

Aggregation, Struktur und pathologische Wirkung
des Amyloid- β Peptides:
die Rolle des GxxxG-Motivs

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Anja Harmeier
aus München

November 2008

Die vorliegende Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Gerd Multhaup am
Institut für Chemie und Biochemie des Fachbereichs Biologie, Chemie und
Pharmazie der Freien Universität Berlin angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Gerd Multhaup
 2. Gutachter: Prof. Dr. Dietmar Kuhl
- Disputation am: 17.12.2008

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	6
1.1	Die Alzheimer Krankheit	6
1.2	Das Amyloid Vorläufer Protein (APP)	7
1.3	Die APP Prozessierung	9
1.4	Das A β -Peptid	12
1.5	Das GxxxG-Motiv	17
1.6	Zielsetzung	19
2.	Ergebnisse	20
2.1	Charakterisierung verschiedener A β Spezies	20
2.1.1	Oligomerisierung der A β Spezies	20
2.1.2	Toxizität der A β Spezies	21
2.2	Einfluss des GxxxG-Motivs auf das Aggregationsverhalten von A β 42	22
2.2.1	Analyse der Oligomerisierung verschiedener A β 42 Peptide	23
2.2.2	Western-Blot Analyse der verschiedenen oligomer Formen von A β 42 wt und GxxxG-Varianten	26
2.2.3	Analyse der Fibrillenbildung verschiedener A β 42 Peptide	27
2.3	Einfluss des GxxxG-Motivs auf die Struktur von A β 42	31
2.3.1	Sekundärstrukturanalyse der verschiedenen A β 42 Peptide mittels Circular dichroismus	32
2.3.2	Tertiärstrukturanalyse der verschiedenen A β 42 Peptide mittels limitierter Proteolyse	33
2.3.3	Computergestütztes Modell der verschiedenen A β 42 Peptide	35
2.4	Einfluss des GxxxG-Motivs auf die pathologische Wirkung von A β 42	38
2.4.1	Analyse der Einwirkung der verschiedenen A β 42 Peptide auf die A β 42 vermittelte Toxizität	38
2.4.2	Analyse der Einwirkung der verschiedenen A β 42 Peptide auf die A β 42 vermittelte LTP Inhibition	43
2.4.3	Analyse der Wirkung der verschiedenen A β 42 Peptide auf NMDA und AMPA Rezeptoren	47
3.	Diskussion	51
3.1	Nur A β 42 und keine kürzeren Spezies sind toxisch	51
3.2	Aggregationsverhalten der A β 42 wt und GxxxG-Austauschpeptide	52
3.3	Struktur der A β 42 wt und GxxxG-Austauschpeptide	53
3.4	Toxizität der A β 42 wt und GxxxG-Austauschpeptide	55
3.5	LTP Inhibition durch A β 42 wt und GxxxG-Austauschpeptide	57

3.6 Einfluss von Ab42 wt und GxxxG-Austauschpeptide auf die basale synaptische Transmission	58
3.7 Effekte des A β 42 Peptids auf die Genregulation	59
3.8 Der Wirkungsmechanismus des A β 42	61
4. Zusammenfassung	63
Summary	65
5. Material	67
5.1 Zelllinien und Nährmedien	67
5.2 Bakterienstämme und Nährmedien	67
5.3 Plasmid-Vektoren und Konstrukte	68
5.4 Antisera und Antikörper	68
5.5 „Kits“	69
5.6 Allgemeine Verbrauchsmaterialien	70
5.7 Pufferlösungen	70
5.8 Geräte	70
5.8.1 Elektrophorese und Elektrophoretogramm	70
5.8.2 Zellkultur	70
5.8.3 Zentrifugen	71
5.8.4 Chromatographie	71
5.8.5 Sonstige Geräte	71
5.9 Software	72
6. Methoden	73
6.1 Molekularbiologische Methoden	73
6.1.1 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	73
6.1.2 Zielgerichtete Mutagenese	73
6.1.3 Herstellung und Transformation kompetenter Zellen	74
6.1.4 Plasmidpräparationen und Konzentrationsbestimmung von DNA	75
6.2 Proteinbiochemische Methoden	75
6.2.1 Peptidsynthese	75
6.2.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen	76
6.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	77
6.2.4 Coomassie Färbung	77
6.2.5 Western-Blot	78
6.2.5.1 Proteintransfer auf Nitrozellulosemembran	81
6.2.5.2 Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulosemembran	81
6.2.5.3 Proteintransfer auf Nitrozellulosemembran mittels "Dot-Blot"	81
6.2.6 Limitierte Proteolyse	79

6.2.7	Größenausschlusschromatographie	80
6.2.8	Messung des Circulardichroismus von A β Peptiden	81
6.2.9	Aufreinigung von A β Peptiden aus E.coli	82
6.3	Bildgebende Verfahren: Elektronenmikroskopie und Rasterkraftmikroskopie	83
6.4	In vitro und in vivo Toxizitätstest	83
6.5	Computer unterstütztes Modell	85
6.6	Elektrophysiologische Methoden	86
6.6.1	Präparation der akuten Hippocampalen Schnitte	86
6.6.2	Langzeit Potenzierung der Schaffer-Kollateralen Synapse	86
6.6.3	Messung NMDA/AMPA vermittelte Feldpotentiale	88
6.7	Zellbiologische Methoden	89
6.7.1	Verwendete Zelllinie	89
6.7.2	Transfektion und Lyse der Zellen	89
6.7.3	Kernpräparation	90
6.7.4	Einfrieren der Zellen	91
6.8	Statistische Analysen	91
7.	Abkürzungen	92
8.	Literaturverzeichnis	95
9.	Anhang	111
9.1	Veröffentlichungen	111
9.2	Lebenslauf	113
9.3	Danksagung	114
9.4	Erklärung	115

1. Einleitung

1.1 Die Alzheimer Krankheit

Im Jahre 1906 beschrieb der Nervenarzt Alois Alzheimer (1864-1915) erstmals die später nach ihm benannte Erkrankung (Alzheimer, 1907). In den Hirnschnitten seiner im Alter von nur 51 Jahren verstorbenen Patientin Auguste Deter (1855-1906) fand Alzheimer extrazelluläre Plaques als histologisch auffällige Ablagerungen.

Heute ist bekannt, dass die Plaques aus Amyloid- β (A β)-Peptiden (Glenner et al., 1984; Masters and Beyreuther, 1989) bestehen, die für die neuronale Degeneration (Klein et al., 2001) ursächlich sind und sich in bestimmten Gehirnregionen wie beispielsweise Cortex, Hippocampus, Amygdala und dem basalen Vorderhirn (Sisodia, 1999) ablagern.

Im Anfangsstadium der Krankheit zeigen sich erste Symptome, die das Lern- und Erinnerungsvermögen sowie das Denken und Planen beeinträchtigen. Im weiteren Verlauf der Krankheit kommt es zu Wortfindungsstörungen sowie Orientierungsproblemen. Bei einer fortgeschrittenen Demenz führen weitere Verluste kognitiver Leistungen dazu, dass Patienten sich selbst stark vernachlässigen, Familienmitglieder nicht mehr erkennen und die Fähigkeit zur Kommunikation verlieren (<http://www.alz.org/brain>).

Die Anzahl der Erkrankten nimmt stetig zu, so dass heute in Deutschland 0,8 Mio. Alzheimer Kranke leben und die Zahl der Neuerkrankungen Jahr für Jahr um ca. 0,25 Mio. zunimmt (<http://www.deutsche-alzheimer.de>; die Epidemiologie der Demenz: Stand 06/2008). Da die Erkrankung auf Altern beruht, wird es aufgrund der demographischen Entwicklung im Jahre 2050 vermutlich 2,6 Mio. Alzheimerkranke geben.

Neben den sporadischen Erkrankungen im Alter (60-80 Jahre) die ca. 95% der Patienten ausmachen, gibt es auch bei 5% der Patienten genetische Mutationen, die bereits im Alter von 30-50 Jahren zur Alzheimer Erkrankung führen können. Bei diesen so genannten familiären Alzheimerpatienten („familial Alzheimer’s disease“, FAD) liegt die Hauptursache in autosomal dominant vererbten Mutationen auf den Chromosomen 1, 14 und 21 (Robakis et al., 1987) welche die Gene für Presenilin 2 (PS-2), Presenilin 1 (PS-1) sowie das Amyloid Vorläufer Protein (Amyloid precursor protein, APP) kodieren (zur Übersicht der Mutationen: <http://www.alzforum.org/res/com/mut>: Stand 2008), (Citron et al., 1992; Tanzi and Bertram, 2001; Van Broeckhoven, 1989).

Neben den FAD, sind auch einige Risikogene beschrieben worden, die zu einer höheren Wahrscheinlichkeit führen, an Alzheimer zu erkranken. Dazu gehört das ϵ -Allel des Apolipoproteins E codierenden Gens (ApoE ϵ 4) (Poirier et al., 1993; St George-Hyslop, 2000), welches bei 63% der sporadischen erkrankten Alzheimer Patienten zu finden ist (Mahley et al., 2006). Auch erhöhte Cholesterinwerte und der Lipidmetabolismus stellen Risikofaktoren bei der Entstehung der Alzheimer Krankheit dar, denn die Regulierung von ApoE (Siemes et al., 2006) und somit auch von Cholesterin durch „Low-Density Lipoprotein-Receptor related Protein 1“ (LRP1) führen zu einer erhöhten γ -Sekretaseaktivität und somit zu einer erhöhten A β -Produktion (Arelin et al., 2002; Grimm et al., 2007; Grimm et al., 2008; Hartmann et al., 2007; Ulery and Strickland, 2000). Des Weiteren scheinen Allel Varianten des SORLA (SORL1, LR11) Gens an der differentiellen Sortierung von APP beteiligt zu sein. Eine Reduktion des SORLA Proteins erhöht dadurch das Risiko an Alzheimer zu Erkranken (Andersen et al., 2005; Pericak-Vance et al., 1991; Rogaeva et al., 2007; Rohe et al., 2008; Tan et al., 2007).

1.2 Das Amyloid Vorläufer Protein (APP)

Die Grundlage zum Verständnis der Alzheimer Krankheit stellt das ubiquitäre APP Protein dar, welches in unterschiedlichen Geweben, wie z.B. Gehirn, Herz, Milz und Niere exprimiert wird (Tanzi et al., 1988). Die neun beschriebenen Isoformen entstehen durch alternatives Spleißen der Exons 2, 7, 8 und 15 (Tang et al., 2003). Die dabei gebildeten Produkte werden nach der Länge des Proteins benannt. Das sind zum einen die im Gehirn und in peripheren Organen exprimierten Proteinvarianten APP770 und APP751, welche eine zusätzliche Kunitz-Protease-Inhibitor (KPI) Sequenz enthalten und zum anderen das hauptsächlich von Neuronen gebildete APP695.

Das humane APP gehört zu einer Genfamilie von TypI-Transmembranproteinen mit drei bekannten Mitgliedern: das APP sowie die beiden APP ähnlichen Proteine APLP1 und APLP2 (Amyloid precursor like Protein, APLP) (Coulson et al., 2000).

Über den sekretorischen Weg (Buxbaum et al., 1990; Walter et al., 1997; Walter et al., 2000; Weidemann et al., 1989) gelangen die Proteine an die Plasmamembran (Dyrks et al., 1992; Eggert et al., 2004; Weidemann et al., 1989). Unter anderem aus Mausstudien (Heber et al., 2000; Zheng et al., 1995) konnten erste Rückschlüsse auf die Funktion der APP-Proteinfamilie gezogen werden. Sie scheinen eine Rolle in der postnatalen Entwicklung, dem Neuriten- und Axonenwachstum, der Zell-Zell- sowie der Zell-Matrix-

Interaktion und der Signaltransduktion im Zellkern zu spielen (Cao and Sudhof, 2001; Herms et al., 2004; Multhaup, 1994; Wang et al., 2005).

Des Weiteren konnten dem APP bereits einige funktionelle Domänen zugeschrieben werden (Abb. 1). In der Ektodomäne befinden sich zwei Heparin bindende Regionen (eine mit geringer Affinität (AS 96-110) und eine mit hoher Affinität (AS 316-337) (Small et al., 1994)), und eine Kollagenbindestelle (AS 448-465) (Beher et al., 1996), wodurch die Hypothese der Funktion von APP in Zell-Zell sowie der Zell-Matrix-Interaktion unterstrichen wird (Breen et al., 1991; Chen and Yankner, 1991; Siemes et al., 2006). Die positiv geladenen, Heparin bindenden Aminosäuren (AS 99 und 104) werden flankiert von Cysteinen, die eine intramolekulare Disulfidbrücke ausbilden und damit strukturgebend für die so genannte Loop-Region (AS 91-111) sind (Kaden et al., 2008a; Rossjohn et al., 1999). Außerdem finden sich in der APP Ektodomäne zwei Bindestellen für Metallionen, eine für Zink (AS 181-188) (Bush et al., 1993) und eine für Kupfer (Multhaup et al., 1996). Letztere ist aktiv am Kupferexport, und damit an der Regulierung der Kupferhomöostase beteiligt (Treiber et al., 2004). Das am C-Terminus lokalisierte NPXY-Motiv (AS 682-687) führt zur Internalisierung des APP in die Endosomen (Koo et al., 1996; Thinakaran and Koo, 2008) (Abb.1).

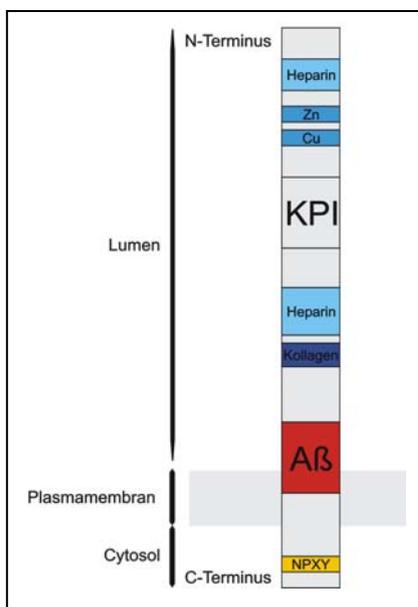


Abb. 1: Schematische Darstellung des APP mit seinen beschriebenen funktionellen Domänen.

In der Ektodomäne finden sich zwei Heparin-Bindestellen (hellblau), eine Kollagenbindestelle (dunkelblau), sowie Metallbindungsstellen für Zink und Kupfer (blau). Die KPI-Domäne ist nur in den längeren APP Spleißformen enthalten (APP751, APP770). Die amyloidogene Aβ Sequenz ist rot markiert. Im C-terminus ist die Konsensussequenz zur Clathrin vermittelten Internalisierung (NPXY, orange) lokalisiert.

Immer mehr Evidenzen belegen, dass das APP in der Plasmamembran als Dimer vorliegt. Die Dimerisierung erfolgt einerseits durch die erste Heparin bindende Region, der so genannten Loop-Region (Kaden et al., 2008a; Kaden et al., 2008b; Scheuermann et al., 2001), andererseits durch die weiter C-terminal gelegene Kollagen bindende Region (Beher et al., 1996). Als dritte Region wurden drei konsekutive GxxxG-Motive (Gly, drei

beliebige Aminosäuren außer Prolin, Gly) innerhalb der TMD beschrieben (Munter et al., 2007).

1.3 Die APP Prozessierung

Es sind zwei verschiedene Wege der APP Prozessierung bekannt: der nicht-pathogenen, nicht-amyloidogene und der die Krankheit verursachende amyloidogene Weg (Abb. 2), wobei zwei Drittel des APP über den nicht-amyloidogenen Weg, und nur ein Drittel zu dem pathologischen A β abgebaut werden (Selkoe, 2004). Sie unterscheiden sich durch den initialen Schnitt der α - und β -Sekretasen (Abb. 2).

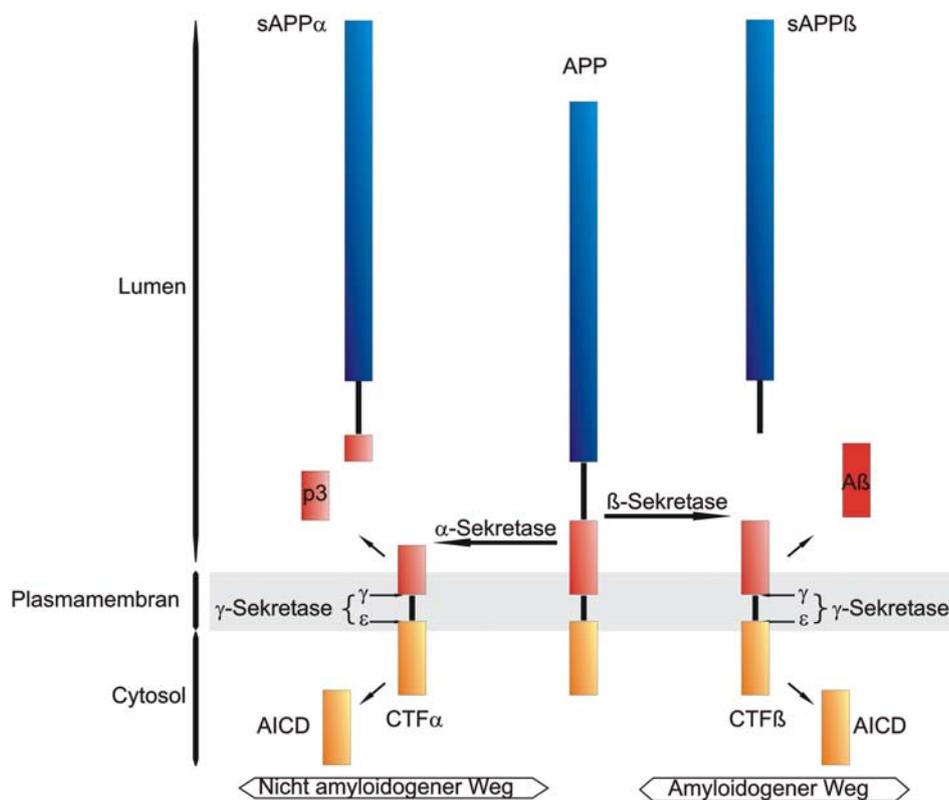


Abb. 2: Schematische Darstellung der APP Prozessierung. APP wird zuerst durch α - oder β -Sekretase N-terminal geschnitten, so dass sAPP α oder sAPP β entstehen. Durch den C-Terminale ϵ -Schnitt der γ -Sekretase wird die APP intrazelluläre Domäne AICD von dem C-terminalen Fragment (CTF α oder CTF β) abgespalten. Nach weiterer sequenzieller Spaltung des C-terminus mittels der γ -Sekretase entsteht aus dem CTF α das nicht amyloidogene p3 Peptid. Aus dem CTF β wird das amyloidogene A β Peptid gebildet. Farbkodierung: AICD in orange, N-Terminus in blau und A β Region in rot.

Beim nicht amyloidogenen Weg wird das APP von der α -Sekretase „a disintegrin and metalloprotease“ (ADAM10 oder ADAM17) gespalten (Lammich et al., 1999). Das dabei entstehende lösliche sAPP α („soluble“ APP, sAPP) wird daraufhin in den Extrazellularraum abgegeben und wirkt dort positiv auf Neuriten- und Axonenwachstum. Das in der Plasmamembran (PM) verbleibende, 83 Aminosäuren lange, C-terminale Fragment (α -CTF; C83) wird daraufhin von dem γ -Sekretase Komplex gespalten, wodurch das nicht amyloidogene p3 (Esch et al., 1990; Marambaud and Robakis, 2005; Thinakaran and Koo, 2008; Wilquet and De Strooper, 2004) und das cytosolische Fragment („APP intracellular C-terminal domain“, AICD) entstehen (Haass et al., 1993).

Der γ -Sekretase-Komplex (Wolfe, 2006) besteht aus vier Komponenten, die zur Spaltung der CTFs notwendig sind. Dazu gehören zur Substraterkennung Nicastrin (Shah et al., 2005), zur Stabilisierung des Komplexes „anterior-pharynx-defective“ (APH-1), zur Aktivierung des katalytischen Zentrums „presenillin-enhancer protein“ (PEN-2) (LaVoie et al., 2003; Wolfe et al., 1999) und das enzymatisch aktive Presenillin-1/2 (PS-1/2) mit den zwei katalytischen Resten D257 und D385 (Edbauer et al., 2003; Kimberly et al., 2000; Rogaev et al., 1995; Thinakaran et al., 1996). Unter nativen Bedingungen konnte bereits gezeigt werden, dass auch dieser Komplex, oder zumindest einzelne Komponenten daraus nicht als Monomer, sondern als Dimer vorliegen (Cervantes et al., 2004; Hebert et al., 2003; Li et al., 2000; Schroeter et al., 2003; Seeger et al., 1997).

Beim amyloidogenen Weg wird der erste, N-terminale Schnitt durch die β -Sekretase „ β -site APP cleaving enzyme“ BACE durchgeführt (Haass, 2004; Sinha et al., 1999; Vassar, 2005; Vassar et al., 1999). BACE (Cole and Vassar, 2008) ist ein Typl-Membranprotein, das zur Gruppe der Aspartat-Proteasen gehört. Die proteolytische Spaltung erfolgt durch zwei aktive Zentren D93 und D289, die das Motiv D(S/T)G(T/S) umfassen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass als Dimer vorliegendes BACE eine höhere Aktivität zur APP Spaltung hat, als monomeres BACE (Schmechel et al., 2004; Westmeyer et al., 2004). Dieser Befund unterstreicht die Annahme, dass nicht nur APP selbst als Dimer vorliegt, sondern auch als Dimer von dimeren Sekretasen geschnitten wird.

