

Amyloid-Kreuzwechselwirkung zur Inhibierung der Proteinaggregation, nicht aber der Proteinfunktion: Inhibierung der Insulinaggregation im nanomolaren Bereich durch ein IAPP-Mimetikum**

Aleksandra Velkova, Marianna Tatarek-Nossol, Erika Andreetto und Aphrodite Kapurniotu*

Die In-vivo-Proteinaggregation steht mit der Pathogenese zahlreicher unheilbarer zell- und neurodegenerativer Krankheiten in Zusammenhang.^[1,2] Die Selbstassoziation zu zelltoxischen Aggregaten scheint eine allgemeine Eigenschaft von Polypeptidketten zu sein, weshalb es denkbar ist, dass natürliche Inhibierungsmechanismen existieren.^[2,3] Solche Mechanismen könnten Wechselwirkungen mit anderen Proteinen und sogar Kreuzwechselwirkungen zwischen amyloidogenen Polypeptidsequenzen nutzen.^[4-8] Die Proteinaggregation in vitro erschwert oder verhindert die Lagerung und den Einsatz als Therapeutika bei einer Reihe bioaktiver Polypeptide.^[9,10] Ein bekanntes Beispiel ist Insulin, das aus 51 Aminosäureresten besteht, bei der Behandlung von Diabetes eingesetzt wird und zu den am meisten verwendeten Biopharmazeutika zählt.^[11,12] Insulin ist ein stark zu „nicht-natürlicher“ Aggregation und Fibrillierung neigendes Polypeptid, insbesondere wenn es in einem partiell entfalteten Zustand vorliegt.^[12-15] Zwar läuft diese nichtnatürliche Insulinaggregation in vivo nicht ab; doch führt die Selbstassoziation von Insulin in vitro zu nichtfunktionellen Aggregaten, was seinen Einsatz als Therapeutikum beeinträchtigt.^[11]

[*] Dipl.-Ing. (FH) A. Velkova, Dipl.-Chem. E. Andreetto, Prof. Dr. A. Kapurniotu
Labor für Peptidbiochemie, Center for Integrated Protein Science München (CIPSM), Technische Universität München An der Saatzauber 5, 85350 Freising-Weihenstephan (Deutschland) und

Institut für Biochemie
Universitätsklinikum der RWTH Aachen (Deutschland)
Fax: (+49) 8161-713-298
E-Mail: akapurniotu@wzw.tum.de
Homepage: http://www.cipsm.de/em/cipsmProfessorships/Aphrodite_Kapurniotu

Dipl.-Chem. M. Tatarek-Nossol
Abteilung für Biochemie und Molekularbiologie
Universitätsklinikum der RWTH Aachen (Deutschland)

[**] Wir bedanken uns bei S. Stevanovic und C. Henkel für die MALDI-Messungen und bei J. Bernhagen für seine Hilfe bei der Etablierung des Insulinrezeptor-Assays und der Übersetzung des Manuskripts sowie bei L. M. Yan für ihre hilfreichen Diskussionen und für die Vorversuche zur Insulinfibrillierung. Diese Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) gefördert.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200801499> zu finden.

Bei der Entwicklung von Inhibitoren der Aggregation eines bioaktiven oder therapeutisch eingesetzten Proteins muss beachtet werden, dass diese die Funktion des Proteins nicht beeinträchtigen dürfen. Da natürlich vorkommende Inhibitoren der Proteinaggregation dieses Kriterium inhärent erfüllen sollten, gingen wir davon aus, dass ein synthetisches Molekül, das einen nativen, endogenen Proteinaggregationsinhibitor nachahmt, ein guter Kandidat sein könnte. Ein natürlich vorkommendes, an Insulin bindendes Polypeptid ist das Insel-Amyloid-Polypeptid (islet amyloid polypeptide, IAPP).^[5,16,17] Die Sequenz dieses aus 37 Aminosäureresten

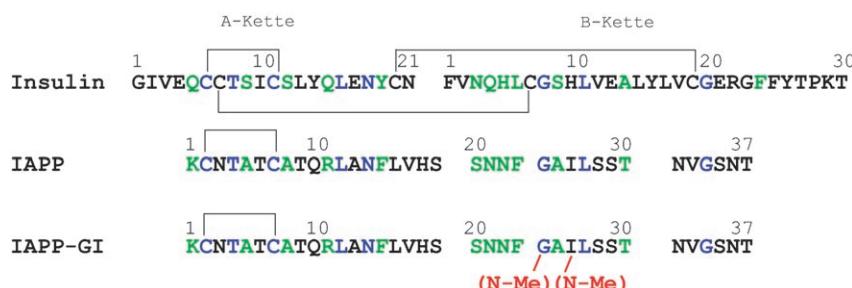


Abbildung 1. Primärstrukturen von Insulin, IAPP und dem IAPP-Mimetikum IAPP-GI. Gleiche Reste in den Sequenzen sind in Blau, ähnliche in Grün dargestellt.

