

Kontakt zwischen den $\beta 1$ - und $\beta 2$ -Segmenten von α -Synuclein inhibiert die Amyloidbildung**

Hamed Shaykhalishahi, Aziz Gauhar, Michael M. Wördehoff, Clara S. R. Grüning, Antonia N. Klein, Oliver Bannach, Matthias Stoldt, Dieter Willbold, Torleif Härd und Wolfgang Hoyer*

Abstract: Die Umwandlung des intrinsisch ungeordneten Proteins α -Synuclein (α -syn) in Amyloidaggregate ist ein Schlüsselprozess der Parkinson-Krankheit. Die Sequenzregion 35–59 enthält die β -Strangsegmente $\beta 1$ und $\beta 2$ aus Strukturmodellen von α -syn-Amyloidfibrillen sowie die Mehrzahl der bekannten krankheitsassoziierten Mutationen. $\beta 1$ und $\beta 2$ gehen miteinander transiente Interaktionen in monomerem α -syn ein. Hier untersuchen wir die Folgen von $\beta 1$ - $\beta 2$ -Kontakten mittels Disulfid-Engineering, biophysikalischen Techniken und Zellviabilitäts-Assays. Die Doppelcystein-Mutante α -synCC mit einer Disulfidbrücke zwischen $\beta 1$ und $\beta 2$ bildet keine Aggregate und inhibiert die Aggregation und Toxizität von Wildtyp- α -syn. Wir zeigen, dass α -syn die Aggregation des Amyloid- β -Peptids und des Inselamyloid-Polypeptids inhibiert, ein Effekt, der in der α -synCC-Mutante verstärkt ist. Tertiäre Interaktionen in der $\beta 1$ - $\beta 2$ -Region von α -syn beeinträchtigen die Nukleation der Amyloidbildung. Ein therapeutischer Ansatz wäre folglich die Förderung solcher Interaktionen.

Die Aggregation von Proteinen und die Toxizität der entstehenden Aggregate sind Grundlage der Pathogenese zahlreicher degenerativer Erkrankungen beim Menschen. Beispielsweise sind Aggregate der Proteine α -Synuclein (α -syn), Amyloid- β -Peptid (A β) und Inselamyloid-Polypeptid (IAPP) Merkmale der Parkinson-Krankheit, der Alzheimer-Krankheit bzw. von Diabetes mellitus Typ 2.^[1] α -Syn ist ein aus 140 Aminosäuren bestehendes zytoplasmatisches Protein, welches in der Zelle hauptsächlich als intrinsisch ungeordnetes

Protein (IUP) vorliegt.^[2] Das Konformationsensemble des IUP enthält eine erhebliche Fraktion an Konformeren, die langreichweite intramolekulare Interaktionen aufweisen, welche die Aggregation unterstützen oder inhibieren können.^[3]

Laut Relaxationsverstärkungs-NMR-Spektroskopie und Moleküldynamik-Simulationen gehören Kontakte zwischen den $\beta 1$ - und $\beta 2$ -Sequenzsegmenten zu den häufigsten tertiären Interaktionen in monomerem α -syn.^[3c] Die Bezeichnungen $\beta 1$ und $\beta 2$ beziehen sich dabei auf zwei der ungefähr fünf β -Stränge von α -syn-Molekülen in Amyloidfibrillen.^[4] Die $\beta 1$ - $\beta 2$ -Region umfasst die Aminosäuren 35–59, liegt außerhalb der hydrophoben, fibrillenbildungsinduzierenden NAC-Region^[5] und ist die am weitesten N-terminal liegende Sequenzregion von α -syn innerhalb des Fibrillenkerns der meisten bisher beschriebenen Fibrillen-Polymorphe.^[4,6] Verschiedene Befunde weisen auf eine entscheidende Bedeutung der $\beta 1$ - $\beta 2$ -Region für die α -syn-Aggregation und für die Pathogenese hin: 1) Sie enthält die Mehrzahl der krankheitsassoziierten Mutationen, welche die Neigung zur Oligomeren- und Fibrillenbildung beeinflussen.^[7] 2) Sie ist Teil des Kerns von α -Syn-Oligomeren, wo sie eine besonders hohe Beständigkeit gegen H/D-Austausch aufweist.^[8] 3) Sie reguliert den Amyloid-Stamm und die Effizienz von Aggregationskeimen.^[9] 4) Wir haben kürzlich gezeigt, dass die Bindung der $\beta 1$ - $\beta 2$ -Region durch das Bindepotein β -Wrapin AS69 die α -syn-Aggregation inhibiert.^[10] Im Komplex mit AS69 nimmt α -syn eine β -Haarnadel-Konformation ein mit β -Strängen bestehend aus Aminosäureresten 37–43 und 48–54, ähnlich den $\beta 1$ - und $\beta 2$ -Strängen von fibrillärem α -syn.^[10] Die tertiären Kontakte zwischen den β -Strängen der AS69-gebundenen β -Haarnadel stimmen gut mit den $\beta 1$ - $\beta 2$ -Kontakten in freiem, monomerem α -syn überein.^[3c]

