

# 1. Einleitung

## 1.1. Amyloide

### 1.1.1. Bedeutung und Charakterisierung von Amyloiden

Die Bildung und extrazelluläre Ablagerung unlöslicher, fibrillärer Proteinaggregate, sogenannter Amyloide, wird bei einer Reihe menschlicher Krankheiten aber auch bei Tieren beobachtet (Sipe, 1994; Westermark *et al.*, 1999). Hierzu gehören z.B. die Alzheimer-Krankheit, Typ II Diabetes oder Prion-Erkrankungen wie BSE (*bovine spongiform encephalopathy*) und Creutzfeldt-Jacob (Tabelle 1). Die fibrillären Proteinaggregate scheinen dabei direkt mit der Pathogenese dieser Erkrankungen verbunden zu sein (Kelly, 1998; Lansbury, 1999). Die Proteinfibrillen assoziieren mit Plasmaproteinen und Proteoglycanen unter Ausbildung von Amyloid-Plaques, die systemisch, d.h. verschiedene Organe betreffend, oder lokalisiert auf einzelnen Organen, wie Gehirn oder Bauchspeicheldrüse (vgl. Tabelle 1) abgelagert werden (Sipe, 1992).

Der Begriff Amyloid leitet sich von Amylose ab. Er wurde von Virchow (1851) aufgrund der stärkeartigen (“amyl-oid”) Anfärbung von Ablagerungen auf Organen und Geweben mit Iod eingeführt. Trotz des Nachweises, daß es sich bei der Hauptkomponente der Amyloid-Plaques um Proteine handelt (Friedreich & Kekule, 1859), wurde der Begriff Amyloid beibehalten. Die Amyloid-bildenden Proteine sind zumeist Fragmente aus einem längeren, normal gefalteteten Vorläuferprotein (Sipe, 1994). Obwohl sie sich sowohl in Sequenz, Größe und Struktur unterscheiden, ist das Erscheinungsbild aller Amyloide recht ähnlich. So wurden insbesondere hinsichtlich der Konformation und Morphologie charakteristische Gemeinsamkeiten gefunden.

Der klassische Nachweis für Amyloid-Ablagerungen ist die Anfärbung mit Kongo Rot (CR) (Puchtler *et al.*, 1962), die zwischen gekreuzten Polarisatoren zu einer charakteristischen grünen Doppelbrechung führt. Die Wechselwirkung zwischen dem Farbstoff und den Amyloid-Fibrillen liefert einen Hinweis auf eine geordnete Anordnung der CR-Moleküle, die durch die reguläre Struktur der Amyloid-Fibrillen hervorgerufen wird (Cooper, 1974; Turnell & Finch, 1992).

**Tabelle 1.** Eine Auswahl von Amyloid-assoziierten Krankheiten

Krankheit	Protein	Struktur des nativen Proteins <sup>1</sup>	Verteilung
Alzheimer/Down Syndrom	Amyloid- $\beta$	unbekannt	Gehirn
Spongiforme Encephalopathien : Creutzfeldt-Jacob/Kuru/Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom/BSE/ Scrapie	Prion	$\alpha+\beta$	Gehirn
Typ II Diabetes	Amylin	unbekannt	Bauchspeicheldrüse
Insulin-assoziierte Amyloidose	Insulin	$\alpha+\beta$	Bauchspeicheldrüse
Medulläres Schilddrüsenkarzinom	Calcitonin	unbekannt	Schilddrüse
Isolierte atriale Amyloidose	ANF <sup>2</sup>	unbekannt	Herz
Familiäre amyloide Polyneuropathie/ Senile systemische Amyloidose	Transthyretin	all- $\beta$	systemisch
Erbliche nicht-neuropathische systemische Amyloidose	Lysozym	$\alpha+\beta$	systemisch
Erbliche Apo-A1 Amyloidose	Apolipoprotein A1	$\alpha/\beta$	systemisch
Hämodialyse-assoziierte Amyloidose	$\beta_2$ -Mikroglobulin	all- $\beta$	systemisch
Erbliche Fibrinogen $\alpha$ -Ketten Amyloidose	Fibrinogen	unbekannt	systemisch

<sup>1</sup>(Sunde & Blake, 1998); <sup>2</sup> Artrialer natriuretischer Faktor

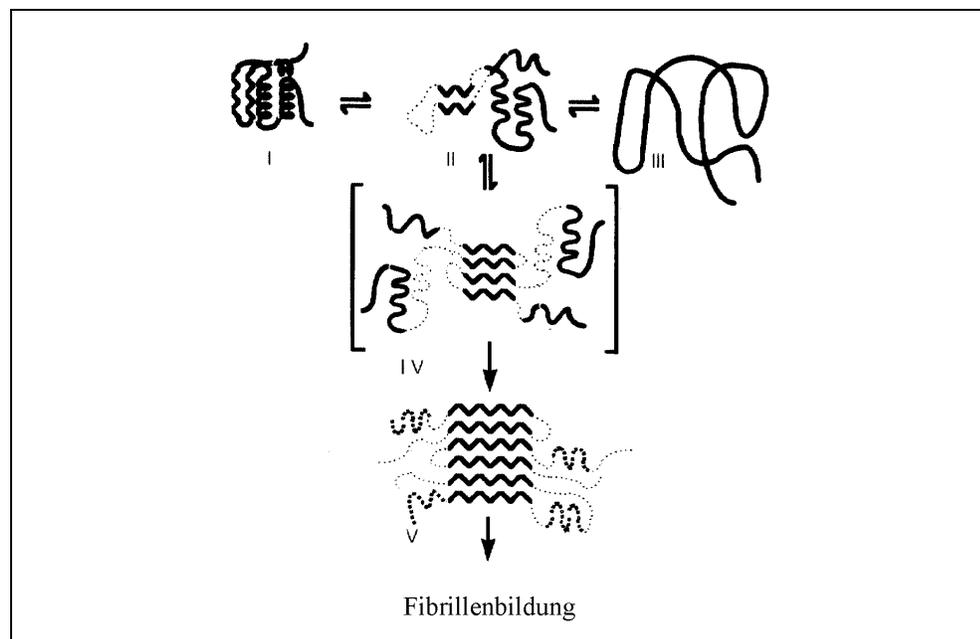
Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen, daß Amyloide durch eine fibrilläre Morphologie gekennzeichnet sind. Die unterschiedlich langen Fibrillen sind gerade und unverzweigt. Sie weisen einen Durchmesser von 5-13 nm auf (Rochet & Lansbury, 2000).

