

Amyloide: nicht nur pathologische Substanzen, sondern auch geordnete Nanomaterialien**

Izhack Cherny und Ehud Gazit*

Amyloidfibrillen · Biotechnologie · Materialwissenschaften · Nanotechnologie · Selbstorganisation

Amyloidfasern gehören zu den wichtigsten selbstorganisierten Strukturen in der Natur. Zahlreiche Proteine und Peptide mit unterschiedlichen Aminosäuresequenzen bilden unter verschiedenen Bedingungen solche sehr stabilen und hochgradig organisierten Assoziate, die man in Phasenzuständen von Flüssigkristallen bis hin zu starren Nanoröhren findet. Für diese supramolekularen Aggregate sind weit mehr Anwendungen denkbar als für synthetische Polymere, da ihre Bausteine biologische Funktionen und mechanische Eigenschaften in sich vereinen. Hier beschreiben wir die Strukturen supramolekularer Amyloidaggregate sowie die Anwendungen von natürlichen oder künstlichen Sequenzen und deren Perspektiven.

1. Einleitung

1.1. Biophysikalische Eigenschaften

Die Bildung von Amyloidfibrillen stellt für viele Proteine und Polypeptide eine energetisch günstige Alternative zur Bildung gefalteter Monomere dar. Die Proteine und Peptide durchlaufen dabei meist eine Strukturumwandlung von der nativen löslichen Monomerkonformation über eine native ungefaltete Zwischenstufe^[1] zu faserförmigen Aggregaten mit überwiegend β -Faltblattstruktur. Grundsätzlich sind Amyloidfasern Bündel hoch geordneter Filamente aus leiterähnlich angeordneten β -Strängen; diese verlaufen senkrecht zur Faserachse und werden durch Wasserstoffbrücken zusammengehalten^[2,3] (Abbildung 1). Amyloidfasern sind elektronenmikroskopisch an ihrer typischen Morphologie mit etwa 7–10 nm Durchmesser und Längen bis zu einigen Mikrometern erkennbar.^[4] Im Querschnitt erscheinen Amyloide als Hohlzylinder oder Bänder. Bei physikalischen Messungen erwiesen sie sich als ähnlich stark wie Stahl und ähnlich steif wie Seide^[5] (Tabelle 1).

Typische Amyloidfasern bestehen aus mindestens zwei verdrillten Protofilament-Untereinheiten. Diese nehmen im Allgemeinen eine Cross- β -Faltblatt- oder eine β -Helixstruktur ein, deren innere Architektur von dem speziellen Protein und den Versuchsbedingungen abhängt.^[6–8] Protofibrillen aus Protofilamenten, den kleinsten in vitro gefundenen Fibrillen, tauchen in den frühen Stadien der

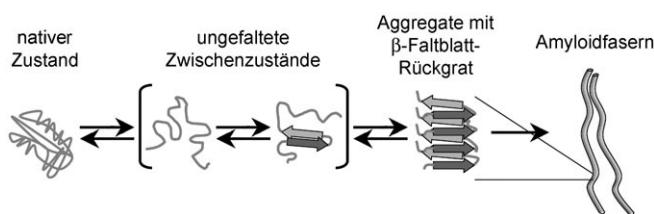


Abbildung 1. Amyloidfibrillen-Bildung: Ein nativ gefaltetes Monomer durchläuft eine Konformationsänderung zu einem β -Faltblatt-reichen Zustand, meist über eine partiell ungefaltete Zwischenstufe. Die Selbstorganisation dieser Zwischenstufen zu Leitern aus β -Strängen führt zu geordneten Filamenten, die sich zu den bekannten Amyloidfibrillen zusammenlagern.

Tabelle 1: Vergleich zwischen den gemessenen mechanischen Eigenschaften von Amyloidfibrillen, Peptidnanoröhren und Spinnenseide.

	Amyloid-fibrillen ^[5, 90]	Phe-Phe-Nanoröhren ^[91]	Spinnenseide ^[92–94]
Steifigkeit [GPa]	–	160×10^{-9}	≤ 30
Bruchfestigkeit [GPa]	0.6 ± 0.4	–	0.9–1
Biegesteifigkeit [Pa]	$(9.1 \pm 1) \times 10^{-26}$	–	–
Schermodul [GPa]	0.28 ± 0.2	–	2.38
Thermische Stabilität [°C]	≥ 130	≥ 150	230
Torsionssteifigkeit [Pa]	$(1.6 \pm 1.1) \times 10^{-26}$	–	–
Elastizitätsmodul [GPa]	3.3 ± 0.4	ca. 19	11–13

[*] Dr. I. Cherny, Prof. E. Gazit

The Department of Molecular Microbiology and Biotechnology
Tel Aviv University, Tel Aviv 69978 (Israel)
Fax: (+ 972) 3-640-5448
E-Mail: ehudg@tauex.tau.ac.il

[**] E.G. wurde von der Israel Science Foundation (ISF) unterstützt.
Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind unter <http://www.angewandte.org> oder vom Autor erhältlich.

Amyloidbildung auf.^[4,9] In vivo entstehen Amyloide extra- und intrazellulär, ein Vorgang, der in vitro leicht reproduziert werden kann.^[10] Außerdem ist die Aggregation zu Amyloidfasern nicht auf Peptide mit bestimmten Kettenlängen, Primär- oder Sekundärstrukturelementen beschränkt, sodass die Bildung β -Faltblatt-reicher Konformationen vermutlich energetisch begünstigt ist.^[11,12]

1.2. Die Rolle von Amyloiden bei Erkrankungen

Die Ablagerung von Amyloidfasern in verschiedenen Geweben und Organen ist ein Kennzeichen für eine Reihe von Erkrankungen,^[7,13] beispielsweise der Alzheimer- und der Parkinson-Krankheit, Chorea Huntington, Typ-II-Diabetes und Prionkrankheiten. Es ist inzwischen allgemein anerkannt, dass unlösliche Proteinablagerungen in Form von Amyloiden in bestimmten Geweben und Organen mit den jeweiligen Krankheiten korrelieren. Allerdings entdeckte man erst in den vergangenen zehn Jahren, dass die präfibrillären Assoziate für den Zelltod in den infizierten Geweben verantwortlich sein könnten.^[14-22] Diese toxischen Oligomere haben ring-, tunnel- oder torusförmige Strukturen. Ihre Konformation und der Oligomerisierungsgrad werden allerdings, ebenso wie der exakte Mechanismus der Zellschädigung, noch diskutiert.

