

Getrennte Konformationszustände des Alzheimer- β -Amyloidpeptids – Nachweis mit Hochdruck-NMR-Spektroskopie**

Claudia Elisabeth Munte, Markus Beck Erlach, Werner Kremer, Joerg Koehler und Hans Robert Kalbitzer*

Die Alzheimersche Krankheit (AD) ist eine der häufigsten und schwersten Formen der Demenz, jedoch ist ihre komplexe Pathogenese noch nicht vollständig verstanden (Übersichtsartikel siehe Mattson^[1] oder Blennow et al.^[2]). Das typische histologische Merkmal von AD ist das Vorhandensein von Amyloid-Ablagerungen in den Gehirnen von Patienten, deren Hauptbestandteil das β -Amyloid-Peptid (A β) ist. Gemäß der allgemein akzeptierten Amyloidhypothese ist A β die primäre Ursache der Erkrankung.^[3,4] Das A β -Peptid wird durch die proteolytische Spaltung des Amyloid-Vorläufer-Proteins (APP) durch die β - und γ -Sekretasen produziert. Man vermutet, dass das Peptid als Teil des APP in der Membran eine α -helikale Konformation einnimmt.^[5–8] Anfänglich löslich, lagert sich das Peptid zu Oligomeren zusammen, die wahrscheinlich der primären toxischen Spezies entsprechen.^[9,10] Schließlich bilden sich die Fibrillen der Amyloid-Plaques, in denen das Peptid eine sich überkreuzende β -Faltstrangstruktur („cross beta“-Struktur) einnimmt.^[11–13]

Die Polymerisationsreaktion setzt sich aus zwei grundlegend verschiedenen Prozessen zusammen: der Keimbildung und der Elongation der bestehenden Fibrillen (Abbildung 1). An beiden Reaktionen könnten entweder nahezu korrekt gefaltete Monomere (Zustand 1) oder weniger strukturierte und unstrukturierte Monomere (Zustand 2) beteiligt sein, die unterschiedlich mit Fibrillen (Zustände 3 und 4) oder mit kleinen oligomeren Keimen (Zustand 5) wechselwirken. Für die Elongation der stabilen Fibrillen (Zustand 4) müssen die im Zustand 3 gebundenen Monomere eine umfassende konformative Reorganisation durchlaufen. Die gefaltete Konformation 1 (falls in Lösung vorhanden) sollte eine signifikant höhere Affinität zu Fibrillen haben (Konformationsselektion). Die Polymerisationskinetik sollte sich deutlich von der

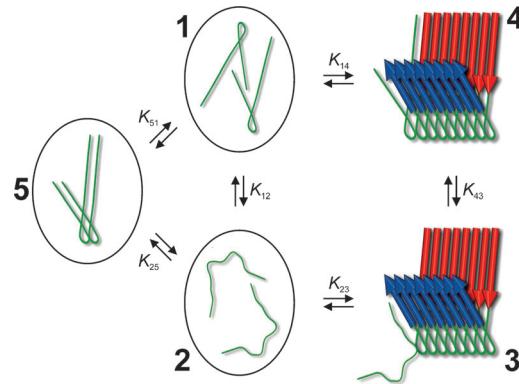


Abbildung 1. Polymerisation von A β . Durch Auslassen kleiner instabiler Oligomere wie der β -Bälle und unterschiedlicher Fibrillengeometrien wurde das Schema vereinfacht. Die Analyse unserer experimentellen Daten zeigt, dass Zustand 2 aus zwei Sub-Zuständen besteht, aus Sub-Zustand 2' von teilweise strukturierten Monomeren und aus Sub-Zustand 2'' von Random-Coil-ähnlichen Strukturen.

des wenig strukturierten Polymers unterscheiden. Konformation 1 von A β könnte wichtig für eine Wirkstoffentwicklung sein.

Normalerweise wird für das Peptid eine überwiegend unstrukturierte Konformation in Lösung angenommen (Zustand 2), die nur vorübergehende helikale Sekundärstrukturelemente bildet.^[14–16] Kürzlich wurde allerdings eine kompakte Struktur von monomerem A β publiziert.^[17] Sättigungstransfer- und ^{15}N -Relaxationsexperimente ermöglichen die Charakterisierung der reversiblen Wechselwirkung der A β -Monomere mit den Oberflächenresten der Protofibrillen (Übergang Zustand 1 zu 3) und lieferten damit Informationen über die direkte Kontaktfläche der Peptide mit den Protofibrillen.^[18]

Der Übergang von A β aus einer partiell α -helikalen Struktur des Monomers zu einer cross- β -Konformation scheint ein entscheidender Schritt in der Pathogenese der AD zu sein.^[19] Der Mechanismus dieser Umwandlung ist jedoch noch nicht aufgeklärt. Hochdruck-NMR-Spektroskopie kann hier im Prinzip helfen, da sie ermöglicht, unterschiedliche Konformationen von Polypeptiden, die bei Normaldruck in Lösung vorliegen, durch die Beobachtung ihrer Druckantwort zu identifizieren. In der Tat können wir einen kompakt gefalteten Zustand und einen partiell gefalteten Zustand mit deutlich unterschiedlichen molaren partiellen Volumina nachweisen. Beide Konformere koexistieren bei Atmosphärendruck.