Konformationell sind Amyloide durch einen sehr hohen Anteil an  $\beta$ -Faltblattstrukturen charakterisiert (Eanes & Glenner, 1968). Die  $\beta$ -Stränge verlaufen senkrecht zur Fibrillenachse und bilden daher eine sogenannte cross- $\beta$ -Struktur (Geddes *et al.*, 1968). Diese klassische, von einer planaren  $\beta$ -Faltblattstruktur ausgehende Strukturvorstellung (Pauling & Corey, 1951) (vgl. Kap. 1.2) wurde zum Modell der  $\beta$ -Helix weiterentwickelt. Bei dieser neueren Interpretation von Röntgenstrukturfaseranalysen wird davon ausgegangen, daß die  $\beta$ -Stränge zueinander verdreht sind und sich daher eine helikale Überordnung ausbildet (Sunde *et al.*, 1997).

### 1.1.2. Mechanismus der Amyloid-Bildung

Die Aggregation von Proteinen ist kein ungewöhnliches Phänomen. In der Regel führt sie jedoch nicht zu einem geordneten, fibrillären Zustand, sondern zu einer amorphen, d.h. ungeordneten Anhäufung von Proteinen (Fink, 1998). Was ist also der Grund dafür, daß eine Reihe sehr verschiedener löslicher Proteine/Proteinfragmente in der Lage ist, in extrem unlösliche, hoch geordnete Strukturen zu aggregieren?

Aufgrund des sehr ähnlichen Erscheinungsbildes aller Amyloide werden auch dem Prozeß der Amyloid-Bildung grundlegende mechanistische Gemeinsamkeiten zugeschrieben (Kelly, 1996). Obwohl dieser Mechanismus noch zu großen Teilen unverstanden ist, gibt es eine Vielzahl von Hinweisen, daß konformationelle Übergänge in partiell entfaltenen Proteinen eine maßgebliche Rolle spielen (Kelly, 1996; Mihara & Takahashi, 1997; Rochet & Lansbury, 2000). In Abb. 1 ist ein möglicher Mechanismus der Amyloid-Bildung am Beispiel von Lysozym dargestellt.



**Abb. 1.** Vorgeschlagener Mechanismus für die Amyloid-Bildung von Lysozym (Booth *et al.*, 1997). Unter bestimmten Bedingungen kommt es zur teilweisen Entfaltung des normal gefalteten Proteins. Es bildet sich ein Intermediat (II), das sich sowohl vom nativen (I) als auch vom völlig entfaltenen Proteinzustand (III) unterscheidet. Konformationelle Veränderungen führen zur Anreicherung von  $\beta$ -Faltblattstrukturen, die über Selbstassoziation die Fibrillenbildung initiieren. Das gebildete Assoziat (IV) dient als Templat für weitere Proteinablagerungen und führt damit zur Herausbildung sehr stabiler  $\beta$ -faltblattstrukturierter Fibrillen (V). Die dünn gepunkteten Abschnitte stellen die partielle Entfaltung des nativen Proteins dar.

Mutationen und Umgebungsveränderungen, die die native Struktur des Proteins destabilisieren, fördern die Bildung eines teilweise entfalteten Intermediats und verursachen damit eine "Fehlfaltung" des Proteins (Wetzel, 1996; Mihara & Takahashi, 1997). Die gebildeten Intermediate durchlaufen strukturelle Veränderungen, die über Anreicherung von  $\beta$ -Faltblattstrukturen und deren Selbstassoziation in hochgeordneten Fibrillen zur Stabilisierung der Struktur führen. Signifikante Veränderungen in der Sekundärstruktur äußern sich darin, daß sich der native Zustand der Proteine (vgl. Tabelle 1) deutlich von der durch die  $\beta$ -Faltblattstruktur dominierten Konformation der Amyloide unterscheidet. Ein konformationeller  $\alpha \rightarrow \beta$  Übergang, wie er für das Prion-Protein von der monomeren, zellulären Form ( $\text{PrP}^c$ ) in die aggregierte Scrapie-Form ( $\text{PrP}^{\text{sc}}$ ) (Prusiner, 1996), oder für Lysozym (Booth *et al.*, 1997) beschrieben wird, könnte ein möglicher Mechanismus für eine Reihe weiterer Amyloid-bildender Proteine sein (Sticht *et al.*, 1995; Mihara, 1997).

Die Fibrillenbildung verläuft ähnlich wie eine Kristallisation über zwei Stufen: Keimbildung und Fibrillenwachstum (Jarrett *et al.*, 1993). Als Keim fungieren kleine Aggregate, die als Template für die weitere Anlagerung von Monomeren dienen und damit das Anwachsen zu stabilen fibrillären Strukturen ermöglichen. Der Nukleationsschritt, bei dem sich Proteinmonomere zu einer organisierten Struktur zusammenfinden müssen, ist energetisch ungünstig und damit der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Das Fibrillenwachstum verläuft im Vergleich dazu sehr schnell ab. Durch den Zusatz von Keimen ist es möglich, den an sich langsamen Nukleationsschritt und damit den gesamten Fibrillenbildungsprozeß stark zu beschleunigen (Jarrett *et al.*, 1993). Mittels Elektronen- und Rasterkraftmikroskopie konnten



**Abb. 2.** Mechanismus der Fibrillenbildung. Ausgehend von kleinen oligomeren Aggregaten (A) erfolgt die Selbstassoziation in Filamente (B). Diese winden sich umeinander, um eine Protofibrille (C) zu bilden. Mehrere Protofibrillen (2-4) vereinigen sich dann zu einer reifen Amyloid-Fibrille (D).

verschiedene Spezies von Aggregaten beobachtet werden. Offensichtlich erfolgt die Fibrillogenese über die Bildung von sphärischen Aggregaten, Filamenten, Protofibrillen und reifen Fibrillen (Abb. 2) (Harper *et al.*, 1997; Walsh, *et al.*, 1997; Jiménez *et al.*, 1999; Ionescu-Zanetti *et al.*, 1999).

