

Bildung von Peptidfibrillen

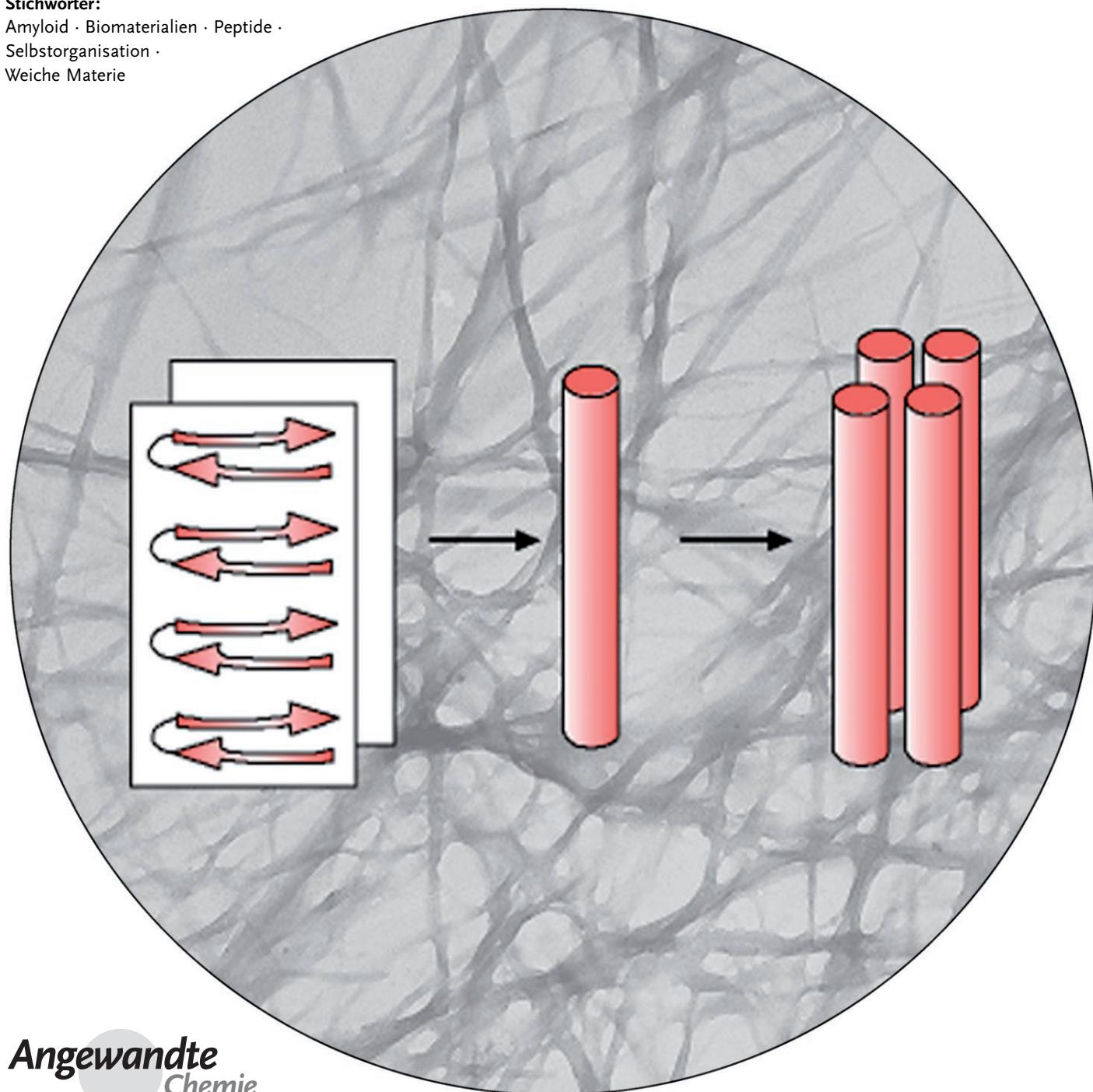
Ian W. Hamley*

Stichwörter:

Amyloid · Biomaterialien · Peptide ·

Selbstorganisation ·

Weiche Materie



Die Bildung von Peptidfibrillen spielt eine bedeutende Rolle bei vielen Krankheiten, die durch Amyloidablagerungen verursacht werden. Intensiv erforscht wird die Bildung von Fibrillen aber auch wegen ihres großen Anwendungspotenzials in der Bionanotechnologie, wo Hydrogele aus Peptidfibrillen als Zellgerüste und als Substrate für funktionelle und responsive Biomaterialien, Biosensoren und Nanodrähte Anwendung finden können. In diesem Aufsatz werden die grundlegenden Aspekte der Selbstorganisation von Peptiden zu Fibrillen behandelt. Sowohl natürliche amyloidbildende Peptide als auch synthetische Verbindungen, z. B. Peptidfragmente, Copolymeren und Amphiphile, werden diskutiert.

1. Einführung

Der vorliegende Aufsatz behandelt die Bildung von Fibrillen aus Peptiden und Peptidverbindungen. Dabei liegt der Schwerpunkt besonders auf Fibrillen des Amyloidstrukturtyps, die β -Faltblattstrukturen enthalten; andere Strukturtypen, z. B. Kollagenfibrillen, betrachten wir nicht. Das große Interesse an diesem Thema erklärt sich aus den zahlreichen Krankheiten, bei denen die Bildung von Amyloidstrukturen eine Rolle spielt, aber auch aus den Möglichkeiten, die Peptidfibrillen als Strukturelemente in der Bionanotechnologie bieten.

Die Bezeichnung „amyloid“ bezieht sich auf Proteinablagerungen mit einem Erscheinungsbild, das zuerst bei Stärke beobachtet wurde (amyloid bedeutet eigentlich stärkeähnlich). Insbesondere werden damit Proteine und Peptide bezeichnet, die Fibrillen mit der Cross- β -Struktur bilden, in denen das Proteingerüst senkrecht zur Fibrillenachse orientiert ist.^[1–5] Die β -Faltblattseinheiten bilden in Selbstorganisation Protofilamente, die z. B. aus Bündeln verdrillter β -Faltblätter bestehen können; die Protofilamente lagern sich anschließend zu Amyloidfasern zusammen (Abbildung 1).^[4,6] Die Struktur der Fibrillen wird in Abschnitt 2 ausführlicher behandelt. Abbildung 2 zeigt ein typisches Transmissionselektronenmikroskopie(TEM)-Bild von Amyloidfibrillen.

Die Bildung von Fibrillen ist symptomatisch für viele Amyloidose-Krankheiten; Beispiele sind die Alzheimersche

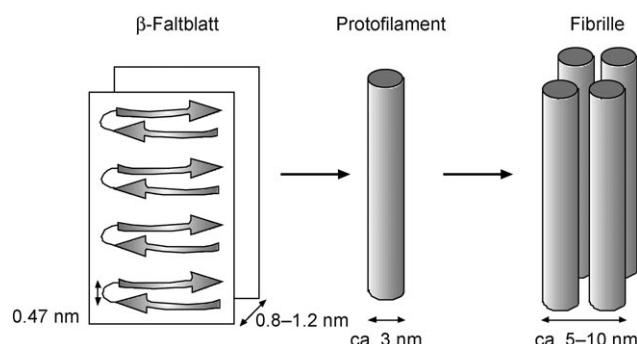


Abbildung 1. Hierarchische Struktur von Amyloidfibrillen.

Aus dem Inhalt

1. Einführung	8275
2. Struktur von Fibrillen	8277
3. Charakterisierung der Fibrillenbildung	8277
4. Kinetik (und Mechanismus) der Fibrillenbildung	8279
5. Aggregate der Fibrillenvorstufen sind toxischer als die fertigen Fibrillen	8281
6. Amyloidbildung ist nicht sequenzspezifisch	8282
7. Fibrillenbildung von Fragmenten	8283
8. Fibrillenbildung von de novo hergestellten Peptiden	8284
9. Peptidamphiphile und Peptidcopolymere	8285
10. Peptidnanoröhrchen	8287
11. Gele aus Peptidfibrillen	8289
12. Fibrillen aus α -Helixpeptiden	8290
13. Zusammenfassung und Ausblick	8291

Krankheit und die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit^[6,8,9] (Listen weiterer Krankheiten, die aus Proteinaggregationen resultieren, findet man in Lit. [10,11]). In einigen Spezies scheint die Amyloidbildung einen Zweck zu erfüllen.^[12–14] Im Krankheitsfall werden Fibrillen aus Proteinen oder Peptiden wie dem Amyloid- β -Peptid (A β) oder dem Tau-Protein gebildet. Die Bildung von Fibrillen aus A β wurde ausführlich untersucht, denn sie ist für eine Reihe von Krankheiten und eine große Zahl von Patienten relevant. Im Menschen kommen zwei Varianten dieses Amyloidpeptids vor: A β 40 und A β 42 (diese Notation bezieht sich jeweils auf das gesamte Peptid mit der angegebenen Zahl von Aminosäure-Einheiten), wobei die Fibrillenbildung bei A β 42 schneller verläuft.^[15] Man geht heute davon aus, dass die Protofilamente, die sich am Beginn der Selbstorganisation bilden, die eigentlichen toxischen Reagenzien sind.^[8,16–21] In Abschnitt 5

[*] Prof. I. W. Hamley
Department of Chemistry
University of Reading
Reading, Berkshire RG6 6AD (Großbritannien)
Fax: (+44) 118-378-8450
E-Mail: i.w.hamley@reading.ac.uk

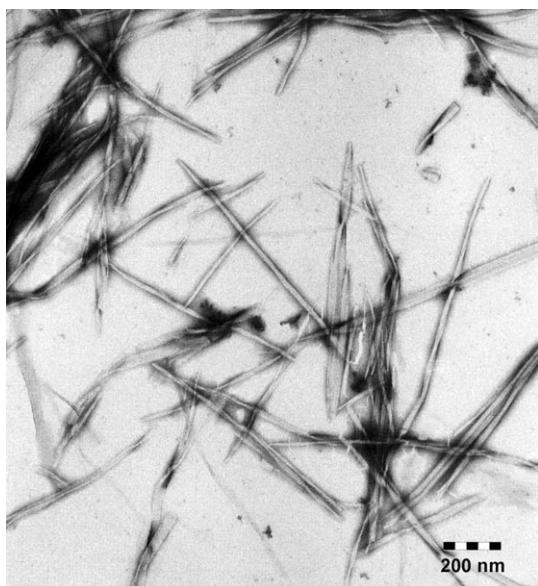


Abbildung 2. TEM-Bild von Amyloidfibrillen aus dem Peptidfragment FFKLVFF.^[7]

werden wir dies ausführlicher diskutieren. Amyloid- β (Abbildung 3) entsteht bei der proteolytischen Spaltung des Amyloid-Precursor-Proteins (APP), eines Transmembran-

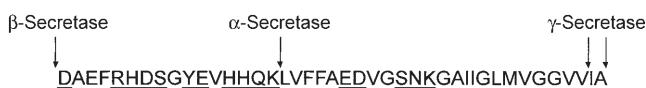


Abbildung 3. Aminosäuresequenz von A β 42. Die Enzymspaltstellen sind gekennzeichnet, und polare Reste sind unterstrichen.

proteins mit unbekannter Funktion.^[8] Der N-Terminus des Peptids entsteht bei der Spaltung mit β -Secretase in der extrazellulären Domäne von APP, der C-Terminus resultiert aus der Spaltung mit γ -Secretase im Intramembranbereich (Abbildung 3). Ein drittes Enzym, α -Secretase, katalysiert eine Spaltung zwischen den Aminosäuren 16 und 17 in A β und verhindert so die Bildung von Fibrillen. Die Bildung von A β -Oligomeren läuft intrazellulär ab, wie In-vivo-Experimente



Ian Hamley, geboren 1965, ist Diamond Professor of Physical Chemistry und Leiter der Fakultät für Physikalische Chemie an der University of Reading. Er promovierte 1991 an der University of Southampton und ging danach mit einem Stipendium der Royal Society an das FOM-Institute for Atomic and Molecular Physics in Amsterdam. 1992 forschte er als Postdoktorand bei Frank Bates an der University of Minnesota in Minneapolis. Er kehrte 1993 als Lecturer für Physik an die University of Durham nach England zurück und schloss sich 1995 dem Chemistry Department der University of Leeds an, wo er 2004 Professor wurde. 2005 wechselte er an die University of Reading.

mit humaner Cerebrospinalflüssigkeit ergaben, bei denen Natriumdodecylsulfat(SDS)-stabile Dimere von A β erhalten wurden.^[22] Eine Inkubation führte nicht zur Produktion extrazellulärer Oligomere, allerdings wurden Oligomere in neuralen und nichtneuralen Zelllinien gefunden.

Das Auftreten der Alzheimerschen Krankheit ist mit verschiedenen Genen in Verbindung gebracht worden; dazu zählen die Gene für APP,^[23] Präsenilin 1 und 2 (PSEN1 und PSEN2)^[24,25] sowie Apolipoprotein E (APOE).^[26–29] Aktuelle Untersuchungen lassen darauf schließen, dass in einem späteren Stadium der Anfangsphase der Alzheimerschen Krankheit eine intrazelluläre Akkumulierung von A β in den späten Endosomen stattfindet, wo die Spaltung durch die Enzyme β -Secretase und γ -Secretase zur Bildung von A β führt; dabei hängt die Funktionsweise von γ -Secretase von Präsenilin ab.^[30] Ein Gen, das an dem Recycling von APP in den Endosomen beteiligt ist, wurde identifiziert und mit *SORL1* oder *LR11* bezeichnet. Normalerweise dirigiert das Proteinprodukt dieses Gens APP in die Recycling-Endosomen, allerdings können Mutationen zu einer Abnahme des Proteinprodukts und damit zu einem Reaktionsweg führen, bei dem die A β -Produktion durch die Enzyme in den späten Endosomen ansteigt. Für die Alzheimersche Krankheit wurden verschiedene Therapien vorgeschlagen,^[9] die wir aber im Rahmen dieses Aufsatzes nicht besprechen werden.

Das Tau-Protein ist am Aufbau der Mikrotubuli und an der Stabilisierung des Cytoskeletts (besonders in den F-Actinfibrillen) beteiligt. Mutationen können zu Filamentablagerungen führen, die bei neurodegenerativen Krankheiten wie der Pickschen Krankheit oder dem Parkinson-Demenz-Komplex von Guam beobachtet wurden.^[8] Filamentablagerungen aus Tau-Protein treten bei diesen Krankheiten immer auf, selbst wenn keine Ablagerungen aus A β beobachtet werden. Die genaue Wechselwirkung zwischen A β und Tau bei der Ablagerung von Fibrillen ist bisher nicht geklärt, es scheint aber einen synergetischen Effekt zu geben, der die Actinbündelung und die Neurodegeneration verstärkt.^[8,31] Wie im Fall von A β wurde vorgeschlagen, dass die toxische Wirkung von Oligomerspezies ausgeht. Die von Tau induzierte neuronale Degeneration wurde *in vivo* untersucht. Hyperphosphorylierte Formen dieses an Mikrotubuli bindenden Proteins induzieren die Akkumulierung von F-Actin, wie mit In-vivo-Untersuchungen an Drosophila und Mäusen nachgewiesen wurde.^[31]

Im ersten Teil dieses Aufsatzes liegt der Schwerpunkt auf Fibrillen, die aus β -Faltblattstrukturen aufgebaut sind. Abschnitt 2 beschreibt die Struktur der Fibrillen. In Abschnitt 3 werden kurz die Methoden vorgestellt, mit denen die Bildung von Fibrillen charakterisiert wird. In Abschnitt 4 werden Aspekte des Mechanismus und die Kinetik der Selbstorganisation diskutiert. Die Abschnitte 5 und 6 beschäftigen sich mit der Toxizität und der Sequenzabhängigkeit der A β -Amyloidbildung. In den Abschnitten 7–10 wird die Bildung von Fibrillen aus verschiedenen anderen Peptiden und Peptidverbindungen behandelt. Abschnitt 11 diskutiert die Bildung von Gelphasen aus Fibrillen, und Abschnitt 12 fasst kurz aktuelle Arbeiten zusammen, die sich mit der Bildung von Fibrillen aus Peptiden mit Coiled-coil-Strukturen beschäftigen.

2. Struktur von Fibrillen

Amyloidfibrillen enthalten Bündel aus β -Faltblattseinheiten, deren Grundgerüste senkrecht zur Fibrillenachse orientiert sind; diese Struktur wird als „Cross- β -Struktur“ bezeichnet.^[1-5] Abbildung 4 zeigt eine verdrillte, aus vier β -



Abbildung 4. Helicale Packung in einem Bündel aus vier Protofilamenten. Die Struktur wurde für Insulin-Amyloidfibrillen vorgeschlagen. Wiedergabe mit Genehmigung aus Lit. [34].

Faltblattsträngen bestehende Fibrille mit einer Cross- β -Struktur. Fibrillen haben oft eine Helixstruktur; Beispiele sind Transthyretin,^[32] die SH3-Domäne von Phosphatidyl-inositol-3'-kinase^[33] und Rinderinsulin^[34] (weitere Beispiele sind in Lit. [5] aufgeführt). Die Helixstruktur resultiert aus der bevorzugten rechtshändigen Verdrillung der β -Faltblattseinheiten.^[35,36] Mit Infrarotspektroskopie wurde nachgewiesen, dass sich die β -Faltblattseinheiten in den Fibrillen antiparallel anordnen; eines der ersten Beispiele für derartige Messungen war eine Untersuchung von humanem Amyloidprotein.^[37]

Abbildung 5 zeigt die β -Strang-Turn- β -Strang-Konformation von $\text{A}\beta(18-42)$ (die Aminosäuren 1-17 sind ungeordnet) in einer Fibrille mit Cross- β -Struktur. Festkörper-

Stapelperiodizität der β -Faltblattseinheiten resultiert (die Ursache für die unterschiedlichen Werte liegt in den unterschiedlichen Abmessungen der Seitenketten). Die meisten Röntgenuntersuchungen der Cross- β -Struktur wurden an getrockneten Filmen durchgeführt. Da die Hydratation die Struktur von β -Faltblattfibrillen beeinflussen kann, untersuchten Squires und Mitarbeiter, ob die Cross- β -Struktur auch in Lösung in einer strömungsorientierten Probe erhalten bleibt.^[40] Die Weitwinkel-Röntgenbeugung (wide-angle x-ray scattering, WAXS) an einem synthetischen Peptid (ein Fragment von Transthyretin) und an Hühnereiweißlysozym ergab tatsächlich das gleiche Beugungsbild wie die an getrockneten Proben; die Cross- β -Struktur ist also auch in Lösung vorhanden und kein von der Trocknung verursachtes Artefakt.

Perutz et al. schlugen vor, dass Amyloidfibrillen aus wassergefüllten Nanoröhrchen bestehen.^[41] Sie schlossen dies aus der Analyse von Röntgenbeugungsdaten des polyglutaminreichen Peptids $\text{D}_2\text{Q}_{12}\text{K}_2$ und der natürlichen polyglutaminreichen Peptide Huntington und Hefephrion Sup35 sowie aus einem Elektronenmikroskopbild von Sup35. Allerdings wurde diese Analyse von zwei Arbeitsgruppen infrage gestellt, die ein Modell aus gestapelten β -Faltblattseinheiten für die Röntgenbeugungsdaten von $\text{D}_2\text{Q}_{12}\text{K}_2$ vorschlugen.^[42-44] (Die zweite Arbeitsgruppe^[43,44] gab eine ähnliche Struktur auch für $\text{K}_2\text{Q}_{28}\text{K}_2$ und $\text{K}_2\text{Q}_{45}\text{K}_2$ an). Bestimmte Merkmale im Röntgenbeugungsbild der polyglutaminreichen Peptide lassen es ebenfalls sehr unwahrscheinlich erscheinen, dass das Modell der wassergefüllten Nanoröhrchen die allgemeine Struktur von Amyloidfasern wiedergibt.^[42]

3. Charakterisierung der Fibrillenbildung

3.1. Einfärbung

Eine Methode zur Identifizierung von Amyloidfibrillen ist die Einfärbung mit Kongorot. Bei Bestrahlung mit polarisiertem Licht zeigen mit Kongorot eingefärbte Amyloidproben eine grüne Doppelbrechungsfarbe.

