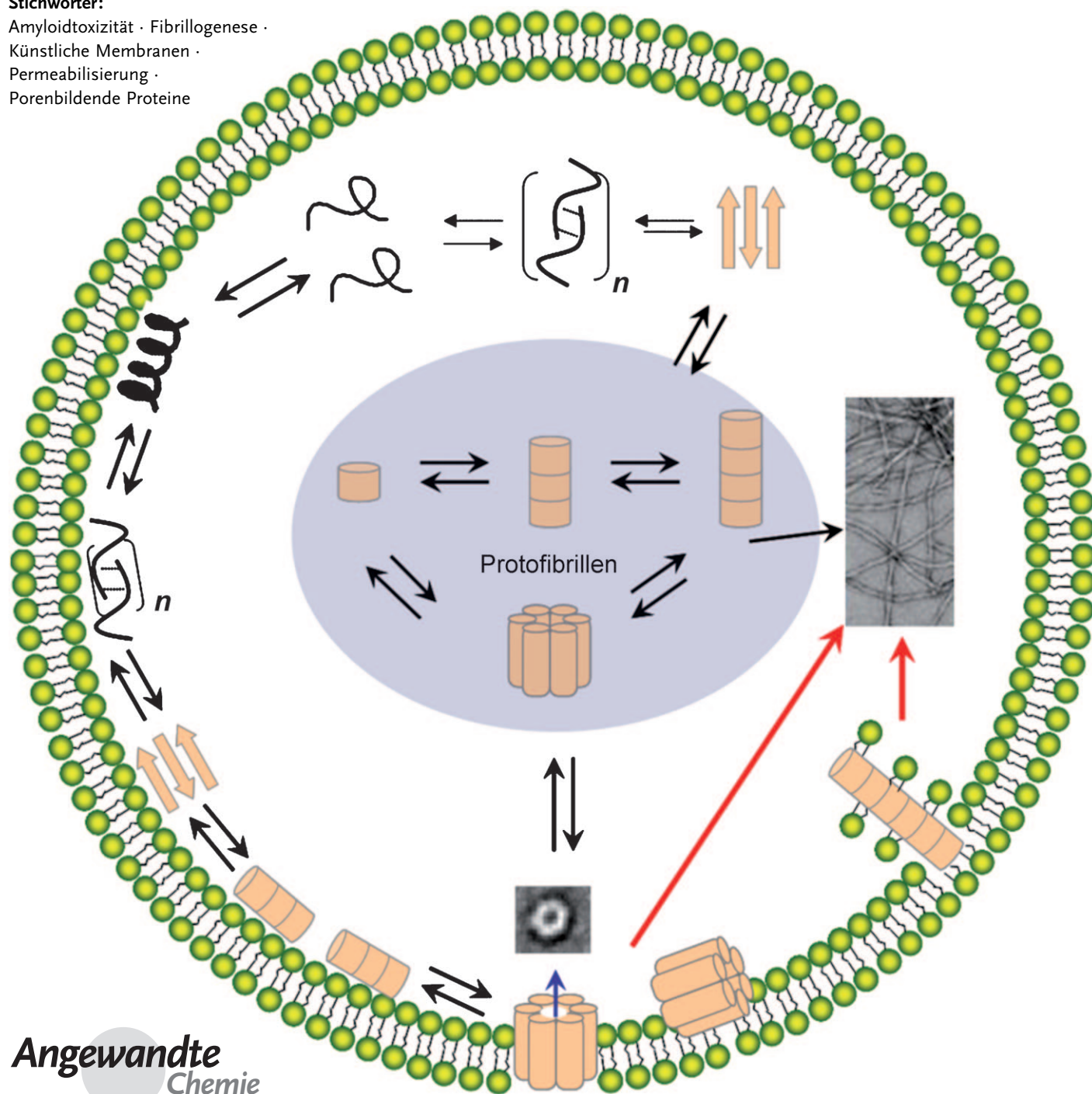


Wechselwirkungen zwischen amyloidogenen Proteinen und Membranen: Modellsysteme liefern mechanistische Einblicke

Sara M. Butterfield und Hilal A. Lashuel*

Stichwörter:

Amyloidtoxizität · Fibrillogenese · Künstliche Membranen · Permeabilisierung · Porenbildende Proteine



Die Toxizität amyloidbildender Proteine ist mit ihrer Wechselwirkung mit Membranen korreliert. Bemerkenswerterweise führen Bindungsereignisse zwischen amyloidogenen Proteinen und Membranen beiderseits zu Strukturstörungen, die mit Toxizität assoziiert sind. Membranoberflächen vermitteln die Umwandlung amyloidbildender Proteine in toxische Aggregate, amyloidbildende Proteine wiederum beeinträchtigen die strukturelle Integrität der Zellmembran. Neuere Untersuchungen an künstlichen Modellmembranen haben eine bemerkenswerte Ähnlichkeit im Mechanismus der Membranpermeabilisierung von amyloidbildenden Proteinen, porenbildenden Toxinen und antimikrobiellen Peptiden aufgezeigt.

1. Einleitung

Die Alzheimer-Krankheit (AD), die Parkinson-Krankheit (PD), Diabetes mellitus vom Typ II und zahlreiche andere altersbedingte neurodegenerative und systemische Funktionsstörungen sind Krankheiten, die sich auf eine Fehlfaltung von Proteinen zurückführen lassen und durch die Anreicherung unlöslicher Proteinablagerungen gekennzeichnet sind. Diese Proteinablagerungen setzen sich zusammen aus fibrillären Aggregaten, oder Amyloiden, die reich sind an β -Faltblattstrukturen und aus einem einzigen Protein bestehen. Das Amyloid-beta(A β)-Peptid ist der Hauptbestandteil seniler Plaques im Gehirn von Alzheimerpatienten.^[1] In gleicher Weise sind Fibrillen aus α -Synuclein der Hauptbestandteil neuronaler Einschlüsse, oder Lewy-Körper, die man im Gehirn von Parkinsonpatienten findet.^[2] Darüber hinaus ist die Pathologie des Diabetes mellitus Typ II gekennzeichnet durch eine extrazelluläre Anreicherung von Amyloidplaques, die hauptsächlich aus Amylin (auch Insel-Amyloid-Polypeptid, IAPP) bestehen und sich nahe der Betazellen des Pankreas ablagnern.^[3]

Amyloidogene Proteine, darunter A β , IAPP und α -Synuclein, werden als lösliche Proteine gebildet und dann in lösliche Oligomere mit β -Faltblattstruktur (z. B. Dimere, Trimere) und niedrigerem Molekulargewicht überführt. Die weitere Proteinanreicherung führt zu protofibrillären Oligomeren mit höherem Molekulargewicht und letztendlich zu unlöslichen Fibrillen, aus denen die Amyloidplaques bestehen (Schema 1). Oligomere mit niedrigem und höherem Molekulargewicht bezeichnet man als präfibrilläre Aggregate.

Immer mehr Hinweise stützen die Hypothese, dass diese präfibrillären Intermediate und nicht die voll entwickelten Amyloidfibrillen die primär toxische Spezies sind, die pathologische Prozesse auslösen.^[4] Bemerkenswerte Ergebnisse zeigen, dass oligomere Formen von A β für primäre Neuronen toxisch sind, die hippokampale Langzeitpotenzierung inhibieren und Gedächtnisschwäche in Ratten- oder Maus-Modellsystemen verursachen.^[5] Diese Ergebnisse führten zur so genannten „Hypothese toxischer Oligomere“.^[4c,6] Die ähnlichen morphologischen und toxikologischen Eigenschaften protofibrillärer Aggregate, die sich von verschiedenen amyloidbildenden Proteinen ableiten, legen nahe, dass der Pa-

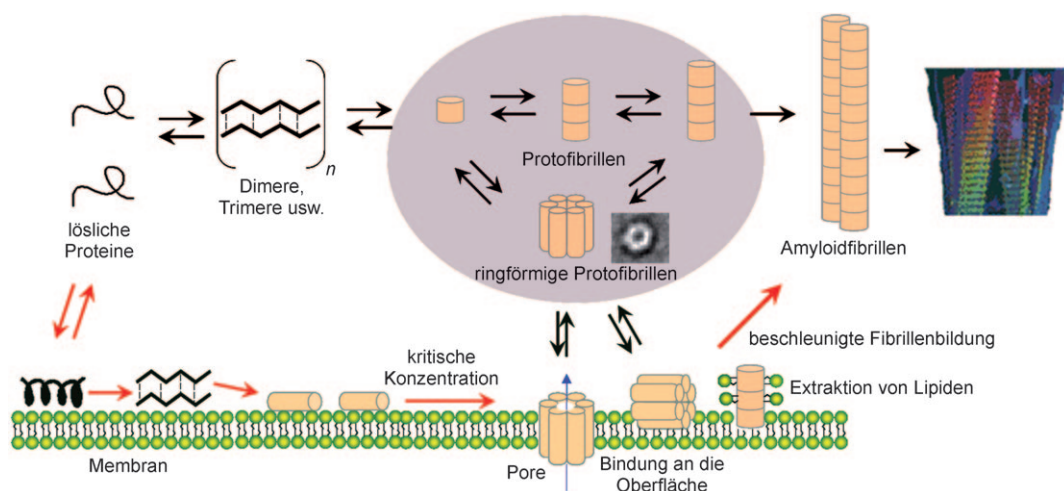
Aus dem Inhalt

1. Einleitung	5761
2. Proteinfehlfaltung und Fibrillbildung an Membranoberflächen	5763
3. Mechanismen der amyloidvermittelten Membranpermeabilisierung	5768
4. Membranmodelle und experimentelle Methoden zur Untersuchung der Mechanismen der Protein-induzierten Membranpermeabilisierung	5775
5. Zusammenfassung und Ausblick	5784

thogenese amyloidbedingter Krankheiten gemeinsame Mechanismen der Aggregation und Toxizität zugrunde liegen.^[7] Dennoch ist wahrscheinlich nicht nur ein einziger Mechanismus für den Beginn der Neurodegeneration verantwortlich, sondern vielmehr das Zusammenspiel vieler. Nichtsdestotrotz gibt es immer mehr Hinweise darauf, dass die Zellmembran der Angriffsort oligomerer Formen amyloidogener Proteine ist.^[7,8]

Biophysikalische Untersuchungen und mechanistische Studien mit vereinfachten Membranmodellsystemen haben wesentlich zu unserem elementaren Verständnis der Interaktionen zwischen amyloidbildenden Proteinen und Membranen beigetragen. Bemerkenswerterweise zeigten die Untersuchungen, dass diese Interaktionen zwischen amyloidbildenden Proteinen und Membranen zu gegenseitigen Strukturstörungen sowohl des Proteins als auch der Membran führen.^[9] Einerseits können Membranoberflächen je nach ihrer chemischen Zusammensetzung als katalytische Stellen dienen, an denen die fehlerhafte Faltung und Aggregation amyloidogener Proteine begünstigt wird (Schema 1).^[10] Andererseits stören amyloidogene Proteine die strukturelle Integrität der Membran, wodurch die unregelmäßige Passage kleiner Moleküle und Ionen durch die Membran möglich wird (Schema 1).^[4a,b,11] Extrapolation dieser Ergebnisse hin zur Situation in vivo deutet auf einen Verlust kritischer Ionengradienten der Membran und eine Depolarisation der Zellmembran als Reaktion auf die Wechselwirkung mit oligomeren Strukturen amyloidogener Proteine hin. Der genaue Mechanismus der Membranpermeabilisierung durch amyloidogene Proteine ist noch nicht vollständig verstanden, aber

[*] Dr. S. M. Butterfield, Prof. H. A. Lashuel
Laboratory of Molecular Neurobiology and Neuroproteomics
Swiss Federal Institute of Technology Lausanne (EPFL)
SV-BMI-LMNN-AI2351, 1015 Lausanne (Schweiz)
E-Mail: hilal.lashuel@epfl.ch



Schema 1. Zusammenhänge zwischen Amyloidbildung und Membranstörung/-zersetzung. Oben: Die Bildung von Amyloidfibrillen geht einher mit der Fehlfaltung löslicher Proteine zu β -Faltblatt-Oligomeren, die sich weiter zu Protofibrillen, darunter auch ringähnlichen (annularen) Protofibrillen und entwickelten Amyloidfibrillen zusammenlagern. Unten: Die Rolle der Membranen bei der Amyloidbildung und deren Toxizität. Lösliche Proteine binden an die Membranoberfläche und wechseln in eine α -Helix-Struktur. Akkumulation der Proteine an der Membranoberfläche induziert die Oligomerisierung zu β -Faltblatt-Aggregaten. Wird eine kritische Grenzkonzentration erreicht, bildet sich eine transmembrane Pore (annuläre Protofibrille) in der Membran, wodurch ein Auslaufen des Membranınhalts möglich wird. Nach einem anderen möglichen oder koexistenten Mechanismus können sich in Lösung gebildete annuläre Protofibrillen in die Membran einlagern, undefinierte präfibrilläre Aggregate an die Membranoberfläche binden und ein Ausdünnen der Membran induzieren, und/oder Lipide können von der Membran extrahiert und in die sich entwickelnden Fibrillen in einem detergensartigen Prozess eingelagert werden.

experimentelle Ergebnisse führten zu mehreren mechanistischen Modellen. Hinweise auf transmembrane oligomere Poren, die an porenbildende Toxine erinnern,^[7b,12] die unspezifische Bindung amyloidogener Oligomere an die Membranoberfläche^[4a,b] und eine Auflösung der Membranen durch Amyloidfibrillen, die auf der Membranoberfläche wachsen,^[13] wurden jeweils experimentell untermauert (Schema 1).

Trotz der steigenden Zahl von Berichten, die die Toxizität eines Amyloidproteins mit seiner Wirkung auf die Membranintegrität in Verbindung bringen, besteht eine Wissenslücke bezüglich der molekularen Details, wie amyloidbildende Proteine auf die Membran wirken und dadurch die Membranpermeabilisierung bewirken. Offen bleiben auch andere Fragen dahingehend, wie der Permeabilisierungsmechanismus in Abhängigkeit vom Oligomerisationszustand und der Identität des Proteins variiert und wie die Membran selbst an der Bildung der oligomeren Spezies des Proteins beteiligt ist und so ihren eigenen Strukturzusammenbruch herbeiführt.

Ein Ziel dieses Aufsatzes ist, neuere Literatur zusammenzufassen und Ergebnisse hervorzuheben, die anhand von Modellsystemen zum Verständnis der molekularen Prozesse beigetragen haben, mittels derer: 1) Membranoberflächen die Faltung, Oligomerisierung und Fibrillenbildung amyloidogener Proteine beeinflussen und 2) diese oligomeren Proteine die Membranstruktur stören. Weiterhin stellen wir die derzeitigen mechanistischen Modelle, die die Amyloid-induzierte Membranpermeabilisierung erklären, sowie die sie stützenden oder ihnen widersprechenden experimentellen Ergebnisse vor. Auch sollen die verschiedenen Membranmodellsysteme und experimentellen Hilfsmittel vorgestellt werden, die zur Verfügung stehen, um die Wechselwirkungen zwischen amyloidogenen Proteinen und Membranen zu untersuchen und damit die wichtigsten mechanistischen Aspekte weiter zu entschlüsseln, die der Cytotoxizität zugrunde liegen.

In diesem Aufsatz werden hauptsächlich Ergebnisse vorgestellt, die in den letzten Jahren (2006–2009) mit A β , α -Synuclein und IAPP erhalten wurden. Diese Proteine wurden



Sara M. Butterfield promovierte 2004 in Bioorganischer Chemie an der UNC Chapel Hill und arbeitet zurzeit als Research Fellow in der Arbeitsgruppe von Prof. H. Lashuel. Ihre Forschungsinteressen liegen in der Entwicklung chemischer und physikalischer Ansätze zur Kontrolle von Proteinfehlfaltungen zur Aufklärung der molekularen Grundlagen neurodegenerativer Erkrankungen.



Hilal A. Lashuel promovierte im Jahr 2000 an der Texas A&M University. 2001 wechselte er an das Center for Neurologic Diseases der Harvard Medical School, zuerst als Research Fellow, später als „Instructor of Neurology“. 2005 wechselte er als Assistant Professor zum Brain Mind Institute am Swiss Federal Institute of Technology in Lausanne. Seine Forschungsinteressen gelten der Proteinfibrillogenese und ihrer Rolle in neurodegenerativen Erkrankungen.

aufgrund der Fülle an aktuellen Ergebnissen und wegen ihrer essentiellen Rolle in den Krankheitsbildern von Alzheimer, Parkinson und Diabetes mellitus Typ II ausgewählt. In geringerem Detail stellen wir auch Ergebnisse über Prionproteine vor, besonders wenn mechanistische Analogien zu amyloidbildenden Proteinen bestehen. Die hier vorgestellten Untersuchungen wurden vornehmlich mit vereinfachten Membranmodellen durchgeführt, in denen das komplexe Zusammenspiel der molekularen Mechanismen, das den wechselseitigen Strukturstörungen zugrunde liegt, in einer relativ kontrollierten und systematischen Weise aufgeklärt werden kann.

Wir hoffen, mit diesem Aufsatz einen umfangreichen Überblick über den derzeitigen Wissensstand zum Mechanismus, über den amyloidogene Proteine auf Membranen wirken, geben zu können und so weitere Arbeiten auf diesem Gebiet anzuregen, damit noch bestehende Wissenslücken geschlossen werden können. Ein besseres Verständnis der Mechanismen der toxischen Aktivität amyloidbildender Proteine auf Membranen ist entscheidend für ein besseres elementares Verständnis Amyloid-bedingter Krankheiten und der Entwicklung benötigter Präventions- und Therapie-strategien.

2. Proteinfehlfaltung und Fibrillbildung an Membranoberflächen

In zahlreichen Studien wurde gezeigt, dass Lipidmembranen die Umwandlung amyloidogener Proteine in fehlgefaltete toxische Aggregate beschleunigen oder sogar katalysieren können.^[9] Wenn man bedenkt, dass Amyloidproteine und Lipide amphipathische Strukturen haben, ist die Assoziation von Amyloidproteinen an Membranoberflächen ein konzeptionell naheliegendes Szenario. Für kationische Proteine wie A β und IAPP und die N-terminale Membranbindungsregion von α -Synuclein^[14] wird der anfängliche Bindungsvorgang vornehmlich angetrieben durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen basischen Seitenketten und anionischen Lipidkopfgruppen.^[10b] Weitere hydrophobe Kontakte mit verdeckten Acylketten sowie die folgende Proteinakkumulation an der Membranoberfläche erhöhen die lokale Proteinkonzentration und erleichtern so den Aggregationsprozess.^[10b] Deswegen können Membranen, je nach ihrer Zusammensetzung und ihren chemischen Eigenschaften, als Templat für die Fehlfaltung amyloidogener Proteine und ihre Anordnung zu Fibrillen dienen.^[10a] In diesem Abschnitt geben wir einen Überblick über die neuesten Untersuchungen mit Membran-Modellsystemen zur Rolle von Lipidmembranen als Templat bei der Bildung toxischer Aggregate und Amyloidfibrillen.^[9]

2.1. Fibrillogenese durch Nukleation/Polymerisation und mögliche Mechanismen Membran-unterstützter Aggregation

Ohne Katalyse folgen Amyloidproteine einem Nukleations-Polymerisations-Mechanismus, der durch eine anfängliche Latenzphase mit vornehmlich monomeren Bestandtei-

len charakterisiert ist. Der Latenzphase folgt ein ungünstiger Konformationswechsel hin zu einer β -Faltblattstruktur und die Zusammenlagerung von Monomeren zu einem oligomeren „Nukleus“, von dem sich wiederum mehrere zu Protofibrillen höherer Ordnung zusammenfügen (Abbildung 1).^[15]

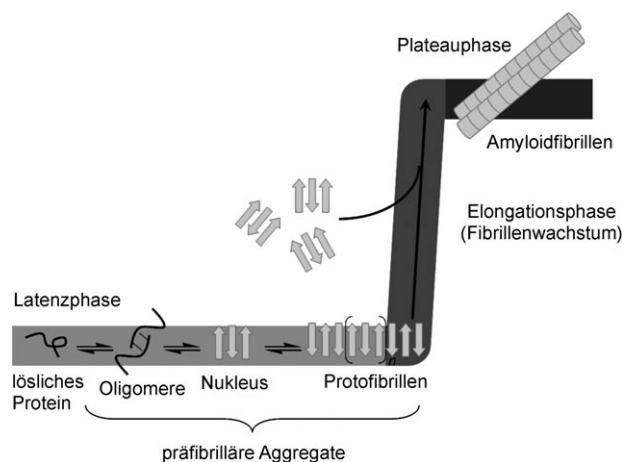


Abbildung 1. Nukleations-/Polymerisations-Weg der Amyloid-Fibrillogenese (nach Wilson et al.).^[20]

Der Nukleus vergrößert sich dann kooperativ und schnell durch Monomeraddition an das wachsende Proteinpolymer, wobei der kinetische Verlauf dieses Prozesses durch eine sigmoidale Kurve gekennzeichnet ist (Abbildung 1).^[16] In vitro erfolgt die Nukleation von A β oberhalb dessen kritischer Micellenkonzentration (CMC), die je nach Länge des Peptids im Bereich von 17.5 bis 100 μ M liegt.^[17] Tatsächlich liegt die physiologische Konzentration von A β Größenordnungen unter diesem Level, so etwa in der Rückenmarksflüssigkeit im subnanomolekularen Bereich.^[18] Dies legt nahe, dass die Fibrillogenese von A β , ebenso wie die von anderen amyloidogenen Proteinen, in vivo einem anderen Mechanismus folgt. Hierbei handelt es sich möglicherweise um einen templatunterstützten Mechanismus, bei dem Bestandteile der lokalen Umgebung die Aktivierungsbarriere für die Nukleation herabsetzen. Daten von Modellsystemen deuten darauf hin, dass die Zellmembran ein wahrscheinlicher Kandidat für die Katalyse der Fibrillbildung ist,^[10,19] wobei die Bindung des Proteins an die Membranoberfläche als Plattform für die Nukleation und weitere Polymerisation dient.^[10b]

Es werden mehrere mögliche Mechanismen vorgeschlagen, nach denen die Bindung an die Membranoberfläche die Fehlfaltung und Aggregation von Proteinen erleichtern kann. Die Adsorption der ungefalteten amphipathischen Peptide an die Membranoberfläche könnte die Konformation des Peptids fixieren (dessen Entropie verringern) und so eine strukturelle Ordnung vermitteln, wodurch die Bildung der Sekundärstruktur induziert würde.^[21] Der Einfluss von Membranen auf die Bildung von Regionen lokal konzentrierter Proteine wird auch als „molecular crowding“-Effekt bezeichnet.^[22] Gröbner und Mitarbeiter untersuchten vor kurzem den Einfluss des „molecular crowding“ auf Konformationsänderungen von A β in Gegenwart von Modell-

membranoberflächen. Durch Einführung von Ficoll 70, einem großen neutralen „Crowding“-Polymer, konnte der Übergang der Konformation von Vesikel-gebundenem A β in eine β -Faltblattstruktur begünstigt werden.^[23]

Neben der Erhöhung der lokalen Proteinkonzentrationen wurden noch andere Faktoren vorgeschlagen, die in der membranvermittelten Fibrillogenese eine Rolle spielen könnten. Eine verringerte Dielektrizitätskonstante des Mediums, die von der Mikroumgebung der Membranoberfläche hervorgerufen wird, kann die Bildung von Peptid-Peptid-Wasserstoffbrücken im β -Faltblatt-Aggregat erleichtern.^[24] Die Verminderung der Dimensionalität von drei Dimensionen in Lösung zu näherungsweise zwei Dimensionen an der Membrangrenzfläche kann auch räumliche Beschränkungen einführen, die die Fibrillbildung begünstigen können.^[22]

2.2. Membranbindungsregionen für A β , IAPP und α -Synuclein sowie die Rolle α -helicaler Intermediate

Die membranvermittelte Proteinfehlfaltung und Fibrillbildung verläuft in vielen Fällen über α -helicale Intermediate (Schema 1).^[25] In Abhängigkeit vom relativen Peptid/Lipid-Anteil^[11b] wechseln sowohl A β ,^[26] IAPP^[27] als auch α -Synuclein^[28] zu einer α -helicalen Struktur nach Bindung an die Membran. Dies erscheint als ein unproduktiver Weg hinsichtlich der Fibrillbildung.^[21] Selbst in einem α -helicalen Zustand wird jedoch das Verankern der aggregationsempfindlichen Peptide an die Membranoberfläche nichtsdestotrotz die lokale Proteinkonzentration in der direkten Mikroumgebung erhöhen und damit einen Konformationswechsel zu einer β -Faltblattstruktur und Proteinaggregation begünstigen.^[10b,25] Der Konformationswechsel von einem freien Zufallsknäuel in Lösung zu einer membrangebundenen α -Helix hin zu einem β -Faltblatt-Aggregat durch die Alterung der Probe wurde für A β ^[26a] und IAPP beschrieben.^[27b,29] Dies deutet darauf hin, dass ein Mechanismus der membranvermittelten Fibrillogenese zugrundeliegt. Die Existenz von α -helicalen Zuständen, die vor der β -Faltblatt-Bildung durchlaufen werden, wurde auch bei der Fibrillbildung von A β und IAPP in Lösung (also von nicht-membrangebundenen Peptiden) gefunden.^[25,27a,30] Im Folgenden präsentieren wir den aktuellen Wissensstand bezüglich der Strukturen membrangebundener α -Helices von A β , IAPP und α -Synuclein sowie der Schlüsselregionen, die bei der Vermittlung der Wechselwirkungen dieser Peptide mit Membranen beteiligt sind.

