



Multi-Targeting Makrozyklische Peptide als Nanomolare Inhibitoren der Selbst- und Kreuznukleation der Amyloiden Selbstassemblierung von α -Synuclein

Simon Hornung, Dominik P. Vogl, Denise Naltsas, Beatrice Dalla Volta, Markus Ballmann, Beatrice Marcon, Muhammed Muazzam Kamil Syed, Yiyang Wu, Anna Spanopoulou, Regina Feederle, Luzia Heidrich, Jürgen Bernhagen, Thomas Koeglsperger, Günter U. Höglinger, Gerhard Rammes, Hilal A. Lashuel, und Aphrodite Kapurniotu*

Abstract: Die amyloide Selbstassemblierung von α -Synuclein (α Syn) wird mit der Pathogenese der Parkinson-Krankheit (PD) in Verbindung gebracht. Typ 2 Diabetes (T2D) hat sich kürzlich als Risikofaktor für PD herausgestellt. Kreuzinteraktionen zwischen den amyloidogenen Proteinen der beiden Erkrankungen könnten eine molekulare Verbindung darstellen. Tatsächlich können Fibrillen des Inselamyloid-Polypeptids (IAPP) bei T2D als Nukleus für die Amyloidbildung von α Syn fungieren. Auch wurde berichtet, dass α Syn und IAPP in Gehirnen von PD-Patienten co-lokalisieren. Daher könnte die Hemmung sowohl der selbst- als auch der IAPP-vermittelten Kreuznukleation der α Syn-Amyloidbildung möglicherweise mit der PD-Pathogenese interferieren. In dieser Studie zeigen wir, dass makrozyklische Peptide, die IAPP-Selbst- und Kreuzinteraktionsstellen nachahmen und sich zuvor als Inhibitoren der Amyloidogenese des IAPP und/oder des Amyloid- β -Peptids A β 40(42) der Alzheimer-Krankheit (AD) erwiesen haben, auch nanomolare Inhibitoren der selbst- bzw. der IAPP-nukleierten Amyloidogenese von α Syn sind. Ihre Anti-Amyloid-Wirkung wird durch ihre Bindung mit nanomolarer Affinität an drei α Syn-Regionen vermittelt. Letztere werden als Schlüsselregionen sowohl für die α Syn-Selbstassemblierung als auch für seine Kreuzwechselwirkungen mit IAPP identifiziert. Darüber hinaus zeigen wir, dass diese Peptide auch die A β 42-vermittelte Kreuznukleation der α Syn-Amyloidogenese hemmen können. Auf der Basis ihres breiten Anti-Amyloid-Wirksamkeitsspektrums und zusätzlicher wirkstoffähnlicher Eigenschaften, stellen diese Peptide Leitstrukturen für multifunktionale Anti-Amyloid-Wirkstoffe bei PD, T2D, AD

[*] Dr. S. Hornung, Dr. D. P. Vogl, M. Sc. D. Naltsas, Dr. B. D. Volta, M. Sc. B. Marcon, Dr. A. Spanopoulou, M. Sc. L. Heidrich, Prof. Dr. A. Kapurniotu
Division of Peptide Biochemistry, TUM School of Life Sciences, Technische Universität München (TUM), Emil-Erlenmeyer-Forum 5, D-85354 Freising, Germany
E-mail: akapurniotu@tum.de
M. Sc. M. Ballmann, Prof. Dr. G. Rammes
Department of Anesthesiology and Intensive Care, Technische Universität München (TUM)/Klinikum Rechts der Isar Ismaningerstr. 22, D-81675 Munich, Germany
M. Sc. M. M. K. Syed, Prof. H. A. Lashuel
Laboratory of Molecular and Chemical Biology of Neurodegeneration, École Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL) CH 1015 Lausanne, Switzerland
M. Sc. Y. Wu, PD. Dr. T. Koeglsperger, Prof. Dr. G. U. Höglinger
Department of Neurology, LMU University Hospital, Ludwig-Maximilian-University (LMU), Marchioninistr. 15, D-81377 Munich, Germany
und
German Center for Neurodegenerative Diseases (DZNE) Feodor-Lynen-Straße 17, D-81377 Munich, Germany
und
Munich Cluster for Systems Neurology (SyNergy) Feodor-Lynen-Straße 17, D-81377 Munich, Germany
Dr. R. Feederle
Core Facility Monoclonal Antibodies, Helmholtz Center Munich German Research Center for Environmental Health Ingolstädter Landstr. 1, D-85764 Neuherberg, Germany

und
Munich Cluster for Systems Neurology (SyNergy) Feodor-Lynen-Straße 17, D-81377 Munich, Germany
und
German Center for Neurodegenerative Diseases (DZNE) Feodor-Lynen-Straße 17, D-81377 Munich, Germany
Prof. Dr. J. Bernhagen
Division of Vascular Biology, Institute for Stroke and Dementia Research (ISD), LMU University Hospital, Ludwig-Maximilian-University (LMU) Feodor-Lynen-Straße 17, D-81377 Munich, Germany
und
Munich Cluster for Systems Neurology (SyNergy) Feodor-Lynen-Straße 17, D-81377 Munich, Germany
Dr. D. P. Vogl
Aktuelle Adresse: Boehringer Ingelheim, Vienna, Austria
Dr. A. Spanopoulou
Aktuelle Adresse: ITM Isotope Technologies Munich SE Garching/Munich, Germany
M. Sc. L. Heidrich
Aktuelle Adresse: Life & Brain GmbH, Bonn, Germany

© 2025 Die Autoren. Angewandte Chemie veröffentlicht von Wiley-VCH GmbH. Dieser Open Access Beitrag steht unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution License, die jede Nutzung des Beitrages in allen Medien gestattet, sofern der ursprüngliche Beitrag ordnungsgemäß zitiert wird.

und deren Komorbiditäten dar. Darüber hinaus sind die identifizierten α Syn-Schlüsselsegmente wertvolle Ziele für neuartige, an mehreren α Syn-Stellen angreifende Amyloidinhibitoren bei PD und verwandten Synucleinopathien.

Einleitung

Die Amyloidbildung wird mit der Pathogenese von mehr als 50 verheerenden Krankheiten in Verbindung gebracht.^[1] Dazu gehören die Parkinson-Krankheit (PD), die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung nach der Alzheimer-Krankheit (AD), und der Typ 2 Diabetes (T2D), welche weltweit mehr als 10 beziehungsweise 450 Millionen Menschen betreffen.

Das Schlüsselprotein der Amyloidbildung bei PD ist das 140-Aminosäuren-lange präsynaptische Protein α -Synuclein (α Syn) während das wichtigste Amyloid-Polypeptid bei T2D das aus 37 Aminosäuren bestehende Inselamyloid-Polypeptid (IAPP) ist (Schema 1).^[1b] In den Gehirnen von PD-Patienten befinden sich sowohl in intraneuronalen Einschlüssen als auch extrazellulär große Mengen neurotoxischer α Syn-Oligomere und -Amyloidfibrillen, welche Entzündungen, Neurodegeneration und eine sogenannte „Transmission der Pathologie“ (Auftreten von α Syn-Aggregaten) vermitteln können.^[2] Im Falle von T2D bildet IAPP zelltoxische Oligomere und Amyloidfibrillen in der Bauchspeicheldrüse; diese Aggregate

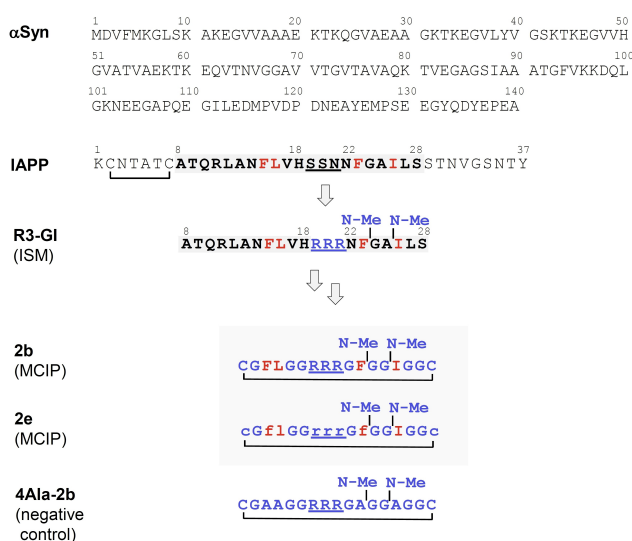
liegen Entzündungsprozessen, β -Zelldegeneration, und T2D-Pathogenese zugrunde.^[3] Unter physiologischen Bedingungen fungiert demgegenüber IAPP, das von pankreatischen β -Zellen sezerniert wird und sowohl im Blut als auch im Gehirn vorhanden ist, als neuroendokriner Regulator der Glukosehomöostase.^[3]

Immer mehr Hinweise deuten darauf hin, dass T2D ein Risikofaktor für PD ist.^[4] Dabei wird angenommen, dass Kreuzwechselwirkungen zwischen α Syn und IAPP eine molekulare Verbindung der beiden Erkrankungen darstellen könnten.^[5] Tatsächlich haben in vitro-Untersuchungen gezeigt, dass IAPP-Fibrillen (fIAPP) in der Lage sind, als Kreuznukleationskeime zu fungieren, was zu einer beträchtlichen Beschleunigung der α Syn-Amyloidogenese führt; diese Befunde wurden vor Kurzem von in vivo-Untersuchungen in PD-Mausmodellen bestätigt.^[5a,c] Weiterhin werden die Hinweise auf eine pathogene Rolle von α Syn/IAPP-Kreuzwechselwirkungen auch unterstützt durch Befunde zu α Syn/IAPP-Co-Aggregaten im Gehirn von PD Patienten bzw. α Syn-Ablagerungen im Pankreas von PD- und T2D-Patienten sowie Befunde zur Rolle von α Syn-Kreuznukleationsereignissen bei der Verbreitung der α Syn-Pathologie in PD und verwandten Synucleinopathien.^[5c,d,6]

Basierend hierauf könnte die Entwicklung von Inhibitoren von sowohl der selbst- als auch der IAPP-nukleierten Amyloidbildung von α Syn ein sinnvoller Ansatz zur Unterdrückung der PD-Pathogenese sein, insbesondere auch bei PD/T2D-Komorbiditäten. Allerdings sind sowohl α Syn als auch IAPP intrinsisch ungeordnete Proteine (IDP) und Kreuzinteraktionsstellen und Strukturen ihrer Hetero-Komplexe sind noch unbekannt. Dadurch wird das Design von Amyloidinhibitoren erschwert.^[7] Tatsächlich hat es bislang noch keiner der berichteten α Syn-Amyloid-Inhibitoren oder der *pipeline*-PD-Therapeutika einschließlich Antikörper, Peptide und niedermolekulare Wirkstoffe in die klinische Anwendung geschafft; auch gibt es keine Hinweise darauf, dass sie die Kreuznukleation der α Syn-Amyloidogenese hemmen können. Die PD ist nach wie vor eine unheilbare Krankheit.^[8]

Makrozyklische Peptide sind äußerst attraktive Kandidaten für Medikamente.^[9] Der Grund hierfür ist, dass sie zusätzlich zu ihren eigenen vorteilhaften Eigenschaften, wichtige Merkmale von Antikörpern und niedermolekularen Wirkstoffen vereinen können.^[9] So zählen zu ihren Eigenschaften eine hohe Wirksamkeit, hohe Affinität, Zielselektivität und eine große Oberfläche, welche bei Inhibitoren von Protein-Protein- (oder IDP/IDP-) Wechselwirkungen, wie z.B. bei Anti-Amyloid-Molekülen, oft erforderlich ist.^[9-10] Weiterhin können makrozyklische Peptide gute proteolytische Stabilität und Blut-Hirn-Schranken-(BHS-)Permeabilität aufweisen oder dahingehend entworfen werden; diese Eigenschaften sind äußerst wünschenswert für Anti-Amyloid-Wirkstoffe bei PD.^[9-11]

Vorherige Untersuchungen haben gezeigt, dass IAPP/Amyloid- β Peptid(A β 40(42))-Kreuzinteraktionsstellen dazu



