

Analyse der Energiebarrieren für das Wachstum von Amyloidfibrillen**

Alexander K. Buell, Anne Dhulesia, Duncan A. White, Tuomas P. J. Knowles, Christopher M. Dobson* und Mark E. Welland*

Löslichkeit ist eine Grundvoraussetzung für die Funktionen eines Proteins innerhalb des komplexen Netzwerks zellulärer Bestandteile.^[1–4] Eine Gruppe schwerster Krankheiten, darunter die Alzheimer'sche und die Parkinson'sche Krankheit, werden mit dem Verlust der Löslichkeit von Peptiden und Proteinen in Verbindung gebracht, welcher von ihrer Aggregation zu geordneten Amyloidfibrillen begleitet wird.^[5] Man weiß, dass diese Aggregate zumindest unter manchen physiologischen Bedingungen thermodynamisch stabiler sind als die nativen Formen biologischer Polypeptide.^[6] Diese Entdeckung wirft die Frage nach den Faktoren auf, die Proteine unter den Bedingungen in Lösung halten, unter denen der lösliche Zustand nicht notwendigerweise dem absoluten Minimum der freien Energie(hyperfläche) entspricht. Um diese Frage anzugehen, haben wir im Detail die Kinetik des Wachstums von Amyloidfibrillen einer Vielzahl von Polypeptiden untersucht. Die Bildung von Amyloidfibrillen aus löslichen Proteinmolekülen umfasst mindestens einen primären Nukleationsprozess, das Wachstum von Fibrillen, und im Allgemeinen einen sekundären Nukleationsprozess, wie etwa die Fragmentierung von Fibrillen.^[7] Zudem können multiple, sich gegenseitig ineinander umwandelnde oligomere Zwischenprodukte beteiligt sein.^[8] Messungen des Wachstums von Amyloidfibrillen in Lösung umfassen oft all diese Prozesse gleichzeitig, und es kann daher sehr schwierig sein, die Konzentrationen der einzelnen Spezies und die Geschwindigkeitskonstanten der Elementarschritte genau zu bestimmen.

Um diese Schwierigkeiten zu umgehen, wurden in den letzten Jahren neue, auf Oberflächensensoren basierte Herangehensweisen entwickelt. Eine hauptsächliche Technik ist die Verwendung von Quarzkristall-Mikrowaagen (QCM), um

das Wachstum einer festen Anzahl von oberflächengebundenen Fibrillen zu verfolgen.^[9–11] Diese Methoden beruhen darauf, dass Aggregation in Anwesenheit von vorher gebildeten Fibrillen durch Animpfen stark beschleunigt werden kann.^[12] Das Wachstum der Fibrillen wird durch die damit verbundene Zunahme der hydrodynamischen Masse verfolgt, was dadurch ermöglicht wird, dass die Änderungsgeschwindigkeit der Resonanzfrequenz direkt zur durchschnittlichen Wachstumsgeschwindigkeit der Fibrillen proportional ist.^[9] Das Wachstum vorhandener Fibrillen durch die Anlagerung eines löslichen Proteinmoleküls kann als eine diffusive Trajektorie über eine einzige freie Energiebarriere beschrieben werden^[13] und läuft ohne Intermediate zwischen Monomer und Fibrillen ab. Die Möglichkeit, die Oberfläche des Quarzsensors mit dem Rasterkraftmikroskop zu untersuchen, erlaubt eine Bestimmung der Oberflächenkonzentration der Fibrillen, welche wichtig ist für die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten dieser bimolekularen Reaktion, deren Geschwindigkeit sowohl von der Konzentration löslichen Proteins als auch der Anzahl verfügbarer Fibrillen abhängt. Zudem kann die Länge der Fibrillen vor und nach einem Experiment verglichen werden, was einer unabhängigen Messung des Längenzuwachses entspricht, welche wiederum dazu verwendet werden kann, um das Frequenzverhalten der Mikrowaage zu kalibrieren. Das kovalente, irreversible Anhaften der Impffibrillen an die Sensoroberfläche^[14] und die darauffolgende Passivierung der verbleibenden Oberfläche sowie auch die kurze Dauer eines einzelnen Experimentes sorgen dafür, dass nur Fibrillenwachstum gemessen wird, und dass primäre und sekundäre Nukleationsprozesse vernachlässigt werden können. Diese Selektivität wird durch die Linearität der Frequenzabnahme und die hohe Reproduzierbarkeit der Daten bestätigt, die durch QCM-Messungen erhalten werden.^[15]

Am Anfang einer systematischen Untersuchung der Energiebarrieren, die den löslichen Zustand eines Proteins vom fibrillären Zustand trennen, steht die Messung der Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeit des Fibrillenwachstums, welche eine Bestimmung der Aktivierungsenthalpie mithilfe eines Arrhenius-Diagramms erlaubt. Die Temperaturabhängigkeit der Wachstumsgeschwindigkeit von Amyloidfibrillen ist schon für eine Anzahl amyloidbildender Peptide und Proteine gemessen worden,^[16–22] und wo immer möglich wurden diese Literaturdaten in der hier durchgeführten Analyse mit in Betracht gezogen. Diese veröffentlichten Daten wurden mithilfe verschiedener experimenteller Techniken gewonnen, vor allem basierend auf Molekülmarkern wie Thioflavin-T. In solchen Experimenten ist es schwierig, ausschließlich das Wachstum vorhandener

