegende Designkriterien sollen in den folgenden Kapiteln genauer besprochen werden.

7.2.1 Design struktureller Ambivalenz

Der Prozess der Bildung amyloider Aggregate geht mit der Änderung der Konformation vom nativen und funktionalen Zustand zu hochorganisierten β -Faltblatt-reichen Amyloiden Fibrillen einher. Ein Teil natürlicher amyloidogener Proteine und Peptide weist im nativen Zustand eine helikale Struktur auf oder deren Amyloidbildungsprozess verläuft über helikale Intermediate. Folglich muss sich zunächst die Konformation von α -Helix zu β -Faltblatt ändern, bevor sich die einzelnen Peptide zur *cross- β* -Struktur zusammenlagern und amyloide

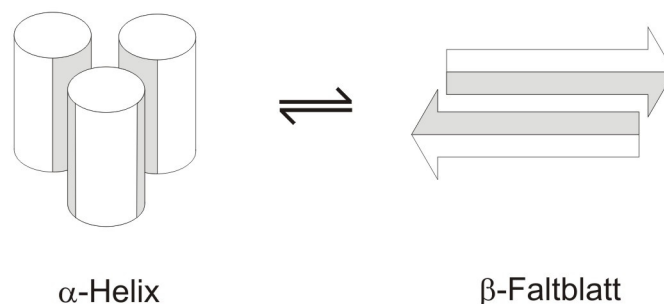


Abbildung 50: Schematische Darstellung des Konformationsübergangs zwischen aggregiertem α -helikalem Zustand, z.B. Coiled Coil-Struktur, und einer β -Faltblatt-Struktur. Graue Flächen entsprechen einer hydrophoben Wechselwirkungsdomäne (verändert nach Lit^[517]).

Fibrillen gebildet werden können (siehe Kapitel 3 *Mechanismen der Bildung amyloider Fibrillen*). Das Design von schaltbaren Modellpeptiden, die Einblicke in diesen Prozess der Bildung amyloider Aggregate einschließlich des zuvor geschilderten konformationellen Übergangs geben sollen, muss verschiedene Eigenschaften aufweisen.^[518, 519] Dazu gehören zum einen die strukturelle Ambivalenz, ähnlich den natürlichen amyloidogenen Sequenzen, und zum anderen eine Funktionalität, die für spezifische Stimuli sensibel ist und somit auf Veränderung der Umgebungsbedingungen reagiert.^[518, 519] Eine der ersten Arbeiten zum Design von Modellpeptiden, welche die Untersuchungen dieses konformationellen Übergangs ermöglicht, wurde von Mutter *et al.* 1991 veröffentlicht.^[517] Diese Arbeit bildet eine wesentliche Grundlage einer ganzen Klasse von Modellpeptiden, die in der wissenschaftlichen Literatur als *Switch*-Peptide bezeichnet werden. Sein Konzept besteht in der Kombination von zwei unterschiedlichen Konformationen in einer Peptidsequenz. Den

Ausgangspunkt bildet eine 16 Aminosäuren lange Sequenz, bestehend aus alternierend hydrophoben und polaren Aminosäureresten (Abbildung 51, I). Diese Anordnung besitzt eine starke Tendenz zur Bildung von β -Faltblatt-Strukturen im wässrigen Milieu, indem sich die hydrophoben Seitenketten zueinander und die polaren Seitenketten zum Lösungsmittel hin orientieren. Stellt man jedoch diese in Sequenz in einer helikalen Anordnung dar, ordnen sich die hydrophoben und polaren Seitenketten gleichmäßig um den helikalen Zylinder und alle Seitenketten sind zum Lösungsmittel hin orientiert. Es wird deutlich, dass eine helikale Anordnung dieser Sequenz aus diesem Grund nicht wahrscheinlich ist. Auf der Grundlage einer amphipathischen Helix mit einer hydrophoben Domäne und einer hydrophilen Domäne kann durch den selektiven Austausch von hydrophoben und polaren Aminosäuren gegen eine neutrale Aminosäure die Tendenz zur Bildung von helikalen Strukturen erhöht werden (Abbildung 51, III, IV). Eine „neutrale“ Aminosäure stellt die Aminosäure Alanin dar, die weder polar noch sonderlich stark hydrophob ist und zudem eine hohe Tendenz zur Ausbildung helikaler Strukturen besitzt.^[520] Das Ergebnis ist eine Peptidsequenz, die gleichzeitig Eigenschaften von α -Helix und von β -Faltblatt-Strukturen in sich vereint und somit die strukturelle Ambivalenz vieler natürlicher amyloidogener Peptide und Proteine widerspiegelt.^[517, 521]

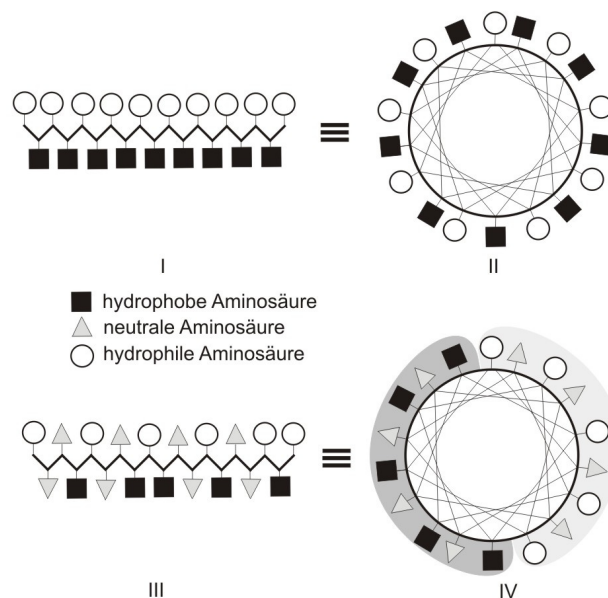


Abbildung 51: Das Design von Switch-Peptiden. I: Ausgangsequenz einer β -Faltblattstruktur; II: Helikale Darstellung der Ausgangssequenz; III: Sequenz eines Switch-Peptids; IV: Helikale Darstellung eines Switch-Peptids (graue Domänen verdeutlichen den amphipathischen Charakter) (verändert nach Lit.^[517] 1991 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co).

7.2.2 Coiled Coil-basierte Switch-Peptide

Das Design einer ganzen Reihe verschiedenster *Switch*-Peptide macht sich eines der bekanntesten Faltungsmotive der Natur zu Nutze, das α -helikale *Coiled Coil*-Faltungsmotiv. *Coiled Coil*-Peptide bestehen aus zwei bis fünf α -Helices, die sich zu einer Superhelix umeinander winden. *Coiled Coil*-Domänen vermitteln über die Interaktion der Helices Protein-Protein-Wechselwirkungen, Oligomerisierung und verschiedene andere Funktionen sowie die Aggregation vom amyloidogenen Proteinen.^[171, 522] Aufgrund der bedeutenden Rolle von *Coiled Coil*-Domänen bei Protein-Protein-Wechselwirkungen suchten Fiumara *et al.* nach *Coiled Coil*-Sequenzmustern in amyloidogenen Q/N-reichen und poly-Q Proteinen (Huntington) und fanden charakteristische Sequenzen, welche die Q/N-reichen und poly-Q Proteine flankieren oder auch überlappen. Mit umfangreichen experimentellen Arbeiten am Q/N-reichen Hefe Prion Ure2, dem *Aplysia* Prion CPEB und dem menschlichen poly-Q Protein Huntington konnte man zeigen, dass *Coiled Coil*-Domänen sowohl die Aktivität als auch die Aggregation regulieren und sie postulieren daher ein Modell, in dem *Coiled Coil*-Domänen eine entscheidende Rolle in der Aggregation von Q/N-reichen und poly-Q Proteinen spielen.^[171]

Das *Coiled Coil*-Motiv bietet die Möglichkeit der Nutzung einer klaren Sequenz-Struktur-Beziehung bezüglich der Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur^[523-526] und eignet sich daher gut für das *de novo* Design von Modellpeptiden.^[518] Die Primärstruktur weist eine charakteristische sich wiederholende Sequenz aus sieben Aminosäuren auf (*heptad repeat*), die typischerweise mit den Buchstaben *a, b, c, d, e, f* und *g* beschrieben werden. Die Positionen *a* und *d* sind mit hydrophoben Aminosäuren besetzt, die das erste Erkennungsmotiv durch die Ausbildung eines hydrophoben Kerns bilden. In den Positionen *e* und *g* befinden sich häufig entgegengesetzt geladenen Aminosäuren wie z.B. Glutamat und Lysin. Sie ermöglichen stabilisierende intermolekulare elektrostatische Wechselwirkungen und haben einen Einfluss auf die Orientierung der Helices zueinander. Die Positionen *b, c* und *f* sind zum Lösungsmittel exponiert und oft mit hydrophilen Aminosäuren besetzt. Die einzelnen Helices im *Coiled Coil*-Faltungsmotiv besitzen somit eine hydrophile Domäne (Position *b, c, e, f, g*) und eine hydrophobe Domäne (Position *a, d*) und sind folglich amphipatisch. Das Design verschiedenster *Switch*-Peptid Systeme nutzt den amphipatischen Charakter für den konformationellen Übergang von α -Helix- zu β -Faltblatt-Konformation. Der amphipatische Charakter ist die thermodynamische Treibkraft sowohl für die Faltung und Zusammenlagerung der α -helikalen *Coiled Coil*-Struktur als auch für die

Faltung einer β -Faltblattstruktur und damit auch eine der Grundlagen der Aggregation zu amyloiden Fibrillen (siehe Kapitel 5.1 Die Bedeutung α -helikaler Intermediate).^[518, 521]

Mihara *et al.* veröffentlichten eine Arbeit über *Coiled Coil*-basierte *Switch*-Peptide mit einer Länge von 14 Aminosäuren. Zwei Helices wurden jeweils am C-Terminus mit Hilfe von β -Alanin und zwei Cysteinresten kovalent verbunden. Am N-Terminus befand sich eine Adamantan-Gruppe. Dieses *Switch*-Peptid mit Namen Ad-2 α durchläuft im neutralen wässrigen Medium eine konformationelle Änderung von α -Helix zu β -Faltblattstrukturen und bildet amyloide Aggregate in Abhängigkeit von der Zeit.^[528, 529]

Im Gegensatz zum Ansatz von Mihara konnte an mehreren Beispielen gezeigt werden, dass die Generierung einer strukturellen Ambivalenz innerhalb eines *Coiled Coil*-Peptids elegant durch die Einführung von Aminosäuren mit einer höheren Propensität für β -Faltblattstrukturen in den lösungsmittlexponierten Positionen *b*, *c*, und *f*, generiert werden kann (Abbildung 52, B, C).^[527, 530-532] Die erhöhte Tendenz zu Bildung von amyloiden Aggregaten kann auf die höhere Propensität für β -Faltblattstrukturen oder aber auch auf die Stabilisierung der amyloiden Struktur durch Bildung einer hydrophoben Domäne mit den hydrophoben Aminosäuren in Position *a* und *d* des *Coiled Coil*-Peptids zurückgeführt werden.^[518, 530, 531]

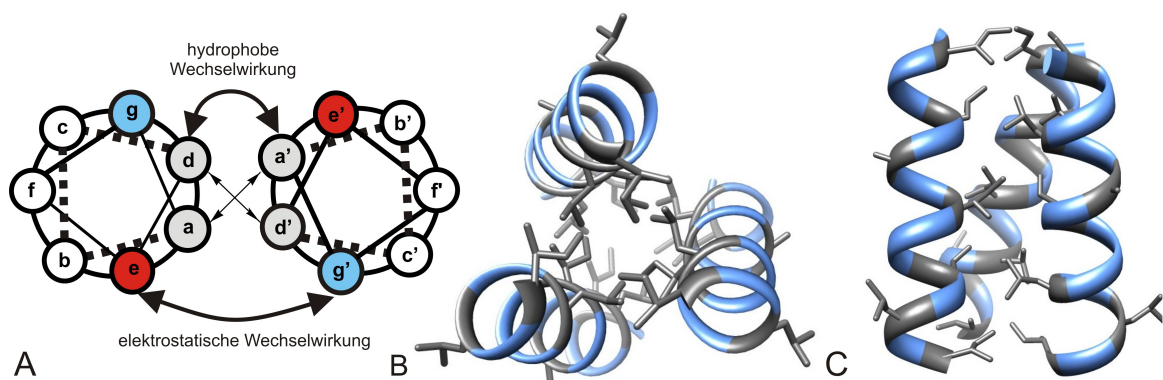


Abbildung 52: (A) Helical Wheel-Darstellung eines *Coiled Coil*-Dimers (Die Farben rot und blau stehen für entgegengesetzte Ladungen, die stabilisierende elektrostatische Wechselwirkungen ermöglichen). (B) und (C) Struktur des 17 Aminosäuren langen amyloiden $cc\beta$ -Trimers (Hydrophobe Aminosäuren Leucin, Isoleucin und Alanin in Position *a*, *d* und der für amyloide Eigenschaften entscheidenden Position *f* in grau) (erstellt mit PDB Code 1S9Z nach Lit.^[527])

Die Primärstruktur von *Switch*-Peptiden weist neben der strukturellen Ambivalenz meist Funktionalitäten auf, die sie sensibel gegenüber spezifischen Stimuli machen.^[518] Dies ermöglicht zum einen die Kontrolle der Bildung von amyloiden Aggregaten und zum anderen Untersuchungen zum Einfluss verschiedenster Faktoren auf das sensible Gleichgewicht zwischen den Konformationen. Erst durch die Wirkung der Faktoren werden die strukturellen

und molekularen Voraussetzungen für die Aggregation zu amyloiden Fibrillen, wie z.B. partielle Entfaltung, erfüllt (siehe Kapitel 3 *Mechanismen der Bildung amyloider Fibrillen*). Zu den Faktoren gehören Temperatur^[527, 530, 533], pH-Wert^[532, 534, 535], Ionenstärke^[534], Phosphorylierung^[536-538] und Glykosylierung^[536] sowie Licht^[539] und Metall-Ionen^[540]. Darüber hinaus weisen einige *Switch*-Peptide Funktionalitäten auf, die erst aufgrund einer O-N bzw. S-N Acylverschiebung eine Aggregation zu amyloiden Fibrillen ermöglichen.^[541-543] Die strukturelle Änderung von einem amyloidogenen *Coiled Coil*-Trimer zu einem β -Faltblatt-Trimer als entscheidender Schritt in der Bildung amyloider Aggregate wurde *in silicio* mit Hilfe von MD-Simulationen von Strodel *et al.* untersucht.^[544] Es wurden zwei verschiedene Prozesswege identifiziert: (I) Eine interne Änderung der Konformation von α -Helix zur β -Faltblattstruktur und (II) einen Prozessweg, der die Dissoziation zu Monomeren und darauf folgend zur strukturellen Änderung und Assemblierung in ein β -Faltblatt-Trimer führt. Diese Arbeit gibt einen Einblick in den Prozess der Bildung amyloider Aggregate aus einer *Coiled Coil*-Struktur heraus.

7.3 Amyloidogene Kernsequenzen in Kombination mit dem *Switch*-Peptid-Ansatz

Host-Guest Switch-Peptide stellen eine besondere Klasse von Modellpeptiden dar. Grundlegende Idee dieses Ansatzes ist die Kombination aus einer amyloidogenen Kernsequenz eines natürlichen amyloidogenen Peptids oder Proteins mit einer *de novo* designten Peptidsequenz, ergänzt durch eine schaltbare Funktionalität. Durch diesen Ansatz werden die Vorteile der Verwendung von einfachen Modellpeptiden mit der erhöhten wissenschaftlichen und medizinischen Relevanz natürlicher amyloidogener Systeme kombiniert.

Camus *et al.* entwarfen ein Modell-Peptid mit der amyloidogenen Kernsequenz von Position 14 bis 24 des A β -Peptids, HQKLVFFAEDV, flankiert durch Sequenzen mit alternierenden Aminosäuren Leucin und Serin, die eine hohe Tendenz zur Bildung von β -Faltblattstrukturen besitzen.^[541] Durch die strategische Platzierung von *Switch*-Elementen auf der Basis der O-N Acyl-Migration am C- und N-Terminus der amyloidogenen Gastsequenz besitzt das Modellpeptid keine Struktur. Erst durch die Initiierung des O-N Acyl-Migration aufgrund der Änderung des pH-Wertes nach pH 7 liegt ein unmodifiziertes Peptidrückgrat vor und das *Switch*-Peptid bildet amyloide Fibrillen. Dieser Ansatz ist auch auf andere natürliche amyloidogene Sequenzen übertragbar. Auf diese Weise lassen sich viele Eigenschaften des Aggregationsprozesses schnell und einfach reproduzieren. Die Kombination der Erkenntnisse

aus dem Bereich der *de novo* designten *Switch*-Peptide mit natürlichen amyloidogenen Sequenzen ermöglicht mehr Kontrolle über den Aggregationsprozess und hilft, die Nachteile natürlicher Sequenzen zu überwinden.^[545-547] Damit leistet dieser Ansatz einen wichtigen Beitrag zur Forschung an amyloiden Aggregaten und zur Suche nach neuen Inhibitoren der Aggregation bzw. zur Optimierung bekannter Inhibitoren.^[541]

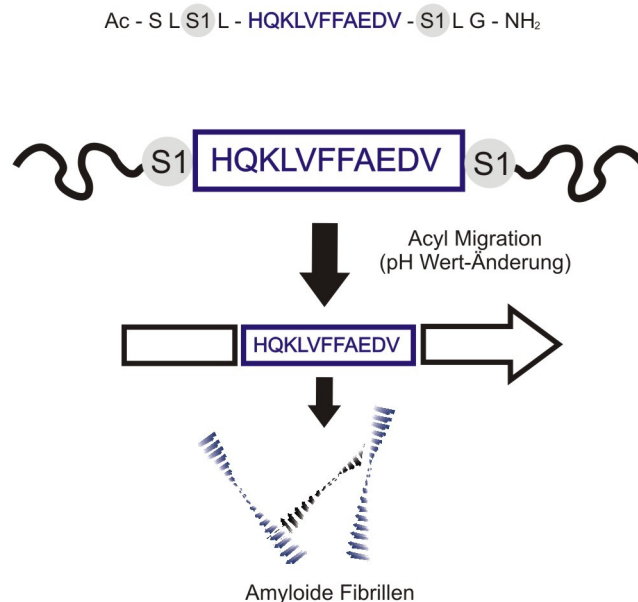


Abbildung 53: Design-Prinzipien eines Host-Guest Switch-Peptids (adaptiert nach Lit.^[541]).

8 Ziele der Arbeit

Bei einigen amyloidogenen Proteinen und Peptiden spielen helikale Intermediate eine entscheidende Rolle in der Aggregation zu amyloiden Fibrillen. Man nimmt an, dass die Helix-vermittelte Assoziation zu einer hohen lokalen Konzentration der amyloidogenen Kernsequenzen führt, was die Bildung von β -Faltblatt-reichen amyloiden Fibrillen ermöglicht und beschleunigt. Darüber hinaus zeigen einige natürliche amyloidogene Proteine und Peptide bereits in ihrem nativen Zustand eine α -helikale Struktur. Die Änderung der Konformation von der α -helikalen Struktur zur β -Faltblattstruktur ist daher der entscheidende Schritt im Prozess der Aggregation zu amyloiden Fibrillen. Auf dieser Grundlage beruht die Strategie, durch eine ausreichende Stabilisierung der α -helikalen Struktur durch geeignete Liganden die Inhibition dieses entscheidenden Schrittes zu ermöglichen und damit die gesamte amyloide Aggregation zu inhibieren. Diese Strategie der Inhibition hat mehrere Vorteile. Zum einen verhindert die Stabilisierung einer nativen α -helikalen Struktur aber möglicherweise auch die Stabilisierung von helikalen Intermediaten, die Bildung potentiell toxischer Oligomere. Zum anderen wird der proteolytische Abbau im Rahmen des zelleigenen Degradationsprozess erleichtert. Diese Strategie geht nicht von einer amyloidogenen Kernsequenz in gestreckter β -Faltblatt-Konformation aus und setzt nicht am Punkt der Elongation des amyloiden Polymerisationsprozesses an. Dadurch wird der aus der Perspektive der Inhibition schwierige Polymerisationscharakter der amyloiden Aggregation umgangen. Im Rahmen dieser Arbeit wird das Potential dieser Inhibitionsstrategie anhand von Modellpeptiden u.a. nach dem von Pagel *et al.* beschriebenen Konzept^[548] untersucht. Dazu werden amyloid-bildende Modellpeptide verwendet, die in ihrer Primärstruktur sowohl Elemente einer α -helikalen Sekundärstruktur als auch Elemente von β -Faltblattstrukturen aufweisen und somit eine ähnliche strukturelle Ambivalenz zeigen, wie sie in einigen natürlichen amyloidogenen Proteinen und Peptiden festgestellt werden kann (siehe Abschnitt 5.1 *Die Bedeutung α -helikaler Intermediate*). Die helikalen Elemente in den amyloidogenen Modellpeptiden werden durch stabile helikale Peptide über spezifische Wechselwirkungen angesprochen. Ziel ist es entweder, den nativ helikalen Zustand amyloidogener Peptide zu stabilisieren oder nativ ungefaltete Peptide in stabile helikale Oligomere zu überführen. Darüber hinaus soll die proteolytische Stabilität der verschiedenen Spezies untersucht werden. Ferner soll ein tieferer Einblick in die strukturelle Organisation der amyloiden Fibrillen der Modellpeptide gewonnen werden, was eine grundsätzliche Voraussetzung für die Inhibition der Aggregation ist.

9 Design der verwendeten Modellpeptide

9.1 Modellpeptide basierend auf dem *Coiled Coil*-Faltungsmotiv

Der Großteil der verwendeten Modellpeptide basiert auf dem *Coiled Coil*-Faltungsmotiv und wurde in vorangegangenen Arbeiten in der Arbeitsgruppe von Prof. Kokschi entwickelt. Die Entwicklung des Designs ist ausführlich in der Dissertation von Dr. Kevin Pagel beschrieben.^[516] Ausgangspunkt bildet das Design eines „idealen“ *Coiled Coil*-Peptids (VW02). Nach dem im Kapitel 7.2.2 *Coiled Coil*-basierte *Switch*-Peptide beschriebenen Ansatz gelang es durch die Einführung von Valinresten, die eine hohe Propensität für β -Faltblattstrukturen besitzen, in den lösungsmittel-exponierten *b*, *c*, und *f*-Positionen eine amyloidogene Peptidsequenz zu kreieren, die eine strukturelle Änderung von einem α -helikalen *Coiled Coil* zu β -Faltblatt-reichen amyloiden Aggregaten durchläuft (siehe

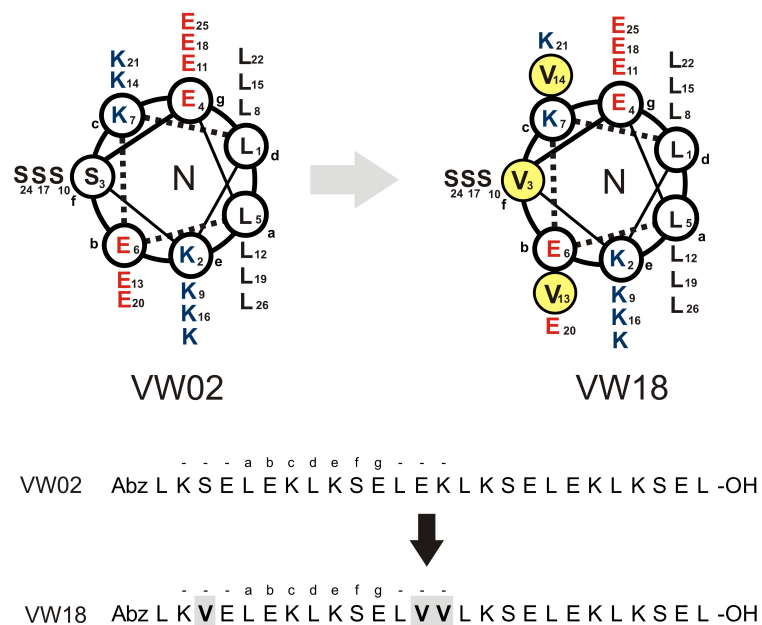


Abbildung 54: Helical Wheel Darstellung des Modellpeptids VW02 („ideales“ *Coiled Coil*) und VW18 (amyloidogen).

Kapitel 10.3 *Coiled Coil*-basiertes Modellpeptid VW18). Durch die Einführung der Valinreste wird zum einen die Tendenz zur Bildung β -Faltblatt-reicher amyloider Aggregate erhöht. Zum anderen ergibt sich durch die Einführung von Valin am N-Terminus ein charakteristisches alternierendes Muster von hydrophoben und hydrophilen Aminosäuren, was die Tendenz zur Bildung einer β -Faltblattstruktur erhöht. Außerdem ergibt die Einführung von zwei Valinresten im Zentrum der Sequenz eine hydrophobe Domäne mit den

Leucinresten in *a* und *d* Position, ähnlich zu den amyloidogenen Kernsequenzen natürlicher Peptide und Proteine, was als ein wesentlicher Faktor der Aggregationstendenz diskutiert wurde.^[531] Diese Peptidsequenz bildet die Grundlage für eine ganze Reihe weiterer vielseitiger amyloidogener Modellpeptide mit verschiedenen Eigenschaften. Durch die Modifizierung der Primärsequenz gelang es, *Coiled Coil*-basierter *Switch*-Peptide zu entwickeln, welche die Untersuchung verschiedenster Einflussfaktoren des Amyloidbildungsprozesses ermöglichen. Dazu gehören der Einfluss des pH-Werts^[532, 534], der Ionenstärke^[534], der Phosphorylierung^[536-538] und Glykosylierung^[536] sowie Metall-Ionen^[540, 549-551] und Nanopartikel^[552] als auch der Einfluss der hydrophob-hydrophilen Oberflächen.^[549-551] Weitere Designspezifitäten sowie die ausführliche Charakterisierung der einzelnen amyloidogenen Modellpeptide werden im jeweiligen Kapitel 10 *Charakterisierung der Modellpeptide* beschrieben bevor in Kapitel 11 auf die Inhibition der Bildung amyloider Aggregate eingegangen wird.

9.2 Modellpeptide auf Basis einer amphipathischen Helix

Eine ganze Reihe natürlicher amyloidogener Peptide und Proteine weisen keine Charakteristika einer *Coiled Coil*-Struktur auf, sind aber trotzdem in der Lage, helikale Strukturen auf der Basis einer amphipathischen Helix zu bilden, wie z.B. das A β -Peptid oder IAPP (siehe Abschnitt 5.1 *Die Bedeutung α -helikaler Intermediate*). Zudem wird in der Dissertation von Dr. Kevin Pagel deutlich, dass das Design *Coiled Coil*-basierte *Switch*-Peptide empfindlich von der Position der hydrophoben Valinreste, aber auch von der Verteilung der polaren und geladenen Aminosäuren abhängig ist. Damit ist das Design gerade in Bezug auf die Einführung von natürlichen amyloidogenen Sequenzen sehr begrenzt. Im Hinblick auf die Aufgabenstellung, d.h. die Inhibition der Bildung amyloider Aggregate durch die Stabilisierung helikaler Strukturen, aber auch inspiriert durch die Arbeit von Arslan *et al.*^[465] (siehe Abschnitt 6.3.3.2.7 *Stabilisierung von β -Faltblatt-Strukturen im nicht amyloiden Zustand*), wurde die Auswahl an Modellpeptiden erweitert. Grundlage bildet die allgemeine und im Vergleich zum *Coiled Coil* weniger durch die strikte Abfolge von polaren und hydrophoben Aminosäuren begrenzte amphipathische Helix. Das einzige Kriterium ist eine hydrophobe und hydrophile Domäne entlang des helikalen Zylinders.

Verschiedene Überlegungen führten zum Design einer amphipathischen Helix α -AH. Es weist eine im Vergleich zu einer *Coiled Coil*-Sequenz ausgedehntere hydrophobe Domäne auf, über die einzelne amphipathische Helices miteinander agieren könne (Abbildung 55). Im Design von α -AH besteht die hydrophobe Domäne aus Leucinresten, eine hydrophobe Aminosäure mit einer relativ hohen helikalen Propensität.^[520] Die hydrophile Domäne weist

die geladenen Aminosäuren Glutamat und Lysin auf, ebenfalls Aminosäuren mit einer hohen helikalen Propensität.^[520] Darüber hinaus befinden sich die entgegengesetzt geladenen Aminosäuren Lysin und Glutamat in i und $i+4$ Position, so dass sie interhelikale Salzbrücken ermöglichen, die ebenfalls die helikale Struktur stabilisieren. Die restlichen Positionen werden durch die Aminosäure Alanin besetzt, welche die höchste helikale Propensität aufweist.^[520] Im zentralen Teil der Primärstruktur befindet sich mit dem Abschnitt LAAAL eine hydrophobe Domäne, die Grundlage für die Einführung amyloidogener Kernsequenzen bildet. Im Vergleich zu den *Coiled Coil*-basierten Modellpeptiden wurde die Länge der Primärstruktur auf 18 Aminosäuren reduziert. Ähnlich wie bei den *Coiled Coil*-basierten amyloidogenen Modellpeptiden wird durch die Einführung von Aminosäuren mit einer hohen

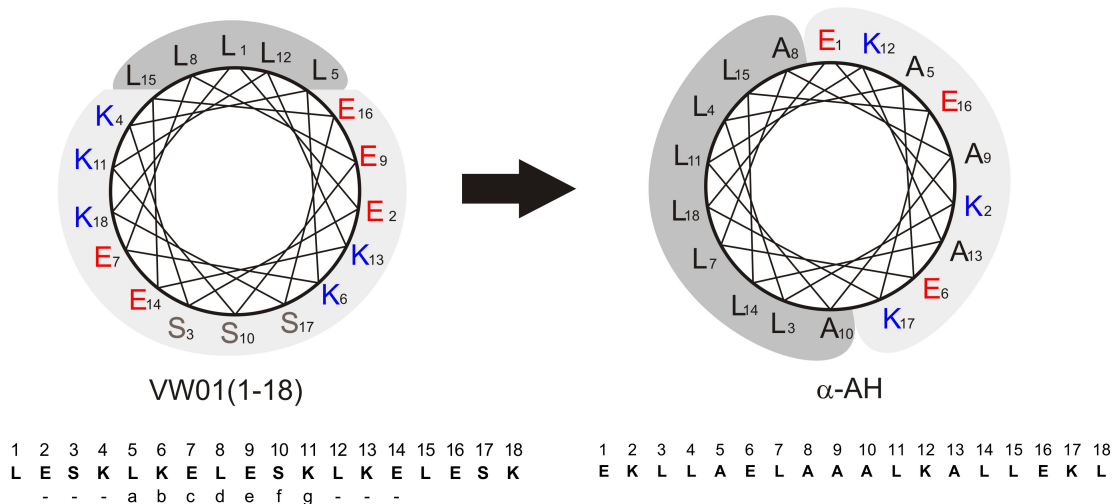


Abbildung 55: Helical wheel-Darstellung von α -AH (rechts) im Vergleich zum gleichlangen Coiled Coil-Peptid VW01 (links) (hydrophobe Domäne = dunkelgrau; hydrophile Domäne = hellgrau).

Propensität für die β -Faltblatt Sekundärstruktur in der hydrophilen Domäne die Tendenz zur Bildung von amyloiden Aggregaten erhöht. Durch die Einführung der Aminosäure Valin an Position 9 von α -AH konnte eine amyloidogene amphipathische Helix kreiert werden, die vergleichbar zu *Coiled Coil*-basierten amyloidogenen VW18 in Abhängigkeit von der Zeit die Struktur zu β -Faltblattreichen amyloide Fibrillen ändert. Die Charakterisierung der einzelnen Modellpeptide wird im folgenden Kapitel (siehe Kapitel 10 *Charakterisierung der Modellpeptide*) beschrieben bevor in Kapitel 11 auf die Inhibition der Bildung amyloider Aggregate eingegangen wird.

10 Charakterisierung der Modellpeptide

Zunächst werden Untersuchungen zur Charakterisierung der Modellpeptide beschrieben bevor in Kapitel 11 auf Untersuchungen zur Inhibition der Bildung amyloider Aggregate eingegangen wird.

10.1 Coiled Coil-basiertes Modellpeptid VW01

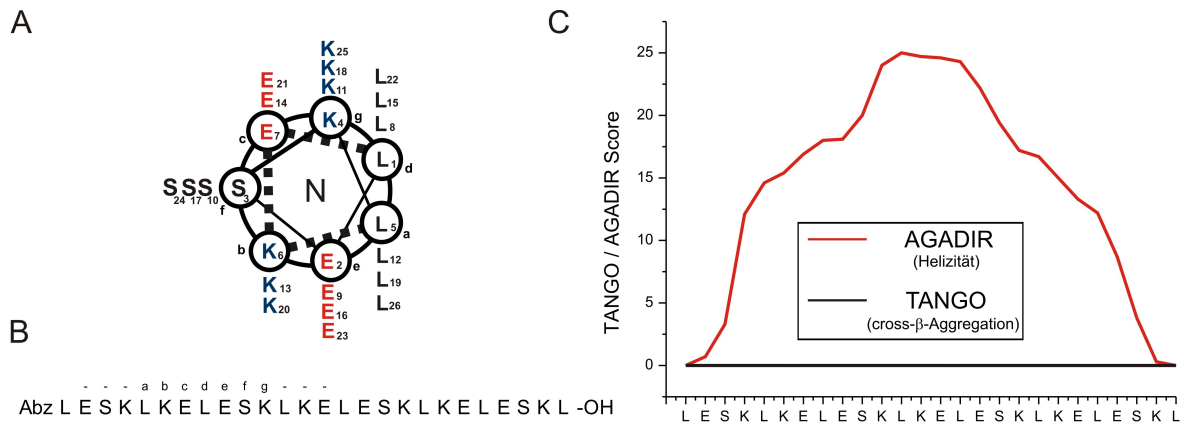


Abbildung 56: (A) Helical wheel – Darstellung und (B) Primärstruktur vom Modellpeptid VW01 (C) Ergebnis der Analyse der Primärsequenz von VW01 mit den Algorithmen TANGO und AGADIR bei pH 7.4 und Raumtemperatur.

Zusätzlich zur ersten und zweiten Erkennungsdomäne sind im Modellpeptid VW01 die Positionen b und c mit den geladenen Aminosäuren Glutamat und Lysin besetzt und so angeordnet, dass sie eine zusätzliche Stabilisierung der α -helikalen Struktur durch intramolekulare Wechselwirkung ermöglichen. Die Position f ist mit polaren Serinresten

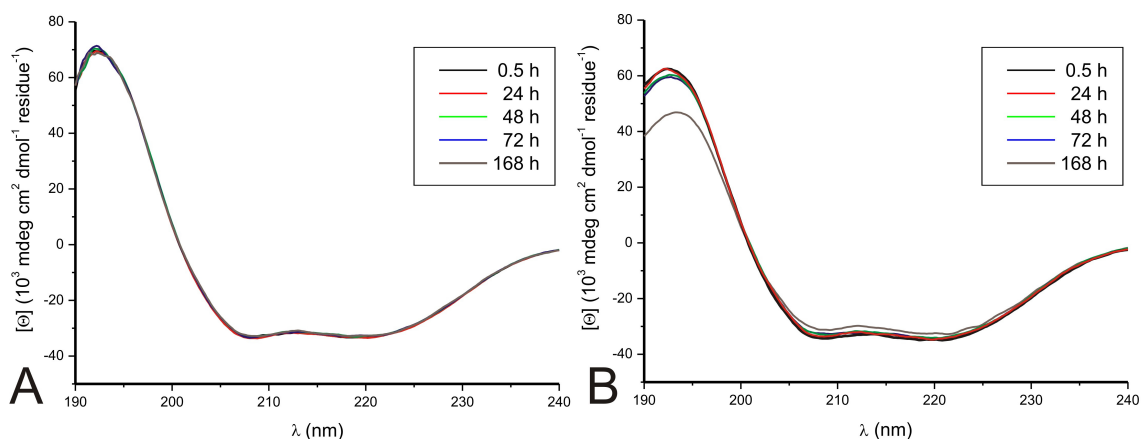


Abbildung 57: CD-Spektren von VW01, gemessen nach unterschiedlichen Inkubationszeiten (0 - 168 h), unterschiedlichen pH-Werten (4,0; 7,4 und 9,0) und unterschiedlichen Konzentrationen (100, 300 und 500 μM): pH 4,0: (A) 100 μM , (B) 300 μM (10 mM Azetat-Puffer, pH 4,0; 10 mM Phosphat-Puffer, pH 7,4; 10 mM Carbonat-Puffer, pH 9,0)

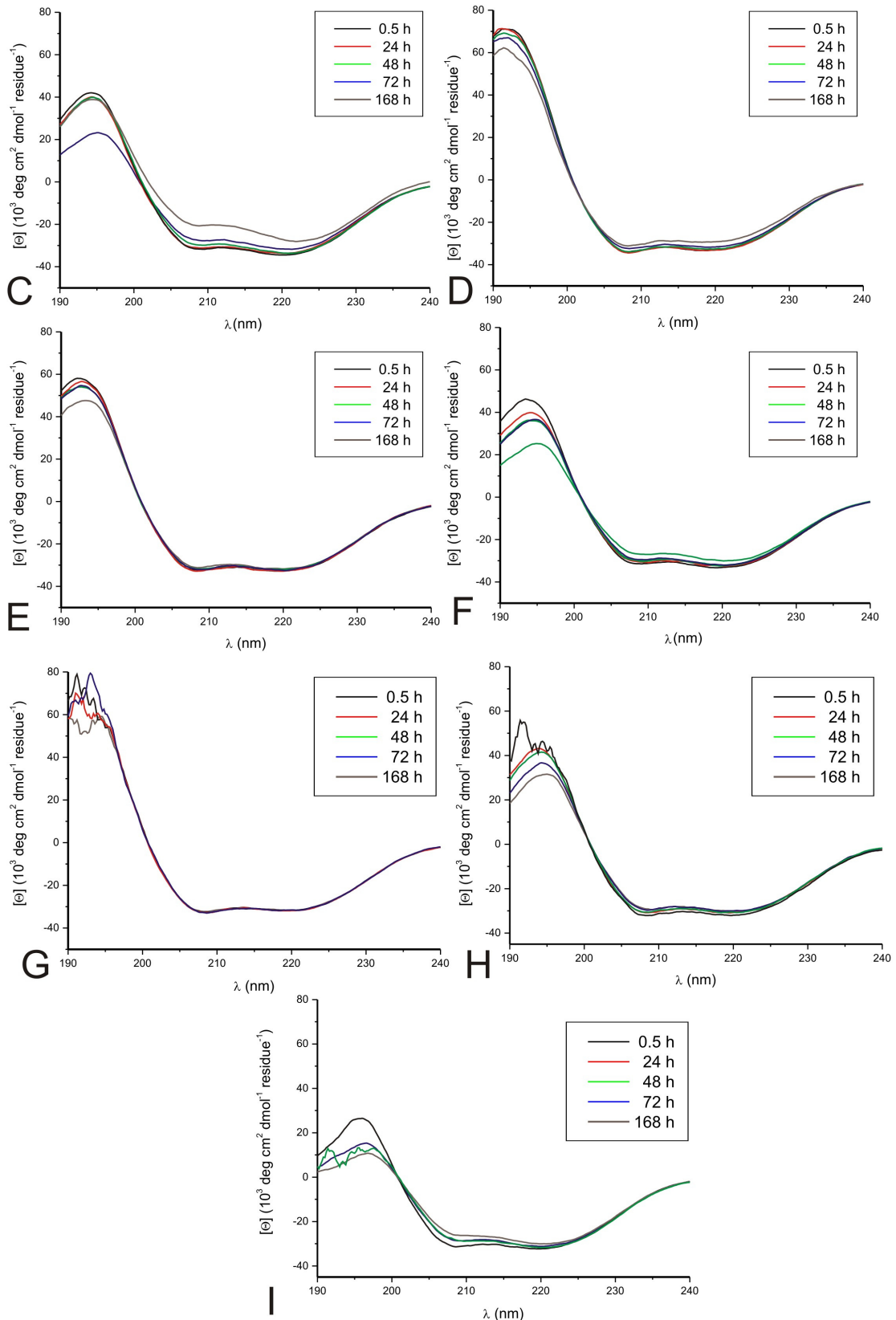


Abbildung 58: CD-Spektren von VW01, gemessen nach unterschiedlichen Inkubationszeiten (0 - 168 h), unterschiedlichen pH-Werten (4,0; 7,4 und 9,0) und unterschiedlichen Konzentrationen (100, 300 und 500 μM): (C) 500 μM ; pH 7,4: (D) 100 μM , (E) 300 μM , (F) 500 μM ; pH 9 (G) 100 μM , (H) 300 μM , (I) 500 μM (10 mM Azetat-Puffer, pH 4,0; 10 mM Phosphat-Puffer, pH 7,4; 10 mM Carbonat-Puffer, pH 9,0)

besetzt. Die Ausgabe von AGADIR (Helizität) und TANGO (*cross-β*-Aggregation) zeigt für die Sequenz von VW01 eine starke Tendenz zur helikalen Konformation und keinerlei Tendenz zur amyloiden Aggregation (Abbildung 56). CD-Spektren zeigen, dass VW01 bei Konzentrationen 100 bis 500 μM in einem pH-Bereich von 4,0 bis 9,0 unabhängig von der Zeit eine stabile α -helikale Konformation einnimmt. Jedes Spektrum weist zwei Minima bei 208 und 222 nm auf, die charakteristisch für α -helikale Konformation sind (Abbildung 57, 58). Elektronenmikroskopische Studien zeigen eine geringe Tendenz zur Bildung α -helikaler Aggregate bei hohen Konzentrationen ($c \geq 300 \mu\text{M}$), die jedoch nicht zu einem Anstieg der Fluoreszenz im Thioflavin-Assay führen. In Kryo-TEM-Aufnahmen lassen sich bei einer Peptidkonzentration von 100 μM kleine Partikel mit einer Größe von 2,5 bis 3,0 nm feststellen (Abbildung 59, a). Die Erhöhung der Konzentration auf 300 μM führt zur Bildung vereinzelter fadenartiger Aggregate mit einem Durchmesser von $2,5 \pm 0,3 \text{ nm}$ und einer

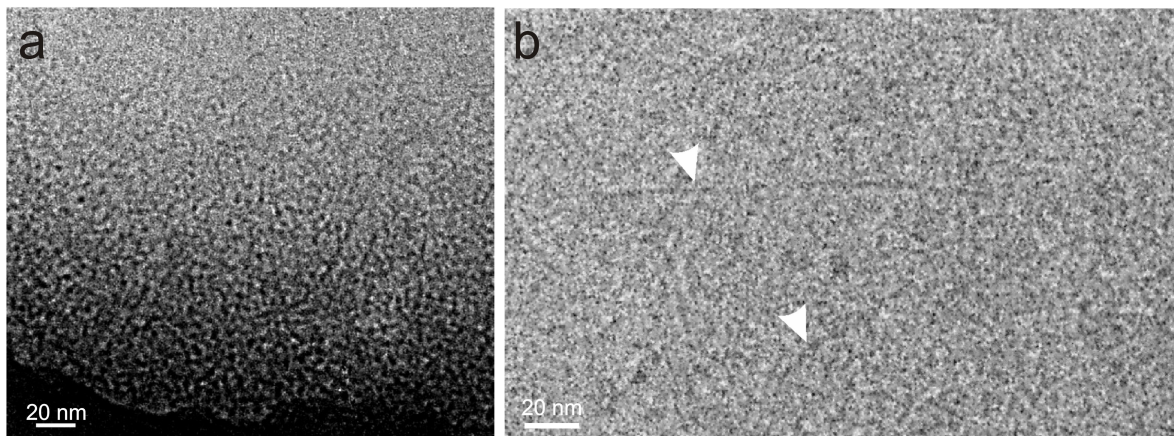


Abbildung 59: Kryo-TEM-Aufnahmen einer 1 mM VW01 Lösung in 10 mM Azetat-Puffer pH 4,0 zeigen (a) kleine Partikel von 2,5 bis 3 nm Größe und (b) fadenartige Aggregate (mit weißen Pfeilen markiert) mit einem Durchmesser von $2,5 \pm 0,3 \text{ nm}$ und einer Länge von 50-100 nm.

Länge von 50 bis 100 nm (Abbildung 59, b). Die Tendenz zur Bildung von Aggregaten ist pH-abhängig und erhöht sich mit steigenden pH-Wert. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von VW01 Proben mit 500 μM bei pH 4,0, pH 7,4 und pH 9,0 zeigen im Vergleich zur Probe bei pH 4,0 ein deutlich größeres Ausmaß an Aggregatbildung neben immer noch sichtbaren kleinen Partikeln (Abbildung 60). Es lassen sich geordnete Bündel erkennen (Abbildung 60, c). Die pH-Abhängigkeit macht deutlich, dass bei der Aggregation elektrostatische Wechselwirkungen eine bedeutende Rolle spielen. Entsprechend der CD-Spektren bleibt die α -helikale Struktur während des Aggregationsprozesses erhalten. Der mit Hilfe der Elektronenmikroskopie bestimmte Durchmesser von 2,5 nm ist mit der Struktur von *Coiled*

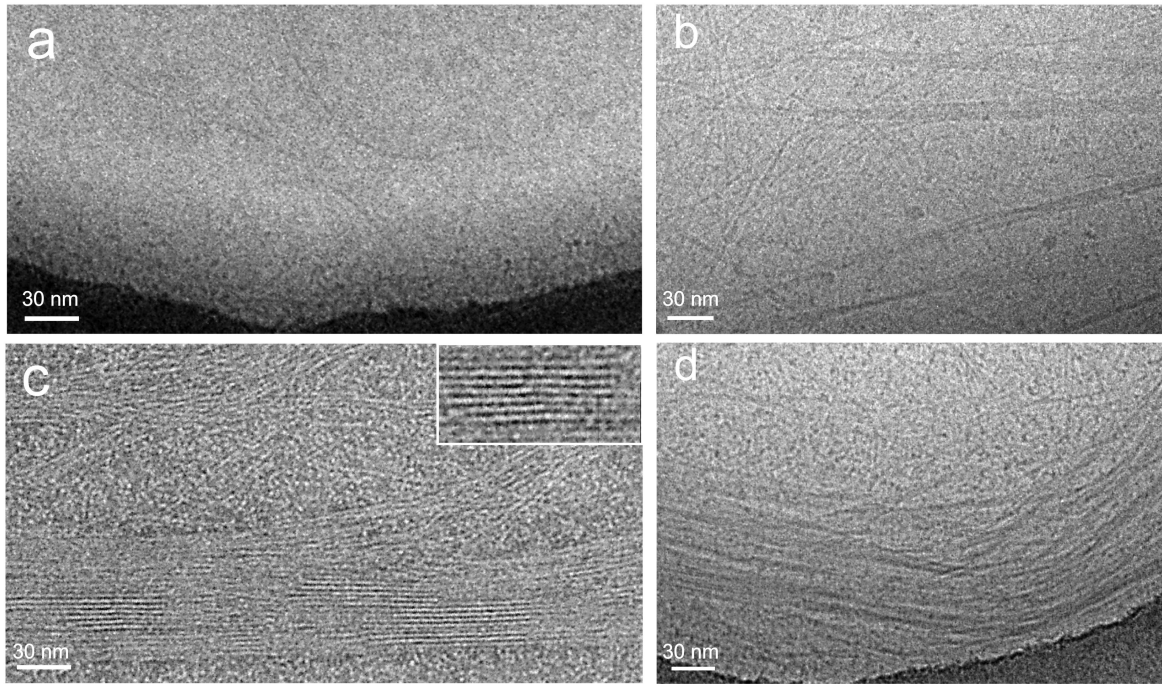


Abbildung 60: Elektronenmikroskopische Studien einer 500 μM VW01-Lösung bei verschiedenen pH-Werten. (a) Kryo-TEM in Azetatpuffer, pH 4,0; (b) Kryo-TEM in 10 mM Phosphat-Puffer, pH 7,4; (c) TEM angefärbt mit PTA in 10 mM Carbonat-Puffer pH 9, Bildausschnitt zeigt Bildung eines Bündels bei stärker Vergrößerung; (d) Kryo-TEM in 10 mM Carbonat-Puffer, pH 9,0.

Coil-Aggregaten vereinbar. Diese Aggregate ließen sich nicht kristallisieren, so dass sie nicht entsprechend charakterisiert werden können. Jedoch ergaben Röntgenbeugungsmessungen mit 5.08 \AA eine Reflexion, die mit dem Abstand zwischen Helices in α -helikalen *Coiled Coil*-Peptiden übereinstimmt (Abbildung 120).^[553] Der Oligomerisierungsgrad lässt sich nicht klar

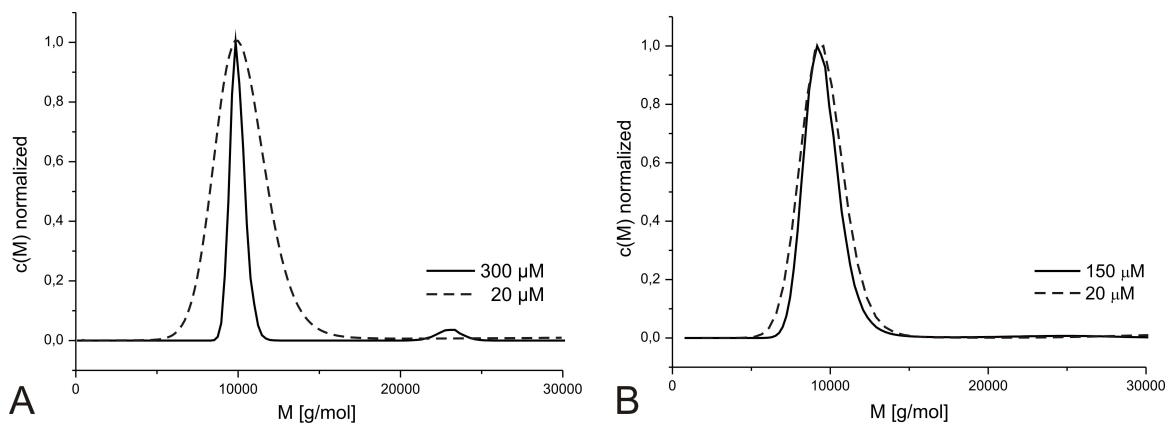


Abbildung 61: (A) Verteilung der ermittelten molaren Masse von VW01 bei einer Geschwindigkeit von 60000 rpm und einer Konzentration von 20 μM (gestrichelte Linie) und 300 μM (solide Linie) in 10 mM Phosphat Puffer pH 7,4. Die Hauptkomponente entspricht mit einer molaren Masse $M_w = 9923 \pm 485$ (20 μM) g/mol einem VW01 Trimer. Für die höhere Konzentration von 300 μM ist eine zweite Komponente mit einer molaren Masse $M_w = 22985 \pm 811$ g/mol feststellbar. (B) Verteilung der ermittelten molaren Masse von VW01 bei einer Geschwindigkeit von 60000 rpm und einer Konzentration von 20 μM (gestrichelte Linie) und 150 μM (solide Linie) in 10 mM Azetat Puffer pH 4,0. Die Hauptkomponente entspricht mit einer molaren Masse $M_w = 9560$ g/mol ebenfalls einem VW01 Trimer.

aufgrund des Designs vorhersagen. Er ist jedoch ein wichtiger struktureller Parameter, so dass eine experimentelle Bestimmung notwendig ist. Daher wurde der Oligomerisierungsgrad durch analytische Ultrazentrifugation (AUZ) bestimmt. Die Bestimmung über die Sedimentationsgeschwindigkeit ergab eine molare Masse $M_w = 9923 \text{ g/mol}$ für eine VW01-Probe mit einer Konzentration von $20 \text{ }\mu\text{M}$ und eine molare Masse $M_w = 9977 \text{ g/mol}$ für eine VW01-Probe mit einer Konzentration von $300 \text{ }\mu\text{M}$ bei einem pH-Wert von 7,4. Bei einer theoretischen Masse für ein einziges VW01-Molekül von $M_{w_{\text{theo}}} = 3190 \text{ g/mol}$ entsprechen beide experimentellen Werte der Masse eines VW01 Trimers. Bei einer Konzentration von $300 \text{ }\mu\text{M}$ ist eine zweite Komponente mit einer molaren Masse $M_w = 22985 \pm 811 \text{ g/mol}$ feststellbar. Hier spiegelt sich die bei den elektronenmikroskopischen Studien festgestellte Tendenz zu höheren Aggregaten wieder. Zusätzlich wurde der Oligomerisierungsgrad über das Sedimentationsgleichgewicht bei zwei verschiedenen Geschwindigkeiten, d.h. bei 25000 und 30000 rpm, und einem Konzentrationsbereich von 20 bis $500 \text{ }\mu\text{M}$ bestimmt. Die Auswertung mit Hilfe des Programms WINNONLIN^[554] führte zu der molaren Masse $M_w = 9706 \text{ g/mol}$ bei 25000 rpm und $M_w = 9757 \text{ g/mol}$ bei 30000 rpm. Auch hier entsprechen beide experimentellen Werte der molaren Masse eines VW01 Trimers. Da VW01 zum großen Teil auch in Experimenten bei einem pH-Wert von 4,0 eingesetzt wurde, wurde ebenfalls für pH 4,0 der Oligomerisierungsgrad über die Sedimentationsgeschwindigkeit und das Sedimentationsgleichgewicht bestimmt. Auch bei pH 4,0 entsprechen die experimentellen Werte der molaren Masse eines VW01 Trimers (Abbildung 61, B; Tabelle , rechts).

Tabelle 4: Analyse des Sedimentationsgleichgewichts für VW01.

pH 7,4			pH 4,0	
c (μM)	M_w (g/mol)	M_w (g/mol)	c (μM)	M_w (g/mol)
500	10113	10391	150	9727
400	9666	10002	120	9752
300	10242	9587	100	10094
200	7866	8763	80	10131
100	7802	8298	60	9050
50	8423	7755	40	9531
20	9680	8547	20	8605
<i>Durchschnitt</i>	9706	9757		9556

10.2 Modellpeptid VW01-ran

Das Modellpeptid VW01-ran dient als Kontrollpeptid zum Modellpeptid VW01. Mit diesem Peptid lässt sich überprüfen, ob die Effekte, hervorgerufen durch VW01, auf das *Coiled Coil-*

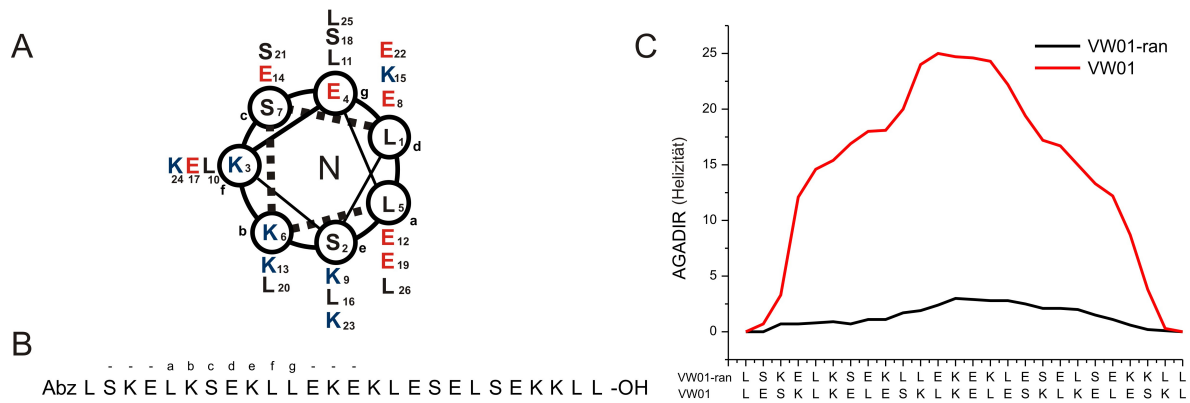


Abbildung 62: (A) Helical wheel-Darstellung (B) Primärstruktur vom Modellpeptid VW01-ran (C) Vergleichende Analyse der Primärsequenz von VW01 und VW01-ran mit AGADIR (Helizität) bei pH 7.4 und Raumtemperatur.

Design und auf die Bildung von *Coiled Coil*-Oligomeren zurückgeführt werden können. Hierfür wurden die Aminosäuren der Sequenz von VW01 so zur Sequenz von VW01-ran angeordnet, dass keine charakteristischen Heptaden entstehen und die Design-Prinzipien eines *Coiled Coil*-Peptids nicht erfüllt werden (siehe Abschnitt 9.1 *Modellpeptide basierend auf dem Coiled Coil-Faltungsmotiv*). Dieses Peptid weist daher keine hydrophobe bzw. elektrostatische Wechselwirkungsdomäne auf. Eine vergleichende Analyse der Primärsequenzen von VW01 und VW01-ran mit dem Algorithmus AGADIR zeigt deutlich die Reduktion der Tendenz zur helikalen Konformation durch die Veränderung der Sequenz von VW01 zu VW01-ran (Abbildung 62, C). CD Spektren einer VW01-ran Lösung zeigen ein Minimum bei 200 nm, was für eine überwiegend ungefaltete Struktur spricht. Darüber hinaus zeigen Kryo-TEM-Aufnahmen einer 500 μ M-Probe kleine Partikel mit einer Größe von 2,5

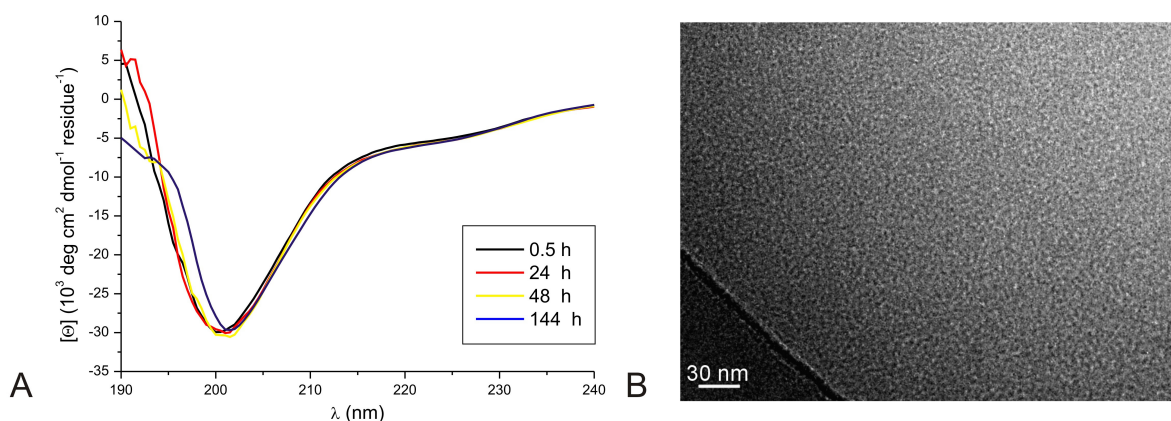


Abbildung 63: (A) CD-Spektren von VW01, gemessen nach unterschiedlichen Inkubationszeiten (0 – 144 h) (B) Die Kryo-TEM-Aufnahme einer 500 μ M VW01-Lösung in 10 mM Phosphatpuffer pH 7,4 zeigt kleine Partikel von 2,5 bis 3 nm Größe und keine größeren Aggregate.

bis 3,0 nm. Selbst bei einer derart hohen Konzentration ließen sich im Unterschied zu VW01 keinerlei Aggregate feststellen.

Um zu zeigen, dass VW01-ran im Unterschied zu VW01, wie durch das Design beabsichtigt, keinerlei Oligomere, wurde der Oligomerisierungsgrad ebenfalls mit analytischer Ultrazentrifugation bestimmt. Die Bestimmung über die Sedimentationsgeschwindigkeit ergab eine molare Masse von $M_w = 2940$ g/mol bei pH 7.4 und einer Peptidkonzentration von $150 \mu\text{M}$. Der Vergleich mit dem theoretischen Wert von 3190 g/mol lässt den Schluss zu, dass unter diesen Bedingungen ausschließlich Monomere des Modellpeptids VW01-ran vorliegen. Zusätzlich wurde der Oligomerisierungsgrad über das Sedimentationsgleichgewicht bei Rotor-Geschwindigkeiten von 30000 und 50000 rpm bestimmt. Die Auswertung mit dem MSTAR-Programm^[555] ergab für 30000 rpm den Wert von 3383 g/mol sowie für 50000 rpm den Wert von 3093 g/mol und entspricht ebenfalls dem theoretischen Wert der molaren Masse von 3190 g/mol für Monomere. Alle dargestellten Ergebnisse unterstützen die Richtigkeit des Designs von VW01-ran, ein Peptid, das als *random coil* vorliegt und keinerlei Oligomere bildet.

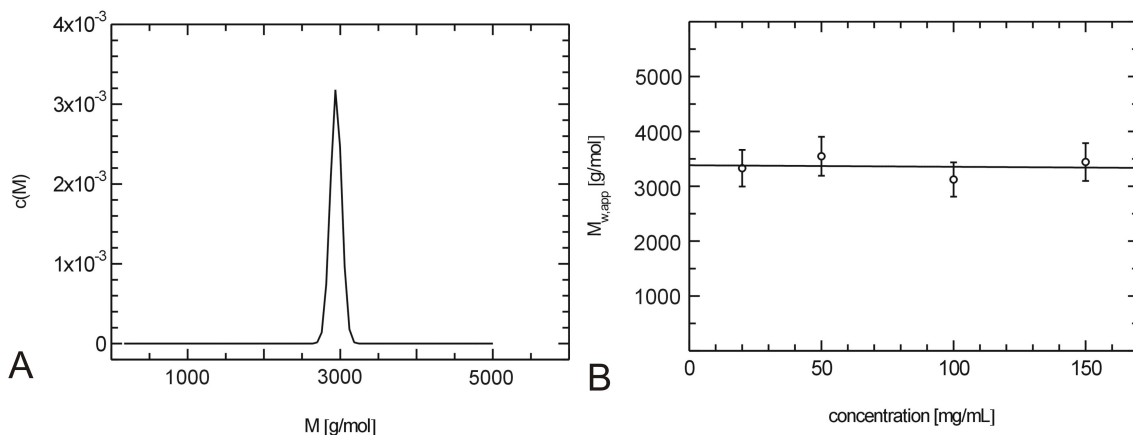


Abbildung 64: (A) Verteilung der ermittelten molaren Masse von VW01-ran bei einer Geschwindigkeit von 60000 rpm und einer Konzentration von $150 \mu\text{M}$ in 10 mM Phosphat Puffer pH $7,4$. Die ermittelte molare Masse $M_w = 2940$ g/mol entspricht einem Monomer. (B) Konzentrationsabhängigkeit der mit Hilfe von MSTAR über das Sedimentationsgleichgewicht ermittelten molaren Massen von VW01-ran bei 30000 rpm. Die Extrapolation in Richtung unendlicher Verdünnung führt zu der molaren Masse von 3383 g/mol.

10.3 Coiled Coil-basiertes Modellpeptid VW18

Das Modellpeptid VW18 weist als wesentlichen Unterschied zum VW01 drei Valinreste in *b*, *c* und *f* Position auf. Die Aminosäure Valin zeigt eine hohe Tendenz für β -Faltblattstrukturen und ermöglicht in diesen Positionen den konformationellen Übergang von der α -helikalen Struktur zur β -Faltblattstruktur und ferner die Aggregation zu amyloiden Fibrillen.^[516] Die Primärstruktur von VW18 weist mit den Elementen einer Helix und Elementen einer

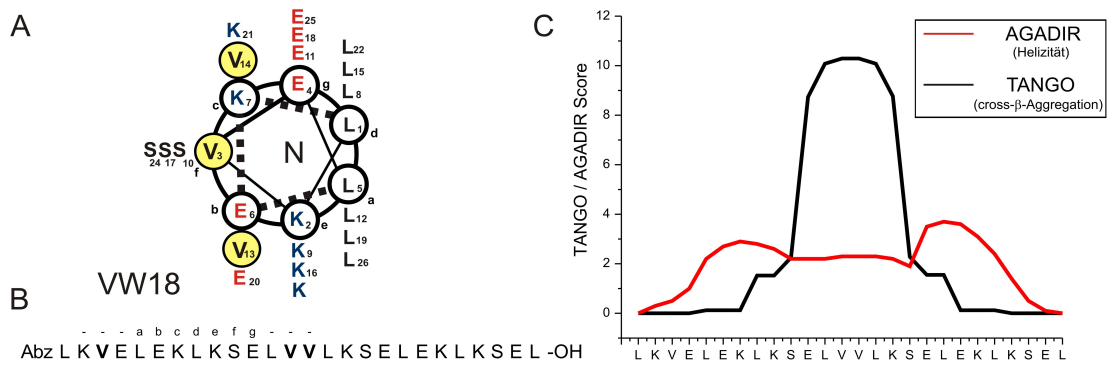


Abbildung 65: (A) Helical wheel-Darstellung und (B) Primärstruktur vom Modellpeptid VW18. (C) Ergebnis der Analyse der Primärsequenz von VW18 mit den Algorithmen TANGO und AGADIR bei pH 7.4 und Raumtemperatur.

β -Faltblattstruktur zwei konkurrierende Sekundärstrukturen auf. Dieses Designprinzip wird durch die Algorithmen TANGO und AGADIR unterstützt. Die Ausgabe von TANGO zeigt für $_{12}LVVLK_{16}$ deutlich das Vorhandensein einer amyloiden Kernsequenz, die mit der amyloiden Kernsequenz $_{16}KLVFF_{20}$ des $A\beta$ -Peptids vergleichbar ist (Abbildung 65). Aufgrund der Bedeutung der amyloiden Kernsequenz als molekulare Grundlage der amyloiden Aggregation (siehe Abschnitt 2.3 *Molekulare Grundlagen und interne Struktur amyloider Fibrillen*) kann man annehmen, dass diese Sequenz ein wesentlicher Faktor im Prozess der amyloiden Aggregation ist. Aber auch die Reduzierung der helikalen Stabilität durch den Austausch polarer Aminosäuren mit Valin im Vergleich zum VW01 muss berücksichtigt werden. Darüber hinaus führt die Einführung der Aminosäure Valin an dritter Position zum Sequenzmuster $_{1}LKVELE_6$ am N-Terminus mit alternierenden polaren und hydrophoben Aminosäuren, das damit eine große Tendenz zu β -Faltblattstrukturen besitzt. Da die α -helikale Konformation an den Enden einer *Coiled Coil*-Struktur zunehmend verloren geht, bildet möglicherweise dies den Startpunkt zum Übergang in die β -Faltblattkonformation. Die Ausgabe von AGADIR zeigt auch eine Tendenz für die α -helikalen Konformation in der Sequenz. Der ambivalente Charakter der Sequenz spiegelt sich im Faltungsverhalten des VW18 in Lösung wider.

Wie durch das Design beabsichtigt, führt die Einführung dreier Valinreste, der wesentliche Unterschied zum VW01, zur Bildung β -Faltblattreicher amyloider Aggregate. Zeitabhängige CD-Spektren zeigen deutlich einen Wechsel von der α -helikalen Konformation mit zwei Minima bei 208 und 222 nm zur β -Faltblatt-Konformation mit einem charakteristischen Minimum bei 218 nm innerhalb von 24 h und bei einem physiologischen pH-Wert von 7,4 (Abbildung 66). Das Einnehmen der β -Faltblatt-Konformation ist nur eine strukturelle Eigenschaft amyloider Aggregate und allein noch kein Nachweis. VW18 zeigt aber darüber

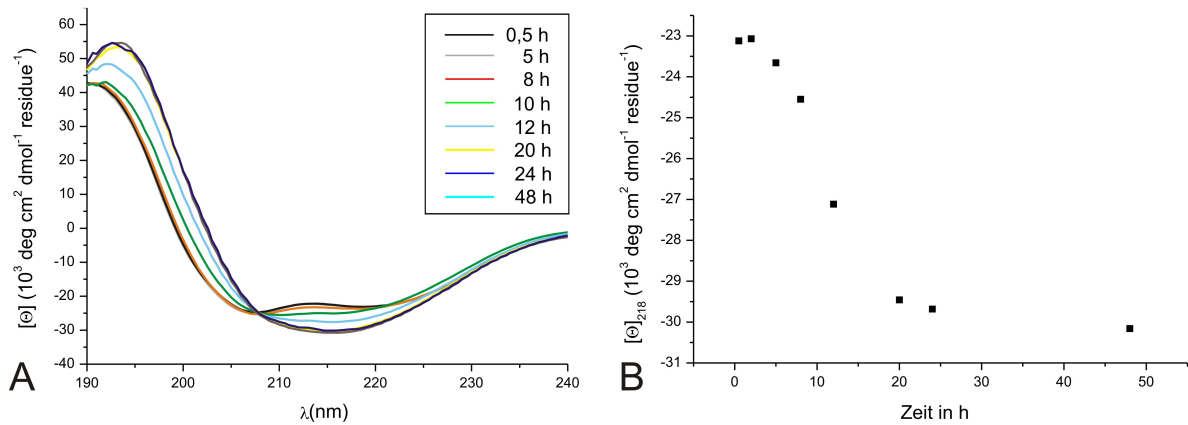


Abbildung 66: Zeitabhängige Änderung der Konformation. (A) Übereinander gelegte CD-Spektren des Modellpeptids VW18 bei verschiedenen Inkubationszeiten. (B) Darstellung der Elliptizität bei 218 nm in Abhängigkeit von der Zeit. (Peptidkonzentration = $100 \mu\text{M}$, in Phosphatpuffer = 10 mM, 0,1% (w/w) NaN_3 , pH 7,4).

hinaus den typischen zeitabhängigen Anstieg der Fluoreszenzintensität bei 485 nm im Thioflavin T Fluoreszenz-Assay, der mit einer sigmoidalen Kurve beschrieben werden kann (Abbildung 67). Die Wachstumsphase beginnt nach etwa 5 h (lag time) und endet nach etwa 24 h mit dem Beginn der Plateau-Phase. Die Zeit bis zum Beginn des Wachstums lässt sich durch die Gegenwart von präparierten gealterten Fibrillen (5% (v/v)), die als Nukleationskeime dienen, eliminieren. Dieses kinetische Verhalten lässt sich auf einen nukleationsabhängigen Prozess schließen, der ebenfalls typisch für die Bildung amyloider Fibrillen ist (siehe Kapitel 4 *Kinetik der Bildung amyloider Fibrillen*). Die vorangegangenen beschriebenen Ergebnisse werden unterstützt durch elektronenmikroskopische Aufnahmen. Sie zeigen einen Ausschnitt von helikal verdrehten amyloiden Fibrillen von mehreren hundert Nanometern Länge und ca. 10 Nanometern Breite. Zusätzlich wurden Röntgenbeugungsstudien an ausgerichteten Fibrillen des VW18 durchgeführt

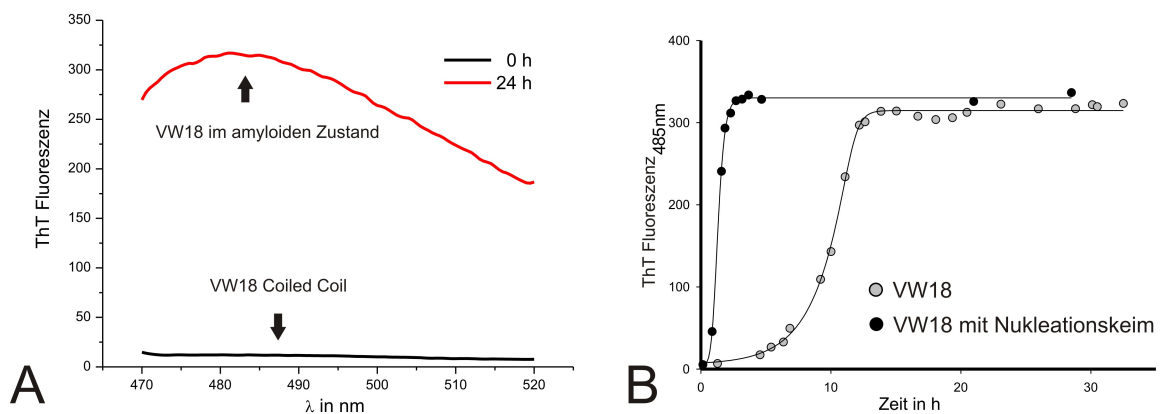


Abbildung 67: Thioflavin-T Assay. (A) Charakteristischer Anstieg der ThT-Fluoreszenz bei 485 nm aufgrund der Bindung des Farbstoffs an amyloide Aggregate. (B) Darstellung kinetischen Verlaufs anhand der Werte der Intensitäten bei 485 nm der Aggregation von VW18 allein (graue Kreise) und in Gegenwart von Nukleationskeimen (schwarze Kreise) (Peptidkonzentration = $100 \mu\text{M}$, in Phosphatpuffer = 10 mM, 0,1% (w/w) NaN_3 , pH 7,4).

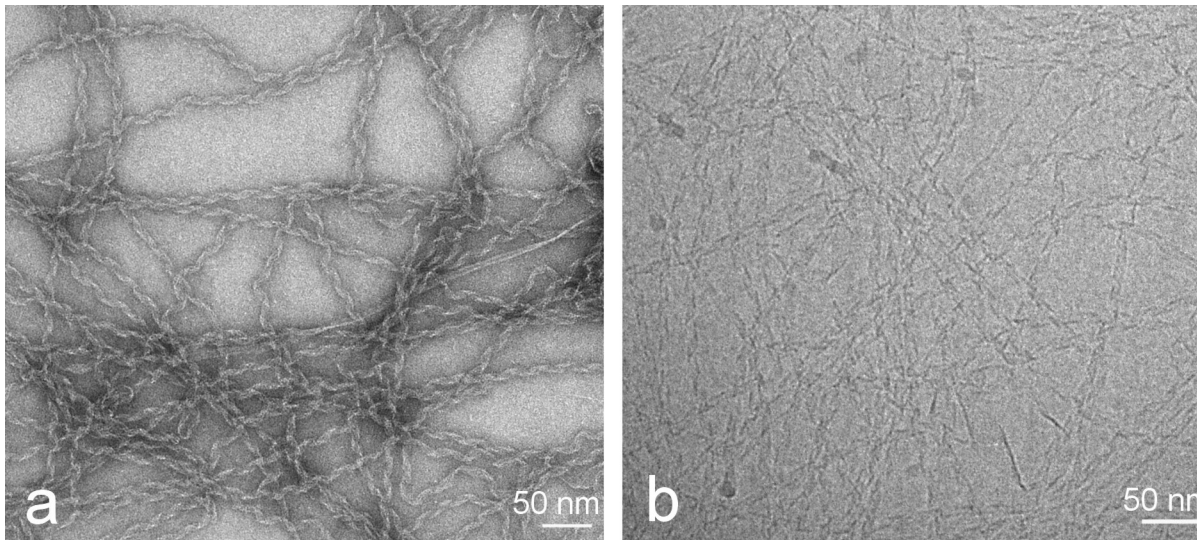


Abbildung 68: (a) TEM-Aufnahme von VW18 im amyloiden Zustand, angefärbt mit PTA nach 2 Tagen Inkubationszeit (b) Kryo-TEM-Aufnahme von VW18 im amyloiden Zustand (Peptidkonzentration = 100µM, in Phosphatpuffer = 10 mM, 0,1% (w/w) NaN₃, pH 7,4).

(WAXS), die das Vorhandensein der charakteristischen *cross-β*-Struktur zeigten. Das Beugungsmuster besteht aus einer scharfen Reflexion bei 4,7 Å senkrecht zur Fibrillenachse, die dem Abstand der Wasserstoffbrückenbindung in der *β*-Faltblatt-Konformation zugewiesen werden kann, und eine diffusere Reflexion bei ca. 10 Å, die auf die Packung der Seitketten zwischen den *β*-Faltblattstrukturen zurückgeführt werden kann. Auf Basis ausgedehnter Studien verschiedener Prolin- und Glycinvariationen des Modellpeptids VW18 mit Hilfe von CD-Spektroskopie, ThT- Fluoreszenz und Elektronenmikroskopie wurde ein Strukturmodell der amyloiden Fibrillen des Modellpeptids VW18 vorgeschlagen und veröffentlicht.^[387] Die interne Struktur eines Protofilaments der amyloiden Fibrillen des Modellpeptids VW18 ist in

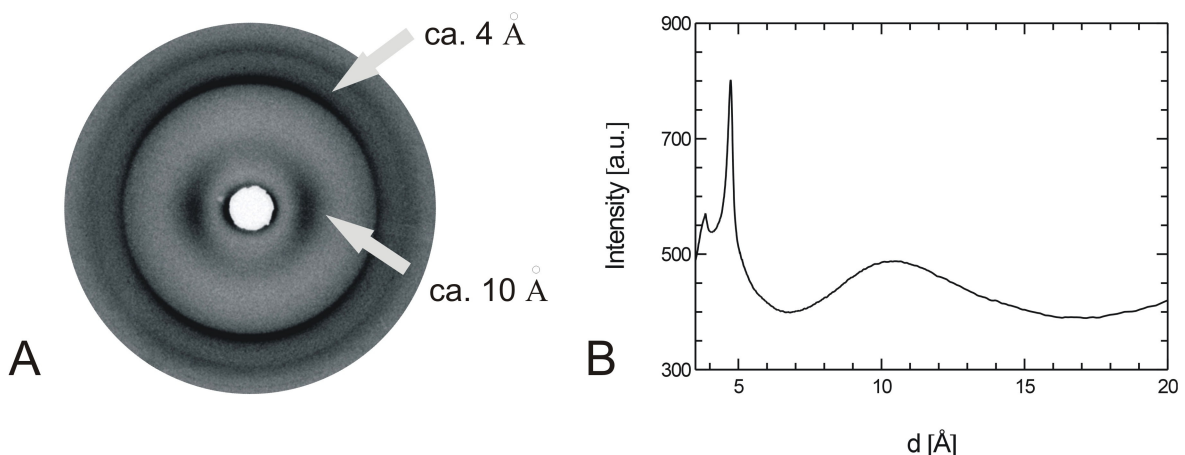


Abbildung 69: (A) 2D WAXS Beugungsmuster an ausgerichteten getrockneten Fibrillen von VW18. Die Fibrillenachse ist vertikal. Das Beugungsmuster zeigt eine scharfe Reflexion bei 4,7 Å und eine diffusere Reflexion bei ca. 10 Å, charakteristisch für die *cross-β*-Struktur amyloider Fibrillen. (B) 1D Darstellung des WAXS Beugungsmusters.