### 1.1.3. Ausweitung des Amyloid-Begriffes

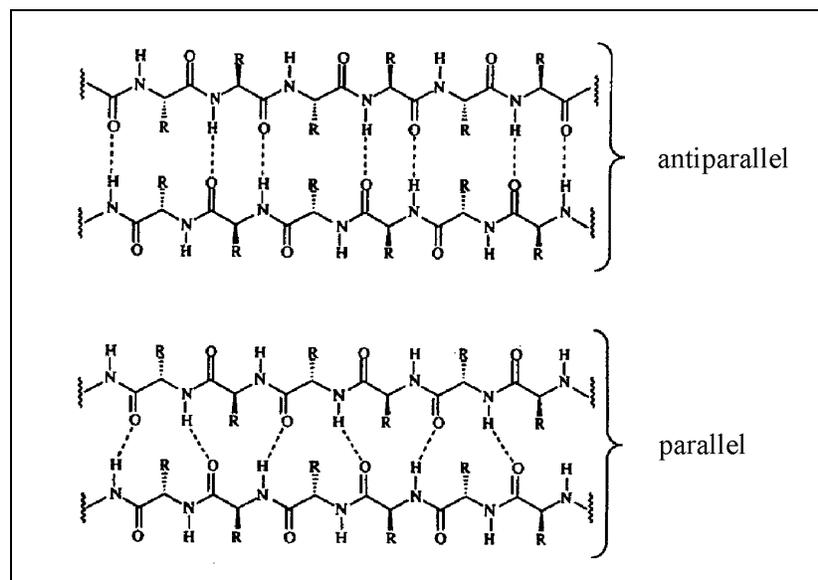
Historisch gesehen bezieht sich der Begriff Amyloid auf extrazelluläre Proteinablagerungen, die mit Krankheiten (Amyloidosen) assoziiert sind (Glennner, 1980). Vom biochemischen Standpunkt aus gesehen, gibt es jedoch eine Vielzahl weiterer Proteine und Peptide, die hochgeordnete, aggregierte Strukturen bilden, welche die Kriterien von Amyloiden hinsichtlich ihrer biophysikalischen Eigenschaften erfüllen, jedoch nicht extrazellulär abgelagert werden oder mit Krankheiten assoziiert sind. Die Ausweitung des Amyloid-Begriffes, um einen spezifischen fibrillären Zustand von Proteinen zu beschreiben, ist daher sinnvoll und auch zunehmend in der Literatur gebräuchlich. Zu den "nicht-klassischen" Amyloiden, die mit Krankheiten assoziiert sind, gehören z.B. intrazelluläre Ablagerungen von Tauprotein (Neurofibrillenbündel) bei Alzheimer (Kirschner *et al.*, 1986) oder Ablagerungen von Huntingtin, einem Protein, das durch eine unnormal hohe Anzahl von sich wiederholenden Glutaminresten (35 bis zu über 100) charakterisiert ist und bei Chorea Huntington eine Rolle spielt (Scherzinger *et al.*, 1997). Darüber hinaus konnte die Bildung amyloider Strukturen auch bei einer Vielzahl weiterer Proteine und Peptide nachgewiesen werden, die nicht in pathologische Prozesse involviert sind. Hierzu gehören natürlich vorkommende Proteine wie die SH3-Domäne der Phosphatidylinositol-3-Kinase (Guijarro *et al.*, 1998), die humane muskuläre Acylphosphatase (Chiti *et al.*, 1999), das Pflanzenprotein Monellin (Konno *et al.*, 1999) und die Phosphoglycerat-Kinase (Damaschun *et al.*, 1999), aber auch Peptide und Proteine, die sich von natürlichen Proteinsequenzen ableiten oder völlig neu entworfen wurden (Zhang *et al.*, 1993; Perutz *et al.*, 1994; Choo *et al.*, 1996; Weaver *et al.*, 1996; Aggelli *et al.*, 1997; Blondelle *et al.*, 1997; Lazo & Downing, 1997; Symmons *et al.*, 1997; Lim *et al.*, 1998; West, *et al.*, 1999). Diese Vielzahl von Amyloid-bildenden Proteinen und Peptiden und der Fakt, daß auch die Anzahl der entdeckten krankheitsassoziierten "klassischen Amyloide" steigt [1992: 15 Proteine (Sipe, 1992), 1999: 20 Proteine (Westermarck *et al.*, 1999)], wirft die Frage auf, ob die Amyloid-Bildung nicht eine allgemeine Eigenschaft von Polypeptidketten sein könnte, die unter bestimmten Bedingungen eintritt.

## 1.2. $\beta$ -Faltblattstrukturen

### 1.2.1. Aufbau und Bildung von $\beta$ -Faltblattstrukturen

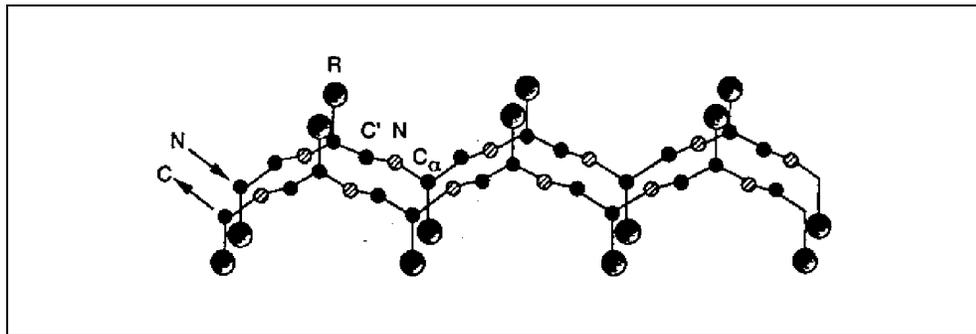
Neben ihrer Bedeutung für die Bildung krankheitsrelevanter amyloider Strukturen besitzen  $\beta$ -Faltblattstrukturen wichtige Funktionen für die Struktur und biologische Aktivität vieler Peptide und Proteine. Sie gehören wie  $\alpha$ -Helices zu den Hauptsekundärstrukturmotiven, die die räumliche Struktur von Proteinen organisieren (Creighton, 1993). Die Ausbildung dieser Sekundärstrukturen stellt einen zentralen Vorgang bei der Proteinfaltung dar (Streyer, 1996). Als dominierendes Strukturmotiv kommen  $\beta$ -Faltblattstrukturen z.B. bei Seide,  $\beta$ -Keratin (Fraser & Macae, 1973) oder Porinen vor (Voet *et al.*, 1999). Intramolekulare  $\beta$ -Faltblattstrukturen können Funktionen bei der Erkennung von DNA (Somers & Phillips, 1992), RNA (Puglisi *et al.*, 1995), oder Proteinen (Derrick & Wigley, 1992) übernehmen. Trotz ihrer strukturellen und funktionellen Bedeutung ist die  $\beta$ -Faltblattstruktur im Gegensatz zur  $\alpha$ -Helix immer noch das weitaus weniger untersuchte und damit auch weniger verstandene Strukturmotiv.