[*] Prof. Dr. C. E. Munte,^[+] M. Beck Erlach, Prof. Dr. W. Kremer, J. Koehler, Prof. Dr. H. R. Kalbitzer
Institut für Biophysik und Physikalische Biochemie
Universität Regensburg
Universitätsstraße 31, 93053 Regensburg (Deutschland)
E-Mail: hans-robert.kalbitzer@biologie.uni-regensburg.de

[+] Gegenwärtige Adresse: Physics Institute of São Carlos
University of São Paulo, São Carlos, SP (Brasilien)

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG), der Bayerischen Forschungsstiftung, dem Fonds der chemischen Industrie (FCI) und der Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) unterstützt.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag (Details der Probenvorbereitung, der NMR-Spektroskopie und der Auswertung der Hochdruckdaten) sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201301537> zu finden.

Eine Reihe von ^1H , ^{15}N -HSQC-Spektren von A β (1–40) wurde bei verschiedenen Drücken und Temperaturen aufgenommen (Abbildung S1 der Hintergrundinformationen). Die meisten der Amidsignale verschieben sich kontinuierlich mit dem Druck, die Mehrheit davon in Richtung Tieffeld. Die druckinduzierten Änderungen der chemischen Verschiebungen sind vollständig reversibel. Um unspezifische Druckeffekte auszuschließen, die in Random-Coil-Strukturen beobachtbar sind, wurden die entsprechenden druckabhängigen Verschiebungsänderungen von Random-Coil-Modellpeptiden^[20] von den experimentellen Daten subtrahiert. Nach dieser Korrektur würde eine Random-Coil-Struktur von A β durch verschwindende Druckeffekte charakterisiert sein. An die kombinierten Daten der ^1H - und ^{15}N -chemischen Verschiebungen^[21] erfolgte eine Anpassung mit einer Taylorreihe zweiter Ordnung [Gl. (1) der Hintergrundinformationen]. Die Anpassung ergab dann die Druckkoeffizienten erster Ordnung, B_1^* , und zweiter Ordnung, B_2^* (Abbildung 2). Bei der Analyse der Daten lassen sich charakteristische Cluster der Druckkoeffizienten in der Aminosäuresequenz erkennen. Sie korrelieren gut mit den Bereichen, in denen Strukturübergänge für A β bei der Fibrillenbildung erwartet werden. Ein Beispiel ist der Bereich zwischen den Aminosäuren 25 und 30, in dem eine Gelenkregion sowohl in den Lösungsstrukturen^[7, 15, 16] als auch in den Modellen von fibrillärem A β ^[11–13, 22] existiert. Die von Danielson et al.^[16] definierten Sekundäreinheiten entsprechen fast perfekt den beobachteten Druckmustern. Die beiden vorhergesagten β -Strangregionen sind durch große positive Koeffizienten erster Ordnung und große negative Koeffizienten zweiter Ordnung charakterisiert. Die letzten Reste 37–39 haben kleine Druckkoeffizienten, wie sie für eine Random-Coil-artige Struktur typisch sind. Die großen Druckkoeffizienten des terminalen Val40 könnten auch durch kleine druckabhängige Änderungen des Protonierungszustands der Carboxygruppe hervorgerufen worden sein.

Wenn die Qualität der druckabhängigen Verschiebungsdaten hoch genug ist, kann eine Anpassung mithilfe eines detaillierten thermodynamischen Modells erfolgen [Gl. (2) und (3) in den Hintergrundinformationen]. Als einfachstes Modell kann man zwei Konformationszustände annehmen. Ein hinreichend schneller Austausch auf der NMR-Zeitskala führt zur populationsgewichteten Mittelung der chemischen Verschiebungen der beiden Zustände. Tatsächlich können die druckinduzierten Änderungen der chemischen Verschiebungen von A β hinreichend gut mit diesem Minimalmodell angepasst werden (Abbildung 3 a,b). In der Regel induzieren hohe Drücke die Entfaltung von Polypeptiden, im einfachsten Fall werden Random-Coil-Strukturen erwartet. Da in Abbildung 3 auch temperaturkorrigierte Random-Coil-Verschiebungen^[23] abgezogen wurden, sollte bei hohen Drücken die Abweichung der chemischen Verschiebungen von den jeweiligen Random-Coil-Werten annähernd 0 ppm sein. Mit Ausnahme von wenigen Resten (z. B. Glu3, Asp23, Met35, Val39) folgen die meisten der ^1H - und ^{15}N -Signale dem erwarteten Trend und zeigen bei hohem Druck Werte der chemischen Verschiebungen, die näher an den vorhergesagten Random-Coil-Werten liegen (Abbildungen 3c,d). Trotzdem erreichen die chemischen Verschiebungen in den meis-

