

# Kälte- und druckinduzierte Dissoziation von Proteinaggregaten und Amyloidfibrillen\*\*

Rajesh Mishra und Roland Winter\*

Amyloidfibrillen · Hochdruck · Kältedenaturierung ·  
Proteinaggregation · Proteindissoziation

Die Faltung von Proteinen ist eine der entscheidenden Stufen im Leben eines Proteins. Wenn durch eine Fehlfunktion die native Konformation nicht erreicht wird, führt dies zur Inaktivierung des Proteins. Das fehlgefaltete Protein kann aber auch zu Störungen und Fehlfunktionen von Komponenten der Zellmaschinerie oder sogar zum Zelltod führen. In den letzten Jahren wurde deutlich, dass eine ganze Reihe menschlicher Krankheiten ursächlich mit der Fehlfaltung von Proteinen zusammenhängt.<sup>[1,2]</sup> Diese Krankheiten, zu denen die Alzheimer-Krankheit (verantwortliches Protein: A $\beta$ ), Parkinson ( $\alpha$ -Synuclein), Encephalopathien des Prionproteins und Diabetes mellitus Typ II (Insel-Amyloid-Polypeptid, IAPP) gehören, werden daher auch „Protein-Konformationskrankheiten“ genannt.

Amyloidablagerungen weisen gemeinsam fibrilläre submikroskopische Strukturen auf, die aus geordneten Sekundärstrukturelementen mit gekreuzter  $\beta$ -Faltblatt-Struktur aufgebaut sind. Sie bestehen aus  $\beta$ -Strängen, die kontinuierlich senkrecht zur Fibrillenachse verlaufen.<sup>[1]</sup> Es wird vermutet, dass die gekreuzte  $\beta$ -Faltblatt-Struktur der Amyloide eine generische Strukturform von Polypeptidketten ist und allgemein ein Energieminimum für aggregierte Protein darstellt. Typischerweise bestehen Amyloidfibrillen aus zwei bis sechs unverzweigten Protofilamenten (mit 2–5 nm Durchmesser), die durch laterale Assoziation und Verdrillen Fibrillen mit einem Durchmesser von 4–13 nm bilden. Einmal gebildet, sind die Fibrillen aufgrund ihrer hohen Packungsdichte und des tiefen Energieminimums, in dem sie sich befinden, extrem stabil und schwierig aufzulösen.<sup>[3]</sup>

Die molekularen Mechanismen, die der Bildung dieser Aggregatstrukturen zugrunde liegen, sind noch nicht gut verstanden. Dies hängt damit zusammen, dass diese unlöslichen Strukturen sehr groß sind (bezüglich ihrer molaren Masse) und generell nicht kristallisiert werden können. Obwohl bekannt ist, dass die Amyloidstrukturen toxisch sind, wird ihre Rolle im Krankheitsverlauf jedoch noch kontrovers

diskutiert. So wird auch vermutet, dass die präfibrillären Aggregate toxischer sind als die Amyloidfibrillen selbst.<sup>[1,4]</sup>

Zur Bestimmung der Stabilität und Energetik der Amyloidfibrillen wurden in der letzten Zeit neben Cosolvens-abhängigen Untersuchungen auch Druck- und Temperaturperturbationsmethoden eingesetzt. Seit der Entdeckung des Nobelpreisträgers P. W. Bridgman im Jahre 1914, dass hohe Drücke zur Entfaltung und Denaturierung von Proteinen führen, wurde in zahlreichen weiteren Arbeiten gezeigt, dass hohe hydrostatische Drücke zum Aufbrechen intermolekularer Wechselwirkungen führen, die die native Konformation des Proteins zusammenhalten, und dass die Entfaltung des Proteins mit einer Volumenabnahme des Protein-Wasser-Systems verknüpft ist.<sup>[5–9]</sup> Weiterhin wurden hohe hydrostatische Drücke (HHD) für die Disaggregation und Rückfaltung von Proteinen aus unlöslichen In-vitro-Aggregaten eingesetzt.<sup>[10]</sup>