10.4 Coiled Coil-basiertes Modellpeptid VW19

Das Modellpeptid VW19 baut auf dem Design von VW18 auf. Im Unterschied zu VW18 weist VW19 eine pH-Sensitivität bezüglich der Einnahme einer spezifischen Sekundärstruktur auf. Zur Schaffung dieser pH-Sensitivität wurden gleich geladene Lysinreste in *b* und *f* Positionen platziert. Es ergibt sich auf diese Weise eine große geladene Domäne über die Positionen *b*, *e* und *f*. VW19 weist in Abhängigkeit vom pH-Wert verschiedene Konformation

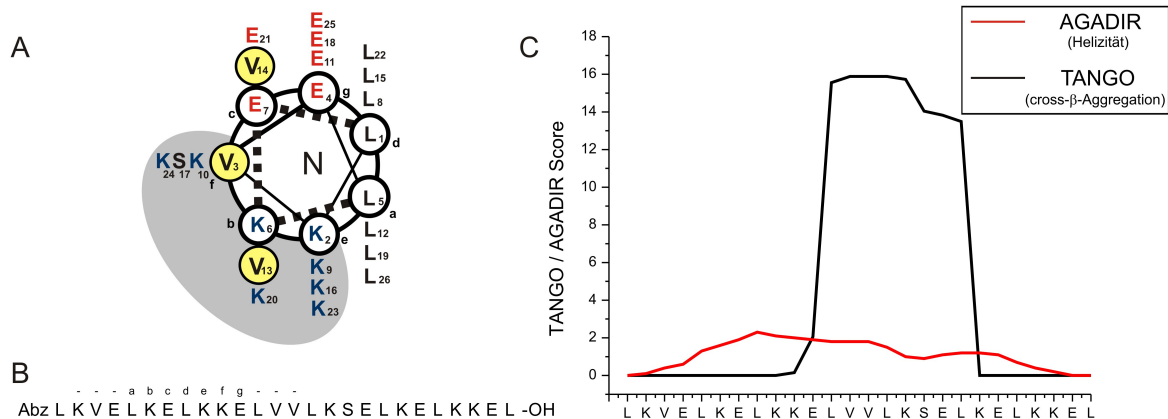


Abbildung 71: (A) Helical wheel-Darstellung, graue Unterlegung entspricht der gleich-geladenen Lysin-Domäne, und (B) Primärstruktur vom Modellpeptid VW19 (C) Ergebnis der Analyse der Primärsequenz von VW19 mit den Algorithmen TANGO und AGADIR bei pH 7.4 und Raumtemperatur.

und morphologisch verschiedene fibrilläre Aggregate auf.^[516, 532, 534] Bei einem pH-Wert von 4,0 sind die Glutamatreste ($pK_{\gamma}(\text{COOH}) \approx 4,3$) nahezu vollständig protoniert und elektrostatische Abstoßung ist fast vollständig eliminiert. Die Lysinreste ($pK(\epsilon\text{-NH}_3^+) \approx 10,5$) in Positionen *b*, *e* und *f* sind jedoch positiv geladen und stoßen sich ab, wodurch die helikale Konformation destabilisiert wird. Die Analyse der Primärstruktur mit TANGO und AGADIR zeigt für ${}_{12}\text{LVV LKSEL}_{19}$ eine zur amyloiden Aggregation fähige Kernsequenz und nur eine geringe Tendenz zur Einnahme der helikalen Konformation bei neutralem pH-Wert (Abbildung 71, C).

Das Modellpeptid VW19 wurde bereits mit Hilfe der CD Spektroskopie und der Elektronenmikroskopie charakterisiert, jedoch ließ sich einige Eigenschaften nicht mehr reproduzieren. Dazu gehört z.B. die Konzentrationsabhängigkeit, so dass eine erneute Charakterisierung notwendig war. Die CD-Spektren für das Modellpeptid bei einer Konzentration 100 μM zeigen direkt nach der Lösung im Azetat-Puffer mit einem pH-Wert von 4,0 ein Minimum um 200 nm, was einer überwiegend ungefalteten Struktur entspricht. Die elektrostatische Abstoßung der Lysinreste in *b*, *e* und *f* Position führt, wie durch das Design beabsichtigt, zur Destabilisierung der helikalen Konformation. Innerhalb von 48 h

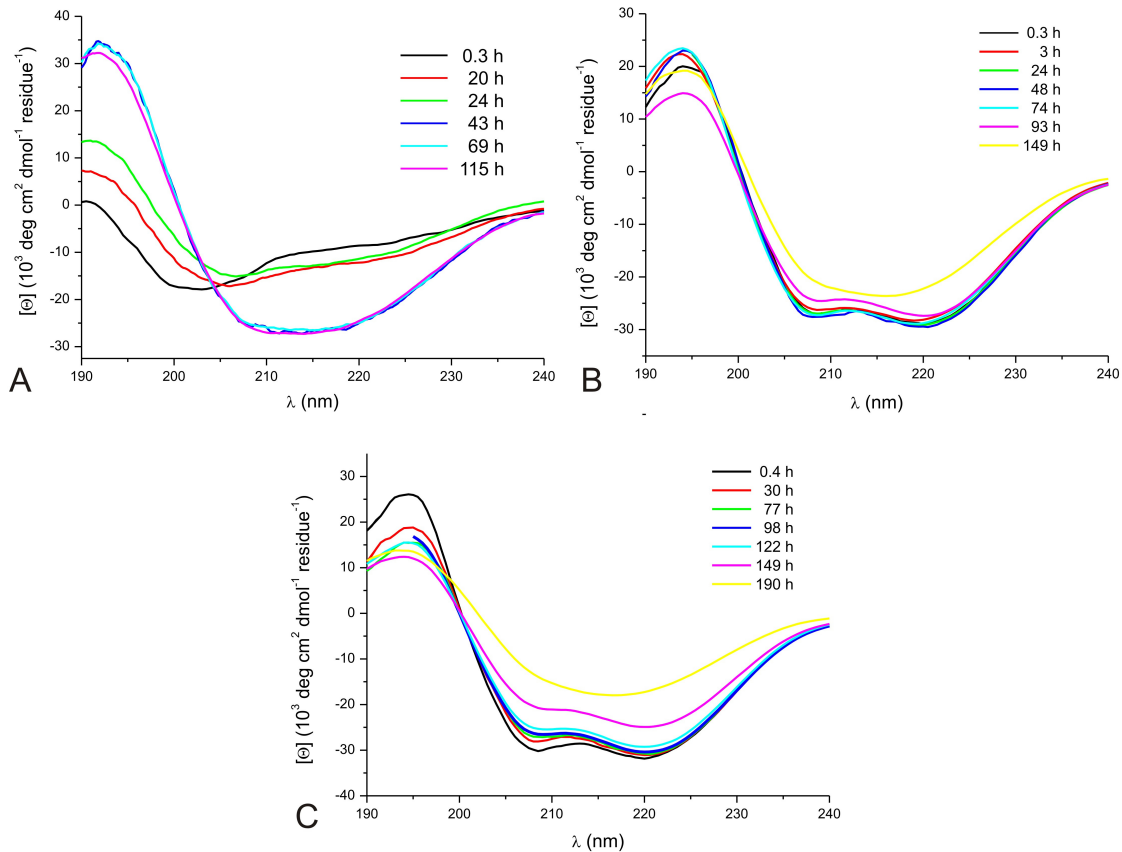


Abbildung 72: CD-Spektren vom Modellpeptid VW19 in 10 mM Azetat-Puffer pH 4,0 und Peptid-Konzentrationen von (A) 100 μM , (B) 300 μM und (C) 500 μM .

findet eine konformationelle Änderung in Richtung einer β -Faltblattstruktur statt, angezeigt durch die Reduzierung des Minimums bei 200 nm und die Entwicklung eines Minimums bei 218 nm. Doch im Unterschied zu vorangegangenen Charakterisierungen^[516, 532, 534] geschieht dies bereits bei einer Konzentration von 100 μM . Bei höheren Konzentrationen ab 300 μM ist die Ausgangskonformation α -helikal und der Übergang zur β -Faltblattstruktur benötigt mit mehr als 140 h deutlich mehr Zeit als zuvor beschrieben. Die α -helikale Struktur scheint dem VW19 Stabilität gegenüber einer konformationellen Änderung zur β -Faltblattstruktur zu verleihen. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen nach 48 h typische unverzweigte amyloide Fibrillen mit einer Morphologie ähnlich zu verdrehten Bändern (Abbildung 73). Zusätzlich wurden ebenfalls Röntgenbeugungsstudien durchgeführt, welche die für Amyloide charakteristische *cross- β* -Struktur bestätigten. Das Beugungsmuster besteht aus den typischen Reflexionen bei 4,7 Å senkrecht zur Fibrillenachse, die dem Abstand der Wasserstoffbrückenbindung zwischen den β -Faltblattstrukturen entspricht und eine diffuse Reflexion bei 10 Å, die dem Abstand horizontaler Wechselwirkungen über die Seitenketten entspricht (Abbildung 73).

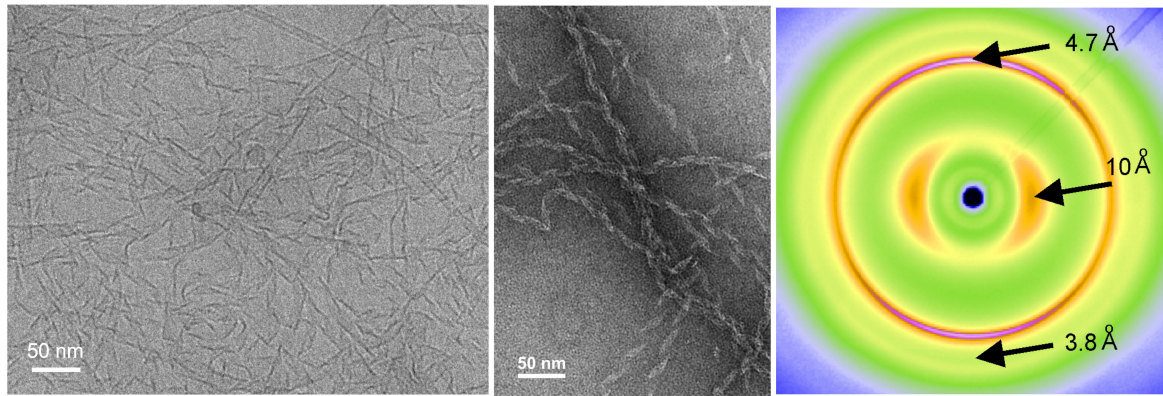


Abbildung 73: (links) Kryo-TEM-Aufnahme einer 500 µM-Probe von VW19 in 10 mM Azetat-Puffer pH 4,0. (Mitte) TEM-Aufnahme einer 100 µM-Probe von VW19 in 10 mM Azetat-Puffer pH 4,0. (rechts) 2D Röntgenbeugungsmuster gerichteter VW19-Fibrillen mit einer scharfen Reflexion bei 4,7 Å und einer diffusen Reflexion bei 10 Å.

Trotz amyloider Struktur zeigt VW19 keine für Amyloide typische Erhöhung der Thioflavin T Fluoreszenz während des Prozesses der Aggregation. Dies lässt sich auf die hohe positive Nettoladung des Modellpeptids bei pH 4,0 zurückführen. Bei pH 4,0 sind alle Lysinreste positiv geladen und Glutamatreste nahezu vollständig protoniert und damit ungeladen. Aufgrund elektrostatischer Abstoßung kann das ebenfalls positiv geladene Thioflavin T-Molekül nicht an amyloide Aggregate des VW19 binden. Es bestand die Möglichkeit, wie in zuvor berichteten Protokollen^[534], das Modellpeptid bei pH 4,0 zu inkubieren und den pH-Wert für die Thioflavin T Fluoreszenz-Messung auf 7,4 zu erhöhen, jedoch ist dies für Inhibitionsstudien von Nachteil, da die Interaktion zwischen den *Coiled Coil*-Peptiden auch durch elektrostatische Wechselwirkung vermittelt wird. Wir verwenden den ungeladenen NIAD-4 Fluoreszenz-Farbstoff, der zuvor auf Eignung für die Zielsetzungen der Experimente getestet

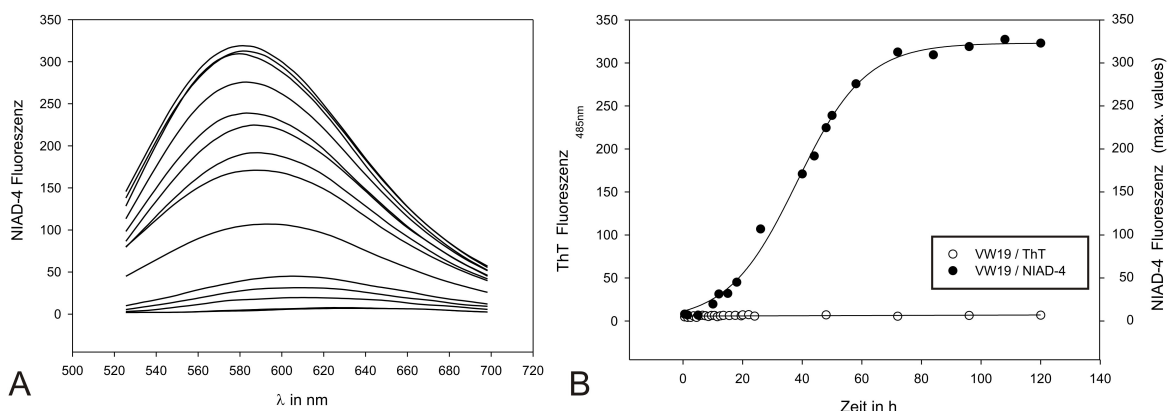


Abbildung 74: (A) NIAD-4 Fluoreszenz-Spektren der Aggregation an VW19 aufgenommen nach unterschiedlichen Inkubationszeiten. (B) Darstellung der maximalen Fluoreszenzintensitäten in Abhängigkeit von der Zeit von der Aggregation von VW19 in der Gegenwart von Thioflavin T und NIAD-4 (Peptidkonzentration = 200 µM, in 10 mM Azetat-Puffer, 0,1% (w/w) NaN₃, pH 4,0, 10 µM ThT, 10 µM NIAD).

wurde (siehe Kapitel 14.2.6.2 NIAD-4, 10.7 NIAD-4 Fluoreszenz bei helikalen Fasern und amyloiden Fibrillen).^[556] NIAD-4 zeigt eine Erhöhung der Fluoreszenz bei ca. 585 nm während des Aggregationsprozesses. Im Gegensatz zu Thioflavin T lässt sich mit NIAD-4 der Aggregationsprozess von VW19 bei einem pH-Wert 4 verfolgen (Abbildung 74). Das Modellpeptid VW19 bildet darüber hinaus bei einer Konzentration von 500 μM und neutralem pH-Wert α -helikale Fasern.^[532] CD-Spektren zeigen zwei Minima bei 208 und 224 nm, gleichbedeutend für α -helikale Konformation. Darüber zeigt sich eine zeitabhängige Abnahme des Minimums bei 208 nm, relativ zum zweiten Minimum bei gleichzeitiger Verschiebung des zweiten Minimums nach größeren Wellenlängen. Dies wurde schon häufig beobachtet und lässt sich auf chirale Streuung an ausgedehnten Fasern zurückführen (Abbildung 75).^[557] Kryo-TEM-Aufnahmen zeigen gleichförmige lange Fasern mit einem Durchmesser von circa 2,5 nm.

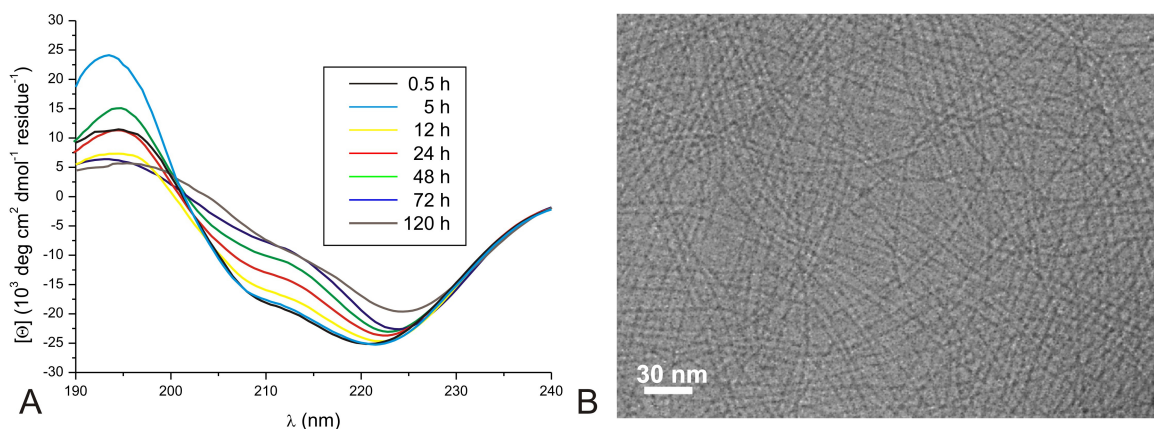


Abbildung 75: (A) CD-Spektren nach unterschiedlichen Inkubationszeiten (0-120 h) und (B) Kryo-TEM-Aufnahme von VW19 (Peptidkonzentration = 500 μM , in 10 mM Phosphat-Puffer, 0,1% (w/w) NaN_3 , pH 7,4).

10.5 Coiled Coil-basiertes Modellpeptid RR01

Das Modellpeptid RR01 stellt das Gegenstück zum Modellpeptid VW19 dar.^[516, 534, 558] Zur Schaffung einer pH-Sensitivität wurden gleich geladene Glutamatreste in den Positionen *c*, *f* und *g* platziert (Abbildung 76, grau unterlegt). Bei neutralem pH-Wert sind alle Glutamatreste ($\text{pK}_\gamma(\text{COOH}) \approx 4,3$) negativ und alle Lysinreste ($\text{pK}(\epsilon\text{-NH}_3^+) \approx 10,5$) positiv geladen. Die elektrostatische Abstoßung führt zur Destabilisierung der α -helikalen Konformation. Die Analyse der Primärstruktur mit TANGO und AGADIR zeigt für ${}_{12}\text{LVVLKS}_{17}$ eine zur amyloiden Aggregation fähige Kernsequenz und nur eine geringe Tendenz zur Bildung der helikalen Konformation bei neutralem pH-Wert (Abbildung 76, C). Im Vergleich zu VW18 und VW19 ist der TANGO-Wert für die Aggregation deutlich geringer, was für einer

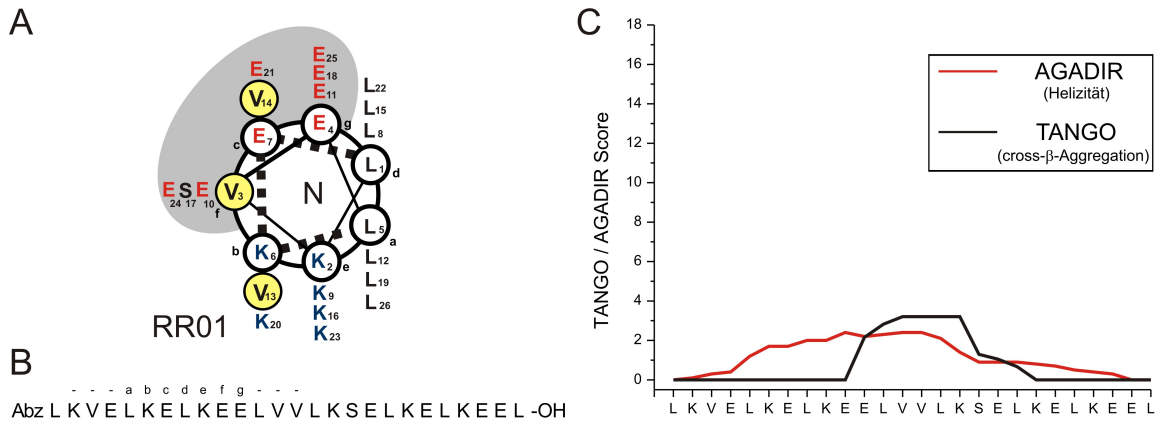


Abbildung 76: (A) Helical wheel-Darstellung, graue Unterlegung entspricht der gleich-geladenen Lysin-Domäne, und (B) Primärstruktur vom Modellpeptid VW19 (C) Ergebnis der Analyse der Primärsequenz von RR01 mit den Algorithmen TANGO und AGADIR bei pH 7,4 und Raumtemperatur.

geringere Aggregationstendenz unter diesen Bedingungen spricht. Die CD-Spektren für das Modellpeptid RR01 zeigen direkt nach der Lösung im Phosphat-Puffer mit einem pH-Wert von 7,4 einem Minimum um 200 nm, was einer überwiegend ungefalteten Struktur entspricht. Innerhalb von 24 h findet eine konformationelle Änderung in Richtung einer β -Faltblattstruktur statt, zu erkennen an der Reduzierung des Minimums bei 200 nm und der Entwicklung eines Minimums bei 218 nm (Abbildung 77, A). Für die konformationelle Änderung ist jedoch mit ca. 170 μM eine vergleichbar hohe kritische Konzentration notwendig. Eine Probe mit einer Peptidkonzentration unter 170 μM bleibt ungefaltet (Abbildung 77, B). In diesem Umstand spiegelt sich die mit Hilfe von TANGO vorhergesagte geringe Aggregationstendenz der Primärsequenz wieder. Die konformationelle Änderung wird vom charakteristischen zeitabhängigen Anstieg der ThT-Fluoreszenz bei 485 nm begleitet. Die Wachstumsphase beginnt nach etwa 5 h (*lag time*) und endet nach etwa 24 h

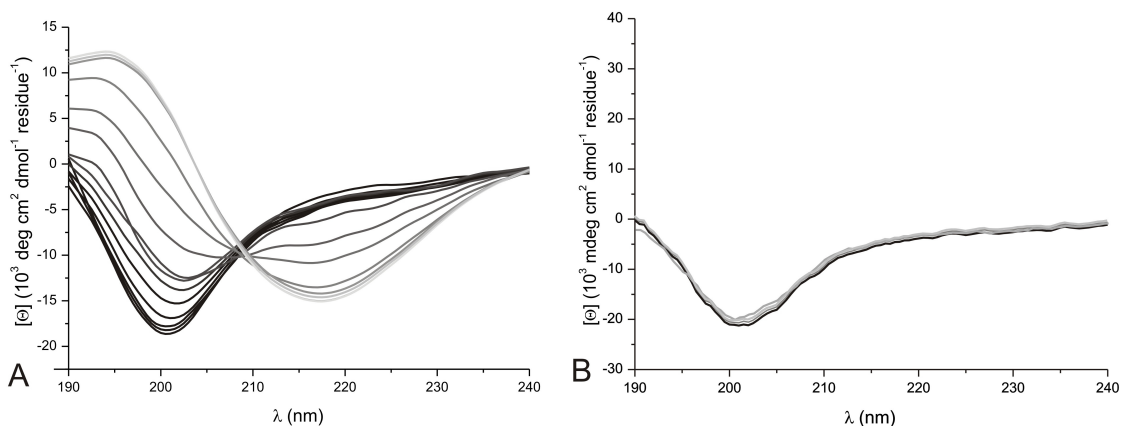


Abbildung 77: CD-Spektren vom Modellpeptid RR01 mit Peptid-Konzentrationen von (A) 200 μM , (B) 50 μM . (10 mM Phosphat-Puffer, 0,1% (w/w) NaN_3 , pH 7,4).

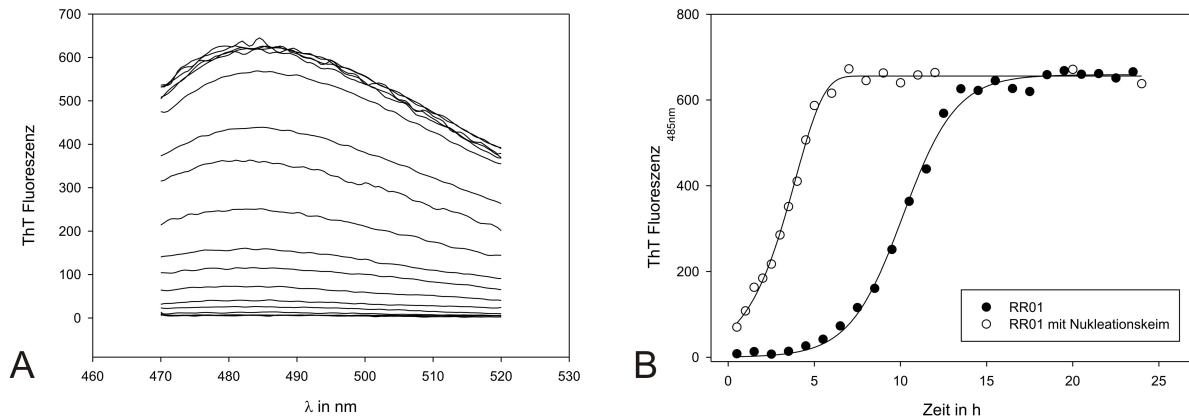


Abbildung 78: (A) ThT Fluoreszenz-Spektren der Aggregation on RR01, aufgenommen nach unterschiedlichen Inkubationszeiten. (B) Darstellung der Fluoreszenzintensitäten bei 485 nm in Abhängigkeit von der Zeit der Aggregation von RR01 mit und ohne Nukleationskeim (Peptidkonzentration = 200 μ M, in 10 mM Phosphat-Puffer, 0,1% (w/w) NaN₃, pH 7,4, 10 μ M ThT).

mit dem Beginn der Plateau-Phase. Der kinetische Verlauf spricht auch in diesem Fall für einen nukleationsabhängigen Mechanismus der Aggregation. Die Zugabe von Nukleationskeimen in Form von fragmentierten gealterten Fibrillen (5% (v/v)) führt zum sofortigen Wachstum der Fibrillen. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen nach 24 h typische unverzweigte amyloide Fibrillen (Abbildung 79). Es lassen sich gleichzeitig helikal gewundene breite Bänder sowie röhren- und trichterförmige Aggregate nachweisen. Eine detaillierte strukturelle Charakterisierung mit Hilfe von Röntgenbeugungsstudien und Aufnahmen mit dem Rasterkraftmikroskop wurden durchgeführt und sind Teil einer noch unveröffentlichten Publikation.^[559] In dieser Arbeit konnte ebenfalls die charakteristische *cross- β* -Struktur mit den typischen Reflexionen bei 4.7 Å und einer diffusen Reflexion bei 10 Å nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnte ein tieferer Blick in die Protofilament-

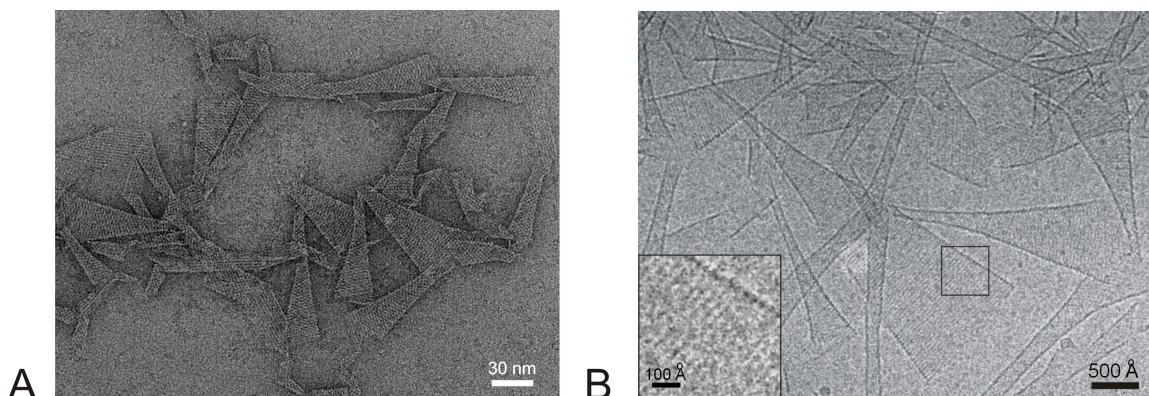


Abbildung 79: (A) TEM-Aufnahme und (B) Kryo-TEM-Aufnahme einer 200 μ M-Probe von RR01 (Peptidkonzentration = 200 μ M, in 10 mM Phosphat-Puffer, 0,1% (w/w) NaN₃, pH 7,4).

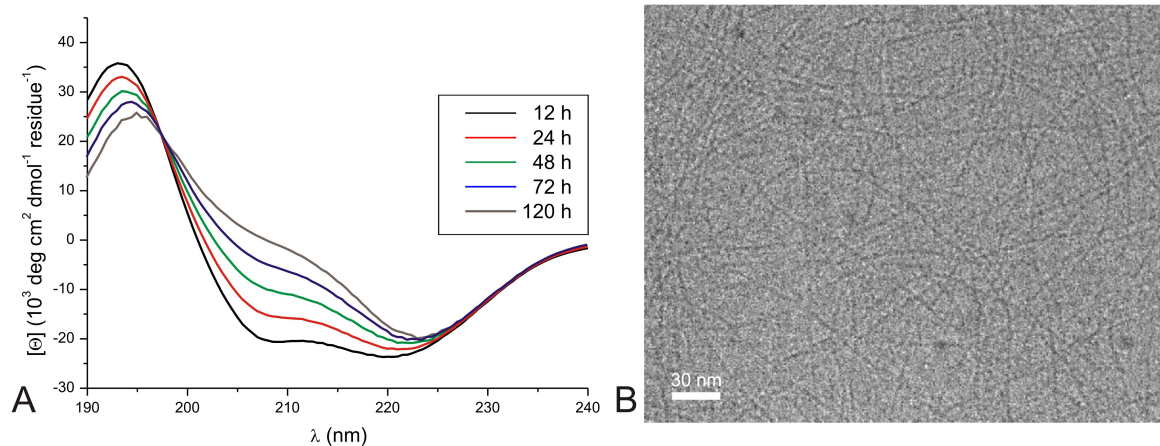


Abbildung 80: (A) CD-Spektren nach unterschiedlichen Inkubationszeiten (0-120 h) und (B) Kryo-TEM-Aufnahme von RR01 (Peptidkonzentration = 500 μ M, in 10 mM Azetat-Puffer, 0,1% (w/w) NaN_3 , pH 4,0).

Struktur gewonnen werden (10.5.1 Aufklärung der supramolekularen Struktur des Modellpeptids RR01).

CD-Spektren des Modellpeptids RR01 bei einem pH-Wert von 4,0 zeigen eine α -helikale Konformation mit zwei Minima bei 208 und 222 nm, wobei das Minimum bei 208 nm mit längeren Inkubationszeiten in Relation zum zweiten Minimum bei 222 nm abnimmt. Dies lässt sich auf Streuungseffekte an α -helikale Aggregate zurückführen (Abbildung 80, A).^[557] Kryo-TEM-Aufnahmen einer 500 μ M zeigen fibrilläre Aggregate mit einem konstanten Durchmesser von ca. 2,5 bis 3 nm (Abbildung 80, B). Damit zeigt das Modellpeptid RR01 mit einer zum Modellpeptid VW19 gegensätzlichen Primärstruktur auch ein entgegengesetztes Faltungsverhalten mit der Bildung amyloider Fibrillen bei pH 7,4 und α -helikalen Fibrillen bei pH 4,0.

10.5.1 Aufklärung der supramolekularen Struktur des Modellpeptids RR01

Die ersten Ergebnisse zur Aufklärung der Struktur durch Dr. Hans v. Berlepsch vom Forschungszentrum Elektronenmikroskopie der FU Berlin beruhen auf der Charakterisierung der Morphologie durch elektronenmikroskopische Methoden und führten bisher nicht zu einem molekularen Modell. Der molekulare Aufbau kann jedoch einen tieferen Einblick in den Prozess der Strukturbildung des Modellpeptids einschließlich der zu Grunde liegenden Wechselwirkungen geben, was möglicherweise auch Aussagen über den Aggregationsprozess von natürlichen amyloidogenen Proteinen und Peptiden ermöglicht. Darüber hinaus bildet die strukturelle Charakterisierung die Grundlage für die Entwicklung von Strategien zur Inhibition der Aggregation.

Die elektronenmikroskopischen Studien zeigten für das Modellpeptid RR01 diverse polymorphe amyloide Strukturen, wie z.B. Bänder, Röhren und Trichter. Die gereiften Fibrillen sind außerordentlich groß und hoch geordnet. Die Breite der Bänder und der Durchmesser der Röhren können mehrere hundert Å betragen. Die einzelnen Protofilamente sind sehr einfach zu detektieren, so dass dieses Modellpeptid für ausführliche strukturelle Untersuchungen ausgewählt wurde. Die hochgeordnete Struktur äußert sich in elektronenmikroskopischen Studien in einer hohen Kontrastschärfe, was auf ausgeprägte elektrostatische Wechselwirkungen zurückgeführt werden kann. Die pH-Abhängigkeit der Fibrillenbildung deutet ebenfalls auf eine hohe Bedeutung elektrostatischer Wechselwirkung hin. Man kann somit schlussfolgern, dass die elektrostatische Anziehung bzw. Abstoßung der zahlreichen geladenen Seitenketten der Aminosäuren Glutamat und Lysin bei neutralem pH-Wert keine unspezifische Aggregation erlauben, sondern die Bildung der amyloiden *cross-β*-Struktur zu einer wenig variablen Packung der amyloidogenen Sequenzen dirigieren. Auf der Grundlage der elektronenmikroskopischen Untersuchungen ließ sich eine Elementarfibrille identifizieren, die wahrscheinlich das Grundelement der beobachteten diversen Überstrukturen, wie Bänder, Röhren und Trichter, bildet.^[559] Durch Fourier-Transformation einer Kryo-TEM Aufnahme lässt sich die Feinstruktur der Fibrille charakterisieren

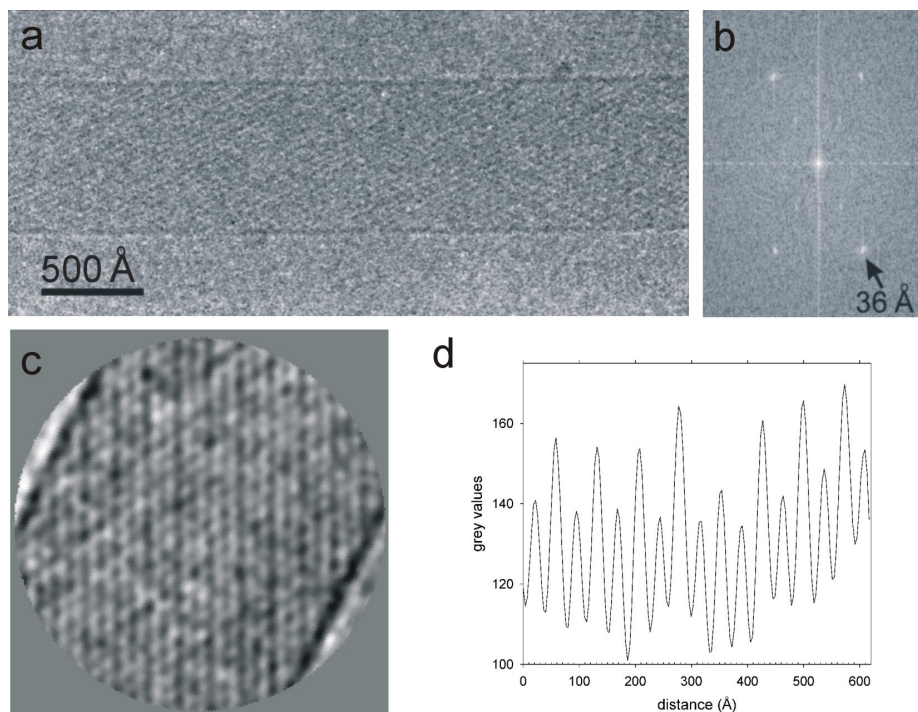


Abbildung 81: Kryo-TEM Aufnahme eines röhrenförmigen Aggregates von RR01 b) Aus der Fouriertransformation des Bildes ergibt sich für den primitiven Streifenabstand ein typischer Wert von 36Å. c) Das gemittelte Bild (Klassensumme) der Röhre zeigt, dass die Streifung mit einer Periode von ~70Å alterniert. d) Aus dem gemittelten Bild (c) errechnetes Dichteprofil der Röhre (aus Lit.^[559]).

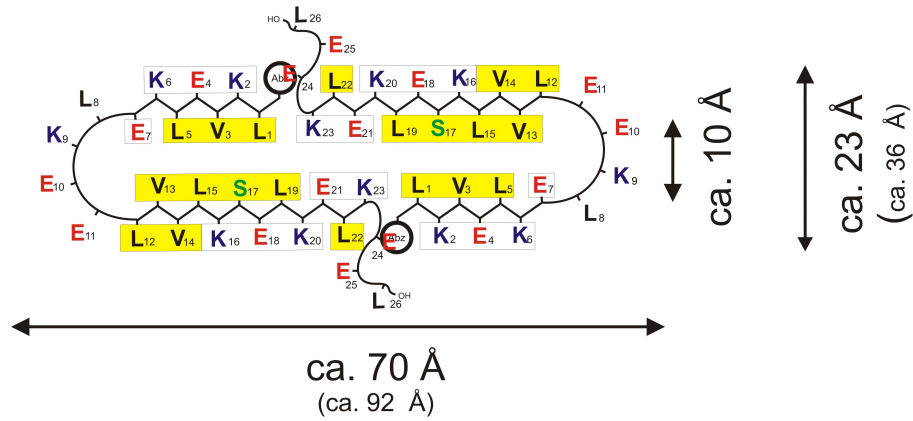
(Abbildung 81),^[559] was einen periodischen Abstand von 36 Å ergab. Die Errechnung eines Dichteprofiles auf Basis der Mittlung vieler Kryo-TEM Einzelbilder führt jedoch zu dem doppelten Abstand von ~ 70 Å (Bild). Die vorliegenden Daten wurden so interpretiert, dass die Elementarfibrille eine Breite von ~ 70 Å besitzt. Darüber hinaus ließ sich die Dicke der Elementarfibrille von ca. 36 Å mit Kryo-TEM und 23 Å mit TEM ebenfalls elektronenmikroskopisch bestimmen.^[559] Der Unterschied zwischen Kryo-TEM und TEM lässt sich auf die Anwesenheit von Wasser im Fall von Kryo-TEM und entsprechend einem Eintrocknungseffekt bei der TEM-Präparation zurückführen.

Zusätzlich zur Charakterisierung mit Hilfe von TEM und Kryo-TEM wurden Röntgenbeugungsexperimente und Untersuchungen mit dem Rasterkraftmikroskop durchgeführt, welche die Dimension der Abhängigkeit von Wasser bestätigen konnten.^[559]

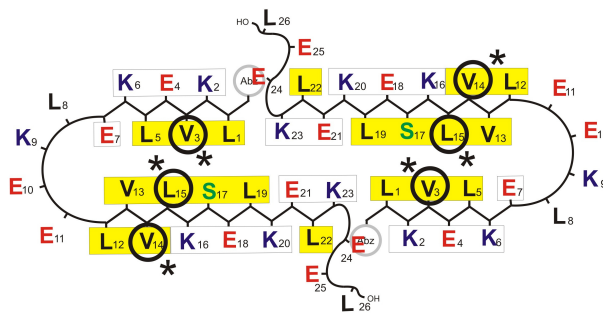
Die Röntgenbeugungsexperimente zeigten darüber hinaus die typischen Reflexe der *cross-β*-Struktur amyloider Aggregate bei 4,7 Å und ca. 10 Å.^[559]

Der Abstand von Aminosäure zu Aminosäure in der gestreckten *β*-Faltblatt-Konformation beträgt ca. 3,4 Å. Bei der Breite der Elementarfibrille von ca. 70 Å entspricht dies einer Länge von 20 Aminosäuren. Die Primärstruktur von RR01 besteht aber 26 Aminosäuren zuzüglich der UV-aktiven Gruppe Abz. Die Dimensionen, die sich aus elektronenmikroskopischen Studien ergeben, sprechen nicht für eine Zusammenlagerung der amyloidogenen Sequenzen in gestreckter Form, sondern eher der dem *Aβ*-Peptid nicht unähnlichen *β*-Faltblatt-*turn-β*-Faltblatt-Struktur. Überlegungen auf Basis der vorhandenen Daten führten zu einem vorläufigen Packungsmodell, dass eine Interaktion zwischen zwei Molekülen RR01 in einer *β*-Faltblatt-*loop-β*-Faltblatt-Struktur vorsieht (Abbildung 82).^[78]

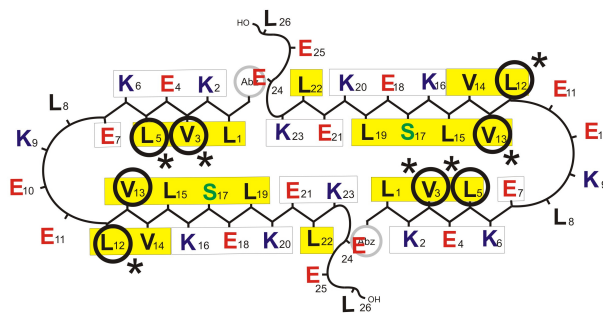
In dieser Modellvorstellung befinden sich im inneren Kern der Fibrille überwiegend hydrophobe Aminosäuren. Jedoch gibt es auch sich direkt gegenüberliegende entgegengesetzt geladene Glutamat- und Lysinseitenketten, die möglicherweise über elektrostatische Wechselwirkungen mit einander interagieren. Für die Erstellung eines Modells auf atomarer Ebene sind ausführliche Festphasen-NMR-Studien notwendig. Die chemische Verschiebung ist dabei von der Primärstruktur, von der räumlichen Anordnung, d.h. von der Sekundärstruktur, als auch von der Umgebung, in der sich die Aminosäure befindet, abhängig. Die Primärstruktur von RR01 weist sich wiederholende Sequenzen von den Position 4 bis 12 und 18 bis 26 auf, die möglicherweise zur Überlappung der chemischen Verschiebung führt, was die spezifische Bestimmung der einzelnen Aminosäuren in der Primärstruktur erschwert. Daher wurden vier RR01-Peptide mit ¹³C und ¹⁵N uniform markierten Aminosäuren an unterschiedlichen Positionen synthetisiert. Den



RR01-V₃L₁₅V₁₄



RR01-V₃L₅V₁₃



RR01-L₁V₃L₁₉K₂₃

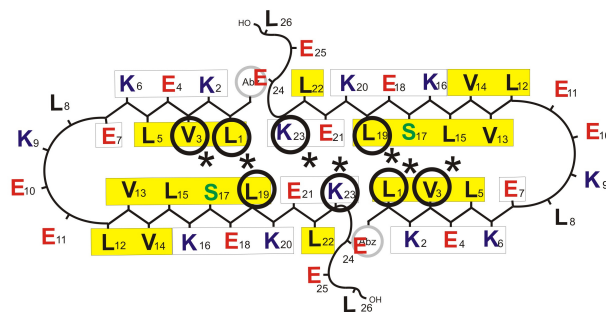


Abbildung 82: (oben) Vorläufiges Packungsmodell einer Elementarfibrille des Peptids RR01 (Blickrichtung längs der Wasserstoffbrückenbindungen in Richtung der Fibrillenlängsachse, Dimensionen in Klammern entsprechen dem Zustand in Gegenwart von Wasser). Unterschiedliche Labeling-Strategie im vorläufigen Packungsmodell einer Elementarfibrille des Peptids RR01. Für die markierten Positionen wurden C¹³ und N¹⁵ uniform markierte Aminosäuren verwendet.

Ausgangspunkt der Fragestellung der unterschiedlichen *Labeling*-Strategien, bildete das zuvor beschriebene Modell. Die ersten drei selektiv markierten Variationen von RR01 (RR01-V₃L₁₅V₁₄; RR01-V₃L₅V₁₃; RR01-L₁V₃L₁₉K₂₃) sind in Abbildung 82 dargestellt. Es wurden nur wenige Position mit markierten Aminosäuren versehen. Die Positionen wurden so gewählt, dass sich die Umgebung für jede markierte Aminosäure unterscheidet und es aufgrund der räumlichen Nähe der markierten Aminosäuren nach dem zugrundeliegenden Modell zu Kopplungen zwischen den Aminosäuren kommt.

Nach der erfolgreichen Synthese der Peptide wurden die Fibrillen durch Modifizierung des pH-Werts präpariert (siehe 14.2.4 *Probenpräparation*). Die ausführlichen Festphasen-NMR-Studien wurden von Frau Prof. Monica de Santos Freitas (Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ) in einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Hartmut Oschkinat (Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie, FMP) durchgeführt und in einem vorläufigen Bericht zusammengefasst.

Die Abbildung 83 zeigt eine PDS (*Proton Driving Spin Diffusion Experiment*) Spektrum von RR01-V₃L₁₅V₁₄. Im Spektrum werden zunächst einmal gut aufgelöste *Peaks*, was für eine hochgeordnete Struktur spricht. Interessanterweise lassen sich 5 Spin-Systeme feststellen, obwohl es nur drei markierte Aminosäuren in der Primärstruktur gibt. Im Bild sind die zusätzlichen Spin-Systeme mit V₁₄* and L₁₅* bezeichnet worden. Möglicherweise sind diese Aminosäuren in zwei verschiedenen Umgebungen eingebettet. Eine Erklärung kann in dem Vorhandensein von polymorphen Strukturen liegen, die häufig bei der Präparation von amyloiden Fibrillen auftreten. V₁₄ und V₃ zeigen eine ähnliche chemische Verschiebung, so dass eine Interaktion zwischen V₃ und L₁₅ bzw. V₁₄ und L₁₅ nicht unterschieden werden kann. Mit dem Peptid RR01-V₃L₁₅V₁₄ gelang es nicht Information über die intermolekularen Wechselwirkungen zwischen den β -Faltblattstrukturen zu gewinnen. dem zugrundeliegenden Modell sollte das Peptid RR01-V₃L₅V₁₃ eine Verbindung zwischen L₅ und V₁₃ zeigen. Darüber hinaus wurde die Position L₁₂ ebenfalls markiert, um eine Unterscheidung zwischen V₃ und V₁₄ zu ermöglichen. Man konnte alle markierten Aminosäuren identifizieren, jedoch ließ sich keine intermolekulare Kontakte feststellen.

Die Eigenschaft amyloider Aggregate polymorphe Strukturen zu bilden, macht eine Form der Kontrolle der Reproduzierbarkeit der Fibrillenstruktur von RR01 notwendig. Die markierte Aminosäure V₃ ist die gemeinsame Komponente aller markierten Aminosäuren, was einen Vergleich der chemischen Verschiebung ermöglicht. Das selektiv markierte Peptid RR01-L₁V₃L₁₉K₂₃ sollte Aufschluss über die vorgeschlagene Dimerbildung des zugrundeliegenden Modells geben (Abbildung 84). Nach dem Modell sollte ein Kontakt zwischen L₁ und K₂₃ der Interaktionsfläche zwischen zwei RR01 Molekülen sichtbar sein, was sich jedoch nicht

nachweisen ließ. Dieses Ergebnis spricht gegen das in Abbildung 82 dargestellte Modell. Dagegen ließ sich eine schwache Verbindung zwischen V_3 und K_{23} , d.h. zwischen $V_3C\alpha$ - $K_{23}C\gamma$, $V_3C\gamma$ - $K_{23}C\epsilon$ and $V_3C\gamma$ - $K_{23}C\gamma$, nachweisen. Es ließ bisher noch nicht unterscheiden, ob diese Verbindung zwischen V_3 und K_{23} inter- oder intramolekular ist.

Zusätzlich wurden Pulssequenzen angewendet, die eine Unterscheidung zwischen flexiblen und starren Segmenten der Fibrillen ermöglichen. Mit Hilfe der *Cross-Polarisation* (CP Transfer) lassen sich starre Sequenzen detektieren und ein umgekehrtes INEPT-Experiment (*Insensitive*

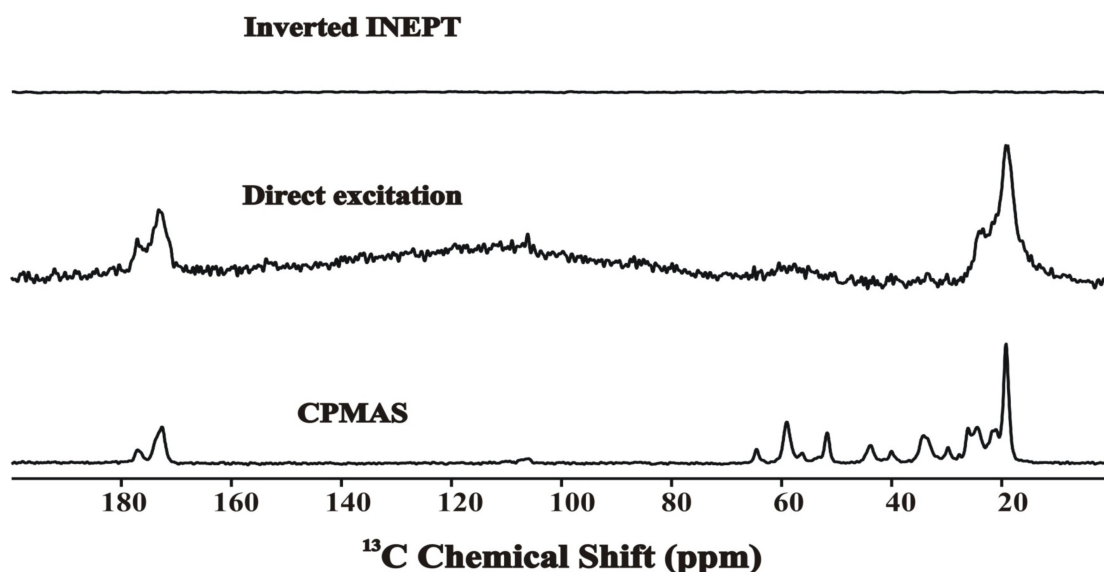


Abbildung 85: Verschiedene Ansätze zur Analyse der Mobilität der amyloiden Fibrillen von RR01- $V_3V_{14}L_{15}$ (oben) umgekehrtes INEPT-Experiment (*Insensitive Nuclei Enhancement by Polarisation*) (mitte) Direkte Anregung (unten) CP-Experiment kombiniert mit *magic angle spinning* (MAS).

Nuclei Enhancement by Polarisation) kann Aufschluss über flexible Regionen geben. Das CP-Experiment mit *magic angle spinning* (MAS) zeigte eine Verteilung gut aufgelöster *Peaks*. Das 1D- ^{13}C -INEPT von RR01- $V_3V_{14}L_{15}$ zeigt dagegen keine *Peaks*. Die entsprechenden Spektren der anderen RR01 Variationen zeigten vergleichbare Ergebnisse. Dies spricht gegen größere flexible Regionen der amyloiden Fibrillen und für eine generell starre Struktur von RR01 Fibrillen. Diese Ergebnisse deuten auf eine nahezu über die gesamte Sequenz ausgedehnte amyloide Kernstruktur.

Für die bis hierhin betrachteten ^{13}C und ^{15}N markierten Variationen deuten die Werte für die chemische Verschiebung überwiegend auf eine β -Faltblatt-Struktur, denn innerhalb einer β -Faltblattstruktur zeigt sich für das Carbonyl-C-Atom und für das C_α -Atom eine chemische Verschiebung von 1-3 ppm in Hochfeldrichtung von und für das C_β -Atom 1-3 ppm in Tieffeldrichtung (Abbildung 86).^[560] Die Analyse der Torsionswinkel, mit Hilfe der TALOS

Software deutet auf eine ausgedehnte β -Faltblattstruktur von K₂ bis E₁₈. Die Länge der β -Faltblattstruktur ist bisher durch die fehlende Bestimmung der einzelnen Aminosäuren am C-Terminus begrenzt und ist womöglich noch länger. Zusätzlich zu den mit Hilfe

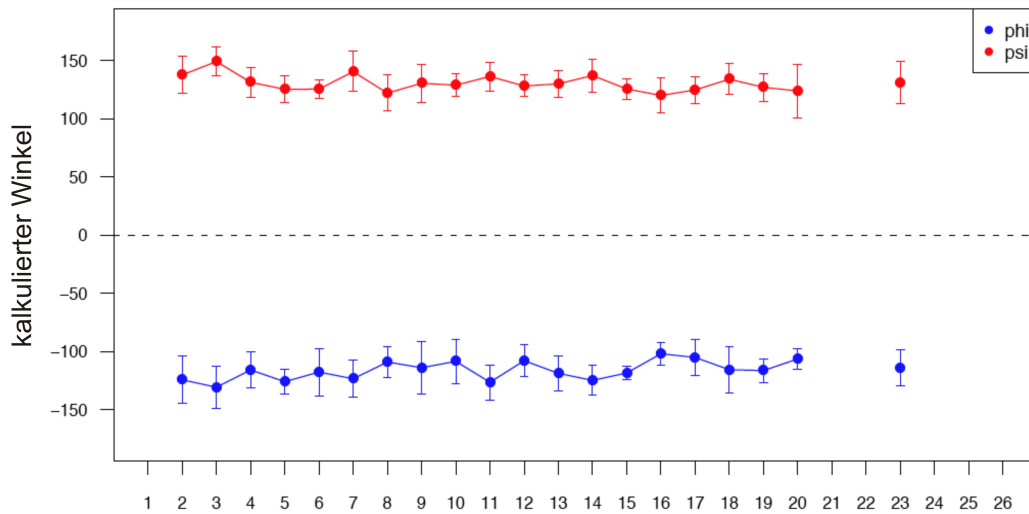


Abbildung 86: Sequenzabhängige Ausgabe der TALOS-Software bezüglich der Torsionswinkel ϕ und ψ .

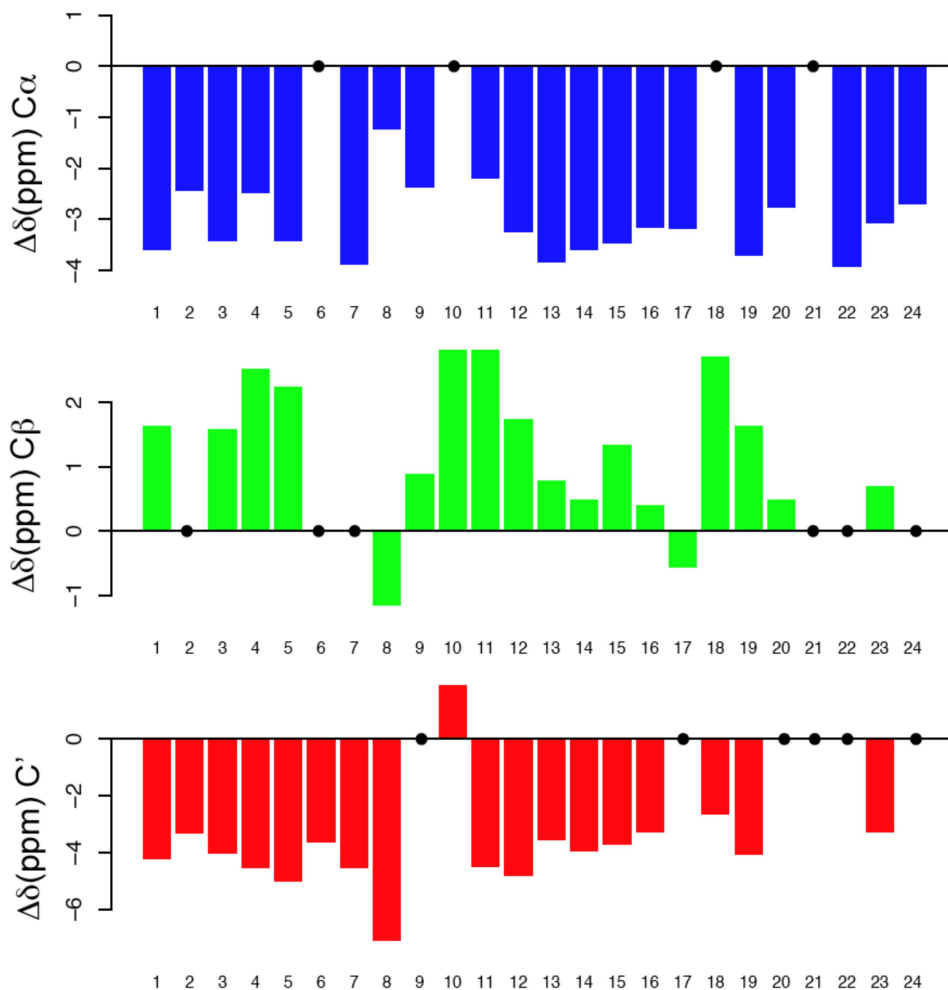


Abbildung 87: Sequenzabhängige Darstellung der chemischen Verschiebung (negativ = Tieffeld, positiv = Hochfeld).

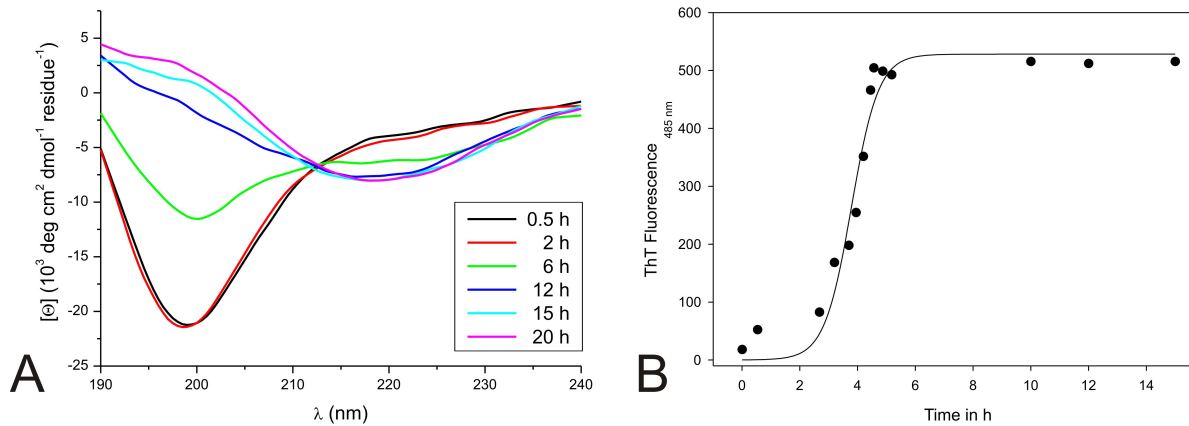


Abbildung 88: (A) CD-Spektren nach unterschiedlichen Inkubationszeiten (0-20 h) und (B) ThT-Assay von exprimierten RR01 (Peptidkonzentration = $200\mu\text{M}$, in 10 mM Phosphat-Puffer, 0,1% (w/w) NaN_3 , pH 7,4).

der Festphasen-Peptid-Synthese hergestellten RR01-Variationen wurden drei unterschiedlich markierte Variationen von RR01 exprimiert und gereinigt. Das exprimierte RR01 zeigt ein zum synthetisierten RR01 vergleichbares Aggregationsverhalten mit einer durchaus beschleunigten Kinetik in der CD Spektroskopie sowie im ThT-Assay (Abbildung 88). Darüber hinaus zeigt das exprimierte RR01 eine zum synthetisierten RR01 vergleichbare Morphologie der amyloiden Fibrillen (Abbildung 89) zeigt das 2D-NMR Spektrum eines Proton Driving Spin Diffusion Experimentes (PDS) an 2-13 Glycerol markierten RR01 Fibrillen. Aufgrund der Mischungszeit von 500 ms sind sowohl kurze als auch weitreichende Verbindungen zu erkennen, die sich zum Teil überlappen, was eine

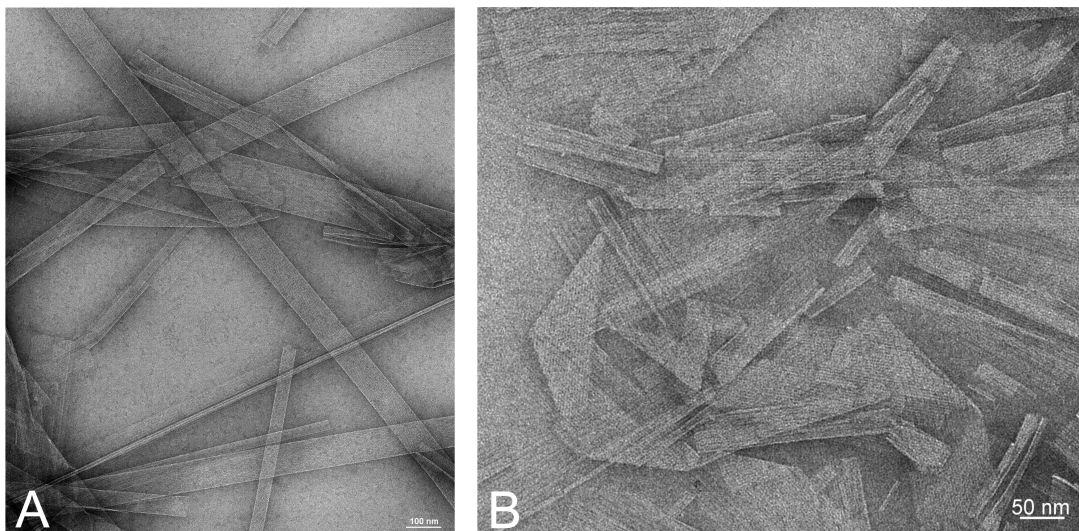


Abbildung 89: TEM-Aufnahme von amyloiden Fibrillen des exprimierten RR01 (Peptidkonzentration = $200\mu\text{M}$, in 10 mM Phosphat-Puffer, 0,1% (w/w) NaN_3 , pH 7,4).

10.6 Modellpeptide basierend auf einer amphipathischen Helix

Helikale Strukturen einer ganzen Reihe natürlicher amyloidogener Peptide und Proteine basieren auf einer amphipathischen Helix ohne die definierten Charakteristika einer *Coiled Coil*-Struktur (siehe Abschnitt 5.1 *Die Bedeutung α -helikaler Intermediate*). Dazu gehören z.B. das $A\beta$ -Peptid oder auch IAPP. Aus diesem Grunde wurde das Repertoire der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Modellpeptide erweitert. Der wesentliche Unterschied besteht in einer weniger definierte Abfolge von polaren und hydrophoben Aminosäuren (siehe auch Kapitel 9.2 *Modellpeptide auf Basis einer amphipathischen Helix*). Ausgangspunkt bildet das Design der amphipathischen Helix α -AH. Es weist eine ausgedehnte hydrophobe Domäne aus ausschließlich Leucinresten und eine hydrophile Domäne mit den geladenen Aminosäuren Glutamat und Lysin ergänzt durch Alanin auf. Das gesamte Design soll eine möglichst hohe Tendenz zu Bildung α -helikaler Strukturen mit sich bringen. Daher wurden Aminosäuren mit einer hohen Propensität für α -helikale Konformation verwendet. Zusätzlich wurden die entgegengesetzt geladenen Aminosäuren Lysin und Glutamat in i und $i+4$ Position gesetzt, so dass die Möglichkeit zur Bildung von interhelikalen Salzbrücken besteht (Abbildung 92). Die Analyse der Primärstruktur mit TANGO und AGADIR ergibt zunächst eine hohe Tendenz zur Einnahme der helikalen Konformation bei neutralem pH Wert, aber auch eine Tendenz zur *cross- β* -Aggregation, welche sich nahezu über die gesamte Peptidlänge erstreckt (Abbildung 92, B). Die CD Spektren zeigen jedoch, dass α -AH in einem pH-Bereich von 4,0 bis 10 α -helikale Strukturen bei einer Konzentration von 100 μ M und bei einer Inkubationszeit von 0-120 h bildet. Die Spektren weisen überwiegend ein Minimum bei

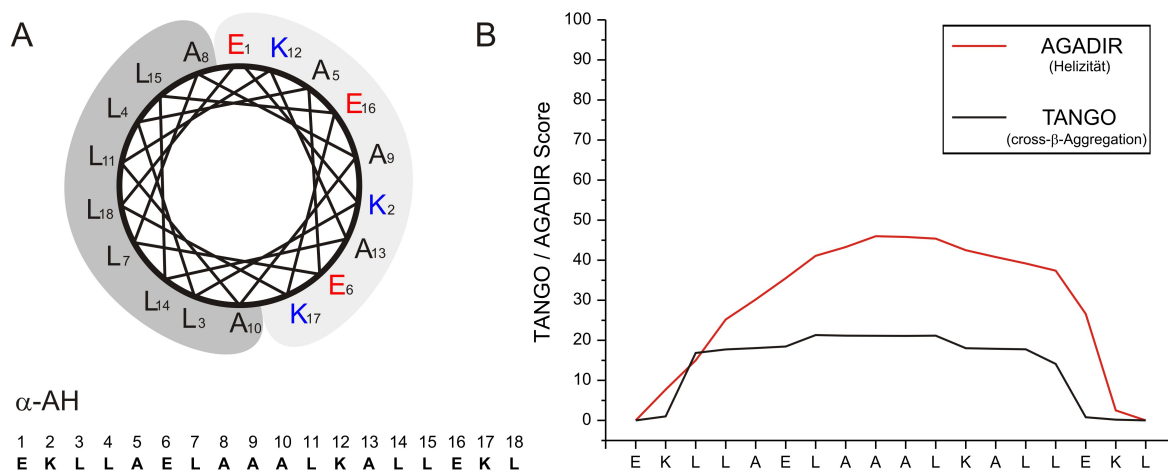


Abbildung 92: (A) Helical wheel-Darstellung und Primärstruktur vom Modellpeptid α -AH (B) Analyse der Primärsequenz von α -AH mit AGADIR und TANGO bei pH 7.4 und Raumtemperatur.

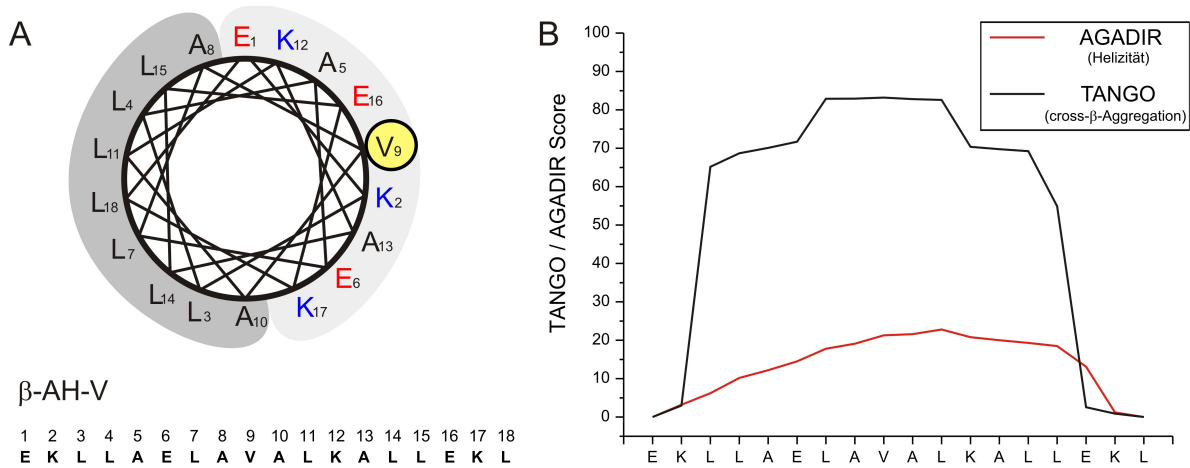


Abbildung 94: (A) Helical wheel-Darstellung und Primärstruktur vom Modellpeptid β -AH-V (B) Analyse der Primärsequenz von β -AH-V mit AGADIR und TANGO bei pH 7.4 und Raumtemperatur.

208 nm und ein Minimum bei 218 nm auf (Abbildung 93). Bei einem pH Wert von 4,0 zeigt sich eine zeitabhängige Abnahme des Minimums bei 208 nm, relativ zum zweiten Minimum Fasern zurückführen, jedoch sind zur Aufklärung elektronenmikroskopische Studien notwendig. In TEM-Aufnahmen lassen sich bei neutralen pH-Wert lediglich kleine Partikel

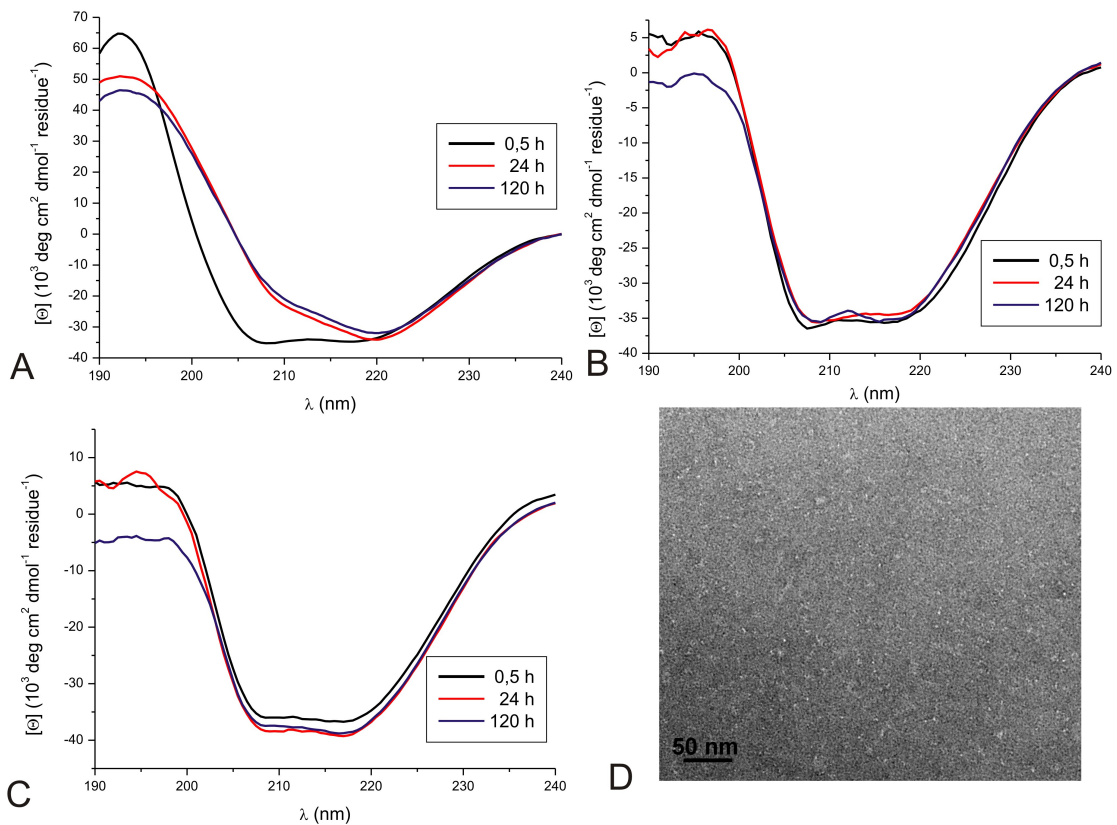


Abbildung 93: CD-Spektren nach unterschiedlichen Inkubationszeiten (0-120 h) für pH 4 (A) pH 7,4 (B) und pH 10 (C) und (D) TEM-Aufnahme von α -AH bei pH 7.4 (Peptidkonzentration = 100 μ M, in 10 mM Azetat-/Carbonat-/Phosphat-Puffer, 0,1% (w/w) NaN_3).

nachweisbar (Abbildung 93, D). Es konnten keine größeren Aggregate beobachtet werden. Bei

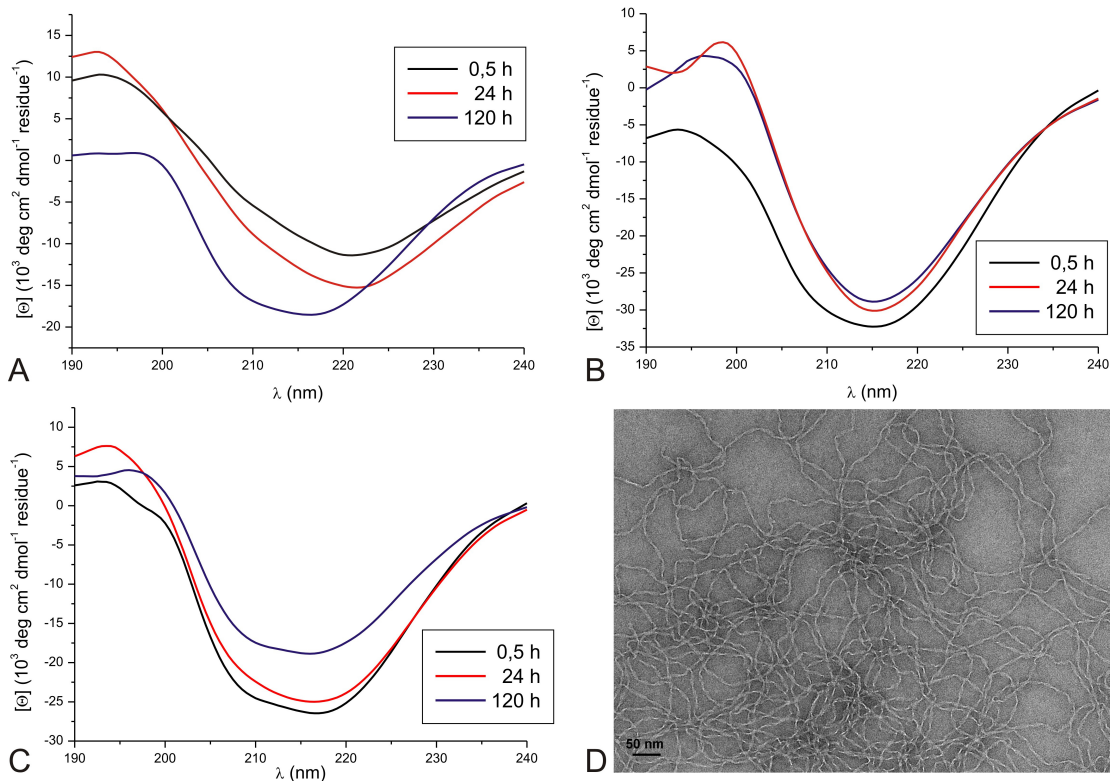


Abbildung 95: CD-Spektren nach unterschiedlichen Inkubationszeiten (0-120 h) für pH 4 (A) pH 7,4 (B) und für pH 10 (C) und TEM-Aufnahme (D) von β -AH-V bei pH 7.4 (Peptidkonzentration = 100 μ M, in 10 mM Carbonat-/Phosphat-Puffer, 0,1% (w/w) NaN_3).

gleichzeitiger Verschiebung des zweiten Minimums in Richtung größerer Wellenlängen (Abbildung 93, A). Dies lässt sich möglicherweise auf die chirale Streuung an α -helikalen Durch die Einführung der Aminosäure Valin an Position 9 in der hydrophilen Domäne, welche eine hohe Propensität für die β -Faltblattstruktur aufweist, wird die Tendenz zur Bildung von amyloiden Aggregaten deutlich erhöht. Die Analyse der Primärstruktur von β -AH-V mit TANGO und AGADIR ergibt im Vergleich zu α -AH bei neutralem pH Wert zunächst eine geringere Tendenz zur Bildung von α -helikalen Strukturen und eine stark erhöhte Tendenz zur *cross- β* -Aggregation (Abbildung 94). Die CD Spektren von β -AH-V in einem pH-Bereich von 4 bis 10 und bei einer Konzentration von 100 μ M und bei einer Inkubationszeit von 0-120 h, zeigen ein klares Minimum bei ca. 218 nm (Abbildung 95). In TEM-Aufnahmen lassen bei neutralen pH-Wert lange unverzweigte Fibrillen feststellen (Abbildung 95, D). Das Modellpeptid β -AH-V zeigt bei neutralem pH darüber hinaus den charakteristischen Anstieg in der Fluoreszenzintensität bei 485 nm im ThT Fluoreszenz Assay. Die Einführung der Aminosäuren Valin in der hydrophoben Domäne der amphipathischen Helix im Modellpeptid AH-V14 führt dagegen nicht zur Bildung von β -Faltblattstrukturen. Die CD Spektren bei pH 7,4 deuten mit zwei Minima bei 208 und 218 nm

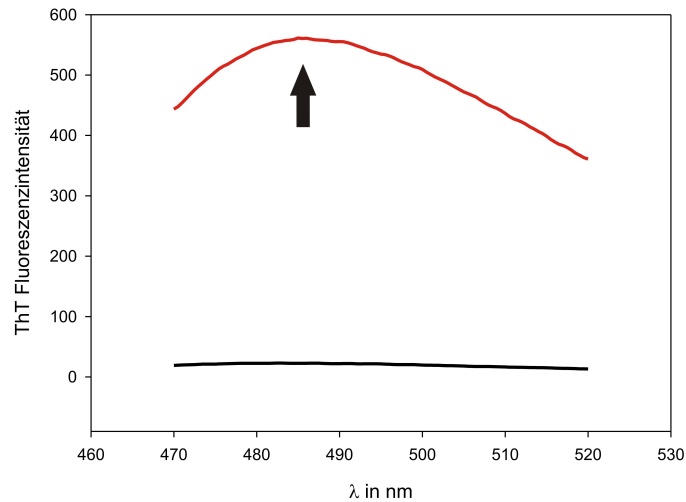


Abbildung 96: Thioflavin-T Assay. Charakteristischer Anstieg der ThT- Fluoreszenz bei 485 nm aufgrund der Bindung des Farbstoffs an amyloiden Aggregaten. (Peptidkonzentration = 100µM, in 10 mM Phosphat-Puffer, 0,1% (w/w) NaN₃, pH 7,4, 10 µM ThT)

auf die Ausbildung einer α -helikalen Konformation. Damit unterstreichen ebenfalls die Untersuchungen an diesen nicht *Coiled Coil*-basierten amphipathischen Helices die Feststellung, dass die Störung des amphipathischen Charakters einer Helix und damit die Reduzierung der Helizität eine Voraussetzung für die Bildung von amyloiden Aggregaten von amyloidogenen Peptidsequenzen ist, welche α -helikale Elemente aufweisen. Nur die Einführung von Valin im zentralen Abschnitt LAAAL führt letztendlich zur Bildung von

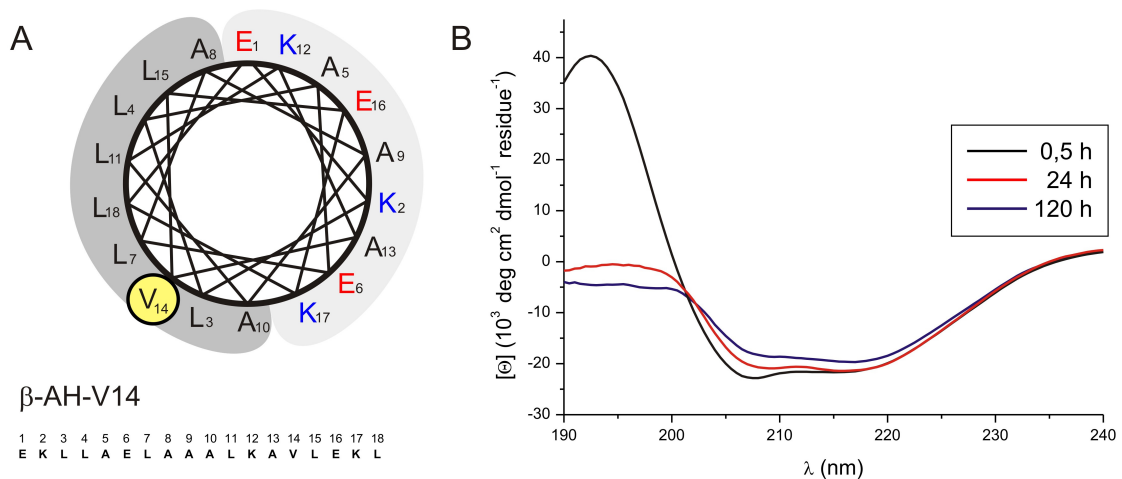


Abbildung 97: (A) Helical wheel-Darstellung und Primärstruktur vom Modellpeptid AH-V14.(B) CD-Spektren nach unterschiedlichen Inkubationszeiten (0-120 h) für pH 7,4 (Peptidkonzentration = 100µM, in 10 mM Phosphat-Puffer, 0,1% (w/w) NaN₃).

amyloiden Aggregaten. Damit erfüllt der Abschnitt LAVAL die Eigenschaften einer amyloidogenen Kernsequenz und es wird deutlich, dass für die Generierung der amyloidogenen Eigenschaft durch die Einführung von Valin ebenso die benachbarten Aminosäuren von großer Bedeutung sind.