$\beta$ -Faltblattstrukturen unterscheiden sich von  $\alpha$ -Helices durch ein gestrecktes Peptidrückgrat. Die axiale Entfernung zwischen benachbarten Aminosäuren beträgt 0,35 nm gegenüber 0,15 nm bei  $\alpha$ -Helices (Streyer, 1996). Ein weiterer Unterschied besteht in der Form der



**Abb. 3.** Schematische Darstellung einer antiparallelen und parallelen  $\beta$ -Faltblattstruktur.

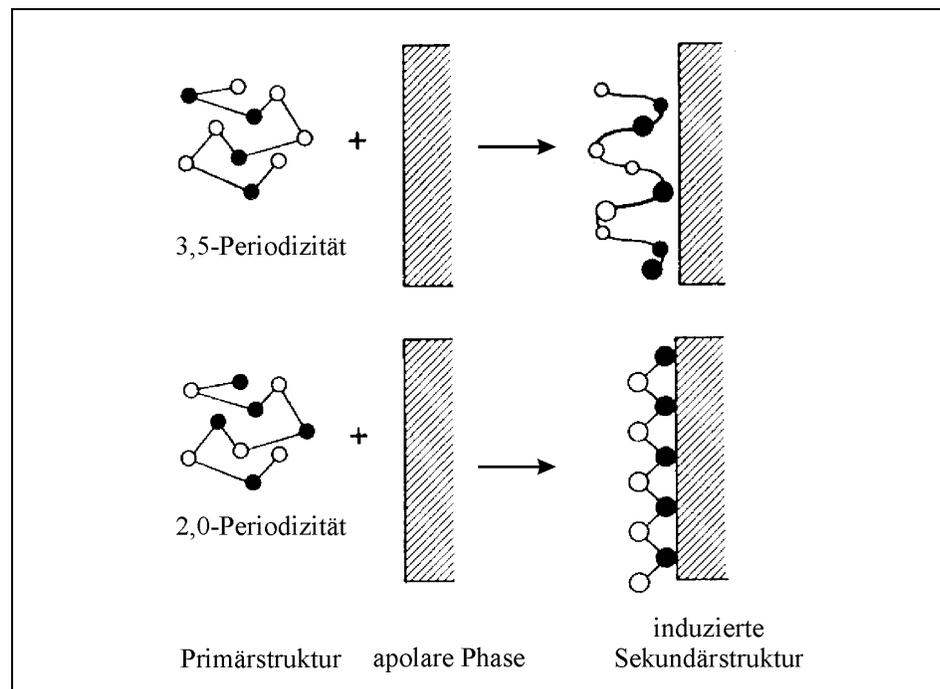
Strukturstabilisierung. Helikale Strukturen stabilisieren sich über Wasserstoffbrücken zwischen Carboxyl- und Amino-Gruppen innerhalb derselben Polypeptidkette. Eine einzelne  $\alpha$ -Helix kann somit isoliert vorliegen. Ein isolierter  $\beta$ -Strang hingegen ist nicht stabil. Hier wird die Stabilisierung über CO- und NH-Gruppen mit einem Nachbarstrang erreicht. Die Stränge können dabei die gleiche Richtung aufweisen (parallele  $\beta$ -Faltblattstruktur) oder entgegengesetzt (antiparallele  $\beta$ -Faltblattstruktur) verlaufen (Abb. 3) (Pauling und Corey, 1951). Antiparallele Faltblätter sind stabiler als parallele und daher auch wesentlich häufiger in Proteinen und Peptiden verbreitet (Richardson, 1977). Im Unterschied zu  $\alpha$ -Helices, bei denen die Seitenketten die äußere Hülle der Helix ausmachen, erstrecken sich bei  $\beta$ -Faltblattstrukturen die Aminosäurereste alternierend ober- und unterhalb der gestreckten Peptidkette (Abb. 4).



**Abb. 4.** Darstellung von antiparallelen  $\beta$ -Strängen. Die Seitenketten (R) erstrecken sich ober- und unterhalb der Peptidkette.

Wechselwirkungen zwischen den Seitenketten in einer Ebene tragen daher im entscheidenden Maße zur Stabilisierung der  $\beta$ -Faltblattstruktur bei (Smith & Regan, 1997). Die räumliche Trennung von polaren und unpolaren Seitenketten in amphipathischen Strukturen führt zu einer erhöhten Stabilität. Durch Wechselwirkung mit einem zweiten Faltblatt wird in wässriger Lösung die hydrophobe Fläche dem Einfluß des Wassers entzogen, während die hydrophilen Seiten der beiden Faltblätter dem Lösungsmittel zugewandt sind. Da  $\beta$ -Stränge in vier Richtungen stabilisierende Wechselwirkungen eingehen können (in der Ebene Wasserstoffbrückenbindungen, ober- und unterhalb Seitenkettenwechselwirkungen), besteht insbesondere bei kürzerkettigen Sequenzen (Peptiden) eine starke Aggregationsneigung (Ostermann & Kaiser, 1985; Hecht, 1994). Das ist auch der Grund, warum das Design von gut definierten  $\beta$ -Faltblattstrukturen mit erheblichen Schwierigkeiten verbunden ist und es weitaus weniger Modelle dieser Art im Vergleich zu  $\alpha$ -helikalen System gibt.

Die statistische Auswertung von Proteinen bekannter Struktur hat gezeigt, daß die einzelnen Aminosäuren eine intrinsische Neigung aufweisen, bevorzugt in  $\alpha$ -Helices,  $\beta$ -Faltblattstrukturen oder  $\beta$ -Turns vorzukommen (Chou & Fasman, 1974, 1978). Neben der Strukturvorhersage nach Chou und Fasman wurden *host guest* Untersuchungen an Proteinen und Peptiden genutzt, um den Einfluß jeder der natürlich vorkommenden L-Aminosäuren auf die Stabilität von  $\alpha$ -Helices (Serrano *et al.*, 1992; Blaber *et al.*, 1994; Chakrabarty *et al.*, 1994; Rohl, *et al.*, 1996; O'Neil & DeGrado, 1990) und  $\beta$ -Faltblattstrukturen (Kim & Berg, 1993; Smith *et al.*, 1994; Minor & Kimm, 1994) zu quantifizieren. Sowohl die statistischen als auch die experimentellen Studien zeigen, daß insbesondere  $\beta$ -verzweigte (Isoleucin, Valin, Threonin) und aromatische Aminosäuren (Tyrosin, Phenylalanin) die besten  $\beta$ -Faltblattstruktur-Bildner sind, während Glycin und Prolin die geringste Neigung dazu aufweisen. Allein aus der Primärstruktur gelingt es jedoch selten, auf die Sekundärstruktur von Proteinen und Peptiden zu schließen. Gerade bei  $\beta$ -Faltblattstrukturen ist die Vorhersagequote im Vergleich zu  $\alpha$ -helikalen Strukturen gering. Eine mögliche Erklärung könnte darin liegen, daß  $\alpha$ -Helices im wesentlichen über lokale Wechselwirkungen stabilisiert werden, während bei  $\beta$ -Faltblattstrukturen nicht-lokale, d.h. weiterreichende Interaktionen zur Stabilisierung führen (Wouter & Curmi, 1995). Bei Peptiden, die sich von Proteinen neben ihrer Größe insbesondere in ihren konformationellen Eigenschaften unterscheiden, ist die Ausbildung der Sekundärstruktur stark von den Umgebungsbedingungen abhängig. Lineare, biologisch aktive Peptide besitzen in wäßriger Lösung häufig keine stabile Konformation und liegen daher vorrangig als ungeordnete, flexible Knäuelstrukturen vor. Erst durch Wechselwirkung mit einem anisotropen Target (Zellmembran, Rezeptorprotein) kommt es zur Strukturinduktion (Kaiser & Kezdy, 1984). Bei Konformationsanalysen ist daher auch der Einfluß des umgebenden Lösungsmittels auf die Strukturierung von Peptiden zu berücksichtigen. Lösungsmittel wie z.B. Trifluorethanol (TFE) oder wäßriges Natriumdodecylsulfat (SDS) sind dafür bekannt, Sekundärstrukturen in Peptiden zu induzieren. Dabei kann sich die Art der Strukturausbildung unabhängig von der intrinsischen Neigung der Aminosäuresequenz vollziehen, wobei sich vorzugsweise  $\alpha$ -helikale Strukturen ausbilden (Zhong & Johnson, 1992; Waterhous & Johnson, 1994). Ob ein Peptid eine  $\alpha$ -helikale oder  $\beta$ -faltblattstrukturierte Konformation einnimmt, hängt bei amphipathischen Sequenzen im wesentlichen von der hydrophoben Periodizität der Aminosäurereste ab