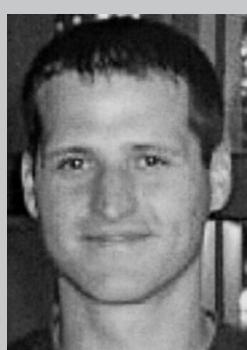
1.3. Amyloide als selbstorganisierte Nanostrukturen

Der Bildungsmechanismus von Amyloidfibrillen ist zwar noch nicht vollständig verstanden, er ähnelt aber den Prozessen der Kristallisation und Gelbildung (Abbildung 1).^[7,23] Zunächst entstehen kleine Oligomere, die als Keime für die Fibrillenbildung wirken.^[11,23] Die Amyloidfasern ähneln viel mehr synthetischen Polymeren als globulären Proteinen: Viele amyloidbildende Sequenzen behalten ihre Neigung zur Selbstorganisation auch, wenn Aminosäuren ersetzt werden oder die Sequenz verkürzt, verlängert oder modifiziert wird. Manchmal resultieren diese Eingriffe in einer veränderten β -Faltblattstruktur oder Fasermorphologie.^[24,25]

In vielen Studien wurde versucht, die Sequenzen der amyloidbildenden Motive aufzuklären, um Einblicke in den

Selbstorganisationsmechanismus und die wesentlichen Eigenschaften der Amyloide zu gewinnen.^[26,27] Daher kann man inzwischen Nanostrukturen nach dem Vorbild natürlicher Amyloid-Erkennungsmotive für verschiedene Anwendungen de novo entwickeln. Die Stabilität von Amyloidstrukturen beruht im Allgemeinen auf nichtkovalenten Bindungen – vor allem Wasserstoffbrücken, hydrophoben Wechselwirkungen und π - π -Stapelwechselwirkungen –, die sowohl zwischen den Seitenketten als auch innerhalb des Peptidrückgrats gebildet werden. Die Bedeutung hydrophober Wechselwirkungen bei der Bildung der Amyloidfibrillen ist ziemlich offensichtlich, da vorrangig ein intermolekularer Prozess zu den unlöslichen Proteinaggregaten führt. Die geordnete Ultrastruktur der Amyloide weist jedoch darauf hin, dass nicht etwa unspezifische hydrophobe Wechselwirkungen, sondern spezifische Muster molekularer Wechselwirkungen die entscheidende Rolle bei der Aggregation spielen. Das gehäufte Auftreten aromatischer Reste in kurzen amyloidähnlichen Peptiden deutet an, dass π -Stapelwechselwirkungen die Selbstorganisation zu Amyloidfibrillen beschleunigen.^[28,29] Wahrscheinlich entstehen durch diese Stapelwechselwirkungen geometrische Einschränkungen, die die wachsenden Fibrillen ausrichten. Dazu kommt der Energiegewinn durch die Stapelwechselwirkungen. So konnten Kim und Hecht^[30] nachweisen, dass die Substitution der Phenylalaninreste im C-Terminus von A β (1-42) durch hydrophobe Reste die Aggregation etwas verlangsamt. Umgekehrt zeigte eine Mutante mit vier Phenylalaninresten im gleichen Sequenzabschnitt eine schnellere Amyloidbildung. Mithilfe von hochauflösenden Festkörper-NMR-spektroskopischen und Röntgenstruktur-Analysen der Amyloidfasern ließ sich der Beitrag aromatischer Aminosäuren bei der Fibrillenbildung zeigen.^[31,32] Die Befunde sprechen für eine Stapelung der aromatischen Ringe benachbarter β -Faltblatt-Bereiche. Ein entscheidender Hinweis auf die Beteiligung solcher Wechselwirkungen bei der Fibrillenbildung ist die spontane Selbstorganisation des Phenylalanin-Dipeptids, eines wichtigen Strukturmotivs des A β -Peptids (Phe 19-Phe 20), zu langen und starren Nanoröhren.^[33-35]

Die Bedeutung von Wasserstoffbrücken lässt sich am besten anhand der Fähigkeit glutamin- und asparaginreicher Proteine zur Amyloidbildung zeigen. Ausgedehnte Glutamin- (oder Asparagin-)Wiederholungssequenzen wurden mit



Izhack Cherny studierte Biologie an der Universität Tel Aviv und promovierte dort 2006 bei Prof. Ehud Gazit am Department of Molecular Microbiology and Biotechnology. Sein Forschungsinteresse gilt in der Natur auftretenden nichtnativen Proteinstrukturen wie Curli-Amyloidfasern und nativ ungefalteten Proteinen. Gegenwärtig arbeitet er als Postdoktorand in der Arbeitsgruppe von Prof. Michael Hecht an der Princeton University, New Jersey.



Ehud Gazit studierte an der Universität Tel Aviv und promovierte 1997 am Weizmann Institute of Science bei Prof. Yechiel Tsai. Bis 2000 war er Postdoktorand am Massachusetts Institute of Technology (MIT) bei Prof. Robert T. Sauer, dem er noch als Gastwissenschaftler verbunden ist. Er ist Professor am Department of Molecular Microbiology and Biotechnology der Universität Tel Aviv und gehört Leitungsgremien des Center for Nanoscience and Nanotechnology der Universität und des Strategic Research Program des Nano2Life Network of Excellence der EU an. Außerdem ist er Berater des European Observatory of Nanobiotechnology und Sachverständiger für den Bereich NanoBiology von Science At Stake.

Amyloiderkrankungen wie Chorea Huntington und spinocerebraler Ataxie sowie mit der Aggregation von Hefeproteinen in Prionen (z. B. Sup35 und Ure2) in Verbindung gebracht. Vermutlich wirken diese Glutaminbereiche als polare „Reißverschlüsse“, die die Moleküle während der Bildung von Amyloidfibrillen aneinanderbinden.^[36] Interessanterweise sind die Röntgenbeugungsmuster von Fasern des Polyglutaminpeptids D₂Q₁₅K₂ und des Exon-1-Peptids von Huntingtin, das 51 Glutaminwiederholungen enthält, identisch; wahrscheinlich bilden die Wasserstoffbrücken-, „Reißverschlüsse“ eine dicht gepackte, starre β -Faltblattstruktur.^[37] Außerdem vermuteten Perutz et al., dass polyglutamin- oder glutamin-/asparaginreiche Peptide eher wassergefüllte β -helicale Nanoröhren als Cross- β -Strukturen einnehmen.^[38] Sikorski und Atkins^[37] stellten diesem Modell die Vermutung entgegen, dass die D₂Q₁₅K₂-Moleküle stabile β -Faltblattbereiche mit Haarnadelkonformation bilden, die sich senkrecht zu den Wasserstoffbrücken anordnen. Sharma et al.^[39] postulierten, dass Glutamin-Homopolymere bevorzugt antiparallele Plattenstrukturen bilden, wobei die Zahl der Umkehrungen von der Länge der Polyglutamin-Sequenz abhängt.

Zahlreiche amyloidbildende Motive sind durch ihre Selbstorganisationseigenschaften und ihre Polymorphie („Plastizität“, siehe z. B. Lit. [8, 9, 40]) als natürliche Bausteine für die Entwicklung von Nanostrukturen und -materialien interessant. In einer aktuellen Übersicht weisen Wetzel et al.^[40] ausdrücklich auf die Parallelen zwischen Amyloiden und synthetischen Polymeren und Kunststoffen hin. Die wichtigsten Ähnlichkeiten sind: 1) Amyloid- und Polymeruntereinheiten behalten ihre Fähigkeit zur Selbstorganisation auch nach größeren chemischen Modifizierungen; 2) beide Formen haben ähnliche Isomorphien bei unterschiedlichen Monomeren; 3) beide Monomere zeigen Polymorphien – sowohl in der nativen als auch in der Polymerstruktur; 4) in beiden Fällen sind die Untereinheiten im kondensierten Zustand über nichtkovalente Wechselwirkungen verbunden; 5) beide können unter bestimmten Bedingungen als Gele und Flüssigkristalle vorliegen. Der wichtigste Unterschied ist, dass Amyloidproteine ungewöhnlich spezifische und komplexe Sequenzen aufweisen, die die Einführung zusätzlicher Funktionen wie katalytisch aktiver Zentren oder Bindungsstellen ermöglicht, während die Kupplung hochmolekularer funktioneller Elemente an synthetische Monomere die Polymerisation verhindern oder die Kristallinität im kondensierten Zustand verringern kann. Außerdem verläuft die erneute Selbstorganisation zu Amyloidstrukturen nach der Depolymerisation (z. B. durch Ultraschallbehandlung) spontan und ohne erneute Zugabe von Katalysatoren wie bei synthetischen Polymeren.