2.2.1. A β

Das A β -Peptid ist ein aus 39 bis 42 Aminosäuren bestehendes Peptid, das durch sequentielle Spaltung des transmembranen Amyloid-Vorläuferproteins (amyloid precursor protein, APP) durch β - und γ -Secretasen gebildet wird (Abbildung 2). Das Peptid enthält je sechs negativ bzw. positiv geladene Aminosäuren und einen hydrophoben C-Terminus. Frühere Untersuchungen mit Micellen oder membranimitierenden Lösungsmitteln wie Trifluorethanol (TFE) oder Hexafluorisopropylalkohol (HFIP) zeigten, dass A β 40 und A β 42 in Gegenwart dieser Membranmimetika α -helicale Struktu-

A β 42:
DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLM
VGGVVIA

hIAPP:
KCNTATCATQRLANFLVHSSNNFGAILSSTNVGSNTY

α -Synuclein:
MDVFMKGLSKAKEGVVAAA EKTKQGVAAEA
GKTKEGVLYVG SKTKEGVVHGVAETKKE
QVTNVG GAVVTGVTVA VAQKTVEGAGSIAAAT
GFVKKDQLGKNEEGAPQEGILEDMPVDPDNE
AYEMPSEEGYQDYEEPA

Abbildung 2. Sequenzen von A β 42, der humanen Form von IAPP (hIAPP), und α -Synuclein. Unterstrichen sind diejenigen Reste von A β 42 und IAPP, die an Membranen unter Induktion α -helicaler Strukturen binden. Bei α -Synuclein sind die an der Membranbindung beteiligten, 11-meren Wiederholungen unterstrichen; die NAC-Region ist kursiv und die C-terminale saure Region ist fett dargestellt.

ren einnehmen. Welche Proteinregion die helicale Struktur einnimmt, ist jedoch stark abhängig von den experimentellen Bedingungen.^[26b-d,31] Fletcher und Keire beobachteten eine helicale Struktur im Bereich der Aminosäuren 16–24 im Fragment A β (12–28) in Gegenwart von SDS-Micellen (3 mM).^[26b] Andere Untersuchungen mit Micellmodellen aus SDS und Dodecylphosphocholin (DPC) zeigten α -helicale Strukturen in den zentralen Regionen (Aminosäuren 12–36), die flankiert sind von unstrukturierten N- und C-Termini,^[26c,31a] sowie Helix-Schlaufe-Helix-Regionen sowohl in A β 40 als auch in A β 42.^[26d]

2.2.2. IAPP

Humanes IAPP (hIAPP) ist ein aus 37 Aminosäuren bestehendes Peptidhormon mit einer Disulfidbrücke zwischen Cys2 und Cys7, die die ersten vier Aminosäuren in eine ungeordnete Haarnadel-Struktur zwingt (Abbildung 2).^[32] Das Peptid enthält mehrere kationische Aminosäuren, die den Kontakt mit anionischen Membranen vermitteln, sowie eine hydrophobe C-terminale Region (Aminosäuren 30–37). Die Aminosäuren 23–29 bilden ein hochgradig amyloidogenes Fragment, das bei der Einleitung der Proteinaggregation beteiligt sein könnte.^[27c]

Die Aufklärung der α -helicalen Konformation des an SDS-Micellen gebundenen Peptids mittels NMR-Spektroskopie lieferte eine Kern-Helix, bestehend aus den Aminosäuren 5–28, und einen ungeordneten C-Terminus.^[32] Das verkürzte Peptid hIAPP_{1–19} bindet ebenfalls an Membranen und erfährt dabei einen Wechsel zu einer α -helicalen Struktur, bildet aber keine Fibrillen.^[33]

Durch die Anwendung paramagnetischer Collider auf spinmarkierte IAPP-Derivate konnten Langen und Mitarbeiter die Struktur von IAPP gebunden an POPS-haltige Vesikel bestimmen.^[27c] Die Aminosäuren 9–22 von membrangebundenem IAPP bilden eine amphipathische α -Helix, die parallel zur Membranoberfläche orientiert ist (Abbildung 3). Die hydrophobe Fläche der Helix war für die polaren paramagnetischen Collider am wenigsten zugänglich, was darauf hindeutet, dass hydrophobe Reste in die Membran eindringen und die polare Fläche der Helix dem Lösungs-

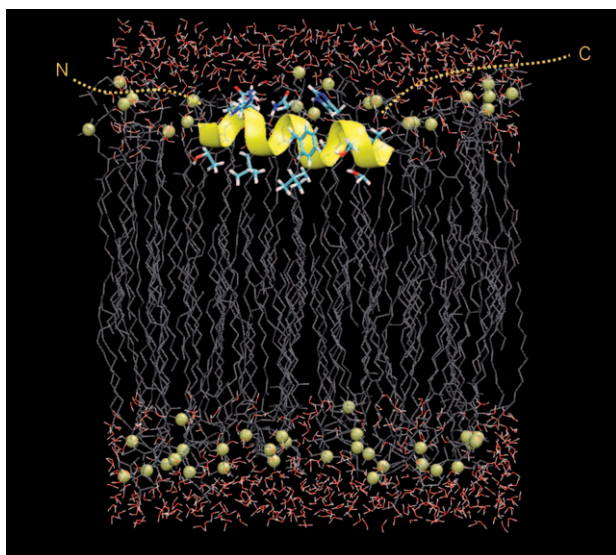


Abbildung 3. Struktur von membranengebundenem hIAPP, abgeleitet aus Messungen mit einer zielgerichtet spinmarkierten Probe.^[27c]

mittel exponiert ist. Die Helix ist flankiert von ungefalteten Konformationen, und die amyloidogenen Aminosäuren 23–29 verblieben unstrukturiert und dem Lösungsmittel exponiert. Die Autoren vermuteten, dass die Oberflächenakkumulation von IAPP, neben anderen Faktoren wie einer verminderten Dielektrizitätskonstanten des Mediums an der Membranoberfläche, den Konformationsübergang des Peptids zu β -Faltblatt-Aggregaten erleichtert, eingeleitet durch das amyloidogene Fragment 23–29.^[27c,28a] Durch Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie wurde auch eine membrangebundene α -helicale Konformation von IAPP, die durch Wechselwirkung mit der kationischen N-terminalen Region an anionische POPG-Monoschichten verankert ist, nachgewiesen.^[29] Der Wechsel von membranengebundenem IAPP von einer anfänglich α -helicalen Konformation zu vernetzten β -Faltblattstrukturen konnte beobachtet werden, indem man über einen Zeitraum von 15 h die charakteristischen Wellenzahlen für die α -Helices und β -Faltblattstrukturen verfolgte.^[29]

2.2.3. α -Synuclein

Die Sequenz von α -Synuclein kann man in drei Hauptregionen unterteilen: 1) Der N-Terminus (Aminosäuren 1–60), der an Membranoberflächen unter gleichzeitigem Konformationswechsel zu einer α -helicalen Struktur bindet;^[14,28a,d,34] 2) die mittlere hydrophobe Region, oder nicht-amyloide Komponente (non-amyloid component, NAC), die aus den Aminosäuren 60–95 besteht und eine hohe Tendenz zur Aggregation in β -Faltblatt-reiche Amyloidfibrillen zeigt; und 3) die saure C-terminale Region (Aminosäuren 95–140), die stark negativ geladen und unstrukturiert ist (Abbildung 2).^[35]

Die N-terminale Membranbindungsregion enthält sieben amphiphile unvollständige Wiederholungen, die aus elf Aminosäuren bestehen, reich sind an Lys und Thr und sich in die NAC-Region ausdehnen (bezeichnet als „Hot Spots“ des

Proteins für die Membranbindung) (Abbildung 2).^[14] NMR-Spektroskopie und Moleküldynamik(MD)-Simulationen ließen den Schluss zu, dass die N-terminalen Aminosäuren eine geringfügig ungewundene α -11/3-Helix (elf Aminosäuren pro drei vollständige Windungen) einnehmen – im Gegensatz zu einer kanonischen α -18/5-Helix –, um die amphiphilen Eigenschaften der membranengebundenen Helix zu optimieren.^[36] In MD-Simulationen steht die hydrophobe Seite der α -11/3-Helix in Kontakt mit der Membran, die anionische Seite zeigt zum Lösungsmittel, und die Lys-Thr-Wiederholungen liegen an der Polar/unpolar-Grenzfläche der Membran. Das Entfernen der N-terminalen Aminosäuren führte zur Abschwächung der Toxizität von α -Synuclein gegenüber Hefepilzen, was die Annahme stützt, dass die Toxizität von α -Synuclein mit seiner Bindung an Membranen über N-terminale Aminosäuren korreliert ist.^[35,37]

Abhängig von der Oberflächenkrümmung der Modellmembran kann membrangebundenes α -Synuclein entweder eine gestreckte α -Helix,^[28d] eine gekrümmte α -Helix^[28a] oder eine antiparallele Helix-Turn-Helix-Konformation einnehmen.^[28b,c,34b] An SDS-Micellen gebundenes α -Synuclein nimmt eine antiparallele Helix-Turn-Helix-Konformation ein, um der hohen Oberflächenkrümmung der Membran Rechnung zu tragen (Abbildung 4a).^[28b] Gekrümmte α -helicale Strukturen von vesikelgebundenem α -Synuclein wurden durch Messungen mit spinmarkierten Sonden bestimmt (Abbildung 4b).^[28a] Eine vollständig gestreckte α -Helix wurde für α -Synuclein gefunden, das an große Vesi-

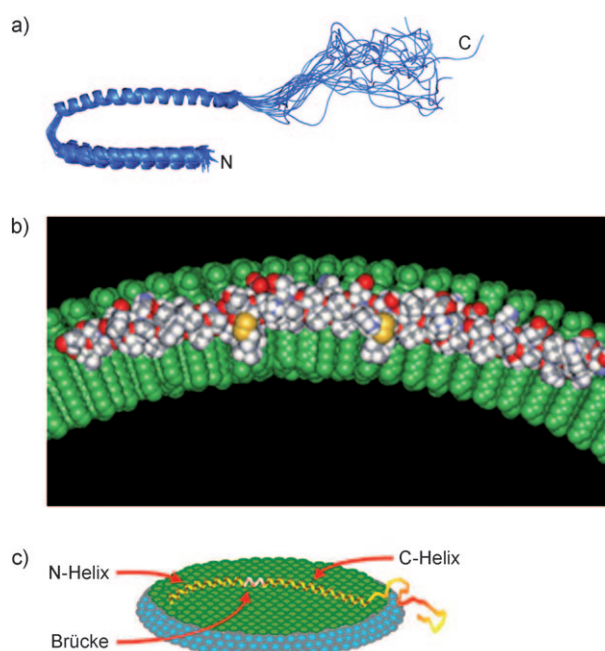


Abbildung 4. α -Helicale Konformationen von α -Synuclein, gebunden an verschiedene Modellmembranen: a) Überlagerung von 20 aus NMR-Messungen abgeleiteten Strukturen von α -Synuclein, gebunden an SDS-Micellen; man erkennt einen „ausgefranst“ C-Terminus (nach Ulmer et al.).^[28b] b) gekrümmte α -Helix von vesikelgebundenem α -Synuclein, abgeleitet aus Messungen mit spinmarkierten Sonden;^[28a] c) gestreckte α -helicale Konformation von micellgebundenem α -Synuclein (nach Georgieva et al.).^[28d]

kel^[34c] oder Bicell-Modellmembranen mit einer flachgedrückten Membranoberfläche gebunden war (Abbildung 4c).^[28d] In allen Fällen stand die C-terminale Region jedoch nicht in Kontakt mit der Membran und verblieb unstrukturiert. Gestreckte α -helicale Strukturen von membrangebundenem α -Synuclein repräsentieren eher die Situation in vivo, in der Membranoberflächen eine nur relativ kleine Krümmung haben. Sogar gealterte Proben von α -Synuclein, für die man eine oligomere β -Faltblatt-Konformation erwartet, banden unter Induktion einer α -helicale Struktur an Vesikel.^[38] Ein direkter Beweis für einen späteren Wechsel zu β -Faltblatt-Aggregaten fehlt bislang für α -Synuclein. Beschrieben wurde sowohl eine Inhibierung der Fibrillbildung mit PG/PC-Vesikeln^[39] als auch eine Verstärkung der Fibrillbildung mit Membranen aus dem Gehirn.^[40] Nuclea et al. berichteten über die beschleunigte Bildung der α -Synuclein-Fibrillen in Gegenwart von Micellen,^[41] die Existenz von helicalen Intermediaten wurde in diesem Fall aber nicht gezeigt.

2.3. Faktoren, die die membranvermittelte Fibrillbildung beeinflussen

In diesem Abschnitt untersuchen wir neueste Ergebnisse zur Beschleunigung der Fibrillbildung von amyloidogenen Proteinen, die bei bestimmten Membranzusammensetzungen und unter bestimmten experimentellen Bedingungen beobachtet wurden. Der Fokus liegt hierbei auf: 1) anionischen Lipiden, 2) Gangliosidclustern, Cholesterin und Lipid-Rafts, 3) dem Einfluss von Metallionen, und 4) der Rolle des Peptid/Lipid-Verhältnisses.

2.3.1. Anionische Lipide

Immer wieder beobachtet man, dass A β bevorzugt an Membranen mit anionischen Lipidkopfgruppen bindet.^[10a,23,42] Durch Röntgen- und Neutronenbeugungstechniken konnten Lee und Mitarbeiter zeigen, dass sich A β 40 bevorzugt in anionische DPPG- statt zwitterionische DPPC-Lipidmonoschichten einlagert.^[10a] Nur die DPPG-Monoschichten konnten eine kristalline Ordnung von A β induzieren, die sich in Beugungsmustern zeigt, die an β -Faltblatt-Aggregate erinnern.^[10a] Durch einen Anstieg des pH-Werts auf 7.4, bei dem A β anionisch wird und daher die anionischen Lipidkopfgruppen abstößt, wurde die Wechselwirkung zwischen A β 40 und DPPG jedoch aufgehoben. Die Autoren bestätigten auch den Fibrill-Templateffekt der PG-Kopfgruppen durch Inkubation von A β mit POPC-Vesikeln, die wässriges 30-proz. POPG enthielten, wodurch eine Beschleunigung der Fibrillbildung erzielt wurde. Die Exposition der anionischen Lipide an der äußeren Seite der Zellmembranen als Ergebnis von oxidativem Stress könnte ein Auslöser der Fibrillogene in vivo sein.

In einem FRET-Assay (FRET = resonanter Förster-Energietransfer) mit Tryptophan-markiertem A β 40 wiesen Wong und Mitarbeiter einen drastischen Anstieg der A β 40-Bindung an DPPC-Vesikel nach Einführung von 30 % anionischen DPPG-Kopfgruppen nach.^[11b] Eine deutliche Blau-

verschiebung der Tryptophan-Markierung in Gegenwart der anionischen Vesikel zeigte das Eindringen des Proteins in die anionischen Liposomen an.^[11b] PG enthaltende Vesikel induzierten eine β -Faltblatt-Konformation von A β 40 sowie eine Oligomerisierung des Peptids.^[11b]

Die Induktion der Fibrillbildung an anionischen Membranen wurde auch mit IAPP^[27b,d] und α -Synuclein^[34a,38,43] beobachtet. Die Bindung von IAPP an anionische Membranen, die PS oder PG enthalten, kann zu einer drastischen Verstärkung der Fibrillbildung führen.^[19,21,24,27d] Röntgen-Reflektometrie offenbarte eine Lipid-induzierte Fibrillnukleation von IAPP in Gegenwart anionischer gemischter DOPC/DOPG-Monoschichten, aber nicht mit reinen zwitterionischen DOPC-Monoschichten.^[44] Ein erhöhter Anteil anionischer Kopfgruppen in gemischten Vesikeln fördert die Bindung von α -Synuclein-Monomeren^[34a,45] und -Oligomeren.^[46] Darüber hinaus erhöht sich die Tendenz von α -Synuclein zur Zusammenlagerung an der Membranoberfläche mit zunehmendem Gehalt der Membran an anionischen Lipiden.^[43] Diese Steigerung der Fibrillbildung von α -Synuclein zeigt sich auch in Gegenwart anionischer Micellen.^[41]

2.3.2. Gangliosid-Cluster, Cholesterin und Lipid-Rafts

An der äußeren Membranseite aggregieren Gangliosidlipide mit Sphingomyelin und Cholesterin unter Bildung steifer Mikrodomänen (Lipid-Rafts), die durch eine langsame seitliche Diffusion der Lipid-Acyketten und eine Resistenz gegenüber Detergentien charakterisiert sind.^[47] Gangliosidlipide sind eine Klasse von Glycolipiden, die eine anionische Sialylsäure-Kopfgruppe enthalten und in der Membran neuronaler Zellen verbreitet vorkommen.^[48] Der Gehalt an Gangliosid und Cholesterin und die gesamte Fluidität (geordnet vs. ungeordnet) der Membranen sind wichtige Faktoren, die zum einen der Verankerung amyloidogener Proteine an Membranen dienen und zum anderen auch ihre Fibrillierungsgeschwindigkeiten beeinflussen.^[49]

Über eine verstärkte Bindung von A β sowie eine Beschleunigung der Fibrillbildung an Gangliosid enthaltenden Membranen wurde vielfach berichtet.^[26a,42a,50] Matsuzaki schlug vor, dass Gangliosidcluster auf der Zellmembran Stellen bilden, von denen A β nach Abspaltung von APP abgesondert wird und die als Keim der A β -Fibrillbildung dienen (Abbildung 5).^[42a] Gestützt wird diese Hypothese durch den Nachweis von Korrelationen zwischen dem Gangliosidgehalt der Zellmembran und dem Auftreten von Alzheimer.^[42a,51] Gangliosidcluster dienten in jüngerer Zeit als Target für Verbindungen, die an die Membran binden und A β -Aggre-

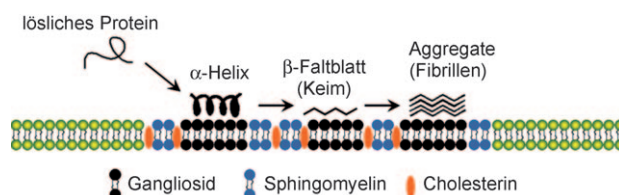


Abbildung 5. Templateffekt bei der Bildung von A β -Fibrillen an Gangliosidclustern in Lipid-Rafts.

gation an ihrer Oberfläche und die damit verbundenen toxischen Effekte auf PC12-Zellen hemmen.^[52]

Die Bindung von A β an Gangliosid enthaltende Membranen induziert einen Übergang von einer Random-Coil-Struktur zu einer α -Helix bei niedrigen Peptid/Lipid-Verhältnissen (≤ 0.025) und begünstigt bei höheren Peptid/Lipid-Verhältnissen (≥ 0.05) eine β -Faltblatt-Konformation, die dann die Fibrillbildung auslöst (Abbildung 5).^[26a] Inkubation von A β 40 mit Monogangliosid GM1 im molaren Verhältnis 1:1 induziert die β -Faltblatt-Bildung und Aggregation des Peptids nach 12 h.^[26a] Unter denselben Bedingungen, aber in Abwesenheit von GM1 verbleibt A β monomer und unstrukturiert. Interessanterweise zeigen die Fibrillen von A β 40, die in Gegenwart von GM1 gebildet wurden, eine höhere Cytotoxizität auf PC12-Zellen als solche ohne GM1, und sie offenbaren im Transmissionselektronenmikroskop (TEM) ausgeprägte morphologische Eigenschaften.^[26a] Dies legt nahe, dass Ganglioside mit A β unter Bildung strukturell einzigartiger fibrillärer Strukturen mit erhöhter Cytotoxizität wechselwirken. Auch bekannt ist die beschleunigte β -Faltblatt-Bildung und Aggregation in Gegenwart von Raft-ähnlichen Liposomen, die GM1, Cholesterin und Sphingomyelin enthalten.^[50] Die resultierenden A β -Fasern haben eine einzigartige strukturelle Morphologie und eine erhöhte Cytotoxizität.^[50] Die Existenz von GM1 in einer Raft-ähnlichen Membranumgebung ist essentiell für die Bildung der A β -Fibrillen, da keine Induktion der β -Faltblatt-Aggregate mit Raft-ähnlichen Sphingomyelin/Cholesterin-Liposomen in Abwesenheit weder von GM1 noch gemischter GM1/PC-Liposomen beobachtet werden konnte.

Die Akkumulation von IAPP-Amyloidablagerungen auf Membranen, die Gangliosid-reiche Domänen enthalten, wurde durch Fluoreszenzbildgebung gezeigt.^[53] Eine direkte Korrelation zwischen der Menge der IAPP-Fibrillen, die sich auf der Membran ablagern, und dem Gangliosidgehalt in der Membran legt nahe, dass ein hoher Gangliosidgehalt in vivo die IAPP-Fibrillbildung stimuliert.^[53] Auch Prionproteine zeigen eine klare Präferenz dafür, an GM1/Cholesterin/Sphingomyelin enthaltende Vesikel als monomere α -Helices zu binden, was nahelegt, dass Lipid-Rafts auch bei der Verankerung von Prionproteinen an Membranen eine Rolle spielen.^[54]

Im Gegensatz zur Akkumulation von A β , IAPP und Prionproteinen auf geordneten Lipid-Raft-Domänen bevorzugt α -Synuclein eine Lokalisierung auf flüssig-ungeordneten Phasen in anionischen Vesikeln.^[45,46] Es wurde vorgeschlagen, dass die größere Packungsdichte anionischer Kopfgruppen auf der Oberfläche flüssig-ungeordneter Phasen in Lipid-Rafts den negativ geladenen C-Terminus des α -Synucleins abstoßt.^[46]

Widersprüchliche Ergebnisse haben gezeigt, dass Cholesterin das Eindringen von A β 40 in Modell-Liposomen entweder inhibieren^[55] oder begünstigen^[56] kann, je nach molarem Anteil des Cholesterins in der Membran. In Neuroblastomzellen unterdrückt die Anreicherung von Cholesterin in Lipid-Raft-Domänen die Assoziation von A β 42-Oligomeren an der Zelloberfläche.^[57] Diese Befunde legen nahe, dass ein spezifischer Anteil an Cholesterin in den Lipid-Rafts nötig ist, um die Oberflächenbindung von A β zu begünsti-

gen.^[56] Weiterhin zeigten Rasterkraftmikroskopie (AFM)-Aufnahmen eine merkliche Abnahme der Zahl und Größe der IAPP-Partikel, die nach Einbau von Cholesterin in die Membran an der Oberfläche von planaren PC/PS-Lipid-Doppelschichten akkumuliert waren. Dies deutet darauf hin, dass der Cholesteringehalt der Membran auch die IAPP-Fibrillogenese beeinflusst.^[58]

2.3.3. Der Einfluss von Metallionen

In der Substantia Nigra von Parkinsonpatienten hat man erhöhte Spiegel an Metallionen gefunden,^[59] und in neuronalen Plaques von Alzheimerpatienten waren Cu²⁺-, Fe³⁺- und Zn²⁺-Ionen angereichert.^[60] Dies deutet darauf hin, dass Metallionen die Aggregation und Toxizität amyloidogener Proteine beeinflussen können.^[61] In vitro haben bestimmte Ionen einen Einfluss auf die Strukturen und die Geschwindigkeit der Fibrillbildung amyloidogener Proteine.^[62] Zum Beispiel induziert die Zugabe von Metallkationen wie Cu²⁺, Fe³⁺ oder Co³⁺ die Sekundärstruktur von α -Synuclein und beschleunigt signifikant die Fibrillbildung.^[63]

Untersuchungen in vitro haben gezeigt, dass Metallionen ferner die Wechselwirkung zwischen Amyloidproteinen und Membranen vermitteln können. Interessanterweise führt die Zugabe von Ca²⁺- und anderen Schwermetallionen zu monomerem α -Synuclein zur schnellen Produktion von annularen Poren aus oligomerem α -Synuclein mit unterschiedlichen Durchmessern.^[6,64] Am C-Terminus verkürzte Varianten von α -Synuclein nahmen jedoch keine annularen Strukturen ein, was darauf hindeutet, dass die Bindung von Metallkationen durch Wechselwirkungen mit dem sauren C-Terminus vermittelt wird. Da annulare Oligomere als mögliche toxische Spezies mit Membranen als Angriffsort diskutiert werden,^[7,12b,65] könnten erhöhte Konzentrationen an Metallkationen toxische Wechselwirkungen zwischen α -Synuclein-Oligomeren und Membranen stimulieren. Tatsächlich induzierte Fe³⁺ detergensresistente oligomere Strukturen von α -Synuclein.^[66] Ebenso wurde die Zusammenlagerung von α -Synuclein auf der Oberfläche anionischer POPG/PC-Doppelschichten in Gegenwart zweiwertiger Metallkationen erleichtert.^[43] Möglicherweise vermitteln Metallkationen die Wechselwirkung des anionischen C-Terminus von α -Synuclein mit anionischen Membranen durch partielle Ladungsneutralisation der Membran oder durch die Bildung koordinativer Brücken.