Durch den initialen Schnitt entsteht das lösliche Fragment sAPP β , das wie sAPP α in den Extrazellularraum abgegeben wird und dort auf Neuriten- und Axonenwachstum wirkt. Auch hier wieder wird das in der PM verbleibende β -CTF (C99) von dem γ -Sekretase Komplex gespalten. Dabei entstehen zwei Endprodukte: die bereits beschriebene AICD, und das die Alzheimer Krankheit verursachende A β Peptid (Abb. 2, 3).

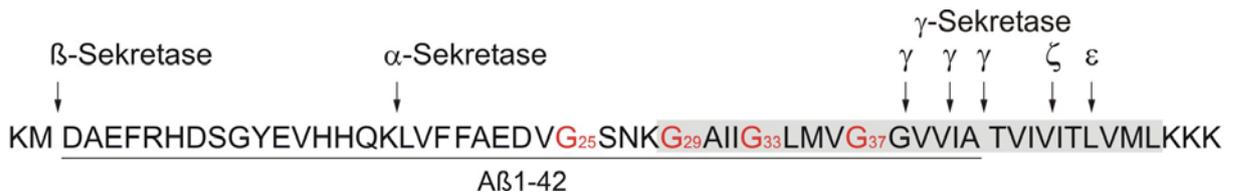


Abb. 3: Ausschnitt der APP695 Sequenz (AS 595-652). Schnittstellen der Sekretasen durch Pfeile markiert. Aβ 1-42 Sequenz ist unterstrichen, die Gly drei konsekutiv aufeinander folgenden GxxxG-Motive sind in rot dargestellt. Grau unterlegt stellt den Bereich der Plasmamembran dar. Die γ -Sekretase schneidet sequenziell innerhalb der Transmembransequenz beginnend beim ε -Schnitt resultierend in A β 49, ζ -Schnitt bei A β 46, γ -Schnitt bei A β 42, 40 und 38.

Dem entstandenen AICD wird eine Rolle in der Signaltransduktion zugeschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass AICD an das Adapterprotein Fe65 bindet und diese dann im Komplex mit der Histon-Acetyltransferase Tip60 in den Zellkern aufgenommen werden (Cao and Sudhof, 2001; Cao and Sudhof, 2004). Dort bindet der Komplex an den KAI-1 Promotor (Tumorsuppressor) (Jang et al., 2007b; Telese et al., 2005) und supprimiert die Transkription des Lipoprotein-Rezeptors (LRP1) durch Bindung an den LRP1 Promotor (Bianchi et al., 2007).

Da bisher vor allem die AICD Fragmente mit 48 und 49 Resten und keine Fragmente variierender Länge detektiert werden konnten (Kakuda et al., 2006), wird von einem ersten Schnitt der γ -Sekretase zwischen den Positionen A β -Position 49 und 50 ausgegangen (Weidemann et al., 2002). Erst nach diesem ε -Schnitt erfolgt zwischen A β -Position 46 und 47 ein ζ -Schnitt (Zhao et al., 2004) auf den dann γ -Schnitte anschließen, die A β -Peptide der Länge 43, 42 oder 40 hervorbringen (Abb. 3). Aus diesen Befunden wurde das Modell der sequenziellen Proteolyse erstellt, welches von zwei Produktlinien ausgeht. Dabei führt die eine Linie von dem A β 49 ausgehend, zur Bildung von A β 46 und weiter zu A β 43 und schließlich A β 40. Bei der anderen Linie wird aus A β 48 über A β 45 letztlich das pathologische A β 42 (Qi-Takahara et al., 2005; Zhao et al., 2005). Innerhalb dieser beiden Produktlinien schneidet der γ -Sekretase Komplex alle drei AS, also Helixwindung für Helixwindung, was auch die Bildung der kürzeren Fragmente (A β 38, A β 37, A β 34, usw.) erklärt (Munter et al., 2007).

Hat das hydrophobe A β Peptid die β -Faltblatt Struktur angenommen, aggregiert es schnell zu Fibrillen welche sich letztlich zu Plaques ablagern (Abb. 5) (Schmechel et al., 2003; Xu et al., 2005). Dabei findet der Aggregationsprozess in mehreren Schritten statt, der *in vitro* bis zu 24 Std dauern kann. Das Monomer bildet zuerst lösliche Oligomere, die nach ihrer Größe in niedere Oligomere (2-8 mere) und höhere Oligomere (10-20 mere) unterteilt werden, wobei das Dimer als besonders stabil angesehen wird (Garzon-Rodriguez et al., 1997; Hilbich et al., 1991; Walsh et al., 1997). Die höheren Oligomere bilden im weiteren Verlauf protofibrilläre Aggregate aus, die bereits im Elektronenmikroskop sichtbar sind. Abschließend aggregieren die Protofibrillen zur unlöslichen, reifen Fibrillen, welche sich im Extrazellularraum ablagern (Arimon et al., 2005; Chen and Glabe, 2006; Mastrangelo et al., 2006; Shankar et al., 2007; Walsh et al., 1997).

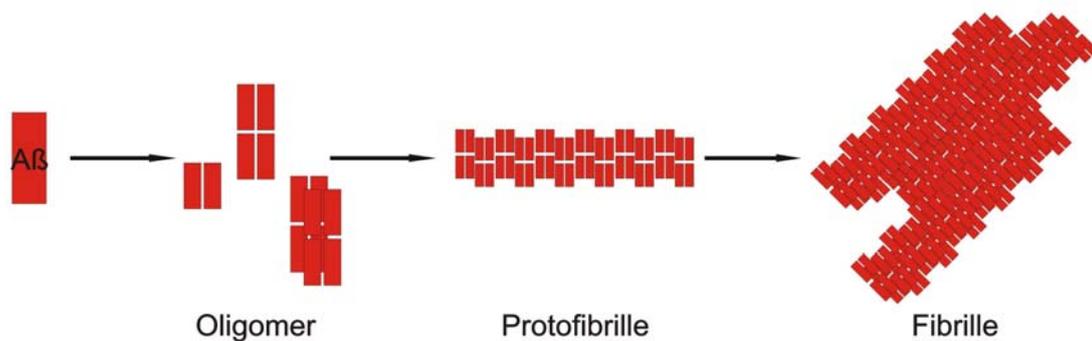


Abb. 5: Schematische Darstellung des Aggregationsprozesses von A β Peptiden. Das monomere Peptid oligomerisiert schnell zu niederen und höheren Oligomeren (2-8 und 10-20-mere) um daraus weiter zu Protofibrillen zu aggregieren um sich letztlich als reife Fibrille in Plaques abzulagern.

Es wurde lange angenommen, dass die Aggregation zur Fibrille zu einer Verstärkung der Toxizität des Peptides führt (Hardy and Higgins, 1992; Lorenzo and Yankner, 1994).

Allerdings wurde in *in vivo* Studien beschrieben, dass es bereits vor der Detektion von A β -Plaques zu Einbußen der kognitiven Leistungen kommt, die mit Verlusten von synaptischen Markern wie Synaptophysin einhergehen (Hsia et al., 1999; Moechars et al., 1999; Mucke et al., 2000; Spires et al., 2005). Daraus ergab sich die Hypothese, dass lösliche A β Oligomere die neuropathologische Ursache der Alzheimer Krankheit darstellen (Klein et al., 2001). Es wurde nachgewiesen, dass diese Oligomere im Gehirn und im CSF von Alzheimer Patienten 70-fach erhöht vorliegen (Georganopoulou et al., 2005; Gong et al., 2003; Kuo et al., 1996). In vielfachen Studien konnte zudem gezeigt werden, dass lösliche Oligomere des A β 42 Peptides als Neurotoxine bereits in geringen Konzentrationen die Hauptursache für den neuronalen Verlust in der Alzheimer Krankheit

darstellen (Cleary et al., 2005; Lambert et al., 1998; Podlisny et al., 1995; Roher et al., 1996; Walsh et al., 2002). Besonders niedere Oligomere, wie Di- und Trimere, die auch aus Patientenmaterial aufbereitet wurden, scheinen eine höchste synaptotoxische Aktivität zu haben (Klyubin et al., 2008; Shankar et al., 2007; Shankar et al., 2008). Ebenfalls ist bekannt, dass A β Peptide intrazellulär zu finden sind noch bevor es zu extrazellulären Ablagerungen kommt (Oakley et al., 2006; Wertkin et al., 1993). Auch diese intrazellulären Peptide oligomerisieren und wirken neurotoxisch (Walsh et al., 2000).

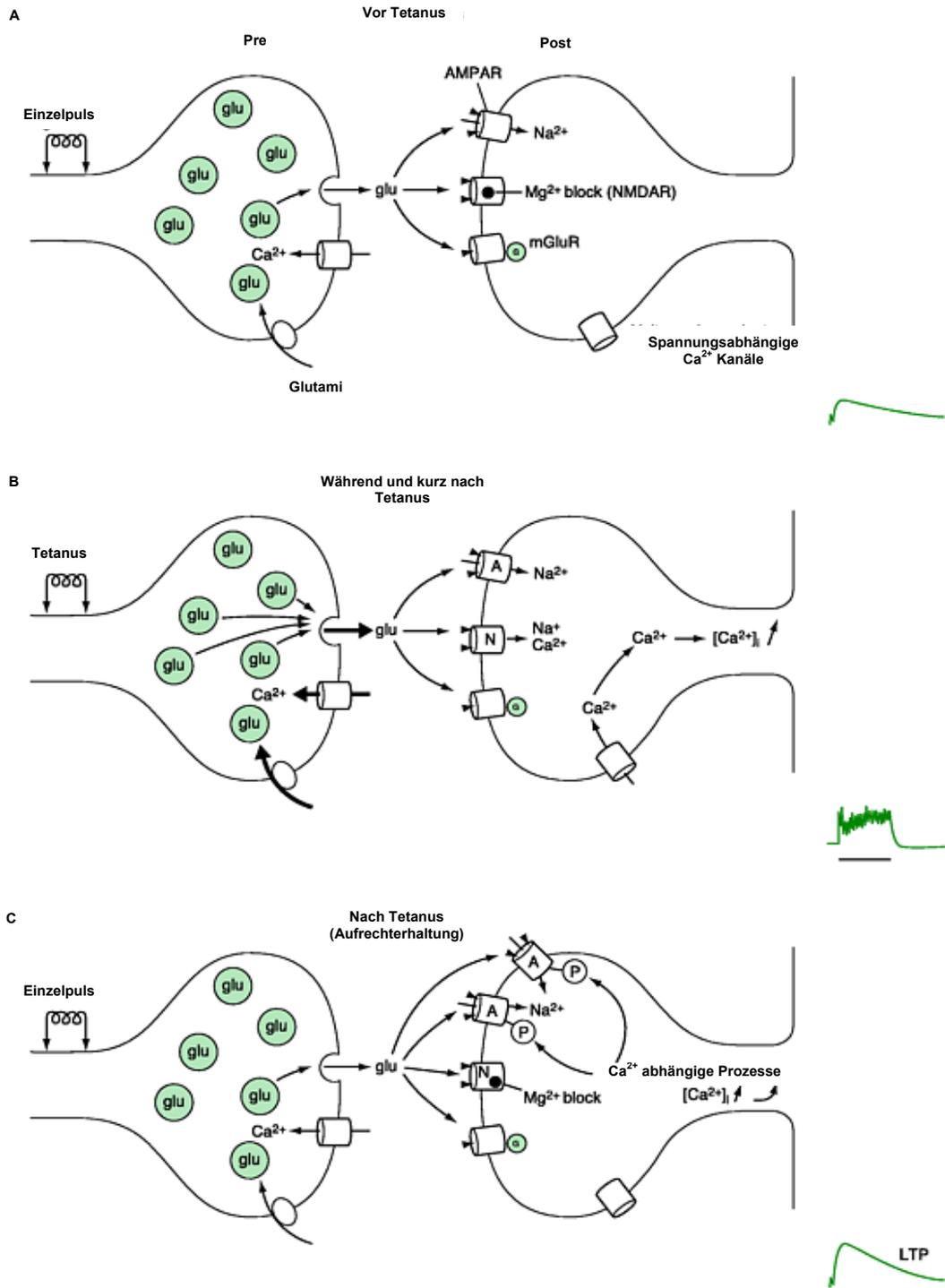
Allerdings ist trotz der ausführlichen Charakterisierung der Wirkung des A β 42 Peptides auf Neurone, der Mechanismus noch nicht eindeutig geklärt.

Es wurde beschrieben, dass intrazelluläres A β 42, in einem geringeren Maße auch A β 40, den Promotor des Tumorsuppressorproteins p53 aktiviert, was zu p53-vermittelter Apoptose führt. Der intrazelluläre Signalweg von A β 42/p53 könnte eine direkte Relevanz für den neuronalen Verlust bei der Alzheimer Krankheit darstellen (Ohyagi et al., 2005).

Des Weiteren gibt es mehrere Untersuchungen darüber, dass intrazelluläres A β eine Erhöhung der radikalen Sauerstoffspezies verursacht und dadurch die Oxidation von Lipiden, Proteinen und DNA erhöht wird (Mattson, 2004; Pratico and Delanty, 2000; Zhu et al., 2005; Zhu et al., 2006).

Auch wurde bereits postuliert, dass sich A β 42, vor allem in tetramerer Form, an die Plasmamembran der Zellen anlagert und Poren ausbildet. Das führt zu einem erhöhten Influx von Ca²⁺ wodurch die Homöostase der Zelle zerstört wird (Arispe et al., 1993; Jang et al., 2007a; Simakova and Arispe, 2006). Dass Ca²⁺ eine Rolle in der Alzheimer Krankheit spielt, wird bereits seit längerem angenommen. Es gibt Hinweise, dass eine gestörte intrazelluläre Ca²⁺ Signalkaskade zu einer Deregulation der APP Prozessierung und somit zur Neurodegeneration führt (Khachaturian, 1989; LaFerla, 2002). Erhöht sich der Ca²⁺ Influx aus dem extrazellulären Bereich oder aus den Speichern des endoplasmatischen Retikulums (ER), steigt die A β 42 Produktion (De Felice et al., 2007; Demuro et al., 2005; Rogueva et al., 2007). Das A β 42 selbst bindet postsynaptisch an N-Methyl-D-Aspartat Rezeptoren (NMDAR) und forciert dadurch einen Ca²⁺ Influx (De Felice et al., 2007).

Seit der verstärkten Nutzung elektrophysiologischer Methoden in der Erforschung der Alzheimer Krankheit, zeichnete sich eine besondere Rolle der NMDAR ab.



21.07 Copyright Academic Press, 2001

Abb. 6: Schematische Darstellung der Langzeit Potenzierung einer Synapse. **A:** Vor Tetanus, **B:** während des Tetanus und **C:** nach Tetanus. (Abbildung aus C. Hammond, Cellular and molecular neurobiology, second edition, Academic Press 2001)

NMDAR gehören neben den α Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxalonpropionat Rezeptoren (AMPA) zu den ionotropen Glutamatrezeptoren an der Postsynapse. Die Aktivierung dieses tetrameren Kationenkanals ist liganden- und spannungsabhängig (Abb. 6a). Erreicht ein Aktionspotential die Präsynapse führt das zum Ausschütten von Neurotransmittern wie Glutamat aus den synaptischen Vesikeln in den synaptischen Spalt (Abb. 6b). Bindet das Glutamat an AMPAR kommt es zu einer Depolarisation der postsynaptischen Membran. Dadurch wird die Blockade des NMDAR durch ein Mg^{2+} -Ion aufgehoben, was zu einem erhöhten Ca^{2+} Einstrom führt. Das erhöhte Ca^{2+} Niveau wiederum aktiviert die Proteinkinase C sowie Ca/ Calmodulin-abhängige Kinasen, was zu einer erhöhten Integration von AMPAR in die Membran sowie morphologischen Veränderungen der Synapse führt (Abb. 6c). Diese Veränderungen werden als Grundlage für die Langzeit Potenzierung (LTP), ein Modell für Lernen und Gedächtnis angesehen (Bliss and Lomo, 1973). In Mausmodellen der Alzheimer Krankheit zeigten sich starke Beeinträchtigungen der LTP (Dewachter et al., 2007; Jacobsen et al., 2006; Larson et al., 1999).

Durch A β 42 werden sowohl AMPAR als auch NMDAR verstärkt endozytiert, dadurch die synaptische Transmission verringert und eine Langzeit Depression (LTD) simuliert (Hsieh et al., 2006; Lacor et al., 2004; Lambert et al., 1998; Shankar et al., 2007; Snyder et al., 2005). Auch die morphologischen Veränderungen der synaptischen Endplatten (Spines) und deren Dichtereduktion geben Hinweise auf den Mechanismus, wie A β 42 den Neuronenverlust verursacht (Hsieh et al., 2006).

Obwohl der Wirkungsmechanismus noch nicht bekannt ist, gibt es bereits einige Ansätze zur Therapie der neurotoxischen A β 42 Oligomere.

Zum einen gibt es den Versuch der Immunisierung mit A β Peptiden um eine Immunantwort gegen die neurotoxischen Spezies zu erreichen (Maier et al., 2006; Maier et al., 2005; McLaurin et al., 2002). Erst kürzlich wurde bekannt, dass eine Immunisierung toxische A β 42 Oligomere aus den Plaques löst, wodurch es zur Erhöhung des neuronalen Verlustes kommen kann.

Da die Alzheimer Krankheit als Kupfermangelkrankung gilt, ist ein anderer Ansatz durch Verabreichung von Cu^{2+} die Konzentration des bioverfügbaren Cu zu erhöhen. Dadurch wird die A β Menge im Gehirn reduziert (Bayer et al., 2003; Borchardt et al., 1999). Trotz der positiven Effekte in den Maustests, konnte in einer ersten klinischen Studie diese viel versprechende Wirkung des Cu nur eingeschränkt bestätigt werden, da es keine signifikanten Unterschiede zwischen Placebo- und Verumgruppe gab (Kessler et al., 2008).

Darüber hinaus gibt es die Möglichkeit verschiedene niedermolekulare Substanzen einzusetzen wie beispielsweise Inositole, wodurch eine Toxizität und Fibrillenbildung von A β 42 inhibiert wird (McLaurin et al., 2000a; McLaurin et al., 2006; McLaurin et al., 2000b; Shankar et al., 2007). Auch nicht-steroidale antiinflammatorische Medikamente (NSAID) sind zu erwähnen, da sie nicht nur positiv auf die Prozessierung von APP wirken, indem sie A β 42 senken (Weggen et al., 2001; Weggen et al., 2003), sondern auch die von A β 42 Peptiden verursachte Toxizität und LTP Inhibition beeinflussen (Ferrera and Arias, 2005; Kukar et al., 2007; Shaw et al., 2005).

1.5 Das GxxxG-Motiv

Das APP enthält innerhalb der A β Sequenz insgesamt drei konsekutive GxxxG-Dimerisierungsmotive (G25xxxG29xxxG33xxxG37, Abb. 3), wobei Gly25 nicht mehr in der Transmembransequenz liegt. Nach der N-terminalen Spaltung durch BACE oder ADAM sind diese Motive ausschlaggebend für die Dimerisierung des APP-CTF (Munter et al., 2007). Die GxxxG vermittelte Dimerisierung des β -CTF führt dazu, dass die Spaltung durch die γ -Sekretase vornehmlich an Position A β 42 und A β 40 endet. Wird das Motiv G29xxxG33 durch Mutation gelöst, werden gemäß des Modells der sequenziellen Proteolyse (siehe 1.3) durch die γ -Sekretase kürzere A β -Spezies gebildet (Munter et al., 2007).

Das GxxxG-Motiv ist ein in Transmembransequenzen weit verbreitetes Dimerisierungsmotiv (30% häufiger als theoretisch erwartet) (Senes et al., 2000). Durch dieses Motiv wird die spezifische Dimerisierung von zwei in der Plasmamembran verankerten α -helikalen Untereinheiten vermittelt (Jozwiak et al., 2008; Kleiger et al., 2002; Lee et al., 2004; Senes et al., 2000). Dabei können die auf einer Seite liegenden Gly sich durch den fehlenden Rest so annähern, dass sie stabilisierende Wechselwirkungen ausbilden können (Senes et al., 2004). Die Dimerisierung zweier Untereinheiten kann um bis zu 80% reduziert werden, indem eines der Gly-Reste zu Ala ausgetauscht wird (Langosch et al., 1996; MacKenzie et al., 1997).

Neben der Dimerisierungsinduktion in α -helikalen Transmembransequenzen lösen GxxxG-Motive in β -Faltblattstrukturen, wie dem A β Peptid, eine erhöhte Aggregation aus. Es konnte gezeigt werden, dass GxxxG-Motive eine erweiterte β -Faltblatt Bildung fördern, sobald sich die α -helikale Transmembransequenz in wässriger Umgebung befindet.