2. Amyloide als Bionanomaterialien

2.1. Natürliche Amyloide

Im Amyloidzustand verfügen viele Proteine über eine außergewöhnliche Stabilität, mechanische Stärke und erhöhte Widerstandsfähigkeit; ihre Schmelztemperaturen sind hoch, und sie sind beständiger gegen Natriumdodecylsulfat

(SDS). Stark amyloidbildende Proteine und vor allem Peptide sind außerdem zur schnellen Selbstorganisation fähig. Vermutlich wegen dieser Eigenschaften nutzen verschiedene Mikroorganismen die Sequenzmotive der Amyloidstrukturen für extrazelluläre Biomaterialien mit wichtigen physiologischen Funktionen. Die folgenden Beispiele demonstrieren, wie völlig verschiedene Proteinsysteme, die in Bakterien, Pilzen und Säugern entwickelt wurden, im Verlauf der Evolution zu Materialien gleicher Ultrastruktur konvergierten, die nun verschiedene – manchmal aber auch identische – Funktionen ausführen.

2.1.1. Amyloide und Biofilme

Einen ersten Hinweis auf die physiologische Funktion natürlicher Amyloide lieferte die Entdeckung der Curli-Fimbrien (Abbildung 2). Curli-Fimbrien sind die Protein-Komponente der extrazellulären Matrix, die die Biofilmbildung bei vielen Enterobakterien erleichtert. Sie haben die

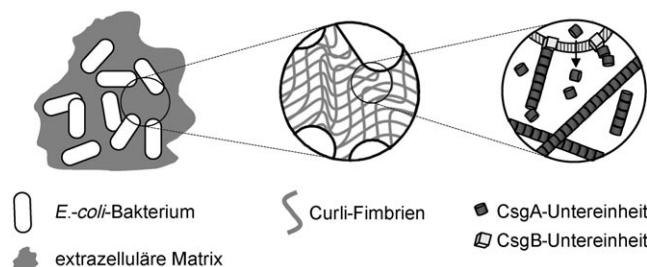


Abbildung 2. Die amyloidale Curli-Komponente der bakteriellen extrazellulären Matrix (schematisch): Die Bildung eines Bakterienfilms (links) wird durch ein Geflecht aus Curli-Fasern erleichtert (Mitte). CsgA, die großen Curli-Untereinheiten, werden von den Bakterien sezerniert und lagern sich extrazellulär zu Amyloidfasern zusammen (rechts). Grundsätzlich wird die Zusammenlagerung der Fasern von einem „Nucleatorprotein“ CsgB ausgelöst, das in der Bakterienmembran verankert ist.

physikalischen und Färbeeigenschaften von eukaryotischen Amyloiden.^[41–43] Die zentrale Amyloiddomäne von Curli-Proteinen umfasst fünf wiederholte Einheiten aus je 19–23 Aminosäuren, die vermutlich eine Strang-Schleife-Strang-Konformation einnehmen und ein kompaktes Knäuel paralleler β -Helixstrukturen bilden.^[44, 45] Jede Einheit enthält konservierte Glutamin-, Asparagin-, Serin- und aromatische Reste, die vermutlich die β -Helixstruktur stabilisieren.^[43, 46] Das wichtigste Curli-Protein, CsgA, löst nach der Sekretion durch das membrangebundene „Nucleatorprotein“ CsgB den extrazellulären Selbstorganisationsprozess aus. Dadurch bilden die Curli-Fimbrien eine Schutzschicht auf der Oberfläche von Bakterien, verleihen diesen biotische oder abiotische Oberflächenadhäsions- oder Invasionsfähigkeiten, Resistenz gegen antimikrobielle Substanzen sowie pathogene Eigenschaften.^[47, 48] Außerdem sind Curli-Fimbrien resistent gegen Proteaseverdau, Harnstoff, Erhitzen und Behandlung mit 1 % SDS.^[49] Es wurde auch nachgewiesen, dass die Bildung der Curli-Fimbrien entscheidend für den Aufbau des Biofilms ist.^[50]

Curli-Fimbrien sind ein faszinierendes Biomaterial. Abgesehen von der Schutzfunktion für Bakterien können sie eine Reihe weiterer Aufgaben erfüllen, die sich aus der Aminosäuresequenz ergeben. Dazu gehören die Bindung an abiotische und biotische Oberflächen, die Zellinternalisierung und die gerichtete Assoziation ausgehend von einem spezifischen Nucleatorprotein. Solche Eigenschaften können für nanotechnologische Anwendungen interessant sein.

2.1.2. Amyloide und Hyphen

Eine Klasse funktioneller amyloidbildender Proteine wurde auf der Oberfläche von Fadenpilzen (Hyphomyceten) und Bakterien identifiziert: Hydrophobine der Klasse I bei Pilzen und Chapline bei Gram-positiven Streptomyzeten.^[51,52] Obwohl keine evolutionäre Verwandtschaftsbeziehung besteht, haben diese Proteine die gleiche Funktion – sie unterstützen sich verzweigende Hyphen (die Fäden, aus denen der Körper oder das Mycel eines Pilzes besteht und die sich gewöhnlich zu Fruchtkörpern weiterentwickeln) beim Überwinden der Hydrophob-hydrophil-Grenzfläche zwischen Wasser und Luft. Die ca. 100 bzw. 50 Aminosäurereste langen Proteine werden an der Luft-Wasser-Grenzfläche sezerniert und bilden dort eine amphipathische Membranmonoschicht.^[51,52] Als Folge wird die Oberflächenspannung des Wassers spürbar verringert, und die Hyphen können in die Luft vordringen. Die Oberfläche der Sporen ist mit einer ähnlichen amphipathischen Schicht bedeckt, sodass diese leichter durch den Wind verbreitet werden können^[53] und besser an abiotischen und biotischen Oberflächen haften.^[51,52] Hydrophobine lagern sich an Öl-Wasser-Grenzflächen oder festen Oberflächen (wie Teflon) an und verändern so deren physikalische Eigenschaften. Außerdem sind die Fasern resistent gegen eine Behandlung mit 2% SDS, Erhitzen und Proteolyse.^[53]

Die Aminosäurezusammensetzung verschiedener Hydrophobine unterscheidet sich beträchtlich: Nur acht konservierte Cysteinreste, die eine schachtförmig gefaltete β -Fass-Struktur stabilisieren, bleiben unverändert.^[54] Anders als Hydrophobine polymerisieren Chapline in wässrigen Lösungen in Gegenwart von Amyloidkeimen, ohne dass es einer Hydrophob-hydrophil-Grenzfläche bedarf.^[51] Alle Chapline enthalten eine hydrophobe Region und drei konservierte Glycin-Asparagin-Wiederholungen.^[55,56]

Hydrophobine und Chapline sind aussichtsreich für biotechnologische Anwendungen. Als amphipathische Moleküle eignen sie sich sehr gut für die Beschichtung fester und flüssiger Oberflächen und zur Veränderung der physikalischen Eigenschaften der Oberfläche (hydrophil/hydrophob). Außerdem lassen sich die Oberflächen so bioverträglich modifizieren und mit einem selbstorganisierten Gerüst für Zellkultur und Gewebezucht versehen. Die große Variationsbreite natürlicher Hydrophobine bietet ein reiches Angebot an Biomaterialien mit spezifischen Eigenschaften.