Frühere Studien zeigten, dass Zn²⁺- und Cu²⁺-Ionen die Insertion von A β 42 in POPC/POPS-Vesikel bei einem pH-Wert von 5.5–7.5 induzieren, mit der entsprechenden Induktion einer α -helicalen Struktur.^[55] Ohne Metallkationen konnte A β 42 die Membran nur bei einem pH unterhalb 5.5 penetrieren, was darauf hinweist, dass eine erhöhte positive Ladung in A β 42, entweder durch ein Absenken des pH-Wertes oder die Komplexbildung mit Metallkationen, die Bindung von A β 42 an Membranen verstärkt. Vor kurzem fand man durch ³¹P- und ²H-Festphasen-NMR-Messungen heraus, dass Cu²⁺-Ionen allein die Modellmembranen zerstören und die Bildung kleinerer Vesikel induzieren.^[67] Zugabe von A β 42 zum System schützte die Membran vor einer Zerstörung durch Cu²⁺, möglicherweise durch Ausspü-

len der Kationen durch Koordination.^[67,68] A β 42-Cu²⁺-Komplexe konnten mit der Oberfläche anionischer Phospholipidmembranen assoziieren, wie mittels ³¹P-NMR-Spektroskopie nachgewiesen wurde.^[67a]

2.3.4. Der Einfluss des Lipid/Peptid-Verhältnisses

Eine gemeinsame Eigenschaft von A β ,^[11b,50,69] IAPP^[21,27a,b] und α -Synuclein^[28a-c,34c,38] ist die Umwandlung einer weitgehend ungefalteten Konformation in eine α -Helix bei Bindung an die Membran, was einen allgemeinen Mechanismus der membranvermittelten Fehlfaltung und Aggregation dieser und anderer amyloidbildender Proteine nahelegt. Nach der anfänglichen Bindung an die Membran hängt die Fehlfaltung amyloidbildender Proteine zu β -Faltblatt-Aggregaten wesentlich von den relativen Konzentrationen der Proteine und Lipide ab.^[11b,27b] Arbeiten von Wong und Mitarbeitern zeigen, dass die Zugabe steigender Mengen von POPC/PG- oder DPPC/PG-Vesikeln einen Wechsel der Konformation von membrangebundenem A β 40 von einer β -Faltblatt- zu einer α -helicalen Struktur bewirkt. Dies führte zu einem sehr reizvollen mechanistischen Modell, das die relative Peptid/Lipid-Konzentration mit der membran gebundenen Struktur des Proteins in Beziehung setzt.^[11b] Bei einem niedrigen Peptid/Lipid-Verhältnis (hohem Lipid-Gehalt) schirmt die Adsorption von Amyloidproteinen an die Membranoberfläche Protein-Protein-Wechselwirkungen effektiv ab und erschwert somit die Fibrillogenese. In diesem Fall dominiert die α -helicale Konformation des membran gebundenen Proteins (Abbildung 6). Durch Erhöhung der

bran kann also je nach Peptid/Lipid-Verhältnis bei hohen relativen Konzentrationen die Fibrillogenese entweder hemmen oder bei niedrigen oder mittleren Konzentrationen die Fibrillogenese beschleunigen. Dieses mechanistische Phänomen beobachtet man bei A β ^[10a,11b,26c,50] und IAPP^[21] bei Kontakt mit anionischen Membranen, und es entspricht früheren Beschreibungen von Wechselwirkungen zwischen antimikrobiellen Peptiden und Membranen.^[70,71] Zum Beispiel hat A β bei einer konstanten Peptidkonzentration eine α -helicale Struktur in Gegenwart von DPC-Micellen (20 mM) und eine β -Faltblatt-Struktur in Gegenwart von DPC-Micellen (5.5 mM).^[26c]

2.4. Die Umkehr der Amyloidfibrillbildung mit Lipiden

Ein bemerkenswerter Befund von Rosseau und Mitarbeitern war, dass DOPC-Liposomen reife und inerte A β 42-Amyloidfibrillen in lösliche toxische protofibrilläre Spezies zerlegen und somit den zur Fibrillogenese reversen Prozess induzieren.^[72] Die biophysikalischen und toxikologischen Eigenschaften der Protofibrillen, die durch die reverse Reaktion erhalten wurden, waren identisch mit denen von Protofibrillen, die durch Alterung von monomerem A β 42 erhalten wurden. Dieser Befund wird bestätigt durch Widenbrant und Mitarbeiter, die A β -Fibrillen in Gegenwart von DOPA-Membranen in kleine Nano-Verbände fragmentierten.^[73] Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den vielzähligen anderen Berichten, die eine Beschleunigung der Fibrillbildung an Membranoberflächen belegen, allerdings ist zu bedenken, dass diese Untersuchungen zum Einfluss der Membranen auf den Vorwärts-Prozess der Fibrillbildung mit löslichen, monomeren Protein-Zubereitungen durchgeführt wurden. Rosseau et al. geben eines der wenigen Beispiele für die Untersuchung des Einflusses von Lipiden auf den reversen Prozess, indem sie entwickelte Fibrillen als Ausgangspunkt verwendeten. Beide Arten von Studien stimmen darin überein, dass sie die Fähigkeit der Lipide demonstrieren, amyloidogene Proteine in toxische, lösliche Aggregate zu überführen – egal ob anfänglich lösliche Monomere oder unlösliche reife Amyloidfibrillen vorliegen –, und sie unterstreichen die Bedeutung der Membranen für die Aggregation und Toxizität amyloidogener Proteine.

3. Mechanismen der amyloidvermittelten Membranpermeabilisierung

Die Toxizität amyloidbildender Proteine ist direkt korreliert mit ihrer Fähigkeit, die Funktion der Membranbarriere zu unterbrechen. Die ursprüngliche Entdeckung von Arispe und Mitarbeitern, dass A β Ionenkanal-Aktivität in planaren Lipid-Doppelschichten besitzt, führte zu der Annahme, dass die Toxizität von A β in einem Ionenkanal-Mechanismus begründet ist, der eine Membrandepolarisation, das Ausströmen von Ca²⁺ und die Störung der Ionenhomöostase zur Folge hat.^[8,12e-g,74] Kanal-Aktivität wurde später auch für andere amyloidogene Proteine, darunter IAPP,^[74c] α -Synuclein,^[11a,65,75] Polyglutamin^[76] und von Prionen abgelei-

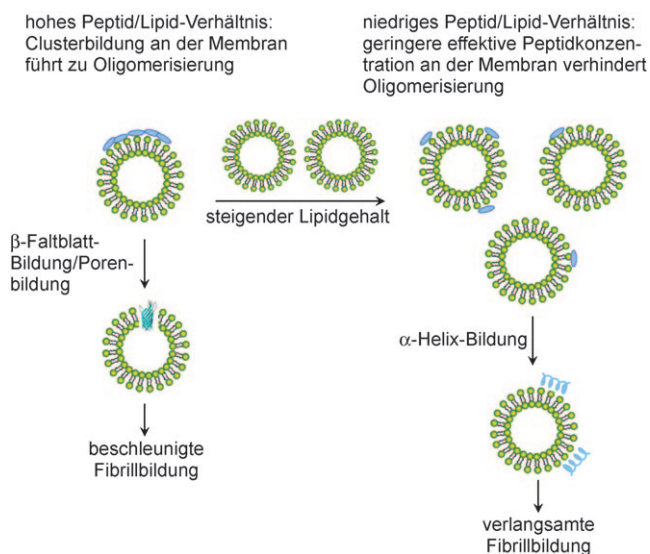


Abbildung 6. Einfluss des Peptid/Lipid-Verhältnisses auf die Geschwindigkeit der Fibrillbildung (nach Wong et al.).^[11b]

relativen Peptidkonzentration erreicht man schließlich ein kritisches Peptid/Lipid-Verhältnis, und ein „crowding“ des Proteins an der Membranoberfläche stimuliert Protein-Protein-Wechselwirkungen, einen Wechsel zur β -Faltblatt-Struktur und das Fibrillwachstum (Abbildung 6). Die Mem-

tete Peptide^[77] nachgewiesen. Dies legt nahe, dass die Toxizität dieser Proteine mit ihrer Fähigkeit zur Bildung von Kanälen oder Poren zusammenhängt, wodurch ein unreguliertes Ausströmen von Ionen analog zu den porenbildenden Toxinen möglich ist (Schema 1).^[7b,12a,e] Diese Hypothese ist konsistent mit der Tatsache, dass eine Störung der Homöostase der Ca^{2+} -Ionen ein charakteristisches Merkmal verschiedener neurodegenerativer Krankheiten ist, darunter Alzheimer und Parkinson.^[78] Gestärkt wurde die Amyloidporen-Hypothese durch die direkte Visualisierung annularer oder ringähnlicher Strukturen oligomerer Protofibrillen verschiedener amyloidogener Proteine durch Elektronen- und Rasterkraftmikroskopie (AFM).^[7,8,12b,c,79]

Auch wenn der störende Einfluss amyloidogener Proteine auf Membranen offensichtlich geworden ist, sind die exakten Mechanismen, über die diese Proteine die Membranpermeabilisierung induzieren, bisher noch nicht vollständig verstanden. Die Amyloidporen-Hypothese ist ein vorgeschlagener Mechanismus, aber auch andere Theorien werden durch experimentelle Daten untermauert. Zum Beispiel führen verschiedene Argumentationslinien experimentelle Beweise gegen das Poren-Modell an und sprechen für die Theorie, dass präfibrilläre Aggregate die Membran nicht vollständig durchdringen, sondern eher mit der Membranoberfläche assoziieren und so eine Verdünnung und Leckage der Membran hervorrufen (Schema 1).^[4a,b,80] Darüber hinaus ist nicht gesagt, dass dem Poren-Modell eine statische Struktur zugrunde liegt. Vielmehr könnte es sich um einen Zwischenzustand handeln, auf den weitere Prozesse wie eine Tensid-artige Auflösung der Membran folgen.^[13b,c,81] Solche intermediären Porenstrukturen charakterisieren den Wirkmechanismus vieler antimikrobieller Peptide und können auch mit der Aktivität amyloidogener Proteine in Beziehung gebracht werden.^[71,82] In der Tat gibt es viele chemische Ähnlichkeiten zwischen amyloidogenen Proteinen und antimikrobiellen Peptiden, z. B. die amphipathische Struktur, die darauf hinweisen, dass man mechanistische Einblicke aus den für den Permeabilisierungsmechanismus antimikrobieller Peptide vorgeschlagenen Modellen ableiten kann.

Neben der Reihe möglicher Wirkmechanismen wird der Sachverhalt weiter verkompliziert durch das Auftreten membranaktiver oligomerer Zustände der amyloidogenen Proteine. Demnach ist der Prozess der Fibrillbildung mit mehreren Zwischenzuständen verbunden, die alle unterschiedliche Membranpermeabilisierungsaktivitäten haben könnten.^[83] Der Wirkmechanismus kann weiterhin auch vom Proteintyp, der Membranzusammensetzung und den experimentellen Bedingungen abhängen. Um auf molekularer Ebene die Toxizität amyloidbedingter Krankheiten vollständig verstehen zu können, müssen diese mechanistischen Überlegungen beschrieben werden. In diesem Abschnitt wollen wir daher einen Überblick geben über die verschiedenen diskutierten Modelle der Membranpermeabilisierung durch amyloidbildende Proteine und, falls vorhanden, die neuesten experimentellen Absicherungen der vorgeschlagenen Mechanismen vorstellen.

3.1. Porenbildung kontra unspezifische Membranpermeabilisierung

Die derzeitige Debatte bezüglich des Mechanismus der Membranpermeabilisierung durch amyloidbildende Proteine rankt sich um deren Fähigkeit zur Bildung von Membrankanälen oder -poren. Die vorliegenden experimentellen Befunde, z. B. von Ionenkanal-Aktivität, stützen die Annahme eines über porenartige Strukturen verlaufenden Mechanismus und der toxischen Eigenschaften amyloidbildender Proteine (Schema 1). Alternativ dazu gibt es auch signifikante experimentelle Daten, die belegen, dass oligomere Formen dieser Proteine an die Membranoberfläche binden und eine allgemeine Ausdünnung der Membran und damit das Ausströmen von Ionen bewirken (Schema 1). Neueste Experimente, die beide Modelle stützen, werden neben zentralen älteren Arbeiten vorgestellt.

3.1.1. Hinweise für eine Porenbildung

Experimentelle Beobachtungen, die sich mit dem Porenmodell in Einklang bringen lassen, sind: 1) Die Induktion einzelner Ionenkanalströme, die charakteristisch sind für Ionenkanäle oder porenbildende Proteine, durch eine Reihe von amyloidogenen Proteinen in Modellmembranen;^[7b,8a,12e,65,77a] 2) die verglichen mit löslichen Monomeren und reifen Fibrillen erhöhte Membranpermeabilisierungsaktivität amyloider Oligomere;^[4a,11a,38,65,75,84] 3) die Blockade der Kanalaktivität amyloider Oligomere mittels Aggregationsinhibitoren wie (–)-Epigallocatechingallat;^[65,85] 4) eine Größenabhängigkeit des Ausströmens von Farbstoffen aus Modellvesikelmembranen, was auf die Bildung von Poren definierten Durchmessers hinweist;^[11a,75,86] 5) hochaufgelöste Aufnahmen annularer porenartiger oligomerer Strukturen mehrerer amyloidogener Proteine, sowohl in Gegenwart von Membranen als auch ohne Membranen;^[7,8,12b] 6) die Bindung des anti-amyloiden Oligomer-Antikörpers A11 an amyloide Oligomere und an Oligomere porenbildender Toxine wie α -Hämolysin mit daraus resultierender Unterdrückung der Membranpermeabilisierungsaktivität.^[4a,87] Die Details dieser Beobachtungen werden in den folgenden Absätzen behandelt.

Die Fähigkeit einer Reihe amyloidbildender Proteine wie A β ,^[12f,g,88] α -Synuclein,^[7b,65,89] IAPP,^[74c] Polyglutamin,^[76] Serumamyloid A^[7b] und der Prionenproteine,^[12e,77,90] Ionenkanalströme mit definierten Leitfähigkeitszuständen in planaren Lipid-Doppelschichten zu induzieren, liefert den stichhaltigen Beweis, dass diese Proteine eine Kanal- oder Porenaktivität in Membranen aufweisen.^[7b] In vielen Fällen zeigen diese amyloidbildenden Proteine Spannungsabhängigkeit und Kationenselektivität, was charakteristische Eigenschaften echter Ionenkanäle sind.^[91] Bei A β führen experimentelle Bedingungen, die eine Peptidaggregation fördern, z. B. ein saurer pH-Wert, zu einer erhöhten Kanalaktivität, während die Zugabe von Stoffen, die die Aggregation hemmen, z. B. Kongorot, die Kanalaktivität abschwächt.^[12e,74d] Dies weist darauf hin, dass die durch A β gebildeten Kanalstrukturen oligomer sind. Die Kanalaktivität von A β konnte durch externe Stoffe wie Tris (Tris(hydroxymethyl)amino-

methan), Al^{3+} ,^[12f] Zn^{2+} ,^[74b] oder andere bestimmte Moleküle^[92] blockiert werden, was Möglichkeiten für eine therapeutische Intervention bezüglich der Porenaktivität aufzeigt. Viele dieser früheren Ionenkanalexperimente wurden jedoch mit monomeren Präparaten oder rekonstituierten Proteinen in schlecht definierten heterogenen oligomeren Zuständen durchgeführt.

Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass die Zugabe definierter oligomerer Präparate von α -Synuclein Ionenkanalaktivität in PC-Monoschichten induziert (Abbildung 7a).^[65]

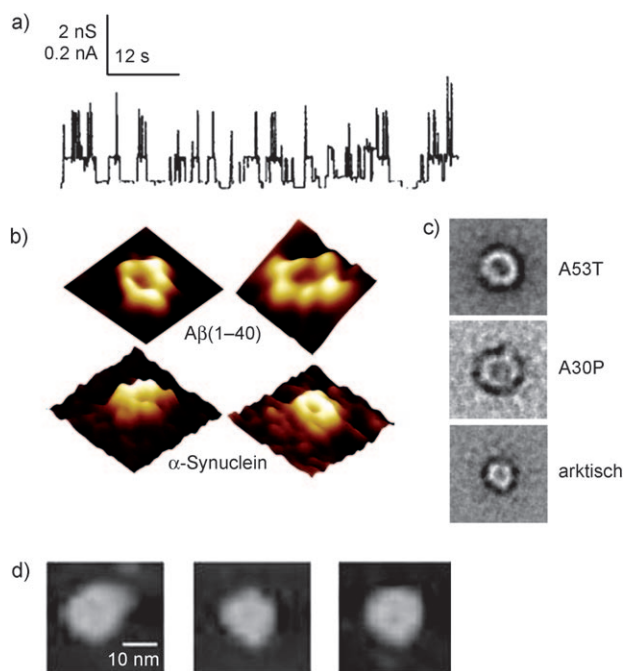


Abbildung 7. a) Leitfähigkeit in planaren Lipid-Doppelschichten in Gegenwart oligomerer Präparate von α -Synuclein (nach Kim et al.).^[65] b) AFM-Aufnahmen von oligomeren Strukturen von $\text{A}\beta(1-40)$ und α -Synuclein nach Rekonstitution in planaren DOPC-Lipid-Doppelschichten (nach Quist et al.).^[7b] c) EM-Aufnahmen der protofibrillären pathogenen Mutanten A53T und A30P von α -Synuclein und der „arktischen“ Mutante $\text{A}\beta(1-40)$ (nach Lashuel et al.).^[12b] d) EM-Aufnahmen der α -Synuclein-Poren, die durch Einwirkung von Detergentien auf Einschlüsse aus atrophierten Gehirnproben freigesetzt wurden (nach Pountney et al.).^[94]

Eine Ionenkanal-ähnliche Leitfähigkeit ist spezifisch für das oligomere Präparat und wurde mit monomeren und fibrillären Präparaten von α -Synuclein nicht beobachtet.^[65] Eine in diesem System durch oligomeres α -Synuclein induzierte Kanalaktivität konnte mit dem Polyphenol (–)-Epigallocatechingallat (aus grünem Tee) effektiv inhibiert werden.^[65] Neuere Untersuchungen zeigen, dass eine Membranpermeabilisierung mit oligomeren Präparationen von $\text{A}\beta$ mit Disacchariden und Trimethylamin-*N*-oxid – also Verbindungen, die auch die Aggregation von $\text{A}\beta$ abschwächen – effektiv gehemmt werden kann.^[85]

Vesikelpermeabilisierungsassays mit präfibrillären Aggregaten aus α -Synuclein,^[75] IAPP^[84a,86] und $\text{A}\beta$ ^[85] lieferten weitere Hinweise darauf, dass Membranpermeabilisierung

durch diese Proteine über einen porenartigen Mechanismus erfolgt. Nur oligomeres protofibrilläres α -Synuclein, und nicht die monomeren oder fibrillären Formen, band an und permeabilisierte PG- und PC-Vesikel.^[11a] Die mit den Krankheitsbildern in Verbindung gebrachten α -Synuclein-Mutanten A30P und A53T zeigten außerdem höhere Permeabilisierungsaktivitäten als der Wildtyp, was darauf hindeutet, dass die Permeabilisierungsaktivität mit der Toxizität des Proteins direkt korreliert.^[75] Ebenso führten toxische oligomere und nicht-amyloide nativ-ähnliche Fibrillen des Hefeprions Ure2p, aber nicht die nicht-toxischen Amyloidfibrillen des Proteins, zur Freisetzung von Farbstoffen aus PS-Vesikeln.^[84b]

Für protofibrilläres α -Synuclein wurde auf der Grundlage der Größenabhängigkeit der Farbstoff-Leckage aus Farbstoff-beladenen Vesikeln ein über porenartige Strukturen verlaufender Mechanismus vorgeschlagen. Kleinere Komponenten wie Ca^{2+} und Dopamin zeigten in Gegenwart des Proteins weitaus höhere Leckage-Geschwindigkeiten als große Polymere wie FITC-Dextran und Cytochrom c.^[75] In gleicher Weise war die Leckage von Ca^{2+} aus PG-Vesikeln, die durch protofibrilläres IAPP permeabilisiert waren, viel schneller als die von FITC-Dextran, was ebenso für eine Leckage durch definierte Poren begrenzten Durchmessers spricht.^[86]

Die optische Beobachtung oligomerer Kanalstrukturen von in Lipid-Doppelschichten rekonstituierten amyloidogenen Proteinen mittels Rasterkraftmikroskopie ist einer der bedeutendsten experimentellen Beweise für einen Porenmechanismus.^[7b,8a] Die ersten AFM-Aufnahmen von in DOPC-Lipid-Doppelschichten rekonstituierten tetrameren bis hexameren Oligomeren von $\text{A}\beta(1-42)$ lieferten Lal und Mitarbeiter.^[8a] Im Jahr 2005 berichtete dieselbe Gruppe über ähnliche oligomere Kanäle für eine Reihe in DOPC-Doppelschichten rekonstituierter amyloidbildender Proteine, darunter α -Synuclein, IAPP, $\text{A}\beta(1-40)$ und Serumamyloid A. Dies weist darauf hin, dass die Porenaktivität ein allgemeines Charakteristikum ist, das die Toxizität amyloidbildender Proteine untermauert.^[7b] In ungefähr 15 % der Aufnahmen ist zu sehen, dass die rekonstituierten Proteine multimere supramolekulare Komplexe aus vier bis sechs Untereinheiten mit einem äußeren Durchmesser von 8–10 nm und einem inneren Porendurchmesser von 1–2 nm bilden (Abbildung 7b).^[7b] Lashuel und Lansbury zeigten, dass isolierte Protofibrillen mutierter amyloidbildender Proteine, die mit familiärem Alzheimer oder Parkinson in Verbindung gebracht werden, darunter die „arktische“ $\text{A}\beta(1-40)$ -Mutante, α -SynA30P und α -SynA53T sowie Wildtyp- α -Synuclein, auch in Abwesenheit einer Lipid-Doppelschicht annuläre Porenstrukturen bilden.^[12b,c] Die Porenabmessungen waren in exzellenter Übereinstimmung mit denen von Quist und Lal publizierten; die äußeren Porendurchmesser lagen zwischen 7 und 10 nm und die inneren Durchmesser zwischen 1.5 und 2 nm (Abbildung 7c). AFM-Aufnahmen zeigten auch Poren, die durch das amyloidogene Prionproteinfragment PrP106–126 in gestützten Lipid-Doppelschichten hervorgerufen wurden, hier wurde jedoch der innere Porendurchmesser nicht publiziert.^[93]

Annuläre Strukturen wurden auch aus post mortem entnommenen Proben isoliert; sie zeigen eine auffallende mor-

phologische Ähnlichkeit zu Porenstrukturen, die *in vitro* bei rekombinanten und synthetischen Amyloidproteinen beobachtet wurden, was nahelegt, dass diese Strukturen obligate Intermediate sind, die *in vivo* auftreten. Sogar größere annuläre Partikel aus α -Synuclein-Oligomeren mit einem Durchmesser zwischen 30 und 50 nm wurden durch Einwirkung von Detergentien auf cytoplasmatische Einschlüsse in atrophierten Gehirnen post mortem erhalten (Abbildung 7d).^[6,94] Inoue beobachtete mittels TEM Porenstrukturen von A β in neuronalen Zellmembranen und Mitochondrien-artigen Organellen aus dem Hirngewebe von Alzheimer-Patienten. Diese Poren waren also größer als die *in vitro* beobachteten; sie hatten einen äußeren Durchmesser von 16 nm und Porenöffnungen von 10 nm.^[95] Die überraschend ähnlichen Morphologien oligomerer amyloidbildender Proteine sowohl in Gegenwart einer Membran als auch ohne Membran, sowie der Proteine, die aus *In-vivo*-Proben extrahiert wurden, gaben einen klaren Hinweis darauf, dass diese Konformationen verantwortlich sind entweder für die direkte Insertion in die Membranen oder die Bildung auf der Membranoberfläche, um die zelluläre Toxizität in amyloidbedingten Krankheiten zu induzieren (Schema 1). Seitdem es akzeptiert ist, dass amyloidbildende Polypeptide beliebiger Sequenz durch ihre Tendenz zur Aggregation zu unlöslichen Fasern höherer Ordnung mit gemeinsamen morphologischen und strukturellen Eigenschaften miteinander in Verbindung gebracht werden können, ist es auch begründet anzunehmen, dass sie eine ähnliche Tendenz zur Bildung verwandter intermediärer Strukturen wie z. B. oligomerer Poren, die die Zellmembranen angreifen, gemeinsam haben.

Neuere Arbeiten zeigen, dass gewöhnliche oligomere Strukturen, die die cytotoxischen Konformationen amyloidbildender Proteine darstellen könnten, auch von anderen porenbildenden Toxinen (pore-forming toxins, PFTs) und porenbildenden Proteinen (pore-forming proteins, PFPs) eingenommen werden. Amyloidbildende Proteine und PFTs, darunter α -Hämolyisin und Anthraxtoxin, haben mehrere auffallende strukturelle und funktionelle Eigenschaften gemeinsam, was einen ähnlichen Mechanismus der Membranpermeabilisierung impliziert.^[7a,87] Die ringförmige Konfiguration amyloidbildender Proteine, die in der AFM und EM beobachtet wird, ähnelt sehr der Konfiguration von PFPs wie Perforin und Perfringolysin O.^[87,96] Zusätzlich haben porenbildende und amyloidbildende Proteine die Eigenschaft gemeinsam, als lösliche Proteine gebildet zu werden, die später in zirkuläre toxische oligomere, oft β -Faltblatt-reiche transmembrane Poren überführt werden.^[96] Der Prozess der Oligomerisierung, der die Kanalbildung begünstigt, wird in beiden Proteinklassen durch Lipid-Rafts beschleunigt, die als Anreicherungsplattform fungieren (Abbildung 5).^[97] Der konformationsspezifische, gegen Amyloid-Oligomere gerichtete Antikörper A11, der unabhängig von ihrer Primärsequenz an Amyloid-Oligomere bindet, reagiert auch mit Oligomeren – aber nicht Monomeren – von α -Hämolyisin und humanem Perforin.^[87] Darüber hinaus unterdrückt eine Bindung an A11, von der man weiß, dass sie die Toxizität und Membranpermeabilisierungsaktivität von Amyloid-Oligomeren inhibiert, auch die hämolytische Aktivität von α -Hämolyisin-Oligomeren.^[87]

Die Summe dieser allgemeinen Eigenschaften stützt fast unbestreitbar die Annahme, dass Amyloid-Oligomere die Membranpermeabilisierung über eine aktive Struktur und einen Mechanismus induzieren, die den Strukturen und Wirkungsweisen entsprechen, die man für PFTs und PFPs annimmt. Mechanistische Fragestellungen bezüglich der Aktivität amyloidogener Proteine auf Membranen können mittels biophysikalischer Methoden und mechanistischer Assays untersucht werden, die auch hilfreich waren bei der Untersuchung der Wirkungsweise von PFPs und verwandten antimikrobiellen Peptiden gegenüber Modellmembranen (siehe Abschnitt 4).