Eine geeignete Form, die thermodynamische Stabilität eines Proteins darzustellen, ist eine mehrdimensionale Energiehyperfläche als Funktion der Temperatur, des Drucks und der Lösungsmittelbedingungen. Wenn die Lösungsmittelbedingungen (pH-Wert, Ionenstärke, Salz- und Cosolvenskonzentration) konstant gehalten werden, ist die Stabilität des Proteins lediglich noch eine Funktion der Temperatur und des Drucks. Die Differenz der Gibbs-Energien zwischen dem denaturierten (entfalteten) und dem nativen Zustand,  $\Delta_u G(T,p)$ , relativ zu einem Referenzzustand  $T_0, p_0$  (z.B. die Entfaltungstemperatur bei Normaldruck) kann – unter Annahme einer Taylor-Reihenentwicklung von  $\Delta_u G(T,p)$  bis zur zweiten Ordnung in  $T$  und  $p$  um den Referenzzustand  $T_0, p_0$  – näherungsweise als Gleichung (1) geschrieben werden:<sup>[11]</sup>

$$\begin{aligned} \Delta_u G = & \Delta_u G_0 + \frac{\Delta_u \kappa}{2} (p - p_0)^2 + \Delta_u \alpha (p - p_0)(T - T_0) \\ & - \Delta_u C_p \left[ T \left( \ln \frac{T}{T_0} - 1 \right) + T_0 \right] + \Delta_u V_0 (p - p_0) - \Delta_u S_0 (T - T_0) \end{aligned} \quad (1)$$

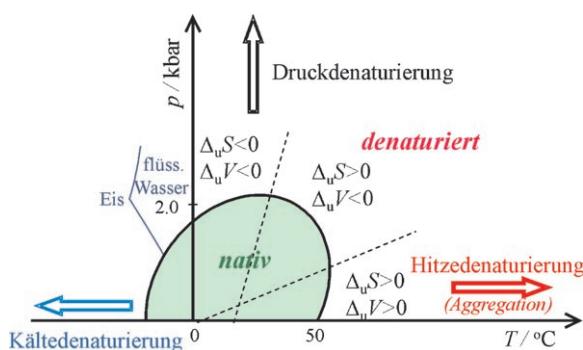
$\Delta_u \kappa$ ,  $\Delta_u \alpha$  und  $\Delta_u C_p$  sind die Änderungen der Kompressibilität, des Ausdehnungskoeffizienten bzw. der Wärmekapazität bei der Entfaltung (unfolding, u) des Proteins. Näherungsweise kann man sich die Entropie- ( $\Delta_u S = \Delta_u H/T$ ) und Volumenänderung ( $\Delta_u V$ ) bei der Entfaltung zusammengesettzt denken aus einem intrinsischen Beitrag des Proteins selbst sowie dem Beitrag seiner Hydrathülle. Die Entropiedifferenz beruht hauptsächlich auf einer Zunahme der Kon-

[\*] Dr. R. Mishra, Prof. Dr. R. Winter  
Technische Universität Dortmund, Fakultät für Chemie  
Physikalische Chemie I – Biophysikalische Chemie  
Otto-Hahn-Straße 6, 44227 Dortmund (Deutschland)  
Fax: (+49) 231-755-3901  
E-Mail: roland.winter@tu-dortmund.de

[\*\*] Unsere Arbeiten werden von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) und dem Fonds der Chemischen Industrie unterstützt.

figurationsentropie der Polypeptidkette,  $\Delta_u S_{\text{conf}}$ , und der Entropieänderung  $\Delta_u S_{\text{hydr}}$  der Hydrathülle aufgrund der Exposition der zuvor im Proteininneren vergrabenen Aminosäurereste ( $\Delta_u S = \Delta_u S_{\text{conf}} + \Delta_u S_{\text{hydr}}$ ). Analoges gilt für die Volumenänderung  $\Delta_u V$  und die Enthalpieänderung  $\Delta_u H$  ( $\Delta_u H = \Delta_u H_{\text{conf}} + \Delta_u H_{\text{hydr}}$ ).

Die Phasengrenze, wo das Protein aufgrund einer Temperatur- oder Druckänderung entfaltet, ergibt sich aus  $\Delta_u G = 0$ . Die physikalisch sinnvolle Lösung der Phasengrenzkurve in der  $p, T$ -Ebene hat eine ellipsenähnliche Form (Abbildung 1).