Schema 1. Sequenzen von α Syn, IAPP, und den früher entworfenen linearen Templat-Peptid R3-GI (IAPP *interaction surface mimic* oder ISM; IAPP-basierte Sequenznummern), *macrocyclic inhibitory peptides* (MCIPs) **2e** und **2b**, und negatives Kontrollpeptid **4Ala-2b** (Tabellen S1,S2).^[11-12] Alle Peptide einschließlich IAPP sind C-terminale Amide.^[11-12] Das IAPP-Amyloidkernsegment IAPP(8-28) ist fettgedruckt und in grau hervorgehoben; Segment IAPP(19-21), das durch RRR- oder rrr-Segmente in den IAPP(8-28)-abgeleiteten Peptiden ersetzt wurde, und die RRR- oder rrr-Segmente sind unterstrichen (D-Aminosäuren, Kleinbuchstaben). Farbkennzeichnung: rot für die 4 Schlüsselreste der IAPP-Selbst-/Kreuzwechselwirkung mit A β 40(42) und blau für nicht-IAPP Reste und Amidbindungen-N-Methyl-Gruppen (N-Me).^[11-13] IAPP enthält eine Disulfidbrücke zwischen Cys2 und Cys7 und MCIPs zwischen Cys1 und Cys17.^[11]

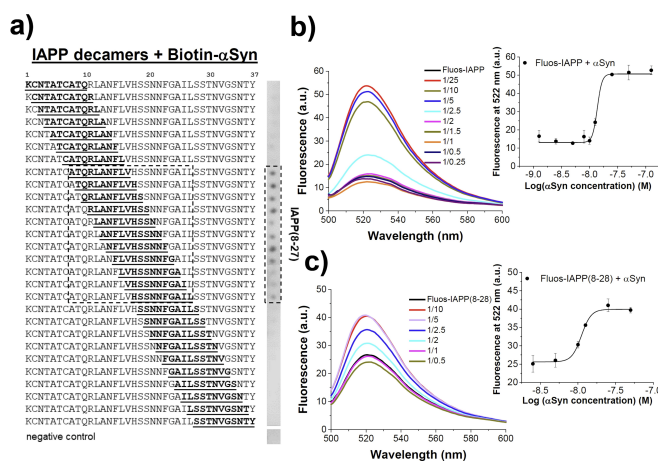
verwendet werden können, Peptide als effektive Inhibitoren ihrer amyloiden Selbstassoziation und Kreuznukleationswechselwirkungen zu entwerfen.^[7d,11–12,14] In diesem Zusammenhang haben wir die von IAPP abgeleiteten makrozyklischen Peptide **2b** und **2e** als nanomolare Inhibitoren der Amyloidbildung von sowohl IAPP als auch A β 40(42) (**2b**) oder nur A β 40(42) (**2e**) entwickelt.^[7d,11] Die beiden 17-Reste langen Peptide (genannt *macrocyclic inhibitory peptides* oder MCIPs) wurden entworfen, um IAPP-Stellen, die seine Selbst- und/oder Kreuzwechselwirkung mit A β 40(42) vermitteln, nachzuahmen, während sie zugleich minimale IAPP-basierte Erkennungselemente konservieren (Schema 1).^[7d,11] Der Entwurf der MCIPs basierte auf dem IAPP-Amyloidkernsegment IAPP(8–28), das die Schlüsselerkennungselemente für die IAPP-Selbstassoziation und seine Kreuzinteraktion mit A β 40(42) enthält, und einem IAPP(8–28)-Analog, dem linearen Peptid R3-GI, genannt IAPP *interaction surface mimic* (ISM) (Schema 1).^[11–13,15] Von großer Bedeutung war der Befund, dass MCIP **2e**, das sich von **2b** nur durch das Vorhandensein von D-Aminosäuren anstatt L-Aminosäuren unterscheidet, eine hohe proteolytische Stabilität in menschlichem Plasma in vitro und gute BHS-Permeabilität in einem Zellmodell aufwies; dadurch wurde **2e** zur Leitstruktur für Anti-Amyloidwirkstoffe bei AD.^[7d,11]

In unserer aktuellen Studie zeigen wir, dass die makrozyklischen Peptide **2b** und **2e** nanomolare Inhibitoren sowohl der selbst- als auch der IAPP-nukleierten amyloiden Selbstassemblierung von α Syn sind. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass die starke Anti-Amyloid-Wirkung der beiden Peptide durch ihre Bindung mit nanomolarer Affinität an drei α Syn-Segmente vermittelt wird. Letztere werden somit als Schlüsselregionen sowohl der α Syn-Selbstassoziation als auch seiner Kreuzinteraktionen mit IAPP identifiziert. Darüber hinaus zeigen wir, dass die beiden Peptide auch in der Lage sind, die Kreuznukleation der α Syn-Amyloidogenese durch A β 42-Amyloidfibrillen (fA β 42) zu hemmen.

Ergebnisse und Diskussion

IAPP/ α Syn-Kreuzinteraktionen Nanomolarer Affinität werden durch IAPP-Amyloidkernregion IAPP(8–28) Vermittelt

Als Erstes haben wir uns gefragt, welche IAPP-Regionen seine Kreuzwechselwirkungen mit α Syn vermitteln. Zu diesem Zweck haben wir synthetische Peptidarrays aus IAPP-Dekameren, die die gesamte IAPP-Sequenz abdeckten und jeweils um einen Aminosäurerest versetzt waren, mit Biotin-markiertem α Syn (Biotin- α Syn) inkubiert. An Biotin- α Syn gebundene IAPP-Dekamere wurden anschließend mittels Chemilumineszenz sichtbar gemacht.^[15a] Wir haben ein Bindungskuster aus 4 aufeinanderfolgenden Dekameren im Bereich IAPP(8–20) sowie einen zweiten, schwächeren Dekamer-Cluster im Bereich IAPP(13–27) identifiziert (Abb. 1a, Abb. S1). Als nächstes haben wir synthetisches, N⁶-aminoterminale fluoreszenzmarkiertes IAPP (Fluos-IAPP) bzw. IAPP(8–28) (Fluos-IAPP(8–28)) mit α Syn titriert. Diese Methode nutzt die Abhängigkeit der Fluoreszenzemission eines Fluorophors von seiner lokalen Umgebung und deren Verände-



genen Analoga IAPP(8–28)-GI und R3-GI, die zwei linearen MCIP-Vorläufern entsprechen, die α Syn-Fibrillenbildung nicht hemmen konnten (Schema 1, Tabelle S1, Abb. S2).^[11–12,17]

Anschließend wurden die Effekte von **2b** und **2e** auf die α Syn-Amyloidbildung untersucht (Schema 1, Abb. 2a–c, Tabelle 1). Gleichzeitig haben wir die Auswirkungen des negativen Kontrollpeptids **4Ala-2b**, bei dem alle vier von IAPP abgeleiteten Schlüsselreste von **2b** und **2e** durch Ala ersetzt wurden, untersucht (Schema 1).^[11] Die Ergebnisse des amyloidspezifischen Thioflavin T-(ThT-) Bindungsassays und der Untersuchungen mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) deuteten darauf hin, dass die α Syn-Fibrillenbildung mit einer Verzögerung von ~24 h begann und nach ~48 h abgeschlossen war (Abb. 2a, b & Abb. S3a–c). In der Gegenwart von **2b** oder **2e** (α Syn/Peptid 1/1) wurde jedoch eine vollständige Unterdrückung der α Syn-Fibrillogenese beobachtet (Abb. 2a, b & Abb. S3b,c). Weiterhin waren die beiden Peptide auch in der Lage, die Bildung zellschädlicher α Syn-Aggregate zu hemmen, wie aus den Ergebnissen des 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyltetrazolium-Bromid (MTT)-Reduktionsassays in kultivierten (Ratten-)Pheochromozytom Zellen (PC12) zu entnehmen (Abb. 2c, Abb. S3d,e). Tatsächlich ergaben sich aus den Titrationen von α Syn mit **2b** und **2e** nanomolare IC_{50} -Werte von 62.3 ($\pm$ 33.9) nM (**2b**) und 66.0 ($\pm$ 23.3) nM (**2e**) (Tabelle 1, Abb. S3d,e). Für die Negativkontrolle **4Ala-2b** wurde bei einem bis zu 50-fach höheren molaren Überschuss im Vergleich zu **2b** oder **2e** keine hemmende Wirkung festgestellt (Abb. 2a–c).

Als Nächstes haben wir uns gefragt, ob **2b** und **2e** auch die Nukleation der α Syn-Fibrillenbildung durch vorgeformte α Syn-Amyloidfibrillen (faSyn) unterdrücken könnten. Wie erwartet führte die Zugabe von faSyn (10%) zu α Syn zur starken Beschleunigung der Bildung von α Syn-Fibrillen und zellschädigenden Aggregaten (Abb. 2d–f, Abb. S4). In der Gegenwart von **2b** und **2e** (1/1) waren jedoch sowohl die Amyloidbildung als auch die Zelltoxizität von α Syn vollständig unterdrückt, während **4Ala-2b** (α Syn/**4Ala-2b**, 1/50) wiederum keine Wirkung zeigte (Abb. 2d–f, Abb. S4). Titrationen mit den beiden Inhibitoren ergaben IC_{50} -Werte von 51.8 ($\pm$ 4.8) nM (**2b**) und 54.7 ($\pm$ 4.4) nM (**2e**), die fast identisch mit den IC_{50} Werten der Wirkung auf nicht-nukleierte α Syn-Selbstassemblierung waren (Tabelle 1, Abb. S5). Bemerkenswerterweise konnten **2b** und **2e** die α Syn-Fibrillenbildung und -Zelltoxizität hemmen, unabhängig davon, ob für die Nukleation 10% oder 1% faSyn verwendet wurden, was auf

eine inhibitorische Wirkung auf sekundäre Nukleation und Fibrillenverlängerung hindeutet (Abb. 2d–f, Abb. S4–S6).^[18]

Wir haben uns dann gefragt, ob die beiden Peptide auch den Kreuznukleationseffekt von fIAPP auf die α Syn-Amyloidogenese beeinträchtigen könnten.^[5a] Übereinstimmend mit vorherigen Befunden beschleunigte die Zugabe von vorgeformtem fIAPP (10%) die α Syn-Amyloidbildung stark (Abb. 2g, h).^[5a] Gleichzeitig wurde eine stark beschleunigte Bildung zellschädigender α Syn-Spezies beobachtet (Abb. S7a, b). In der Gegenwart von **2b** oder **2e** (1/1) wurde jedoch eine vollständige Unterdrückung der fIAPP-Kreuznukleation der α Syn-Amyloidogenese und Zytotoxizität beobachtet. Die entsprechenden Titrationen ergaben die folgenden nanomolaren IC_{50} -Werte für die beiden Peptide: 75.2 ($\pm$ 21.1) nM (**2b**) und 42.0 ($\pm$ 18.5) nM (**2e**) (Tabelle 1, Abb. S7c–h). Wie erwartet konnte **4Ala-2b** (50-facher Überschuss) auch diesen Prozess nicht hemmen (Abb. 2g–i). Erwähnenswerterweise waren **2b** und **2e** mindestens bis zu einem 200-fachen Überschuss im Vergleich zu ihren IC_{50} -Werten nicht-amyloidogen und nicht-zelltoxisch, was in guter Übereinstimmung mit ihrem Entwurfskonzept und vorherigen Ergebnissen war (Abb. S8).^[11–12,19]

Zusammenfassend zeigten die obigen Untersuchungen, dass die MCIPs **2b** und **2e** nanomolare Inhibitoren sowohl der selbst- als auch der fIAPP-kreuznukleierten α Syn-Amyloidselfstassemblierung sind.