3.1.2. Dreidimensionale Modelle oligomerer Poren

Die optische Beobachtung der topologischen Eigenschaften oligomerer Poren erbrachte wichtige Schlussfolgerungen bezüglich des Mechanismus der Membranpermeabilisierung durch amyloidbildende Proteine – jedoch konnten dreidimensionale Strukturen auf atomarer Ebene bisher experimentell nicht bestimmt werden. Die Forschung auf diesem Gebiet wird behindert durch die inhärente Löslichkeit und Nicht-Kristallinität amyloider Proteine, Faktoren, die beim Einbringen in Membranumgebungen noch verschärft werden. Darüber hinaus sind wohldefinierte Strukturen amyloidbildender Proteine inhärent kurzlebig und schwer zu isolieren und charakterisieren.^[65] Nichtsdestotrotz wurden dreidimensionale Porenmodelle rechnergestützt konstruiert und lieferten Einblicke in mögliche Konformationen. Durch computergestützte Modellierung des per NMR-Spektroskopie erhaltenen β -Faltblatt-Turn- β -Faltblatt-Motivs von A β _{17–42} zu annulären scheibenähnlichen Strukturen konnten Nussinov und Mitarbeiter ein Modell für die A β -Pore entwickeln, deren Abmessungen in auffallend guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen von AFM- und EM-Studien sind (Abbildung 8).^[98] Nach Insertion dieser Scheiben aus A β _{17–42} in eine DOPC-Doppelschicht, bei der der hydrophobe C-terminale Strang an die Doppelschicht ankoppelt, zeigten MD-Simulationen eine Relaxation der Porenstrukturen zu Untereinheiten analog zu den per AFM dargestellten Einheiten (Abbildungen 7b und 8a).^[98] Die inneren Porenabmessungen waren ein wenig größer als die der AFM-Proben (2.2–2.5 nm), dafür waren die äußeren Durchmesser in sehr guter Übereinstimmung, und die Höhe entsprach genau der Dicke einer DOPC-Doppelschicht, was diese Modelle als annehmbare dreidimensionale Beschreibungen erscheinen lässt.^[98] Man sollte anmerken, dass der N-Terminus von A β vermutlich nicht an der Kanalstruktur beteiligt ist und sich von der Membran „wegstreckt“. In einem anderen Modell des A β -Kanals, das auf Perutz' Röntgenbeugungsmodell von Polyglutaminfasern beruht, werden tubuläre Anordnungen aus zylindrisch gewundenen monomeren A β -Untereinheiten, die linear gestapelt sind und die Breite der Doppelschicht umspannen, angenommen.^[99] Dieses Modell sagt auch einen wassergefüllten Kanal von 1.5 nm Durchmesser voraus.

Molecular Modeling der helicalen Struktur von α -Synuclein offenbarte eine Kopf-Kopf-Anordnung von dimeren α -Synuclein-Untereinheiten, die sich zu ringartigen Hexameren und Pentameren anordnen und mit der per EM bestimmten

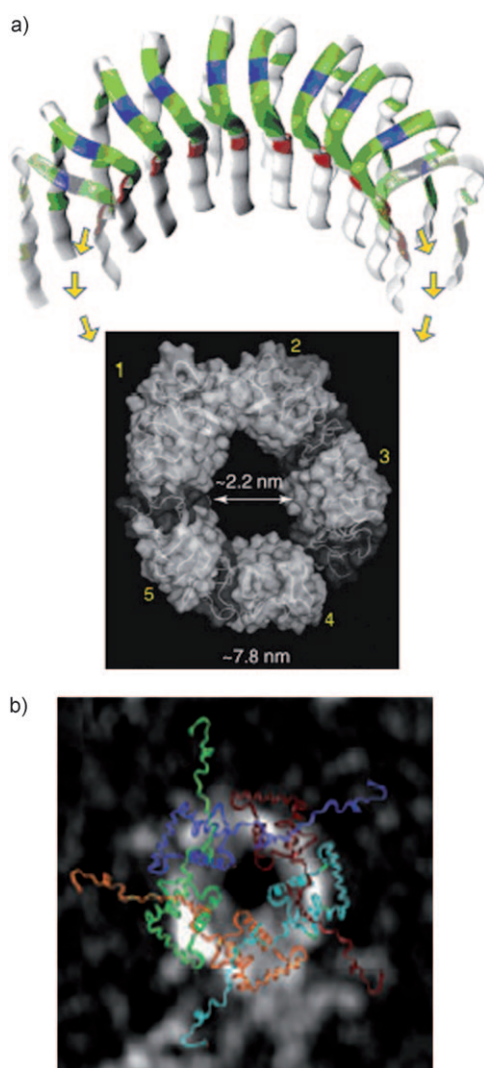


Abbildung 8. Computermodelle a) der oligomeren Aβ-Pore (nach Jang et al.^[98]) und b) des oligomeren α-Synuclein-Kanals, überlagert mit der von Lashuel et al.^[12b] bestimmten Porenstruktur (nach Tsigelny et al.).^[100]

Porenstruktur in Deckung gebracht werden können (Abbildung 8b).^[12b,c,100]

3.1.3. Nachweis der unspezifischen Membranpermeabilisierung

Trotz zahlreicher Berichte über die Ionenkanal-Aktivität mit definierten offenen und geschlossenen Leitfähigkeitszuständen,^[7b,12e,101] die charakteristische Eigenschaften von Ionenkanälen und Porentoxinen sind,^[91] sowie der Bestimmung gut aufgelöster Porenstrukturen für Amyloid-Oligomere (Abbildung 7) konnte ein Nachweis der Ionenkanal-Aktivität nicht in jedem Labor reproduziert werden.^[80a] Wegweisende Arbeiten von Glabe und Mitarbeitern zeigten, dass vorgebildete lösliche Oligomere aus Aβ, IAPP, Polyglutamin oder Prion 106–126 – aber keine Monomere oder ausgereifte Fibrillen – die allgemeine Leitfähigkeit der Modell-Doppelschichten deutlich erhöhen, und das ohne das Auftreten diskreter Leitfähigkeitsänderungen oder offener und geschlossener Zustände, die charakteristisch sind für eine Ionenkanal-

Aktivität.^[4a] Während dieser Befund klar die Annahme stützt, dass oligomere Formen amyloidbildender Proteine die membranpermeabilisierende Spezies sind, spricht er gegen die Amyloidkanal-Hypothese. Vor kurzem zeigten Sokolov et al., dass gereinigte Zubereitungen von Aβ-Oligomeren, die sich mit Antioligomer-Antikörpern positiv anfärben ließen, ebenfalls einen allgemeinen konzentrationsabhängigen Anstieg der Leitfähigkeit von Modellmembranen hervorriefen, wenn sie der Doppelschicht extern zugegeben wurden.^[4b] Diese Berichte sichern ein Modell ab, wonach Amyloidoligomere an die Membranoberfläche binden und die Lipidzusammenlagerung stören und so eine Verdünnung der Membran und erhöhte Membran-Leckage verursachen, ohne dass eine Bildung definierter Poren auftritt (Schema 1).^[4b]

3.1.4. HFIP bringt Klarheit: Das Porenmodell setzt sich durch

Der Grund für die Unstimmigkeiten bezüglich der Ionenkanal-Aktivität amyloidbildender Proteine war einige Zeit Gegenstand der Debatte. Ionenkanal-Aktivität wurde beobachtet, wenn Proteine mit der Membran unter Bildung von Proteoliposomen fusioniert wurden. In den Fällen, in denen ein allgemeiner Anstieg der Membranleitfähigkeit beobachtet wurde, waren Zubereitungen des vorgebildeten oligomeren Proteins extern der Doppelschicht zugegeben worden.^[4a,b,80b] Eine Erklärung war, dass die Proteoliposomen, die durch Ultraschallbehandlung gebildet werden, die Kanalbildung verstärken und dass die Insertion der extern zugegebenen Oligomere in die Membran gehindert sein könnte, sodass lediglich eine Bindung an die Oberfläche resultiert.^[80a] Ein jüngster Bericht zeigt nun jedoch, dass das Fehlen diskreter Ionenkanalleitfähigkeitsmuster ein Artefakt der Membranpermeabilisierung durch Reste von Hexafluor-isopropylalkohol (HFIP) ist, der bei der Zubereitung der vorgebildeten Oligomere verwendet wird und die eigentliche Ionenkanal-Aktivität amyloidbildender Proteine maskiert.^[12d] In dieser Arbeit zeigten Capone und Mitarbeiter, dass HFIP-Proben sowohl mit als auch ohne Aβ identische Stromspuren ohne definierte Leitfähigkeitszustände zeigen, was darauf hinweist, dass der beobachtete Strom durch HFIP allein induziert wurde. Bemerkenswerterweise konnte durch sorgfältiges Entfernen von HFIP aus den Proben von oligomeren Aβ (durch Spülen mit Stickstoff) der schrittweise Ionenfluss durch planare Lipid-Doppelschichten, der charakteristisch ist für Ionenkanal-Aktivität, vollständig wiederhergestellt werden.^[12d] Damit kann das Porenmodell für die Störung der Membranintegrität durch Proteinoligomere als experimentell belegt gelten.

3.2. Welche oligomeren Formen sind für die Membranersetzung zuständig?

Wie in den voranstehenden Abschnitten beschrieben, zeigen oligomere und protofibrilläre Formen amyloidbildender Proteine in Untersuchungen mit Modellsystemen eine höhere Membranpermeabilisierungsaktivität als die entsprechenden fibrillären oder niedermolekularen Varianten, was darauf hindeutet, dass diese erstgenannten Formen die primär

toxischen Spezies sind.^[4a,11a,75,86] Bisher nur wenig verstanden ist jedoch das unterschiedliche Ausmaß an Membranpermeabilisierungsaktivität der verschiedenen oligomeren Spezies, die vom Monomer bis hin zu den ausgebildeten Fibrillen reichen.

Die Zahl möglicher oligomerer Zustände für amyloidbildende Proteine, die vom Dimer bis hin zu den vollständig ausgebildeten Fibrillen in der Größenordnung von 10^6 Dalton reichen, sowie die verschiedenen Morphologien der intermediären Aggregate^[83] machen die Identifizierung einer membranaktiven Spezies mit definiertem oligomerem Zustand und Konformation zu einer gewaltigen Aufgabe. Es wurden erhebliche Forschungsanstrengungen unternommen, um die strukturellen Typen von Amyloid-Oligomeren auf der Basis ihrer verschiedenen Immunaktivitäten mit konformationsspezifischen Antikörpern zu klassifizieren.^[83] Präfibrilläre Oligomere (PFOs), die im Test gegen den oligomergegerichteten Antikörper A11 positiv sind, sind sphärische Partikel mit Durchmessern von 3 bis 10 nm, die sich zu einem frühen Zeitpunkt der Inkubation bilden. Bei längeren Inkubationszeiten oder unter Katalyse mit einer Hydrophob/hydrophil-Grenzfläche, lagern sich PFOs zu annularen Protofibrillen (APFs) um,^[102] von denen man annimmt, dass sie zirkuläre Formen von PFO-Untereinheiten sind. Sie zeigen unter dem Elektronenmikroskop porenartige Morphologien (Abbildung 7).^[12b] APFs färben mit α APF-Antikörpern stark und mit A11-Antikörpern schwach an, was für eine abweichende Morphologie zu den PFOs spricht. Heptamere Poren aus α -Hämolsin färben ebenso mit α APF an, was nahelegt, dass APFs eine β -Barrel-Konformation einnehmen. Fibrilläre Oligomere sind eine andere Klasse oligomerer Intermediate, die nicht an A11-Antikörper binden, aber eine positive Bindung an OC-Antikörper zeigen und sich somit strukturell von PFOs unterscheiden.^[83] Da OC-Antikörper auch für ausgebildete Fibrillen spezifisch sind, nimmt man an, dass fibrilläre Oligomere kleine Stücke von Fibrillen darstellen oder wie Fibrillkeime wirken, die das Fibrillwachstum einleiten.^[83]

Die morphologische Ähnlichkeit zwischen APFs und PFTs legt instinktiv nahe, dass APFs die oligomere Form amyloidogener Proteine sind, die die Membranpermeabilisierung verursachen. Weiterhin verstärken familiär auftretende Mutationen, die zur vererbten Form von Parkinson und Alzheimer führen, die Population von APFs, weswegen man vermuten sollte, dass diese oligomeren Formen die primär toxische Spezies sind.^[12b] Überraschenderweise berichteten jedoch Glabe und Mitarbeiter, dass PFOs von A β 42 und α -Synuclein eine viel größere Membranpermeabilisierungsaktivität zeigen als ihre entsprechenden APFs in planaren Lipid-Doppelschichten.^[102] Modellmembranen beschleunigten jedoch den Konformationswechsel von PFOs zu APFs, was durch Immunreaktion mit A11 und α APF festgestellt wurde.^[102] Die Autoren schlugen vor, dass PFOs an die Membran binden und dass der Schlüsselschritt das Zusammenlagern von APFs aus PFOs auf der Membran ist. Dieser Schlüsselschritt ist mit der Membranpermeabilisierung assoziiert, und es ist derjenige Prozess, der AFP ermöglicht, eine in die Membran eingebettete Pore mit β -Barrel-Konformation zu bilden. Im Gegensatz dazu fehlt vorgebildeten APFs in Lösung eine ausreichende Fähigkeit

zur Membraninsertion. Vorgebildete Poren aus α -Hämolsin konnten ebenso kein Eindringen in die Membran induzieren,^[103] was einen ähnlichen Mechanismus nahelegt.

3.3. Mechanistische Einblicke durch Studien an antimikrobiellen Peptiden

Die Mechanismen, die die Membranpermeabilisierungsaktivität antimikrobieller Peptide steuern und die über rein auf Porenbildung beruhende Mechanismen hinausgehen, können auch für die Aufklärung der membranaktiven Strukturen amyloidogener Proteine relevant sein.^[70,71] Tatsächlich teilen antimikrobielle Peptide und amyloidbildende Proteine viele Charakteristika, was nahelegt, dass sie über ähnliche Mechanismen auf die Membran wirken. Zum Beispiel haben beide Klassen von Polypeptiden die Fähigkeit, amphipathische Strukturen mit hydrophoben und kationisch hydrophilen Enden anzunehmen und zeigen erhöhte Affinitäten für negativ geladene Membranoberflächen.^[42a,70] Darüber hinaus ändern A β ,^[11b,26b-d] IAPP^[27c,32,33] und α -Synuclein^[8d,28a,34a,b] ihre Struktur von einer Random-Coil-Struktur zu einer α -Helix bei erstem Kontakt mit Membranoberflächen, was die konformativen Wechsel antimikrobieller Peptide in Gegenwart von Membranen widerspiegelt (Schema 1).^[71b] Sowohl für antimikrobielle Peptide als auch für amyloidogene Proteine wird für die Induktion der oligomeren membranpermeabilisierenden Spezies eine Schwellenkonzentration an Peptid an der Membranoberfläche benötigt (Schema 1).^[11b,71b] Bemerkenswerterweise wandeln sich membrangebundene oligomere Spezies bestimmter antimikrobieller Peptide, wie z.B. der Temporine B und L, sogar weiter zu amyloidartigen Fibrillen um.^[104]

Auch wenn über den Mechanismus, mit dem antimikrobielle Peptide auf Membranen einwirken, noch diskutiert wird und viele Fragen offen sind, stehen doch relativ viele experimentelle Daten zur Verfügung, aus denen eine Reihe klassischer Aktivitätsmodelle abgeleitet wurden. In den folgenden Abschnitten werden wir diese mechanistischen Modelle kurz vorstellen, die den Wirkmechanismus antimikrobieller Peptide, porenbildender Toxine und konstruierter amphipathischer permeabilisierender Peptide auf Membranen erklären; dies geschieht in der Hoffnung, anhand dieser Modelle ein wenig Licht auf die Membranaktivität amyloidogener Proteine werfen zu können.^[71,81]

Wenn die Anreicherung permeabilisierender Peptide auf der Membran eine kritische lokale Grenzkonzentration erreicht, bilden sich oligomere Spezies, die eine transmembrane Pore bilden, für die zwei strukturelle Anordnungen vorgeschlagen wurden. In einer Barrel-Stave(„Fassdauben“)-Pore berühren die hydrophoben Regionen des Peptid-Oligomers das hydrophobe Membraninnere, und die hydrophilen Enden kleiden eine wassergefüllte Pore aus. Bei diesem Porentyp rühren Variationen in der Leitfähigkeit von einem Monomeraustausch mit dem transmembranen Oligomer her (Abbildung 9a).^[71a] Barrel-Stave-Poren stören die Membranarchitektur nur minimal, erzeugen aber örtlich fixierte Löcher, durch die Moleküle in die oder aus der Membran „lecken“. ^[97] Alternativ dazu gibt es eine toroidale Poren-

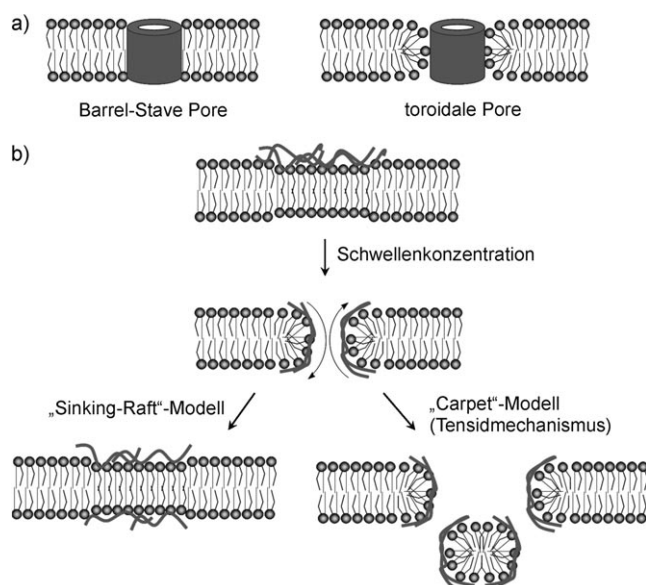


Abbildung 9. a) Modell der Barrel-Stave- und toroidalen Poren; b) zweidimensionale Darstellungen des „Sinking-Raft“- und „Carpet“-Modells der Membranpermeabilisierung.

struktur, bei der die hydrophilen Enden des Peptids mit den Lipidkopfgruppen in Kontakt bleiben, wodurch eine Verkrümmung der Membran hervorgerufen wird und eine Pore erzeugt wird, die mit Lipidkopfgruppen und Peptiden ausgekleidet ist, wodurch die Passage von Molekülen durch die Membran ermöglicht wird (Abbildung 9a). Von der toroidalen Pore nimmt man an, dass sie eine metastabile Struktur ist und nach einem von zwei denkbaren Mechanismen zerfällt. Im „Sinking-Raft“-Modell zerfällt die Pore unter Bildung einer wiederverschlossenen Doppelschicht mit Peptiden auf der inneren und äußeren Membranseite (Abbildung 9b).^[81] Alternativ dazu zerfällt die Membran im „Carpet“-Modell unter Bildung von tensidischen Peptid-Lipid-Aggregaten (Abbildung 9b).^[82]

Neuere Daten zeigen, dass insbesondere IAPP über toroidale Porenintermediate wirkt. Dynamische Differenzkalorimetrie (DSC) und Festphasen-NMR-Experimente zeigen, dass IAPP eine schwerwiegende Krümmungsspannung bei Modellmembranen hervorruft, was bezeichnend ist für toroidale Porenstrukturen.^[105] Der Einbau der membranzerstörenden IAPP-Fragmente (hIAPP_{1–37}, hIAPP_{1–19} und Ratten-IAPP_{1–19} (rIAPP_{1–19})) in DiPoPE-Lipid-Doppelschichten führte gemäß DSC zu einer Abnahme der Übergangstemperatur von der flüssig-kristallinen (L_{α}) in die invers hexagonale (H_{II}) Phase, was dafür spricht, dass die Peptide eine negative Krümmungsspannung in der Membran induzieren.^[105] Das nicht-membranpermeabilisierende Peptid rIAPP_{1–37} hatte einen schwachen Einfluss auf die Stabilität der H_{II} -Phase. Weiterhin offenbarten ³¹P-Verschiebungen die bevorzugte Bindung der permeabilisierenden IAPP-Peptide an stark gekrümmte Regionen von Modell-Bicellen, die statische Mimikria der in toroidalen Porenintermediaten erzeugten Membranperforationen darstellen.^[105] Wenn ein toroidales Porenmodell für IAPP gültig ist, ist es wahrscheinlich keine statische Struktur, und andere Mechanismen für

Membranstörungen schließen sich wahrscheinlich an (Abbildung 9b). Im folgenden Abschnitt stellen wir Daten verschiedener Arbeitsgruppen vor, die belegen, dass auch für IAPP und möglicherweise auch andere amyloidogene Proteine ein Tensid-artiger Mechanismus gültig ist.

3.4 Sind Fibrillbildung an Membranoberflächen und Membranpermeabilisierung konzentrierte Prozesse? Ein Tensid-Modell zur Membranpermeabilisierung

In vielen Fällen, in denen Lipidmembranen die Fehlfaltung von Amyloidproteinen in β -Faltblatt-Aggregate begünstigen, wird auch eine entsprechende Störung der Membranstruktur beobachtet.^[10a,11b,106] Derartige Ergebnisse zeigen, dass diese scheinbar separat verlaufenden Prozesse kooperativ und energetisch gekoppelt sind. Ein neueres und überzeugendes Modell zur Amyloidprotein-bedingten Toxizität verknüpft direkt die Amyloid-Aggregation auf Membranoberflächen unter Zerstörung der Zellmembran mit der Entstehung von Toxizität.^[13a,107] Mit anderen Worten: Wenn sich die Fibrille auf der Membranoberfläche entwickelt, wird gleichzeitig die strukturelle Integrität der Membran beeinträchtigt.

In einer eleganten Untersuchung konnten Engel und Mitarbeiter zeigen, dass die kinetischen Profile für das Wachstum von hIAPP-Fibrillen, das mittels Fluoreszenz von Thioflavin T (ThT) verfolgt wurde, und für die Induktion eines Farbstoff-Leckage aus co-inkubierten gemischten DOPC/DOPS-Vesikeln übereinstimmen (Abbildung 10a).^[13a] Beide Profile sind charakterisiert durch eine Latenzphase von etwa 3 h Dauer, der sich ein sigmoider Verlauf entsprechend der Bildung von hIAPP-Fibrillen und ein nahezu kompletter Farbstoff-Ausstrom aus dem Vesikel anschließt. Dieses Ergebnis belegt, dass es der Prozess der Fibrillbildung auf den Membranoberflächen ist, der die Barrierefunktion der Membran beseitigt. Kryo-TEM-Aufnahmen von großen unilamellaren Vesikeln (large unilamellar vesicles, LUVs) aus DOPC/DOPS, die mit humanem IAPP (hIAPP) co-inkubiert wurden, zeigten eine Störung und „Quetschung“ von Membranregionen, die in Kontakt mit den Fibrillen waren (Abbildung 10b), wohingegen Vesikel, die in Gegenwart von nicht-amyloidogenem Maus-IAPP (mIAPP) inkubiert wurden, intakt blieben.^[13a] Als mechanistisches Modell schlugen die Autoren vor, dass das Wachstum von IAPP-Fibrillen auf der Membran begleitend auftritt mit einem erzwungenen Wechsel der Membrankrümmung und geschwächter Lipidpackung, wodurch es zu einem Ausströmen des intravesikulären Inhalts kommt (Abbildung 10b). Interessanterweise ist diese Ansicht konsistent mit Toxizitätsuntersuchungen, die gezeigt haben, dass es kein spezifischer oligomerer Zustand ist, der Zelltod und Toxizität hervorruft, sondern vielmehr der dynamische Prozess der Fibrillbildung.^[108]

Neuere Ergebnisse liefern überzeugende Hinweise darauf, dass IAPP auf Membranoberflächen durch die Ex-traktion und den Einbau von Lipiden in die sich entwickelnden Fasern die Membran zersetzt.^[13b,c] Mit Rhodamin-markierten Lipiden in riesigen unilamellaren Vesikeln (giant

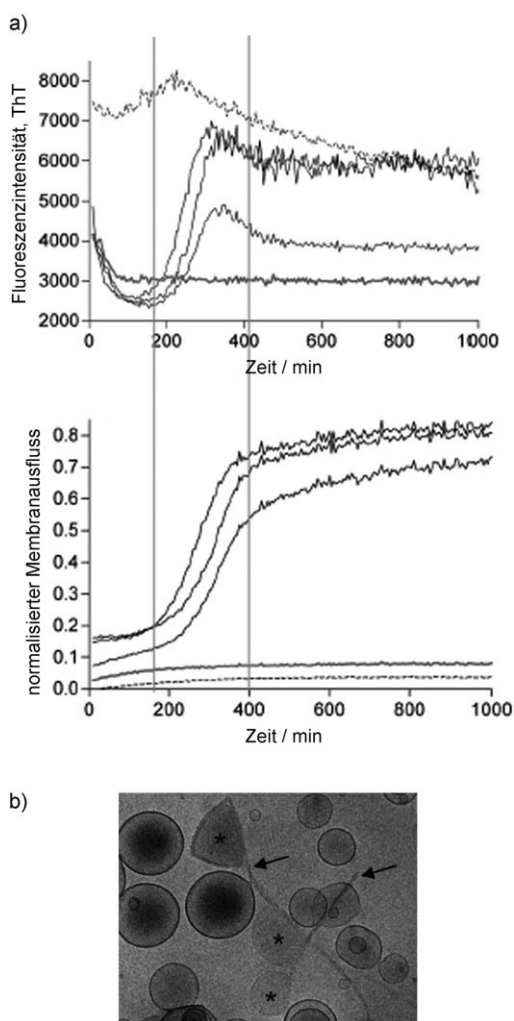


Abbildung 10. Fibrillwachstum an der Membranoberfläche induziert Membranpermeabilisierung. a) Das kinetische Profil der hIAPP-Fibrillbildung, die mittels ThT-Fluoreszenz verfolgt wurde (oben), stimmt mit dem Profil des hIAPP-induzierten Farbstoff-Ausflusses aus gemischten DOPC/DOPS-Vesikeln (unten) überein; b) Kryo-EM-Aufnahmen der hIAPP-Fibrillen im Kontakt mit gekrümmten Vesikeln (Nach Engel et al.).^[13a]

unilamellar vesicles, GUVs) aus DOPC konnte die Aufnahme fluoreszierender Lipide in co-inkubierte wachsende IAPP-Fibrillen mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie visualisiert werden (Abbildung 11).^[13b] Nach nur 10 min Inkubation war eine vollständige Membranzerstörung sichtbar (Abbildung 11c). In ähnlicher Weise konnte mit BODIPY-markiertem PC in einer gestützten, trägerfixierten Lipid-Doppelschicht die Extraktion und Aufnahme fluoreszierender Lipide in die wachsenden IAPP-Fasern mittels konfokaler Mikroskopie nach 2–5 h Inkubation visualisiert werden.^[13c] Nach 20 h Inkubation waren die fluoreszierenden Lipide vollständig in die entwickelten IAPP-Fibrillen inkorporiert. Ein FRET zwischen Faser-gebundenem ThT und BODIPY-PC belegte eine enge Assoziation der extrahierten Lipide und der fertigen Faser. Die Aufnahme von Rhodamin-markierten Lipiden, die aus Modell-Lipid-Rafts durch BODIPY-markierte IAPP-Fasern gewonnen wurden, wurde ebenfalls mittels Fluoreszenzmikroskopie beobachtet.^[109] Die extrahierten



Abbildung 11. Konfokale Fluoreszenzmikroskopie von GUVs, die mit hIAPP co-inkubiert wurden. Zu sehen ist die Aufnahme von Rhodamin-markierten Lipiden in die wachsenden Peptidfibrillen, die letztendlich zur Zerstörung des Vesikels führt: a) GUVs vor der Zugabe von hIAPP (Carboxyfluorescein wurde dem extravasikulären Lösungsmittel zugegeben, um die intakte Barrierefunktion des Vesikels zu zeigen), b) 2–3 min nach Zugabe von hIAPP und c) 10 min nach Zugabe von hIAPP (nach Sparr et al.).^[13b] Skalenbalken 25 μm .