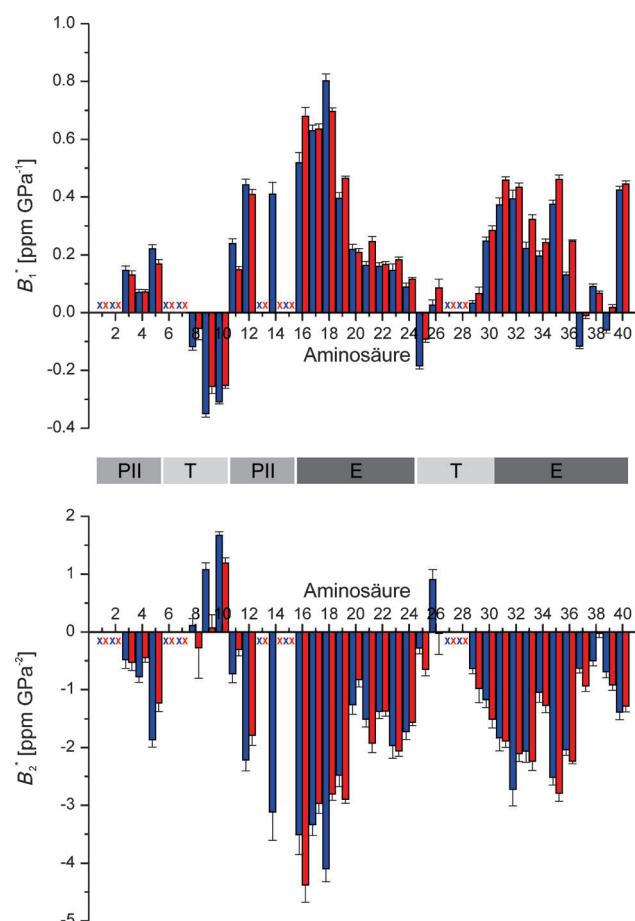


Abbildung 2. Auftragung der Druckkoeffizienten erster und zweiter Ordnung von A β (1–40). Die Probe enthielt 474 μM ^{15}N -angereichertes humanes A β (1–40) in 50 mM [D_{11}]Tris, 90 mM NaCl, 50 μM DSS, 0.1 mM Dioxan, 1 mM Na N_3 , 0.5 mM [D_{16}]EDTA, 8% $^2\text{H}_2\text{O}$, pH 7.0 (DSS = 4,4-Dimethyl-4-silapentan-1-sulfonsäure, EDTA = Ethylendiamintetraessigsäure, Tris = Tris(hydroxymethyl)aminomethan). Die kombinierten Druckkoeffizienten erster und zweiter Ordnung wurden aus den ^1H , ^{15}N -HSQC-Spektren berechnet, die in Druckstufen von 20–200 MPa aufgenommen wurden. Temperaturen: blau 277 K, rot 288 K; x Reste, die nicht mit ausreichender Qualität detektiert werden konnten. Die Taylorkoeffizienten wurden für Random-Coil-Effekte korrigiert (siehe Hintergrundinformationen). Oben: kombinierte Druckkoeffizienten erster Ordnung, B_1^* . Unten: kombinierte Druckkoeffizienten zweiter Ordnung, B_2^* . Mitte: von Danielson et al.^[16] vorgeschlagenes Strukturmodell von A β (1–40) in Lösung. PII: Neigung zur Bildung einer Polyprolin-II-ähnlichen Helix, T: wahrscheinliche Bildung einer Gelenkregion und E: eines ausgestreckten Strangs.

ten Fällen keine Werte, die genau denen eines Zufallsknäuels entsprechen. Dies deutet darauf hin, dass auch Zustand 2 nicht komplett in einer Random-Coil-ähnlichen Konformation vorliegt. Eine Korrelationsanalyse der druckinduzierten Änderungen der chemischen Verschiebungen stützt die Hypothese, dass ein korrelierter Prozess durch Druck induziert wird (Abbildung S2 der Hintergrundinformationen). Es ist eine starke Korrelation der Druckantwort in der Region von Ser8-Lys16 mit derjenigen in der C-terminalen Region zu beobachten, wie man sie erwarten würde, wenn das Konformationsgleichgewicht des gesamten Peptids durch ein Zwei-Zustands-Modell beschreibbar ist. Auch Regionen mit