10.7 NIAD-4 Fluoreszenz bei helikalen Fasern und amyloiden Fibrillen

Trotz der häufigen Anwendung von Thioflavin T in der Amyloidforschung weist es doch einige Nachteile auf. So lässt sich mit ThT nicht zwischen verschiedenen Konformationen und nicht zwischen verschiedenen oligomeren Zuständen unterscheiden, die während des Prozesses der Aggregation durchlaufen werden. Darüber hinaus ist es bekannt, dass ThT nicht nur an Amyloide bindet, sondern ebenfalls an Strukturen wie z.B. Nukleinsäuren, Keratin und Elastin-Fibrillen.^[561] Ein bedeutender Nachteil von ThT als Fluoreszenzfarbstoff basiert auf der positiven Ladung am quartären, heterozyklischen Stickstoff, was die Bindung an Amyloiden bei aziden pH-Wert auf Grund möglicher elektrostatischer Abstoßung erschwert.^[561-563] Dies ist der Fall bei der Anwendung von Thioflavin T zur Charakterisierung der amyloiden Aggregation des Modellpeptids VW19 bei pH 4,0. VW19 weist eine hohe positive Nettoladung (+6) bei pH 4 auf, so dass es zu einer elektrostatischen Abstoßung mit dem positiv geladenen Thioflavin T kommt. Daher kommt es trotz der Bildung amyloider Aggregate nicht zur typischen Verstärkung der Fluoreszenzintensität bei 485 nm (Abbildung 101). Daher kann Thioflavin T nicht für Inhibitionsstudien am Modellpeptid VW19 herangezogen werden. Aufgrund der geschilderten Nachteile sind eine Reihe von Alternativen entwickelt worden. Eine dieser Alternativen ist der ungeladene Fluoreszenzfarbstoff NIAD-4 ([5'-(4-Hydroxyphenyl)[2,2'-bithiophen]-5-yl]methyliden] propandinitril).^[564] Dieser Farbstoff

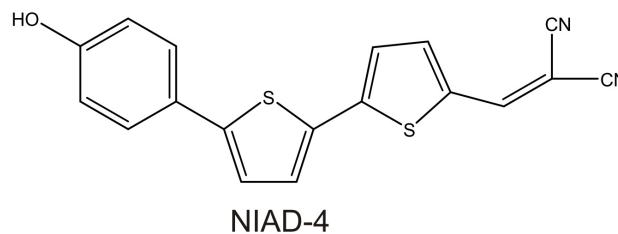


Abbildung 98: Chemische Struktur von NIAD-4.

zeigt eine rote Fluoreszenz mit einer hohen Quantenausbeute in Methanol. Die Löslichkeit in Wasser ist gering begleitet von einer geringeren Quantenausbeute (4.1 μM NIAD-4 in Phosphat-Puffer hat eine Quantenausbeute von 8×10^{-5}). Studien zeigen, dass der Farbstoff über einer Konzentration von 10 μM Aggregate bildet und in Gegenwart des aggregierten $A\beta$ -(1-40) zeigt der Fluoreszenzfarbstoff eine erhöhte Emission mit einer Quantenausbeute von 0,05 im Wellenlängenbereich von 525 bis 700 nm. *In vitro*-Studien konnten darüber hinaus zeigen, dass die NIAD-4 an ähnlichen Stellen an der $A\beta$ -Fibrille bindet wie das ebenfalls ungeladene Benzothiazolanilin-Derivat BTA-1. Swager *et al.* entwarfen nach dem Vorbild des ThT Moleküls den Fluoreszenzfarbstoff NIAD-4. Es weist zwei coplanare Thienylringe und einen relativ zu den Thienylringen leicht gedrehten Benzenring auf.^[564]

Proteinbindungsstudien zeigten, dass NIAD-4 mit $K_i = 10$ nM eine höhere Affinität für amyloide Fibrillen aufweist als das ThT-Molekül ($K_i = 580$ nM). Nach Anregung bei 475 nm lässt sich ein Fluoreszenzspektrum zwischen 525 bis 700 nm detektieren (Abbildung 99). Diese Eigenschaften, gepaart mit einer starken Rotverschiebung bei Bindung an amyloide Fibrillen und der Fähigkeit, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden, ermöglichen den Einsatz *in vitro* und *in vivo* Bildgebungsverfahren. NIAD-4 wurde bereits in einigen Arbeiten verwendet.^[565-567]

Die Anwendbarkeit und Spezifität des Fluoreszenz-Farbstoffs zur Vorbereitung der Inhibitionsstudien mit den Modellpeptiden musste zunächst getestet werden. Dazu wurden die amyloidogenen Modellpeptide RR01 und VW19 gewählt.^[556] Beide Modellpeptide zeigen in Abhängigkeit von pH-Wert und Peptidkonzentration komplementäres Faltungs- und Aggregationsverhalten.^[516] Im Wesentlichen unterscheidet sich das Design nur durch eine invertierte Position der geladenen Aminosäuren Lysin und Glutamat in *b*, *c* und *f* Position. Dadurch weisen die Peptide einen starken Unterschied in der Nettoladung und ein entgegengesetztes pH-abhängiges Faltungsverhalten auf. VW19 zeigt bei pH 7,4 mit einer Nettoladung von +2 α -helikale Fasern und amyloide Aggregate bei pH 4,0 und mit Nettoladung von +6. RR01 zeigt es im Prinzip ein entgegengesetztes Faltungsverhalten mit amyloiden Aggregaten bei pH 7,4 mit einer Nettoladung von -2 und α -helikalen Fasern bei pH 4,0 mit einer Nettoladung von ca. +3.

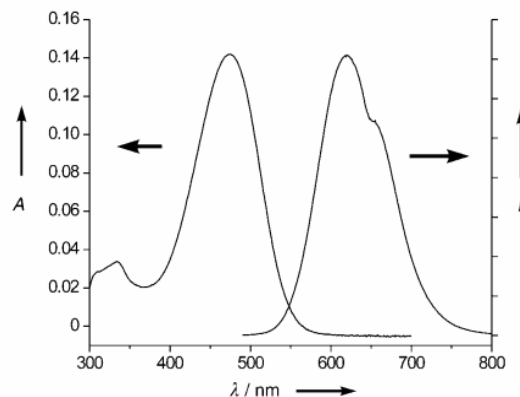


Abbildung 99: Absorptions- und Fluoreszenzspektrum von NIAD-4 in Methanol (Extinktionskoeffizient $\epsilon(475 \text{ nm})$ 35700, Fluoreszenz Quantenausbeute 0,15). Lit.^[564]

Zunächst wurde ein Kontrollexperiment mit dem Modellpeptid RR01 durchgeführt, dessen Aggregation mit dem Fluoreszenzfarbstoff verfolgt werden kann. Wie erwartet, wurde für den ungefalteten Zustand kein Fluoreszenzanstieg im Wellenlängenbereich 470 bis 520 nm festgestellt. Nach einer Inkubationszeit von 24 h konnte aufgrund der Aggregation zu amyloiden Fibrillen wie erwartet ein Fluoreszenzsignal bei 485 nm festgestellt werden. Der

gleiche Versuchsansatz mit NIAD-4 anstelle von ThT zeigt im ungefalteten Zustand ebenfalls keine Fluoreszenz im Wellenbereich von 525 bis 700 nm. Jedoch lässt sich nach einer Inkubationszeit von 24 h eine starke Fluoreszenzemission bei 610 nm feststellen, die im Prinzip mit der erhöhten Intensität von Thioflavin T in Gegenwart von amyloiden Aggregaten vergleichbar ist (Abbildung 101). Der NIAD-4-Farbstoff scheint damit in ähnlicher Weise anwendbar zu sein, wie Thioflavin T. Wie bereits beschrieben, führte die Anwendung von

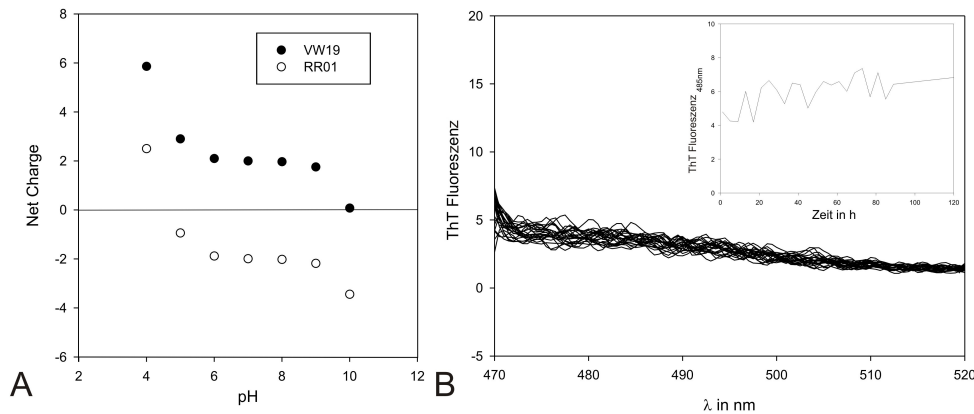


Abbildung 100: (A) Berechnete Nettoladung in Abhängigkeit von pH-Wert für das Modellpeptid VW19 und RR01. (B) ThT Fluoreszenz während der Aggregation von VW19 (Peptidkonzentration VW19 = 150 μ M, in 10 mM Azetat-Puffer, 0,1% NaN_3 , pH 4,0, 10 μ M ThT).

Thioflavin T auf amyloide Fibrillen des Modellpeptids VW19 nicht zum gewünschten Fluoreszenzsignal. Die Anwendung von NIAD-4 auf VW19 in ungefaltetem Zustand führt dagegen zu einem Fluoreszenzsignal. VW19 im fibrillären Zustand führt zu einem Fluoreszenzsignal zwischen 525 und 700 nm mit einem Maximum bei 585 nm. Die unterschiedlichen Maxima für RR01 und VW19 lassen sich womöglich auf unterschiedliche Bindungsstellen an der Oberfläche der amyloiden Fibrillen oder auf den unterschiedlichen pH-Wert zurückführen. Die Spezifität von NIAD-4 wurden anhand von α -helikalen Fasern der Modellpeptide RR01 und VW19 bei veränderten pH-Werten getestet. Eine 500 μ M Lösung von VW19 bildet bei neutralem pH-Wert innerhalb von 24 h nanometerlange α -helikale Fasern. Die NIAD-4 Fluoreszenzspektren in Gegenwart des ungefalteten Zustands, α -helikale Fasern und amyloide Fibrillen von VW19 sind zum Vergleich in einer Abbildung dargestellt. NIAD-4-Fluoreszenzspektren der Probe mit α -helikalen Fasern des VW19 zeigten einen leichten Anstieg der Fluoreszenz mit einem Maximum um 600 nm im Vergleich zum ungefalteten Zustand. Jedoch muss diese leichte Emission von 15 % im Vergleich zum Fluoreszenzspektrum der amyloiden Aggregate relativiert werden, da mit einer Konzentration von 500 μ M die 2,5fach größere Peptidkonzentration als in der Amyloid-Probe vorlag. Die hohe Konzentration war notwendig, um die Bildung von ausgedehnten α -helikalen Fasern zu

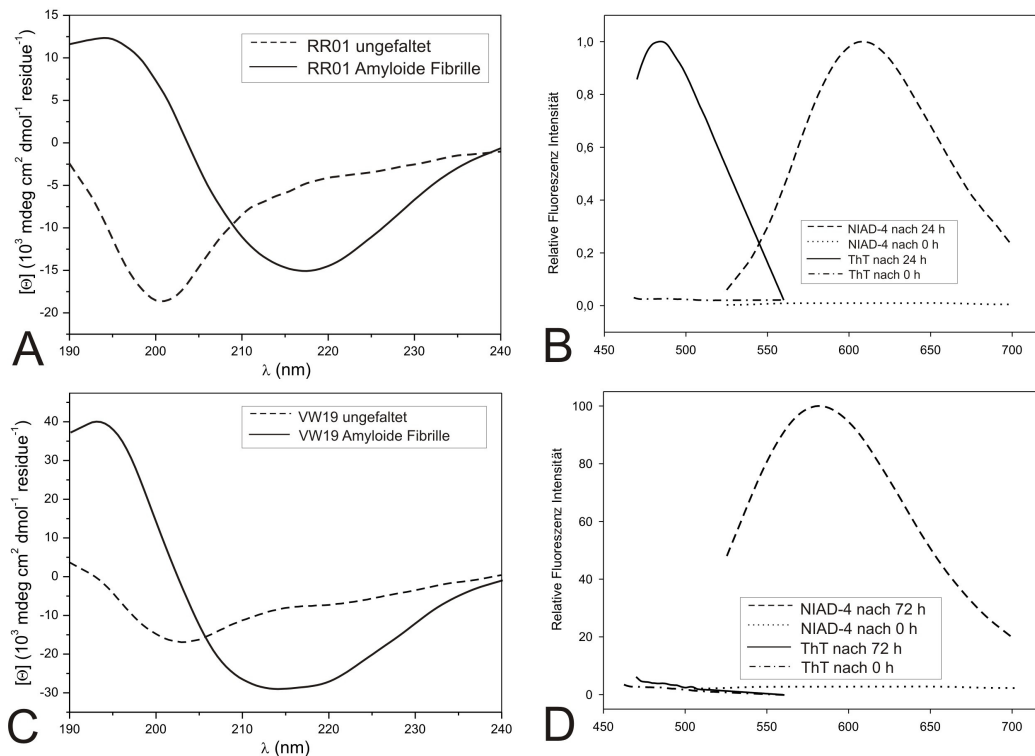


Abbildung 101: Vergleichende spektroskopische Charakterisierung von VW19 und RR01 (A) CD-Spektren von $200 \mu\text{M}$ von RR01 bei pH 7,4 nach 0 (----) und 24 h (—). (B) ThT Fluoreszenzspektren von RR01 nach 0 (·-·-) und 24 h (—) und NIAD-4 nach 0 h (·····) und 24 h (-·-·-). (C) CD-Spektren von $200 \mu\text{M}$ von VW19 bei pH 4,0 nach 0 (----) und 72 h (—). (D) ThT-Fluoreszenzspektren von VW19 nach 0 (·-·-) und 72 h (—) und NIAD-4 nach 0 h (·····) und 72 h (-·-·-). Fluoreszenzspektren wurden normalisiert.

gewährleisten. Für das Modellpeptid RR01 konnten ähnliche Verhältnisse gezeigt werden, so dass man von einer Spezifität von NIAD-4 für amyloide Aggregate sprechen kann. Zur Prüfung der Anwendbarkeit von NIAD-4 für kinetische Untersuchungen wird NIAD-4 im Vergleich zu Thioflavin T auf die Aggregation des Modellpeptids RR01 angewendet, da hier beide Fluoreszenzfarbstoffe aufgrund der Bindung an amyloiden Aggregaten ein Fluoreszenzsignal zeigen. Der kinetische Verlauf mit Thioflavin T weist zumeist eine anfängliche Phase ohne Fibrillenwachstum auf (*lag time*), in der zunächst der Nukleus gebildet werden muss. Ist der Nukleus gebildet, beginnt die Wachstumsphase bzw. Elongationsphase, in welcher der größte Anteil des amyloidogenen Peptids zu Fibrillen aggregiert, was zu einem Anstieg des Fluoreszenzsignals führt. Daran schließt sich die Plateauphase an, in der kein weiteres Wachstum der Fibrillen mehr stattfindet und das Fluoreszenzsignal entsprechend stagniert. Insgesamt ergibt sich eine für das Fibrillenwachstum charakteristische sigmoidale Kurve. Dieser kinetische Verlauf wird auf einen nukleationsabhängigen Mechanismus zurückgeführt. Das Modellpeptid RR01 zeigt mit Thioflavin T diesen charakteristischen Verlauf. Für den Vergleich des kinetischen Verlaufs

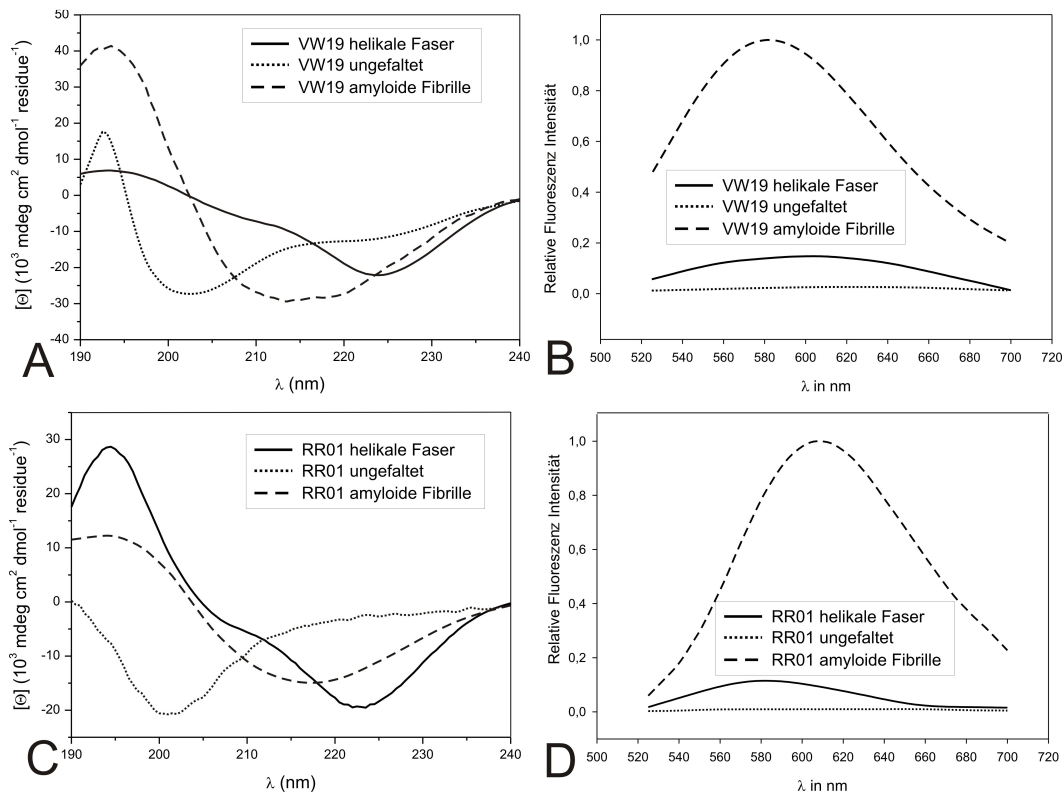


Abbildung 102: NIAD-4 Fluoreszenz in Gegenwart von α -helikalen Fasern. (A) CD-Spektren von 50 μM (.....) und 200 μM (----) bei pH 4,0 und 500 μM (—) Peptidlösung von VW19 bei pH 7,4 nach 72 h. (B) Normalisierte NIAD-4 (10 μM) Fluoreszenzspektren von 50 μM (.....) und 200 μM (----) bei pH 4,0 und 500 μM (—) Peptidlösung von VW19 bei pH 7,4 nach 72 h. (C) CD-Spektren von 50 μM (.....) und 200 μM (----) bei pH 7,4 und 500 μM (—) Peptidlösung von RR01 bei pH 4,0 nach 72 h. (D) Normalisierte NIAD-4 (10 μM) Fluoreszenzspektren von 50 μM (.....) und 200 μM (----) bei pH 7,4 und 500 μM (—) Peptidlösung von RR01 bei pH 4,0 nach 72 h.

mit dem Fluoreszenzfarbstoff NIAD-4 wurden identische Präparationsprotokolle verwendet. Die vollständigen Emissionsspektren sind Abbildung 103 dargestellt. Zusätzlich wurde die konformationelle Änderung mit Hilfe von CD-Spektroskopie verfolgt (Abbildung 103, C). In Abbildung 103, D ist der kinetische Verlauf der Aggregation von RR01 in Gegenwart von ThT und NIAD-4 dargestellt. Die Anwesenheit von Nukleationskeimen, in Form von fragmentierten amyloide Fibrillen des RR01, führt in beiden Fällen zur vollständigen Reduktion der lag time. Für den Vergleich des kinetischen Verlaufs der NIAD-4 und ThT-Fluoreszenz sowie der Entwicklung der CD-Spektren wurden die Werte bei 485 nm für ThT, die Werte für die maximalen Intensitäten für NIAD-4 und die absoluten Werte der Elliptizität $[\Theta]$ bei 218 nm, wo sich das für β -Faltblattstrukturen charakteristische Minimum entwickelt, normalisiert, in Abhängigkeit der Zeit aufgetragen und mit folgender Gleichung gefittet, die bereits zur Beschreibung der Kinetik der Aggregation herangezogen wurde^[568-570] (Abbildung 103, E).

$$I_{Fl} = a + \frac{b}{1 + e^{-(t-t_{50})/\tau}}$$

Das einfachste kinetische Modell beinhaltet die Zusammenlagerung von Monomeren, die Bildung eines kritischen Nukleus und das fibrilläre Wachstum.^[568-570] Die in Abbildung 104, E dargestellten Kurven wurden zuvor so normalisiert, dass sie bei $a = 0$ mit der *lag time* beginnen und die Plateauphase bei $b = 1$ erreichen. Die übrigen Parameter, d.h. Wachstumsrate k_{app} und *lag time* t_{lag} stehen mit den Parametern des Fits t_{50} and τ durch $k_{app} = b/4\tau$ und $t_{lag} = t_{50} - 2\tau$ in Beziehung und beschreiben den Übergang. Es lassen sich nur geringe Unterschiede bezüglich des Beginns des Fibrillenwachstums und der Wachstumsrate feststellen.^[556] Die Unterschiede zwischen dem kinetischen Verlauf von CD und ThT sind relativ klein und lassen sich vernachlässigen. Lediglich bezüglich des Beginns der Aggregation lassen sich deutlichere Unterschiede feststellen, wobei das CD Signal früher ansteigt, als das Signal der ThT Fluoreszenz. Dies ist ein unerwartetes Ergebnis, denn eigentlich sollten Veränderungen bezüglich der Konformation vor der Aggregation detektierbar sein. Möglicherweise werden in der frühen Phase Intermediate gebildet,

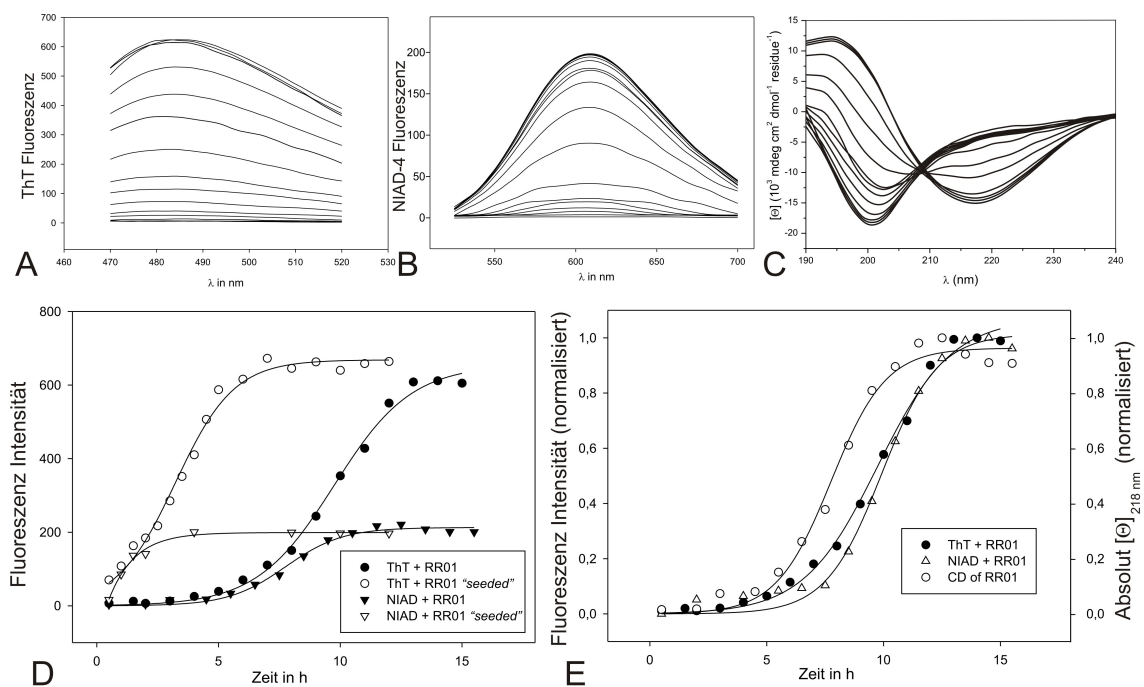


Abbildung 103: Kinetische Untersuchung der Aggregation des Modellpeptids RR01. (A) (B) (C) (D) Kinetischer Verlauf der ThT (o) und NIAD-4 (●) Fluoreszenz der Aggregation von RR01 mit und ohne Nukleationskeime („seed“) (E) Normalisierter Verlauf der ThT (o) und NIAD-4 (●) Fluoreszenz.

die sich mit Hilfe der CD Spektroskopie nicht verlässlich nachweisen lassen. Der Unterschied zwischen den verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen ist größer. Diesen Unterschied zu erklären fällt relativ schwer, da der Bindungsmechanismus der Fluoreszenzfarbstoffe an amyloide Fibrillen relativ unbekannt ist.^[556] Möglicherweise gibt es zwischen dem neutralen Farbstoff NIAD-4 und dem amyloidogenen Peptid stärkere hydrophobe Wechselwirkungen,

die zusätzliche Bindungsstellen an der Fibrille ermöglichen. Ein möglicher „*seeding*“-Effekt kann ausgeschlossen werden, da in diesem Fall keine Nukleation für den Beginn der Aggregation notwendig wäre und somit keine *lag-time* zu beobachten wäre. Sowohl für NIAD-4 als auch ThT ließ sich die *lag-time* durch die Zugabe von zu „*seeds*“ präpartierten amyloiden Fibrillen eliminieren. Die Ergebnisse zeigen, dass NIAD-4 qualitativ in ähnlicher Weise verwendet werden kann wie ThT. Darauf folgend wurde der Fluoreszenzfarbstoff NIAD-4 auf das Modellpeptid VW19 angewendet, deren Fibrillen mit ThT bei pH 4 nicht nachgewiesen werden können (Abbildung 104). Unter Verwendung des gleichen Präparationsprotokolls wurde Fluoreszenzspektren in Abhängigkeit von der Zeit aufgenommen. Der so erhaltene kinetische Verlauf der Aggregation ist ebenfalls sigmoidal, was auf einen nukleationsabhängigen Polymerisationsprozess schließen lässt. Interessanterweise ließ sich bezüglich der zeitlichen Entwicklung der Fluoreszenzspektren eine Verschiebung

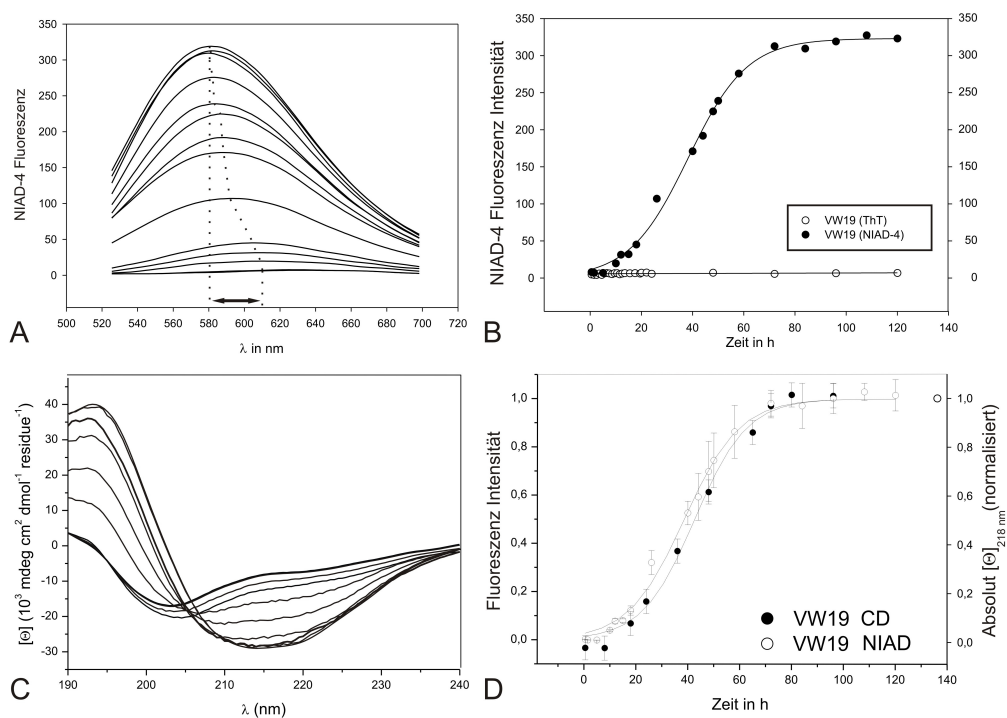


Abbildung 104: Kinetische Charakterisierung der Aggregation von VW19. (A) NIAD-4-Fluoreszenzspektren in Abhängigkeit bei verschiedenen Inkubationszeiten (10µM NIAD-4 in 10mM Azetat-Puffer pH 4,0). (B) Darstellung der Werte der maximalen Fluoreszenzintensitäten in Abhängigkeit von der Zeit. (C) CD-Spektren zu verschiedenen Inkubationszeiten zeigen den konformationellen Übergang von ungefaltet hin zu β -Faltblattstrukturen. (D) Vergleich des kinetischen Verlaufs der Fluoreszenzintensität und der Elliptizität $[\theta]$ bei 218 nm.

des Maximums in Richtung kürzerer Wellenlängen beobachten. Dieser Effekt konnte für das Modellpeptide RR01 bei neutralem pH-Wert nicht festgestellt werden. Möglicherweise lässt sich dieser Unterschied auf die unterschiedliche Morphologie der Fibrillen und entsprechend auf unterschiedliche Bindungsstellen an der Fibrille zurückführen. Für letztendliche Klärung dieses Effekts sind noch weitere Studien notwendig.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich NIAD-4 im Prinzip in ähnlicher Weise auf unsere Modellpeptide anwenden lässt wie Thioflavin T. Bei der Charakterisierung von amyloiden Aggregaten mit einer hohen positiven Nettoladung hat die Anwendung von NIAD-4 Vorteile gegenüber dem häufig genutzten ThT, da es keine Ladung trägt. Dies konnte am Modellpeptid VW19 bei azidem pH-Wert und einer entsprechenden Nettoladung von +6 demonstriert werden. Dafür wurde das gleiche Protokoll wie bei RR01 verwendet. Abbildung 104, A zeigt NIAD-4-Fluoreszenzspektren für die Aggregation VW19 zu verschiedenen Inkubationszeiten. Mit zunehmender Aggregationszeit ist ein Fluoreszenzsignal zwischen 520 und 700 nm mit einem Maximum bei 580 nm feststellbar, wobei sich das Maximum der Spektren in Richtung kürzerer Wellenlängen mit ca. 17 nm verschiebt.^[556] Für die Darstellung des kinetischen Verlaufs wurden die maximalen Werte für die NIAD-4-Fluoreszenzintensitäten in Abhängigkeit von der Zeit in Abbildung 104, B dargestellt.

11 Inhibition der Bildung amyloider Aggregate

In diesem Kapitel werden die Untersuchungen zur Inhibition der Bildung amyloider Aggregate anhand von Modellpeptiden beschrieben. Die Ergebnisse werden im darauf folgenden Kapitel 12 diskutiert.

11.1 Mischungssystem VW18 und VW01

Zunächst wurde der Effekt des stabil α -helikalen Modellpeptids VW01 auf die Amyloidbildung des Modellpeptids VW18 mit einer α/β -Diskordanz mit Hilfe von CD-Spektroskopie, ThT-Fluoreszenz und Elektronmikroskopie untersucht. Dazu wurde VW01 in verschiedenen molaren Verhältnissen zu VW18 untersucht. Bei einer konstanten Konzentration an VW18 von 100 μ M wurden Lösungen mit den molaren Verhältnissen $r[\text{VW18}/\text{VW01}]$ von 3, 2, und 1 untersucht.

CD-Spektren zeigen für $r[\text{VW18}/\text{VW01}] = 2$ und 1 über die Inkubationszeit von 5 Tagen zwei klare Minima bei 208 und 222 nm, was auf eine stabile helikale Konformation deutet. Die Bildung einer β -Faltblattstruktur ist nicht zu beobachten. Jedoch lässt sich bei einem

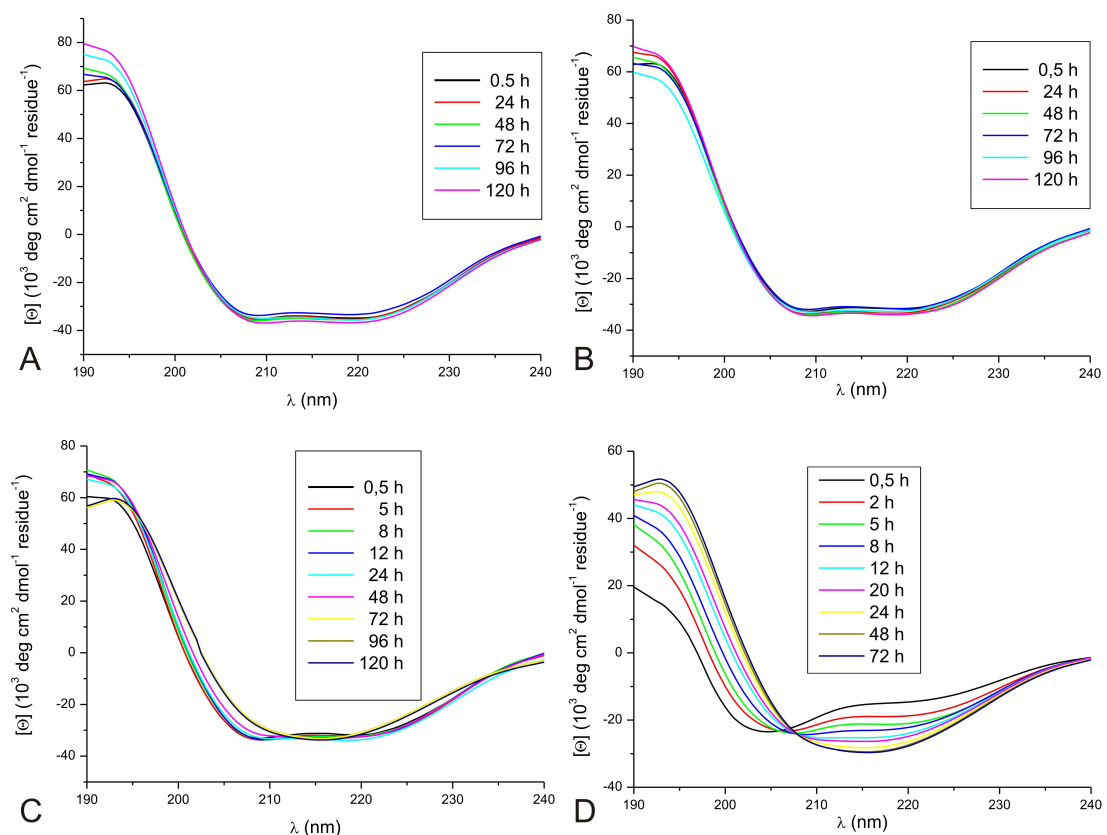


Abbildung 105: Zeitabhängige Entwicklung der CD-Spektren von VW18 in Gegenwart verschiedener Mengen an VW01 bzw. VW01-ran. (A) $r[\text{VW18}/\text{VW01}] = 1$, (B) $r[\text{VW18}/\text{VW01}] = 2$, (C) $r[\text{VW18}/\text{VW01}] = 3$, (D) VW18 und VW01-ran in äquimolarer Mischung. (Peptidkonzentration VW18 = 100 μ M, in 10 mM Phosphat-Puffer, 0,1% NaN_3 , pH 7,4)

molaren Verhältnis von $r[\text{VW18}/\text{VW01}] = 3$, d.h. einem Überschuss an VW18, die Bildung einer β -Faltblattstruktur beobachten, angezeigt durch die Reduktion der Minima bei 208 und 222 nm und der Entwicklung des Minimums bei 218 nm. Jedoch entwickelt sich dieses Minimum im Vergleich zum VW18 ohne VW01 zu einem deutlich späteren Zeitpunkt.

In Gegenwart des Kontrollpeptids VW01-ran in äquimolarer Mischung konnte kein inhibitorischer Effekt beobachtet werden. Hier entwickelte sich das Minimum bei 218 nm im Vergleich zu VW18 in vergleichbarer Geschwindigkeit (Abbildung 105).

Zur Überprüfung der inhibitorischen Wirkung von VW01 auf die Aggregation von VW18 wurde ein ThT Fluoreszenz-Assay durchgeführt. Die Probe mit dem molaren Verhältnis $r[\text{VW18}/\text{VW01}] = 1$ zeigte keinerlei Fluoreszenz bei 485 nm, was auf eine nahezu vollständige Inhibition der Aggregation deutet. Im Vergleich zur Entwicklung der ThT-Fluoreszenz von VW18 zeigte die Probe mit $r[\text{VW18}/\text{VW01}] = 2$ eine Reduktion der Fluoreszenz um ca. 95 % und die die Probe mit $r[\text{VW18}/\text{VW01}] = 3$ eine Reduktion der Fluoreszenz um ein Drittel. Im Gegensatz zu VW01 führt die Gegenwart von VW01-ran in äquimolarer Mischung nur zu einer Verlangsamung der Aggregation, aber nicht zur

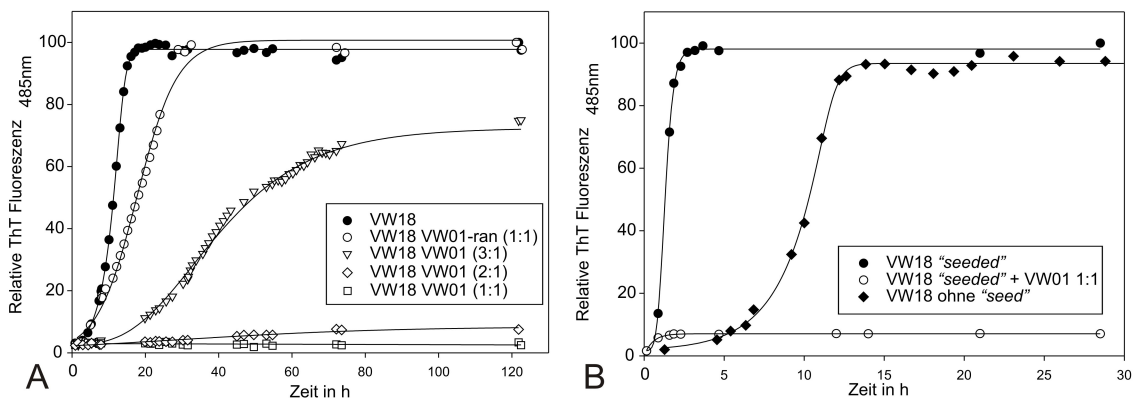


Abbildung 106: (A) ThT Fluoreszenz-Assay von VW18 in Gegenwart verschiedener Mengen an VW01 bzw. VW01-ran. (B) ThT Fluoreszenz-Assay von VW18 in Gegenwart von Nukleationskeimen („seed“) und VW01 in äquimolarer Mischung (Peptidkonzentration VW18 = 100 μM , in 10 mM Phosphat-Puffer, 0,1% NaN_3 , pH 7,4)

Inhibition, was darauf hindeutet, dass die α -helikale Konformation und die spezifische Wechselwirkung im Rahmen der *Coiled Coil*-Struktur eine notwendige Voraussetzung für die inhibitorische Wirkung ist. Somit unterstützen die Daten der ThT-Fluoreszenz die CD-spektroskopischen Untersuchungen.

Der amyloide Aggregationsprozess lässt sich durch die Zugabe von Nukleationskeimen in Form von fragmentierten gealterten Fibrillen des VW18 beschleunigen. Sie wirken als Template und die Wachstumsphase, d.h. die Polymerisation zur Fibrille, kann ohne Zeitverzögerung (*lag time*) beginnen. Die inhibitorische Wirkung von VW01 ließ sich selbst

in Gegenwart von Nukleationskeimen nachweisen, was für eine sehr hohe Stabilität der gebildeten helikalen Oligomere spricht. Die als Templat wirkenden Nukleationskeime sind anscheinend nicht in der Lage, amyloidogene Sequenzen aus den helikalen Oligomeren für die amyloide Aggregation zu rekrutieren (Abbildung 106, B). Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Proben von VW18 mit VW01 in äquimolarer Mischung im Vergleich zu VW18 ohne VW01 mit einer Inkubationszeit von 5 Tagen können die inhibitorische Wirkung, gezeigt mit spektroskopischen Methoden, weiter unterstützen. In Gegenwart von VW01 in äquimolarer Mischung lassen sich keine typischen amyloiden Fibrillen mehr finden. Es sind lediglich kleine Partikel nachweisbar.

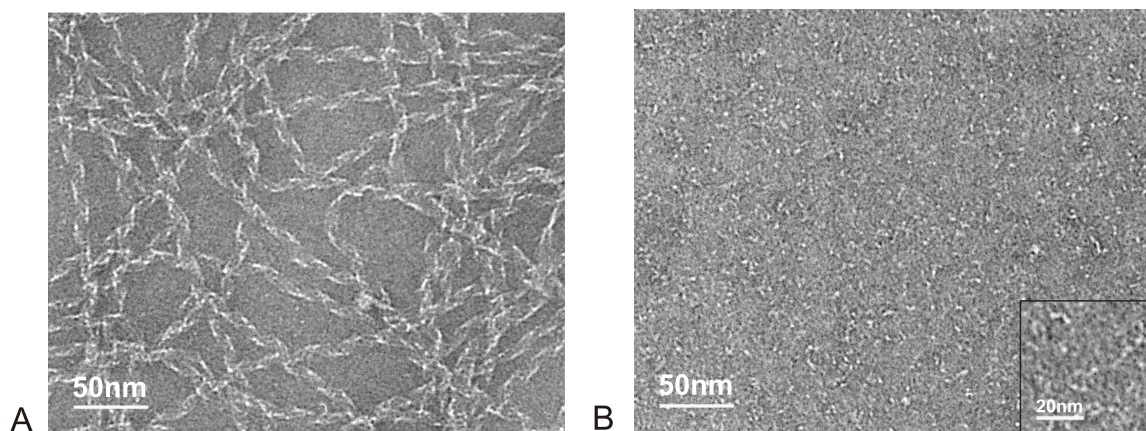


Abbildung 107: TEM-Aufnahmen von (A) VW18 und (B) VW18 in Gegenwart von VW01 in äquimolarer Mischung (Peptidkonzentration VW18 = 100 μ M, in 10 mM Phosphat-Puffer, 0,1% NaN_3 , pH 7,4, 1 % PTA).

Obwohl zahlreiche Studien die Stabilität amyloider Aggregate herausstellen,^[188, 233] gibt es Hinweise darauf, dass die Bildung amyloider Aggregate reversibel ist,^[571, 572] was die Grundlage für die Suche nach Strategien bildet, die zur Auflösung amyloider Fibrillen führen können. Die zuvor beschriebenen Ergebnisse motivierten schließlich, die Wirkung von VW01 auf bereits gebildete, gealterte Fibrillen von VW18 zu untersuchen. Hierfür wurde eine VW18-Stammlösung so lange inkubiert, bis die maximale ThT-Fluoreszenzintensität erreicht wurde, was für das Ende der Bildung amyloider Aggregate spricht. Danach wurde die Stammlösung mit amyloiden Fibrillen des VW18 in drei unterschiedliche Proben geteilt. Eine Probe blieb unverändert und diente als Kontrolle. Die zweite und dritte Probe wurden jeweils durch VW01 und VW01-ran in einem Verhältnis von $r[\text{VW18}/\text{VW01-ran}] = 0,2$ ergänzt. Die Entwicklung der Fluoreszenzintensität wurde für die nächsten 7 Tage weiter verfolgt.

Im Vergleich zur unbehandelten VW18-Probe führte die Zugabe von VW01 im Überschuss zu einer raschen Reduktion der Fluoreszenzintensität um etwa 60 %. Die Zugabe von VW01-ran führte lediglich zu einer Reduktion der Fluoreszenzintensität um etwa 20 % (Abbildung

108, A). TEM-Aufnahmen nach 8 Tagen Inkubationszeit der entsprechenden Proben zeigen, dass VW01 im Gegensatz zu VW01-ran die Menge der Fibrillen reduziert und deren Morphologie signifikant verändert. Anstatt der typisch verdrehten amyloiden Fibrillen wie in Abbildung 108, B sind kleinere Partikel, die mögliche VW18/VW01-Oligomere darstellen können, und „zerfrante“ Reste amyloider Fibrillen des VW18 zu erkennen. Im Gegensatz dazu zeigt die TEM-Aufnahme mit VW01-ran keine Veränderung der Morphologie der Fibrillen. Es sind neben den typischen amyloiden Fibrillen lediglich kleine Partikel detektierbar, die möglicherweise Oligomere des VW01-ran darstellen. Die TEM-Aufnahmen deuten auf eine starke Interaktion zwischen Fibrillen des VW18 und VW01. Die ThT-Fluoreszenz spricht für eine quantitative Reduktion der Fibrillen von VW18 in Anwesenheit von VW01, was auf eine starke Interaktion zwischen beiden Peptiden zurückgeführt werden kann. Die leichte Reduzierung der ThT-Fluoreszenz in Anwesenheit von VW01-ran kann möglicherweise durch begrenzte Loslösung von ThT-Molekülen von der Fibrille durch VW01-ran erklärt werden.

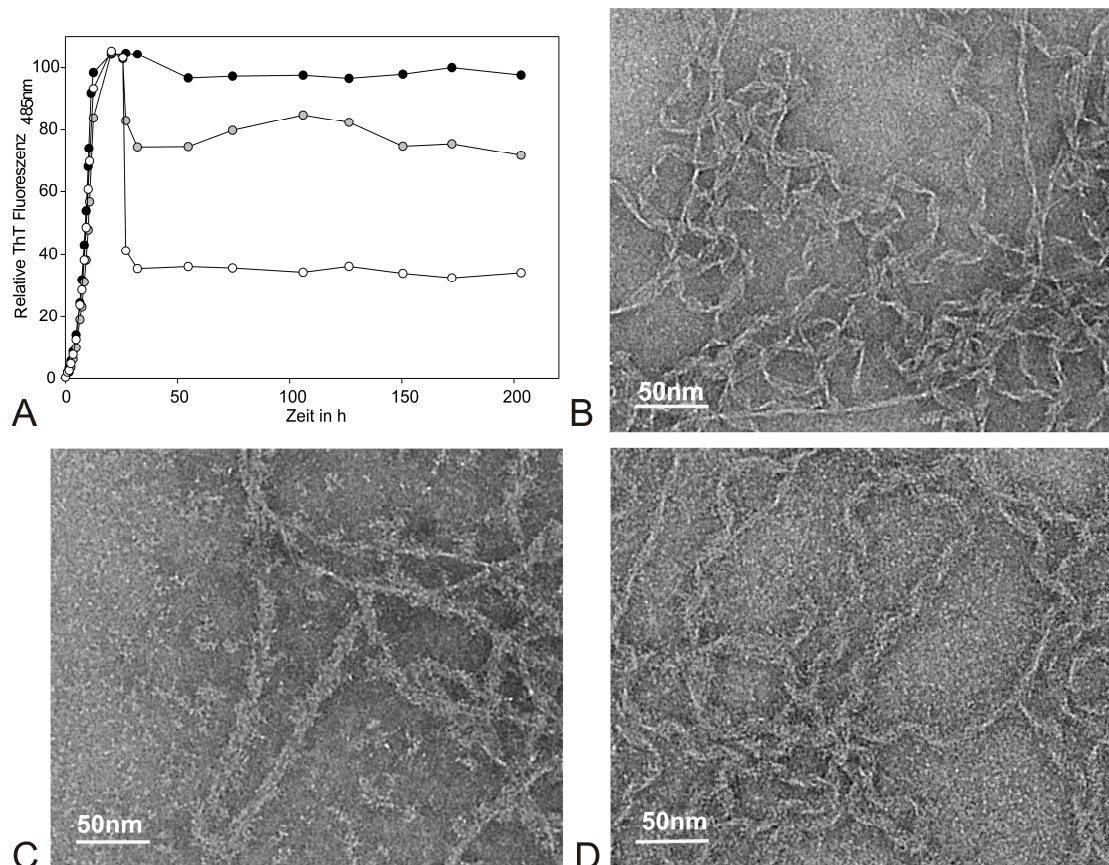


Abbildung 108: Deaggregation von VW18 Fibrillen. (A) ThT-Fluoreszenz von VW18 allein (●), mit VW01 (○), und mit VW01-ran (◐). TEM-Aufnahmen nach einer Inkubationszeit von 8 Tagen von VW18 allein (B) mit VW01 (C) und mit VW01-ran (D). (Peptidkonzentration VW18 = 100µM; $r[18/01(-ran)] = 0,2$; in 10 mM Phosphat-Puffer, 0,1% NaN_3 , pH 7,4, 1 % PTA)

Da die Oligomerisierung zwischen VW18 und VW01 entscheidend für die inhibitorische Wirkung und deren Interpretation ist, wurden die Ergebnisse der analytischen Ultrazentrifugation durch Experimente mit Hilfe der Größenaustauschchromatographie erweitert. Die Charakterisierung von VW18 und der Oligomere mit VW01 mit Hilfe der analytischen Ultrazentrifugation führt möglicherweise zu unbeabsichtigter amyloider Aggregation. Daher wurde die Charakterisierung der verschiedenen Oligomere mit Hilfe der Größenaustauschchromatographie im Vergleich mit AUZ gut charakterisierten Modellpeptiden VW01 und VW01-ran durchgeführt. Die Addition von Abz-Gly zu allen Proben der Größenaustauschchromatographie ermöglicht den besseren Vergleich aller Chromatogramme.

Das Modellpeptid VW01, das mit Hilfe von AUZ-Experimenten als Trimer identifiziert wurde, wird mit einer Retentionszeit von 57 min deutlich früher eluiert als das monomere Modellpeptid VW01-ran mit einer Retentionszeit 64 min. Das frisch gelöste Modellpeptid VW18 im löslichen α -helikalen Faltungszustand wird dagegen 62 min und damit zwischen einem Trimer und einem Monomer eluiert, was für ein *Coiled Coil*-Dimer spricht. Da der wesentliche Unterschied zu VW01 in der Einführung von Valinresten in *b*, *c* und *f* Position besteht, muss die reduzierte Helizität und die Oligomerisierung darauf zurückgeführt werden. In der Literatur wird der Oligomerisierungsgrad hauptsächlich auf die Positionen der ersten und zweiten Erkennungsdomäne zurückgeführt. In einer kürzlich erschienen Studie zur Entwicklung eines Algorithmus zur Vorhersage der Oligomerisierungsgrades

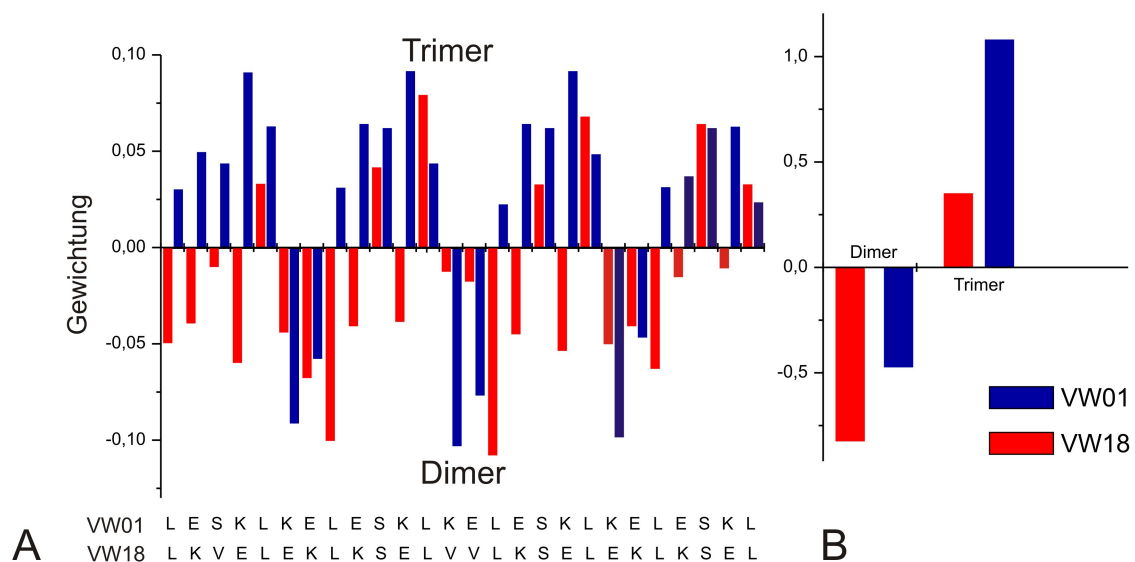


Abbildung 109: (A) Sequenzprofil der Klassifikation des Beitrages jeder einzelnen Aminosäure zur Oligomerisierungstendenz für VW18 und VW01 kalkuliert mit Hilfe des Algorithmus PrOCoil (B) Summe des Beitrags der gesamten Sequenz zum Dimer bzw. Trimer.

wurde herausgestellt, dass auch die Aminosäuren in *b*, *c* und *f* Position einen Einfluss auf die Oligomerisierung zeigen. Eine Analyse der Primärstruktur beider Modellpeptide mit einem eigens für die Vorhersage von Oligomerisierungszuständen von *Coiled Coil*-Peptiden erstellten Algorithmus (ProCoil, <http://www.bioinf.jku.at/software/procoil/>), zeigt den Unterschied (Abbildung 109).^[573] Die Gewichtung einer trimeren Struktur ist im Fall von VW01 deutlich größer als im Fall von VW18, das wiederum eine größere Gewichtung für eine dimere Struktur zeigt.

Die äquimolare Mischung von VW18 und VW01, die eine nahezu vollständige Inhibition der Bildung amyloider Fibrillen zeigte, als auch das Mischungsverhältnis $r[\text{VW18}/\text{VW01}] = 2$ werden mit der gleichen Retentionszeit eluiert wie das VW01 Trimer. Daraus folgt, dass mit diesem Mischungsverhältnis ein trimerer Peptidkomplex gebildet wird. Die Mischung mit dem molaren Verhältnis $r[\text{VW18}/\text{VW01}] = 3$ führte zu zwei Fraktionen. Die größere Fraktion mit der gleichen Retentionszeit eluiert wie das VW01 Trimer und eine kleinere Fraktion mit der gleichen Retentionszeit wie VW18. Das Modellpeptid VW01 ist folglich in diesem Verhältnis nicht in der Lage, ein stabiles trimeres Oligomer mit der gesamten Menge an VW18 zu bilden. Die Ergebnisse unterstützen die zuvor beschriebenen Daten zur Inhibition der Bildung amyloider Fibrillen und weisen stark auf die Bildung stabiler heteromere *Coiled Coil* Trimere zwischen VW18 und VW01 hin. Zusammen mit der Tatsache, dass VW01-*ran* keinerlei inhibitorische Wirkung zeigt, macht dies deutlich, dass die spezifischen Wechselwirkungen einer *Coiled Coil*-Struktur für die Bildung stabiler α -helikaler Trimere und daraus folgend zur Entfaltung der inhibitorischen Wirkung notwendig sind.

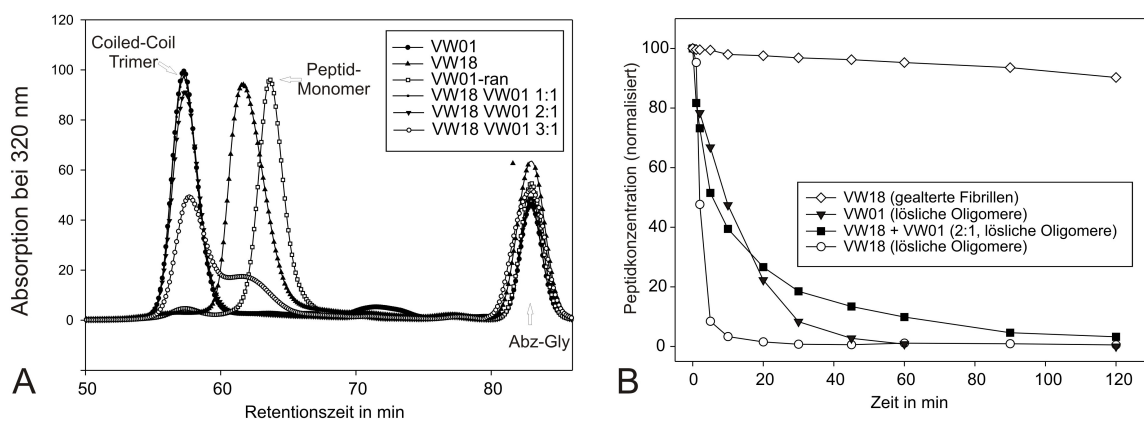


Abbildung 110: (A) Größenaustauschchromatographie von VW01, VW01-*ran*, VW18 und verschiedene Mischungen (siehe Legende). Zur Kalibrierung wurde Abz-Gly hinzugefügt. (Peptidkonzentration VW18 = 100 μM , in 10 mM Phosphat-Puffer, 0,1% NaN_3 , pH 7,4) (B) Kinetischer Verlauf des proteolytischen Abbaus von VW18 aus dem löslichen und aus dem amyloiden Zustand, von VW01 und der Mischung mit $r[\text{VW18}/\text{VW01}] = 2$ (Peptidkonzentration = 100 μM , in 10 mM Phosphat-Puffer, 0,1% NaN_3 , pH 7,4, 37 °C).

Die Bildung von stabilen löslichen Oligomeren durch geeignete Liganden bzw. Inhibitoren ist eine Strategie der Inhibition. Man nimmt an, dass diese Oligomere durch vorhandene Degradationsmechanismen *in vivo* z.B. durch Proteasen abgebaut werden (siehe Abschnitt 6.3 *Inhibition der Aggregation amyloidogener Proteine und Peptide*). Amyloide zeigen eine relative hohe Stabilität gegenüber Proteasen. Daher sollte weiterhin untersucht werden, ob die Bildung löslicher Oligomere zwischen VW18 und VW01 im Vergleich zu VW18 im amyloiden Zustand merklich zu einer besseren Degradation durch Proteasen beiträgt. Hierfür wurde VW18 im löslichen α -helikalen sowie im amyloiden Zustand als auch VW01 und die Mischung mit $r[VW18/VW01] = 2$ auf die Stabilität gegenüber der Protease Trypsin getestet. Die Protease Trypsin bevorzugt basische Aminosäuren und spaltet die Peptidbindung C-terminal an den Aminosäuren Lysin und Arginin und arbeitet bei neutralem pH-Wert. VW18 als auch VW01 weisen jeweils sieben über die gesamte Primärstruktur verteilte Lysinreste auf. Somit ist die Protease Trypsin sehr gut für diese Experimente geeignet. Der Verlauf des proteolytischen Abbaus wurde mit Hilfe der HPLC verfolgt. Die zeitabhängigen Werte in Abbildung 110, B entsprechen hierbei der Menge des vollständigen Peptids mit der

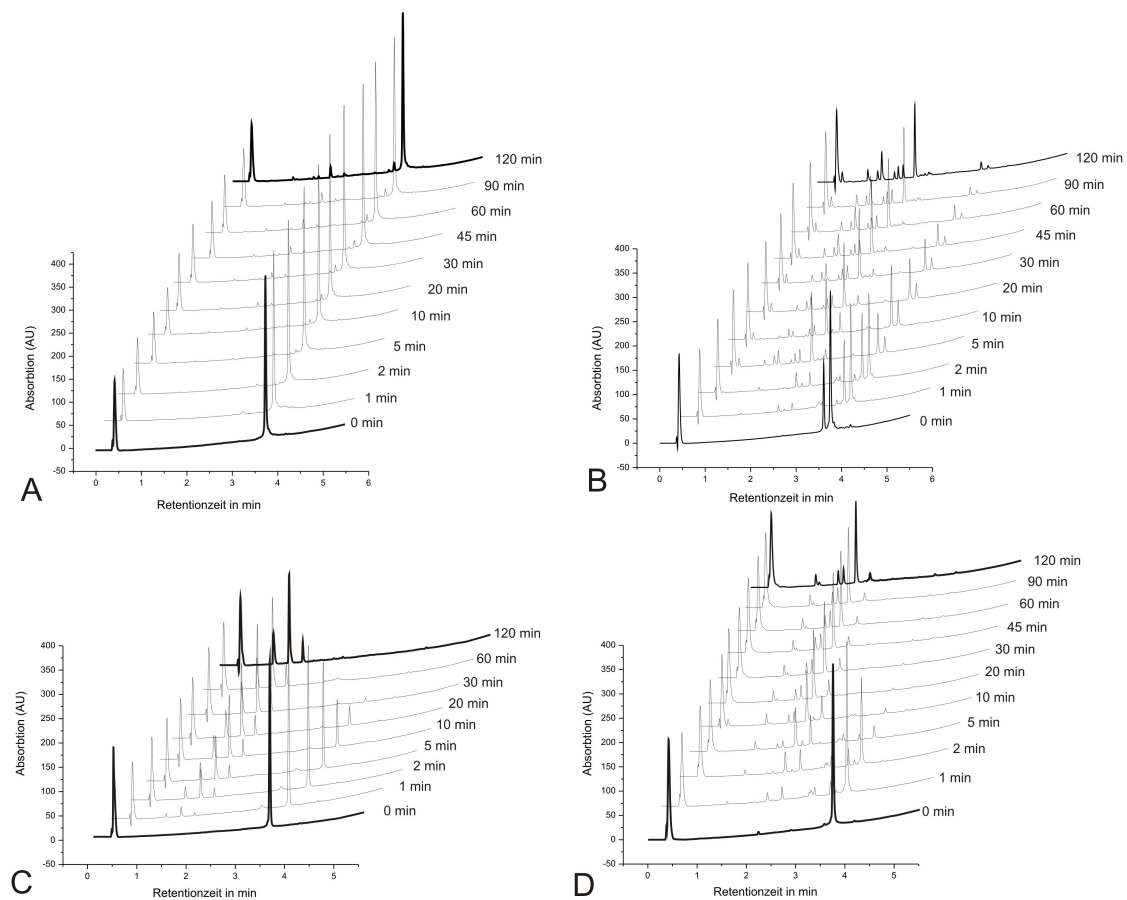


Abbildung 111: HPLC-Chromatogramme bei 220 nm und unterschiedlichen Zeitpunkten der Degradation durch Trypsin von (A) VW18 im amyloiden Zustand, (B) VW18/VW01-Mischung $r[VW18/VW01]=2$. (c), von VW01 und von (D) VW18 α -helikalem löslichen Zustand.

spezifischen Retentionszeit. Die Menge und Anzahl der Fragmente wurde nicht berücksichtigt. In Abbildung 110, B zeigt sich ein deutlicher Unterschied zwischen VW18 im amyloiden Zustand, das unter den Testbedingungen innerhalb von 120 min kaum abgebaut wurde, und VW18 im α -helikalen löslichen Zustand, das dagegen innerhalb von 10 min vollständig abgebaut wurde. VW01 und die Mischung mit $r[\text{VW18}/\text{VW01}] = 2$ werden innerhalb ca. 60 bzw. 120 min vollständig abgebaut. Diese Ergebnisse machen deutlich, dass der Komplex aus VW18 und dem Inhibitor VW01 eine geringere Stabilität gegenüber Trypsin hat als VW18 im amyloiden Faltungszustand.

11.2 Mischungssystem VW19 und VW01

Der Effekt des stabilen α -helikalen Modellpeptids VW01 wurde ebenfalls auf die amyloide Aggregation von VW19 untersucht. VW19 bildet im Gegensatz zu VW18 bei einem pH-Wert von 4,0 amyloide Fibrillen und die folgenden Studien wurden daher bei pH 4,0 durchgeführt. VW01 wurde in verschiedenen Verhältnissen zu Proben mit einer konstanten Konzentration von 150 μM VW19 hinzugegeben und mit CD-Spektroskopie, NIAD-4 basierter Fluoreszenzspektroskopie, elektronenmikroskopischen Methoden und Röntgenbeugungsstudien untersucht. Die CD-Spektren zeigen gleich zu Beginn der Inkubationszeit im Unterschied zum Modellpeptid VW19 allein in Anwesenheit von VW01 in den Verhältnissen $r[\text{VW19}/\text{VW01}]$, von 2, 1 und 0,5 Minima bei 208 und 222 nm, die typisch für eine α -helikale Konformation sind. Dies spricht für eine kooperative Faltung eines Coiled Coil-Heteromers aus VW01 und VW19, wobei das stabile α -helikale VW01 das ungefaltete VW19 in eine α -helikale Konformation zwingt.

CD-Spektren der Probe mit $r[\text{VW19}/\text{VW01}] = 2$ zeigen ausgehend von den zwei Minima der α -helikalen Struktur die Entwicklung eines einzigen Minimum bei 218 nm, was für die Bildung von β -Faltblattstrukturen spricht. CD-Spektren der Probe mit $r[\text{VW19}/\text{VW01}] = 1$ und 0,5 zeigen eine konstante α -helikale Konformation über die gesamte Inkubationszeit von fünf Tagen und keine Bildung von β -Faltblattstrukturen. Das CD-Spektrum mit $r[\text{VW19}/\text{VW01}] = 0,5$ weist eine zeitabhängige Reduzierung des Minimums bei 208 nm relativ zum Minimum bei 222 nm auf und das Minimum bei 222 nm weist eine leichte Verschiebung gegen größere Wellenlängen auf. Diese Dynamik in α -helikalen CD-Spektren wurde bereits in anderen Arbeiten berichtet und der chiralen Streuung aufgrund der Bildung von fibrillären Aggregaten zugeschrieben.^[557] Aufgrund der elektrostatischen Abstoßung zwischen dem positiv geladenen ThT-Molekül und dem Modellpeptid VW19 bei pH 4,0 und daraus folgender schlechter Bindung an amyloide Fibrillen des VW19 wurde der Effekt des

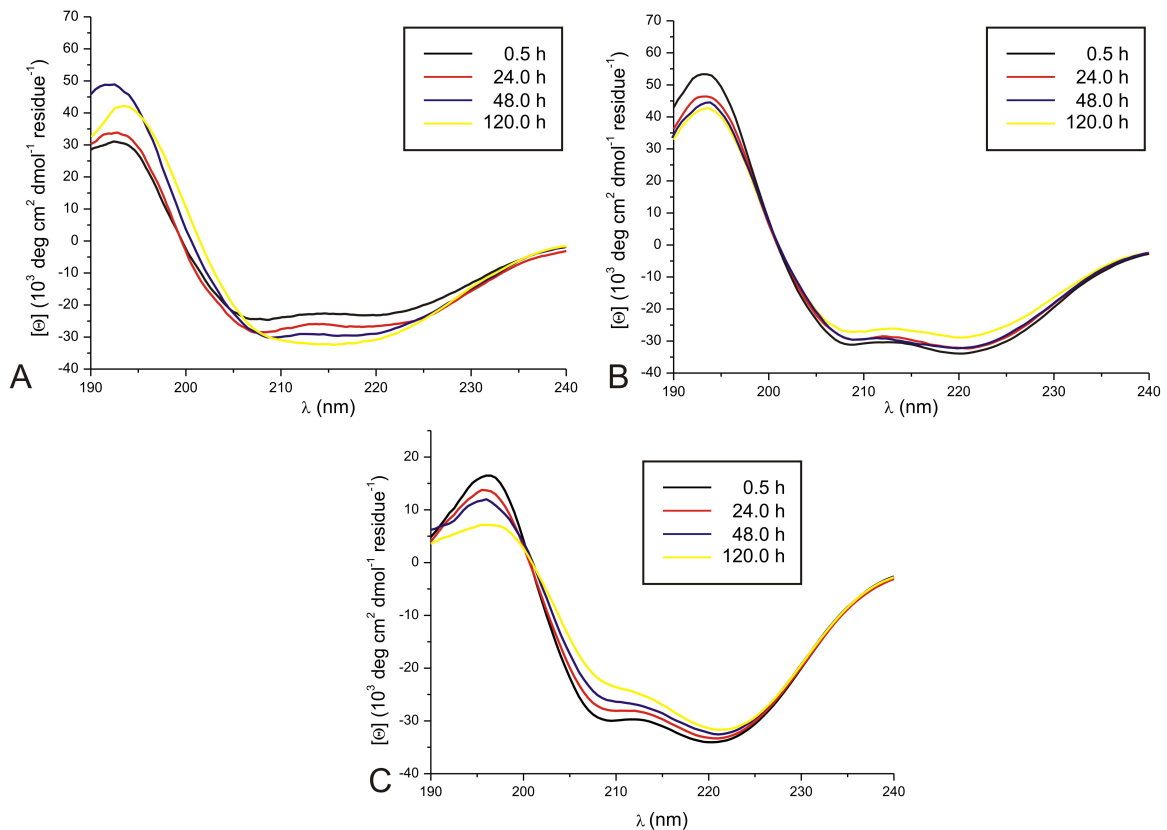


Abbildung 112: Zeitabhängige Entwicklung der CD-Spektren von VW19 in Gegenwart verschiedener Konzentration an VW01 (A) $r[\text{VW19}/\text{VW01}] = 2$, (B) $r[\text{VW19}/\text{VW01}] = 1$, (C) $r[\text{VW19}/\text{VW01}] = 0,5$. (Peptidkonzentration VW19 = $150\mu\text{M}$, in 10 mM Azetat-Puffer, 0,1% NaN_3 , pH 4,0)

VW01 auf die Aggregation von VW19 mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs NIAD-4 durchgeführt (siehe Kapitel 14.2.6.2 NIAD-4, 10.7 NIAD-4 Fluoreszenz bei helikalen Fasern und amyloiden Fibrillen).^[556] Die NIAD-4-Fluoreszenzstudien zeigen eine konzentrationsabhängige Inhibition der Aggregation des amyloidogenen Modellpeptids VW19 durch VW01. Die Abbildung 114 zeigt die zeitabhängige Entwicklung der Fluoreszenz in Gegenwart verschiedener Konzentrationen an VW01.

Der kinetische Verlauf des Effekts von VW01 auf die Aggregation von VW19, d.h. der Wert für die maximale Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Zeit, ist in Abbildung 118 für einen Inkubationszeitraum von 150 h dargestellt. Er ist zu erkennen, dass die Aggregation von VW19 zu amyloide Fibrillen innerhalb von 60 h abgeschlossen ist. Im Vergleich dazu führt die Gegenwart von VW01 zu einer Reduktion der Fluoreszenz, für $r[\text{VW19}/\text{VW01}] = 2$ um ein Drittel und für $r[\text{VW19}/\text{VW01}] = 1$ um zwei Drittel und für $r[\text{VW19}/\text{VW01}] = 0,5$. Lediglich das Verhältnis von $r[\text{VW19}/\text{VW01}] = 0,5$ führte zu einer vollständigen Inhibition der Aggregation. Die Ergebnisse der Fluoreszenz-Studien stehen somit im Einklang mit den Ergebnissen der CD-Spektroskopie. Die Morphologie der Aggregate wurde zunächst mit

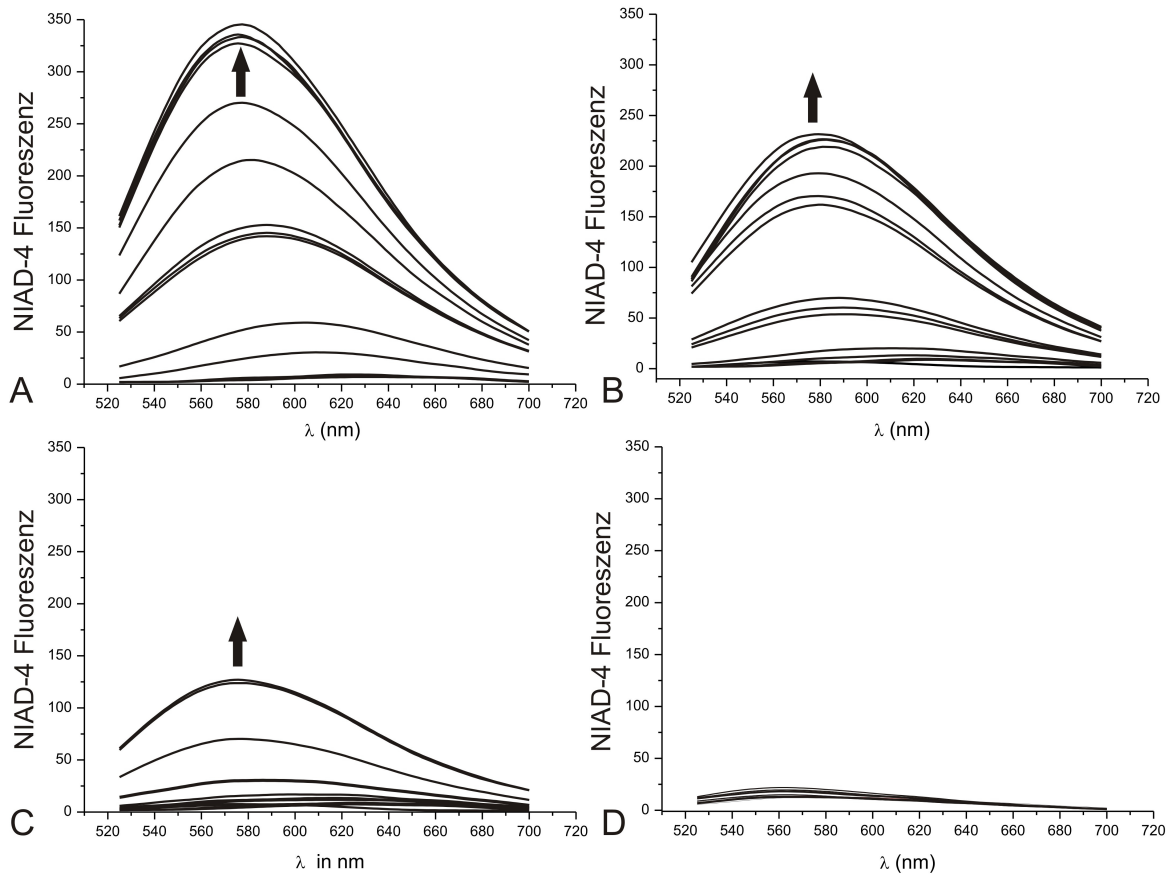


Abbildung 113: Zeitabhängige Entwicklung der NIAD-4 Fluoreszenz Spektren von (A) VW19, (B) $r[VW19/VW01] = 2$, (C) $r[VW19/VW01] = 1$, (D) $r[VW19/VW01] = 0,5$ (Peptidkonzentration VW19 = $150\mu\text{M}$, in 10 mM Azetat-Puffer, 0,1% NaN_3 , pH 4,0, $10\mu\text{M}$ NIAD-4).