**Abb. 5.** Einfluß der hydrophoben Periodizität auf die Sekundärstruktur-Induktion bei Peptiden (DeGrado & Lear, 1985). Hydrophobe Aminosäurereste sind gefüllt und hydrophile ungefüllt dargestellt. In isotroper Umgebung sind die Peptidketten unstrukturiert (links). Die Gegenwart einer apolaren/polaren Grenzfläche (anisotropes System) maximiert die Wechselwirkungen der hydrophoben Gruppen mit der apolaren Phase und der hydrophilen mit der polaren (wäßrigen) Umgebung, wobei es zur Ausbildung von  $\alpha$ -helikalen (3,5-Periodizität) oder  $\beta$ -Faltblattstrukturen (2,0-Periodizität) kommt.

(DeGrado & Lear, 1985). Sie kann bei Peptiden an apolaren Phasen (z.B. Phospholipidmembran, Luft, hydrophobe Bindungsseiten von Proteinen) induziert werden (Kaiser & Kezdy, 1983) (Abb. 5). Dabei bestimmt die Periodizität über die intrinsische Neigung der Aminosäuren hinweg die Art der Sekundärstruktur (Xiong *et al.*, 1995).

Während  $\alpha$ -helikale Strukturen bei niedrigen Konzentrationen stabil sind, begünstigt eine Erhöhung der Peptidkonzentration Aggregationsprozesse, die mit der Bildung stabiler  $\beta$ -Faltblattstrukturen verbunden sein können (Cerpa *et al.* 1996). Auch bei einer durch Temperaturerhöhung induzierten Aggregation von Proteinen ist die  $\beta$ -Faltblattstruktur das dominierende Strukturmotiv, wobei sich der strukturelle Übergang in eine  $\beta$ -faltblattstrukturreiche Konformation unabhängig von der initialen Sekundärstruktur des nativen Proteins vollzieht (Dong *et al.*, 1995). Das gilt sowohl für die Bildung amorpher als auch fibrillärer Proteinaggregate (Fink, 1998).

### 1.2.2. Konformationelle $\alpha \rightarrow \beta$ Übergänge

Konformationelle  $\alpha \rightarrow \beta$  Übergänge werden als ein möglicher Mechanismus für Fehlfaltungsprozesse, die zur Amyloid-Bildung (Kap. 1.1.2.) führen, beschrieben. Sie werden aber auch beim korrekten Faltungsgeschehen beobachtet. Bei  $\beta$ -Lactoglobulin, einem von  $\beta$ -Strängen dominierten Protein, wird die native Struktur aus  $\alpha$ -helikalen Faltungsintermediaten gebildet (Kuwajima *et al.*, 1996). Strukturell ist die Transformation von  $\alpha$ -Helices in  $\beta$ -Faltblattstrukturen durch den Übergang von lokalen in globale, d.h. weiter auseinanderreichende Wechselwirkungen charakterisiert (Kuwajima *et al.*, 1996; Hamada *et al.*, 1996). Der direkte Nachweis, daß die Sekundärstruktur einer Aminosäurekette hauptsächlich durch die 3-D Struktur und nicht durch lokale Effekte bestimmt wird, konnte von Minor und Kim (1996) erbracht werden. Eine aus 11 Aminosäuren bestehende *de novo* Chamäleon-Sequenz, die bezüglich der Sequenz weder die Bedingungen einer idealen amphipathischen  $\alpha$ -Helix noch die eines  $\beta$ -Stranges erfüllt, faltet sowohl in eine  $\alpha$ -helikale Konformation als auch in eine  $\beta$ -Faltblattstruktur, wenn sie in unterschiedliche Positionen innerhalb der Sequenz eines Proteins (Protein G) eingebaut wird. Nachfolgende Arbeiten konnten bestätigen, daß eine Aminosäuresequenz mit einer innerhalb eines Proteins definierten Sekundärstruktur ihre Konformation in einer anderen Proteinumgebung ändert (Dalal *et al.*, 1997; Yuan & Clarke, 1998; Kwoket *et al.*, 1998). Veränderungen in der Tertiärstruktur des nativen Proteins (z.B. partielle Entfaltung) können somit konformationelle Veränderungen innerhalb einzelner Sequenzabschnitte auslösen. Helikale Bereiche in den Amyloid-bildenden Proteinen Lysozym und dem Prion-Protein zeigen ebenfalls weder den idealen amphipathischen Charakter einer  $\alpha$ -Helix noch den eines  $\beta$ -Stranges. Diese Helices könnten somit auch Chamäleon-Eigenschaften besitzen, mit einem nur sehr geringfügigen Unterschied an freier Energie der beiden konformationellen Zustände (Perutz, 1997).