MCIPs Binden α Syn mit Nanomolarer Affinität und Überführen es in Nicht-Fibrilläre und Nicht-Zelltoxische Heteroaggregate

Um mehr über den Inhibitionsmechanismus zu erfahren, haben wir α Syn/Peptid-Wechselwirkungen und -Heteroaggregate mittels verschiedener biophysikalischer und biochemischer Methoden untersucht. Zuerst wurden die Affinitäten der α Syn/Peptid-Wechselwirkungen durch fluoreszenzspektroskopische Titrationen von synthetischem N-aminoterminal fluoreszein-markiertem **2b** (Fluos-**2b**) und **2e** (Fluos-**2e**) mit α Syn bestimmt (Abb. 3a, b). Die app. K_d -Werte lagen für beide Wechselwirkungen im niedrigen nanomolaren Bereich (Fluos-**2b**/ α Syn, app. K_d =17.2 ($\pm$ 2.6) nM; Fluos-**2e**/ α Syn app. K_d =22.0 ($\pm$ 5.1) nM) was in guter Übereinstimmung mit den IC_{50} -Werten war (Abb. 3a, b, Tabellen 2 & 1). Erwähnenswerterweise lagen **2b** und **2e** bei niedrigen nanomolaren Konzentrationen größtenteils als Monomere vor, wobei sie in höheren Konzentrationen zu löslichen Oligomeren aggregierten; dies war konsistent mit ihrem Designkonzept und frühe-

Tabelle 1: IC_{50} Werte der Inhibitor-Wirkung von **2b**, **2e**, und **4Ala-2b** auf zellschädigende Effekte von nicht-nukleierter, faSyn-nukleierter, und fIAPP-nukleierter α Syn-Amyloidselfstassemblierung.

Peptid	IC_{50} ($\pm$ SD) (nM) Inhibition von α Syn ^[a]	IC_{50} ($\pm$ SD) (nM) Inhibition von α Syn + faSyn ^[a]	IC_{50} ($\pm$ SD) (nM) Inhibition von α Syn + fIAPP ^[a]
2b	62.3 ($\pm$ 33.9)	51.8 ($\pm$ 4.8)	75.2 ($\pm$ 21.1)
2e	66.0 ($\pm$ 23.3)	54.7 ($\pm$ 4.4)	42.0 ($\pm$ 18.5)
4Ala-2b	> 5000	> 5000	> 5000

[a] IC_{50} -Werte, Mittelwerte ($\pm$ SD) aus 3 Titrationassays (je $n = 3$); α Syn, 100 nM ohne oder mit vorgeformten faSyn- oder fIAPP-Nukleationskeimen (10%).

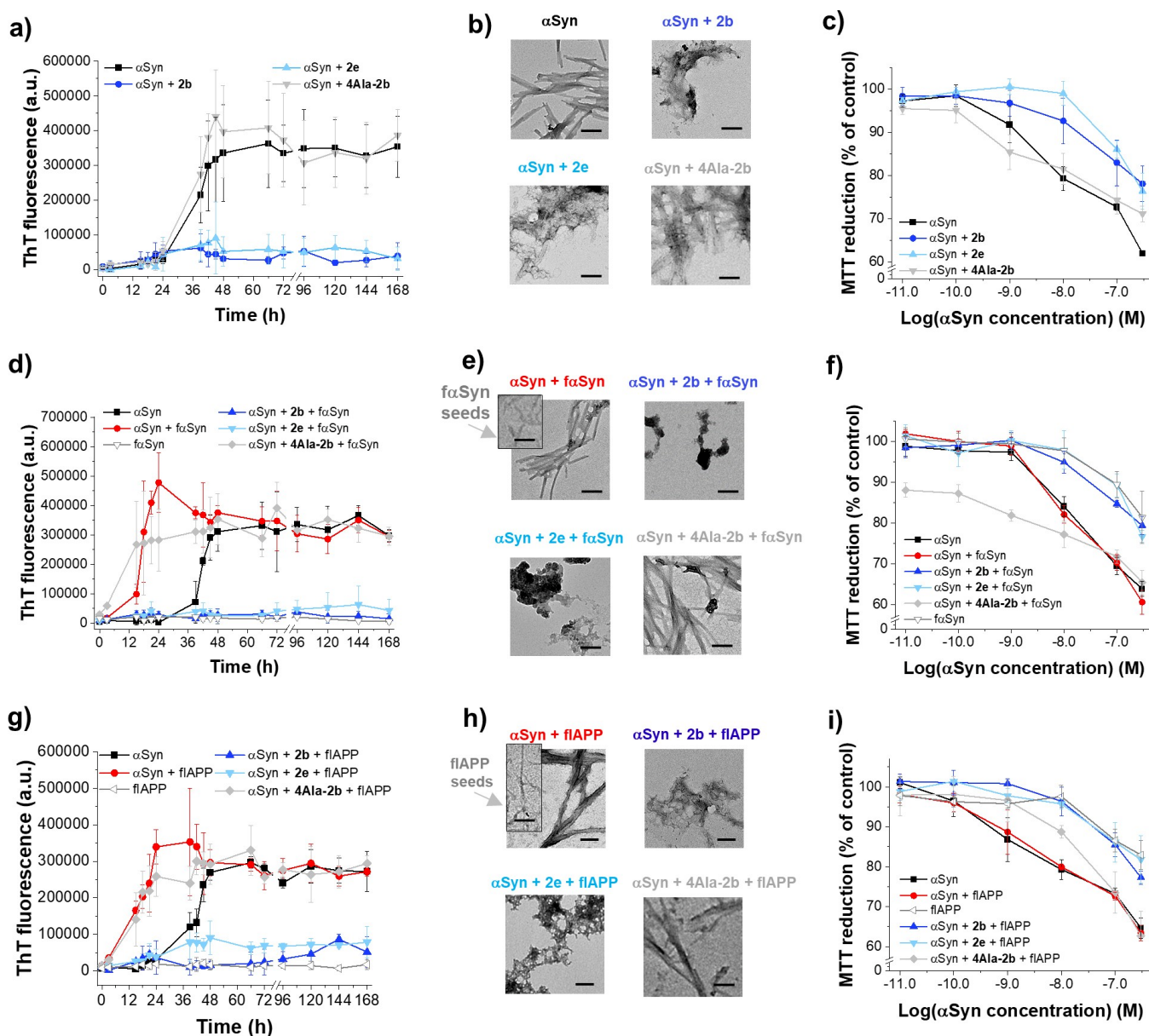


Abbildung 2. Effekte von **2b**, **2e**, und **4Ala-2b** auf nicht-nukleierte (a–c), mit α Syn nukleierte (d–f) und mit α Syn-nukleierte (g–i) α Syn-Amyloidselbstassemblierung und die damit zusammenhängende Zellschädigung. a–c) Fibrillenbildung von α Syn (3 μ M) alleine und in der Anwesenheit von **2b** und **2e** (1/1) oder **4Ala-2b** (1/50) bestimmt mittels des ThT-Bindungsassays (Mittelwerte ($\pm$ SD), 3 Assays (je $n=3$)) (a); TEM-Bilder der Lösungen (7 Tage gealtert) aus (a) wie angegeben (Farbkennzeichnung wie in (a)) (Maßstab, 100 nm) (b); PC12-Zellviabilität nach Behandlung mit Lösungen (7 Tage gealtert) aus (a) bestimmt mittels des MTT-Reduktionsassays (Mittelwerte ($\pm$ SD), 3 Assays (je $n=3$)) (c). d–f) Fibrillenbildung von α Syn alleine (3 μ M) oder nach Nukleation durch α Syn (10%) alleine oder mit **2b** und **2e** (1/1) oder **4Ala-2b** (1/50) bestimmt mittels des ThT-Bindungsassays, und ThT-Bindungsassay der α Syn-Nukleationskeime (0.3 μ M) (Mittelwerte ($\pm$ SD), 3 Assays (je $n=3$)) (d); TEM-Bilder der Lösungen aus (d) gealtert für 7 Tage (mit α Syn-angeimpfte α Syn/**2b**(**2e**)-Mischungen) oder für 24 h (α Syn-angeimpftes α Syn alleine oder mit **4Ala-2b**) und der α Syn-Nukleationskeime (Maßstab, 100 nm) (e); PC12-Zellviabilität nach Behandlung mit Lösungen aus (d) (7 Tage gealtert) bestimmt mittels des MTT-Reduktionsassays (Mittelwerte ($\pm$ SD), 3 Assays (je $n=3$)) (f). g–i) Amyloidbildung von α Syn (3 μ M) alleine oder nach Kreuznukleation durch α Syn (10%) alleine oder mit **2b** und **2e** (1/1) oder **4Ala-2b** (1/50) bestimmt mittels des ThT-Bindungsassays und ThT-Bindungsassay der α Syn-Nukleationskeimen (0.3 μ M) (Mittelwerte ($\pm$ SD), 3 Assays (je $n=3$)) (g); TEM-Bilder der Lösungen aus (g) gealtert für 7 Tage (mit α Syn-angeimpfte α Syn/**2b**(**2e**)-Mischungen) oder für 24 h (mit α Syn-angeimpftes α Syn alleine oder mit **4Ala-2b**) wie angegeben (Maßstab, 100 nm) (h); PC12-Zellviabilität nach Behandlung mit Lösungen (7 Tage gealtert) aus (g) bestimmt mittels des MTT-Reduktionsassays (Mittelwerte ($\pm$ SD), 3 Assays (je $n=3$)).

ren Befunden (Abb. S9).^[11–12,20] Außerdem waren ihre α Syn-Bindungsaffinitäten sehr ähnlich zu ihren IAPP-Bindungsaffi-

nitäten, während **4Ala-2b** weder IAPP noch α Syn binden konnte (Abb. S10, S11, Tabelle 2).^[11]