Außerdem wird die Verdichtung einzelner β -Faltblätter zu Amyloid ähnlichen Fibrillen stabilisiert (Liu et al., 2005; Xu et al., 2005). Werden Inhibitor-Peptide verwendet die ein GxxxG-Motiv enthalten, so kann die Fibrillenbildung von A β 42 verhindert werden (Sato et al., 2006). Ein Austausch der A β 42 GxxxG Gly zu Leu zeigte in einer ersten Studie, dass der Zelltod stark minimiert ist (Kim et al., 2005).

1.6 Zielsetzung

Zahlreiche Publikationen der letzten Jahre verdeutlichen, dass die Bildung löslicher A β Oligomere vor ihrer Aggregation zu Fibrillen eine mögliche Ursache der Alzheimer Krankheit darstellen. Niedriger Oligomere sind bereits in geringer Konzentration neurotoxisch. Besonders betroffen ist davon der für die Gedächtniskonsolidierung wichtige Hippocampus. Jedoch ist der Mechanismus, der zum Neuronenverlust führt, noch nicht bekannt. Auch ist noch nicht geklärt, ob die Toxizität des A β Peptides ausschließlich vom Aggregationszustand des Peptides abhängt und durch welche Oligomere die Toxizität vermittelt wird.

Da bei der Prozessierung des APP A β Peptide mit unterschiedlicher Länge entstehen, sollten zunächst die in ihrer Länge variierenden A β Formen auf Unterschiede in Oligomerisierung und Toxizität untersucht werden.

Ausgehend von den GxxxG-Motiven innerhalb der A β Sequenz hat sich gezeigt, dass diese Motive nicht nur eine wichtige Rolle bei der Prozessierung des APP spielen, sondern auch in der Aggregation des Peptides.

Das Hauptziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob und wie A β 42 Peptide mit Aminosäureaustauschen innerhalb der GxxxG-Motive im pathologischen Verhalten der Peptide eine Rolle spielen. Dabei sollte überprüft werden, ob die GxxxG-Motive das bisher allgemein angenommene Dogma widerlegen können, dass Oligomerisierung und der Toxizität auf molekularer Ebene untrennbar miteinander verbunden sind.

Dazu wurden das Aggregationsverhalten vom Monomer zur Fibrille und die strukturellen Unterschiede der verschiedenen Peptide und Aggregationsformen untersucht. Vervollständigt wurden diese Untersuchungen durch detaillierte Analysen der Toxizität *in vitro* und *in vivo*. Schließlich wurden die verschiedenen Peptid- und Aggregationsformen in einem physiologischen Modellsystem für Lernen und Gedächtnis (LTP) getestet.

2 Ergebnisse

2.1 Charakterisierung verschiedener A β Spezies

2.1.1 Oligomerisierung der A β Spezies

Während der sequenziellen Spaltung des APP entstehen unterschiedlich lange A β Spezies, die eine Präferenz zur Aggregation aufweisen.

Um die Unterschiede in der Oligomerisierung von A β 34, A β 38, A β 40 und A β 42 Peptiden beschreiben zu können, wurden Größenausschlusschromatographien (GPC) mit den einzelnen A β Spezies durchgeführt. Vergleicht man die Chromatogramme der verschiedenen Peptide, so ist bei allen eine hohe Menge an Oligomeren zu erkennen, die mit dem molekularen Gewicht eines Tetramers bis Hexamers gleichzusetzen sind (Abb. 7). Besonders auffällig ist, dass A β 40 (Abb. 7C) zusätzlich noch eine große Menge Dimer und Monomer enthält, welche bei A β 42 (Abb. 7D) und A β 34 (Abb. 7A) am Rande der Detektionsgrenze liegen und bei A β 38 (Abb. 7B) nicht mehr erkennbar sind. Außerdem ist zu bemerken, dass die kürzeren Peptide im Gegensatz zum A β 42 keine höheren Oligomere aufzeigen. Lediglich A β 40 oligomerisiert noch zu einer geringen Menge 10-mer (Abb. 7C). Dieses initiale Oligomerisierungsverhalten kann auch mittels Western-Blot Analyse beobachtet werden. Durch den monoklonalen Antikörper W02 können alle A β Spezies detektiert werden. Aufgrund der denaturierenden Bedingungen durch das SDS und das Aufkochen der Proben können nur SDS stabile Oligomere in den frisch gelösten Peptidproben (Total) gemessen werden. A β 34 und A β 38 (Abb. 7A, B) zeigen beide im Western-Blot ausschließlich Banden mit dem apparenten Molekulargewicht von monomeren und dimeren Peptiden. Bereits bei A β 40 (Abb. 7C) sind erste höhere Oligomere zu erkennen, beginnend mit Tetrameren bis hin zu einer diffusen Bande auf Höhe von 105 kDa welche besonders bei A β 42 deutlich stärker sichtbar ist (Abb. 7D). Auffällig hierbei ist auch die Zunahme der diffusen Bande, die hinunter bis zur Tetramerbande verläuft. Diese diffusen Banden entstehen durch aggregierte Peptide, die während der Gelelektrophorese dissoziieren.

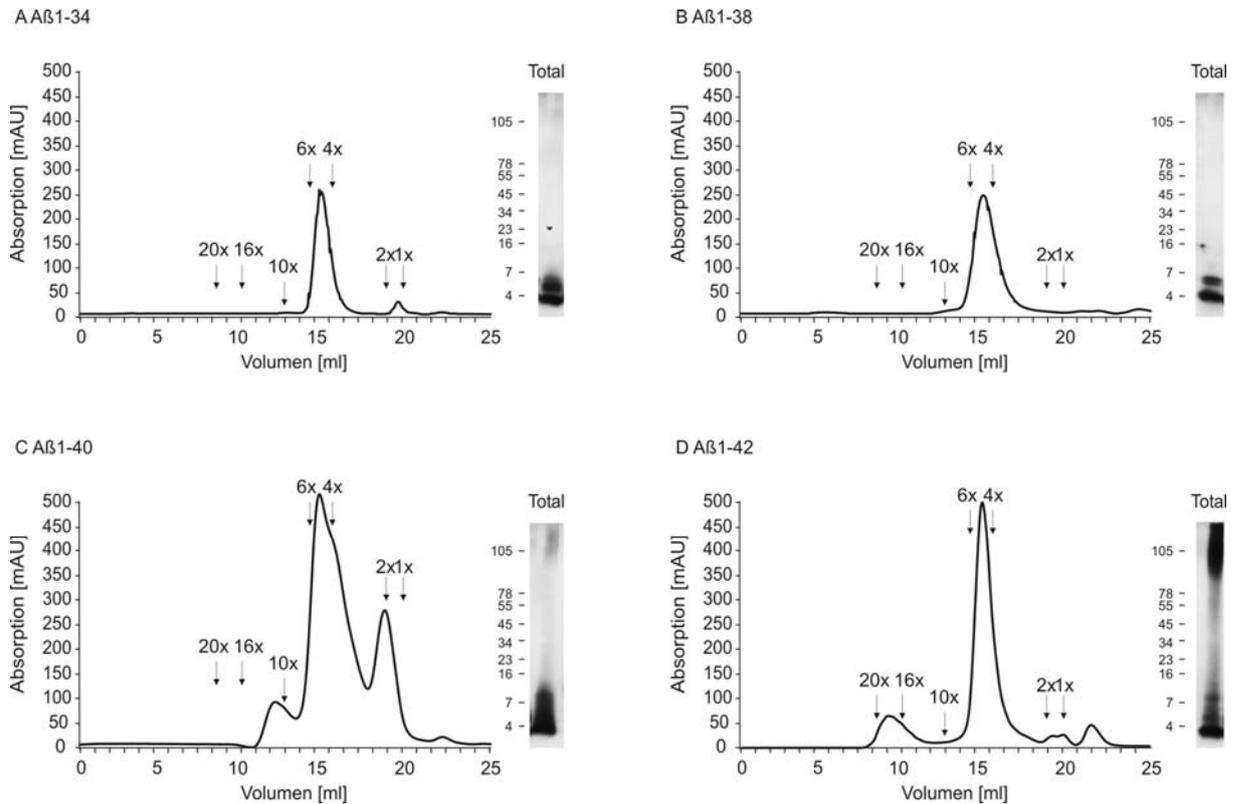


Abb. 7: Größenausschlusschromatographie (GPC) und Western-Blot von A β Spezies verschiedener Länge. Zur Western Blot Detektion der frisch gelösten Peptide vor der Auftrennung durch die GPC wird der monoklonale W02 Antikörper verwendet. Im Chromatogramm der Peptide **A**: A β 34; **B**: A β 38; **C**: A β 40; **D**: A β 42 werden die Oligomerformen durch Pfeile markiert und der Oligomerisierungszustand durch Zahlen (1x, 2x, 4x,...) dargestellt. Abgebildet ist ein exemplarisches Experiment aus mindestens drei unabhängigen Wiederholungen.

Unabhängig von ihrer Länge weisen alle A β Spezies hohe Mengen an tetrameren bis zu hexameren Oligomerformen auf. Diese sind bei allen A β Spezies jedoch nicht SDS-stabil, kommen demnach nur unter nativen, nicht denaturierenden Bedingungen vor. Im SDS-PA-Gel mit folgender Western-Blot Analyse sind als stabile Untereinheiten monomere und dimere Formen zu erkennen.

2.1.2 Toxizität der A β Spezies

Um darüber hinaus Aussagen über die toxischen Effekte der A β Spezies treffen zu können, wurden mit allen Peptiden Toxizitätstests durchgeführt. Dazu wurden SH-SY5Y Zellen mit gleichen Mengen frisch gelösten Peptids oder über GPC aufgereinigten Fraktionen (1x-10x) für 12 h inkubiert und die Zellviabilität mittels MTT-Test bestimmt. Weder A β 34, A β 38 noch A β 40 führen zu einem signifikanten Zellverlust (Abb. 8A-C). Nur

A β 38 Monomer und 10-mer und A β 40 Monomer konnten die Zellzahl um 20% reduzieren (Abb. 8B, C). A β 42 jedoch reduzierte die Zellviabilität um bis zu 50%. Besonders toxisch wirkten A β 42 Tetramere (Abb. 8D).

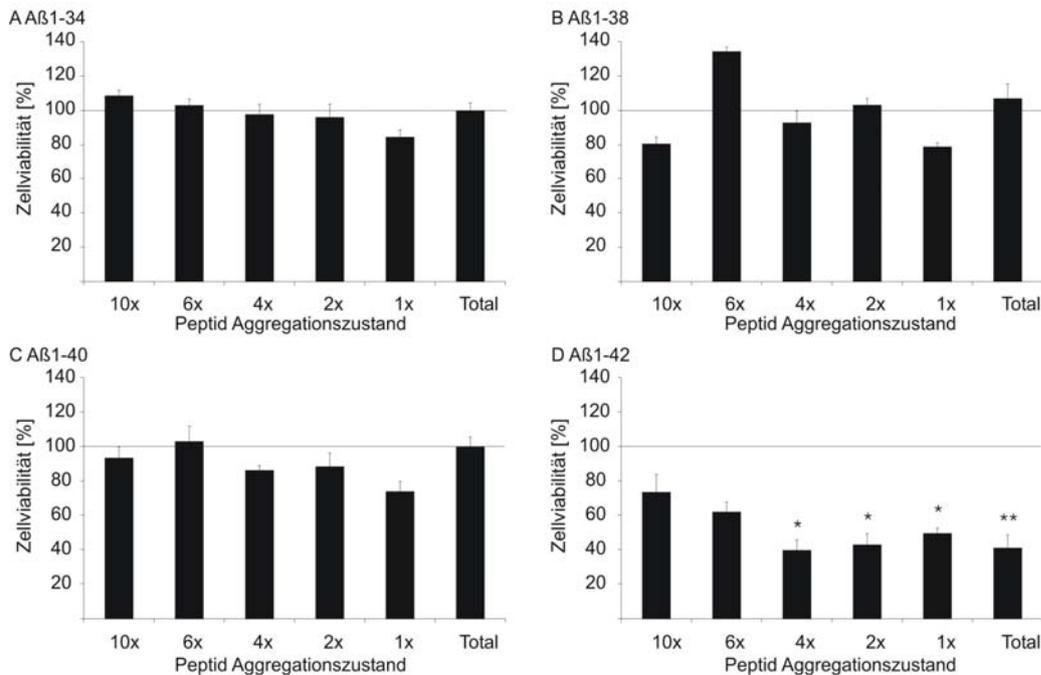


Abb. 8: Messung der Zellviabilität von A β Spezies auf SH-SY5Y Zellen mittels MTT-Test. Unbehandelte Kontrollzellen sind auf 100% gesetzt. Weder durch das frisch gelöste Peptid (Total) noch durch die GPC aufgereinigten Oligomerfraktionen (1x-10x) ist durch **A**: A β 34, **B**: A β 38 oder **C**: A β 40 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ein signifikanter Zellverlust erkennbar. Lediglich **D**: A β 42 reduzierte die Zellviabilität um bis zu 50%. (n=4-8; \pm SEM; $p^* < 0.001$; $p^{**} < 0.0001$, Student's t-Test)

Trotz der Bildung von Oligomeren gleicher Größe (4-6-mer) führt eine Verkürzung der Aminosäuresequenz des A β 42 Peptides dazu, dass keinerlei Toxizität von den Peptiden ausgeht.

Diese Erkenntnis ließ die Frage zu, ob auch A β 42 eine Konformation erreichen kann, die den toxischen Effekt des Peptides inhibiert. Aus diesem Grund liegt der Schwerpunkt der weiteren Arbeit auf der Untersuchung des A β 42 Peptides.

2.2 Einfluss des GxxxG-Motivs auf das Aggregationsverhalten von A β 42

2.2.1 Analyse der Oligomerisierung verschiedener A β 42 Peptide

Bereits im Jahre 2005 veröffentlichte V. Marchesi eine theoretische Arbeit, die eine wichtige Rolle der GxxxG-Motive in der A β Pathologie postulierte (Marchesi, 2005).

Um Unterschiede in der Oligomerisierung durch die GxxxG-Motive aufzuzeigen, wurden A β 42 Peptide synthetisiert, die einen konservativen Aminosäureaustausch von Gly zu Ala an den Positionen Gly25, Gly29, Gly33, Gly29/33 und Gly37 oder Gly zu Ile an Position Gly33 erfahren haben. Durch diesen konservativen Austausch an jeweils nur einer Gly Position der Motive ist eine ausführliche Charakterisierung möglich und die Gefahr der artifiziellen Resultate im Gegensatz zu mehrfachen oder progressiven Austauschen minimiert. Die Oligomerisierung der verschiedenen Peptide wurde durch GPC ermittelt. Trotz gleicher Behandlung der Peptide konnten schnell dramatische Unterschiede erkannt werden.

Wie bereits gezeigt, bildet frisch gelöstes A β 42 Wildtyp (wt) Peptid sofort große Mengen Tetramere und geringe Mengen höherer Oligomere wie 20-mere, Dimere und Monomere (Abb. 9A). Wird nun das Peptid A β 42 G25A nach seiner Größe aufgetrennt, können vor allem große Mengen an Tetrameren, geringe Mengen an Monomeren, Dimeren und höheren Oligomeren, hier vor allem 10-mere, detektiert werden (Abb. 9B). Auch das Peptid A β 42 G29A zeigt eine ähnliche Oligomerverteilung wie das A β 42 wt Peptid. Auch hier sind in erster Linie Tetramere detektierbar und kleine Mengen an Dimeren und höheren Oligomeren wie 20-mere (Abb. 9C).

Ganz anders verhält sich das A β 42 G33A Peptid. Durch den Austausch an dieser Position kann eine Verschiebung hin zu höheren Oligomeren induziert werden. Obwohl noch geringe Mengen an Monomer, Dimer und Tetramer vorhanden sind, ist der Großteil des Peptides direkt nach dem Lösen zu 20-meren aggregiert (Abb. 9D). Dieser Effekt wird durch den Austausch von G33I sogar noch verstärkt. Hier liegt die Konzentration der niederen Oligomere (Monomer- 10-mer) am Detektionsminimum (Abb. 9E).

Eine Kombination des Gly-Austausches an Position Gly29 und Gly33 führt zu einem intermediären Aggregationsverhalten. So sind im Chromatogramm von A β 42 G29/33A fast gleiche Mengen an Tetrameren und 20-meren zu erkennen. Aber auch hier ist die Konzentration der Monomere und Dimere äußerst gering (Abb. 9F).

Bei dem Peptid A β 42 G37A sind, wie bei A β 42 wt, erneut hohe Mengen an Tetrameren zu erkennen. Allerdings ist hier die Monomer und Dimer Konzentration drastisch erhöht im Vergleich zu allen anderen Peptiden (Abb. 9G).

Die Western-Blot Analysen der frisch gelösten A β 42 wt (Abb. 9A), A β 42 G25A (Abb. 9B), A β 42 G29A (Abb. 9C) und A β 42 G29/33A (Abb. 9F) zeigen vornehmlich Monomere aber auch SDS-stabile 2-4-mere. Höhere Aggregate sind ausschließlich als diffuse Banden zu erkennen.

Eine Substitution an Position G33 führt bei beiden Peptiden dazu, dass die detektierbare Menge an niederen Oligomeren in der Western-Blot Analyse deutlich geringer sind als bei den anderen Peptiden (Abb. 9D, E).

Besonders auffällig in der Western-Blot Analyse ist, dass bei A β 42 G37A (Abb. 9G) nur Monomere und hohe Oligomere zu erkennen sind und kaum SDS-stabile niedere Oligomere.

Es kann zusammengefasst werden, dass alle Peptide, unter den gewählten Bedingungen sofort oligomerisieren, so dass nur sehr geringe Mengen an Monomeren und Dimeren vorliegen. Bei den Peptiden A β 42 wt, A β 42 G25A und A β 42 G29A liegt der Hauptteil des Peptides als Tetramer vor, nur wenig Peptid ist zu höheren Oligomeren aggregiert. A β 42 G37A bildet vergleichbare Mengen Mono- Dimer und Tetra- Hexamere.

Im Gegensatz dazu verhalten sich die Peptide A β 42 G33A und A β 42 G33I. Beide bilden fast ausschließlich höhere Oligomere (10- 20- mere) und kaum kleinere Aggregate.

Einen besonderen Stellenwert hat auch das A β 42 G29/33A Peptid. Bei diesem sind sowohl Tetramere als auch 20-mere in gleicher Menge vorhanden.

Aufgrund ihres besonderen Oligomerisierungsverhaltens und ihrer Position im zentralen GxxxG-Motiv werden in den weiteren Experimenten zu Aggregation, Struktur und Toxizität vor allem A β 42 wt, A β 42 G29A, A β 42 G33A, A β 42 G33I und A β 42 G29/33A miteinander verglichen.

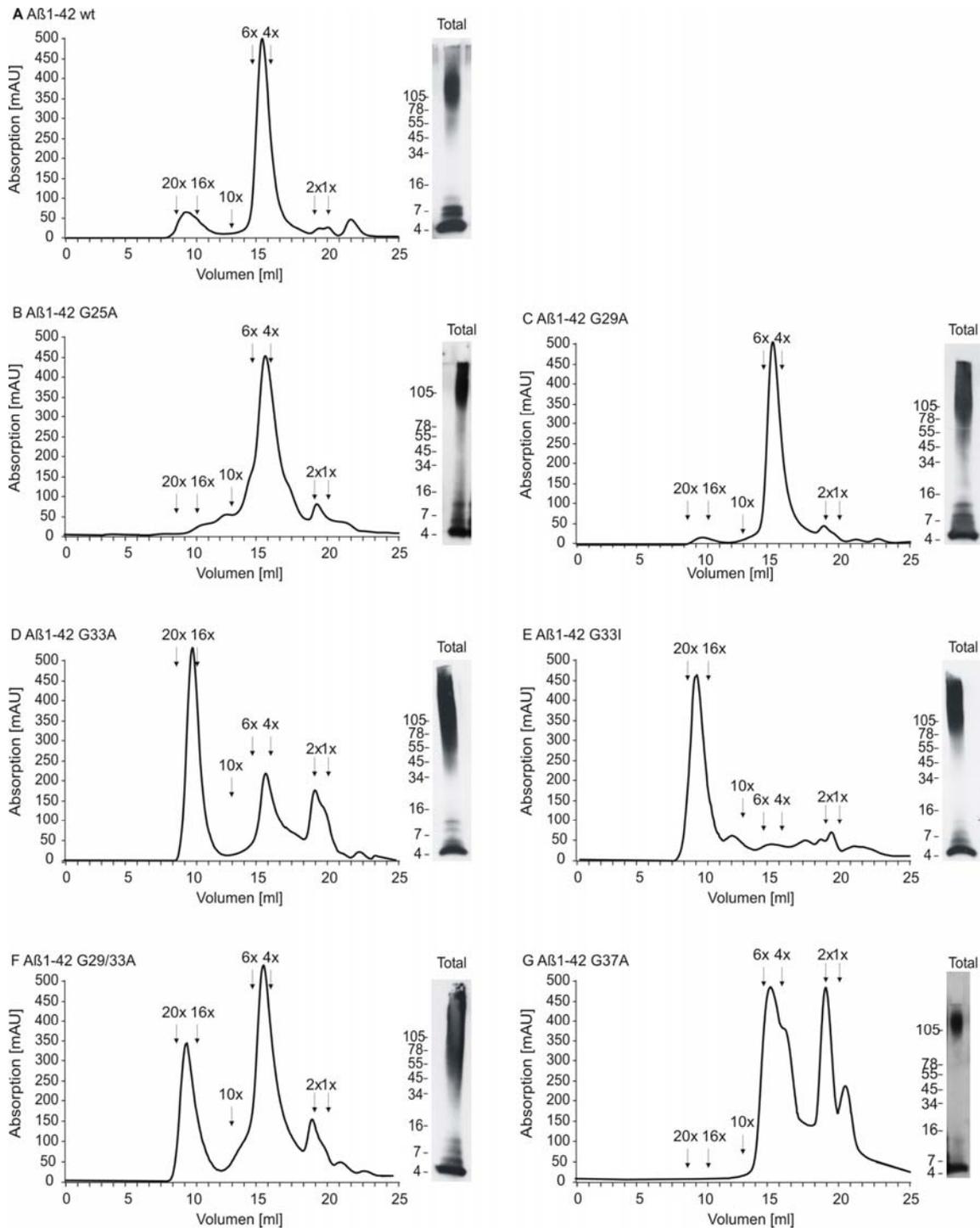


Abb. 9: Größenausschlusschromatographie und Western-Blot Analyse der frisch gelösten Peptide vor Auftrag auf die Säule (Total) von Aβ42 wt und Aβ42 GxxxG-Substitutionen. Zur Western-Blot Analyse der Peptide (Total) wurde der monoklonale W02 Antikörper verwendet. Im Chromatogramm der Peptide **A**: Aβ42 wt, **B**: Aβ42 G25A, **C**: Aβ42 G29A, **D**: Aβ42 G33A, **E**: Aβ42 G33I, **F**: Aβ42 G29/33A und **G**: Aβ42 G37A werden die Oligomerformen durch Pfeile markiert und durch die Zahlen wird die Monomermenge dargestellt. Abgebildet ist exemplarisch ein Experiment aus mindestens drei unabhängigen Wiederholungen.