**Abbildung 1.** Druck/Temperatur-Stabilitätsdiagramm eines typischen monomeren Proteins.<sup>[9]</sup> Dargestellt sind die verschiedenen Wege der Entfaltung des nativen Proteins (grüne Fläche) sowie die entsprechenden thermodynamischen Eigenschaften beim Entfaltungsprozess. Die Hitzedenaturierung wird oftmals von einer irreversiblen Aggregation des Proteins begleitet. Weiterhin ist die Wasser/Eis-Phasengrenzkurve angedeutet.

Die Exposition unpolarer Aminosäuregruppen bei der Entfaltung führt zu Bindung und Immobilisierung von Wassermolekülen an ihrer Oberfläche, was zu einer Absenkung ihrer Entropie führt. Dieser Prozess ist stark temperaturabhängig und gekennzeichnet von einer Zunahme der Wärme Kapazität bei konstantem Druck, d.h.  $\Delta_u C_p > 0$  (die kalorimetisch bestimmt werden kann).

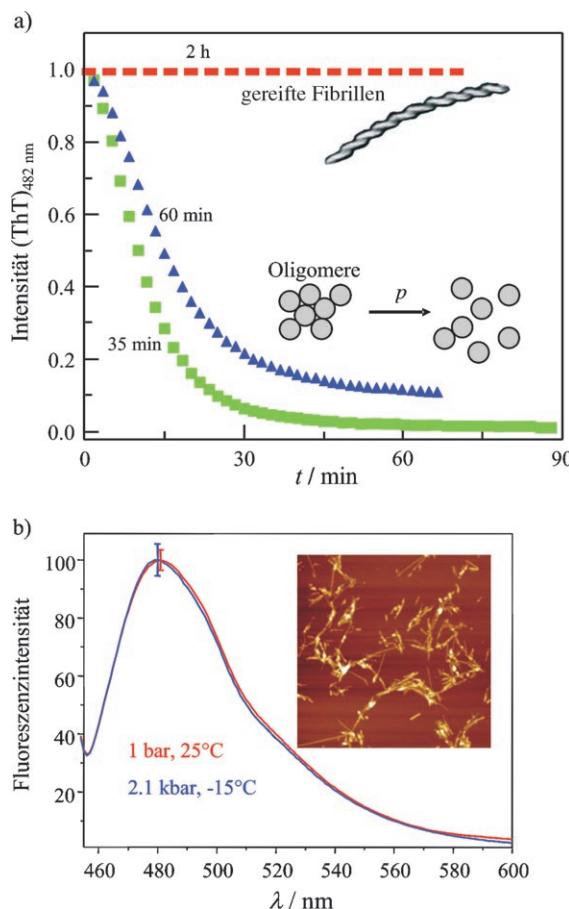
Wie auch in Abbildung 1 zu sehen, ist die Steigung der  $p, T$ -Phasengrenzkurve zwischen Wasser und Eis I negativ, was bedeutet, dass erhöhter Druck den Stabilitätsbereich flüssigen Wassers bis auf Temperaturen unter 0°C ausdehnt (z.B. -18°C bei ca. 2 kbar). Diese Möglichkeit, den Zustandsbereich flüssigen Wassers unterhalb von 0°C bei etwas erhöhten Drücken auszuweiten, kann daher genutzt werden, um die Kältedenaturierung von Proteinen zu studieren. Bei solch tiefen Temperaturen führt eine signifikante Abnahme der Hydratationsenthalpie  $\Delta_u H_{\text{hydr}}$  (hervorgerufen durch eine Zunahme energetisch günstiger Wechselwirkungen zwischen Wasser und der Proteinoberfläche) zu einer Destabilisierung der nativen Proteinstruktur.<sup>[12]</sup> Die Enthalpieänderung bei der Entfaltung ist damit stark temperaturabhängig und führt dazu, dass bei genügend tiefer Temperatur die Gibbs-Energie der Entfaltung,  $\Delta_u G$ , negativ wird und das Protein unter Abgabe von Wärme entfaltet. Im Allgemeinen liegen die Temperaturen für die Kältedenaturierung weit unterhalb von 0°C, sodass Druck angewendet werden muss, um das Wasser im fluiden Zustand zu halten. Das Gefrieren des Wassers kann unter Umständen aber auch durch Unterkühlung-