Hilfe der Elektronenmikroskopie untersucht. Kryo-TEM-Aufnahmen der bereits mit CD-Spektroskopie und NIAD-Fluoreszenz untersuchten Proben zeigen eine starke Veränderung in der Morphologie. Wie bereits beschrieben, zeigt VW01 unter diesen Bedingungen oligomere Partikel und VW19 bildet amyloide Aggregate mit charakteristischer Morphologie. Die

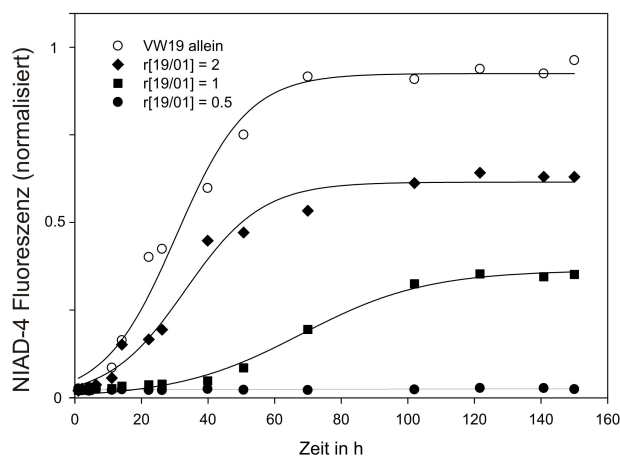


Abbildung 114: Kinetik der Fibrillenbildung von VW19 in Abhängigkeit von verschiedenen Konzentrationen VW01. (Peptidkonzentration VW19 = $150\mu\text{M}$, in 10 mM Azetat-Puffer, 0,1% NaN_3 , pH 4,0, $10\mu\text{M}$ NIAD-4).

Mischungen aus VW01 und VW19 mit $r = 0,05$ zeigen dagegen faserartige Aggregate mit einer Länge von 50 bis 100 nm und einem Durchmesser von $2,6 \pm 0,3$ nm (Abbildung 115, A). Neben den faserartigen Aggregaten sind ebenfalls oligomere Partikel erkennbar, jedoch keine amyloiden Fibrillen. Die Mischung mit $r[\text{VW19}/\text{VW01}] = 0,5$ mit vollständiger Inhibierung in den NIAD-4-Fluoreszenzstudien zeigt dagegen ein dichtes, aber loses Netzwerk von scheinbar unendlich langen und gleichförmigen Fasern (Abbildung 115, B). Eine Bündelung von Fasern, wie bereits berichtet wurde,^[574] ist nicht zu erkennen. Auch in dieser Probe sind wenige oligomere Partikel erkennbar. Amyloide Fibrillen lassen sich jedoch nicht finden. Für die äquimolare Mischung aus VW19 und VW01 oder Proben mit einem Überschuss an VW19 sind dagegen neben den Fasern auch die typischen amyloiden Fibrillen erkennbar (Abbildung 115, C). Diese deutlichen Änderungen in der Morphologie sprechen für eine starke Wechselwirkung zwischen VW19 und VW01. Die Ergebnisse stehen dabei im Einklang mit den zuvor beschriebenen Untersuchungen, die für die Mischung mit $r[\text{VW19}/\text{VW01}] \geq 1$ die Bildung von amyloiden Fibrillen detektiert haben.

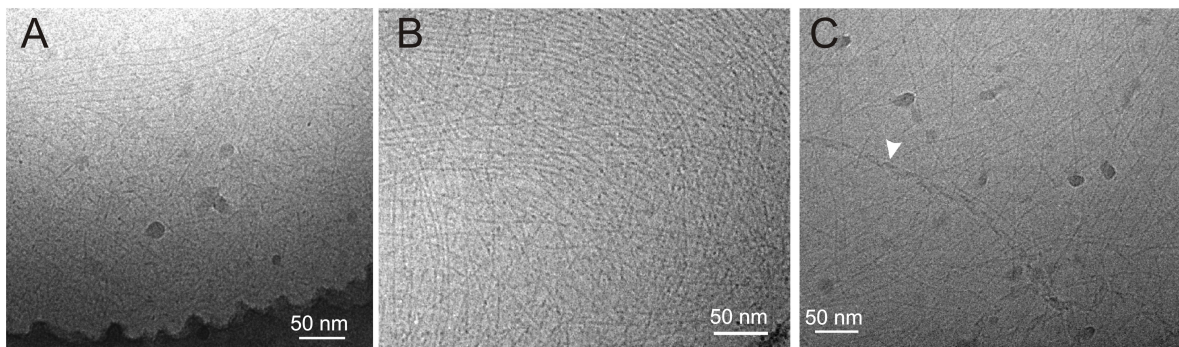


Abbildung 115: Kryo-TEM-Aufnahmen verschiedener VW19/VW01 Mischungen. (A) $r = 0,05$; $[\text{VW19}] = 50 \mu\text{M}$, $[\text{VW01}] = 1 \text{ mM}$. (B) $r = 0,5$; $[\text{VW19}] = 150 \mu\text{M}$, $[\text{VW01}] = 300 \mu\text{M}$. (C) $r = 1$; $[\text{VW19}] = 150 \mu\text{M}$, $[\text{VW01}] = 150 \mu\text{M}$; der Pfeil markiert eine amyloide Fibrille. (in 10 mM Azetat-Puffer, 0,1% NaN_3 , pH 4,0).

Amyloide Fibrillen weisen eine hohe thermodynamische Stabilität, aber auch eine hohe Stabilität gegenüber Proteasen, Säuren und chemischen Denaturierungsmitteln auf.^[188, 233]

Kürzliche Studien konnten aber zeigen, dass die Bildung amyloider Aggregate reversibel ist^[571, 572] und Inhibitionsstudien konnten zeigen, dass amyloide Fibrillen aufgelöst werden können (Siehe Kapitel 6 *Eingriff in den Prozess der Bildung amyloider Aggregate*).

Auch im Mischungssystem VW18/VW01 ließ sich ein derartiger Effekt beobachten. Zur Untersuchung dieses Effekts im Mischungssystem VW19/VW01 wurde eine Stammlösung von VW19 mit NIAD-4-Fluoreszenzfarbstoff präpariert und für 140 Stunden inkubiert, d.h. bis zu dem Zeitpunkt, an dem sich die Intensität der Fluoreszenz nicht mehr ändert, was für das Ende der Fibrillenbildung spricht. Die Stammlösung wurde in drei Proben geteilt. Eine

Probe blieb unbehandelt. Der zweiten Probe wurde durch VW01 im Überschuss bis zu einem Verhältnis von $r[\text{VW19}/\text{VW01}] = 0,2$ ergänzt. Der dritten Probe wurde dieselbe Menge an VW01-ran hinzugefügt, der Variation der VW01-Primärsequenz ohne intakte *Coiled Coil*-Erkennungsmotive. Schließlich wurden die drei Proben weitere 140 h mit Hilfe der NIAD-4-Fluoreszenz beobachtet. Das Modellpeptid VW01 führt zu einer klaren Reduzierung der Intensität der NIAD-4 Fluoreszenz. Dies spricht für eine starke Reduzierung der Anzahl amyloider Aggregate, denn die Addition von der gleichen Menge an VW01-ran führte nur zu einer geringen Reduzierung der NIAD-4-Fluoreszenz. Daher kann ein bloßer Austausch von VW01 gegen den Fluoreszenzfarbstoff an der Oberfläche der Fibrille ausgeschlossen werden

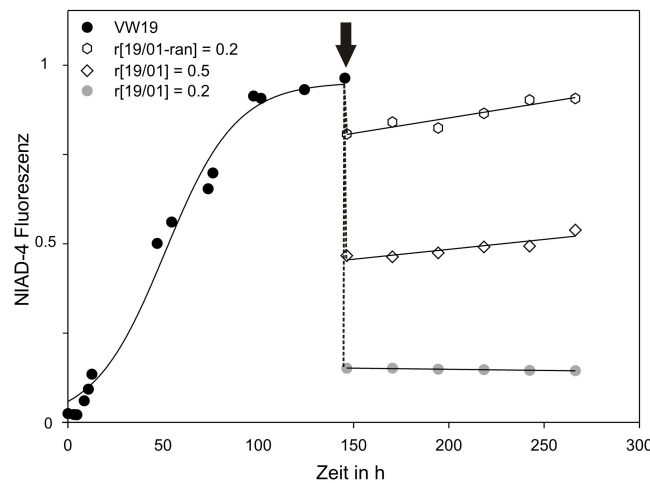


Abbildung 116: NIAD-4 Fluoreszenz-Studie der Deaggregation amyloider Fibrillen durch VW01. Der Pfeil markiert die Zugabe von VW01 bzw. VW01-ran. (Peptidkonzentration VW19 = $150\mu\text{M}$, in 10 mM Azetat-Puffer, $0,1\%$ NaN_3 , $\text{pH } 4,0$, $10\mu\text{M}$ NIAD-4).

kann.^[575] Zusätzlich wurden die Proben mit Hilfe von Kryo-TEM untersucht. Die Abbildung 117 zeigt Proben der VW19/VW01 bzw. VW01-ran-Mischungen mit $r[\text{VW19}/\text{VW01}] = 0,5$ und $r[\text{VW19}/\text{VW01-ran}] = 0,2$. Die Probe mit VW01-ran zeigt nur typische amyloide Fibrillen des VW19 und steht damit im Einklang mit den Ergebnissen der Fluoreszenz-Studien. Die Probe mit VW01 im Verhältnis $r[\text{VW19}/\text{VW01}] = 0,5$ zeigt neben den typischen amyloiden Fibrillen die schon bereits beschriebenen faserartigen Aggregate. Die Morphologie der faserartigen Aggregate unterscheidet sich nicht von denen, die mit frisch präpariertem, ungefalteten VW19 gebildet werden. Man kann sagen, dass diese Ergebnisse ebenfalls im Einklang mit den Fluoreszenzstudien stehen, obwohl es mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Aufnahmen schwierig ist, quantitative Aussagen zu treffen. Um mehr über die Stöchiometrie der Aggregate zu erfahren, wurden zusätzlich CD-Spektroskopie, AUZ und Größenaustauschchromatografie angewendet. Eine Untersuchung von CD-Spektren bei unterschiedlichen Verhältnisse von VW19 und VW01 zeigt, dass die

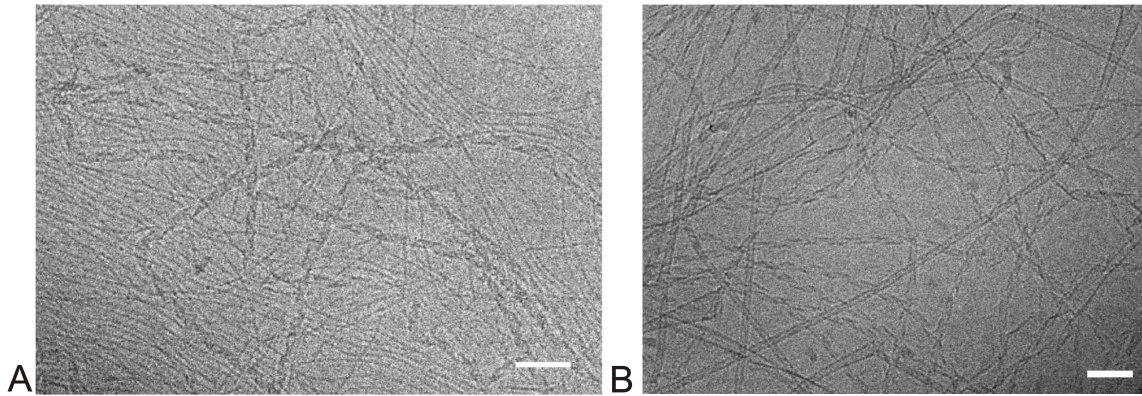


Abbildung 117: Kryo-TEM-Aufnahme der VW19/VW01 Mischungen mit (A) $r[\text{VW19/VW01}] = 0,2$ und (B) $r[19/01\text{-ran}] = 0,2$. (in 10 mM Azetat-Puffer, 0,1% NaN_3 , pH 4,0).

geringsten Werte für die Elliptizität $\Theta_{222\text{nm}}$, ein Maß für die Helizität, bei $f_{[\text{VW01}]} = [\text{VW01}]/([\text{VW19}]+[\text{VW01}]) \approx 0.65$ erreicht werden, was für ein stöchiometrisches Verhältnis von $r[\text{VW19/VW01}] = 0,5$ spricht (Abbildung 119). Da die Bestimmung des Oligomerisierungsgrades der 2:1 Mischung aus VW19 und VW01 mit Hilfe der AUZ möglicherweise ungewollt zur Aggregation führen kann, wurde im Beispiel der Mischung von VW18 und VW01 der Oligomerisierungsgrad über Größenaustausch-Chromatographie und der Vergleich mit dem über AUZ bestimmten Oligomerisierungsgrad von VW01 bestimmt. Auch in diesem Fall wurde Abz-Gly allen Proben hinzugefügt, was einen Vergleich ermöglichte. Die frisch präparierte Probe von VW19, d.h. die lösliche ungefaltete Form des VW19, wurde bei einer höheren Retentionszeit eluiert, als die Probe von VW01, für die AUZ die Bildung von Trimeren ergab. Dies deutet auf einen niedrigeren Oligomerisierungsgrad als der eines Trimeren. Da frisch präpariertes VW19 ungefaltet vorliegt, ist es sehr wahrscheinlich,

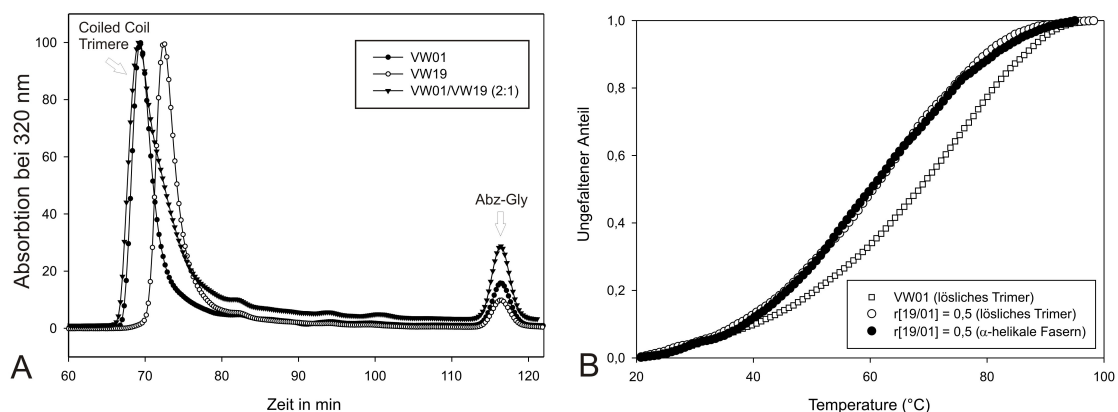


Abbildung 118: Größenaustauschchromatographie von VW01, VW19 und einer Mischung mit $r[\text{VW19/VW01}] = 0,5$. Zur Kalibrierung wurde Abz-Gly hinzugefügt (Peptidkonzentration = $150\mu\text{M}$, in 10 mM Azetat-Puffer, 0,1% NaN_3 , pH 4,0). Thermische Denaturierung von VW01 und der Mischung mit $r[\text{VW19/VW01}] = 0,5$ im Zustand löslicher Trimer und α -helikaler Fasern hinzugefügt (Peptidkonzentration = $150\mu\text{M}$, 2,5 M GdnHCl, in 10 mM Azetat-Puffer, 0,1% NaN_3 , pH 4,0).

dass ein Monomer vorliegt. Für die Mischung mit $r[\text{VW19}/\text{VW01}] = 0,5$, die eine vollständige Inhibition der Bildung amyloider Aggregate zeigt, wurde nur in einer Fraktion bei der Retentionszeit des trimeren VW01 eluiert. Zusammenfassend lässt sich daher sagen, dass trimere Komplexe aus einem VW19-Molekül und einem VW01-Molekül gebildet werden. Zum Vergleich der Stabilität von VW01, als lösliches trimeres *Coiled Coil*, und der Mischung von VW19 und VW01 mit $r[\text{VW9}/\text{VW01}] = 0,5$ im frisch präparierten Zustand, d.h. ein lösliches trimeres Heteromer, und im Zustand α -helikaler Fasern, d. h. nach einer Inkubationszeit von einer Woche, wurden temperaturabhängige CD-Spektren aufgenommen. Über die Abnahme der Intensität bei 222 nm wurde die Denaturierung der helikalen Strukturen beobachtet (Abbildung 118, B). Es wird deutlich, dass VW01 stabiler ist als die

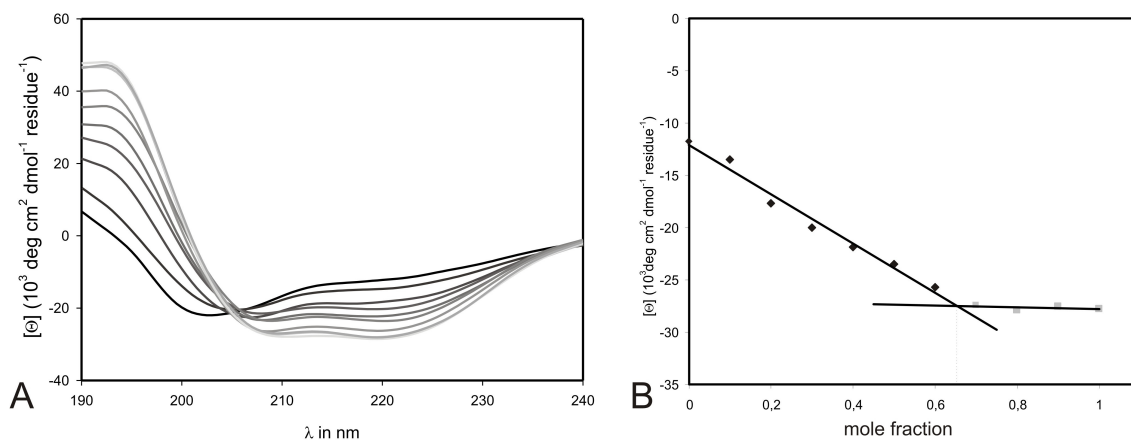


Abbildung 119: (A) CD-Spektren unterschiedlicher Verhältnisse der VW19/VW01 mit steigendem Anteil von VW01 von 0,1 bis 1,0. (B) Verlauf der molaren Elliptizität pro Aminosäurerest bei 222 nm. (Peptidkonzentration $100\mu\text{M}$, in 10 mM Azetat-Puffer, 0,1% NaN_3 , pH 4,0).

2:1 Mischung aus VW01 und VW19, was möglicherweise auf eine nicht optimale Interaktion zwischen VW19 und VW01 hinweist. Darüber hinaus gibt es keinen wesentlichen Unterschied zwischen der 2:1 Mischung als lösliches Trimer und in Form von α -helikalen Fasern.

Die verschiedenen Aggregate wurden ferner mit Hilfe von Röntgenbeugungsstudien (WAXS) charakterisiert. Neben der Mischung mit dem Verhältnis von $r[\text{VW19}/\text{VW01}] = 0,5$ wurden ebenfalls VW19 im amyloiden Zustand und VW01 zum Vergleich untersucht. Die entsprechenden konzentrierten Proben wurden über mehrere Wochen unter atmosphärischen Bedingungen im 1,5 mL Eppendorf getrocknet. Daher sind die Aggregate in den Proben nicht ausgerichtet und führen zu isotropischen zweidimensionalen WAXS Mustern, die als Grundlage für das in Abbildung 120 gezeigte eindimensionale Beugungsprofil azimuthal gemittelt wurden. Zum eindimensionalen Beugungsprofil in Abbildung 120 wurde das

Beugungsprofil (grün) aus Abbildung 73 der Probe von VW19 mit ausgerichteten amyloiden Fibrillen als Referenz hinzugefügt. Es weist eine äquatoriale Reflexion (B1) von $d = 2\pi/q \approx 10 \text{ \AA}$ auf, was dem Abstand lateraler Wechselwirkungen der β -Faltblattstrukturen über die Aminosäureseitenketten entspricht, eine scharfe Reflexion (B2) bei $4,7 \text{ \AA}$, was dem Abstand der Wasserstoffbrücken zwischen den β -Faltblattstrukturen entspricht, und einer weiteren Reflexion (B3) bei $3,8 \text{ \AA}$, die bereits bei amyloid- β -Kristalliten beobachtet wurde.^[576, 577]

Die drei isotropischen Proben, d.h. VW19 (schwarz), VW01 (blau) und die Mischung mit $r[\text{VW19/VW01}] = 0,5$ weisen verschiedene diffuse Reflexionen zwischen $0,5$ and $0,8 \text{ \AA}^{-1}$ and eine Maximum bei $1,44 \text{ \AA}^{-1}$ und einige scharfe Reflexionen auf. Das Modellpeptid VW19 (schwarz) zeigt die typischen Reflexionen amyloider Aggregate (B1, B2). Die dritte Reflexion B3 ist möglicherweise vom breiten Maximum um $1,44 \text{ \AA}^{-1}$ überlagert. Dieses breite Maximum ist in allen isotropischen Proben, jedoch nicht in der Probe mit ausgerichteten amyloiden Fibrillen des VW19 (grün) zu erkennen, so dass dies möglicherweise auf die spezifische Probenpräparation zurückgeführt werden kann. Das Modellpeptid VW01 (blau) zeigt eine scharfe Reflexion bei $d = 5,08 \text{ \AA}$ (A1), die typisch für ein α -helikales *Coiled Coil* in dem Abstand zwischen den Windungen zugeschrieben werden kann.^[553] Die Mischung mit $r[\text{VW19/VW01}] = 0,5$ (rot) zeigt eine „Schulter“ anstelle einer scharfen Reflexion an gleicher Position, was auf die Bildung α -helikaler Strukturen deutet. Die diffuse Reflexion zwischen $q \approx 0,5$ und $0,8 \text{ \AA}^{-1}$ lässt sich dem Abstand zwischen den α -Helices innerhalb einer *Coiled Coil*-Struktur mit entsprechenden $8-12 \text{ \AA}$ zuschreiben. Beide helikalen Proben, d.h. VW01 und die

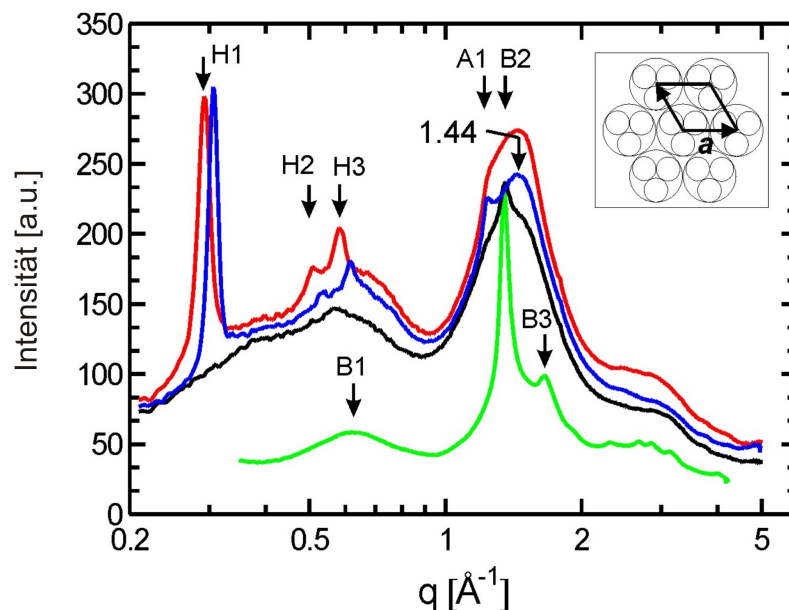


Abbildung 120: Azimutal gemittelte WAXS Streuungsprofile von VW19 (schwarz), VW01 (blau) und der gemischten Probe (rot) mit $r[\text{VW19/VW01}] = 0,5$. Als Referenz wurde das Streuungsprofil der ausgerichteten amyloiden Fibrillen von VW19 (grün) hinzugefügt. Das eingelassene Bild zeigt eine schematische Darstellung eines Bündels mit hexagonal gepackten trimeren Coiled-Coil-Fasern mit der Gitterkonstanten a (in 10 mM Azetat-Puffer, 0,1% NaN_3 , pH 4,0).

Mischung $r[\text{VW19}/\text{VW01}] = 0,5$, zeigen zusätzliche scharfe Reflexionen: H1, H2 und H3. Diese Reflexionen sprechen für eine zweidimensionale hexagonale Packung einzelner *Coiled Coil*-Fasern senkrecht zur Faserachse, da das Verhältnis der betreffenden Abstände sich als $1/\sqrt{1}:1/\sqrt{3}:1/\sqrt{4}$ ausdrücken lässt.^[578, 579] Der Abstand von Zentrum zu Zentrum entspricht für das Modellpeptid VW01 einer Länge von 23,7 Å, wobei sich die Gitterkonstante a mit Hilfe der Reflexion q_{10} und die Gleichung $a = 4\pi/\sqrt{3}(q_{10})$ berechnen lässt. Der entsprechende Abstand für die VW19/VW01-Mischung ist dabei mit 24,8 Å etwas größer. Unter der Annahme, dass sich die individuellen α -helikalen Fasern nur durch den Trocknungsvorgang zu dicht gepackten Bündeln zusammenlagern, können diese Werte als Durchmesser einer individuellen Faser betrachtet werden. Diese Werte stehen im Einklang mit dem Durchmesser einer typischen trimeren *Coiled Coil*-Superhelix, die durch Analyse von Kristallstrukturen bestimmt wurde.^[580] Unter Beachtung der begrenzten Auflösung stehen diese Werte auch im Einklang mit der Bestimmung des Durchmessers durch die Elektronenmikroskopie. Die Bündelung individueller Fasern wurde in Kryo-TEM-Aufnahmen nicht beobachtet, so dass man annehmen kann, dass dies auf Konzentrierungseffekte bzw. auf den Trocknungsvorgang bei der TEM Probenpräparation zurückgeführt werden kann. Damit unterscheiden sich die α -helikalen Fasern von denen, die zum Beispiel durch die Arbeitsgruppe von Woolfson untersucht worden sind.^[579] Diese zeigen eine hohe Tendenz zur Bündelung, was jedoch im Design begründet liegt.

11.3 Mischungssystem RR01 und VW01

Das Modellpeptid RR01 bildet im Gegensatz zu VW19 amyloide Fibrillen bei neutralem pH-Wert. Auch in diesem Fall wurde der Effekt von VW01 auf die Aggregation getestet. Dafür wurden Lösungen mit dem Modellpeptid RR01 mit einer konstanten Konzentration von 200 μM ebenfalls mit verschiedenen Verhältnissen an VW01 versetzt und mit CD-Spektroskopie, Thioflavin T basierte Fluoreszenzspektroskopie und elektronenmikroskopischen Methoden untersucht.

Die Ergebnisse der CD-Spektroskopie zeigen im Unterschied zum reinen RR01 für die Mischungen mit $r[\text{RR01}/\text{VW01}] = 1, 0,5$ und $0,3$ zwei Minima bei 208 und 222 nm, die typisch für eine α -helikale Konformation sind. Alle drei Mischungsverhältnisse zeigen mit fortschreitender Inkubationszeit eine Reduzierung des Minimums bei 208 nm in Relation zum zweiten Minimum bei 222 nm, jedoch kein klares charakteristisches Spektrum für β -Faltblattstrukturen mit einem Minimum bei 218 nm. Die Thioflavin T-Fluoreszenzstudien zeigen einen konzentrationsabhängigen Effekt auf die Aggregation von RR01. Jedoch scheint

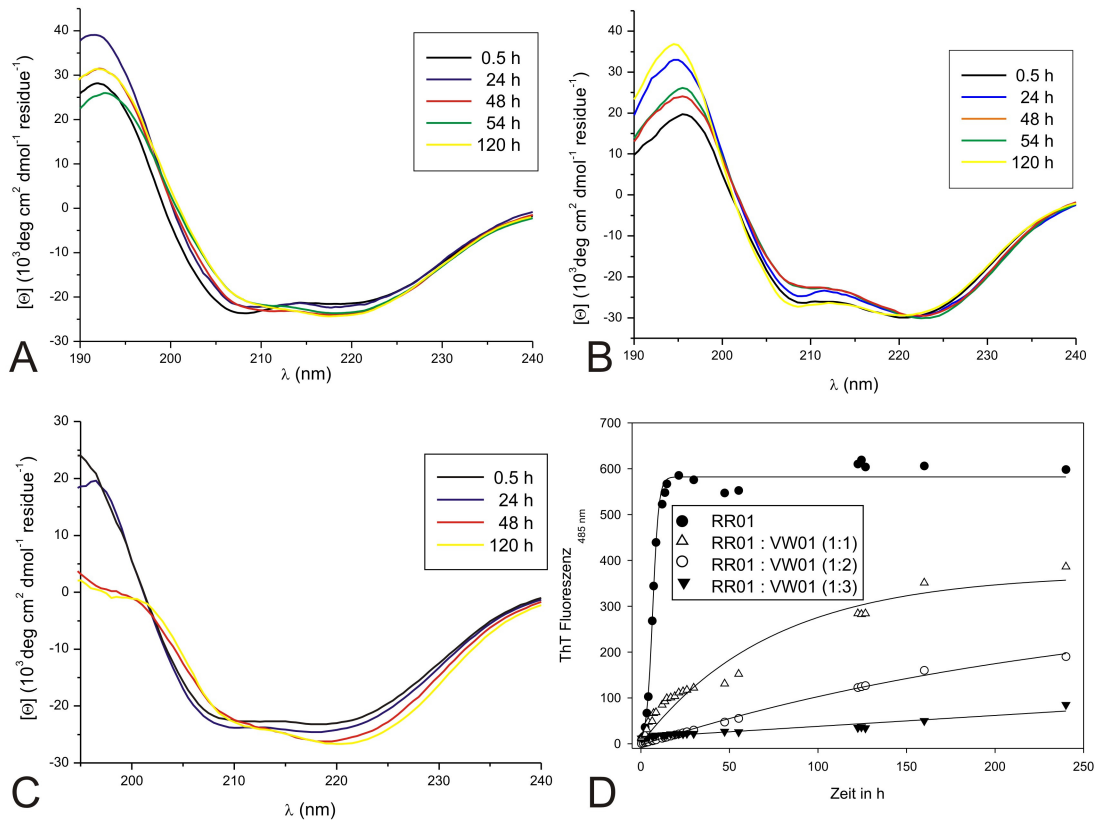


Abbildung 121: Zeitabhängige Entwicklung der CD-Spektren von RR01 in Gegenwart verschiedener Konzentration an VW01 (A) $r[RR01/VW01] = 1$, (B) $r[RR01/VW01] = 0,5$, (C) $r[VW19/VW01] = 0,3$. (Peptidkonzentration RR01 = $200 \mu\text{M}$, in 10 mM Phosphat-Puffer, 0,1% NaN_3 , pH 7,4) (D) Kinetik der Fibrillenbildung von RR01 in Abhängigkeit von verschiedenen Konzentration VW01. (Peptidkonzentration RR01 = $200 \mu\text{M}$, in 10 mM Phosphat-Puffer, 0,1% NaN_3 , pH 7,4; $10 \mu\text{M}$ ThT).

es mit VW01 in den Mischungen mit $r[RR01/VW01] = 1$ und $0,5$ im beobachteten Zeitraum nur zu einer Verlangsamung der Kinetik der Aggregation zu kommen. Die Probe $r[RR01/VW01] = 0,33$ zeigt nahezu vollständige Inhibition im Beobachtungszeitraum von 120 h. Jedoch zeigte eine Überprüfung der Fluoreszenzintensität nach zwei Wochen nur noch eine ca. 80%ige Inhibition, was den Trend, d.h. eine Verlangsamung der Aggregation von RR01, bestätigt. Im Vergleich zur reinen RR01-Probe zeigen die TEM-Aufnahmen von RR01 in Gegenwart von VW01 nicht die typische Morphologie amyloider Aggregate von RR01. Die Bildung trichter- und bänderförmiger Aggregate kann nicht mehr festgestellt werden (Abbildung 50, B, C). Neben kleinen Partikeln sind jedoch selbst in der Mischung mit $r[RR01/VW01] = \frac{1}{3}$ verdrehte fibrilläre Aggregate detektierbar, so dass man nicht von einer vollständigen Inhibition sprechen kann, wie die spektroskopischen Studien vermuten lassen. In sehr seltenen, aber nicht reproduzierbaren Fällen, ließen sich Fasern ähnlich dem Mischungssystem von VW01 und VW19 feststellen (Abbildung 50, B). Man muss daher zu dem Schluss kommen, dass VW01 bei den gewählten Untersuchungsbedingungen nicht in der Lage ist, die Aggregation von RR01 wie im Fall von VW18, durch Bildung von α -helikalen

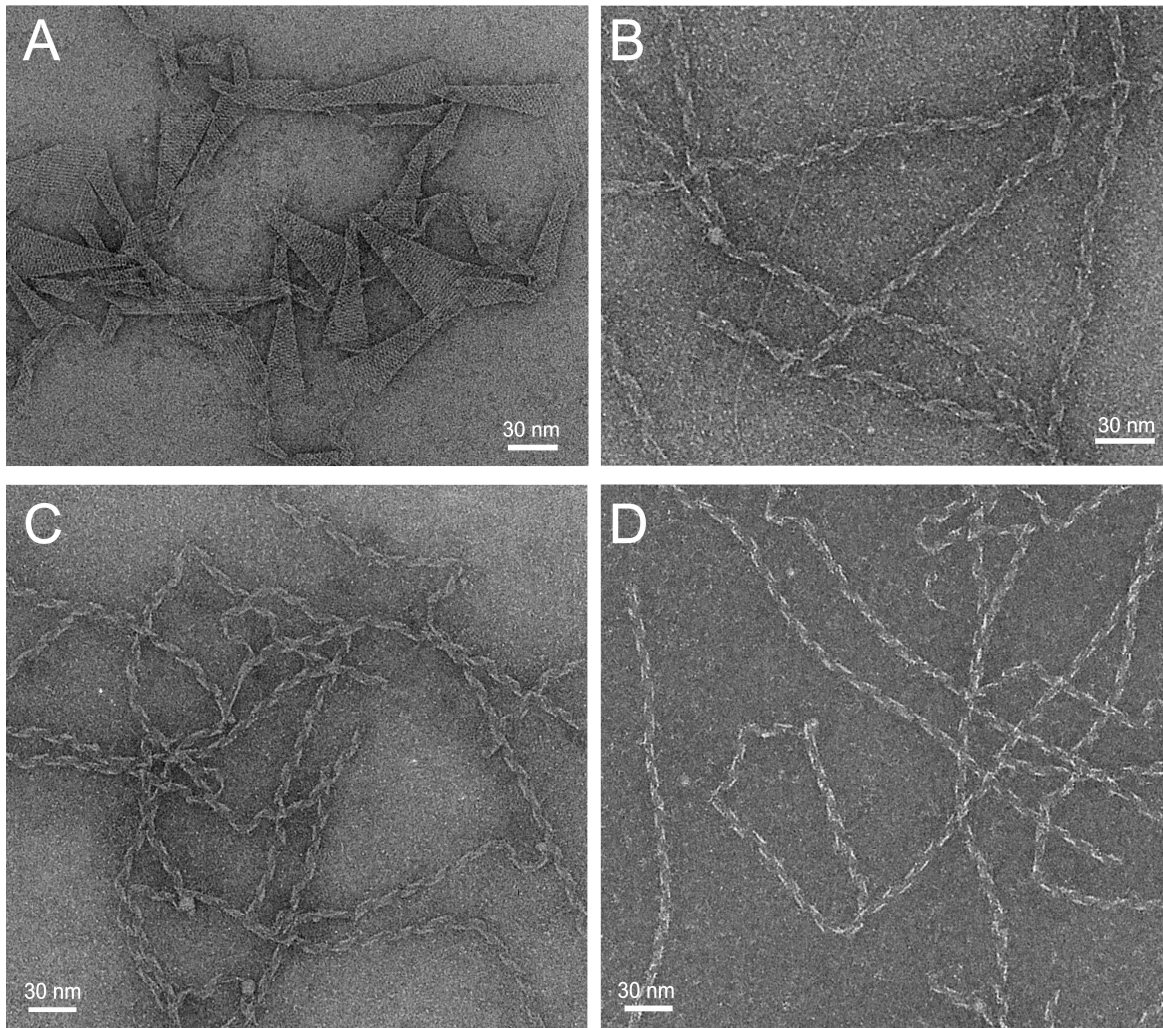


Abbildung 122: TEM Aufnahmen verschiedener RR01/VW01 Mischungen. (A) RR01 200 μM , (B) $r[\text{RR01}/\text{VW01}] = 0,5$; (C) $r[\text{RR01}/\text{VW01}] = 0,5$; (D) $r[\text{RR01}/\text{VW01}] = \frac{1}{3}$. ($[\text{RR01}] = 200 \mu\text{M}$, in 10 mM Phosphat-Puffer, 0,1% NaN_3 , pH 7,4).

löslichen Oligomeren oder im Fall von VW19 durch Bildung von α -helikalen Fasern, vollständig zu inhibieren. Eine Interaktion zwischen VW01 und RR01 kann aufgrund der spektroskopischen Daten und aufgrund der Tatsache, dass die Morphologie der amyloiden Fibrillen nicht mit dem reinen RR01 vergleichbar ist, nicht ausgeschlossen werden. Zudem zeigt VW01 mit 600 μM in der Mischung mit dem Verhältnis $r[\text{RR01}/\text{VW01}] = \frac{1}{3}$ nicht die Tendenz zur Bildung typischer α -helikaler Aggregate wie es laut der Charakterisierung von VW01 der Fall sein müsste, was für eine Interaktion mit RR01 spricht. Zusammenfassend gesagt, sind die Ergebnisse des Mischsystem RR01/VW01 nicht eindeutig, wie die zuvor beschriebenen Mischungssysteme. Die Aggregation des Modellpeptids RR01 ist selbst in einem dreifachen Überschuss an VW01 nicht vollständig zu inhibieren.

11.4 Mischungssystem RR01 und FF03

Inspiziert durch die Ergebnisse des Mischsystems VW19 und VW01 kam ich schließlich zur Überlegung, dass ein *Coiled Coil*-basiertes Peptid mit einer hohen Tendenz zu Bildung α -helikaler Aggregate möglicherweise eine größere inhibitorische Wirkung entfalten kann. Zu diesem Zweck wurde das Peptid FF03 mit dem Ziel designt, eine höhere Tendenz zur Bildung von α -helikalen Aggregaten zu zeigen als VW01. Als Basis dient das Design von VW19, das bei neutralen pH-Wert α -helikale Fasern bildet.^[516, 532, 581] Im Vergleich zur Primärstruktur von VW19 wurden für das Peptid FF03 die Valine in *b*, *c*, und *f*-Position durch die geladenen Aminosäuren Glutamat und Lysin ausgetauscht, so dass das Peptid keine Tendenz für β -Faltblatt-Konformation mehr aufweist und nicht mehr fähig ist, amyloide Fibrillen zu bilden. Die Ergebnisse der TANGO und AGADIR-Kalkulationen zeigen im Vergleich zu VW19 deutlich die Erhöhung der Tendenz zur Bildung α -helikaler Strukturen und das Fehlen einer amyloiden Kernsequenz (Abbildung 123, C). Die CD-Spektren von 200 μ M zeigen zu Beginn der Inkubationen die zwei charakteristischen Minima bei 208 und 222 nm, die typisch für eine α -helikale Konformation sind. In Abhängigkeit von der Zeit nimmt das Minimum bei 208 nm relativ zum zweiten Minimum bei 222 nm ab. Die Entwicklung ist charakteristisch für CD-Spektren an α -helikalen Aggregaten und lässt sich auf Streuungseffekte zurückführen.^[557] Die TEM-Aufnahmen von einer 200 μ M FF03-Probe zeigen deutlich die Bildung von fadenartigen Aggregaten, die sich darüber hinaus zu Bündeln zusammenlagern. Die Bündelung ist ein klarer Unterschied zu der Morphologie der Fasern des Modellpeptids VW19 bei neutralem pH. An einigen Stellen ist eine sehr dichte, hochgeordnete Packung der

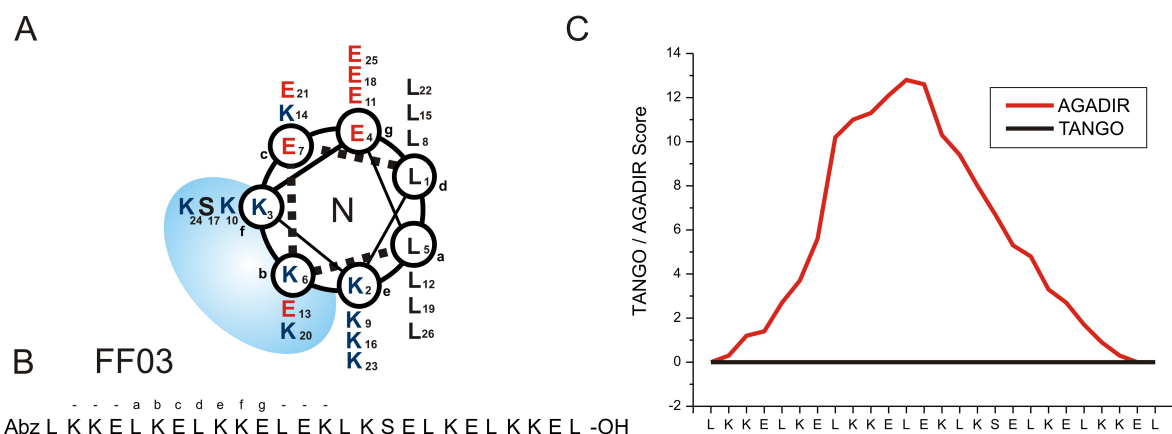


Abbildung 123: (A) Helical wheel – Darstellung, blaue Unterlegung entspricht einer überwiegend positiv-geladenen Lysin-Domäne und (B) Primärstruktur vom Modellpeptid FF03 (C) Ergebnis der Analyse der Primärsequenz von FF03 mit den Algorithmen TANGO und AGADIR bei pH 7.4 und Raumtemperatur.

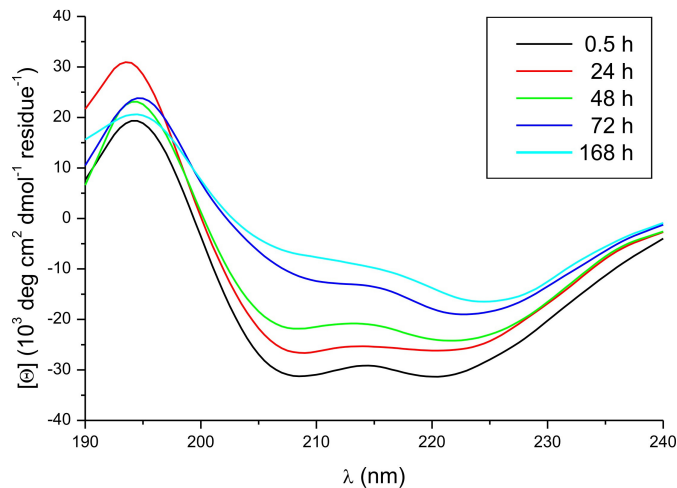


Abbildung 124: Zeitabhängige Entwicklung der CD Spektren von FF03 ($[FF03] = 200 \mu\text{M}$, 10 mM Phosphat-Puffer, 0,1% NaN_3 , pH 7,4)

Fasern zu erkennen. Im überwiegenden Teil sind die Fasern jedoch eher locker gebündelt und wachsen mitunter ineinander, so dass die dichte und hochgeordnete Packung auch auf Präparationseffekte zurückgeführt werden kann. Die Bündelung von *Coiled Coil*-basierten Fasern beruht auf nicht-kovalenten Wechselwirkungen zwischen den lösungsmittel-exponierten Positionen *b*, *c*, und *f*.^[582, 583] Die Positionen *b*, *c* und *f* sind überwiegend mit positiv geladenen Lysin- und negativ geladenen Glutamatresten besetzt, so dass man von elektrostatischen Wechselwirkungen ausgehen kann. Jedoch ist eine durchgängige hochgeordnete und dichte Packung vergleichbar zu den designten *Coiled Coil*-basierten Fasern der Arbeitsgruppe D.N. Woolfson nicht zu erkennen.^[579] Damit weist das Modellpeptid FF03 die geforderten Eigenschaften auf. Es zeigt eine erhöhte Tendenz zur Bildung α -helikaler Fasern. Der nächste Schritt bestand in der Untersuchung des inhibitorischen Potentials in Gegenwart des amyloidogenen Modellpeptids RR01. Die CD-

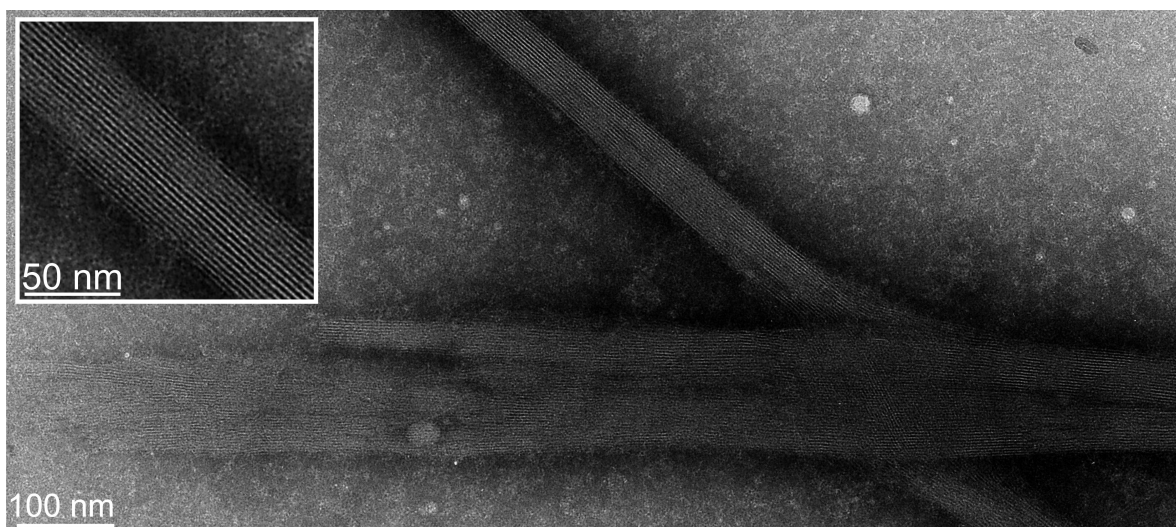


Abbildung 125: (A) TEM-Aufnahme von FF03 (Peptidkonzentration = $200\mu\text{M}$, 10 mM Phosphat-Puffer, 0,1% (w/w) NaN_3 , pH 7,4; 0,1% PTA).

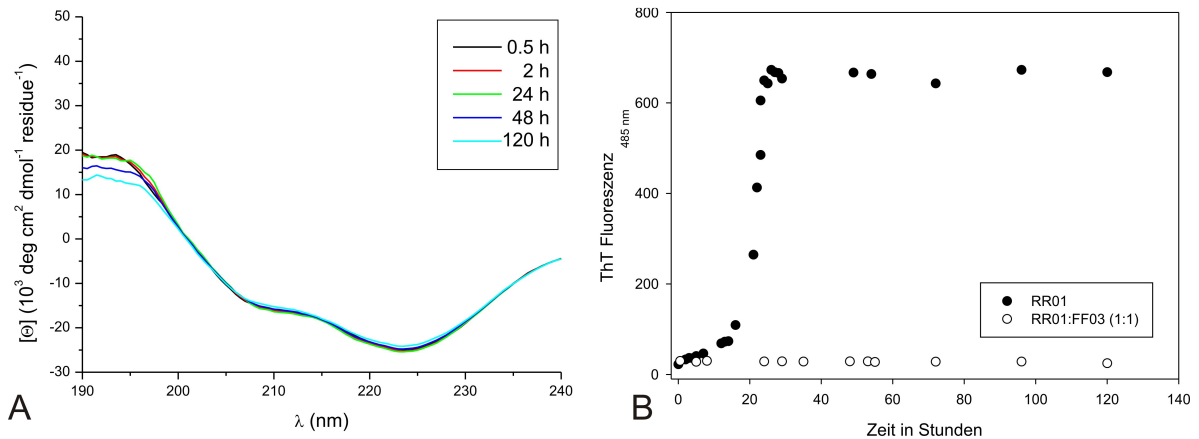


Abbildung 126: (A) CD-Spektren und (B) ThT-Assay der Mischung mit $r[\text{RR01}/\text{FF03}] = 0,5$. (RR01 Peptidkonzentration = $200 \mu\text{M}$, in 10 mM Phosphat-Puffer, 0,1% (w/w) NaN_3 , pH 7,4, $20 \mu\text{M}$ ThT).

Spektren für die Mischungen mit $r[\text{RR01}/\text{FF02}] = 0,5$ zeigen im Unterschied zum reinen RR01, das nativ ungeordnet vorliegt, zwei für eine α -helikale Konformation charakteristische Minima bei 208 und 222 nm. Das deutet stark auf die Überführung des nativ ungeordneten RR01 in eine α -helikale Struktur hin. Im Unterschied zum reinen FF03 ist das Minimum bei 208 nm von Beginn der Inkubationszeit an relativ zum zweiten Minimum bei 222 nm reduziert, was für eine rasche Bildung α -helikaler Fasern spricht.^[557] Die Ergebnisse des Thioflavin T-Assays der Mischungen mit $r[\text{RR01}/\text{FF02}] = 0,5$ zeigen im Vergleich zum reinen RR01 keinen charakteristischen Anstieg der Fluoreszenz bei 485 nm, was für eine vollständige Inhibition der Bildung amyloider Aggregate spricht. Kryo-TEM-Aufnahmen zeigen keine typischen amyloiden Fibrillen des Modellpeptids RR01. Es sind nur lange Fasern erkennbar, die sich zu eher lockeren Bündeln vereinen. Die Ergebnisse der CD-

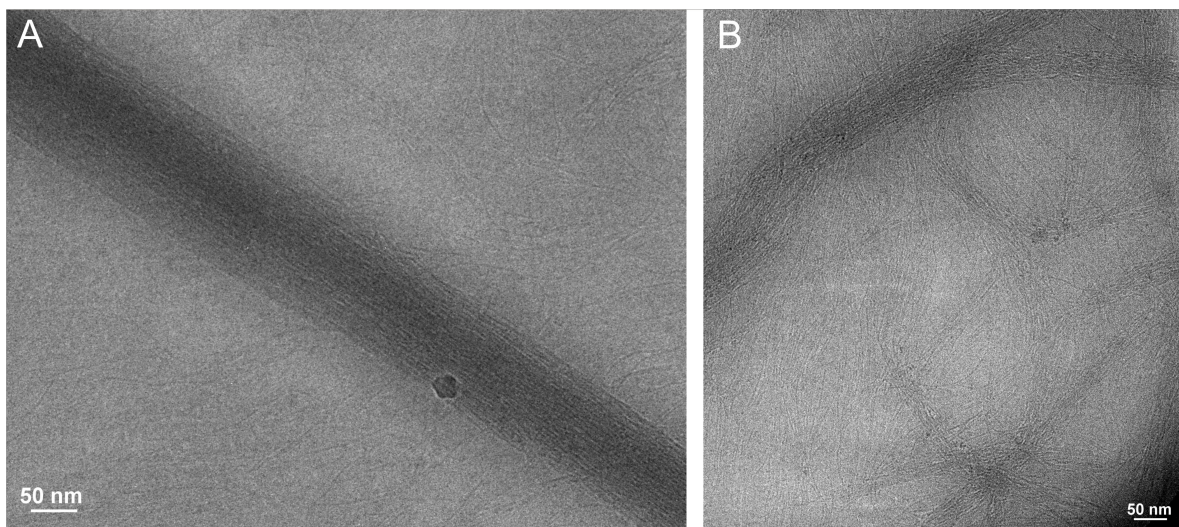


Abbildung 127: Kryo-TEM-Aufnahme von RR01/FF03 Mischung mit $r[\text{RR01}/\text{FF03}] = 0,5$ (RR01 Peptidkonzentration = $200 \mu\text{M}$, in 10 mM Phosphat-Puffer, 0,1% (w/w) NaN_3 , pH 7,4).

Spektroskopie, des Thioflavin T-Assays und der Elektronenmikroskopie stehen im Einklang miteinander und sprechen für eine vollständige Inhibition der Bildung amyloider Fibrillen unter Ausbildung von α -helikalen Fasern.

11.5 Mischungssystem α -AH und β -AH-V

Mit diesen Modellpeptiden sollte überprüft werden, ob das Inhibitionsprinzip der Stabilisierung der helikalen Konformation auf amyloidogene Peptide, die keine charakteristische *Coiled Coil*-Erkennungsdomänen aufweisen, übertragbar ist. Durch die Zugabe von 5 % HFIP, ein Lösungsmittel, dass die Ausbildung von α -helikalen Strukturen unterstützt, konnte die Bildung von β -Faltblatt-reichen amyloiden Fibrillen von β -AH-V unter Ausbildung einer α -helikalen Struktur angezeigt durch zwei charakteristische Minima bei 208 und 222 nm inhibiert werden (Abbildung 128). Dieses Experiment zeigt, dass die

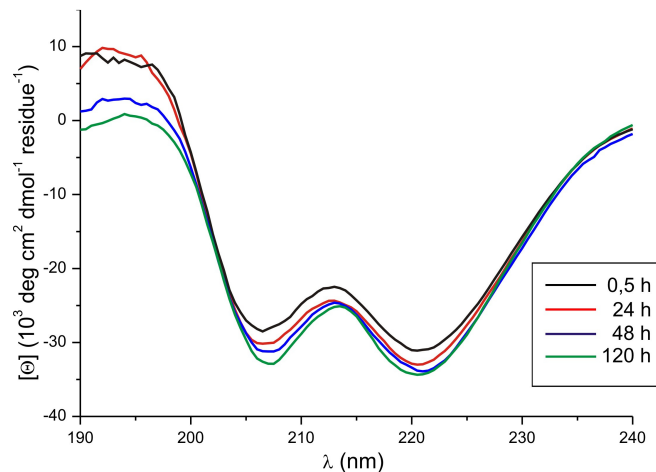


Abbildung 128: CD Spektren von β -AH-V bei 5 % HFIP (Peptidkonzentration = $100\mu\text{M}$, 10 mM Phosphat-Puffer pH 7,4, 0,1% NaN_3 , 5% HFIP).

Peptidsequenz von β -AH-V helikale Elemente aufweist, die sich durch entsprechende Liganden ansprechen lassen. Der Effekt des α -helikalen Modellpeptids α -AH auf den Aggregationsprozess von β -AH-V wurde mit Hilfe von CD Spektroskopie, ThT Fluoreszenz und Elektronenmikroskopie bei neutralen pH-Wert untersucht. Die Probe von β -AH-V ohne Gegenwart α -AH zeigt im ThT-Assay eine rasche Aggregation ohne das Verstreichen einer Nukleationszeit zu Beginn des Aggregationsprozesses, wobei das Maximum des Fibrillen bereits nach 5 h erreicht wird. Für eine äquimolare Mischung aus α -AH und β -AH-V ist eine klare inhibitorische Wirkung innerhalb einer Inkubationszeit von 24 h im ThT-Assay festzustellen (Abbildung 129). Die CD Spektren zeigen für die äquimolare Mischung einen zu den CD-Spektren von α -AH vergleichbaren Verlauf mit zwei Minima was für eine α -helikale Konformation spricht. Innerhalb des Beobachtungszeitraumes von 48 h ist lediglich eine

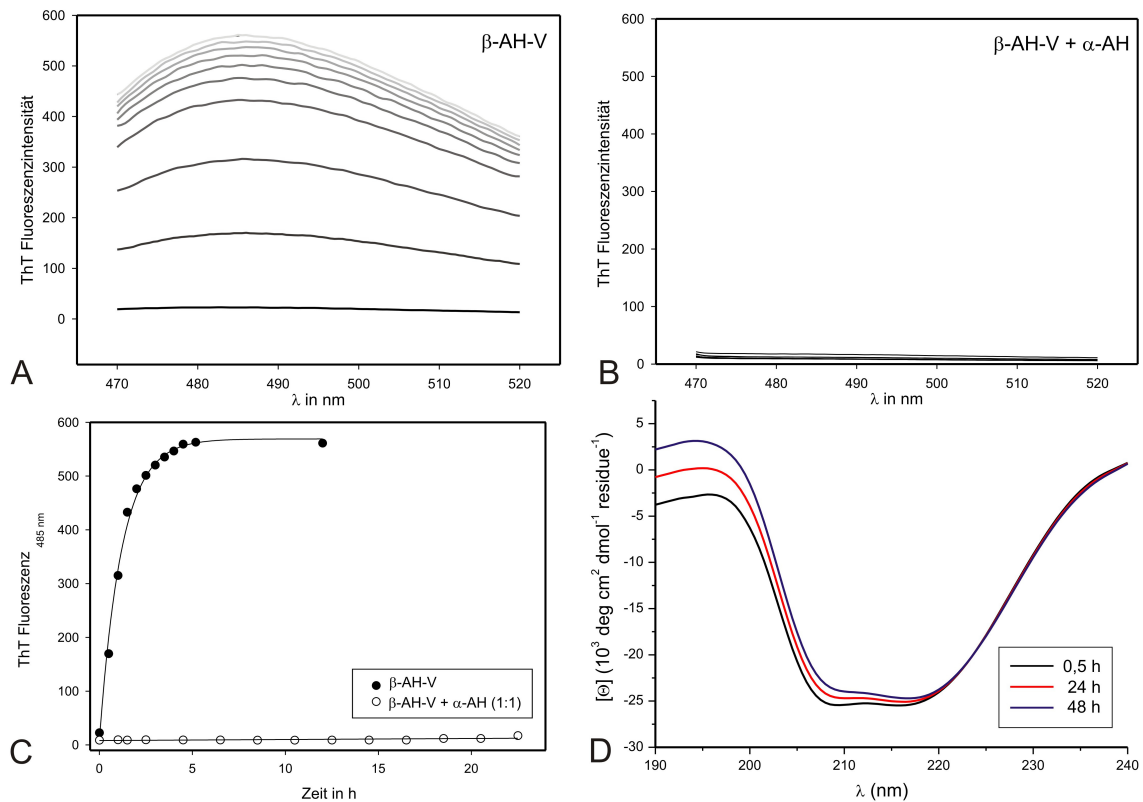


Abbildung 127: Thioflavin-T Assay. Charakteristischer Anstieg der ThT- Fluoreszenz bei 485 nm aufgrund der Bindung des Farbstoffs an amyloiden Aggregaten von β -AH-V (A, C) ohne und in Gegenwart von α -AH (B, C). (D) CD Spektren für eine äquimolare Mischung von α -AH und β -AH-V. (Peptidkonzentration = $100\mu\text{M}$, 10 mM Phosphat-Puffer pH 7,4, $0,1\%$ NaN_3).

leichte Reduzierung des Minimums bei 208 nm festzustellen (Abbildung 129, D). Zur weiteren Überprüfung der inhibitorischen Wirkung von α -AH auf die Aggregation von β -AH-V wurde TEM Aufnahmen β -AH-V nach 48 h mit und ohne Gegenwart des Peptids α -AH gemacht. In Gegenwart von α -AH waren keine amyloide Fibrillen zu detektieren. Lediglich

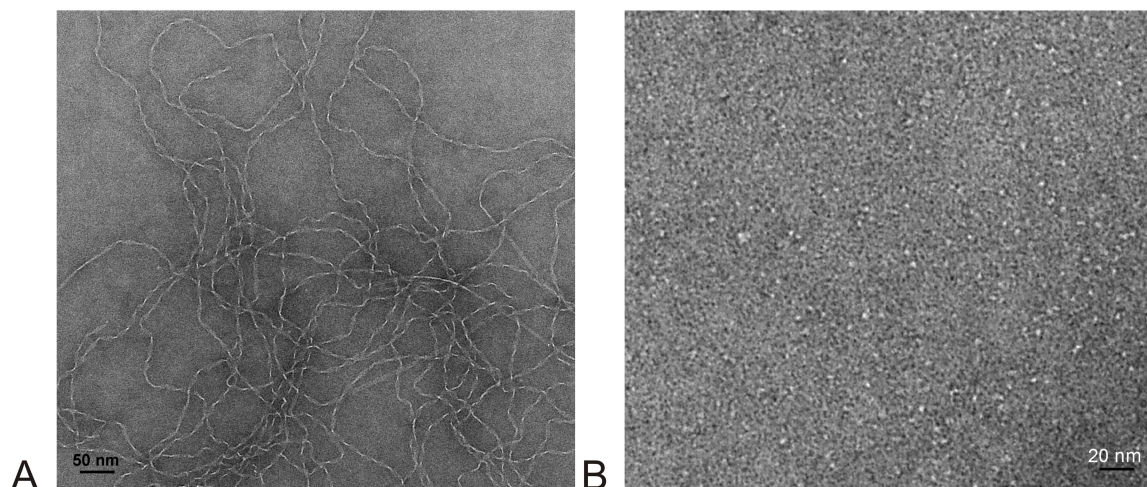


Abbildung 130: (A) Amyloide Fibrillen des Peptids β -AH-V und (B) das Peptid β -AH-V in Gegenwart von α -AH nach einer Inkubationszeit von 48 h (Peptidkonzentration = $100\mu\text{M}$, 10 mM Phosphat-Puffer pH 7,4, $0,1\%$ NaN_3 , $0,1\%$ PTA).

kleinere Partikel konnten festgestellt werden, was insgesamt für eine Inhibition durch Bildung helikaler Oligomere spricht (Abbildung 130, B).

11.6 Mischungssystem Pseudopeptid PP1 mit VW18 und RR01

Wie bereits im Kapitel 6 *Eingriff in den Prozess der Bildung amyloider Aggregate* beschrieben, sind eine Reihe peptidbasierter und nicht-peptidbasierter Inhibitoren zur Inhibition der amyloiden Aggregation entwickelt worden. Ein Großteil der peptidbasierten Inhibitoren nimmt amyloidogene Kernsequenzen als Ausgangspunkt, die zur Optimierung ihrer Eigenschaften modifiziert werden. Zu diesen Modifizierungen gehört z.B. die Einführung von N-methylierten Aminosäuren, Ester-Bindungen oder auch die Einführung der Aminosäure Prolin als Sekundärstrukturbrecher. In der Arbeitsgruppe von Prof. Stefan Hecht (HU Berlin) designte und synthetisierte man eine neue Klasse von Pseudopeptiden auf der Basis von Bis-(Thioharnstoff)hydraziden.^[584] Diese Verbindungen wurden im Wesentlichen nach folgenden Designprinzipien entwickelt: Sie sollten ähnlich wie peptidbasierte Verbindungen mit N-methylierten Aminosäuren die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen blockieren, die Aggregation von β -Faltblattstrukturen unterbinden und die Tendenz zur Aggregation des Inhibitors selbst herabsetzen.^[584] Diese Eigenschaft wird durch die Verwendung von Thioharnstoff-Komponenten verstärkt, da dieser Schwefel statt des Carbonyl-Sauerstoffs einer normalen Peptidbindung als deutlich schwächeren Wasserstoffbrückenbindungspartner anbietet.^[584] Die Einführung der

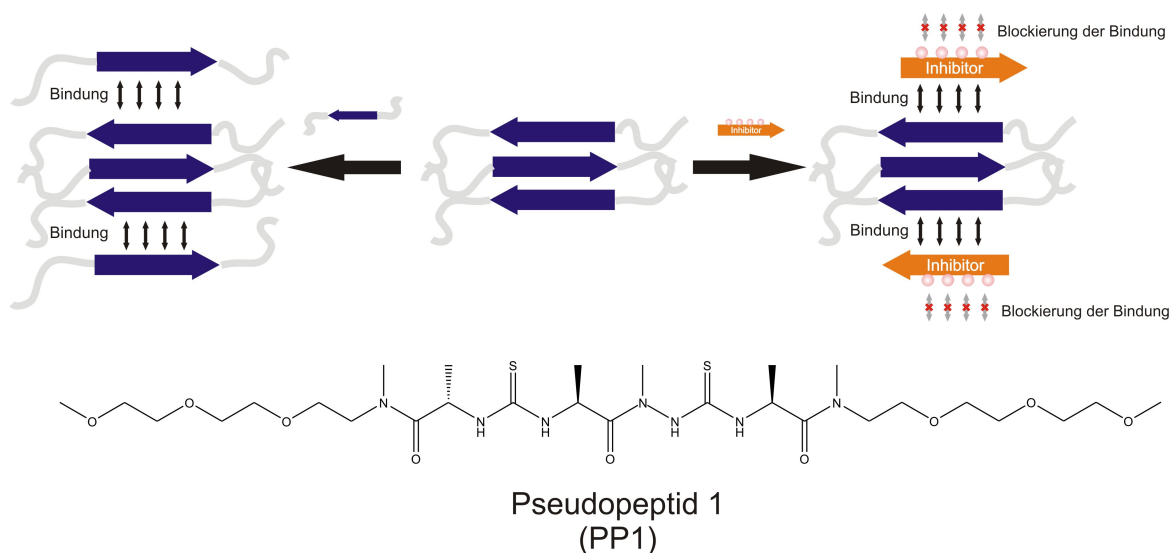


Abbildung 131: Inhibition der amyloiden Aggregation durch einen multivalenten Inhibitor, basierend auf Bis(Thioharnstoff)hydraziden (verändert nach Lit.^[584]). Chemische Struktur des hier untersuchten Di-Thioharnstoff-hydrazids mit PEG-Einheiten an den Termini zur Steigerung der Löslichkeit in Wasser, die im Rahmen dieser Arbeit als Pseudopeptid 1 (PP1) bezeichnet wird.

Thioharnstoff-Komponenten führt jedoch auf der anderen Seite zu einer erhöhten Tendenz zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen, da im Vergleich zur normalen Peptidbindung die zwei Amidprotonen des Thio-Harnstoffs deutlich azider sind.^[584] Die Harnstoff-Komponenten sind über eine Hydrazid verbunden, dass die Verwendung von Aminosäuren-Synthesebausteine zur Modifizierung der gesamten Verbindungen erleichtert. Das Konzept der Inhibition um das hier untersuchte Pseudopeptid ist in Abbildung 131 dargestellt. Die chemische Struktur des untersuchten Pseudopeptids 1 (PP1) entspricht einem Peptid aus drei Aminosäuren mit Alaninseitenketten an den drei Stereozentren jeweils in S-Konformation. An den Termini befinden sich polare Triethylglycol-Ketten zur Steigerung der Löslichkeit in wässrigen Lösungen.

CD-Spektren von PP1 bei neutralem pH-Wert zeigen ein Maximum um 220 nm. Die Konformation ändert sich nicht mit höheren Konzentrationen und nicht mit der Länge der Inkubationszeit (Abbildung 132, *Supportings* von Lit. ^[584]). Die Wirkung des Pseudopeptids in Gegenwart des Modellpeptids VW18 und des Modellpeptids RR01 wurde bei neutralem pH-Wert getestet. Beide Modellpeptide bilden bei neutralem pH-Wert amyloide Fibrillen, zeigen jedoch mit einer α -Helix bzw. ungefalteten Struktur verschiedene Ausgangskonformationen. Die Untersuchung des Inhibitions potentials von PP1 auf die Aggregation von VW18 und RR01 wurde mit Hilfe der CD-Spektroskopie und Thioflavin T Fluoreszenz-Studien sowie Elektronenmikroskopie durchgeführt. Die CD-Spektren von VW18 in Abhängigkeit von verschiedenen Inkubationszeiten in der Mischung PP1 im $r[\text{VW18}/\text{PP1}] = 0,5$ und $r[\text{VW18}/\text{PP1}] = \frac{1}{3}$ zeigen trotz der Anwesenheit von PP1 die von VW18 bekannte Änderung der Konformation von α -Helix zu β -Faltblatt. ThT Fluoreszenz-Studien wurden

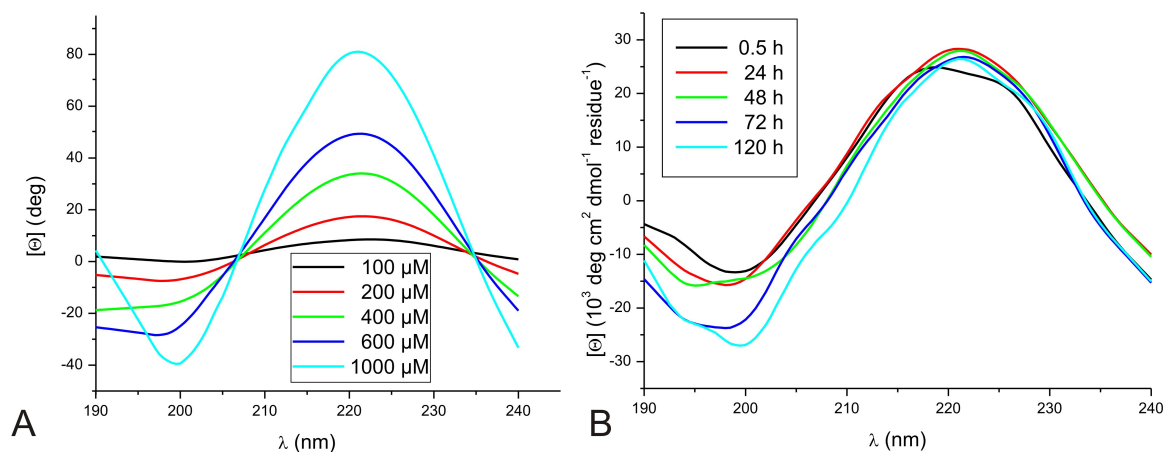


Abbildung 132: (A) CD-Spektren von verschiedenen Konzentrationen an Pseudopeptid 1 (B) CD-Spektren von 100 μM PP1, gemessen zu unterschiedlichen Zeitpunkten (10mM Phosphat-Puffer, pH 7,4, 0,1% NaN_3).

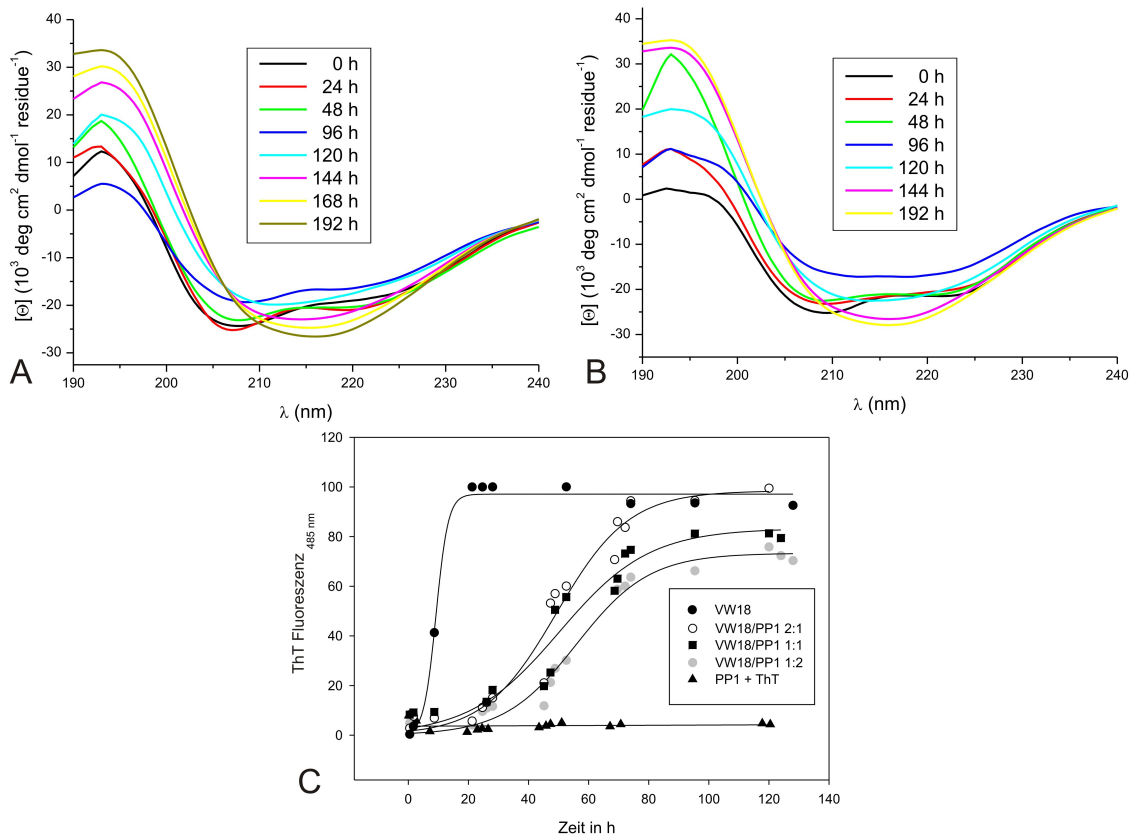


Abbildung 133: CD-Spektren von VW18 in Gegenwart von PP1 (A) $r[\text{VW18}/\text{PP1}] = 0,5$ (B) $r[\text{VW18}/\text{PP1}] = \frac{1}{3}$ (C) Kinetische Fibrillenbildung von VW18 im ThT-Assay in Abhängigkeit von verschiedenen Konzentrationen PP1 (VW18 Peptidkonzentration $100\mu\text{M}$, 10mM Phosphat-Puffer, $\text{pH } 7,4$, $0,1\%$ NaN_3).

mit einer Mischung mit $r[\text{VW18}/\text{PP1}] = 1$ und mit $r[\text{VW18}/\text{PP1}] = 0,5$ durchgeführt. Die Anwesenheit von PP1 führt zum einen zu einer Verlangsamung der Kinetik und zum anderen zu einer konzentrationsabhängigen Reduzierung der maximalen Fluoreszenzintensität, jedoch nur in einem geringen Ausmaß. Die Mischung $r[\text{VW18}/\text{PP1}] = 0,5$ mit dem höchsten hier untersuchten Anteil an PP1 zeigte nur eine Reduktion um ca. 20%. Die Daten des Thioflavin T-Assays stehen somit im Einklang mit der CD-Spektroskopie. Die Daten der Spektroskopie wurden im Fall im von VW18 durch elektronenmikroskopische Studien ergänzt. Die Abbildung 134, A zeigt eine Kryo-TEM-Aufnahme der $500\mu\text{M}$ PP1 in 10mM Phosphat-Puffer. Es sind kleinere Partikel mit einem Durchmesser von $2,6 \pm 0,8\text{ nm}$ zu erkennen, was möglicherweise auf die Bildung von Mizellen schließen lässt. Die Abbildung 134, B zeigt eine TEM-Aufnahme der Mischung $r[\text{VW18}/\text{PP1}] = 2$. Es sind die typischen verdrillten amyloiden Fibrillen des VW18 erkennbar. Eine Veränderung der Morphologie durch PP1 ist nicht nachweisbar. Darüber hinaus sind vereinzelte helle Partikel erkennbar, die mit den Partikeln in der Kryo-TEM-Aufnahme der reinen PP1-Probe vergleichbar sind und daher möglicherweise die PP1 Mizellen oder auch Mischaggregate mit VW18 darstellen. Die Partikel sind im Unterschied zur Kryo-TEM-Aufnahme hell aufgrund der Kontrastumkehr

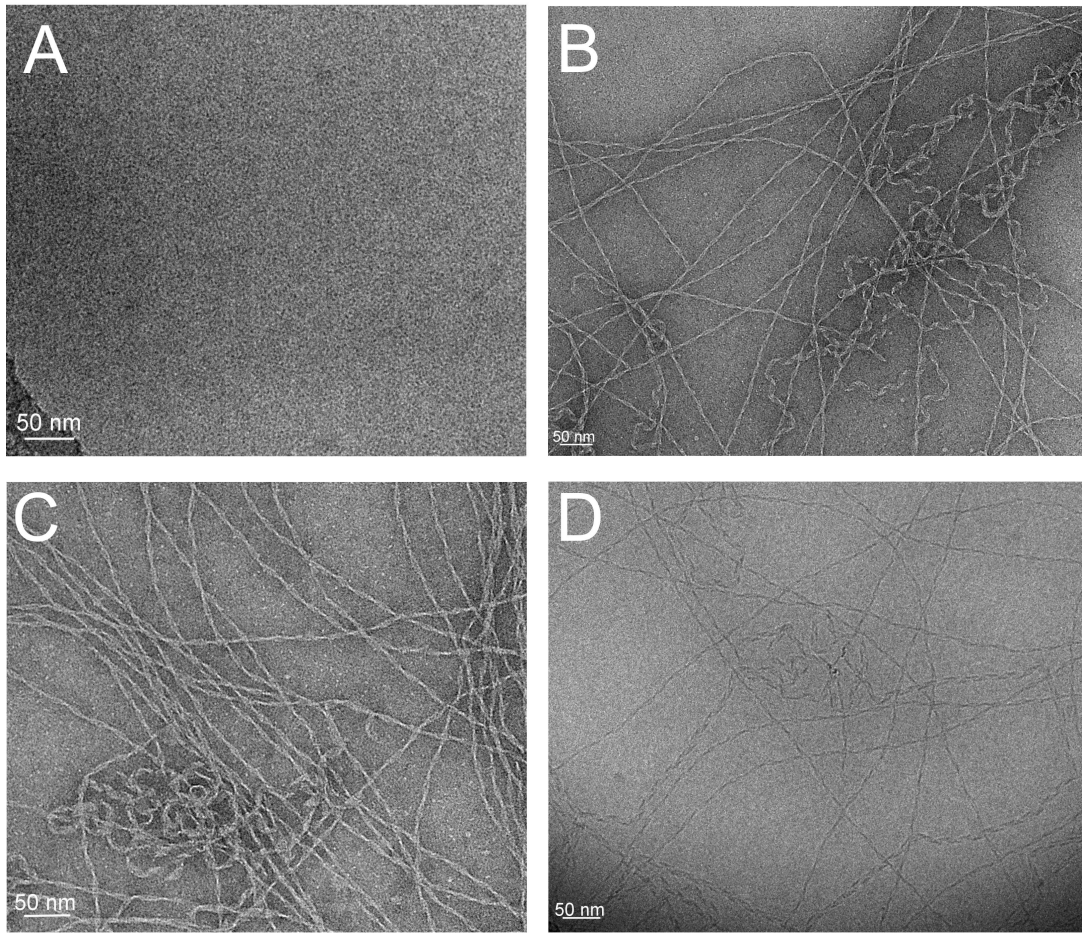


Abbildung 134: (A) Kryo-TEM-Aufnahme von Pseudopeptid 1 [500µM], (B) TEM-Aufnahme einer VW18/PP1 Mischung mit $r[VW18/PP1] = 2$ (C) TEM-Aufnahme einer VW18/PP1 Mischung mit $r[VW18/PP1] = 0,5$ (D) Kryo-TEM-Aufnahme der Mischung mit $r[VW18/PP1] = 0,5$ ((VW18 Peptidkonzentration 100 µM in 10 mM Phosphat-Puffer, 0,1% NaN₃, pH 7,4).

gegenüber der TEM-Aufnahme. Die Abbildung 134, C zeigt eine TEM-Aufnahme der Mischung $r[VW18/PP1] = 0,5$. Es ist eine höhere Menge an Partikeln deutlich erkennbar, was sich auf die höhere Konzentration von PP1 zurückführen lässt. Jedoch ist die Morphologie der amyloiden Fibrillen von VW18 in keiner Weise verändert. Die Abbildung 134, D zeigt eine Kryo-TEM-Aufnahme der Mischung $r[VW18/PP1] = 0,5$ Fibrillen von VW18 mit der TEM-Aufnahme vergleichbaren Morphologie. Damit stehen die elektronenmikroskopischen Studien im Einklang mit den Ergebnissen der Spektroskopie. Im Vergleich zu VW18 ohne PP1 scheint das Pseudopeptid lediglich die konformationelle Änderung zu verzögern, wobei die Mischung mit $r[VW18/PP1] = \frac{1}{3}$ die konformationelle Änderung später durchläuft als die Mischung mit $r[VW18/PP1] = 0,5$.