Membranfraktionen verliehen der Faser thermodynamische Stabilität, möglicherweise durch elektrostatische Interaktionen mit freiliegenden positiv geladenen IAPP-Seitenketten oder durch die Bereitstellung einer physikalischen Barriere für den proteolytischen Abbau der sich entwickelnden Fasern *in vivo*.^[13c]

Die Ergebnisse widersprechen nicht dem beobachteten Zusammenhang zwischen Fibrillbildung auf Membranoberflächen und Membranzerstörung, und sie stützen die Annahme, dass die wachsende IAPP-Faser nach einem Tensid-ähnlichen Mechanismus agiert, nämlich durch Lipid-Extraktion und Auflösung der Doppelschicht – im Gegensatz zu bloßem „Quetschen“ der Membranoberfläche.^[21] Membranverzerrungen können mechanistisch jedoch der Lipidaufnahme vorangehen. Kombiniert man die Beweise für eine Tensid-artige Aktivität von IAPP mit denen für die Induktion toroidaler Porenstrukturen, kann man annehmen, dass IAPP dem Carpet-Modell der Membranpermeabilisierung folgt (Abbildung 9b). Die Strukturanalogien zwischen IAPP und A β ^[110] legen nahe, dass A β nach einem ähnlichen Mechanismus auf Membranen wirkt. Tatsächlich zeigen TEM-Aufnahmen gemischter POPC/POPG-Vesikel, die mit A β co-inkubiert wurden, den Einbau von Lipidvesikeln in das fertige Fibrill-Netzwerk.^[10a]

Im Widerspruch zu den oben erwähnten Argumenten berichteten Ramamoorthy und Mitarbeiter, dass das membranbindende N-terminale Fragment 1–19 von humanem IAPP, dem das amyloidogene Fragment 20–29 fehlt und das keine Fibrillen bildet, einen Farbstoff-Ausfluss aus POPG-Vesikeln im selben Ausmaß induziert wie die volle Sequenz.^[33b] Zusätzlich konnte Ratten-IAPP, das keine Fibrillen bildet, in signifikantem Ausmaß Membranen permeabilisieren.^[27b] Die Autoren folgerten, dass die Fibrillbildung kein notwendiger Faktor der Membranzerstörung ist und dass diese zwei Prozesse nach unterschiedlichen Mechanismen ablaufen.

4. Membranmodelle und experimentelle Methoden zur Untersuchung der Mechanismen der Protein-induzierten Membranpermeabilisierung

4.1. Biologische Membranen kontra Modellmembranen

Natürliche Zellmembranen sind komplexe Strukturen, die aus einer Lipid-Doppelschicht mit eingelagerten globu-

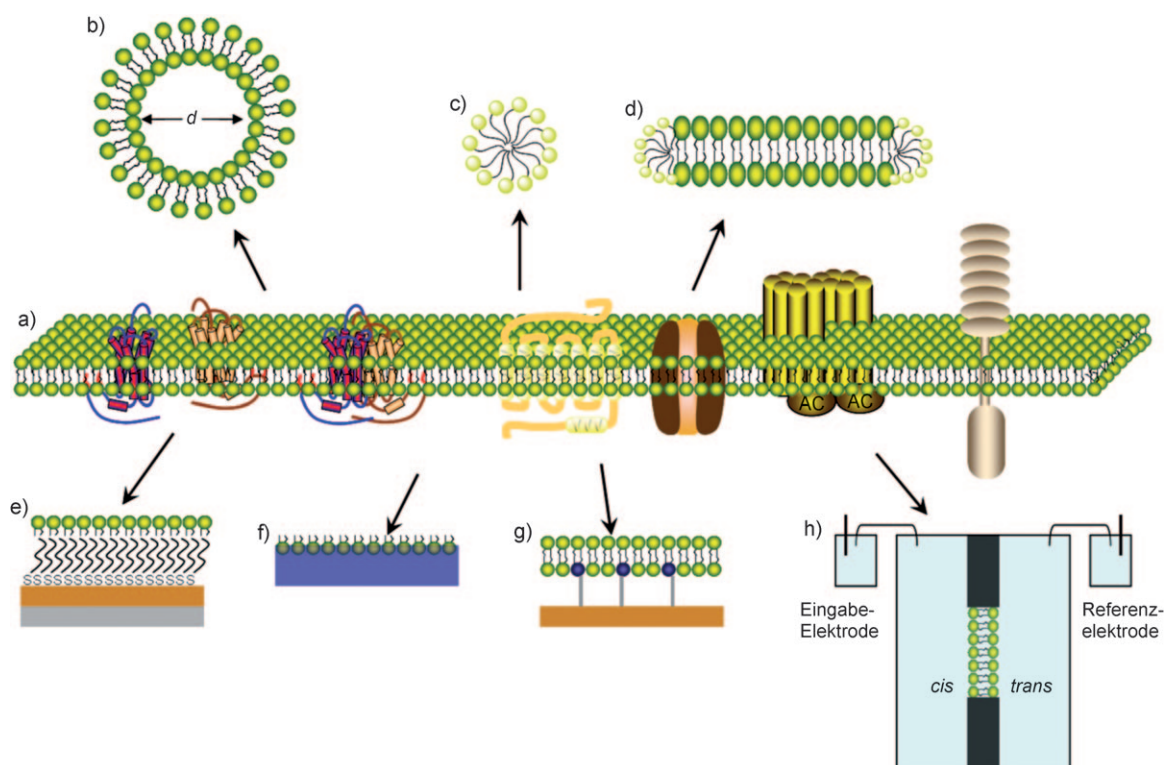


Abbildung 12. Membranmodellsysteme als Derivate natürlicher Zellmembranen: a) Darstellung einer Zellmembran; b) Vesikel oder Liposom; c) Micelle; d) Bicelle; e) gestützte Lipid-Monoschicht; f) selbstorganisierte Lipid-Monoschicht an der Luft-Wasser-Grenzfläche; g) gebundene gestützte Lipid-Doppelschicht; h) planare Lipid-Doppelschicht.

lären Proteinen, Rezeptoren, transmembranen Kanälen und Glycoproteinen sowie variierenden fluiden Regionen bestehen (Abbildung 12).^[111] Ihre strukturelle Komplexität ist ein Spiegelbild ihrer mannigfaltigen Funktionen, zu denen die Kommunikation zwischen intra- und extrazellulären Kompartimenten und der selektive Molekültransport in die und aus der Zelle gehören.

In Anbetracht der Komplexität biologischer Membranen sind viele Wissenschaftler auf die Verwendung strukturell und bezüglich der Zusammensetzung vereinfachter Membranmodellsysteme angewiesen. Diese Systeme bieten die Möglichkeit, die chemische Zusammensetzung und Fluidität der Membran systematisch zu verändern und die daraus resultierenden Veränderungen von Proteinbindung und Permeabilisierungsaktivität zu verfolgen.^[112] Der Unterschied zwischen Modellmembranen und biologischen Membranen liegt im Wesentlichen in ihrer Komplexität: Modellmembranen fehlen Bestandteile wie integrale Membranproteine und Polysaccharide, die die experimentellen Ergebnisse und deren Interpretation störend beeinflussen können.^[112] Modellmembranen sind daher die bevorzugten Systeme, um den Einfluss von Proteinen speziell auf lipidische Membranbestandteile in einer systematisch kontrollierten Weise zu untersuchen. Der Hauptnachteil von Modellmembranen ist, dass das Gesamtbild der komplexen Ordnung biochemischer Prozesse, die die Proteinaktivität beeinflussen, bei der alleinigen Verwendung von Modellsystemen nicht eingefangen werden kann. Modellsysteme bieten die Möglichkeit, sich auf ausgewählte Protein-Membran-Wechselwirkungen und Schlüsselschritte

im Mechanismus zu konzentrieren, die der biologischen Aktivität zugrunde liegen. Indem man jedoch die Interpretation experimenteller Beobachtungen und die Entwicklung mechanistischer Modelle vereinfacht, können neue Hypothesen später in komplexeren biologischen Umgebungen getestet werden. Im folgenden Abschnitt stellen wir die verschiedenen Typen verfügbarer Membranmodellsysteme vor, die von zentraler Bedeutung für ein mechanistisches Verständnis amyloider Proteine und anderer membranpermeabilisierender Proteine wie antimikrobieller Peptide oder porenbildender Toxine waren. Bezüglich komplexerer Modelle verweisen wir auf einen aktuellen Übersichtsartikel von Chan et al.^[113]

4.2. Klassen von Membranmodellsystemen

4.2.1. Vesikel, Micellen und Bicellen

Vesikel (Liposomen) sind wassergefüllte sphärische Lipid-Doppelschichten, die verschiedene Durchmesser haben können (Abbildung 12b). Man unterscheidet drei Arten von Vesikeln: 1) kleine unilamellare Vesikel (SUVs) mit Durchmessern von 20–50 nm, 2) große unilamellare Vesikel (LUVs) mit Durchmessern von etwa 100 nm und 3) sehr große unilamellare Vesikel (GUVs) mit Durchmessern von 1–10 μm (Abbildung 12b).^[112b,113] Der Begriff unilamellar bezeichnet die Tatsache, dass die Vesikel aus einer einzigen Doppelschicht bestehen. Mit ihrer sphärischen Form und ihrem wassergefüllten Inneren geht man davon aus, dass Vesikel die

biologisch relevantesten Mimetika natürlicher Zellmembranen sind. Für Details zur Vesikelherstellung verweisen wir auf einen aktuellen Übersichtsartikel.^[112b]

Die Möglichkeit zur Einführung von Farbstoffen in das Vesikelinnere macht insbesondere LUVs zu einem beliebten Instrument für die Untersuchung der peptidinduzierten Membranpermeabilisierung mittels Farbstoffleckage-Assays, die im folgenden Abschnitt beschrieben werden. SUVs gelten als weniger attraktive Systeme, da ihre hohe Krümmung Strukturspannungen und hohe Hintergrund-Leckagen verursacht. Zur Untersuchung von Peptid-Membran-Wechselwirkungen mit Fluoreszenzmethoden wie FRET können auch eine Vielfalt fluoreszenzmarkierter Kopfgruppen eingeführt werden.^[73,114] Die physikalische Beobachtung von SUVs und LUVs erfordert Elektronenmikroskopie-Techniken wie Kryo-EM, wohingegen GUVs bereits durch Lichtmikroskopie charakterisiert werden können.^[46,115] Der Nachweis der Bindung von TAMRA-markiertem α -Synuclein speziell an Oberflächen anionischer GUVs, die mit fluoreszierenden NBD-Kopfgruppen markiert waren, gelang durch bildgebende Fluoreszenzverfahren.^[45]

Micellen sind relativ kleine Tensid- oder Lipid-Aggregate mit Durchmessern von etwa 5 nm, die sich oberhalb einer kritischen Micellbildungskonzentration (CMC) des amphiphilen Tensids bilden (Abbildung 12c). Sie wurden verwendet als Modell für die Wechselwirkung von A β mit einer Zellmembran *in vitro*^[69] und für die Bestimmung der Struktur von micellgebundenem A β ,^[26b-d,31a] α -Synuclein,^[28b,36b] IAPP^[32,116] und antimikrobiellen Peptiden^[117] mittels NMR-Spektroskopie. Im Unterschied zum wässrigen Milieu im Inneren von Vesikeln befinden sich im Innenraum von Micellen die Kohlenwasserstoff-Schwanzgruppen des Tensids (Abbildung 12c). Ein potentieller Nachteil ist, dass die hohe Krümmung der Micellen eine unnatürlich gekrümmte Sekundärstruktur der micellgebundenen Proteine und Peptide bewirken kann. Zum Beispiel nimmt LUV-gebundenes α -Synuclein eine gestreckte α -Helix-Konformation ein,^[28a,34c] während micellgebundenes α -Synuclein eine Helix-Turn-Helix-Konformation hat, die wahrscheinlich an die stark gekrümmte Membranoberfläche angepasst ist (Abbildung 4).^[28b] Man geht davon aus, dass die gestreckte helicale Konformation membranangebundenes α -Synuclein im Assoziat mit relativ flachen synaptischen Vesikeln präziser repräsentiert.

Die hohe Krümmung von Micellen kann reduziert werden, indem Tenside und Phospholipide in einem bestimmten molaren Verhältnis gemischt werden, sodass die Bildung von Bicellen resultiert. Bicellen (Doppelschicht-Micellen) sind scheibenförmige Strukturen mit flachen lamellaren Oberflächen und Bereichen hoher Krümmung (Abbildung 12d), und sie sind daher eine genauere Nachahmung der Membranoberfläche *in vivo*. In der Tat nimmt bicellgebundenes α -Synuclein eine gestreckte α -Helix-Konformation ein, wie durch ESR-Abstandsmessungen bestimmt wurde (Abbildung 4).^[28d] Darüber hinaus richten sich Bicellen spontan in Gegenwart eines äußeren magnetischen Feldes aus, was zu scharf aufgelösten Signalen in ihren NMR-Spektren führt.^[105] Infolgedessen fanden Bicellen Anwendung in NMR-Untersuchungen von membranbindenden und amyloidbildenden Proteinen,^[118] darunter IAPP.^[105]

4.2.2. Lipid-Monoschichten

Eine Lipid-Monoschicht ist vielleicht die einfachste Nachahmung der Außenseite einer biologischen Membran. Eine planare gestützte Lipid-Monoschicht wird hergestellt durch die Verteilung kleiner, unilamellarer Vesikel auf einer selbstorganisierten Monoschicht, die auf einem festen Träger verankert ist, z. B. einer Goldoberfläche (Abbildung 12e).^[119] Auf diese Weise stehen die hydrophoben Schwanzgruppen der Lipidketten in Kontakt mit der Oberfläche und die polaren Lipid-Kopfgruppen zeigen in die wässrige Phase hinein (Abbildung 12e). Die Adsorption oder Insertion membranbindender Peptide an gestützte Lipid-Monoschichten kann mit Techniken wie SPR (Oberflächenplasmonenresonanz; surface plasmon resonance) oder AFM direkt verfolgt werden.^[119] Durch AFM-Aufnahmen einer POPC/POPS-Lipid-Monoschicht auf einer Goldoberfläche wurden z. B. Änderungen oder Defekte in der Struktur der Monoschicht nach Behandlung mit Wildtyp- α -Synuclein charakterisiert.^[120]

Eine Lipid-Monoschicht kann auch an der Luft-Wasser-Phasengrenze in einem Langmuir-Blodgett-Trog konstruiert werden. In diesem System ragen die hydrophilen Kopfgruppen in die Wasserphase und die hydrophoben Gruppen in die Luft (Abbildung 12f).^[121] Messungen des Oberflächendrucks von DOPC/DOPS-Lipid-Monoschichten an der Luft-Wasser-Grenzfläche liefern einen Größenwert für die Membran-Lipid-Packung und wurden genutzt, um die bevorzugte Membraninsertion von IAPP-Monomeren gegenüber entwickelten Fibrillen zu untersuchen.^[122] Zusätzlich wurden Monoschichten aus Glycolipid-lactosylceramid verwendet, um das zur Glycolipid-Bindung benötigte minimale IAPP-Fragment festzustellen.^[123] Röntgenbeugungs- und Neutronenreflexionsexperimente mit Lipid-Monoschichten an der Luft-Wasser-Grenzfläche ermöglichten vor kurzem die Charakterisierung von Änderungen in der Schichtdicke und der Membranpenetration in Gegenwart von in die wässrige Phase injiziertem A β .^[10a]

4.2.3. Modell-Lipid-Doppelschichten

Gestützte Lipid-Doppelschichten werden durch Langmuir-Transfer oder Vesikel-Fusion auf einer geeigneten Oberfläche hergestellt.^[124,125] Um zu vermeiden, dass die feste Oberfläche mit den Membraneigenschaften interferiert, werden häufig polymere Träger oder chemische Abstandhalter („tether“) zur Verankerung der Lipid-Doppelschicht auf der festen Oberfläche verwendet (Abbildung 12g). Die Doppelschicht kann auch über ein markiertes Membranprotein angebunden werden. Neue Übersichtsartikel geben einen Überblick über Methoden sowie Vor- und Nachteile verschiedener Strategien zur Herstellung gestützter Lipid-Doppelschichten.^[124,25] Die Art der Oberfläche richtet sich nach der technischen Anwendung. Goldoberflächen verwendet man in SPR oder Ionenkanal-Aktivitätsmessungen,^[126] während Glimmer, Silicium oder flaches Gold bei AFM-Messungen Anwendung finden.^[127] In einer neueren Untersuchung wird über ein per AFM abgebildetes Wachstum von A β ₂₆₋₃₅-Fasern parallel zu Glimmer-gestützten POPC-Lipid-Doppelschichten berichtet.^[128] Gestützte Lipid-Doppel-

schichten wurden auch als Modellsysteme zur Untersuchung der IAPP-Fibrillbildung^[13c] und α -Synuclein-Aggregation an Membranoberflächen mittels Fluoreszenzmikroskopie verwendet.^[43]

Planare Lipid-Doppelschichten, die man auch als schwarze Lipid-Membranen bezeichnet, sind eines der ältesten Membranmodellsysteme^[129] und dienen als Standardsysteme zur Durchführung von Einzel- oder Mehrkanal-Ionenleitfähigkeits- und Ionenselektivitätsexperimenten.^[44] In einem typischen experimentellen Aufbau für Leitfähigkeitsmessungen werden zwei Kammern mit elektrolythaltigem Puffer befüllt und durch die Lipid-Doppelschicht getrennt, die sich in einem mikrometerlangen Durchlass in einem hydrophoben Film z. B. aus Teflon befindet (Abbildung 12h).^[129] Eine Ionenkanal- oder porenbildende Probe wird typischerweise in die Membran über die cis-Kammer eingebracht, und der durch den Kanal fließende Strom wird als Funktion der Zeit in Reaktion auf die angelegte Spannung aufgezeichnet. Das Öffnen und Schließen eines einzelnen Kanals kann typischerweise in Echtzeit als ein An- bzw. Abschalten des Stromes beobachtet werden. Ionenkanal-Messungen in planaren Lipid-Doppelschichten wurden zur Bestimmung der Ionenkanal-Aktivität von α -Synuclein,^[65,66,89] A β ,^[7b,88] Polyglutamin und von Prionen abgeleiteten Polypeptiden verwendet.^[7b,76]

4.3. Mechanistische Fragen: experimentelle Ansätze

In diesem Abschnitt erläutern wir, wie die oben diskutierten Modellsysteme mit biophysikalischen Methoden untersucht werden können, um die mechanistischen Schlüssel Fragen bezüglich der Aktivität amyloidogener Proteine auf Membranen zu beantworten. Die biophysikalischen Methoden werden in einer logischen Reihenfolge vorgestellt, beginnend mit Methoden zum Nachweis von Proteinaggregation auf Membranoberflächen und von allgemeinen Membranstörungen, gefolgt von Methoden, die auf strukturelle Details des toxischen Protein-Membran-Komplexes abzielen (z.B. Bildung transmembraner Poren, Porengröße und -struktur). Mit bestimmten Methoden lassen sich Membranintegrität und strukturelle Eigenschaften untersuchen, andere dienen der Beobachtung von Änderungen in der Proteinstruktur. Anhand ausgewählter Beispiele demonstrieren wir den Nutzen der Methoden zur Klärung mechanistischer Aspekte von membranaktiven Proteinen und Peptiden. Durch viele der vorgestellten Methoden wurden bereits grundlegende Informationen bezüglich der membranpermeabilisierenden Aktivität amyloidogener Proteine gewonnen. Für Techniken, die bisher noch nicht zur Untersuchung amyloidogener Proteine angewendet wurden, werden wir aufzeigen, wie diese Methoden zum Verständnis der molekularen Mechanismen beigetragen haben, nach denen antimikrobielle Peptide, porenbildende Toxine und andere membrandurchdringende Peptide auf die Membranen einwirken. Angesichts der strukturellen und mechanistischen Ähnlichkeiten, die amyloidogene Proteine mit porenbildenden Toxinen und antimikrobiellen Peptiden verbinden, wird die Anwendung letzterer Techniken sicher unser Verständnis über die Wechsel-

wirkung zwischen amyloidogenen Proteinen und Membranen verbessern.

4.3.1. Beschleunigt die Bindung eines Proteins/Peptids an die Membranoberfläche seine Aggregation?

Eine Vielfalt an Techniken kann verwendet werden, um die membranvermittelte Katalyse der Fibrillogenese nachzuweisen, darunter bildgebende Verfahren (AFM und TEM), die Bindung an Amyloid-spezifische Farbstoffe oder Methoden zur Beobachtung von Änderungen der Proteingröße (z.B. Gelelektrophorese, Größenausschlusschromatographie und Lichtstreuung).

In-situ-AFM wurde kürzlich genutzt, um das Wachstum von A β_{26-35} -Fibrillen auf gestützten POPC-Lipid-Doppelschichten parallel zur Membranoberfläche abzubilden.^[128] Die Visualisierung der Fibrillbildung nach Inkubation von Amyloidproteinen in Gegenwart von Lipidmembranen gelingt auch mittels TEM.^[69] Mithilfe von TEM konnte auch die beschleunigte Fibrillbildung von A β (1–40) in Gegenwart von Gangliosid-Modellmembranen gezeigt werden.^[26a] Umgekehrt wurde in einer anderen Untersuchung die Spaltung von A β (1–40)-Fibrillen in kleinere lösliche Oligomere in Gegenwart einer Lipid-Monoschicht nachgewiesen.^[73]

Die beschleunigte Bildung von Proteinaggregaten oder Fibrillen durch Membranen kann leicht durch Fluoreszenzverstärkung des amyloidspezifischen Farbstoffs Thioflavin-T (ThT) detektiert werden.^[130] Eine beschleunigte Aggregation von A β (1–40) in Gegenwart von Gangliosiden^[26a,50,106] sowie DPPG enthaltenden Vesikeln^[11b] und SDS-Micellen^[69] konnte mit dieser Technik nachgewiesen werden.

Die membraninduzierte Oligomerisierung von Amyloidproteinen konnte auch durch Gelelektrophorese beobachtet werden. Nach Inkubation der Amyloidproteine in Gegenwart oder bei Fehlen einer Membran wurden die Amyloidproteine mit Glutaraldehyd vernetzt, um die dominanten oligomeren Zustände zur Analyse durch denaturierende SDS-PAGE kovalent zu fixieren. Amyloidproteine, darunter α -Synuclein und A β , bilden Oligomere höherer Ordnung nach Rekonstitution und Extraktion aus DOPC-Liposomen mittels Gelelektrophorese.^[7b]

4.3.2. Detektion der Membranpermeabilisierung/-störung

Die Störung der strukturellen Integrität von Modell-Lipid-Doppelschichten in Gegenwart eines Proteins ist ein erster Indikator einer toxischen Wirkung. Der Einbau spektroskopischer Sonden entweder in das Vesikelinnere oder in die Lipidschichten selbst eröffnet eine Reihe an Wegen, die Schwächung der Membranstruktur indirekt zu untersuchen. Andere Methoden sind Kalorimetrie oder direkte Bildgebung der Membran durch Fluoreszenzmikroskopie und Kryoelektronenmikroskopie. Auch wenn einige dieser Methoden angepasst werden können, um detailliertere Informationen zum Mechanismus zu erhalten (siehe folgende Abschnitte), eignen sich die hier vorgestellten nur zur Detektion allgemeiner Membran-Destabilisierung, können aber keine strukturellen und mechanistischen Details des Prozesses liefern.

4.3.2.1. Farbstoffleckage-Assays

Farbstoffleckage-Assays werden normalerweise genutzt, um Änderungen in der Membranpermeabilisierung und Störungen der Doppelschicht-Integrität zu detektieren, die als Folge einer Peptid- oder Proteinbindung auftreten.^[131] In diesen Experimenten werden zunächst LUVs mit fluoreszierenden oder farbigen Farbstoffen beladen. Als Folge der Bindung des Peptids an die Membran kann die Lipidpackung geschwächt werden, sodass der intravesikuläre Farbstoff in das äußere Puffermedium ausläuft, was wiederum eine Fluoreszenz- oder Farbänderung bewirkt (Abbildung 13).^[132]

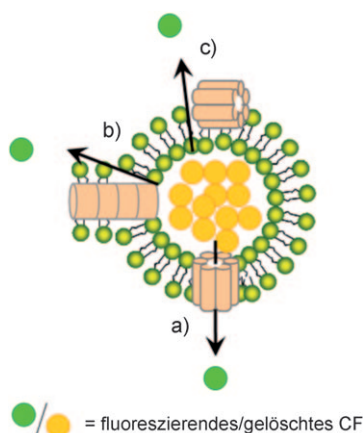


Abbildung 13. Farbstoffleckage-Assay mit Vesikeln am Beispiel des Carboxyfluorescein(CF)-Dequenching. Die Farbstoffleckage kann durch mehrere Mechanismen induziert werden, die auch für die Amyloidtoxizität vorgeschlagen werden: a) Amyloidporenbildung; b) Tensid-artige Membranauflösung durch wachsende Amyloidfibrillen oder -aggregate; und c) unspezifische Leckage, die durch Bindung von Amyloidaggregaten an die Vesikeloberfläche verursacht wird.