techniken und Verwendung kleiner Volumina verhindert werden.<sup>[13]</sup> Während die Hitzedenaturierung von Proteinen, die hauptsächlich von einer großen positiven Konfigurationsentropieänderung,  $\Delta S_{\text{conf}}$ , hervorgerufen wird, meist ein hochkooperativer Prozess ist, der zu einer weitgehenden Entfaltung des Proteins führt, stellt die Kältedenaturierung, die durch die Anzahl und Stärke der H-Brücken zur Oberfläche des Proteins bei tiefen Temperaturen begünstigt wird, eine milder Form der Denaturierung des Proteins dar, die auch nur zu einer teilweisen Entfaltung des Proteins führt.<sup>[9]</sup>

Entsprechend dem in Abbildung 1 dargestellten Stabilitätsdiagramm führen auch Druck und Kälte zu einer Destabilisierung des Proteins. Beide Parameter wurden damit auch angewendet, um Proteinaggregate und Fibrillen zu destabilisieren. Dies ist auf eine Kombination von Effekten zurückzuführen. HHD führt zunächst ganz allgemein zu einer Schwächung hydrophober Wechselwirkungen. Weiterhin begünstigt die Anwesenheit von Kavitäten im Inneren des gefalteten Proteins und an der Grenzfläche der Proteine in Oligomeren die Entfaltung und Dissoziation dieser Strukturen. Wenn diese beim Entfalten bzw. der Dissoziation der Proteine mit Wasser gefüllt werden, führt dies zu einer Volumenabnahme des Systems, wodurch der Prozess unter hohem Druck begünstigt wird. Auch die Dissoziation elektrostatischer Wechselwirkungen mit anschließender Exposition der geladenen Gruppen in wässriger Lösung führt durch Elektrostriktion zu einer signifikanten Volumenverkleinerung. Analog führt auch die Solvatation polarer Gruppen zu einer Volumenabnahme der Lösung.

Der Einfluss von Druck auf Proteinaggregate hängt entscheidend vom Ordnungsgrad der Aggregatstruktur ab. Frisch gebildete, amorphe Aggregate sind anfälliger gegen Druck und die Rückfaltung in den nativen Zustand als gereifte, voll entwickelte Amyloidfibrillen. Im letzteren Fall hängt die Effektivität einer druckinduzierten Dissoziation der Fibrillen von der speziellen Packung des Polypeptidrückgrats und der Aminosäure-Seitenketten und damit vom freien Volumen aufgrund von Packungsdefekten ab. Die Anfälligkeit frisch gebildeter Aggregate und die Resistenz der meisten gereiften Fibrillen gegenüber HHD erlaubt damit nicht nur, verschiedene Stufen des Amyloidbildungsprozesses zu unterscheiden, man erhält aufgrund der Reversibilität der Aggregationsreaktion auch zuverlässige thermodynamische Daten über den Transformationsprozess.<sup>[14-16]</sup>

Als Beispiel betrachten wir den Druckeinfluss auf Insulin<sup>[15]</sup> und IAPP in verschiedenen Stadien des Aggregationsprozesses (Abbildung 2). Die Fähigkeit, den Fluoreszenzfarbstoff Thioflavin T (ThT) zu binden, wird herangezogen, um die Fibrillenbildung zu detektieren. Die Bindung von ThT an fibrilläre Strukturen führt zu einer Zunahme der Fluoreszenzintensität. Man erkennt deutlich, dass im Anfangsstadium der Insulinaggregation, in dem nur oligomere Spezies in einem Keimbildungs- und Wachstumsprozess gebildet werden, Druckanwendung zur Dissoziation der Oligomere führt. Diese Oligomere werden hauptsächlich durch elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen stabilisiert. Sie weisen noch nicht die effektive Packung wie die gereiften Insulinfibrillen auf, was sie gegen eine druckinduzierte Dissoziation anfällig macht. Die Unempfindlichkeit gereifter