Die Anwendung von PP1 auf RR01 führte ebenfalls nicht zur Inhibition der amyloiden Aggregation. Wie die CD-Spektren und der ThT-Assay zeigen, ist PP1 nicht in der Lage, die Bildung von β -Faltblattstrukturen und amyloiden Aggregaten zu verhindern. Die CD-

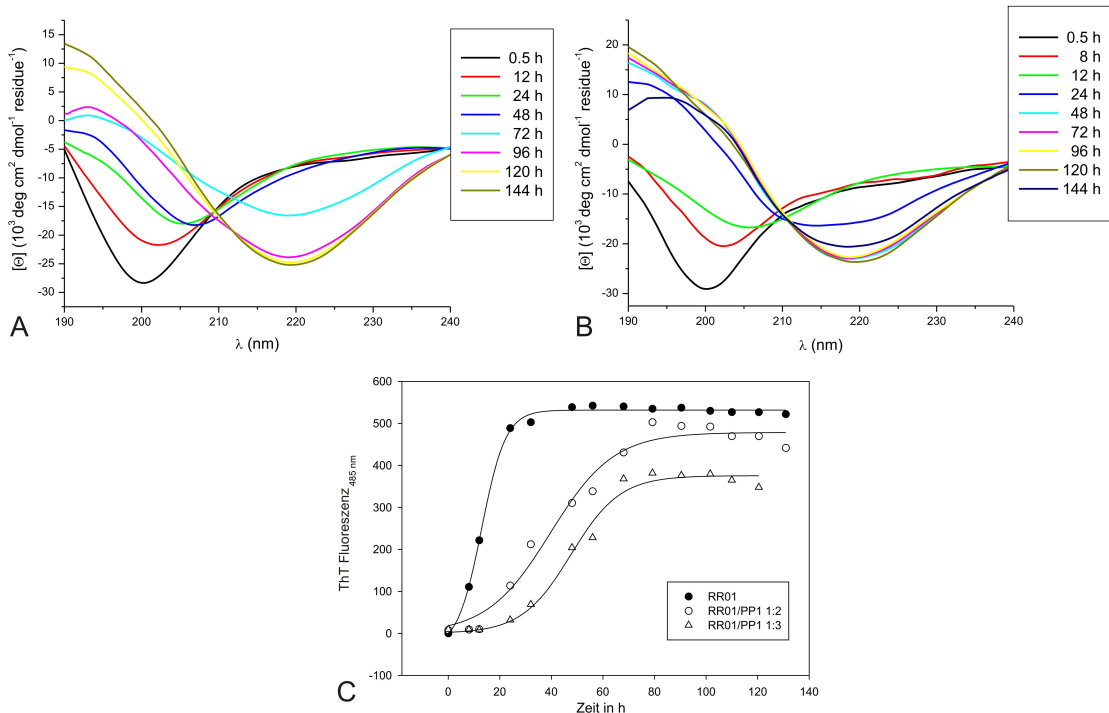


Abbildung 135: CD-Spektren von RR01 in Gegenwart von PP1 (A) $r[\text{RR01}/\text{PP1}] = \frac{1}{3}$ (B) $r[\text{RR01}/\text{PP1}] = 0,5$ (C) Kinetische Fibrillenbildung von RR01 im ThT-Assay in Abhängigkeit von verschiedenen Konzentrationen PP1 (RR01 Peptidkonzentration $100\mu\text{M}$, 10mM Phosphat-Puffer, $\text{pH } 7,4$, $0,1\%$ NaN_3).

Spektren mit $r[\text{RR01}/\text{PP1}] = \frac{1}{3}$ und $0,5$ zeigen eine konformationelle Änderung von ungefaltet mit einem Minimum bei ca. 200 nm zu β -Faltblattstrukturen mit einem charakteristischen Minimum bei 218 nm . Doch im Vergleich zu RR01 ohne PP1 verläuft diese konformationelle Änderung langsamer, denn das Minimum bei 218 nm wird in der Mischung mit $r[\text{RR01}/\text{PP1}] = \frac{1}{3}$ zwischen 48 und 72 h erreicht. Der Thioflavin T-Assay mit der Mischung $r[\text{RR01}/\text{PP1}] = \frac{1}{3}$ und $0,5$ im Vergleich zu RR01 ohne PP1 zeigt ebenfalls einen konzentrationsabhängigen verlangsamteten kinetischen Verlauf der Aggregation und geringere Reduktion der Fluoreszenzintensität. Jedoch führen selbst 3 eq. PP1 nicht zu einer überzeugenden Inhibition der Aggregation.

11.7 Einführung des amyloidogenen Modellpeptids VW18 in eine zelluläre Umgebung

Synthetische Peptide ermöglichen das rationale Design von effizienten Inhibitoren und eröffnen Wege molekulare Wechselwirkungen zu beeinflussen. Jedoch besitzen Peptide im Allgemeinen nur eine geringe Fähigkeit die Zellmembran zu überwinden und in eine Zelle einzudringen. Darüber hinaus zeigen sie eine geringe metabolische Stabilität gegenüber Proteasen. Die Kombination aus einer peptidbasierten Komponente mit einem Polymer kann

helfen diese Nachteile zu überwinden, wie es bereits in vergangenen Studien gezeigt werden konnte.^[585, 586]

In einer Kooperation mit M.Sc. Katharina Koschek (FMP) aus der Arbeitsgruppe von Prof. Jörg Rademann (FMP, Universität Leipzig) wurden diese Prinzipien auf die Inhibition der amyloiden Aggregation innerhalb einer zellulären Umgebung angewandt. Dazu wurde das System aus dem amyloidogenen Peptid VW18 und dem helikalen Inhibitor VW01 gewählt. Beide Peptide sollen in eine zelluläre Umgebung eingeführt werden, um sowohl die Auswirkung der amyloiden Aggregation des Modellpeptids VW18 als auch die Inhibition der Aggregation durch VW01 innerhalb einer zellulären Umgebung zu untersuchen. Das Modellpeptid VW18 aggregiert bei physiologischem pH-Wert und die Aggregation lässt sich in der Mischung mit VW01 gut inhibieren (siehe *Kapitel 11.1 Mischungssystem VW18 und VW01*). Das von M. Sc. Katharina Koschek entwickelte Konzept zur Einführung amyloidogener Modellpeptide in eine zelluläre Umgebung ist in Abbildung 136 dargestellt. Das Modellpeptid VW18 muss dazu chemisch modifiziert werden. Anstatt der UV-aktiven chromophoren Gruppe Abz wurde N-terminal die fluoreszenzaktive Verbindung [5-(und-6)-Carboxytetramethylrhodamin] über einen Aminohexyl-Linker kovalent an VW18 gebunden. Dies ermöglicht die Beobachtung des Peptids innerhalb der zellulären Umgebung mit Hilfe der *Life-Time*-Mikroskopie. Die Aufnahme der Peptide in die Zellen wird durch die Konjugation mit einem Polymer gewährleistet. Dieses Polymer ist über ein lichtsensitives Cumarin-Derivat an das Modellpeptid kovalent gebunden (Abbildung 137). Das gebundene Polymer soll zum einen die Aggregation von VW18 verhindern und außerdem die Aufnahme

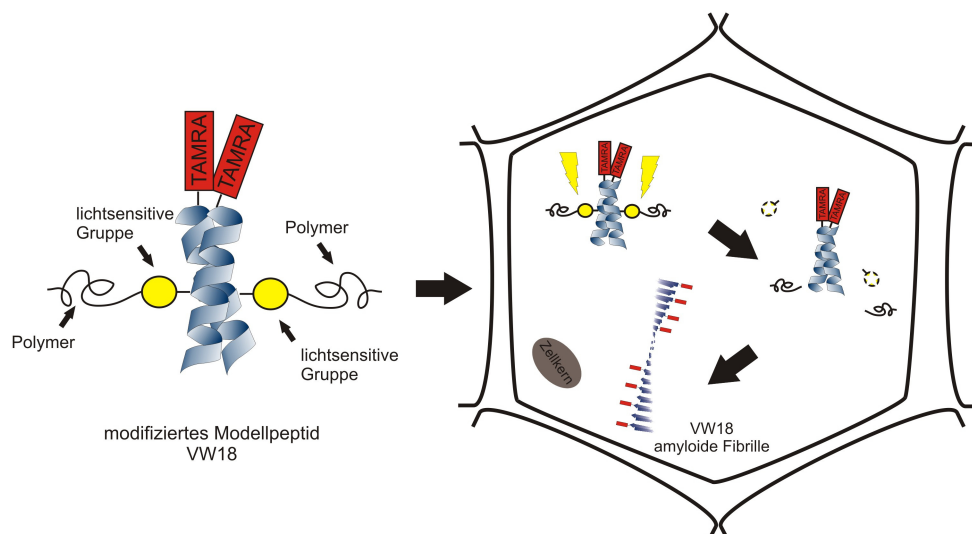


Abbildung 136: Schematische Darstellung des Konzepts der Einführung amyloidogener Modellpeptide in eine zelluläre Umgebung.

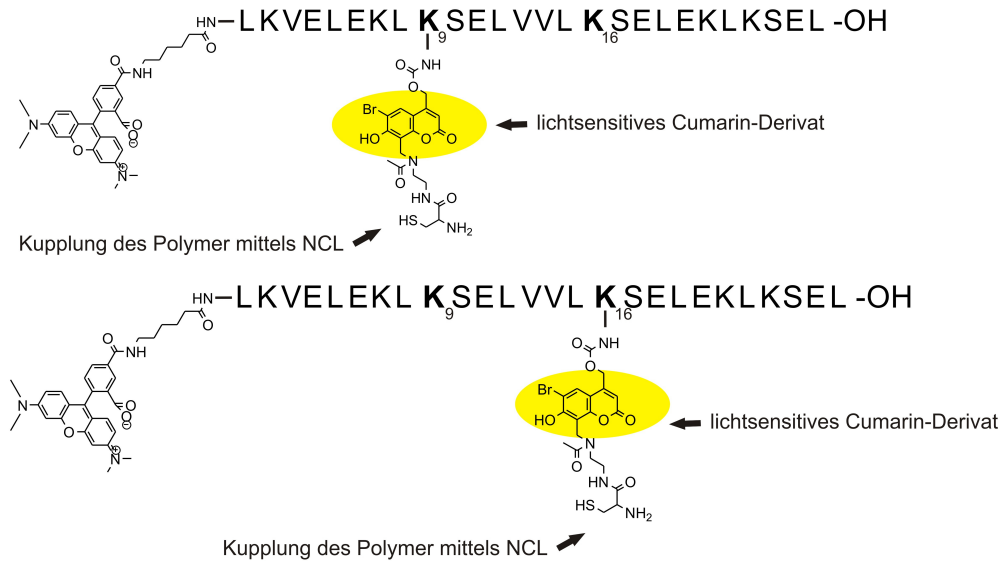
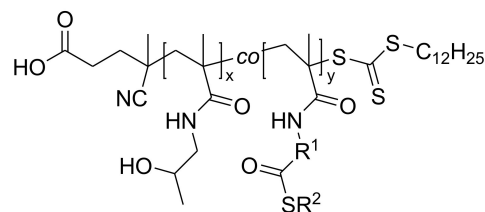


Abbildung 137: Variationen des Modellpeptids VW18 mit cysteinyliertem Coumarin-Derivat in der Seitenkette von Lysin an der Position 9 oder 16.

durch die Zellen vermitteln. Innerhalb der Zellen kann durch die Einwirkung von Licht und der daraus folgenden Zerstörung des Coumarin-Derivats das Peptid vom Polymer getrennt werden, wodurch die Aggregation von VW18 innerhalb der Zelle ausgelöst werden soll.

Das Peptid VW18 wurde zunächst mit Hilfe der Festphasen-Synthese synthetisiert. Für die Aminosäuren Lysin an Position 9 bzw. 16 wurde Mtt-geschütztes Lysin verwendet. Diese Schutzgruppe lässt sich unter leicht sauren Bedingungen selektiv abspalten, so dass das von



HPMA-Thioester-Copolymer

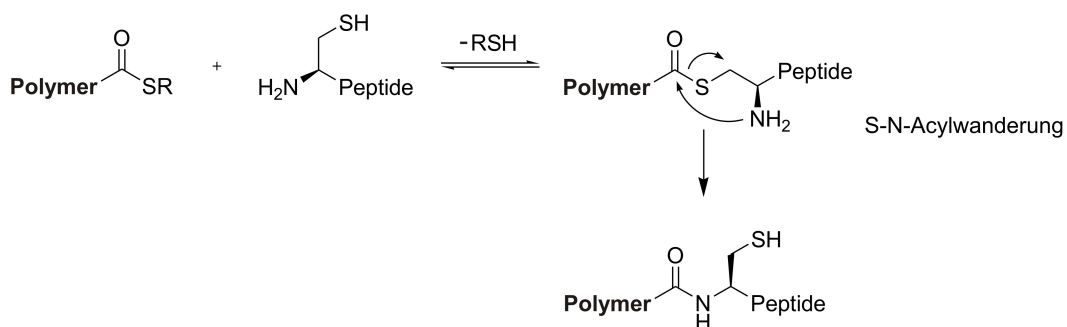


Abbildung 138: Kupplung des Polymers an TAMRA-VW18-BHC-Cys durch native chemische Ligation (Lit.^[587]).

M.Sc. Katharina Koschek synthetisierte Cumarin-Derivat mit der Cysteinfunktion zu den in Abbildung 137 gezeigten Produkten an VW18-TAMRA gekoppelt werden konnte. Diese Positionen wurden ausgewählt, da sie wahrscheinlich in der Nähe bzw. Teil des amyloiden Kerns sind, so dass eine Modifizierung an dieser Stelle sehr wahrscheinlich die Aggregation von VW18 verhindert. Anschließend wurde das modifizierte VW18 vollständig von der festen Phase abgespalten und mit Hilfe der nativen chemischen Ligation von M.Sc. Katharina Koschek an das Polymer gekoppelt (Abbildung 138).

Zunächst wurde mit Hilfe von *in vitro* Experimenten gezeigt, dass das Peptid VW18 mit der über einen Aminohexyl-Linker gekoppelten fluoreszenzaktiven Verbindung TAMRA im Vergleich zu VW18 mit UV-aktiven Abz-Gruppe am N-Terminus immer noch amyloide Aggregate bildet. Die CD Spektren zeigen einen konformationellen Wechsel von einer α -helikalen Struktur, angezeigt durch zwei charakteristische Minima bei 208 und 222 nm, hin zu einer β -Faltblattstruktur mit einem charakteristischen Minimum bei 218 nm innerhalb von 12 Stunden. Dies steht im Einklang mit den CD Spektren von VW18 mit UV-aktiven Abz-Gruppe (siehe 10.3 *Coiled Coil*-basiertes Modellpeptid VW18). In der TEM-Aufnahme nach 24 Stunden Inkubationszeit lassen sich Aggregate nachweisen, deren Morphologie sich jedoch von VW18 mit der UV-aktiven Gruppe Abz unterscheidet (siehe 10.3 *Coiled Coil*-basiertes Modellpeptid VW18).

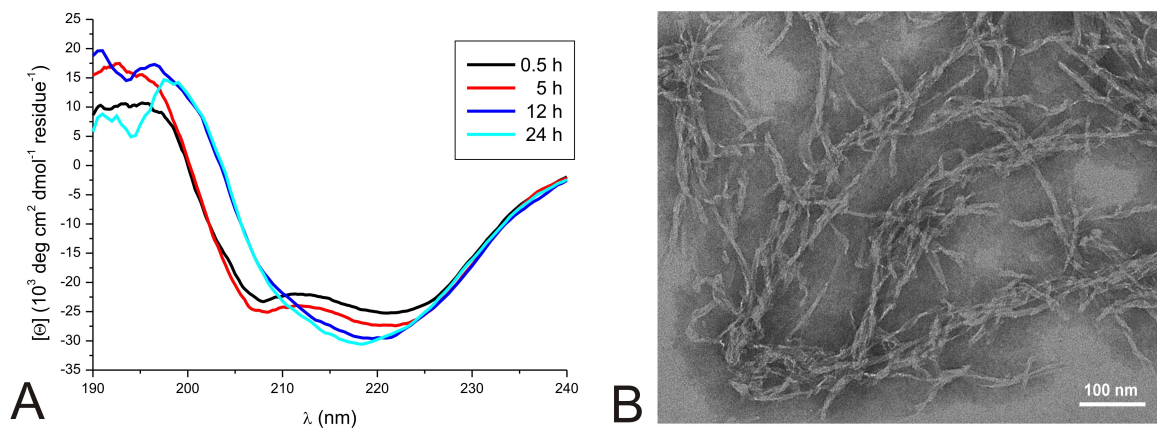


Abbildung 139: (A) CD Spektren TAMRA-VW18 zu unterschiedlichen Inkubationszeiten (B) TEM-Aufnahme TAMRA-VW18 in aggregiertem Zustand nach 24 h (TAMRA-VW18 Peptidkonzentration $100\mu\text{M}$, 10mM Phosphat-Puffer, pH 7,4, $0,1\%$ NaN_3)

Der Nachweis von amyloiden Aggregaten mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie und dem Fluoreszenzfarbstoff Thioflavin T ist nicht gelungen. Die Anregung bei 450 nm führt hier nicht zu einem charakteristischen Emissionsmaximum bei 485 nm wie beim ursprünglichen VW18 (Abbildung 140). Die Anregung bei 546 nm führt dagegen zu einer für TAMRA

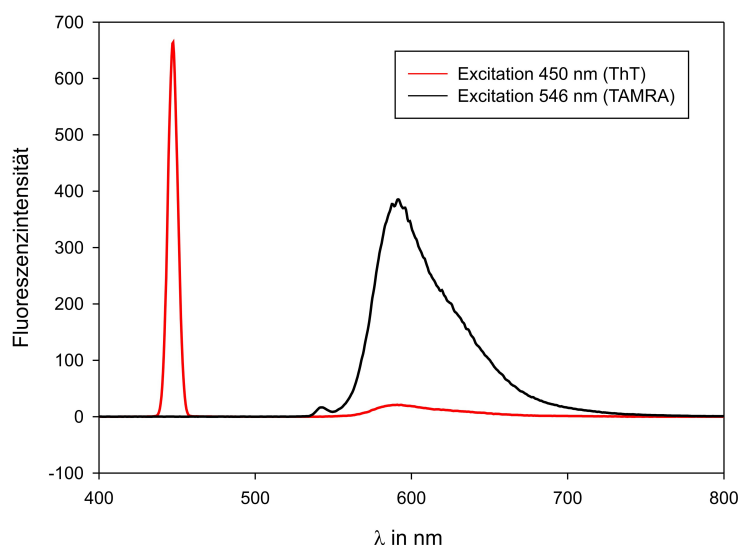


Abbildung 140: Fluoreszenzspektrale von TAMRA-VW18 jeweils für die Anregung bei 450 nm, die Wellenlänge für die Anregung von Thioflavin T, und für die Anregung bei 546 nm, die Wellenlänge für die Anregung von TAMRA (TAMRA-VW18 Peptidkonzentration 100 μ M, 10mM Phosphat-Puffer, pH 7,4, 0,1% NaN₃, 20 μ M ThT)

charakteristischen Emission um 600 nm. Die Anregung bei 450 nm (ThT) führte in diesem Bereich ebenfalls zu einem kleinen Maximum um 600 nm, so dass man schlussfolgern kann, dass durch die Anregung bei 450 nm die TAMRA-Gruppe angeregt wird und nicht das Thioflavin T (Abbildung 140).

Des Weiteren wurde CD-Spektroskopie mit TAMRA-VW18(K9)-BHC mit dem an der Lysinposition gebundenen Cumarin-Derivat durchgeführt. Dazu wurde eine Stammlösung von TAMRA-VW18(K9)-BHC in Phosphat-Puffer geteilt und einmal im unbelichteten Zustand und nach einer Belichtungszeit von 30 min bei 312 nm mit Hilfe der CD-Spektroskopie untersucht (Abbildung 141). CD Spektren von TAMRA-VW18(K9)-BHC im unbelichteten Zustand zeigt eine α -helikale Konformation mit zwei charakteristischen Minima bei 208 und 222 nm. Es ist durchaus bemerkenswert, dass trotz der Modifikation das Konjugat TAMRA-VW18-BHC wie das ursprüngliche VW18 eine α -helikale Konformation annimmt. Ein konformationeller Wechsel von einer helikalen Struktur zu einer β -Faltblattstruktur, wie es für das unmodifizierte VW18 der Fall ist konnte nicht nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu zeigte das durch die Belichtung von TAMRA-VW18(K9)-BHC zu TAMRA-VW18 veränderte Peptid eine konformationelle Änderung von der α -helikale Konformation mit zwei charakteristischen Minima bei 208 und 222 nm nach 48 Stunden zu einem Spektrum mit einem Minimum bei ca. 224 nm, was auf eine β -Faltblattstruktur deutet, wobei das Minimum im CD Spektrum von der charakteristischen Wellenlänge bei 218 nm in Richtung höherer Wellenlänge verschoben ist. Dies kann möglicherweise auf die

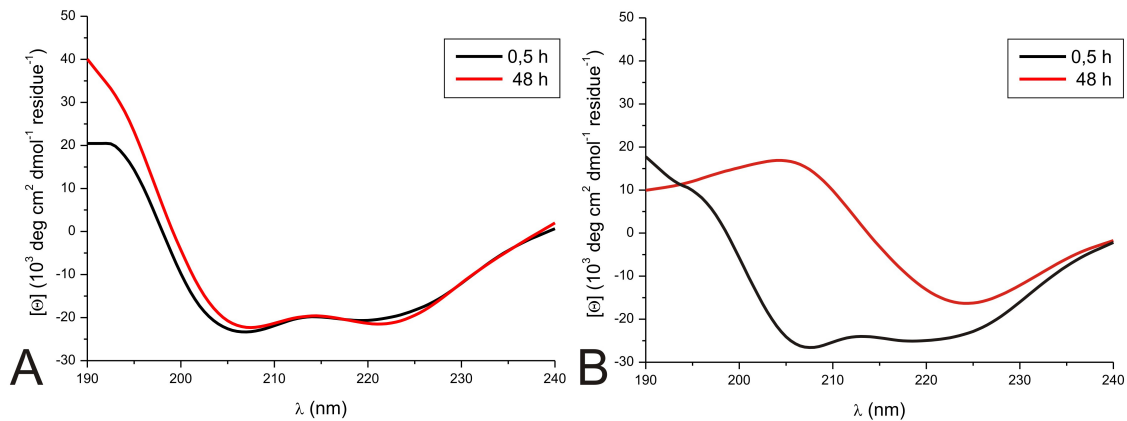


Abbildung 141: CD Spektren nach 0.5 und 48 h von TAMRA-VW18(K9)-BHC (A) ohne Belichtung (B) nach 30 min Belichtung bei 312 nm zur Loslösung des Polymers (TAMRA-VW18-BHC Peptidkonzentration 50 μ M, 10mM Phosphat-Puffer, pH 7,4, 0,1% NaN₃).

Anwesenheit des Polymers und der restlichen Komponenten zurückgeführt werden. Elektronenmikroskopische Studien mit dem gleichen experimentellen Ansatz stehen noch aus. Mit diesen ersten Experimenten konnte die Durchführbarkeit des Konzepts der kontrollierten Aggregation bestätigt werden. Erste kinetische Untersuchungen zur Aufnahme von VW18(K9)-BHC-Cys-Polymer in SH-SY5Y Zellen (Neuroblastom) wurden mit Hilfe der Screening Unit am FMP von M. Sc. Katharina Koschek durchgeführt und konnten zunächst einmal zeigen, dass VW18(K9)-BHC-Cys-Polymer in die Zellen aufgenommen wird. Weitere Studien werden in Zusammenarbeit mit der Mikroskopie-Abteilung des Max-Delbrück-Zentrums durchgeführt. Ziel ist es zunächst mit Hilfe der *Life-Time*-Mikroskopie die Auswirkung der amyloiden Aggregation des Modellpeptids VW18 auf die Zelle zu untersuchen, d.h. z.B. den Zusammenhang zwischen Toxizität und Aggregation. Im darauf folgenden Schritt soll das Zweipeptid-System bestehend aus VW18 und VW01 in die Zelle eingeführt werden, um Fragestellung der Inhibition der amyloiden Aggregation durch ein helikales Peptid innerhalb einer zellulären Umgebung zu untersuchen. Dazu gehören z.B. kinetische Untersuchungen zur Aufnahme durch die Zelle, zur metabolischen Stabilität und zur inhibitorischen Wirkung innerhalb der Zelle.

12 Diskussion

12.1 Diskussion der Inhibition durch Stabilisierung der α -helikalen Konformation

Bei einigen amyloidogenen Proteinen und Peptide spielen helikale Intermediate eine entscheidende Rolle in der Aggregation zu amyloiden Fibrillen. Man nimmt an, dass die Helix-vermittelte Assoziation zu einer hohen lokalen Konzentration die amyloidogenen Kernsequenzen führt, was die Bildung von β -Faltblatt-reichen amyloiden Fibrillen ermöglicht und beschleunigt (5.1 Die Bedeutung α -helikaler Intermediate). Darüber hinaus zeigen einige natürliche amyloidogene Proteine und Peptide bereits in ihrer nativen Struktur α -helikale Konformation. Der entscheidende Schritt zur Bildung amyloider Aggregate ist daher die konformationelle Änderung von der α -Helix zur β -Faltblattstruktur. Der wesentliche Unterschied zwischen beiden Konformationen besteht darin, dass α -helikale Struktur durch intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen und β -Faltblattstrukturen durch intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen gekennzeichnet sind.^[588] Hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen sind sowohl in α -helikalen als auch β -Faltblattstrukturen zu finden.^[588] Die konformationelle Änderung von einem α -helikalen *Coiled Coil*-Trimer zu einem β -Faltblatt-Trimer wurde erst kürzlich mit Hilfe von MD-Simulationen untersucht, wobei zwei verschiedene Prozesswege identifiziert werden konnten: (I) Eine interne Änderung der Konformation von α -Helix zur β -Faltblattstruktur und (II) ein Prozessweg, der die Dissoziation zu Monomeren und darauf folgend zur strukturellen Änderung und Assemblierung in ein β -Faltblatt-Trimer führt.^[544] Eine ebenfalls auf MD-Simulationen basierende Studie von Ito *et al.* zur konformationellen Änderung der zentralen Region des A β (13–26)-Peptids, für die eine α/β -Diskordanz gezeigt worden ist, schlägt für die konformationelle Änderung einen Mechanismus aus drei Schritten vor.^[164] Zunächst müssen ausreichend intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen gelöst werden, gefolgt von starken hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den unpolaren Seitenketten, gefolgt von elektrostatischen Wechselwirkungen. Wird einer dieser Schritte nicht durchlaufen, führt dies zur Inhibition der amyloiden Aggregation. Beide Studien stehen im Einklang mit den im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnissen und können einen Einblick in den Inhibitionsmechanismus geben. Voraussetzung für die Inhibition ist die Bildung stabiler α -helikaler Strukturen durch geeignete Liganden, die in der Lage sind, die helikalen Elemente in der Primärstruktur anzusprechen und zu stabilisieren. Dieses Inhibitionsprinzip wurde anhand von Modellpeptiden im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

Man muss zunächst davon ausgehen, dass die α -helikalen Peptide in Lösung kein einfaches Gleichgewicht aus den zwei Zuständen α -Helix und der ungeordneten Struktur bilden. Man muss vielmehr ein komplexeres Gleichgewicht aus vollständiger α -helikaler Struktur und vollständig ungeordneter Struktur sowie Helices unterschiedlicher Länge annehmen, wobei die Wahrscheinlichkeit einer α -helikalen Struktur im Zentrum größer ist und die Enden meist eher ungeordnet, förmlich ausgefranst sind.^[589]

Nach den Grundlagen der Bildung von Amyloiden und der Eingangs der Diskussion beschriebenen Sachverhalte muss man davon ausgehen, dass, bevor die Bildung von amyloiden Aggregaten beginnt, zunächst eine partielle oder vollständige Entfaltung der Peptidsequenz vorliegen muss. Im Fall von VW19 und RR01 liegen die amyloidogenen Peptide bereits ungefaltet vor. Im Fall VW18 zeigten die Untersuchungen an einer frisch gelösten Probe das Vorhandensein eines *Coiled Coil*-Dimers, wobei die Helizität im Vergleich zum Modellpeptid VW01 kleiner ist.

CD- und Thioflavin T-Fluoreszenz sowie elektronenmikroskopische Studien zeigten deutlich die Inhibition der Aggregation des Modellpeptids VW18 in Gegenwart des stabil α -helikalen Modellpeptids VW01. Es konnte eine Konzentrationsabhängigkeit gezeigt werden, wobei für die Mischung $r[\text{VW18}/\text{VW01}] = 1$ und $r[\text{VW18}/\text{VW01}] = 2$ eine nahezu vollständige Inhibition festgestellt wurde. Obwohl die Thioflavin T-Fluoreszenz-Methode weit verbreitet ist und sehr häufig angewendet wird, muss sie nicht unbedingt immer verlässliche quantitative Aussagen zum Ausmaß der Fibrillen ergeben. So kann die reduzierte ThT-Fluoreszenz auch einfach auf einen lokalen Austausch von ThT-Molekülen durch den Inhibitor an der Oberfläche der Fibrille zurückgehen.^[590, 591] Das Kontrollpeptid VW01-*ran*, das kein charakteristisches *Coiled Coil*-Design aufweist und lediglich eine zufällige Anordnung der Aminosäurereste von VW01 repräsentiert, führte zu keiner deutlichen Reduzierung der ThT-Fluoreszenz. Dies schließt einen Austauscheffekt aus und darüber hinaus wird deutlich, dass der inhibitorische Effekt eindeutig auf die kooperative Faltung auf Basis der *Coiled Coil*-Erkennungsdomänen zurückzuführen ist. Die ausführlichen Studien zum Oligomerisierungsgrad der Aggregate und die Ergebnisse der Inhibitionsstudien zeigen für die Mischung $r[\text{VW18}/\text{VW01}] = 2$ trimere *Coiled Coil*-Komplexe unter vollständiger Inhibition der amyloiden Aggregation, woraus sich schließen lässt, dass lediglich ein Molekül VW01 notwendig ist, um zwei amyloidogene Moleküle VW18 in einem α -helikalen Komplex dauerhaft zu stabilisieren. Die Bildung eines heteromeren *Coiled Coil*-Komplexes beruht auf komplementärer Wechselwirkung zwischen der hydrophoben (Positionen *a* und *d*) und geladenen Domäne (Positionen *e* und *g*). Elektrostatische Wechselwirkungen zwischen

wie es zum Beispiel für die Inhibitoren der Aggregation des Transthyretin-Proteins beschrieben worden ist.

Die Experimente zur Deaggregation von bereits gebildeten amyloiden Aggregaten zeigen zunächst einmal die prinzipielle Möglichkeit der Deaggregation durch die Zugabe des helikalen Inhibitors. Dieser Effekt lässt sich auf einem Gleichgewicht zwischen dem amyloidogenen Monomer und den amyloiden Fibrillen zurückführen, wobei das Gleichgewicht deutlich auf Seite der thermodynamisch sehr stabilen amyloiden Fibrillen liegt. Der Prozess der amyloiden Aggregation ist damit reversibel. Im Vergleich zu den Experimenten, bei denen der Inhibitor VW01 von Beginn an präsent ist, ist für die Deaggregation von amyloiden Fibrillen jedoch ein Vielfaches des Inhibitors nötig, um einen Effekt zu erzielen. Dieser Umstand kann auf die hohe Stabilität amyloider Aggregate zurückgeführt werden.

Die Studien zur Proteasestabilität der einzelnen Peptidkomplexe zeigen deutliche Unterschiede in Abhängigkeit von der Struktur. Das amyloidogene Modellpeptid VW18 im amyloiden Zustand zeigt die größte Stabilität und VW18 im löslichen Zustand zeigte die geringste Stabilität gegen den proteolytischen Abbau, was den Ergebnissen über Proteasestabilität natürlicher amyloidogener Proteine und Peptide entspricht.^[592] Darüber hinaus zeigt sich der α -helikale *Coiled Coil*-Komplex mit dem Inhibitor VW01 im Vergleich zum amyloiden Zustand von VW18 deutlich weniger stabil gegenüber der Protease Trypsin. Verschiedene Faktoren können die Proteasestabilität von Peptiden beeinflussen. Zunächst sind gefaltete Peptide stabiler als ungefaltete Peptide. Darüber hinaus kann die Geschwindigkeit der proteolytischen Degradation davon abhängig sein, ob der gefaltete Zustand in einem Gleichgewicht mit einer ungefalteten Spezies steht. Ein derartiges Gleichgewicht wurde sowohl für *Coiled Coil*-Systeme^[589, 593] als auch für Amyloide^[571, 572] berichtet. Für alle gefalteten Zustände kann man nach der *Helix-Coil*-Theorie davon ausgehen, dass das Gleichgewicht mehr auf der Seite des gefalteten Zustands liegt. Jedoch liegt eine kleine Fraktion im Gleichgewicht ungefaltet vor und ist gut für die proteolytische Degradation zugänglich. So können die Unterschiede zwischen VW18 im amyloiden Zustand und dem VW18/VW01 Komplex in der proteolytischen Abbaurate auch auf ein unterschiedliches Ausmaß einer mit dem gefalteten Zustand im Gleichgewicht befindlichen ungefalteten Spezies zurückzuführen sein, was ebenfalls auf die unterschiedliche thermodynamische Stabilität der gefalteten Zustände deutet.^[188] Die Rate der proteolytischen Degradation hängt ebenfalls von der Konformation des gefalteten Zustands ab. So konnten Computersimulationen zeigen, dass für eine Bindung am aktiven Zentrum eine lokale Entfaltung notwendig ist.^[594] In dieser Arbeit zeigte sich, dass die lokale Entfaltung im Fall

einer α -helikalen Konformation im Vergleich zu ausgedehnten β -Faltblattstrukturen deutlich einfacher durchlaufen wird. Im Vergleich zu β -Faltblattstrukturen müssen im Fall einer α -helikalen Konformation weniger Wasserstoffbrückenbindungen für eine lokale Entfaltung gelöst werden. Die verschiedenen Aspekte bestätigen die Ergebnisse und die darauf folgende Schlussfolgerung, dass der β -Faltblatt-reiche amyloide Zustand des Modellpeptids VW18 gegenüber des proteolytischen Abbaus deutlich stabiler ist als der helikale *Coiled Coil*-Komplex mit dem Inhibitor VW01.

Diese Ergebnisse zeigen auf, wie die Strategie der Inhibition durch die Adressierung der helikalen Elemente *in vivo* funktionieren könnte. Durch die Verhinderung der Bildung β -Faltblatt-reicher amyloider Fibrillen durch die Stabilisierung oder Überführung in einen α -helikalen Faltungszustand wird die amyloidogene Sequenz in der Zelle zugänglicher für Proteasen. Ein α -helikaler Inhibitor, der selbst durch entsprechende Modifikation gegenüber Proteasen stabil ist, könnte lediglich amyloidogene Sequenzen für Proteasen zugänglich machen, läge selbst jedoch immer wieder unverändert vor und könnte so den proteolytischen Abbau eines Überschusses an amyloidogenen Sequenzen gewährleisten.

Die Studien am System VW19/VW01 zeigen überraschenderweise einige deutliche Unterschiede. Es lässt sich auch im Mischungssystem VW19/VW01 die Inhibition der Bildung amyloider Fibrillen feststellen, jedoch werden keine löslichen α -helikalen *Coiled Coil*-Komplexe gebildet sondern lange α -helikale Fasern. Diese Ergebnisse eröffnen neben der Inhibition amyloider Aggregation neue Möglichkeiten des Designs von α -helikalen Fasern, die z.B. Anwendung in der Biotechnologie und des *tissue engineering* finden können.^[512, 513] Im Gegensatz zu den bereits bekannten Designkonzepten auf der Basis der Zusammenlagerung von α -helikalen *Coiled Coil*-Peptiden, wie z.B. *sticky end*-Design^[574] und *blunt end*-Design^[582], verwendet dieses heteromere System ein Peptid mit amyloidogenen Eigenschaften, VW19, und ein zweites Peptid, VW01, mit der Eigenschaft, stabile und lösliche α -helikale *Coiled Coil*-Trimere zu bilden. Die beschriebenen Ergebnisse deuten neben der Inhibition der Bildung amyloider Fibrillen auf die spontane Bildung von α -helikalen Fasern in Gegenwart des Peptids VW01 hin. Anscheinend gibt es zwei Aggregationswege, die um das ungefaltete, monomere VW19 konkurrieren (Abbildung 143). In der Abwesenheit von VW01 bildet VW19 amyloide Fibrillen. In Gegenwart von VW01 werden durch kooperative Faltung auf Basis der *Coiled Coil*-Erkennungsdomänen α -helikale heteromere Komplexe gebildet, die sich zu langen Fasern zusammenlagern. Die komplementäre Wechselwirkung der *Coiled Coil*-Erkennungsdomänen scheint wie im Mischungssystem VW18/VW01 stärker zu sein als die intermolekularen Wechselwirkungen,

die eine β -Faltblattbildung und die Aggregation zu amyloiden Fibrillen fördern. Vergleichbar zum Mischungssystem VW18/VW01 ist VW01 ebenfalls in der Lage, die *cross- β* -Struktur bereits gebildeter amyloider Fibrillen von VW19 aufzulösen und die amyloidogene Sequenz in stabile α -helikale Fasern zu überführen.

Diese Ergebnisse stehen in einem Gegensatz zu kürzlich veröffentlichten Studien über Peptidmischungssysteme, bei denen die Sequenz des hinzugefügten Peptids in Gegenwart eines amyloidogenen Peptids in die Struktur der amyloiden Fibrillen mit eingefügt worden ist.^[595, 596] Wie bereits beschrieben, (siehe Kapitel 2.3 *Molekulare Grundlagen und interne Struktur amyloider Fibrillen*) aggregieren amyloidogene Sequenzen aufgrund der Bildung eines Netzwerkes von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Peptidrückgraten. Diese Form der Wechselwirkung ist der wesentliche Grund für die allgemeine Struktur amyloider Fibrillen, die prinzipiell jeder Peptidsequenz ermöglicht, amyloide Fibrillen zu bilden. Vor diesem Hintergrund scheinen die Wechselwirkungen zwischen den Seitenketten lediglich die physikalischen Eigenschaften sowie die Morphologie zu beeinflussen. Zur *cross- β* -Struktur zusammengelagerte gestreckte β -Faltblattstrukturen scheinen thermodynamisch die stabilste Struktur zu sein, die ein Peptidrückgrat annehmen kann.^[188, 233] Aber wie die Studie zur Entfaltung der zentralen Helix des A β (1-40/42) zeigte, ist die Lösung von intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen der erste Schritt zur Bildung amyloider Aggregate. Erst im zweiten und dritten Schritt kommen intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Peptidrückgraten und hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Seitenketten zum Tragen. Im Unterschied zum System VW18/VW01 wird das monomere und ungefaltete amyloidogene VW19 erst durch die Anwesenheit von VW01 in eine stabile α -helikale Form überführt. Die starken intermolekularen Wechselwirkungen zwischen dem stabil helikalen Peptid VW01 und VW19 führen wieder vergleichbar zum System VW18/VW01 zu einem stabilen heteromeren *Coiled Coil*-Komplex, der die intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert. Zur Erklärung der Zusammenlagerung der *Coiled Coil*-Komplexe zu langen helikalen Fasern wird in der wissenschaftlichen Literatur oft von einer gegeneinander verschobenen Anordnung der Helices ausgegangen. Verschiedene wissenschaftliche Arbeiten zeigen die Bildung von Fasern auf der Basis von *Coiled Coil*-Peptiden, durch die das Design von Überhängen oder so genannten klebrigen Enden erreicht werden kann.^[574, 578] Aber auch die Länge der Peptide bzw. die Anzahl des charakteristischen Musters der sieben Aminosäuren einer *Coiled Coil*-Sequenz (*heptad repeats*) sind bedeutende Faktoren. So wurde berichtet, dass Peptide mit identischer sich wiederholender Sequenz aus sieben Aminosäuren ohne spezifisches Design sich gegeneinander verschieben und lange Fasern bilden, wenn die Länge

der Primärsequenz nicht einem Vielfachen von Sieben entspricht.^[523, 578] Die Primärsequenz der *Coiled Coil*-basierten Modellpeptide besteht aus 26 Aminosäuren. Mit der zusätzlichen Abz-Gruppe am N-Terminus entspricht dies der Regel. Darüber hinaus können weitere Eigenschaften des Designs die Bildung von helikalen Fasern fördern. Bei der Betrachtung des Mischungssystems VW19/VW01 muss zunächst festgestellt werden, dass die negative Ladung an den Glutamatresten aufgrund der Protonierung bei pH 4 ($pK_{\gamma(\text{COOH})} \approx 4.3$) nahezu vollständig eliminiert ist, während die Lysinseitenketten ($pK_{(\epsilon\text{-NH}_3^+)} \approx 10.5$) ebenfalls protoniert sind, jedoch eine positive Ladung tragen. Auf der Basis der erzielten Ergebnisse wurde eine Modellvorstellung entwickelt und in Abbildung 143 dargestellt. Der heteromere *Coiled Coil*-Komplex wird hauptsächlich durch den hydrophoben Kern durch die Wechselwirkungen der Leucinseitenketten in Position *a* und *d* stabilisiert. Es ist davon auszugehen, dass die Helices VW19 und VW01 antiparallel angeordnet sind, so dass elektrostatische Abstoßung zwischen gleich geladenen Lysinseitenketten vermieden wird. Die nahezu vollständig eliminierte Ladung in Position *e* für VW01 und Position *g* für VW19 könnte möglicherweise Teil einer erweiterten hydrophoben Oberfläche sein, was als ein wesentlicher Faktor für die Bildung von α -helikalen Fasern diskutiert wird.^[578, 597] Die

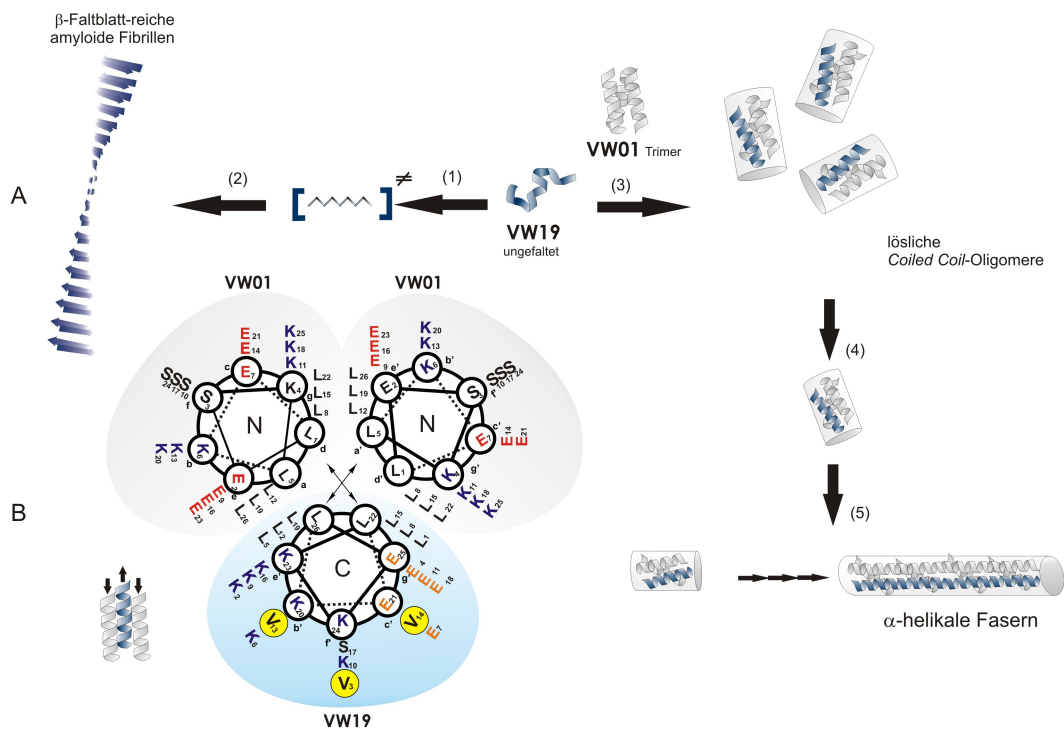


Abbildung 143: Schematische Darstellung der verschiedenen Prozesswege der Zusammenlagerung, die zum einen im Fall von VW19 zur Bildung von amyloiden Aggregaten führt (Schritt 1 und 2) und zum anderen zur Bildung von heteromeren helikalen Fasern in der Mischung von VW19 und VW01 (Schritte 3,4 und 5). (1) von der Peptidkonzentration abhängige Nukleation (2) Bildungen von β -Faltblatt-reichen amyloiden Fibrillen. (3) Bildung von heteromeren Coiled Coil-Komplexen (4) von der Peptidkonzentration abhängige Nukleation. (5) Polymerisierung in lange helikale Fasern.

Auswahl der Aminosäuren in *b*, *c* und *f*-Position ist ein wesentlicher Faktor zur Beeinflussung der Länge und des Durchmessers α -helikaler Fasern, da die laterale Assoziation im Allgemeinen ein Folge vielfacher, nicht-kovalenter Wechselwirkungen zwischen den Aminosäuren dieser Positionen ist.^[582, 598] So konnte bereits gezeigt werden, dass elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den Aminosäuren in *b* und *c* Position zu einer spezifischen Anordnung der Helices und zu lateraler Assoziation führen. Schwache hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Aminosäuren in *b* und *c* Position führen nach diesen Studien zu kleinen, flexiblen und dünnen Fasern.^[583]

Im Fall des Mischungssystems VW19/VW01 sind lösungsexponierte Positionen mit positiv geladenen Lysinresten und hydrophilen Serinresten besetzt, während die Glutamatseitenketten nahezu vollständig protoniert sind. Diese Zusammensetzung erlaubt keine elektrostatische Anziehung und ebenfalls keine hydrophobe Wechselwirkung zwischen den einzelnen Fasern, was mit der Beobachtung der nicht vorhandenen Bündelung der Fasern übereinstimmt.

Die Inhibitionsstudien an dem amyloidogenen Modellpeptid RR01 mit Hilfe des α -helikalen Peptids VW01 führten unter den untersuchten Bedingungen nicht zur vollständigen Inhibition. Mit spektroskopischen Methoden ist deutlich ein Effekt auf die Konformation sowie auf die Kinetik der Fibrillenbildung zu erkennen. Die elektronenmikroskopischen Studien zeigen aber selbst in Gegenwart von 3 äq. VW01 amyloide Fibrillen. Man muss hier zu dem Schluss kommen, dass im Fall des Modellpeptids RR01 das Inhibitorpeptid VW01 nur einen Effekt auf die Kinetik hat, jedoch nicht in der Lage ist, RR01 in stabile α -helikale Aggregate zu überführen. Obwohl im Unterschied zum ebenfalls ungefalteten VW19 bei pH 4.0 nun im Fall von RR01 bei 7.4 nicht nur hydrophobe Wechselwirkungen der ersten Erkennungsdomäne für die Bildung von *Coiled Coil*-Komplexen zur Verfügung stehen, sondern auch elektrostatische Wechselwirkungen der zweiten Erkennungsdomäne zwischen den positiv geladenen

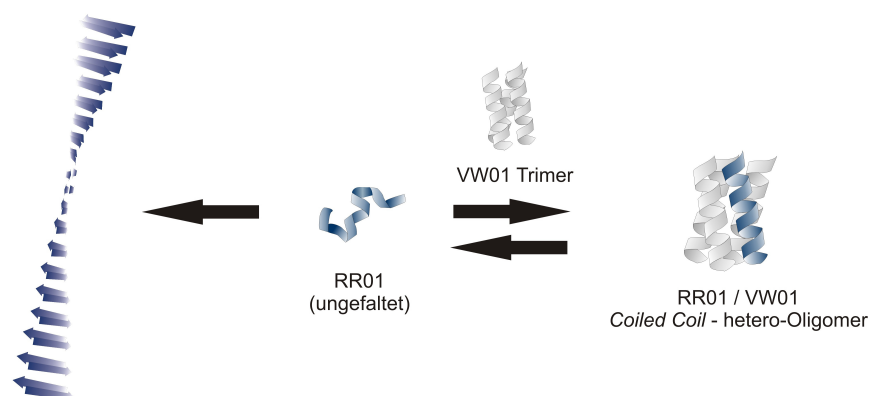


Abbildung 144: Schematische Darstellung der Interaktion von VW01 mit dem amyloidogenen Modellpeptid RR01.

Lysinseitenketten und negativ geladenen Glutamatseitenketten möglich sind, führt die Gegenwart von VW01 nicht zur vollständigen Inhibition der Fibrillenbildung.

Der Vergleich der gesamten Ergebnisse der Studien an den *Coiled Coil*-basierten Modellpeptiden ermöglicht eine Erklärung der beschriebenen Effekte. Der Inhibitor VW01 bietet den amyloidogenen Modellpeptiden VW18, VW19 und RR01 ein stabiles helikales Templat an. Aufgrund kooperativer Faltung basierend auf der Bildung eines hydrophoben Kerns, wodurch die hydrophoben Seitenketten vor der wässrigen Umgebung verborgen werden, und im Fall von VW18 basierend auf zusätzlichen elektrostatischen Wechselwirkung führt dies zur Bildung von stabilen helikalen *Coiled Coil*-Komplexen. Im Fall von VW18 und VW19 führt dies zur Bildung stabiler helikaler Strukturen, in denen intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert werden. Im Fall von RR01 werden zwar *Coiled Coil*-Komplexe gebildet, die jedoch durch die Anwesenheit von VW01 nicht stabilisiert werden können, obwohl es im Vergleich zu VW18 und VW19 keinen Unterschied bezüglich der Ausbildung des hydrophoben Kerns oder der zusätzlichen Stabilisierung durch elektrostatische Wechselwirkung gibt. Die untersuchten *Coiled Coil*-basierten amyloidogenen Modellpeptide VW18, VW19 und RR01 unterscheiden sich jedoch in ihrer Helizität, was sich mit Hilfe der CD-Messung darstellen lässt (Abbildung 145). Der Unterschied in der Helizität der einzelnen Modellpeptide beeinflusst ebenfalls das vereinfachte Gleichgewicht zwischen dem α -helikalen Zustand und dem ungefalteten Zustand, so dass bei geringer Helizität von einem hohen Anteil an ungefalteter Spezies ausgegangen werden kann. Das Modellpeptid VW01 weist die höchste Helizität auf. Die Tatsache, dass VW01 Trimere bildet, deutet darauf hin, dass dieser Oligomerisierungszustand für *Coiled Coil*-Peptide von gleicher Länge und identischer erster und zweiter Erkennungsdomäne die stabilste Form der Assoziation darstellt.

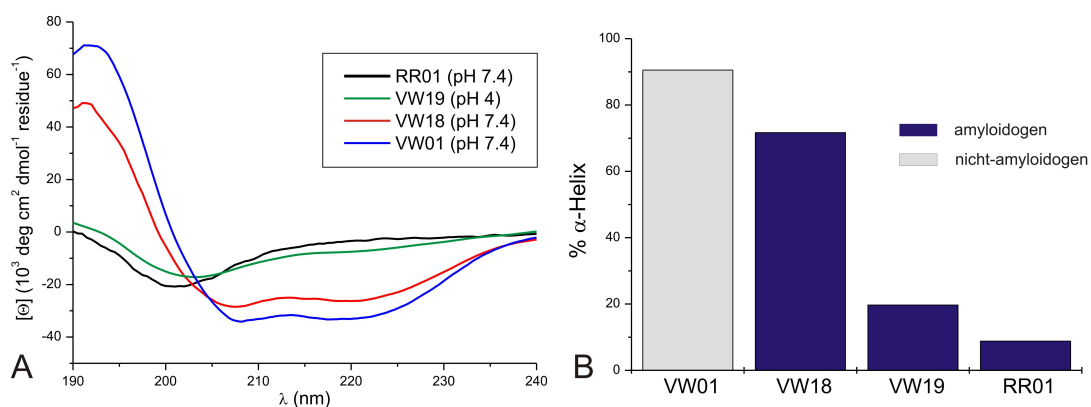


Abbildung 145: Vergleich der Helizität (A) CD-Spektren der Ausgangsstruktur nach einer Inkubationszeit von 0,5 h und (B) Berechnung der Helizität der Ausgangsstruktur auf Basis der CD-Daten nach Lit.^[599].

Das Modellpeptid VW18 zeigt mit ca. 70% ebenfalls eine hohe Helizität. Die Ergebnisse zum Oligomerisierungsgrad deuten jedoch im Unterschied zu VW01 auf die Bildung von Dimeren. Die reduzierte Helizität und der veränderte Oligomerisierungszustand lassen sich auf die Einführung der Valinreste in *b*, *c* und *f* Position zurückführen (siehe auch Vergleich ProCoil, Abbildung 145, B). Zur vollständigen Inhibition der amyloiden Aggregation ist ein Trimer bestehend aus einem VW01 Molekül und zwei amyloidogene VW18 Molekülen notwendig.

Die CD-Spektren des Ausgangszustandes von VW19 bei einem pH von 4,0 und einer Peptidkonzentration von 50 bis 150 μM zeigen eine hauptsächlich ungefaltete Struktur und entsprechend eine geringe Helizität von ca. 20%. Im Vergleich zu VW01 besitzt VW19 ebenfalls eine vergleichbare erste und zweite Erkennungsdomäne. Die ungefaltete Struktur ist neben der Einführung der Valinreste auf die per Design beabsichtigte Anordnung von gleich geladenen Aminosäuren in *b*, *c*, und *f* zurückzuführen. Bei pH 4.0 ergibt sich eine gleich positiv geladene Domäne, die aufgrund der elektrostatischen Abstoßung die Ausbildung einer α -helikalen Struktur verhindert. Zur vollständigen Inhibition der amyloiden Aggregation ist ebenfalls ein Trimer, aber aus zwei VW01 Moleküle und einem amyloidogen VW19 Molekül notwendig. Der Unterschied in der Stöchiometrie zum Mischungssystem VW18/VW01 lässt sich einerseits durch die höhere Helizität von VW18 und die reduzierten elektrostatischen Wechselwirkungen im Fall des Mischungssystems VW19/VW01 bei azidem pH Wert, der zur teilweisen Protonierung der Glutamatreste führt, erklären. Im Vergleich zum ungefalteten VW19 bei pH 4,0 ist VW18 bei einem pH von 7,4 durch kooperative Faltung mit dem Inhibitor leichter in eine stabile *Coiled Coil*-basierte α -helikale Struktur zu überführen, was sich in der Stöchiometrie widerspiegelt.

Mit den gleichen Argumenten lassen sich auch die Ergebnisse der Inhibitionsstudien an dem Modellpeptid RR01 erklären. Die CD-Spektren des Ausgangszustandes von RR01 bei einem pH von 7,4 zeigen eine hauptsächlich ungefaltete Struktur und eine im Vergleich zu VW19 noch geringe Helizität mit weniger als 10%. Auch bei RR01 sind die erste und zweite Erkennungsdomäne intakt. Die ungefaltete Struktur ist vergleichbar zu VW19 neben der Einführung der Valinreste auf die per Design beabsichtigte Anordnung von gleich geladenen Aminosäuren in *b*, *c*, und *f* zurückzuführen. Im Unterschied zu VW19 sind bei pH 7,4 sowohl positiv geladene Lysinseitenketten als auch negativ geladenen Glutamatseitenketten im Fall der Bildung einer Helix in enger räumlicher Nachbarschaft. Die elektrostatische Abstoßung zwischen gleich geladenen Seitenketten hemmt daher die Ausbildung einer Helix. Der Unterschied in der Helizität zwischen VW19 und RR01 wird ebenfalls auch darin deutlich, dass VW19 bei vergleichsweise hoher Konzentration von 300 μM bis 500 μM in der Lage ist, α -helikale Struktur zu bilden, wie die CD-Spektren zeigen (*10.4 Coiled Coil-basiertes*

Modellpeptid VW19). Für das Modellpeptid RR01 sind bei einem pH-Wert von 7,4 und Konzentration von 50 bis 300 μM keine helikalen Strukturen in der CD-Spektroskopie feststellbar. Höhere Konzentrationen führen zur schnellen Aggregation, was die Detektion einer möglichen Ausgangsstruktur vor der Änderung der Konformation in β -Faltblattstruktur unmöglich macht. Die niedrige Helizität von RR01 führt dazu, dass der Inhibitor VW01 trotz der kooperativen Faltung basierend auf intakten *Coiled Coil*-Erkennungsdomänen selbst im Überschuss nicht in der Lage ist, das Modellpeptid RR01 in stabile helikale *Coiled Coil*-basierte Strukturen zu überführen.

Es lässt sich also eindeutig ein Trend der Inhibitionsfähigkeit durch das Modellpeptid VW01 feststellen. Die Inhibition durch VW01 ist abhängig von Helizität des amyloidogenen Modellpeptids.

Im Gegensatz zu VW01 ist FF03 in der Lage, die Bildung amyloider Fibrillen des Modellpeptids RR01 zu inhibieren. FF03 und VW01 weisen mit den jeweiligen Aminosäuren in Position *a* und *d* bzw. *e* und *g* eine identische erste und zweite Erkennungsdomäne auf. Wie jedoch das Mischungssystem RR01 / VW01 zeigte, ist kooperative Faltung auf der Basis der ersten und zweiten Erkennungsdomäne nicht ausreichend, um die Aggregation von RR01 zu inhibieren. Das Peptid FF03 zeigt darüber hinaus eine viel stärkere Tendenz zur Bildung von α -helikalen Aggregaten als VW01 und bildet gebündelte Fasern, was neben der kooperativen Faltung über die erste und zweite Erkennungsdomäne für eine Wechselwirkung über die lösungsmittlexponierten Positionen spricht. Das Modellpeptid FF03 kann aufgrund der geladenen Aminosäuren in *e* und *g* Position an RR01 nur parallel binden und ist im Gegensatz zu VW01 durch eine hohe Tendenz zur Bildung α -helikaler Aggregate gekennzeichnet. Die Tendenz zur Bündelung lässt sich auf die lösungsmittlexponierten Positionen *b*, *c*, und *f*, zurückführen, wie es bereits in einigen Studien gezeigt werden konnte.^[582, 583] Neben der Wechselwirkung über die erste und zweite Erkennungsdomäne ermöglicht FF03 auch die Wechselwirkung über die lösungsmittlexponierten Positionen *b*, *c*, und *f*. Die drei Wechselwirkungsdomänen ermöglichen trotz der geringen Helizität von RR01 die Bildung von stabilen α -helikalen Strukturen, wodurch die konformationelle Änderung zur β -Faltblatt-Konformation und folglich die Bildung von amyloiden Aggregaten unterbunden wird. Die Ergebnisse des Mischungssystems α -AH und β -AH-V sprechen für eine Übertragbarkeit des Inhibitionsprinzips der Experimente mit den *Coiled Coil*-basierten Modellpeptiden auf amphipathische Helices ohne *Coiled Coil*-Erkennungsdomänen. Die Interaktion zwischen dem amyloidogenen Peptid und einer amphipathischen Helix beruht hier lediglich auf einer ausgedehnteren hydrophoben Domäne. Jedoch deuten die Ergebnisse auch

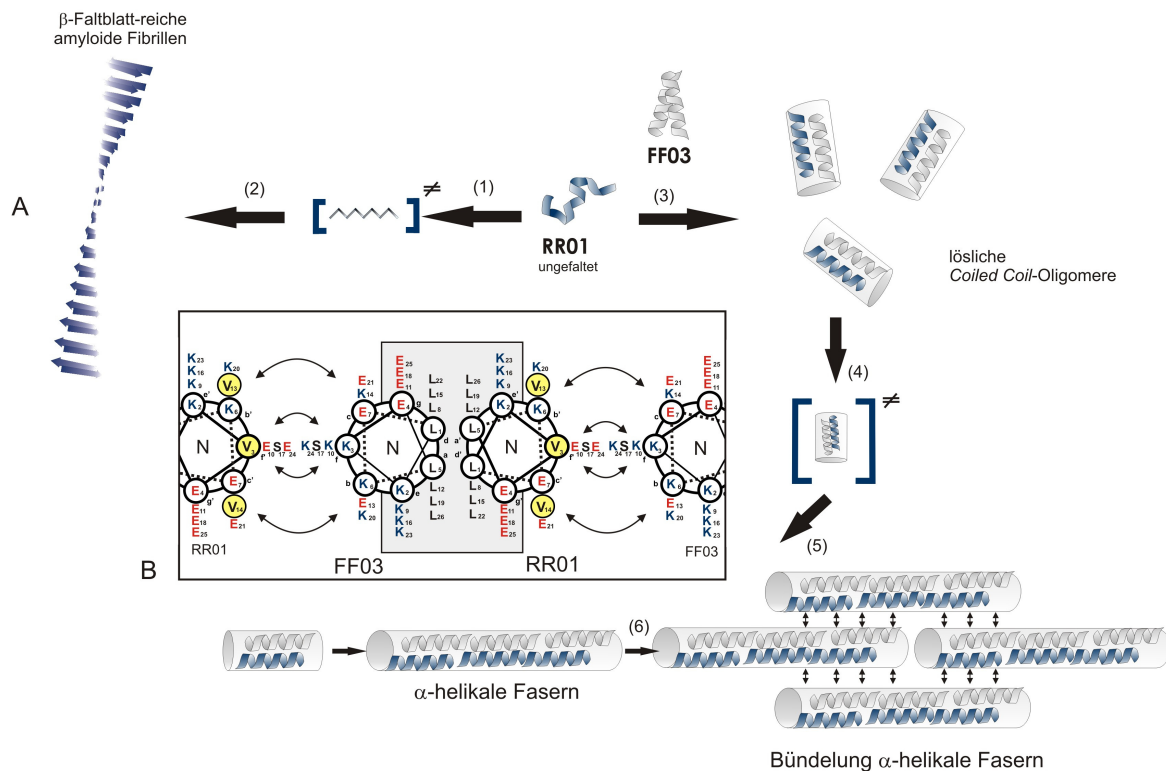


Abbildung 146: Schematische Darstellung der verschiedenen Prozesswege der Zusammenlagerung, die zum einen im Fall von RR01 zur Bildung von amyloiden Aggregaten führt (Schritt 1 und 2) und zum anderen zur Bildung von heteromeren helikalen Fasern in der Mischung von RR01 und FF03 (Schritte 3 bis 6). (1) von der Peptidkonzentration abhängige Nukleation (2) Bildungen von β -Faltblatt-reichen amyloiden Fibrillen. (3) Bildung von heteromeren Coiled-Coil Komplexen (4) von der Peptidkonzentration abhängige Nukleation. (5) Polymerisierung in lange helikale Fasern (6) Bündelung der Fasern über die Interaktion b, c, und f Position. (B) Helical wheel-Darstellung von RR01 und FF03. Positiv (blau) und Negativ (rot) geladene Domänen ermöglichen elektrostatische Wechselwirkung, die zur Bündelung von Coiled-Coil-Fasern führt (graue Box umfasst die hydrophoben und elektrostatischen Wechselwirkungen der ersten, d.h. Position a und d, und der zweiten Erkennungsdomäne, Position e und g, Doppelpfeile zeigen zusätzliche elektrostatische Wechselwirkung über die Positionen b, c, und f.)

in diesem Fall auf die Inhibierung der amyloiden Aggregation durch die Bildung stabiler α -helikaler Oligomere, wobei die Form der Oligomerisierung durch Methoden wie analytische Ultrazentrifugation, Größenaustausch-Chromatographie oder auch dynamische Lichtstreuung noch näher untersucht werden muss.

12.2 Diskussion der Inhibition durch Pseudopeptid PP1

Die beschriebenen Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass PP1 durchaus einen Effekt auf die Kinetik der Aggregation von VW18 und RR01 hat. PP1 ist jedoch nicht in der Lage, die amyloidogenen Modellpeptide in ihrer ursprünglichen Konformation zu stabilisieren. Die verlangsamte konformationelle Änderung lässt sich womöglich durch kurzzeitige

Wechselwirkung mit dem Peptidrückgrat erklären. Jedoch deuten die Ergebnisse darauf hin, dass PP1 nicht in der Lage ist, permanent an die amyloidogenen Modellpeptide zu binden. Das geringe Ausmaß der Reduktion der Fluoreszenzintensität lässt sich womöglich auch durch eine Störung der Bindung von ThT-Molekülen an der Oberfläche der Fibrillen erklären.^[575, 591, 600] Das Design von PP1 zielt auf die selektive Bindung an das Peptidrückgrat über Wasserstoffbrückenbindungen ab. Möglicherweise ist das Rückgrat des Pseudopeptids zu kurz, um stabil an diese Modellpeptide zu binden. Darüber hinaus repräsentiert PP1 ein Alanin-Analogon, wodurch die spezifischen Wechselwirkungen über die Seitenketten, die einer ganzen Reihe von peptidbasierten Inhibitoren zu Grunde liegen, fehlen. Zudem können die PEG-Einheiten zur Steigerung der Löslichkeit die Bindung durch sterische Hinderung oder durch polare Abstoßung stören. Das Design des Inhibitors enthält keine spezifischen Eigenschaften, welche die hier untersuchten amyloidogenen Modellpeptide in ihrer nativen Konformation unterstützen. Vielmehr muss man daher von einer Bindung an gebildeten gestreckten β -Faltblattstrukturen ausgehen, wie es zuvor für eine Reihe peptidbasierter Inhibitoren beschrieben worden ist, was die Bildung möglicher toxischer Oligomere nicht verhindert. Zur Entfaltung einer überzeugenden inhibitorischen Wirkung muss das Design auf das jeweilige amyloidogene Peptidrückgrat angepasst werden, z.B. durch die Einführung von entsprechenden Seitenketten. Die bereits in der Einleitung geschilderten Studien zeigen, dass gerade im Hinblick auf die natürlichen amyloidogenen Kernsequenzen die Einführung von aromatischen Aminosäuren die inhibitorische Wirkung erhöhen können (2.3.4 *Die Rolle aromatischer Seitenketten*).

13 Zusammenfassung und Ausblick

Der wesentliche Teil dieser Dissertation besteht aus Untersuchungen zum Potential der Inhibition der amyloiden Aggregation durch die Generierung von stabilen α -helikalen Strukturen durch die Anwesenheit eines α -helikalen peptidbasierten Inhibitors. Im Gegensatz zu anderen, im ersten Teil dieser Arbeit beschriebenen Konzepten der Inhibition der Bildung amyloider Aggregate beruht die hier untersuchte Strategie nicht auf der Adressierung einer amyloidogenen Kernsequenz in β -Faltblattkonformation (siehe Abschnitt 6.3.3.2 *Rationales Design von peptidbasierten Inhibitoren*), sondern auf der spezifischen Adressierung der helikalen Elemente in den amyloidogenen Peptidsequenz durch Wechselwirkung mit einem geeigneten peptidbasierten Liganden. Auf diese Weise gelang es drei verschiedene amyloidogene Peptidsequenzen durch kooperative Faltung in einem heteromeren helikalen Komplex zu stabilisieren. Die gebildeten α -helikalen Komplexe sind stabil genug, um die amyloidogenen Sequenzen selbst in Gegenwart bereits gebildeter amyloider Fibrillen in der α -helikalen Konformation zu halten. Die Experimente zum proteolytischen Abbau zeigen, dass durch die Bildung helikaler Komplexe die amyloidogene Sequenz für den Abbau durch Proteasen zugänglicher gemacht werden kann und geben Einblick wie α -helikale Inhibitoren *in vivo* ihre Wirkung entfalten können.^[622]

Zur fluoreszenzspektroskopischen Charakterisierung der amyloiden Aggregation bzw. der Inhibition bei azidem pH-Wert wurde ein alternativer Fluoreszenz-Farbstoff zum weit verbreiteten Thioflavin T verwendet und eigenst auf die Anwendbarkeit für die Inhibitionsstudien getestet. Der Fluoreszenz-Farbstoff NIAD-4 stellte sich dabei als sinnvolle Alternative zu Thioflavin T bei acidem pH-Wert heraus.^[556]

Im Rahmen dieser Arbeit wurden erste Experimente zur Einführung der Modellpeptide in die Zelle durchgeführt. Sie deuten bereits an, wie prinzipiell ein möglicher peptidbasierter helikaler Inhibitor in die Zelle eingeführt bzw. generell die Zellmembran überwinden kann. Die Kombination eines peptidbasierten Inhibitors mit einem spezifischen Polymer ermöglicht nicht nur die Permeabilität durch die Zellmembran sondern erhöht gleichzeitig die metabolische Stabilität. Wie die bisherigen Experimente zeigten, bleibt trotz der dafür notwendigen umfangreichen Modifikationen das Modellpeptid VW18 in einer α -helikalen Konformation. Daraus lässt sich schließen, dass der Inhibitor in ähnlicher Weise modifiziert, ebenfalls helikal vorliegt und daher seine Wirkung entfalten kann. Mit diesem Ansatz lässt sich in weiteren Experimenten überprüfen ob sich die amyloide Aggregation von VW18 auch innerhalb einer zellulären Umgebung durch einen helikalen Inhibitor inhibieren lässt.

Darüber hinaus wurden *Coiled Coil*-Mischungssysteme ausführlich beschrieben und charakterisiert, mit denen sich sowohl amyloide Aggregate als auch α -helikale Fasern generieren lassen. Im Unterschied zu bisher veröffentlichten Arbeiten, in denen das zugesetzte Peptid in die amyloide Kernstruktur eingebaut wurde, konnte hier gezeigt werden, dass amyloidogene Peptide in α -helikalen Fasern integriert worden sind. In Abhängigkeit von der Mischung *Coiled Coil*-basierter Modellpeptide und den entsprechenden Designeigenschaften ließen sich unter Inhibition der amyloiden Aggregation und Deaggregation bereits gebildeter amyloider Aggregate sowohl ~ 2.6 nm dünne helikale Fasern als auch dicke Bündel von helikalen Fasern generieren. Somit ermöglichen die beschriebenen Ergebnisse nicht nur ein tieferes Verständnis der Wirkung von α -helikalen peptidbasierten Inhibitoren, sondern eröffnen auch neue Möglichkeiten des Designs peptidbasierter fibrillärer Materialien mit potentiellen Anwendungen in den Materialwissenschaften oder der Biotechnologie (z.B. „*tissue engineering*“).^[623]

Neben der Inhibition *Coiled Coil*-basierte Modellpeptide gelang es mit Methoden der Elektronenmikroskopie, Rasterkraftmikroskopie, Röntgenbeugung, Festphasen-NMR sowie der strukturellen Analyse mit Hilfe eines systematischen Aminosäureaustauschs gegen Glycin und Prolin einen Einblick in die Struktur der Fibrillen der amyloidogenen Modellpeptide zu gewinnen.^[387, 559, 560]

Weiterhin konnte mit Hilfe eines neuen Designs amyloidogene Modellpeptide entwickelt werden, die nicht auf dem *Coiled Coil*-Faltungsmotiv beruhen, aber ebenfalls eine α -/ β -Diskordanz bezüglich ihrer Sekundärstruktur aufweisen. Diese Modellpeptide zeigen damit ähnliche Eigenschaften wie natürliche amyloidogene Proteine und Peptide, wie z.B. die zentrale Sequenz des $A\beta$ -Peptids oder das IAPP (Diabetes Typ 2). Sie sind daher geeignet einen Einblick in die molekularen Grundlagen der amyloiden Aggregation von Sequenzen mit α -/ β -Diskordanz zu geben und ermöglichen darüber hinaus Untersuchungen des Potentials der Stabilisierung der α -helikalen Konformation zur Inhibition der amyloiden Aggregation mit Blick auf natürliche amyloidogene Proteine und Peptide. Die bisherigen Ergebnisse zu diesen auf amphipathischen Helices beruhenden Modellpeptiden deuten auf eine Übertragbarkeit des Inhibitionsprinzips der Studien mit den *Coiled Coil*-basierten Modellpeptiden, wobei die komplementären Wechselwirkungen für die Adressierung der helikalen Elemente unabhängig vom *Coiled Coil*-Heptad-Muster sind.

Des Weiteren wurde neben der Strategie der Adressierung der helikalen Elemente in amyloidogenen Sequenzen ein von Prof. Stefan Hecht und Jan J. Klein (HU Berlin) designer und synthetisierter Inhibitor bezüglich der inhibitorischen Wirkung auf die Aggregation

Coiled Coil-basierter Modellpeptide getestet. Die Inhibitor sollte die spezifischen Wechselwirkungen, d.h. die Ausbildung intermolekularer Wasserstoffbrückenbindungen, zwischen den Peptidrückgraten, stören und so die Aggregation zu amyloiden Aggregaten inhibieren.^[584] Es ließ sich jedoch selbst in einem Überschuß an Inhibitormolekülen keine signifikante inhibitorische Wirkung feststellen. Im Vergleich mit der Strategie der Stabilisierung der α -helikalen Konformation zeigen die Ergebnisse die Bedeutung des richtigen Ansatzes des strategiegeliteten Designs von peptidbasierten Inhibitoren auf.