Ein gebräuchlicher Fluoreszenzfarbstoff für die Untersuchung der Amyloidbildung ist Thioflavin T, das bei 450 nm angeregt wird und ein Fluoreszenzmaximum bei 482 nm aufweist.^[45,46]

3.2. Röntgenbeugung

Wie in Abschnitt 2 erwähnt, werden Weitwinkel-Röntgenbeugungs(WAXS)-Messungen normalerweise an getrockneten Proben in der Form von Filmen oder aus der Lösung erhaltenen Fäden vorgenommen. Weitere Methoden zur Herstellung ausgerichteter Proben^[47] umfassen den Einsatz von Spannrahmen oder von Kryoschleifen, die getrocknete flache Filme („Matten“) produzieren. Um die Ausrichtung zu verbessern, können Fäden auch in Gegenwart eines Magnetfelds getrocknet werden. Aus Kleinwinkel-Röntgenbeugungsmessungen (small-angle x-ray scattering, SAXS) können Informationen über die Sekundärstruktur bei größeren Längenskalen (5–100 nm) erhalten werden.

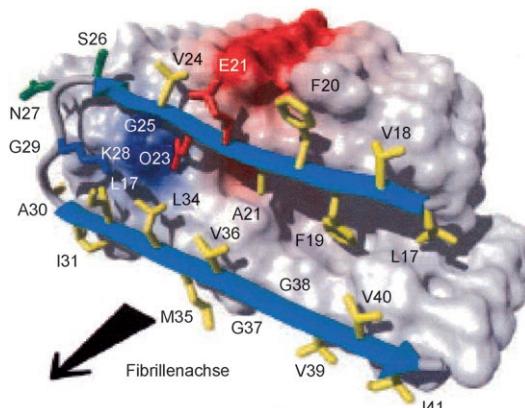


Abbildung 5. Aus H/D-Austausch-NMR-Spektroskopie erhaltene Konformation von $\text{A}\beta(17-42)$. Die Farben Gelb, Grün, Rot und Blau kennzeichnen hydrophobe, polare, negativ geladene bzw. positiv geladene Aminosäuren. Positiv oder negativ geladene Oberflächenabschnitte sind in Blau bzw. Rot, übrige Oberflächen in Weiß dargestellt. Wiedergabe mit Genehmigung aus Lit. [39].

NMR-Messungen ergaben (unter Berücksichtigung der Befunde von Röntgenbeugungs- und TEM-Experimenten) eine ähnliche Struktur für $\text{A}\beta 40$.^[38]

Charakteristisch für das Röntgenbeugungsbild der Cross- β -Struktur sind eine meridionale Reflexion bei 4.7 Å, was dem Abstand zwischen den Peptidgerüsten entspricht, sowie eine breitere äquatoriale Reflexion bei 8–12 Å, die aus der

3.3. Dynamische und statische Lichtstreuung

Die Analyse der Intensitätsautokorrelationsfunktion von Licht, das an Partikeln gestreut wird, die einer Translations- oder Rotationsdiffusion ausgesetzt sind, ermöglicht die Messung des Diffusionskoeffizienten und damit, über die Stokes-Einstein-Beziehung, die Bestimmung des effektiven hydrodynamischen Radius. Mit verschiedenen Näherungsmethoden lassen sich aus dieser Größe die Länge und der Durchmesser der Fibrillen erhalten.^[48,49]

Mit Messungen der statischen Lichtstreuung kann man das Molekulargewicht von Peptidaggregaten bestimmen; die Winkelabhängigkeit der Streuintensität liefert außerdem Hinweise auf die Form der Partikel.

Lichtstreuungsmessungen wurden oft eingesetzt, um die Bildung von Amyloidprotofilamenten und Amyloidfibrillen zu beobachten.^[50-53]

3.4. Circulardichroismus

Mit Circulardichroismus (CD) wird die unterschiedliche Absorption von rechts- und linkscircular polarisiertem Licht bezeichnet. Circulardichroismusmessungen reagieren empfindlich auf die Gegenwart chiraler Gruppen und sind eine grundlegende Technik für die Charakterisierung der Sekundärstruktur von Proteinen. Die übliche Vorgehensweise besteht aus der Bestimmung charakteristischer Merkmale („Fingerprinting“) im Bereich des fernen UV (190–250 nm).^[54] Daten im Nah-UV-Bereich liefern Informationen über die Faltstruktur von Peptiden mit aromatischen Resten. Im Fern-UV-Bereich werden charakteristische Minima in den Absorptionsspektren bei ca. 208 und 222 nm (α -Helix), bei 216–220 nm (β -Faltblatt) oder bei 195 nm (Zufallsknäuel) beobachtet. CD-Spektren werden normalerweise mithilfe von Datenbanken analysiert, die für Peptide mit bekannter Kristallstruktur angelegt wurden.^[54] Auf diese Weise können die genauen Anteile der Sekundärstrukturen bestimmt und die CD-Spektren „kalibriert“ werden. Mehrere Algorithmen stehen zur Verfügung, die auf verschiedenen Datenbanken aufbauen. Die meisten beziehen sich nur auf größere Proteine, es gibt aber auch in begrenztem Umfang Referenzdaten (und Kurvenangleichungsprogramme) für kürzere Peptide.^[55]

3.5. FTIR-Spektroskopie

In FTIR-Spektren wird das Amid-I-Band bei 1620–1640 cm^{-1} den β -Faltblattseinheiten zugeordnet.^[56-60] Verglichen mit Knäuel- oder Helixstrukturen ist dieses Band zu tieferen Frequenzen verschoben. Ein anderes Seitenband bei 1680–1690 cm^{-1} wurde Wasserstoffbrücken zugeschrieben; allerdings legen Ab-initio-Rechnungen^[61] nahe, dass es aus der Schwingungskopplung von Aminosäureresten resultieren könnte. Das schmale, intensive Band, das manche Peptide bei 1610–1620 cm^{-1} zeigen, wird auf die antiparallele Aggregatstruktur zurückgeführt.

Das Amid-II-Band bei 1550 cm^{-1} resultiert hauptsächlich aus den N-H-Deformationsschwingungen. Diese Schwin-

gungsfrequenz ändert sich in der Gegenwart von Deuterium (in D_2O wird das Wasserstoffatom der N-H-Bindung gegen Deuterium ausgetauscht), die das Amid-II-Band um etwa 100 cm^{-1} auf 1450 cm^{-1} verschiebt.

In den meisten Fällen ist eine vollständige quantenchemische Analyse der Schwingungsmoden von Peptiden oder Proteinen nicht möglich, sodass die FTIR-Daten mithilfe von Fingerprinting oder Peakangleichung ausgewertet werden müssen.^[56,57] Wegen der Überlappung von Merkmalen in den Spektren sind diese Methoden allerdings mit einer gewissen Unsicherheit behaftet.^[56,57,59]

FTIR-Messungen lassen sich auf die Untersuchung des Lineardichroismus in ausgerichteten, isotopenmarkierten Proben ausdehnen (FTIR mit linear polarisiertem Licht); auch Circulardichroismusspektren können im IR-Bereich aufgenommen werden (Schwingungs-Circulardichroismus).^[58]

3.6. NMR-Spektroskopie

Aus Festkörper-NMR-Spektren lassen sich detaillierte Informationen über die Struktur von Amyloidfibrillen erhalten. Verschiedene hochauflösende Messungen können mit MAS (magic angle spinning) an ^{13}C - oder ^{15}N -markierten Peptiden vorgenommen werden.^[62-65] Aus homo- und heteronuclearen zwei- und dreidimensionalen Spektren können Informationen über interatomare Abstände und Torsionswinkel in getrockneten, isotopenmarkierten Peptiden erhalten werden.^[66,67]

Wasserstoff/Deuterium-Austauschtechniken wurden ebenfalls eingesetzt, um die Strukturänderungen während der Amyloidbildung zu untersuchen.^[66] Die Austauschgeschwindigkeit liefert Informationen über Umlagerungen der Segmente eines Proteins oder Peptids während der Faltung, Entfaltung oder Fibrillenbildung. Mit dieser Methode konnte auch die dreidimensionale Struktur von A β 42 bestimmt werden (siehe Abbildung 5).^[39]

3.7. Rasterkraftmikroskopie und Elektronenmikroskopie

Mit diesen Methoden können Peptidfibrillen direkt abgebildet werden. Die Rasterkraftmikroskopie (AFM) liefert Bilder der Oberfläche. Die Methode wurde bisher hauptsächlich dazu eingesetzt, Fibrillen aus Lösungen abzubilden, die auf planaren festen Substraten, z. B. Glimmer, getrocknet wurden. Zu den elektronenmikroskopischen Methoden gehört die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM), mit der getrocknete Filme auf weitmaschigen Gittern untersucht werden (um den Kontrast zu erhöhen, enthalten die Gitter normalerweise schwermetallhaltige Verbindungen), und die Rasterelektronenmikroskopie (SEM), mit der Oberflächen abgebildet werden. Um Artefakte zu vermeiden, die durch langsames Trocknen entstehen können, werden meist Kryotechniken für die Präparation bevorzugt.

4. Kinetik (und Mechanismus) der Fibrillenbildung

Die Fibrillenbildung läuft offenbar über Aggregationsvorstufen ab,^[11,15,50,68,69] die aus kleinen (sphärischen) Proteinklumpen bestehen, die im Verlauf der Fibrillenbildung verbraucht werden.^[50,68] AFM-Untersuchungen von A β 40 und A β 42 lieferten überzeugende Bilder von der anfänglichen Bildung der Protofilamente und der folgenden Fibrillenbildung aus den Filamenten.^[68] Mit ergänzenden Lichtstreuungs-, TEM- und SEC-Untersuchungen wurde das Molekulargewicht in den verschiedenen Stadien des Polymerisationsprozesses bestimmt.^[50] Die Aggregation von A β wurde auf hydrophilen Glimmer- und hydrophoben Graphitsubstraten untersucht. Auf Glimmer wurden bei niedriger Konzentration pseudo-micellare Aggregate und bei höherer Konzentration Fibrillen beobachtet. Dagegen bildeten sich auf Graphit Faltblattstrukturen, deren Dicke der Länge der gestreckten Peptide entsprach, die parallel zu den Graphit-Gitterachsen orientiert waren.^[68] Eine weitere AFM-Untersuchung beschäftigte sich mit der Fibrillenbildung von A β 42, der Bildung von Plaque und der Wechselwirkung zwischen A β 40 und A β 42.^[70] Dabei wurde die Ablagerung auf einem synthetischen Templat untersucht, dessen Oberflächen mit *N*-Hydroxysuccinimidester aktiviert waren. A β 42-Oligomere erwiesen sich als effektivere Keime für das Fibrillenwachstum als Monomere oder reife Fibrillen.

Vor kurzem wurde die Fragestellung untersucht, ob sich Amyloidfibrillen aus partiell gefalteten Intermediaten, die β -Faltblattstrukturen enthalten, oder aus vollkommen denaturierten Strukturen bilden. Bei den meisten Proteinen begünstigen Bedingungen, die zu einer teilweisen Entfaltung führen, die Fibrillenbildung. Beispiele sind Transthyretin,^[71,72] das Prionprotein PrP^C,^[73,74] die leichten Ketten von Immunglobulinen,^[75–77] Lysozym,^[78,79] die SH3-Domäne von Rinderphosphatidylinositol-3-kinase^[80] und β_2 -Mikroglobulin.^[81–83]

Das Ausmaß der Entfaltung und letztlich die Morphologie der Fibrillen scheinen vom Grad der Denaturierung abzuhängen.^[82,84] Diese beiden Eigenschaften wurden von Kad et al. in einer Untersuchung von β_2 -Mikroglobulin miteinander korreliert.^[82] Dobson und Mitarbeiter untersuchten die Aggregation von Acylphosphatase unter milden Denaturierungsbedingungen in wässrigen 2,2,2-Trifluorethanol(TFE)-Lösungen mit verschiedenen Konzentrationen.^[85] Es kam zu einer partiellen Denaturierung, die zur Fibrillenbildung führte. Dagegen wird unter aggressiven Denaturierungsbedingungen, z. B. bei hohen Konzentrationen von Harnstoff oder Guanidiniumchlorid, meist nur ein löslicher, vollkommen entfalteter Zustand beobachtet. Eine Komplikation dieser Untersuchung besteht allerdings darin, dass das native Protein einen beträchtlichen Gehalt an β -Faltblattstrukturen enthält, sodass wahrscheinlich β -Faltblatt-reiche Intermediaten auftreten. Die gleiche Arbeitsgruppe untersuchte die Bildung von Fibrillen bei Myoglobin; in diesem Fall legen die Befunde nahe, dass vor der Fibrillenbildung eine vollständige Denaturierung erfolgt.^[86] Myoglobin weist im nativen Zustand vorwiegend α -helikale Strukturen auf und hat keinen Gehalt an β -Faltblattstrukturen. Es ist daher ein nützliches Modell für die Untersuchung des Mechanismus der Fibril-

lenbildung. CD-, Fluoreszenz- und FTIR-Experimente ergaben, dass die Intermediaten keine β -Faltblattstrukturen enthielten. Die Autoren schlugen vor, dass der Entfaltungsmechanismus ein allgemeines Merkmal der Fibrillenbildung ist. Diese Hypothese wird auch dadurch gestützt, dass viele Proteine Fibrillen bilden können, auch wenn sie keine spezifische Sekundärstruktur aufweisen (siehe Abschnitt 6). Die bei der Entfaltung auftretende Struktur sollte daher die Faltung zurück in den nativen Zustand nicht begünstigen und gleichzeitig ausgedehnte transiente und wasserstoffbrückenfreie Bereiche enthalten, die als Vorstufen der Amyloidfibrillen wirken können.^[85,86]

Dobson et al. und andere Arbeitsgruppen beobachteten, dass die entfaltete Struktur einen erheblichen Gehalt an Poly(L-prolin) II (PPII) aufweisen kann.^[87–89] Raman-spektroskopische Untersuchungen mit polarisiertem Licht (Raman optical activity) an verschiedenen Formen von Synuclein ergaben, dass dies keine hinreichende Bedingung für die β -Faltblattaggregation ist, denn β - und γ -Synuclein zeigen nur eine sehr geringe Tendenz zur Bildung von Fibrillen, obwohl sie einen hohen Gehalt an PPII haben.^[90] Hou et al. untersuchten A β 40- und A β 42-Peptide, in denen die Methioninseitenkette (Rest 35) oxidiert oder reduziert war; mit NMR-Messungen in Lösung wiesen sie Wechselwirkungen zwischen bestimmten Aminosäureresten in den ersten Phasen der Aggregation nach.^[89] Die Befunde lassen darauf schließen, dass für die ersten Schritte der Aggregation sowohl hydrophobe als auch schleifenförmige Strukturen erforderlich sind. Mit NMR-Experimenten in Lösung wurde die Region in A β 40 identifiziert, die für Kontakte zwischen den Fibrillen relevant ist: Dabei handelt es sich um die Sequenz A β (15–24) (weitere Arbeiten über diese Sequenz werden in Abschnitt 7 vorgestellt).^[91] Die NMR-spektroskopischen Daten belegen auch, dass bei geeigneten (physiologischen) Salzkonzentrationen ein löslicher Monomerzustand mit einem aggregierten Oligomerzustand im Gleichgewicht steht, wobei die Lage des Gleichgewichts durch eine Änderung der Anionenstärke verschoben werden kann. Das Molekulargewicht des Oligomers betrug mehr als 100 kDa.^[91]

Mit Kleinwinkel-Röntgenbeugungsmessungen^[92] wurde die Aggregation von mutiertem Myoglobin mit erweiterten Glutamin-Wiederholungssequenzen beobachtet (derartige Sequenzen hängen z. B. mit der Huntingtonschen Krankheit zusammen^[93]). Nach einer thermisch induzierten partiellen Entfaltung wurde die erste Phase der Aggregation untersucht. Dabei wurde ein Aggregat ohne Fibrillen beobachtet, in dessen Röntgenbeugungsbild keine Anzeichen für β -Faltblattstrukturen vorhanden waren. Die Autoren schlugen vor, dass derartige Protofilamente eine Ursache für die toxischen Eigenschaften polyglutaminreicher Proteine sein könnten.

Die Fibrillenbildung ist ein mehrstufiger Prozess, und die zuerst gebildeten Aggregate, die noch keine Fibrillenstruktur aufweisen, können auch wieder zerfallen.^[94] Humane Muskelacylphosphatase wurde unter milden Denaturierungsbedingungen (25 % TFE) in Fluoreszenzexperimenten untersucht. Nach einer partiellen Entfaltung bildeten sich zuerst globuläre Aggregate mit einem Durchmesser von 60–200 nm, die sich dann zu Clustern (400–800 nm Durchmesser) zusammenlagerten. Überschritt die Konzentration der globu-

lären Aggregate einen kritischen Wert, konnten sich auch größere ($> 5 \mu\text{m}$) Überstrukturen bilden. Bei einer Verdünnung (auf 5 % TFE) zerfielen die globulären Aggregate und Cluster. Proteinmonomere falteten sich schnell wieder in den nativen Zustand, während die globulären Aggregate und Cluster (400–800 nm) etwas langsamer zerfielen. Die größeren Überstrukturen wurden von der Verdünnung nicht beeinflusst.

Die Fibrillenbildung von A β 40 setzt oberhalb einer kritischen Konzentration ein, was in Analogie zum Konzept der kritischen Micellenkonzentration beschrieben wurde.^[48,95,96] Das in Abbildung 6 gezeigte Verhalten ist identisch mit dem

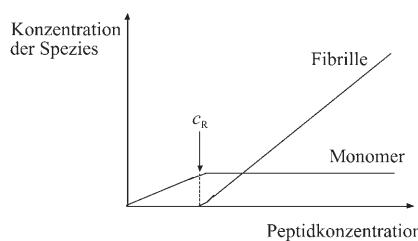


Abbildung 6. Fibrillen- und Monomermenge abhängig von der zugegebenen Proteinmenge. Oberhalb einer kritischen Konzentration c_R setzt die Bildung von Fibrillen ein.

der Micellenbildung.^[97] Die Fibrillenbildung lässt sich mit einem entsprechenden eindimensionalen Modell der Selbstorganisation beschreiben.^[97]

Die Fibrillenbildung setzt üblicherweise nach einer zeitlichen Verzögerung ein, was auf einen Keimbildungs- und Wachstumsprozess schließen lässt.^[48,82,95,96,98–101] Gibt man zuvor hergestellte Aggregate als Keime zu (seeding), tritt keine Verzögerung auf (Abbildung 7).^[95,96]

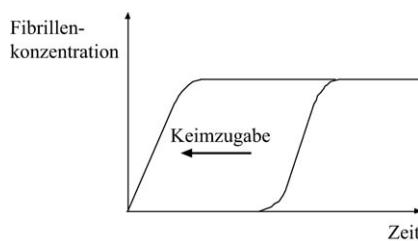


Abbildung 7. Die Zugabe von Aggregaten, die als Keime für die Fibrillenbildung wirken, kann die Verzögerungsphase der Fibrillenbildung unterdrücken.

Bei mehreren Proteinen, einschließlich A β 40, A β 42 und α -Synuclein, bestehen die anfänglich gebildeten Prototiefen aus sphärischen Aggregaten mit ringförmigen Porenstrukturen,^[11,68,69] die sich zu Ketten vereinigen können.^[11,69] Der Prozess zur Bildung der Prototiefen kann vor oder während der Verzögerungsphase ablaufen.

Die durch einen niedrigen pH-Wert und eine erhöhte Temperatur (57 °C) induzierte Bildung von Fibrillen setzt bei

Hühnereiweißlysozym (HEWL) erst nach einer ausgedehnten Verzögerungszeit von 48 Stunden ein. Die Verzögerungszeit hängt nicht von der Konzentration ab, was auf einen Einzelmolekülprozess für die Fibrillenbildung schließen lässt.^[84] Die Beobachtung eines isodichroischen Punktes in den CD-Daten weist darauf hin, dass bei der Entfaltung der Ausgangsspezies, die reich an α -helicalen Strukturen ist, ein kooperativer Prozess mit zwei Zuständen eine Rolle spielt. Eine Probe wurde elf Tage erhitzt und durch Filtration in Fraktionen getrennt; CD-Messungen ergaben, dass das Monomer eine Zufallsknäuelstruktur hatte, während für die Fibrillen zusätzlich ein kleines, für β -Faltblattstrukturen charakteristisches Signal beobachtet wurde. Die Morphologie der Fibrillen hing auch von den Präparationsbedingungen ab.