[*] A. K. Buell, M. E. Welland
Nanoscience Centre, University of Cambridge
11 JJ Thomson Avenue, West Cambridge CB3 0FF (Großbritannien)
E-Mail: mew10@cam.ac.uk

A. K. Buell, A. Dhulesia, D. A. White, T. P. J. Knowles, C. M. Dobson
Department of Chemistry, University of Cambridge
Lensfield Road, Cambridge CB2 1EW (Großbritannien)
E-Mail: cmd44@cam.ac.uk

[**] A.K.B. dankt dem Magdalene College, Cambridge, für Unterstützung durch ein Forschungsstipendium. Die Autoren danken für Unterstützung durch den Wellcome Trust (C.M.D., T.P.J.K.) und den Leverhulme Trust (C.M.D.) sowie Novo Nordisk für die großzügige Bereitstellung von Glucagon, Vittorio Bellotti für β 2-Mikroglobulin, Sarah Perrett für das Ure2p und David Chandler für hilfreiche Diskussionen.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201108040> zu finden.

Fibrillen zu untersuchen, und daher entsprechen die veröffentlichten Werte für Energiebarrieren vermutlich in manchen Fällen einer Kombination aus verschiedenen Elementarschritten. Wir hingegen haben unsere Messungen des Fibrillenwachstums mit Mikrowaagen durchgeführt, die ganz besonders spezifisch sind, und haben den Umfang der vorhandenen Datensammlung ganz erheblich dadurch vergrößert, dass wir Peptide und Proteine ganz verschiedener Sequenz untersuchten, die Amyloid unter einer Reihe unterschiedlicher Lösungsbedingungen bilden können. Abbildung 1 zeigt z.B. sowohl Rohdaten der Temperaturabhängigkeit des Fibrillenwachstums von PI3K-SH3 als auch Rasterkraftmikroskopie (AFM)-Bilder der QCM-Sensoroberfläche.

Ähnliche Experimente wurden mit einer Reihe anderer Peptide und Proteine durchgeführt, und die resultierenden Arrhenius-Diagramme sind in Abbildung 2 gezeigt. Es wurde keine ausgeprägte Krümmung beobachtet, im Gegensatz zu der manchmal in der Proteinfaltung beobachteten Abweichung von der Linearität.^[23] Dies könnte dadurch bedingt sein, dass wir in unserer Studie eine begrenzte Temperaturregion untersucht haben. Zudem deutet dieses Ergebnis aber auch darauf hin, dass die Unterschiede in der Wärmekapazität zwischen den löslichen Zuständen und den Übergangszuständen der Proteine, ΔC_p^\ddagger , klein sind. Die Aktivierungsenthalpien, ΔH^\ddagger , wurden daher direkt durch lineare Regression der Arrhenius-Diagramme erhalten. Die Werte sind in Tabelle 1 aufgeführt und als rote Balken in Abbildung 3 gezeigt.

Um die freien Aktivierungsenergien ΔG^\ddagger zu bestimmen, wurden auch die absolute Wachstumsgeschwindigkeiten r der Fibrillen bei 25 °C gemessen, da $r = [M] \Gamma \exp(-\Delta G^\ddagger)$ ist. $[M]$ ist die Konzentration von löslichem Protein und Γ ein präexponentieller Frequenzfaktor, den wir für ein vereinfachtes Modell des Amyloidfibrillenwachstums mithilfe von