2.1.3. Amyloide und Melaninbiosynthese

Melaninpigmente werden in den Melanosomen von Säuger-Melanocyten und den Epithelzellen der Retina synthetisiert und gespeichert. Melanin entsteht durch die Polymerisation von reaktiven Indolchinonen, die aus Tyrosin erzeugt werden. Die Reifung von Melanosomen erfordert die Synthese des Transmembranglycoproteins Pme117. Nach seiner Abspaltung lagert sich das dem Lumen zugewandte Fragment von Pme117 (ca. 80 kDa) schnell zu Amyloidfasern innerhalb des Melanosoms zusammen.^[57,58] Diese Fibrillenbildung von Pme117 beschleunigt die Biosynthese von Melanin, da die Fibrillen als Matrize für die Polymerisation der reaktiven Melaninvorstufen dienen.^[57,58] Interessanterweise sind auch die Amyloidstrukturen anderer Proteine in der Lage, die Melaninpolymerisation in vitro zu beschleunigen; dies lässt darauf schließen, dass die Funktion des Pme117-Gerüsts in der Ultrastruktur selbst codiert ist, möglicherweise, indem sie die effektive Indolchinon-Konzentration erhöht und die Verbindungen entlang der Faser orientiert.^[58,59] Die Polymerisation von rekombinantem Pme117, die um vier Größenordnungen schneller abläuft als bei A β oder α -Synuclein, wurde während der Evolution möglicherweise optimiert, um die Bildung toxischer Intermediate zu vermeiden.^[58]

Pme117-Fasern haben mehrere besondere Vorteile in Hinblick auf die Herstellung neuer Bionanomaterialien: 1) Die Moleküle bleiben in Lösung, bis ein externer Auslöser (eine Protease) den Aggregationsvorgang startet; 2) die Polymerisation verläuft hoch effizient; 3) die Funktion wird erst nach der Polymerisation ausgeübt. Aufgrund dieser bemerkenswerten Eigenschaften könnte Pme117 für verschiedene technische Anwendungen als Gerüst dienen.

2.1.4. Amyloide und Eihüllen

Amyloidfasern kommen als Schutzmaterial in den Eihüllen von Insekten und Fischen vor.^[60,61] Die Hülle schützt die Eier vor Temperaturänderungen, mechanischem Druck, Proteasen, dem Eindringen von Bakterien und Viren und vor Dehydrierung. Hauptbestandteil der Eihülle ist Chorion, das sezerniert wird und sich zur extrazellulären Chorionschicht zusammenlagert. Den zahlreichen bekannten Chorionproteinen ist offenbar eine konservierte zentrale amyloidbildende Domäne aus ca. 50 Aminosäuren gemeinsam, die aus repetitiven Hexapeptiden aus Glycin und hydrophoben Aminosäuren (meist Valin) besteht.^[60,61] Vermutlich handelt es sich bei diesem wiederkehrenden Tandem-Hexapeptid um das amyloidbildende Motiv der Chorionproteine.^[62] Chorion ist ein typisches Beispiel für die Kombination von Selbstorganisation und Kapselbildung in einem Biopolymer. Die Integration von Choriondomänen in Biopolymere könnte deren physikalische Widerstandsfähigkeit erhöhen.

2.2. Amyloide und Seide im Vergleich

Seide, eines der am meisten untersuchten Biomaterialien, wird für viele Zwecke verwendet: von Textilwaren bis hin zu medizinischen Anwendungen.^[63] Die außergewöhnlichen mechanischen Eigenschaften von Spinnen- und Insektenseide werden von synthetischen Fasern nicht erreicht (Tabelle 1). Seidenproteine sind als hoch konzentrierte Lösungen in den Spinndrüsen gespeichert und wandeln sich bei der Sekretion

in Seide um. Jede Seidenart hat eine andere Aminosäurezusammensetzung und weist mechanische Eigenschaften auf, die an die jeweilige Funktion angepasst sind.^[63] Typisch für Spinnenseidenproteine ist ein hochrepetitives Primärsequenzmotiv mit einem großen Anteil an Glycin, Alanin und Prolin. Die hydrophoben Stellen bilden wahrscheinlich β -Faltblattstrukturen und kristallähnliche Partikel, die die Faser verstärken, während die Glycinreste 3_{10} -Helices und β -Schleifen bilden, die Elastizität verleihen; insgesamt erhält man eine flüssigkristalline Phase.^[63-65] Interessanterweise hat Spinnenseide einige Strukturmerkmale mit Amyloidfibrillen gemeinsam:^[64,66] 1) Repetitive Primärsequenzen kommen oft bei amyloidbildenden Proteinen vor; sie legen deren Strukturen fest, ohne spezifische Erkennungs- oder Katalyse-eigenschaften zu vermitteln; 2) ein (irreversibler) Übergang von einem teilweise (oder überwiegend) nichtstrukturierten Zustand in ein stabiles β -Faltblatt findet in beiden Fällen statt; 3) der β -Faltblatt-reiche Zustand von Seide entspricht demjenigen vieler anderer Amyloidfibrillen mit Durchmessern von 10 nm; 4) rekombinante Spinnenseidenproteine organisieren sich in Lösung zu morphologisch ähnlichen Fibrillenstrukturen, aber – wie bei amyloidbildenden Sequenzen – wurde unter bestimmten Bedingungen auch die Bildung von Kugelchen beobachtet; 5) Spinnenseidenfibrillen binden Kongorot und ThT-Amyloid-spezifische Farbstoffe; 6) ein Vergleich der Sekundärstrukturen von Spinnenseide und Prionenfibrillen spricht für einen sehr ähnlichen β -Strukturgehalt; die Amyloidfibrillen enthalten aber nicht immer 3_{10} -Helix- oder Zufallsknäuel-Konformationen; 7) die Röntgenbeugungsmuster von Spinnenseide und Amyloidfibrillen lassen ein vergleichbares Cross- β -Muster erwarten, in dem die β -Faltblattelemente parallel zur Faserachse durch Wasserstoffbrücken gebunden sind, aber die Packungsdichte zwischen den Faltblattbereichen (5.3 Å) ist deutlich größer. Alles in allem könnten Amyloide und Seidenfäden zu Unterklassen mit einer gemeinsamen Grundstruktur gehören.

Die beschriebenen Beispiele zeigen anschaulich, wie die Natur die bemerkenswerten physikalischen Eigenschaften der Amyloide für ihre Zwecke nutzt. Aktuelle technische Anwendungen von Amyloidfibrillen schöpfen nur einen Bruchteil des großen Potenzial dieses Biomaterials aus.

3. Amyloide in den Materialwissenschaften

Eine Reihe technologischer Anwendungen soll mithilfe von Amyloidfasern als Materialien erschlossen werden. Amyloide sind aussichtsreiche Kandidaten für die Herstellung molekularer Nanobiomaterialien (z. B. Drähte, Schichten, Gele, Gerüste, Matrizen und Flüssigkristalle) nach einer „Bottom-up“-Strategie. Dies liegt an ihrer Größe und der effizienten Organisation zu einer definierten Ultrastruktur, der einfachen Produktion und den niedrigen Kosten. Die Bausteine lassen sich mit einfachen molekularbiologischen Techniken in weiten Grenzen variieren.