Bei β -Lactoglobulin setzt die Aggregation bei Erwärmung hingegen sofort ein,^[102] was auf einen anderen Mechanismus der Fibrillenbildung hindeutet. Möglicherweise spielt der Gehalt an β -Faltblattstrukturen eine Rolle, denn β -Lactoglobulin hat einen hohen Gehalt an dieser Sekundärstruktur, während HEWL reich an α -Helixstrukturen ist (30–40 %).^[103,104] Für die wärmeinduzierte Fibrillenbildung von β -Lactoglobulin wurde ein Mechanismus vorgeschlagen, der mehrere Schritte umfasst: Der erste Schritt besteht aus der Aggregation von (partiell) denaturierten Proteinmolekülen zu Fibrillen oder zu nicht fibrillenförmigen Oligomeren. Anschließend erfolgt die reversible Bildung von linearen Aggregaten, aus denen in einem dritten Prozess der „Konsolidierung“ thermisch stabile Fibrillen gebildet werden.^[102]

In Lichtstreuungs- und Neutronenbeugungsexperimenten wurde die Struktur von β -Lactoglobulinaggregaten untersucht, die bei der wärmeinduzierten Denaturierung bei pH 2 entstehen.^[105] Dabei wurde beobachtet, dass die Morphologie von der Ionenstärke abhängt, was auf eine wichtige Rolle der elektrostatischen Wechselwirkungen bei der Selbstorganisation hinweist. Bei niedriger Ionenstärke wurden stäbchenförmige Aggregate beobachtet, während für Lösungen mit höherer Ionenstärke eine fraktale Struktur vorgeschlagen wurde. Bei pH 7, bei dem sich globuläre Aggregate bilden, findet ein zweistufiger Aggregationsprozess statt, der bei pH 2, bei dem sich Fibrillen bilden, nicht auftritt.^[105]

Die Abhängigkeit der Morphologie von der Ionenstärke wurde vor kurzem in AFM- und Lichtstreuungsexperimenten untersucht.^[106] Dabei fand man, dass es eine kritische Konzentration für die Fibrillenbildung gibt und dass mit zunehmender Ionenstärke die Fibrillen kürzer werden und eine größere Krümmung aufweisen. Die bei β -Lactoglobulin bei hohen Konzentrationen auftretende Bildung von Gelphasen aus Fibrillen wird in Abschnitt 11 diskutiert. Die Verzögerungsphase bei Fibrillenbildung kann, wie oben beschrieben, durch Zugabe von zuvor hergestellten Fibrillenbildungskeimen vermieden oder zumindest erheblich reduziert werden.^[6,107]

Mit Fluoreszenzmessungen an β -Lactoglobulin und AFM-Experimenten an Extraktionsproben wurde der Einfluss einer Scherströmung auf die Amyloidbildung untersucht.^[108] Dabei wurde festgestellt, dass die Scherströmung in einer Couette-Zelle (konzentrische Zylinder) die Bildung von sphäroidalen Aggregaten induziert. Diese Aggregate konnten als Keime für eine anschließende Fibrillenbildung

bei einer Inkubation eingesetzt werden; die Fibrillenbildung war gegenüber einer Kontrolllösung, die keine Keime enthielt, signifikant erhöht. Eine ständige Scherung mit einer hohen Scherrate über einen längeren Zeitraum führte zu einer Degradation der zuvor gebildeten Fibrillen zu kürzeren Fibrillen. Diese Ergebnisse wurden im Kontext mit den Bedingungen der physiologischen Blutströmung betrachtet.^[108] Auch in SAXS-, TEM- und DLS-Experimenten (DLS = dynamische Lichtstreuung) wurde das Aufbrechen in kurze stäbchenförmige β -Lactoglobulinfragmente durch eine permanente Scherströmung beobachtet (bei Einsetzen der Scherströmung wurde eine ausrichtende Wirkung festgestellt).^[109]

Für die Wachstumsphase der Fibrillenbildung belegten ältere Untersuchungen an $\text{A}\beta 40$ eine Kinetik erster Ordnung, d.h., die Geschwindigkeit der Fibrillenverlängerung ist zur Konzentration der Monomere proportional.^[48,110,111] Dies ergeben Lichtstreuungsmessungen an $\text{A}\beta 40$ in 0.1 M HCl^[48] (die Kinetik der Aggregation ist pH-abhängig), In-vitro-Untersuchungen der Ablagerung auf Plaques in Hirngewebe von Alzheimer-Patienten^[110] und Thioflavin-T(ThT)-Fluoreszenz-Untersuchungen.^[111] Die Temperaturabhängigkeit der Aggregation von $\text{A}\beta 40$ (bestimmt aus Größenmessungen mit dynamischer Lichtstreuung) folgt der Arrhenius-Beziehung;^[51] der Wert der Aktivierungsenergie beträgt 96 kJ mol⁻¹ und ist vergleichbar mit Werten, die für die Entfaltung mehrerer anderer Peptide gefunden wurden.^[51] Wie oben erwähnt, wurde die Kinetik der verdünnungsinduzierten Disaggregation an Monomeren und neugebildeten Protofilamenten der humanen Muskelacylphosphatase untersucht.^[94] Aktuellere Arbeiten weisen auf eine komplexere Kinetik der Fibrillenbildung mit einer sigmoidalen Wachstumskurve hin.

Zwei Arbeitsgruppen untersuchten die Kinetik der Fibrillenbildung des Hefeprionenproteins Sup35.^[112,113] Für die Wachstumskinetik nach der Zugabe von Keimen wurde ein dreistufiges Modell vorgeschlagen, das Keimbildung, schrittweise Addition von Monomeren, aber auch Fragmentierung von Fibrillen umfasst.^[112] Mit anderen Worten, neben dem Aufbau der Fibrillen durch die Addition von Monomeren gibt es einen konkurrierenden Prozess der Disaggregation. Ein molekulares Chaperon wurde beobachtet, das Sup35 durch Subtraktion von Oligomeren (Hexameren bis Dodecameren) abbaut.^[113] Diese Befunde unterstreichen die Bedeutung von niedermolekularen Oligomeren beim Auf- und Abbau der Fibrillen.

Die Geschwindigkeit der Fibrillenbildung wird erheblich durch die Zugabe von Keimen beeinflusst.^[95] Dabei ist ihre Effizienz offenbar mit der Ähnlichkeit der Sequenzen der Keime und des aggregierenden Proteins korreliert; dies ergeben Untersuchungen, in denen Fibrillen verschiedener Proteine zu einer Lösung von Hühnerlysozym gegeben wurden.^[114] TEM- und Festkörper-NMR-Experimente mit $\text{A}\beta 40$ belegen, dass auch die Morphologie der Fibrillen durch Seeding beeinflusst wird.^[115] Auch die Präparationsbedingungen, besonders der Einsatz von Ultraschall, beeinflussen die Morphologie der Fibrillen und die Toxizität.^[115] In AFM-Untersuchungen an β -Lactoglobulin^[102,116] und HEWL^[84] hing die Morphologie ebenfalls erheblich von den Präparations-

bedingungen ab, wobei die Entfaltung durch den pH-Wert, das Lösungsmittel oder die Zufuhr von Wärme induziert wurde.

Die Geschwindigkeit der Aggregation beeinflusst die Länge der Fibrillen.^[83] Eine schnelle Aggregation führt zu kurzen Fibrillen, während sich unter Bedingungen, die ein langsameres Wachstum begünstigen, längere Fibrillen bilden. Allerdings zeigen neuere ThT-Fluoreszenz-Untersuchungen, dass die Kinetik des keiminduzierten Wachstums von β_2 -Mikroglobulin von Fibrille zu Fibrille variiert, wobei aber stets ein unidirektionales Wachstum und eine Kinetik erster Ordnung beobachtet werden.^[117] Die Ursache für dieses Verhalten könnte in Variationen der β -Faltblattkonfiguration/Wachstumsfront liegen.

5. Aggregate der Fibrillenvorstufen sind toxischer als die fertigen Fibrillen

Man geht derzeit davon aus, dass die Protofilamente, die zu Beginn des Selbstorganisationsprozesses von $\text{A}\beta$ gebildet werden, die eigentlich toxischen Reagentien sind.^[8,15-21,118-124] Untersuchungen von Proteinen, die bei Krankheiten eine Rolle spielen, und auch von anderen Proteinen liefern Belege dafür. In-vivo- und Zellkultur-Experimente ergaben, dass $\text{A}\beta 42$ -Oligomere, die unter Bedingungen gebildet werden, bei denen keine Fibrillen entstehen, eine neurotoxische Wirkung aufweisen.^[118-120] Es wurde nachgewiesen, dass $\text{A}\beta$ -Oligomere, besonders Dimere und Trimere, Lernprozesse bei Ratten verhindern.^[124] Aus Immunglobulin isolierte Anti- $\text{A}\beta$ -Antikörper unterdrücken die Fibrillenbildung vollständig.^[125] Experimenten mit polyklonalen Antikörpern zufolge wird die Toxizität von löslichen Oligomeren durch Antikörper unterdrückt, während fertige Fibrillen keine Antikörperreaktion zeigen.^[122] Dieses Verhalten könnte ein Ausgangspunkt für die Entwicklung einer Schutzimpfung mit $\text{A}\beta 42$ -Oligomeren sein.^[126] Experimente mit $\text{A}\beta$, α -Synuclein und Transthyretin lassen darauf schließen, dass ihre cytotoxische Wirkung eine gemeinsame Ursache hat, die nicht von der jeweiligen Sequenz abhängt (siehe dazu die Diskussion über die allgemeine Ursache der Amyloidbildung in Abschnitt 6).^[16,21] Beispielsweise zeigen zwei nicht mit Krankheiten zusammenhängende Proteine, die N-terminale HypF-N-Domäne von *E. coli* und die SH31-Domäne der Rinderphosphatidyl-inositol-3-kinase, nur dann eine toxische Wirkung auf Zellen, wenn sie dem Kulturmedium in der Form von Fibrillenvorstufen zugesetzt werden.^[16] Vor kurzem durchgeführte In-vivo-Untersuchungen an Mäusen weisen darauf hin, dass der Gedächtnisverlust bei der Alzheimerschen Krankheit mit bestimmten löslichen $\text{A}\beta$ -Multimeren, besonders dem Dodecamer mit einem Molekulargewicht von 56 kDa, zusammenhängt.^[127]

Der Mechanismus der Cytotoxizität könnte mit der Beobachtung zusammenhängen, dass mehrere amyloidbildende Proteine und Peptide Poren oder Kanäle in Membranen bilden.^[18,128-130] Eine Ursache könnte die offene Lage von hydrophoben Regionen in falsch gefalteten Proteinen (z. B. in amyloidbildenden Proteinen) sein.^[129] Eine Rolle könnten auch positive Ladungen auf Peptiden spielen, die zu Wech-

selwirkungen mit negativ geladenen Lipidmembranen führen.^[129] Gemäß der Kanalhypothese ist die Porenbildung für die neurotoxische Wirkung von A β verantwortlich. Arispe et al. wiesen nach, dass A β Membrankanäle bilden kann.^[131-133] Lambert et al. demonstrierten, dass A β 42-Oligomere an Zellmembranen binden und unter Bedingungen, bei denen sich keine ausgereiften Fibrillen bilden, eine cytotoxische Wirkung ausüben.^[118] Auch die Beobachtung, dass die Porenbildung durch die Bindung von Kongorot unterdrückt wird,^[134] weist darauf hin, dass A β zu Protofilamenten aggregieren muss, damit dieser Mechanismus wirksam wird. AFM-Experimente belegen, dass A β in Lipidmembranen Poren bildet, die Multimere des Proteins enthalten.^[135] Die Aufnahme von Ca²⁺ durch die Ionenkanäle führt zur Nervendegeneration und letztlich zum Zelltod.^[135]

Dieser Mechanismus wird auch für die N-terminale Hyp-F-Domäne angenommen, und es liegt nahe, dass er bei mehreren amyloidbildenden Peptiden auftritt; dazu zählen auch Peptide, die bei Krankheiten keine Rolle spielen, sowie Peptide, die mit mehreren seltenen degenerativen Krankheiten zusammenhängen.^[21] Fibrillenvorstufen von α -Synuclein (von denen man weiß, dass sie bei bestimmten Formen der Parkinsonschen Krankheit eine Rolle spielen) weisen eine höhere Permeabilität bei Phospholipidvesikelmembranen als das Wildtyp-Protein auf.^[136] Das selektive Entweichen niedermolekularer Verbindungen lässt auf die Bildung von Poren in der Vesikelmembran schließen.^[136] In Fluoreszenz-Experimenten wurden die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration und der Redoxzustand der N-terminalen Hyp-F-Domäne untersucht. Die cytotoxische Wirkung des Konzentrationsanstiegs freier Ca²⁺-Ionen und reaktiver Sauerstoffspezies ähnelt der Wirkung von Proteinen, die bei bestimmten Amyloidosen auftreten;^[18] dies ist in Einklang mit der Schlussfolgerung, dass die Aggregation und die daraus resultierende Cytotoxizität nicht für eine bestimmte Sequenz spezifisch sind (Abschnitt 6).^[21]

„Pfortner-Reste“ (gatekeeper residues) schirmen in natürlichen Proteinen Sequenzen ab, die zur Aggregation neigen, und unterstützen so die Inhibierung der Fibrillenbildung.^[17] Der Evolutionsdruck hat zur Entstehung von Proteinen geführt, die Reste enthalten, die die Aggregation behindern und/oder die Faltung in den nativen Zustand unterstützen.^[17,100] Mithilfe eines Computerprogramms, das die Aggregationstendenz von Sequenzen analysiert, wurden bestimmte Reste identifiziert, die die Aggregation behindern.^[17]

Wie in Abschnitt 2 erwähnt, weist A β 42 eine größere Tendenz zur Fibrillenbildung und damit auch eine erheblich größere Toxizität als A β 40 auf.^[119,123] Es ist nicht geklärt, ob für die Toxizität von A β extrazelluläre oder intrazelluläre Prozesse verantwortlich sind. Intrazelluläres A β 42 ist zumindest für humane Nervenzellen toxisch.^[123] Die Beobach-

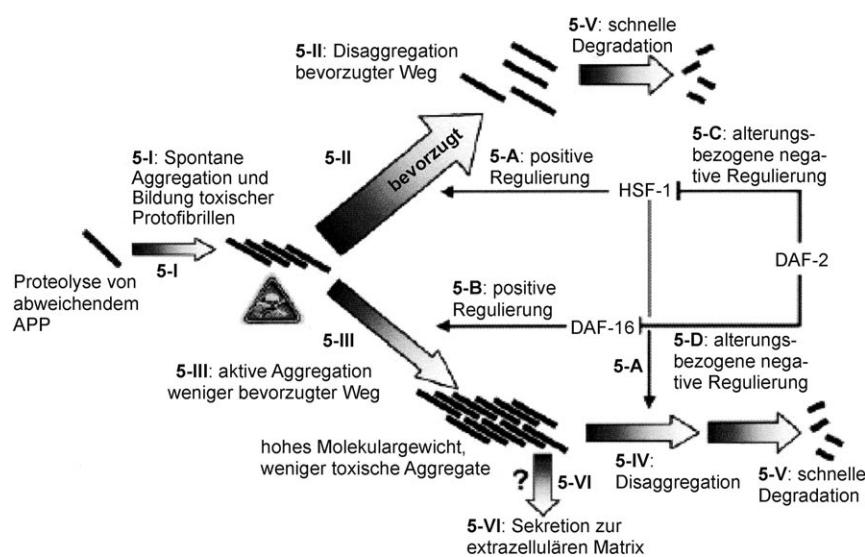


Abbildung 8. Regulationswege der Fibrillenbildung bei der altersbedingten A β -Proteolyse. (Wiedergabe aus Lit. [19] mit Genehmigung. Copyright 2006, American Association for the Advancement of Science (AAAS).)

tung, dass Protofilamente eine größere toxische Wirkung haben als fertige Fibrillen, scheint auch auf das Tau-Protein zuzutreffen.^[8]

Abbildung 8 zeigt schematisch die vorgeschlagenen Reaktionspfade für die In-vivo-Aggregation von A β 42, die für die in höherem Alter auftretenden proteotoxischen Wirkungen relevant sein könnten.^[19] Der Insulin/Insulin-Wachstumsfaktor-1-Signalweg (insulin/insulin growth factor-1-like signalling pathway, IIS) wird durch den DAF-2-Rezeptor reguliert (eine Inhibition der Expression von DAF-2 verlängert die Lebensspanne von Würmern). Die Transkriptionsfaktoren Hitzeschockfaktor (HSF-1) und DAF-16 regulieren entgegengesetzte Disaggregations- und Aggregationsprozesse. Der bevorzugte Mechanismus zum schnellen Abbau toxischer Aggregate (5-II) wird von HSF-1 positiv (Stadium 5-A) und von DAF-2 negativ (Stadium 5-C) reguliert. Wenn die Kapazität des HSF-1-regulierten Disaggregationsmechanismus ausgeschöpft ist, kommt ein zweiter Mechanismus zum Tragen (5-III), der weniger toxische Aggregate mit einem höheren Molekulargewicht produziert. Dieser Mechanismus wird von DAF-16 positiv (Stadium 5-B) und von DAF-2 negativ (Stadium 5-D) reguliert. Die Aggregate mit dem hohen Molekulargewicht können über verschiedene, in Abbildung 8 dargestellte Wege abgebaut werden.

6. Amyloidbildung ist nicht sequenzspezifisch

Ein gemeinsames Merkmal der Amyloidfibrillen vieler verschiedener Proteine und Peptide sind offenbar die Cross- β -Faltblattstrukturen (Abschnitt 2).^[18,20,137] Verschiedene Experimente liefern Belege dafür, dass die Bildung von Amyloidfibrillen eine gemeinsame Eigenschaft vieler, wenn nicht gar aller Proteine ist: Erstens kann die Bildung von Fibrillen durch die partielle Denaturierung von Proteinen induziert

werden, die nichts mit einer Krankheit zu tun haben;^[85] auch de novo erzeugte Peptidfragmente können Fibrillen bilden (siehe Abschnitt 8). Zweitens kann die Amyloidbildung durch Zugabe von Fibrillenbildungskeimen induziert werden, die von dem gleichen, einem ähnlichen oder einem ganz anderen Protein stammen.^[82,96,99,107,114,138] Dieser Prozess könnte bei der Übertragung von Prionenkrankheiten eine Rolle spielen,^[96] allerdings ist der vollständige Mechanismus bisher nicht geklärt, und an der Übertragung von spongiformen Encephalopathien könnten auch zusätzliche Cofaktoren beteiligt sein.^[139] Man kann kleine Peptidfragmente herstellen, die die Fibrillenbildung inhibieren; z.B. lässt sich, wie in Abschnitt 7 diskutiert, die Fibrillenbildung von A β 40 durch Fragmente inhibieren, die A β 40-homologe Sequenzen enthalten.

Fändrich und Dobson wiesen nach, dass eine Reihe von Polyaminosäuren unabhängig von ihrer Sequenz oder ihren Seitenketten Cross- β -Faltblattstrukturen bilden kann: Beispiele sind Poly(L-lysin), Poly(L-glutaminsäure) und Poly(L-threonin).^[140] Wie sie betonten, unterscheidet sich dieses Verhalten völlig von der Faltung von Proteinen, die von spezifischen Seitenkettenwechselwirkungen bestimmt wird. Allerdings können spezifische Seitenkettenwechselwirkungen, die zu kinetisch bevorzugten Zuständen oder zur Destabilisierung von Fibrillenaggregaten führen, bei bestimmten Temperaturen oder pH-Werten eine Aggregation zu Amyloidfibrillen verhindern. Die Bildung von Fibrillen scheint also auf Eigenschaften des gemeinsamen Polypeptidgrundgerüstes zu beruhen, während die Proteinfaltung durch spezifische Wechselwirkungen der Seitenketten bestimmt wird.^[100]

Eine weitere Gemeinsamkeit von Amyloidstrukturen besteht darin, dass sie von Kongorot und Thioflavinfarbstoffen eingefärbt werden. Dies könnte einfach an den gemeinsamen Cross- β -Faltblattstrukturen liegen.^[18] Glabe und Mitarbeiter untersuchten einen Antikörper, der auf lösliche oligomere Intermediate von A β reagiert, und wiesen nach, dass er auch Oligomere mehrerer anderer Proteine und Peptide erkennt.^[122] Dagegen reagierte er nicht auf A β -Spezies mit niedrigem Molekulargewicht oder auf A β -Fibrillen, was nahe legt, dass der Antikörper ein gemeinsames Epitop löslicher Oligomere erkennt.