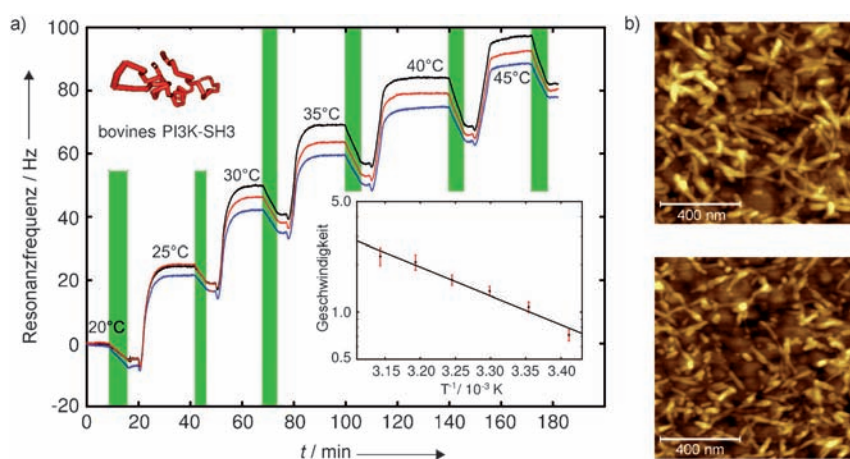


Abbildung 1. a) QCM-Experimente zur Untersuchung der Temperaturabhängigkeit des Wachstums von PI3K-SH3-Amyloidfibrillen. Der Temperaturanstieg zwischen jeder Messung führt zu einem Anstieg der Resonanzfrequenz (weißer Hintergrund). Nachdem sich die Frequenz stabilisiert hatte, wurden die an die Oberfläche gebundenen Fibrillen mit einer Lösung des gleichen Proteins inkubiert (grüne Streifen), und das Wachstum der Fibrillen führt zu einer Abnahme der Resonanzfrequenz, da die an die Oberfläche gebundene hydrodynamische Masse zunimmt. Die Änderungsgeschwindigkeit der Frequenz ist proportional zur (durchschnittlichen) Wachstumsgeschwindigkeit der Fibrillen. Die drei Frequenzobertöne $N=3$ (schwarz), $N=5$ (rot) und $N=7$ (blau) sind dargestellt. Einschub: Arrhenius-Diagramm der Rohdaten, in dem der Mittelwert der drei gezeigten Obertöne aufgetragen wurde. b) AFM-Bilder zweier Regionen des QCM-Sensors, die verwendet wurden, um die Oberflächendichte der Fibrillen abzuschätzen.

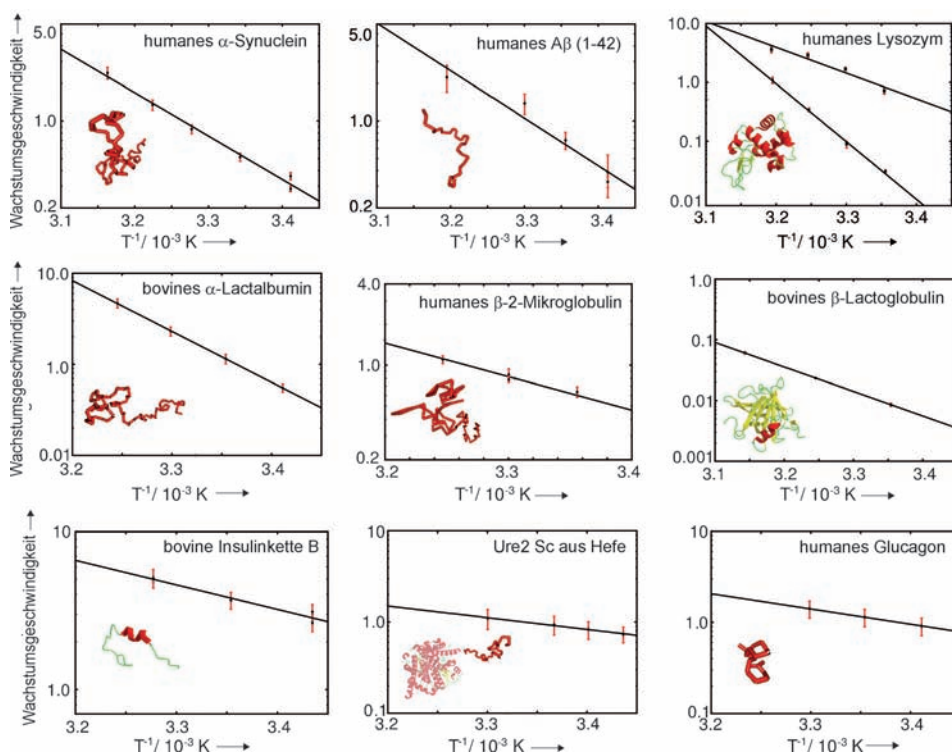


Abbildung 2. Arrhenius-Diagramme für die verschiedenen Peptide und Proteine, die in dieser Arbeit untersucht wurden. Jedes Diagramm entspricht einem Experiment ähnlich dem in Abbildung 1 gezeigten. Die Fehlerbalken der Datenpunkte leiten sich aus dem Unterschied in der Frequenzantwort der Obertöne $N=3,5,7$ ab (Details siehe Hintergrundinformationen). Die betreffenden Moleküle sind entweder als pdb-Strukturen oder als Zufallsknäuel schematisch dargestellt, je nachdem, wie das Protein unter den experimentellen Bedingungen vorliegt. Für Humanlysozym sind zwei Diagramme gezeigt, eines für die native Form (untere Datenpunkte mit höherer Steigung) und eines für die reduzierte Form des Proteins, in der die Disulfidbrücken gebrochen wurden.

Tabelle 1: Zusammenfassung der thermodynamischen Aktivierungsparameter der Proteine, die in dieser Studie untersucht wurden, ergänzt durch Literaturdaten.^[a]