2.2.2 Western-Blot Analyse der verschiedenen oligomeren A β 42 Formen

Zur Überprüfung der Oligomerisierung wurden neben der GPC auch noch Western-Blot Analysen der Fraktionen durchgeführt. Da jedoch das SDS in den PA-Gelen nicht kovalente Wechselwirkungen aufhebt, ist nicht davon auszugehen, dass die hier detektierten Oligomere so auch unter nativen Bedingungen vorliegen. Deshalb ist es nicht überraschend, dass in allen getesteten Fraktionen zumindest eine geringe Menge des Peptides als Monomer detektierbar ist (Abb. 10). Außerdem sollte beachtet werden, dass aggregierte Peptide schwerer zugänglich für das SDS sein können, wodurch das Laufverhalten im SDS-PA-Gel nicht dem apparenten Molekulargewicht entspricht.

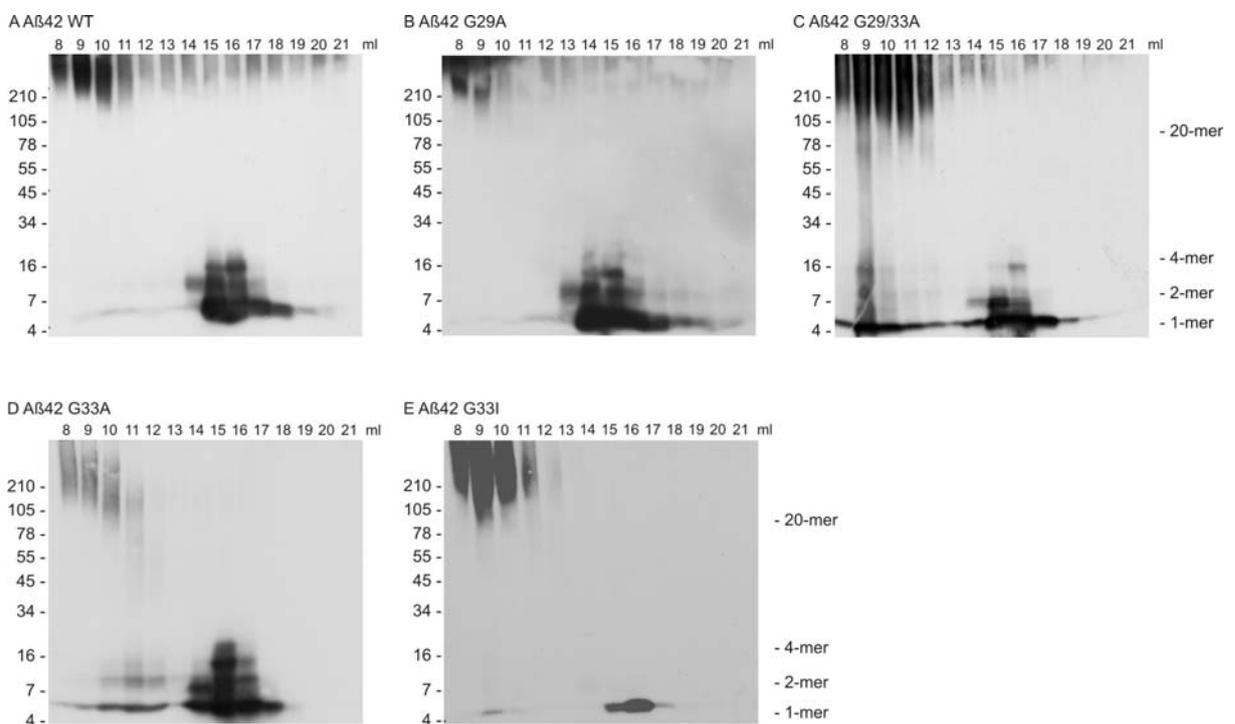


Abb. 10: Western-Blot Analyse der GPC Fraktionen von A β 42wt und A β 42 GxxxG-Substitutionen. Vergleichbare Konzentrationen der GPC Peakfraktionen wurden mittels SDS-PA-Gel aufgetrennt und mittels Western-Blot Verfahren mit dem A β spezifischen Antikörper W02 detektiert. Das Elutionsvolumen der Fraktionen ist in ml angegeben. Die Größe des Peptides ist durch einen Proteinstandard in kDa und durch die Aggregationsform (x-mer) markiert.

Vergleicht man die Peptid-Fractionen von A β 42 wt, A β 42 G29A, A β 42 G33A, A β 42 G33I und A β 42 G29/33A miteinander, wird vor allem der Unterschied zu A β 42 G33I offensichtlich (Abb. 10). Während bei allen anderen Peptiden Monomer, SDS-stabile 2-4-mere und höhere Oligomere (210 kDa) gebildet werden, kann bei A β 42 G33I (Abb. 10E) neben den höheren Oligomeren lediglich Monomer Peptid detektiert werden. Die

Verteilung der Peptideaggregate ist aber vergleichbar mit den Chromatogrammen aus der GPC (Abb. 9).

In den ersten Fraktionen aller Peptide sind neben Monomer Banden auch Banden zu erkennen, die größer sind als 210 kDa. Korrelierend mit der Verteilung, die schon bei der GPC zu beobachten war, sind bei A β 42 wt (Abb. 10A) und A β 42 G29A (Abb. 10B) hauptsächlich SDS-stabile 2-4-mere in den Fraktionen bei 14-17 ml detektierbar. Die höheren Oligomere (9-11 ml) von A β 42 G29/33A (Abb. 10C) zerfallen in SDS-stabile 2-4-mere, die auch hier bei 14-17 ml wieder zu finden sind. Auch bei A β 42 G33A (Abb. 10D) ist das gleiche Verhalten der Oligomere zu erkennen. Nur bei A β 42 G33I (Abb. 10E) lassen sich neben den hohen Oligomeren in den frühen Fraktionen in den späteren Fraktionen ausschließlich monomere Formen des Peptids detektieren.

2.2.3 Analyse der Fibrillenbildung verschiedener A β 42 Peptide

Wenn A β 42 G33A und A β 42 G33I Peptide schneller oligomerisieren, wäre nach dem für A β 42 angenommenen Aggregationsprozess (Abb. 5) zu erwarten, dass diese Peptide auch schneller zu Fibrillen aggregieren, was ein Endstadium in der A β 42 Aggregation und Hauptbestandteil der Alzheimer Plaques darstellt. Um diese Vermutung zu untersuchen, wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen von 24 Std gereiften Fibrillen durchgeführt. Fibrillen, gebildet von A β 42 wt Peptid, zeichnen sich durch besondere Rigidität aus und weisen eine durchschnittliche Länge von 301 +/- 63 nm bei einer Breite von 18,5 +/- 0,68 nm auf. Ein Teil der Peptide liegt zwar noch als protofibrilläre oder kleinere Aggregate vor, dieser Anteil ist jedoch deutlich geringer als die Anzahl der maturierten Fibrillen (Abb. 11A, F, G).

Auch A β 42 G29A Peptide aggregieren innerhalb von 24 Std zu reifen Fibrillen (Abb. 11B, F, G). Erstaunlich ist, dass diese Fibrillen trotz größerer Varianz im Durchschnitt doppelt so lang wie A β 42 wt Fibrillen sind (Länge: 668 +/- 212 nm) (Abb. 11G). Bei der Vermessung der Fibrillenbreite fällt auf, dass sie keinen signifikanten Unterschied zu A β 42 wt Fibrillen aufweisen (Breite: 20 +/- 1,2 nm) (Abb. 11F). Wird jedoch innerhalb des A β 42 wt Peptides das G33 ausgetauscht (A β 42 G33A, A β 42 G33I, A β 42 G29/33A), entstehen überraschenderweise keine Fibrillen (Abb. 11C-G). Es werden lediglich Protofibrillen gebildet, die in ihrer Länge nur ein Drittel der A β 42 wt Fibrillen umfassen (87-109 +/- 4-7 nm) (Abb. 11F), wobei auch hier wieder kein Unterschied in der Breite festgestellt werden kann (17-20 +/- 0,6 nm) (Abb. 11G).

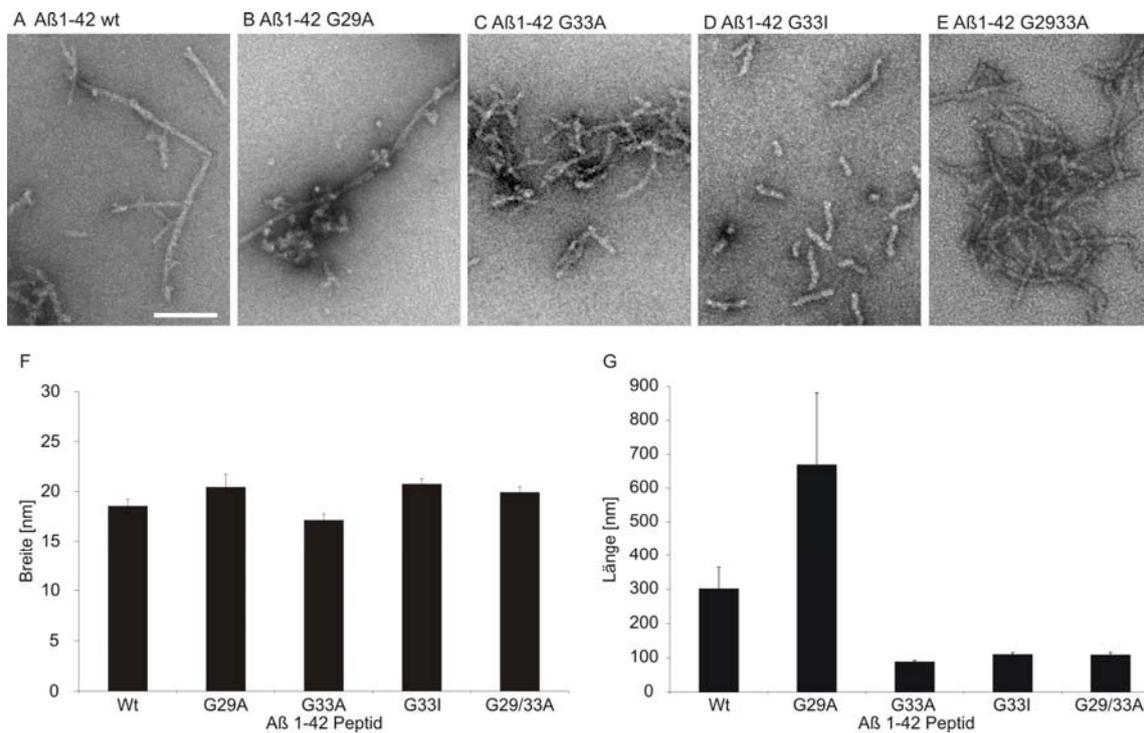


Abb. 11: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von 50 μM A β 42 Peptiden nach 24 Std Inkubation bei RT. **A:** A β 42 wt Peptid und **B:** A β 42 G29A bilden rigide, lange Fibrillen aus während **C:** A β 42 G33A **D:** A β 42 G33I und **E:** A β 42 G29/33A lediglich kurze protofibrilläre Strukturen aufzeigen. Der Skalierungsbalken zeigt 100nm. Die Auswertung der Fibrillen mit EM-Menu 4 ergab bei allen Fibrillen eine konstante **F:** Breite während die **G:** Länge stark variierte. Sie entsprach bei A β 42 G33 Substitution nur ein Drittel der A β 42 wt Fibrillen, wohingegen Fibrillen des A β 42 G29A Peptides zwei bis dreimal länger waren als die des A β 42 wt.

Durch die Analysen der Oligomerisierung und Fibrillenbildung wird deutlich, dass im Gegensatz zu A β 42 wt, eine Substitution an Position G33 zu einer schnellen Oligomerisierung führt, die Aggregation zu einer reifen Fibrille aber an einem bestimmten Punkt unterbindet. Um diesen Zeitpunkt besser charakterisieren und die Fibrillenbildung des A β 42 wt Peptides beschreiben zu können, wurden in Kooperation mit Prof. J.P. Rabe von der Humboldt Universität, Berlin, Rasterkraftmikroskopie (AFM) Messungen durchgeführt.

Durch die bessere Auflösung dieses Mikroskops können hier nicht nur Fibrillen und Protofibrillen abgebildet werden, sondern auch kleinere Aggregate und Oligomere. Zur genaueren Berechnung der Partikelgröße werden für die Eichung des Mikroskops und der abtastenden Spitzen (Tips) Goldpartikel mit genormter Größe, sowie A β 42-1 wt Peptid eingesetzt (Gensler, 2008). Das inverse Peptid dient zum besseren Vergleich mit den späteren A β 42 Peptiden, da es die gleiche Größe hat, aber nicht aggregiert, sondern nur

in monomerer Form vorliegt (Roher et al., 1996). Die Peptide werden in einem Zeitverlauf von Zeitpunkt null (entspricht frisch gelöstem Peptid) bis 24 Std alle vier Stunden gemessen. Das gelöste Peptid wurde während der gesamten Messung bei RT gehalten. Für Peptide mit einem Aminosäureaustausch an Position G33 (A β 42 G33A, A β 42 G33I, A β 42 G29/33A) können während des gesamten Messzeitraumes keinerlei Veränderung der Aggregatgröße festgestellt werden (Abb. 12C-D). Beobachtet man über den gleichen Zeitraum das A β 42 wt Peptid, so können zum Zeitpunkt null nur Oligomere gemessen werden, die mit der Größe von Monomeren bis Tetrameren korrelieren (Abb. 12A). Diese Oligomere aggregieren weiter, werden aber nach 12 Std wieder kleiner (Abb. 12A). Zu diesem Zeitpunkt werden dafür erste fibrilläre Strukturen erkennbar. Die Länge der Fibrillen nimmt im weiteren Zeitverlauf zu und parallel wird auch die Partikelgröße wieder erhöht (Abb. 12A). Bereits bei den EM Aufnahmen kann gezeigt werden, dass A β 42 G29A längere Fibrillen ausbildet als das A β 42 wt Peptid. Während des Zeitverlaufes wird mit AFM abgebildet, dass A β 42 G29A bereits nach 4 Std Inkubation erste fibrilläre Strukturen bildet (Abb. 12B). Diese wachsen im Gegensatz zum A β 42 wt Peptid schneller und nehmen auch zahlenmäßig zu (Abb. 12A, B).

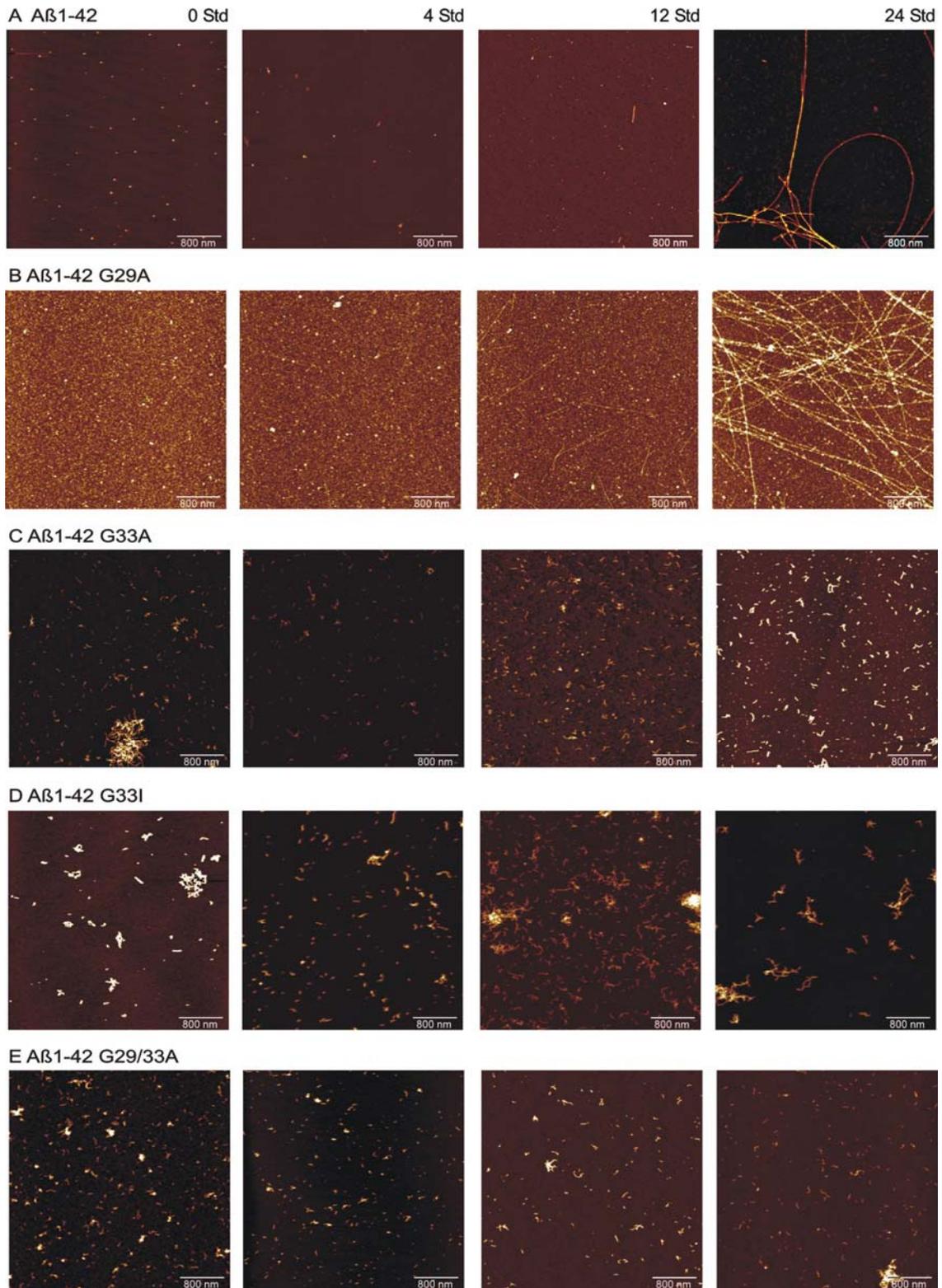


Abb. 12: Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen von 50 μ M A β 42 Peptiden über einen Zeitraum von 24 Std Inkubation bei RT. **A:** A β 42 wt Peptid bilden nach 12 Std und **B:** A β 42 G29A bereits nach 4 Std erste Fibrillen aus während **C:** A β 42 G33A und **D:** A β 42 G33I **E:** A β 42 G29/33A lediglich kurze protofibrilläre Strukturen aufzeigen die sich über den gesamten Zeitverlauf nicht verändern. Skalierungsbalken zeigt 800 nm.

Die statistische Auswertung der Fibrillenlänge ergibt für A β 42 wt nach 8 Std erste messbare Fibrillen variabler Länge von 350 +/- 150 nm (Abb. 13A). Die Fibrillenlänge wird in den nächsten vier Stunden verdoppelt, erreichen dann aber mit einer Länge von 750 +/- 10 nm ein konstant bleibendes Maximum (Abb. 13A).

A β 42 G29A bildet schneller, längere Fibrillen aus, die bereits nach vier Stunden eine Länge von 500 +/- 200 nm erreichen und bis zu 24 Std (1500 +/- 1000 nm) kontinuierlich länger werden, wobei die Länge zu allen Zeitpunkten stark variiert (Abb. 13B).