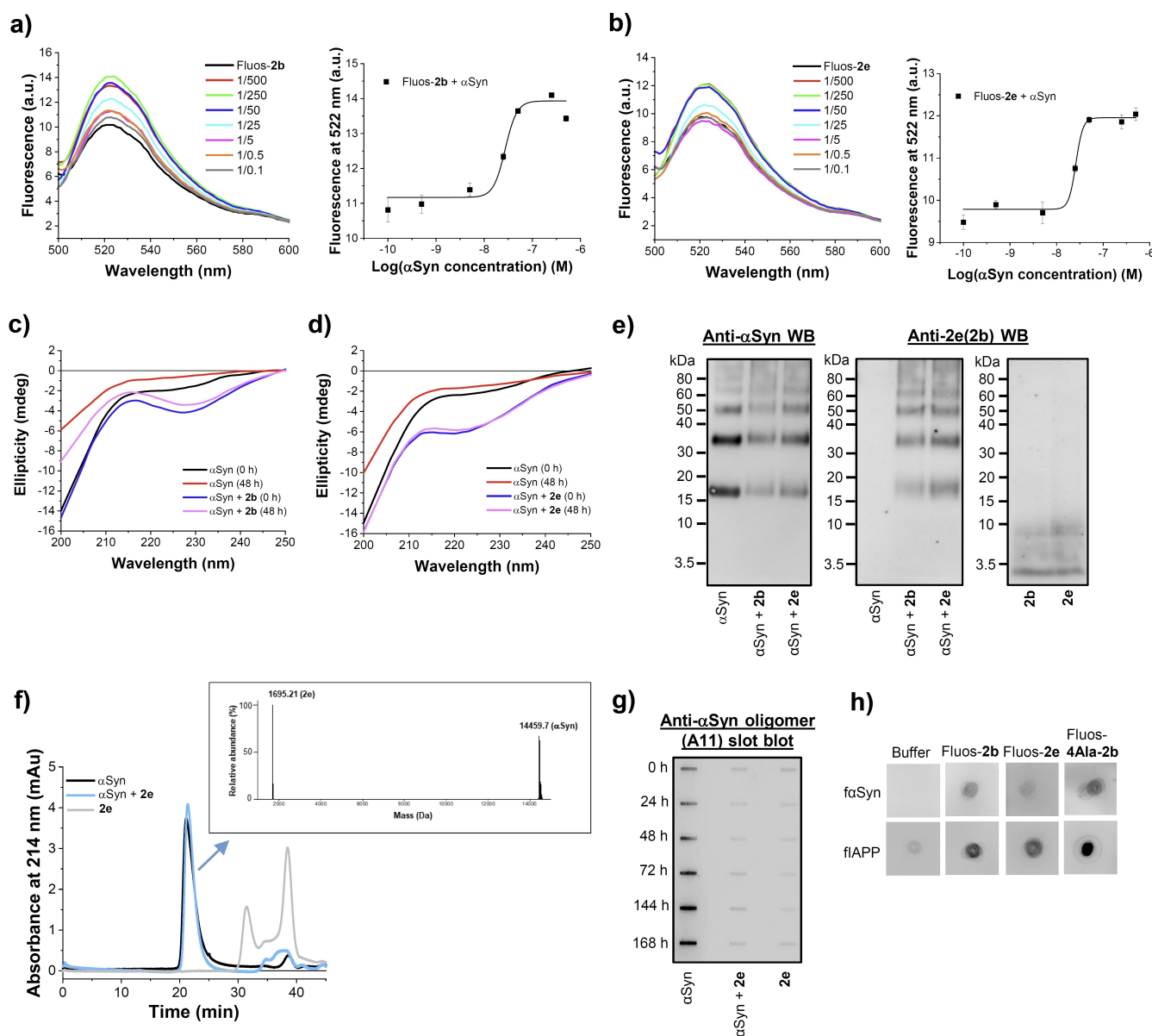


Abbildung 3. Untersuchungen zu Wechselwirkungen, Heterokomplexen und dem Mechanismus der Anti-Amyloid-Effekte von **2e** und **2b** auf die α Syn-Amyloidbildung. a, b) Links, app. K_d s der Interaktionen von Fluos-**2b** (a) und Fluos-**2e** (b) mit α Syn bestimmt mittels fluoreszenzspektroskopischer Titrations. Fluoreszenzemissionsspektren von Fluos-**2b** oder Fluos-**2e** (1 nM) und deren Mischungen mit verschiedenen molaren Verhältnissen von α Syn sind dargestellt wie angegeben; Spektren aus 1 repräsentativen Bindungsassay ($n = 3$). Rechts, Bindungskurven; Daten sind Mittelwerte ($\pm$ SD) aus 3 Titrationsassays; app. K_d s in Tabelle 2. c, d) Fern-UV CD-Spektren von α Syn (1 μ M) alleine und seinen Mischungen mit **2b** (c) oder **2e** (d) (10 μ M) gemessen bei 0 h und nach 48 h Inkubation. e) Charakterisierung der α Syn/MCIP-Hetero- und α Syn-Homo-Oligomere mittels Quervernetzung mit Glutaraldehyd, SDS-PAGE und Westernblot mit anti- α Syn- (links) oder anti-**2e(2b)** (rechts) Antikörpern (α Syn, 10 μ M; MCIPs, 50 μ M) (siehe auch Abb. S12); repräsentative Ergebnisse aus 3 Assays. f) Charakterisierung der α Syn/**2e**-Heterokomplexe im Vergleich zu α Syn und **2e** alleine mittels Größenausschlusschromatographie (SEC). Chromatogramme von α Syn (3 μ M), **2e** (30 μ M), und der α Syn/**2e**-Mischung (1/10) sind gezeigt. Einschluss, ESI-MS Spektrum (dekonvolviert) des 21 min-Peaks aus der SEC der α Syn/**2e**-Mischung (siehe auch Abb. S14). Bestimmte MG wie angegeben; berechnete Masse (Durchschnitt) 14460.27 Da (α Syn) und 1695.04 Da (**2e**). Repräsentative Ergebnisse aus 3 SEC-Analysen und ESI-MS. g) Kinetik der α Syn-Selbstassemblierung in A11-reaktive toxische Oligomere alleine oder in Gegenwart von **2e** gefolgt von Slot Blot-Analyse mittels des A11-Antikörpers (siehe auch Abb. S15). Lösungen von α Syn alleine (3 μ M), α Syn/**2e** (1/1), und **2e** alleine (3 μ M) wurden zu den angegebenen Inkubationszeiten analysiert. Repräsentative Ergebnisse aus 4 Assays. h) Bindung von **2b**, **2e** und **4Ala-2b** an faSyn und flAPP bestimmt mittels Dot Blot-Analyse. Fluos-**2b**, Fluos-**2e** und Fluos-**4Ala-2b** (1.5 μ M) sowie der Puffer alleine als Kontrolle wurden mit Membranen, auf denen faSyn oder flAPP aufgetragen war, inkubiert; Bindung wurde mittels Fluoreszenz sichtbar gemacht (siehe auch Abb. S16). Repräsentative Ergebnisse aus 3 Assays.

Das Fern-UV CD-Spektrum von frisch gelöstem α Syn zeigte ein ausgeprägtes Minimum bei ~ 200 nm, was, überein-

stimmend mit früheren Berichten, auf eine hauptsächlich ungeordnete Struktur hinwies (Abb. 3c, d).^[21] Nach Inkubati-

Tabelle 2: App. K_d s der Interaktionen von Fluos-**2b**, **2e** und -IAPP mit IAPP, α Syn und den drei identifizierten α Syn-Schlüsselsegmenten bestimmt mittels fluoreszenzspektroskopischen Titrationsen.^[a]

Bindungs- partner	App. K_d ($\pm$ SD) (nM) (2b)	App. K_d ($\pm$ SD) (nM) (2e)	App. K_d ($\pm$ SD) (nM) (IAPP)
IAPP	29.6 ($\pm$ 19.3)	46.9 ($\pm$ 33.4)	9.7 ($\pm$ 0.9) ^[19]
α Syn	17.2 ($\pm$ 2.6)	22.0 ($\pm$ 5.1)	26.7 ($\pm$ 6.0)
α Syn(1–14)	366.2 ($\pm$ 115.8)	461.3 ($\pm$ 47.5)	886.4 ($\pm$ 552.0)
α Syn(34–52)	662.8 ($\pm$ 9.4)	504.7 ($\pm$ 171.2)	347.5 ($\pm$ 103.2)
α Syn(87–105)	72.1 ($\pm$ 20.5)	122.2 ($\pm$ 17.1)	31.9 ($\pm$ 0.6)

[a] App. K_d s, Mittelwerte ($\pm$ SD) aus 3 Bindungskurven (3 Titrationsassays) mit N^a-aminoterminal fluoreszenzmarkiertem **2b** (Fluos-**2b**), **2e** (Fluos-**2e**), und IAPP (Fluos-IAPP) (pH 7.4). Fluos-Peptide 5 nM, außer für Titrationsen von Fluos-**2b**(**2e**) mit α Syn und Fluos-IAPP mit IAPP (Daten aus Quelle 19) (Fluos-Peptide 1 nM).^[19]

on („Alterung“) für 48 h, wurde eine starke Reduktion der CD-Signalstärke beobachtet, was auf α Syn Oligomerisierung hindeutete.^[21a,b] In Anwesenheit von **2b** oder **2e** jedoch wurde keine oder nur eine langsame Verringerung der CD-Signalstärke festgestellt, was im Einklang mit der hemmenden Wirkung der beiden Peptide auf die α Syn-Amyloidbildung stand (Abb. 3c, d). Weiterhin wiesen die CD-Spektren der α Syn/Inhibitor-Mischungen zusätzlich zum Minimum bei ~200 nm ein schwächeres aber deutlich erkennbares Minimum zwischen 220–230 nm auf. Ihre Form und Signalstärke deuten darauf hin, dass die Heterokomplexe geordneter als α Syn waren (Figure 3c,d).

Als nächstes wurden α Syn/Inhibitor-Hetero-Komplexe mit Glutaraldehyd quervernetzt, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Westernblot (WB) mit anti- α Syn- und anti-**2e**(**2b**)-Antikörpern visualisiert (Abb. 3e & Abb. S12). In frisch vorbereiteten α Syn-Lösungen waren Monomere und Dimere die Hauptspezies; Trimere und andere Aggregate mit mittlerem bis hohem Molekulargewicht (MG) waren weniger vorhanden.^[21c] In α Syn/**2b**(**2e**)-Mischungen wurde ein ähnliches Muster wie bei α Syn alleine beobachtet mit dem Unterschied, dass die Banden sowohl mit dem anti- α Syn- als auch dem monoklonalen anti-**2e**(**2b**)-Antikörper sichtbar gemacht wurden. Außerdem waren die Banden, die α Syn-Mono-, Di-, und Trimeren entsprechen könnten, leicht nach oben verschoben. Diese Daten deuten darauf hin, dass **2b** und **2e** mit α Syn-Monomeren und kleineren Oligomeren zu Hetero-Dimeren und kleineren Hetero-Oligomeren co-assemblieren.

Heterokomplexe, die in frühen Schritten der α Syn/**2e**-Co-Aggregation entstanden, wurden anschließend mittels Größenausschlusschromatographie (SEC) untersucht (Abb. 3f). Dabei eluierten die α Syn-Monomere (~15 kDa), die in frisch hergestellten α Syn-Lösungen vorhanden waren, bei einer Retentionszeit (t_R) von ~21 min. Letztere entsprach jedoch einem globulären 44 kDa-Protein; diese Diskrepanz könnte mit der intrinsisch ungeordneten Struktur von α Syn, welche zu einem höheren hydrodynamischen Radius führt, zusammenhängen (Abb. 3f, Abb. S13).^[21a,b] In Lösungen von **2e** alleine (~2 kDa) eluierte der Großteil bei ~38 min und entsprach **2e**-Monomeren, während eine kleinere Fraktion, die **2e**-Oligomeren entsprach, bei ~32 min eluierte. Von Bedeutung war auch der Befund, dass in α Syn/**2e**-Mischungen der 21 min-Peak, der in den α Syn-alleine-Lösungen gefunden wurde, auch vorhanden war, wobei die **2e**-Peaks

deutlich verringert waren (Abb. 3f). Die obigen Befunde deuteten auf die Bildung von α Syn/**2e**-Heterokomplexen, welche bei ~21 min eluierten; tatsächlich wurde die Heterokomplexbildung durch Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) bestätigt (Abb. 3f, Abb. S14). Der erwarteten jedoch nicht-beobachteten Verschiebung des α Syn-Peaks der α Syn/**2e**-Mischung zu höheren MGs lagen höchstwahrscheinlich das niedrige MG von **2e** und die Auflösungskapazität der Säule zugrunde. Zusammen legen diese Studien nahe, dass α Syn/**2e**-Hetero-Dimere und Hetero-Oligomere mit niedrigem MG frühe Spezies der α Syn/**2e**-Co-Aggregation repräsentieren.

Die Bildung zelltoxischer α Syn-Oligomere wird mit Neurodegeneration und der Pathogenese von PD in Verbindung gebracht.^[22] Unsere ThT-Bindungs- und MTT-Reduktionsassays deuten darauf hin, dass in der Gegenwart der MCIPs, die Bildung zelltoxischer α Syn-Aggregate stark unterdrückt wird (Abb. 2a–c). Um die Auswirkungen der MCIPs auf die Bildung von α Syn-Oligomeren direkter zu charakterisieren, haben wir die Kinetik der Bildung zellschädigender Oligomere in Lösungen von α Syn alleine und seinen Mischungen mit **2e** untersucht. Wir haben eine Slot Blot-Analyse eingesetzt und den Antikörper A11 verwendet, der toxische Oligomere verschiedener Proteine, darunter auch α Syn-Oligomere, erkennt (Abb. 3g, Abb. S15a).^[23] Die Bildung zelltoxischer α Syn-Oligomere wurde außerdem durch den MTT-Reduktionsassay und TEM bestätigt (Abb. S15b–e). In ~48 h-gealterten α Syn-Lösungen wurden große Mengen zytotoxischer A11-reaktiver Oligomere gefunden (Abb. 3g, Abb. S15). Im Gegensatz dazu wurden in α Syn/**2e**-Mischungen (1/1) nur wenige A11-reaktive Oligomere gefunden; auch wurden keine zytotoxischen Effekte beobachtet (Abb. 3g, Abb. S15a, b).

Die starke amyloidinhibitorische Wirkung der MCIPs könnte auch durch die Bindung an α Syn und/oder IAPP, die zu einer Unterdrückung der sekundären Nukleation und/oder Fibrillenverlängerung führen kann, vermittelt werden.^[18] Tatsächlich zeigten Dot Blot-Assays, dass Fluos-**2b** und Fluos-**2e** sowohl α Syn als auch IAPP binden können (Abb. 3h). Allerdings konnte auch der nicht-Inhibitor Fluos-**4A1a-2b** binden -wahrscheinlich unspezifisch (Abb. 3h, Abb. S16). Darüber hinaus wirkten sich substöchiometrische Mengen an **2b** und **2e** nicht merklich auf die Selbst-/Kreuznukleation der α Syn-Fibrillenbildung aus (Abb. S3, S5, S7). Außerdem stellte sich heraus, dass α Syn- oder IAPP-Nukleationskeime die α Syn-Amyloidogenese im Kontext von

α Syn/**2e**(**2b**)-Heterokomplexen nicht nukleieren konnte (Abb. S17, S18).