Peptid/Protein	Anzahl Aminosäuren	Struktur	pH	Ladung	Ionenstärke [M]	ΔG^\ddagger [kJ mol ⁻¹]	ΔH^\ddagger [kJ mol ⁻¹]	$T\Delta S^\ddagger$ [kJ mol ⁻¹] (bei 298 K)
humanes Glucagon	29	nt	2.0	+5	0.03	16.2 ± 4.5–1.5	30.0 ± 12.0	13.8 ± 18.0
bovine Insulinkette B	30	nt	2.0	+3	0.01	16.2 ± 4.4–1.5	35.0 ± 10.0	18.8 ± 16.0
humanes Aβ (1–42)	42	nt	7.4	–3	0.1	5.9 ± 4.0–1.4	66.1 ± 8.1	60.2 ± 13.5
bovines Insulin	51	t	2.0	+5	0.01	25.0 ± 4.0–1.5	102.5 ± 4.2 ^[9]	77.5 ± 9.6
Ure2p aus Hefe	354 (≈ 70)	nt	8.4	–7	0.25	9.6 ± 4.0–1.5	27.0 ± 10.0	17.4 ± 15.5
bovines PI3K-SH3	84	nt	2.0	+12	0.01	20.4 ± 3.9–1.5	42.1 ± 8.5	21.8 ± 13.9
humanes β2-Mikroglobulin	100	nt	2.0	+18	0.04	16.7 ± 5.2–1.5	48.3 ± 8.6	31.6 ± 15.3
bovines α-Lactalbumin	123	nt	1.2	+17	0.2	13.5 ± 4.1–1.4	107.0 ± 10.0	93.5 ± 15.6
humanes Lysozym (nativ)	130	t	1.2	+21	0.2	25.0 ± 4.0–1.5	167.7 ± 14.7	142.7 ± 20.1
humanes Lysozym (reduziert)	130	nt	1.2	+21	0.2	9.9 ± 4.1–1.4	68 ± 12	58.1 ± 17.5
humanes α-Synuclein	140	nt	7.4	–9	0.15	13.9 ± 4.1–1.5	71.0 ± 5.6 ^[b]	57.1 ± 11.2
bovines β-Lactoglobulin	162	t	2.0	+21	0.2	31.8 ± 3.9–1.4	83.7 ± 9.6 ^[c]	53.9 ± 14.9
humanes Aβ (1–40)	40	nt	1.0	+7	0.1	n/a	95.4 ± 4.6 ^[16]	n/a
humanes Aβ (1–40)	40	nt	7.5	–4	0.15	n/a	61.9 ± 1.3 ^[27]	n/a
humanes Aβ (1–40)	40	nt	3.1	+6	0.1	n/a	42.9 ^[19]	n/a
fungales Het-s	289 (≈ 70)	nt	7.0	–6	0.12	n/a	16 ± 2 ^[28]	n/a
humanes Stefin B	98	t	4.75	+8	0.165	n/a	112.9 ± 20.9 ^[22]	n/a
humanes Ig (leichte Kette)	122	t	7.4	+1	0.11	n/a	153 ± 12 ^[18]	n/a
humanes α-Chymotrypsin	245	t	7.0	+4	0.15	n/a	208 ± 17 ^[21]	n/a

[a] Wir haben die Aktivierungsenthalpie der Viskosität von Wasser hier nicht von der gemessenen Aktivierungsenthalpie subtrahiert, wie es manchmal in Studien von Proteinfaltung praktiziert wird.^[29] Des Weiteren zitieren wir keine Werte für Aktivierungsentropien, da diese Größe sehr vom jeweiligen theoretischen Modell des analysierten Prozesses abhängt und es schwierig ist, verschiedene Arbeiten in dieser Hinsicht zu vergleichen. Im Fall der Prionen Ure2p und Het-s entspricht die Zahl in Klammern der Länge der Region in der Sequenz, die Fibrillen bilden kann. Abkürzungen: nt = keine Tertiärstruktur im löslichen Protein vorhanden, t = Tertiärstruktur vorhanden (siehe Hintergrundinformationen für Literaturquellen dazu). In Fällen, in denen die Aktivierungsenthalpie für ein bestimmtes Protein, das wir vermessen haben, schon publiziert war, finden wir gute Übereinstimmung mit unseren Messwerten: [b] 84.1 ± 3.3 kJ mol⁻¹^[17]. [c] 100.4 kJ mol⁻¹.^[20]

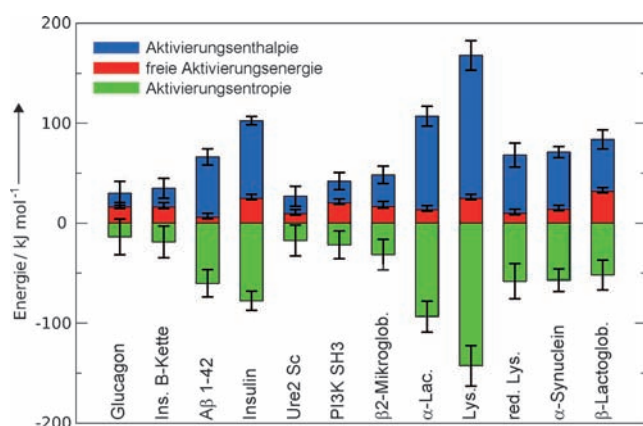


Abbildung 3. Überblick über die gemessenen und berechneten Werte der Aktivierungsparameter. Alle Aktivierungsenthalpien ΔH^\ddagger sind positiv und daher ungünstig für die Reaktion, wohingegen die Aktivierungsentropien ΔS^\ddagger immer günstig sind. Die Enthalpie-Entropie-Kompensation, die im Text näher erläutert wird, ist hier klar erkennbar.

polymerphysikalischer Theorie hergeleitet haben.^[13] Diese Methode der Bestimmung von ΔG^\ddagger ist formal äquivalent zur in Lit. [24] dargelegten und vermeidet wie diese lange Extrapolationen von Arrhenius-Diagrammen. Die absolute Wachstumsgeschwindigkeit konnte relativ einfach durch Mikrowaagenmessungen erhalten werden, wie oben erläutert wurde (siehe Abbildung 1b). Der Proportionalitätsfaktor zwischen Frequenzänderung und zusätzlich angelagerter

Masse durch das Fibrillenwachstum wurde empirisch kalibriert (siehe Hintergrundinformationen), da bekannte analytische Modelle, die eine Verbindung zwischen diesen Größen herstellen, die hydrodynamischen Verhältnisse einer Fibrillenschicht in Kontakt mit einer Flüssigkeit nicht angemessen beschreiben.