Vor kurzem wurden mutierte Formen von Wildtyp-A β 42 hergestellt, in denen hydrophobe Reste in der C-terminalen Hälfte durch zufällige unpolare Reste ersetzt wurden.^[141] Es zeigte sich, dass die Fibrillenbildung davon nicht beeinflusst wurde. Offenbar sind beliebige hydrophobe Sequenzen für die Fibrillenbildung von A β 42 ausreichend.

7. Fibrillenbildung von Fragmenten

Aktuelle Untersuchungen haben sich darauf konzentriert, die kürzeste Peptidsequenz zu bestimmen, die noch zur Bildung von Amyloidfibrillen führen kann.^[44] Viele Arbeiten, die wir im Folgenden diskutieren werden, haben sich dabei mit A β beschäftigt; allerdings wurde die minimale Kernsequenz auch für das PHF6-Tau-Protein (VYK),^[142] Medin (NFGSVQ),^[143] humanes Calcitonin (DFNK)^[144] und das

Hefepnion Sup35 (GNNQQNY)^[138] bestimmt. Interessanterweise bestehen die kürzesten Kernsequenzen aus nur drei Aminosäuren.

Die Fibrillenbildung von A β 40- und A β 42-Fragmenten ist ausführlich untersucht worden. Mehrere ältere Arbeiten werden in den Aufsätzen von Teplow^[6] und Serpell^[4] zusammengefasst. Wir konzentrieren uns in diesem Abschnitt auf die Fibrillenbildung durch die kürzesten Fragmente, die für die Bildung von Fibrillen entscheidend sind. Hilbich et al. zeigten, dass eine Region im hydrophoben Kern um die Reste 17 bis 20 (d.h. LVFF) für die Bildung von β -Faltblattstrukturen ausschlaggebend ist.^[145] Sie stellten Varianten von A β 42/A β 43 her, in denen die Reste 17–20 auf verschiedene Weise substituiert waren, und untersuchten die Fibrillenbildung mit CD-, FTIR- und TEM-Experimenten. Eine Substitution mit hydrophilen Aminosäuren führte zu einer signifikanten Reduzierung der Amyloidbildung. Tjernberg et al. untersuchten die Bindung von A β 40-Fragmenten und modifizierten A β 40-Fragmenten an das vollständige Peptid.^[146,147] Die Bindung von 125 I-markierten A β 40-Peptiden wurde mit Autoradiographie untersucht. Dabei wurden A β 40-Fragmente mit drei bis zehn Resten hergestellt. Nur Pentapeptide oder längere Fragmente wiesen eine signifikante Bindung an A β 40 auf, wobei in allen stark bindenden Sequenzen das Fragment A β (16–20) (d.h. KLVFF) enthalten war.^[147] Die Untersuchung verschiedener Varianten des Pentapeptids KLVFF mit substituierten Aminosäuren ergab, dass die Reste 2, 3 und 5 (K,L,F) am wichtigsten für die Bindung dieses Fragments an A β 40 sind.^[146,147] Ein Modell für die Bindung von KLVFF an A β (13–23) bestätigte die wichtige Rolle, die diese Reste durch die Bildung einer antiparallelen β -Faltblattstruktur spielen. Ebenfalls untersucht wurde das Bindungsvermögen von Pentapeptiden, die die gegen Proteolyse widerstandsfähigen D-Aminosäuren anstelle von L-Aminosäuren enthielten. Die Reste 2 und 3 waren am wichtigsten für die Bindung, wobei D-Lys und D-Phe die Bindung verstärkten.^[147] Findeis et al. untersuchten ausführlich die Inhibition der A β -Fibrillenbildung durch A β -Fragmente.^[148] Auch diese Untersuchung bestätigte die Bedeutung der A β (16–21)-Region. Als ein besonders wirkungsvoller Inhibitor der Fibrillenbildung erwies sich ein A β (17–21)-Derivat, nämlich Cholyl-LVFFA-OH; zwar wies dieses Peptid nur eine begrenzte biochemische Stabilität auf, allerdings war die entsprechende D-Aminosäureversion in der Cerebrospinalflüssigkeit von Affen stabil.

An A β -Fragmenten, die die A β (16–20)-Sequenz enthielten, wurde die Abhängigkeit der Fibrillenbildung von der Fragmentgröße untersucht.^[149] Elektronenmikroskopische Untersuchungen ergaben, dass A β (14–23) (d.h. das Decapeptid HQKLVFFAED) die kürzeste Peptidsequenz ist, aus der sich Fibrillen bilden. Das KLVFF-Peptid allein bildet keine Fibrillen. Meredith und Mitarbeiter untersuchten später Varianten von KLVFF^[150] und KLVFFAE,^[151] in denen bei jedem zweiten Rest Amidprotonen durch N-Methylgruppen ersetzt wurden.^[150,151] Für Ac-K(Me)LV(Me)FF-NH₂ wurde die Bildung von ausgedehnten β -Strängen beobachtet.^[150] Dieses Peptid weist außerdem eine höhere Wasserlöslichkeit als KLVFF auf, es kann Membranen von Phospholipidvesikeln und Zellen durchdringen und wird

durch Lösungsmittelzugabe und Temperatur- oder pH-Wert-Erhöhung nicht denaturiert. Es ist zudem ein wirkungsvoller Inhibitor der A β 40-Fibrillenbildung und kann zuvor hergestellte A β 40-Fibrillen auflösen; bei beiden Prozessen ist es effizienter als KLVFF^[150] (dies trifft auch auf das Heptapeptid NH₂-KLV(Me)F(Me)F(Me)A(Me)E-CONH₂ zu^[151]).

Man nimmt an, dass diese Fragmente β -Stränge mit unterschiedlichen Seiten bilden: eine Seite mit den nichtmodifizierten Gruppen, die Wasserstoffbrücken bilden können, und eine Seite, auf der sich die unpolaren Methylgruppen befinden. Dadurch kann die auf Wasserstoffbrücken basierende β -Faltblattstruktur des A β -Peptids selbst unterbrochen werden. Weitere Fragmente für die Inhibition der Fibrillenbildung von A β 40 und A β 42 wurden hergestellt. Ausgehend von der bindenden Pentapeptidsequenz führte rationales Design zur Präparation und Untersuchung von LPFFD.^[152] Dieses Peptid, das mit Prolin einen bekannten β -Faltblatt-Blocker enthält, reduzierte die In-vivo-Ablagerung von Amyloidfibrillen und bewirkte in vitro die Auflösung von zuvor hergestellten Fibrillen.^[152] Man hat auch beobachtet,^[153] dass das retro-inverse Peptid ffvlk (Kleinbuchstaben kennzeichnen D-Aminosäuren) mit einer mäßigen Affinität an A β 40-Fibrillen bindet, wobei die Affinität erheblich verstärkt werden kann, wenn mehrere Kopien dieses Peptids an achtarmig verzweigtes Poly(ethylenglycol) (PEG) gebunden werden. Auch Tandemdimere von ffvlk, die über einen k(β A)-Abstandhalter oder eine difunktionale PEG-Kette verknüpft wurden, weisen eine etwas verstärkte Bindung auf. Alle diese Konjugate sind wirksame Inhibitoren der Fibrillenbildung des vollständigen A β 40-Peptids.^[153]

TEM-Untersuchungen des KLVFF-Fragments in phosphatgepufferten Kochsalzlösungen (pH 7.4) deuten darauf hin, dass dieses Fragment selbst Fibrillen bildet.^[150] Dies steht im Gegensatz zu den Beobachtungen von Tjernberg et al.,^[149] weshalb die Frage, ob dieses Fragment selbst Fibrillen bilden kann, bisher nicht geklärt ist. In einer anderen Untersuchung wurde die Bildung von Fibrillen aus dem Heptapeptid A β (16–22) (d.h. (CH₃CO)-KLVFFAE(-NH₂)) beschrieben.^[154] Elektronenmikroskopische und rasterkraftmikroskopische Untersuchungen sowie Kleinwinkelbeugungsexperimente lassen darauf schließen, dass die Fibrillen dieses Peptids aus Nanoröhrchen aufgebaut sind.^[155] In der β -Strang-Turn- β -Strang-Gesamtstruktur (Abbildung 5) der A β 42-Reste 18–42 (die Reste 1–17 sind ungeordnet) bilden die Reste 18–26 zusammen mit den Resten 31–42 ein β -Faltblatt, wie NMR-spektroskopische Untersuchungen der dreidimensionalen Struktur von A β 42 ergaben.^[39] Die A β (17–23)-Sequenz, die ein entscheidender Faktor bei der Amyloidbildung zu sein scheint, spielt offenbar auch bei der Bildung der korrekten β -Faltblattstruktur des A β -Peptids eine wichtige Rolle.^[145,156]

Computersimulationen, die auf Berechnungen von Konfigurationsverteilungen von β -Faltblattpeptiden beruhen, sagen voraus, dass A β (17–21) zur Aggregation in β -Faltblattstrukturen tendiert.^[17,157] Auch Rechnungen auf der Basis der Aggregationseigenschaften der konstituierenden Aminosäuren sagen vorher, dass diese Region von A β (1–42) zur Aggregation neigt.^[158] Auf der Grundlage ähnlicher Untersuchungen schlugen Kallberg et al. vor, dass A β (16–23) eine so genannte diskordante Aminosäuresequenz ist,^[159]

d.h., diese Sequenz bevorzugt eine β -Strangkonformation, während anhand der Proteindatenbank (Ref. 1ba6) eine α -Helixstruktur für diese Region von A β 40 vorhergesagt wird. Die Proteindatenbankstruktur 1ba6^[160] bezieht sich auf A β 40 mit einer oxidierten Methioninseitenkette (Rest 35) in wässriger SDS-Lösung; man weiß, dass dieses Medium α -Helices bevorzugt.

NMR-spektroskopische Daten für A β 40 in einer Wasser/TFE-Lösung^[161] und einer SDS-Lösung^[162] deuten ebenfalls auf eine α -Helix für die Reste 15–24 in wässrigen Lösungen hin (die Daten von Sticht et al.^[161] entsprechen der Proteindatenbankstruktur 1 AML). Wie erwähnt, weisen NMR-Spektren in wässriger Lösung^[39] auf eine β -Faltblattstruktur in dieser Region von A β 42 hin. Auch Methoden zur Vorhersage von Sekundärstrukturen führen zu unterschiedlichen Aussagen für die Konformation von KLVFF.^[163] Die Methode von Garnier sagt α -Helices für KLVFF voraus, während die Chou-Fasman-Methode für die Reste KLV einen β -Strang und für FF eine α -Helix ergibt.

Die Sequenzen in dieser zentralen Region von A β 42 sind auch deshalb interessant, weil die Spaltung durch das Enzym α -Secretase zwischen K und L geschieht.^[8] Die Fragmente des gespaltenen Peptids bilden keine Fibrillen.

8. Fibrillenbildung von de novo hergestellten Peptiden

Aggeli und Mitarbeiter untersuchten detailliert die Selbstorganisation von zwei Typen von de novo hergestellten Peptiden. Die Peptide K24 und K27 (die Nummern geben die Zahl der Reste an) wurden von der Transmembrandomäne des IsK-Proteins mit dem Ziel abgeleitet, in organischen Lösungsmitteln β -Faltblattstrukturen zu bilden.^[164,165] Der zweite Typ umfasste Peptide mit elf Resten, die in Wasser β -Faltblattstrukturen bilden sollten.^[166] Das Originalpeptid (DN1 oder P₁₁-II) enthielt sechs Glutaminreste, die eine hydrophobe Seite des β -Faltblatts bildeten, während die übrigen Reste eine hydrophile Oberfläche bildeten.

Die Selbstorganisation von K24 zu β -Faltblattstrukturen und die Gelbildung in ausreichend polaren Lösungsmitteln wurde untersucht,^[164,166] wobei Gel-Phasendiagramme in Abhängigkeit der Parameter Lösungsmittelpolarität (Dielektrizitätskonstante) und Fähigkeit zur Bildung von Wasserstoffbrücken bestimmt wurden. Bei der Untersuchung der rheologischen Eigenschaften der Gele wurde nach Scherung ein ausgeprägter Modulanstieg beobachtet. Mit dynamischer Lichtstreuung wurde die Struktur von Bändern, die sich in Selbstorganisation aus K24 in 2-Chlorethanol bildeten, detailliert untersucht.^[167] Oberhalb der kritischen Gelkonzentration bildeten sich Netzwerkstrukturen, die als halbstarre, ineinander verschränkte Polymere beschrieben wurden.

Die Selbstorganisation von DN1 und ähnlichen Peptiden wurde anhand eines Modells^[168] analysiert, das sowohl die Wechselwirkungsenergien zwischen Monomeren (β -Stränge), Bändern (β -Faltblätter) und komplexen Bändern (Stapel aus β -Faltblättern) als auch die elastische Energie berücksichtigt, die man für die Verdrillung der komplexen Bänder zu Helices aufbringen muss. Abbildung 9 zeigt eine schematische Dar-

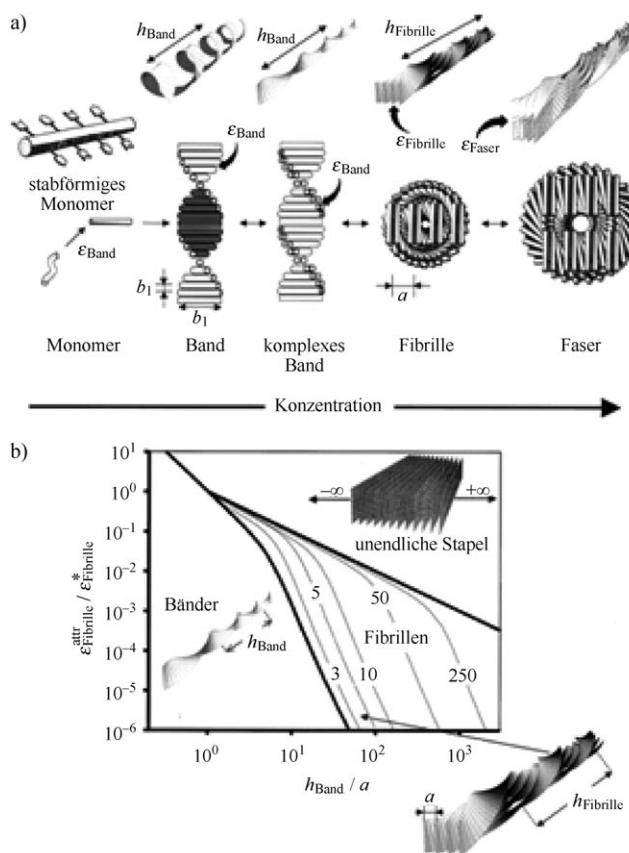


Abbildung 9. Selbstorganisation chiraler Peptidbänder.^[169] a) Aufeinanderfolgende Stadien des Selbstorganisationsprozesses und entsprechende Wechselwirkungsenergien ε . b) Berechnetes Phasendiagramm als Funktion der Parameter $\varepsilon_{\text{fibrille}}^{\text{attr}} / \varepsilon_{\text{fibrille}}^*$ (relative seitliche Anziehungsenergie zwischen komplexen Bändern) und h_{Band} / a (relative Helixganghöhe der komplexen Bänder). Dicke Linien trennen die Gebiete, in denen verschiedene Aggregatormen stabil sind, entlang den gepunkteten Linien sind Fibrillen aus p komplexen Bändern stabil. Bei dieser Berechnung^[168] betrug das Verhältnis der elastischen Konstanten $k_{\text{bend}} / k_{\text{twist}} = 0.1$.

stellung der Hierarchie der Selbstorganisation und ein berechnetes Phasendiagramm.

An elf auf DN1 basierenden Peptiden wurde untersucht, welchen Einfluss die Substitution von Aminosäuren auf die Bildung von Fibrillen ausübt. Die Substitutionen beeinflussen die Ladung und die Hydrophobie der Peptide und führten zu Änderungen der Länge und Breite der Fibrillen sowie ihres Aggregationszustands.^[170] Die innere Dynamik wurde mit dynamischer Lichtstreuung studiert.^[170] Auch die Bildung nematischer Gele wurde untersucht.^[169–172] Mit zunehmender Konzentration kommt es zu einem Flüssig-flüssig-Phasenübergang von einer isotropen zu einer nematischen Phase; bei höherer Konzentration findet ein weiterer Übergang zwischen einer viskoelastischen nematischen Phase und einem nematischen Gel statt.^[169] Wenn Peptide vom DN1-Typ eine geeignete Sequenz haben, lässt sich die Gelbildung sehr schnell (in Sekunden) induzieren, indem der pH-Wert geändert wird.^[172]

Eine Datenbankrecherche über Sequenzen, die zur Bildung von β -Faltblattstrukturen neigen, führte zur De-novo-

Herstellung einer Reihe von Hexapeptiden.^[173] Eine Fibrillenbildung war nur zu beobachten, wenn die Ladung der Peptide ± 1 betrug. Die Peptide bildeten eine Cross- β -Struktur mit vier antiparallelen β -Faltblättern, die parallel zur Achse der Protofilamente angeordnet waren, ähnlich dem Modell von Blake und Serpell^[32] (allerdings gab es keine Anzeichen für eine Verdrillung der β -Faltblätter).

Chen und Mitarbeiter haben die Fibrillenbildung bei mehreren so genannten ionisch komplementären Peptiden untersucht.^[174] Diese Verbindungen enthalten Peptidsequenzen mit alternierenden positiven und negativen Ladungen; dabei werden mehrere Typen unterschieden: $-+$ (Typ I), $--++$ (Typ II) oder $----++++$ (Typ IV), ein Beispiel ist AAEAEAKAKAEAEAKAK (Typ II). Weitere Peptide sind in Lit. [174] aufgeführt. Die Selbstorganisation dieser Peptide hängt von der Sequenz ab^[175] und wird auch vom pH-Wert und dem Zusatz von Gegenionen beeinflusst.^[174] Bei einem Typ-II-Peptid mit einer GGH-Endgruppe, an die Metallionen binden können, transformierte die Zugabe von Kupfersalzen eine α -Helix/Zufallsknäuel-Konformation in eine β -Faltblattstruktur.^[176] AFM-Untersuchungen zeigten, dass verschiedene Anionen die Morphologie der Fibrillen ändern. Zweiwertige SO_4^{2-} -Ionen führten zu langen Fibrillen, während sich bei einwertigen Gegenionen wie Cl^- oder NO_3^- kurze Fibrillen bildeten.^[176] Die Autoren schlugen vor, dass die zweiwertigen Anionen eine elektrostatische Brücke zwischen K-Einheiten bilden könnten, die die Fibrillenbildung unterstützen würde. Im Fall der einwertigen Anionen wurde eine gemischte Sekundärstruktur beobachtet, die α -Helix/Zufallsknäuel-Abschnitte enthielt und die Fibrillenbildung unterbrechen könnte.^[176] Andere Arbeitsgruppen stellten Peptide her, die bei Bindung von Metallionen ihre Konformation änderten und β -Faltblattstrukturen bildeten.^[177,178]

Es wurde auch die Selbstorganisation mehrerer amphiphiler β -Faltblattpeptide untersucht, die die Sequenz PK-X¹-K-X²-X²-E-X¹-EP enthielten; X¹ und X² bezeichnen hydrophobe Reste (F, I, V oder Y).^[179] Verschiedene Varianten mit aromatischen X¹- und X²-Resten bildeten helicale Bänder, die entsprechend dem Modell von Aggeli et al.^[169] zu geraden Fibrillen aggregierten. Allerdings bildeten Varianten, die nur aliphatische Seitenketten enthielten, bandähnliche Fibrillen, die keine Anzeichen für eine helicale Struktur innerhalb der Fibrillen aufwiesen. Betrachtet man die Neigung der Aminosäuren zur Bildung von β -Faltblattstrukturen, dann zeigt sich, dass I und F die Fibrillenbildung erheblich begünstigen, während Peptide mit einer VV-Sequenz oder einem oder zwei Tyrosinresten keine Fibrillen bilden. Tyrosin ist nur mäßig hydrophob, und diese Befunde unterstreichen die Bedeutung des hydrophoben Charakters für den Selbstorganisationsprozess.^[179]

9. Peptidamphiphile und Peptidcopolymeren

Peptidamphiphile (PAs) und Peptidcopolymeren haben verwandte Strukturen: PAs bestehen meist aus einem hydrophilen Peptid und einem hydrophoben Rest, z.B. einer Kohlenwasserstoffkette oder einer Sequenz von hydrophoben Aminosäuren. Diese Amphiphile bilden typische Tensid-

strukturen wie Micellen und Vesikel, aber auch Nanoröhrchen (die in Abschnitt 10 besprochen werden). In Peptidblockcopolymeren sind hydrophile oder hydrophobe synthetische Polymere mit Peptidsequenzen verbunden, die jeweils den entgegengesetzten amphiphilen Charakter aufweisen; dabei können Diblock-, Triblock- oder andere Architekturen vorliegen. Die meisten Arbeiten betreffen Copolymeren aus Peptiden und hydrophilen Poly(ethylenglycol)-Einheiten.