**Abbildung 2.** a) Druckeinfluss auf 0.5 Gew.-% Insulin in wässriger Lösung (0.1 M NaCl,  $T = 60^\circ\text{C}$ ) in verschiedenen Stadien des Aggregationsprozesses. Gezeigt ist die Abnahme der normierten ThT-Fluoreszenzintensität infolge eines Druckanstiegs auf 1 kbar nach zunehmend längeren Inkubationszeiten. Nach einem Zeitraum von 35 und 60 min herrschen oligomere Spezies vor, während nach 2 h voll ausgereifte druckresistente Insulfibrillen gewachsen sind. b) ThT-Fluoreszenzspektren von gereiften IAPP-Fibrillen, die bei 1 bar und  $25^\circ\text{C}$  aus  $10 \mu\text{M}$  IAPP 6 Tage lang gewachsen sind (rot), sowie nach weiteren 72 h unter einem Druck von 2.1 kbar bei  $-15^\circ\text{C}$  (blau).

Insulfibrillen gegenüber HHD zeigen dagegen, dass ihr ausgedehntes Wasserstoffbrückennetzwerk und eine optimale Packung ihrer Seitenketten essenziell für ihre Stabilität sind. Abbildung 2b zeigt den Einfluss kältedenaturierender Bedingungen bei erhöhten Drücken auf IAPP-Fibrillen, die zuvor 6 Tage lang bei  $25^\circ\text{C}$  gewachsen sind. Man beobachtet keine Abnahme der ThT-Fluoreszenzintensität unter diesen Bedingungen. Dies bedeutet, dass, ähnlich den Insulfibrillen, auch diese gereiften IAPP-Fibrillen, die bei  $\mu\text{M}$ -Konzentrationen gewachsen sind, unter diesen Bedingungen nicht dissoziieren. Dies wird durch Hochdruck-NMR-Experimente bestätigt. Lediglich bei viel höheren Peptidkonzentrationen und Drücken beobachtet man eine teilweise Dissoziation der IAPP-Aggregate.

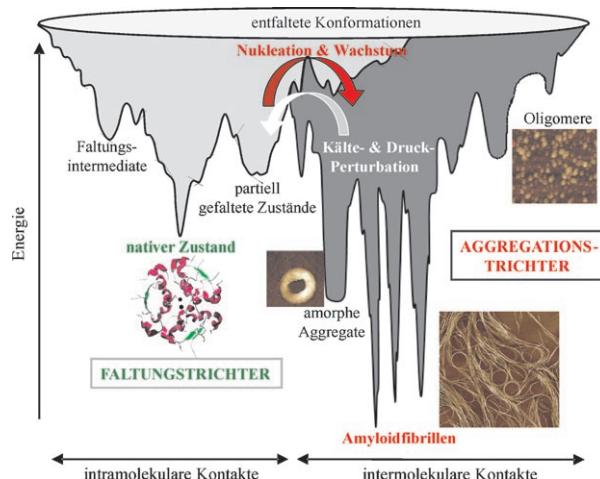
Einige Amyloidfibrillen (insbesondere Prototibrillen) haben ein größeres partielles spezifisches Volumen als die sie aufbauenden Proteine. Dies ist dann der Fall, wenn beim Aggregationsprozess, der von Konformationsänderungen der

nativen Proteine auf ihrem Weg zu den nicht-nativen  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen begleitet wird, neue, wasserfreie Kavitäten und hydrophobe Taschen gebildet werden.<sup>[16,17]</sup> In diesen Fällen kann HHD auch zur Dissoziation der Amyloidfibrillen führen. So wurde z.B. gezeigt, dass moderate Drücke (1–3 kbar) in der Lage sind, Amyloidfibrillen von Transthyretin,  $\beta_2$ -Microglobulin und  $\alpha$ -Synuclein zu dissoziieren.<sup>[17,18]</sup> Im Falle des  $\alpha$ -Synucleins zeigte sich, dass die Fibrillen aus Mutationen, die bei der Parkinson-Krankheit eine große Rolle spielen (A53T and A30P), anfälliger gegen HHD sind als die Wildtyp-Fibrillen, was dafür spricht, dass durch diese Mutationen hydrophobe Wechselwirkungen und die Packung der Proteine in den Amyloidfibrillen beeinflusst werden. Eine der spannendsten Anwendungen hoher Drücke in der Proteinaggregationsforschung ist die Zerstörung der Infektiosität von Prionenproteinen durch Druckbehandlung.<sup>[19]</sup>