### 1.2.3. $\beta$ -Faltblattstrukturierte Modellpeptide

Ziel des *de novo* Designs von Peptiden und Proteinen ist es, die Prinzipien und Mechanismen der Proteinfaltung besser zu verstehen. Dabei steht einer Vielzahl erfolgreich entworfener  $\alpha$ -helikaler Modelle nur eine geringe Anzahl von gut definierten, wasserlöslichen  $\beta$ -Faltblattstrukturmodellen gegenüber. Während das Design kurzer, monomerer  $\beta$ -Hairpin-Strukturen erfolgreich durchgeführt werden konnte (Blanco *et al.*, 1994; Kortemme *et al.*, 1998;

De Alba *et al.*, 1999), ist der Übergang zu kompakteren intramolekularen  $\beta$ -Faltblattstrukturen wie in den  $\beta$ -Sandwich-Peptiden Betabellin und Betadoublet mit einer limitierten Wasserlöslichkeit verbunden (Yan & Erickson, 1994; Quinn *et al.*, 1994).

Die Schwierigkeit im Design von  $\beta$ -faltblattstrukturierten Peptiden besteht darin, die Balance zwischen der Stabilisierung von  $\beta$ -Faltblattstrukturen, deren Selbstassoziationsneigung und ihrer Wasserlöslichkeit zu finden. Es ist wichtig, unkontrollierte Aggregationsprozesse, die zur Präzipitation der Peptide führen, zu verhindern. Dies gilt insbesondere für Peptide, bei denen intermolekulare Wechselwirkungen zwischen den  $\beta$ -Strängen die Voraussetzung für die Stabilisierung der  $\beta$ -Faltblattstruktur darstellen (Tabelle 2). Als Rezept für die Konstruktion wasserlöslicher  $\beta$ -Faltblattstruktur-bildender Peptide wurde vorgeschlagen, neben 40-50% hydrophoben Aminosäureresten, positiv und negativ geladene Aminosäurereste im Verhältnis zwischen 4/2 und 6/2 einzusetzen und nicht mehr als 20% ungeladene, polare Reste zu verwenden (Mayo *et al.* 1996). Das repetitive Sequenzmuster einer amphipathischen  $\beta$ -Faltblattstruktur begünstigt ihre Strukturstabilität, aber auch gleichzeitig die Tendenz zur Bildung hydrophober Cluster (Mutter, 1985), die zur Peptidaggregation führt (Brack & Orgel, 1975; Zhang *et al.*, 1993). In den letzten Jahren hat

**Tabelle 2.** *De novo* Design intermolekularer  $\beta$ -Faltblattstrukturen

Sequenz	Nachweis amyloider Strukturen	Literatur
Poly-(VK)	-	Brack & Orgel, 1975
(VEV-Orn) <sub>1-3</sub>	-	Ostermann <i>et al.</i> , 1985
(TV) <sub>n=1-4</sub>	-	Altmann <i>et al.</i> , 1986
Ac-(AEAEAKAK) <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>	x	Zhang <i>et al.</i> , 1993
Ac-D <sub>2</sub> -Q <sub>15</sub> -K <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>	x	Perutz <i>et al.</i> , 1994
Ac-ETATKAELLAKYEATHK-NH <sub>2</sub>	x	Cerpa <i>et al.</i> , 1996
(KV) <sub>3</sub> -1-(KV) <sub>3</sub> -NH <sub>2</sub> , 1: 4-(2-Aminoethyl)-6-dibenzofuranpropansäure	x	Choo <i>et al.</i> , 1996
Ac-(KL) <sub>3</sub> -(EL) <sub>3</sub> -G-NH <sub>2</sub>	x	Lazo & Downing, 1997
Ac-K-A <sub>14</sub> -K-NH <sub>2</sub>	x	Blondelle <i>et al.</i> , 1997
(KL) <sub>n=4-7</sub> -K	-	Castano <i>et al.</i> , 2000

Orn: Ornithin

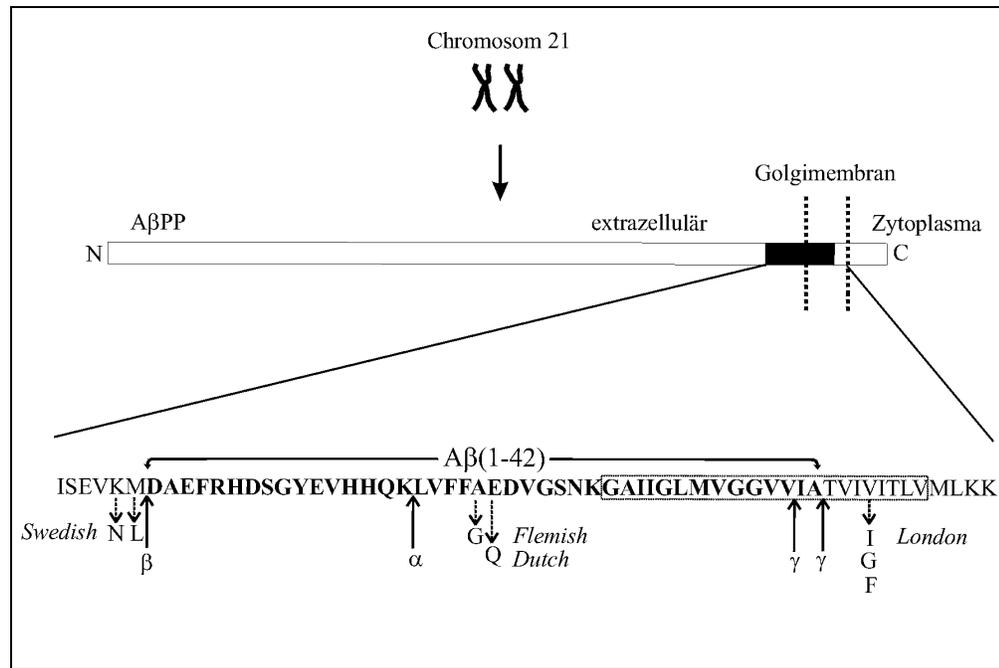
allerdings im Zusammenhang mit der Amyloid-Problematik gerade das Interesse an assoziierenden  $\beta$ -Faltblattstrukturen stark zugenommen. Für eine Reihe von  $\beta$ -faltblatt-strukturierten Peptiden konnte die Bildung amyloider Strukturen nachgewiesen werden (Tabelle 2). Eine gute Wasserlöslichkeit wurde allerdings nur im Falle des Poly-Ala-Modells berichtet (Blondelle *et al.*, 1997). Hier wurden Lysinreste an beiden Termini zu Erhöhung der Löslichkeit eingebaut.