Stupp und Mitarbeiter stellten PAs mit multifunktionalen Bausteinen her, die zu Nanofibrillen aggregierten und zur Konstruktion von Biomaterialien, z.B. von Gerüsten für die Biomineralisierung, genutzt werden konnten.^[180,181] Die PAs (Abbildung 10) bestanden aus einer Kohlenwasserstoffkette

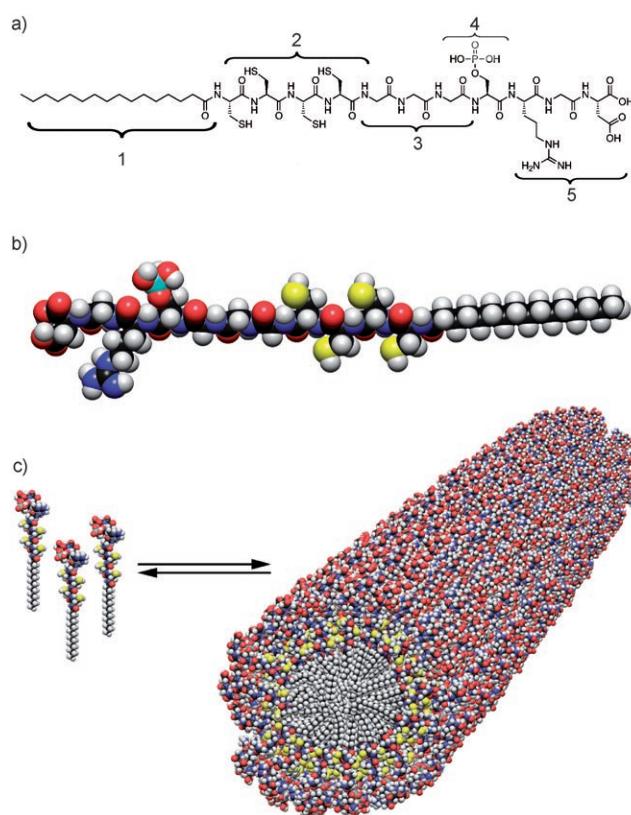


Abbildung 10. a) Chemische Struktur und b) Molekülmodell des von Stupp und Mitarbeitern hergestellten Peptidamphiphils (siehe Text) sowie c) Modell einer durch Selbstorganisation gebildeten zylindrischen Micelle. (Wiedergabe aus Lit. [180] mit Genehmigung. Copyright 2001, American Association for the Advancement of Science (AAAS).)

(Region 1), an die sich eine Sequenz aus vier Cysteineinheiten anschloss (um eine Vernetzung über Disulfidbindungen zu ermöglichen, Region 2); eine flexible Region (3) aus drei G-Resten bildete die Verbindung zwischen der vernetzten Region und der Kopfgruppe. Die Kopfgruppe bestand aus einem einzelnen phosphorylierten Serinrest (4) und einem RGD-Liganden (5), der an Zellen binden kann. Der phosphorylierte Serinrest wurde für die Wechselwirkung mit Ca^{2+} -Ionen eingeführt und sollte bei der Biomineralisierung die direkte Mineralisierung von Hydroxyapatit unterstützen.

Diese PAs zeigten bei niedrigen pH-Werten eine reversible Selbstorganisation.^[180] Auch der Einfluss einer Modifizierung der Aminosäuresequenz und der Alkylkette auf die Morphologie der Fibrillen wurde untersucht.^[181] Bei Zugabe von zweiwertigen Kationen entstand ein Gel, und durch Trocknen bei pH 8 bildeten sich Fibrillen, was die Bedeutung der Konzentration für den Selbstorganisationsprozess unterstreicht.^[181] Ähnliche Peptidamphiphile wurden mit speziellen Kopfgruppen hergestellt, die Erkennungssequenzen wie IKVAV oder YIGSR enthielten, die mit Säugetierneuronen wechselwirken.^[182] Paare von entgegengesetzt geladenen Peptidamphiphilen bildeten bei neutralem pH-Wert Fibrillen. Die Bildung von Fibrillen wurde auch für die negativ geladenen Moleküle in saurer und für die positiv geladenen Moleküle in basischer Umgebung beobachtet. FTIR-Messungen ergaben einen erheblichen Gehalt an β -Faltblattstrukturen in diesen Fibrillen. Die gleiche Arbeitsgruppe beschrieb auch die Bildung von Fibrillen in wässriger Lösung eines Peptid-Bolamphiphils, in dem zwei hydrophile Kopfgruppen durch einen hydrophoben Abstandhalter verbunden waren.^[183]

Peptidamphiphile bilden auch Netzwerke aus Fibrillen, die aus Nanoröhrchen aufgebaut sind.^[184,185] Die Peptide bestehen aus sieben bis acht Einheiten, wobei die geladene Kopfgruppe eine bis zwei Aminosäuren umfasst und der hydrophobe Rest eine Mehrfachsequenz aus hydrophoben Aminosäuren enthält, z.B. A₆D, G₆D₂ oder eine ähnliche Sequenz. Für die Nanoröhrchen wurde eine Struktur aus Peptid-Doppelschichten vorgeschlagen, die ähnlich wie Lipid-Doppelschichten aufgebaut sind (die Peptide haben eine ähnliche Länge wie Phospholipide); TEM-Bilder zeigten eine Helixstruktur und Verzweigungen der Nanoröhrchen.^[184] Die gleiche Arbeitsgruppe gab auch eine Übersicht über andere Aspekte der Selbstorganisation amphiphiler Peptide.^[186] Peptidnanofibrillen wurden auch für PAs aus 13 Aminosäuren beobachtet; die Peptide enthielten eine Struktureinheit, die durch Enzyme spaltbar war, einen Glutaminsäurerest zur Unterstützung der Bindung von Calcium sowie eine RGDS-Sequenz zur Bindung an Zellen.^[187] Netzwerke aus diesen Fibrillen konnten enzymatisch abgebaut werden. Diese PAs fanden auch Anwendung als Wachstumsmedium für Zellen.

Die Bildung amyloidähnlicher Strukturen an Wasser/Luft-Grenzflächen wurde für „Peptidolipide“ beobachtet, die aus der Peptidsequenz IIGLM, entsprechend dem Fragment A β (31–35), und einer C₁₈-Kette bestanden.^[188] Die Bildung von faden- und nadelähnlichen Aggregaten wurde mit Epifluoreszenzmikroskopie verfolgt.

Peptidamphiphile wurden mit DNA-bindenden Kopfgruppen (GCN4-Sequenz) und mit C₁₂-Ketten hergestellt, deren Ende mit einer polymerisierbaren Methylmethacrylatgruppe versehen war.^[189] In wässriger Lösung wurde die Bildung von Fibrillen beobachtet. Bei der Bindung von DNA wandelte sich die Morphologie zu Lamellen (verursacht durch die Veränderung der Kopfgruppen). Auch sehr große PA-Moleküle wurden hergestellt, in denen ein großes Protein (eine Lipase) an ein synthetisches Polymer (Polystyrol) gebunden war.^[190] Das Polystyrol hatte eine funktionelle Endgruppe und wurde über eine Disulfidbrücke an die Oberfläche

che des Proteins gebunden. TEM-Bilder zeigten stäbchenförmige Fibrillenstrukturen.

Verschiedene Arten von Peptidamphiphilen wurden von van Hest und Mitarbeitern hergestellt. Die Bildung von Fibrillen wurde für das Peptidamphiphil C_{18} -GANPNAAG-OH beobachtet.^[191] Die Fibrillen bestanden aus verdrillten β -Faltblattbändern. Kürzere Peptide, die N-terminal acyliert waren (C_8 -, C_{10} - oder C_{12} -Ketten), zeigten unabhängig von der Temperatur Zufallsknäuelstrukturen. Peptide mit hydrophoben C_{14} - und C_{16} -Resten wiesen eine temperaturabhängige Selbstorganisation auf und bildeten bei niedrigen Temperaturen β -Faltblattstrukturen. Diese Befunde zeigen die Möglichkeit auf, Peptide sekundär zu stabilisieren, indem sie an eine Kette mit einer geeigneten Länge gebunden werden (dieser Punkt wird unten im Zusammenhang mit Peptidblockcopolymeren diskutiert). Die gleiche Arbeitsgruppe untersuchte vor kurzem, wie die Selbstorganisation von Ac-KTVIIE-NH₂ durch terminale hydrophobe Alkylketten beeinflusst wird.^[192] Dieses Hexapeptid bildet β -Faltblattfibrillen. Hauptsächlich wurden CD-Messungen durchgeführt, um zu prüfen, welche Auswirkungen das Vorhandensein von Alkylketten (CH_3 bis $C_{16}H_{33}$) an einem oder beiden Enden auf die Stabilität der Fibrillen hat. Die Alkylierung erhöhte die thermische Stabilität des Peptids, ein Verhalten, das auch bei einer Verknüpfung mit PEG (siehe unten) beobachtet wird. Die Verstärkung des hydrophoben Charakters führte außerdem zur Fibrillenbildung bei niedrigeren Konzentrationen.

Die Bindung von Peptiden an synthetische Polymere wie PEG kann eine bessere Löslichkeit, eine erhöhte Stabilität gegen Verdünnung sowie eine Reduzierung der Toxizität und der immunogenen Aktivität bewirken.^[193–195] Einen Aufsatz über die Selbstorganisation peptidhaltiger Blockcopolymere in Lösung findet man in Lit. [196].

In einer Reihe von grundlegenden Arbeiten haben Meredith und Mitarbeiter die Bildung von Fibrillen in wässrigen Lösungen von PEG-Peptid-Blockcopolymeren untersucht; dabei entsprach der Peptidblock der zentralen hydrophoben $\text{A}\beta(10-35)$ -Domäne des β -Amyloidpeptids, und der PEG-Block hatte ein Molekulargewicht von 3000 g mol^{-1} .^[197–199] Die Autoren beobachteten mithilfe von Kleinwinkel-Neutronenstreuung(SANS)- und TEM-Experimenten, dass die Fibrillen von einer PEG-Schicht umhüllt waren, die wie eine „sterische Stabilisierungsschicht“ wirkte. Collier und Messersmith studierten den Einfluss der Bindung an PEG auf die Breite der Peptidfibrillen; sie untersuchten PEG-*b*-Peptid- und Peptid-*b*-PEG-*b*-Peptid-Copolymere mit Sequenzen, die β -Faltblattstrukturen bildeten.^[200] Sie untersuchten die Sekundärstruktur durch FTIR und machten TEM-Aufnahmen von Fibrillen für ein Peptid aus elf Aminosäuren (und eine Kernsequenz aus sieben Aminosäuren), das in Form eines Transglutaminase-Substrats aufgebaut worden war; zudem untersuchten sie Copolymeren mit terminalen PEG-Ketten oder mit einer zentralen PEG-Domäne, die zwei Ketten aus je sieben Aminosäuren verbindet.

Klok und Mitarbeiter untersuchten an zwei Gruppen kurzer Peptide, welchen Einfluss die Bindung an PEG auf die thermische Stabilität und die pH-Wert-Stabilität der Sekundärstrukturen ausübt.^[193,201] Die erste Gruppe umfasste de-

novo hergestellte Peptide mit Coiled-coil-Struktur,^[202] und bei der zweiten Gruppe handelte es sich um „Switch-Peptide“. Switch-Peptide haben hydrophobe und hydrophile Substituenten, die so angeordnet sind, dass sie, abhängig vom pH-Wert, entweder amphiphile α -Helices oder amphiphile β -Stränge bilden; die β -Faltblattstruktur ist bei $\text{pH} \approx 7$ stabil.^[203] Die Bindung an PEG zerstört die Sekundärstruktur nicht, sondern erhöht die Stabilität gegen Konzentrations- und pH-Wert-Änderungen verglichen mit dem freien Peptid.^[201] Mit CD-Spektroskopie, Kleinwinkel-Röntgenbeugung und TEM wurde die Selbstorganisation in wässriger Lösung einer Reihe von Hybrid-Blockcopolymeren untersucht, die amphiphile β -Strangsequenzen und ein oder zwei terminale PEG-Ketten enthielten.^[204] Die CD-Messungen wiesen hauptsächlich auf β -Strang-Sekundärstrukturen hin. Die Sekundärstruktur der PEG-haltigen Di- und Triblockcopolymere war stabiler gegen pH-Wert- und Temperaturänderungen als das native Peptid. SAXS-Experimente deuteten auf das Vorhandensein von Fibrillen hin, deren Abmessungen vergleichbar mit der geschätzten Breite der β -Stränge (mit terminalen PEG-Ketten im Fall der Copolymeren) waren. TEM-Bilder von selektiv eingefärbten und getrockneten Proben belegten das Auftreten von Fibrillen. Die Autoren schlugen vor, dass diese Fibrillen das Ergebnis einer hierarchischen Aggregation sind, bei der zunächst β -Stränge helicale Bänder bilden, die dann zu Fibrillen aggregieren (siehe Abbildung 9).

Bei Poly(styrol)-*b*-poly(isocyanidepeptid)-Diblockcopolymern wurden helicale Filamente und andere Morphologien beobachtet.^[205] Das Poly(isocyanid)-Grundgerüst des Peptids nahm eine helicale Konformation an. Die Selbstorganisation wurde durch Wasserstoffbrücken und elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den Peptiden unterstützt.

Auch ABA-Triblockcopolymere aus β -Faltblattpolypeptiden mit einer seidenähnlichen Struktur und PEG-Endblöcken bilden Fibrillen in aus Methanol gewonnenen, getrockneten Proben.^[206] Das Polypeptid besteht aus $[(AG)_3EG]_{10}$ und ähnelt der AGAG-Wiederholungssequenz, die in den kristallinen Bereichen der Seide der Seidenraupe beobachtet wird. Die Morphologie der Fibrillen wird von der Länge der PEG-Ketten beeinflusst, wobei kürzere Fibrillen für die PEG-Einheiten mit dem größten Molekulargewicht (5000 g mol^{-1}) beobachtet wurden.

10. Peptidnanoröhrchen

Bemerkenswerterweise bildet das einfache Dipeptid Diphenylalanin in wässriger Lösung Nanoröhrchen.^[207] Als Ursache für dieses Verhalten wurden aromatische π - π -Stapelwechselwirkungen vorgeschlagen.^[208,209] Zur Prüfung dieser Hypothese wurden die Endgruppen des FF-Dipeptids variiert, um den Einfluss von Ladungen auf die Selbstorganisation zu untersuchen.^[210] Dazu wurden Varianten des ursprünglichen Peptids NH₂-FF-COOH (das entgegengesetzt geladene Endgruppen aufweist) synthetisiert, die ungeladene Endgruppen oder eine Nettoladung aufwiesen; auch diese Varianten bildeten Nanoröhrchen oder Amyloidstrukturen. Bei anderen aromatischen Dipeptiden wurde ebenfalls die Bildung von Nanoröhrchen beobachtet.^[211] Diese Befunde

unterstreichen die wichtige Rolle der aromatischen Wechselwirkungen. Allerdings wurde auch vorgeschlagen, dass andere oder noch weitere Ursachen für die Bildung der Nanoröhrchen infrage kommen könnten. Röntgenbeugungsexperimenten zufolge hat die Schale der Nanoröhrchen die gleiche Struktur wie die entsprechenden Einkristalle;^[212] dies lässt darauf schließen, dass keine π - π -Stapelwechselwirkungen für den Selbstorganisationsprozess in Lösung erforderlich sind. Die Bildung von hydrophoben Poren in der Kristallstruktur hydrophober Dipeptide^[213,214] war bereits bekannt, bevor die selbstorganisierte Bildung von Nanoröhrchen in Lösung beobachtet wurde.

Die bereits in diesem Aufsatz diskutierten Arbeiten belegen die wichtige Rolle von elektrostatischen und hydrophoben Wechselwirkungen sowie von Wasserstoffbrücken für die selbstorganisierte Bildung von Amyloidfibrillen aus Peptiden mit vier oder mehr Aminosäuren. Tracz et al. untersuchten Varianten und Fragmente von Amylin; sie wiesen nach, dass die Substitution des einzelnen aromatischen Restes (F) durch L die Amyloidbildung nicht verhindert, obwohl sie unterbunden wird, wenn F durch A ersetzt wird. Diese Befunde demonstrieren die wichtige Rolle von hydrophoben Wechselwirkungen und der Tendenz zur β -Faltblattbildung für die Fibrillenbildung.^[215] Mit Fluoreszenzmessungen an Thioflavin T untersuchten Bemporad et al. den Einfluss aromatischer Reste auf die Kinetik der Aggregation von mutierten Varianten humaner Muskelacylphosphatase.^[216] Die Substitution aromatischer Reste führte zu einer Reduzierung der Aggregation, allerdings wurde dieses Verhalten eher auf die Reduzierung des hydrophoben Charakters und die Tendenz zur β -Faltblattbildung zurückgeführt als auf bestimmte Wechselwirkungen zwischen aromatischen Gruppen. Die wichtige Rolle von aromatischen Wechselwirkungen für die Stabilisierung von Amyloidfibrillen wurde auch durch Untersuchungen eines synthetischen Peptids mit FF-Einheiten bestätigt.^[217] (In dieser Arbeit werden auch weitere Untersuchungen aufgeführt, die auf aromatische Wechselwirkungen bei der Amyloidbildung schließen lassen.)

Röntgenbeugungsexperimente erbrachten auch den Nachweis für die Bildung von Nanoröhrchen aus Peptiden, die eine ähnliche Morphologie aus helicalen Filamentpaaren wie das Tau-Protein aufwiesen und die Sequenzen VQIINK und VQIVYK enthielten.^[218] Die Wasserstoffbrücke lag entlang der Fibrillenachse mit einer radialen röhrenförmigen Peptid-Doppelschichtstruktur. Die Struktur wurde durch aromatische Wechselwirkungen zwischen Tyrosinresten stabilisiert.