Tabelle 1 gibt einen Überblick über in Farbstoffleckage-Assays gebräuchliche Fluorophore und Farbstoffe, zusammen mit den jeweiligen Änderungen in Farbe oder Fluoreszenz, die bei einer Membranpermeabilisierung auftreten.

Einer der gebräuchlichsten Farbstoffleckage-Assays zur Beobachtung von Protein- oder Peptid-induzierter Membranpermeabilisierung beruht auf Fluoreszenz-Dequenching. Bei diesem Verfahren werden LUVs mit selbstlöschenden Fluorophoren wie Carboxyfluorescein^[85] oder Calcein^[46,84b] in

hohen Konzentrationen im Vesikelinneren beladen (Abbildung 13). Farbstoff-Leckage aus dem Vesikelinneren als Folge peptidinduzierter Membranpermeabilisierung führt dann zur Wiederherstellung der Fluoreszenz im extravasikulären Puffer.^[133] Die Komplexbildung von Kationen durch fluoreszierende Farbstoffe ist eine andere gängige Methode zur Detektion von protein- oder peptidvermittelter Vesikelpermeabilisierung. Der Tb³⁺/DPA-Assay beruht auf der Bildung eines stark fluoreszierenden Ligand-Rezeptor-Komplexes zwischen Terbiumkationen (Tb³⁺) und Dicolinsäure (DPA).^[81,131] Das Vesikel wird entweder mit Tb³⁺ oder DPA beladen, und der entsprechende Partner wird an die Vesikeloberfläche gebunden, sodass die komplexierenden Spezies durch die Doppelschicht vollständig getrennt sind. Bei einer peptidinduzierten Permeabilisierung wird dann Tb³⁺ und/oder DPA die Membran passieren, und es kommt zur Bildung eines stark fluoreszierenden Komplexes, der eine Vesikelpermeabilisierung anzeigt. In ähnlicher Weise detektieren mit Fura-2 beladene Vesikel Membranpermeabilisierungen durch die Bildung eines stark fluoreszierenden Komplexes mit extravasikulärem Ca²⁺.^[11a,75] Andere Farbstoffe wie Arsenazo III und Pyrocatechol-Violett reagieren auf eine Membranpermeabilisierung nach Bindung extravasikulärer Kationen wie Cu²⁺ oder Ca²⁺ mit einer Farbänderung der Lösung.^[132] Diese Assays benötigen typischerweise jedoch Kationenkonzentrationen im millimolaren Bereich, die gewiss mit der Aggregation von Amyloidproteinen und ihren Wechselwirkungen mit der Membran interferieren.^[55,62,63,67] Im ANTS/DPX-Assay (ANTS, 8-Amino-1,3,6-trisulfonsäure; DPX, *p*-Xylolbipyridiniumbromid) werden anionische Fluorophore gemeinsam mit kationischen DPX-Fluoreszenzlöschern in Lipidvesikel gebracht. Die Trennung des ANTS-Akzeptors vom DPX-Donor, die durch peptidinduzierte Leckage verursacht wird, wird über die Verstärkung der ANTS-Emission detektiert.^[81]

Der Hauptnachteil von Farbstoffleckage-Assays ist, dass sie kein genaues mechanistisches Bild peptidinduzierter Membranerzörung liefern, da nahezu alle Mechanismen, die Defekte in der Doppelschichtstruktur hervorrufen, die Passage von Farbstoffen oder Ionen durch die Lipid-Doppelschicht befördern (Abbildung 13).

4.3.2.2. Lipophile Fluoreszenzsonden

Lipophile Fluoreszenzsonden wie 1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatrien (DPH) und Laurdan reagieren auf Änderungen der Membranfluidität und Lipidketten-dynamik, als Folge der Bindung von Peptiden oder Proteinen.^[114,134] Die Vesikel wurden so hergestellt, dass ca. 1 Mol-% der Fluoreszenzsonde im Membraninneren eingebaut wurden. Im Fall von DPH spiegelt die Abnahme der Fluoreszenz-anisotropie eine Abnahme der Membranordnung wider.^[134] Laurdan ist ein polaritätssensitiver Farbstoff, der auf das Eindringen von Wassermolekülen in die hydrophobe

Tabelle 1: Farbstoffleckage-Assays zum Nachweis von Membranpermeabilisierungen.

Farbstoff	Kation	$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$	Gegenwart von Poren				Lit.
			— ^[a]	+ ^[a]	— ^[b]	+ ^[b]	
DPA ^[c]	Tb ³⁺	270/545	—	—	aus	an/grün	[131]
CF ^[d]	—	492/517	orange	gelb	aus	an/grün	[85]
ANTS/DPX ^[e]	—	360/530	—	—	aus	an/grün	[81]
Fura-2	Ca ²⁺	340/510	—	—	aus	an/grün	[75]
Arsenazo III	Ca ²⁺ , Cu ²⁺	560	rot	blau	—	—	[132]
PV ^[d]	Cu ²⁺	450	gelb	blau	—	—	[132]

[a] Farbe. [b] Fluoreszenz. [c] DPA = Dicolinsäure. [d] CF = Carboxyfluorescein. [e] ANTS = 8-Amino-1,3,6-trisulfonsäure, DPX = *p*-Xylolbipyridiniumbromid.

Lipid-Doppelschicht als Folge einer strukturellen Membranstabilisierung mit einem Anstieg der Fluoreszenz anspricht.^[114,134] Interessanterweise führte die Zugabe von monomeren α -Synuclein zu LUVs zu einem Anstieg der strukturellen Ordnung der Doppelschichten bei Verwendung dieser zwei Sonden.^[134] In einer späteren Untersuchung wurde die Abnahme der Membranfluidität mittels DPH in Gegenwart von gealterten ThT-aktiven undefinierten α -Synuclein-Aggregaten detektiert, was vermuten lässt, dass die membranstörende Struktur ein β -Faltblatt-Aggregat ist.^[38] Ein Anstieg in der strukturellen Lipidordnung von Cholesterin enthaltenden POPC-Vesikeln wurde auch beobachtet nach dem Einbau von A β (1–42) unter Verwendung von Laurdan als spektroskopische Sonde.^[135]

4.3.2.3. Fluoreszenz- und Kryo-Elektronenmikroskopie von Membranen

Fluoreszenzmikroskopie (FM) kann verwendet werden, um die Änderungen der Membranoberflächenmorphologie als Folge einer Injektion von Peptiden oder Proteinen abzubilden.^[106] Hierfür werden die Membranen so hergestellt, dass sie etwa 1 % an Kopfgruppen-markierten fluoreszierenden Lipiden enthalten. Gebräuchliche Fluoreszenz-Markierungen sind Texas-Rot, BODIPY und Rhodamin. Im Fall von Lipid-Monoschichten erscheinen FM-Aufnahmen von geordneten, kondensierten Lipidphasen dunkel, wenn Farbstoffmarkierungen von diesen Regionen wegen sterischer Hinderung ausgeschlossen wurden, wohingegen weniger geordnete Phasen (flüssig-expandierte Phasen), in denen sich die Farbstoffmoleküle verteilt haben, hell erscheinen.^[106] Eine Störung der Lipidpackung als Folge der Bindung von Peptiden ist charakterisiert durch eine Abnahme der dunklen und eine Zunahme der hellen Regionen in FM-Aufnahmen.^[106] In Gangliosid enthaltenden Membranen wurden Membrandefekte nach Zugabe von A β ^[106] und in PG enthaltenden gestützten Lipid-Doppelschichten nach Injektion von hIAPP^[13c] mittels FM beobachtet. Änderungen in der GUV-Oberflächenmorphologie in Gegenwart von hIAPP^[13b] (Abbildung 11) und α -Synuclein^[46] konnten vor kurzem auch durch FM abgebildet werden.

Die Kryo-Elektronenmikroskopie (Kryo-EM) bietet ebenfalls einen attraktiven Weg, um Änderungen der Vesikelmorphologie als Reaktion auf membranaktive Proteine abzubilden. Der Vorteil der Kryo-EM gegenüber anderen bildgebenden Verfahren ist, dass keine Probenfixierung oder Färbemittel benötigt werden und somit die Vesikelstruktur im hydratisierten Zustand erhalten bleibt. Zum Beispiel konnten Strukturstörungen von DOPC/DOPS-Vesikeln bei Kontakt mit hIAPP-Fasern mittels Kryo-EM dargestellt werden (Abbildung 10b).^[13a]

4.3.3. Wirkt das permeabilisierende Peptid an der Oberfläche oder dringt es in die Membran ein?

Peptide können an die Membran entweder über Oberflächenassoziation oder Insertion in den hydrophoben Innenraum binden. Methoden zur Unterscheidung oberflächenaktiver von membranpenetrierenden Proteinen gehen

gewöhnlich mit einer Markierung der Peptid- oder Lipidalkylketten mit entweder paramagnetischen oder fluoreszierenden Reportermolekülen einher, die auf die lokale Lösungsumgebung reagieren.

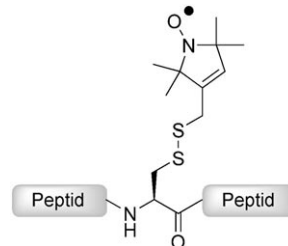


Abbildung 14. Ortsgerichtete Spinmarkierung von Proteinen: Beispiel eines Peptids mit einem Cysteinrest, der mit einer Nitroxid-Spinmarkierung modifiziert wurde.

4.3.3.1. Ortsgerichtete Spinmarkierung von Proteinen

Die ortsgerichtete Spinmarkierung (site-directed spin labeling, SDSL) von Proteinen und Peptiden ist eine EPR-Methode zur strukturellen Aufklärung der Wechselwirkung von Proteinen und Peptiden mit Membranen.^[136] Ausgewählte Aminosäuren werden zu Cystein mutiert, entweder durch ortsgerichtete Mutagenese oder durch Festphasen-peptidsynthese, und anschließend mit einem Nitroxid-Reagens zur Einführung einer Spinmarkierung zur Reaktion gebracht (Abbildung 14). Das Ausmaß, zu dem markierte Aminosäuren für polare (Nickelethylendiamindiacetat, NiEDDA) oder unpolare (Sauerstoff) paramagnetische Colider zugänglich sind, wird zur Berechnung von seitenketten-spezifischen Lösungsmittelzugänglichkeitsparametern Π genutzt, wodurch Informationen bezüglich der Umgebung des membran-gebundenen Proteins auf Aminosäureebene erhalten werden. Die Aminosäuren, die in die Membran eindringen, sind für unpolare Fluoreszenzlöcher besser zugänglich, wogegen lösungsmittel-exponierte Aminosäuren für polare Reagentien besser zugänglich sind. Die Π -Werte für eine bestimmte Aminosäure für polare vs. unpolare Fluoreszenzlöcher sind gegeneinander phasenverschoben. Zugänglichkeitsparameter können auch genutzt werden zur Berechnung der Tiefenparameter Φ [$\Phi = \ln\{\Pi(\text{O}_2)/\Pi(\text{NiEDDA})\}$], die der Membraneindringtiefe einer einzelnen Aminosäure direkt proportional sind. Mithilfe der SDSL-Methode konnte die Membranpenetration von IAPP^[27c] und α -Synuclein^[28a] nachgewiesen werden (Abbildungen 4b und 5b). Detaillierte strukturelle Informationen, z. B. über die Proteinkonformation oder die Bildung wassergefüllter Kanäle, können aus SDSL-Messungen abgeleitet werden, wie wir in den folgenden Abschnitten näher erläutern.

4.3.3.2. Tryptophanfluoreszenz

Tryptophane dienen als ortsgerichtete Fluoreszenzsonden, um das Ausmaß der Membrandurchdringung eines Proteins oder Peptids zu beobachten. Die Blauverschiebung der Fluoreszenz von Tryptophanresten amyloidbildender

Proteine oder Peptide zeigt ein Eindringen der Peptide in die hydrophobe Umgebung der Doppelschicht an.^[137] Hierbei muss in vielen Fällen zur Einführung des Tryptophan-Reporters die natürliche Sequenz modifiziert werden. Bei modifiziertem A β 40[Y10W] wurde nach Zugabe von anionischen DPPC/PG- und POPC/PG-SUVs, nicht aber von elektrisch neutralen Vesikeln, eine Blauverschiebung um 15 nm beobachtet.^[11b]

Zur Bestimmung der Eindringtiefe eines membranaktiven Peptids werden Spinmarkierungen oder Schweratome, wie z. B. in Dibrom- oder Nitroxidderivaten, in unterschiedlicher Tiefe der Lipide der Modellmembran eingeführt (d. h. an den Lipidkopfgruppen oder an einem bestimmten Kohlenstoffatom der Lipidalkylkette).^[138] Auch wenn diese Methode bisher noch nicht bei amyloidogenen Proteinen angewendet wurde, kann das Muster der Tryptophanfluoreszenzlöschung in Abhängigkeit von der Tiefe des Fluoreszenzlöschers zur Bestimmung der Eindringtiefe (die im Å-Bereich liegt) eines bestimmten Tryptophans in die Membran genutzt werden.^[138, 139] Durch Spinmarkierung mit Phosphatidylcholin an den Acylkohlenstoffatomen C5 und C15 des Bienengiftes Mellitin wurde eine Eindringtiefe von 10.5–11.0 Å für das einzige Tryptophan der Seitenkette sowohl in neutralen als auch anionischen Vesikeln ermittelt.^[140] Durch Beobachtung verschiedener Tryptophansonden an verschiedenen Positionen des Proteins kann eine Strukturkarte erhalten werden, die die Eindringtiefe von verschiedenen Regionen des membrangebundenen Proteins beschreibt. Unter Verwendung bromierter spinmarkierter Fettsäuren in PC-Vesikeln zeigten Raja und Mitarbeiter, dass sämtliche natürlichen Tryptophane eines porenbildenden α -Toxins aus *Staphylococcus aureus* an der Membran-Lösungsmittel-Grenzfläche positioniert sind.^[137] Diese Methode wurde auch zur Bestimmung der pH-abhängigen Membraninsertion der N-terminalen Region des Diphtherietoxins in LUVs mit selektiv bromierten Kohlenstoffatomen in den Lipidsäureketten genutzt.^[141]

Ein weiteres Maß für die Eindringtiefe in die Membran ist der Grad, zu dem Tryptophane vor Kollisionslöschern wie Acrylamid^[11b] oder Iodid (I⁻)^[81] geschützt sind. Wenn die Seitenketten des lipidgebundenen Peptids in der Doppelschicht vergraben sind, so sind die Tryptophane vor den im wässrigen Lösungsmittel vorliegenden Kollisionslöschern geschützt. So war der Zugang von Kollisionslöschern zum Tryptophan in tryptophanmarkiertem A β 40[Y10W] in Gegenwart von DPPC/PG-SUVs um 97 % reduziert.^[11b]

4.3.3.3. Expansionsanalyse von Lipid-Monoschichten

Zum Nachweis, dass antimikrobielle Peptide, Toxine und amyloidogene Proteine in die Membran eindringen, wurde die Expansionsanalyse von Lipid-Monoschichten auf Langmuir-Lipidfilmen an der Luft-Wasser-Grenzfläche angewendet.^[106, 123, 142] Oberflächendruck-Flächen-Isothermen wurden bestimmt, indem die Lipide auf einer proteinfreien Subphase aufgespreizt und anschließend der Lipidfilm unter konstant gehaltenem Druck verdichtet wurde.^[121] Nach Injektion des Peptids in die wässrige Subphase wird die Änderung der Fläche pro Lipidmolekül ($\Delta A/A$) bestimmt.^[121] Das Eindrin-

gen des Peptids in die Membran äußert sich in einem Anstieg der Monoschichtfläche infolge der Verringerung der Lipidpackung. Umgekehrt würde eine Auflösung der Membran durch das Peptid zu einer Verkleinerung der Monoschichtoberfläche führen. Die bevorzugte Insertion von A β 40 in anionische Monoschichten^[142a] und Gangliosidmembranen^[106] konnte mit dieser Methode demonstriert werden. Die bevorzugte Insertion monomerer Strukturen von hIAPP gegenüber fibrillären Formen in DOPC/DOPS wurde über Druck-Fläche-Isothermen auf Lipid-Monoschichten gezeigt.^[122]

4.3.3.4. Röntgen- und Neutronenreflexionsmessungen

Röntgen- und Neutronenreflexion sind analoge Methoden, die eine Bestimmung der Dicke- und Dichteänderungen von Lipid-Monoschichten infolge der Bindung von Peptiden oder Proteinen im Å-Bereich ermöglichen. Die Reflexionsdaten werden an ein Modell angepasst, und detaillierte strukturelle Informationen des Protein-Membran-Komplexes, wie die Eindringtiefe des Proteins in die Membran, die Abmessungen des in die wässrige Phase ausgedehnten Proteins und die Orientierung des membrangebundenen Proteins, werden extrapoliert. Die selektive Insertion von A β 40 in anionische Lipid-Monoschichten an der Luft-Wasser-Grenzfläche sowie der Templateffekt der Lipide bei der Amyloidfibrillbildung an anionischen Membranoberflächen wurden auf der Grundlage dieser Techniken aufgezeigt.^[10a] Röntgenreflexionsdaten wurden kürzlich zur Modellierung der zeitabhängigen Fibrillbildung von hIAPP auf der Oberfläche von DOPC/DOPG-Lipid-Monoschichten genutzt, beginnend mit der Peptidinsertion gefolgt von der Dissoziation der aggregierten Formen von hIAPP von der Membranoberfläche.^[109]

4.3.3.5. Festphasen- und Flüssig-NMR-Spektroskopie sowie Circular dichroismus

Festphasen-NMR-Spektroskopie von ¹⁵N-, ¹³C- oder ²H-markierten Peptiden, die in makroskopisch orientierten Lipid-Doppelschichten rekonstituiert wurden, wurden zur Untersuchung der Orientierung von membranbindenden Proteinen auf Membranen verwendet.^[143] Unter anderem wurde die transmembrane Anordnung der porenbildenden antimikrobiellen Peptide Alamethicin^[143a, 144] und Melittin^[143b] bestimmt. NMR-Spektroskopie in flüssiger Phase mit paramagnetischer Relaxationsverstärkung ermöglicht die Bestimmung der Membranimmersionstiefe von Schweratommarkierten Proteinatomen. Mit dieser Methode wurde die transmembrane Anordnung von Alamethicin bestätigt.^[145] In ähnlicher Weise wurde gerichteter Circular dichroismus unter Verwendung rekonstituierter Proteine in gepackten Multischichtmembranen adaptiert, um zu zeigen, dass das cytolytische Peptid Mellitin sich parallel oder senkrecht zu der eine transmembrane Pore bildenden Membran anordnen kann.^[146] Diese Methoden wurden bisher jedoch nicht zur Untersuchung der Orientierung membrangebundener amyloidogener Proteine verwendet.

4.3.4. Welche Konformation hat das membrangebundene Protein?

α -Helices an der Membranoberfläche und in die Membran eindringende β -Barrel- oder α -helicale Oligomere sind einige der möglichen Konformationen membranaktiver amyloidogener Proteine, antimikrobieller Peptide und Proteintoxine. Neben dem Circulardichroismus (CD) gibt es Methoden wie SDSL oder NMR-Spektroskopie, die Informationen über die Konformation des membrangebundenen Proteins in einer Auflösung auf der Ebene der Aminosäuren liefern.

Aus der Periodizität der Tiefenparameter Φ , die mittels SDSL von jeder Aminosäure in der Sequenz eines membrangebundenen Proteins bestimmt wurde, kann eine Karte erzeugt werden, die die Konformation des membrangebundenen Proteins und seiner Orientierung zur Membran beschreibt.^[136] Für ein membranassoziiertes α -helicales Peptid haben die Aminosäuren i und $i + 4$, die auf derselben Seite der Helix lokalisiert sind und eine ähnliche Lösungsumgebung haben, ähnliche Φ - und Π -Werte. Demgegenüber sind die Aminosäuren i und $i + 2$, die sich auf entgegengesetzten Seiten der Helix befinden und von denen die eine dem Lösungsmittel exponiert ist und die andere im Kontakt mit der Membran steht, gegenseitig phasenverschoben. Mit dieser Methode konnten die membrangebundenen α -helicalen Konformationen von hIAPP (Abbildung 3)^[27c] und α -Synuclein (Abbildung 4b und 15)^[28a] auf der Ebene der einzelnen Aminosäuren aufgelöst werden.

Hochauflösende NMR-Techniken sind nicht in der Lage, die Konformation von Peptiden im Kontakt mit ganzen Zellen zu ermitteln. Modellmembranen haben sich daher als geeignete Hilfsmittel zur Strukturbestimmung mittels NMR-Spektroskopie erwiesen. Die α -helicale Konformation von micellgebundenem A β ,^[26c,d,31a] IAPP^[32,33,116] und α -Synuclein^[28b,147] konnte mit NMR-Methoden in Lösung aufgeklärt werden (Abbildung 4a).^[28b,147] Die Strukturaufklärung membrangebundener β -Faltblatt-Aggregate und/oder oligomerer transmembraner Poren amyloidbildender Proteine, die sich wahrscheinlich zu einem späteren Zeitpunkt nach der Bindung an die Membran bilden (Schema 1), kann mit NMR-Methoden in Lösung schwieriger sein, da die Proteinlöslichkeit abnimmt. Festphasen-NMR-Methoden, die bei der Strukturaufklärung von Amyloidfibrillen erfolgreich angewendet wurden, können bei der Bestimmung membrangebundener Strukturen toxischer β -Faltblatt-Aggregate amyloidbildender Proteine ebenso nützlich sein.^[148] Auch zur Konformationsbestimmung anderer oligomerer porenbildender Proteine wie der Pore aus α -helicalem Alamethin wurden Festphasen-NMR-Methoden eingesetzt.^[149] Darüber hinaus wurden auch Einblicke in die oligomere transmembrane β -Barrel-Struktur des antimikrobiellen Peptids Protegrin-1 gewonnen.^[150] Für die Porenstruktur von Protegrin-1 werden strukturelle Analogien zur A β -Pore angenommen, was ein Potential der NMR-Methoden für die Strukturaufklärung der Amyloidporen zu erkennen gibt.^[148,151]

Ebenso wie beim SDSL ist ein Vorteil der Konformationsbestimmung von Proteinen mittels NMR-Spektroskopie die hochaufgelöste Strukturinformation, die man im Ver-

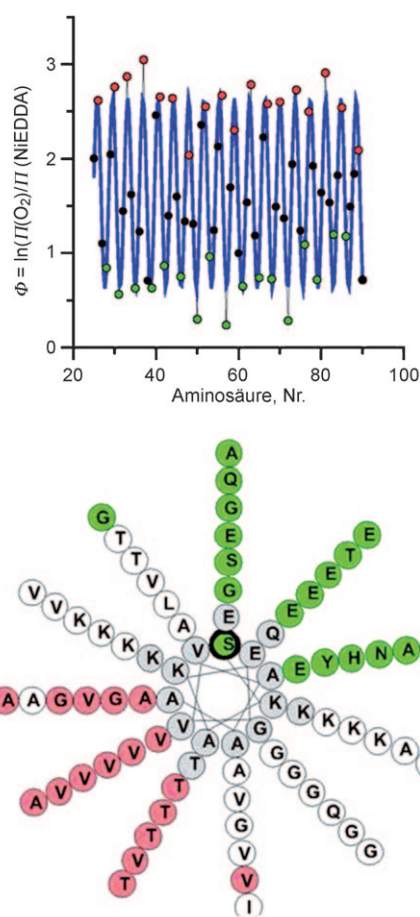


Abbildung 15. Periodizität der Φ -Werte von spinmarkiertem α -Synuclein in Gegenwart von Lipidvesikeln, verwendet zur Bestimmung der membrangebundenen Konformation in Abbildung 4. Aminosäuren mit hohen Φ -Werten (rot) sind lipidexponierte Stellen. Aminosäuren mit roten Markierungen befinden sich auf derselben membranexponierten Seite der Helix (d. h. mit den Abständen i , $i + 4$); Aminosäuren mit grünen Markierungen befinden sich auf der gegenüberliegenden, lösungsmittel-exponierten Seite der Helix (nach Jao et al.).^[28a]

gleich zu allgemeineren Methoden wie z. B. CD erhält. Es sollte angemerkt werden, dass die strukturelle Auflösung der membrangebundenen Strukturen amyloidbildender Proteine, die mit diesen Methoden erzielt werden kann, bis jetzt hauptsächlich auf monomeren oder heterogenen Präparationen amyloidbildender Proteine beruhte. Auf atomarer Ebene aufgelöste Strukturen wohldefinierter oligomerer Proben – ob allein oder an Membranen gebunden – wurden bisher nicht veröffentlicht. Das Fehlen von Strukturinformationen zu wohldefinierten oligomeren Präparationen im Aggregat mit Membranen ist hauptsächlich ihrer kurzlebigen Natur und den Schwierigkeiten bei ihrer Isolierung geschuldet.^[65]

4.3.5. Unspezifische Leckage kontra Bildung diskreter Ionenkanäle oder Poren

Die Detektion einer Peptidpenetration durch die oben erwähnten Methoden zeigt nicht zwangsläufig auch die Bildung einer transmembranen Pore an, da Regionen oder Seitenketten des Proteins auch nur partiell in die Membran

eindringen können. Der Nachweis eines wassergefüllten Kanals gelingt über die Zugänglichkeitsparameter, die man durch SDSL membranbindender Proteine erhalten kann.^[136c] Die wohl direkteste Methode zum Nachweis einer echten Ionenkanal- oder Porenaktivität ist die Messung der Einzelionenleitfähigkeit eines Kanals.^[91] Wurde eine echte Porenbildung erst einmal festgestellt, kann mittels der nachfolgend beschriebenen Methoden die Porengröße bestimmt werden.