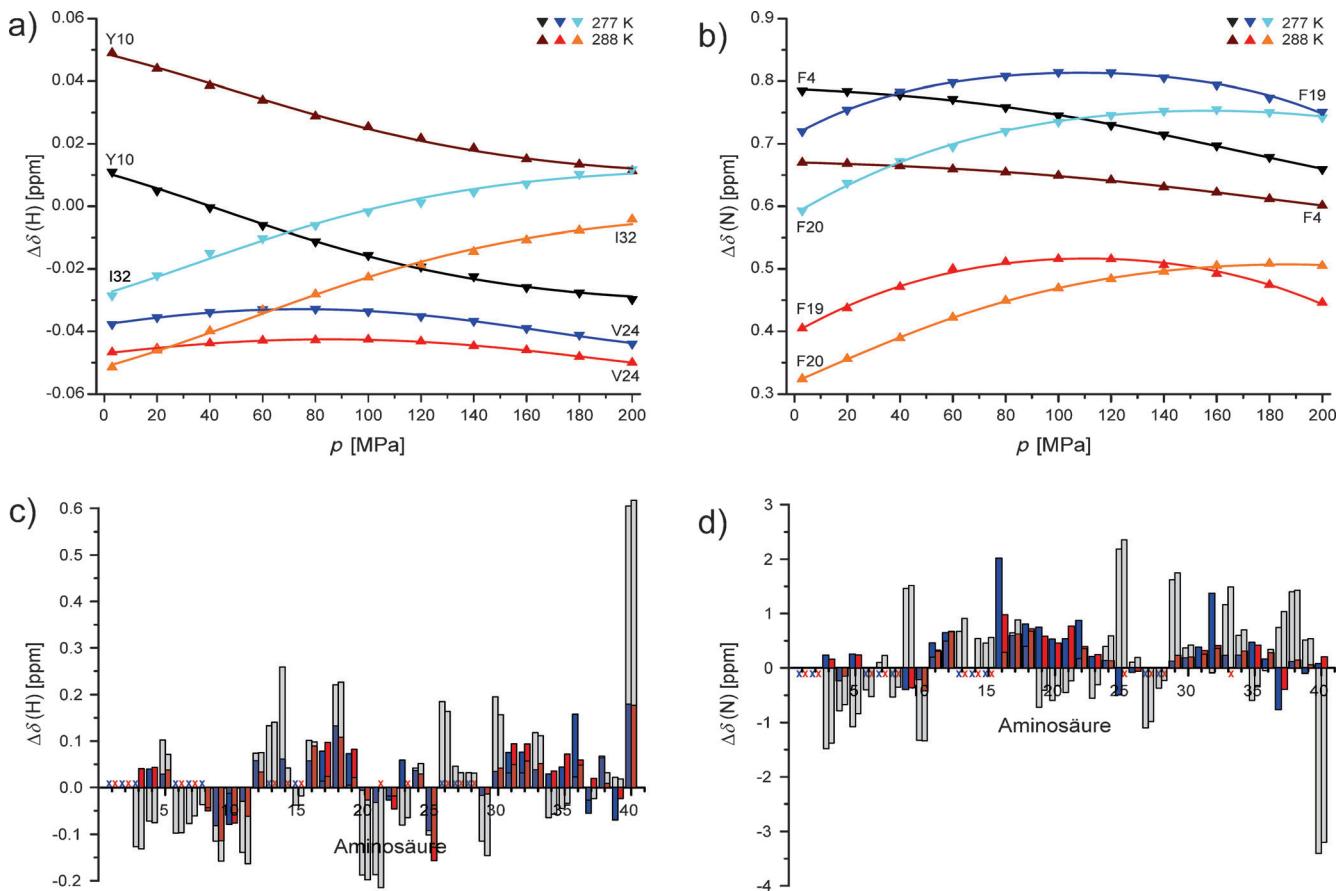


Abbildung 3. Anpassung an die druckabhängigen Änderungen der chemischen Verschiebungen mit einem thermodynamischen Modell. Die druckinduzierten chemischen Verschiebungen δ von ausgewählten Resten bei 277 und 288 K sind dargestellt und wurden mit Gleichung (2) angepasst (Hintergrundinformationen). Vor der Anpassung wurden die Daten mit der Druckabhängigkeit von Random-Coil-Verschiebungen^[20] korrigiert. Die Abweichung $\Delta\delta$ von den temperatur- und druckkorrigierten Random-Coil-Verschiebungen^[23] wurde als Funktion des Drucks für a) einige ^1H -chemische Verschiebungen und b) für einige ^{15}N -chemische Verschiebungen aufgetragen. Durch Anpassung an die Daten wurden die Differenzen der chemischen Verschiebungen, $\Delta\delta_{12}$, zwischen Zustand **1** und **2** erhalten und sind c) für die Amidprotonen und d) für die ^{15}N -Atome als Funktion der Position in der Sequenz dargestellt. blau 277 K, rot 288 K, x Reste, für die keine zufriedenstellende Anpassung gelang. Darüber hinaus sind die Abweichungen der chemischen Verschiebungen bei Normaldruck von temperaturkorrigierten Random-Coil-Werten als graue Balken dargestellt.

einem Korrelationskoeffizienten < 0.9 können an diesem korrelierten Prozess teilnehmen, da ihr niedriger Korrelationskoeffizient vor allem auf die geringe Qualität ihrer druckabhängigen Verschiebungsdaten zurückzuführen ist.