Einen sehr eleganten Weg haben auch kürzlich Kim et al.<sup>[13]</sup> beschritten, als sie zeigen konnten, dass sich Amyloidfibrillen auch durch tiefe Temperaturen auflösen lassen. Sie zeigten, dass Amyloidfibrillen aus  $\alpha$ -Synuclein in unterkühlter wässriger Lösung bei  $-15^\circ\text{C}$  schnell dissoziieren.  $^{15}\text{N}$ -markiertes  $\alpha$ -Synuclein wurde in 1-mm-Glaskapillaren injiziert, und diese wurden in 5-mm-NMR-Röhrchen platziert, die dann einen Tag lang bei  $-15^\circ\text{C}$  im unterkühlten Zustand inkubiert wurden. Nach der Inkubation wurden transmissionelektronenmikroskopische Aufnahmen (TEM), ThT-Fluoreszenz- und 2D-HSQC-NMR-Spektren aufgenommen, die belegten, dass ungeordnete Aggregate mit nur wenigen fibrillären Strukturen entstanden sind. Ähnlich der Wirkung von HHD wird die Stärke hydrophober Wechselwirkungen mit abnehmender Temperatur geringer. Die Autoren zeigten weiterhin, dass bei  $-15^\circ\text{C}$  die Abnahme der hydrophoben und elektrostatischen Wechselwirkungen zu dieser kälteinduzierten Dissoziation der  $\alpha$ -Synuclein-Fibrillen beiträgt.

Neben der Auflösung mit aggressiven chemischen Agentien sind also auch tiefe Temperaturen und/oder hohe Drücke in der Lage, Proteinaggregate und Fibrillen zu dissoziieren. Weiterhin sehen wir, dass die Anwendung von tiefer Temperatur und hohem Druck als Perturbationsparameter eine Reihe neuer, aufschlussreicher Informationen über die Struktur und Stabilität der Aggregate sowie die Kinetik ihrer Bildung liefern kann.

Abbildung 3 zeigt eine Energielandschaft der Proteinfaltung und der Aggregationsprozesse.<sup>[9,20]</sup> Im Bereich hoher Energien und Entropien liegt das Protein im entfalteten Zustand in einer Vielzahl ungeordneter Konformationen vor. Die Faltung des Proteins zum nativen Zustand geschieht entlang einer rauen Energiehyperfläche („Faltungstrichter“) über eine schnelle Ausbildung intramolekularer Kontakte. In einem – im Allgemeinen langsamen – Nukleationsprozess mit anschließendem autokatalytischem Aggregationswachstum partiell entfalteter Konformationen (die durch Mutationen, bestimmte Cosolventien, pH-Änderung usw. entstehen können), kann die Bildung von Aggregaten und Amyloidfibrillen über intermolekulare Kontakte einsetzen. Das System geht dann in den „Aggregationstrichter“ unter Bildung von lose gepackten Oligomeren, amorphen Aggregaten oder Fibrillenstrukturen über. Oftmals beobachtet man auch die Bildung unterschiedlicher Fibrillenstrukturen (Stämme) mit unterschiedli-



**Abbildung 3.** Energienetzwerk für die Faltung und Aggregations-/Amyloidbildung eines Proteins.<sup>[9, 20]</sup> Während das Protein unter normalen physiologischen Bedingungen seine native Konformation in einem globalen Energiedreieck des Faltungstrichters erreicht, kann die Stapelung dieser Proteine zu Amyloidstrukturen in einem „Aggregationstrichter“ zu tieferen Energien führen. Bei Anwendung genügend tiefer Temperaturen und hoher Drücke ist eine Dissoziation dieser Proteinaggregate und Fibrillen möglich, falls diese nicht dicht gepackt sind.

chen Packungseigenschaften und unterschiedlich tiefen Energiedreiecke, also eine ausgeprägte strukturelle Polymorphie. Eine Dissoziation der Proteinaggregate, unter bestimmten Bedingungen auch der Fibrillen, ist durch Anwendung hoher Drücke oder unter kältedenaturierenden Bedingungen (weit unterhalb von 0°C) möglich. Dies lässt vermuten, dass eine nicht-optimal gepackte Amyloidstruktur – je nach Umgebungsbedingungen – unterschiedliche Isoformen zu bilden vermag. Im Gegensatz zur Einzigartigkeit des nativen, funktionellen Faltungszustands des Proteins könnte dies die Ursache für die Strukturvielfalt von Amyloidfibrillen sein.