Der Beweis einer wassergefüllten Pore gelingt über das Muster der Π -Werte spinmarkierter Peptide. Die Größen der Π -Werte entlang einer Sequenz sind normalerweise recht einheitlich für ein oberflächenadsorbiertes Protein oder Peptid, wobei die Aminosäuren, die mit der Membran in Kontakt sind – ebenso wie diejenigen, die nicht im Kontakt sind –, näherungsweise die gleichen Π -Werte haben (Abbildung 16).^[136c] Bei einer wassergefüllten Pore sind nun die

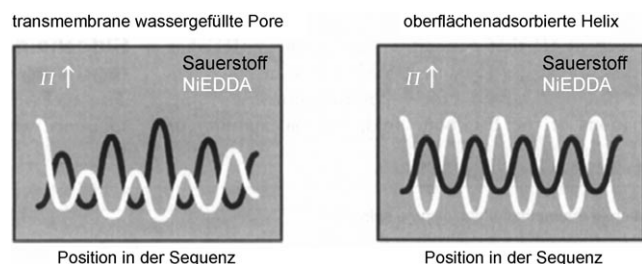


Abbildung 16. Auftragung der idealisierten Π -Werte gegen die Position in der Sequenz für eine wassergefüllte Pore (links) und eine oberflächenadsorbierte Helix (rechts). Die Zugänglichkeit der Aminosäuren für unpolare und polare paramagnetische Collider ist durch die schwarzen bzw. weißen Kurven dargestellt (nach Hubbell et al.).^[136c]

Aminosäuren nahe der Porenöffnung besser für das Lösungsmittel zugänglich, während Aminosäuren im Zentrum der Doppelschicht eine unpolare Umgebung haben. Im Fall einer wassergefüllten Pore sollten daher die Π -Werte im Zentrum der Doppelschicht in Gegenwart unpolarer paramagnetischer Collider größer sein, während die Werte an der Porenöffnung in Gegenwart polarer paramagnetischer Collider größer sein sollten (Abbildung 16).^[136c] Die Methode wurde zur Identifizierung oberflächenadsorbierter α -Helices sowohl für hIAPP^[27c] als auch für α -Synuclein verwendet.^[28a]

Einzelkanal-Leitfähigkeit: Die Leitfähigkeit von Einzelkanälen, die durch ein Protein oder Peptid in planaren Lipid-Doppelschichten induziert wird (Abbildung 13h), liefert starke Beweise für die Bildung diskreter Ionenkanäle oder Poren.^[7b,91] Typische Ionenkanäle bleiben nur für den Bruchteil einer Sekunde offen und erlauben so die Passage von Ionen durch die Pore. Die Messung des Stroms als Funktion der Zeit zeigt Stromsprünge entsprechend dem Öffnen und Schließen der Kanäle, wenn diskrete Ionenkanäle oder Poren existieren (Abbildung 7a).^[129] Spannungssteuerung (d. h. Öffnen oder Schließen des Kanals als Antwort auf eine Änderung des elektrischen Feldes)^[91] und Ionenspezifität sind ebenso allgemeine Eigenschaften einer Ionenkanal- oder Porenaktivität.^[76] Ein gradueller Anstieg der Doppelschicht-Leitfähigkeit ohne Hinweis auf offene oder geschlossene Zustände ist bezeichnend für eine Schwächung der

Doppelschichtbarriere ohne die Bildung diskreter Kanäle oder Poren.^[4a,b]

4.3.6. Messung von Porengrößen

Zusätzlich zu den oben beschriebenen Methoden können die hier vorgestellten Techniken weitere Beweise für die Porenbildung eines membranpermeabilisierenden Proteins oder Peptids liefern und die Porengröße charakterisieren. Die Porengröße kann bestimmt werden durch Größenselektivitätsuntersuchungen mit farbstoffbeladenen Vesikeln oder durch direkte bildgebende Messungen mit EM, AFM und Kry-EM.

4.3.6.1. Größenabhängigkeit der Farbstoff-Leckage

FITC-Dextrane wurden in LUVs eingebracht und als Sonden für die Porengröße verwendet. Die Größe des FITC-Dextrans wird kontrolliert durch die Größe des Dextranpolymers. Durch Vergleich der Leckage-Geschwindigkeit kleiner Fluorophore wie Calcein oder Carboxyfluorescein mit denen von FITC-Dextranen verschiedener Größen kann die ungefähre Porengröße ermittelt werden.^[152] Typischerweise setzt man FITC-Dextrane mit Molekulargewichten MW = 4000–40 000 ein. Kleine Poren von etwa 2–3 nm Durchmesser lassen auch nur kleine Fluorophore passieren (z. B. Carboxyfluorescein), Poren von 5–7 nm Durchmesser erlauben die Passage von FITC-Dextranen mit MW = 4000–20 000, und große Poren von 8 nm Durchmesser oder mehr erlauben auch die Passage von FITC-Dextranen mit MW = 40 000.^[152] Es ist davon auszugehen, dass eine unspezifische oder Tensid-artige Auflösung der Membran durch das Peptid keine Größendifferenzierung der Farbstoff-Leckage ergibt. Typische bakterielle Poren sind zu klein ($d = 0.8$ – 1.1 nm), um Moleküle über 600 Da durchzulassen,^[91] auch wenn Porendurchmesser von bis zu 15–45 nm für die PFTs Streptolysin O^[153] und Perfringolysin O^[154] berichtet wurden. Der Grenzwert der Molekülgröße für die Membranpermeabilisierung durch verschiedene amyloidogene Proteine muss erst noch ermittelt werden. Die Passage von Ca^{2+} und Dopamin, die durch protofibrilläres IAPP und α -Synuclein induziert wurde, ist wesentlich schneller als die Passage größerer FITC-Dextrane, was eine Größenselektivität vermuten lässt. Der spezifische Porendurchmesser wurde in dieser Untersuchung jedoch nicht bestimmt.^[86]

4.3.6.2. Elektronenmikroskopie und Rasterkraftmikroskopie

Zur direkten Visualisierung und Bestimmung der Porengröße sind EM und AFM die Methoden der Wahl. Sie fanden verbreitet Einsatz zur Charakterisierung von Aggregationsintermediaten, darunter auch Amyloidporen, die sich während der Fibrillbildung von Amyloidproteinen in vitro bilden (Schema 1). EM wurde eingesetzt zur Bestimmung der inneren Porendurchmesser protofibrillärer Spezies von α -Synuclein und A β , die im Bereich von 1.5–2.5 nm liegen (Abbildung 7c).^[12a–c] Mittels AFM gelingt es, Porengrößen bis in den Nanometerbereich aufzulösen. AFM-Aufnahmen liefern hochaufgelöste strukturelle Informationen über ver-

schiedene amyloidogene Proteine, die in Lipid-Doppelschichten oder auf einem festen Glimmerträger rekonstituiert waren (Abbildung 7b).^[7b, 8a]

Neutronenstreuung wurde zur Bestimmung des inneren Durchmessers einer Alamethicin-Pore eingesetzt.^[155] Mittels Kryo-EM wurde die Porengröße von Magainin, einem antimikrobiellen Peptid, bestimmt.^[156] Eine Vielzahl von Kryo-EM-Spektren, die die porösen Vesikel in Gegenwart des Peptids zeigen, wurden gemittelt, um ein Pendant einer Elektronenbeugungskurve zu erhalten, woraus eine durchschnittliche Porengröße von 8 nm für die Magainin-Pore abgeleitet wurde.^[156] Bis jetzt wurden Poren, die von amyloidogenen Proteinen gebildet werden, mit diesen Methoden noch nicht untersucht.

4.3.7. Barrel-Stave- kontra toroidale Poren

Die Klassifizierung einer Peptidpore als Barrel-Stave- oder toroidale Struktur ist ein wichtiger Schritt zur strukturellen Auflösung der membranaktiven Spezies (Abbildung 9a). Das klassische Beispiel eines antimikrobiellen Peptids, das eine Barrel-Stave-Struktur bildet, ist Alamethicin, für das wichtige Hinweise auf die Porenstruktur aus Einzelkanal-Leitfähigkeitsmessungen erhalten wurden.^[146, 157] Insbesondere konnten diskrete Leitfähigkeitsniveaus beobachtet werden, was die Bildung eines durchgehenden Kanals anzeigt. Weitere Hinweise auf ein Barrel-Stave-Modell für Alamethicin lieferte eine Kombination von Festphasen-NMR,^[143a, 144, 149, 158] NMR in Lösung und MD-Simulationen, die sämtlich darauf hindeuteten, dass dieses Protein eine transmembrane α -helicale Pore bildet.^[145] Weniger reproduzierbare Muster der Ionenkanal-Leitfähigkeit wurden für α -helicale Magainin-Peptide gefunden, von denen man annimmt, dass sie toroidale Poren bilden. Der experimentelle Befund spiegelt die Tatsache wider, dass toroidale Poren variable statt diskrete Strukturen sind.^[146] Mit derartigen Methoden können also Informationen zur Struktur von Amyloidporen abgeleitet werden.

Andere Methoden wie dynamische Differenz-Kalorimetrie (DSC) und Festphasen-NMR-Spektroskopie mit Bicell-Modellen wurden verwendet, um die Induktion einer Membrankrümmung zu detektieren, die charakteristisch ist für toroidale Porenintermediate.^[105] Mittels DSC wurde eine Verschiebung des Phasenübergangs von der flüssig-kristallinen (L_{α}) in die invers hexagonale (H_{II}) Phase in DiPoPE-Membranen in Gegenwart von IAPP-Peptiden beobachtet, was die Induktion einer negativen Krümmungsspannung anzeigt und auf eine mögliche toroidale Porenstrukturen hinweist.^[105] Die bevorzugte Bindung von Peptiden an stark gekrümmte Regionen der Bicell-Modellmembranen stützt die Annahme einer Membranpermeabilisierung durch die Bildung toroidaler Poren. In Gegenwart von z. B. IAPP wurden Verschiebungen für die ^{31}P -Kopfguppen an Perforationen gekrümmter Bicellen beobachtet, was auf die Induktion toroidaler Porenstrukturen durch das Protein hinweist.^[105]

Ebenfalls verfügbar sind spektroskopische Assays zum Nachweis toroidaler Porenintermediate. Der Lipid-Flip-Flop-Assay detektiert die Translokation von Lipiden von der äußeren zur inneren Membranseite, was durch toroidale Poren

begünstigt wird.^[117, 152, 159] Durch Kopplung von Lipid-Flip-Flop mit Farbstoff-Leckage aus farbstoffbeladenen Vesikeln lässt sich die Bildung toroidaler Poren anzeigen. Die Methode wurde bisher noch nicht bei mechanistischen Untersuchungen mit amyloidbildenden Proteinen eingesetzt.

4.3.8. Detektion der Membranfusion

Eine Membranpermeabilisierung kann auch bei der durch Peptide oder Proteine induzierten Membranfusion auftreten. Es ist unwahrscheinlich, dass ein einzelner Fusionsmechanismus allein für die Membrandestabilisierung im Fall amyloidogener Proteine verantwortlich ist, da sogar Fusionskomplexe mit der Bildung von Poren assoziiert werden können.^[160] Der Prozess der peptid-/proteininduzierten Fusion geht einher mit: 1) der Anbindung von Membranen, 2) der Membrandestabilisierung, während der der Inhalt der Doppelschicht auslaufen kann, und 3) der Fusion zu größeren Membranstrukturen.^[161]

Membranfusionsaktivität konnte mehrfach für $\text{A}\beta$ ^[10a, 106, 162] und das amyloidogene Prionproteinfragment $\text{PrP}(106-126)$ ^[163] nachgewiesen werden und wurde auch mit der Membranaktivität von α -Synuclein in Zusammenhang gebracht.^[164] Vesikelfusionsassays verfolgen die Vesikelfusion spektroskopisch und wurden zum Nachweis der Membranfusionsaktivität eines $\text{A}\beta$ -Fragments genutzt.^[162b] Typische Vesikelfusionsassays beruhen auf FRET mit fluorophormarkierten Lipidvesikeln^[163, 165] oder Core-Mixing-Assays.^[166] Dynamische Lichtstreuung bietet die Möglichkeit, die Änderung des hydrodynamischen Radius des Vesikels als Folge peptidinduzierter Fusion zu untersuchen; die Methode wurde zum Nachweis des Anstiegs des Vesikelradius nach Inkubation mit $\text{A}\beta$ verwendet.^[10a, 106] Ferner kann die Bildung größerer Vesikel als Folge peptidinduzierter Vesikelfusion durch Fluoreszenzmikroskopie unter Verwendung markierter Lipide^[167] oder mittels Kryo-EM direkt abgebildet werden.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Umfangreiche experimentelle Beweise zeigen, dass die Toxizität amyloidbildender Proteine mit ihrer Wechselwirkung mit Zellmembranen zusammenhängt. So wurde ein Zusammenhang beobachtet zwischen der membraninduzierten Fibrillbildung und einer durch amyloidogene Proteine induzierten Membranstörung. Der Prozess der Amyloidfibrillbildung wird an der Oberfläche anionischer Membranen verstärkt, möglicherweise durch Verkürzung der Latenzphase (d. h. lösliches Protein \rightarrow α -Helix \rightarrow präfibrilläre β -Faltblatt-Oligomere). Ein wahrscheinlicher Angriffsort für diese präfibrillären Aggregate ist die Zellmembran selbst, da die präfibrillären Aggregate eine höhere Membranpermeabilisierungsaktivität haben als die monomeren oder fibrillären Formen. Die direkte Visualisierung annularer porenähnlicher protofibrillärer Oligomere mit auffallenden morphologischen Ähnlichkeiten zu den membranaktiven Strukturen porenbildender Toxine, sowie der Nachweis kanalähnlicher Leitfähigkeitszustände in mehreren amyloidbildenden Proteinen stützen die Annahme, dass der Toxizität amyloidogener

Proteine ein porenähnlicher Mechanismus zugrunde liegt. Porenaktivität kann jedoch nur einen Bruchteil des Permeabilisierungsprozesses widerspiegeln. Neuere Untersuchungen speziell mit IAPP zeigen einen vollständigen Membranabbau durch Lipidextraktion und Aufnahme in die wachsenden IAPP-Fibrillen, in Analogie zum Tensid-ähnlichen Carpet-Modell, das für bestimmte antimikrobielle Peptide diskutiert wird.

Auch wenn weitere Untersuchungen nötig sind, kann man beginnen, durch Einarbeitung der hier vorgestellten Ergebnisse ein mechanistisches Modell des Permeabilisierungsprozesses zu konstruieren. Präfibrilläre Aggregate binden an die Membran oder bilden sich auf ihr aus α -helicalen Vorläufern und bilden transmembrane annuläre β -Faltblatt-Strukturen, was den unregulierten Ausstrom des Zellinhalts durch die Pore ermöglicht. In späteren Stadien der Aggregation beginnt die sich entwickelnde Faser, Lipidmoleküle aus der Membran zu extrahieren, was letztendlich zu einem vollständigen Verlust der Barrierefunktion der Membran führt. Dies könnte erklären, weshalb in manchen Berichten nicht etwa einzelne Intermediate mit der Membranersetzung und Toxizität assoziiert werden, sondern vielmehr der Prozess der Fibrillbildung.

Man sollte anmerken, dass viele der hier vorgestellten Untersuchungen mit monomeren oder gealterten heterogenen Proben mit unklarer Struktur oder in einem oligomeren Zustand durchgeführt wurden. Angesichts der Komplexität der Amyloidfibrillbildung, der enormen Zahl intermediärer oligomerer Zustände, die sich im Austausch befinden, sowie der fehlenden Kenntnis der 3D-Strukturen dieser verschiedenen intermediären Zustände kann ein vollständiger logischer Zusammenhang der experimentellen Ergebnisse so lange nicht möglich sein, bis standardisierte Verfahren der Proteinherstellung angewendet werden. Um einige dieser Unstimmigkeiten zu klären, sollten die ersten Schritte die Optimierung der Isolierung der vorherrschenden oligomeren Intermediate und, wenn möglich, die Aufklärung ihrer 3D-Strukturen sein. Mechanistische Untersuchungen und Assays mit diesen Proben könnten dann zur Identifizierung der Spezies mit der höchsten Membranpermeabilisierungsaktivität und der Aufklärung des molekularen Prozesses der Membranersetzung führen. Allerdings kann es auch sein, dass nicht nur ein einzelner oligomerer Zustand, sondern vielmehr der dynamische Austausch zwischen mehreren Zuständen während der Fibrillbildung für die Membranersetzung verantwortlich ist. Hierauf wurde in mehreren Berichten hingewiesen.

Laufende Untersuchungen mit künstlichen Modellmembransystemen erbrachten bereits erste wertvolle Einblicke in den Mechanismus, über den amyloidogene Proteine mit Membranen wechselwirken und Zelltoxizität induzieren, und haben dem Forschungsgebiet neue Untersuchungsmöglichkeiten eröffnet. In diesen Studien wurden mehrere Analogien zwischen amyloidbildenden Proteinen, porenbildenden Toxinen und antimikrobiellen Peptiden gefunden. Deshalb können Methoden, mit denen bereits mechanistische Informationen über die Aktivitäten porenbildender Toxine und antimikrobieller Peptide gewonnen wurden, auch verwendet werden, um die Wissenslücken bezüglich der weniger gut

charakterisierten amyloidbildenden Proteine zu schließen. Wir hoffen, dass die in diesem Aufsatz vorgestellten Informationen weitere Forschungsbemühungen auf diesem Gebiet anregen.

Abkürzungen

DiPoPE	Dipalmitoleoylphosphatidylethanolamin
DMPG	1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DMPG	1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho-(1'- <i>rac</i> -glycerin)
DPC	Dodecylphosphocholin
DPPC	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DPPG	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho-(1'- <i>rac</i> -glycerin)
DOPA	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphat
DOPC	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DOPG	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho-(1'- <i>rac</i> -glycerin)
DOPS	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho-L-serin
NBD	(7-Nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)
POPC	1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
POPG	1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho-(1'- <i>rac</i> -glycerin)
POPS	1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho-L-serin
PC	Phosphatidylcholin
PG	Phosphatidylglycerin
PS	Phosphatidylserin
SDS	Natriumdodecylsulfat

Die Autoren danken Prof. Ralf Langen, Prof. Maarten Engel, Prof. Ratnesh Lal, Prof. Eliezer Masliah, Prof. Ruth Nussinov und Prof. Wei-Ping Gai für die Verwendung von Daten in diesem Aufsatz. H.A.L. dankt Prof. Peter T. Lansbury und Prof. Thomas Walz für ihre Beiträge zu unseren Arbeiten in diesem Forschungsgebiet und für umsichtige Diskussionen. Diese Arbeit wurde unterstützt durch Förderungen der Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL) und ein Stipendium der Swiss National Science Foundation (H.A.L., FE-310000-110027).

Eingegangen am 26. November 2009

Online veröffentlicht am 9. Juli 2010

Übersetzt von Dr. Ina Emme-Papastavrou, Lörrach

- [1] F. M. LaFerla, K. N. Green, S. Oddo, *Nat. Rev. Neurosci.* **2007**, 8, 499.
- [2] M. G. Spillantini, M. L. Schmidt, V. M. Lee, J. Q. Trojanowski, R. Jakes, M. Goedert, *Nature* **1997**, 388, 839.
- [3] P. Westermark, C. Wernstedt, E. Wilander, D. W. Hayden, T. D. O'Brien, K. H. Johnson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, 84, 3881.
- [4] a) R. Kaye, Y. Sokolov, B. Edmonds, T. M. McIntire, S. C. Milton, J. E. Hall, C. G. Glabe, *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 46363;

- b) Y. Sokolov, J. A. Kozak, R. Kayed, A. Chanturiya, C. Glabe, J. E. Hall, *J. Gen. Physiol.* **2006**, *128*, 637; c) L. Haataja, T. Gurlo, C. J. Huang, P. C. Butler, *Endocr. Rev.* **2008**, *29*, 303.
- [5] a) D. M. Walsh, I. Klyubin, J. V. Fadeeva, W. K. Cullen, R. Anwyl, M. S. Wolfe, M. J. Rowan, D. J. Selkoe, *Nature* **2002**, *416*, 535; b) S. Lesné, M. T. Koh, L. Kotilinek, R. Kaye, C. G. Glabe, A. Yang, M. Gallagher, K. H. Ashe, *Nature* **2006**, *440*, 352.
- [6] D. L. Pountney, N. H. Voelcker, W. P. Gai, *Neurotoxic. Res.* **2005**, *7*, 59.
- [7] a) H. A. Lashuel, P. T. Lansbury, Jr., *Q. Rev. Biophys.* **2006**, *39*, 167; b) A. Quist, I. Doudevski, H. Lin, R. Azimova, D. Ng, B. Frangione, B. Kagan, J. Ghiso, R. Lal, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 10427.
- [8] a) H. Lin, R. Bhatia, R. Lal, *FASEB J.* **2001**, *15*, 2433; b) H. B. Pollard, N. Arispe, E. Rojas, *Cell. Mol. Neurobiol.* **1995**, *15*, 513.
- [9] A. Relini, O. Cavalleri, R. Rolandi, A. Gliozzi, *Chem. Phys. Lipids* **2009**, *158*, 1.
- [10] a) E. Y. Chi, C. Ege, A. Winans, J. Majewski, G. Wu, K. Kjaer, K. Y. Lee, *Proteins Struct. Funct. Genet.* **2008**, *72*, 1; b) C. Aisenbrey, T. Borowik, R. Byström, M. Bokvist, F. Lindström, H. Misiak, M.-A. Sani, G. Gröbner, *Eur. Biophys. J.* **2008**, *37*, 247.
- [11] a) M. J. Volles, S. J. Lee, J. C. Rochet, M. D. Shtilerman, T. T. Ding, J. C. Kessler, P. T. Lansbury, Jr., *Biochemistry* **2001**, *40*, 7812; b) P. T. Wong, J. A. Schauerte, K. C. Wissner, H. Ding, E. L. Lee, D. G. Steel, A. Gafni, *J. Mol. Biol.* **2009**, *386*, 81.
- [12] a) H. A. Lashuel, P. T. Lansbury, *Q. Rev. Biophys.* **2006**, *39*, 167; b) H. A. Lashuel, D. Hartley, B. M. Petre, T. Walz, P. T. Lansbury, Jr., *Nature* **2002**, *418*, 291; c) H. A. Lashuel, B. M. Petre, J. Wall, M. Simon, R. J. Nowak, T. Walz, P. T. Lansbury, Jr., *J. Mol. Biol.* **2002**, *322*, 1089; d) R. Capone, F. G. Quiroz, P. Prangkio, I. Saluja, A. M. Sauer, M. R. Bautista, R. S. Turner, J. Yang, M. Mayer, *Neurotoxic. Res.* **2009**, *16*, 1; e) B. L. Kagan, R. Azimov, R. Azimova, *J. Membr. Biol.* **2004**, *202*, 1; f) N. Arispe, E. Rojas, H. B. Pollard, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 567; g) H. B. Pollard, E. Rojas, N. Arispe, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1993**, *695*, 165.
- [13] a) M. F. Engel, L. Khemtouri, C. C. Kleijer, H. J. Meeldijk, J. Jacobs, A. J. Verkleij, B. de Kruijff, J. A. Killian, J. W. Hoppener, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 6033; b) E. Sparr, M. F. Engel, D. V. Sakharov, M. Sprong, J. Jacobs, B. de Kruijff, J. W. Hoppener, J. A. Killian, *FEBS Lett.* **2004**, *577*, 117; c) Y. A. Domanov, P. K. Kinnunen, *J. Mol. Biol.* **2008**, *376*, 42.
- [14] J. N. Rao, Y. E. Kim, L. S. Park, T. S. Ulmer, *J. Mol. Biol.* **2009**, *390*, 516.
- [15] F. Chiti, C. M. Dobson, *Annu. Rev. Biochem.* **2006**, *75*, 333.
- [16] R. M. Murphy, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2007**, *1768*, 1923.
- [17] R. Sabaté, J. Estelrich, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 11027.
- [18] P. Seubert, C. Vigo-Pelfrey, F. Esch, M. Lee, H. Dovey, D. Davis, S. Sinha, M. Schiossmacher, J. Whaley, C. Swindlehurst, R. McCormack, R. Wolfert, D. Selkoe, I. Lieberburg, D. Schenk, *Nature* **1992**, *359*, 325.
- [19] J. D. Knight, A. D. Miranker, *J. Mol. Biol.* **2004**, *341*, 1175.
- [20] M. R. Wilson, J. J. Yerbury, S. Poon, *Mol. Biosyst.* **2008**, *4*, 42.
- [21] J. A. Hebda, A. D. Miranker, *Annu. Rev. Biophys.* **2009**, *38*, 125.
- [22] R. Byström, C. Aisenbrey, T. Borowik, M. Bokvist, F. Lindström, M. A. Sani, A. Olofsson, G. Gröbner, *Cell Biochem. Biophys.* **2008**, *52*, 175.
- [23] M. Bokvist, G. Gröbner, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 14848.
- [24] S. A. Jayasinghe, R. Langen, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2007**, *1768*, 2002.
- [25] A. Abedini, D. P. Raleigh, *Protein Eng. Des. Sel.* **2009**, *22*, 453.
- [26] a) T. Okada, M. Wakabayashi, K. Ikeda, K. Matsuzaki, *J. Mol. Biol.* **2007**, *371*, 481; b) T. G. Fletcher, D. A. Keire, *Protein Sci.* **1997**, *6*, 666; c) P. K. Mandal, J. W. Pettigrew, *Neurochem. Res.* **2004**, *29*, 2267; d) H. Shao, S. Jao, K. Ma, M. G. Zagorski, *J. Mol. Biol.* **1999**, *285*, 755.
- [27] a) J. A. Williamson, J. P. Loria, A. D. Miranker, *J. Mol. Biol.* **2009**, *393*, 383; b) J. D. Knight, J. A. Hebda, A. D. Miranker, *Biochemistry* **2006**, *45*, 9496; c) M. Apostolidou, S. A. Jayasinghe, R. Langen, *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 17205; d) S. A. Jayasinghe, R. Langen, *Biochemistry* **2005**, *44*, 12113.
- [28] a) C. C. Jao, B. G. Hegde, J. Chen, I. S. Haworth, R. Langen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 19666; b) T. S. Ulmer, A. Bax, N. B. Cole, R. L. Nussbaum, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 9595; c) M. Drescher, F. Godschalk, G. Veldhuis, B. D. van Rooijen, V. Subramaniam, M. Huber, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 2411; d) E. R. Georgieva, T. F. Ramlall, P. P. Borbat, J. H. Freed, D. Eliezer, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 12856.
- [29] D. H. Lopes, A. Meister, A. Gohlke, A. Hauser, A. Blume, R. Winter, *Biophys. J.* **2007**, *93*, 3132.
- [30] M. D. Kirkitadze, M. M. Condron, D. B. Teplow, *J. Mol. Biol.* **2001**, *312*, 1103.
- [31] a) M. Coles, W. Bicknell, A. A. Watson, D. P. Fairlie, D. J. Craik, *Biochemistry* **1998**, *37*, 11064; b) T. Kohno, K. Kobayashi, T. Maeda, K. Sato, A. Takashima, *Biochemistry* **1996**, *35*, 16094.
- [32] S. M. Patil, S. Xu, S. R. Sheftic, A. T. Alexandrescu, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 11982.
- [33] a) R. P. Nanga, J. R. Brender, J. Xu, G. Veglia, A. Ramamoorthy, *Biochemistry* **2008**, *47*, 12689; b) J. R. Brender, E. L. Lee, M. A. Cavitt, A. Gafni, D. G. Steel, A. Ramamoorthy, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 6424.
- [34] a) L. Kjaer, L. Giehm, T. Heimburg, D. Otzen, *Biophys. J.* **2009**, *96*, 2857; b) M. Drescher, G. Veldhuis, B. D. van Rooijen, S. Milikisyants, V. Subramaniam, M. Huber, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 7796; c) A. J. Trexler, E. Rhoades, *Biochemistry* **2009**, *48*, 2304; d) D. Eliezer, E. Kutluay, R. Bussell, Jr., G. Browne, *J. Mol. Biol.* **2001**, *307*, 1061.
- [35] K. Vamvaca, M. J. Volles, P. T. Lansbury, Jr., *J. Mol. Biol.* **2009**, *389*, 413.
- [36] a) M. Mihajlovic, T. Lazaridis, *Proteins Struct. Funct. Genet.* **2008**, *70*, 761; b) R. Bussell, Jr., D. Eliezer, *J. Mol. Biol.* **2003**, *329*, 763.
- [37] M. J. Volles, P. T. Lansbury, Jr., *J. Mol. Biol.* **2007**, *366*, 1510.
- [38] D. P. Smith, D. J. Tew, A. F. Hill, S. P. Bottomley, C. L. Masters, K. J. Barnham, R. Cappai, *Biochemistry* **2008**, *47*, 1425.
- [39] M. Zhu, A. L. Fink, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 16873.
- [40] H. J. Lee, C. Choi, S. J. Lee, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 671.
- [41] M. Nuclea, C. N. Chirita, J. Kuret, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 46674.
- [42] a) K. Matsuzaki, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2007**, *1768*, 1935; b) C. H. Davis, M. L. Berkowitz, *Biophys. J.* **2009**, *96*, 785.
- [43] A. P. Pandey, F. Haque, J. C. Rochet, J. S. Hovis, *Biophys. J.* **2009**, *96*, 540.
- [44] F. Evers, C. Jeworrek, S. Tiemeyer, K. Weise, D. Sellin, M. Paulus, B. Struth, M. Tolan, R. Winter, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 9516.
- [45] M. Stöckl, P. Fischer, E. Wanker, A. Herrmann, *J. Mol. Biol.* **2008**, *375*, 1394.
- [46] B. D. van Rooijen, M. M. Claessens, V. Subramaniam, *FEBS Lett.* **2008**, *582*, 3788.
- [47] J. A. Allen, R. A. Halverson-Tamboli, M. M. Rasenick, *Nat. Rev. Neurosci.* **2007**, *8*, 128.
- [48] Y. Tamai, S. Matsukawa, M. Satake, *J. Biochem.* **1971**, *69*, 235.
- [49] a) D. R. Taylor, N. M. Hooper, *Mol. Membr. Biol.* **2006**, *23*, 89; b) S. I. Kim, J. S. Yi, Y. G. Ko, *J. Cell. Biochem.* **2006**, *99*, 878; c) T. J. Pinheiro, *Chem. Phys. Lipids* **2006**, *141*, 66.
- [50] T. Okada, K. Ikeda, M. Wakabayashi, M. Ogawa, K. Matsuzaki, *J. Mol. Biol.* **2008**, *382*, 1066.