Über den gesamten Inkubationszeitraum ändert sich die Länge der Peptide mit einer G33 Substitution (A β 42 G33A, A β 42 G33I, A β 42 G29/33A) nicht. Alle drei Peptide zeigen eine Länge von 70-190 +/- 5-10 nm (Abb. 13C-E).

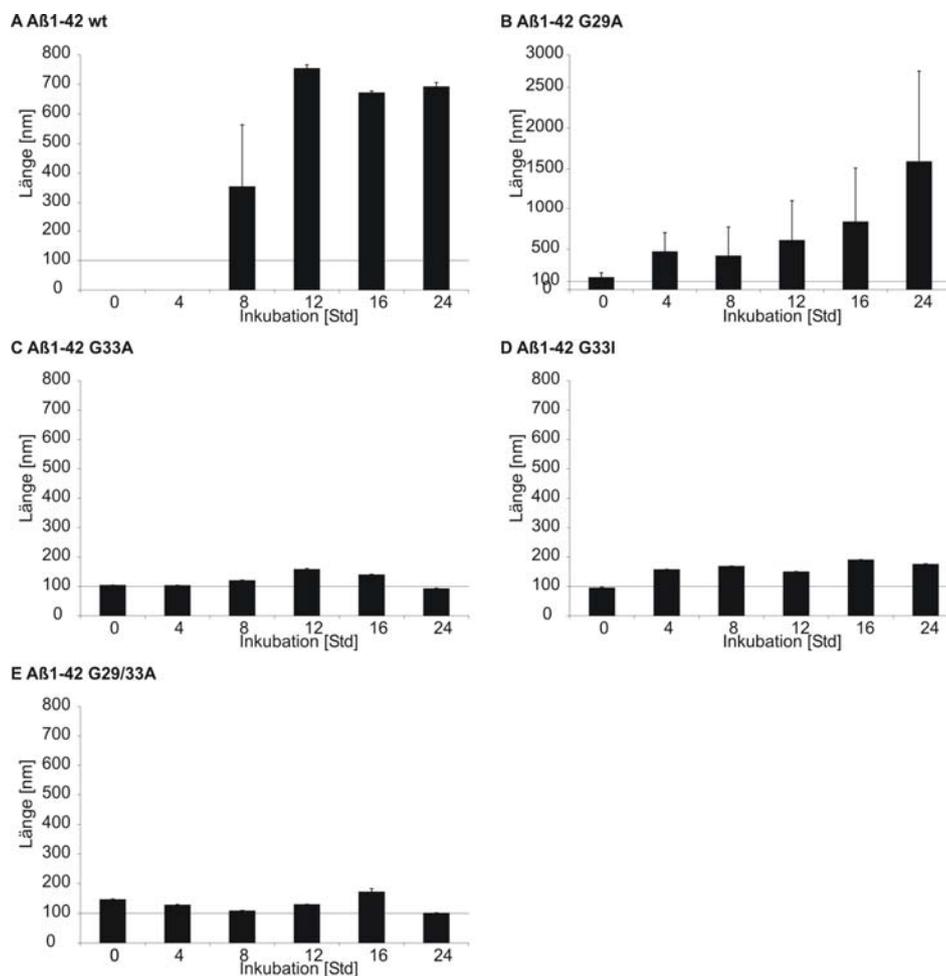


Abb. 13: Statistische Auswertung der Fibrillen Länge von A β 42 Peptiden innerhalb der durch AFM dokumentierten Inkubation von 24 Std bei RT. **A:** A β 42 wt bildet nach 8 Std erste messbare Fibrillen deren Länge bis zu 12 Std. steigt und dann konstant bleibt. **B:** A β 42 G29A formt bereits früh Fibrillen mit stark variierender Länge die stetig länger werden. Zu beachten ist die veränderte Skalierung. **C:** A β 42 G33A, **D:** A β 42 G33I und **E:** A β 42 G29/33A aggregieren nur zu protofibrillären Strukturen, die bereits zum Zeitpunkt null vorhanden sind und auch über den gesamten Zeitraum nicht länger werden (n=3 \pm sem).

Somit kann aus den EM und AFM Ergebnissen geschlussfolgert werden, dass während Substitutionen an Position G33 des A β 42 Peptides zu einer Arretierung des Aggregationszustandes im protofibrillären Stadium führen, eine Substitution an Position G29 die Aggregation des A β 42 Peptides zur reifen und rigiden Fibrille beschleunigt und erhöht. Dennoch wird der Durchmesser der Aggregate durch keine Substitution verändert.

2.3 Einfluss des GxxxG-Motivs auf die Struktur von A β 42

2.3.1 Sekundärstrukturanalyse der verschiedenen A β 42 Peptide mittels Circular dichroismus

Die aufgezeigten Unterschiede in der Aggregation der A β 42 wt und substituierten Peptide (Abb. 10-12) werfen die Frage auf, ob diese auf Unterschiede in der Konformation der Peptide zurückzuführen sind. Dazu wurde die Sekundärstruktur der Peptide mittels Circular dichroismus (CD) bestimmt. Jeweils 200 μ M frisch gelöste oder für 60 min inkubierte A β 42 wt, A β 42 G29A, A β 42 G33A und A β 42 G33I Peptide wurden getestet.

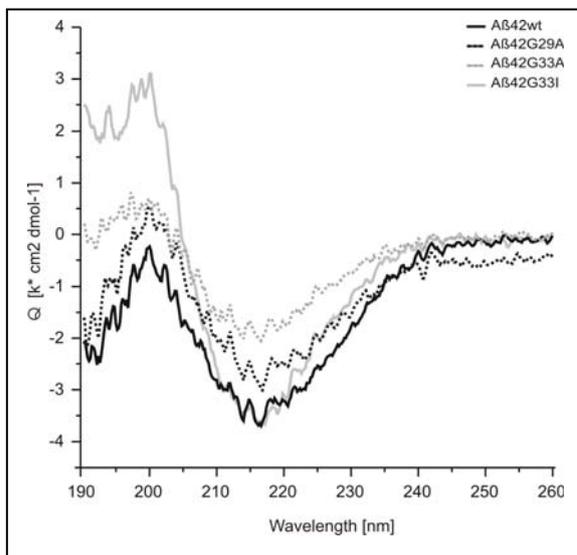


Abb. 14: Messung des Circular dichroismus von in 0,1xPBS frisch gelösten 200 μ M A β 42 Peptiden. Alle Peptide A β 42 wt (schwarze Linie), A β 42 G29A (schwarze gestrichelte Linie), A β 42 G33A (graue gestrichelte Linie) und A β 42 G33I (graue Linie) zeigen eine sekundäre β -Faltblatt Struktur.

Exemplarische Darstellung einer Messung aus mindestens drei unabhängigen Messungen, berechnet mit Origin7.

Die Messungen ergeben bei allen Peptiden eine sekundäre β -Faltblatt-Struktur, die sich innerhalb der verschiedenen Peptide nicht deutlich unterscheidet (Abb. 14). So ist bei allen Peptiden das für β -Faltblatt-Struktur charakteristische Spektrum mit Absorptions-Minimum bei 215 nm und Maximum bei 200 nm zu erkennen.

2.3.2 Tertiärstrukturanalyse der verschiedenen A β 42 Peptide mittels limitierter Proteolyse

Obwohl aufgrund der CD Daten die Sekundärstruktur der Peptide vergleichbar ist, ist ein Unterschied in der Tertiärstruktur möglich. Es ist bekannt, dass A β aus einem unstrukturierten N-Terminus und zwei aneinander gelagerten, durch einen Turn verbundenen β -Faltblättern besteht (Abb. 4) (Luhrs et al., 2005). Änderungen, vor allem im Faltungskern des Peptids, können Veränderungen in der Konformation verursachen. Um diese Annahme zu überprüfen, wurde eine limitierte Proteolyse durch Trypsin durchgeführt. Durch eine vorherige *in silico* Simulation des tryptischen Verdaus und der dabei entstehenden Fragmente (Tab. 1) kann über die Zeit verfolgt werden, wann welches Peptid entsteht. Somit kann nachgestellt werden, welche Schnittstellen am besten exponieren und in welcher Reihenfolge die Spaltungen durchgeführt werden. Gibt es unter den einzelnen Peptiden Unterschiede, lässt dies Rückschlüsse auf die Struktur des Peptids zu.

Tab. 1: Erwartete Spaltprodukte nach dem tryptischen Verdaus von A β 42 Peptid.

Spaltungsprodukt (A β Reste)	Monoisotopische Masse	Spaltungsprodukt (Aminosäuresequenz)
01-05	637.29	DAEFR
01-16	1954.88	DAEFRHDSGYEVHHQK
06-16	1336.60	HDSGYEVHHQK
17-28	1325.67	LVFFAEDVGSNK
01-28	3261.53	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNK
29-42	1269.76	GAIIGLMVGGVVIA
17-42	2576.26	LVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA
01-42	4512.27	ungespalten

Alle Proben wurden sowohl in Kokristallisation mit Sinapinsäure (SA) als auch α -Cyano Zimtsäure (CCA) gemessen, da sich SA vor allem für größere Peptide, CCA vor allem für die Messung kleinerer Fragmente eignet. Hydrophobe Fragmente wie A β 29-42 können unter keinen Bedingungen detektiert werden, da sie keine ionisierbaren Aminosäuren enthalten und besonders schnell aggregieren.

Mit dem Hintergrund, dass MALDI-MS Analysen keine quantitativen Ergebnisse abbilden, sondern nur qualitative Rückschlüsse zulassen, sind in der Auswertung Verhältnisse des ungespaltenen Peptids zu den gebildeten Fragmenten berechnet.

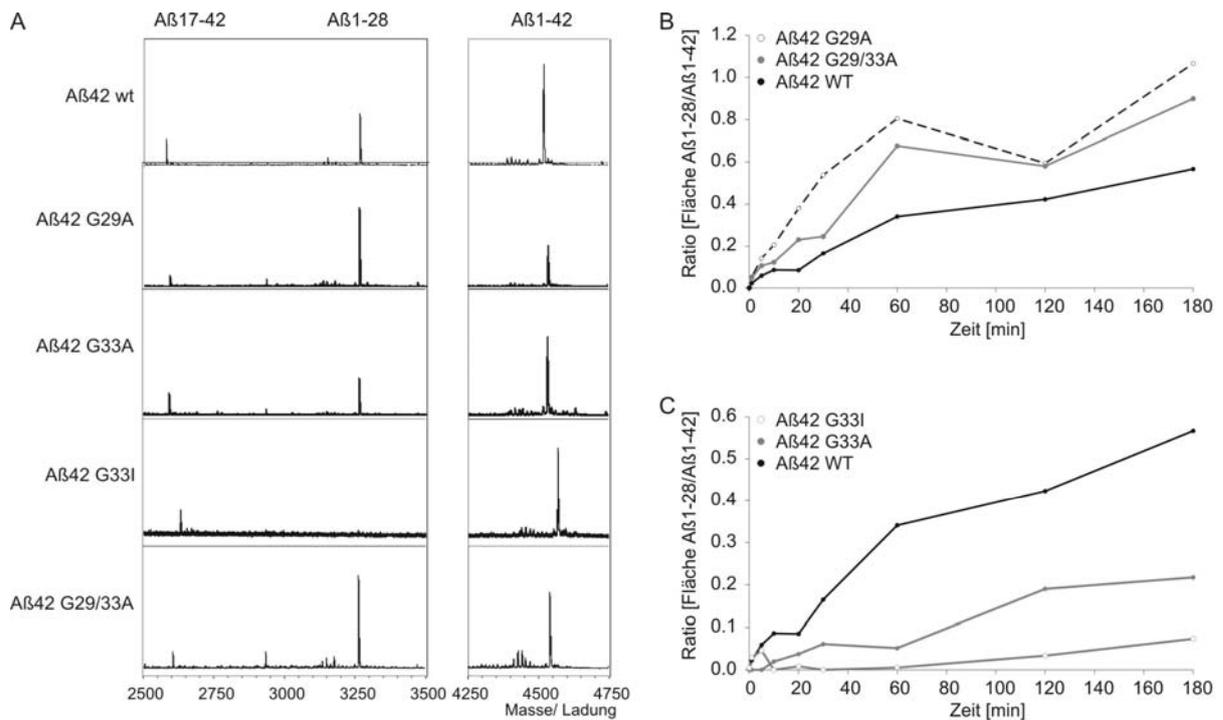


Abb. 15: Limitierte Proteolyse von Aβ42 Peptiden mit Trypsin über einen Zeitraum von 3 Std bei 37°C. **A:** Exemplarische MALDI-Spektren nach drei Stunden tryptischen Verdaus. Die Aβ17-42 Fragmente sind in allen Proben sofort detektierbar. Aβ1-28 sind in signifikanten Mengen nur in den Proben von Aβ42 wt, Aβ42 G29A und Aβ42 G29/33A messbar. Das Verhältnis der Peakflächen des Aβ1-28 zu Aβ1-42 beschreibt die Unterschiede in der Proteolyse **B:** Aβ42 G29A und Aβ42 G29/33A bilden schneller Aβ1-28 als Aβ42 wt, während **C:** Aβ42 G33A und Aβ42 G33I nicht zu Aβ1-28 gespalten werden. Exemplarische Darstellung einer Messung aus mindestens drei unabhängigen Messungen.

Während des gesamten Zeitverlaufs ist immer ein großer Anteil an ungespaltenem Peptid zu detektieren. Jedoch sind bereits nach 1 min Inkubation mit Trypsin erste Fragmente nachweisbar. Dabei handelt es sich bei allen Peptiden um das Spaltprodukt Aβ1-16 (nicht abgebildet) sowie das ergänzende Aβ17-42 (Abb. 15A). Auch das Fragment 6-16 kann vor allem auf SA Matrix detektiert werden, ist aus Gründen der Übersichtlichkeit hier aber nicht extra aufgeführt. Ein Unterschied in der Spaltung der Peptide ist lediglich bei dem Fragment Aβ1-28 zu erkennen. Während aus Aβ42 G29A und Aβ42 G29/33A (Abb. 15A, B) bereits früh hohe Mengen des Spaltproduktes gebildet werden, ist die Position K28 für das Trypsin bei Aβ42 G33A und Aβ42 G33I nicht erreichbar (Abb. 15A, C). Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass Trypsin Aβ42 zuerst an Position K16 schneidet und dann sofort weiter an Position K28.

Als Teil der Turn Struktur, ist K28 bei einer Substitution an Position G33 maskiert, und abhängig von der Hydrophobizität der Aminosäure, nicht oder nur schwach zugänglich für das Trypsin. Ein Aminosäureaustausch an Position G29 hingegen destabilisiert die

Konformation und führt im Gegensatz zu A β 42 wt, zu einer erhöhten Spaltung des Trypsins an Position K28.

2.3.3 Computergestütztes Modell der verschiedenen A β 42 Peptide

Die bisherige Annahme der strukturellen Unterschiede sollten nicht nur experimentell analysiert, sondern auch mittels theoretischer Untersuchungen dargestellt werden. Um eine wahrscheinliche Struktur abzubilden, wurde ein computergestütztes Modell erstellt. Dabei wurde mit Unterstützung von Dr. P. Hildebrand von der Charité, Berlin, ein bereits bestehendes Modell von Luhrs et al. 2005 verwendet und durch Einführen der gewählten Aminosäureaustausche modifiziert. Das Modell geht davon aus, dass das A β 42 Peptid in wässriger Umgebung eine β -Faltblatt Struktur annimmt, die durch einen Turn an Position 27-30 unterbrochen ist (Luhrs et al., 2005) (Abb. 4). Dabei exponiert das N-terminale β -Faltblatt eine hydrophile, das C-terminale β -Faltblatt eine hydrophobe Oberfläche (Abb. 16A). Zusätzliche Stabilität bekommt diese β -Faltblatt-Turn- β -Faltblatt Anordnung durch Wasserstoffbrückenbindungen durch die Aminosäuren an Position Asp22 und Lys28 (Street and Mayo, 1999; Yan et al., 2007).

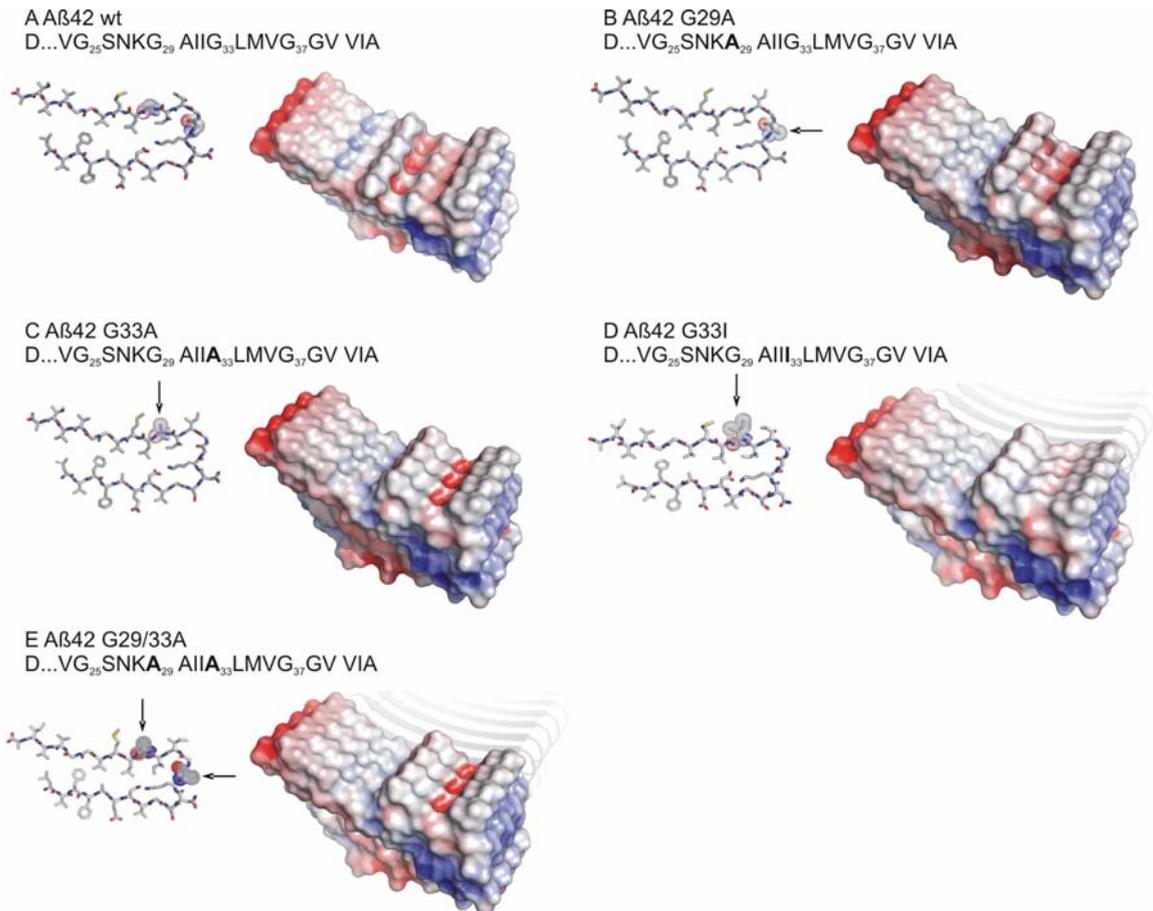


Abb. 16: Computergestütztes Modell von Tetrameren A β 42 Peptiden, ausgehend von dem Modell von Luhrs et al. 2005. Substitutionen in der Aminosäuresequenz sind fett dargestellt und im Stabmodell mit Pfeilen markiert. **A:** A β 42 wt; **B:** A β 42 G29A; **C:** A β 42 G33A; **D:** A β 42 G33I und **E:** A β 42 G29/33A
In rot sind negativ geladene, in blau positiv geladene Oberflächen dargestellt.

Durch Berechnung der Hydrophobizität der einzelnen Aminosäuren innerhalb eines Peptids kann ermittelt werden, an welchen Positionen es zu Abschirmungen der wässrigen Umgebung kommt (Abb. 17). Es zeigt sich, dass durch Erhöhung der Hydrophobizität an Position Gly33 durch Ala oder Ile das C-terminale β -Faltblatt im Gesamten eine ebenmäßigere hydrophobe Oberfläche erhält (Abb. 16C, D). Dies kann zu einer schnelleren Aggregation und durch die erzwungene Annäherung der hydrophoben Oberflächen zu einer Krümmung der Oligomere und damit zu einer unvollständigen Fibrillenbildung führen (Abb. 16C, D, 17). Es ist davon auszugehen, dass die Erhöhung der Hydrophobizität an Position G33 zu einer Stabilisierung des Faltungskerns (AS 21–30) führt.