In Anbetracht der Bedeutung der $\beta 1$ - $\beta 2$ -Region für die α -syn-Aggregation könnten tertiäre $\beta 1$ - $\beta 2$ -Kontakte wichtige Aggregationsregulatoren darstellen. Hier untersuchen wir die Auswirkungen von Kontakten zwischen $\beta 1$ und $\beta 2$ auf die Amyloidbildung. Ein stabiler Kontakt wurde geschaffen durch die Einführung einer intramolekularen Disulfidbrücke in der als α -synCC bezeichneten Doppelcystein-Mutante G41C/V48C. Die C41-C48-Disulfidbindung ist mit der β -Haarnadel-Konformation von an AS69 gebundenem α -syn kompatibel (Abbildung 1a). Die beiden Austausche G41C und V48C liegen im $\beta 1$ - bzw. $\beta 2$ -Strang, schräg gegenüber voneinander. Der $\text{Ca}-\text{Ca}$ -Abstand von G41 und V48 im α -syn:AS69-Komplex beträgt 6.1 Å und liegt damit innerhalb des Bereichs der $\text{Ca}-\text{Ca}$ -Abstände von Cystein-Disulfidbrücken in Röntgenstrukturen (Mittel: 5.6 Å).^[11] Der sterische

[*] Dr. H. Shaykhalishahi, Dr. A. Gauhar, M. M. Wördehoff, Dr. C. S. R. Grüning, Dr. O. Bannach, Dr. M. Stoldt, Prof. Dr. D. Willbold, Dr. W. Hoyer
Institut für Physikalische Biologie
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
40204 Düsseldorf (Deutschland)
E-Mail: Wolfgang.Hoyer@uni-duesseldorf.de
A. N. Klein, Dr. O. Bannach, Dr. M. Stoldt, Prof. Dr. D. Willbold, Dr. W. Hoyer
Strukturbiochemie (ICS-6), Forschungszentrum Jülich
52425 Jülich (Deutschland)
Prof. Dr. T. Härd
Department of Chemistry and Biotechnology
Swedish University of Agricultural Sciences (SLU)
750 07 Uppsala (Schweden)

[**] Diese Arbeit wurde vom Ministerium für Innovation, Wissenschaft und Forschung des Landes Nordrhein-Westfalen gefördert.
 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201503018> zu finden.