bestehenden Polypeptids, das den Kohlenhydratstoffwechsel reguliert, hat eine beachtliche Ähnlichkeit mit der von Insulin (Abbildung 1); es wird zusammen mit Insulin in den β -Zellen der Bauchspeicheldrüse synthetisiert, gespeichert und sezerniert.^[17-19] IAPP ist jedoch äußerst amyloidogen und bildet pankreatische Amyloidablagerungen beim Typ-2-Diabetes (T2D).^[17,18] Es wurde gezeigt, dass IAPP mit Insulin wechselt und dass diese Interaktion die In-vitro-Bildung von IAPP-Fibrillen deutlich verzögert.^[5] Daher wurde Insulin als ein natürlicher Inhibitor der IAPP-Aggregation vorgeschlagen.^[5,6,20,21] Allerdings wurde bisher die Frage nicht aufgegriffen, ob umgekehrt IAPP – in einem nichtaggregierten und nichttoxischen Zustand – auch ein natürlicher Inhibitor der Insulinaggregation sein könnte. Grund dafür ist höchstwahrscheinlich die Schwierigkeit, IAPP in einem stabilen, nichtaggregierten und nichttoxischen Zustand zu halten.

Wir haben vor kurzem ein konformativ eingeschränktes IAPP-Analogon entworfen, das eine nichtamyloidogene und nichttoxische IAPP-Konformation nachahmt,^[22] und gezeigt, dass dieses Peptid, [(N-Me)G24, (N-Me)I26]-IAPP (IAPP-GI; Abbildung 1), ein sehr gut lösliches, nichtamyloidogenes und nichttoxisches IAPP-Analogon ist, das mit einer Affinität im nanomolaren Bereich an IAPP bindet und die zelltoxische

IAPP-Selbstassoziation blockiert.^[22] Hier zeigen wir, dass IAPP-GI auch ein Inhibitor der Insulinaggregation ist, der Insulin mit einer Affinität im nanomolaren Bereich bindet, ohne dessen physiologische Funktion zu beeinträchtigen. Weiterhin deuten unsere Ergebnisse darauf hin, dass eine hochaffine Interaktion zwischen nichtfibrillären und nicht-toxischen Insulin- und IAPP-Spezies die toxische Selbstassoziation beider Polypeptide abschwächt.

Zunächst untersuchten wir, ob IAPP-GI die Fibrillierung von Insulin stören kann. Dazu wurde Insulin allein oder mit IAPP-GI (1:5) unter zuvor etablierten Bedingungen für die Induktion der In-vitro-Fibrillogenese (pH 2, 60°C; siehe Hintergrundinformationen) inkubiert. Die Fibrillenbildung wurde durch den Thioflavin-T(ThT)-Bindungssassay gemessen und mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) untersucht. Die Amyloidbildung von Insulin setzte nach etwa fünf Tagen ein und war nach weiteren vier bis fünf Tagen abgeschlossen (Abbildung 2a,b). Die höchste inhibitorische Wirkung wurde mit einem 5- bis 10fachen molaren Überschuss an IAPP-GI erreicht, bei einem Verhältnis von 1:1 war sie schwächer (siehe Abbildung S1 und Hintergrundinformationen).

Da die nichtnatürliche Selbstassoziation von Insulin auch zu zytotoxischen Aggregaten führt, untersuchten wir an-

schließend, ob IAPP-GI diesen Prozess ebenfalls stört.^[26] Insulinlösungen oder Mischungen von Insulin mit IAPP-GI (1:10) wurden gealtert (24 h, pH 2, 60°C) und zu Zellen der Ratteninsulinom-Zelllinie RIN5fm gegeben. Die Zellvitalitäten wurden durch den 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid(MTT)-Reduktionsassay bestimmt (Abbildung 2c,d). Es stellte sich in der Tat heraus, dass IAPP-GI die Bildung toxischer Aggregate vollständig und über einen großen Konzentrationsbereich blockiert (Faktor 100, Abbildung 2c). Die höchste inhibitorische Wirkung wurde mit einem 10fachen molaren Überschuss an IAPP-GI erzielt (Abbildung 2d), wobei sich der IC_{50} -Wert zu 205 nm ergab. Dieser Befund wurde durch die Ergebnisse zweier weiterer Assays bestätigt (siehe Abbildung S2 und Hintergrundinformationen). Diese Untersuchungen belegen somit eindeutig, dass IAPP-GI ein Inhibitor der zytotoxischen Selbstassoziation von Insulin mit einer Aktivität im nanomolaren Bereich ist.