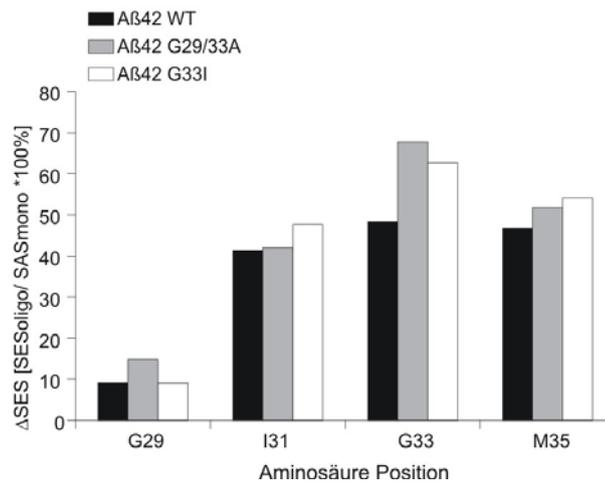


Abb. 17: Berechnung der Oberflächenhydrophobizität ausgehend von dem Aβ42 Tetrameren Modell.

$\Delta\text{SES} = [\text{SES des Oligomers}] - [\text{SES des Monomers}] / [\text{SAS des Monomers}] * 100\%$. Die Verdeckung des hydrophoben SAS unterstützt die Faltung zum β -Faltblatt, und damit zur Oligomerisierung. Hier dargestellt ist der Anteil der Aminosäuren G29, I31, G33 und M35 die in der Oligomeren Form im Gegensatz zum Monomer von der Oberfläche die innerhalb der Aβ42 wt (schwarz), Aβ42 G29/33A (grau), Aβ42 G33I (weiß) Peptide verdeckt sind. Keine Erhöhung der SES bei Aminosäure G29. Bei I32, G33 und M35 ist die SES erhöht, was verstärkt wird durch Substitution des Aβ42 wt zu Aβ42 G29/33A, Aβ42 G33I.

Die Bildung von Oligomeren wird demnach durch die Maskierung hydrophober Oberflächen unterstützt. Die Tendenz dazu kann am besten durch die Berechnung der relativen Erhöhung der von der Lösung geschützten Oberfläche (solvent-excluded surface, SES) (ΔSES) dargestellt werden. Dabei wird das Verhältnis SES zu von der Lösung erreichbaren Oberflächen (solvent-accessible surface (SAS)) errechnet (Christensen et al., 1990).

$\Delta\text{SES} = [\text{SES des Oligomers}] - [\text{SES des Monomers}] / [\text{SAS des Monomers}] * 100\%$.

Die Berechnung ergibt, dass Aminosäuren innerhalb des C-terminalen β -Faltblattes, die an der Oberfläche exponiert vorliegen (I31, G33, M35) verdeckt werden, um einen Kontakt mit der umgebenden Lösung soweit wie möglich zu vermeiden. Durch das Einfügen weiterer hydrophober Aminosäuren, wie bei Aβ42 G33I oder Aβ42 G33A, wird die hydrophobe Oberfläche kontinuierlich/planer, was zu einer erhöhten Abschirmung des β -Faltblattes führt (Abb. 16C, D, 17).

Im Gegensatz dazu ist G29 innerhalb des Turn lokalisiert und hat einen äußerst geringen Effekt auf die Peptid Faltung und Oligomerisierung (Abb. 8C, 9, 14A, C). Da aber in der AFM Darstellung des Peptids erkannt werden konnte, dass diese schneller Fibrillen (Abb. 10-12) ausbildet, führt die Substitution des G29 zu einer offeneren Konformation (Abb. 16B, 17), was bei dem Aβ42 G29/33A Peptid (Abb. 16E, 17) das intermediäre Verhalten in der Oligomerisierung erklärt.

2.4 Einfluss des GxxxG-Motivs auf die pathologische Wirkung von A β 42

2.4.1 Analyse der Einwirkung der verschiedenen A β 42 Peptide auf die A β 42 vermittelte Toxizität

Obwohl bereits seit einigen Jahren bekannt ist, dass diese toxischen Effekte nicht auf die abgelagerten Plaques oder Fibrillen sondern vor allem auf lösliche Oligomere zurückzuführen sind, ist noch nicht gänzlich geklärt, welche Aggregationsform zum Neuronenverlust führt (Gong et al., 2003; Lesne et al., 2006; Shankar et al., 2007; Shankar et al., 2008; Walsh et al., 2002). Es wird jedoch angenommen, dass die Oligomerisierungsform mit der toxischen Wirkung einhergeht.

Um zu zeigen, welche oligomeren Formen am meisten toxisch sind und ob die GxxxG-Motive einen Einfluss darauf haben, wurden Zell-Viabilitätstests durchgeführt.

Zuerst wurden SH-SY5Y Zellen mit gleichen Mengen frisch gelöstem Peptid oder aus der GPC getrennten Oligomerformen inkubiert. Durch Verwendung des MTT-Tests kann die Anzahl der lebenden Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ermittelt werden (Abb. 18). Dabei induzieren die frisch gelösten A β 42 wt Peptide eine Reduktion der Zellen um 59 +/- 7,5% (Abb. 18A). Die Toxizität der Oligomer-Fractionen steigt graduell vom Monomer (50 +/- 3%) bis es ein Maximum von 60 +/- 6% bei der Tetramer Fraction erreicht, um dann mit steigender Oligomerisierung abzunehmen bis zu einer Toxizität von 10 +/- 6% (Abb. 18A).

Ein ähnliches toxisches Verhalten kann für das A β 42 G29A Peptid gezeigt werden (Abb. 18B). Auch hier steigt die Toxizität vom Monomer zum Tetramer an und sinkt vom Tetramer zum 20-mer (Abb. 18B). Jedoch ist der Zellverlust des frisch gelösten Peptids (67 +/- 5%) und des Tetramers (70 +/- 3%) gegenüber dem A β 42 wt erhöht (Abb. 18A, B). Gegenteilig zu diesen Peptiden verhalten sich die A β 42 G33 substituierten Peptide (Abb. 18C-E). Während frisch gelöstes und dimeres A β 42 G33A eine maximale Toxizität von 20 +/- 6% verursacht (Abb. 18C), führt eine Inkubation mit A β 42 G33I Peptid weder in frisch gelöster Form noch in irgendeiner oligomeren Form zu einem Zellverlust (Abb. 18D).

Ähnlich wie bereits für das Oligomerisierungsverhalten beschrieben (GPC), nimmt das A β 42 G29/33A Peptid eine intermediäre Position ein (Abb. 18E). Auch hier ist eine graduelle Zunahme der Toxizität mit steigender Oligomerisierung bis zum Tetramer zu erkennen, wenn auch in abgeschwächter Form gegenüber A β 42 wt und G29A Peptid

(Abb. 18A, B, E). Aus der bekannten Abfolge fallen das 6-mer und das 10-mer heraus. Während das 6-mer keine signifikante Toxizität verursacht, löst das 10-mer einen Zellverlust von 27 +/- 6% aus (Abb. 18E).

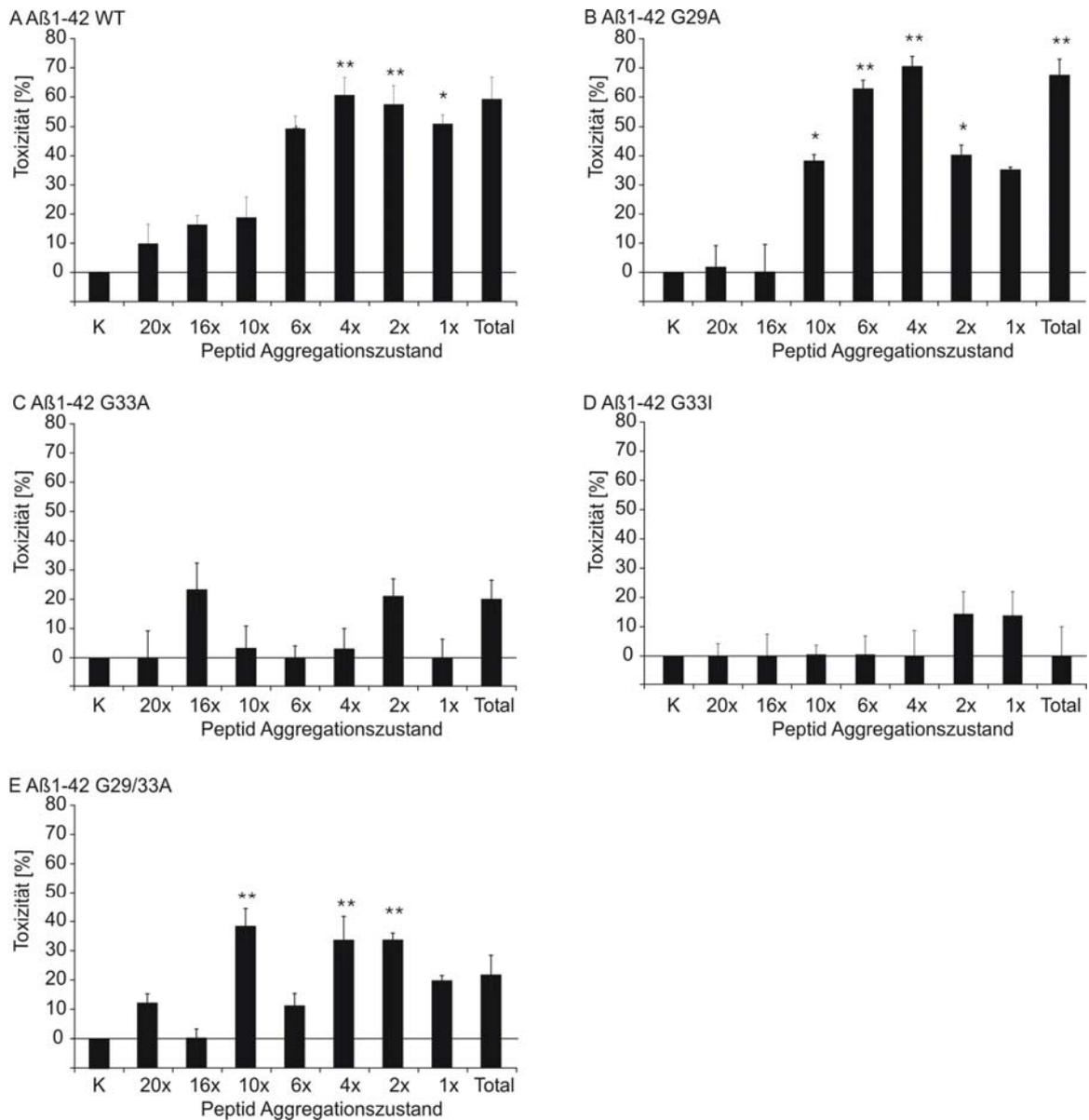


Abb. 18: Toxizitätstest von Aβ42 Peptiden auf SH-SY5Y Zellen. Die Zellen wurden mit 2,5 μM Peptid für 12 Std inkubiert um anschließend die lebenden Zellen mittels MTT-Test zu messen. Als K sind unbehandelte Kontrollzellen dargestellt, die auf 100% gesetzt wurden. Total entspricht dem Gemisch der Oligomeren vor deren Separation durch GPC. **A:** Aβ42 wt, **B:** Aβ42 G29A, **C:** Aβ42 G33A, **D:** Aβ42 G33I und **E:** Aβ42 G29/33A. (n = 4–8 ± sem) (*p<0.01, **p<0.001, Student's t-test).

Um ein weiteres aussagekräftiges Modell zur Charakterisierung des toxischen Effekts von A β 42 zu haben, wurden Kulturen von primären Rattenneuronen auf einem Gliarase kultiviert und auch hier die Zellviabilität nach Inkubation mit A β 42 Peptiden ermittelt. Da der Gliarase das Ergebnis verfälschen kann, wurde zuerst die Toxizität der Peptide auf Gliazellen bestimmt. Daraus ergibt sich, dass sowohl A β 42 wt als auch GxxxG-Austauschpeptide keinerlei toxische Effekte auf diese Zellen haben (Abb. 19).

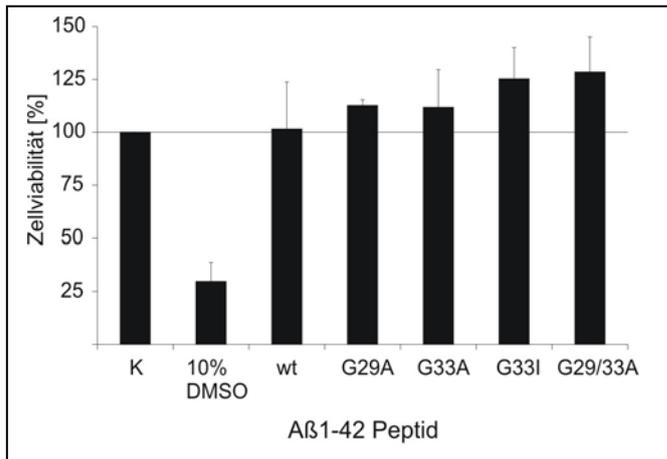


Abb. 19: Toxizitätstest von 2,5 μ M frisch gelöstem A β 42 Peptiden auf Glia Zellen. K bezeichnet unbehandelte Kontrollzellen als Negativkontrolle. Zellen, die mit 10% DMSO behandelt wurden, dienten als Positivkontrolle. Es wurden sowohl tote als auch lebende Zellen mit einem Multitox Test gemessen und zueinander in ein Verhältnis gesetzt. (n= 4 \pm sem).

Es zeigt sich, dass die primären Neuronen, anders als die Neuroblastom-Zellen, längere Zeit mit der gleichen Menge an Peptid inkubiert werden müssen, um einen Effekt erkennenbar zu machen. Die Reduktion der lebenden Zellen ist im Allgemeinen weniger stark als bei den SH-SY5Y Zellen ausgeprägt, jedoch ist die Verteilung wieder die gleiche (Abb. 20). Auch hier wird eine maximale Toxizität durch A β 42 wt, A β 42 G29A und deren Tetramere verursacht, die vom Monomer zu Tetramer ansteigt um dann mit steigender Oligomerisierung graduell zu fallen (Abb. 20A, B). Wie bereits bei den SH-SY5Y Zellen, haben A β 42 G33A und G33I Peptide keine signifikanten toxischen Effekte (Abb. 20C, D). A β 42 G29/33A zeigt ebenfalls das bereits beobachtete intermediäre Verhalten, mit einem Anstieg der Toxizität bis zum Maximum durch das Tetramer und einem Absinken bis hin zum 20-mer in geringerer Wirkung als A β 42 wt und G29A (Abb. 20E). Zu bemerken ist, dass bei keinem der untersuchten Peptide der Verlust primärer Neuronen höher als 50 \pm 2% liegt (Abb. 20).

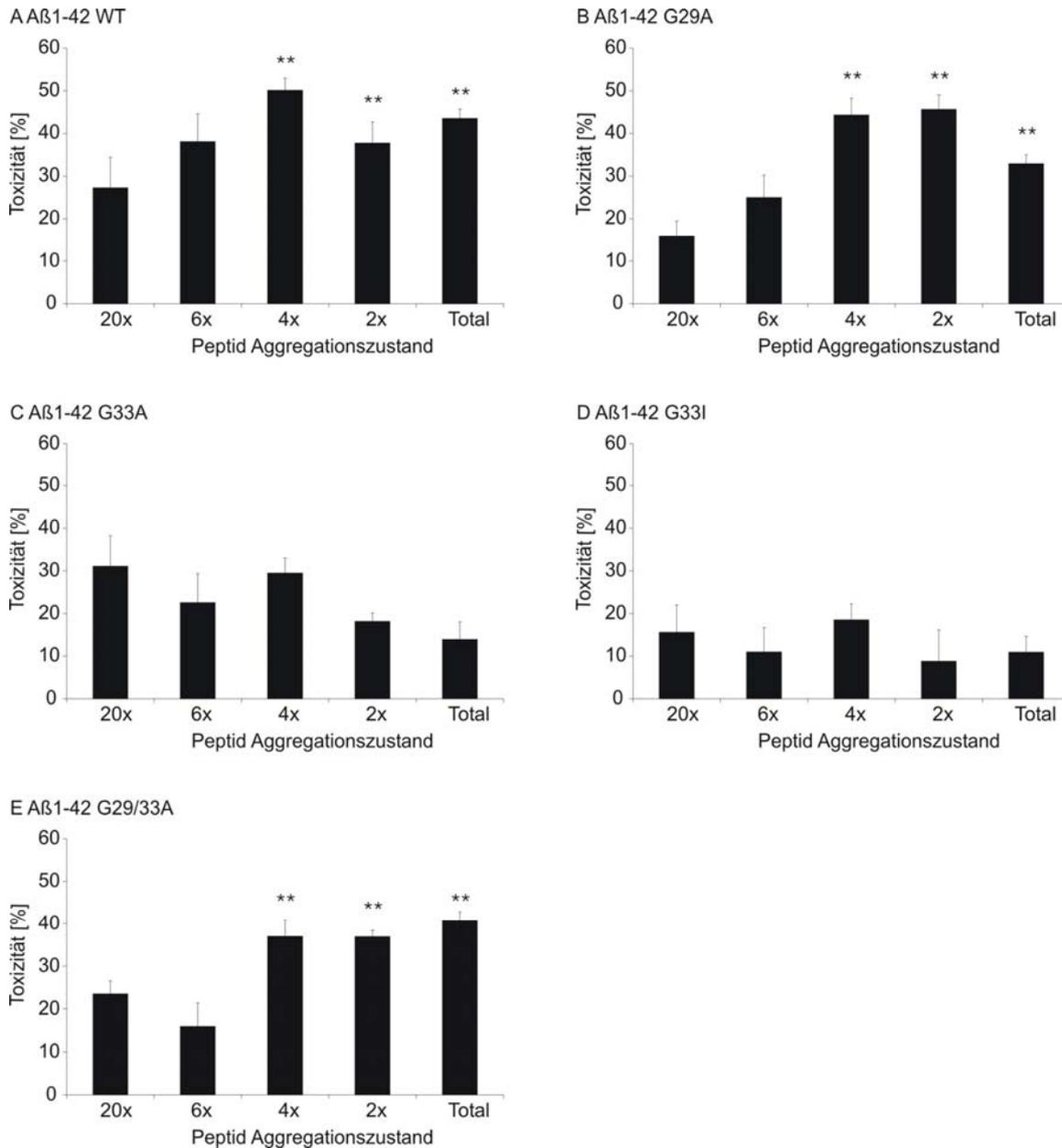


Abb. 20: Toxische Wirkung von Aβ42 Peptiden auf primäre Neuronen. Primäre Neuronen wurden auf Gliarasen kultiviert und für 24 Std mit 2,5 μM Peptid inkubiert bevor mit dem Multitox-Test lebende und tote Zellen gemessen wurden. **A:** Aβ42 wt, **B:** Aβ42 G29A, **C:** Aβ42 G33A, **D:** Aβ42 G33I und **E:** Aβ42 G29/33A. (n= 4–8 ± sem) (*p<0.01, **p<0.001, Student's t-test).

Diese ersten Untersuchungen zeigen, dass Aβ42 wt und Aβ42 G29A eine ähnlich hohe Toxizität verursachen, die auf ein Minimum reduziert ist, wenn Gly33 ausgetauscht wird. Werden Gly29 und Gly33 substituiert, führt das zu einem intermediären Verhalten. Um zu überprüfen, ob dieses Verhalten auch in einem *in vivo* Modell zu finden ist, wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. W. Schaffner von der Universität Zürich transgene *Drosophila melanogaster* Fliegen gezüchtet. Dabei wurde sich eines Systems

bedient, das es erlaubt, Proteine spezifisch in den Augen der Fliegen zu exprimieren, was im Falle eines toxischen Effekts des Proteins zu einer Deformation der Ommatidien, der Einzelaugen des Facettenauges der Fliege, führt. Diese Beeinträchtigung kann dann mit einem Mikroskop aufgenommen und dokumentiert werden.

A β 42 wt Fliegen zeigen im Vergleich zu nicht transgenen Kontrolltieren einen starken Phänotyp mit einer dramatischen Entstellung der Fliegenaugen (Abb. 21A, B). Auch bei A β 42 G29/33A Fliegen können starke Veränderungen der Augen dokumentiert werden (Abb. 21C). Wie erwartet zeigen Fliegen, die A β 42 G33I Peptid exprimieren, keinerlei Veränderung an den Augen (Abb. 21D). Es kann ein Phänotyp beobachtet werden, der vergleichbar ist mit nicht transgenen Fliegen (Abb. 21A, D).