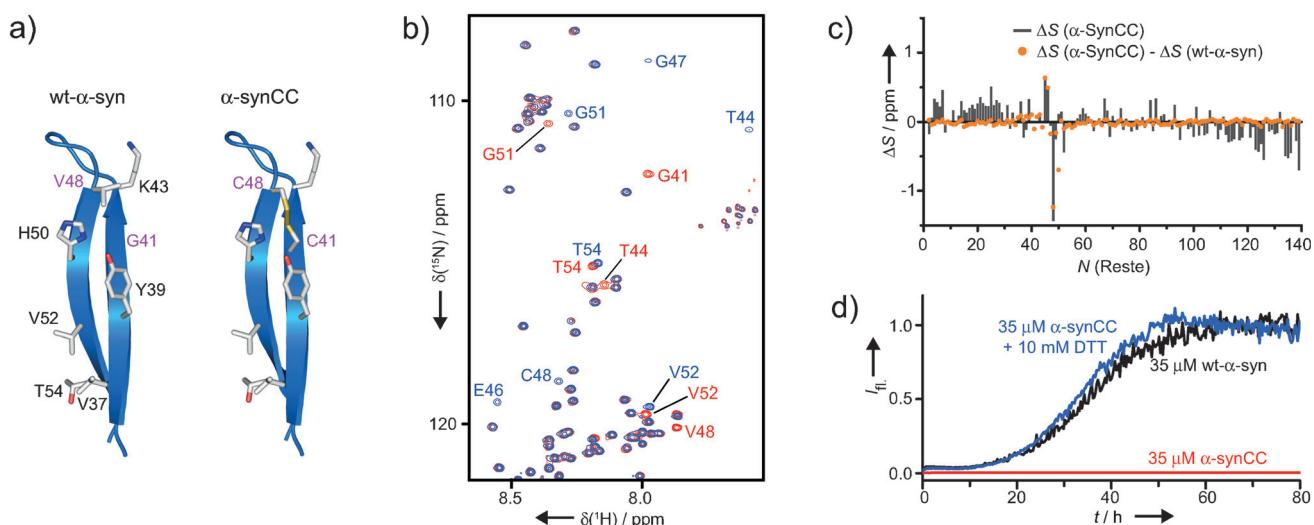


Abbildung 1. Protein-Engineering und Charakterisierung von α -synCC. a) Links: β 1- β 2-Region von α -syn im Komplex mit β -wrapin AS69 (pdb: 4bxl). Die Seitenketten der Vorderseite sind im Stabmodell dargestellt. Rechts: Modell der β 1- β 2-Region von α -synCC, in dem die Reste 41 und 48 von wt- α -syn gegen Cysteine ausgetauscht wurden. b) $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren von [U^{15}N]-wt- α -syn (rot) und [U^{15}N]- α -synCC (blau) bei 10°C. Die Zuordnungen der durch den Cystein-Austausch beeinträchtigten Resonanzsignale sind angegeben. c) Gemittelte sekundäre chemische $\text{C}\alpha$ - und C' -Verschiebungen von α -synCC und Differenz der sekundären chemischen Verschiebungen von α -synCC und wt- α -syn. d) Zeitverlauf der Fibrillenbildung von oxidiertem und reduziertem α -synCC verglichen mit wt- α -syn in einem Thioflavin-T-Fluoreszenzassay.

Anspruch zweier Disulfid-verbrückter Cysteinreste (Gesamtvolumen der Reste: 207 Å³) ist ähnlich dem der ursprünglichen Glycin-Valin-Kombination (Gesamtvolumen der Reste: 203 Å³).^[12] Zur Untersuchung der Konformation von α -synCC wurde das $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HSQC-NMR-Spektrum von [U^{15}N]- α -synCC mit dem von [U^{15}N]-Wildtyp-(wt)- α -syn verglichen (Abbildung 1b). Die geringe Resonanzdispersion von wt- α -syn wurde auch bei α -synCC beobachtet; die eingeführte Disulfidbrücke induziert also keine Faltung in eine stabile Konformation. α -synCC zeigte unerhebliche sekundäre chemische Verschiebungen, was ebenso darauf hinweist, dass es ein IUP wie wt- α -syn ist (Abbildung 1c). Deutliche Unterschiede in den chemischen Verschiebungen wurden nur bei den Aminosäuren in unmittelbarer Umgebung der beiden Austausche beobachtet, die sekundären chemischen Verschiebungen deuteten jedoch nicht auf die Ausbildung einer stabilen Sekundärstruktur in diesen Bereichen hin (Abbildung 1c).

Oxidiertes α -synCC bildete keine Fibrillen nach längerer Inkubation in einem Thioflavin-T-Fluoreszenzassay (Abbildung 1d). Reduktion der β 1- β 2-Disulfidbindung mittels Dithiothreitol (DTT), führte jedoch zu einem ähnlichen Aggregationsverlauf wie im Falle von wt- α -syn (Abbildung 1d). Die Bildung der β 1- β 2-Disulfidbindung führt also dazu, dass α -synCC keine Fibrillen bildet. β 1- β 2-Kontakte können folglich die Ausbildung autoinhibitorischer Konformationen^[3a] verursachen. Größenausschlusschromatographie bestätigte, dass oxidiertes α -synCC nach Inkubation keine stabilen Oligomere bildete, sondern weiterhin als Monomer vorlag (Abbildung S1 in den Hintergrundinformationen). α -synCC zeigt hier andere Eigenschaften als A β CC, eine nach einer analogen Strategie hergestellte Doppelcystein-Mutante von A β (Abbildung S2), die stabile, neurotoxische Oligomere

bildet.^[13] Dieser Unterschied beruht möglicherweise auf der geringeren Hydrophobie der Haarnadel-Region von α -synCC gegenüber der von A β CC, mit GRAVY-Werten^[14] (grand average of hydrophobicity) von 0.48 für α -synCC(37-54) und 1.27 für A β CC(17-36).