Zusammengefasst werden die Anti-Amyloid-Effekte von **2b** und **2e** auf α Syn vermutlich durch hochaffine Wechselwirkungen zwischen Monomeren und/oder -Oligomeren von MCIPs und α Syn vermittelt. Diese resultieren in der Sequestrierung von α Syn in amorphe, nicht-zelltoxische und nukleationsinkompetente α Syn/MCIP-Heteroaggregate. Ein ähnlicher Mechanismus wurde interessanterweise auch für die Wirkung der MCIPs und verwandter IAPP-abgeleiteter Inhibitoren auf die Amyloidbildung von IAPP und A β 40(42) vorgeschlagen.^[11–12,14a,20]

Zusätzliche Anti-Amyloid-Wirkungen der MCIPs

Es wird vermutet, dass die Beeinträchtigung der synaptischen Langzeitpotenzierung (LTP) im Hippocampus durch α Syn-Oligomere im direkten Zusammenhang mit der neuronalen Dysfunktion bei PD steht.^[2a,24] Um erste Informationen über die mögliche physiologische Relevanz unserer in vitro-Befunde zu erhalten, haben wir die Wirkung der beiden MCIPs auf α Syn-Oligomer-vermittelte Beeinträchtigung der synaptischen LTP im Hippocampus von Mausgehirnen ex vivo untersucht (Abb. 4a–c). Tatsächlich zeigten elektrophysiologische Untersuchungen, dass die Beeinträchtigung der hippocampalen synaptischen LTP, die durch vorgebildete zelltoxische α Syn-Oligomere verursacht wurde, in der Anwesenheit von **2b** oder **2e** signifikant reduziert war (Abb. 4a–c, Abb. S19).^[24a] Die Effekte der MCIPs auf die α Syn-Toxizität wurden ebenfalls in α Syn-überexprimierenden postmitotischen, dopaminergen Lund-menschlichen mesenzephalen (LUHMES) Neuronen untersucht, einem zuvor entwickelten krankheitsrelevanten Zellmodell zum Screening möglicher Modulatoren der α Syn-Toxizität.^[25] α Syn-Zytotoxizität wurde mittels des Laktatdehydrogenase (LDH) Freisetzungssassays quantifiziert. Für beide Peptide wurde ein signifikanter Schutz der Neuronen festgestellt, was ihre Anti-Amyloid-Funktion zusätzlich unterstützt (Abb. 4d). Da A β -vermittelte Kreuznukleation von α Syn eine Rolle bei der AD/PD-Co-Pathologie spielen könnte, haben wir uns auch gefragt, ob **2b** und **2e**, die auch die A β -Amyloidbildung hemmen, ebenfalls diesen Prozess beeinflussen würden.^[26] Tatsächlich zeigten der ThT-Bindungsassay, TEM und Zellviabilitätsuntersuchungen eine vollständige Unterdrückung der α Syn Kreuznukleation durch A β 42-Fibrillen (fA β 42) in der Anwesenheit der beiden Peptide (1/1) (Abb. 4e–g). Schließlich zeigten ThT-Bindungsuntersuchungen, dass **2b** und **2e** die Insulin-Fibrillogenese nicht hemmen, obwohl ihre Vorläufer IAPP und IAPP-GI diesen Prozess inhibieren können (Abb. S20).^[14c] Da darüber hinaus **2b** die Amyloidbildung von A β 40(42), IAPP und α Syn inhibiert, während **2e** A β 40(42) und α Syn, aber nicht IAPP, inhibiert, könnte man davon ausgehen, dass die Anti-Amyloid-Multifunktionalität der beiden Peptide zielspezifisch ist.^[11] Untersuchungen mit weiteren möglichen Interaktionspartnern werden erforderlich sein, um dieses Thema näher zu beleuchten.

Drei α Syn-Schlüsselregionen Vermitteln seine Hochaffine Interaktionen mit MCIPs und IAPP: Mehrstellenbindung als Grundlage der Anti-Amyloiden Wirkung der MCIPs

Um die α Syn-Regionen, die hochaffine Interaktionen mit den MCIPs vermitteln, zu identifizieren, haben wir einen synthetischen Peptidarray, der α Syn-Dekamere enthält, welche die gesamte Sequenz abdecken und jeweils um einen Rest verschoben sind, mit Fluos-**2e** inkubiert (Abb. 5a, Abb. S21). Wir haben drei Bereiche stark bindender Dekamere identifiziert: ein lokalisiert im N-terminalen Segment α Syn(1–14), ein zweiter in der Region α Syn(34–52), und ein dritter in α Syn(87–105) (Abb. 5a, Abb. S21). Die Ergebnisse der Peptidarray-Untersuchungen wurden durch fluoreszenzspektroskopische Titrations bestätigt und quantifiziert. Diese ergaben nanomolare app. K_{ds} für die Interaktionen von **2e** und **2b** mit allen 3 α Syn-Segmenten (Abb. 5b–d, Abb. S22, Tabelle 2). Diese Daten deuteten darauf hin, dass die hohe Bindungsaffinität der MCIPs an α Syn durch die 3 α Syn-Regionen α Syn(1–14), α Syn(34–52), und α Syn(87–105) vermittelt wird.

Da die MCIPs IAPP-Regionen, die seine Kreuzinteraktionen mit α Syn vermitteln, nachahmen könnten, stellten wir die Hypothese auf, dass sie mit den gleichen bzw. ähnlichen α Syn-Regionen wie IAPP interagieren könnten; dies könnte ihrer starken Hemmwirkung auf die IAPP-vermittelte Kreuznukleation der α Syn-Amyloidogenese zugrunde liegen. Um diese Annahme zu überprüfen, wurde der α Syn-Peptidarray mit Fluos-IAPP inkubiert. Wir haben 3 Hauptbindungsgebiete in den Regionen α Syn(1–13), α Syn(34–46) und α Syn(87–104) identifiziert, sowie einen schwächeren Bereich innerhalb der NAC-Region α Syn(68–80) (Abb. 5e, Abb. S23). Von Bedeutung war, dass die 3 IAPP-Hauptbindungsgebiete von α Syn, die an IAPP gebunden haben, mit den 3 α Syn-Bereichen, die an die MCIPs gebunden haben, fast identisch waren. Dies war in Einklang mit unserer Hypothese. Darüber hinaus bestätigten fluoreszenzspektroskopische Titrations, dass die 3 wichtigsten MCIP-bindenden α Syn-Segmente ebenfalls (f)IAPP binden, und es zeigte sich auch, dass die Affinitäten ihrer Wechselwirkungen mit IAPP den Affinitäten ihrer Wechselwirkungen mit **2b** und **2e** sehr ähnlich waren (Abb. S24, S25, Tabelle 2). Zusammenfassend haben die oben beschriebenen Untersuchungen die Segmente α Syn(1–14), α Syn(34–52), und α Syn(87–105) als Schlüsselsegmente für die hochaffinen Wechselwirkungen von α Syn sowohl mit MCIPs als auch mit IAPP identifiziert.

Bemerkenswerterweise liegen die identifizierten α Syn-Segmente, die die Interaktionen mit **2e**, **2b** und IAPP vermitteln, in α Syn-Regionen, welche für ihre entscheidende Rolle in der α Syn-Amyloidbildung bzw. ihrer zellschädigenden Wirkung bekannt sind (Abb. 5f).^[27–28] Ihre Amyloid-modulierenden Funktionen scheinen durch vielseitige Wechselwirkungen mit verschiedenen Bereichen von α Syn und einer Reihe anderer Moleküle vermittelt zu werden (Abb. 5f).^[23b,27–28,29] Zum Beispiel ist die N-terminale Region α Syn(1–60) bekannt für ihre Schlüsselrolle bei der α Syn-Amyloidogenese über selbstassoziationsfördernde oder -unterdrückende Interaktionen z.B. mit Lipiden, Chaperonen, und Teilen von α (oder β)Syn.^[22a,28a–f,1m,30] In diesem Zusam-