Wir haben diesen Proportionalitätsfaktor für alle Proteine dieser Studie zu 5 ± 4 ng Hz⁻¹ bestimmt (angelagerte Masse pro Frequenzänderung). In Verbindung mit einer Abschätzung der Gesamtanzahl an wachsenden Fibrillen auf der Oberfläche des Quarzsensors (extrapoliert anhand von mehreren AFM-Bildern verschiedener Regionen der Sensoroberfläche) war es uns möglich, die durchschnittliche Wachstumsgeschwindigkeit pro Fibrille zu bestimmen. Dieser Wert erlaubt es uns wiederum, die freien Aktivierungsenergien ΔG^\ddagger zu berechnen, und wenn diese mit den Aktivierungsenthalpien aus den Arrhenius-Diagrammen kombiniert werden, erhalten wir die Aktivierungsentropien $T\Delta S^\ddagger$. Wir halten hierbei fest, dass die Entropiewerte mit den größten experimentellen Unsicherheiten behaftet sind, da sie die Fehler aus den Messungen der freien Aktivierungsenergien und der Aktivierungsenthalpien enthalten.

Zusammenfassungen dieser Daten und Berechnungen sind in Abbildung 3 und in Tabelle 1 gezeigt, mit Fehlerbalken, die von Wiederholungen der Experimente stammen. Die meisten Messungen der Temperaturabhängigkeit wurden mindestens dreifach wiederholt. Im Allgemeinen gilt, dass je kleiner der Wert der gemessenen Aktivierungsenthalpie ΔH^\ddagger ist, desto größer ist der relative Fehler, da die Wachstums-

geschwindigkeit weniger von der Temperatur abhängt. Die Bestimmungen der absoluten Wachstumsgeschwindigkeit wurden auch mindestens dreimal durchgeführt. Hierbei werden die Fehlerbalken durch die eine Größenordnung umfassende Unsicherheit in der Bestimmung des Proportionalitätsfaktors der Mikrowaage dominiert, welche linear mit den Fehlern in der Wachstumsgeschwindigkeit der Fibrillen verbunden ist.

Eine bemerkenswerte Eigenschaft dieser Sammlung von Daten ist, dass die Aktivierungsenthalpien in allen Fällen ungünstig sind, während die Aktivierungsentropien immer günstig für die Reaktion sind. Die Werte der Enthalpien und Entropien sind variabler für die verschiedenen Proteine als die freien Aktivierungsenergien. Man kann daher erkennen, dass das bekannte Phänomen der Enthalpie-Entropie-Kompensation, das für viele Reaktionen in (wässriger) Lösung beobachtet wird,^[25,26] auch hier auftritt.

Nachdem wir nun diese umfangreiche Sammlung aus unseren eigenen Daten und Literaturdaten (Tabelle 1) vorliegen haben, können wir untersuchen, welche mechanistischen Informationen darin enthalten sind, indem wir die Werte der Aktivierungsparameter mit charakteristischen Eigenschaften der Peptide in Zusammenhang bringen. Wenn die Aktivierungsenthalpien ΔH^\ddagger gegen die Länge der Aminosäuresequenz aufgetragen werden (Abbildung 4a), wird erkennbar, dass diese Größen signifikant korreliert sind ($r^2 = 0.51$). Diese Beobachtung impliziert ein einfaches Verhältnis zwischen der Energie des Übergangszustandes und der Größe des Proteins. Allerdings wird aus dieser Auftragung auch klar, dass Proteine, die unter den Bedingungen unserer kinetischen Experimente zu einem hohen Grad gefaltet sind (d.h. die einen hohen Grad an Tertiärstruktur haben), in den meisten Fällen eine höhere Aktivierungsenthalpie bei gegebener Sequenzlänge aufweisen. Wenn die Aktivierungsenthalpien durch die Anzahl der Aminosäuren des jeweiligen Peptides geteilt und anhand des Vorhandenseins von Tertiärstruktur in zwei Gruppen eingeteilt werden (Abbildung 4b), wird deutlich, dass signifikante Tertiärstruktur in der Regel die Aktivierungsenthalpie pro Aminosäure erhöht. Wir merken hier an, dass alle Experimente unter Bedingungen durchgeführt wurden, unter denen die Tendenz der Peptide zur Bildung von Amyloidfibrillen sehr hoch ist, was die beobachtete Korrelation wahrscheinlich schwächer macht, da wir auch wissen, dass diese Bedingungen Tertiärstruktur destabilisieren können.^[30]