Bei verschiedenen Dipeptiden wurde die Bildung von Hydrogelen mit einer Struktur aus vernetzten Fibrillen beobachtet.^[219,220] Die Dipeptidnanoröhrchen wurden als Template für die Herstellung von metallischen Nanodrähten verwendet;^[207] auch andere Anwendungen in der Bionanotechnologie wurden diskutiert.^[221,222]

Ghadiri und Mitarbeiter untersuchten die Herstellung von Peptidnanoröhrchen durch das Stapeln cyclischer Peptide aus alternierenden D- und L-Aminosäuren.^[223] Diese Peptide bilden Nanoröhrchen mit einer β -Helixstruktur; bereits vor ihrer experimentellen Realisierung war diese Struktur auf der Basis von Konformationsmodellen vorhergesagt worden.^[224]

Abbildung 11 zeigt diese Strukturen, die als künstliche Membrananäle eingesetzt wurden^[225] und weitere Anwendungen in der Nanotechnologie finden könnten.^[226] Vor kurzem wurden hybride Peptidnanoröhrchen hergestellt, die aus einer thermoresponsiven Polymerschale aus Poly(*N*-isopropylacrylamid) (PNIPAM) und einem Kern aus einem cyclischen Peptid bestehen.^[227]

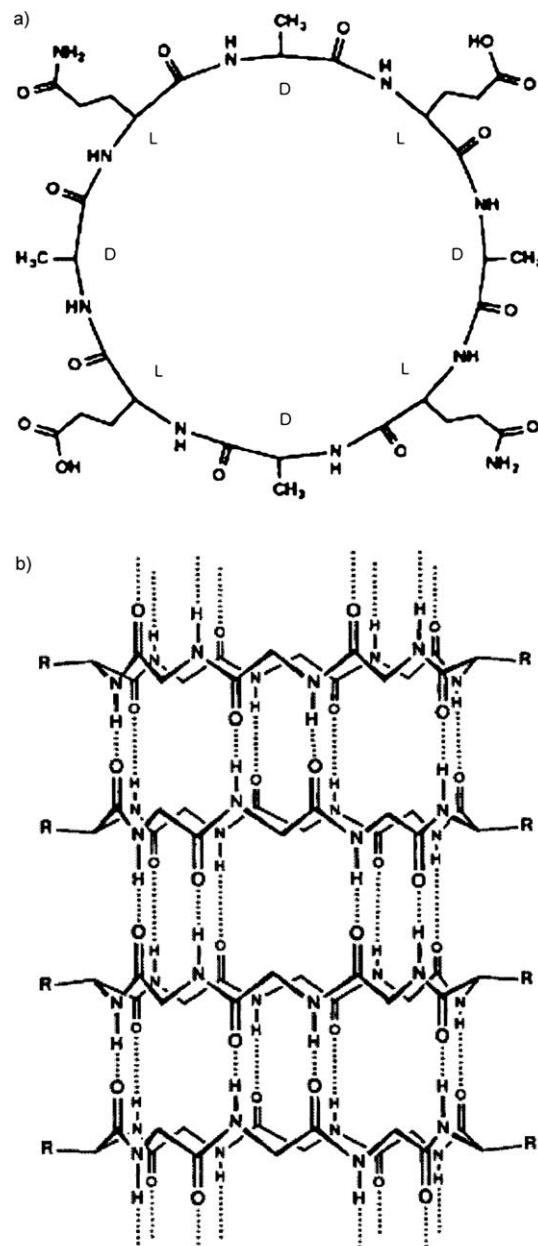


Abbildung 11. a) Cyclische Peptide mit einer alternierenden Abfolge von D- und L-Aminosäuren. b) Peptidnanoröhrchen, die sich durch Wasserstoffbrücken (gepunktete Linien) zwischen den cyclischen Peptiden bilden.^[223]

Zu weiteren Peptidstrukturen, die Nanoröhrchen bilden können,^[218] zählen hydrophobe Dipeptide im kristallinen Zustand,^[214] Peptide mit β -Helixstrukturen^[228] sowie Peptidamphiphile und Peptidcopolymere (siehe Abschnitt 9). Die

Kontroverse über das Perutz-Modell für die Bildung von Nanoröhrchen aus Amyloidpeptiden wurde in Abschnitt 2 diskutiert.

11. Gele aus Peptidfibrillen

Bei genügend hohen Konzentrationen wird die Bildung von Peptidfibrillen von einer Gelbildung begleitet. In diesem Abschnitt betrachten wir die Strukturen von Hydrogelen und Organogelen, die aus Fibrillen natürlicher oder synthetischer Peptide gebildet werden.

In Abschnitt 4 haben wir die Fibrillenbildung durch thermisch induzierte Denaturierung von β -Lactoglobulin und Lysozym vorgestellt. β -Lactoglobulin bildet eine Gelphase aus Fibrillen, wenn es bei niedrigem pH-Wert erwärmt wird. Bei höheren pH-Werten nahe am isoelektrischen Punkt, wo das Protein eine niedrige Nettoladung besitzt, werden partikuläre Gele gebildet,^[229,230] die wir im Rahmen dieses Aufsatzes nicht betrachten. Im Zusammenhang mit der Gelbildung ist zu beachten, dass die Gele auch aus Zweiphasensystemen bestehen können, in denen nematische Tröpfchen in einer isotropen Matrix dispergiert sind.^[231] Das Phasendiagramm wurde in Abhängigkeit von der β -Lactoglobulinkonzentration und der Ionenstärke bestimmt. Rheologische Messungen der kritischen Perkolationskonzentration zur Netzwerkbildung lieferten die Persistenzlänge der Fibrillen. β -Lactoglobulin hat eine erheblich größere Persistenzlänge als Rinderserumalbumin oder Ovalbumin bei pH 2.^[231]

Ross-Murphy und Mitarbeiter untersuchten die Bildung von Gelphasen aus β -Lactoglobulinfibrillen in einer Reihe von Arbeiten.^[116,232–234] Die Struktur der Fibrillen wurde mithilfe von AFM-Messungen, FTIR- und Raman-Spektroskopie sowie Röntgenbeugungsexperimenten bestimmt.^[116,233,234] Der Mechanismus der Fibrillenbildung wurde für zwei Fälle verglichen: für die thermische Induzierung bei pH 2 und für die Induzierung durch Zugabe von organischen Lösungsmitteln wie TFE.^[233] Die thermisch induzierte Aggregation wies einen eher kooperativen Charakter auf, und die Fibrillen bildeten sich nach einer definierten Verzögerungsphase; dies ist in Einklang mit dem in Abschnitt 4 diskutierten Keimbildungs- und Wachstumsmechanismus. Dieses Verhalten wurde auch bei rheologischen Messungen beobachtet, in denen die Zeitabhängigkeit des isochronen dynamischen Schermoduls bestimmt wurde.^[116,233] Mit zeitabhängigen Schermodulmessungen wurde die Sol-Gel-Phasengrenze in Abhängigkeit von der Konzentration bestimmt und das Skalierungsverhalten analysiert.^[234] Durch eine Reskalierung der Daten in der Form G'/G'_{inf} als Funktion von t/t_{gel} wurden universelle Diagramme der Kinetik der Gelbildung bei 75 und 80°C erhalten; hier bezeichnet G'_{inf} den auf unendliche Zeit extrapolierten Speichermodul, und t_{gel} ist die Gelzeit. Mit ähnlichen Messungen wurde auch die pH-Abhängigkeit der Gelbildung untersucht.^[232] Lysozym kann in wässriger Lösung bei hohen Temperaturen mithilfe des Lösungsmittels Dithiothreitol denaturiert werden. Die resultierende reversible Gelbildung wurde mit rheologischen Schermessungen und Mikro-DSC-Messungen (DSC = dynamische Differenzkalorimetrie) untersucht, TEM- und SEM-

Experimente lieferten Bilder der Fibrillmorphologie.^[235] Die Hydrogelen eignen sich als Gerüste für Zellkulturen.

Die Bildung von Hydrogelen aus mehreren 9-Fluorenylmethoxycarbonyl(Fmoc)-Dipeptiden wurde beschrieben,^[219] wobei die Gelbildung bei sieben verschiedenen Dipeptiden untersucht wurde. SEM-Bilder zeigten Fibrillenstrukturen, und CD-Spektren enthielten Merkmale, die auf π - π^* -Wechselwirkungen der Fluorenylgruppen und die Bildung von Helixstrukturen hinwiesen. Es wurde eine Verwendung der Gele als Gerüste für Zellkulturen vorgeschlagen.

Hybridhydrogelen bildeten sich selbstorganisiert aus wasserlöslichen synthetischen Polymeren und Peptiden mit Coiled-coil-Struktur, die gentechnisch mit *E. Coli*-Bakterien hergestellt worden waren.^[236,237] Es wurde ein hydrophiles Copolymer aus *N*-(2-Hydroxypropyl)methacrylamid(HP-MA)- und *N*-(*N*',*N*'-Dicarboxymethylaminopropyl)methacrylamid(DAMA)-Einheiten hergestellt. Die DAMA-Einheiten enthielten eine angehängte Metallchelatgruppe, über die die Verbindung mit dem Peptid hergestellt wurde. Zwei Coiled-coil-Peptide wurden eingesetzt: Dem ersten Peptid lag eine natürliche Sequenz aus dem Motorprotein Kinesin zugrunde (die einen Block von sechs Histidinresten enthielt), das zweite Protein war ein Blockcopolymer mit der Struktur HHHHHH-*b*-(nichtverknäuelte Sequenz aus 30 Aminosäuren)-*b*-(VSSLESK)₆. Die Heptad-Sequenz fördert die Coiled-coil-Bildung, und der Histidinblock fungiert als Chelatgruppe für Ni²⁺-Ionen, an die auch die Ligandgruppen des Polymer binden. Die Hydrogelen, die mit dem Wildtyp-Peptid vernetzt waren, wiesen einen Volumenphasenübergang auf, der durch thermische Entfaltung induziert wurde. Die Hydrogelen mit dem Blockpolypeptid zeigten keinen Volumenphasenübergang. Allerdings zeigten beide Hydrogelen ein Quellverhalten der Gelphase, wenn der Histidinblock durch einen Metallchelatliganden ersetzt wurde.^[238] Danach wurden Peptide mit Blocksequenzen untersucht, in denen sich nichtverknäuelte Regionen (A) mit Sequenzen aus dem Kinesinstammprotein (B) abwechselten, die die Tendenz zur Bildung von Coiled-coil-Strukturen aufwiesen.^[239] Mit rekombinanten DNA-Techniken wurden Histidin-markierte AB-Diblock-, ABAB-Tetrablock- und ABABAB-Hexablockpolymere hergestellt. Mit Größenausschluss-Chromatographie wurden Multimer-Aggregatstrukturen nachgewiesen (hauptsächlich Dimere und Tetramere). Das Ausmaß der Quellung nahm wegen der eintretenden Entfaltung mit zunehmender Temperatur ab.

An synthetischen Proteinen, die Coiled-coil-Domänen mit der Leucin-Reißverschlusssequenz enthielten (siehe Abschnitt 12), wurde eine reversible, durch pH-Wert- oder Temperaturänderungen induzierte Bildung von Hydrogelen untersucht.^[240] Mit CD-Messungen wurden helicale Sekundärstrukturen nachgewiesen, und die viskoelastischen Eigenschaften wurden untersucht, indem mit dynamischer Vielfachstreuung von Licht (diffusing wave spectroscopy, DWS) die mittlere örtliche Verschiebung von Sondenpartikeln gemessen wurde.

Deming und Mitarbeiter verwendeten synthetische Polypeptidblockcopomere für die Synthese von Hydrogelen.^[241,242] Sie untersuchten die Gelbildung bei einer Reihe von Diblockverbindungen, die einen hydrophilen und einen hydrophoben Block enthielten: Der hydrophile Block war ein

Polyelektrolyt aus PLys oder Poly(L-glumatinsäure), und der hydrophobe Block bestand aus Poly(L-leucin) in einer α -Helixstruktur oder aus Poly(L-valin) in einer β -Faltblattstruktur.^[241] Um eine Gelbildung zu beobachten, musste die hydrophobe Kette ein hohes Maß an Konformationsordnung aufweisen; α -Helixstrukturen eigneten sich etwas besser für die Gelbildung. Die Bedeutung der Kettenpackung wurde auch durch folgende Beobachtung unterstrichen: Bei einem gemischten Copolymer, das einen bestimmten Anteil an racemischem Leucin enthielt, wurde kein Gel gebildet, während das Copolymer mit einem gleichgroßen Anteil des reinen Enantiomers eine Gelbildung zeigte. Man fand eine hierarchische Ordnung, die einander durchdringende Netzwerkstrukturen auf der Nanometerebene aufwies und im Mikrometermaßstab eine poröse bikontinuierliche Morphologie besaß, die aus einer Gelmatrix mit Wasserkanälen bestand.^[242] Mit konfokaler Laser-Rastermikroskopie und Kryo-TEM-Experimenten wurde die zelluläre Netzwerkstruktur eines PLys-*b*-poly(L-leucin-*stat*-L-valin)-Diblockcopolymers untersucht (Abbildung 12). SANS-Messungen bestätigten eine geordnete Struktur im Nanometerbereich.

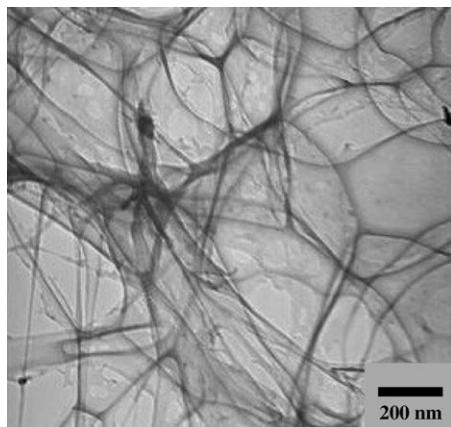


Abbildung 12. Kryo-TEM-Bild der zellulären Struktur in der Gelphase eines Poly(L-lysin)-*b*-poly(L-leucin-*stat*-L-valin)-Diblockcopolymers.^[242]

Pochan und Mitarbeiter untersuchten die pH-abhängige Selbstorganisation eines Peptids, in dem VK-Wiederholungssequenzen mit einer D-Prolin-L-Prolin(^{DPLP})- β -Schleife verbunden waren.^[243–245] Das Peptid faltet sich unter basischen Bedingungen, wobei sich Hydrogele bilden. Auch eine Erhöhung der Ionenstärke, die durch Abschirmung positiv geladener Lysinreste eine elektrostatische Abstoßung zwischen verschiedenen Lysinresten verhindert, kann eine Faltung induzieren.^[244] Später wurde eine Variante dieses Peptids hergestellt, indem mehrere Valinreste durch Threonin ersetzt wurden (T ist weniger hydrophob als V).^[245] Das neue Peptid bildete thermisch reversibel Hydrogele, wobei die Gelbildung bei hohen Temperaturen auftrat. Eine lichtinduzierte Bildung von Hydrogelen wurde für ein homologes Peptid mit einer β -Schleife beschrieben, das eine α -Carboxy-2-nitrobenzylgruppe enthielt, die an einen Cysteinrest gebunden war.^[246] Bestrahlung mit UV-Licht induzierte eine intramolekulare Faltung, die von einer Hydrogelbildung begleitet wurde.

12. Fibrillen aus α -Helixpeptiden

Die Bildung von Fibrillen aus Peptiden mit α -helicalen Strukturen wurde nur selten beobachtet. Woolfson und Mitarbeiter synthetisierten „SAF-Peptide“ („Self-Assembling Fibril“) mit Coiled-coil-Strukturen, die auf der Heptad-Sequenz HPPHPPP aus hydrophoben und polaren Resten basieren.^[247–249] Aufgrund von komplementären Wechselwirkungen zwischen den Kernbereichen, die zusätzlich von komplementären Ionenpaaren flankiert wurden, bildeten sich gestaffelte Heterodimere (Abbildung 13 a).^[247,250] Diese Peptide hatten außerdem „klebrige Enden“, die – ebenfalls aufgrund von Wechselwirkungen zwischen geladenen Resten – die Bildung langer Fibrillen begünstigten (Abbildung 13 b).

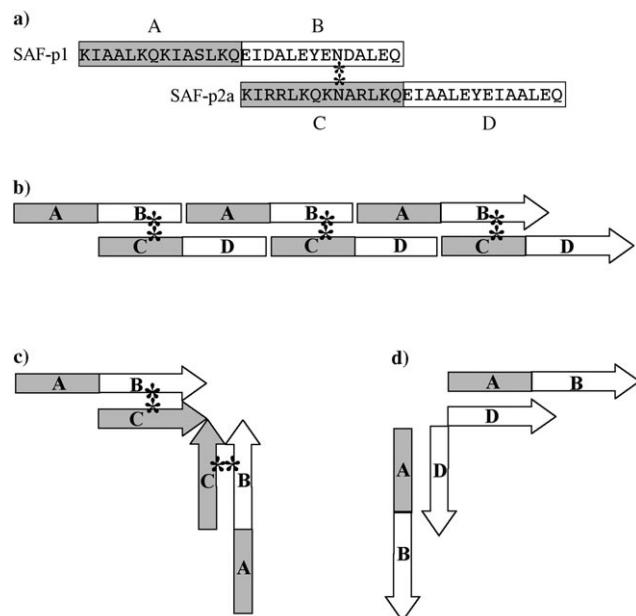


Abbildung 13. a) Selbstorganisation von Peptidfibrillen durch komplementäre elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Heterodimeren (A mit D, B mit C). Wechselwirkungen zwischen Asparaginresten (gekennzeichnet mit *) führen zu einer zusätzlichen Stabilisierung.^[250] Fibrillen werden durch eine gestaffelte Anordnung der Peptide gebildet (b). Abgewinkelte Peptide mit flexiblen β -Alaninresten (c, d) können Verzweigungen in die Fibrillen einführen.

Die Struktur dieser Peptide wurde später im Hinblick auf stärkere Wechselwirkungen zwischen den Prototibrillen verbessert. Zur Synthese verzweigter Fibrillen wurden in gemischte Peptidsysteme nichtlineare, „faserformende“ („fibre-shaping“, FiSh) Peptide integriert (Abbildung 13 c,d).^[250,251] Stark verzweigte Netzwerkstrukturen und regelmäßig segmentierte und terminierte Fibrillen konnten hergestellt werden, indem Peptide mit dreiarmigen dendritischen Abstandhaltern verbunden wurden.^[252] Eine Modifizierung der ursprünglichen linearen SAF-Peptide durch eine Substitution an der ϵ -Aminogruppe von Lysin ermöglichte die Funktionalisierung von Fibrillen mit Liganden, z. B. mit Biotin oder dem FLAG-Octapeptid.^[253] Diese beiden Peptide wurden eingesetzt, um mit Streptavidin funktionalisierte Goldnanopartikel zu binden (im zweiten Fall waren biotinylierte Anti-

FLAG-Antikörper für die molekulare Erkennung erforderlich).

Mehrere Gruppen beschrieben die Synthese von Switch-Peptiden, die eine parallele Coiled-coil-Dimerstruktur aufweisen (diese Struktur ist bekannt als Leucin-Reißverschlusssequenz).^[201,203,254–256] Der Einbau passender Reste in die Heptad-Sequenz der Coiled-coil-Struktur kann unter geeigneten Bedingungen die Bildung von β -Faltblattstrukturen begünstigen.^[203] Mutter et al. synthetisierten de novo ein Switch-Peptid, das bei pH 4 eine β -Faltblattstruktur und bei höheren pH-Werten eine partiell α -helicale Struktur bildete. Eine Peptidstruktur von Woolfson et al. enthielt eine β -Schleife (Abbildung 14).^[254] Infolge der Bildung intramole-

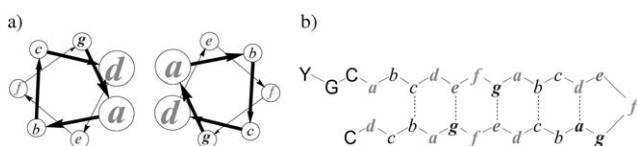


Abbildung 14. a) Helixrad-Projektionsdarstellung eines Coiled-coil-Dimers. b) Struktur einer β -Schleife; gestrichelte Linien kennzeichnen Wasserstoffbrücken zwischen den Strängen.^[254]

kularer Disulfidbindungen zwischen den Cys-Resten neben der Schleife kommt es bei Wärmezufuhr zu einem Übergang von einer α -Helix- zu einer β -Faltblattstruktur; einhergehend mit diesem Übergang findet eine Gelbildung statt. Darüber hinaus wurden ähnliche Peptide synthetisiert, die nicht nur auf thermische, sondern auch auf chemische Auslöser reagierten.^[257] Pagel et al. stellten ein Peptid aus 26 Aminosäuren her, das bei entsprechenden pH-Wert- und Konzentrationsbedingungen Zufallsknäuel, β -Faltblatt- oder Coiled-coil-Strukturen bilden kann.^[256] Zudem wurde ein Peptid mit 17 Resten entwickelt, das bei Raumtemperatur Coiled-coil-Strukturen und bei höheren Temperaturen Amyloidfibrillen bildet.^[255]

Für ein Peptid aus drei Heptad-Sequenzen, das eine Struktur aus wasserlöslichen helicalen Bündeln hat, wurde bei bestimmten pH-Werten die Bildung von Fibrillen beobachtet.^[258] Ein weiteres Peptid bildete Fibrillen, die aus fünf helicalen Strängen in einer gestaffelten Anordnung bestanden.^[259] Aus drei helicalen Strängen bestehende Peptidbündel bildeten Fibrillen, wenn die Helices eine geeignete Orientierung aufwiesen.^[260] Die intermolekulare Assoziation der Monomere bildet ein Beispiel für eine dreidimensionale Proteinstruktur mit Domänaustausch, in der eine strukturelle Domäne eines Proteinmonomers gegen die gleiche Domäne eines anderen Proteins ausgetauscht ist, woraus ein verflochtenes Oligomer resultiert.