Neben den Themen rund um die amyloide Aggregation wurde im Rahmen der Promotion in Zusammenarbeit mit Dr. Ayumi Kashiwada (College of Industrial Technology, Nihon University) ein pH-abhängiges *Coiled Coil*-basiertes Membran-Fusion-System designt und charakterisiert und in Zusammenarbeit mit Dr. Hans v. Berlepsch und PD. Dr. Christoph Böttcher (Forschungszentrum Elektronenmikroskopie) wurde der Einfluss *Coiled Coil*-basierter Modellpeptide auf die Aggregation eines Cyanin-Farbstoffs untersucht, wobei die Ergebnisse aufgrund der thematischen Ferne im Rahmen dieser Dissertation nicht beschrieben worden wohl aber publiziert worden sind.^[624,625]

Zur Untersuchung des Potentials der Inhibition der Bildung von amyloiden Aggregaten anhand von Modellpeptiden als auch zur strukturellen Charakterisierung amyloider Fibrillen sind weiterführende Studien notwendig bzw. sind um Teil bereits begonnen worden. Dazu gehört z.B. weitere Experimente zur Einführung der amyloidogenen Modellsysteme sowie der entsprechenden peptidbasierten Inhibitoren in eine natürliche Zellumgebung. Darüber hinaus können die verschiedenen Schritte der Aggregation zu amyloiden Fibrillen sowie der Inhibition durch helikale peptidbasierte Inhibitoren mittels MD-Simulationen charakterisiert werden. Darüber hinaus befinden sich die strukturellen Charakterisierungen der amyloiden Fibrillen des Modellpeptids RR01 kurz vor dem Abschluss.^[559, 560] Die abschließende Interpretation der Ergebnisse soll schließlich einen Einblick in den dreidimensionalen Aufbau der Fibrillen sowie in den Prozess des Übergangs aus dem nativ ungefalteten, löslichen Zustand in eine hochgeordnete, unlösliche Fibrille geben.

Ferner sind tiefergehende Studien mit natürlichen amyloidogenen Peptiden notwendig, um das therapeutische Potential dieses Inhibitionsansatzes einschätzen zu können. Die Entwicklung der Modellpeptide basierend auf einer amphipathischen Helix geht bereits in diese Richtung. Diese Modelle zeigen in ihrem Faltungsverhalten eine große Ähnlichkeit zu den natürlichen amyloidogenen Systemen, bringen jedoch aufgrund des Modellcharakters einige Vorteile mit sich (siehe Kapitel 7 *Amyloide Modellpeptide*). Hier konnte bereits die Einführung eines Valins im hydrophilen Teil der amphipathischen Helix die Amyloidogenität entscheidend erhöhen. Die natürlichen amyloidogenen Peptide sind bereits auf der Ebene der

Primärstruktur um einiges komplexer. Um sich dem natürlichen System weiter zu nähern, ist die Konzentration auf kürzere Sequenzabschnitte sinnvoll. So kann man zum Beispiel von der zentralen Helix des A β -Peptids, d.h. von A β (13-26), ausgehen, das eine α / β -Diskordanz aufweist. Um schließlich ein stabil helikales Modellpeptid auf Basis einer amphipathischen Helix zu finden, dass in der Lage ist die helikalen Elemente in der Sequenz anzusprechen, kann die Sequenz einer amphipathischen Helix als Grundlage für einen Phagen-*Display* dienen, mit dem die Peptidsequenz primär im hydrophoben Teil in Richtung stabiler Wechselwirkung mit z.B. A β (13-26) optimiert werden kann.

Zusammenfassend demonstrieren die hier beschriebenen Ergebnisse das Potential zur Inhibierung amyloider Aggregation mit Hilfe der Strategie der Adressierung helikaler Elemente in amyloidogenen Sequenzen. Sie zeigen, dass die α / β -Diskordanz, die für einige natürliche amyloidogene Peptide und Proteine beschrieben worden ist sowie die Tendenz zur Bildung α -helikaler Intermediate als auch ein nativer α -helikaler Faltungszustand amyloidogener Peptide und Proteine für das Design von neuartigen Inhibitoren genutzt werden kann (siehe Abschnitt, *5.1 Die Bedeutung α -helikaler Intermediate*, *6.3.1 Strategie der Stabilisierung der α -helikalen Konformation*). Diese Inhibitoren sind in der Lage, über hydrophobe aber auch elektrostatische Wechselwirkungen die helikalen Elemente in der Primärstruktur des amyloidogenen Peptids anzusprechen und als starker helikaler Partner für die Bildung von α -helikalen Strukturen zu dienen. Der amphipathische Charakter der α -helikalen Peptide ist dabei von großem Vorteil und birgt ein großes inhibitorisches Potential, da sie generell über die hydrophoben Domäne an hauptsächlich hydrophobe amyloidogene Sequenzen binden und die Löslichkeit dieser Sequenzen über die hydrophile Domäne in Wechselwirkung mit dem wässrigen Milieu erhöhen sowie den proteolytischen Abbau ermöglichen können.

14 Experimentelle Beschreibung

14.1 Peptid Synthese, Reinigung und Charakterisierung

14.1.1 Festphasenpeptidsynthese

Alle Peptide wurden mittels Festphasensynthese unter Verwendung der Fmoc-Schutzgruppenstrategie von C- zum N-Terminus synthetisiert. Die Peptide wurden im 0,05 mmol-Maßstab mit Hilfe des Syro XP von MultiSynTech synthetisiert. Dazu wurden folgende Fmoc-geschützten Aminosäuren verwendet:

Fmoc-L-Glu(OtBu)-OH (Glutamat), Fmoc-L-Leu-OH (Leucin), Fmoc-L-Lys-OH (Lysin), Fmoc-L-Ser(tBu)-OH (Serin), Fmoc-Val-OH (Valin), Fmoc-Ala-OH (Alanin), Fmoc-Phe-OH (Phenylalanin)

Die Aminosäuren wurden von Iris Biotech, NovaBiochem, oder Fa. Gehardt erworben. Zur Synthese wurden die Kupplungsreagenzien DIPEA, TBTU und HOBt bzw. DIC und HOBt verwendet. Die Fmoc-Schutzgruppe wurde jeweils mit der sterisch gehinderten Base Piperidin und DBU entfernt. Das detaillierte Protokoll ist in Tabelle 2 beschrieben.

Harz

Zur Synthese der Peptide wurde Fmoc-L-Leu-Wang-Harz und Fmoc-L-Lysin-TGA-Harz der Firma NovaBiochem verwendet. Die Beladung der Harze variierte je nach Anwendung zwischen 0,2 bis 0,70 mmol/g.

Kupplung der Aminosäuren

Zur Kupplung der Aminosäurederivate wurde das Harz mit einem Reaktionsgemisch auf jeweils 4 Äquivalenten TBTU, HOBt, dem entsprechenden Aminosäurederivat sowie 8 Äquivalenten DIPEA in 4 ml DMF für 30 min geschüttelt. Zusätzlich liegt in diesem Reaktionsgemisch 0,23 mol/L Natriumperchlorat zur Vermeidung von Aggregation vor, das die Kupplung von Aminosäuren erschwert. Die Aminosäurederivate wurden zweimal gekuppelt, d.h. nach Ende der zuvor beschriebenen Kupplung wurde nach einem Waschschrift mit 4 ml DMF eine weitere Kupplung durchgeführt. An jede Doppelkupplung schließt sich die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe durch ein Gemisch aus 20 % Piperidin und 2 % DBU in DMF für jeweils zweimal 10 min an. Die Synthese von Peptiden mit dem Peptid-

Syntheseroboter Synthesizer Syro XP von MultiSynTech erfolgt in Zyklen. Jeder Zyklus steht für die Kupplung einer Aminosäure in der Peptidsequenz. Der erste Zyklus unterscheidet sich von allen weiteren Zyklen durch das Vorhandensein eines Schrittes, in dem das Harz im Lösungsmittel DMF zunächst aufquellt, mit anschließender Fmoc-Entschützung der bereits am Harz gekuppelten Aminosäure. Allen Zyklen ist die zuvor beschriebene Doppelkupplung des Aminosäurederivats mit zuvor beschriebener anschließender Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe und abschließendem Waschschrift mit jeweils sechsmal 4 mL DMF gemeinsam. Das verwendete Syntheseprotokoll für die automatisierte Festphasensynthese ist in der Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 2: Verwendetes Syntheseprotokoll für die automatisierte Festphasensynthese

Syntheseschritt		Chemikalien	Dauer
Erster Zyklus	Quellen des Harzes	4 mL DMF	2 x 30 min
	Fmoc-Abspaltung	2 mL 20 % Piperidin + 2 % DBU in DMF	2 x 10 min
	Waschen	4 mL DMF	6 x 1 min
	Kupplung der Aminosäure	4 Äq. Fmoc-Xaa-OH und HOBt 4 Äq. TBTU in DMF 8 Äq. DIPEA in NMP	2 x 30 min
	Waschen	4 mL DMF	6 x 1 min
Alle weiteren Zyklen	Kupplung der Aminosäure	4 Äq. Fmoc-Xaa-OH und HOBt 4 Äq. TBTU in DMF 8 Äq. DIPEA in NMP	2 x 30 min
	Waschen	4 mL DMF	6 x 1 min
	Fmoc-Abspaltung	2 mL 20 % Piperidin + 2 % DBU in DMF	2 x 10 min
	Waschen	4 mL DMF	6 x 1 min

Manuelle Kupplung

Sofern nicht anders beschrieben, wurden die Peptide am N-Terminus mit einer UV-aktiven 2-Aminobenzoesäure gekuppelt. Hierfür wurde das Derivat Boc-2-Abz-OH der Firma Bachem verwendet. Die Kupplung von Boc-2-Abz-OH erfolgte manuell. Das Harz wurde nach Abschluss der automatischen Synthese in eine Filterspritze überführt. Boc-2-Abz-OH wurde mit DIC und HOBt mit 4 Äquivalenten bezogen auf die Aminosäure in 2 mL DMF 5 min

aktiviert. Anschließend wurde die aktivierte Lösung in die das Harz enthaltende Filterspritze aufgezogen. Die Reaktionszeit betrug je nach Bedarf entweder zweimal 2 h oder einmal 12 h. Anschließend wurde das Harz durch mehrmaliges Spülen mit DCM gewaschen.

Abspaltung der Peptide

Nach Abschluss der Synthese wurde das Harz durch mehrmaliges Spülen mit DCM gewaschen. Die Abspaltungslösung setzt sich aus 1,8 mL TFA, 0,2 mL TIS und 20 µL H₂O zusammen und wurde in die Filterspritze aufgezogen und für 2,5 bis 3 h geschüttelt. Die TFA-Lösung mit dem abgespaltenen Rohpeptid wurde anschließend in einen mit gekühltem Diethylether gefüllten 100 mL-Rundkolben gefällt und bei -20°C über Nacht aufbewahrt. Danach wurde das ausgefallene Peptid zentrifugiert, getrocknet und durch präparative HPLC gereinigt.

14.1.2 Reinigung und Charakterisierung

Präparative HPLC

Die synthetisierten Rohpeptide wurden durch präparative RP-HPLC unter Verwendung einer *Phenomenex* Luna C8 10 µm (250 mm x 21.2 mm) an einem Knauer Smartline Hochdruckgradientensystem, bestehend aus zwei Pumpen Smartline 1000, einem Smartline Manager 5000 Interface mit Lösungsmitteldegaser, einem variablem UV-Detektor 2500 sowie aus einer Hochdruckgradienten-Mischkammer und 5 mL-Probenschleife und Injektionsventil, gereinigt. Die Flussrate von 20 mL/min wurde unter Verwendung des folgenden Gradienten eluiert.

	H ₂ O (0,1 % TFA)	ACN (0,1 % TFA)
0 min	95 %	5 %
30 min	30 %	70 %
32 min	0 %	100 %
35 min	0 %	100 %
38 min	95 %	5 %
40 min	95 %	5 %

Das Rohpeptid wurde hierfür in einer Lösungsmittelmischung aus H₂O (0,1 % TFA) und ACN (0,1 % TFA) aufgelöst, filtriert und injiziert. Die Detektion erfolgte mit UV bei einer Wellenlänge von 320 nm für Peptide mit einem Abz-Label und bei 220 nm für Peptide ohne Label.

Analytische HPLC

Die gesammelten Fraktionen wurden mittels analytischer HPLC auf Reinheit überprüft. Dazu wurden zwei verschiedene HPLC-Systeme verwendet. Zum einen ein LaChrom-HPLC-

System (Merk-Hitachi), bestehend aus einem Interface L-7000, zwei HPLC-Pumpen L-1000, einem Diodenarray-Durchflussdetektor L-7450, einem Hochdruckgradienten-Mixer, einem Rheodyne Injektionsventil 7725i, einer 20 µL Probenschleife, einem Lösungsmitteldegaser L-7612, einem Autosampler 7200. Bedienung und Auswertung der Daten wurde mit Hilfe der LaChrom Software Version 4.0 durchgeführt. Proben 100µL wurden in Standard Autosamples Proben mit dem im Teil Präparative HPLC verwendeten Lösungsmittel-Gradienten mit einer Flussrate von 1 mL/min eluiert. Die Detektion erfolgte mit UV bei 320 nm bei Peptiden mit einem Abz-Label und bei 220 nm bei Peptiden ohne Label. Reine Fraktionen wurden vereinigt, vom Acetonitril getrennt und lyophilisiert.

Massenspektrometrie

Zur Identifizierung wurde die molekulare Masse der synthetisierten Peptide mittels ESI-ToF-Massenspektrometrie analysiert. Es wurde ein LC-ESI-MS 6210-Spektrometer der Firma Agilent Technologies Inc. (USA) mit direkter Injektion der Probe über eine Harvard Apparatus 11 Plus Spritzenpumpe verwendet. Die Proben wurden von der analytischen HPLC aufgefangen und die jeweiligen Peptide lagen gelöst in einem Gemisch aus Wasser und ACN mit 0.1% TFA vor und wurden mit einer Flussrate von 0.1 ml/min ins Massenspektrometer injiziert.

14.1.3 Synthetisierte Peptide

Folgende Peptide wurden im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert:

RR01 Molmasse	Abz-LKVELKELKEELVVLKSELKELKEEL-OH berechnet: 3226,96 Da (monoisotpisch) 3228,86 Da (gemittelt) bestimmt: 3227,01 Da
RR01_o-Abz Molmasse	Ac-LKVELKELKEELVVLKSELKELKEEL-OH berechnet: 3149.8413 Da (monoisotpisch) 3151.7736 Da (gemittelt) bestimmt: 3149,85 Da
RR01-V ₃ V ₁₄ L ₁₅ Molmasse	Abz-LKV*ELKELKEELVV*L*KSELKELKEEL-OH berechnet: 3243,14 Da (monoisotpisch) 3244,84 Da (gemittelt) bestimmt: 3243,92 Da
RR01-L ₁ V ₃ V ₁₄ L ₁₉ K ₂₃ Molmasse	Abz-L*KV*ELKELKEELVVLKSEL*KELK*EEL-OH berechnet: 3252,12Da (monoisotpisch) 3253.74 Da (gemittelt) bestimmt: 3255,96 Da
RR01-V ₃ L ₅ L ₁₃ V ₁₃ Molmasse	Abz-LKV*EL*KELKEEL*V*VLKSELKELKEEL-OH berechnet: 3251.11 Da (monoisotpisch) 3252.74 Da (gemittelt) bestimmt: 3253,96 Da

RR01-V ₃ L ₅ E ₁₀ K ₁₆ S ₁₇ L ₂₂ Molmasse	Abz-LKV*EL*KELKE*ELVVLK*S*ELKEL*KEEL-OH berechnet: 3262,23 Da (monoisotopisch) 3263,72 Da (gemittelt) bestimmt: 3264,01 Da
VW19 Molmasse	Abz-LKVELKELKKELVVLKSELKELKKEL-OH berechnet: 3225,06 Da (monoisotopisch) 3226,98 Da (gemittelt) bestimmt: 3224,97 Da
VW18 Molmasse	Abz-LKVELEKLNKSELVVLKSELEKLNKSEL-OH berechnet: 3142,90 Da (monoisotopisch) 3144,76 Da (gemittelt) bestimmt: 3142,88 Da
VW02 Molmasse	Abz-LKSELEKLNKSELEKLNKSELEKLNKSEL-OH berechnet: 3189,80 Da (monoisotopisch) 3191,66 Da (gemittelt) bestimmt: 3189,81 Da
VW01 Molmasse	Abz-LESKLNKESKLNKESKLNKESKLNK-OH berechnet: 3189,80 Da (monoisotopisch) 3191,66 Da (gemittelt) bestimmt: 3190,8 Da
VW01-ran Molmasse	Abz-LSKELKSEKLNKESKLNKESKLNK-OH berechnet: 3189,80 Da (monoisotopisch) 3191,66 Da (gemittelt) bestimmt: 3190,94 Da
FF03 Molmasse	Abz-LKKELKELKKELEKLNKSELKELKKEL-OH berechnet: 3312,99 Da (monoisotopisch) 3314,94 Da (gemittelt) bestimmt: 3313,03 Da
α -AH Molmasse	Abz-EKLLAELAAALKALLEKL-OH berechnet: 2055,29 Da (monoisotopisch) 2056,49 Da (gemittelt) bestimmt: 2055,31 Da
β -AH-V Molmasse	Abz- EKLLAELAAALKALLEKL-OH berechnet: 2083,32 Da (monoisotopisch) 2084,54 Da (gemittelt) bestimmt: 2083,30 Da
AH-V14 Molmasse	Abz- EKLLAELAAALKAVLEKL-OH berechnet: 2027,29 Da (monoisotopisch) 2028,47 Da (gemittelt) bestimmt: 2027,35 Da

*vollständig mit C¹³ und N¹⁵ markierte Aminosäuren

14.2 Faltungsstudien

14.2.1 Allgemeine Bedingungen

Probengefäße

Die Peptidproben für Faltungsstudien wurden in Eppendorf® Probengefäßen mit 1.5 und 2 mL bereit. 15 mL Plastibrand® Zentrifugenröhrchen wurden für die Bereitung von Peptidelösungen für Volumina oberhalb von 2 mL verwendet.

Pufferlösungen

Für die Peptid-Proben wurden verschiedene Puffer entweder mit einer Konzentration von 10 mM oder 100 mM für Experimente in einem pH-Bereich von 4 bis 10 hergestellt. Zusätzlich wurde 0,1 % (w/w) NaN_3 hinzugefügt zur Vermeidung von Bakterienwachstum.

pH 4,0	Acetat-Puffer AcOH/NaOAc
pH 7,4	Phosphat-Puffer $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (Fluka)
pH 9-10	Carbonat-Puffer $\text{HCO}_3^- / \text{CO}_3^{2-}$

Bestimmung des pH-Werts

Der pH-Wert der Puffer-Lösungen und der Peptid-Lösungen wurde mit Hilfe eines WTW pH526 pH-Meter und einer InLab® Micro Elektrode (Mettler Toledo) bestimmt. Die Anpassung des pH-Werts erfolgte durch die Zugabe von 1 M HCl bzw. 1 M NaOH im μL Maßstab.

14.2.2 Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration der Peptid-Stammlösungen wurde mit Hilfe UV-Spektroskopie und dem an den Peptiden gekuppelten UV-Laben Abz unter Verwendung eines Varian Cary 50 Photometer (Varian Medical Systems, Palo Alto, CA, USA) bestimmt.

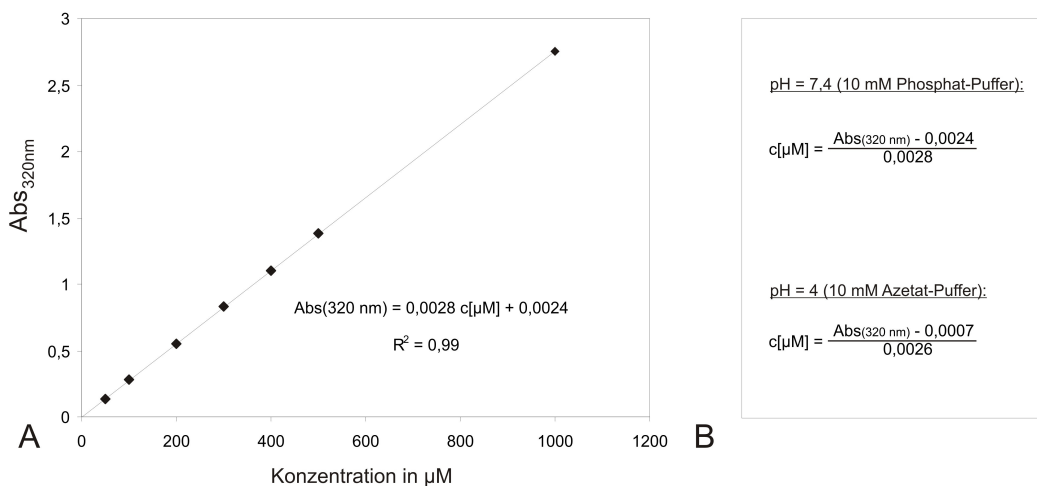


Abbildung 147: (A) Kalibriergerade zur Bestimmung der Peptidkonzentration mit UV Spektroskopie bei pH 7,4 (10 mM Phosphat-Puffer 0,1% NaN_3) (B) Verwendete Gleichungen zur Berechnung der Peptidkonzentration in Phosphat-Puffer pH 7,4 und Azetat-Puffer pH 4,0.

Dazu wurden 50 bis 100 μL der Peptid-Stammlösung mit dem entsprechenden Puffer auf 1 mL verdünnt und in 1,5 mL PMMA Küvetten (Plastibrand®, VWR) überführt und gemessen. Die gemessenen Werte für die Absorption wurden über die zuvor ermittelte Kalibrierkurve

auf die Konzentration bezogen. Die Kalibrierkurve wurde mit Abz-Gly-OH HCl-Lösungen definierter Konzentration im entsprechenden Puffer aufgenommen.

14.2.3 Bestimmung der Nettoladung eines Peptids

Die Nettoladung eines Peptids bei einem bestimmten pH Wert wurde näherungsweise durch folgende Gleichung berechnet:

$$Z = \sum_i N_i \frac{10^{\text{pKa}_i}}{10^{\text{pH}} 10^{\text{pKa}_i}} - \sum_j N_j \frac{10^{\text{pH}}}{10^{\text{pH}} 10^{\text{pKa}_j}}$$

Tabelle 3: Verwendete pKa-Werte

Glu	4,25
Lys	10,5
C-Term	2,34
NH ₂ von Abz	4,98

Die N_i entspricht der Anzahl und pKa_i der pKa-Werte des N-Terminus und der Seitenketten mit Aminofunktion (Arginin, Lysin, Histidin). Die N_j entspricht der Anzahl und pKa_j der pKa-Werte des C-Terminus und der Seitenketten mit Carboxylfunktion (Aspartat, Glutamat) sowie Cystein und Tyrosin.

14.2.4 Probenpräparation

Nicht amyloidogene Peptide wurden in frisch hergestelltem und filtriertem Puffer gelöst. Die Bereitung von Proben amyloidogener Peptide erfordert eine besondere Vorgehensweise. Denn zum Teil zeichnen sich die amyloidogenen Peptide durch ihre vergleichsweise schlechte Löslichkeit in wässrigem Lösungsmittel aus. Um jedoch die Bereitung homogener Proben, die keinerlei bereits gebildete Aggregationskeime aufweisen, zu gewährleisten, wurden verschiedene Präparationsmethoden angewandt.

Modifizierung des pH-Werts

Das lyophilisierte amyloidogene Peptid, z.B. RR01, wurde im Phosphat-Puffer mit einer 10 mM Konzentration in 90 % des letztendlichen Volumens gelöst. Der pH-Wert wurde durch Zugabe von 1 NaOH im μL Maßstab auf pH 11 gestellt, das zur Auflösung von Aggregaten und Aggregationskeimen führt. Die Lösung wurde für 15 min in ein Ultraschallbad gestellt und gevortext und über Nacht in diesem Zustand belassen. Am nächsten Tag wurde die Lösung wieder auf den gewünschten pH-Wert zurückgestellt. Die Konzentration der Lösung wurde nun wie beschrieben bestimmt und die fehlende Menge Puffer wurde hinzugefügt.

Verwendung von Hexafluoroisopropanol (HFIP)

Das lyophilisierte amyloidogene Peptid wurde zunächst in Hexafluoroisopropanol (1 mg/mL) gelöst, gevortext und für 15 min in ein Ultraschalbad gestellt. Zur Bestimmung der Konzentration wurde ein kleiner Teil der Lösung entnommen und mit dem entsprechenden Puffer auf 1 mL aufgefüllt und wie beschrieben die Absorption bei 320 nm gemessen. Das HFIP der Peptid-Stammlösung wurde unter einem sanften Argonstrom abgedampft, so dass sich das Peptid gleichmäßig am Rand des Probengefäßes verteilte. Danach wurde der frisch hergestellte und filtrierte Puffer zur Generierung der gewünschten Konzentration hinzugefügt.

14.2.5 CD-Spektroskopie

Theoretischer Hintergrund

Mit Hilfe der Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie wird die Absorptionsdifferenz $\Delta\varepsilon$, die sich beim Durchgang des links- und rechts-zirkular polarisierten Lichts durch eine chirale Probe ergibt, bestimmt. Fällt zirkular polarisiertes Licht auf eine optisch aktive Substanz, so wird die Geschwindigkeit des Lichts einer Polarisationskomponente gegenüber der anderen verzögert. Die Verzögerung einer Komponente gegenüber der anderen führt bei entgegengesetzt zirkular polarisiertem Licht in der Kombination der Feldvektoren zu einer Ellipse.

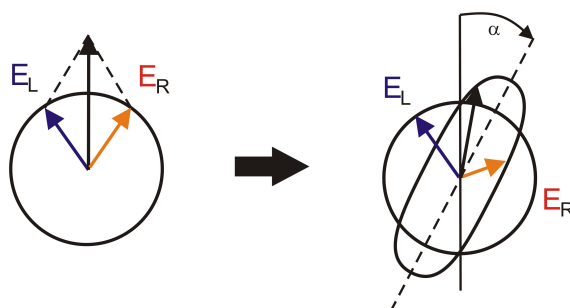


Abbildung 148: Feldvektoren von links- (E_L) und rechts-zirkular (E_R) polarisiertem Licht vor (links) und nach (rechts) dem Durchgang durch die Probe.

Die mit Hilfe der CD-Spektroskopie sich ergebenden Differenz $\Delta\varepsilon$ zwischen der Absorption des links- (ε_L) und rechts- zirkular polarisierten Lichts mit den jeweiligen Absorptionskoeffizienten ε_L und ε_R wird daher als Elliptizität Θ bezeichnet und ergibt sich für eine spezifische Wellenlänge nach dem Lambert Beerschen Gesetz wie folgt:

$$\Theta_\lambda = (\varepsilon_L - \varepsilon_R) \cdot c \cdot d$$

Zur Erzeugung des links- und rechts-zirkular polarisierten Lichts wird zunächst mit Hilfe eines Monochromators Licht einer bestimmten Wellenlänge λ erzeugt und linear polarisiert. Das linear polarisierte Licht zweier Strahlengänge wird anschließend durch einen Modulator unter dem Einfluss eines hochfrequenten Wechselfeldes alternativ in links- und rechts-

zirkular polarisiertes Licht umgewandelt. Die Intensität des links- (I_L) und rechts- (I_R) zirkular polarisierten Lichts wird nach dem Durchgang durch die Probe mit Hilfe eines Detektors gemessen. Daraus wird die Elliptizität Θ berechnet und entsprechend der Wellenlänge aufgenommen.

Zur Analyse der Konformation von Protein- und Peptidstrukturen wird CD-Spektroskopie im Wellenlängenbereich von 160 bis 250 nm durchgeführt, wo sich die $n \rightarrow \pi^*$ und $\pi \rightarrow \pi^*$ Übergänge der Peptidbindung befinden. Rechtshändige α -helikale Strukturen zeigen eine charakteristische negative Elliptizität $\lambda = 222$ nm ($n \rightarrow \pi^*$) und $\lambda = 207$ nm (Carbonyl- $\pi \rightarrow \pi^*$) und eine positive Elliptizität bei $\lambda = 192$ nm (Carbonyl- $\pi \rightarrow \pi^*$). CD-Spektroskopie in Hinsicht auf die Bildung amyloider Aggregate wird zur Untersuchung der konformationellen Änderung amyloidogener Proteine und Peptide von ihrer nativen Struktur zu polymeren β -Faltblatt-reichen Aggregaten eingesetzt. Das CD-Signal polymerer β -Faltblatt-Strukturen besteht aus einem Minimum zwischen 215 und 220 nm ($n \rightarrow \pi^*$) und ein Maximum zwischen 195 und 202 nm ($\pi \rightarrow \pi^*$). Es kann hierbei zu Streuungseffekten aufgrund bereits gebildeter Fibrillen kommen, welche die Aufnahme von Spektren erschweren kann. Ein Minimum zwischen 195 und 200 nm ist charakteristisch für eine ungeordnete Struktur.

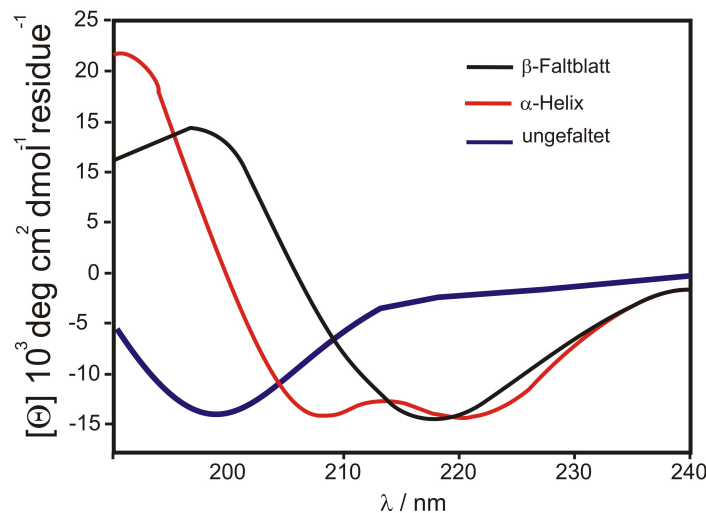


Abbildung 149: Typische CD-Spektren einer β -Faltblattstruktur (schwarz), einer α -Helix (rot) und einer ungefalteten Struktur (blau).

Durchführung

Die CD-Spektren wurden mit Hilfe des Jasco J-715 Spektrometers aufgenommen. Die Temperatur wurde mit Hilfe des Zusatzgeräts PTC 348WI Pelletier bei 20° C konstant gehalten. Die Peptidkonzentration reichte von 50 bis $500 \mu\text{M}$. Es wurden SUPRASIL®-Quarküvetten mit verschiedenen Schichtdicken von 0,2 bis 1 mm verwendet. Die Spektren des jeweilig verwendeten Puffers wurden von den Spektren der Peptidproben abgezogen. Die

gemessenen Werte für die Elliptizität $[\Theta]_{obs}$ wurden nach folgender Gleichung in die molare Elliptizität $[\Theta]$ umgerechnet und normalisiert: $[\Theta] = [\Theta]_{obs} / (10000 \cdot l \cdot c \cdot n)$ Die Länge l entspricht der Dicke der Küvette in cm, c entspricht der Peptidkonzentration in mol/L und n entspricht der Anzahl der Aminosäuren des Peptids. Die verwendeten Parameter sind in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 4: Parameter der CD-Spektroskopie

Parameter		Parameter	
Empfindlichkeit:	100 mdeg	Akkumulation:	3 bzw. 5
Wellenlängenbereich:	190-240 nm	Bandbreite	2 nm
Schrittauflösung:	0,5 nm	Response:	2 s
Scangeschwindigkeit:	100 nm/min	N ₂ -Fluss:	ca. 3 L/min

Berechnung der Helizität

Die Helizität der Peptide wurde auf Basis der charakteristischen normalisierten Elliptizität $[\Theta]$ bei 222 nm berechnet. Der Wert für eine 100%ige Helizität eines 27 Aminosäuren langen Peptids mit der Gleichung $[\Theta]_H = 39500 \cdot (1 - 2,57/n)$ berechnet. Der Wert -39500 entspricht der Elliptizität einer Helix mit n gegen unendlich Aminosäuren in $\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$ und der Wert 2,57 ist der Faktor der die Länge des Primärstruktur mit der Anzahl an Aminosäure n . Für eine Peptid mit $n = 27$ Aminosäuren ergibt sich der von $-35740 \text{ deg cm}^2 \text{dmol}^{-1} \text{ residue}^{-1}$ [599]

14.2.6 Fluoreszenz-Assays

14.2.6.1 Thioflavin T

Theoretischer Hintergrund

Der ursprünglich hauptsächlich in der Histologie zur Lokalisierung der von amyloiden Aggregaten verwendete Fluoreszenzfarbstoff Thioflavin T (ThT) wurde zum meist verwendeten Fluoreszenzfarbstoff zur spezifischen Identifizierung von amyloiden Fibrillen sowohl *in vivo* als auch *in vitro*. Naiki *et al.* und LeVine gehören zu den ersten Wissenschaftlern, die Eigenschaften von ThT bei Bindung an amyloiden Fibrillen untersuchten.^[601-604] Sie konnten zeigen, dass ThT eine starke Verschiebung des Anregungsmaximums von 385 nm zu 450 nm und des Emissionsmaximums von 445 zu 482 nm bewirkt. Es ist wasserlöslich mit einer moderaten Affinität zu amyloiden Fibrillen. Es bindet an amyloide Fibrillen vieler verschiedener natürlicher amyloidogener Proteine und Peptide, was auf eine gemeinsame molekulare Struktur aller amyloiden Fibrillen deutet. Die intensive Verwendung in der wissenschaftlichen Forschung macht eine Charakterisierung des

Mechanismus der Bindung von Thioflavin T notwendig. Verschiedene Modelle zum Fluoreszenzeffekt von ThT werden diskutiert. Zunächst konnten Untersuchungen von Krebs *et al.* zeigen, dass ThT-Moleküle parallel zur Fibrillenachse binden, was zu einem Kanal-Modell führte, nach dem sich ThT anhand der Kanäle orientiert, die sich durch die Seitenketten in der *cross-β*-Struktur ergeben.^[606] Gestützt wird dieses Modell durch eine Reihe von MD-Simulationen.^[605] In aktuellen Studien konnte gezeigt werden, dass sich das

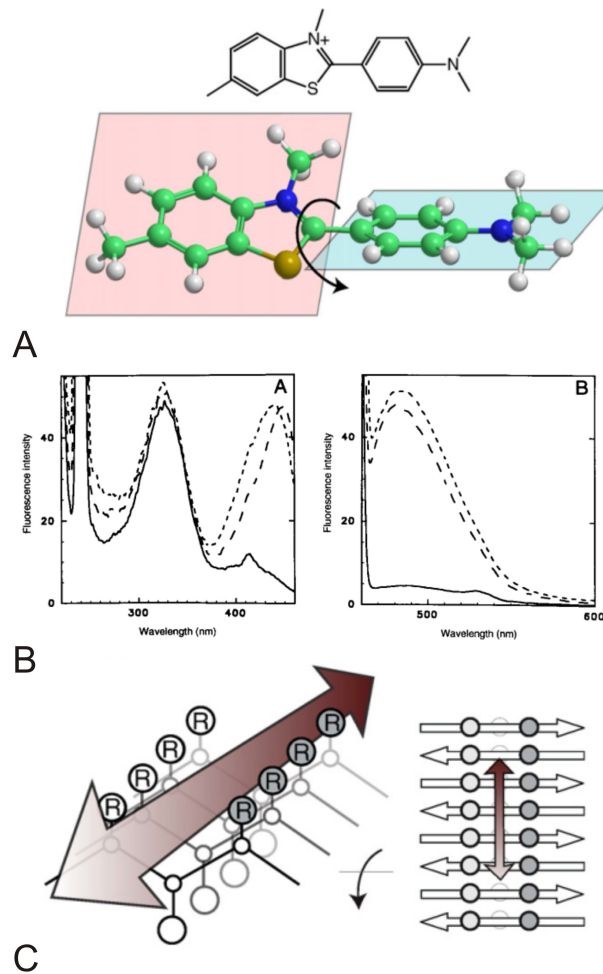


Abbildung 150: (A) Chemische Struktur von Thioflavin T und Illustrierung der beiden planaren Segmente, deren relative Rotation die Chiralität des Moleküls bestimmt (Lit. ^[605] Copyright © Elsevier) (B) Extinktions- und Emissionsspektren in Gegenwart amyloider Fibrillen von Aβ(1-28) (kurz gestrichelte Linie) und Aβ(1-40) (lang gestrichelte Linie) (Lit. ^[601] Copyright© Cold Spring Harbor Laboratory Press) (C) Orientierung von ThT-Molekülen and der Oberfläche einer Fibrille (Lit. ^[605] Copyright © Elsevier).

ThT-Molekül wie ein molekularer Motor verhält.^[607-610] In Lösung ohne Gegenwart von amyloiden Fibrillen können der Benzylaminring und Benzylthiolring frei rotieren, was die Abgabe von angeregten Photonen unterbindet. Die Folge ist eine niedrige Fluoreszenzemission von ThT. Durch die Bindung an einer kanalähnlichen Oberfläche einer amyloiden Fibrille, die sich aus den wiederholenden Seitenkettenwechselwirkungen in der

cross-β-Struktur entlang der Fibrille ergeben, kommt es jedoch zum Verlust von Freiheitsgraden der Rotation, was als Grund für den starken Fluoreszenzeffekt diskutiert wird.^[606, 611] Darüber hinaus werden Modelle der Selbstassoziation von ThT diskutiert. Groenning *et al.* konnten z.B. zeigen, dass ThT in angeregten Dimeren in hydrophoben „Taschen“ der amyloiden Fibrillen bindet.^[605] Jedoch kann keines dieser Modelle verdeutlichen, warum ThT parallel zur Fibrillenachse bindet und warum die Chiralität von ThT beeinflusst wird.^[605]

Durchführung

Mit Hilfe von Thioflavin lassen sich die Kinetik sowie das quantitative Ausmaß der Fibrillenbildung bestimmen. Es wurde ein von Sigma Aldrich käuflich erworbenes Thioflavin T vor der Verwendung mit Hilfe einer chromatografischen Säule gereinigt. Die Fluoreszenzspektren wurden mit Hilfe des Lumineszenz Spektrometer LS50B (Perkin-Elmer, Boston, MA, USA) aufgenommen. Fluoreszenzproben innerhalb einer Quarz-Küvette (Quartz Suprasil; 0,2 x 1 cm) enthielten 490 μL Peptidlösung in Phosphat-Puffer (pH 7,4; 0,1% NaN_3) und 10 μL eine 500 μM ThT-Lösung (10 μM). Die Spektren wurden von einer Wellenlänge $\lambda = 470$ zu 600 nm und Anregung bei $\lambda = 450$ nm aufgenommen. Zur Aufnahme des kinetischen Verlaufs der Aggregation wird die Fluoreszenzintensität bei einer Wellenlänge von $\lambda = 485$ nm in Abhängigkeit von der Zeit gemessen.

14.2.6.2 NIAD-4

Der Fluoreszenz-Farbstoff NIAD-4 wurde zur Unterscheidung zwischen helikalen Fasern und amyloiden Fibrillen speziell bei azidem pH Wert angewendet und dafür im Rahmen dieser Arbeit getestet (siehe 10.7 *NIAD-4 Fluoreszenz bei helikalen Fasern und amyloiden Fibrillen*).^[556]

NIAD-4 Assay

NIAD-4 wurde von ICx Nomadics Inc. (Cambridge, MA, USA) ($\epsilon = 35700$ L/mol·cm) erworben. Aufgrund der geringen Löslichkeit in Wasser wurde eine 500 μM Stammlösung in Methanol hergestellt. Die Fluoreszenzspektren wurden mit Hilfe des Lumineszenz Spektrometer LS50B (Perkin-Elmer, Boston, MA, USA) aufgenommen. Fluoreszenzproben innerhalb einer Quarz-Küvette (Quartz Suprasil; 0,2 x 1 cm) enthielten 490 μL Peptidlösung in Phosphat- bzw. Azetat-Puffer (pH 7,4 oder pH 4,0; 0,1% NaN_3) und 10 μL einer 500 μM NIAD-4-Lösung (10 μM). Der pH-Wert wurde anschließend neu angepasst. Die Spektren wurden von einer Wellenlänge $\lambda = 525$ zu 700 nm und Anregung bei $\lambda = 450$ nm

aufgenommen. Zur Aufnahme des kinetischen Verlaufs der Aggregation wird die maximale Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Zeit gemessen.

14.2.7 Inhibitionsstudien mit Hilfe der CD-Spektroskopie und Fluoreszenz-Assays

Für den kinetischen Verlauf der amyloiden Aggregation wird die Fluoreszenzintensität bzw. der Betrag der Elliptizität $[\Theta]$ bei 218 nm (β -Faltblattstruktur) in Abhängigkeit von der Zeit gemessen. Testet man die inhibitorische Wirkung *in vitro* mit z. B. einem ThT-Assay oder CD-Spektroskopie, äußert sich die inhibitorische Wirkung im Vergleich zum Verlauf der Fibrillenbildung ohne Inhibitor zum einen durch eine verlängerte Dauer bis zur Nukleation der Aggregation und zum anderen durch eine Reduzierung des Ausmaßes der Fibrillenbildung bis hin zur vollständigen Inhibition der Aggregation im beobachteten Zeitraum (Abbildung).

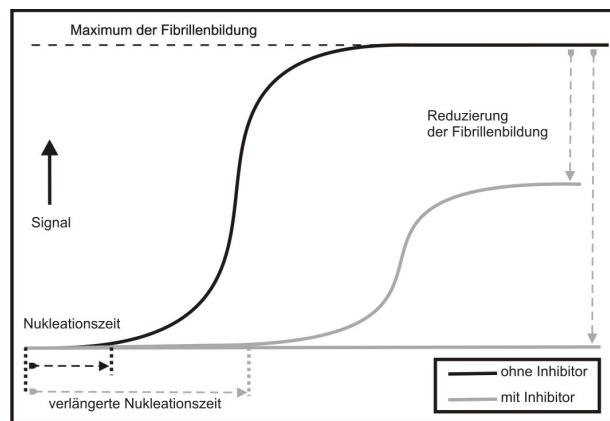


Abbildung 151: Schematische Darstellung eines *in vitro* Aggregations-Assays (verändert nach Lit. [402])

14.2.8 Größenausschlusschromatographie

Theoretischer Hintergrund

Wie bereits im Namen der Methode zu erkennen ist, trennt man mit Hilfe der Größenausschlusschromatographie gelöste Moleküle entsprechend ihrer Größe. Die unterschiedliche Größe hat eine unterschiedliche Permeation durch ein poröses Trägermaterial mit spezifischer Porengröße zur Folge. Die Molekülgröße, d.h. das hydrodynamische Volumen der Probenmoleküle, muss in einem bestimmten Verhältnis zur Porengröße des Trägermaterials stehen. Können Probenmoleküle aufgrund ihrer Größe nicht in die Poren eindringen, werden sie mit der Lösemittelfront eluiert. Sie werden mit dem so genannten Ausschlussvolumen V_0 eluiert. Sind die Moleküle kleiner, können sie sich ungehindert durch die stationäre Phase bewegen und in die Poren des Trägermaterials eindringen. Sie werden daraufhin mit einer Verzögerung zum Ausschlussvolumen V_0 eluiert. Die kleinsten Moleküle können sich länger innerhalb des Trägermaterials aufhalten und werden daher zuletzt eluiert.

Sie werden zwischen dem Ausschlussvolumen V_0 und dem Elutionsvolumen V_m , das der Summe des internen Porenvolumens und des Partikelzwischenraums entspricht, eluiert.

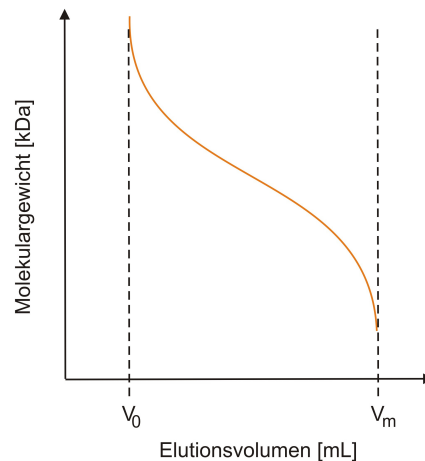


Abbildung 152: Effekt der Größenaustauschchromatographie (nach Lit.^[612]).

Durchführung

Mit Hilfe der Größenaustauschchromatographie wurde der Oligomerisierungsgrad gebildeter Komplexe im Vergleich zu dem bekannten Oligomerisierungsgrad von VW01 und VW01-ran bestimmt, der mit Hilfe der analytischen Ultrazentrifugation bestimmt wurde. Die Größenaustauschchromatographie wurde mit einer Superdex 75 PC 3.2/30 Säule mit einem Gel Volumen von 2,4 mL durchgeführt. Die einzelnen Peptidproben oder Mischungen wurden in Puffer gelöst (100 mM Azetat-Puffer für pH 4,0; 100 mM Phosphat-Puffer für pH 7,4) und mit gleichem Puffer mit Hilfe eines Elite LaChrome Systems mit einer Flussrate von 0,025 mL pro Minute innerhalb von 240 min eluiert. Die Absorption wurde entsprechend der Abz-Gruppe an den jeweiligen Peptiden bei $\lambda = 320$ nm in Abhängigkeit von der Retentionszeit aufgenommen. Die Säule wurde zuvor mit dem entsprechenden Puffer equilibriert. Für den Vergleich der einzelnen Proben untereinander wurde das Abz-Gly als Standard zu jeder Probe hinzugefügt.

14.2.9 Analytische Ultrazentrifugation

Theoretischer Hintergrund

Bei der Methode der analytischen Ultrazentrifugation wird mit Hilfe einer auf hohe Geschwindigkeiten (60000 U/min) optimierten Zentrifuge die Bewegung des zu untersuchenden Partikels im Schwerfeld spektroskopisch detektiert. Partikel wird nach Größe, Dichte und Form fraktioniert. Die Messzelle mit der jeweiligen Partikelprobe wird mit Hilfe einer Absorptionsoptik während der Sedimentation bei einer bestimmten Wellenlänge

untersucht. Auf diese Weise erhält man ein Konzentrationsprofil über den radialen Verlauf der Messzellen. Durch Wiederholung der Messung wird diese Information zeitlich aufgelöst. Im Laufe der Sedimentation wandert die Sedimentationsfront in Richtung Zellboden. Aus der Geschwindigkeit der Sedimentation einzelner Partikel sind die Partikeleigenschaften zugänglich.

Die Bestimmung der molaren Masse ist über zwei verschiedene Experimente möglich, das Sedimentationsgeschwindigkeits- und das Sedimentationsgleichgewichtsexperiment. Beim Sedimentationsgeschwindigkeitsexperiment wird eine Konzentrationsverteilung in Abhängigkeit von der Zeit innerhalb der Messzellen detektiert. Die Daten fließen in die Verteilung des Sedimentationskoeffizienten (s-Verteilung) ein. Der Sedimentationskoeffizient gibt Auskunft über die Geschwindigkeit der Sedimentation. Die Verteilung des Sedimentationskoeffizienten macht z. B. Aussagen über die Anzahl und Konzentration der unterschiedlichen Komponenten möglich und erlaubt die Berechnung der Partikelmasse nach folgenden Gleichung:

$$\frac{m_p(1 - \tilde{V}_2 \rho_{Lm})}{f} = \frac{u}{\omega^2 r} = s$$

m_p	= Partikelmasse
r	= radialer Abstand Partikel/Rotationsachse
ω	= Winkelgeschwindigkeit
V_p	= Teilchenvolumen
ρ_{Lm}	= Lösemitteldichte
V_2	= partielles spezif. Volumen
f	= Reibungskoeffizient
s	= Sedimentationskoeffizient

Das Sedimentationsgleichgewicht beschreibt das Gleichgewicht zwischen Sedimentation zum Zellboden und der Rückdiffusion vom Zellboden weg am Ende Sedimentation, an dem keine Transportprozesse mehr stattfinden. Im Gleichgewicht können mehrer Spezies vorliegen und es sind daher Annahmen bezüglich der Anzahl und relativen Konzentration der Spezies notwendig. Die Auswertung führt zu einer Molmassenverteilung.

Durchführung

Die Experimente wurden Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. Helmut Cölfen am Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung mit Hilfe einer XL-I Ultrazentrifuge (Beckman-Coulter, Palo Alto, CA) von Ulla Gerling durchgeführt. Mit der analytischen Ultrazentrifugation (AUZ) wurde der Oligomerisierungsgrad der Modellpeptide VW01 und VW01-ran bestimmt. Die Peptidstammlösungen gegen Puffer (Phosphatpuffer: 10 mM, pH 7.4, 0.1% NaN₃, $\rho = 0.99941$ g/ml $\eta = 0.008972$ P ; Azetat-Puffer: 10 mM, pH 4,0, 0.1% NaN₃, $\rho = 0.998192$ g/ml, $\eta = 0.008925$ P) wurden mit einer Membran SpectraPro®-Membran (MWCO; Carl Roth GmbH) dialysiert. Sedimentationsgeschwindigkeitsmessungen wurden bei einer Rotorgeschwindigkeit von 60000 rpm und einer Peptidkonzentration von 20 bis 300 μ M durchgeführt. Sedimentationsgleichgewichtsexperimente wurden bei einer

Rotorgeschwindigkeit von 25000, 30000 und 50000 rpm für Peptidkonzentration von 20 bis 500 μM durchgeführt. Die Absorption wurde im Wellenlängenbereich von 320 bis 360 nm detektiert. Das partielle spezifische Volumen wurde mit Hilfe des Paar DMA 5000 Dichtemesser (Anton Paar, Graz, Austria) bestimmt und mit der Software SED NTERP berechnet (<http://www.rasmb.bbri.org>; Lit. ^[613]). Das partielle spezifische Volumen betrug 0,736 mL/g. Die apparente Masse wurde mit Hilfe des Programms MSTAR von Harding und Cölfen bestimmt. Die Daten der Sedimentationsgeschwindigkeitsmessung wurden mit Hilfe des Programms SEDFIT von Schuck ausgewertet und führten zur spezifischen Verteilung der molaren Massen $c(M)$.

14.2.10 Limitierte Proteolyse

Theoretischer Hintergrund

Die limitierte Proteolyse ist eine Methode zur strukturellen Analyse von Proteinen und Peptiden. Da zur Spaltung der Peptidbindung durch Proteasen eine Peptidsequenz von bis zu 10 Aminosäuren in einer zugänglichen, flexiblen Konformation notwendig sind, kann man schließen, dass die spezifische Position der Spaltung innerhalb der Primärstruktur exponiert, flexibel oder auch schwach strukturiert sein muss.^[614] Diese Methode fand bereits in der strukturellen Analyse von Amyloiden Anwendung. Man konnte auf diese Weise zeigen, welche Segmente der amyloidogenen Primärstruktur nicht Teil der gegenüber Proteasen relativ stabilen und β -Faltblatt-reichen, amyloiden Kernstrukturen sind.^[592, 594]

Durchführung

Die Methode wurde hier angewendet, um die unterschiedliche Stabilität der jeweiligen Komplexe gegenüber Proteasen zu untersuchen. Die jeweiligen Peptidproben enthielten stets eine Gesamtpeptidkonzentration von 150 μM in 10 mM Phosphatpuffer (10 mM, pH 7,4, 0,1% NaN_3). Die Peptidlösung wurde mit einer Enzymstammlösung so verdünnt, dass die Gesamtpeptidkonzentration 100 μM entspricht. Alle Proben wurden bei 37°C inkubiert. Die Inkubationszeit wurde nach bestimmten Zeitpunkten durch die Addition von Acetonitril (0,1% TFA) und 1%-iger TFA gestoppt, wodurch die Peptidkonzentration auf 33 μM verdünnt wurde. Diese Prozedur ist zur Auflösung der amyloiden Fibrillen und Inhibierung jeder weiterer Form von amyloider Aggregation im Autosampler der HPLC sowie zur Deaktivierung der Protease notwendig. Die einzelnen Proben wurden mit Hilfe der analytischen HPLC (Merck LaChrome Elite System, Merck, KGaA, Darmstadt, Germany) unter Verwendung einer Merck Chromolith HPLC Säule untersucht. Die Peptide wurden mit einem linearen Gradienten aus H_2O /Acetonitril/0,1% TFA eluiert. Die Peptidkonzentration

wurde über die Berechnung der HPLC *Peak*-Fläche bei 220 nm anhand einer zuvor aufgenommenen Standardkurve erstellt. Hierfür wurde die Konzentration des Standardpeptids mit UV bestimmt. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe mit HPLC aufgenommen, mit der schließlich die Fläche unter dem *Peak* einer Konzentration zugeordnet werden konnte.

14.2.11 Computer-Algorithmen zur Vorhersage des Faltungsverhaltens

14.2.11.1 AGADIR

AGADIR ist ein Algorithmus zur Vorhersage der Helizität von Peptidsequenzen, d. h. der Tendenz zur Bildung von α -helikalen Strukturen. Es basiert auf der *Helix-Coil*-Theorie, genauer auf dem Lifson-Roig Modell, und wurde von Serrano, Munoz und deren Mitarbeitern entwickelt.^[9, 615, 616] Das Lifson-Roig Modell ist ein Modell der statistischen Mechanik, das Aussagen über die Wahrscheinlichkeit des Konformationsübergangs eines Aminosäurerests von ungefalteten in den α -helikalen Zustand erlaubt. Die ursprüngliche Version von AGADIR berücksichtigte die Helix-Propensität ohne Wasserstoffbrückenbindungen, die Enthalpie der Wasserstoffbrückenbindung, die Wechselwirkungen zwischen den Seitenketten und die Entfaltung am Ende von helikalen Sequenzen. In weiteren Entwicklungsschritten wurden schließlich auch andere potentielle Konformationen für eine Aminosäure neben der helikalen Konformation mit einbezogen. Der Algorithmus berücksichtigt darüber hinaus elektrostatische Wechselwirkungen, das Helix-Dipolmoment, die pH-Abhängigkeit, die Temperatur, *capping*-Motive und die Ionenstärke. Zur Evaluierung des Algorithmus wurden 1200 Peptide analysiert und die Ergebnisse wurden mit experimentellen Werten verglichen. AGADIR ist in der Lage, zuverlässig Vorhersagen bezüglich der helikalen Tendenz für jede Peptidsequenz zu machen. Darüber hinaus kann der Algorithmus auch Vorhersagen bezüglich der chemischen Verschiebung und Kupplungskonstanten bei NMR treffen.^[9] Der Algorithmus lässt sich über die Website www.agadir.crg.es nutzen.

14.2.11.2 TANGO

Der auf der statistischen Mechanik beruhende Algorithmus TANGO wurde zur Vorhersage von *cross- β* -Aggregation, d. h. Bildung amyloider Aggregate, in Peptiden und denaturierten Proteinen entwickelt. Der Algorithmus basiert auf einfachen physiko-chemischen Prinzipien und berücksichtigt neben dem ungefalteten Zustand die Propensitäten verschiedener Sekundärstrukturen. Dazu gehören β -turn, α -Helix, aggregierende β -Faltblatt- sowie aggregierende α -Helix-Strukturen. Zur Vorhersage der Aggregationstendenz wird angenommen, dass die amyloidogene Kernsequenz vollständig desolvatisiert wird. Die

entsprechende energetische Bilanz wird mitberücksichtigt. Darüber hinaus werden elektrostatische Wechselwirkungen, d. h. der Grad der Ionisierung in Abhängigkeit vom pH-Wert und der Temperatur miteinbezogen. Optional lässt sich auch der Einfluss des Lösungsmittels Tetrafluorethan TFE zum einen über die Verstärkung des Einflusses von Wasserstoffbrückenbindungen und zum anderen über die Erhöhung der helikalen Propensität mit einbeziehen. TANGO wurde mit Hilfe von 175 Peptiden und 20 Proteinen evaluiert und ist in der Lage, die Wahrscheinlichkeit der *cross-β*-Aggregation vorherzusagen und die spezifischen Segmente der Primärstruktur (siehe amyloidogene Kernsequenzen) zu identifizieren, welche die für Aggregation verantwortlich sind. Der Algorithmus lässt sich über die Website www.tango.crg.es nutzen.

14.3 Strukturelle Charakterisierung

14.3.1 Elektronenmikroskopie

Aufbau eines Elektronenmikroskops (nach Lit.^[617])

Prinzipiell ist der Aufbau eines Elektronenmikroskops mit dem eines Lichtmikroskops vergleichbar. An die Stelle der Glaslinsen im Lichtmikroskop treten magnetische Linsen in Form von eisenummantelten Wicklungen, durch die ein Strom fließt und so das Magnetfeld erzeugt wird. Magnetische Linsen wirken als Sammellinsen. Eine Kathode dient als Elektronenquelle, indem sie elektrisch aufgeheizt wird und dadurch Elektronen emittiert werden. Eine Anode, an der eine Spannung von Größenordnungen von 10^5 Volt anliegt, beschleunigt die Elektronen. Kondensorlinsen fokussieren den Elektronenstrahl auf das Objekt. Der Elektronenstrahl durchdringt das Objekt durch mehrere Projektivlinsen aufgeweitet, wodurch die Vergrößerung erhöht wird. Die Aufnahmen wurden auf Negativen dokumentiert.

Durchführung

Die elektronenmikroskopischen Experimente wurden von Hans v. Berlepsch (Forschungszentrum Elektronenmikroskopie, FU Berlin) durchgeführt. Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie lassen sich die peptidbasierten Aggregate abbilden und strukturell untersuchen. Für die im Rahmen dieser Arbeit erstellten Bilder wurde die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) und Kryo-TEM verwendet. Der wesentliche Unterschied liegt in der Präparation der Proben. Für TEM werden getrocknete Filme auf weitmaschigen Gittern (*grids*) untersucht. Dazu wurden ca. 5 bis 10 μ L der Peptidlösung auf Kohlenstoff-beschichteten Kupfer-Gittern (400 mesh) absorbiert. Nach der Anfärbung mit

1%iger Phosphorwolframsäure (PTA) wurden die Gitter an der Luft getrocknet. Die TEM-Aufnahmen wurden bei einer Vergrößerung von 58300 und einem Defokus von 0,7 μm aufgenommen.

Zur Bereitung der Proben für die Kryo-TEM-Aufnahmen wird ein Droplet (5 bis 10 μL) der Peptidlösung auf ein hydrophilisiertes, perforiertes und Kohlenstoff-beschichtetes Gitter bei Raumtemperatur aufgetragen. Die überstehende Flüssigkeit wird zu einer ultradünnen Schicht über die Löcher des Gitters gestrichen. Das Gitter wird sofort mit flüssigen Ethan bei einem Gefrierpunkt von $-184\text{ }^\circ\text{C}$ vitrifiziert. Durch diesen schnellen Kühlungsprozess wird eine störungsfreie thermale Fixierung (Vitrifizierung) der wässrigen Lösung erreicht ohne Kristallisierung des Lösungsmittels und der daraus folgenden Veränderung der zu untersuchenden Aggregate. Die vitrifizierten Proben werden mit Hilfe von flüssigem

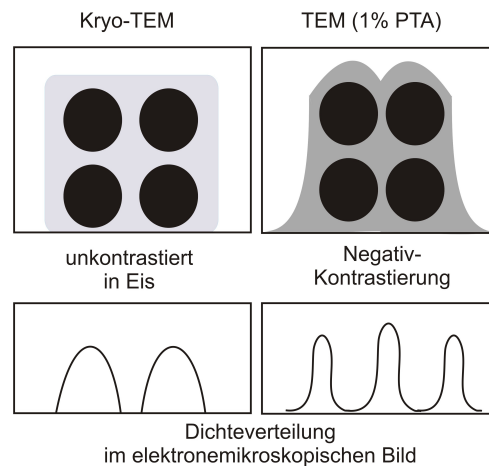


Abbildung 153: Kontrastumkehr zwischen TEM und Kryo-TEM-Aufnahmen. Schematische Darstellung der angewendeten Kontrastierungsarten (die schwarzen Kreise repräsentieren Aggregate) (nach Lit.^[617]).

Stickstoff zu einem CM 12 Transmission Elektronenmikroskop transportiert. Die mikroskopischen Studien werden bei $-175\text{ }^\circ\text{C}$ bei einer Vergrößerung von 58300 und einem Defokus von 1,5 μm durchgeführt. Die Bereitung von Kryo-TEM-Aufnahmen dient u. a. auch dazu, mögliche Präparationseffekte bei TEM-Aufnahmen auszuschließen.

14.3.2 Röntgenbeugung

Probenpräparation

Die Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Hans v. Berlepsch (Forschungszentrum Elektronenmikroskopie, FU Berlin) sowie Jörk Leiterer und Franziska Emmerling (BAM, Bundesinstitut für Materialforschung) am BESSY (Berlin) durchgeführt. Zunächst wurde das gereinigte Peptid in frisch gefiltertem 10 mM Phosphat- bzw.- Azetatpuffer gelöst und für 7

bis 10 Tage bei Raumtemperatur inkubiert. Die amyloiden Aggregate wurden mit Hilfe von CD-Spektroskopie, ThT-Assay und TEM überprüft. Die Peptidkonzentration wurde mit Hilfe der UV-Spektroskopie (14.2.2 Konzentrationsbestimmung) bestimmt. Letztendlich lag die Peptidkonzentration in einem Bereich 200 bis 1000 μM . Da die Intensität der Reflektionen relativ zum Hintergrund des Lösungsmittels mit Dichte der Packung der Fibrillen ansteigt, ist eine hohe Peptidkonzentration notwendig. Dies wird durch Eintrocknung der Peptidlösung erreicht.^[618] Verschiedene Methoden wurden hierbei ausprobiert. Die einfachste Methode ist das Einrockung der Peptidlösung in den Eppendorf® Probengefäßen (1,5 mL), was zu einem dünnen Film an der Oberfläche des Gefäßes führt. Zur Bereitung von Proben mit partiell gerichteten Fibrillen wird ein Droplet der Peptidlösung zwischen zwei silikonisierten Enden von Glaskapillaren in einem Abstand von 1,5 mm getrocknet. Durch mehrere Wiederholungen wird so ein Bündel von gerichteten Fibrillen erreicht. Die getrockneten Proben wurden in einem dünnen Klebeband fixiert (Scotch Tape, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Berlin)

Durchführung der Messung

Alle Röntgenbeugungsexperimente wurden mit Hilfe einer synchrotronen Röntgenstrahlungsquelle am BESSY durchgeführt (Berlin, Deutschland). Der Aufbau ist in der Literatur^[619] detailliert beschrieben. Für die Röntgenbeugungsmessungen wird ein Strahlgang von etwa 300 μm Durchmesser an der Fokusposition verwendet. Die Abweichung des Strahlgangs betrug weniger als ein 1 mrad (horizontal und vertikal) bei einem Photonflux von $1 \times 10^9 \text{ s}^{-1}$ und einem Ringstrom von 100 mA. Alle Experimente wurden mit Hilfe von hoch monochromatischer Röntgenstrahlung durchgeführt. Die Intensität der Beugung wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda = 1.0024 \text{ \AA}$ gemessen und mit Hilfe eines 2D MarMosaic CCD Detektors aufgezeichnet. Der Abstand zwischen der Probe und dem Detektor wurde in einem Bereich von 200 bis 300 mm variiert. Die Dauer der Exponierung variierte von 10 s bis 10 min in Abhängigkeit vom erzielten Kontrast. Die Messapparatur wurde mit Hilfe von Korundpulver (Al_2O_3 , Korngröße $< 10 \mu\text{m}$, Sigma-Aldrich) kalibriert. Eindimensionale Beugungsprofile wurden durch azimutale Mittlung der zweidimensionalen Muster mit Hilfe des Programms FIT2D kreiert.^[620] Nach der Mittlung der eindimensionalen Profile der getrockneten Proben wurde der Hintergrund ohne Probe abgezogen, hier das Klebeband bzw. die Beugung einer leeren Probe.

14.3.3 Festphasen-Kernresonanzspektroskopie (ssNMR)

Diese Methode nutzt das Phänomen der kernmagnetischen Resonanz. Ein homogenes Magnetfeld führt bei Atomkernen mit einem magnetischen Moment zu einer Aufspaltung der Energieniveaus des Kernspins in mehrere Zustände. Wenn man Radiowellen mit einer Frequenz einstrahlt, die diesem Energieunterschied zwischen den Zuständen entspricht (Resonanz), lässt sich ein Übergang induzieren. Diese Methode dient der spektroskopischen Untersuchung der elektronischen Umgebung einzelner Atome und der Wechselwirkung mit benachbarten Atomen und lässt sich u.a. zur strukturellen Charakterisierung von Biomolekülen, wie z.B. amyloide Aggregate, nutzen.^[612]

Amyloide Fibrillen sind zwar unlösliche aber nicht kristalline Aggregate. Es ist daher nicht möglich die Struktur mit hochauflösenden Methoden wie der Kristallstrukturanalyse oder herkömmlicher NMR-Spektroskopie aufzuklären. Die Festphasen-NMR (*solid state-NMR*) konnte aber in den letzten Jahren einen entscheidenden Einblick in den Aufbau amyloider Fibrillen auf molekularer Ebene geben. NMR-Spektroskopie lässt sich nur mit Hilfe magnetisch aktiver Kerne (Nuklide mit ungerader Massen- oder Ordnungszahl) durchführen. Bei der herkömmlichen NMR-Spektroskopie von Lösungen ist der wichtigste Atomkern das Proton. Jedoch bei der Festphasen-NMR führen Proton-Resonanzen zu breiten Peaks die sich nicht auflösen lassen. Daher ist die Markierung mit ^{13}C und ^{15}N Isotopen notwendig. Die lassen sich mit Hilfe der Festphasenpeptidsynthese oder durch rekombinante Expression in einem Nährmedium aus ^{15}N -markiertes Ammoniumchlorid und $^{13}\text{C}_6$ -markierte Glukose. Die Verwendung von 1,3- $^{13}\text{C}_2$ -Glycerol, 2- ^{13}C -Glycerol oder 1- ^{13}C -Glycerol führt zur Reduzierung der Isotopenmarkierung, wodurch mögliche Überlappungen der Resonanzen verringert werden kann.^[626] Durch die Mischung von Isotopen-markierten Peptidsequenzen mit unmarkierten Peptidsequenzen, lassen sich mögliche Kontakte in den NMR-Spektren auf intramolekulare Kontakte begrenzen. Dies ermöglicht einen Einblick in den dreidimensionalen Aufbau einer Fibrille.^[626]

Verschiedene NMR-spektroskopische Methoden stehen zur Erhebung von strukturellen Daten zur Verfügung. Aufgrund der Überlagerung verschiedener Signale, ist es unmöglich eindimensionalen Spektren in der Festphasen-NMR-Spektroskopie zu interpretieren.^[612] Mit Hilfe von 2D-Experimenten lassen sich diese Überlagerung auflösen. Dazu wird eine Reihe von Spektren aufgenommen, die sich in der Phase und Intensität systematisch ändern. Durch Fourier-Transformation entsteht entlang einer Zeitachse eine Reihe von eindimensionalen Spektren. Durch erneute Fourier-Transformation entlang der Zeitachse entsteht aus diesen Spektren ein zweidimensionales Spektrum, das üblicherweise als Höhenliniendiagramm

dargestellt wird.^[612] Im homonuklearen 2D-Spektrum zieht sich eine diagonale Linie durch das Spektrum. Zusätzlich symmetrisch zur dieser Diagonalen sind sogenannte Kreuzsignale erkennbar, die aufgrund des Austausch der Magnetisierung zwischen zwei Kernen entstehen. Sie beruhen auf der Wechselwirkung zwischen zwei Kernen und enthalten die eigentliche Strukturinformation. Für die NMR-Spektroskopie an Biomolekülen werden im Wesentlichen drei verschiedene 2D-Experimente verwendet.

2D-COSY (*correlation spectroscopy*) ist eine zweidimensionale Methode, wobei die Kerne über skalare Kopplung miteinander korreliert werden können. Das 2D-TOCSY (*total correlated spectroscopy*) werden ebenfalls wie beim 2D-COSY die Kerne über die skalare Kopplung korreliert, jedoch können mehrere Kopplungen der in einem Spinsystem verbundenen Kerne miteinander korreliert werden.

2D-NOESY (*nuclear overhauser enhancement spectroscopy*) ist eine zweidimensionale Methode, wobei die Kerne über den Kern-Overhauser-Effekt (NOE), d.h. der dipolaren Wechselwirkung des Kernspins, und nicht über skalare Kopplung korreliert werden. Die Wechselwirkung des Kernspins wirkt durch den Raum, wobei die Korrelation vom räumlichen Abstand abhängig ist. Die Auswertung der Spektren ermöglicht eine sequentielle Zuordnung, d.h. die Zuordnung der NMR-Signale der Aminosäuren aufgrund der Wechselwirkung mit den benachbarten Aminosäuren.^[612] Mit Hilfe der chemischen Verschiebung des α -C-Atoms und β -C-Atoms lässt sich die Sekundärstruktur bestimmen. Die Torsionswinkel φ und ψ des Peptidrückgrats lassen sich auf Basis der Zuweisung der Resonanzen mit Hilfe des Programms TALOS berechnen.^[626] So lässt sich bei amyloiden Fibrillen z.B. die Ausdehnung der β -Faltblattstruktur bestimmen.^[626]

Für die tiefergehende Beschreibung der Methodik (z.B. spezifische Pulssequenzen usw.) zur Erlangung der im Rahmen dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse bezüglich der Festphasen-NMR muss ich auf die Kooperationspartner Frau Prof. Monica de Santos Freitas (Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ) und Prof. Hartmut Oschkinat (Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie, FMP) verweisen, da ich selbst die NMR-spektroskopischen Messungen nicht durchgeführt und die Spektren selbst nicht interpretiert bzw. ausgewertet habe.^[560]

15 Abkürzungsverzeichnis

Å	Angström ($0,1 \text{ nm} = 10^{-4} \mu\text{m} = 10^{-7} \text{ mm} = 10^{-10} \text{ m}$)
A β -Peptide	A β (1-40) und A β (1-42) sind Spaltprodukte der Wirkung von β - und γ -Sekretase auf des Vorläufer Protein APP und führen zu extrazellulären amyloiden Aggregaten im Rahmen der Alzheimerschen Krankheit
Abz	o-Aminobenzoessäure
ACN	Acetonitril
AFM	<i>Atomic Force Microscopy</i> , Rasterkraftmikroskopie
Aib	2-Aminoisobutylsäure
(h)APP	<i>(human) Amyloid Precursor Protein</i> ; Vorläuferprotein des A β -Peptids
AUZ (engl. AUC)	Analytische Ultrazentrifugation
Boc	tert-Butyloxycarbonyl
CD	<i>engl. circular dichroism</i> ; Zirkulardichroismus
CSF	<i>cerebrospinal fluid</i> ; engl. für Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit
Da	Dalton
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DCM	Dichlormethan
DIC	N,N'-Diisopropylcarbodiimid
DMF	Dimethylformamid
DIPEA	N,N-Diisopropylethylamine
EGCG	Epigallocatechingallat
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
FTIR	Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie
HET-s	Funktionales Prion des Pilzes <i>Podospora anserina</i> , schützt Pilzkolonien vor „fremden“ Zellen oder anderen Pilzkolonien
HFIP	Hexafluoroisopropanol
hIAPP	human islet amyloid polypeptide, wird auch als Amylin bezeichnet. (\rightarrow Amyloidogenese Typ II Diabetes)
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
ITC	<i>isothermal titration calorimetry</i> ; Isotherme Titrationskalorimetrie
MD	Moleküldynamik
MS	Massenspektrometrie
NIAD-4	[[5'-(4-Hydroxyphenyl)[2,2'-bithiophen]-5-yl]methylen]-propandinitril
NMP	N-Methyl-2-pyrrolidon
NMR	Kernspinresonanz
PEG	Polyethylenglykol
poly-Q	Ausgedehnte Glutaminsequenz im Huntington Protein (Htt), welche im Rahmen der Huntingtonschen Krankheit zu intrazellulären Aggregaten und ferner zur Neurodegenerartion führt
PrP ^C	<i>Prion Protein cellular</i> = zelluläres Prion-Protein; schützt Nervenzellen vor toxischen Substanzen wie Cu^{2+} , H_2O_2 und freien Radikalen

PrP ^{Sc}	<i>Prion Protein Scrapie</i> ; pathogene Form des Prion-Proteins; amyloides Aggregat, wirkt neurodegenerativ → Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJK)
ROS	<i>reactive oxygen species</i> ; toxische freie Sauerstoff-basierte Radikale
SEC	<i>size exclusion chromatography</i> ; Größenaustauschchromatografie
TBTU	2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylamintetrafluorborat
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TFA	Trifluoressigsäure
TFE	2,2,2-Trifluoerethanol
ThT	Thioflavin T
TIS	Triisopropylsilan
TTR	Transthyretin ; Thyroxin bindendes Präalbumin, TBPA
Ure2p	Hefe Protein; unterdrückt die Transkription von Genen, die den Stickstoffhaushalt regulieren; aggregierter Prion-Form ist inaktiv
UV	Ultraviolett ; UV-Spektroskopie
Xaa	Aminosäure (allgemein)

16 Literatur

- [1] J. D. Sipe and A. S. Cohen »Review: history of the amyloid fibril« *J. Struct. Biol.* **2000**, 130, 88-98.
- [2] F. Chiti and C. M. Dobson »Protein misfolding, functional amyloid, and human disease« *Annu. Rev. Biochem.* **2006**, 75, 333-366.
- [3] J. Meinhardt and M. Fändrich »[Structure of amyloid fibrils]« *Pathologe* **2009**, 30, 175-181.
- [4] O. S. Makin and L. C. Serpell »Structures for amyloid fibrils« *FEBS J.* **2005**, 272, 5950-5961.
- [5] ADI »Welt-Alzheimer-Bericht « **2010**. <http://www.alz.co.uk/research/world-report>
- [6] A. Abbott »Dementia: a problem for our age« *Nature* **2011**, 475, S2-4.
- [7] J. Hardy and D. J. Selkoe »The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics« *Science* **2002**, 297, 353-356.
- [8] I. W. Hamley »Peptide Fibrillization« *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2007**, 46, 8128-8147.
- [9] V. Munoz »Protein Folding, Misfolding and Aggregation - Classical Themes and Novel Approaches« RSC Publishing, Cambridge, **2008**.
- [10] J. L. Jimenez, E. J. Nettleton, M. Bouchard, C. V. Robinson, C. M. Dobson and H. R. Saibil »The protofilament structure of insulin amyloid fibrils« *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 9196-9201.
- [11] J. L. Jiménez, J. I. Guijarro, E. Orlova, J. Zurdo, C. M. Dobson, M. Sunde and H. R. Saibil »Cryo-electron microscopy structure of an SH3 amyloid fibril and model of the molecular packing« *EMBO J.* **1999**, 18, 815-821.
- [12] C. Sachse, N. Grigorieff and M. Fändrich »Nanoscale flexibility parameters of Alzheimer amyloid fibrils determined by electron cryo-microscopy« *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2010**, 49, 1321-1323.
- [13] J. L. Jimenez, G. Tennent, M. Pepys and H. R. Saibil »Structural diversity of ex vivo amyloid fibrils studied by cryo-electron microscopy« *J. Mol. Biol.* **2001**, 311, 241-247.
- [14] A. T. Petkova, R. D. Leapman, Z. Guo, W.-M. Yau, M. P. Mattson and R. Tycko »Self-propagating, molecular-level polymorphism in Alzheimer's beta-amyloid fibrils« *Science* **2005**, 307, 262-265.
- [15] M. Fändrich, M. Schmidt and N. Grigorieff »Recent progress in understanding Alzheimer's beta-amyloid structures« *Trends Biochem. Sci.* **2011**, 36, 338-345.
- [16] R. Kodali, A. D. Williams, S. Chemuru and R. Wetzel »Abeta(1-40) forms five distinct amyloid structures whose beta-sheet contents and fibril stabilities are correlated« *J. Mol. Biol.* **2010**, 401, 503-517.
- [17] G. Habicht, C. Haupt, R. P. Friedrich, P. Hortschansky, C. Sachse, J. Meinhardt, K. Wieligmann, G. P. Gellermann, M. Brodhun, J. Götz, K.-J. Halbhuber, C. Röcken, U. Horn and M. Fändrich »Directed selection of a conformational antibody domain that prevents mature amyloid fibril formation by stabilizing Abeta protofibrils« *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2007**, 104, 19232-19237.
- [18] J. Meinhardt, C. Sachse, P. Hortschansky, N. Grigorieff and M. Fändrich »Abeta(1-40) fibril polymorphism implies diverse interaction patterns in amyloid fibrils« *J. Mol. Biol.* **2009**, 386, 869-877.
- [19] A. K. Paravastu, R. D. Leapman, W.-M. Yau and R. Tycko »Molecular structural basis for polymorphism in Alzheimer's beta-amyloid fibrils« *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2008**, 105, 18349-18354.
- [20] E. Hellstrand, B. Boland, D. M. Walsh and S. Linse »Amyloid β -Protein Aggregation Produces Highly Reproducible Kinetic Data and Occurs by a Two-Phase Process« *ACS Chem. Neurosci.* **2010**, 1, 13-18.