α -synCC inhibierte die Aggregation von wt- α -syn sowohl bei äquimolarer als auch bei substochiometrischer Zugabe (Abbildung 2a). Der inhibitorische Effekt bei substochiometrischem Verhältnis zeigt, dass α -synCC in die Keimbildung und/oder Elongation von wt- α -syn-Fibrillen eingreift. Die β 1- β 2-Disulfidbrücke war ursächlich für den inhibitorischen Effekt, da er durch Reduktion mittels DTT aufgehoben wurde (Abbildung 2a). Um zu überprüfen, ob α -synCC die Elongation von wt- α -syn-Fibrillen hemmt, wurde das Wachstum von wt- α -syn-Fibrillenkeimen (Seeds) in Gegenwart von wt- α -syn-Monomeren in einem Fluoreszenz-Mikrotiterplatten-Lesegerät (Abbildung S3) oder mittels Fluoreszenzmikroskopie mit interner Totalreflexion (TIRFM) (Abbildung 2d) untersucht. Als Fibrillenkeime wurden im Ultraschallbad behandelte wt- α -syn-Fibrillen verwendet. Zugabe von α -synCC führte zu einer konzentrationsabhängigen Hemmung des wt- α -syn-Fibrillenwachstums (Abbildung S3). Die Fibrillenkeime werden mit TIRFM als Partikel mit mehreren Fibrillenwachstumsstellen abgebildet, die sich nach Inkubation mit monomerem wt- α -syn zu Fibrillennetzwerken ausdehnen (Abbildung 2d).^[15] Bei Inkubation der Fibrillenkeime mit α -synCC wurden hingegen keine Fibrillennetze gefunden, in Übereinstimmung mit der Feststellung, dass α -synCC keine Fibrillen bildet (Abbildung 2d). Inkubation der Fibrillenkeime mit monomerem wt- α -syn führte nicht zu Fibrillennetzen, wenn gleichzeitig α -synCC koinkubiert wurde (Abbildung 2d). Der inhibitorische Effekt von α -synCC auf die Elongation von wt- α -syn-Fibrillen