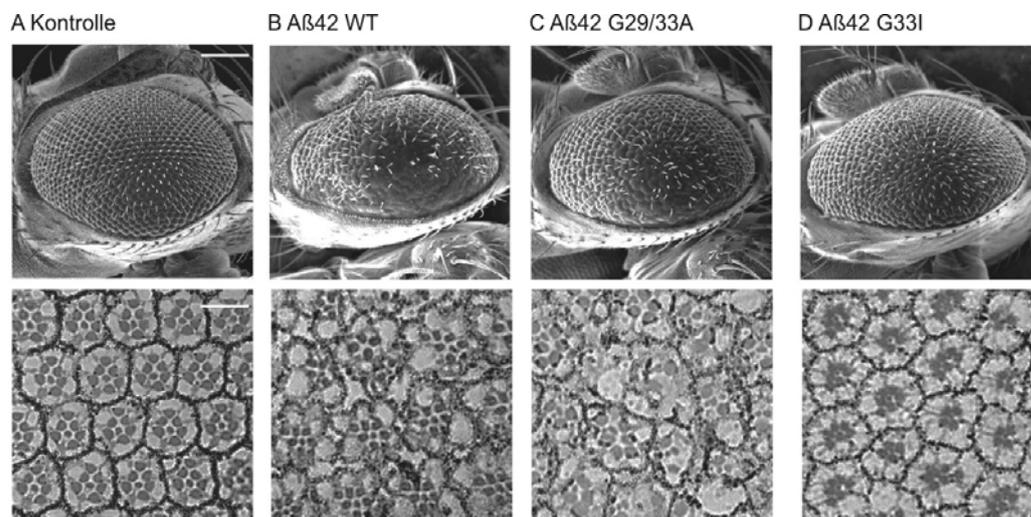


Abb. 21: Analyse der Toxizität von A β 42 exprimierenden Fliegen durch Elektronenmikroskopie der Augenstruktur und -Schnitte. **B**: A β 42 wt und **C**: A β 42 G29/33A zeigen drastische Störungen in den Fliegenaugen auf. Ähnlich wie **A**: die Augen von nicht transgenen Kontrolltieren weisen **D**: A β 42 G33I exprimierende Tiere keine Defizite auf. Skalierungsbalken entspricht 100 μ m.

Zusammenfassend können zwei Hauptbeobachtungen beschrieben werden. Erstens, sind vor allem Tetramere als die toxische Spezies zu betrachten. Zweitens führt eine Substitution an Position Gly33 zu einem Verlust der toxischen Wirkung des Peptids in jeder oligomeren Form. Das bedeutet, dass nicht nur der Aggregationszustand, sondern wahrscheinlicher die Struktur des Oligomers für die Toxizität entscheidend ist.

2.4.2 Analyse der Einwirkung der verschiedenen A β 2 Peptide auf die A β 42 vermittelte LTP Inhibition

Die oben ermittelte Toxizität beschreibt den Verlust von Zellen, was jedoch keine Aussage über den Einfluss des Peptids auf das Lernen und Gedächtnis im Gehirn zulässt. Wird der Hippocampus, wie bei Alzheimer Patienten, geschädigt, können diese Patienten keine neuen Gedächtnisinhalte mehr generieren. Ein anerkanntes Modell für Lernen und Gedächtnis ist die Langzeit-Potenzierung (LTP) der Schaffer-Kollateralen. Dabei werden in dem hier beschriebenen Aufbau zwei parallele Stimulationselektroden und eine Ableitelektrode orthodrom im Bereich der Dendriten positioniert und das exzitatorische postsynaptische Feld Potential (fEPSP) gemessen (Abb. 29). Durch einen hochfrequenten Stimulus wird dieses Potential langfristig erhöht, was als prozentuale Zunahme zur unstimulierten Basislinie (entspricht 100%) dargestellt wurde. Als Basislinie gilt hier der Zeitraum von 20 min vor Tetanus, währenddessen jeweils 500 nM frisch gelöster Peptide eingewaschen wurden. Da hier zwei Schaffer-Kollaterale Signalbahnen aufgenommen werden, aber nur einer der beiden den Stimulus erfährt, kann der unstimulierte vom stimulierten Weg abgezogen werden, was eine Bereinigung des Ergebnisses erzielt und etwaige Effekte des Peptids auf die Basislinie ausgleicht.

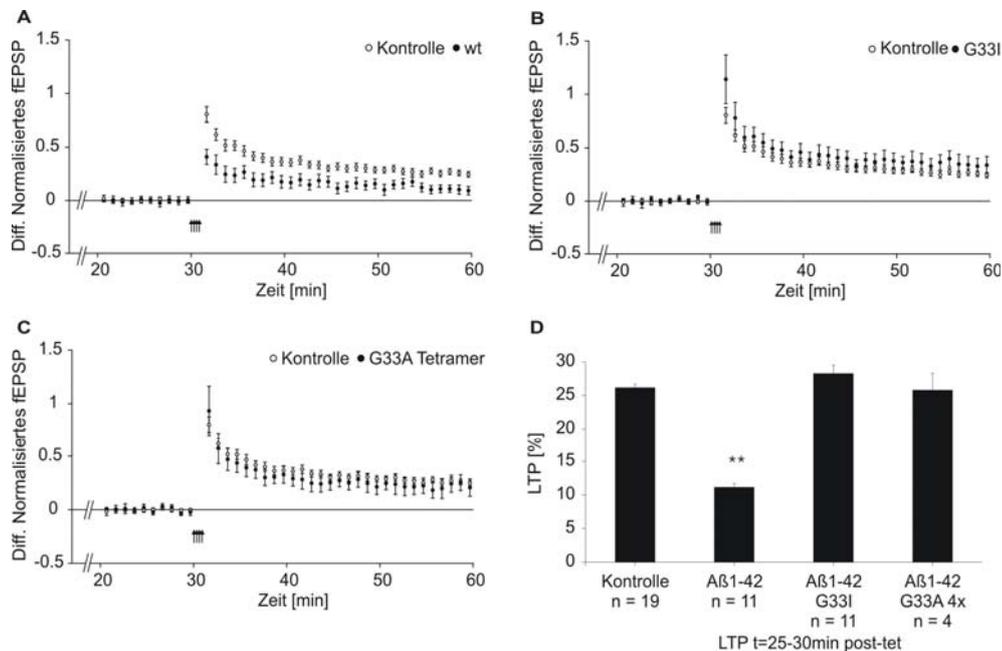


Abb. 22: Langzeit-Potenzierung der Schaffer-Kollateralen CA1 Region durch TBS (theta-burst stimulation). Dargestellt ist die Differenz des nicht-stimulierten Pfades vom stimulierten Pfad. Die Pfeile stellen die TBS dar. Kontroll-Messungen (offener Kreis) ohne Peptid sind zusammen mit Peptid (gefüllter Kreis) inkubierten Schnitten abgebildet **A:** A β 42 wt, **B:** A β 42 G33I, **C:** A β 42 G33A. **D:** Quantitative Auswertung aller Messungen 25-30 min nach Tetanus im Verhältnis zur Kontrolle. (n= 4–19 \pm sem) (**p<0.001, Student's t-test).

Wie bereits bekannt, führt eine Inkubation der akuten Schnitte mit A β 42 wt zu einer vollständigen Inhibition des LTP (Puzzo and Arancio, 2006). Dies konnte auch in diesen Experimenten mit frisch gelöstem A β 42 wt bestätigt werden (Abb. 22A, D, 23B).

Werden die Schnitte jedoch mit frisch gelöstem A β 42 G33I Peptid inkubiert, kann keine Inhibition der LTP beobachtet werden, sondern eine Potenzierung vergleichbar mit unbehandelten Kontrollschnitten (Abb. 22B, D). Eine vergleichbare Potenzierung ist auch nach Inkubation mit GPC aufgereinigten A β 42 G33A Tetramere zu erkennen (Abb. 22C, D).

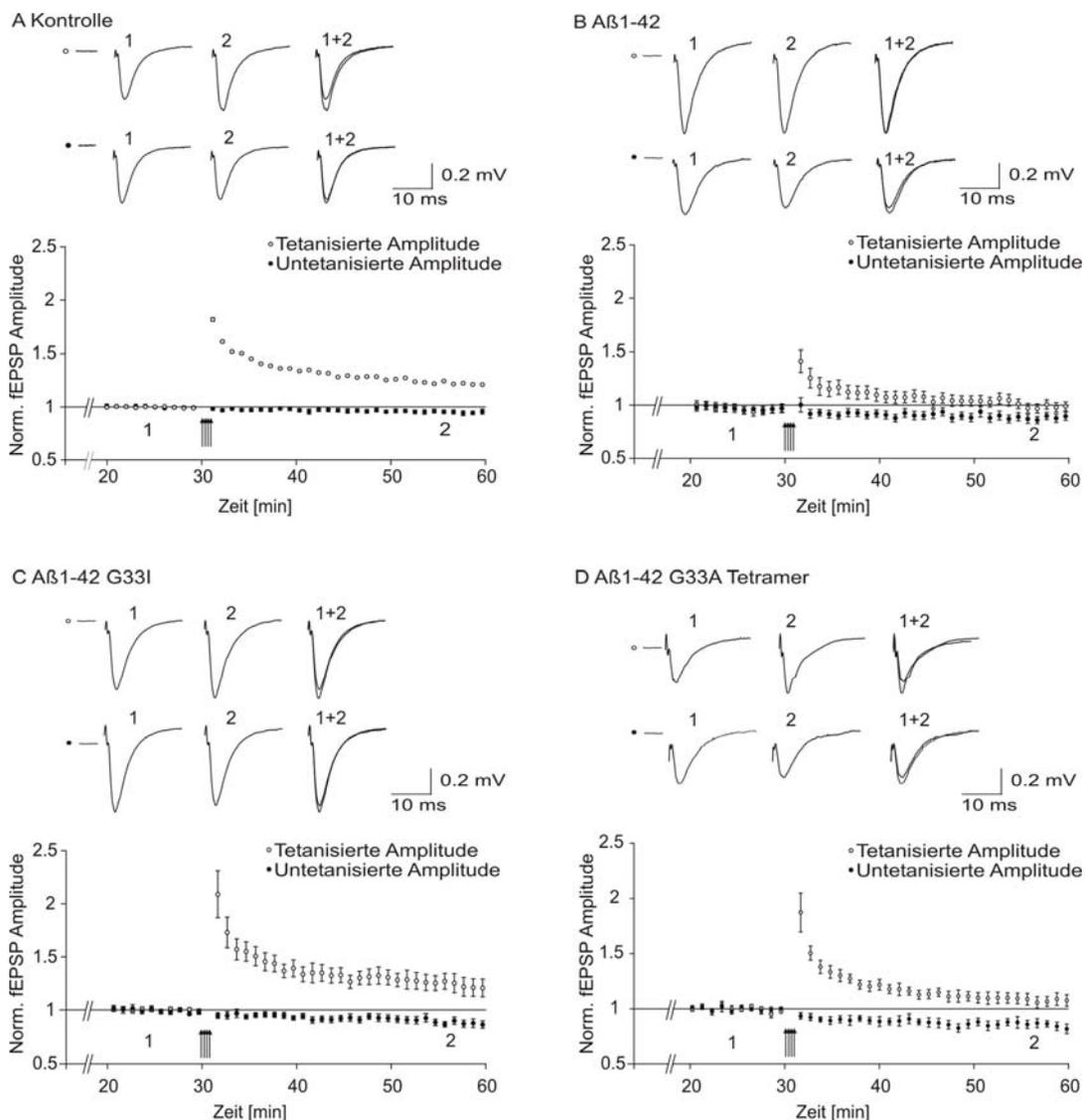


Abb. 23: Darstellung der tetanisierten (offener Kreis) und untetanisierten (geschlossener Kreis) Pfade der LTP Messungen in der Schaffer-Kollateralen CA1 Region. Exemplarisch sind die normalisierten Amplituden einer Messung vor (1) und nach (2) Tetanus jeweils beider Pfade abgebildet. Tetanisierung mit TBS nach 20 min einwaschen von 500 nM Peptid ist mit Pfeilen dargestellt. **A:** Kontroll-Messungen, **B:** A β 42 wt, **C:** A β 42 G33I, **D:** A β 42 G33A Tetramere. (n= 4–19 \pm sem)

Bei allen Peptiden ist zu beachten, dass sie einen starken Effekt auf die synaptische Transmission haben, da es zu einer Reduktion des Potentials der Basislinie des unstimulierten Weges gekommen ist (Abb. 23), es also durch alle Peptide einen vergleichbaren Effekt auf die Schnitte gibt.

Die Ergebnisse dieser LTP Messungen sind demnach deckungsgleich mit den Aussagen, die durch die Toxizitätstests getroffen werden konnten. Eine Substitution an A β Position G33 führt zu keiner LTP Inhibition. Auch ist die LTP-Inhibition nicht abhängig von dem Aggregationszustand des Peptids, wie durch die Potenzierung durch A β 42 G33A Tetramer unterstrichen werden konnte.

Aus den Messungen lässt sich außerdem noch ablesen, ob die LTP-Inhibition auf prä-, oder postsynaptischen Effekten beruht. Löst A β 42 präsynaptische Effekte aus, so würde sich das Verhalten der synaptischen Vesikel vor oder bei dem Ausschütten in den synaptischen Spalt verändern. Mögliche Ursachen wären dafür z.B. die Reduktion/ Erhöhung des Vesikel Pools in der Präsynapse oder eine Blockade/ Förderung bei der Verschmelzung der Vesikel mit der präsynaptischen Membran bzw. bei der Rückbildung der Vesikel. Das würde sich bei starker Änderung auf das „Paired-Pulse-Ratio“ auswirken. Durch die beiden kurz hintereinander folgenden Testpulse ist in der Regel die zweite postsynaptische Antwort größer als die Erste. Das beruht vor allem darauf, dass in der Präsynapse noch erhöhte Mengen Ca²⁺ von dem Aktionspotential des ersten Testpulses vorhanden sind (Zucker and Regehr, 2002). Somit sollte bei einer unbeeinflussten Präsynapse das Verhältnis der auf die Basislinie normalisierten zweiten Antwort zur ersten Antwort immer eins betragen.

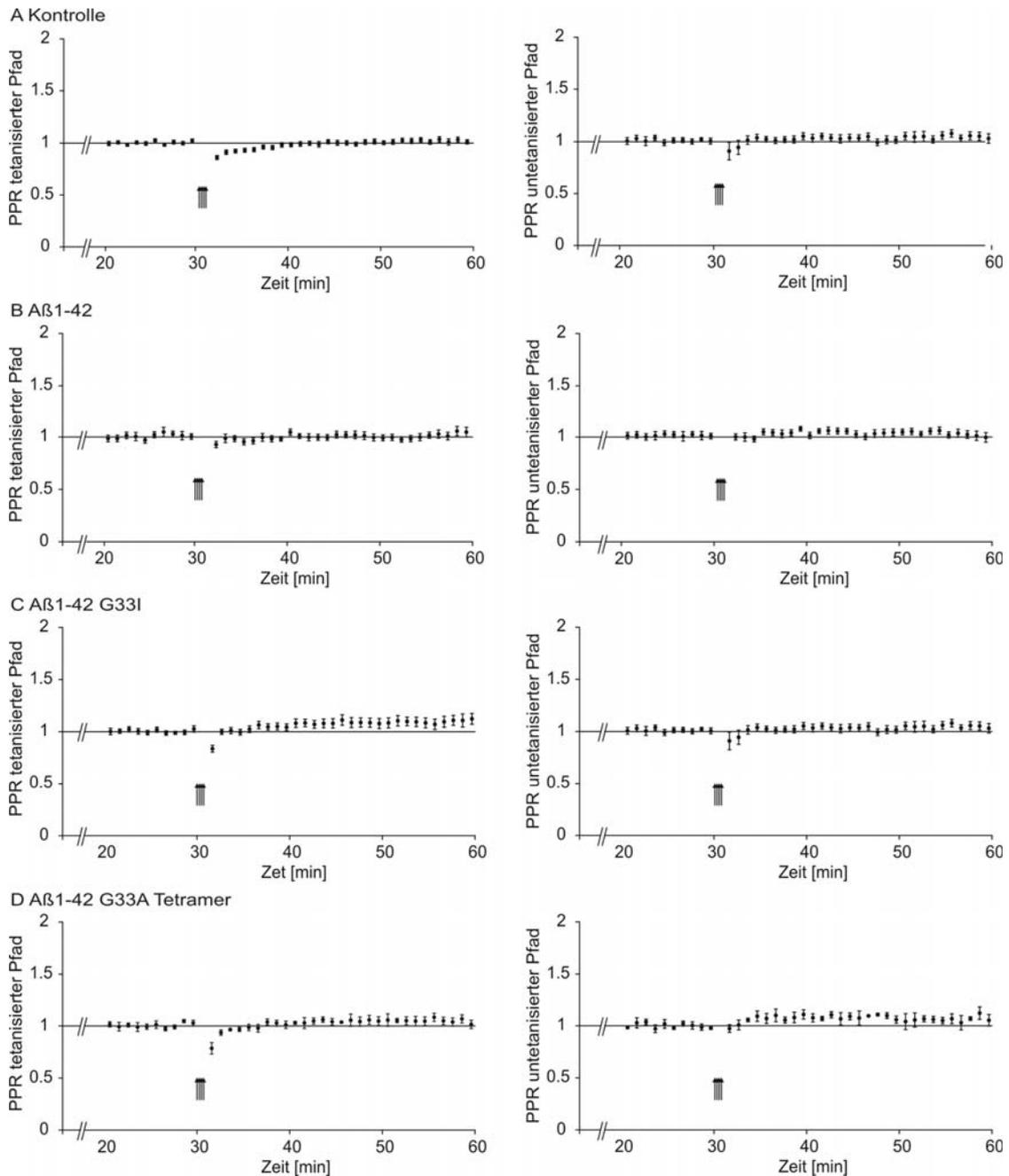


Abb. 24: Darstellung der „Paired-Pulse-Ratio“ (PPR) der tetanisierten (links) und untetanisierten (rechts) Wege. Weder bei **A**: Kontroll-Messungen, **B**: A β 42 wt **C**: A β 42 G33I noch **D**: A β 42 G33A Tetramere zeigt eine Veränderung der PPR. (n= 4–19 \pm sem)

Hier kann durch Analyse dieses Verhältnisses ein präsynaptischer Effekt des Peptids ausgeschlossen werden, da es während der gesamten Messung bei keinem der Peptide zu einer Veränderung kommt (Abb. 24).

Der Effekt des Peptids wird daraus schlussfolgernd postsynaptisch verursacht, wobei daraus noch nicht abgelesen werden kann, auf welchen Rezeptor es dabei einwirkt.

2.4.3 Analyse der Wirkung der verschiedenen A β 42 Peptide auf NMDA und AMPA Rezeptoren

Bereits seit einiger Zeit gibt es Untersuchungen auf welches postsynaptische Protein aus der LTP Kaskade A β 42 wirken könnte. Dabei lagen vor allem die ionotropen Glutamat-Rezeptoren AMPA und NMDA im Fokus (Hsieh et al., 2006; Hynd et al., 2004; Parameshwaran et al., 2007; Pellegrini-Giampietro et al., 1994; Snyder et al., 2005). Da die CA1 aus glutamatergen Synapsen besteht, können durch die spezifische Inhibition jeweils eines Rezeptors bereits im Feld erste Untersuchungen zur Wirkung von A β 42 auf NMDA- und AMPA-Rezeptoren gemacht werden. Zur Messung der NMDA vermittelten Feldpotentiale wurden die AMPA-Rezeptoren mit NBQX (2,3-Dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo(F) Quinoxalin) inhibiert. Zur Messung der AMPA vermittelten Feldpotentiale wurden die NMDA-Rezeptoren mit APV (2-Amino-5-phosphonopentanoat, AP5) inhibiert. Sobald sich das synaptische Potential stabilisiert hat wurde A β 42 wt oder A β 42 G33I Peptid eingewaschen.

Beide Peptide zeigen keinen signifikanten Einfluss auf die NMDA vermittelten Feldpotentiale (Abb. 25B, D), wohingegen die AMPA-Rezeptoren durch beide Peptide blockiert sind (Abb. 25A, C). Vergleicht man die sinkenden AMPA fEPSP mit der stetig abfallenden Basislinie des nicht-stimulierten Weges bei den LTP-Messungen, so zeigt sich bei beiden Messungen ein ähnlicher Verlauf verursacht durch die A β 42 Peptide (Vergleiche Abb. 23 mit Abb. 25). Obwohl A β 42 G33I LTP nicht inhibiert und auch sonst keine toxischen Effekt aufzeigt, blockiert es dennoch die AMPA Rezeptoren.

Es konnte damit bei beiden Peptiden A β 42 wt und A β 42 G33I eine vergleichbare Senkung der AMPA vermittelten Feldpotentiale beobachtet werden.