Diese Untersuchungen unter Einsatz der Kältedenaturierung von Kim et al.<sup>[13]</sup> sowie der Druckperturbation werden weitere Arbeiten an amyloidogenen Proteinen anstoßen. Diese Arbeiten werden zu weiteren Einsichten in die strukturelle Vielfalt von Amyloidfibrillen führen, die wahrscheinlich verantwortlich ist für die verblüffendste Beobachtung bei den Prionen-Krankheiten: das Auftreten und die Propagation

von Stämmen mit unterschiedlichen Phänotypen – ausgehend von einem einzigen Protein.

Online veröffentlicht am 21. Juli 2008

- [1] F. Chiti, C. M. Dobson, *Annu. Rev. Biochem.* **2006**, *75*, 333–366.
- [2] C. M. Dobson, *Nature* **2003**, *426*, 884–890.
- [3] O. S. Makin, E. Atkins, P. Sikorski, J. Johansson, L. C. Serpell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 315–320.
- [4] M. Stefani, C. M. Dobson, *J. Mol. Med.* **2003**, *81*, 678–699.
- [5] J. L. Silva, D. Foguel, C. A. Royer, *Trends Biochem. Sci.* **2001**, *26*, 612–618.
- [6] F. Meersman, C. M. Dobson, K. Heremans, *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35*, 908–917.
- [7] K. Akasaka, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 1814–1835.
- [8] L. Mitra, K. Hata, R. Kono, A. Maeno, D. Isom, J.-B. Rouget, R. Winter, K. Akasaka, B. García-Moreno, C. A. Royer, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 14108–14109.
- [9] R. Winter, D. Lopes, S. Grudzielanek, K. Vogt, *J. Non-Equilib. Thermodyn.* **2007**, *32*, 41–97.
- [10] R. J. St. John, J. F. Carpenter, T. W. Randolph, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 13029–13033.
- [11] R. Ravindra, R. Winter, *ChemPhysChem* **2003**, *4*, 359–365.
- [12] a) P. L. Privalov, Y. V. Griko, S. Y. Venyaminov, V. P. Kutyshenko, *J. Mol. Biol.* **1986**, *190*, 487–498; b) C. L. Dias, T. Alani-Nissila, M. Karttunen, I. Vattulainen, M. Grant, *Phys. Rev. Lett.* **2008**, *100*, 118101.
- [13] H.-Y. Kim, M.-K. Cho, D. Riedel, C. O. Fernandez, M. Zweckstetter, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 5124–5126; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 5046–5048.
- [14] a) Y. Cordeiro, J. Kraineva, R. Ravindra, L. M. T. R. Lima, M. P. B. Gomes, D. Foguel, R. Winter, J. L. Silva, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 32354–32359; b) D. Foguel, J. L. Silva, *Biochemistry* **2004**, *43*, 11361–11370.
- [15] S. Grudzielanek, V. Smirnovas, R. Winter, *J. Mol. Biol.* **2006**, *356*, 497–509.
- [16] K. Akasaka, A. R. A. Latif, A. Nakamura, K. Matsuo, H. Tachibana, K. Gekko, *Biochemistry* **2007**, *46*, 10444–10450.
- [17] D. Foguel, M. C. Suarez, A. D. Ferrão-Gonzales, T. C. R. Porto, L. Palmieri, C. M. Einsiedler, L. R. Andrade, H. A. Lashuel, P. T. Lansbury, J. W. Kelly, J. L. Silva, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 9831–9836.
- [18] E. Chatani, M. Kato, T. Kawai, H. Naiki, Y. Goto, *J. Mol. Biol.* **2005**, *352*, 941–951.
- [19] P. Brown, R. Meyer, F. Cardone, M. Pochiari, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 6093–6097.
- [20] J. N. Onuchic, P. G. Wolynes, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2004**, *14*, 70–75; T. R. Jahn, S. E. Radford, *FEBS J.* **2005**, *272*, 5962–5970.