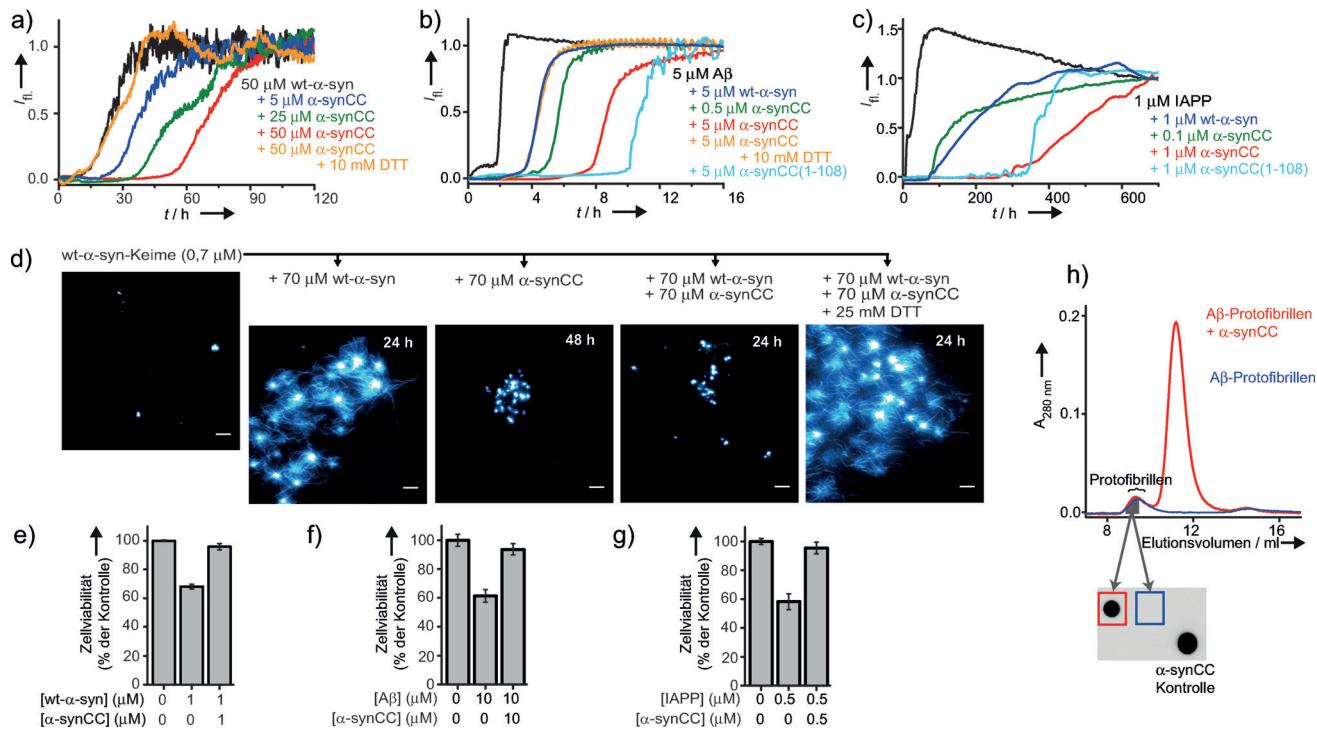


Abbildung 2. α -SynCC inhibiert die Aggregation und Toxizität von wt- α -syn, $A\beta$ und IAPP. a–c) Zeitverlauf der Fibrillenbildung von wt- α -syn (a), $A\beta$ (b) und IAPP (c) in Abwesenheit oder Gegenwart von α -synCC in einem Thioflavin-T-Fluoreszenzassay. d) TIRF-Mikroskopie der Fibrillenbildung von α -synCC und wt- α -syn in der Gegenwart von wt- α -syn-Aggregationskeimen. Maßstab, 5 μ m. e–g) MTT-Toxizitätstest zur Bestimmung der Toxizität von wt- α -syn (e), $A\beta$ (f) und IAPP (g) nach Inkubation in Abwesenheit oder Gegenwart von α -synCC für SH-SY5Y-Neuroblastomzellen. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von Dreifachmessungen, normiert auf die Werte unbehandelter Kontrollzellen. h) α -SynCC interagiert mit $A\beta$ -Protofibrillen. Größenausschlusschromatogramme aufgereinigter $A\beta$ -Protofibrillen nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur in Abwesenheit (blau) oder Gegenwart (rot) von 2 molaren Äquivalenten α -synCC (in Monomereinheiten berechnet). $A\beta$ -Protofibrillen eluieren nahe des Ausschlussvolumens (≈ 8.5 mL), während der Elutionspeak bei 11.5 mL α -synCC entspricht. Ein Dot-Blot der Protofibrillenfraktionen unter Einsatz des Anti- α -syn-Primärantikörpers 211 ist unterhalb des Chromatogramms gezeigt. Frisches α -synCC diente als Positivkontrolle. $A\beta$ (1–40) (b,f) bzw. $A\beta$ (1–42) (h) mit N-terminalem Methionin^[19] wurden verwendet.

len ist von der $\beta 1$ - $\beta 2$ -Disulfidbrücke abhängig, da er durch Reduktion mittels DTT aufgehoben wurde (Abbildung 2d). Zusammengefasst weisen die Experimente zum Wachstum von wt- α -syn-Fibrillenkeimen darauf hin, dass α -synCC mit den Enden der wt- α -syn-Fibrillen interagiert. Gealtertes, aggregiertes wt- α -syn verursachte eine Abnahme der Viabilität von SH-SY5Y-Neuroblastomzellen laut MTT-Toxizitätstest (Abbildung 2e). Wurde wt- α -syn jedoch in Gegenwart von α -synCC gealtert, war die Zellviabilität nicht beeinträchtigt.

Verschiedene Proteinaggregationskrankheiten, die mit unterschiedlichen amyloidogenen Proteinen nicht-homologer Sequenz assoziiert sind, zeigen häufig klinische und pathologische Überschneidungen, welche auf eine wechselseitige Beeinflussung der Aggregationsreaktionen der jeweiligen Proteine hindeuten.^[9,16] So werden $A\beta$ -Plaques häufig bei Parkinson-Patienten gefunden, während α -syn-Lewy-Körperchen bei der Mehrheit der Alzheimer-Fälle auftreten.^[17] Ebenso wurden IAPP-Oligomere und -Plaques in den Hirnen von Alzheimer-Patienten mit Diabetes identifiziert.^[18] Wir haben potentielle heterotypische Interaktionen von α -synCC mit anderen amyloidogenen Proteinen untersucht, indem wir den Effekt von α -synCC auf die Fibrillenbildung von $A\beta$ und IAPP bestimmt haben. Der durch α -synCC verursachte Effekt wurde mit dem von wt- α -syn verglichen. Wt- α -syn und