3.1. Amyloidproteine als funktionelle Matrizen

In verschiedenen Untersuchungen wurden Amyloide als funktionelle Matrizen eingesetzt (Abbildung 3). Lindquist et al.^[67] gelang die Herstellung von leitfähigen Nanodrähten

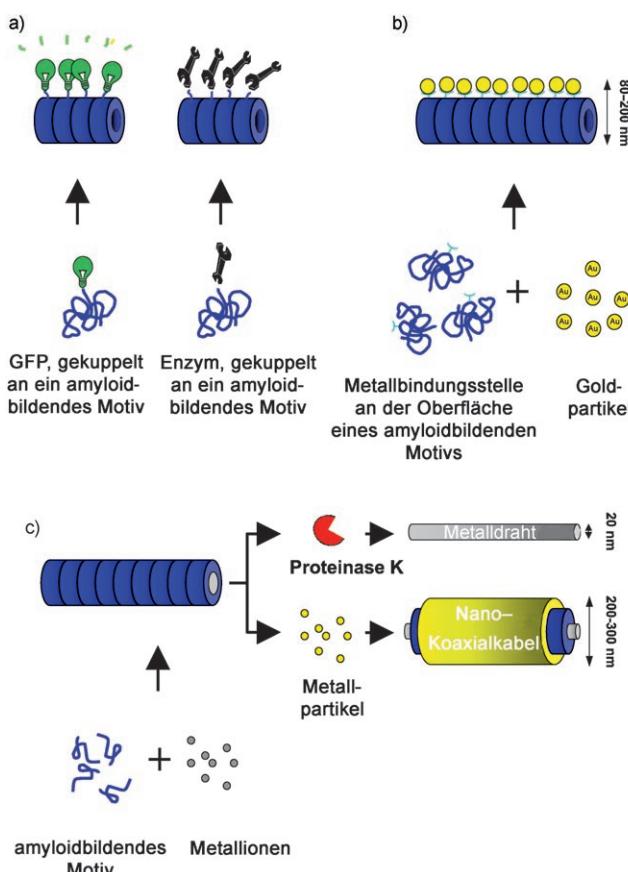


Abbildung 3. Amyloide als funktionelle Matrizen. a) Die Konjugation funktioneller Proteine an amyloidbildende Motive kann zur Bildung funktioneller Fasern führen, in denen die Aktivität des konjugierten Proteins erhalten bleibt. b) Die Modifikation der amyloidbildenden Sequenz mit einer Bindestelle, die an der Oberfläche der gebildeten Faser präsentiert wird, kann diese mit neuen Funktionen ausstatten. (Im Beispiel: Nach außen gerichtete Cysteinreste binden Goldpartikel und bilden so leitende Amyloidfibrillen.) c) Amyloidbildende Motive, die Nanoröhren bilden, können als „Gussformen“ für die Herstellung von Drähten im Faserinneren dienen. Nach dem (proteolytischen) Abbau der Faser bleibt ein Nanodraht zurück, während das Abscheiden eines Metalls auf der aktivierten Oberfläche der Faser ein Nano-Koaxialkabel ergibt.

mit Amyloidfibrillen als Matrizen (Abbildung 3b). Das amyloidbildende Protein NM Sup35 (die N-terminale und mittlere Region des Hefepriions Sup35), das für seine chemische, thermische und Proteolysestabilität im fibrillären Zustand bekannt ist, wurde genetisch mit einem Cysteinrest an der Oberfläche versehen. Nach der Amyloidbildung wurden kolloidale Goldpartikel über diese Cysteinreste hoch spezifisch und kovalent an die Fibrillen gebunden und anschließend durch Metallisierung mit Silberionen verstärkt. Die Leitfähigkeit der beschichteten Fibrillen mit einem

Durchmesser von 80–200 nm war mit derjenigen durchgängiger Drähte vergleichbar.

Perutz et al. hatten vermutet, dass Amyloide wassergefüllte Nanoröhren bilden,^[38] die zur Herstellung von Nanodrähten genutzt werden könnten (Abbildung 3c). Lu et al.^[68] zeigten, dass das Heptapeptidfragment KLVFFAE des β -Amyloid-Polypeptids sich unter bestimmten Bedingungen zu solchen Röhrenstrukturen zusammenlagert. Nanoröhren können auch von einem kleineren Fragment des zentralen Erkennungsmotivs des β -Amyloids gebildet werden. Nanoröhren aus Di(phenylalanin) (FF) wurden zuerst als Matrizen für eine Metallbeschichtung verwendet.^[33] Indem man Silberionen ins Lumen der Nanoröhren diffundieren ließ und das Proteingerüst anschließend enzymatisch abbaute, erhielt man Silberdrähte von 20 nm Durchmesser. In einer anderen Studie wurden solche Dipeptid-Nanoröhren eingesetzt, um Platin nanopartikel zusammenzulagern.^[69] Die Beschichtung von silbergefüllten Peptidnanoröhren mit Gold ergab ein Nano-Koaxialkabel mit drei Schichten (Metall-Peptid-Metall).^[70] Vor kurzem wurden die FF-Nanoröhren auch chemisch mit Biotinresten konjugiert und für weitere Anwendungen selektiv mit avidinmarkierten Molekülen beladen.^[71]

Amyloidfibrillen haben auch das Potenzial zur Biofunktionalisierung (Abbildung 3a). Da Amyloidsequenzen chemisch modifiziert werden können, lassen sich funktionelle Proteine gut an amyloidbildende Sequenzen kuppeln, um diese mit einer gewünschten Funktion zu versehen. So verknüpften Baxa et al.^[72] das bakterielle Barnase-Protein und Enzyme wie Carboanhydrase und Glutathion-S-Transferase mit dem C-Terminus der Ure2-Prionmonomere aus Hefe und zeigten, dass sie ihre native Struktur auch nach der Amyloidbildung durch Ure2 behielten. Baldwin et al.^[73] kuppelten ein funktionelles Cytochrom b effizient an eine Amyloidfibrille. Sie erhielten hochdichte Netze von Häm molekülen auf der Oberfläche der Amyloidfibrillen. Mit diesen Systemen versuchten sie, die natürliche Elektronenübertragung über weite Strecken nachzuahmen.

3.2. Gele und Flüssigkristalle auf Amyloidbasis

Viele synthetische und natürliche Polymere können Gele und/oder Flüssigkristallphasen bilden. Flüssigkristallphasen wurden auch bei amyloidbildenden Proteinen nachgewiesen (Abbildung 4). Corrigan et al.^[74] zeigten, dass Hühnerlysozym, das bei niedrigem pH und erhöhter Temperatur effizient Amyloidfibrillen bildet, in Flüssigkristallphasen aus einem Netzwerk von Lysozymfibrillen übergehen kann. Das Gel bestand aus einer großen Zahl von Flüssigkristalldomänen. Diese bildeten eine glasige Flüssigkristallphase, weil sich die zahlreichen Fibrillen nicht über eine große Entfernung parallel anordnen können. Insgesamt nahm die Bildung von Flüssigkristallphasen aus Hühnerlysozym mit steigender Konzentration, Länge und Ladung (pH-Abhängigkeit) der Fibrillen zu, die Ionenstärke hatte dagegen kaum einen Einfluss. Aggeli et al.^[75] charakterisierten die Gelereigenschaften des Lys β -21-Peptids (d.h. des Fragments 41–61, das die β -Domäne des Hühnerlysozyms umfasst). Sie fanden heraus, dass man Lys β -21-Gele durch Anheben des pH-Werts in eine

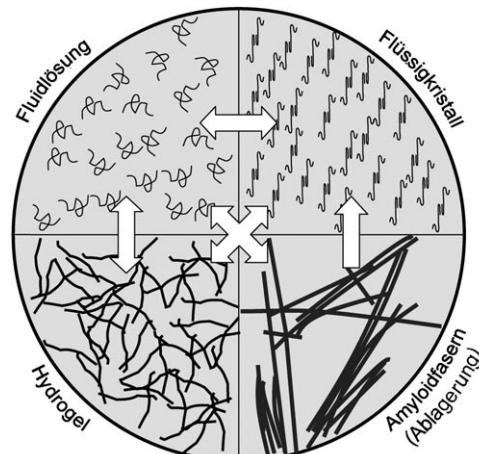


Abbildung 4. Ultrastruktur von Phasen, die von amyloidbildenden Sequenzen gebildet werden können: Das Schema zeigt die allgemeine Anordnung von löslichen Monomeren (oben links) und ausgerichteten Fasern oder Fibrillen in möglichen Phasen. Beschriftete Phasenübergänge sind durch Pfeile angedeutet.