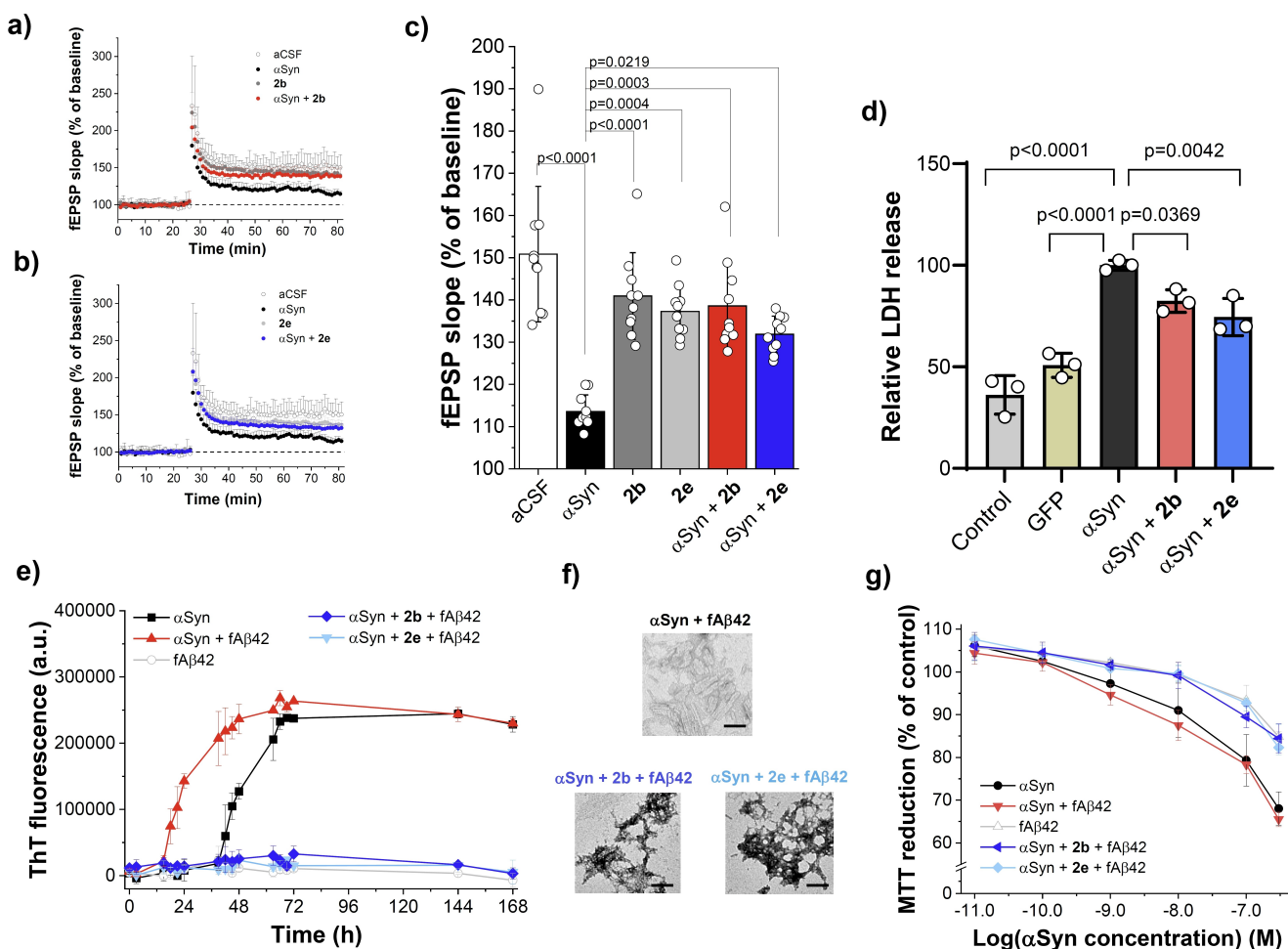


Abbildung 4. MCIPs unterdrücken αSyn-vermittelte synaptische Schäden in Mausgehirnen ex vivo (a–c) und αSyn-Zytotoxizität in αSyn-überexprimierenden humanen postmitotischen dopaminergen Neuronen (d) und blockieren die Kreuznukleation der αSyn-Amyloidbildung durch Aβ42-Fibrillen (fAβ42) (e–g). a–c) Unterdrückung der αSyn-Oligomer-vermittelten LTP-Beeinträchtigung in murinen Hippocampus-Querschnitten ex vivo durch **2b** und **2e**. a, b) Zeitlicher Verlauf der synaptischen Übertragung (fEPSP, *field excitatory postsynaptic potential*) nach Behandlung mit künstlicher Zerebrospinalflüssigkeit (aCSF), Medium (Pufferkontrolle), αSyn-Oligomeren (175 nM), **2b** (a) oder **2e** (b) alleine (1.75 μM), und αSyn-Oligomer/**2b**- (a) oder **2e**-Mischungen (b) (1/10), wie angegeben; Daten sind Mittelwerte (± SD), aus jeweils n = 10 Proben/Behandlungen. c) LTP-Werte: Balken zeigen den Durchschnitt der letzten 10 min der Aufzeichnung; Data sind Mittelwerte (± SD), je n = 10 pro Gruppe; p-Werte wie angegeben; berechnet durch nicht-parametrische Tests mit Mann-Whitney-U-Tests oder einem Kruskal-Wallis-Test. (d) Unterdrückung der αSyn-vermittelten Toxizität in αSyn-überexprimierenden humanen postmitotischen dopaminergen LUHMES-Neuronen durch **2b** und **2e** (10 nM) gemessen mittels LDH-Freisetzung. Graue Säule (Kontrolle): nicht-transduzierte Zellen; dunkelgelbe Säule (GFP): Zellen transduziert mit GFP (Kontrolle für Virus); schwarze Säule (αSyn): αSyn-überexprimierende Zellen ohne Behandlung; rote Säule (αSyn + **2b**): αSyn-überexprimierende Zellen behandelt mit **2b**; blaue Säule (αSyn + **2e**): αSyn-überexprimierende Zellen behandelt mit **2e**. Daten sind Mittelwerte (± SEM) aus 3 Assays (je n = 3). Statistische Signifikanz wurde mittels einseitiger ANOVA und anschließendem Dunnett-Test für Mehrfachvergleiche ermittelt; p-Werte wie angegeben. e–g) MCIPs blockieren die Kreuznukleation der αSyn-Amyloidbildung durch fAβ42. Fibrillenbildung von αSyn (3 μM) alleine oder nach Kreuznukleation durch fAβ42 (20%) alleine oder mit **2b** und **2e** (1/1) bestimmt mittels des ThT-Bindungsassays; Daten der fAβ42-Nukleationskeimen (0.6 μM) ebenfalls gezeigt zum Vergleich; Daten sind Mittelwerte (± SD), 3 Assays (je n = 3) (e); TEM-Bilder der 7 Tage gealterten Lösungen aus (e) (Maßstab, 100 nm) (f); PC12-Zellviabilität nach Behandlung mit 7 Tage gealterten Lösungen aus (e) bestimmt mittels des MTT-Reduktionsassays (Mittelwerte (± SD), 3 Assays (je n = 3)) (g). P-Werte < 0.05 wurden als signifikant betrachtet.

menhang wurde berichtet, dass intermolekulare Wechselwirkungen von αSyn(1–11) oder αSyn(1–20) mit dem C-terminalen Teil αSyn(96–140) von αSyn-Oligomeren oder -Fibrillen die αSyn-Amyloidbildung auslösen können; im Gegensatz dazu sollen intramolekulare Wechselwirkungen zwischen den N- und C-Termini αSyn-Monomere vor Aggregation schützen.^[28a,b,d,e,m] Weiterhin wurde αSyn(36–42), bekannt als “P1”, als “master controller” der αSyn-Amyloidselfassemblierung

vorgeschlagen, während αSyn(45–57), bekannt als “P2” oder “pre-NAC” Region (αSyn(45–56)), ein zusätzlicher Schlüsselregulator der αSyn Amyloidbildung ist.^[28f,k] Auch wurden Teile von αSyn(34–52) als Vermittler von αSyn-Interaktionen mit diversen Amyloidmodulatoren einschließlich rational designter Peptide/Proteine und niedermolekularer Wirkstoffen identifiziert.^[8b,c,28g,29b] Abschließend sind die MCIP- und IAPP-bindenden Segmente αSyn(34–52) und αSyn(87–105) in

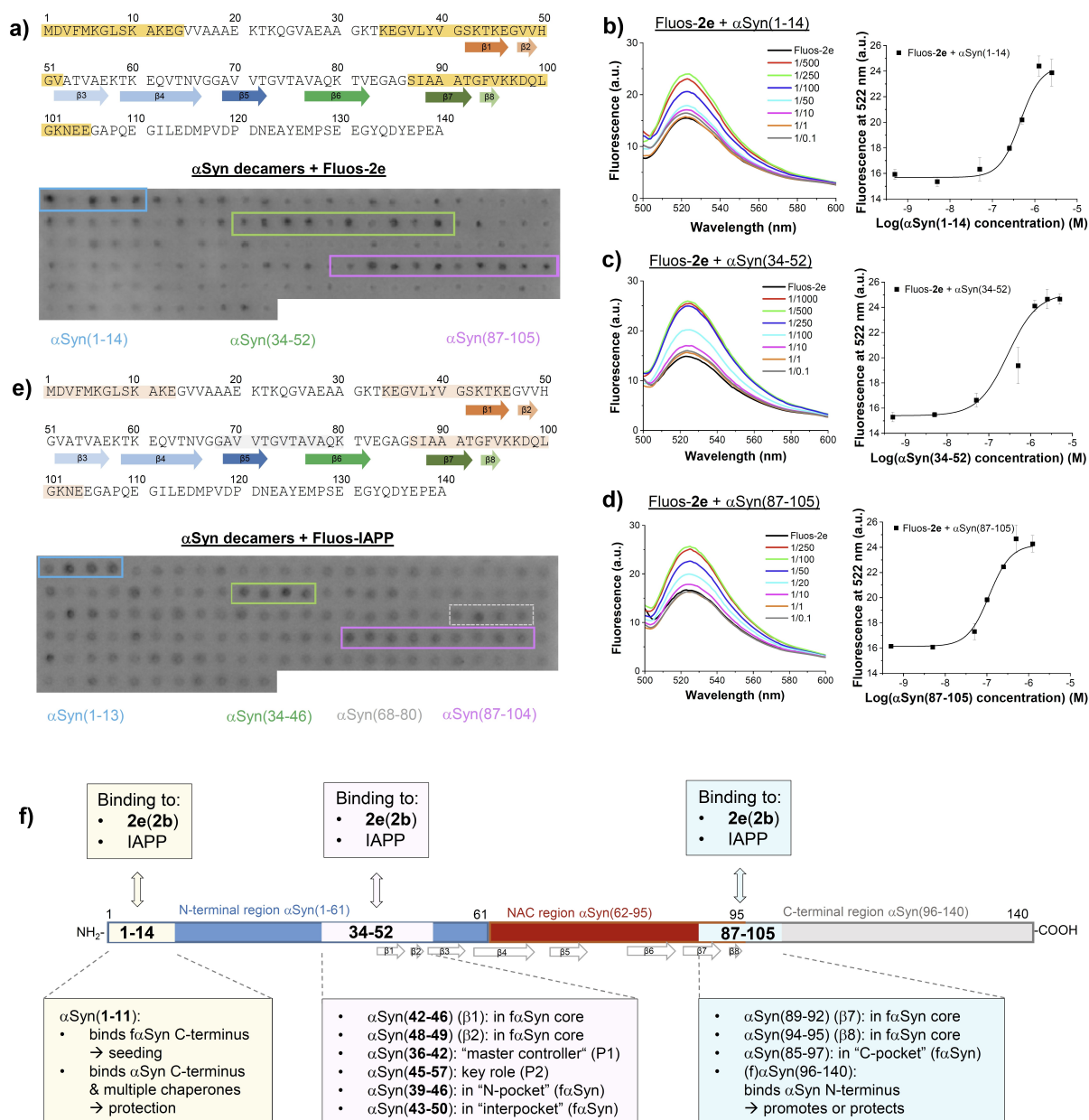


Abbildung 5. Identifizierung der α Syn-Segmente, die seine Wechselwirkungen mit MCIPs und IAPP vermitteln, mittels synthetischer Peptidarrays (a, e), Bestimmung der Bindungsaffinitäten mittels fluoreszenzspektroskopischer Titrations (b–d) und schematische Übersicht von wichtigen Bindungsregionen von α Syn und ihrer Funktionen (f). a) Identifizierung der Schlüsselregionen von α Syn, die mit **2e** interagieren, mittels Peptidarrays. Oben, α Syn-Sequenz; identifizierte Bindungsregionen in orangefarbenen Rechtecken wie angegeben; farbige Pfeile deuten β -Stränge β 1– β 8 der α Syn-Struktur von Guerreiro-Ferreira et al.^[27] an. Unten, Peptidarray mit α Syn-Dekameren nach Inkubation mit Fluos-2e (1 μ M). Das gebundene Peptid wurde mittels Fluoreszenz visualisiert; identifizierte Fluos-2e-bindende α Syn-Segmente α Syn(1–14), α Syn(34–52) und α Syn(87–105) in farbigen Rechtecken. Array ist repräsentativ für 2 Arrays, die parallel synthetisiert wurden, und 2 unabhängige Inkubationen mit Fluos-2e (Abb. S21). b–d) Bestimmung der app. K_d s der Fluos-2e Wechselwirkung mit den identifizierten 2e-bindenden α Syn-Segmenten mittels fluoreszenzspektroskopischer Titrations. Links, Fluoreszenzemissionsspektren von Fluos-2e alleine (5 nM) oder mit verschiedenen molaren Verhältnissen zu α Syn(1–14) (b), α Syn(34–52) (c) und α Syn(87–105) (d) (Fluos-2e/Peptid wie angegeben). Spektren aus 1 repräsentativen Assay von insgesamt 3. Rechts, Bindungskurven; Daten sind Mittelwerte ($\pm$ SD) aus 3 Assays (siehe Tabelle 2). e) Identifizierung der α Syn-Schlüsselregionen, die mit IAPP interagieren, mittels Peptidarrays. Oben, α Syn-Sequenz; IAPP-bindende α Syn-Regionen in Rosa (starke Bindung) oder Grau (schwächere Bindung) hervorgehoben; farbige Pfeile wie in (a).^[27] Unten, Peptidarray mit α Syn Dekameren (wie in (a)) nach Inkubation mit Fluos-IAPP (1 μ M). Identifizierte 3 Fluos-IAPP-bindende α Syn-Hauptsegmente α Syn(1–13), α Syn(34–46) und α Syn(87–104) in farbigen Rechtecken (aus durchgezogenen Linien); schwächer bindendes Segment α Syn(68–80) in Rechteck aus gestrichelter Linie. Array ist repräsentativ aus 2 Arrays, die parallel synthetisiert wurden und 2 unabhängigen Inkubationen mit Fluos-IAPP (Abb. S23). f) Schematische Übersicht der 3 identifizierten α Syn-Schlüsselsegmente, die seine Wechselwirkung mit **2e**, **2b**, und IAPP vermitteln, und zuvor berichtete verwandte α Syn-Schlüsselsegmente.^[23b,27–28] Weiße Pfeile zeigen β -Stränge β 1– β 8 der α Syn-Struktur von Guerreiro-Ferreira et al.^[27]

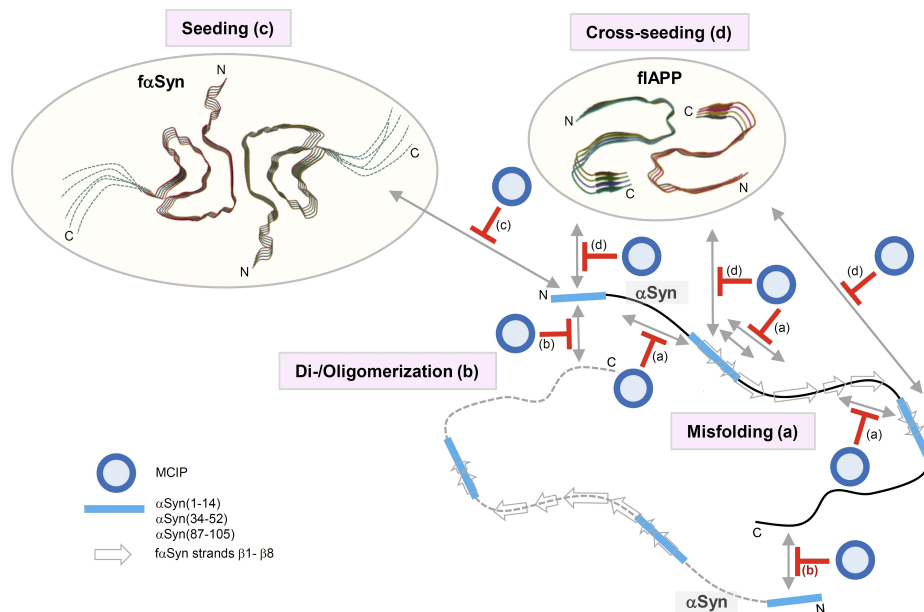
3 von 4 vor Kurzem identifizierten α Syn-Bindungstaschen enthalten.^[28]

Die ausgeprägte hemmende Wirkung der MCIPs, sowohl auf die selbstinduzierte als auch die fIAPP-Kreuznukleation der α Syn-Amyloidbildung wird daher vermutlich durch ihre hochaffinen Wechselwirkungen mit α Syn über 3 α Syn-Segmente vermittelt. Letztere befinden sich in Regionen, die entscheidend für die α Syn-Amyloidbildung sind und hier ebenfalls als Schlüsselstellen ihrer Kreuzinteraktion mit IAPP identifiziert wurden (Schema 2).