Anschließend wurde die Insulin/IAPP-GI-Wechselwirkung mithilfe von Fern-UV-CD-Spektroskopie charakterisiert. Das CD-Spektrum von Insulin (pH 2) deutete auf eine signifikante Menge an α -helicalen Anteilen hin (Abbildung 3a).^[14,25] Das Spektrum der Mischung (1:5) sprach für die Bildung geordneter Heterokomplexe mit einem geringen

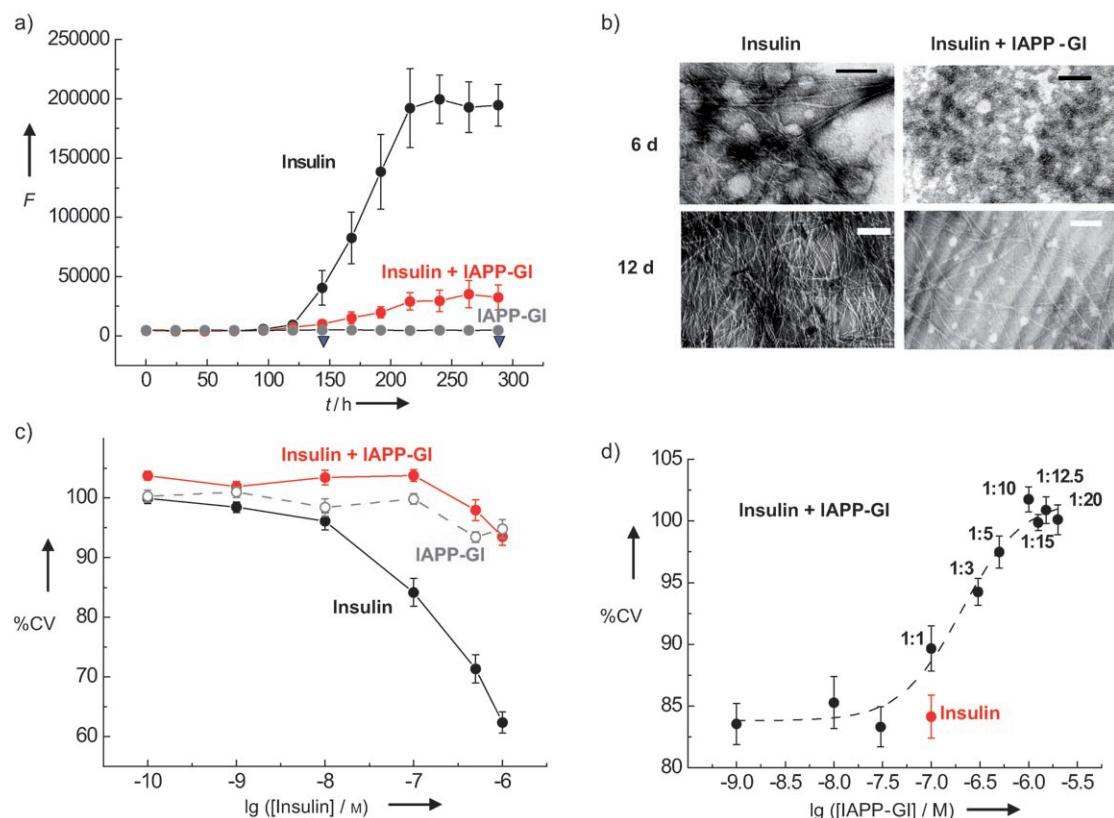


Abbildung 2. Inhibitierung der Fibrillogenese und zytotoxischen Selbstassoziation von Insulin durch IAPP-GI. a) Fibrillenbildung von Insulin, einer Insulin/IAPP-GI-Mischung und von IAPP-GI, gemessen durch den ThT-Bindungssassay (F : Fluoreszenz). Die Daten sind Mittelwerte (\pm SEM) aus drei Assays (SEM: Standardfehler des Mittelwerts). Pfeilspitzen markieren die Zeitpunkte der TEM-Analyse (Abbildung 2b). b) TEM-Messung von Insulin allein und von einer Insulin/IAPP-GI-Mischung (Inkubationen von Abbildung 2a) bei den angegebenen Zeitpunkten (Balken: 100 nm). c) Einfluss von gealtertem Insulin, einer Insulin/IAPP-GI-Mischung und IAPP-GI allein auf die Vitalität von RIN5fm-Zellen (% CV: Zellvitalität relativ zu einer Blindprobe in %). Die Daten sind Mittelwerte (\pm SEM) aus drei Assays (je $n=3$). d) Bestimmung des IC_{50} -Wertes von IAPP-GI bezüglich der Inhibition der Bildung von zytotoxischen Insulinaggregaten durch den MTT-Assay. Die Daten sind Mittelwerte (\pm SEM) aus drei Assays (je $n=3$).