### 1.3. Alzheimer-Krankheit

#### 1.3.1. Molekulare Grundlagen

Alzheimer ist heute unter den neurodegenerativen Erkrankungen die häufigste Todesursache in den industrialisierten Ländern (Baumeister & Eimer, 1998). Die Pathogenese dieser Erkrankung ist durch einen zunehmenden Verlust an synaptischen Verschaltungen und dem Absterben von Neuronen im Cortex und Hippokampus charakterisiert, also jenen Gehirnregionen, die für Gedächtnis und Lernfähigkeit verantwortlich sind. Intraneuronale Neurofibrillenbündel und massive extrazelluläre Amyloid-Ablagerungen in Form von senilen Plaques bestimmen dabei das neuropathologische Erscheinungsbild (Selkoe, 1998). Hauptbestandteile der Neurofibrillenbündel sind Tau-Proteine, die durch Phosphorylierung und paarweise Aneinanderlagerung ihre Eigenschaft verloren haben, die für den Stofftransport in der Zelle verantwortlichen Mikrotubuli zu stabilisieren (Wilson & Binder, 1995). Die Hauptkomponente der Amyloid-Plaques ist das aus 40-42 Aminosäuren bestehende Peptid A $\beta$  (Glenner & Wong, 1984). Es entsteht durch proteolytische Spaltung aus einem wesentlich größeren Vorläuferprotein, das als Amyloid- $\beta$  Precursor Protein (A $\beta$ PP) bezeichnet wird (Kang *et al.*, 1987) (Abb. 6). A $\beta$ PP kommt sowohl in Neuronen als auch in einer Reihe weiterer Zelltypen vor (Selkoe, 1994). Seine Funktion ist immer noch unklar.

Die am A $\beta$ PP-Abbau beteiligten Enzyme werden als  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase bezeichnet. Die beiden Metalloproteasen, TACE und ADAM 10, sind in die Spaltung durch die  $\alpha$ -Sekretase involviert (Buxbaum *et al.*, 1998; Lammich *et al.*, 1999). Die Aktivität der  $\gamma$ -Sekretase steht im Zusammenhang mit den Presenilinen (PS 1 und PS 2). Hierbei handelt es sich um homologe Membranproteine, die im Endoplasmatischen Retikulum (ER) und im Golgi-Apparat lokalisiert sind. Neben der Vorstellung, daß sie den Transport der  $\gamma$ -Sekretase und



**Abb. 6.** Das membranständige, aus 695-770 Aminosäuren aufgebaute Glycoprotein AβPP ist auf dem Chromosom 21 codiert. Aβ ist mit seinem C-Terminus in der Zellmembran lokalisiert. Der N-Terminus ragt in den extrazellulären Raum. Drei verschiedene Enzymaktivitäten (α-, β-, und γ-Sekretase) bestimmen den AβPP-Stoffwechsel. Im Normalfall läuft der sekretorische Weg ab: Die α-Sekretase spaltet innerhalb der amyloiden Sequenz und verhindert damit die Bildung des Aβ. Der amyloidogene Weg hingegen wird in Gang gesetzt, wenn die β-Sekretase am N-Terminus der Aβ-Sequenz spaltet. In Kombination mit der γ-Sekretase-Aktivität führt sie spezifisch zur Produktion von Aβ. Aminosäuremutationen (unterhalb der Aβ-Sequenz dargestellt) sind mit genetisch bedingten Alzheimer-Fällen verbunden. Sie führen zu einer verstärkten Bildung des amyloiden Peptides.

des AβPP zueinander regulieren, wird vermutet, daß es sich bei den Presenilinen selbst um die γ-Sekretase handelt (De Strooper *et al.*, 1999; Wolfe *et al.*, 1999). Es gibt jedoch keinen endgültigen Nachweis dafür. Ein Durchbruch ist kürzlich bei der Identifizierung der β-Sekretase gelungen. Das Enzym BACE (*beta-side AβPP-cleaving enzyme*) zeigt alle charakteristischen Eigenschaften für die β-Sekretase (Vassar *et al.*, 1999). Es handelt sich um eine im ER und Golgi-Apparat lokalisierte transmembranäre Aspartatprotease, die unabhängig von dieser Studie von drei weiteren Gruppen entdeckt wurde (Yan *et al.*, 1999; Sihna *et al.*, 1999; Hussain *et al.*, 1999). Mutationen im AβPP (Chromosom 21) und in den Presenilinen (Chromosomen 1 und 14) führen zu erblichen Formen von Alzheimer, die im Vergleich zu den sporadischen Fällen im höheren Alter mit einem früheren Ausbruch und

schnellerem Fortschreiten der Krankheit verbunden sind. Mutationen im Apolipoprotein E/ $\epsilon$ 4-Isoform (ApoE) (Chromosom 19) stellen ein größeres Risiko dar, um im Alter an Alzheimer zu erkranken. Alle Mutationen sind mit einer verstärkten A $\beta$ (1-42)-Produktion bzw. Plaque-Ablagerung verbunden (Selkoe, 1999). Insgesamt stellen jedoch die genetisch bedingten Alzheimer-Fälle im Vergleich zur sporadischen Form im Alter nur einen sehr geringen Prozentsatz dar (<5%).

Neben den 40 und 42 Aminosäuren langen Varianten des A $\beta$  kommen auch verkürzte Fragmente des Peptides (3-42, 11-42 und 17-42) in den Amyloid-Plaques vor (Teplow, 1998). Jedoch wird der 42 Aminosäuren langen Sequenz eine besondere Funktion bei der Amyloid-Bildung zugeschrieben. A $\beta$ (1-42) zeigt eine bedeutend größere Neigung zur Fibrillenbildung als die C-terminal um Isoleucin und Alanin verkürzte Sequenz 1-40 (Lansbury, 1996). Sie fungiert offensichtlich aufgrund ihrer erhöhten Hydrophobie als Promotor für die Keimbildung, infolgedessen auch die verkürzten und besser löslichen Sequenzen in amyloide Strukturen übergehen (Jarrett *et al.*, 1993).

Ob die Bildung und fibrilläre Ablagerung von A $\beta$  tatsächlich direkt mit der Pathogenese von Alzheimer verbunden ist (Amyloid-Hypothese), oder ob es sich hierbei nur um einen peripheren Prozeß handelt, ist derzeit noch unbeantwortet (St George-Hyslop & Westaway, 1999). Von vielen Gruppen wird jedoch die Amyloid-Hypothese unterstützt. Hierfür sprechen z.B., daß die genetisch bedingte Überproduktion von A $\beta$ (1-42) (A $\beta$ PP/PS-Mutationen) zu einer verstärkten Pathogenese führt, sowie, daß A $\beta$ -Fibrillen neurotoxisch sind (Yankner, 1996; Geula *et al.*, 1998). Ein beschriebener Mechanismus der A $\beta$ -induzierten Neuronenzerstörung, besteht in der Aktivierung von Mikroglia, welche neurotoxische Faktoren, wie TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ ), Zytokine und freie Radikale sekretieren. (Yankner, 1996, Giulian *et al.*, 1998).