Die Hypothese, dass die Gegenwart von Struktur neben der Anzahl der Aminosäuren zumindest für einen Teil der Aktivierungsenthalpie verantwortlich ist, wird durch die Beobachtung gestützt, dass die Reduktion und Passivierung der Disulfidbrücken in Humanlysozym eine signifikante Abnahme (mehr als 50 %) der Aktivierungsenthalpie zur Folge hat (siehe Abbildung 2 und Tabelle 1). Reduktion führt zum Totalverlust aller Tertiärstruktur des Lysozyms (Lit. [31] und Hintergrundinformationen). Obgleich das Brechen einer Disulfidbindung komplizierte Folgen für die gesamte Energiehyperfläche des Proteins haben kann, stützt diese Beobachtung die These, dass die Gegenwart von Tertiärstruktur einen Beitrag zur Energiebarriere der Umwandlung des löslichen Zustandes eines Proteins in den Fibrillen liefert.

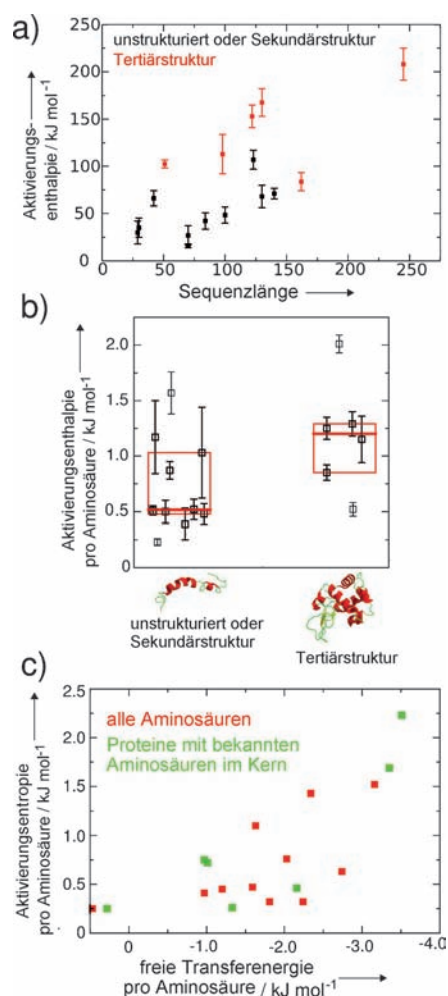


Abbildung 4. Korrelationen der Aktivierungsparameter mit Eigenschaften der Aminosäuresequenz der Polypeptide. a) Korrelation der Aktivierungsenthalpie mit der Länge der Peptidkette ($r^2 = 0.51$). Die Datenpunkte sind farblich markiert, je nachdem ob das Protein unter den experimentellen Bedingungen signifikante native Struktur aufweist (rot, separates $r^2 = 0.41$) oder nicht (schwarz, separates $r^2 = 0.39$). b) Aktivierungsenthalpien, geteilt durch die Anzahl der Aminosäuren. Eine Kastengraphik (Median und obere und untere Quartile) zeigt, dass ein signifikanter Anteil der Aktivierungsenthalpie von der Gegenwart von Tertiärstruktur im löslichen amyloidbildenden Protein stammt (MannWhitney $U = 12.5$, $n_1 = 10$, $n_2 = 6$, $P = 0.066$ zweiseitig). c) Aktivierungsentropie pro Aminosäure als Funktion der durchschnittlichen Hydrophobie des Polypeptids (wobei die freie Energie des Transfers von Wasser nach Octanol als Maß der Hydrophobie verwendet wird, nach Lit. [35]). Diese Analyse kann noch verfeinert werden, indem nur die Daten von Proteinen verwendet werden, für die eine Abschätzung des Teiles der Sequenz existiert, der sich im Kern der Fibrillen befindet (Hintergrundinformationen). Die Korrelation verbessert sich durch diese Verfeinerung (r^2 ändert sich von 0.37 nach 0.71), was darauf hinweist, dass Hydrophobie signifikant zur günstigen Aktivierungsentropie beiträgt.

Nach Abbildung 4a wird jedoch ein großer Teil der Aktivierungsenthalpie schlicht von der Größe des Polypeptids bestimmt. Daher ist die gemessene Aktivierungsenthalpie wahrscheinlich eine Summe einer großen Anzahl schwacher Wechselwirkungen, deren Anzahl zur Länge der Aminosäurekette proportional ist. Wenn ein Polypeptid in wässriger

Umgebung seine Struktur ändert, wird simultan eine große Zahl von Wasserstoffbrücken und anderen schwachen Wechselwirkungen gebrochen und gebildet, was nur eine geringe Gesamtänderung der Energie zur Folge hat.^[32] Diese Änderungen in der Energie sind allerdings oft von entropischen Beiträgen begleitet, besonders bei Vorgängen, die Wasserstoffbrücken mit Wasser betreffen.^[33] Wenn sich z.B. ein monomeres Polypeptid an eine Fibrille anlagert, wird es der wässrigen Umgebung einen geringeren Anteil seiner Oberfläche präsentieren, und die Anlagerung wird daher von einer (teilweisen) Desolvatisierung begleitet sein. Dieser Vorgang könnte daher nicht nur für die Korrelation in Abbildung 4a verantwortlich sein, sondern auch für die günstige und in manchen Fällen sehr hohe Aktivierungsentropie (Abbildung 3 und Tabelle 1).^[34]