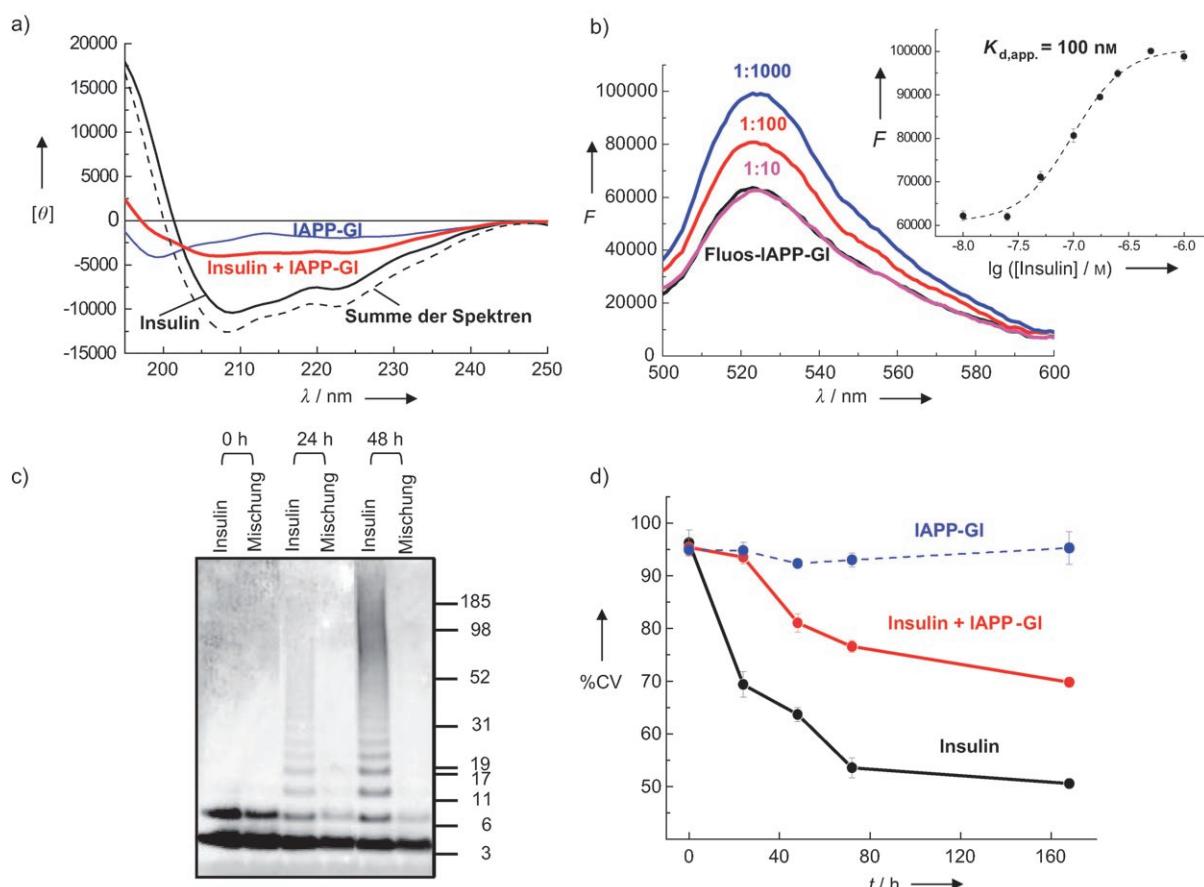


Abbildung 3. a) CD-Spektren (mittlere molare Elliptizität $[\theta]$ in $\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$) von Insulin, der Insulin/IAPP-GI-Mischung und IAPP-GI. Zusätzlich ist die Summe der Spektren von Insulin und IAPP-GI gezeigt. b) Fluoreszenzemissionsspektren von Fluos-IAPP-GI allein und nach der Titration mit Insulin (das Molverhältnis Fluos-IAPP-GI zu Insulin ist angegeben). Der Einschub zeigt die Mittelwerte ($\pm \text{SEM}$) aus drei Bindungskurven. c) Kinetik der Insulinoligomerisierung mit und ohne IAPP-GI, detektiert mittels NuPAGE-Elektrophorese und Western Blotting mit einem Anti-Insulin-Antikörper. Ein repräsentativer Blot aus drei Experimenten ist gezeigt. d) Kinetik der Entstehung von zytotoxischen Insulinspezies ($1 \mu\text{M}$) mit und ohne IAPP-GI, gemessen durch den MTT-Reduktionsassay. Insulin, die Insulin/IAPP-GI-Mischung und IAPP-GI wurden gealtert und zu den angegebenen Zeitpunkten zu RIN5fm-Zellen gegeben. Die Daten sind Mittelwerte ($\pm \text{SEM}$) aus drei Assays (je $n=3$).

ren Anteil helicaler Strukturen als bei Insulin (Abbildung 3a). N^α-aminoterminal Fluorescein-markiertes IAPP-GI (Fluos-IAPP-GI) wurde anschließend mit Insulin titriert, und Fluoreszenzemissionsspektren wurden aufgenommen.^[22–27] Ein 100facher molarer Überschuss an Insulin führte zu einer Fluoreszenzerhöhung von 61 %, und die scheinbare Dissoziationskonstante ($K_{d,app.}$) betrug (100 ± 9) nm (Abbildung 3b), ein Wert, der sehr gut mit dem ermittelten IC_{50} -Wert in Einklang war. Da Insulinlösungen im nano- bis niedrig mikromolaren Bereich hauptsächlich Monomere und Dimere enthalten, ließen diese Ergebnisse darauf schließen, dass IAPP-GI mit einer hohen Affinität Insulinmonomere und/oder -dimere bindet.^[14,15]