α -synCC inhibieren beide die Bildung von Fibrillen aus $A\beta$ und IAPP, wobei α -synCC das stärkere inhibitorische Potential zeigt (Abbildung 2b,c). Die Verzögerungsphase der Fibrillenbildung in einer 5 μ M $A\beta$ -Lösung verlängerte sich um den Faktor 2 bzw. 4 bei Zugabe äquimolarer Mengen wt- α -syn bzw. α -synCC (Abbildung 2b). Durch Reduktion der Disulfidbindung wurde die inhibitorische Wirkung von α -synCC auf das Niveau von wt- α -syn herabgesetzt. Die $\beta 1$ - $\beta 2$ -Disulfidbrücke ist folglich für das erhöhte inhibitorische Potential von α -synCC verantwortlich (Abbildung 2b).

Die Verzögerungsphase der Fibrillenbildung in einer 1 μ M IAPP-Lösung verlängerte sich um den Faktor 10 bzw. 40 bei Zugabe äquimolarer Mengen wt- α -syn bzw. α -synCC (Abbildung 2c). Die Zugabe von α -synCC im Molverhältnis 1:10 war ausreichend, um eine deutliche Verlängerung der Verzögerungsphase der $A\beta$ - und IAPP-Fibrillenbildung zu erreichen, was auf einen Effekt von α -synCC auf die Keimbildung und/oder Elongation der Amyloidfibrillen hinweist (Abbildung 2b,c). Eine Chaperon-artige Aktivität von α -syn wurde zuvor in thermisch und chemisch induzierten Proteinaggregations-Assays beobachtet.^[20] Die saure C-terminale Region war entscheidend für diese Aktivität, indem sie für Löslichkeit sorgte. Eine C-terminal verkürzte Variante von α -synCC, α -synCC(1–108), verursachte jedoch ähnliche Ver-

längerungen der Verzögerungsphase der Fibrillenbildung von A β und IAPP wie α -synCC voller Länge (Abbildung 2b,c). Die über β 1- β 2-Kontakte vermittelte Aggregationshemmung ist also unabhängig von der sauren C-terminalen Region und muss über einen anderen Mechanismus wirken als die zuvor beschriebene Chaperon-artige Funktion. Zur Ergänzung der ThT-Fluoreszenzdaten wurde die A β -Aggregation mit Größenausschlusschromatographie und Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) analysiert. α -synCC inhibierte die Bildung von Oligomeren und Fibrillen (Abbildung S4). Unter aggregationsfördernden Bedingungen gealterte Lösungen von A β und IAPP führten zu einer Abnahme der Viabilität von SH-SY5Y-Neuroblastomzellen im MTT-Toxizitätstest (Abbildung 2f,g). Wurden die Zellen jedoch mit A β - und IAPP-Proben behandelt, die in Gegenwart von α -synCC gealtert waren, so wurde keine reduzierte Viabilität festgestellt (Abbildung 2f,g).

Um die mit α -synCC interagierende molekulare Spezies zu identifizieren, wurde die Bindung von α -synCC an Monomere von wt- α -syn, A β und IAPP sowie an A β -Protofibrillen, metastabile neurotoxische Oligomere, überprüft. Biotinylierte Monomere der Zielproteine wurden auf einen Streptavidin(SA)-Sensorchip aufgebracht. Wurde α -synCC nun als Analyt über die Sensoroberfläche gespült, so wurde für keines der drei Zielproteine ein Bindung anzeigenches Oberflächenplasmonresonanzsignal erhalten (Daten nicht gezeigt). Frisch hergestellte A β -Prototibrillen wurden 10 Minuten mit oder ohne α -synCC inkubiert. Die inkubierten Proben wurden mittels Injektion auf eine Größenausschluss-Säule, Isolierung der Protofibrillenfraktion, und Dot-Blot unter Verwendung des Anti- α -syn-Antikörpers 211 analysiert (Abbildung 2h). Die mit α -synCC vorinkubierten A β -Prototibrillen zeigten Immunoreaktivität, was auf eine Bindung von α -synCC an A β -Prototibrillen hinweist.