Um diese Vermutung zu testen, haben wir die Aktivierungsentropie pro Aminosäure gegen die durchschnittliche Hydrophobie der jeweiligen Polypeptidsequenz aufgetragen (Abbildung 4c). Als Maß für die Hydrophobie verwenden wir hier die freie Energie des Transfers der Aminosäuren von der wässrigen Phase in Octanol (Lit. [35] und Hintergrundinformationen). Diese zwei Größen sind schwach korreliert ($r^2 = 0.37$) (rote Datenpunkte), aber selbst wenn eine solche Korrelation sehr hoch wäre, würde sie in unseren Daten nur schwer erkennbar sein, da wir die Unterschiede in den Lösungsbedingungen für die verschiedenen Proteine und weitere Beiträge zur Aktivierungsentropie, wie z.B. Translationsentropie und die Entropie der Peptidkette, in dieser Analyse nicht berücksichtigen. Um dennoch eine Verbindung zwischen Hydrophobie und Aktivierungsentropie klarer herauszuarbeiten, haben wir eine weitere Analyse auf die Polypeptide beschränkt, für die bekannt ist, welche Aminosäuren den Kern der Fibrillen bilden (Hintergrundinformationen). Diese Teile der Peptidsequenz sind mit großer Wahrscheinlichkeit wichtiger für die Ausbildung des Übergangszustandes als andere Teile der Sequenz. Wenn die Werte der Aktivierungsentropien durch die Anzahl der Aminosäuren im Kern geteilt werden, wird tatsächlich eine stärkere Korrelation mit der durchschnittlichen Hydrophobie dieser Aminosäuren beobachtet (grüne Datenpunkte, $r^2 = 0.71$). Diese Analyse weist klar darauf hin, dass die Desolvatisierung der hydrophoben Teile der Peptidsequenz im Übergangszustand einen großen Beitrag zur günstigen Aktivierungsentropie leistet.

Zusammenfassend haben wir in dieser Arbeit die freien Energiebarrieren, die mit dem Wachstum von Amyloidfibrillen assoziiert sind, mithilfe von QCM-Techniken gemessen und analysiert. Wir haben herausgefunden, dass die ungünstigen Aktivierungsenthalpien ΔH^\ddagger von der insgesamt ungünstigen Bildung und dem Zerschneiden von vielen schwachen Wechselwirkungen (wohl hauptsächlich zwischen dem Polypeptid und Wasser) verursacht werden, welche nötig sind, um den Übergangszustand zu erreichen. Außerdem ist es nötig, die vorhandene interne Struktur des löslichen Polypeptids aufzubrechen. Die Aktivierungsentropien sind hingegen günstig, und wir haben herausgefunden, dass diese Größe mit der Hydrophobie der Kernregion des Polypeptids korreliert, das die Fibrillen bildet. Diese Studie liefert daher wichtige Informationen über den molekularen Ursprung der

Energiebarrieren, die in vielen Fällen für die Metastabilität löslicher Proteine gegenüber Aggregation verantwortlich sind.^[6] Insofern trägt diese Arbeit auch zum Verständnis der Faktoren bei, die die feine Balance zwischen der normalen Funktion und aberrantem Verhalten eines Proteins, das zu Krankheit führt, kontrollieren.^[36]

Experimentelles

Die Messungen der Amyloidwachstumsgeschwindigkeiten wurden mithilfe einer E4-Quarzkristallmikrowaage (Q-Sense, Västra Frölunda, Schweden) durchgeführt. Um die Oberflächendichte der Fibrillen abzuschätzen, wurden Bilder der getrockneten QCM-Sensoren vor und/oder nach den kinetischen Experimenten mit einem Rasterkraftmikroskop (Molecular Imaging Pico Plus, Tempe, AZ) aufgenommen, und die Fibrillen innerhalb einer bestimmten Region wurden gezählt. Der Proportionalitätsfaktor zwischen der Frequenzänderung und der Zunahme der Proteinmasse wurde detailliert untersucht und für vier Polypeptide (humanes A β (1-42), Ure2p aus Hefe, humanes α -Synuclein und bovines Insulin) mit zwei verschiedenen Methoden bestimmt (Verarmung der Peptidkonzentration in der QCM-Zelle und AFM-Längenanalyse).