13. Zusammenfassung und Ausblick

Langsam erhalten wir ein klares Bild vom Mechanismus der Amyloidbildung aus $\text{A}\beta$ und ähnlichen Proteinen. Dieses Wissen wird nun genutzt, um Inhibitoren für die Fibrillenbildung zu entwickeln – damit könnte ein Durchbruch in der Therapie gelingen. Es bleiben allerdings noch wichtige

Fragen zu den thermodynamischen Grundlagen der Fibrillenbildung von β -Faltblattstrukturen und dem Zusammenhang mit der Proteinfaltung zu beantworten. Unterdessen arbeitet man mit Selbstorganisationskonzepten auf der Basis nichtkovaler Wechselwirkungen, um neuartige Peptide und Peptidverbindungen mit nützlichen Eigenschaften herzustellen; Beispiele sind kontrollierbare Fibrillenmorphologie, verbesserte Stabilität, responsive Gelbildung oder funktionelle Gruppen für bio-anorganische Hybridverbindungen. Damit eröffnet sich ein vielversprechendes neues Feld, das noch aufregende Entdeckungen erwarten lässt.

Ich danke Dr. Adam Squires (University of Reading) für hilfreiche Diskussionen und Marta Krysmann für die TEM-Aufnahmen im Titelbild und in Abbildung 2. Den Gutachtern danke ich für die Hinweise auf mehrere zusätzliche interessante Literaturstellen.

Eingegangen am 26. Februar 2007
Online veröffentlicht am 12. Oktober 2007

Übersetzt von Dr. Christian Bahr, Schildow

- [1] E. D. Eanes, G. G. Glenner, *J. Histochem. Cytochem.* **1968**, *16*, 673.
- [2] D. A. Kirschner, C. Abraham, D. J. Selkoe, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, *83*, 503.
- [3] M. Sunde, C. C. F. Blake, *Adv. Protein Chem.* **1997**, *50*, 123.
- [4] L. C. Serpell, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **2000**, *1502*, 16.
- [5] O. S. Makin, L. C. Serpell, *FEBS J.* **2005**, *272*, 5950.
- [6] D. B. Teplow, *Amyloid* **1998**, *5*, 121.
- [7] M. J. Krysmann, I. W. Hamley, P. J. F. Harris, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [8] M. Goedert, M. G. Spillantini, *Science* **2006**, *314*, 777.
- [9] E. D. Roberson, L. Mucke, *Science* **2006**, *314*, 781.
- [10] J. D. Sipe, *Annu. Rev. Biochem.* **1992**, *61*, 947.
- [11] B. Caughey, P. T. Lansbury, *Annu. Rev. Neurosci.* **2003**, *26*, 267.
- [12] M. R. Chapman, L. S. Robinson, J. S. Pinkner, R. Roth, J. Heuser, M. Hammar, S. Normark, S. J. Hultgren, *Science* **2002**, *295*, 851.
- [13] J. W. Kelly, W. E. Balch, *J. Cell Biol.* **2003**, *161*, 461.
- [14] J. F. Berson, A. C. Theos, D. C. Harper, D. Tenza, G. Raposo, M. S. Marks, *J. Cell Biol.* **2003**, *161*, 521.
- [15] P. T. Lansbury, H. A. Lashuel, *Nature* **2006**, *443*, 774.
- [16] M. Bucciantini, E. Giannoni, F. Chiti, F. Baroni, L. Formigli, J. Zurdo, N. Taddei, G. Ramponi, C. M. Dobson, M. Stefani, *Nature* **2002**, *416*, 507.
- [17] F. Rousseau, J. Schmykowitz, L. Serrano, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2006**, *16*, 118.
- [18] C. G. Glabe, *Neurobiol. Aging* **2006**, *27*, 570.
- [19] E. Cohen, J. Bieschke, R. M. Perciavalle, J. W. Kelly, A. Dillin, *Science* **2006**, *313*, 1604.
- [20] C. M. Dobson, *Trends Biochem. Sci.* **1999**, *24*, 329.
- [21] M. Bucciantini, G. Calloni, F. Chiti, L. Formigli, D. Nosi, C. M. Dobson, M. Stefani, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 31374.
- [22] D. M. Walsh, B. P. Tseng, R. E. Rydel, M. B. Podlisny, D. J. Selkoe, *Biochemistry* **2000**, *39*, 10831.
- [23] A. Goate, M. C. Chartierharlin, M. Mullan, J. Brown, F. Crawford, L. Fidani, L. Giuffra, A. Haynes, N. Irving, L. James, R. Mant, P. Newton, K. Rooke, P. Roques, C. Talbot, M. Pericakvance, A. Roses, R. Williamson, M. Rossor, M. Owen, J. Hardy, *Nature* **1991**, *349*, 704.

- [24] R. Sherrington, E. I. Rogaev, Y. Liang, E. A. Rogaeva, G. Levesque, M. Ikeda, H. Chi, C. Lin, G. Li, K. Holman, T. Tsuda, L. Mar, J. F. Foncin, A. C. Bruni, M. P. Montesi, S. Sorbi, I. Rainero, L. Pinessi, L. Nee, I. Chumakov, D. Pollen, A. Brookes, P. Sanseau, R. J. Polinsky, W. Wasco, H. A. R. Dasilva, J. L. Haines, M. A. Pericakvance, R. E. Tanzi, A. D. Roses, P. E. Fraser, J. M. Rommens, P. H. St George-Hyslop, *Nature* **1995**, 375, 754.
- [25] E. I. Rogaev, R. Sherrington, E. A. Rogaeva, G. Levesque, M. Ikeda, Y. Liang, H. Chi, C. Lin, K. Holman, T. Tsuda, L. Mar, S. Sorbi, B. Nacmias, S. Piacentini, L. Amaducci, I. Chumakov, D. Cohen, L. Lannfelt, P. E. Fraser, J. M. Rommens, P. H. St George-Hyslop, *Nature* **1995**, 376, 775.
- [26] D. E. Schmeichel, A. M. Saunders, W. J. Strittmatter, B. J. Crain, C. M. Hulette, S. H. Joo, M. A. Pericakvance, D. Goldgaber, A. D. Roses, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 9649.
- [27] A. M. Saunders, W. J. Strittmatter, D. Schmeichel, P. H. S. St George-Hyslop, M. A. Pericakvance, S. H. Joo, B. L. Rosi, J. F. Gusella, D. R. Crappermaclachlan, M. J. Alberts, C. Hulette, B. Crain, D. Goldgaber, A. D. Roses, *Neurology* **1993**, 43, 1467.
- [28] E. H. Corder, A. M. Saunders, W. J. Strittmatter, D. E. Schmeichel, P. C. Gaskell, G. W. Small, A. D. Roses, J. L. Haines, M. A. Pericakvance, *Science* **1993**, 261, 921.
- [29] K. R. Bales, T. Verina, R. C. Dodel, Y. S. Du, L. Altstiel, M. Bender, P. Hyslop, E. M. Johnstone, S. P. Little, D. J. Cummins, P. Piccardo, B. Ghetti, S. M. Paul, *Nat. Genet.* **1997**, 17, 263.
- [30] E. Rogaeva, Y. Meng, J. H. Lee, Y. Gu, T. Kawarai, F. Zou, T. Katayama, C. T. Baldwin, R. Cheng, H. Hasegawa, F. Chen, N. Shibata, K. L. Lunetta, R. Pardossi-Piquard, C. Bohm, Y. Wakutani, L. A. Cupples, K. T. Cuenco, R. C. Green, L. Pinessi, I. Rainero, S. Sorbi, A. Bruni, R. Duara, R. P. Friedland, R. Inzelberg, W. Hampe, H. Bujo, Y. Q. Song, O. M. Andersen, T. E. Willnow, N. Graff-Radford, R. C. Petersen, D. Dickson, S. D. Der, P. E. Fraser, G. Schmitt-Ulms, S. Younkin, R. Mayeux, L. A. Farrer, P. St George-Hyslop, *Nat. Genet.* **2007**, 39, 168.
- [31] T. A. Fulga, I. Elson-Schwab, V. Khurana, M. L. Steinhibl, T. L. Spires, B. T. Hyman, M. B. Feany, *Nat. Cell Biol.* **2006**, 9, 139.
- [32] C. Blake, L. C. Serpell, *Structure* **1996**, 4, 989.
- [33] J. L. Jiménez, J. L. Guijarro, E. Orlova, J. Zurdo, C. M. Dobson, M. Sunde, H. R. Saibil, *EMBO J.* **1999**, 18, 815.
- [34] J. L. Jiménez, E. J. Nettleton, M. Bouchard, C. V. Robinson, C. M. Dobson, H. R. Saibil, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 9196.
- [35] D. Voet, J. G. Voet, *Biochemistry*, John Wiley & Sons, New York, **1995**.
- [36] M. Sunde, L. C. Serpell, M. Bartlam, P. E. Fraser, M. B. Pepys, C. C. F. Blake, *J. Mol. Biol.* **1997**, 273, 729.
- [37] J. D. Termine, E. D. Eanes, D. Ein, G. G. Glenner, *Biopolymers* **1972**, 11, 1103.
- [38] A. T. Petkova, Y. Ishii, J. J. Balbach, O. N. Antzutkin, R. D. Leapman, F. Delaglio, R. Tycko, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 16742.
- [39] T. Lührs, C. Ritter, M. Adrian, D. Riek-Loher, B. Bohrmann, H. Döbeli, D. Schubert, R. Riek, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, 102, 17342.
- [40] A. M. Squires, G. L. Devlin, S. L. Gras, A. K. Tickler, C. E. MacPhee, C. M. Dobson, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 11738.
- [41] M. F. Perutz, J. T. Finch, J. Berriman, A. Lesk, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 5591.
- [42] P. Sikorski, E. Atkins, *Biomacromolecules* **2005**, 6, 425.
- [43] D. Sharma, L. M. Shinchuk, H. Inouye, R. Wetzel, D. A. Kirschner, *Proteins Struct. Funct. Bioinf.* **2005**, 61, 398.
- [44] H. Inouye, D. A. Kirschner in *Adv. Protein Chem.*, Vol. 73 (Hrsg.: A. Kakava, J. M. Squire, D. A. D. Parry), Elsevier Academic, San Diego, **2006**.
- [45] H. LeVine, *Protein Sci.* **1993**, 2, 404.
- [46] S. J. Wood, B. Maleef, T. Hart, R. Wetzel, *J. Mol. Biol.* **1996**, 256, 870.
- [47] O. S. Makin, L. C. Serpell, *Fibre Diffr. Rev.* **2004**, 12, 29.
- [48] A. Lomakin, D. S. Chung, G. B. Benedek, D. A. Kirschner, D. B. Teplow, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 1125.
- [49] J. Riseman, J. G. Kirkwood, *J. Chem. Phys.* **1950**, 18, 512.
- [50] D. M. Walsh, A. Lomakin, G. B. Benedek, M. M. Condron, D. B. Teplow, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 22364.
- [51] Y. Kusumoto, A. Lomakin, D. B. Teplow, G. B. Benedek, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 12277.
- [52] F. Sokolowski, A. J. Modler, R. Masuch, D. Zirwer, M. Baier, G. Lutsch, D. A. Moss, K. Gast, D. Naumann, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 40481.
- [53] A. J. Modler, K. Gast, G. Lutsch, G. Damaschun, *J. Mol. Biol.* **2003**, 325, 135.
- [54] S. M. Kelly, T. J. Jess, N. C. Price, *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteomics* **2005**, 1751, 119.
- [55] J. Reed, A. Reed, *Anal. Biochem.* **1997**, 254, 36.
- [56] W. K. Surewicz, H. H. Mantsch, D. Chapman, *Biochemistry* **1993**, 32, 389.
- [57] B. Stuart, *Biological Applications of Infrared Spectroscopy*, Wiley, Chichester, **1997**.
- [58] H. Hiramatsu, T. Kitagawa, *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteomics* **2005**, 1753, 100.
- [59] M. Jackson, H. H. Mantsch, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1995**, 30, 95.
- [60] P. Haris, D. Chapman, *Biopolymers* **1995**, 37, 251.
- [61] J. Kubelka, T. A. Keiderling, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 6142.
- [62] P. R. Costa, D. A. Kocisko, B. Q. Sun, P. T. Lansbury, R. G. Griffin, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 10487.
- [63] T. L. S. Benzing, D. M. Gregory, T. S. Burkoth, H. Miller-Auer, D. G. Lynn, R. E. Botto, S. C. Meredith, *Biochemistry* **2000**, 39, 3491.
- [64] A. B. Siemer, C. Ritter, M. Ernst, R. Riek, B. H. Meier, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 2494; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 2441.
- [65] H. Heise, W. Hoyer, S. Becker, O. C. Andronesi, D. Riedel, M. Baldus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, 102, 15871.
- [66] R. Tycko, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2004**, 14, 96.
- [67] R. Tycko, *Q. Rev. Biophys.* **2006**, 39, 1.
- [68] J. D. Harper, S. S. Wong, C. M. Lieber, P. T. Lansbury, *Chem. Biol.* **1997**, 4, 119.
- [69] G. Bitan, M. D. Kirkpatridge, A. Lomakin, S. S. Vollers, G. B. Benedek, D. B. Teplow, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 330.
- [70] C. Ha, C. B. Park, *Langmuir* **2006**, 22, 6977.
- [71] S. L. McCutchen, Z. H. Lai, G. J. Miroy, J. W. Kelly, W. Colon, *Biochemistry* **1995**, 34, 13527.
- [72] Z. Lai, W. Colón, J. W. Kelly, *Biochemistry* **1996**, 35, 6470.
- [73] G. S. Jackson, L. L. P. Hosszu, A. Power, A. F. Hill, J. Kenney, H. Saibil, C. J. Craven, J. P. Waltho, A. R. Clarke, J. Collinge, *Science* **1999**, 283, 1935.
- [74] L. L. P. Hosszu, N. J. Baxter, G. S. Jackson, A. Power, A. R. Clarke, J. P. Waltho, C. J. Craven, J. Collinge, *Nat. Struct. Biol.* **1999**, 6, 740.
- [75] M. R. Hurle, L. R. Helms, L. Li, W. Chan, R. Wetzel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, 91, 5446.
- [76] L. R. Helms, R. Wetzel, *J. Mol. Biol.* **1996**, 257, 77.
- [77] R. Raffen, L. J. Dieckman, M. Szpunar, C. Wunschl, P. R. Pokkuri, P. Dave, P. W. Stevens, X. Y. Cai, M. Schiffer, F. J. Stevens, *Protein Sci.* **1999**, 8, 509.
- [78] S. E. Radford, C. M. Dobson, P. A. Evans, *Nature* **1992**, 358, 302.
- [79] D. R. Booth, M. Sunde, V. Bellotti, C. V. Robinson, W. L. Hutchinson, P. E. Fraser, P. N. Hawkins, C. M. Dobson, S. E. Radford, C. C. F. Blake, M. B. Pepys, *Nature* **1997**, 385, 787.

- [80] J. I. Guijarro, M. Sunde, J. A. Jones, I. D. Campbell, C. M. Dobson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 4224.
- [81] V. J. McParland, N. M. Kad, A. P. Kalverda, A. Brown, P. Kirwin-Jones, M. G. Hunter, M. Sunde, S. E. Radford, *Biochemistry* **2000**, *39*, 8735.
- [82] N. M. Kad, N. H. Thomson, D. P. Smith, D. A. Smith, S. E. Radford, *J. Mol. Biol.* **2001**, *313*, 559.
- [83] D. P. Smith, S. E. Radford, *Protein Sci.* **2001**, *10*, 1775.
- [84] L. N. Arnaudov, R. de Vries, *Biophys. J.* **2004**, *88*, 515.
- [85] F. Chiti, P. Webster, N. Taddei, A. Clark, M. Stefani, G. Ramponi, C. M. Dobson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 3590.
- [86] M. Fändrich, V. Forge, K. Buder, M. Kittler, C. M. Dobson, S. Diekmann, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 15463.
- [87] R. Schweitzer-Stenner, T. Measey, A. Hagarman, F. Eker, K. Griebel, *Biochemistry* **2006**, *45*, 2810.
- [88] F. Eker, K. Griebel, R. Schweitzer-Stenner, *Biochemistry* **2004**, *43*, 6893.
- [89] L. M. Hou, H. Y. Shao, Y. B. Zhang, H. Li, N. K. Menon, E. B. Neuhaus, J. M. Brewer, I. J. L. Byeon, D. G. Ray, M. P. Vitek, T. Iwashita, R. A. Makula, A. B. Przybyla, M. G. Zagorski, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1992.
- [90] C. D. Syme, E. W. Blanch, C. Holt, R. Jakes, M. Goedert, L. Hecht, L. D. Barron, *Eur. J. Biochem.* **2002**, *269*, 148.
- [91] S. Narayanan, B. Reif, *Biochemistry* **2005**, *44*, 1444.
- [92] M. Tanaka, Y. Machida, Y. Nishikawa, T. Akagi, T. Hashikawa, T. Fujisawa, N. Nukina, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 34717.
- [93] G. P. Bates, C. Benn in *Huntington's Disease* (Hrsg.: G. P. Bates, P. S. Harper, L. Jones), Oxford University Press, Oxford, **2002**.
- [94] M. Calamai, C. Canale, A. Relini, M. Stefani, F. Chiti, C. M. Dobson, *J. Mol. Biol.* **2005**, *346*, 603.
- [95] J. T. Jarrett, P. T. Lansbury, *Cell* **1993**, *73*, 1055.
- [96] J. D. Harper, P. T. Lansbury, *Annu. Rev. Biochem.* **1997**, *66*, 385.
- [97] J. N. Israelachvili, *Intermolecular and Surface Forces*, Academic Press, San Diego, **1991**.
- [98] J. M. Andreu, S. N. Timasheff, *Methods Enzymol.* **1986**, *130*, 47.
- [99] K. Johan, G. Westermark, U. Engström, A. Gustavsson, P. Hultman, P. Westermark, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 2558.
- [100] C. M. Dobson, *Nature* **2003**, *426*, 884.
- [101] I. V. Baskakov, G. Legname, Z. Gryczynski, S. B. Prusiner, *Protein Sci.* **2004**, *13*, 586.
- [102] L. N. Arnaudov, R. de Vries, *Biomacromolecules* **2003**, *4*, 1614.
- [103] Y.-H. Chen, J. T. Yang, H. M. Martinez, *Biochemistry* **1972**, *11*, 4120.
- [104] Y.-H. Chen, J. T. Yang, K. H. Chau, *Biochemistry* **1974**, *13*, 3350.
- [105] P. Aymard, T. Nicolai, D. Durand, A. Clark, *Macromolecules* **1999**, *32*, 2542.
- [106] L. N. Arnaudov, R. de Vries, *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 3490.
- [107] M. R. H. Krebs, D. K. Wilkins, E. W. Chung, M. C. Pitkeathly, A. K. Chamberlain, J. Zurdo, C. V. Robinson, C. M. Dobson, *J. Mol. Biol.* **2000**, *300*, 541.
- [108] E. K. Hill, B. Krebs, D. G. Goodall, G. J. Howlett, D. E. Dunstan, *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 10.
- [109] V. Castelletto, I. W. Hamley, *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 77.
- [110] W. P. Esler, E. R. Stimson, J. R. Ghilardi, H. V. Vinters, J. P. Lee, P. W. Mantyh, J. E. Maggio, *Biochemistry* **1996**, *35*, 749.
- [111] H. Naiki, K. Nakakuki, *Lab. Invest.* **1996**, *74*, 374.
- [112] S. R. Collins, A. Douglass, R. D. Vale, J. S. Weissman, *PLoS Biol.* **2004**, *2*, 1582.
- [113] S. Narayanan, S. Walter, B. Reif, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 757.
- [114] M. R. H. Krebs, L. A. Morozova-Roche, K. Daniel, C. V. Robinson, C. M. Dobson, *Protein Sci.* **2004**, *13*, 1933.
- [115] A. T. Petkova, R. D. Leapman, Z. H. Guo, W. M. Yau, M. P. Mattson, R. Tycko, *Science* **2005**, *307*, 262.
- [116] W. S. Gosal, A. H. Clark, P. D. A. Pudney, S. B. Ross-Murphy, *Langmuir* **2002**, *18*, 7174.
- [117] T. Ban, D. Hamada, K. Hasegawa, H. Naiki, Y. Goto, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 16462.
- [118] M. P. Lambert, A. K. Barlow, B. A. Chromy, C. Edwards, R. Freed, M. Liosatos, T. E. Morgan, I. Rozovsky, B. Trommer, K. L. Viola, P. Wals, C. Zhang, C. E. Finch, G. A. Kraft, W. L. Klein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 6448.
- [119] K. N. Dahlgren, A. M. Manelli, W. B. Stine, L. K. Baker, G. A. Kraft, M. J. LaDu, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 32046.
- [120] D. M. Hartley, D. M. Walsh, C. P. P. Ye, T. Diehl, S. Vasquez, P. M. Vassilev, D. B. Teplow, D. J. Selkoe, *J. Neurosci.* **1999**, *19*, 8876.
- [121] K. Andersson, A. Olofsson, E. H. Nielsen, S. E. Svehag, E. Lundgren, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *294*, 309.
- [122] R. Kayed, E. Head, J. L. Thompson, T. M. McIntire, S. C. Milton, C. W. Cotman, C. G. Glabe, *Science* **2003**, *300*, 486.
- [123] Y. Zhang, R. McLaughlin, C. Goodyer, A. LeBlanc, *J. Cell Biol.* **2002**, *156*, 519.
- [124] J. P. Cleary, D. M. Walsh, J. J. Hofmeister, G. M. Shankar, M. A. Kuskowski, D. J. Selkoe, K. H. Ashe, *Nat. Neurosci.* **2005**, *8*, 79.
- [125] Y. S. Du, X. Wei, R. Dodel, N. Sommer, H. Hampel, F. Gao, Z. Z. Ma, L. M. Zhao, W. H. Oertel, M. Farlow, *Brain* **2003**, *126*, 1935.
- [126] M. P. Lambert, K. L. Viola, B. A. Chromy, L. Chang, T. E. Morgan, J. X. Yu, D. L. Vinton, G. A. Kraft, C. E. Finch, W. L. Klein, *J. Neurochem.* **2001**, *79*, 595.
- [127] S. Lesné, M. T. Koh, L. Kotilinek, R. Kayed, C. G. Glabe, A. Yang, M. Gallagher, K. H. Ashe, *Nature* **2006**, *440*, 352.
- [128] H. B. Pollard, N. Arispe, E. Rojas, *Cell. Mol. Neurobiol.* **1995**, *15*, 513.
- [129] J. I. Kourie, C. L. Henry, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2002**, *29*, 741.
- [130] H. A. Lashuel, D. Hartley, B. M. Petre, T. Walz, P. T. Lansbury, *Nature* **2002**, *418*, 291.
- [131] N. Arispe, E. Rojas, H. B. Pollard, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 567.
- [132] N. Arispe, H. B. Pollard, E. Rojas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 10573.
- [133] N. Arispe, H. B. Pollard, E. Rojas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 1710.
- [134] Y. Hirakura, M. C. Lin, B. L. Kagan, *J. Neurosci. Res.* **1999**, *57*, 458.
- [135] H. Lin, R. Bhatia, R. Lal, *FASEB J.* **2001**, *15*, 2433.
- [136] M. J. Volles, P. T. Lansbury, *Biochemistry* **2002**, *41*, 4595.
- [137] T. R. Jahn, S. E. Radford, *FEBS J.* **2005**, *272*, 5962.
- [138] M. Balbirnie, R. Grothe, D. S. Eisenberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 2375.
- [139] B. Gaughey, G. S. Baron, *Nature* **2006**, *443*, 803.
- [140] M. Fändrich, C. M. Dobson, *EMBO J.* **2002**, *21*, 5682.
- [141] W. K. Kim, M. H. Hecht, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 15824.
- [142] W. J. Goux, L. Kopplin, A. D. Nguyen, K. Leak, M. Rutkofsky, V. D. Shanmuganandam, D. Sharma, H. Inouye, D. A. Kirschner, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 26868.
- [143] M. Reches, E. Gazit, *Amyloid* **2004**, *11*, 81.
- [144] M. Reches, Y. Porat, E. Gazit, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 35475.
- [145] C. Hilbich, B. Kisterswoijke, J. Reed, C. L. Masters, K. Beyreuther, *J. Mol. Biol.* **1992**, *228*, 460.
- [146] L. O. Tjernberg, J. Naslund, F. Lindqvist, J. Johansson, A. R. Karlstrom, J. Thyberg, L. Terenius, C. Nordstedt, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 8545.
- [147] L. O. Tjernberg, C. Lilliehook, D. J. E. Callaway, J. Naslund, S. Hahne, J. Thyberg, L. Terenius, C. Nordstedt, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 12601.
- [148] 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, S. M. Molineaux, *Biochemistry* **1999**, *38*, 6791.