Als Nächstes untersuchten wir, ob IAPP-GI auch die Bildung von nichtfibrillären Insulinoligomeren und -multimeren beeinflusst.^[14,15] Die Insulinaggregation wird durch Dissoziation und partielle Entfaltung eingeleitet.^[14,15] Bei pH 2 und Raumtemperatur kommen hauptsächlich Monomere und Dimere des nativ gefalteten Insulins vor, die durch die Dissoziation nativ gefalteter Insulinhexamere entstehen. Bei höheren Temperaturen dissoziert das Dimer, und durch partielle Entfaltung entstehen fehlgefaltete Monomere, Oli-

gomere, Multimere und Fibrillen. Dabei wird angenommen, dass ein fehlgefaltetes Monomer als Vorstufe der nichtnativen Insulinaggregation benötigt wird.^[14,15] Der kinetische Verlauf der Insulinoligomerisierung wurden mithilfe der nichtreduzierenden NuPAGE-Elektrophorese und des Western Blotting untersucht. Die Insulinlösungen oder Mischungen von Insulin mit IAPP-GI (1:5) wurden (co-)inkubiert (pH 2, 60 °C) und nach verschiedenen Zeitpunkten analysiert (Abbildung 3c). Es stellte sich heraus, dass in frisch hergestellten Insulinlösungen (0 h) hauptsächlich Monomere und wenige Dimere vorlagen, nach 24 und 48 h jedoch eine signifikante Menge an Oligo- und Multimeren zu messen war. Die Insulin/IAPP-GI-Mischung dagegen bestand zu allen Zeitpunkten nur aus Monomeren und Dimeren. Dies belegt, dass IAPP-GI die Insulinoligo- und -multimerisierung unterdrückt.

Anschließend wurde die Entstehung von zellschädigenden Spezies aus zunächst nichttoxischen Insulinlösungen in Gegenwart (1:10) bzw. bei Abwesenheit von IAPP-GI untersucht (pH 2, 60 °C; Abbildung 3d sowie Abbildung S3a in den Hintergrundinformationen). Nach unseren Befunden bindet IAPP-GI „frühe“, nichtfibrilläre und nichttoxische Insulinspezies und unterdrückt ihre Umwandlung in toxische

Spezies. Die Spezifität dieser Wechselwirkung wurde durch Kontrolluntersuchungen mit dem Polypeptid Parathyroidhormon bestätigt (siehe Abbildung S4 und Hintergrundinformationen).

Da IAPP-GI eine nichtamyloidogene IAPP-Konformation nachstellt, sollte es somit auch mindestens eine nichtfibrilläre und nichttoxische IAPP-Konformation geben, die die Insulinselbstassoziation stört.^[22] Tatsächlich ergaben unsere Untersuchungen, dass nichtfibrilläres IAPP Insulin mit einem $K_{d,app}$ von (142 ± 34) nm bindet und dass es die Insulinselbstassoziation deutlich, wenn auch weniger stark als IAPP-GI inhibiert (siehe Abbildung S5 und Hintergrundinformationen). Ein weiteres Ergebnis unserer Untersuchungen ist, dass eine konformationsspezifische Wechselwirkung zwischen präfibrillären und nichttoxischen IAPP- und Insulinspezies – höchstwahrscheinlich Monomeren und Dimeren – zur Unterdrückung der Selbstassoziations- und Fibrillierungsprozesse beider Polypeptide führt (siehe Abbildung S6 und S7 und Hintergrundinformationen).

Als Letztes griffen wir die entscheidende Frage auf, ob die Wechselwirkung zwischen IAPP-GI (oder IAPP) und Insulin die Wirkung von Insulin auf seine Zielzellen beeinflusst. Die Bioaktivität von Insulin wird über die Bindung von monomerem Insulin an den Insulinrezeptor (IR) vermittelt.^[28,29] Darauf folgt die physiologische Signalübertragung über eine Kaskade von Protein-Protein-Wechselwirkungen und Phosphorylierungen.^[28–30] Beim ersten Phosphorylierungsschritt, direkt nach der Bindung von Insulin an seinen Rezeptor, wird dessen β -Untereinheit (IR β) autophosphoryliert.^[29,30] Wir untersuchten daher an einer humanen, IR exprimierenden Brustkrebszelllinie, ob die von Insulin induzierte IR-Autophosphorylierung von IAPP-GI (oder IAPP) beeinflusst wird.^[31,32] In allen Fällen wiesen die behandelten Zellen den gleichen Gehalt an phosphoryliertem IR β auf (Abbildung 4 und nicht gezeigte Daten). Diese Ergebnisse wurden durch eine weitere Studie zur Aktivierung von Akt belegt (siehe Abbildung S8 und Hintergrundinformationen). Daraus folgt, dass die Wechselwirkung von IAPP-GI (oder IAPP) mit Insulin keinen Einfluss auf dessen biologische Aktivität hat.