Eingegangen am 15. November 2011,
veränderte Fassung am 13. Januar 2012
Online veröffentlicht am 5. April 2012

Stichwörter: Amyloide · Energiebarrieren · Proteinfaltung · Quarzkristall-Mikrowaage

- [1] C. H. Schein, *Biotechnology* **1990**, 8, 308–317.
- [2] C. M. Dobson, *Trends Biochem. Sci.* **1999**, 24, 329–332.
- [3] E. Gazit, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 267–269; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 257–259.
- [4] M. Vendruscolo, T. P. J. Knowles, C. M. Dobson, *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* **2011**, 3(12), a010454.
- [5] C. M. Dobson, *Nature* **2003**, 426, 884–890.
- [6] J. Baldwin, T. P. J. Knowles, G. G. Tartaglia, A. W. Fitzpatrick, G. L. Devlin, S. L. Shammah, C. A. Waudby, M. F. Mossuto, S. Meehan, S. L. Gras, J. Christodoulou, S. J. Anthony-Cahill, P. D. Barker, M. Vendruscolo, C. M. Dobson, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 14160–14163.
- [7] T. P. J. Knowles, C. A. Waudby, G. L. Devlin, S. I. A. Cohen, A. Aguzzi, M. Vendruscolo, E. M. Terentjev, M. E. Welland, C. M. Dobson, *Science* **2009**, 326, 1533–1537.
- [8] R. Kaye, E. Head, J. L. Thompson, T. M. McIntire, S. C. Milton, C. W. Cotman, C. G. Glabe, *Science* **2003**, 300, 486–489.
- [9] T. P. J. Knowles, W. Shu, G. L. Devlin, S. Meehan, S. Auer, C. M. Dobson, M. E. Welland, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, 104, 10016–10021.
- [10] M. B. Hovgaard, M. Dong, D. E. Otzen, F. Besenbacher, *Biophys. J.* **2007**, 93, 2162–2169.
- [11] J. A. Kotarek, K. C. Johnson, M. A. Moss, *Anal. Biochem.* **2008**, 378, 15–24.
- [12] J. T. Jarrett, E. P. Berger, P. T. Lansbury, *Biochemistry* **1993**, 32, 4693–4697.
- [13] A. K. Buell, J. R. Blundell, C. M. Dobson, M. E. Welland, E. M. Terentjev, T. P. J. Knowles, *Phys. Rev. Lett.* **2010**, 104, 228101.
- [14] A. K. Buell, D. A. White, C. Meier, M. E. Welland, T. P. J. Knowles, C. M. Dobson, *J. Phys. Chem. B* **2010**, 114, 10925–10938.
- [15] D. A. White, A. K. Buell, C. M. Dobson, M. E. Welland, T. P. J. Knowles, *FEBS Lett.* **2009**, 583, 2587–2592.

- [16] Y. Kusumoto, A. Lomakin, D. B. Teplow, G. B. Benedek, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 12277–12282.
- [17] V. N. Uversky, J. Li, A. L. Fink, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 10737–10744.
- [18] Y.-S. Kim, T. W. Randolph, F. J. Stevens, J. F. Carpenter, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 27240–27246.
- [19] R. Carrotta, M. Manno, D. Bulone, V. Martorana, P. L. S. Biagio, *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 30001–30008.
- [20] K. R. Domike, A. M. Donald, *Biomacromolecules* **2007**, 8, 3930–3937.
- [21] N. Rezaei-Ghaleh, A. Ebrahim-Habibi, A. A. Moosavi-Movahedi, M. Nemat-Gorgani, *Arch. Biochem. Biophys.* **2007**, 457, 160–169.
- [22] K. Škerget, A. Vilfan, M. Pompe-Novak, V. Turk, J. P. Waltho, D. Turk, E. Žerovnik, *Proteins Struct. Funct. Bioinf.* **2009**, 74, 425–436.
- [23] M. Oliveberg, Y. J. Tan, A. R. Fersht, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, 92, 8926–8929.
- [24] R. Krug, W. Hunter, R. Grieger, *Nature* **1976**, 261, 566–567.
- [25] V. M. Krishnamurthy, B. R. Bohall, V. Semetey, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 5802–5812.
- [26] E. B. Starikov, B. Nordén, *J. Phys. Chem. B* **2007**, 111, 14431–14435.
- [27] K. Hasegawa, K. Ono, M. Yamada, H. Naiki, *Biochemistry* **2002**, 41, 13489–13498.
- [28] R. Sabaté, V. Castillo, A. Espargaro, S. J. Saupe, S. Ventura, *FEBS J.* **2009**, 276, 5053–5064.
- [29] B. Schuler, E. A. Lipman, W. A. Eaton, *Nature* **2002**, 419, 743–747.
- [30] A. K. Buell, A. Dhulesia, M. F. Mossuto, N. Cremades, J. R. Kumita, M. Dumoulin, M. E. Welland, T. P. J. Knowles, X. Salvatella, C. M. Dobson, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 7737–7743.
- [31] M. F. Mossuto, B. Bolognesi, B. Guixer, A. Dhulesia, F. Agostini, J. R. Kumita, G. G. Tartaglia, M. Dumoulin, C. M. Dobson, X. Salvatella, *Angew. Chem.* **2011**, 123, 7186–7189; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 7048–7051; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 7048–7051.
- [32] R. L. Baldwin, *J. Mol. Biol.* **2007**, 371, 283–301.
- [33] D. Chandler, *Nature* **2005**, 437, 640–647.
- [34] K. Lum, D. Chandler, J. D. Weeks, *J. Phys. Chem. B* **1999**, 103, 4570–4577.
- [35] J. Fauchere, V. Pliska, *Eur. J. Med. Chem.* **1983**, 18, 369–375.
- [36] A. W. Fitzpatrick, T. P. J. Knowles, C. A. Waudby, M. Vendruscolo, C. M. Dobson, *PLoS Comput. Biol.* **2011**, 7, e1002169.