- [149] L. O. Tjernberg, D. J. E. Callaway, A. Tjernberg, S. Hahne, C. Lilliehöök, L. Terenius, J. Thyberg, C. Nordstedt, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 12619.
- [150] D. J. Gordon, R. Tappe, S. C. Meredith, *J. Pept. Res.* **2002**, *60*, 37.
- [151] D. J. Gordon, K. L. Sciarretta, S. C. Meredith, *Biochemistry* **2001**, *40*, 8237.
- [152] C. Soto, E. M. Sigurdsson, L. Morelli, R. A. Kumar, E. M. Castano, B. Frangione, *Nat. Med.* **1998**, *4*, 822.
- [153] G. Zhang, M. J. Leibowitz, P. J. Sinko, S. Stein, *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 86.
- [154] J. J. Balbach, Y. Ishii, O. N. Antzutkin, R. D. Leapman, N. W. Rizzo, F. Dyda, J. Reed, R. Tycko, *Biochemistry* **2000**, *39*, 13748.
- [155] K. Lu, J. Jacob, P. Thiagarajan, V. P. Conticello, D. G. Lynn, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6391.
- [156] S. J. Wood, R. Wetzel, J. D. Martin, M. R. Hurle, *Biochemistry* **1995**, *34*, 724.
- [157] A.-M. Fernandez-Escamilla, F. Rousseau, J. Schymkowitz, L. Serrano, *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 1302.
- [158] A. P. Pawar, K. F. DuBay, J. Zurdo, F. Chiti, M. Vendruscolo, C. M. Dobson, *J. Mol. Biol.* **2005**, *350*, 379.
- [159] Y. Kallberg, M. Gustafsson, B. Persson, J. Thyberg, J. Johansson, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 12945.
- [160] A. A. Watson, D. P. Fairlie, D. J. Craik, *Biochemistry* **1998**, *37*, 12700.
- [161] H. Sticht, P. Bayer, D. Willbold, S. Dames, C. Hilbich, K. Beyreuther, R. W. Frank, P. Rosch, *Eur. J. Biochem.* **1995**, *233*, 293.
- [162] M. Coles, W. Bicknell, A. A. Watson, D. P. Fairlie, D. J. Craik, *Biochemistry* **1998**, *37*, 11064.
- [163] S. B. Malinchik, H. Inouye, K. E. Szumowski, D. A. Kirschner, *Biophys. J.* **1998**, *74*, 537.
- [164] A. Aggeli, M. Bell, N. Boden, J. N. Keen, P. F. Knowles, T. C. B. McLeish, M. Pitkeathly, S. E. Radford, *Nature* **1997**, *386*, 259.
- [165] A. Aggeli, M. L. Bannister, M. Bell, N. Boden, J. B. C. Findlay, M. Hunter, P. F. Knowles, J.-C. Yang, *Biochemistry* **1998**, *37*, 8121.
- [166] A. Aggeli, M. Bell, N. Boden, J. N. Keen, T. C. B. McLeish, I. Nyrkova, S. E. Radford, A. Semenov, *J. Mater. Chem.* **1997**, *7*, 1135.
- [167] A. Aggeli, G. Fytas, D. Vlassopoulos, T. C. B. McLeish, P. J. Mawer, N. Boden, *Biomacromolecules* **2001**, *2*, 378.
- [168] I. A. Nyrkova, A. N. Semenov, A. Aggeli, M. Bell, N. Boden, T. C. B. McLeish, *Eur. Phys. J. B* **2000**, *17*, 499.
- [169] A. Aggeli, I. A. Nyrkova, M. Bell, R. Harding, L. Carrick, T. C. B. McLeish, A. N. Semenov, N. Boden, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 11857.
- [170] L. Carrick, M. Tassieri, T. A. Waigh, A. Aggeli, N. Boden, C. Bell, J. Fisher, E. Ingham, R. M. L. Evans, *Langmuir* **2005**, *21*, 3733.
- [171] A. Aggeli, M. Bell, N. Boden, L. M. Carrick, A. E. Strong, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 5761; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 5603.
- [172] A. Aggeli, M. Bell, N. Boden, L. Carrick, C. W. G. Fishwick, P. J. Mawer, S. E. Radford, A. E. Strong, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9619.
- [173] M. L. de la Paz, K. Goldie, J. Zurdo, E. Lacroix, C. M. Dobson, A. Hoenger, L. Serrano, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 16052.
- [174] P. Chen, *Colloids Surf. A* **2005**, *261*, 3.
- [175] S. Jun, Y. Hong, H. Imamura, B.-Y. Ha, J. Bechhoefer, P. Chen, *Biophys. J.* **2004**, *87*, 1249.
- [176] H. Yang, M. Pritzker, S. Y. Fung, Y. Sheng, W. Wang, P. Chen, *Langmuir* **2006**, *22*, 8553.
- [177] K. Pagel, T. Vagt, T. Kohajda, B. Koks, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 2500.
- [178] K. Pagel, T. Vagt, B. Koks, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 3843.
- [179] S. Matsumura, S. Uemura, H. Mihara, *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 2789.
- [180] J. D. Hartgerink, E. Beniash, S. I. Stupp, *Science* **2001**, *294*, 1684.
- [181] J. D. Hartgerink, E. Beniash, S. I. Stupp, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 5133.
- [182] K. L. Niece, J. D. Hartgerink, J. J. M. Donners, S. I. Stupp, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 7146.
- [183] R. C. Claussen, B. M. Rabatic, S. I. Stupp, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12680.
- [184] S. Vauthey, S. Santoso, H. Gong, N. Watson, S. Zhang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 5355.
- [185] S. Santoso, W. Hwang, H. Hartman, S. Zhang, *Nano Lett.* **2002**, *2*, 687.
- [186] S. S. Santoso, S. Vauthey, S. Zhang, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2002**, *7*, 262.
- [187] H.-W. Jun, V. Yuwono, S. E. Paramonov, J. D. Hartgerink, *Adv. Mater.* **2005**, *17*, 2612.
- [188] C. Li, J. Orbulescu, G. Sui, R. M. Leblanc, *Langmuir* **2004**, *20*, 8641.
- [189] R. Bitton, J. Schmidt, M. Biesalski, R. Tu, M. Tirrell, H. Bianco-Peled, *Langmuir* **2005**, *21*, 11888.
- [190] K. Velonia, A. E. Rowan, R. J. M. Nolte, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 4224.
- [191] D. W. P. M. Löwik, J. Garcia-Hartjes, J. T. Meijer, J. C. M. van Hest, *Langmuir* **2005**, *21*, 524.
- [192] J. T. Meijer, M. Roeters, V. Viola, D. W. P. M. Löwik, G. Vriend, J. C. M. van Hest, *Langmuir* **2007**, *23*, 2058.
- [193] G. W. M. Vandermeulen, C. Tziatzios, H.-A. Klok, *Macromolecules* **2003**, *36*, 4107.
- [194] G. W. M. Vandermeulen, H.-A. Klok, *Macromol. Biosci.* **2004**, *4*, 383.
- [195] I. W. Hamley, *Block Copolymers in Solution*, Wiley, Chichester, **2005**.
- [196] H. Schlaad, *Adv. Polym. Sci.* **2006**, *202*, 53.
- [197] T. S. Burkoth, T. L. S. Benzinger, D. N. M. Jones, K. Hallenga, S. C. Meredith, D. G. Lynn, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 7655.
- [198] T. S. Burkoth, T. L. S. Benzinger, V. Urban, D. G. Lynn, S. C. Meredith, P. Thiagarajan, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 7429.
- [199] P. Thiagarajan, T. S. Burkoth, V. Urban, S. Seifert, T. L. S. Benzinger, D. M. Morgan, D. Gordon, S. C. Meredith, D. G. Lynn, *J. Appl. Crystallogr.* **2000**, *33*, 535.
- [200] J. H. Collier, P. B. Messersmith, *Adv. Mater.* **2004**, *16*, 907.
- [201] H.-A. Klok, G. W. M. Vandermeulen, H. Nuhn, A. Rösler, I. W. Hamley, V. Castelletto, H. Xu, S. Sheiko, *Faraday Discuss.* **2005**, *128*, 29.
- [202] J. Y. Su, R. S. Hodges, C. M. Kay, *Biochemistry* **1994**, *33*, 15501.
- [203] M. Mutter, R. Gassmann, U. Buttkus, K.-H. Altmann, *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 1504; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 1514.
- [204] I. W. Hamley, I. A. Ansari, V. Castelletto, H. Nuhn, A. Rösler, H.-A. Klok, *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 1310.
- [205] J. J. L. M. Cornelissen, M. Fischer, N. A. J. M. Sommerdijk, R. J. M. Nolte, *Science* **1998**, *280*, 1427.
- [206] J. M. Smeenk, P. Schön, M. B. J. Otten, S. Speller, H. G. Stuinenberg, J. C. M. van Hest, *Macromolecules* **2006**, *39*, 2989.
- [207] M. Reches, E. Gazit, *Science* **2003**, *300*, 625.
- [208] E. Gazit, *FEBS J.* **2005**, *272*, 5971.
- [209] S. Gilead, E. Gazit, *Supramol. Chem.* **2005**, *17*, 87.
- [210] M. Reches, E. Gazit, *Isr. J. Chem.* **2005**, *45*, 363.
- [211] M. Reches, E. Gazit, *Nano Lett.* **2004**, *4*, 581.
- [212] C. H. Görbitz, *Chem. Commun.* **2006**, 2332.
- [213] C. H. Görbitz, *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 5153.
- [214] C. H. Görbitz, *New J. Chem.* **2003**, *27*, 1789.
- [215] S. M. Tracz, A. Abedini, M. Driscoll, D. P. Raleigh, *Biochemistry* **2004**, *43*, 15901.

- [216] F. Bemporad, N. Taddei, M. Stefani, F. Chiti, *Protein Sci.* **2006**, 15, 862.
- [217] O. S. Makin, E. Atkins, P. Sikorski, J. Johansson, L. C. Serpell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, 102, 315.
- [218] H. Inouye, D. Sharma, W. J. Goux, D. A. Kirschner, *Biophys. J.* **2005**, 90, 1774.
- [219] V. Jayawarna, M. Ali, T. A. Jowitt, A. F. Miller, A. Saiani, J. E. Gough, R. V. Ulijn, *Adv. Mater.* **2006**, 18, 611.
- [220] A. Mahler, M. Reches, M. Rechter, S. Cohen, E. Gazit, *Adv. Mater.* **2006**, 18, 1365.
- [221] M. Yemini, M. Reches, J. Rishpon, E. Gazit, *Nano Lett.* **2004**, 4, 183.
- [222] X. Gao, H. Matsui, *Adv. Mater.* **2005**, 17, 2037.
- [223] M. R. Ghadiri, J. R. Granja, R. A. Milligan, D. E. McRee, N. Khazanovich, *Nature* **1993**, 366, 324.
- [224] P. De Santis, S. Morosetti, R. Rizzo, *Macromolecules* **1974**, 7, 52.
- [225] M. R. Ghadiri, J. R. Granja, L. K. Buehler, *Nature* **1994**, 369, 301.
- [226] D. T. Bong, T. D. Clark, J. R. Granja, M. R. Ghadiri, *Angew. Chem.* **2001**, 113, 1016; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 988.
- [227] J. Couet, J. D. J. S. Samuel, A. Kopyshev, S. Santer, M. Biesalski, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 3361; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 3297.
- [228] C. Valery, M. Paternostre, B. Robert, T. Gulik-Krzywicki, T. Narayanan, J. C. Dedieu, G. Keller, M. L. Torres, R. Cherif-Cheikh, P. Calvo, F. Artzner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 10258.
- [229] R. Parker, T. E. Noel, G. J. Brownsey, K. Laos, S. G. Ring, *Biophys. J.* **2005**, 89, 1227.
- [230] E. H. C. Bromley, M. R. H. Krebs, A. M. Donald, *Eur. Phys. J. E* **2006**, 21, 145.
- [231] L. M. C. Sagis, C. Veerman, E. van der Linden, *Langmuir* **2004**, 20, 924.
- [232] G. M. Kavanagh, A. H. Clark, S. B. Ross-Murphy, *Langmuir* **2000**, 16, 9584.
- [233] W. S. Gosal, A. H. Clark, S. B. Ross-Murphy, *Biomacromolecules* **2004**, 5, 2408.
- [234] W. S. Gosal, A. H. Clark, S. B. Ross-Murphy, *Biomacromolecules* **2004**, 5, 2420.
- [235] H. Yan, A. Saiani, J. E. Gough, A. F. Miller, *Biomacromolecules* **2006**, 7, 2776.
- [236] C. Wang, R. J. Stewart, J. Kopecek, *Nature* **1999**, 397, 417.
- [237] J. Kopecek, A. Tang, C. Wang, R. J. Stewart, *Macromol. Symp.* **2001**, 174, 31.
- [238] A. Tang, C. Wang, R. J. Stewart, J. Kopecek, *J. Controlled Release* **2001**, 72, 57.
- [239] C. Wang, J. Kopecek, R. J. Stewart, *Biomacromolecules* **2001**, 2, 912.
- [240] W. A. Petka, J. L. Harden, K. P. McGrath, D. Wirtz, D. A. Tirrell, *Science* **1998**, 281, 389.
- [241] A. P. Nowak, V. Breedveld, L. Pakstis, B. Ozbas, D. J. Pine, D. Pochan, T. J. Deming, *Nature* **2002**, 417, 424.
- [242] D. J. Pochan, L. Pakstis, B. Ozbas, A. P. Nowak, T. J. Deming, *Macromolecules* **2002**, 35, 5358.
- [243] J. P. Schneider, D. J. Pochan, B. Ozbas, K. Rajogopal, L. Pakstis, J. Kretsinger, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 15030.
- [244] B. Ozbas, J. Kretsinger, K. Rajogopal, J. P. Schneider, D. J. Pochan, *Macromolecules* **2004**, 37, 7331.
- [245] D. J. Pochan, J. P. Schneider, J. Kretsinger, B. Ozbas, K. Rajogopal, L. Haines, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 11802.
- [246] L. A. Haines, K. Rajogopal, B. Ozbas, D. A. Salick, D. J. Pochan, J. P. Schneider, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 17025.
- [247] M. J. Pandya, G. M. Spooner, M. Sunde, J. R. Thorpe, A. Rodger, D. N. Woolfson, *Biochemistry* **2000**, 39, 8728.
- [248] C. E. MacPhee, D. N. Woolfson, *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* **2004**, 8, 141.
- [249] D. N. Woolfson, *Adv. Protein Chem.* **2005**, 70, 79.
- [250] M. G. Ryadnov, D. N. Woolfson, *Nat. Mater.* **2003**, 2, 329.
- [251] M. G. Ryadnov, D. N. Woolfson, *Angew. Chem.* **2003**, 115, 3129; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 3021.
- [252] M. G. Ryadnov, D. N. Woolfson, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 12407.
- [253] M. G. Ryadnov, D. N. Woolfson, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 7454.
- [254] B. Ciani, E. G. Hutchinson, R. B. Sessions, D. N. Woolfson, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 10150.
- [255] R. A. Kammerer, D. Kostrewa, J. Zurdo, A. Detken, C. Garcia-Echeverria, J. D. Green, S. A. Muller, B. H. Meier, F. K. Winkler, C. M. Dobson, M. O. Steinmetz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, 101, 4435.
- [256] K. Pagel, S. C. Wagner, K. Samedov, H. von Berlepsch, C. Bottcher, B. Koksch, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 2196.
- [257] M. J. Pandya, E. Cerasoli, A. Joseph, R. G. Stoneman, E. Waite, D. N. Woolfson, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 17016.
- [258] S. Kojima, Y. Kuriki, T. Yoshida, K. Yazaki, K. Miura, *Proc. Jpn. Acad. Ser. B* **1997**, 73, 7.
- [259] S. A. Potekhin, T. N. Melnik, V. Popov, N. F. Lanina, A. A. Vazina, P. Rigler, A. S. Verdini, G. Corradin, A. V. Kajava, *Chem. Biol.* **2001**, 8, 1025.
- [260] N. L. Ogihara, G. Ghirlanda, J. W. Bryson, M. Gingery, W. F. DeGrado, D. Eisenberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, 98, 1404.