Tabelle 1: Konformationsübergänge in monomerem A β und Thermodynamik der Polymerisation.^[a]

T [K]	Übergang i-j	K_{ij} (at 0.1 MPa)	ΔG_{ij}^0 [kJ mol $^{-1}$]	ΔV_{ij}^0 [mL mol $^{-1}$]	$\Delta \beta_{ij}^0$ [mL MPa $^{-1}$ mol $^{-1}$]
277	1-2'	0.48	1.7 ± 0.9	-43.6 ± 1.7	-0.30 ± 0.04
	(1,2')-2''	0.24	3.3 ± 0.1	-11.8 ± 5.0	0.05 ± 0.03
288	1-2'	0.42	2.1 ± 0.8	-43.7 ± 1.7	-0.28 ± 0.05
	(1,2')-2''	0.11	5.2 ± 0.3	-29 ± 13	0.03 ± 0.13

[a] Experimentelle Bedingungen siehe Abbildung 2. Die Parameter wurden wie in den Hintergrundinformationen beschrieben berechnet. K_{ij} , T , ΔG_{ij}^0 , ΔV_{ij}^0 , $\Delta \beta_{ij}^0$: Gleichgewichtskonstante $K_{ij} = [j]/[i]$ zwischen Zustand j und i , absolute Temperatur, Differenz der partiellen molaren freien Enthalpien, partielle Volumina bzw. Kompressibilitätsfaktoren.

Tabelle 1 fasst die erhaltenen thermodynamischen Parameter für den Übergang von **1** nach **2** zusammen.

Die Häufigkeitsverteilungen der erhaltenen thermodynamischen Parameter sind in Abbildung S3 der Hintergrundinformationen dargestellt. Für ein Ensemble von Peptidstrukturen würde man eine gewisse Variation der Parameter von Aminosäure zu Aminosäure erwarten, da die beobachteten Kerne unterschiedliche Prozesse erfahren könnten, die sich simultan mit dem Hauptübergang ereignen, der durch ein Zwei-Zustands-Modell beschrieben wird. In der Tat wird eine solche sequenzspezifische Verteilung der thermodynamischen Parameter normalerweise in Proteinen beobachtet (siehe z.B. die Druckantworten des humanen Prionproteins, wie sie von Kremer et al. beschrieben werden^[24]). Darüber hinaus ist die Genauigkeit der thermodynamischen Parameter, die man aus der Anpassung der Daten erhält, auch stark von der Größe der Änderungen der chemischen Verschiebungen abhängig. So ist die beobachtete Streuung der Parameter zumindest teilweise auf die begrenzte Genauigkeit der Anpassung zurückzuführen.

Stabil in Amyloid-Fibrillen eingebautes A β zeigt sehr breite NMR-Signale und entzieht sich daher der direkten Beobachtung durch die Lösungs-NMR-Spektroskopie. Zusätzlich zu diesem Zustand, der nicht sichtbar in Lösungs-NMR-Spektren ist (dark state), detektierten Fawzi et al.^[18] zwei unterschiedliche Bindungszustände der Aminosäuren von A β -Monomeren an der Oberfläche der Amyloid-Fibrillen: einen partiell gebundenen (tethered) Zustand t und einen Zustand c , bei dem die Aminosäurereste in direktem Kontakt mit der Fibrillenoberfläche stehen. Diese beiden Zustände entsprechen annähernd den Zuständen **3** und **4** in Abbildung 1. Als Folge einer druckinduzierten Depolymerisation führt eine Erhöhung des Drucks zu einer signifikanten Zunahme der Signalintensitäten in den ^1H -NMR-Spektren. Eine solche durch Depolymerisation verursachte Signalzunahme wurde auch schon früher für das Lysozym-Amyloid beobachtet.^[25] Sie ist generell charakterisiert durch eine starke Intensitätszunahme der Haupt- und Seitenketten-NMR-Signale des Monomers (siehe z.B. Abbildung S4 der Hintergrundinformationen). Zusätzlich zu diesem allgemeinen Anstieg der Kreuzsignalintensitäten mit Druck können für individuelle Kreuzsignale im $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum Unterschiede in der Größe der druckinduzierten Intensitätsänderungen beobachtet werden. Nach einer Korrektur der Kreuzsignalvolumina um das Anwachsen der Monomerkonzentration mit Druck bleibt für eine Reihe von Resten eine druckabhängige Reduktion der Kreuzsignalvolumina bestehen (Abbildung 4). Die sequenzspezifische Volumenreduktion

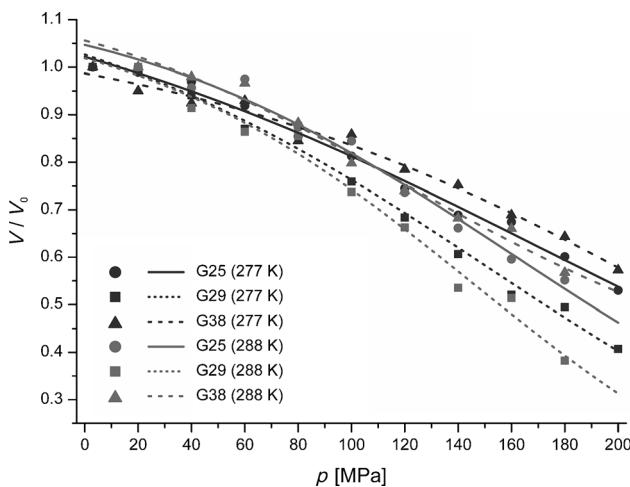


Abbildung 4. Druckabhängige Volumenänderungen. Als Beispiele für die druckinduzierten Volumenänderungen $V_i(p)/V_i(p_0)$ wurden Gly25, Gly29 und Gly38 bei 277 K (schwarz) und 288 K (grau) gewählt. Die Anpassung an die Daten erfolgte mit Gleichung (5) (siehe Hintergrundinformationen). Vor der Anpassung an die Daten wurden diese für die Konzentrationsänderungen durch die druckabhängige Monomerisierung korrigiert. Experimentelle Bedingungen siehe Abbildung 2.