Die vorliegende Studie zeigt, dass α -synCC mit ausgebildeter Disulfidbrücke aktiv in die Aggregation amyloidogener Proteine eingreift (Abbildung 3). Wie inhibiert der β 1- β 2-Kontakt die Proteinaggregation? Betrachtet man die Ami-

nosäuresequenz, so führen β 1- β 2-Kontakte zur Ausbildung von Konformationen mit Clustern hydrophober und aromatischer Aminosäuren, einschließlich Tyr-39 und His-50. Diese Konformere sind möglicherweise nicht fähig, Fibrillen zu bilden, aber in der Lage, mit anderen Spezies auf dem Aggregations-Reaktionsweg wie etwa oligomeren Aggregationskeimen und Fibrillenenden zu interagieren, was eine weitere Aggregation dieser Spezies unterbinden könnte.

Diese Arbeit unterstreicht, dass die β 1- β 2-Region ein wichtiger Regulator der α -syn-Aggregation ist. Tertiäre Interaktionen zwischen β 1 und β 2 interferieren mit der Aggregation und steuern Hetero-Interaktionen von α -syn mit anderen amyloidogenen IUPs. Auf der Suche nach Inhibitoren der Amyloidbildung^[21] ist die Förderung von β 1- β 2-Kontakten ein möglicher Ansatz.

Stichwörter: Aggregation · Intrinsisch ungeordnete Proteine · Protein-Engineering · Proteinfaltung · Protein-Protein-Interaktionen

Zitierweise: Angew. Chem. Int. Ed. 2015, 54, 8837–8840
Angew. Chem. 2015, 127, 8962–8966

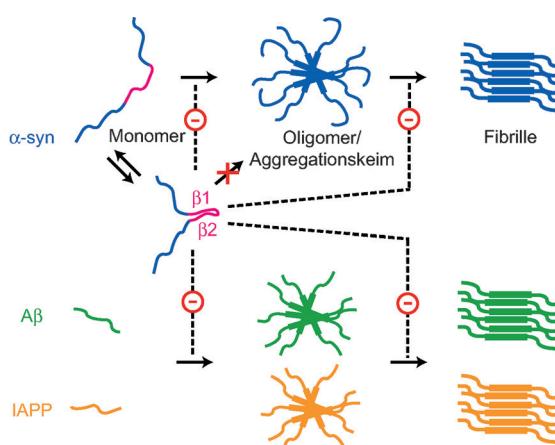


Abbildung 3. Schema des inhibitorischen Effekts tertärer Kontakte in der β 1- β 2-Region von α -syn auf die Aggregation amyloidogener IUPs. Konformationen, die β 1- β 2-Kontakte aufweisen, bilden weder Oligomere noch Fibrillen und inhibieren zudem die Fibrillennukleation und -verlängerung von α -syn, A β und IAPP.