Wir haben somit eine neue chemische Strategie zur Inhibition der Aggregation von bioaktiven oder therapeutisch genutzten Polypeptiden vorgestellt, die biologische Funktionen der Zielproteine nicht beeinträchtigt. Dabei wird die

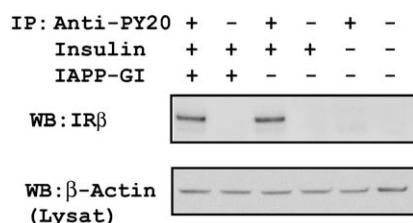


Abbildung 4. Humane, IR exprimierende Brustkrebszellen wurden mit Insulin, mit Mischungen aus Insulin und IAPP-GI (1:10), mit IAPP-GI oder mit Puffer behandelt. Die phosphorylierten Proteine wurden mit einem Anti-Phosphotyrosin-Antikörper (Anti-PY20) immunopräzipitiert (IP), und IR β wurde mittels Western-Blot-Analyse (WB) mit einem Anti-IR β -Antikörper (Anti-IR β) nachgewiesen. Die gleichen Mengen an zellulären Proteinen wurden bei jeder Probe verwendet (siehe β -Actin-WB). Ein repräsentativer Blot aus drei Experimenten ist gezeigt.

Aggregation durch das Nachahmen einer nativen Amyloid-Kreuzwechselwirkung unterbunden. Unser Befund, dass IAPP-GI, ein gezielt entworfenes Peptid, das eine nichtamyloidogene Konformation von IAPP nachahmt, mit einer Affinität im nanomolaren Bereich die nichtnatürliche Insulinaggregation unterbindet, ohne dabei dessen Funktion zu beeinflussen, untermauert die Validität dieser Inhibierungsstrategie (Abbildung 5a). Darüber hinaus weisen unsere Untersuchungen auf eine mögliche neue Funktion der Insulin/IAPP-Wechselwirkung hin, die bisher nur als eine Wechselwirkung bekannt war, die die IAPP-Fibrillogenese inhibiert (Abbildung 5b,c).^[5,6] Interessanterweise erinnert die hier vorgeschlagene hochaffine Insulin/IAPP-Heteroassoziation, die die Selbstassoziation beider Polypeptide unterdrückt, stark an die Wechselwirkung zwischen dem β -Amyloidpeptid (A β) der Alzheimer-Krankheit (AD) und IAPP.^[7] Unsere Befunde stützen die Hypothese, dass Amyloid-Kreuzwechselwirkungen vor der pathophysiologischen In-vivo-Selbstassoziation von diesen drei – und möglicherweise auch anderen – amyloidogenen Polypeptiden schützen.^[7] Falls solche funktionellen Kreuzwechselwirkungen tatsächlich in vivo existieren, würden sie wichtige Verbindungen auf molekularer Ebene zwischen AD und T2D darstellen.^[7,33]

IAPP-GI inhibiert nicht nur die Insulinaggregation, sondern unterbindet auch die IAPP-Selbstassoziation im nanomolaren Bereich. Des Weiteren ist IAPP-GI ein lösliches und nichttoxisches IAPP-Analogon, das als IAPP-Rezeptoragonist fungieren kann.^[22] Lösliche IAPP-Analoga und -Rezeptoragonisten wurden vor kurzem für die Behandlung von T2D zusammen mit Insulin zugelassen.^[34,35] Der Einsatz von IAPP-GI oder ähnlichen Substanzen könnte deren gute Löslichkeit und IAPP-ähnliche erwünschte Funktion als Glucoseregulator mit der wirksamen Inhibition der In-vivo-IAPP-Amyloidogenese bei T2D und der In-vitro-Insulinaggregation kombinieren, ohne dabei die Funktion von Insulin zu beeinträchtigen.^[11,22,34] Ob solche multifunktionellen Stoffe bei der Behandlung von T2D nützlich sein könnten, muss durch weiterführende Untersuchungen gezeigt werden.

Die Tatsache, dass IAPP-GI auch die zytotoxische Selbstassoziation von A β 40 im nanomolaren Bereich blockiert,^[7] macht dieses Molekül zudem zu einem vielversprechenden Kandidaten bei der Entwicklung von AD-Therapeutika.^[7] Da IAPP die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann, ist dies auch für IAPP-GI zu erwarten, was ein Eingreifen in die A β 40-Aggregation in- und außerhalb des zentralen Nervensystems erlauben würde.^[36,37]

IAPP-GI ist bisher der einzige bekannte Peptidabkömmling, der drei verschiedene amyloidogene Polypeptide, die zudem amyloidogene „Schlüsselmoleküle“ bei AD und T2D sind, mit nanomolarer Affinität bindet und ihre zytotoxische Selbstassoziation und Fibrillogenese inhibiert. Da diesen Krankheiten vermutlich ähnliche molekulare und pathologische Prozesse zugrunde liegen,^[33,38,39] ihr Eintreten mit steigendem Alter wahrscheinlicher wird und T2D-Patienten ein erhöhtes Risiko haben, an AD zu erkranken, und umgekehrt, könnte IAPP-GI als eine einzigartige Leitstruktur für die Entwicklung neuer Medikamente und therapeutischer Konzepte gegen beide Krankheiten genutzt werden.^[33,38,39] Darüber hinaus könnte die hier vorgestellte