an den hier beobachteten Amidkreuzsignale ist typisch für einen langsamen Austausch zwischen (mindestens) zwei Zuständen (siehe Hintergrundinformationen). Bei höheren Drücken können einige wenige zusätzliche Kreuzsignale beobachtet werden, deren chemische Verschiebungen nahe an

typischen Random-Coil-Positionen liegen und die einem Subzustand **2''** von Zustand **2** entsprechen könnten. Obwohl die Größe der beobachteten Amid-Kreuzsignalvolumenänderungen auch sequenzabhängig ist, kann eine Anpassung an die meisten von ihnen mit einem ähnlichen Satz thermodynamischer Parameter erfolgen (Abbildung S5 der Hintergrundinformationen), was für einen gemeinsamen Prozess für die Signalreduktion spricht. Eine Anpassung an die Druckabhängigkeit der Kreuzsignalvolumina [Gl. (10) der Hintergrundinformationen] ergibt eine mittlere Differenz der partiellen molaren Volumina von (-12 ± 5) und (-29 ± 13) mL mol^{-1} bei 277 bzw. 288 K (Tabelle 1). Da in dieser Analyse die Übergänge von Zustand **1** und Zustand **2'** nicht getrennt werden können, ist der erhaltene Fehler von ΔV relativ groß (Tabelle 1), und es werden nur apparetive Werte von der Analyse erhalten. Der apparetive ΔV -Wert enthält also auch Anteile des Übergangs zwischen den Subzuständen **2'** und **2''**, wobei die Volumenänderung wesentlich kleiner als -12 mL mol^{-1} sein sollte. Aus den Parametern in Tabelle 1 können die relativen Konzentrationen der drei Zustände für alle Drücke berechnet werden (Abbildung 5). Bei Normal-

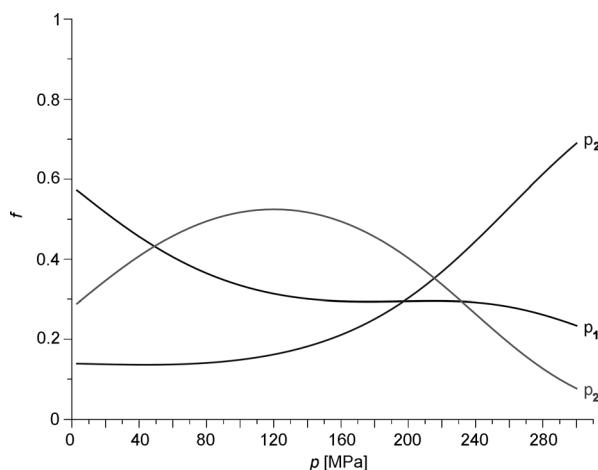


Abbildung 5. Relative Populationen der drei Konformationszustände von A β . Die relativen Populationen f der Zustände **1**, **2'** und **2''** wurden mit den in Tabelle 1 [Gl. (6), Hintergrundinformationen] angegebenen Parametern berechnet und sind als Funktion des Drucks p bei $T = 277 \text{ K}$ aufgetragen.

druck dominiert Zustand **1**, etwa bei 277 und 288 K sind jeweils 58 bzw. 65 % aller Moleküle in Lösung im gefalteten Zustand **1**. Im Unterschied dazu dominiert bei mittleren Drücken um etwa 100 MPa die partiell gefaltete Konformation **2'** das Gleichgewicht. Bei sehr hohen Drücken hat die Random-Coil-ähnliche Struktur **2''** die höchste relative Konzentration. Die partiellen molaren Volumina der Zustände **2'** und **2''** sind wesentlich kleiner als diejenigen von Zustand **1**. Auch sind die Unterschiede der Kompressibilitätsfaktoren der Zustände **2** und **2'** wesentlich kleiner als die des gefalteten Zustands **1** (Tabelle 1). Im Allgemeinen ist eine Abnahme der partiellen molaren Volumen und der Kompressibilität charakteristisch für Entfaltungsprozesse.