- [1] a) T. P. Knowles, M. Vendruscolo, C. M. Dobson, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2014**, *15*, 384–396; b) M. G. Spillantini, M. L. Schmidt, V. M. Lee, J. Q. Trojanowski, R. Jakes, M. Goedert, *Nature* **1997**, *388*, 839–840.
- [2] a) J. Burré, S. Vivona, J. Diao, M. Sharma, A. T. Brunger, T. C. Südhof, *Nature* **2013**, *498*, E4–6; b) B. Fauvet, M. K. Mbefo, M. B. Fares, C. Desobry, S. Michael, M. T. Ardah, E. Tsika, P. Coune, M. Prudent, N. Lion, et al., *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 15345–15364.
- [3] a) C. W. Bertoncini, Y. S. Jung, C. O. Fernandez, W. Hoyer, C. Griesinger, T. M. Jovin, M. Zweckstetter, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 1430–1435; b) M. M. Dedmon, K. Lindorff-Larsen, J. Christodoulou, M. Vendruscolo, C. M. Dobson, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 476–477; c) S. Esteban-Martín, J. Silvestre-Ryan, C. W. Bertoncini, X. Salvatella, *Biophys. J.* **2013**, *105*, 1192–1198; d) J. C. Lee, R. Langen, P. A. Hummel, H. B. Gray, J. R. Winkler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 16466–16471; e) A. Nath, M. Sammalkorpi, D. C. DeWitt, A. J. Trexler, S. Elbaum-Garfinkle, C. S. O'Hern, E. Rhoades, *Biophys. J.* **2012**, *103*, 1940–1949; f) O. Ullman, C. K. Fisher, C. M. Stultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 19536–19546.
- [4] M. Vilar, H. T. Chou, T. Luhrs, S. K. Maji, D. Riek-Lohrer, R. Verel, G. Manning, H. Stahlberg, R. Riek, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 8637–8642.
- [5] E. A. Waxman, J. R. Mazzulli, B. I. Giasson, *Biochemistry* **2009**, *48*, 9427–9436.
- [6] a) M. Chen, M. Margittai, J. Chen, R. Langen, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 24970–24979; b) H. Heise, W. Hoyer, S. Becker, O. C. Andronesi, D. Riedel, M. Baldus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 15871–15876; c) G. Comellas, L. R. Lemkau, A. J. Nieuwkoop, K. D. Kloepfer, D. T. Ladrón, R. Ebisu, W. S. Woods, A. S. Lipton, J. M. George, C. M. Rienstra, *J. Mol. Biol.* **2011**, *411*, 881–895.
- [7] D. Ghosh, S. Sahay, P. Ranjan, S. Salot, G. M. Mohite, P. K. Singh, S. Dwivedi, E. Carvalho, R. Banerjee, A. Kumar, et al., *Biochemistry* **2014**, *53*, 6419–6421.
- [8] W. Paslawski, S. Mysling, K. Thomsen, T. J. Jorgensen, D. E. Otzen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 7560–7563; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 7690–7693.

- [9] J. L. Guo, D. J. Covell, J. P. Daniels, M. Iba, A. Stieber, B. Zhang, D. M. Riddle, L. K. Kwong, Y. Xu, J. Q. Trojanowski, et al., *Cell* **2013**, *154*, 103–117.
- [10] E. A. Mirecka, H. Shaykhalishahi, A. Gauhar, S. Akgül, J. Lecher, D. Willbold, M. Stoldt, W. Hoyer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 4227–4230; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 4311–4314.
- [11] B. Schmidt, L. Ho, P. J. Hogg, *Biochemistry* **2006**, *45*, 7429–7433.
- [12] Y. Harpaz, M. Gerstein, C. Chothia, *Structure* **1994**, *2*, 641–649.
- [13] a) C. Lendel, M. Bjerring, A. Dubnovitsky, R. T. Kelly, A. Filippov, O. N. Antzutkin, N. C. Nielsen, T. Härd, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 12756–12760; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 12970–12974; b) A. Sandberg, L. M. Luheshi, S. Sollvander, T. Pereira de Barros, B. Macao, T. P. Knowles, H. Biverstal, C. Lendel, F. Ekholm-Pettersson, A. Dubnovitsky, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 15595–15600.
- [14] J. Kyte, R. F. Doolittle, *J. Mol. Biol.* **1982**, *157*, 105–132.
- [15] M. M. Wördehoff, O. Bannach, H. Shaykhalishahi, A. Kulawik, S. Schiefer, D. Willbold, W. Hoyer, E. Birkmann, *J. Mol. Biol.* **2015**, *427*, 1428–1435.
- [16] E. Andreetto, L. M. Yan, M. Tatarek-Nossol, A. Velkova, R. Frank, A. Kapurniotu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 3081–3085; *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 3146–3151.
- [17] A. Serrano-Pozo, M. P. Froesch, E. Masliah, B. T. Hyman, *Cold Spring Harbor Perspect. Med.* **2011**, *1*, a006189.
- [18] K. Jackson, G. A. Barisone, E. Diaz, L. W. Jin, C. DeCarli, F. Despa, *Ann. Neurol.* **2013**, *74*, 517–526.
- [19] B. Macao, W. Hoyer, A. Sandberg, A. C. Brorsson, C. M. Dobson, T. Härd, *BMC Biotechnol.* **2008**, *8*, 82.
- [20] a) S. M. Park, H. Y. Jung, T. D. Kim, J. H. Park, C. H. Yang, J. Kim, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 28512–28520; b) J. M. Souza, B. I. Giasson, V. M. Lee, H. Ischiropoulos, *FEBS Lett.* **2000**, *474*, 116–119.
- [21] T. Härd, C. Lendel, *J. Mol. Biol.* **2012**, *421*, 441–465.

Eingegangen am 1. April 2015

Online veröffentlicht am 26. Juni 2015