Newton'sche Flüssigkeit umwandeln kann. Sie versuchten außerdem, mithilfe des pH-Werts die Selbstorganisation (und Auflösung) von Peptid- β -Faltblattbereichen zu Bändern, Fibrillen und Fasern auszulösen,^[76] und zeigten so die kontrollierte Polymerisation von monomeren Peptiden, die von isotropen Flüssigkeiten bis zu nematischen Gelphasen führt. Diese Eigenschaft lässt sich nutzen, um selbstorganisierende Polymere mit bestimmbarer mechanischen Eigenschaften und diversen, nanostrukturierten und biokompatiblen Materialien mit den Charakteristika harter und weicher Materie zu entwerfen.

Vor einigen Jahren wurde auch Hydrogele aus sehr kurzen Peptidkonjugat-Bausteinen beschrieben. Die Arbeitsgruppe um Xu berichtete über die Polymerisation verschiedener 9-Fluorenylmethoxycarbonyl(Fmoc)-Dipeptide und Naphthalin(Nap)-Phe-Phe-Konjugate zu biokompatiblen Hydrogele.^[77,78] Die Peptidkonjugate bauten Nanofasern auf, die sich zu Hydrogele mit einem Netz von π - π -Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken zusammenlagerten. Auch das Fmoc-Derivat des Diphenylalanin-Kernmotivs des β -Amyloids bildet ein starres Hydrogel aus einem Fasernetzwerk; die Fibrillen haben einen Durchmesser zwischen 10 und 100 nm.^[79] Dieses Hydrogel erwies sich über einen weiten Temperatur- und pH-Bereich (auch unter extrem sauren Bedingungen) sowie in Gegenwart von Harnstoff und Guanidiniumhydrochlorid als bemerkenswert stabil. Im Vergleich zu anderen Peptidhydrogele ist das Fmoc-Diphenylalanin-Hydrogel auffällig stark und starr, sodass es sich für verschiedene Anwendungen nutzen lassen sollte. Beispielsweise war die so hergestellte feste biokompatible Masse ebenso zur Verkapselung und kontrollierten Freisetzung von Wirkstoffen geeignet wie als Unterlage für Zellkulturen. Daneben wurden auch die Gelierungseigenschaften einiger weiterer Fmoc-Dipeptide aus Kombinationen von Glycin, Alanin, Leucin und Phenylalanin untersucht.^[80] Fast alle Fmoc-Dipeptide bildeten spontan faserige Hydrogele, einige davon (darunter auch Fmoc-Diphenylalanin) bei physiologischem pH-Wert. Die

Aminosäurezusammensetzung bestimmte dabei die physikalischen Eigenschaften des Gels. Manche Gele unterstützten darüber hinaus ein zwei- und dreidimensionales Zellkulturwachstum.

3.3. De-novo-Entwicklung amphiphiler β -Faltblatt-reicher Sequenzen

Der Einsatz gezielt entwickelter β -Faltblattpeptide mit amyloidähnlichen Eigenschaften eröffnet viele Möglichkeiten für die Biomaterialwissenschaften. Die Gesamtheit aller Daten über den Einfluss der Aminosäuren auf die Amyloidbildung von Proteinen ermöglicht es, amyloidähnliche Sequenzen de novo zu entwerfen. Aus einem einfachen alternierenden Muster von polaren und unpolaren Aminosäureresten entwickelten und isolierten Hecht et al.^[81] Sequenzen mit amphiphiler β -Struktur, die sich spontan zu amyloidähnlichen Fibrillen zusammenlagern. Sie wendeten diese Biomaterialien in selbstorganisierten Monoschichten und für die matrizengesteuerte Beschichtung an. Die Proteine organisierten sich an der Luft-Wasser-Grenzfläche zu β -Faltblatt-Monoschichten, und bei der Abscheidung auf der Oberfläche von hochgeordnetem pyrolytischem Graphit bildeten sie Fasern, die sich am Gitter der Graphitoberfläche ausrichteten.

In einer anderen Untersuchung wurden kurze amphiphile β -Faltblattpeptide entworfen (7–17 Aminosäuren, abwechselnd mit hydrophilen und hydrophoben Resten), die sich effizient an der Luft-Wasser-Grenzfläche zu einer kristallinen zweidimensionalen β -Faltblattschicht anordnen.^[82] Als unpolare Reste wurden hauptsächlich Phenylalaninreste eingesetzt, und an den Enden sorgten Prolinreste dafür, dass sich keine lateralen Wasserstoffbrücken ausbilden konnten. Dadurch waren regelmäßige intermolekulare Wechselwirkungen nur zwischen benachbarten β -Faltblattbändern möglich. Als Folge zeigte die so gebildete Schicht eine außergewöhnliche Elastizität in einer Raumrichtung.^[83] Eine der vielen Anwendungsmöglichkeiten solcher nanometergroßer Gerüste wurde kürzlich von Cavalli et al. anhand der Bildung einer geordneten β -Faltblatt-Lipopeptidmonoschicht demonstriert,^[84] die als Matrize für die Biomineralisation von Calciumcarbonat diente.^[85]

Schneider et al.^[86] entwickelten amphiphile Sequenzen aus 20 Aminosäureresten, die sich in wässriger Lösung zu β -Haarnadelschleifen falten und sich weiter in ein Fasernetzwerk anordnen, sodass ein Hydrogel entsteht. Nach einer leichten Modifizierung der Peptidprimärsequenzen konnte der Prozess durch Änderungen von pH-Wert, Ionenstärke oder Temperatur sowie durch UV-Bestrahlung eingeleitet und reversibel gesteuert werden.^[87] Ein solches Design lässt sich wahrscheinlich für die Herstellung vorhersagbar reagierender Materialien verwenden.

Zhang und Mitarbeiter entwarfen auch künstliche amphiphile Peptide aus Modulen mit abwechselnd polaren und unpolaren Segmenten als Gerüste für Zellkulturen.^[88] Die Peptide, die chemisch für die verschiedenen Zwecke synthetisiert worden waren, bilden in wässriger Lösung ca. 10 nm dicke geordnete Fibrillen und dann ein poröses Hydrogelmaterial mit extrem hohem Wassergehalt über 99 %. Aus

diesem Grund waren die Peptidgerüste eine geeignete Wachstumsunterlage für neue Zellen in dreidimensionaler Zellkultur, kontrollierter Zelldifferenzierung, „Tissue-Engineering“ und regenerativer Medizin.^[88,89]

4. Zusammenfassung und Ausblick

Die biologische Bedeutung von Amyloiden wird in naher Zukunft wahrscheinlich durch die Entdeckung weiterer natürlicher Amyloidstrukturen unterstrichen werden. Amyloidfibrillen haben darüber hinaus auch zahlreiche Eigenschaften, die für die Konstruktion funktioneller Materialien sehr vielversprechend sind.