- [21] M. G. Zagorski, J. Yang, H. Shao, K. Ma, H. Zeng and A. Hong »Methodological and chemical factors affecting amyloid beta peptide amyloidogenicity« *Methods Enzymol.* **1999**, 309, 189-204.
- [22] B. O'Nuallain, A. K. Thakur, A. D. Williams, A. M. Bhattacharyya, S. Chen, G. Thiagarajan, R. Wetzel, I. Kheterpal and R. Wetzel »Kinetics and Thermodynamics of Amyloid Assembly Using a High-Performance Liquid Chromatography–Based Sedimentation Assay « *Methods Enzymol.* **2006**, 34-74.
- [23] W. S. Gosal, I. J. Morten, E. W. Hewitt, D. A. Smith, N. H. Thomson and S. E. Radford »Competing pathways determine fibril morphology in the self-assembly of β 2-microglobulin into amyloid« *J. Mol. Biol.* **2005**, 351, 850-864.
- [24] K. Klement, K. Wieligmann, J. Meinhardt, P. Hortschansky, W. Richter and M. Fandrich »Effect of different salt ions on the propensity of aggregation and on the structure of Alzheimer's abeta(1-40) amyloid fibrils« *J. Mol. Biol.* **2007**, 373, 1321-1333.
- [25] R. Verel, I. T. Tomka, C. Bertozzi, R. Cadalbert, R. A. Kammerer, M. O. Steinmetz and B. H. Meier »Polymorphism in an Amyloid-Like Fibril-Forming Model Peptide« *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2008**, 47, 5842 - 5845.
- [26] A. K. Paravastu, A. T. Petkova and R. Tycko »Polymorphic fibril formation by residues 10-40 of the Alzheimer's beta-amyloid peptide« *Biophys. J.* **2006**, 90, 4618-4629.
- [27] M. Tanaka, S. R. Collins, B. H. Toyama and J. S. Weissman »The physical basis of how prion conformations determine strain phenotypes« *Nature* **2006**, 442, 585-589.
- [28] R. Kodali and R. J. Wetzel »Polymorphism in the intermediates and products of amyloid assembly« *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2007**, 17, 48-57.
- [29] C. Blake and L. Serpell »Synchrotron X-ray studies suggest that the core of the transthyretin amyloid fibril is a continuous beta-sheet helix« *Structure* **1996**, 4, 989-998.
- [30] M. Sunde, L. C. Serpell, M. Bartlam, P. E. Fraser, M. B. Pepys and C. C. Blake »Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction« *J. Mol. Biol.* **1997**, 273, 729-739.
- [31] O. S. Makin, E. Atkins, P. Sikorski, J. Johansson and L. C. Serpell »Molecular basis for amyloid fibril formation and stability« *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**, 102, 315-320.
- [32] R. Tycko »Solid-state NMR as a probe of amyloid structure« *Protein. Pept. Lett.* **2006**, 13, 229-234.
- [33] R. Tycko »Solid-state NMR studies of amyloid fibril structure« *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2011**, 62, 279-299.
- [34] R. J. Tycko »Progress towards a molecular-level structural understanding of amyloid fibrils« *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2004**, 14 96-103.
- [35] A. T. Petkova, Y. Ishii, J. J. Balbach, O. N. Antzutkin, R. D. Leapman, F. Delaglio and R. Tycko »A structural model for Alzheimer's beta -amyloid fibrils based on experimental constraints from solid state NMR« *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2002**, 99, 16742-16747.
- [36] T. Lührs, C. Ritter, M. Adrian, D. Riek-Loher, B. Bohrmann, H. Dobeli, D. Schubert and R. Riek »3D structure of Alzheimer's amyloid- β (1-42) fibrils« *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2005**, 102, 17342-17347.
- [37] A. K. Paravastu, I. Qahwash, R. D. Leapman, S. C. Meredith and R. Tycko »Seeded growth of beta-amyloid fibrils from Alzheimer's brain-derived fibrils produces a distinct fibril structure« *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2009**, 106, 7443-7448.
- [38] C. Wasmer, L. Benkemoun, R. Sabate, M. O. Steinmetz, B. Coulary-Salin, L. Wang, R. Riek, S. J. Saupé and B. H. Meier »Solid-state NMR spectroscopy reveals that E. coli inclusion bodies of HET-s(218-289) are amyloids« *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2009**, 48, 4858-4860.
- [39] C. Wasmer, A. Lange, H. Van Melckebeke, A. B. Siemer, R. Riek and B. H. Meier »Amyloid fibrils of the HET-s(218-289) prion form a beta solenoid with a triangular hydrophobic core« *Science* **2008**, 319, 1523-1526.

- [40] C. Wasmer, A. Schütz, A. Loquet, C. Buhtz, J. Greenwald, R. Riek, A. Böckmann and B. H. Meier »The molecular organization of the fungal prion HET-s in its amyloid form« *J. Mol. Biol.* **2009**, 394, 119-127.
- [41] C. Wasmer, A. Soragni, R. Sabate, A. Lange, R. Riek and B. H. Meier »Infectious and noninfectious amyloids of the HET-s(218-289) prion have different NMR spectra« *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2008**, 47, 5839-5841.
- [42] A. V. Kajava and A. C. Steven »Beta-rolls, beta-helices, and other beta-solenoid proteins« *Adv. Protein. Chem.* **2006**, 73, 55-96.
- [43] M. F. Perutz, J. T. Finch, J. Berriman and A. J. Lesk »Amyloid fibers are water-filled nanotubes« *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2002**, 99, 5591-5595.
- [44] R. B. Wickner, F. Dyda and R. Tycko »Amyloid of Rnq1p, the basis of the [PIN+] prion, has a parallel in-register beta-sheet structure« *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2008**, 105, 2403-2408.
- [45] F. Shewmaker, R. P. McGlinchey, K. R. Thurber, P. McPhie, F. Dyda, R. Tycko and R. B. Wickner »The functional curli amyloid is not based on in-register parallel beta-sheet structure« *J. Biol. Chem.* **2009**, 284, 25065-25076.
- [46] F. Shewmaker, D. Kryndushkin, B. Chen, R. Tycko and R. B. Wickner »Two prion variants of Sup35p have in-register parallel beta-sheet structures, independent of hydration« *Biochemistry* **2009**, 48, 5074-5082.
- [47] M. T. Pastor, A. Esteras-Chopo and L. Serrano »Hacking the code of amyloid formation: the amyloid stretch hypothesis« *Prion* **2007**, 1, 9-14.
- [48] C. M. Dobson »Protein misfolding, evolution and disease« *Trends Biochem. Sci.* **1999**, 24, 329-332.
- [49] J. W. Kelly »The alternative conformations of amyloidogenic proteins and their multi-step assembly pathways« *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1998**, 8, 101-106.
- [50] J. C. Rochet and P. T. J. J. Lansbury »Amyloid fibrillogenesis: themes and variations« *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2000**, 10, 60-68.
- [51] K. L. Sciarretta, D. J. Gordon and S. C. Meredith »Peptide-based inhibitors of amyloid assembly« *Methods Enzymol.* **2006**, 413, 273-312.
- [52] M. Fändrich and C. M. Dobson »The behaviour of polyamino acids reveals an inverse side chain effect in amyloid structure formation« *EMBO J.* **2002**, 21, 5682-5690.
- [53] T. Yamashita, Y. Takahashi, T. Takahashi and H. Mihara »Inhibition of peptide amyloid formation by cationic peptides with homologous sequences« *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, 13, 4051-4054.
- [54] M. I. Ivanova, M. R. Sawaya, M. Gingery, A. Attinger and D. Eisenberg »An amyloid-forming segment of beta2-microglobulin suggests a molecular model for the fibril« *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2004**, 101, 10584-10589.
- [55] K. Tenidis, M. Waldner, J. Bernhagen, W. Fischle, M. Bergmann, M. Weber, M. L. Merkle, W. Voelter, H. Brunner and A. Kapurniotu »Identification of a penta- and hexapeptide of islet amyloid polypeptide (IAPP) with amyloidogenic and cytotoxic properties« *J. Mol. Biol.* **2000**, 295, 1055-1071.
- [56] L. O. Tjernberg, J. Naslund, F. Lindqvist, J. Johansson, A. R. Karlström, J. Thyberg, L. Terenius and C. Nordstedt »Arrest of beta-amyloid fibril formation by a pentapeptide ligand« *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 8545-8548.
- [57] S. Ventura, J. s. Zurdo, S. Narayanan, M. Parreo, R. n. Mangués, B. Reif, F. Chiti, E. Giannoni, C. M. Dobson, F. X. Aviles and L. Serrano »Short amino acid stretches can mediate amyloid formation in globular proteins: the Src homology 3 (SH3) case« *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2004**, 101, 7258-7263.
- [58] M. von Bergen, P. Friedhoff, J. Biernat, J. Heberle, E. M. Mandelkow and E. Mandelkow »Assembly of tau protein into Alzheimer paired helical filaments depends on a local sequence motif ((306)VQIVYK(311)) forming beta structure« *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2000**, 97, 5129-5134.

- [59] A. Esteras-Chopo, L. Serrano and M. L. de la Paz »The amyloid stretch hypothesis: Recruiting proteins toward the dark side« *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2005**, 102, 16672-16677.
- [60] C. Wurth, N. K. Guimard and M. H. Hecht »Mutations that reduce aggregation of the Alzheimer's Abeta42 peptide: an unbiased search for the sequence determinants of Abeta amyloidogenesis« *J. Mol. Biol.* **2002**, 319, 1279-1290.
- [61] H. Amijee, J. Madine, D. A. Middleton and A. J. Doig »Inhibitors of protein aggregation and toxicity« *Biochem. Soc. Trans.* **2009**, 37, 692-696.
- [62] M. Lopez de la Paz, K. Goldie, J. Zurdo, E. Lacroix, C. M. Dobson, A. Hoenger and L. Serrano »De novo designed peptide-based amyloid fibrils« *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2002**, 99, 16052-16057.
- [63] M. Lopez de la Paz and L. Serrano »Sequence determinants of amyloid fibril formation« *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2004**, 101, 87-92.
- [64] S. Zhang and A. J. Rich »Direct conversion of an oligopeptide from a beta-sheet to an alpha-helix: a model for amyloid formation« *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1997**, 94, 23-28.
- [65] M. R. Caplan, E. M. Schwartzfarb, S. Zhang, R. D. Kamm and D. A. Lauffenburger »Control of self-assembling oligopeptide matrix formation through systematic variation of amino acid sequence« *Biomaterials* **2002**, 23, 219-227.
- [66] J. Zurdo, J. I. Guijarro, J. L. Jimenez, H. R. Saibil and C. M. Dobson »Dependence on solution conditions of aggregation and amyloid formation by an SH3 domain« *J. Mol. Biol.* **2001**, 311, 325-340.
- [67] A. Aggeli, I. A. Nyrkova, M. Bell, R. Harding, L. Carrick, T. C. McLeish, A. N. Semenov and N. Boden »Hierarchical self-assembly of chiral rod-like molecules as a model for peptide beta-sheet tapes, ribbons, fibrils, and fibers« *Proc Natl Acad Sci U S A* **2001**, 98, 11857-11862.
- [68] A. Esteras-Chopo, M. T. Pastor and L. Serrano »Protein Misfolding and β -Amyloid Formation in: Munoz, V. (2008) Protein Folding, Misfolding and Aggregation.« RSC Publishing, Cambridge, **2008**.
- [69] F. Chiti, M. Stefani, N. Taddei, G. Ramponi and C. M. Dobson »Rationalization of the effects of mutations on peptide and protein aggregation rates« *Nature* **2003**, 424, 805-808.
- [70] K. E. Marshall, K. L. Morris, D. Charlton, N. O'Reilly, L. Lewis, H. Walden and L. C. Serpell »Hydrophobic, aromatic, and electrostatic interactions play a central role in amyloid fibril formation and stability« *Biochemistry* **2011**, 50, 2061-2071.
- [71] F. Bemporad, G. Calloni, S. Campioni, G. Plakoutsi, N. Taddei and F. Chiti »Sequence and structural determinants of amyloid fibril formation« *Acc. Chem. Res.* **2006**, 39, 620-627.
- [72] W. Kim and M. H. Hecht »Sequence determinants of enhanced amyloidogenicity of Alzheimer A{beta}42 peptide relative to A{beta}40« *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 35069-35076.
- [73] A. D. Williams, E. Portelius, I. Kheterpal, J.-t. Guo, K. D. Cook, Y. Xu and R. Wetzel »Mapping abeta amyloid fibril secondary structure using scanning proline mutagenesis« *J. Mol. Biol.* **2004**, 335, 833-842.
- [74] F. Shewmaker, R. P. McGlinchey and R. B. Wickner »Structural insights into functional and pathological amyloid« *J. Biol. Chem.* **2011**, 286, 16533-16540.
- [75] D. Eisenberg, R. Nelson, M. R. Sawaya, M. Balbirnie, S. Sambashivan, M. I. Ivanova, A. O. Madsen and C. Riek »The structural biology of protein aggregation diseases: fundamental questions and some answers« *Acc. Chem. Res.* **2006**, 39, 568-575.
- [76] M. I. Apostol, M. R. Sawaya, D. Cascio and D. Eisenberg »Crystallographic studies of prion protein (PrP) segments suggest how structural changes encoded by polymorphism at residue 129 modulate susceptibility to human prion disease« *J. Biol. Chem.* **2010**, 285, 29671-29675.

- [77] M. R. Sawaya, S. Sambashivan, R. Nelson, M. I. Ivanova, S. A. Sievers, M. I. Apostol, M. J. Thompson, M. Balbirnie, J. J. W. Wiltzius, H. T. McFarlane, A. O. Madsen, C. Riek and D. Eisenberg »Atomic structures of amyloid cross- β spines reveal varied steric zippers« *Nature* **2007**, 447, 453-457.
- [78] R. Nelson, M. R. Sawaya, M. Balbirnie, A. O. Madsen, C. Riek, R. Grothe and D. Eisenberg »Structure of the cross- β spine of amyloid-like fibrils« *Nature* **2005**, 435, 773-778.
- [79] M. J. Thompson, S. A. Sievers, J. Karanicolas, M. I. Ivanova, D. Baker and D. Eisenberg »The 3D profile method for identifying fibril-forming segments of proteins« *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2006**, 103, 4074-4078.
- [80] M. I. Ivanova, S. A. Sievers, M. R. Sawaya, J. S. Wall and D. Eisenberg »Molecular basis for insulin fibril assembly« *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2009**, 106, 18990-18995.
- [81] M. I. Apostol, J. J. Wiltzius, M. R. Sawaya, D. Cascio and D. Eisenberg »Atomic structures suggest determinants of transmission barriers in mammalian prion disease« *Biochemistry* **2011**, 50, 2456-2463.
- [82] S. A. Sievers, J. Karanicolas, H. W. Chang, A. Zhao, L. Jiang, O. Zirafi, J. T. Stevens, J. Munch, D. Baker and D. Eisenberg »Structure-based design of non-natural amino-acid inhibitors of amyloid fibril formation« *Nature* **2011**, 475, 96-100.
- [83] M. F. Perutz, T. Johnson, M. Suzuki and J. T. Finch »Glutamine repeats as polar zippers: their possible role in inherited neurodegenerative diseases« *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1994**, 91, 5355-5358.
- [84] F. U. Hartl and M. Hayer-Hartl »Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein« *Science* **2002**, 295, 1852-1858.
- [85] E. Zerovnik, V. Stoka, A. Mirtic, G. Guncar, J. Grdadolnik, R. A. Staniforth, D. Turk and V. Turk »Mechanisms of amyloid fibril formation--focus on domain-swapping« *FEBS J.* **2011**, 278, 2263-2282.
- [86] A. P. Pawar, K. F. Dubay, J. s. Zurdo, F. Chiti, M. Vendruscolo and C. M. Dobson »Prediction of "aggregation-prone" and "aggregation-susceptible" regions in proteins associated with neurodegenerative diseases« *J. Mol. Biol.* **2005**, 350, 379-392.
- [87] E. Gazit »A possible role for π -stacking in the self-assembly of amyloid fibrils« *FASEB J.* **2002**, 16, 77-83.
- [88] S. M. Tracz, A. Abedini, M. Driscoll and D. P. Raleigh »Role of aromatic interactions in amyloid formation by peptides derived from human Amylin« *Biochemistry* **2004**, 43, 15901-15908.
- [89] E. Gazit »Self-assembled peptide nanostructures: the design of molecular building blocks and their technological utilization« *Chem. Soc. Rev.* **2007**, 36, 1263-1269.
- [90] R. Azriel and E. Gazit »Analysis of the minimal amyloid-forming fragment of the islet amyloid polypeptide. An experimental support for the key role of the phenylalanine residue in amyloid formation« *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 34156-34161.
- [91] Y. Porat, Y. Mazor, S. Efrat and E. Gazit »Inhibition of islet amyloid polypeptide fibril formation: a potential role for heteroaromatic interactions« *Biochemistry* **2004**, 43, 14454-14462.
- [92] M. Reches, Y. Porat and E. Gazit »Amyloid Fibril Formation by Pentapeptide and Tetrapeptide Fragments of Human Calcitonin« *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 35475-35480.
- [93] M. Reches and E. Gazit »Amyloidogenic hexapeptide fragment of medin: homology to functional islet amyloid polypeptide fragments« *Amyloid* **2004**, 11, 81-89.
- [94] Y. Porat, A. Stepensky, F.-X. Ding, F. Naider and E. Gazit »Completely different amyloidogenic potential of nearly identical peptide fragments« *Biopolymers* **2003**, 69, 161-164.
- [95] A. Aggeli, M. Bell, N. Boden, J. N. Keen, P. F. Knowles, T. C. McLeish, M. Pitkeathly and S. E. Radford »Responsive gels formed by the spontaneous self-assembly of peptides into polymeric beta-sheet tapes« *Nature* **1997**, 386, 259-262.

- [96] S. K. Burley and G. A. Petsko »Aromatic-aromatic interaction: a mechanism of protein structure stabilization« *Science* **1985**, 229, 23-28.
- [97] F. Bemporad, N. Taddei, M. Stefani and F. Chiti »Assessing the role of aromatic residues in the amyloid aggregation of human muscle acylphosphatase« *Protein Sci.* **2006**, 15, 862-870.
- [98] R. Nelson and D. Eisenberg »Recent atomic models of amyloid fibril structure« *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2006**, 16, 260-265.
- [99] P. Sikorski and E. Atkins »New model for crystalline polyglutamine assemblies and their connection with amyloid fibrils« *Biomacromolecules* **2005**, 6, 425-432.
- [100] R. Krishnan and S. L. Lindquist »Structural insights into a yeast prion illuminate nucleation and strain diversity« *Nature* **2005**, 435, 765-772.
- [101] J. S. Elam, A. B. Taylor, R. Strange, S. Antonyuk, P. A. Doucette, J. A. Rodriguez, S. S. Hasnain, L. J. Hayward, J. S. Valentine, T. O. Yeates and P. J. Hart »Amyloid-like filaments and water-filled nanotubes formed by SOD1 mutant proteins linked to familial ALS« *Nat. Struct. Biol.* **2003**, 10, 461-467.
- [102] S. Sambashivan, Y. Liu, M. R. Sawaya, M. Gingery and D. Eisenberg »Amyloid-like fibrils of ribonuclease A with three-dimensional domain-swapped and native-like structure« *Nature* **2005**, 437, 266-269.
- [103] R. Nelson and D. Eisenberg »Structural models of amyloid-like fibrils« *Adv. Protein Chem.* **2006**, 73, 235-282.
- [104] M. J. Bennett, M. R. Sawaya and D. Eisenberg »Deposition diseases and 3D domain swapping« *Structure* **2006**, 14, 811-824.
- [105] C. Liu, M. R. Sawaya and D. Eisenberg »beta-microglobulin forms three-dimensional domain-swapped amyloid fibrils with disulfide linkages« *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2011**, 18, 49-55.
- [106] K. Domanska, S. Vanderhaegen, V. Srinivasan, E. Pardon, F. Dupeux, J. A. Marquez, S. Giorgetti, M. Stoppini, L. Wyns, V. Bellotti and J. Steyaert »Atomic structure of a nanobody-trapped domain-swapped dimer of an amyloidogenic beta2-microglobulin variant« *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2011**, 108, 1314-1319.
- [107] M. Wahlbom, X. Wang, V. Lindstrom, E. Carlemalm, M. Jaskolski and A. Grubb »Fibrillogenic oligomers of human cystatin C are formed by propagated domain swapping« *J. Biol. Chem.* **2007**, 282, 18318-18326.
- [108] M. Orlikowska, E. Jankowska, R. Kolodziejczyk, M. Jaskolski and A. Szymanska »Hinge-loop mutation can be used to control 3D domain swapping and amyloidogenesis of human cystatin C« *J. Struct. Biol.* **2010**, 173, 406-413.
- [109] B. Japelj, J. P. Walther and R. Jerala »Comparison of backbone dynamics of monomeric and domain-swapped stefin A« *Proteins* **2004**, 54, 500-512.
- [110] D. M. Walsh, A. Lomakin, G. B. Benedek, M. M. Condron and D. B. J. Teplow »Amyloid b-protein fibrillogenesis« *J Biol Chem* **1997**, 272, 22364-22372.
- [111] J. D. Harper and P. T. Lansbury, Jr. »Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie: mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of amyloid proteins« *Annu. Rev. Biochem.* **1997**, 66, 385-407.
- [112] F. Chiti and C. M. Dobson »Amyloid formation by globular proteins under native conditions« *Nat. Chem. Biol.* **2009**, 5, 15-22.
- [113] V. N. Uversky and A. L. Fink »Conformational constraints for amyloid fibrillation: the importance of being unfolded« *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **2004**, 1698, 131-153.
- [114] M. Stefani »Protein misfolding and aggregation: new examples in medicine and biology of the dark side of the protein world« *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, 1739, 5-25.

- [115] J. I. Guijarro, M. Sunde, J. A. Jones, I. D. Campbell and C. M. Dobson »Amyloid fibril formation by an SH3 domain« *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1998**, 95, 4224-4228.
- [116] V. J. McParland, N. M. Kad, A. P. Kalverda, A. Brown, P. Kirwin-Jones, M. G. Hunter, M. Sunde and S. E. Radford »Partially Unfolded States of b2-Microglobulin and Amyloid Formation in Vitro« *Biochemistry* **2000**, 39, 8735-8746.
- [117] S. V. Litvinovich, S. A. Brew, S. Aota, S. K. Akiyama, C. Haudenschild and K. C. Ingham »Formation of amyloid-like fibrils by self-association of a partially unfolded fibronectin type III module« *J. Mol. Biol.* **1998**, 280, 245-258.
- [118] M. Fandrich, M. A. Fletcher and C. M. Dobson »Amyloid fibrils from muscle myoglobin« *Nature* **2001**, 410, 165-166.
- [119] A. D. Ferrao-Gonzales, S. O. Souto, J. L. Silva and D. Foguel »The preaggregated state of an amyloidogenic protein: hydrostatic pressure converts native transthyretin into the amyloidogenic state« *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2000**, 97, 6445-6450.
- [120] F. G. De Felice, M. N. Vieira, M. N. Meirelles, L. A. Morozova-Roche, C. M. Dobson and S. T. Ferreira »Formation of amyloid aggregates from human lysozyme and its disease-associated variants using hydrostatic pressure« *FASEB J.* **2004**, 18, 1099-1101.
- [121] F. Chiti, P. Webster, N. Taddei, A. Clark, M. Stefani, G. Ramponi and C. M. Dobson »Designing conditions for in vitro formation of amyloid protofilaments and fibrils« *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1999**, 96, 3590-3594.
- [122] J. P. Schmittschmitt and J. M. Scholtz »The role of protein stability, solubility, and net charge in amyloid fibril formation« *Protein Sci* **2003**, 12, 2374-2378.
- [123] C. M. Dobson »Getting out of shape« *Nature* **2002**, 418, 729-730.
- [124] J. W. Kelly »Mechanisms of amyloidogenesis« *Nat. Struct. Biol.* **2000**, 7, 824-826.
- [125] M. M. Pallitto and R. M. Murphy »A mathematical model of the kinetics of beta-amyloid fibril growth from the denatured state« *Biophys. J.* **2001**, 81, 1805-1822.
- [126] E. T. Powers and D. L. Powers »Mechanisms of protein fibril formation: nucleated polymerization with competing off-pathway aggregation« *Biophys. J.* **2008**, 94, 379-391.
- [127] H. A. Lashuel, D. Hartley, B. M. Petre, T. Walz and P. T. Lansbury, Jr. »Neurodegenerative disease: amyloid pores from pathogenic mutations« *Nature* **2002**, 418, 291.
- [128] G. Bitan, M. D. Kirkitadze, A. Lomakin, S. S. Vollers, G. B. Benedek and D. B. Teplow »Amyloid beta - protein (Abeta) assembly: Abeta 40 and Abeta 42 oligomerize through distinct pathways« *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2003**, 100, 330-335.
- [129] M. Hoshi, M. Sato, S. Matsumoto, A. Noguchi, K. Yasutake, N. Yoshida and K. Sato »Spherical aggregates of beta-amyloid (amylospheroid) show high neurotoxicity and activate tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3beta« *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2003**, 100, 6370-6375.
- [130] N. Yamamoto, E. Matsubara, S. Maeda, H. Minagawa, A. Takashima, W. Maruyama, M. Michikawa and K. Yanagisawa »A ganglioside-induced toxic soluble Abeta assembly. Its enhanced formation from Abeta bearing the Arctic mutation« *J. Biol. Chem.* **2007**, 282, 2646-2655.
- [131] C. G. Glabe »Structural classification of toxic amyloid oligomers« *J. Biol. Chem.* **2008**, 283, 29639-29643.
- [132] R. Roychaudhuri, M. Yang, M. M. Hoshi and D. B. Teplow »Amyloid beta-protein assembly and Alzheimer disease« *J. Biol. Chem.* **2009**, 284, 4749-4753.
- [133] G. Bitan, E. A. Fradinger, S. M. Spring and D. B. Teplow »Neurotoxic protein oligomers--what you see is not always what you get« *Amyloid* **2005**, 12, 88-95.

- [134] N. D. Hammer, X. Wang, B. A. McGuffie and M. R. Chapman »Amyloids: friend or foe?« *J. Alzheimers Dis.* **2008**, 13, 407-419.
- [135] S. K. Maji, M. H. Perrin, M. R. Sawaya, S. Jessberger, K. Vadodaria, R. A. Rissman, P. S. Singru, K. P. R. Nilsson, R. Simon, D. Schubert, D. Eisenberg, J. Rivier, P. Sawchenko, W. Vale and R. Riek »Functional amyloids as natural storage of peptide hormones in pituitary secretory granules« *Science* **2009**, 325, 328-332.
- [136] B. Caughey and P. T. Lansbury »Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders« *Annu. Rev. Neurosci.* **2003**, 26, 267-298.
- [137] R. Kaye, E. Head, J. L. Thompson, T. M. McIntire, S. C. Milton, C. W. Cotman and C. G. Glabe »Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis« *Science* **2003**, 300, 486-489.
- [138] M. D. Kirkitadze, G. Bitan and D. B. Teplow »Paradigm shifts in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders: the emerging role of oligomeric assemblies« *J. Neurosci. Res.* **2002**, 69, 567-577.
- [139] P. T. Lansbury and H. A. Lashuel »A century-old debate on protein aggregation and neurodegeneration enters the clinic« *Nature* **2006**, 443, 774-779.
- [140] D. M. Walsh and D. J. Selkoe »Oligomers on the brain: the emerging role of soluble protein aggregates in neurodegeneration« *Protein Pept. Lett.* **2004**, 11, 213-228.
- [141] E. H. Corder, A. M. Saunders, W. J. Strittmatter, D. E. Schmechel, P. C. Gaskell, G. W. Small, A. D. Roses, J. L. Haines and M. A. Pericak-Vance »Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families« *Science* **1993**, 261, 921-923.
- [142] E. I. Rogae, R. Sherrington, E. A. Rogae, G. Levesque, M. Ikeda, Y. Liang, H. Chi, C. Lin, K. Holman, T. Tsuda and et al. »Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene« *Nature* **1995**, 376, 775-778.
- [143] K. J. Barnham and A. I. Bush »Metals in Alzheimer's and Parkinson's Diseases« *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, 12, 222-228.
- [144] J. Pronchik, X. He, J. T. Giurleo and D. S. Talaga »In Vitro Formation of Amyloid from alpha-Synuclein Is Dominated by Reactions at Hydrophobic Interfaces« *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132(28), 9797-9803.
- [145] A. Alonso, T. Zaidi, M. Novak, I. Grundke-Iqbal and K. Iqbal »Hyperphosphorylation induces self-assembly of tau into tangles of paired helical filaments/straight filaments« *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2001**, 98, 6923-6928.
- [146] H. Sato, S. Arawaka, S. Hara, S. Fukushima, K. Koga, S. Koyama and T. Kato »Authentically phosphorylated alpha-synuclein at Ser129 accelerates neurodegeneration in a rat model of familial Parkinson's disease« *J. Neurosci.* **2011**, 31, 16884-16894.
- [147] S. L. Myers, S. Jones, T. R. Jahn, I. J. Morten, G. A. Tennent, E. W. Hewitt and S. E. Radford »A systematic study of the effect of physiological factors on beta2-microglobulin amyloid formation at neutral pH« *Biochemistry* **2006**, 45, 2311-2321.
- [148] A. J. Borysik, I. J. Morten, S. E. Radford and E. W. Hewitt »Specific glycosaminoglycans promote unseeded amyloid formation from beta2-microglobulin under physiological conditions« *Kidney Int.* **2007**, 72, 174-181.
- [149] N. P. Reynolds, A. Soragni, M. Rabe, D. Verdes, E. Liverani, S. Handschin, R. Riek and S. Seeger »Mechanism of Membrane Interaction and Disruption by alpha-Synuclein« *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 19366-19375.
- [150] J. R. Brender, S. Salamekh and A. Ramamoorthy »Membrane Disruption and Early Events in the Aggregation of the Diabetes Related Peptide IAPP from a Molecular Perspective« *Acc. Chem. Res.* **2011**, [Epub ahead of print].

- [151] T. L. Williams and L. C. Serpell »Membrane and surface interactions of Alzheimer's Abeta peptide-- insights into the mechanism of cytotoxicity« *FEBS. J.* **2011**, 278, 3905-3917.
- [152] S. M. Butterfield and H. A. Lashuel »Amyloidogenic protein-membrane interactions: mechanistic insight from model systems« *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2010**, 49, 5628-5654.
- [153] H. Jang, F. T. Arce, S. Ramachandran, R. Capone, R. Azimova, B. L. Kagan, R. Nussinov and R. Lal »Truncated beta-amyloid peptide channels provide an alternative mechanism for Alzheimer's Disease and Down syndrome« *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2010**, 107, 6538-6543.
- [154] N. B. Last, E. Rhoades and A. D. Miranker »Islet amyloid polypeptide demonstrates a persistent capacity to disrupt membrane integrity« *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, 108, 9460-9465.
- [155] R. Jakob-Roetne and H. Jacobsen »Alzheimer's Disease: From Pathology to Therapeutic Approaches« *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2009**, 48, 3030-3059.
- [156] C. Kuwahara, A. M. Takeuchi, T. Nishimura, K. Haraguchi, A. Kubosaki, Y. Matsumoto, K. Saeki, Y. Matsumoto, T. Yokoyama, S. Itohara and T. Onodera »Prions prevent neuronal cell-line death« *Nature* **1999**, 400, 225-226.
- [157] S. Chandra, G. Gallardo, R. Fernandez-Chacon, O. M. Schluter and T. C. Sudhof »Alpha-synuclein cooperates with CSPalpha in preventing neurodegeneration« *Cell* **2005**, 123, 383-396.
- [158] A. S. Rambold, M. Miesbauer, D. Olschewski, R. Seidel, C. Riemer, L. Smale, L. Brumm, M. Levy, E. Gazit, D. Oesterhelt, M. Baier, C. F. Becker, M. Engelhard, K. F. Winklhofer and J. Tatzelt »Green tea extracts interfere with the stress-protective activity of PrP and the formation of PrP« *J. Neurochem.* **2008**, 107, 218-229.
- [159] A. Abedini and D. P. Raleigh »A role for helical intermediates in amyloid formation by natively unfolded polypeptides?« *Phys. Biol.* **2009**, 6, 15005.
- [160] A. Abedini and D. P. Raleigh »A critical assessment of the role of helical intermediates in amyloid formation by natively unfolded proteins and polypeptides« *Protein Eng. Des. Sel.* **2009**, 22, 453-459.
- [161] M. D. Kirkitadze, M. M. Condrón and D. B. Teplow »Identification and characterization of key kinetic intermediates in amyloid beta-protein fibrillogenesis« *J. Mol. Biol.* **2001**, 312, 1103-1119.
- [162] D. B. Teplow, N. D. Lazo, G. Bitan, S. Bernstein, T. Wytenbach, M. T. Bowers, A. Baumketner, J. E. Shea, B. Urbanc, L. Cruz, J. Borreguero and H. E. Stanley »Elucidating Amyloid β -Protein Folding and Assembly: A Multidisciplinary Approach« *Acc. Chem. Res.* **2006**, 39, 635-645.
- [163] M. Dasari, A. Espargaro, R. Sabate, J. M. Lopez Del Amo, U. Fink, G. Grelle, J. Bieschke, S. Ventura and B. Reif »Bacterial Inclusion Bodies of Alzheimer's Disease beta-Amyloid Peptides Can Be Employed To Study Native-Like Aggregation Intermediate States« *Chembiochem* **2011**, 12(3), 407-423.
- [164] M. Ito, J. Johansson, R. Stromberg and L. Nilsson »Unfolding of the Amyloid beta-Peptide Central Helix: Mechanistic Insights from Molecular Dynamics Simulations« *PLoS One* **2011**, 6, e17587.
- [165] Y. Kallberg, M. Gustafsson, B. Persson, J. Thyberg and J. Johansson »Prediction of amyloid fibril-forming proteins« *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 12945-12950.
- [166] C. Nerelius, A. Sandegren, H. Sargsyan, R. Raunak, H. Leijonmarck, U. Chatterjee, A. Fisahn, S. Imarisio, D. A. Lomas, D. C. Crowther, R. Stromberg and J. Johansson »Alpha-helix targeting reduces amyloid-beta peptide toxicity« *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **2009**, 106, 9191-9196.
- [167] J. A. Williamson, J. P. Loria and A. D. Miranker »Helix stabilization precedes aqueous and bilayer-catalyzed fiber formation in islet amyloid polypeptide« *J. Mol. Biol.* **2009**, 393, 383-396.
- [168] G. Liu, A. Prabhakar, D. Aucoin, M. Simon, S. Sparks, K. J. Robbins, A. Sheen, S. A. Petty and N. D. Lazo »Mechanistic Studies of Peptide Self-Assembly: Transient alpha-Helices to Stable beta-Sheets« *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132(51), 18223-18232.

- [169] R. Kunjithapatham, F. Y. Oliva, U. Doshi, M. Perez, J. Avila and V. Munoz »Role for the alpha-helix in aberrant protein aggregation« *Biochemistry* **2005**, 44, 149-156.
- [170] V. L. Anderson, T. F. Ramlall, C. C. Rospigliosi, W. W. Webb and D. Eliezer »Identification of a helical intermediate in trifluoroethanol-induced alpha-synuclein aggregation« *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2010**, 107, 18850-18855.
- [171] F. Fiumara, L. Fioriti, E. R. Kandel and W. A. Hendrickson »Essential role of coiled coils for aggregation and activity of Q/N-rich prions and PolyQ proteins« *Cell* **2011**, 143, 1121-1135.
- [172] V. N. Sivanandam, M. Jayaraman, C. L. Hoop, R. Kodali, R. Wetzel and P. C. van der Wel »The aggregation-enhancing huntingtin N-terminus is helical in amyloid fibrils« *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 4558-4566.
- [173] G. D'Auria, M. Vacatello, L. Falcigno, L. Paduano, G. Mangiapia, L. Calvanese, R. Gambaretto, M. Dettin and L. Paolillo »Self-assembling properties of ionic-complementary peptides« *J. Pept. Sci.* **2009**, 15, 210-219.
- [174] J. Jarvet, P. Damberg, J. Danielsson, I. Johansson, L. E. G. Eriksson and A. Gr nslund »A left-handed 3(1) helical conformation in the Alzheimer Aβ(12-28) peptide« *FEBS Lett.* **2003**, 555, 371-374.
- [175] A. P ivi , E. Nordling, Y. Kallberg, J. Thyberg and J. Johansson »Stabilization of discordant helices in amyloid fibril-forming proteins« *Protein Sci.* **2004**, 13, 1251-1259.
- [176] S. Subramanian, D. Bandopadhyay, P. K. Mishra, M. Mathew and M. John »Design and development of non-fibrillar amyloid beta as a potential Alzheimer vaccine« *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2010**, 394, 393-397.
- [177] J. A. Williamson and A. D. Miranker »Direct detection of transient alpha-helical states in islet amyloid polypeptide« *Protein Sci.* **2007**, 16, 110-117.
- [178] I. T. Yonemoto, G. J. Kroon, H. J. Dyson, W. E. Balch and J. W. Kelly »Amylin proprotein processing generates progressively more amyloidogenic peptides that initially sample the helical state« *Biochemistry* **2008**, 47, 9900-9910.
- [179] L. Wei, P. Jiang, Y. H. Yau, H. Summer, S. G. Shochat, Y. Mu and K. Pervushin »Residual structure in islet amyloid polypeptide mediates its interactions with soluble insulin« *Biochemistry* **2009**, 48, 2368-2376.
- [180] J. Cort, Z. Liu, G. Lee, S. M. Harris, K. S. Prickett, L. S. Gaeta and N. H. Andersen »Beta-structure in human amylin and two designer beta-peptides: CD and NMR spectroscopic comparisons suggest soluble beta-oligomers and the absence of significant populations of beta-strand dimers« *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1994**, 204, 1088-1095.
- [181] J. D. Knight, J. A. Hebda and A. D. Miranker »Conserved and cooperative assembly of membrane-bound alpha-helical states of islet amyloid polypeptide« *Biochemistry* **2006**, 45, 9496-9508.
- [182] S. A. Jayasinghe and R. Langen »Lipid membranes modulate the structure of islet amyloid polypeptide« *Biochemistry* **2005**, 44, 12113-12119.
- [183] M. Apostolidou, S. A. Jayasinghe and R. Langen »Structure of alpha-helical membrane-bound human islet amyloid polypeptide and its implications for membrane-mediated misfolding« *J. Biol. Chem.* **2008**, 283, 17205-17210.
- [184] J. A. Hebda and A. D. Miranker »The interplay of catalysis and toxicity by amyloid intermediates on lipid bilayers: insights from type II diabetes« *Annu. Rev. Biophys.* **2009**, 38, 125-152.
- [185] S. A. Jayasinghe and R. Langen »Identifying structural features of fibrillar islet amyloid polypeptide using site-directed spin labeling« *J Biol Chem* **2004**, 279, 48420-48425.
- [186] S. B. Padrick and A. D. Miranker »Islet amyloid: phase partitioning and secondary nucleation are central to the mechanism of fibrillogenesis« *Biochemistry* **2002**, 41, 4694-4703.

- [187] S. A. Jayasinghe and R. Langen »Membrane interaction of islet amyloid polypeptide« *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, 1768, 2002-2009.
- [188] A. Perczel, P. Hudaky and V. Palfi »Dead-end street of protein folding: thermodynamic rationale of amyloid fibril formation« *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 14959-14965.
- [189] J. M. Mason, N. Kokkoni, K. Stott and A. J. Doig »Design strategies for anti-amyloid agents« *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2003**, 13, 526-532.
- [190] I. Melnikova »Therapies for Alzheimer's disease« *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, 6, 341-342.
- [191] R. S. Shah, H. G. Lee, Z. Xiongwei, G. Perry, M. A. Smith and R. J. Castellani »Current approaches in the treatment of Alzheimer's disease« *Biomed. Pharmacother.* **2008**, 62, 199-207.
- [192] E. Karran, M. Mercken and B. De Strooper »The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics« *Nat. Rev. Drug Discov.* **2011**, 10, 698-712.
- [193] H. Kessler »Peptide - Schlüsselverbindungen für einen neuen Weg zur Entwicklung von pharmazeutischen Wirkstoffen« *Angew. Chem.* **1993**, 572-573.
- [194] D. Games, M. Buttini, D. Kobayashi, D. Schenk and P. Seubert »Mice as models: transgenic approaches and Alzheimer's disease« *J. Alzheimers. Dis.* **2006**, 9, 133-149.
- [195] J. Bieschke, E. Cohen, A. Murray, A. Dillin and J. W. Kelly »A kinetic assessment of the C. elegans amyloid disaggregation activity enables uncoupling of disassembly and proteolysis« *Protein Sci.* **2009**.
- [196] J. Bilén and N. M. J. Bonini »Drosophila as a model for human neurodegenerative disease« *Annu. Rev. Genet.* **2005**, 39, 153-171.
- [197] L. M. Luheshi, G. G. Tartaglia, A.-C. Brorsson, A. P. Pawar, I. E. Watson, F. Chiti, M. Vendruscolo, D. A. Lomas, C. M. Dobson and D. C. Crowther »Systematic in vivo analysis of the intrinsic determinants of amyloid Beta pathogenicity« *PLoS Biol* **2007**, 5, e290.
- [198] K. Shruti, K. Shrey and R. Vibha »Micro RNAs: tiny sequences with enormous potential« *Biochem Biophys Res Commun* **2011**, 407, 445-449.
- [199] C. Haass and B. De Strooper »The presenilins in Alzheimer's disease--proteolysis holds the key« *Science* **1999**, 286, 916-919.
- [200] T. Hamaguchi, K. Ono and M. Yamada »Anti-amyloidogenic therapies: strategies for prevention and treatment of Alzheimer's disease« *Cell. Mol. Life Sci.* **2006**, 63, 1538-1552.
- [201] H. Cai, Y. Wang, D. McCarthy, H. Wen, D. R. Borchelt, D. L. Price and P. C. Wong »BACE1 is the major beta-secretase for generation of Abeta peptides by neurons« *Nat. Neurosci.* **2001**, 4, 233-234.
- [202] Y. Luo, B. Bolon, S. Kahn, B. D. Bennett, S. Babu-Khan, P. Denis, W. Fan, H. Kha, J. Zhang, Y. Gong, L. Martin, J. C. Louis, Q. Yan, W. G. Richards, M. Citron and R. Vassar »Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's beta-secretase, have normal phenotype and abolished beta-amyloid generation« *Nat Neurosci* **2001**, 4, 231-232.
- [203] A. K. Ghosh, M. Brindisi and J. Tang »Developing beta-secretase inhibitors for treatment of Alzheimer's disease« *J. Neurochem.* **2011**.
- [204] M. S. Wolfe »gamma-Secretase inhibitors and modulators for Alzheimer's disease« *J. Neurochem.* **2011**.
- [205] S. F. Lichtenthaler »Alpha-secretase in Alzheimer's disease: molecular identity, regulation and therapeutic potential« *J. Neurochem.* **2011**, 116, 10-21.
- [206] R. Postina, A. Schroeder, I. Dewachter, J. Bohl, U. Schmitt, E. Kojro, C. Prinzen, K. Endres, C. Hiemke, M. Blessing, P. Flamez, A. Dequenne, E. Godaux, F. van Leuven and F. Fahrenholz »A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model« *J. Clin. Invest.* **2004**, 113, 1456-1464.

- [207] A. A. Davis, J. J. Fritz, J. Wess, J. J. Lah and A. I. Levey »Deletion of M1 muscarinic acetylcholine receptors increases amyloid pathology in vitro and in vivo« *J. Neurosci.* **2010**, 30, 4190-4196.
- [208] R. M. Nitsch, M. Deng, M. Tennis, D. Schoenfeld and J. H. Growdon »The selective muscarinic M1 agonist AF102B decreases levels of total Abeta in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease« *Ann Neurol* **2000**, 48, 913-918.
- [209] K. Endres and F. Fahrenholz »Upregulation of the alpha-secretase ADAM10--risk or reason for hope?« *FEBS J.* **2010**, 277, 1585-1596.
- [210] N. N. Nalivaeva, C. Beckett, N. D. Belyaev and A. J. Turner »Are amyloid-degrading enzymes viable therapeutic targets in Alzheimer's disease?« *J. Neurochem.* **2011**.
- [211] M. A. Leissring »The AbetaCs of Abeta-cleaving proteases« *J. Biol. Chem.* **2008**, 283, 29645-29649.
- [212] N. Iwata, S. Tsubuki, Y. Takaki, K. Shirotani, B. Lu, N. P. Gerard, C. Gerard, E. Hama, H. J. Lee and T. C. Saïdo »Metabolic regulation of brain Abeta by neprilysin« *Science* **2001**, 292, 1550-1552.
- [213] M. A. Leissring, W. Farris, A. Y. Chang, D. M. Walsh, X. Wu, X. Sun, M. P. Frosch and D. J. Selkoe »Enhanced proteolysis of beta-amyloid in APP transgenic mice prevents plaque formation, secondary pathology, and premature death« *Neuron* **2003**, 40, 1087-1093.
- [214] B. Spencer, R. A. Marr, R. Gindi, R. Potkar, S. Michael, A. Adame, E. Rockenstein, I. M. Verma and E. Masliah »Peripheral delivery of a CNS targeted, metallo-protease reduces abeta toxicity in a mouse model of Alzheimer's disease« *PLoS One* **2011**, 6, e16575.
- [215] T. Saito, N. Iwata, S. Tsubuki, Y. Takaki, J. Takano, S. M. Huang, T. Suemoto, M. Higuchi and T. C. Saïdo »Somatostatin regulates brain amyloid beta peptide Abeta42 through modulation of proteolytic degradation« *Nat. Med.* **2005**, 11, 434-439.
- [216] D. M. Walsh and D. J. Selkoe »Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease« *Neuron* **2004**, 44, 181-193.
- [217] J. P. Cleary, D. M. Walsh, J. J. Hofmeister, G. M. Shankar, M. A. Kuskowski, D. J. Selkoe and K. H. Ashe »Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function« *Nat. Neurosci.* **2005**, 8, 79-84.
- [218] L. F. Lue, Y. M. Kuo, A. E. Roher, L. Brachova, Y. Shen, L. Sue, T. Beach, J. H. Kurth, R. E. Rydel and J. Rogers »Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease« *Am. J. Pathol.* **1999**, 155, 853-862.
- [219] C. A. McLean, R. A. Cherny, F. W. Fraser, S. J. Fuller, M. J. Smith, K. Beyreuther, A. I. Bush and C. L. Masters »Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease« *Ann. Neurol.* **1999**, 46, 860-866.
- [220] J. Wang, D. W. Dickson, J. Q. Trojanowski and V. M. Lee »The levels of soluble versus insoluble brain Abeta distinguish Alzheimer's disease from normal and pathologic aging« *Exp. Neurol.* **1999**, 158, 328-337.
- [221] D. M. Fowler, A. V. Koulov, C. Alory-Jost, M. S. Marks, W. E. Balch and J. W. Kelly »Functional amyloid formation within mammalian tissue« *PLoS Biol* **2006**, 4, e6.
- [222] D. M. Fowler, A. V. Koulov, W. E. Balch and J. W. Kelly »Functional amyloid--from bacteria to humans« *Trends. Biochem. Sci.* **2007**, 32, 217-224.
- [223] E. Frare, M. F. Mossuto, P. P. de Laureto, S. Tolin, L. Menzer, M. Dumoulin, C. M. Dobson and A. Fontana »Characterization of oligomeric species on the aggregation pathway of human lysozyme« *J. Mol. Biol.* **2009**, 387, 17-27.
- [224] M. Lindgren and P. Hammarström »Amyloid oligomers: spectroscopic characterization of amyloidogenic protein states« *FEBS J.* **2010**, 277, 1380-1388.

- [225] J. Bieschke, M. Herbst, T. Wiglenda, R. P. Friedrich, A. Boeddrich, F. Schiele, D. Kleckers, J. M. Lopez Del Amo, B. A. Gruning, Q. Wang, M. R. Schmidt, R. Lurz, R. Anwyl, S. Schnoegl, M. Fandrich, R. F. Frank, B. Reif, S. Gunther, D. M. Walsh and E. E. Wanker »Small-molecule conversion of toxic oligomers to nontoxic beta-sheet-rich amyloid fibrils« *Nat. Chem. Biol.* **2011**, 8, 93-101.
- [226] R. Wetzel, S. Shivaprasad and A. D. Williams »Plasticity of amyloid fibrils« *Biochemistry* **2007**, 46, 1-10.
- [227] R. E. Tanzi, R. D. Moir and S. L. Wagner »Clearance of Alzheimer's Abeta peptide: the many roads to perdition« *Neuron* **2004**, 43, 605-608.
- [228] S. M. Huang, A. Mouri, H. Kokubo, R. Nakajima, T. Suemoto, M. Higuchi, M. Staufenbiel, Y. Noda, H. Yamaguchi, T. Nabeshima, T. C. Saido and N. Iwata »Neprilysin-sensitive synapse-associated amyloid-beta peptide oligomers impair neuronal plasticity and cognitive function« *J Biol Chem* **2006**, 281, 17941-17951.
- [229] K. Numata and D. L. Kaplan »Mechanisms of Enzymatic Degradation of Amyloid Beta Microfibrils Generating Nanofilaments and Nanospheres Related to Cytotoxicity« *Biochemistry* **2010**.
- [230] E. Kilger, A. Buehler, H. Woelfing, S. Kumar, S. A. Kaeser, A. Nagarathinam, J. Walter, M. Jucker and J. Coomaraswamy »BRI2 Protein Regulates {beta}-Amyloid Degradation by Increasing Levels of Secreted Insulin-degrading Enzyme (IDE)« *J. Biol. Chem.* **2011**, 286, 37446-37457.
- [231] E. Malito, R. E. Hulse and W. J. Tang »Amyloid beta-degrading cryptidases: insulin degrading enzyme, presequence peptidase, and neprilysin« *Cell. Mol. Life Sci.* **2008**, 65, 2574-2585.
- [232] T. Bartels, J. G. Choi and D. J. Selkoe »alpha-Synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation« *Nature* **2011**, 477, 107-110.
- [233] A. J. Baldwin, T. P. Knowles, G. G. Tartaglia, A. W. Fitzpatrick, G. L. Devlin, S. L. Shammis, C. A. Waudby, M. F. Mossuto, S. Meehan, S. L. Gras, J. Christodoulou, S. J. Anthony-Cahill, P. D. Barker, M. Vendruscolo and C. M. Dobson »Metastability of native proteins and the phenomenon of amyloid formation« *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 14160-14163.
- [234] M. Masuda, N. Suzuki, S. Taniguchi, T. Oikawa, T. Nonaka, T. Iwatsubo, S. Hisanaga, M. Goedert and M. Hasegawa »Small molecule inhibitors of alpha-synuclein filament assembly« *Biochemistry* **2006**, 45, 6085-6094.
- [235] M. Necula, R. Kaye, S. Milton and C. G. Glabe »Small molecule inhibitors of aggregation indicate that amyloid beta oligomerization and fibrillization pathways are independent and distinct« *J. Biol. Chem.* **2007**, 282, 10311-10324.
- [236] T. Tomiyama, A. Shoji, K. Kataoka, Y. Suwa, S. Asano, H. Kaneko and N. Endo »Inhibition of amyloid beta protein aggregation and neurotoxicity by rifampicin. Its possible function as a hydroxyl radical scavenger« *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 6839-6844.
- [237] L. A. Woods, G. W. Platt, A. L. Hellewell, E. W. Hewitt, S. W. Homans, A. E. Ashcroft and S. E. Radford »Ligand binding to distinct states diverts aggregation of an amyloid-forming protein« *Nat. Chem. Biol.* **2011**, 7, 730-739.
- [238] H. He, W. Dong and F. Huang »Anti-amyloidogenic and anti-apoptotic role of melatonin in Alzheimer disease« *Curr. Neuropharmacol.* **2010**, 8, 211-217.
- [239] R. W. McLaughlin, J. K. De Stigter, L. A. Sikkink, E. M. Baden and M. Ramirez-Alvarado »The effects of sodium sulfate, glycosaminoglycans, and Congo red on the structure, stability, and amyloid formation of an immunoglobulin light-chain protein« *Protein Sci.* **2006**, 15, 1710-1722.
- [240] A. G. Bobylev, A. B. Kornev, L. G. Bobyleva, M. D. Shpagina, I. S. Fadeeva, R. S. Fadeev, D. G. Deryabin, J. Balzarini, P. A. Troshin and Z. A. Podlubnaya »Fullerenolates: metallated polyhydroxylated fullerenes with potent anti-amyloid activity« *Org. Biomol. Chem.* **2011**, 9, 5714-5719.
- [241] H. A. Lashuel, D. M. Hartley, D. Balakhaneh, A. Aggarwal, S. Teichberg and D. J. E. Callaway »New class of inhibitors of amyloid-beta fibril formation. Implications for the mechanism of pathogenesis in Alzheimer's disease« *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 42881-42890.

- [242] D. Morshedi, N. Rezaei-Ghaleh, A. Ebrahim-Habibi, S. Ahmadian and M. Nemat-Gorgani »Inhibition of amyloid fibrillation of lysozyme by indole derivatives--possible mechanism of action« *Febs J* **2007**, 274, 6415-6425.
- [243] S. S. Wang, K. N. Liu and T. C. Han »Amyloid fibrillation and cytotoxicity of insulin are inhibited by the amphiphilic surfactants« *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, 1802, 519-530.
- [244] T. Hamaguchi, K. Ono and M. Yamada »REVIEW: Curcumin and Alzheimer's disease« *CNS Neurosci. Ther.* **2010**, 16, 285-297.
- [245] P. Rzepecki, L. Nagel-Steger, S. Feuerstein, U. Linne, O. Molt, R. Zadnand, K. Aschermann, M. Wehner, T. Schrader and D. J. Riesner »Prevention of Alzheimer's disease-associated Abeta aggregation by rationally designed nonpeptidic beta-sheet ligands« *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 47497-47505.
- [246] S. Salloway, R. Sperling, R. Keren, A. P. Porsteinsson, C. H. van Dyck, P. N. Tariot, S. Gilman, D. Arnold, S. Abushakra, C. Hernandez, G. Crans, E. Liang, G. Quinn, M. Bairu, A. Pastrak and J. M. Cedarbaum »A phase 2 randomized trial of ELND005, scyllo-inositol, in mild to moderate Alzheimer disease« *Neurology* **2011**, 77, 1253-1262.
- [247] K. Ono, M. M. Condrón, L. Ho, J. Wang, W. Zhao, G. M. Pasinetti and D. B. Teplow »Effects of grape seed-derived polyphenols on amyloid beta-protein self-assembly and cytotoxicity« *J. Biol. Chem.* **2008**, 283, 32176-32187.
- [248] D. E. Ehrnhoefer, J. Bieschke, A. Boeddrich, M. Herbst, L. Masino, R. Lurz, S. Engemann, A. Pastore and E. E. Wanker »EGCG redirects amyloidogenic polypeptides into unstructured, off-pathway oligomers« *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2008**, 15, 558-566.
- [249] D. E. Ehrnhoefer, M. Duennwald, P. Markovic, J. L. Wacker, S. Engemann, M. Roark, J. Legleiter, J. L. Marsh, L. M. Thompson, S. Lindquist, P. J. Muchowski and E. E. Wanker »Green tea (-)-epigallocatechin-gallate modulates early events in huntingtin misfolding and reduces toxicity in Huntington's disease models« *Hum Mol Genet* **2006**, 15, 2743-2751.
- [250] P. S. Aisen, S. Gauthier, B. Vellas, R. Briand, D. Saumier, J. Laurin and D. Garceau »Alzhemed: a potential treatment for Alzheimer's disease« *Curr. Alzheimer. Res.* **2007**, 4, 473-478.
- [251] D. H. Kim, S. J. Park, J. M. Kim, S. J. Jeon, D. H. Kim, Y. W. Cho, K. H. Son, H. J. Lee, J. H. Moon, J. H. Cheong, K. H. Ko and J. H. Ryu »Cognitive dysfunctions induced by a cholinergic blockade and Abeta 25-35 peptide are attenuated by salvianolic acid B« *Neuropharmacology* **2011**, 61, 1432-1440.
- [252] C. Lendel, B. Bolognesi, A. Wahlstrom, C. M. Dobson and A. Graslund »Detergent-like interaction of Congo red with the amyloid beta peptide« *Biochemistry* **2010**, 49, 1358-1360.
- [253] A. Cavalli, M. L. Bolognesi, S. Capsoni, V. Andrisano, M. Bartolini, E. Margotti, A. Cattaneo, M. Recanatini and C. Melchiorre »A small molecule targeting the multifactorial nature of Alzheimer's disease« *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2007**, 46, 3689-3692.
- [254] T. Thomas, G. T. Nadackal and K. Thomas »Aspirin and diabetes: inhibition of amylin aggregation by nonsteroidal anti-inflammatory drugs« *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes.* **2003**, 111, 8-11.
- [255] T. Takeda, R. Kumar, E. P. Raman and D. K. Klimov »Nonsteroidal anti-inflammatory drug naproxen destabilizes Abeta amyloid fibrils: a molecular dynamics investigation« *J. Phys. Chem. B* **2010**, 114, 15394-15402.
- [256] S. Kim, W. E. Chang, R. Kumar and D. K. Klimov »Naproxen interferes with the assembly of Abeta oligomers implicated in Alzheimer's disease« *Biophys. J.* **2011**, 100, 2024-2032.
- [257] A. K. Schütz, A. Soragni, S. Hornemann, A. Aguzzi, M. Ernst, A. Bockmann and B. H. Meier »The amyloid-Congo red interface at atomic resolution« *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2011**, 50, 5956-5960.
- [258] A. Lorenzo and B. A. Yankner » β -Amyloid Neurotoxicity Requires Fibril Formation and is Inhibited by Congo Red« *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1994**, 91, 12243-12247.

- [259] M. C. Burgevin, M. Passat, N. Daniel, M. Capet and A. Doble »Congo red protects against toxicity of beta-amyloid peptides on rat hippocampal neurones« *Neuroreport* **1994**, 5, 2429-2432.
- [260] M. B. Podlisny, D. M. Walsh, P. Amarante, B. L. Ostaszewski, E. R. Stimson, J. E. Maggio, D. B. Teplow and D. J. Selkoe »Oligomerization of endogenous and synthetic amyloid beta-protein at nanomolar levels in cell culture and stabilization of monomer by Congo red« *Biochemistry* **1998**, 37, 3602-3611.
- [261] I. Sanchez, C. Mahlke and J. Yuan »Pivotal role of oligomerization in expanded polyglutamine neurodegenerative disorders« *Nature* **2003**, 421, 373-379.
- [262] V. Heiser, E. Scherzinger, A. Boeddrich, E. Nordhoff, R. Lurz, N. Schugardt, H. Lehrach and E. E. Wanker »Inhibition of huntingtin fibrillogenesis by specific antibodies and small molecules: implications for Huntington's disease therapy« *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2000**, 97, 6739-6744.
- [263] M. Necula, L. Breydo, S. Milton, R. Kaye, W. E. van der Veer, P. Tone and C. G. Glabe »Methylene blue inhibits amyloid Abeta oligomerization by promoting fibrillization« *Biochemistry* **2007**, 46, 8850-8860.
- [264] R. A. Edwards and R. W. Woody »Spectroscopic studies of Cibacron Blue and Congo Red bound to dehydrogenases and kinases. Evaluation of dyes as probes of the dinucleotide fold« *Biochemistry* **1979**, 18, 5197-5204.
- [265] B. Stopa, B. Piekarska, L. Konieczny, J. Rybarska, P. Spolnik, G. Zemanek, I. Roterman and M. Krol »The structure and protein binding of amyloid-specific dye reagents« *Acta. Biochim. Pol.* **2003**, 50, 1213-1227.
- [266] P. Frid, S. V. Anisimov and N. Popovic »Congo red and protein aggregation in neurodegenerative diseases« *Brain. Res. Rev.* **2007**, 53, 135-160.
- [267] C. Lendel, C. W. Bertocini, N. Cremades, C. A. Waudby, M. Vendruscolo, C. M. Dobson, D. Schenk, J. Christodoulou and G. Toth »On the mechanism of nonspecific inhibitors of protein aggregation: dissecting the interactions of alpha-synuclein with Congo red and Lacmoid« *Biochemistry* **2009**, 48, 8322-8334.
- [268] B. Y. Feng, B. H. Toyama, H. Wille, D. W. Colby, S. R. Collins, B. C. H. May, S. B. Prusiner, J. Weissman and B. K. Shoichet »Small-molecule aggregates inhibit amyloid polymerization« *Nat. Chem. Biol.* **2008**, 4, 197-199.
- [269] D. C. Crowther, K. J. Kinghorn, E. Miranda, R. Page, J. A. Curry, F. A. Duthie, D. C. Gubb and D. A. Lomas »Intraneuronal Abeta, non-amyloid aggregates and neurodegeneration in a Drosophila model of Alzheimer's disease« *Neuroscience* **2005**, 132, 123-135.
- [270] A. Abelein, B. Bolognesi, C. M. Dobson, A. Graslund and C. Lendel »Hydrophobicity and Conformational Change as Mechanistic Determinants for Nonspecific Modulators of Amyloid beta Self-Assembly« *Biochemistry* **2011**, 51(1), 126-137.
- [271] A. Wahlstrom, L. Hugonin, A. Peralvarez-Marin, J. Jarvet and A. Graslund »Secondary structure conversions of Alzheimer's Abeta(1-40) peptide induced by membrane-mimicking detergents« *FEBS J.* **2008**, 275, 5117-5128.
- [272] D. J. Tew, S. P. Bottomley, D. P. Smith, G. D. Ciccotosto, J. Babon, M. G. Hinds, C. L. Masters, R. Cappai and K. J. Barnham »Stabilization of neurotoxic soluble beta-sheet-rich conformations of the Alzheimer's disease amyloid-beta peptide« *Biophys. J.* **2008**, 94, 2752-2766.
- [273] W. Hoyer, C. Grönwall, A. Jonsson, S. Stahl and T. Härd »Stabilization of a beta-hairpin in monomeric Alzheimer's amyloid-beta peptide inhibits amyloid formation« *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2008**, 105, 5099-5104.
- [274] K. Ono, Y. Yoshiike, A. Takashima, K. Hasegawa, H. Naiki and M. Yamada »Potent anti-amyloidogenic and fibril-destabilizing effects of polyphenols in vitro: implications for the prevention and therapeutics of Alzheimer's disease« *J. Neurochem.* **2003**, 87, 172-181.
- [275] G. Grelle, A. Otto, M. Lorenz, R. F. Frank, E. E. Wanker and J. Bieschke »Black Tea Theaflavins Inhibit Formation of Toxic Amyloid-beta and alpha-Synuclein Fibrils« *Biochemistry* **2011**.

- [276] J. Bieschke, J. Russ, R. P. Friedrich, D. E. Ehrnhoefer, H. Wobst, K. Neugebauer and E. E. Wanker »EGCG remodels mature alpha-synuclein and amyloid-beta fibrils and reduces cellular toxicity« *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2010**, 107, 7710-7715.
- [277] S. Bastianetto, S. Krantic and R. Quirion »Polyphenols as potential inhibitors of amyloid aggregation and toxicity: possible significance to Alzheimer's disease« *Mini Rev. Med. Chem.* **2008**, 8, 429-435.
- [278] K. Ono, K. Hasegawa, H. Naiki and M. Yamada »Anti-amyloidogenic activity of tannic acid and its activity to destabilize Alzheimer's beta-amyloid fibrils in vitro« *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, 1690, 193-202.
- [279] T. Richard, A. D. Pawlus, M. L. Iglesias, E. Pedrot, P. Waffo-Teguo, J. M. Merillon and J. P. Monti »Neuroprotective properties of resveratrol and derivatives« *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2011**, 1215, 103-108.
- [280] X. Meng, L. A. Munishkina, A. L. Fink and V. N. Uversky »Molecular Mechanisms Underlying the Flavonoid-Induced Inhibition of alpha-Synuclein Fibrillation« *Biochemistry* **2009**.
- [281] S. Bastianetto and R. Quirion »Natural antioxidants and neurodegenerative diseases« *Front. Biosci.* **2004**, 9, 3447-3452.
- [282] S. A. Hudson, H. Ecroyd, F. C. Dehle, I. F. Musgrave and J. A. Carver »(-)-Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG) Maintains kappa-Casein in Its Pre-Fibrillar State without Redirecting Its Aggregation Pathway« *J. Mol. Biol.* **2009**.
- [283] Y. Porat, A. Abramowitz and E. Gazit »Inhibition of amyloid fibril formation by polyphenols: structural similarity and aromatic interactions as a common inhibition mechanism« *Chem. Biol. Drug. Des.* **2006**, 67, 27-37.
- [284] S. H. Wang, F. F. Liu, X. Y. Dong and Y. Sun »Thermodynamic analysis of the molecular interactions between amyloid beta-peptide 42 and (-)-epigallocatechin-3-gallate« *J. Phys. Chem. B* **2010**, 114, 11576-11583.
- [285] T. Ishii, T. Ichikawa, K. Minoda, K. Kusaka, S. Ito, Y. Suzuki, M. Akagawa, K. Mochizuki, T. Goda and T. Nakayama »Human serum albumin as an antioxidant in the oxidation of (-)-epigallocatechin gallate: participation of reversible covalent binding for interaction and stabilization« *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2011**, 75, 100-106.
- [286] S. Taniguchi, N. Suzuki, M. Masuda, S. Hisanaga, T. Iwatsubo, M. Goedert and M. Hasegawa »Inhibition of heparin-induced tau filament formation by phenothiazines, polyphenols, and porphyrins« *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 7614-7623.
- [287] R. Huang, V. Subramanian, J. R. Brender, Y. Abe, A. Naito and A. Ramamoorthy »NMR Characterization of Monomer and Oligomeric Conformations of Human Calcitonin and its Interaction with EGCG« *J. Mol. Biol.* **2011**, 416(1), 108-120.
- [288] J. C. Sacchettini and J. W. Kelly »Therapeutic strategies for human amyloid diseases« *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, 1, 267-275.
- [289] F. E. Cohen and J. W. Kelly »Therapeutic approaches to protein-misfolding diseases« *Nature* **2003**, 426, 905-909.
- [290] S. Connelly, S. Choi, S. M. Johnson, J. W. Kelly and I. A. Wilson »Structure-based design of kinetic stabilizers that ameliorate the transthyretin amyloidoses« *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2010**, 20, 54-62.
- [291] M. G. McCammon, D. J. Scott, C. A. Keetch, L. H. Greene, H. E. Purkey, H. M. Petrassi, J. W. Kelly and C. V. Robinson »Screening transthyretin amyloid fibril inhibitors: characterization of novel multiprotein, multiligand complexes by mass spectrometry« *Structure* **2002**, 10, 851-863.
- [292] A. R. Hurshman Babbes, E. T. Powers and J. W. Kelly »Quantification of the thermodynamically linked quaternary and tertiary structural stabilities of transthyretin and its disease-associated variants: the relationship between stability and amyloidosis« *Biochemistry* **2008**, 47, 6969-6984.
- [293] P. Hammarström, R. L. Wiseman, E. T. Powers and J. W. Kelly »Prevention of transthyretin amyloid disease by changing protein misfolding energetics« *Science* **2003**, 299, 713-716.

- [294] T. R. Foss, M. S. Kelker, R. L. Wiseman, I. A. Wilson and J. W. Kelly »Kinetic stabilization of the native state by protein engineering: implications for inhibition of transthyretin amyloidogenesis« *J. Mol. Biol.* **2005**, 347, 841-854.
- [295] N. Reixach, T. R. Foss, E. Santelli, J. Pascual, J. W. Kelly and J. N. Buxbaum »Human-murine transthyretin heterotetramers are kinetically stable and non-amyloidogenic. A lesson in the generation of transgenic models of diseases involving oligomeric proteins« *J. Biol. Chem.* **2008**, 283, 2098-2107.
- [296] S. M. Johnson, H. M. Petrassi, S. K. Palaninathan, N. N. Mohamedmohaideen, H. E. Purkey, C. Nichols, K. P. Chiang, T. Walkup, J. C. Sacchettini, K. B. Sharpless and J. W. Kelly »Bisaryloxime ethers as potent inhibitors of transthyretin amyloid fibril formation« *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 1576-1587.
- [297] H. M. Petrassi, S. M. Johnson, H. E. Purkey, K. P. Chiang, T. Walkup, X. Jiang, E. T. Powers and J. W. Kelly »Potent and selective structure-based dibenzofuran inhibitors of transthyretin amyloidogenesis: kinetic stabilization of the native state« *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 6662-6671.
- [298] H. Razavi, S. K. Palaninathan, E. T. Powers, R. L. Wiseman, H. E. Purkey, N. N. Mohamedmohaideen, S. Deechongkit, K. P. Chiang, M. T. Dendle, J. C. Sacchettini and J. W. Kelly »Benzoxazoles as transthyretin amyloid fibril inhibitors: synthesis, evaluation, and mechanism of action« *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2003**, 42, 2758-2761.
- [299] T. Klabunde, H. M. Petrassi, V. B. Oza, P. Raman, J. W. Kelly and J. C. Sacchettini »Rational design of potent human transthyretin amyloid disease inhibitors« *Nat. Struct. Biol.* **2000**, 7, 312-321.
- [300] S. M. Johnson, S. Connelly, I. A. Wilson and J. W. Kelly »Toward optimization of the linker substructure common to transthyretin amyloidogenesis inhibitors using biochemical and structural studies« *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 6348-6358.
- [301] S. M. Johnson, S. Connelly, I. A. Wilson and J. W. Kelly »Biochemical and structural evaluation of highly selective 2-arylbenzoxazole-based transthyretin amyloidogenesis inhibitors« *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 260-270.
- [302] S. M. Johnson, S. Connelly, I. A. Wilson and J. W. Kelly »Toward optimization of the second aryl substructure common to transthyretin amyloidogenesis inhibitors using biochemical and structural studies« *J. Med. Chem.* **2009**, 52, 1115-1125.
- [303] A. Wojtczak, V. Cody, J. R. Luft and W. Pangborn »Structures of human transthyretin complexed with thyroxine at 2.0 Å resolution and 3',5'-dinitro-N-acetyl-L-thyronine at 2.2 Å resolution« *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **1996**, 52, 758-765.
- [304] A. Aguzzi and T. O'Connor »Protein aggregation diseases: pathogenicity and therapeutic perspectives« *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2010**, 9, 237-248.
- [305] T. Härd and C. Lendel »Inhibition of Amyloid Formation« *J. Mol. Biol.* **2012**, Jan 5. [Epub ahead of print].
- [306] A. I. Bush, W. H. Pettingell, G. Multhaup, M. d Paradis, J. P. Vonsattel, J. F. Gusella, K. Beyreuther, C. L. Masters and R. E. Tanzi »Rapid induction of Alzheimer A beta amyloid formation by zinc« *Science* **1994**, 265, 1464-1467.
- [307] C. S. Atwood, R. D. Moir, X. Huang, R. C. Scarpa, N. M. Bacarra, D. M. Romano, M. A. Hartshorn, R. E. Tanzi and A. I. Bush »Dramatic aggregation of Alzheimer abeta by Cu(II) is induced by conditions representing physiological acidosis« *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 12817-12826.
- [308] C. S. Atwood, R. C. Scarpa, X. Huang, R. D. Moir, W. D. Jones, D. P. Fairlie, R. E. Tanzi and A. I. Bush »Characterization of copper interactions with alzheimer amyloid beta peptides: identification of an attomolar-affinity copper binding site on amyloid beta1-42« *J Neurochem* **2000**, 75, 1219-1233.
- [309] A. I. J. Bush »Metals and neuroscience« *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, 4, 184-191.
- [310] R. A. Cherny, C. S. Atwood, M. E. Xilinas, D. N. Gray, W. D. Jones, C. A. McLean, K. J. Barnham, I. Volitakis, F. W. Fraser, Y. Kim, X. Huang, L. E. Goldstein, R. D. Moir, J. T. Lim, K. Beyreuther, H. Zheng, R.

- E. Tanzi, C. L. Masters and A. I. Bush »Treatment with a copper-zinc chelator markedly and rapidly inhibits beta-amyloid accumulation in Alzheimer's disease transgenic mice« *Neuron* **2001**, 30, 665-676.
- [311] C. W. Ritchie, A. I. Bush, A. Mackinnon, S. Macfarlane, M. Mastwyk, L. MacGregor, L. Kiers, R. Cherny, Q. X. Li, A. Tammer, D. Carrington, C. Mavros, I. Volitakis, M. Xilinas, D. Ames, S. Davis, K. Beyreuther, R. E. Tanzi and C. L. Masters »Metal-protein attenuation with iodochlorhydroxyquin (clioquinol) targeting Abeta amyloid deposition and toxicity in Alzheimer disease: a pilot phase 2 clinical trial« *Arch. Neurol.* **2003**, 60, 1685-1691.
- [312] H. Amijee and D. I. C. Scopes »The Quest for Small Molecules as Amyloid Inhibiting Therapies for Alzheimer's Disease« *J. Alzheimers Dis.* **2009**.
- [313] P. A. Adlard, R. A. Cherny, D. I. Finkelstein, E. Gautier, E. Robb, M. Cortes, I. Volitakis, X. Liu, J. P. Smith, K. Perez, K. Laughton, Q. X. Li, S. A. Charman, J. A. Nicolazzo, S. Wilkins, K. Deleva, T. Lynch, G. Kok, C. W. Ritchie, R. E. Tanzi, R. Cappai, C. L. Masters, K. J. Barnham and A. I. Bush »Rapid restoration of cognition in Alzheimer's transgenic mice with 8-hydroxy quinoline analogs is associated with decreased interstitial Abeta« *Neuron* **2008**, 59, 43-55.
- [314] L. Lannfelt, K. Blennow, H. Zetterberg, S. Batsman, D. Ames, J. Harrison, C. L. Masters, S. Targum, A. I. Bush, R. Murdoch, J. Wilson and C. W. Ritchie »Safety, efficacy, and biomarker findings of PBT2 in targeting Abeta as a modifying therapy for Alzheimer's disease: a phase IIa, double-blind, randomised, placebo-controlled trial« *Lancet Neurol* **2008**, 7, 779-786.
- [315] J. S. Choi, J. J. Braymer, R. P. Nanga, A. Ramamoorthy and M. H. Lim »Design of small molecules that target metal-A{beta} species and regulate metal-induced A{beta} aggregation and neurotoxicity« *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2010**, 107, 21990-21995.
- [316] S. S. Hindo, A. M. Mancino, J. J. Braymer, Y. Liu, S. Vivekanandan, A. Ramamoorthy and M. H. Lim »Small molecule modulators of copper-induced Abeta aggregation« *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 16663-16665.
- [317] C. Rodriguez-Rodriguez, N. Sanchez de Groot, A. Rimola, A. Alvarez-Larena, V. Lloveras, J. Vidal-Gancedo, S. Ventura, J. Vendrell, M. Sodupe and P. Gonzalez-Duarte »Design, selection, and characterization of thioflavin-based intercalation compounds with metal chelating properties for application in Alzheimer's disease« *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 1436-1451.
- [318] A. Dedeoglu, K. Cormier, S. Payton, K. A. Tseitlin, J. N. Kremsky, L. Lai, X. Li, R. D. Moir, R. E. Tanzi, A. I. Bush, N. W. Kowall, J. T. Rogers and X. Huang »Preliminary studies of a novel bifunctional metal chelator targeting Alzheimer's amyloidogenesis« *Exp. Gerontol.* **2004**, 39, 1641-1649.
- [319] C. Hureau, I. Sasaki, E. Gras and P. Faller »Two functions, one molecule: a metal-binding and a targeting moiety to combat Alzheimer's disease« *Chembiochem* **2010**, 11, 950-953.
- [320] J. J. Braymer, A. S. Detoma, J. S. Choi, K. S. Ko and M. H. Lim »Recent Development of Bifunctional Small Molecules to Study Metal-Amyloid-beta Species in Alzheimer's Disease« *Int. J. Alzheimers Dis.* **2011**, 2011, 623051.
- [321] S. Gilead, H. Wolfenson and E. Gazit »Molecular mapping of the recognition interface between the islet amyloid polypeptide and insulin« *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2006**, 45, 6476-6480.
- [322] J. J. W. Wiltzius, S. A. Sievers, M. R. Sawaya and D. Eisenberg »Atomic structures of IAPP (amylin) fusions suggest a mechanism for fibrillation and the role of insulin in the process« *Protein Sci.* **2009**, 18, 1521-1530.
- [323] J. D. Knight, J. A. Williamson and A. D. Miranker »Interaction of membrane-bound islet amyloid polypeptide with soluble and crystalline insulin« *Protein Sci.* **2008**, 17, 1850-1856.
- [324] I. Saraogi, J. A. Hebda, J. Becerril, L. A. Estroff, A. D. Miranker and A. D. Hamilton »Synthetic alpha-Helix Mimetics as Agonists and Antagonists of Islet Amyloid Polypeptide Aggregation« *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2010**, 49(4), 736-739.
- [325] J. A. Hebda, I. Saraogi, M. Magzoub, A. D. Hamilton and A. D. Miranker »A peptidomimetic approach to targeting pre-amyloidogenic states in type II diabetes« *Chem. Biol.* **2009**, 16, 943-950.