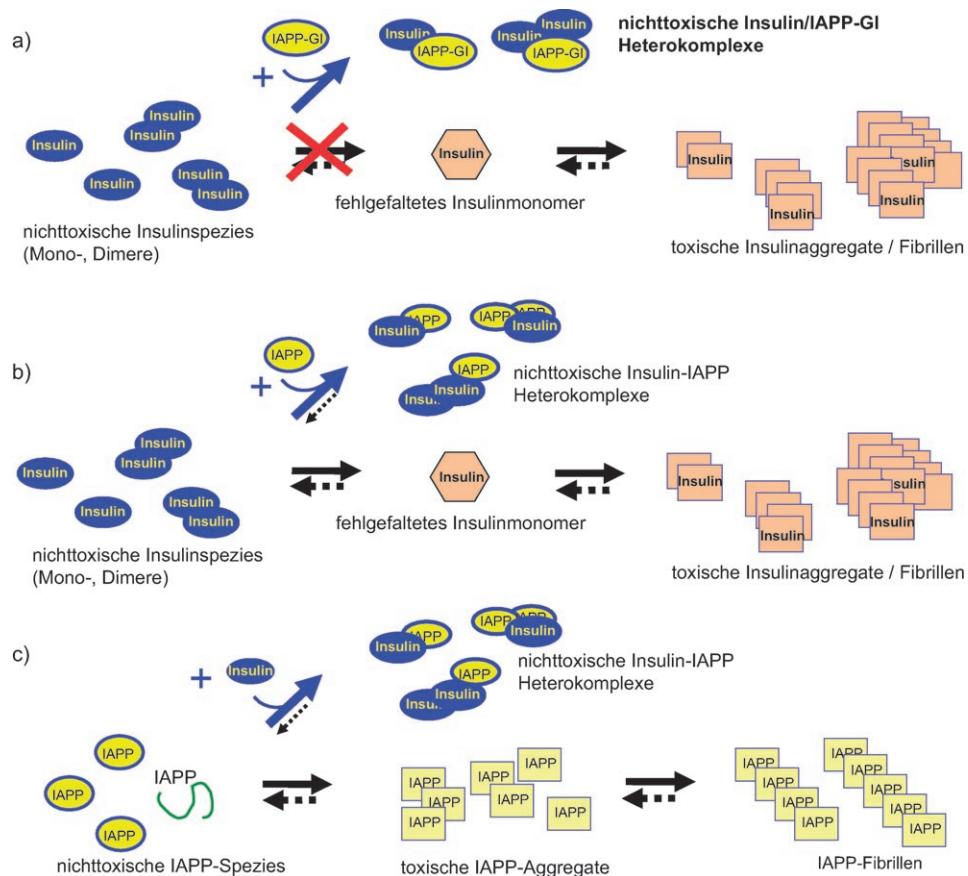


Abbildung 5. Vorgeschlagener Mechanismus der Wechselwirkung von Insulin mit IAPP-GI und einem nichttoxischen IAPP-Konformen. a) IAPP-GI bindet mit hoher Affinität an nichtfibrilläre und nichttoxische Insulinspezies – möglicherweise nativ gefaltete Monomere und/oder Dimere – und unterbindet so die Fehlfaltung und Selbstassoziation von Insulin. b) Ein nichtfibrilläres und nichttoxisches IAPP-Konformen – möglicherweise ein Monomer – bindet mit hoher Affinität an nichtfibrilläre und nichttoxische Insulinspezies (siehe unter (a)), was die Fehlfaltung und Aggregation von Insulin unterdrückt. c) Die Wechselwirkung von nichtfibrillären und nichttoxischen Insulin- und IAPP-Spezies – möglicherweise Monomeren und/oder Dimeren – unterdrückt die zytotoxische Selbstassoziation und Fibrillogene von IAPP.

Strategie zur Entwicklung von Inhibitoren der Proteinaggregation, die die Proteinfunktion nicht beeinflussen, auch bei anderen zur Aggregation neigenden Polypeptiden und Proteinen Anwendung finden.

Eingegangen am 30. März 2008,
veränderte Fassung am 11. Juni 2008
Online veröffentlicht am 8. August 2008

Stichwörter: Diabetes · Inselamyloid-Polypeptid · Insulin · Proteinaggregation · Proteindesign