Mit $-43.6 \text{ mL mol}^{-1}$ ist der Volumenunterschied zwischen Zustand **1** und **2** signifikant, was für große Strukturunterschiede spricht. Ungefaltete Strukturen sind durch ein kleineres partielles Volumen charakterisiert: So erhält man beispielsweise für die Denaturierung der gut gefalteten Ras-Bindungsdomäne von RalGDS (87 Aminosäuren) eine Volumenänderung von -78 mL mol^{-1} .^[26] Dies deutet auf eine eher kompakt gefaltete Struktur von $\text{A}\beta(1-40)$ im Zustand **1** hin. Die beobachtete, eher kleine Dispersion der chemischen Verschiebungen scheint im Widerspruch zu unserem Befund zu stehen. Normalerweise schließen NMR-Spektroskopiker aus einer kleinen Dispersion der chemischen Verschiebungen, dass ein Protein ungefaltet ist. In den meisten Fällen ist dies richtig, da die Bildung von kanonischen Sekundärstrukturen zu wesentlich größeren Änderungen der chemischen Verschiebungen führt. Doch für kleine Peptide muss dies nicht richtig sein. Ein Beispiel ist das Inaktivierungspeptid des Kaliumkanals von Raw3,^[27] das kompakt gefaltet ist, aber keine kanonischen Sekundärstrukturelemente enthält und eine ähnliche Verteilung der chemischen Verschiebungen wie $\text{A}\beta$ aufweist. In $\text{A}\beta$ unterscheiden sich die Werte der chemischen Verschiebung signifikant von Random-Coil-Werten (Abbildung 3), aber bei Druckerhöhung nähern sie sich den druckkorrigierten Random-Coil-Werten immer mehr an. Auch die H^{α} - und ^{13}C -Verschiebungen von Hou et al.^[15] unterscheiden sich signifikant von Random-Coil-Werten und ermöglichen aber nur die Vorher sage eines kleinen β -Strangs von V18 bis F20 (Abbildung S6 der Hintergrundinformationen). Wenn Zustand **1** des $\text{A}\beta$ -Monomers eine cross- β -ähnliche Struktur haben würde (ein von uns bevorzugtes Modell), die hauptsächlich durch Seitenkettenkontakte stabilisiert wäre, würde man eine ähnliche Verteilung der chemischen Verschiebungen erwarten. Eine sich bei hohem Druck öffnende cross- β -Struktur würde auch gut die sequenzielle Verteilung der Druckkoeffizienten erklären (Abbildung 2).

NMR-spektroskopische Parameter wie chemische Verschiebungen oder Kern-Overhauser-Effekte entsprechen nur (nicht-linearen) Ensemblemittelungen. In unserem Fall haben wir zwei Strukturenensembles mit vergleichbaren Populationen. Zwischen Zustand **1** und **2'** ist der Austausch schnell auf der NMR-Zeitskala. Aus der maximalen Differenz der chemischen Verschiebungen $\Delta\delta$ kann die Austauschkorrelationszeit τ_e für den Übergang zwischen den beiden Zuständen zu $< 1.2 \text{ ms}$ abgeschätzt werden. Bei einer Interpretation der Daten mit nur einem Ensemble würde man eine inkorrekte Struktur erhalten, da sie die Populationswichtung der verwendeten NMR-Parameter vernachlässigen würde. Die berechnete Struktur würde von den relativen Populationen der beiden Zustände abhängen, die wiederum von der Temperatur (diese Veröffentlichung) und höchstwahrscheinlich auch vom pH-Wert und der Ionenstärke abhängen. Offensichtlich führen diese Rechnungen in den meisten Fällen zum Standardbild von monomerem $\text{A}\beta$, das durch eine Random-Coil-ähnliche Struktur mit transienten α -helikalen Anteilen dargestellt wird.^[5-8] Bei anderen Bedingungen kann der kompakt gefaltete Zustand **1** vorherrschen, und die ungleichmäßige Mittelung kann kompaktere mittlere Strukturen wie die NMR-Struktur von Vivekanandan et al.^[17] produzieren.

Überraschenderweise gibt es nur eine kleine Population von reinen Random-Coil-ähnlichen Strukturen bei Normaldruck (Abbildung 5, Tabelle 1).

Nach unserer Analyse treten bei Normaldruck die $\text{A}\beta$ -Monomere hauptsächlich in zwei Strukturenensembles auf, dem Ensemble **2** von teilweise gefaltetem oder ungefaltetem $\text{A}\beta$ und dem Ensemble **1** mit kompakt gefalteten Strukturen. Ensemble **1** hat höchstwahrscheinlich schon ähnliche Struktureigenschaften wie an das Polymer gebundenes $\text{A}\beta$ (Abbildung 1) und hat daher wahrscheinlich auch eine höhere Affinität zu existierenden Polymerisationskeimen (β -Bälle und Fibrillen). Mit dieser Annahme lassen sich anhand unserer Daten die Temperatur- und Druckabhängigkeit der Polymerisationsreaktion erklären: Die Population des hochaffinen Zustands **1** nimmt mit der Temperatur im hier untersuchten Temperaturbereich zu und nimmt mit zunehmendem Druck ab. Dies würde die beobachtete temperaturinduzierte Polymerisation erklären und zu einer druckinduzierten Depolymerisation von $\text{A}\beta$ führen. In Abwesenheit von Fibrillen, die als Polymerisationskeime wirken, könnte der hier detektierte, kompakt gepackte Zustand **1** auch zur Bildung von intermediären Zuständen wie β -Bällen beitragen. Die Stabilisierung des partiell gefalteten Zustands **2'** (Hemmung der Bildung von Zustand **1**) durch kleine Moleküle könnte also ein geeigneter Ansatzpunkt für die Arzneimittelentwicklung durch eine Schwächung der Monomer-Oligomer-Wechselwirkung sein, ähnlich dem Mechanismus, der schon für die Inhibierung der Wechselwirkung von Effektoren mit onkogenem Ras nachgewiesen wurde.^[28,29]