- [51] K. Yanagisawa, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2007**, 1768, 1943.
- [52] K. Matsuzaki, T. Noguchi, M. Wakabayashi, K. Ikeda, T. Okada, Y. Ohashi, M. Hoshino, H. Naiki, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2007**, 1768, 122.
- [53] M. Wakabayashi, K. Matsuzaki, *FEBS Lett.* **2009**, 583, 2854.
- [54] F. Re, S. Sesana, A. Barbiroli, F. Bonomi, E. Cazzaniga, E. Lonati, A. Bulbarelli, M. Masserini, *FEBS Lett.* **2008**, 582, 215.
- [55] C. C. Curtain, F. E. Ali, D. G. Smith, A. I. Bush, C. L. Masters, E. C. Barnham, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 2977.
- [56] L. Qiu, A. Lewis, J. Como, M. W. Vaughn, J. Huang, P. Sommerharju, J. Virtanen, K. H. Cheng, *Biophys. J.* **2009**, 96, 4299.
- [57] C. Cecchi, D. Nichino, M. Zampagni, C. Bernacchioni, E. Evangelisti, A. Pensalfini, G. Liguri, A. Gliozzi, M. Stefani, A. Relini, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2009**, 1788, 2204.
- [58] W. J. Cho, S. Trikha, A. M. Jeremic, *J. Mol. Biol.* **2009**, 393, 765.
- [59] E. C. Hirsch, J. P. Brandel, P. Galle, F. Javoy-Agid, Y. Agid, *J. Neurochem.* **1991**, 56, 446.
- [60] M. A. Lovell, J. D. Robertson, W. J. Teesdale, J. L. Campbell, W. R. Markesbery, *J. Neurol. Sci.* **1998**, 158, 47.
- [61] A. Gaeta, R. C. Hider, *Br. J. Pharmacol.* **2005**, 146, 1041.
- [62] E. House, J. Collingwood, A. Khan, O. Korchazkina, G. Berthon, C. Exley, *J. Alzheimer's Dis.* **2004**, 6, 291.
- [63] a) V. N. Uversky, J. Li, A. L. Fink, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 44284; b) Bharathi, S. S. Indi, K. S. J. Rao, *Neurosci. Lett.* **2007**, 424, 78.
- [64] R. Lowe, D. L. Pountney, P. H. Jensen, W. P. Gai, N. H. Voelcker, *Protein Sci.* **2004**, 13, 3245.
- [65] H.-Y. Kim, M.-K. Cho, A. Kumar, E. Maier, C. Siebenhaar, S. Becker, C. O. Fernandez, H. A. Lashuel, R. Benz, A. Lange, M. Zweckstetter, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 17482.
- [66] M. Kostka, T. Hogen, K. M. Danzer, J. Levin, M. Habeck, A. Wirth, R. Wagner, C. G. Glabe, S. Finger, U. Heinzelmann, P. Garidel, W. Duan, C. A. Ross, H. Kretschmar, A. Giese, *J. Biol. Chem.* **2008**, 283, 10992.
- [67] a) J. D. Gehman, C. C. O'Brien, F. Shabanpoor, J. D. Wade, F. Separovic, *Eur. Biophys. J.* **2008**, 37, 333; b) T. L. Lau, E. E. Ambroggio, D. J. Tew, R. Cappai, C. L. Masters, G. D. Fidelio, K. J. Barnham, F. Separovic, *J. Mol. Biol.* **2006**, 356, 759.
- [68] D. P. Smith, D. G. Smith, C. C. Curtain, J. F. Boas, J. R. Pilbrow, G. D. Ciccotosto, T.-L. Lau, D. J. Tew, K. Perez, J. D. Wade, A. I. Bush, S. C. Drew, F. Separovic, C. L. Masters, R. Cappai, K. J. Barnham, *J. Biol. Chem.* **2006**, 281, 15145.
- [69] V. Rangachari, B. D. Moore, D. K. Reed, L. K. Sonoda, A. W. Bridges, E. Conboy, D. Hartigan, T. L. Rosenberry, *Biochemistry* **2007**, 46, 12451.
- [70] Y. Shai, *Biopolymers* **2002**, 66, 236.
- [71] a) M. N. Melo, R. Ferre, M. A. Castanho, *Nat. Rev. Microbiol.* **2009**, 7, 245; b) H. W. Huang, *Biochemistry* **2000**, 39, 8347.
- [72] I. C. Martins, I. Kuperstein, H. Wilkinson, E. Maes, M. Vanbrabant, W. Jonckheere, P. Van Gelder, D. Hartmann, R. D'Hooge, B. De Strooper, J. Schymkowitz, F. Rousseau, *EMBO J.* **2008**, 27, 224.
- [73] M. J. O. Widenbrant, J. Rajadas, C. Sutardja, G. G. Fuller, *Biophys. J.* **2006**, 91, 4071.
- [74] a) N. Arispe, H. B. Pollard, E. Rojas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 10573; b) N. Arispe, H. B. Pollard, E. Rojas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 1710; c) T. A. Mirzabekov, M. C. Lin, B. L. Kagan, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 1988; d) Y. Hirakura, M. C. Lin, B. L. Kagan, *J. Neurosci. Res.* **1999**, 57, 458.
- [75] M. J. Volles, P. T. Lansbury, Jr., *Biochemistry* **2002**, 41, 4595.
- [76] H. Monoi, S. Futaki, S. Kugimiya, H. Minakata, K. Yoshihara, *Biophys. J.* **2000**, 78, 2892.
- [77] a) J. I. Kourie, A. Culverson, *J. Neurosci. Res.* **2000**, 62, 120; b) J. I. Kourie, P. V. Farrelly, C. L. Henry, *J. Neurosci. Res.* **2001**, 66, 214.
- [78] a) M. P. Mattson, S. L. Chan, *J. Mol. Neurosci.* **2001**, 17, 205; b) P. Hajieva, C. Kuhlmann, H. J. Luhmann, C. Behl, *Neurosci. Lett.* **2009**, 451, 119.
- [79] H. A. Lashuel, D. M. Hartley, B. M. Petre, J. S. Wall, M. N. Simon, T. Walz, P. T. Lansbury, Jr., *J. Mol. Biol.* **2003**, 332, 795.
- [80] a) D. Eliezer, *J. Gen. Physiol.* **2006**, 128, 631; b) G. Valincius, F. Heinrich, R. Budvytyte, D. J. Vanderah, D. J. McGillivray, Y. Sokolov, J. E. Hall, M. Losche, *Biophys. J.* **2008**, 95, 4845.
- [81] J. M. Rausch, J. R. Marks, R. Rathinakumar, W. C. Wimley, *Biochemistry* **2007**, 46, 12124.
- [82] B. Bechinger, K. Lohner, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2006**, 1758, 1529.
- [83] C. G. Glabe, *J. Biol. Chem.* **2008**, 283, 29639.
- [84] a) Y. Porat, S. Kolusheva, R. Jelinek, E. Gazit, *Biochemistry* **2003**, 42, 10971; b) L. Pieri, M. Bucciantini, P. Guasti, J. Savitschenko, R. Melki, M. Stefani, *Biophys. J.* **2009**, 96, 3319.
- [85] W. Qi, A. Zhang, T. A. Good, E. J. Fernandez, *Biochemistry* **2009**, 48, 8908.
- [86] M. Anguiano, R. J. Nowak, P. T. Lansbury, Jr., *Biochemistry* **2002**, 41, 11338.
- [87] Y. Yoshiike, R. Kayed, S. C. Milton, A. Takashima, C. G. Glabe, *NeuroMolecular Med.* **2007**, 9, 270.
- [88] M. R. de Planque, V. Raussens, S. A. Contera, D. T. Rijkers, R. M. Liskamp, J. M. Ruyschaert, J. F. Ryan, F. Separovic, A. Watts, *J. Mol. Biol.* **2007**, 368, 982.
- [89] S. D. Zakharov, J. D. Hulleman, E. A. Dutseva, Y. N. Antonenko, J.-C. Rochet, W. A. Cramer, *Biochemistry* **2007**, 46, 14369.
- [90] R. Bahadi, P. V. Farrelly, B. L. Kenna, J. I. Kourie, F. Tagliavini, G. Forloni, M. Salmona, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2003**, 285, C862.
- [91] G. Bainbridge, I. Gokce, J. H. Lakey, *FEBS Lett.* **1998**, 431, 305.
- [92] N. Arispe, J. C. Diaz, O. Simakova, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2007**, 1768, 1952.
- [93] a) J. Zhong, C. Yang, W. Zheng, L. Huang, Y. Hong, L. Wang, Y. Sha, *Biophys. J.* **2009**, 96, 4610; b) J. Zhong, W. Zheng, L. Huang, Y. Hong, L. Wang, Y. Qiu, Y. Sha, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2007**, 1768, 1420; c) W. Zheng, L. Wang, Y. Hong, Y. Sha, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2009**, 379, 298.
- [94] D. L. Pountney, R. Lowe, M. Quilty, J. C. Vickers, N. H. Voelcker, W. P. Gai, *J. Neurochem.* **2004**, 90, 502.
- [95] S. Inoue, *Amyloid* **2008**, 15, 223.
- [96] M. Bischofberger, M. R. Gonzalez, F. G. van der Goot, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2009**, 21, 589.
- [97] M. R. Gonzalez, M. Bischofberger, L. Pernot, F. G. van der Goot, B. Frêche, *Cell. Mol. Life Sci.* **2008**, 65, 493.
- [98] H. Jang, J. Zheng, R. Lal, R. Nussinov, *Trends Biochem. Sci.* **2008**, 33, 91.
- [99] a) S. J. Singer, N. N. Dewji, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, 103, 1546; b) J. A. Yong, Y. Pin, *Chin. Sci. Bull.* **2007**, 52, 1576.
- [100] I. F. Tsigelny, P. Bar-On, Y. Sharikov, L. Crews, M. Hashimoto, M. A. Miller, S. H. Keller, O. Platoshyn, J. X.-J. Yuan, E. Masliah, *FEBS J.* **2007**, 274, 1862.
- [101] M. R. de Planque, V. Raussens, S. A. Contera, D. T. S. Rijkers, R. M. J. Liskamp, J.-M. Ruyschaert, J. F. Ryan, F. Separovic, A. Watts, *J. Mol. Biol.* **2007**, 368, 982.
- [102] R. Kaye, A. Pensalfini, L. Margol, Y. Sokolov, F. Sarsoza, E. Head, J. Hall, C. Glabe, *J. Biol. Chem.* **2009**, 284, 4230.
- [103] R. Füssle, S. Bhakdi, A. Sziegoleit, J. Tranum-Jensen, T. Kranz, H. J. Wellensiek, *J. Cell Biol.* **1981**, 91, 83.
- [104] A. K. Mahalka, P. K. Kinnunen, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2009**, 1788, 1600.
- [105] P. E. Smith, J. R. Brender, A. Ramamoorthy, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 4470.
- [106] E. Y. Chi, S. L. Frey, K. Y. Lee, *Biochemistry* **2007**, 46, 1913.
- [107] R. Friedman, R. Pellarin, A. Cafilisch, *J. Mol. Biol.* **2009**, 387, 407.

- [108] a) A. Jan, O. Gokce, R. Luthi-Carter, H. A. Lashuel, *J. Biol. Chem.* **2008**, 283, 28176; b) M. Wogulis, S. Wright, D. Cunningham, T. Chilcote, K. Powell, R. E. Rydel, *J. Neurosci.* **2005**, 25, 1071.
- [109] D. Radovan, N. Opitz, R. Winter, *FEBS Lett.* **2009**, 583, 1439.
- [110] L.-M. Yan, A. Velkova, M. Tatarek-Nossol, E. Andreetto, A. Kapurniotu, *Angew. Chem.* **2007**, 119, 1268; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 1246.
- [111] S. J. Singer, G. L. Nicolson, *Science* **1972**, 175, 720.
- [112] a) M. Vestergaard, T. Hamada, M. Takagi, *Biotechnol. Bioeng.* **2008**, 99, 753; b) L. Maler, A. Graslund, *Methods Mol. Biol.* **2009**, 480, 129.
- [113] Y. H. Chan, S. G. Boxer, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, 11, 581.
- [114] L. A. Munishkina, A. L. Fink, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2007**, 1768, 1862.
- [115] A. Fischer, T. Oberholzer, P. L. Luisi, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2000**, 1467, 177.
- [116] R. P. Nanga, J. R. Brender, J. Xu, K. Hartman, V. Subramanian, A. Ramamoorthy, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 8252.
- [117] D. J. Schibli, L. T. Nguyen, S. D. Kernaghan, O. Rekdal, H. J. Vogel, *Biophys. J.* **2006**, 91, 4413.
- [118] S. V. Dvinskikh, U. H. Durr, K. Yamamoto, A. Ramamoorthy, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 794.
- [119] M. A. Cooper, A. C. Try, J. Carroll, D. J. Ellar, D. H. Williams, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1998**, 1373, 101.
- [120] E. Giannakis, J. Pacifico, D. P. Smith, L. W. Hung, C. L. Masters, R. Cappai, J. D. Wade, K. J. Barnham, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2008**, 1778, 1112.
- [121] A. Cruz, J. Pérez-Gil, *Methods Mol. Biol.* **2007**, 400, 439.
- [122] M. F. M. Engel, H. Yigittop, R. C. Elgersma, D. T. S. Rijkers, R. M. J. Liskamp, B. de Kruijff, J. W. M. Höppener, J. A. Killian, *J. Mol. Biol.* **2006**, 356, 783.
- [123] M. Levy, N. Garmy, E. Gazit, J. Fantini, *FEBS J.* **2006**, 273, 5724.
- [124] C. Rossi, J. Chopineau, *Eur. Biophys. J.* **2007**, 36, 955.
- [125] R. P. Richter, R. Berat, A. R. Brisson, *Langmuir* **2006**, 22, 3497.
- [126] B. A. Cornell, V. L. Braach-Maksvytis, L. G. King, P. D. Osman, B. Raguse, L. Wiczorek, R. J. Pace, *Nature* **1997**, 387, 580.
- [127] B. Seantier, M.-C. Giocondi, C. Le Grimellec, P.-E. Milhiet, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2008**, 13, 326.
- [128] L. Zhang, J. Zhong, L. Huang, L. Wang, Y. Hong, Y. Sha, *J. Phys. Chem. B* **2008**, 112, 8950.
- [129] P. Van Gelder, F. Dumas, M. Winterhalter, *Biophys. Chem.* **2000**, 85, 153.
- [130] R. Khurana, C. Coleman, C. Ionescu-Zanetti, S. A. Carter, V. Krishna, R. K. Grover, R. Roy, S. Singh, *J. Struct. Biol.* **2005**, 151, 229.
- [131] J. M. Rausch, W. C. Wimley, *Anal. Biochem.* **2001**, 293, 258.
- [132] S. M. Butterfield, A. Hennig, S. Matile, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, 7, 1784.
- [133] G. Das, P. Talukdar, S. Matile, *Science* **2002**, 298, 1600.
- [134] F. Kamp, K. Beyer, *J. Biol. Chem.* **2006**, 281, 9251.
- [135] R. H. Ashley, T. A. Harroun, T. Hauss, K. C. Breen, J. P. Bradshaw, *BMC Struct. Biol.* **2006**, 6, 21.
- [136] a) G. E. Fanucci, D. S. Cafiso, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2006**, 16, 644; b) M. Margittai, R. Langen, *Methods Enzymol.* **2006**, 413, 122; c) W. L. Hubbell, A. Gross, R. Langen, M. A. Lietzow, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1998**, 8, 649.
- [137] S. M. Raja, S. S. Rawat, A. Chattopadhyay, A. K. Lala, *Biophys. J.* **1999**, 76, 1469.
- [138] A. Chattopadhyay, H. Raghuraman, *Curr. Sci.* **2004**, 87, 175.
- [139] A. S. Ladokhin, *Biophys. J.* **1993**, 64, A290.
- [140] A. K. Ghosh, R. Rukmini, A. Chattopadhyay, *Biochemistry* **1997**, 36, 14291.
- [141] C. Montagner, A. Perier, S. Pichard, G. Vernier, A. Menez, D. Gillet, V. Forge, A. Chenal, *Biochemistry* **2007**, 46, 1878.
- [142] a) C. Ege, K. Y. Lee, *Biophys. J.* **2004**, 87, 1732; b) V. Vie, N. Van Mau, L. Chaloin, E. Lesniewska, C. Le Grimellec, F. Heitz, *Biophys. J.* **2000**, 78, 846; c) D. Gidalevitz, Y. Ishitsuka, A. S. Muresan, O. Kononov, A. J. Waring, R. I. Lehrer, K. Y. Lee, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 6302.
- [143] a) M. Bak, R. P. Bywater, M. Hohwy, J. K. Thomsen, K. Adelhorst, H. J. Jakobsen, O. W. Sorensen, N. C. Nielsen, *Biophys. J.* **2001**, 81, 1684; b) A. Naito, T. Nagao, K. Norisada, T. Mizuno, S. Tuzi, H. Saito, *Biophys. J.* **2000**, 78, 2405.
- [144] a) E. S. Salnikov, M. De Zotti, F. Formaggio, X. Li, C. Toniolo, J. D. O'Neil, J. Raap, S. A. Dzuba, B. Bechinger, *J. Phys. Chem. B* **2009**, 113, 3034; b) B. Bechinger, D. A. Skladnev, A. Ogrel, X. Li, E. V. Rogozhkina, T. V. Ovchinnikova, J. D. O'Neil, J. Raap, *Biochemistry* **2001**, 40, 9428.
- [145] J. Dittmer, L. Thogersen, J. Underhaug, K. Bertelsen, T. Vosegaard, J. M. Pedersen, B. Schiott, E. Tajkhorshid, T. Skrydstrup, N. C. Nielsen, *J. Phys. Chem. B* **2009**, 113, 6928.
- [146] L. Yang, T. A. Harroun, T. M. Weiss, L. Ding, H. W. Huang, *Biophys. J.* **2001**, 81, 1475.
- [147] C. R. Bodner, C. M. Dobson, A. Bax, *J. Mol. Biol.* **2009**, 390, 775.
- [148] A. Naito, I. Kawamura, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2007**, 1768, 1900.
- [149] K. Bertelsen, J. M. Pedersen, B. S. Rasmussen, T. Skrydstrup, N. C. Nielsen, T. Vosegaard, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 14717.
- [150] a) M. Tang, M. Hong, *Mol. Biosyst.* **2009**, 5, 317; b) R. Mani, S. D. Cady, M. Tang, A. J. Waring, R. I. Lehrer, M. Hong, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, 103, 16242.
- [151] H. Jang, B. Ma, R. Lal, R. Nussinov, *Biophys. J.* **2008**, 95, 4631.
- [152] a) F. Yoneyama, Y. Imura, K. Ohno, T. Zendo, J. Nakayama, K. Matsuzaki, K. Sonomoto, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, 53, 3211; b) T. Tachi, R. F. Epand, R. M. Epand, K. Matsuzaki, *Biochemistry* **2002**, 41, 10723.
- [153] K. Sekiya, R. Satoh, H. Danbara, Y. Futaesaku, *J. Bacteriol.* **1993**, 175, 5953.
- [154] A. Olofsson, H. Hebert, M. Thelestam, *FEBS Lett.* **1993**, 319, 125.
- [155] K. He, S. J. Ludtke, D. L. Worcester, H. W. Huang, *Biophys. J.* **1996**, 70, 2659.
- [156] M. Han, Y. Mei, H. Khant, S. J. Ludtke, *Biophys. J.* **2009**, 97, 164.
- [157] D. O. Mak, W. W. Webb, *Biophys. J.* **1995**, 69, 2323.
- [158] E. S. Salnikov, H. Friedrich, X. Li, P. Bertani, S. Reissmann, C. Hertweck, J. D. O'Neil, J. Raap, B. Bechinger, *Biophys. J.* **2009**, 96, 86.
- [159] A. Pokorny, P. F. Almeida, *Biochemistry* **2004**, 43, 8846.
- [160] A. Engel, P. Walter, *J. Cell Biol.* **2008**, 183, 181.
- [161] R. Jahn, T. Lang, T. C. Südhof, *Cell* **2003**, 112, 519.
- [162] a) S. Dante, T. Hauss, A. Brandt, N. A. Dencher, *J. Mol. Biol.* **2008**, 376, 393; b) T. Pillot, M. Goethals, B. Vanloo, C. Talusot, R. Brasseur, J. Vandekerckhove, M. Rosseneu, L. Lins, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 28757.
- [163] I. Dupiereux, W. Zorzi, L. Lins, R. Brasseur, P. Colson, E. Heinen, B. Elmoulaj, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, 331, 894.
- [164] J. Madine, E. Hughes, A. J. Doig, D. A. Middleton, *Mol. Membr. Biol.* **2008**, 25, 518.
- [165] a) D. K. Struck, D. Hoekstra, R. E. Pagano, *Biochemistry* **1981**, 20, 4093; b) Y. Gong, Y. Luo, D. Bong, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 14430.
- [166] H. Ellens, J. Bentz, F. C. Szoka, *Biochemistry* **1985**, 24, 3099.
- [167] G. J. Gabriel, J. G. Pool, A. Som, J. M. Dabkowski, E. B. Coughlin, M. Muthukumar, G. N. Tew, *Langmuir* **2008**, 24, 12489.