Eines der Hauptziele der Nanomaterialforschung ist die Entwicklung industriell produzierbarer Polymere, die über vorteilhafte makroskopische Struktureigenschaften verfügen und dabei aus Nanopartikeln mit den gewünschten Funktionen bestehen. Protein- und Peptidamyloide erfüllen diese Voraussetzungen auf einzigartige Weise. Sie können einerseits biologische Funktionen durch kovalente Verknüpfung oder direkte Aufprägung integrieren, und andererseits auch verschiedenartige Strukturen einnehmen: angefangen von isotropen Flüssigkeiten über Flüssigkristall- und Gelphasen bis hin zu festen Gerüststrukturen.

In den kommenden Jahren werden sicherlich weitere Anwendungen mit natürlichen oder gezielt entworfenen amyloidbildenden Biomolekülen intensiv untersucht werden. Dabei werden wohl vor allem die Bereiche Nanobiomedizin und Nanoelektronik profitieren: von ausgefeilten dreidimensionalen Gerüsten für „Tissue-Engineering“ und Geweberegeneration, von Matrices für den kontrollierten Wirkstofftransport, von Biosensoren und -schaltern, Mikrofluidiksystemen, Beschichtungen von medizinischen oder analytischen Durchflusselementen, biomimetischen katalytischen Gerüsten und der Selbstorganisation amyloidbasierter leitfähiger Nanodrähte.

Eingegangen am 13. Juli 2007

Online veröffentlicht am 15. April 2008

Übersetzt von Dr. Burkard Neuß, Jülich

- [1] R. Linding, J. Schymkowitz, F. Rousseau, F. Diella, L. Serrano, *J. Mol. Biol.* **2004**, *342*, 345–353.
- [2] M. Calero, M. Gasset, *Methods Mol. Biol.* **2005**, *299*, 129–151.
- [3] 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*, 16742–16747.
- [4] T. Shirahama, A. S. Cohen, *J. Cell Biol.* **1967**, *33*, 679–708.
- [5] J. F. Smith, T. P. Knowles, C. M. Dobson, C. E. MacPhee, M. E. Welland, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 15806–15811.
- [6] D. A. Kirschner, H. Inouye, L. K. Duffy, A. Sinclair, M. Lind, D. J. Selkoe, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 6953–6957.
- [7] C. M. Dobson, *Trends Biochem. Sci.* **1999**, *24*, 329–332.
- [8] O. S. Makin, L. C. Serpell, *FEBS J.* **2005**, *272*, 5950–5961.
- [9] L. Kreplak, U. Aebi, *Adv. Protein Chem.* **2006**, *73*, 217–233.
- [10] M. Lopez De La Paz, K. Goldie, J. Zurdo, E. Lacroix, C. M. Dobson, A. Hoenger, L. Serrano, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 16052–16057.

- [11] E. Gazit, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 267–269; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 257–259.
- [12] M. Stefani, C. M. Dobson, *J. Mol. Med.* **2003**, *81*, 678–699.
- [13] D. J. Selkoe, *Nature* **2003**, *426*, 900–904.
- [14] K. A. Conway, J. D. Harper, P. T. Lansbury, *Nat. Med.* **1998**, *4*, 1318–1320.
- [15] E. Gazit, *Drugs Future* **2004**, *29*, 613–620.
- [16] C. G. Glabe, *Neurobiol. Aging* **2006**, *27*, 570–575.
- [17] Y. Porat, S. Kolusheva, R. Jelinek, E. Gazit, *Biochemistry* **2003**, *42*, 10971–10977.
- [18] 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. Krafft, W. L. Klein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 6448–6453.
- [19] H. A. Lashuel, Z. Lai, J. W. Kelly, *Biochemistry* **1998**, *37*, 17851–17864.
- [20] D. M. Walsh, A. Lomakin, G. B. Benedek, M. M. Condron, D. B. Teplow, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 22364–22372.
- [21] C. Goldsbury, P. Frey, V. Olivier, U. Aebi, S. A. Muller, *J. Mol. Biol.* **2005**, *352*, 282–298.
- [22] H. K. Blackley, G. H. Sanders, M. C. Davies, C. J. Roberts, S. J. Tendler, M. J. Wilkinson, *J. Mol. Biol.* **2000**, *298*, 833–840.
- [23] J. T. Jarrett, P. T. Lansbury, Jr., *Cell* **1993**, *73*, 1055–1058.
- [24] A. D. Williams, S. Shivaprasad, R. Wetzel, *J. Mol. Biol.* **2006**, *357*, 1283–1294.
- [25] I. Kheterpal, M. Chen, K. D. Cook, R. Wetzel, *J. Mol. Biol.* **2006**, *361*, 785–795.
- [26] S. Gilead, E. Gazit, *Supramol. Chem.* **2005**, *17*, 87–92.
- [27] E. Gazit, *Curr. Med. Chem.* **2002**, *9*, 1725–1735.
- [28] E. Gazit, *Bioinformatics* **2002**, *18*, 880–883.
- [29] E. Gazit, *FASEB J.* **2002**, *16*, 77–83.
- [30] W. Kim, M. H. Hecht, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 15824–15829.
- [31] E. Jack, M. Newsome, P. G. Stockley, S. E. Radford, D. A. Middleton, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 8098–8099.
- [32] O. S. Makin, E. Atkins, P. Sikorski, J. Johansson, L. C. Serpell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 315–320.
- [33] M. Reches, E. Gazit, *Science* **2003**, *300*, 625–627.
- [34] C. H. Görbitz, *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 5153–5159.
- [35] C. H. Görbitz, *Chem. Commun.* **2006**, 2332–2334.
- [36] M. F. Perutz, T. Johnson, M. Suzuki, J. T. Finch, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 5355–5358.
- [37] P. Sikorski, E. Atkins, *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 425–432.
- [38] M. F. Perutz, J. T. Finch, J. Berriman, A. Lesk, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 5591–5595.
- [39] D. Sharma, L. M. Shinchuk, H. Inouye, R. Wetzel, D. A. Kirschner, *Proteins Struct. Funct. Genet.* **2005**, *61*, 398–411.
- [40] R. Wetzel, S. Shivaprasad, A. D. Williams, *Biochemistry* **2007**, *46*, 1–10.
- [41] M. Hammar, Z. Bian, S. Normark, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 6562–6566.
- [42] M. R. Chapman, L. S. Robinson, J. S. Pinkner, R. Roth, J. Heuser, M. Hammar, S. Normark, S. J. Hultgren, *Science* **2002**, *295*, 851–855.
- [43] X. Wang, D. R. Smith, J. W. Jones, M. R. Chapman, *J. Biol. Chem.* **2006**, *282*, 3713–3719.
- [44] S. K. Collinson, J. M. Parker, R. S. Hodges, W. W. Kay, *J. Mol. Biol.* **1999**, *290*, 741–756.
- [45] A. P. White, S. K. Collinson, P. A. Banser, D. L. Gibson, M. Paetz, N. C. Strynadka, W. W. Kay, *J. Mol. Biol.* **2001**, *311*, 735–749.
- [46] I. Cherny, L. Rockah, O. Levy-Nissenbaum, U. Gophna, E. Z. Ron, E. Gazit, *J. Mol. Biol.* **2005**, *352*, 245–252.
- [47] M. M. Barnhart, M. R. Chapman, *Annu. Rev. Microbiol.* **2006**, *60*, 131–147.
- [48] J. W. Costerton, P. S. Stewart, E. P. Greenberg, *Science* **1999**, *284*, 1318–1322.
- [49] S. K. Collinson, L. Emody, K. H. Muller, T. J. Trust, W. W. Kay, *J. Bacteriol.* **1991**, *173*, 4773–4781.
- [50] T. Kikuchi, Y. Mizunoe, A. Takade, S. Naito, S. Yoshida, *Microbiol. Immunol.* **2005**, *49*, 875–884.
- [51] M. F. Gebbink, D. Claessen, B. Bouma, L. Dijkhuizen, H. A. Wosten, *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3*, 333–341.
- [52] N. J. Talbot, *Curr. Biol.* **2003**, *13*, R696–698.
- [53] H. A. Wosten, M. L. de Vocht, *Biochim. Biophys. Acta Rev. Biomembr.* **2000**, *1469*, 79–86.
- [54] M. L. de Vocht, I. Reviakine, H. A. Wosten, A. Brisson, J. G. Wessels, G. T. Robillard, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 28428–28432.
- [55] D. Claessen, R. Rink, W. de Jong, J. Siebring, P. de Vreugd, F. G. Boersma, L. Dijkhuizen, H. A. Wosten, *Genes Dev.* **2003**, *17*, 1714–1726.
- [56] M. A. Elliot, N. Karoonuthaisiri, J. Huang, M. J. Bibb, S. N. Cohen, C. M. Kao, M. J. Buttner, *Genes Dev.* **2003**, *17*, 1727–1740.
- [57] J. F. Berson, A. C. Theos, D. C. Harper, D. Tenza, G. Raposo, M. S. Marks, *J. Cell Biol.* **2003**, *161*, 521–533.
- [58] D. M. Fowler, A. V. Koulov, C. Alory-Jost, M. S. Marks, W. E. Balch, J. W. Kelly, *PLoS Biol.* **2006**, *4*, e6.
- [59] D. M. Fowler, A. V. Koulov, W. E. Balch, J. W. Kelly, *Trends Biochem. Sci.* **2007**, *32*, 217–224.
- [60] V. A. Iconomidou, G. Vriend, S. J. Hamodrakas, *FEBS Lett.* **2000**, *479*, 141–145.
- [61] J. E. Podrabsky, J. F. Carpenter, S. C. Hand, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2001**, *280*, R123–131.
- [62] V. A. Iconomidou, G. D. Chryssikos, V. Gionis, A. S. Galanis, P. Cordopatis, A. Hoenger, S. J. Hamodrakas, *J. Struct. Biol.* **2006**, *156*, 480–488.
- [63] G. H. Altman, F. Diaz, C. Jakuba, T. Calabro, R. L. Horan, J. Chen, H. Lu, J. Richmond, D. L. Kaplan, *Biomaterials* **2003**, *24*, 401–416.
- [64] U. Slotta, S. Hess, K. Spiess, T. Stromer, L. Serpell, T. Scheibel, *Macromol. Biosci.* **2007**, *7*, 183–188.
- [65] R. Valluzzi, S. Winkler, D. Wilson, D. L. Kaplan, *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B* **2002**, *357*, 165–167.
- [66] J. M. Kenney, D. Knight, M. J. Wise, F. Vollrath, *Eur. J. Biochem.* **2002**, *269*, 4159–4163.
- [67] T. Scheibel, R. Parthasarathy, G. Sawicki, X. M. Lin, H. Jaeger, S. L. Lindquist, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 4527–4532.
- [68] K. Lu, J. Jacob, P. Thiagarajan, V. P. Conticello, D. G. Lynn, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6391–6393.
- [69] Y. Song, S. R. Challa, C. J. Medforth, Y. Qiu, R. K. Watt, D. Pena, J. E. Miller, F. van Swol, J. A. Shelnutt, *Chem. Commun.* **2004**, 1044–1045.
- [70] O. Carny, D. E. Shalev, E. Gazit, *Nano Lett.* **2006**, *6*, 1594–1597.
- [71] M. Reches, E. Gazit, *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2007**, *7*, 2239–2245.
- [72] U. Baxa, V. Speransky, A. C. Steven, R. B. Wickner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 5253–5260.
- [73] A. J. Baldwin, R. Bader, J. Christodoulou, C. E. MacPhee, C. M. Dobson, P. D. Barker, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2162–2163.
- [74] A. M. Corrigan, C. Muller, M. R. Krebs, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14740–14741.
- [75] A. Aggeli, M. Bell, N. Boden, J. N. Keen, P. F. Knowles, T. C. McLeish, M. Pitkeathly, S. E. Radford, *Nature* **1997**, *386*, 259–262.
- [76] A. Aggeli, M. Bell, L. M. Carrick, C. W. Fishwick, R. Harding, P. J. Mawer, S. E. Radford, A. E. Strong, N. Boden, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9619–9628.
- [77] Y. Zhang, H. Gu, Z. Yang, B. Xu, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13680–13681.
- [78] Z. Yang, G. Liang, L. Wang, B. Xu, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 3038–3043.