- [326] H. Yin, G. I. Lee, H. S. Park, G. A. Payne, J. M. Rodriguez, S. M. Sebt and A. D. Hamilton »Terphenyl-based helical mimetics that disrupt the p53/HDM2 interaction« *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2005**, 44, 2704-2707.
- [327] J. M. Rodriguez, L. Nevola, N. T. Ross, G. I. Lee and A. D. Hamilton »Synthetic inhibitors of extended helix-protein interactions based on a biphenyl 4,4'-dicarboxamide scaffold« *ChemBiochem* **2009**, 10, 829-833.
- [328] J. M. Rodriguez, N. T. Ross, W. P. Katt, D. Dhar, G. I. Lee and A. D. Hamilton »Structure and function of benzoylurea-derived alpha-helix mimetics targeting the Bcl-x(L)/Bak binding interface« *ChemMedChem* **2009**, 4, 649-656.
- [329] J. T. Ernst, J. Becerril, H. S. Park, H. Yin and A. D. Hamilton »Design and application of an alpha-helix-mimetic scaffold based on an oligoamide-foldamer strategy: antagonism of the Bak BH3/Bcl-xL complex« *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2003**, 42, 535-539.
- [330] L. A. Estroff, C. D. Incarvito and A. D. Hamilton »Design of a synthetic foldamer that modifies the growth of calcite crystals« *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 2-3.
- [331] P. Rzepecki and T. Schrader »beta-Sheet ligands in action: KLVFF recognition by aminopyrazole hybrid receptors in water« *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 3016-3025.
- [332] F. Biesemeier, K. Hochdörffer, L. Nagel-Steger, D. Riesner and T. Schrader »Patent DE 10 2006 015 140.2« **2006**.
- [333] L. Nagel-Steger, B. Demeler, W. Meyer-Zaika, K. Hochdörffer, T. Schrader and D. Willbold »Modulation of aggregate size- and shape-distributions of the amyloid-beta peptide by a designed beta-sheet breaker« *Eur. Biophys. J.* **2010**, 39, 415-422.
- [334] K. Hochdörffer, J. Marz-Berberich, L. Nagel-Steger, M. Epple, W. Meyer-Zaika, A. H. Horn, H. Sticht, S. Sinha, G. Bitan and T. Schrader »Rational design of beta-sheet ligands against Abeta42-induced toxicity« *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 4348-4358.
- [335] I. Lynch, T. Cedervall, M. Lundqvist, C. Cabaleiro-Lago, S. Linse and K. A. Dawson »The nanoparticle-protein complex as a biological entity; a complex fluids and surface science challenge for the 21st century« *Adv. Colloid. Interface Sci.* **2007**, 134-135, 167-174.
- [336] M. Lundqvist, J. Stigler, G. Elia, I. Lynch, T. Cedervall and K. A. Dawson »Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts« *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2008**, 105, 14265-14270.
- [337] A. M. Saraiva, I. Cardoso, M. J. Saraiva, K. Tauer, M. C. Pereira, M. A. N. Coelho, H. Möhwald and G. Brezesinski »Randomization of Amyloid-beta-Peptide(1-42) Conformation by Sulfonated and Sulfated Nanoparticles Reduces Aggregation and Cytotoxicity« *Macromol. Biosci.* **2010**, 10(10), 1152-1163.
- [338] S. I. Yoo, M. Yang, J. R. Brender, V. Subramanian, K. Sun, N. E. Joo, S. H. Jeong, A. Ramamoorthy and N. A. Kotov »Inhibition of Amyloid Peptide Fibrillation by Inorganic Nanoparticles: Functional Similarities with Proteins« *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2011**.
- [339] S. C. Wagner »On the interaction between proteins and nanoparticles: Coiled coil peptides organize nanoparticles and vice versa« Freie Universität Berlin, Berlin, **2010**.
- [340] C. Cabaleiro-Lago, I. Lynch, K. A. Dawson and S. Linse »Inhibition of IAPP and IAPP(20-29) fibrillation by polymeric nanoparticles« *Langmuir* **2011**, 26, 3453-3461.
- [341] C. Cabaleiro-Lago, F. Quinlan-Pluck, I. Lynch, S. Lindman, A. M. Minogue, E. Thulin, D. M. Walsh, K. A. Dawson and S. Linse »Inhibition of amyloid beta protein fibrillation by polymeric nanoparticles« *J Am Chem Soc* **2008**, 130, 15437-15443.
- [342] S. Linse, C. Cabaleiro-Lago, W.-F. Xue, I. Lynch, S. Lindman, E. Thulin, S. E. Radford and K. A. Dawson »Nucleation of protein fibrillation by nanoparticles« *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2007**, 104, 8691-8696.

- [343] C. Cabaleiro-Lago, F. Quinlan-Pluck, I. Lynch, K. A. Dawson and S. Linse »Dual Effect of Amino Modified Polystyrene Nanoparticles on Amyloid β Protein Fibrillation« *ACS Chem. Neurosci.* **2010**, 1, 279-287.
- [344] C. Cabaleiro-Lago, S. S. Linse and O. Szczepankiewicz »Effect of nanoparticles on amyloid aggregation depends on protein stability and intrinsic aggregation rate« *Langmuir* **2011**.
- [345] F. Gervais, J. Paquette, C. Morissette, P. Krzywkowski, M. Yu, M. Azzi, D. Lacombe, X. Kong, A. Aman, J. Laurin, W. A. Szarek and P. Tremblay »Targeting soluble Abeta peptide with Tramiprosate for the treatment of brain amyloidosis« *Neurobiol. Aging.* **2007**, 28, 537-547.
- [346] T. Ariga, T. Miyatake and R. K. Yu »Role of proteoglycans and glycosaminoglycans in the pathogenesis of Alzheimer's disease and related disorders: amyloidogenesis and therapeutic strategies--a review« *J. Neurosci. Res.* **2010**, 88, 2303-2315.
- [347] J. Di Domizio, R. Zhang, L. J. Stagg, M. Gagea, M. Zhuo, J. E. Ladbury and W. Cao »Binding with nucleic acids or glycosaminoglycans converts soluble protein oligomers to amyloid« *J. Biol. Chem.* **2011**.
- [348] T. M. Wright »Tramiprosate« *Drugs Today (Barc)* **2006**, 42, 291-298.
- [349] H. Y. Kim, Y. Kim, G. Han and D. J. Kim »Regulation of in vitro Abeta1-40 aggregation mediated by small molecules« *J. Alzheimers Dis.* **2010**, 22, 73-85.
- [350] F. Gervais, R. Chalifour, D. Garceau, X. Kong, J. Laurin, R. McLaughlin, C. Morissette and J. Paquette »Glycosaminoglycan mimetics: a therapeutic approach to cerebral amyloid angiopathy« *Amyloid* **2001**, 8 Suppl 1, 28-35.
- [351] P. S. Aisen, D. Saumier, R. Briand, J. Laurin, F. Gervais, P. Tremblay and D. Garceau »A Phase II study targeting amyloid-beta with 3APS in mild-to-moderate Alzheimer disease« *Neurology* **2006**, 67, 1757-1763.
- [352] J. McLaurin, R. Golomb, A. Jurewicz, J. P. Antel and P. E. Fraser »Inositol stereoisomers stabilize an oligomeric aggregate of Alzheimer amyloid beta peptide and inhibit abeta -induced toxicity« *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 18495-18502.
- [353] J. McLaurin, M. E. Kierstead, M. E. Brown, C. A. Hawkes, M. H. Lambermon, A. L. Phinney, A. A. Darabie, J. E. Cousins, J. E. French, M. F. Lan, F. Chen, S. S. Wong, H. T. Mount, P. E. Fraser, D. Westaway and P. St George-Hyslop »Cyclohexanehexol inhibitors of Abeta aggregation prevent and reverse Alzheimer phenotype in a mouse model« *Nat. Med.* **2006**, 12, 801-808.
- [354] D. Fenili, M. Brown, R. Rappaport and J. McLaurin »Properties of scyllo-inositol as a therapeutic treatment of AD-like pathology« *J. Mol. Med. (Berl)* **2007**, 85, 603-611.
- [355] S. Bachurin, E. Bukatina, N. Lermontova, S. Tkachenko, A. Afanasiev, V. Grigoriev, I. Grigorieva, Y. Ivanov, S. Sablin and N. Zefirov »Antihistamine agent Dimebon as a novel neuroprotector and a cognition enhancer« *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2001**, 939, 425-435.
- [356] R. S. Doody, S. I. Gavrilova, M. Sano, R. G. Thomas, P. S. Aisen, S. O. Bachurin, L. Seely and D. Hung »Effect of dimebon on cognition, activities of daily living, behaviour, and global function in patients with mild-to-moderate Alzheimer's disease: a randomised, double-blind, placebo-controlled study« *Lancet* **2008**, 372, 207-215.
- [357] J. Wang, M. G. Ferruzzi, M. Varghese, X. Qian, A. Cheng, M. Xie, W. Zhao, L. Ho and G. M. Pasinetti »Preclinical study of dimebon on beta-amyloid-mediated neuropathology in Alzheimer's disease« *Mol. Neurodegener.* **2011**, 6, 7.
- [358] P. H. Lu, S. D. Edland, E. Teng, K. Tingus, R. C. Petersen and J. L. Cummings »Donepezil delays progression to AD in MCI subjects with depressive symptoms« *Neurology* **2009**, 72, 2115-2121.
- [359] I. Bezprozvanny »The rise and fall of Dimebon« *Drug. News Perspect.* **2010**, 23, 518-523.
- [360] J. Wu, Q. Li and I. Bezprozvanny »Evaluation of Dimebon in cellular model of Huntington's disease« *Mol. Neurodegener.* **2008**, 3, 15.

- [361] J. W. Steele, S. H. Kim, J. R. Cirrito, D. K. Verges, J. L. Restivo, D. Westaway, P. Fraser, P. S. Hyslop, M. Sano, I. Bezprozvanny, M. E. Ehrlich, D. M. Holtzman and S. Gandy »Acute dosing of latrepirdine (Dimebon), a possible Alzheimer therapeutic, elevates extracellular amyloid-beta levels in vitro and in vivo« *Mol. Neurodegener.* **2009**, 4, 51.
- [362] K. Kiebertz, M. P. McDermott, T. S. Voss, J. Corey-Bloom, L. M. Deuel, E. R. Dorsey, S. Factor, M. D. Geschwind, K. Hodgeman, E. Kayson, S. Noonberg, M. Pourfar, K. Rabinowitz, B. Ravina, J. Sanchez-Ramos, L. Seely, F. Walker and A. Feigin »A randomized, placebo-controlled trial of latrepirdine in Huntington disease« *Arch. Neurol.* **2010**, 67, 154-160.
- [363] S. Lien and H. B. Lowman »Therapeutic peptides« *Trends Biotechnol.* **2003**, 21, 556-562.
- [364] R. Haubner, H. J. Wester, F. Burkhart, R. Senekowitsch-Schmidtke, W. Weber, S. L. Goodman, H. Kessler and M. Schwaiger »Glycosylated RGD-containing peptides: tracer for tumor targeting and angiogenesis imaging with improved biokinetics« *J. Nucl. Med.* **2001**, 42, 326-336.
- [365] J. J. Nestor, Jr. »The medicinal chemistry of peptides« *Curr. Med. Chem.* **2009**, 16, 4399-4418.
- [366] S. Pujals, E. Sabido, T. Tarrago and E. Giralt »all-D proline-rich cell-penetrating peptides: a preliminary in vivo internalization study« *Biochem. Soc. Trans.* **2007**, 35, 794-796.
- [367] M. Paschke »Phage display systems and their applications« *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, 70, 2-11.
- [368] G. P. Smith and V. A. Petrenko »Phage Display« *Chem. Rev.* **1997**, 97, 391-410.
- [369] Y. Nagai, T. Tucker, H. Ren, D. J. Kenan, B. S. Henderson, J. D. Keene, W. J. Strittmatter and J. R. Burke »Inhibition of polyglutamine protein aggregation and cell death by novel peptides identified by phage display screening« *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 10437-10442.
- [370] Y. Nagai, N. Fujikake, K. Ohno, H. Higashiyama, H. A. Popiel, J. Rahadian, M. Yamaguchi, W. J. Strittmatter, J. R. Burke and T. Toda »Prevention of polyglutamine oligomerization and neurodegeneration by the peptide inhibitor QBP1 in *Drosophila*« *Hum. Mol. Genet.* **2003**, 12, 1253-1259.
- [371] S. A. Funke and D. Willbold »Mirror image phage display--a method to generate D-peptide ligands for use in diagnostic or therapeutical applications« *Mol. Biosyst.* **2009**, 5, 783-786.
- [372] S. A. Funke, T. van Groen, I. Kadish, D. Bartnik, L. Nagel-Steger, O. Brener, T. Sehl, R. Batra-Safferling, C. Moriscot, G. Schoehn, A. H. C. Horn, A. Müller-Schiffmann, C. Korth, H. Sticht and D. Willbold »Oral Treatment with the D -Enantiomeric Peptide D3 Improves the Pathology and Behavior of Alzheimer's Disease Transgenic Mice« *ACS Chem. Neurosci.* **2010**, 1, 639-648.
- [373] K. Wiesehan, K. Buder, R. P. Linke, S. Patt, M. Stoldt, E. Unger, B. Schmitt, E. Bucci and D. Willbold »Selection of D-amino-acid peptides that bind to Alzheimer's disease amyloid peptide abeta1-42 by mirror image phage display« *Chembiochem* **2003**, 4, 748-753.
- [374] K. Wiesehan, J. Stohr, L. Nagel-Steger, T. van Groen, D. Riesner and D. Willbold »Inhibition of cytotoxicity and amyloid fibril formation by a D-amino acid peptide that specifically binds to Alzheimer's disease amyloid peptide« *Protein. Eng. Des. Sel.* **2008**, 21, 241-246.
- [375] T. van Groen, K. Wiesehan, S. A. Funke, I. Kadish, L. Nagel-Steger and D. Willbold »Reduction of Alzheimer's disease amyloid plaque load in transgenic mice by D3, A D-enantiomeric peptide identified by mirror image phage display« *ChemMedChem* **2008**, 3, 1848-1852.
- [376] A. J. Doig »Peptide inhibitors of beta-amyloid aggregation« *Curr. Opin. Drug. Discov. Devel.* **2007**, 10, 533-539.
- [377] A. Esteras-Chopo, M. T. Pastor, L. Serrano and M. Lopez de la Paz »New strategy for the generation of specific D-peptide amyloid inhibitors« *J. Mol. Biol.* **2008**, 377, 1372-1381.
- [378] A.-M. Fernandez-Escamilla, F. Rousseau, J. Schymkowitz and L. Serrano »Prediction of sequence-dependent and mutational effects on the aggregation of peptides and proteins« *Nat. Biotechnol.* **2004**, 22, 1302-1306.

- [379] L. O. Tjernberg, C. Lilliehook, D. J. Callaway, J. Naslund, S. Hahne, J. Thyberg, L. Terenius and C. Nordstedt »Controlling amyloid beta-peptide fibril formation with protease-stable ligands« *J. Biol. Chem* **1997**, 272, 12601-12605.
- [380] C. Hetenyi, Z. Szabo, E. Klement, Z. Datki, T. Kortvelyesi, M. Zarandi and B. Penke »Pentapeptide amides interfere with the aggregation of beta-amyloid peptide of Alzheimer's disease« *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, 292, 931-936.
- [381] J. Chabry, B. Caughey and B. Chesebro »Specific inhibition of in vitro formation of protease-resistant prion protein by synthetic peptides« *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 13203-13207.
- [382] E. J. Gazit »A possible role for pi-stacking in the self-assembly of amyloid fibrils« *FASEB J.* **2002**, 16, 77-83.
- [383] S. R. Hughes, S. Goyal, J. E. Sun, P. Gonzalez-DeWhitt, M. A. Fortes, N. G. Riedel and S. R. Sahasrabudhe »Two-hybrid system as a model to study the interaction of beta-amyloid peptide monomers« *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1996**, 93, 2065-2070.
- [384] S. J. Wood, R. Wetzel, J. D. Martin and M. R. Hurlle »Prolines and amyloidogenicity in fragments of the Alzheimer's peptide beta/A4« *Biochemistry* **1995**, 34, 724-730.
- [385] A. K. Thakur and R. Wetzel »Mutational analysis of the structural organization of polyglutamine aggregates« *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2002**, 99, 17014-17019.
- [386] A. Morimoto, K. Irie, K. Murakami, Y. Masuda, H. Ohigashi, M. Nagao, H. Fukuda, T. Shimizu and T. Shirasawa »Analysis of the secondary structure of beta-amyloid (Abeta42) fibrils by systematic proline replacement« *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 52781-52788.
- [387] U. I. Gerling, E. Brandenburg, H. von Berlepsch, K. Pagel and B. Koksche »Structure analysis of an amyloid-forming model peptide by a systematic glycine and proline scan« *Biomacromolecules* **2011**, 12, 2988-2996.
- [388] D. F. Moriarty and D. P. Raleigh »Effects of sequential proline substitutions on amyloid formation by human amylin20-29« *Biochemistry* **1999**, 38, 1811-1818.
- [389] C. Soto, E. M. Sigurdsson, L. Morelli, R. A. Kumar, E. M. Castano and B. Frangione »Beta-sheet breaker peptides inhibit fibrillogenesis in a rat brain model of amyloidosis: implications for Alzheimer's therapy« *Nat. Med.* **1998**, 4, 822-826.
- [390] B. Permanne, C. I. Adessi, G. P. Saborio, S. Fraga, M.-J. Frossard, J. Van Dorpe, I. Dewachter, W. A. Banks, F. Van Leuven and C. Soto »Reduction of amyloid load and cerebral damage in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease by treatment with a beta-sheet breaker peptide« *FASEB J.* **2002**, 16, 860-862.
- [391] C. Yang, X. Zhu, J. Li and R. Shi »Exploration of the mechanism for LPFFD inhibiting the formation of beta-sheet conformation of Abeta(1-42) in water « *J. Mol. Model.* **2010**, 16, 813-821.
- [392] H. Wadai, K. Yamaguchi, S. Takahashi, T. Kanno, T. Kawai, H. Naiki and Y. Goto »Stereospecific amyloid-like fibril formation by a peptide fragment of beta2-microglobulin« *Biochemistry* **2005**, 44, 157-164.
- [393] R. J. Chalifour, R. W. McLaughlin, L. Lavoie, C. Morissette, N. Tremblay, M. Boule, P. Sarazin, D. Stea, D. Lacombe, P. Tremblay and F. Gervais »Stereoselective interactions of peptide inhibitors with the beta-amyloid peptide« *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 34874-34881.
- [394] J. Ghanta, C. L. Shen, L. L. Kiessling and R. M. Murphy »A strategy for designing inhibitors of beta-amyloid toxicity« *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 29525-29528.
- [395] M. M. Pallitto, J. Ghanta, P. Heinzelman, L. L. Kiessling and R. M. Murphy »Recognition sequence design for peptidyl modulators of beta-amyloid aggregation and toxicity« *Biochemistry* **1999**, 38, 3570-3578.
- [396] M. A. Moss, M. R. Nichols, D. K. Reed, J. H. Hoh and T. L. Rosenberry »The peptide KLVFF-K(6) promotes beta-amyloid(1-40) protofibril growth by association but does not alter protofibril effects on cellular

- reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)« *Mol. Pharmacol.* **2003**, 64, 1160-1168.
- [397] D. P. McGregor »Discovering and improving novel peptide therapeutics« *Curr. Opin. Pharmacol.* **2008**, 8, 616-619.
- [398] T. S. Burkoth, T. L. Benzinger, D. N. M. Jones, K. Hallengae, S. C. Meredith and D. G. Lynn »C-terminal PEG blocks the irreversible step in β -amyloid(10-35) fibrillogenesis« *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 7655-7656.
- [399] C. Schmuck, P. Frey and M. Heil »Inhibition of fibril formation of Abeta by guanidiniocarbonyl pyrrole receptors« *Chembiochem* **2005**, 6, 628-631.
- [400] K. Watanabe, K. Nakamura, S. Akikusa, T. Okada, M. Kodaka, T. Konakahara and H. Okuno »Inhibitors of fibril formation and cytotoxicity of beta-amyloid peptide composed of KLVFF recognition element and flexible hydrophilic disrupting element« *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, 290, 121-124.
- [401] T. L. Lowe, A. Strzelec, L. L. Kiessling and R. M. Murphy »Structure-function relationships for inhibitors of beta-amyloid toxicity containing the recognition sequence KLVFF« *Biochemistry* **2001**, 40, 7882-7889.
- [402] M. A. Findeis, G. M. Musso, C. C. Arico-Muendel, H. W. Benjamin, A. M. Hundal, J. J. Lee, J. Chin, M. Kelley, J. Wakefield, N. J. Hayward and S. M. Molineaux »Modified-peptide inhibitors of amyloid beta-peptide polymerization« *Biochemistry* **1999**, 38, 6791-6800.
- [403] M. A. Findeis, J. J. Lee, M. Kelley, J. D. Wakefield, M. H. Zhang, J. Chin, W. Kubasek and S. M. Molineaux »Characterization of cholyl-leu-val-phe-phe-ala-OH as an inhibitor of amyloid beta-peptide polymerization« *Amyloid* **2001**, 8, 231-241.
- [404] D. T. S. Rijkers, J. W. M. Höppener, G. Posthuma, C. J. M. Lips and R. M. J. Liskamp »Inhibition of amyloid fibril formation of human amylin by N-alkylated amino acid and alpha-hydroxy acid residue containing peptides« *Chemistry* **2002**, 8, 4285-4291.
- [405] E. Hughes, R. M. Burke and A. J. Doig »Inhibition of toxicity in the beta-amyloid peptide fragment beta-(25-35) using N-methylated derivatives: a general strategy to prevent amyloid formation« *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 25109-25115.
- [406] A. M. Bodles, O. M. A. El-Agnaf, B. Greer, D. J. S. Guthrie and G. B. Irvine »Inhibition of fibril formation and toxicity of a fragment of alpha-synuclein by an N-methylated peptide analogue« *Neurosci Lett* **2004**, 359, 89-93.
- [407] J. Madine, A. J. Doig and D. A. Middleton »Design of an N-methylated peptide inhibitor of alpha-synuclein aggregation guided by solid-state NMR« *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 7873-7881.
- [408] D. J. Gordon, K. L. Sciarretta and S. C. J. Meredith »Inhibition of beta-amyloid(40) fibrillogenesis and disassembly of beta-amyloid(40) fibrils by short beta-amyloid congeners containing N-methyl amino acids at alternate residues« *Biochemistry* **2001**, 40, 8237-8245.
- [409] D. J. Gordon, R. Tappe and S. C. Meredith »Design and characterization of a membrane permeable N-methyl amino acid-containing peptide that inhibits Abeta1-40 fibrillogenesis« *J. Pept. Res.* **2002**, 60, 37-55.
- [410] Y. Chebaro and P. Derreumaux »Targeting the early steps of Abeta16-22 protofibril disassembly by N-methylated inhibitors: a numerical study« *Proteins* **2009**, 75, 442-452.
- [411] N. Kokkoni, K. Stott, H. Amijee, J. M. Mason and A. J. Doig »N-Methylated peptide inhibitors of beta-amyloid aggregation and toxicity. Optimization of the inhibitor structure« *Biochemistry* **2006**, 45, 9906-9918.
- [412] H. Amijee, A. Doig, D. Scopes and J. Treherne » β -Amyloid aggregation inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease« *Alzheimers Dement (Suppl 2)* **2008**, 4, 2-295.
- [413] M. Tatarek-Nossol, L.-M. Yan, A. Schmauder, K. Tenidis, G. Westermark and A. Kapurniotu »Inhibition of hIAPP amyloid-fibril formation and apoptotic cell death by a designed hIAPP amyloid-core-containing hexapeptide« *Chem. Biol.* **2005**, 12, 797-809.

- [414] L.-M. Yan, M. Tatarek-Nossol, A. Velkova, A. Kazantzis and A. Kapurniotu »Design of a mimic of nonamyloidogenic and bioactive human islet amyloid polypeptide (IAPP) as nanomolar affinity inhibitor of IAPP cytotoxic fibrillogenesis« *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2006**, 103, 2046-2051.
- [415] A. Kapurniotu, A. Schmauder and K. Tenidis »Structure-based design and study of non-amyloidogenic, double N-methylated IAPP amyloid core sequences as inhibitors of IAPP amyloid formation and cytotoxicity« *J Mol Biol* **2002**, 315, 339-350.
- [416] L. M. Yan, M. Tatarek-Nossol, A. Velkova, A. Kazantzis and A. Kapurniotu »Design of a mimic of nonamyloidogenic and bioactive human islet amyloid polypeptide (IAPP) as nanomolar affinity inhibitor of IAPP cytotoxic fibrillogenesis« *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2006**, 103, 2046-2051.
- [417] C. Adessi, M.-J. Frossard, C. Boissard, S. Fraga, S. Bieler, T. Ruckle, F. Vilbois, S. M. Robinson, M. Mutter, W. A. Banks and C. Soto »Pharmacological profiles of peptide drug candidates for the treatment of Alzheimer's disease« *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 13905-13911.
- [418] Q. Li, M. Gordon, M. A. Etienne, R. P. Hammer and D. Morgan »Contrasting in vivo effects of two peptide-based amyloid-beta protein aggregation inhibitors in a transgenic mouse model of amyloid deposition« *Cell Transplant* **2008**, 17, 397-408.
- [419] H. Kessler, J. Chatterjee, L. Doedens, F. Operrerr, E. Biron, D. Hoyer, H. Schmid, C. Gilon, V. J. Hrubby and D. F. Mierkes »New perspective in peptide chemistry by N-alkylation« *Adv. Exp. Med. Biol.* **2009**, 611, 229-231.
- [420] R. C. Elgersma, G. E. Mulder, J. A. W. Kruijtzter, G. Posthuma, D. T. S. Rijkers and R. M. J. Liskamp »Transformation of the amyloidogenic peptide amylin(20-29) into its corresponding peptoid and retropeptoid: access to both an amyloid inhibitor and template for self-assembled supramolecular tapes« *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, 17, 1837-1842.
- [421] R. C. Elgersma, T. Meijneke, R. de Jong, A. J. Brouwer, G. Posthuma, D. T. S. Rijkers and R. M. J. Liskamp »Synthesis and structural investigations of N-alkylated beta-peptidosulfonamide-peptide hybrids of the amyloidogenic amylin(20-29) sequence: Implications of supramolecular folding for the design of peptide-based bionanomaterials« *Org. Biomol. Chem.* **2006**, 4, 3587-3597.
- [422] R. C. Elgersma, G. Posthuma, D. T. S. Rijkers and R. M. J. Liskamp »Backbone-modified amylin derivatives: implications for amyloid inhibitor design and as template for self-assembling bionanomaterials« *J. Pept. Sci.* **2007**, 13, 709-716.
- [423] J. Bieschke, S. J. Siegel, Y. Fu and J. W. Kelly »Alzheimer's A β peptides containing an isostructural backbone mutation afford distinct aggregate morphologies but analogous cytotoxicity. Evidence for a common low-abundance toxic structure(s)?« *Biochemistry* **2008**, 47, 50-59.
- [424] D. J. Gordon and S. C. Meredith »Probing the role of backbone hydrogen bonding in beta-amyloid fibrils with inhibitor peptides containing ester bonds at alternate positions« *Biochemistry* **2003**, 42, 475-485.
- [425] Y. Fu, J. Gao, J. Bieschke, M. A. Dendle and J. W. Kelly »Amide-to-E-olefin versus amide-to-ester backbone H-bond perturbations: Evaluating the O-O repulsion for extracting H-bond energies« *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 15948-15949.
- [426] Y. Fu, J. Bieschke and J. W. Kelly »E-olefin dipeptide isostere incorporation into a polypeptide backbone enables hydrogen bond perturbation: probing the requirements for Alzheimer's amyloidogenesis« *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 15366-15367.
- [427] I. L. Karle and P. Balaram »Structural characteristics of alpha-helical peptide molecules containing Aib residues« *Biochemistry* **1990**, 29, 6747-6756.
- [428] R. Kaul and P. Balaram »Stereochemical control of peptide folding« *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, 7, 105-117.
- [429] J. Venkatraman, S. C. Shankaramma and P. Balaram »Design of folded peptides« *Chem. Rev.* **2001**, 101, 3131-3152.

- [430] S. Aravinda, N. Shamala, C. Das, A. Sriranjini, I. L. Karle and P. Balaran »Aromatic-aromatic interactions in crystal structures of helical peptide scaffolds containing projecting phenylalanine residues« *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 5308-5315.
- [431] S. Gilead and E. Gazit »Inhibition of amyloid fibril formation by peptide analogues modified with alpha-aminoisobutyric acid« *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2004**, 43, 4041-4044.
- [432] E. Gazit »Self assembly of short aromatic peptides into amyloid fibrils and related nanostructures« *Prion* **2007**, 1, 32-35.
- [433] A. Frydman-Marom, M. Rechter, I. Shefler, Y. Bram, D. E. Shalev and E. Gazit »Cognitive-performance recovery of Alzheimer's disease model mice by modulation of early soluble amyloidal assemblies« *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2009**, 48, 1981-1986.
- [434] T. Cohen, A. Frydman-Marom, M. Rechter and E. Gazit »Inhibition of amyloid fibril formation and cytotoxicity by hydroxyindole derivatives« *Biochemistry* **2006**, 45, 4727-4735.
- [435] S. Barghorn, V. Nimmrich, A. Striebinger, C. Krantz, P. Keller, B. Janson, M. Bahr, M. Schmidt, R. S. Bitner, J. Harlan, E. Barlow, U. Ebert and H. Hillen »Globular amyloid beta-peptide oligomer - a homogenous and stable neuropathological protein in Alzheimer's disease« *J. Neurochem.* **2005**, 95, 834-847.
- [436] M. A. Etienne, J. P. Aucoin, Y. Fu, R. L. McCarley and R. P. Hammer »Stoichiometric inhibition of amyloid beta-protein aggregation with peptides containing alternating alpha,alpha-disubstituted amino acids« *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 3522-3523.
- [437] C. K. Bett, Ngunjiri, J. N., Serem, W. K., Fontenot, K. R., Hammer, R. P., McCarley, R. L., and Garino, J. C. »Structure-activity relationships in peptide modulators of β -amyloid protein aggregation: Variation in alpha,alpha-disubstitution results in altered aggregate size and morphology« *ACS Chem. Neurosci.* **2010**, 1 (9), 608-626.
- [438] C. Toniolo, M. Crisma, F. Formaggio and C. Peggion »Control of peptide conformation by the Thorpe-Ingold effect (C alpha-tetrasubstitution)« *Biopolymers* **2001**, 60, 396-419.
- [439] R. P. Cheng, S. H. Gellman and W. F. DeGrado »beta-Peptides: from structure to function« *Chem. Rev.* **2001**, 101, 3219-3232.
- [440] D. Seebach and J. Gardiner »Beta-peptidic peptidomimetics« *Acc. Chem. Res.* **2008**, 41, 1366-1375.
- [441] J. Frackenpohl, P. I. Arvidsson, J. V. Schreiber and D. Seebach »The outstanding biological stability of beta- and gamma-peptides toward proteolytic enzymes: an in vitro investigation with fifteen peptidases« *Chembiochem* **2001**, 2, 445-455.
- [442] J. Madine, X. Wang, D. R. Brown and D. A. Middleton »Evaluation of beta-alanine- and GABA-substituted peptides as inhibitors of disease-linked protein aggregation« *Chembiochem* **2009**, 10, 1982-1987.
- [443] V. Castelletto, I. W. Hamley, R. A. Hule and D. Pochan »Helical-ribbon formation by a beta-amino acid modified amyloid beta-peptide fragment« *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2009**, 48, 2317-2320.
- [444] V. Castelletto, I. W. Hamley and P. J. F. Harris »Self-assembly in aqueous solution of a modified amyloid beta peptide fragment« *Biophys. Chem.* **2008**, 138, 29-35.
- [445] V. Castelletto, I. W. Hamley, T. Lim, M. B. De Tullio and E. M. Castano »A beta-amino acid modified heptapeptide containing a designed recognition element disrupts fibrillization of the amyloid beta-peptide« *J. Pept. Sci.* **2010**, 16, 443-450.
- [446] V. Castelletto, G. Cheng and I. W. Hamley »Amyloid peptides incorporating a core sequence from the amyloid beta-peptide and gamma amino acids: relating bioactivity to self-assembly« *Chem. Commun.* **2011**, 47, 12470-12472.
- [447] K. L. Sciarretta, D. J. Gordon, A. T. Petkova, R. Tycko and S. C. Meredith »Abeta40-Lactam(D23/K28) models a conformation highly favorable for nucleation of amyloid« *Biochemistry* **2005**, 44, 6003-6014.

- [448] J. Zheng, C. Liu, M. R. Sawaya, B. Vadla, S. Khan, R. J. Woods, D. Eisenberg, W. J. Goux and J. S. Nowick »Macrocyclic beta-sheet peptides that inhibit the aggregation of a tau-protein-derived hexapeptide« *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 3144-3157.
- [449] G. Zhang, M. J. Leibowitz, P. J. Sinko and S. Stein »Multiple-peptide conjugates for binding beta-amyloid plaques of Alzheimer's disease« *Bioconjug. Chem.* **2003**, 14, 86-92.
- [450] S. M. Chafekar, H. Malda, M. Merckx, E. W. Meijer, D. Viertl, H. A. Lashuel, F. Baas and W. Scheper »Branched KLVFF tetramers strongly potentiate inhibition of beta-amyloid aggregation« *Chembiochem* **2007**, 8, 1857-1864.
- [451] T. Sato, P. Kienlen-Campard, M. Ahmed, W. Liu, H. Li, J. I. Elliott, S. Aimoto, S. N. Constantinescu, J.-N. Octave and S. O. Smith »Inhibitors of amyloid toxicity based on beta-sheet packing of Abeta40 and Abeta42« *Biochemistry* **2006**, 45, 5503-5516.
- [452] R. Mishra, M. Jayaraman, B. P. Roland, E. Landrum, T. Fullam, R. Kodali, A. K. Thakur, I. Arduini and R. Wetzel »Inhibiting the Nucleation of Amyloid Structure in a Huntingtin Fragment by Targeting alpha-Helix-Rich Oligomeric Intermediates« *J. Mol. Biol.* **2011**, 900-917.
- [453] M. Jayaraman, R. Kodali, B. Sahoo, A. K. Thakur, A. Mayasundari, R. Mishra, C. B. Peterson and R. Wetzel »Slow Amyloid Nucleation via alpha-Helix-Rich Oligomeric Intermediates in Short Polyglutamine-Containing Huntingtin Fragments« *J. Mol. Biol.* **2011**, 415(5), 881-899.
- [454] A. K. Thakur, W. Yang and R. Wetzel »Inhibition of polyglutamine aggregate cytotoxicity by a structure-based elongation inhibitor« *FASEB J.* **2004**, 18, 923-925.
- [455] S. M. Malakauskas and S. L. Mayo »Design, structure and stability of a hyperthermophilic protein variant« *Nat. Struct. Biol.* **1998**, 5, 470-475.
- [456] S. C. Meyer, C. Huerta and I. Ghosh »Single-site mutations in a hyperthermophilic variant of the B1 domain of protein G result in self-assembled oligomers« *Biochemistry* **2005**, 44, 2360-2368.
- [457] K. N. Huggins, M. Bisaglia, L. Bubacco, M. Tatarek-Nossol, A. Kapurniotu and N. H. Andersen »Designed hairpin peptides interfere with amyloidogenesis pathways: fibril formation and cytotoxicity inhibition, interception of the preamyloid state« *Biochemistry* **2011**, 50, 8202-8212.
- [458] K. N. Huggins and N. H. Andersen »Hairpin peptide inhibitors of amyloid fibril formation. In Chemistry of Peptides in Life Science, Technology and Medicine (Lankinen, H., Ed.) « *Chemistry of Peptides in Life Science, Technology and Medicine (Lankinen, H., Ed.) Peptides 2008 (Proceedings of the 30th European Peptide Symposium)* **2010**, 590-591.
- [459] L. Eidenschink, B. L. Kier, K. N. L. Huggins and N. H. Andersen »Very short peptides with stable folds: building on the interrelationship of Trp/Trp, Trp/cation, and Trp/backbone-amide interaction geometries« *Proteins* **2009**, 75, 308-322.
- [460] B. Ma, T. Elkayam, H. Wolfson and R. Nussinov »Protein-protein interactions: structurally conserved residues distinguish between binding sites and exposed protein surfaces« *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2003**, 100, 5772-5777.
- [461] H. K. Binz, P. Amstutz and A. Plückthun »Engineering novel binding proteins from nonimmunoglobulin domains« *Nat. Biotechnol.* **2005**, 23, 1257-1268.
- [462] C. Grönwall and S. Stahl »Engineered affinity proteins--generation and applications« *J. Biotechnol.* **2009**, 140, 254-269.
- [463] C. Grönwall, A. Jonsson, S. Lindström, E. Gunneriusson, S. Stahl and N. Herne »Selection and characterization of Affibody ligands binding to Alzheimer amyloid beta peptides« *J. Biotechnol.* **2007**, 128, 162-183.

- [464] L. M. Luheshi, W. Hoyer, T. P. de Barros, I. van Dijk Härd, A.-C. Brorsson, B. Macao, C. Persson, D. C. Crowther, D. A. Lomas, S. Stahl, C. M. Dobson and T. Härd »Sequestration of the Abeta peptide prevents toxicity and promotes degradation in vivo« *PLoS Biol* **2010**, 8, e1000334.
- [465] P. E. Arslan, V. K. Mulligan, S. Ho and A. Chakrabartty »Conversion of Abeta42 into a Folded Soluble Native-like Protein using a Semi-random Library of Amphipathic Helices« *J. Mol. Biol.* **2010**, 396, 1284-1294.
- [466] J. Wang, S. Gulich, C. Bradford, M. Ramirez-Alvarado and L. Regan »A twisted four-sheeted model for an amyloid fibril« *Structure* **2005**, 13, 1279-1288.
- [467] A. M. Gronenborn, D. R. Filpula, N. Z. Essig, A. Achari, M. Whitlow, P. T. Wingfield and G. M. Clore »A novel, highly stable fold of the immunoglobulin binding domain of streptococcal protein G« *Science* **1991**, 253, 657-661.
- [468] W. Kim, Y. Kim, J. Min, D. J. Kim, Y.-T. Chang and M. H. Hecht »A high-throughput screen for compounds that inhibit aggregation of the Alzheimer's peptide« *ACS Chem. Biol.* **2006**, 1, 461-469.
- [469] J. Greenwald and R. Riek »Biology of amyloid: structure, function, and regulation« *Structure* **2010**, 18, 1244-1260.
- [470] C. Nerelius, M. Fitzen and J. Johansson »Amino acid sequence determinants and molecular chaperones in amyloid fibril formation« *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2010**, 396, 2-6.
- [471] H. Willander, E. Hermansson, J. Johansson and J. Presto »BRICHOS domain associated with lung fibrosis, dementia and cancer - a chaperone that prevents amyloid fibril formation?« *FEBS J.* **2011**, 278, 3893-3390.
- [472] J. M. Barral, S. A. Broadley, G. Schaffar and F. U. Hartl »Roles of molecular chaperones in protein misfolding diseases« *Semin. Cell. Dev. Biol.* **2004**, 15, 17-29.
- [473] H. Willander, J. Presto, G. Askarieh, B. Frohm, S. Knight, J. Johansson and S. Linse ». « *Unveröffentlichte Ergebnisse zitiert in: Willander et. al, BRICHOS domain associated with lung fibrosis, dementia and cancer - a chaperone that prevents amyloid fibril formation?FEBS J., 2011, 278, 3893-390. 2012.*
- [474] S. Peng, M. Fitzen, H. Jornvall and J. Johansson »The extracellular domain of Bri2 (ITM2B) binds the ABri peptide (1-23) and amyloid beta-peptide (Abeta1-40): Implications for Bri2 effects on processing of amyloid precursor protein and Abeta aggregation« *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2010**, 393, 356-361.
- [475] C. Nerelius, M. Gustafsson, K. Nordling, A. Larsson and J. Johansson »Anti-amyloid activity of the C-terminal domain of proSP-C against amyloid beta-peptide and medin« *Biochemistry* **2009**, 48, 3778-3786.
- [476] T. K. Chaudhuri and S. Paul »Protein-misfolding diseases and chaperone-based therapeutic approaches« *FEBS J.* **2006**, 273, 1331-1349.
- [477] J. Schnabel »Vaccines: chasing the dream« *Nature* **2011**, 475, S18-19.
- [478] H. L. Weiner and D. Frenkel »Immunology and immunotherapy of Alzheimer's disease« *Nat. Rev. Immunol.* **2006**, 6, 404-416.
- [479] P. L. McGeer, J. Rogers and E. G. McGeer »Inflammation, anti-inflammatory agents and Alzheimer disease: the last 12 years« *J. Alzheimers. Dis.* **2006**, 9, 271-276.
- [480] M. Britschgi, C. E. Olin, H. T. Johns, Y. Takeda-Uchimura, M. C. LeMieux, K. Rufibach, J. Rajadas, H. Zhang, B. Tomooka, W. H. Robinson, C. M. Clark, A. M. Fagan, D. R. Galasko, D. M. Holtzman, M. Jutel, J. A. Kaye, C. A. Lemere, J. Leszek, G. Li, E. R. Peskind, J. F. Quinn, J. A. Yesavage, J. A. Ghiso and T. Wyss-Coray »Neuroprotective natural antibodies to assemblies of amyloidogenic peptides decrease with normal aging and advancing Alzheimer's disease« *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2009**, 106, 12145-12150.
- [481] M. Dumoulin, A. M. Last, A. Desmyter, K. Decanniere, D. Canet, G. Larsson, A. Spencer, D. B. Archer, J. Sasse, S. Muyldermans, L. Wyns, C. Redfield, A. Matagne, C. V. Robinson and C. M. Dobson »A camelid antibody fragment inhibits the formation of amyloid fibrils by human lysozyme« *Nature* **2003**, 424, 783-788.

- [482] J. M. Perchiacca, A. R. Ladiwala, M. Bhattacharya and P. M. Tessier »Structure-based design of conformation- and sequence-specific antibodies against amyloid beta« *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2011**.
- [483] T. Nasstrom, S. Goncalves, C. Sahlin, E. Nordstrom, V. Screpanti Sundquist, L. Lannfelt, J. Bergstrom, T. F. Outeiro and M. Ingelsson »Antibodies against alpha-synuclein reduce oligomerization in living cells« *PLoS One* **2011**, 6, e27230.
- [484] R. Kaye, E. Head, F. Sarsoza, T. Saing, C. W. Cotman, M. Necula, L. Margol, J. Wu, L. Breydo, J. L. Thompson, S. Rasool, T. Gurlo, P. Butler and C. G. Glabe »Fibril specific, conformation dependent antibodies recognize a generic epitope common to amyloid fibrils and fibrillar oligomers that is absent in prefibrillar oligomers« *Mol. Neurodegener.* **2007**, 2, 18.
- [485] R. Kaye, I. Canto, L. Breydo, S. Rasool, T. Lukacovich, J. Wu, R. Albay, 3rd, A. Pensalfini, S. Yeung, E. Head, J. L. Marsh and C. Glabe »Conformation dependent monoclonal antibodies distinguish different replicating strains or conformers of prefibrillar Abeta oligomers« *Mol. Neurodegener.* **2010**, 5, 57.
- [486] D. Frenkel, I. Dewachter, F. Van Leuven and B. Solomon »Reduction of beta-amyloid plaques in brain of transgenic mouse model of Alzheimer's disease by EFRH-phage immunization« *Vaccine* **2003**, 21, 1060-1065.
- [487] D. Frenkel, M. Balass, E. Katchalski-Katzir and B. Solomon »High affinity binding of monoclonal antibodies to the sequential epitope EFRH of beta-amyloid peptide is essential for modulation of fibrillar aggregation« *J. Neuroimmunol.* **1999**, 95, 136-142.
- [488] K. Bodin, S. Ellmerich, M. C. Kahan, G. A. Tennent, A. Loesch, J. A. Gilbertson, W. L. Hutchinson, P. P. Mangione, J. R. Gallimore, D. J. Millar, S. Minogue, A. P. Dhillon, G. W. Taylor, A. R. Bradwell, A. Petrie, J. D. Gillmore, V. Bellotti, M. Botto, P. N. Hawkins and M. B. Pepys »Antibodies to human serum amyloid P component eliminate visceral amyloid deposits« *Nature* **2010**, 468, 93-97.
- [489] C. Janus, J. Pearson, J. McLaurin, P. M. Mathews, Y. Jiang, S. D. Schmidt, M. A. Chishti, P. Horne, D. Heslin, J. French, H. T. Mount, R. A. Nixon, M. Mercken, C. Bergeron, P. E. Fraser, P. St George-Hyslop and D. Westaway »A beta peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease« *Nature* **2000**, 408, 979-982.
- [490] D. Morgan »Immunotherapy for Alzheimer's disease« *J. Alzheimers. Dis.* **2006**, 9, 425-432.
- [491] Y. Zhang and D. H. Lee »Sink hypothesis and therapeutic strategies for attenuating Abeta levels« *Neuroscientist* **2011**, 17, 163-173.
- [492] J. G. Sutcliffe, P. B. Hedlund, E. A. Thomas, F. E. Bloom and B. S. Hilbush »Peripheral reduction of beta-amyloid is sufficient to reduce brain beta-amyloid: implications for Alzheimer's disease« *J. Neurosci. Res.* **2011**, 89, 808-814.
- [493] C. Hamers-Casterman, T. Atarhouch, S. Muyldermans, G. Robinson, C. Hamers, E. B. Songa, N. Bendahman and R. Hamers »Naturally occurring antibodies devoid of light chains« *Nature* **1993**, 363, 446-448.
- [494] A. S. Greenberg, D. Avila, M. Hughes, A. Hughes, E. C. McKinney and M. F. Flajnik »A new antigen receptor gene family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversification in sharks« *Nature* **1995**, 374, 168-173.
- [495] P. H. Chan, E. Pardon, L. Menzer, E. De Genst, J. R. Kumita, J. Christodoulou, D. Saerens, A. Brans, F. Bouillenne, D. B. Archer, C. V. Robinson, S. Muyldermans, A. Matagne, C. Redfield, L. Wyns, C. M. Dobson and M. Dumoulin »Engineering a camelid antibody fragment that binds to the active site of human lysozyme and inhibits its conversion into amyloid fibrils« *Biochemistry* **2008**, 47, 11041-11054.
- [496] X. P. Wang, J. H. Zhang, Y. J. Wang, Y. Feng, X. Zhang, X. X. Sun, J. L. Li, X. T. Du, M. P. Lambert, S. G. Yang, M. Zhao, W. L. Klein and R. T. Liu »Conformation-dependent single-chain variable fragment antibodies specifically recognize beta-amyloid oligomers« *FEBS Lett.* **2009**, 583, 579-584.
- [497] A. Zameer, S. Kasturirangan, S. Emadi, S. V. Nimmagadda and M. R. Sierks »Anti-oligomeric Abeta single-chain variable domain antibody blocks Abeta-induced toxicity against human neuroblastoma cells« *J. Mol. Biol.* **2008**, 384, 917-928.

- [498] B. L. Nannenga, A. Zameer and M. R. Sierks »Anti-oligomeric single chain variable domain antibody differentially affects huntingtin and alpha-synuclein aggregates« *FEBS Lett.* **2008**, 582, 517-522.
- [499] C. Haupt, M. Bereza, S. T. Kumar, B. Kieninger, I. Morgado, P. Hortschansky, G. Fritz, C. Rocken, U. Horn and M. Fandrich »Pattern recognition with a fibril-specific antibody fragment reveals the surface variability of natural amyloid fibrils« *J. Mol. Biol.* **2011**, 408, 529-540.
- [500] C. Haupt, I. Morgado, S. T. Kumar, C. Parthier, M. Bereza, P. Hortschansky, M. T. Stubbs, U. Horn and M. Fandrich »Amyloid fibril recognition with the conformational B10 antibody fragment depends on electrostatic interactions« *J. Mol. Biol.* **2010**, 405, 341-348.
- [501] J. M. Orgogozo, S. Gilman, J. F. Dartigues, B. Laurent, M. Puel, L. C. Kirby, P. Jouanny, B. Dubois, L. Eisner, S. Flitman, B. F. Michel, M. Boada, A. Frank and C. Hock »Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after Abeta42 immunization« *Neurology* **2003**, 61, 46-54.
- [502] S. Gilman, M. Koller, R. S. Black, L. Jenkins, S. G. Griffith, N. C. Fox, L. Eisner, L. Kirby, M. B. Rovira, F. Forette and J. M. Orgogozo »Clinical effects of Abeta immunization (AN1792) in patients with AD in an interrupted trial« *Neurology* **2005**, 64, 1553-1562.
- [503] A. Serrano-Pozo, C. M. William, I. Ferrer, E. Uro-Coste, M. B. Delisle, C. A. Maurage, C. Hock, R. M. Nitsch, E. Masliah, J. H. Growdon, M. P. Frosch and B. T. Hyman »Beneficial effect of human anti-amyloid-beta active immunization on neurite morphology and tau pathology« *Brain* **2010**, 133, 1312-1327.
- [504] C. Holmes, D. Boche, D. Wilkinson, G. Yadegarfar, V. Hopkins, A. Bayer, R. W. Jones, R. Bullock, S. Love, J. W. Neal, E. Zotova and J. A. Nicoll »Long-term effects of Abeta42 immunisation in Alzheimer's disease: follow-up of a randomised, placebo-controlled phase I trial« *Lancet* **2008**, 372, 216-223.
- [505] J. Delrieu, P. J. Ousset, C. Caillaud and B. Vellas »'Clinical trials in Alzheimer's disease': immunotherapy approaches« *J. Neurochem.* **2011**.
- [506] J. D. Sipe, M. D. Benson, J. N. Buxbaum, S. Ikeda, G. Merlini, M. J. Saraiva and P. Westermark »Amyloid fibril protein nomenclature: 2010 recommendations from the nomenclature committee of the International Society of Amyloidosis« *Amyloid* **2010**, 17, 101-104.
- [507] M. T. Pastor, N. Kammerer, V. Schubert, A. Esteras-Chopo, C. G. Dotti, M. Lopez de la Paz and L. Serrano »Amyloid toxicity is independent of polypeptide sequence, length and chirality« *J. Mol. Biol.* **2008**, 375, 695-707.
- [508] A. Esteras-Chopo, G. Morra, E. Moroni, L. Serrano, M. Lopez de la Paz and G. Colombo »A molecular dynamics study of the interaction of D-peptide amyloid inhibitors with their target sequence reveals a potential inhibitory pharmacophore conformation« *J. Mol. Biol.* **2008**, 383, 266-280.
- [509] T. C. Holmes »Novel peptide-based biomaterial scaffolds for tissue engineering« *Trends Biotechnol.* **2002**, 20, 16-21.
- [510] F. Gelain, A. Horii and S. Zhang »Designer self-assembling peptide scaffolds for 3-d tissue cell cultures and regenerative medicine« *Macromol. Biosci.* **2007**, 7, 544-551.
- [511] A. Horii, X. Wang, F. Gelain and S. Zhang »Biological designer self-assembling peptide nanofiber scaffolds significantly enhance osteoblast proliferation, differentiation and 3-D migration« *PLoS One* **2007**, 2, e190.
- [512] E. H. C. Bromley, K. Channon, E. Moutevelis and D. N. J. Woolfson »Peptide and protein building blocks for synthetic biology: from programming biomolecules to self-organized biomolecular systems« *ACS Chem. Biol.* **2008**, 3, 38-50.
- [513] J. H. Collier, J. S. Rudra, J. Z. Gasiorowski and J. P. Jung »Multi-component extracellular matrices based on peptide self-assembly« *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 3413-3424.
- [514] N. Sureshbabu, R. Kirubakaran, H. Thangarajah, E. J. P. Malar and R. Jayakumar »Lipid-Induced Conformational Transition of Amyloid beta Peptide Fragments« *J. Mol. Neurosci.* **2010**, 41(3), 368-382.

- [515] A. Mazzaglia, N. Micali, L. M. Scolaro, F. Attanasio, A. Magra, G. Pappalardo and V. Villari »Aggregation properties of the peptide fragments derived from the 17-29 region of the human and rat IAPP: a comparative study with two PEG-conjugated variants of the human sequence« *J. Phys. Chem. B* **2010**, 114, 705-713.
- [516] K. Pagel »Design and characterization of coiled coil-based amyloid forming model peptides« Freie Universität Berlin, Berlin, **2007**.
- [517] M. Mutter, R. Gassmann, U. Buttkeus and K. H. Altmann »Switch Peptides: pH-Induced α -Helix to β -Sheet Transitions of Bis-amphiphilic Oligopeptides« *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, 30, 1514-1516.
- [518] K. Pagel and B. Koksche »Following polypeptide folding and assembly with conformational switches« *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, 12, 730-739.
- [519] X. I. Ambroggio and B. Kuhlman »Design of protein conformational switches« *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2006**, 16, 525-530.
- [520] C. N. Pace and J. M. Scholtz »A helix propensity scale based on experimental studies of peptides and proteins« *Biophys. J.* **1998**, 75, 422-427.
- [521] D. M. Gendoo and P. M. Harrison »Discordant and chameleon sequences: their distribution and implications for amyloidogenicity« *Protein Sci.* **2011**, 20, 567-579.
- [522] D. A. D. Parry, R. D. B. Fraser and J. M. Squire »Fifty years of coiled-coils and alpha-helical bundles: a close relationship between sequence and structure« *J. Struct. Biol.* **2008**, 163, 258-269.
- [523] D. N. Woolfson »Building fibrous biomaterials from alpha-helical and collagen-like coiled-coil peptides« *Biopolymers* **2010**, 94, 118-127.
- [524] J. M. Mason and K. M. Arndt »Coiled Coil Domains: Stability, Specificity, and Biological Implications« *ChemBioChem* **2004**, 5, 170-176.
- [525] D. N. Woolfson »The Design of Coiled-Coil Structures and Assemblies« *Adv. Protein. Chem.* **2005**, 70, 79-112
- [526] P. Burkhard, J. Stetefeld and S. V. Strelkov »Coiled coils: a highly versatile protein folding motif« *Trends Cell Biol.* **2001**, 11, 82-88.
- [527] R. A. Kammerer, D. Kostrewa, J. Zurdo, A. Detken, C. García-Echeverría, J. D. Green, S. A. Müller, B. H. Meier, F. K. Winkler, C. M. Dobson and M. O. Steinmetz »Exploring amyloid formation by a de novo design« *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2004**, 101, 4435-4440.
- [528] Y. Takahashi, A. Ueno and H. Mihara »Design of a Peptide Undergoing α - β Structural Transition and Amyloid Fibrillogenesis by the Introduction of a Hydrophobic Defect« *Chemistry - A European Journal* **1998**, 4, 2475-2484.
- [529] Y. Takahashi, A. Ueno and H. Mihara »Amyloid Architecture: Complementary Assembly of Heterogeneous Combinations of Three or Four Peptides into Amyloid Fibrils« *ChemBioChem* **2002**, 3, 637-642.
- [530] B. Ciani, E. G. Hutchinson, R. B. Sessions and D. N. Woolfson »A Designed System for Assessing How Sequence Affects alpha to beta Conformational Transitions in Proteins« *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 10150-10155.
- [531] H. Dong and J. D. Hartgerink »Role of hydrophobic clusters in the stability of alpha-helical coiled coils and their conversion to amyloid-like beta-sheets« *Biomacromolecules* **2007**, 8, 617-623.
- [532] K. Pagel, S. C. Wagner, K. Samedov, H. von Berlepsch, C. Böttcher and B. Koksche »Random Coils, β -Sheet Ribbons, and α -Helical Fibers: One Peptide Adopting Three Different Secondary Structures at Will« *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 2196-2197.
- [533] R. A. Kammerer and M. O. Steinmetz »De novo design of a two-stranded coiled-coil switch peptide« *J. Struct. Biol.* **2006**, 155, 146-153

- [534] K. Pagel, S. C. Wagner, R. Rezaei Araghi, H. von Berlepsch, C. Böttcher and B. Kokschi »Intramolecular charge interactions as a tool to control the coiled-coil-to-amyloid transformation« *Chemistry* **2008**, 14, 11442-11451.
- [535] Y. Zimenkov, S. N. Dublin, R. Ni, R. S. Tu, V. Breedveld, R. P. Apkarian and V. P. Conticello »Rational Design of a Reversible pH-Responsive Switch for Peptide Self-Assembly« *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 6770-6771.
- [536] M. Broncel, J. A. Falenski, S. C. Wagner, C. P. R. Hackenberger and B. Kokschi »How Post-Translational Modifications Influence Amyloid Formation: A Systematic Study of Phosphorylation and Glycosylation in Model Peptides« *Chemistry* **2010**, 16, 7881-7888.
- [537] M. Broncel, S. C. Wagner, C. P. R. Hackenberger and B. Kokschi »Enzymatically triggered amyloid formation: an approach for studying peptide aggregation« *Chem. Commun. (Camb)* **2010**, 46, 3080-3082.
- [538] M. Broncel, S. C. Wagner, K. Paul, C. P. R. Hackenberger and B. Kokschi »Towards understanding secondary structure transitions: phosphorylation and metal coordination in model peptides« *Org. Biomol. Chem.* **2010**, 8, 2575-2579.
- [539] A. A. Deeg, T. E. Schrader, S. Kempter, J. Pfizer, L. Moroder and W. Zinth »Light-triggered aggregation and disassembly of amyloid-like structures« *Chemphyschem* **2011**, 12, 559-562.
- [540] K. Pagel, T. Seri, H. v. Berlepsch, J. Griebel, R. Kirmse, C. Böttcher and B. Kokschi »How Metal Ions Affect Amyloid Formation: Cu²⁺- and Zn²⁺-Sensitive Peptides« *ChemBioChem* **2008**, 9, 531-536.
- [541] M.-S. p. Camus, S. Dos Santos, A. Chandravarkar, B. Mandal, A. W. Schmid, G. Tuchscherer, M. Mutter and H. A. Lashuel »Switch-peptides: design and characterization of controllable super-amyloid-forming host-guest peptides as tools for identifying anti-amyloid agents« *Chembiochem* **2008**, 9, 2104-2112.
- [542] S. Dos Santos, A. Chandravarkar, B. Mandal, R. Mimna, K. Murat, L. Sauc de, P. Tella, G. Tuchscherer and M. Mutter »Switch-peptides: controlling self-assembly of amyloid beta-derived peptides in vitro by consecutive triggering of acyl migrations« *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 11888-11889.
- [543] R. Mimna, M.-S. Camus, A. Schmid, G. Tuchscherer, Hilal A. Lashuel and M. Mutter »Disruption of Amyloid-Derived Peptide Assemblies through the Controlled Induction of a b-Sheet to a-Helix Transformation: Application of the Switch Concept« *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2007**, 46, 2681-2684.
- [544] B. Strodel, A. W. Fitzpatrick, M. Vendruscolo, C. M. Dobson and D. J. Wales »Characterizing the first steps of amyloid formation for the ccbeta peptide« *J. Phys. Chem. B* **2008**, 112, 9998-10004.
- [545] A. Taniguchi, M. Skwarczynski, Y. Sohma, T. Okada, K. Ikeda, H. Prakash, H. Mukai, Y. Hayashi, T. Kimura, S. Hirota, K. Matsuzaki and Y. Kiso »Controlled production of amyloid beta peptide from a photo-triggered, water-soluble precursor "click peptide"« *Chembiochem* **2008**, 9, 3055-3065.
- [546] A. Taniguchi, Y. Sohma, Y. Hirayama, H. Mukai, T. Kimura, Y. Hayashi, K. Matsuzaki and Y. Kiso »"Click Peptide": pH-Triggered in Situ Production and Aggregation of Monomer Abeta1-42« *Chembiochem* **2009**.
- [547] A. Taniguchi, Y. Sohma, M. Kimura, T. Okada, K. Ikeda, Y. Hayashi, T. Kimura, S. Hirota, K. Matsuzaki and Y. Kiso »"Click Peptide" Based on the "O-Acyl Isopeptide Method": Control of Aβ 1-42 Production from a Photo-Triggered Aβ 1-42 Analogue« *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 696-697.
- [548] K. Pagel, T. Vagt and B. Kokschi »Directing the secondary structure of polypeptides at will: from helices to amyloids and back again?« *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3, 3843-3850.
- [549] M. Hoernke, B. Kokschi and G. Brezesinski »Influence of the hydrophobic interface and transition metal ions on the conformation of amyloidogenic model peptides« *Biophys. Chem.* **2011**, 150(1-3), 64-72.
- [550] M. Hoernke, B. Kokschi and G. Brezesinski »Amyloidogenic peptides at hydrophobic-hydrophilic interfaces: coordination affinities and the chelate effect dictate the competitive binding of Cu²⁺ and Zn²⁺« *Chemphyschem* **2011**, 12, 2225-2229.

- [551] M. Hoernke, J. A. Falenski, C. Schwieger, B. Kokschi and G. Brezesinski »Triggers for beta-sheet formation at the hydrophobic-hydrophilic interface: high concentration, in-plane orientational order, and metal ion complexation« *Langmuir* **2011**, 27, 14218-14231.
- [552] S. C. Wagner, M. Roskamp, M. Pallerla, R. R. Araghi, S. Schlecht and B. Kokschi »Nanoparticle-induced folding and fibril formation of coiled-coil-based model peptides« *Small* **2010**, 6, 1321-1328.
- [553] R. Rasmussen, D. Benvegnu, E. K. O'Shea, P. S. Kim and T. Alber »X-ray scattering indicates that the leucine zipper is a coiled coil« *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1991**, 88, 561-564.
- [554] D. A. Yphantis, Johnson, M.L., and Lary, J.W. 1997. WINNONLIN v. 1.06. University of Connecticut.
- [555] H. Cölfen *Eur. Biophys. J.* **1997**, 25, 333-346.
- [556] E. Brandenburg, H. v. Berlepsch and B. Kokschi »Specific in situ discrimination of amyloid fibrils versus α -helical fibres by the fluorophore NIAD-4« *Mol. Biosyst.* **2012**, 8(2), 557-564.
- [557] E. H. Bromley, K. J. Channon, P. J. King, Z. N. Mahmoud, E. F. Banwell, M. F. Butler, M. P. Crump, T. R. Dafforn, M. R. Hicks, J. D. Hirst, A. Rodger and D. N. Woolfson »Assembly pathway of a designed α -helical protein fiber« *Biophys. J.* **2010**, 98, 1668-1676.
- [558] R. R. Araghi »Structural investigation on amyloid forming model peptides based on environmental factors« Master Thesis, Freie Universität Berlin, Berlin, Germany, **2006**.
- [559] H. v. Berlepsch, R. R. Araghi, E. Brandenburg, K. Pagel, J. Leiterer, F. Emmerling, A. Schulz, C. Böttcher and B. Kokschi »The protofilament structure of a designed amyloidogenic peptide: A combined TEM, AFM, and time-resolved WAXS study « **2012**, in preparation.
- [560] M. De Santos Freitas »Research Report (not published results) (Date 14.11.2011)« **2011**.
- [561] R. Khurana, C. Coleman, C. Ionescu-Zanetti, S. A. Carter, V. Krishna, R. K. Grover, R. Roy and S. Singh »Mechanism of thioflavin T binding to amyloid fibrils« *J. Struct. Biol.* **2005**, 151, 229-238.
- [562] W. E. Klunk, Y. Wang, G. F. Huang, M. L. Debnath, D. P. Holt and C. A. Mathis »Uncharged thioflavin-T derivatives bind to amyloid-beta protein with high affinity and readily enter the brain« *Life. Sci.* **2001**, 69, 1471-1484.
- [563] R. Mishra, D. Sjolander and P. Hammarström »Spectroscopic characterization of diverse amyloid fibrils in vitro by the fluorescent dye Nile red« *Mol. Biosyst.* **2011**, 7, 1232-1240.
- [564] E. E. Nesterov, J. Skoch, B. T. Hyman, W. E. Klunk, B. J. Bacskai and T. M. Swager »In vivo optical imaging of amyloid aggregates in brain: design of fluorescent markers« *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2005**, 44, 5452-5456.
- [565] S. B. Raymond, J. Skoch, I. D. Hills, E. E. Nesterov, T. M. Swager and B. J. Bacskai »Smart optical probes for near-infrared fluorescence imaging of Alzheimer's disease pathology« *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* **2008**, 35 Suppl 1, 93-98.
- [566] P. B. McIntosh, S. R. Martin, D. J. Jackson, J. Khan, E. R. Isaacson, L. Calder, K. Raj, H. M. Griffin, Q. Wang, P. Laskey, J. F. Eccleston and J. Doorbar »Structural analysis reveals an amyloid form of the human papillomavirus type 16 E1-E4 protein and provides a molecular basis for its accumulation« *J. Virol.* **2008**, 82, 8196-8203.
- [567] H. Olzscha, S. M. Schermann, A. C. Woerner, S. Pinkert, M. H. Hecht, G. G. Tartaglia, M. Vendruscolo, M. Hayer-Hartl, F. U. Hartl and R. M. Vabulas »Amyloid-like aggregates sequester numerous metastable proteins with essential cellular functions« *Cell* **2011**, 144, 67-78.
- [568] W.-F. Xue, S. W. Homans and S. E. Radford »Systematic analysis of nucleation-dependent polymerization reveals new insights into the mechanism of amyloid self-assembly« *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2008**, 105, 8926-8931.

- [569] L. Nielsen, R. Khurana, A. Coats, S. Frokjaer, J. Brange, S. Vyas, V. N. Uversky and A. L. Fink »Effect of environmental factors on the kinetics of insulin fibril formation: elucidation of the molecular mechanism« *Biochemistry* **2001**, 40, 6036-6046.
- [570] C. C. Lee, A. Nayak, A. Sethuraman, G. Belfort and G. J. McRae »A three-stage kinetic model of amyloid fibrillation« *Biophys. J.* **2007**, 92, 3448-3458.
- [571] N. Carulla, G. L. Caddy, D. R. Hall, J. Zurdo, M. Gairi, M. Feliz, E. Giralt, C. V. Robinson and C. M. Dobson »Molecular recycling within amyloid fibrils« *Nature* **2005**, 436, 554-558.
- [572] B. O'Nuallain, S. Shivaprasad, I. Kheterpal and R. Wetzel »Thermodynamics of A beta(1-40) amyloid fibril elongation« *Biochemistry* **2005**, 44, 12709-12718.
- [573] C. C. Mahrenholz, I. G. Abfalter, U. Bodenhofer, R. Volkmer and S. Hochreiter »Complex networks govern coiled-coil oligomerization--predicting and profiling by means of a machine learning approach« *Mol. Cell Proteomics* **2011**, 10, M110 004994.
- [574] D. Papapostolou, E. H. C. Bromley, C. Bano and D. N. Woolfson »Electrostatic control of thickness and stiffness in a designed protein fiber« *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 5124-5130.
- [575] S. A. Hudson, H. Ecroyd, T. W. Kee and J. A. Carver »The thioflavin T fluorescence assay for amyloid fibril detection can be biased by the presence of exogenous compounds« *FEBS J.* **2009**, 6(20), 5960-5972.
- [576] D. A. Kirschner, H. Inouye, L. K. Duffy, A. Sinclair, M. Lind and D. J. Selkoe »Synthetic peptide homologous to beta protein from Alzheimer disease forms amyloid-like fibrils in vitro« *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1987**, 84, 6953-6957.
- [577] U. Slotta, S. Hess, K. Spiess, T. Stromer, L. Serpell and T. Scheibel »Spider silk and amyloid fibrils: a structural comparison« *Macromol. Biosci.* **2007**, 7, 183-188.
- [578] S. A. Potekhin, T. N. Melnik, V. Popov, N. F. Lanina, A. A. Vazina, P. Rigler, A. S. Verdini, G. Corradin and A. V. J. Kajava »De novo design of fibrils made of short alpha-helical coiled coil peptides« *Chem. Biol.* **2001**, 8, 1025-1032.
- [579] D. Papapostolou, A. M. Smith, E. D. T. Atkins, S. J. Oliver, M. G. Ryadnov, L. C. Serpell and D. N. J. Woolfson »Engineering nanoscale order into a designed protein fiber« *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2007**, 104, 10853-10858.
- [580] L. Gonzalez, Jr., R. A. Brown, D. Richardson and T. Alber »Crystal structures of a single coiled-coil peptide in two oligomeric states reveal the basis for structural polymorphism« *Nat. Struct. Biol.* **1996**, 3, 1002-1009.
- [581] S. C. Wagner »Strukturelle Charakterisierung eines auf dem α -helikalen coiled coil-Motiv basierenden switch-Peptids« Diploma Thesis, Freie Universität Berlin, Berlin, Germany, **2005**.
- [582] H. Dong and J. D. Hartgerink »Short Homodimeric and Heterodimeric Coiled Coils« *Biomacromolecules* **2006**, 7, 691-695.
- [583] 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 and D. N. Woolfson »Rational design and application of responsive alpha-helical peptide hydrogels« *Nat. Mater.* **2009**, 8, 596-600.
- [584] J. J. Klein and S. Hecht »Synthesis of a New Class of Bis(thiourea)hydrazide Pseudopeptides as Potential Inhibitors of beta-Sheet Aggregation« *Org. Lett.* **2012**, 14, 330-333.
- [585] I. R. Ruttekkolk, A. Chakrabarti, M. Richter, F. Duchardt, H. Glauner, W. P. Verdurmen, J. Rademann and R. Brock »Coupling to polymeric scaffolds stabilizes biofunctional peptides for intracellular applications« *Mol. Pharmacol.* **2010**, 79, 692-700.
- [586] I. R. Ruttekkolk, F. Duchardt, R. Fischer, K. H. Wiesmuller, J. Rademann and R. Brock »HPMA as a scaffold for the modular assembly of functional peptide polymers by native chemical ligation« *Bioconjug. Chem.* **2008**, 19, 2081-2087.

- [587] K. Koschek, M. Dathe and J. Rademann »HPMA-Thioester Copolymers for the Flexible Generation and Cellular Delivery of Peptide-Polymer Conjugates« *in preparation* **2012**.
- [588] K. Pagel, T. Vagt, T. Kohajda and B. Koksich »From alpha-helix to beta-sheet--a reversible metal ion induced peptide secondary structure switch« *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3, 2500-2502.
- [589] A. J. Doig »Recent advances in helix-coil theory« *Biophys. Chem.* **2002**, 101-102, 281-293.
- [590] M. R. Nilsson »Techniques to study amyloid fibril formation in vitro« *Methods* **2004**, 34, 151-160.
- [591] F. Meng, P. Marek, K. J. Potter, C. B. Verchere and D. P. Raleigh »Rifampicin does not prevent amyloid fibril formation by human islet amyloid polypeptide but does inhibit fibril thioflavin-T interactions: implications for mechanistic studies of beta-cell death« *Biochemistry* **2008**, 47, 6016-6024.
- [592] I. Kheterpal, A. Williams, C. Murphy, B. Bledsoe and R. Wetzel »Structural features of the A β amyloid fibril elucidated by limited proteolysis« *Biochemistry* **2001**, 40, 11757-11767.
- [593] T. Wang, W. L. Lau, W. F. DeGrado and F. Gai »T-jump infrared study of the folding mechanism of coiled-coil GCN4-p1« *Biophys. J.* **2005**, 89, 4180-4187.
- [594] P. Polverino de Laureto, N. Taddei, E. Frare, C. Capanni, S. Costantini, J. Zurdo, F. Chiti, C. M. Dobson and A. Fontana »Protein aggregation and amyloid fibril formation by an SH3 domain probed by limited proteolysis« *J. Mol. Biol.* **2003**, 334, 129-141.
- [595] C. E. MacPhee and C. M. Dobson »Formation of Mixed Fibrils Demonstrates the Generic Nature and Potential Utility of Amyloid Nanostructures« *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 12707-12713.
- [596] D. M. Ridgley, K. C. Ebanks and J. R. Barone »Peptide Mixtures Can Self-Assemble into Large Amyloid Fibers of Varying Size and Morphology« *Biomacromolecules* **2011**, 12(10), 3770-3779.
- [597] T. N. Melnik, V. Villard, V. Vasiliev, G. Corradin, A. V. Kajava and S. A. Potekhin »Shift of fibril-forming ability of the designed α -helical coiled-coil peptides into the physiological pH region« *Protein Eng.* **2003**, 16, 1125-1130.
- [598] Y. Zimenkov »Rational Design of a nanoscale helical scaffold« *Tetrahedron* **2004**, 60, 7237-7246.
- [599] Y. H. Chen, J. T. Yang and K. H. Chau »Determination of the helix and beta form of proteins in aqueous solution by circular dichroism« *Biochemistry* **1974**, 13, 3350-3359.
- [600] K. N. Liu, H. Y. Wang, C. Y. Chen and S. S. Wang »L-Arginine reduces thioflavin T fluorescence but not fibrillation of bovine serum albumin« *Amino Acids* **2011**, 39, 821-829.
- [601] H. LeVine, 3rd »Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution« *Protein Sci.* **1993**, 2, 404-410.
- [602] H. LeVine, 3rd »Quantification of beta-sheet amyloid fibril structures with thioflavin T« *Methods Enzymol.* **1999**, 309, 274-284.
- [603] H. Naiki, K. Higuchi, M. Hosokawa and T. Takeda »Fluorometric determination of amyloid fibrils in vitro using the fluorescent dye, thioflavin T1« *Anal. Biochem.* **1989**, 177, 244-249.
- [604] H. Naiki, K. Higuchi, K. Matsushima, A. Shimada, W. H. Chen, M. Hosokawa and T. Takeda »Fluorometric examination of tissue amyloid fibrils in murine senile amyloidosis: use of the fluorescent indicator, thioflavine T« *Lab. Invest.* **1990**, 62, 768-773.
- [605] M. Biancalana and S. Koide »Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils« *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, 1804, 1405-1412.
- [606] M. R. H. Krebs, E. H. C. Bromley and A. M. Donald »The binding of thioflavin-T to amyloid fibrils: localisation and implications« *J. Struct. Biol.* **2005**, 149, 30-37.

- [607] M. Lindgren, K. Sörgjerd and P. Hammarström »Detection and characterization of aggregates, prefibrillar amyloidogenic oligomers, and protofibrils using fluorescence spectroscopy« *Biophys. J.* **2005**, 88, 4200-4212.
- [608] V. I. Stsiapura, A. A. Maskevich, V. A. Kuzmitsky, V. N. Uversky, I. M. Kuznetsova and K. K. Turoverov »Thioflavin T as a molecular rotor: fluorescent properties of thioflavin T in solvents with different viscosity« *J. Phys. Chem. B* **2008**, 112, 15893-15902.
- [609] V. I. Stsiapura, A. A. Maskevich, S. A. Tikhomirov and O. V. Buganov »Charge transfer process determines ultrafast excited state deactivation of thioflavin T in low-viscosity solvents« *J. Phys. Chem. A* **2010**, 114, 8345-8350.
- [610] P. K. Singh, M. Kumbhakar, H. Pal and S. Nath »Ultrafast Torsional Dynamics of Protein Binding Dye Thioflavin-T in Nanoconfined Water Pool« *J. Phys. Chem. B* **2009**, 113(25), 8532-8538.
- [611] K. J. Robbins, G. Liu, G. Lin and L. N. D. »Detection of Strongly Bound Thioflavin T Species in Amyloid Fibrils by Ligand-Detected 1H NMR« *J. Phys. Chem. Lett.* **2011**, 2, 735-740.
- [612] F. Lottspeich and H. Zorbas »Bioanalytik« Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, **1998**.
- [613] J. Lebowitz, M. S. Lewis and P. Schuck »Modern analytical ultracentrifugation in protein science: a tutorial review« *Protein Sci.* **2002**, 11, 2067-2079.
- [614] A. Fontana, P. P. de Laureto, B. Spolaore, E. Frare, P. Picotti and M. Zamboni »Probing protein structure by limited proteolysis« *Acta Biochim. Pol.* **2004**, 51, 299-321.
- [615] V. Munoz and L. Serrano »Elucidating the folding problem of helical peptides using empirical parameters« *Nat. Struct. Biol.* **1994**, 1, 399-409.
- [616] V. Munoz and L. Serrano »Development of the multiple sequence approximation within the AGADIR model of alpha-helix formation: comparison with Zimm-Bragg and Lifson-Roig formalisms« *Biopolymers* **1997**, 41, 495-509.
- [617] F. Lottspeich and H. Zorbas »Bioanalytik« Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, **1998**.
- [618] G. Stubbs »Developments in fiber diffraction« *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1999**, 9, 615-619.
- [619] O. Paris, C. Li, S. Siegel, G. Weseloh, F. Emmerling, H. Riesemeier, A. Erko and P. Fratzl »A new experimental station for simultaneous X-ray microbeam scanning for small- and wide-angle scattering and fluorescence at BESSY II« *J. Appl. Cryst.* **2007**, 40(Supplement), 466-470.
- [620] A. P. Hammersley »European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) Internal Report. ESRF98HA01T, FIT2D V9.129 Reference Manual V3.1« ESRF, Grenoble, France, **1998**.
- [621] F. U. Hartl und M. Hayer-Hartl »Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo« *Nature Struct. Mol. Biol.*, **2009**, 16, 9, 574-581.
- [622] E. Brandenburg, H.v. Berlepsch, U.I.M. Gerling, C. Böttcher, B. Kokschi »Inhibition of Amyloid Aggregation by Formation of Helical Assemblies« *Chemistry - A European Journal*, **2011**, 17(38), 10651-10661.
- [623] E. Brandenburg, H.v. Berlepsch, J. Leiterer, F. Emmerling, B. Kokschi »Formation of α -Helical Nanofibers by Mixing β -Structured and a α -Helical Coiled Coil Peptides« **2012**, Manuskript in Bearbeitung.
- [624] A. Kashiwada, M. Tsuboi, N. Takamura, E. Brandenburg, K. Matsuda, B. Kokschi »Design and characterization of endosomal-pH-responsive coiled coil for constructing artificial membrane fusion system.« *Chemistry - A European Journal*, **2011**, 17, 6179 - 6186
- [625] H.v. Berlepsch, E. Brandenburg, B. Kokschi, C. Böttcher »Peptide adsorption to cyanine dye aggregates revealed by cryo-transmission electron microscopy« *Langmuir*, **2010**, 26, 11452-11460.
- [626] H. Heise »Solid-State NMR Spectroscopy of Amyloid Proteins« *ChemBioChem*, **2008**, 9(2), 179-89