- [1] P. Westermark, *FEBS J.* **2005**, 272, 5942–5949.
- [2] F. Chiti, C. M. Dobson, *Annu. Rev. Biochem.* **2006**, 75, 333–366.
- [3] M. Stefani, C. M. Dobson, *J. Mol. Med.* **2003**, 81, 678–699.
- [4] L. Liu, R. M. Murphy, *Biochemistry* **2006**, 45, 15702–15709.
- [5] P. Westermark, Z.-C. Li, G. Westermark, A. Leckström, D. Steiner, *FEBS Lett.* **1996**, 379, 203–206.
- [6] S. Gilead, H. Wolfson, E. Gazit, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 6626–6630; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 6476–6480.
- [7] L. M. Yan, A. Velkova, M. Tatarek-Nossol, E. Andreetto, A. Kapurniotu, *Angew. Chem.* **2007**, 119, 1268–1274; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 1246–1252.
- [8] J. N. Buxbaum, Z. Ye, N. Reixach, L. Friske, C. Levy, P. Das, T. Golde, E. Masliah, A. R. Roberts, T. Bartfai, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, 105, 2681–2686.
- [9] J. Zurdo, *Protein Pept. Lett.* **2005**, 12, 171–187.
- [10] E. Y. Chi, S. Krishnan, T. W. Randolph, J. F. Carpenter, *Pharm. Res.* **2003**, 20, 1325–1336.
- [11] G. Walsh, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, 67, 151–159.
- [12] J. Brange, L. Andersen, E. D. Laursen, G. Meyn, E. Rasmussen, *J. Pharm. Sci.* **1997**, 86, 517–525.
- [13] L. Nielsen, S. Frokjaer, J. Brange, V. N. Uversky, A. L. Fink, *Biochemistry* **2001**, 40, 8397–8409.
- [14] Q. Hua, M. A. Weiss, *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 21449–21460.
- [15] R. Jansen, W. Dzwolak, R. Winter, *Biophys. J.* **2005**, 88, 1344–1353.
- [16] P. Westermark, C. Wernstedt, E. Wilander, D. W. Hayden, T. D. O'Brien, K. H. Johnson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, 84, 3881–3885.
- [17] R. L. Hull, G. T. Westermark, P. Westermark, S. E. Kahn, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2004**, 89, 3629–3643.
- [18] A. Kapurniotu, *Biopolymers* **2001**, 60, 438–459.
- [19] S. J. Wimalawansa, *Crit. Rev. Neurobiol.* **1997**, 11, 167–239.
- [20] E. T. Jaikaran, M. R. Nilsson, A. Clark, *Biochem. J.* **2004**, 377, 709–716.
- [21] J. L. Larson, A. D. Miranker, *J. Mol. Biol.* **2004**, 335, 221–231.
- [22] L. M. Yan, M. Tatarek-Nossol, A. Velkova, A. Kazantzis, A. Kapurniotu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, 103, 2046–2051.

- [23] X. Huang, W. Miller, *Adv. Appl. Math.* **1991**, *12*, 337–357.
- [24] H. LeVine III in *Methods in Enzymology: Amyloids, Prions, and other Protein Aggregates*, Vol. 309 (Hrsg.: R. Wetzel), Academic Press, San Diego, **1999**, S. 274–284.
- [25] S. Grudzianek, R. Jansen, R. Winter, *J. Mol. Biol.* **2005**, *351*, 879–894.
- [26] S. Grudzianek, A. Velkova, A. Shukla, V. Smirnovas, M. Tarek-Nossol, H. Rehage, A. Kapurniotu, R. Winter, *J. Mol. Biol.* **2007**, *370*, 372–384.
- [27] M. R. Eftink in *Methods in Enzymology: Fluorescence Spectroscopy*, Vol. 278 (Hrsg.: L. Brand, M. L. Johnson), Academic Press, San Diego, **1997**, S. 221–257.
- [28] F. P. Ottensmeyer, D. R. Beniac, R. Z.-T. Luo, C. C. Yip, *Biochemistry* **2000**, *39*, 12103–12112.
- [29] B. Cheatham, C. R. Kahn, *Endocr. Rev.* **1995**, *16*, 117–142.
- [30] F. H. Nystrom, M. J. Quon, *Cell. Signalling* **1999**, *11*, 563–574.
- [31] L. Sepp-Lorenzino, N. Rosen, D. E. Lebwohl, *Cell Growth Differ.* **1994**, *5*, 1077–1083.
- [32] L. Simpson, J. Li, D. Liaw, I. Hennessy, J. Oliner, F. Christians, R. Parsons, *Mol. Cell Biol.* **2001**, *21*, 3947–3958.
- [33] M.-K. Sun, D. L. Alkon, *Drugs Today* **2006**, *42*, 481–489.
- [34] O. Schmitz, B. Brock, J. Rungby, *Diabetes* **2004**, *53s3*, 233–238.
- [35] M. C. Jones, *Am. Fam. Physician* **2007**, *75*, 1831–1835.
- [36] W. A. Banks, A. J. Kastin, L. M. Maness, W. Huang, J. B. Jaspan, *Life Sci.* **1995**, *57*, 1993–2001.
- [37] F. Bard, C. Cannon, R. Barbour, R. Burke, D. Games, H. Grajeda, T. Guido, K. Hu, R. Motter, N. Vasquez, *Nat. Med.* **2000**, *6*, 916–919.
- [38] L. Li, C. Hölscher, *Brain Res. Rev.* **2007**, *56*, 384–402.
- [39] S. G. Watson, S. Craft, *CNS Drugs* **2003**, *17*, 27–45.