Zusammen mit Ergebnissen anderer deuten unsere Befunde daraufhin, dass die Bindung der MCIPs an mehreren α Syn-Stellen Wechselwirkungen blockiert, welche der α Syn-Fehlfaltung in zelltoxische Di-/Oligomere und der (Selbst-)Nukleation bzw. der fIAPP-vermittelten Kreuznukleation der α Syn-Amyloidselfassemblierung zugrundeliegen. Sie sind im Einklang mit dem Vorschlag, dass die Bindung an mehrere α Syn-Stellen eine wichtige Voraussetzung für eine effektive Anti-Amyloid-Funktion ist (Schema 2).^[22a,23b,27–28] Darüber hinaus deuten unsere Befunde darauf hin, dass die Fähigkeit der MCIPs IAPP-Regionen nachzuahmen, die IAPP/ α Syn-Kreuzwechselwirkungen vermitteln, dem *multi-site targeting* von α Syn zugrunde liegt und unterstützen den Vorschlag, dass gemeinsame molekulare Erkennungsmerkmale von A β , IAPP und α Syn bestehen, welche ausgenutzt werden können, um multifunktionale Anti-Amyloid-Moleküle zu entwickeln.^[7d,11,23b,29b,32]

Schlussfolgerungen

Hier zeigen wir, dass die makrozyklischen Peptide **2b** und **2e**, die entworfen wurden, um die IAPP-Selbst-/Kreuzinteraktionsstellen nachzuahmen und zuvor als wirkungsvolle Inhibitoren der Amyloidbildung von IAPP und/oder Amyloid- β -Peptid (A β) der Alzheimer-Erkrankung (AD) identifiziert wurden, auch nanomolare Inhibitoren der Selbst- und der IAPP-vermittelten Kreuznukleation der α Syn-Amyloidbildung sind. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass ihre Anti-Amyloid-Funktion durch Wechselwirkungen nanomolarer Affinität mit α Syn über drei α Syn-Segmente vermittelt wird. Diese wurden als Schlüsselstellen sowohl für die α Syn-Selbst- als auch für seine Kreuzinteraktionen mit IAPP identifiziert. Außerdem zeigen wir, dass **2b** und **2e** auch in der Lage sind, die A β 42-vermittelte Kreuznukleation der α Syn-Amyloidogenese zu blockieren. Aufgrund ihres breiten amyloidinhibitorischen Wirkungsspektrums und zusätzlicher wirkstoffähnlicher Eigenschaften sind diese makrozyklischen Peptide vielversprechende Leitstrukturen für multifunktionale Anti-Amyloid-Wirkstoffe gegen PD, T2D, AD und ihre Komorbiditäten; Untersuchungen in Tiermodellen sind nun ein wichtiger nächster Schritt. Darüber hinaus dienen die identifizierten α Syn-Schlüsselsegmente als wertvolle Zielstrukturen für die Entwicklung neuartiger, auf mehreren α Syn-Stellen abzielende Moleküle, als effektive Anti-Amyloid-Wirkstoffe gegen PD und verwandte Synucleinopathien.



Schema 2. Schematischer Überblick des vorgeschlagenen *multi-site-targeting*-Mechanismus der hemmenden Funktion von MCIPs sowohl auf die selbst- als auch die fIAPP-vermittelten Kreuznukleation der α Syn-Amyloidbildung. Hochaffine Bindung der MCIPs (blaue Kreise) an die 3 identifizierten α Syn-Schlüsselstellen blockieren entscheidende α Syn-Wechselwirkungen mit α Syn, f α Syn und (f)IAPP, die zuvor ((a)-(c))^[22a,23b,27–28] oder in dieser Arbeit gefunden wurden (d), der α Syn-Fehlfaltung (a), α Syn-Di-/Oligomerisierung (b), Nucleation der α Syn-Amyloidbildung durch f α Syn (c) und der Kreuznukleation der α Syn-Amyloidbildung durch fIAPP (d) zugrunde zu liegen (Ereignisse (a)-(d) in rosa Rechtecken). Die α Syn-Monomere sind in intrinsisch ungeordnetem Zustand gezeigt; blaue Balken, identifizierte α Syn-Schlüsselsegmente; graue Pfeile, β -Strang-bildende Regionen in der f α Syn-Struktur von Guerrero-Ferreira et al.;^[27] das f α Syn-Modell ist eine abgeänderte Version der f α Syn-Struktur von Guerrero-Ferreira et al.;^[27] das fIAPP-Modell ist die fIAPP-Struktur von Roeder et al.^[31]

Danksagung

Diese Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation) Förderung SFB1035 B06 an A.K. im Rahmen des Sonderforschungsbezirks SFB1035 (Projektnummer 201302640) gefördert. R.F., J.B., G.H. und T.K. wurden durch die DFG in Deutschlands Exzellenzstrategie im Rahmen des *Munich Cluster for Systems Neurology* (EXC 2145 SyNergy-ID 390857198) gefördert. G.H. und T.K. wurden außerdem durch das JPND-Konsortium, SynOD „alpha-Synuclein OMICS to identify Drug-targets“ (gefördert durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung, BMBF, 01ED2405 A) finanziert. S.H. wurde durch ein Stipendium der Studienstiftung des Deutschen Volkes e. V. gefördert. Wir danken C. Peters und der verstorbenen S. Weinkauf für ihre Hilfe mit TEM. Wir danken dem Bayerischen Zentrum für Biomolekulare Massenspektrometrie (BayBioMS) der TUM School of Life Science und der Massenspektrometrie Anlage der TUM School of Natural Sciences für den Zugang zu MALDI und ESI-Massenspektrometrie und Unterstützung. Wir danken K. Hille, J. Jekel, C. Kontos, und A. Calzi für massenspektrometrische Messungen. Wir danken K. Hille, A. Grammatikopoulos, A. Pena-Vaquero, A. Seidler, und J. Jekel für Peptidsynthese und Reinigung. Wir danken K. Tas, V. Armiento, K. Hille, und C. Kontos für ihre Beiträge zur Synthese der Peptidarrays und C. Krammer, S. Gerra, und B. Yang für die Immobilisierung von Peptidarrays auf Glaträgern oder deren Entwicklung. Wir danken H. Ji und O. Gokce für die anti-2e-Antikörper-Validierung. Wir danken J. Buchner und anderen Mitgliedern des SFB1035 für wertvolle Diskussionen und Unterstützung. Open Access Veröffentlichung ermöglicht und organisiert durch Projekt DEAL.

Interessenkonflikt

Potential conflict of interest: A. Spanopoulou, L. Heidrich, J. Bernhagen, and A. Kapurniotu are co-inventors of a European Patent Application and an US Patent No. US 11, 498,943 (by TUM) related to the macrocyclic peptides of our manuscript and potential biomedical applications in AD and T2D. In addition, S. Hornung and A. Kapurniotu are co-inventors in a European Patent Application filled by TUM in 2024 related to the peptides of the manuscript and potential biomedical applications in PD, synucleinopathies, and comorbidities. The remaining authors declare no competing interests.

Erklärung zur Datenverfügbarkeit

Die Daten, die die Ergebnisse dieser Studie unterstützen, sind auf begründete Anfrage beim Autor erhältlich.

Stichwörter: α -Synuclein · Proteinwechselwirkungen · Kreuznukleation · Selbstassemblierung · Amyloidinhibitor

- [1] a) P. C. Ke, R. Zhou, L. C. Serpell, R. Riek, T. P. J. Knowles, H. A. Lashuel, E. Gazit, I. W. Hamley, T. P. Davis, M. Fandrich, D. E. Otzen, M. R. Chapman, C. M. Dobson, D. S. Eisenberg, R. Mezzenga, *Chem. Soc. Rev.* **2020**, *49*, 5473–5509; b) F. Chiti, C. M. Dobson, *Annu. Rev. Biochem.* **2017**, *86*, 27–68.
- [2] a) H. A. Lashuel, C. R. Overk, A. Oueslati, E. Masliah, *Nat. Rev. Neurosci.* **2013**, *14*, 38–48; b) S. Neupane, E. De Cecco, A. Aguzzi, *J. Mol. Biol.* **2023**, *435*, 167930.
- [3] P. Westermark, A. Andersson, G. T. Westermark, *Physiol. Rev.* **2011**, *91*, 795–826.
- [4] a) D. Athauda, J. Evans, A. Wernick, G. Virdi, M. L. Choi, M. Lawton, N. Vijiaratnam, C. Girges, Y. Ben-Shlomo, K. Ismail, H. Morris, D. Grosset, T. Foltynie, S. Gandhi, *J. Mov. Disord.* **2022**, *37*, 1612–1623; b) C. M. Labandeira, A. Fraga-Bau, D. Arias Ron, E. Alvarez-Rodriguez, P. Vicente-Alba, J. Lago-Garma, A. I. Rodriguez-Perez, *Neural Regen. Res.* **2022**, *17*, 1652–1658; c) Y. Q. Lv, L. Yuan, Y. Sun, H. W. Dou, J. H. Su, Z. P. Hou, J. Y. Li, W. Li, *Transl. Neurodegener.* **2022**, *11*, 14.
- [5] a) I. Horvath, P. Wittung-Stafshede, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, 12473–12477; b) T. Werner, I. Horvath, P. Wittung-Stafshede, *J. Parkinsons Dis.* **2020**, *10*, 819–830; c) L. Meng, Y. Li, C. Liu, G. Zhang, J. Chen, M. Xiong, L. Pan, X. Zhang, G. Chen, J. Xiong, C. Liu, X. Xu, L. Bu, Z. Zhang, Z. Zhang, *Prog. Neurobiol.* **2023**, *226*, 102462; d) I. Martinez-Valbuena, I. Amat-Villegas, R. Valenti-Azcarate, M. D. M. Carmona-Abellan, I. Marcilla, M. T. Tunon, M. R. Luquin, *Acta Neuropathol.* **2018**, *135*, 877–886.
- [6] a) F. Bassil, H. J. Brown, S. Pattabhiraman, J. E. Iwasyk, C. M. Maghames, E. S. Meymand, T. O. Cox, D. M. Riddle, B. Zhang, J. Q. Trojanowski, V. M. Lee, *Neuron* **2023**, *111*, 3699; b) M. B. Fares, B. Maco, A. Oueslati, E. Rockenstein, N. Ninkina, V. L. Buchman, E. Masliah, H. A. Lashuel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, E912–921.
- [7] a) P. Joshi, M. Vendruscolo, *Adv. Exp. Med. Biol.* **2015**, *870*, 383–400; b) H. Lu, Q. Zhou, J. He, Z. Jiang, C. Peng, R. Tong, J. Shi, *Signal Transduct. Target Ther.* **2020**, *5*, 213; c) J. A. Wells, C. L. McClendon, *Nature* **2007**, *450*, 1001–1009; d) V. Armiento, A. Spanopoulou, A. Kapurniotu, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2020**, *59*, 3372–3384.
- [8] a) H. Grosso Jasutkar, S. E. Oh, M. M. Mouradian, *Pharmacol. Rev.* **2022**, *74*, 207–237; b) S. G. Allen, R. M. Meade, L. L. White Stenner, J. M. Mason, *Mol. Neurodegener.* **2023**, *18*, 80; c) S. Pena-Diaz, J. Garcia-Pardo, S. Ventura, *Pharmaceutica* **2023**, *15*.
- [9] a) A. A. Vinogradov, Y. Yin, H. Suga, *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 4167–4181; b) M. Muttenthaler, G. F. King, D. J. Adams, P. F. Alewood, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2021**, *20*, 309–325; c) X. Ji, A. L. Nielsen, C. Heinis, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2024**, *63*, e202308251; d) H. Zhang, S. Chen, *RSC Chem Biol* **2022**, *3*, 18–31.
- [10] D. Goyal, S. Shuaib, S. Mann, B. Goyal, *ACS Comb. Sci.* **2017**, *19*, 55–80.
- [11] A. Spanopoulou, L. Heidrich, H. R. Chen, C. Frost, D. Hrle, E. Malideli, K. Hille, A. Grammatikopoulos, J. Bernhagen, M. Zacharias, G. Rammes, A. Kapurniotu, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2018**, *57*, 14503–14508.
- [12] E. Andreetto, E. Malideli, L. M. Yan, M. Kracklauer, K. Farbiarz, M. Tatarek-Nossol, G. Rammes, E. Prade, T. Neumuller, A. Caporale, A. Spanopoulou, M. Bakou, B. Reif, A. Kapurniotu, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2015**, *54*, 13095–13100.
- [13] M. Bakou, K. Hille, M. Kracklauer, A. Spanopoulou, C. V. Frost, E. Malideli, L. M. Yan, A. Caporale, M. Zacharias, A. Kapurniotu, *J. Biol. Chem.* **2017**, *292*, 14587–14602.
- [14] a) L. M. Yan, A. Velkova, M. Tatarek-Nossol, E. Andreetto, A. Kapurniotu, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2007**, *46*, 1246–