### **1.3.2. Konformationelles Verhalten des Alzheimer-Peptides A $\beta$**

Lösliches A $\beta$  ist ein normaler Bestandteil menschlicher Körperflüssigkeiten, wie z.B. Cerebrospinalflüssigkeit, Plasma und Urin (Seubert *et al.*, 1992; Shoji *et al.*, 1992; Ghiso *et al.*, 1997). Unter pathogenen Bedingungen aggregiert es in unlösliche Amyloid-Fibrillen, die durch einen hohen Gehalt an  $\beta$ -Faltblattstrukturen charakterisiert sind. Eine Vielzahl von Faktoren kann das konformationelle Verhalten von A $\beta$  sowie seine Fibrillognese beeinflussen: Länge des C-Terminus, Peptidkonzentration, chemische Modifikationen,

Ionenstärke, pH, Lösungsmittel, Metallionen, Gegenwart von Aggregationskeimen, Wechselwirkungen mit anderen Proteinen, etc. (Übersichtsartikel: Teplow, 1998). Die strukturellen Eigenschaften von löslichem A $\beta$  unter physiologischen Bedingungen (subnanomolare Konzentration) sind unbekannt. Untersuchungen zur Aufklärung der A $\beta$ -Konformation sind durch die hohe Neigung des Peptides, im mikro- bis millimolaren Konzentrationsbereich  $\beta$ -Faltblattstrukturen zu bilden, erschwert (Barrow *et al.*, 1992). In Abhängigkeit von den gewählten experimentellen Bedingungen werden daher unterschiedliche Anteile an  $\beta$ -Faltblatt-, ungeordneter oder  $\alpha$ -helikaler Struktur gefunden. Unter Bedingungen bei denen ein monomeres Zustand von A $\beta$ (1-40) und A $\beta$ (1-42) stabilisiert wird (in TFE oder SDS), konnte mittels CD- und NMR-Untersuchungen ein hoher  $\alpha$ -helikaler Strukturanteil nachgewiesen werden (Barrow *et al.*, 1992; Sticht *et al.*, 1995; Coles *et al.*, 1998; Shao *et al.*, 1999). Strukturvorhersagen nach Chou-Fasman bestätigen das Potential des Peptides, eine  $\alpha$ -helikale Konformation einzunehmen (Mihara *et al.*, 1998). In Abwesenheit organischer Lösungsmittel wurde hingegen eine ungeordnete Struktur von verkürzten A $\beta$ -Sequenzen beobachtet (Terzi *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1995). Ein konformationeller Übergang vom  $\alpha$ -helikalen oder ungeordneten Zustand des A $\beta$  in die  $\beta$ -Faltblattstruktur wird als initialer Schritt für die Auslösung der Peptidaggregation in Amyloid-Fibrillen angenommen (Soto *et al.*, 1995; Mihara *et al.*, 1998; Teplow, 1998). Bisherige Studien zur Amyloid-Bildung des Alzheimer-Peptides haben sich auf sein Assoziationsverhalten konzentriert. So zeigen Aminosäure-Substitutionen, die allerdings aufgrund einer im Vergleich zum Gesamtmolekül verbesserten Löslichkeit in verkürzten A $\beta$ -Sequenzen durchgeführt wurden, daß durch Substitutionen im zentralen Bereich <sup>17</sup>LVFFAE<sup>23</sup>D des Peptides die Fibrillenbildungstendenz beeinflusst werden kann (Hilbich *et al.*, 1992; Fraser, *et al.*, 1994, Wood *et al.*, 1995; Esler *et al.* 1996). Die Aminosäurereste <sup>16</sup>KLVF<sup>20</sup>F wurden als Bindungsdomäne während der A $\beta$ -Assoziation beschrieben (Tjernberg *et al.*, 1996) und stellen damit ein Target für die Inhibierung des Assoziationsprozesses dar (Soto *et al.*, 1998). Die Anhäufung hydrophober Aminosäuren in diesem Molekülbereich unterstreicht, daß hydrophobe Wechselwirkungen eine entscheidende Rolle bei der Assoziation des Alzheimer-Peptides spielen. Jedoch wird insbesondere durch die beiden innerhalb der A $\beta$ -Sequenz lokalisierten Punktmutationen Ala21→Gly (*Flemish type*) (Hendriks *et al.*, 1992) und Glu22→Gln (*Dutch type*) (Levy *et al.*, 1990) (vgl. Abb. 6) hervorgehoben, daß nicht nur hydrophobe Interaktionen den Prozeß der Amyloid-Bildung

---

bestimmen können. Bei diesen A $\beta$ -Varianten treten die Symptome von Alzheimer in einem bedeutend früheren Alter auf, obwohl die Hydrophobie der zentralen Domäne nicht erhöht wird. Es besteht die Vermutung, daß die zentrale Domäne neben dem Assoziations- auch das konformationelle Verhalten von A $\beta$  bestimmt (Soto *et al.*, 1995; Mihara *et al.*, 1998).

#### **1.4. Zielstellung**

Ausgehend von der Bedeutung des Assoziationsprozesses von  $\beta$ -Faltblattstrukturen für die Ausbildung von krankheitsrelevanten amyloiden Strukturen werden in der vorliegenden Arbeit zwei Zielstellungen verfolgt.

Der erste Schwerpunkt liegt in der Darstellung des Zusammenhanges zwischen der Stabilität von  $\beta$ -Faltblattstrukturen, deren Assoziationsverhalten und der Bildung fibrillärer Strukturen. Dazu werden Konformations- und Assoziationsstudien an Modellpeptiden mit einer differenzierten Fähigkeit zur Ausbildung intermolekularer  $\beta$ -Faltblattstrukturen beschrieben. Hierbei werden Variationen in der Sequenzlänge sowie D-Aminosäure-Analoga einbezogen.

Im zweiten Teil der Arbeit sollen, auf der Basis der Erkenntnisse an den Modellpeptiden, experimentelle Beweise für die Hypothese gefunden werden, daß konformationelle Veränderungen in der löslichen, monomeren Form des Alzheimer-Peptides A $\beta$ (1-42) die Bildung unlöslicher,  $\beta$ -faltblattstrukturierter Amyloid-Fibrillen initial verursachen. Ausgehend von einem monomeren, löslichen Zustand des Peptides soll über Untersuchungen an einem kompletten D-Aminosäure-Substitutionsset ermittelt werden, welche Bereiche von A $\beta$ (1-42) sensitiv auf Sekundärstruktur-destabilisierende Effekte reagieren und dadurch den Übergang in eine Amyloid-bildende  $\beta$ -Faltblattstruktur auslösen.