- [79] A. Mahler, M. Reches, M. Rechter, S. Cohen, E. Gazit, *Adv. Mater.* **2006**, *18*, 1365–1370.
- [80] V. Jayawarna, M. Ali, T. A. Jowitt, A. F. Miller, A. Saiani, J. E. Gough, R. V. Ulijn, *Adv. Mater.* **2006**, *18*, 611–614.
- [81] M. H. Hecht, A. Das, A. Go, L. H. Bradley, Y. Wei, *Protein Sci.* **2004**, *13*, 1711–1723.
- [82] H. Rapaport, K. Kjaer, T. R. Jensen, L. Leiserowitz, D. A. Tirrell, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 12523–12529.
- [83] H. Isenberg, K. Kjaer, H. Rapaport, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 12468–12472.
- [84] S. Cavalli, J. W. Handgraaf, E. E. Tellers, D. C. Popescu, M. Overhand, K. Kjaer, V. Vaisser, N. A. Sommerdijk, H. Rapaport, A. Kros, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 13959–13966.
- [85] S. Cavalli, D. C. Popescu, E. E. Tellers, M. R. Vos, B. P. Pichon, M. Overhand, H. Rapaport, N. A. Sommerdijk, A. Kros, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 753–758; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 739–744.
- [86] J. P. Schneider, D. J. Pochan, B. Ozbas, K. Rajagopal, L. Pakstis, J. Kretsinger, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 15030–15037.
- [87] L. A. Haines, K. Rajagopal, B. Ozbas, D. A. Salick, D. J. Pochan, J. P. Schneider, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17025–17029.
- [88] X. Zhao, S. Zhang, *Macromol. Biosci.* **2007**, *7*, 13–22.
- [89] S. Zhang, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 1171–1178.
- [90] T. Appel, M. Wolff, F. von Rheinbaben, M. Heinzel, D. Riesner, *J. Gen. Virol.* **2001**, *82*, 465–473.
- [91] L. Adler-Abramovich, M. Reches, V. L. Sedman, S. Allen, S. J. Tendler, E. Gazit, *Langmuir* **2006**, *22*, 1313–1320.
- [92] J. M. Gosline, P. A. Guerette, C. S. Ortlepp, K. N. Savage, *J. Exp. Biol.* **1999**, *202*, 3295–3303.
- [93] P. M. F. Cunniff, S. A. Auerbach, M. A. Song, J. W. Kaplan, D. L. Adams, W. Wade, R. K. Eby, D. Mahoney, D. L. Vezie, *Polym. Adv. Technol.* **1994**, *5*, 401–410.
- [94] S. K. Frank, K. Ko, M. Inoue, M. Niwa, S. Fossey, J. W. Song, *Engineering Properties of Spider Silk Fibers*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, **2004**.