- 1252; b) K. Tas, B. D. Volta, C. Lindner, O. El Bounkari, K. Hille, Y. Tian, X. Puig-Bosch, M. Ballmann, S. Hornung, M. Ortnier, S. Prem, L. Meier, G. Rammes, M. Haslbeck, C. Weber, R. T. A. Megens, J. Bernhagen, A. Kapurniotu, *Nat. Commun.* **2022**, *13*, 5004; c) A. Velkova, M. Tatarek-Nossol, E. Andreetto, A. Kapurniotu, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2008**, *47*, 7114–7118; d) L. M. Yan, A. Velkova, M. Tatarek-Nossol, G. Rammes, A. Sibaev, E. Andreetto, M. Kracklauer, M. Bakou, E. Malideli, B. Goke, J. Schirra, M. Storr, A. Kapurniotu, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2013**, *52*, 10378–10383; e) P. Krotee, S. L. Griner, M. R. Sawaya, D. Cascio, J. A. Rodriguez, D. Shi, S. Philipp, K. Murray, L. Saelices, J. Lee, P. Seidler, C. G. Glabe, L. Jiang, T. Gonen, D. S. Eisenberg, *J. Biol. Chem.* **2018**, *293*, 2888–2902.
- [15] a) E. Andreetto, L. M. Yan, M. Tatarek-Nossol, A. Velkova, R. Frank, A. Kapurniotu, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2010**, *49*, 3081–3085; b) J. J. Wiltzius, S. A. Sievers, M. R. Sawaya, D. Eisenberg, *Protein Sci.* **2009**, *18*, 1521–1530.
- [16] M. R. Eftink, in *Methods in Enzymology: Fluorescence Spectroscopy*, Vol. 278 (Eds.: L. Brand, M. L. Johnson), Academic Press, San Diego, **1997**, pp. 221–257.
- [17] E. Andreetto, L. M. Yan, A. Caporale, A. Kapurniotu, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 1313–1322.
- [18] M. Tornquist, T. C. T. Michaels, K. Sanagavarapu, X. Yang, G. Meisl, S. I. A. Cohen, T. P. J. Knowles, S. Linse, *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 8667–8684.
- [19] L. M. Yan, M. Tatarek-Nossol, A. Velkova, A. Kazantzis, A. Kapurniotu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 2046–2051.
- [20] Z. Niu, E. Prade, E. Malideli, K. Hille, A. Jussupow, Y. G. Mideksa, L. M. Yan, C. Qian, M. Fleisch, A. C. Messias, R. Sarkar, M. Sattler, D. C. Lamb, M. J. Feige, C. Camilloni, A. Kapurniotu, B. Reif, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2020**, *59*, 5771–5781.
- [21] a) S. T. Kumar, S. Donzelli, A. Chiki, M. M. K. Syed, H. A. Lashuel, *J. Neurochem.* **2020**, *153*, 103–119; b) N. Lorenzen, S. B. Nielsen, A. K. Buell, J. D. Kaspersen, P. Arosio, B. S. Vad, W. Paslawski, G. Christiansen, Z. Valnickova-Hansen, M. Andreassen, J. J. Enghild, J. S. Pedersen, C. M. Dobson, T. P. Knowles, D. E. Otzen, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 3859–3868; c) B. Fauvet, M. K. Mbefo, M. B. Fares, C. Desobry, S. Michael, M. T. Ardah, E. Tsika, P. Coune, M. Prudent, N. Lion, D. Eliezer, D. J. Moore, B. Schneider, P. Aebischer, O. M. El-Agnaf, E. Masliah, H. A. Lashuel, *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 15345–15364.
- [22] a) G. Fusco, S. W. Chen, P. T. F. Williamson, R. Cascella, M. Perni, J. A. Jarvis, C. Cecchi, M. Vendruscolo, F. Chiti, N. Cremades, L. Ying, C. M. Dobson, A. De Simone, *Science* **2017**, *358*, 1440–1443; b) R. Cascella, S. W. Chen, A. Bigi, J. D. Camino, C. K. Xu, C. M. Dobson, F. Chiti, N. Cremades, C. Cecchi, *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 1814.
- [23] a) R. Kaye, E. Head, J. L. Thompson, T. M. McIntire, S. C. Milton, C. W. Cotman, C. G. Glabe, *Science* **2003**, *300*, 486–489; b) M. Chemerovskii-Glikman, E. Rozentur-Shkop, M. Richman, A. Grupi, A. Getler, H. Y. Cohen, H. Shaked, C. Wallin, S. K. Warmlander, E. Haas, A. Graslund, J. H. Chill, S. Rahimipour, *Chemistry* **2016**, *22*, 14236–14246.
- [24] a) M. J. Diogenes, R. B. Dias, D. M. Rombo, H. Vicente Miranda, F. Maiolino, P. Guerreiro, T. Nasstrom, H. G. Franquelim, L. M. Oliveira, M. A. Castanho, L. Lannfelt, J. Bergstrom, M. Ingelsson, A. Quintas, A. M. Sebastiao, L. V. Lopes, T. F. Outeiro, *J. Neurosci.* **2012**, *32*, 11750–11762; b) F. van Diggele, D. Hrle, M. Apetri, G. Christiansen, G. Rammes, A. Tepper, D. E. Otzen, *PLoS One* **2019**, *14*, e0213663.
- [25] a) M. Hollerhage, J. N. Goebel, A. de Andrade, T. Hildebrandt, A. Dolga, C. Culmsee, W. H. Oertel, B. Hengerer, G. U. Hoglinger, *Neurobiol. Aging* **2014**, *35*, 1700–1711; b) M. Hollerhage, C. Moebius, J. Melms, W. H. Chiu, J. N. Goebel, T. Chakroun, T. Koeglsperger, W. H. Oertel, T. W. Rosler, M. Bickle, G. U. Hoglinger, *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 11469.
- [26] F. Bassil, H. J. Brown, S. Pattabhiraman, J. E. Iwasysk, C. M. Maghames, E. S. Meymand, T. O. Cox, D. M. Riddle, B. Zhang, J. Q. Trojanowski, V. M. Lee, *Neuron* **2020**, *105*, 260–275e266.
- [27] R. Guerrero-Ferreira, N. M. Taylor, D. Mona, P. Ringler, M. E. Lauer, R. Riek, M. Britschgi, H. Stahlberg, *eLife* **2018**, *7*.
- [28] a) S. D. Khare, P. Chinchilla, J. Baum, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2023**, *80*, 102579; b) X. Yang, B. Wang, C. L. Hoop, J. K. Williams, J. Baum, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2021**, *118*; c) J. K. Williams, X. Yang, T. B. Atieh, M. P. Olson, S. D. Khare, J. Baum, *J. Mol. Biol.* **2018**, *430*, 2360–2371; d) P. Kumari, D. Ghosh, A. Vanas, Y. Fleischmann, T. Wiegand, G. Jeschke, R. Riek, C. Eichmann, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2021**, *118*; e) R. P. McGlinchey, X. Ni, J. A. Shadish, J. Jiang, J. C. Lee, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2021**, *118*; f) C. P. A. Doherty, S. M. Ulamec, R. Maya-Martinez, S. C. Good, J. Makepeace, G. N. Khan, P. van Oosten-Hawle, S. E. Radford, D. J. Brockwell, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2020**, *27*, 249–259; g) E. A. Mirecka, H. Shaykhalishahi, A. Gauhar, S. Akgul, J. Lecher, D. Willbold, M. Stoldt, W. Hoyer, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2014**, *53*, 4227–4230; h) E. D. Agerschou, P. Flagmeier, T. Saridakis, C. Galvagnon, D. Komnig, L. Heid, V. Prasad, H. Shaykhalishahi, D. Willbold, C. M. Dobson, A. Voigt, B. Falkenburger, W. Hoyer, A. K. Buell, *eLife* **2019**, *8*; i) Y. Tao, W. Xia, Q. Zhao, H. Xiang, C. Han, S. Zhang, W. Gu, W. Tang, Y. Li, L. Tan, D. Li, C. Liu, *Nat. Chem. Biol.* **2023**, *19*, 1235–1245; j) B. Li, P. Ge, K. A. Murray, P. Sheth, M. Zhang, G. Nair, M. R. Sawaya, W. S. Shin, D. R. Boyer, S. Ye, D. S. Eisenberg, Z. H. Zhou, L. Jiang, *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 3609; k) S. M. Ulamec, R. Maya-Martinez, E. J. Byrd, K. M. Dewison, Y. Xu, L. F. Willis, F. Sobott, G. R. Heath, P. van Oosten-Hawle, V. L. Buchman, S. E. Radford, D. J. Brockwell, *Nat. Commun.* **2022**, *13*, 4986; l) G. Fusco, A. De Simone, T. Gopinath, V. Vostrikov, M. Vendruscolo, C. M. Dobson, G. Veglia, *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 3827; m) B. M. Burmann, J. A. Gerez, I. Matecko-Burmann, S. Campioni, P. Kumari, D. Ghosh, A. Mazur, E. E. Aspholm, D. Sulskis, M. Wawrzyniuk, T. Bock, A. Schmidt, S. G. D. Rudiger, R. Riek, S. Hiller, *Nature* **2020**, *577*, 127–132.
- [29] a) H. Shaykhalishahi, A. Gauhar, M. M. Wordehoff, C. S. Gruning, A. N. Klein, O. Bannach, M. Stoldt, D. Willbold, T. Hard, W. Hoyer, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2015**, *54*, 8837–8840; b) H. Shaykhalishahi, E. A. Mirecka, A. Gauhar, C. S. Gruning, D. Willbold, T. Hard, M. Stoldt, W. Hoyer, *ChemBioChem* **2015**, *16*, 411–414.
- [30] E. Cholak, K. Bugge, A. Khondker, K. Gauger, E. Pedraz-Cuesta, M. E. Pedersen, S. Bucciarelli, B. Vestergaard, S. F. Pedersen, M. C. Rheinstadter, A. E. Langkilde, B. B. Krage-lund, *FASEB J.* **2020**, *34*, 7462–7482.
- [31] C. Roder, T. Kupreichyk, L. Gremer, L. U. Schafer, K. R. Pothula, R. B. G. Ravelli, D. Willbold, W. Hoyer, G. F. Schroder, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2020**, *27*, 660–667.
- [32] A. Frydman-Marom, R. Shaltiel-Karyo, S. Moshe, E. Gazit, *Amyloid* **2011**, *18*, 119–127.

Manuskript erhalten: 23. November 2024

Akzeptierte Fassung online: 17. Januar 2025

Endgültige Fassung online: 31. Januar 2025