Eingegangen am 21. Februar 2013
Online veröffentlicht am 10. Juli 2013

Stichwörter: Alzheimersche Erkrankung · Amyloide β -Peptide · Hochdruckchemie · NMR-Spektroskopie · Proteinfaltung

- [1] M. P. Mattson, *Nature* **2004**, *430*, 631–639.
- [2] L. Blennow, M. J. de Leon, H. Zetterberg, *Lancet* **2006**, *368*, 387–403.
- [3] J. Hardy, D. J. Selkoe, *Science* **2002**, *297*, 353–356.
- [4] R. E. Tanzi, L. Bertram, *Cell* **2005**, *120*, 545–555.
- [5] X. P. Xu, D. A. Case, *Biopolymers* **2002**, *65*, 408–423.
- [6] J. Danielsson, J. Jarvet, P. Damberg, A. Graslund, *Magn. Reson. Chem.* **2002**, *40*, S89–S97.
- [7] O. Crescenzi, S. Tomaselli, R. Guerrini, S. Salvadori, A. M. D'Ursi, P. A. Temussi, D. Picone, *Eur. J. Biochem.* **2002**, *269*, 5642–5648.
- [8] P. A. Temussi, L. Masino, A. Pastore, *EMBO J.* **2003**, *22*, 355–361.
- [9] J. P. Cleary, D. M. Walsh, J. J. Hofmeister, G. M. Shankar, M. A. Kuskowski, D. J. Selkoe, K. H. Ashe, *Nat. Neurosci.* **2005**, *8*, 79–84.
- [10] C. Haass, D. J. Selkoe, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8*, 101–112.
- [11] A. T. Petkova, Y. Ishii, J. J. Balbach, O. N. Antzutkin, R. D. Leapman, F. Delaglio, R. Tycko, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 16742–16747.
- [12] T. Lührs, C. Ritter, M. Adrian, D. Riek-Lohr, B. Bohrmann, H. Döbeli, D. Schubert, R. Riek, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 17342–17347.
- [13] A. T. Petkova, W.-M. Yau, R. Tycko, *Biochemistry* **2006**, *45*, 498–512.

- [14] R. Riek, P. Güntert, H. Döbeli, B. Wipf, K. Wüthrich, *Eur. J. Biochem.* **2001**, *268*, 5930–5936.
- [15] L. Hou, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1992–2005.
- [16] J. Danielsson, A. Andersson, J. Jarvet, A. Graslund, *Magn. Reson. Chem.* **2006**, *44*, S114–S121.
- [17] S. Vivekanandan, J. R. Brender, S. Y. Lee, A. Ramamoorthy, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2011**, *411*, 312–316.
- [18] N. L. Fawzi, J. Ying, R. Ghirlando, D. A. Torchia, G. M. Clore, *Nature* **2011**, *480*, 268–272.
- [19] M. Gross, *Curr. Protein Pept. Sci.* **2000**, *1*, 339–347.
- [20] J. Koehler, M. Beck Erlach, E. Crusca, Jr., W. Kremer, C. E. Munte, H. R. Kalbitzer, *Materials* **2012**, *5*, 1774–1786.
- [21] F. H. Schumann, H. Riepl, T. Maurer, W. Gronwald, K.-P. Neidig, H. R. Kalbitzer, *J. Biomol. NMR* **2007**, *39*, 275–289.
- [22] R. Tycko, *Q. Rev. Biophys.* **2006**, *39*, 1–55.
- [23] M. Kjaergaard, S. Brander, F. Poulsen, *J. Biomol. NMR* **2011**, *49*, 139–149.
- [24] W. Kremer, N. Kachel, K. Kuwata, K. Akasaka, H. R. Kalbitzer, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 22689–22698.
- [25] T. N. Niraula, T. Konno, H. Li, H. Yamada, K. Akasaka, H. Tachibana, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 4089–4093.
- [26] K. Inoue, H. Yamada, K. Akasaka, C. Herrmann, W. Kremer, T. Maurer, R. Döker, H. R. Kalbitzer, *Nat. Struct. Biol.* **2000**, *7*, 547–550.
- [27] C. Antz, M. Geyer, B. Fakler, M. K. Schott, H. R. Guy, R. Frank, J. P. Ruppertsberg, H. R. Kalbitzer, *Nature* **1997**, *385*, 272–275.
- [28] I. Rosnizeck, et al., *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 3918–3922; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 3830–3833.
- [29] I. Rosnizeck, M. Spoerner, T. Harsch, S. Kreitner, D. Filchtinski, C. Herrmann, D. Engel, B. König, H. R. Kalbitzer, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 10799–10804; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 10647–10651.