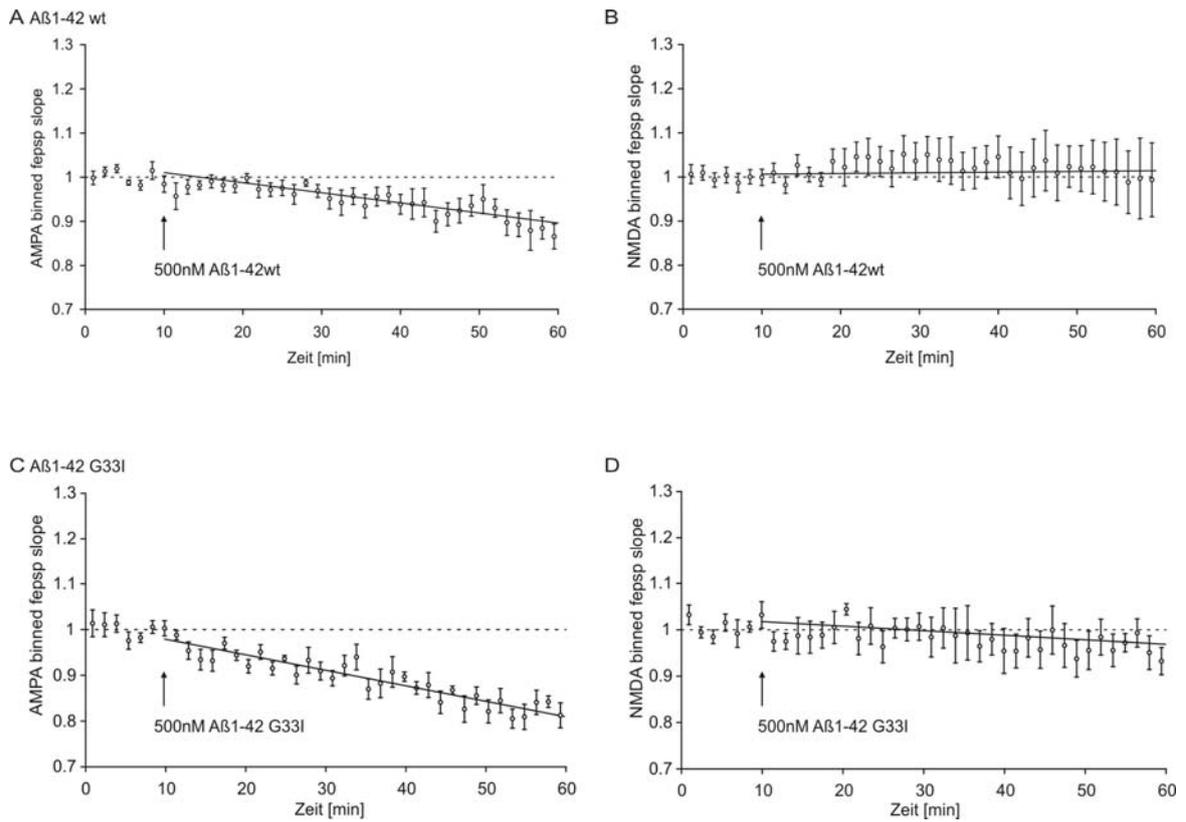


Abb. 25: Messung der NMDA und AMPA vermittelten Feldpotentiale in der Schaffer-Kollateralen CA1 Region. Bei Messung der NMDA Potentiale durch AMPAR Blockade mit APV werden auch 50 min nach Einwaschen des Peptids weder bei **B**: A β 42 wt noch **D**: A β 42 G33I Veränderungen sichtbar. Erst bei der Messung der AMPA Potentiale kann ein Effekt beider Peptide **A**: A β 42 wt **C**: A β 42 G33I beobachtet werden ($n = 4 \pm \text{sem}$).

Zusammenfassend kann aus den gewonnenen Ergebnissen geschlussfolgert werden, dass vor allem eine Substitution an Position G33 innerhalb des zentralen GxxxG-Motivs des A β 42 Peptids zu einer erhöhten Oligomerisierung, jedoch nicht zur Ausbildung reifer Fibrillen führt. Die strukturellen Daten deuten darauf hin, dass das Aggregationsverhalten der G33 Substitution einer konformationellen Änderung zu Grunde liegt, welche den Faltungskern des Peptids stabilisiert. Darüber hinaus wird ein neurotoxisches Verhalten des A β 42 Peptids durch Aminosäure Austausch an Position G33 *in vitro* und *in vivo* komplett unterbunden. Obwohl die durch A β 42 verursachte LTP Inhibition durch die G33 Substitution behoben ist, wirken dennoch beide Peptide negativ auf AMPA Ströme.

Während A β 42 G29A sich in allen Bereichen wie der A β 42 wt verhält, weist A β 42 G29/33A ein intermediäres Verhalten auf. In Oligomerisierung und Toxizität bildet A β 42 G29/33A ein genaues Mittel von A β 42 wt und A β 42 G33I sowie A β 42 G33A aus. Strukturell hingegen ist es durch den Aminosäureaustausch kaum beeinflusst. In seiner Fibrillenbildung jedoch verhält sich das Peptid genauso wie A β 42 G33I und A β 42 G33A

Die Aussagen, die im Rahmen dieser Arbeit zum Einfluss der GxxxG-Motive im A β Peptid auf Aggregation, Struktur, Toxizität und LTP Inhibition getroffen werden können, sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tab. 2: Schematische Zusammenfassung der Ergebnisse dieser Arbeit im Hinblick auf Aggregation, Struktur und Synaptotoxizität der A β 42 Peptide mit und ohne GxxxG-Substitution.

Peptid	A β 42 wt	A β 42 G25A	A β 42 G29A	A β 42 G33A	A β 42 G33I	A β 42 G29/33A	A β 42 G37A
Oligomerformen	4-6 mere	4-6 mere	4-6 mere	4-6 und 16-20 mere	16-20 mere	4-6 und 16-20 mere	4-6 mere
Fibrillenbildung (nm)	Länge	-----	300-2000	100	100	100	100
	Breite	-----	15-20	15-20	15-20	15-20	15-20
Strukturunterschiede	Hydrophobizität	-----	kein Einfluß	erhöht	erhöht	kaum Einfluß	-----
	Trypsinspaltung AS	K16, K28, R5	-----	K16, K28, R5	K16, R5	K16, K28, R5	-----
Toxizität	max.50%	max.50%	max.50%	keine	keine	max.40%	max.50%
LTP Inhibition	100%	-----	100%	keine	keine	-----	-----
NMDA fEPSP	kein Einfluß	-----	-----	-----	kein Einfluß	-----	-----
AMPA fEPSP	Partielle Inhibition	-----	-----	-----	Partielle Inhibition	-----	-----

3 Diskussion

Die fortschreitenden neurodegenerativen Symptome in der Alzheimer Krankheit werden verursacht durch die Oligomerisierung von A β 42 Peptiden zu synaptotoxischen Aggregaten. Bisher wurde angenommen, dass die Oligomerisierung direkt mit den toxischen Effekten des A β 42 Peptids zusammenhängt und dass vor allem Dimere den Neuronenverlust verursachen. In dieser Arbeit konnte diese weit verbreitete Annahme widerlegt werden.

Den kürzeren A β Spezies, vor allem A β 40, wurde bisher keine oder nur äußerst geringe toxische Aktivität zugeschrieben. Hier konnte erstmals das Oligomerisierungsverhalten sowie die Toxizität der kürzeren A β Formen detailliert dargestellt werden.

3.1 Nur A β 42 und keine kürzeren Spezies sind toxisch

Zuerst wurden die Unterschiede der verschiedenen A β Spezies, welche während der Prozessierung des APP entstehen, ermittelt.

Es konnte gezeigt werden, dass die Oligomerisierung von A β 34, A β 38, A β 40 und A β 42 kaum voneinander abweichen. Bei allen Peptiden sind die häufigsten Aggregationsformen die 4-6-mere, wobei A β 40 und A β 42 auch als höhere Aggregate vorkommen.

Da es sich bei den C-terminal verlängernden Aminosäuren um Teile der TMS und damit um hydrophobe Aminosäuren handelt, wird vermutlich die progressive Oligomerisierung auch von diesen Resten verursacht.

Des Weiteren konnte in ersten Ergebnissen gezeigt werden, dass außer A β 42 keines der kürzeren, Peptide signifikant toxisch auf Neuroblastom-Zellen wirkt. Auch diese Erkenntnis lässt vermuten, dass die letzten beiden hydrophoben Aminosäuren ausschlaggebend für die pathologische Rolle des A β 42 in der Alzheimer Krankheit sind.

Dies wäre zu erklären wenn davon ausgegangen wird, dass A β 42 - anders als die kürzeren Spezies nach der APP Prozessierung - membranassoziiert bleibt. Dadurch könnte es in höherem Maße Rezeptoren blockieren, selbst Poren formen oder internalisiert werden, was zu einer erhöhten Toxizität führen könnte. Zusammenfassend konnte gezeigt werden das je kürzer die Peptide, desto weniger pathologische Wirkung haben sie bei gleichem Aggregationsverhalten.

3.2 Aggregationsverhalten der A β 42 wt und GxxxG-Austauschpeptide

Wie bereits erwähnt, postulierten einige Arbeitsgruppen eine wichtige Rolle der GxxxG-Motive auf Aggregationsverhalten und Toxizität von A β 42 Peptiden (Liu et al., 2005; Marchesi, 2005; Xu et al., 2005). Diese Annahme wurde im Rahmen dieser Arbeit ausführlich untersucht. Dazu wurden A β 42 Peptide synthetisiert, die einen Aminosäureaustausch innerhalb der drei konsekutiven GxxxG-Motive aufweisen.

Bei der Untersuchung der Oligomerisierung mittels GPC und der Fibrillenbildung zeigten die Peptide A β 42 G25A und A β 42 G29A keine signifikanten Unterschiede zu A β 42 wt auf. Bei den analysierten Peptiden A β 42 G33A und A β 42 G33I konnte eine Verschiebung zu höheren Oligomeren bemerkt werden, die keine Fibrillen ausbilden. Ein intermediäres Aggregationsverhalten ist bei einer doppelten Substitution beim A β 42 G29/33A Peptid (gleiche Mengen niederer und höherer Oligomere) zu beobachten, wobei auch hier keine Fibrillen gebildet werden. Anders als erwartet verhält sich auch das A β 42 G37A Peptide, indem es hauptsächlich niedere Oligomere aber auch hohe Mengen an Mono- und Dimeren bildet. Betrachtet man jedoch die Fibrillenbildung dieses Peptids, bildet es im Vergleich mit A β 42 wt nach 24 Std zwar kürzere, aber doch lange und rigide Fibrillen aus (Daten nicht gezeigt). Eine Aggregation des A β 42 G37A Peptids ist demnach nicht verändert, sondern nur verlangsamt.

Die erhaltenen Daten deuten daraufhin das die beiden N-terminalen GxxxG-Motive (Gly25, Gly29) keinen Einfluss auf die Aggregation des Peptides haben, sondern nur das Daraus kann geschlussfolgert werden, dass Peptide, die schneller größere Mengen an höheren Oligomeren ausbilden, in dieser Oligomerform arretieren und keine reifen Fibrillen mehr ausbilden können. Dies konnte besonders gut in den AFM Aufnahmen dargestellt werden. A β 42 wt und A β 42 G29A bilden erst kleine Aggregate, die nach 12 bzw. 8 Std Aggregation eine Umfaltung zur Fibrille erfahren. Durch Manipulation der Fibrille mit der Abtastspitze konnte gezeigt werden, dass Fibrillen aus einzelnen kleinen globulomeren Untereinheiten bestehen, die wie Perlen an einer Schnur aufgereiht vorliegen (Gensler, 2008).

Bei A β 42 G33 Austauschpeptiden hingegen zeigten sich bereits zu Beginn des Experiments größere Aggregate, die keine globulomeren Untereinheiten aufweisen und sich über den gesamten Zeitraum der Beobachtung nicht verändern.

3.3 Struktur der A β 42 wt und GxxxG-Austauschpeptide

Die Unterschiede in der Aggregation, vor allem der A β 42 G33 Austauschpeptide, ließen vermuten, dass diese Aminosäureposition basierend auf konformationelle Beeinflussung, essentiell für die Oligomerisierung ist.

In einer ersten Untersuchung konnte ausgeschlossen werden, dass die untersuchten A β 42 Peptide verschiedene Sekundärstrukturen aufweisen. Alle zeigten die erwartete β -Faltblattstruktur.

Es wurde bereits beschrieben, dass eine Veränderung der Hydrophobizität innerhalb des A β 42 Peptids zu einer Verstärkung der Aggregation führen kann (Chiti et al., 2003).

Analysiert man nun aber die Hydrophobizität der ausgetauschten Aminosäuren innerhalb des Peptids und ihre Wirkung auf umgebene Aminosäuren, wird deutlich, dass Position Gly33 eine besondere Rolle einnimmt.

Gly37 ist zu weit C-terminal positioniert um einen Einfluss auf den Faltungskern (A β 42 21-30) zu haben, wodurch bei A β 42 G37A im Vergleich zu A β 42 wt keine signifikanten Differenzen die Aggregation und Toxizität betreffend ermittelt werden konnten.

Auch ein Einfluss von Gly25 auf die Struktur des Peptids erscheint unwahrscheinlich, da es sich zwischen den AS Asp23 und Lys28 befindet, die eine stabile Salzbrücke ausbilden. Demnach wäre ein konservativer Austausch von Gly25 zu Ala zu gering um durch gesteigerte Hydrophobizität die Aggregation und Toxizität zu verändern.

In Übereinstimmung mit den erhaltenen Daten erhöhen A β 42 G33A und A β 42 G33I die Stabilität des Faltungskerns, was durch das Fehlen der 1-28 Fragmente in der limitierten Proteolyse gezeigt werden konnte. Durch die Erhöhung der hydrophoben Oberfläche beim Austausch von Gly33 zu Ala oder Ile wird die hydrophile Umgebung abgeschirmt, was durch die benachbarten, an der Oberfläche exponierten Aminosäuren Met35 und Ile31 unterstützt wird. Durch die erhöhte Stabilität werden auch die intramolekularen hydrophoben Cluster zwischen Leu17/Phe19 und Ile32/Leu34 gefestigt. Diese entstandene, plane hydrophobe Oberfläche führt zu einer beschleunigten Aggregation. Durch die Abschirmung der hydrophoben Fläche kommt es dann schnell zu einer starken Krümmung, was in einem Abbrechen der Untereinheiten endet und somit die schnelle Oligomerisierung aber mangelnde Fibrillenbildung erklärt. Durch die Unterstützung des Faltungskernes wird die Struktur des Peptides nur geringfügig beeinflusst, so dass die Durchmesser der Aggregate, wie experimentell in EM- und AFM-Analysen dargestellt, sich nicht verändern. Es wäre aber möglich, dass sich die Höhe der Aggregate zum A β 42 wt unterscheidet, was unter den gewählten Bedingungen nicht ermittelt werden konnte.

Wird das Gly29 innerhalb des Turns zu Ala ausgetauscht, ist die Erhöhung der Hydrophobizität gering. Da zusätzlich auch keine hydrophoben Aminosäuren in der Umgebung sind, wird keine hydrophobe Oberfläche gebildet und auch kein Einfluss auf die Oligomerisation ausgeübt. Jedoch ist es möglich, dass A β 42 G29A den Turn öffnet und damit die intramolekulare Dichte/ Struktur verringert, womit die Schnittstelle an Position Lys28 besser für Trypsin zugänglich ist. Es ist auch zu beachten, dass bei A β 42 G29A eine Verlängerung der Fibrillen im Vergleich zum A β 42 wt beobachtet werden konnte. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass Gly29 die Kontaktstelle zweier A β 42 Monomer Peptide darstellt und dieser Kontakt durch den Austausch zu Ala stabilisiert wird. Davon ausgehend, dass eine Fibrillenuntereinheit aus einem A β 42 Tetramer besteht, wird der Kern der Fibrille bei A β 42 G29A gefestigt (Abb. 26) wodurch Rigidität und Länge erhöht werden können.

Kommt es bei A β 42 G29/33A zu einem Aminosäureaustausch beider Gly des zentralen GxxxG-Motivs, ist eine heterogene aber gleichmäßige Mischung von niederen und höheren Oligomeren (GPC) erkennbar, die sich in der AFM und EM Analyse nicht von A β 42 G33A unterscheiden. Demnach stabilisiert die Gly29Ala Substitution tetramere Aggregate, während die erhöhte Hydrophobizität durch Ala Substitution an Position Gly33 die Protofibrillenbildung beeinflusst und die reife Fibrillenbildung unterbindet.

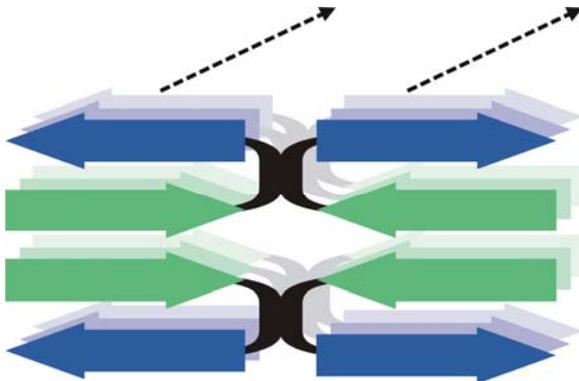


Abb. 26: Angenommene tetramere Untereinheit einer A β 42 Fibrille. In blau die hydrophile, N-terminale β -Faltblattstruktur, in grün die hydrophobe, C-terminale β -Faltblattstruktur verbunden durch den in schwarz dargestellten Turn. Die schwarzen Pfeile stellen die Erweiterung zur Fibrille durch Anlagerung weiterer A β 42 Tetramere dar.

Um die Unterschiede in der Struktur der verschiedenen Peptide weiter herauszuarbeiten, werden in ersten Experimenten Kernspinresonanz (nuklear magnetic resonance, NMR) Messungen durchgeführt. Um diese Messungen, in Kooperation mit Prof. B. Reif, FMP, Berlin, durchführen zu können, wurde eine Methode zur Aufreinigung großer A β 42

Mengen aus *E.coli* etabliert (Daten nicht gezeigt). Diese Methode ermöglicht durch Zugabe von N15 enthaltendem Ammoniumchlorid eine Markierung des Peptids, welches eine mehrdimensionale NMR Messung zulässt. Das erhaltene Peptid wurde bereits auf seine pathologische Wirkung untersucht und zeigte das erwartete Verhalten (Daten nicht gezeigt). In einem nächsten Schritt werden diese markierten Peptide nach ihrer Größe aufgereinigt, um somit die Struktur der einzelnen Oligomerfraktionen durch NMR zu ermitteln. Durch Mutagenese der ursprünglichen A β 42 Konstrukte konnte bereits ein Austausch an Position Gly33 zu Ala und Ile vorgenommen werden, um davon NMR-Strukturanalysen durchzuführen (Daten nicht gezeigt).

Es ist davon auszugehen, dass nach dem Erhalt der Strukturen der toxischen und der nicht-toxischen A β 42 Spezies deutlich gemacht werden kann, welche Aminosäuren bzw. welche Struktur zum Auslösen der Alzheimer Krankheit führt. Das würde ermöglichen Therapieansätze zu schaffen, welche diese Konformation begünstigt.

3.4 Toxizität der A β 42 wt und GxxxG-Austauschpeptide

Da die neurotoxische Wirkung von A β 42 in der Alzheimer Pathologie eine besonders Rolle spielt (siehe 1.4), ist ein weiterer wichtiger Teil dieser Arbeit war die Untersuchung des Einflusses der GxxxG-Motive auf die pathologischen Effekte des A β 42 Peptids.

Dazu wurden Toxizitätstests mit humanen Neuroblastom-Zellen, primären Rattenneuronen und transgenen *Drosophila melanogaster* durchgeführt.

Bei der Untersuchung des toxischen Effekts von A β 42 wt und Austauschpeptiden auf SH-SY5Y Zellen zeigte sich, dass die von den Peptiden gebildeten Fibrillen (24 Std Inkubation bei RT) keinen Zellverlust verursachen. Lediglich A β 42 G29A reduzierte die Zellviabilität um 20% im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen (Daten nicht gezeigt).

Im Gegensatz dazu reduzierten frisch gelöste A β 42 wt, G25A, G29A und G37A Peptide die Zellzahl um bis zu 70%. Keines dieser Peptide unterscheidet sich im pathologischen Verhalten von A β 42 wt (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu blieb die Zellviabilität von A β 42 G33A, G33I und G29/33A Peptiden weitestgehend unbeeinflusst. Während frisch gelöstes A β 42 G33A und A β 42 G29/33A die Zellzahl um circa 20% reduziert, wirkt eine Inkubation mit A β 42 G33I sogar proliferierend.

Abgeleitet von den EM- und AFM-Daten sollten demnach nicht nur reife Fibrillen, sondern auch bereits Protofibrilläre Aggregate, die in der GPC mit 20-meren korrelieren, keine Toxizität verursachen. Diese Annahme konnte auch für die mittels GPC aufgereinigten

Fractionen bestätigt werden. Weder höhere Oligomere von A β 42 wt und G29A noch von A β 42 G33A, G33I und G29/33A haben toxische Effekte.

Bei den niederen Oligomeren Formen von A β 42 wt, G29A und in abgeschwächter Form bei A β 42 G29/33A ist zu erkennen, dass die Toxizität vom Monomer bis zum Tetramer graduell ansteigt, um dann wieder abzufallen. Damit kann unterstrichen werden, dass niedrigere Oligomere toxischer sind als höhere Oligomere und dass eine maximale Toxizität von tetrameren Aggregaten verursacht wird. Im Gegensatz dazu verursachen A β 42 G33A und G33I Peptide keinerlei Zellverlust in keinem ihrer untersuchten Aggregationsformen.

Die gleichen Effekte der Peptide sind auch auf primären hippocampalen Neuronen zu erkennen. Jedoch ist hier die maximale Toxizität bereits bei 50% (A β 42 wt, A β 42 G29A Tetramer) erreicht. Zum einen ist dies vermutlich in der fehlenden Zellteilung begründet, wodurch in dem getesteten Zeitrahmen nicht mehr als 50% der Zellen absterben können. Zum anderen produzieren Rattenzellen endogen kein toxisches A β 42. Es ist also möglich, dass durch den Einfluss des endogenen humanen A β 42 die Toxizität auf Neuroblastom-Zellen erhöht wird. Darüber hinaus war zu beobachten, dass besonders höhere Oligomere auf primäre Neuronen toxischer wirken als auf Neuroblastom-Zellen. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass durch das unterschiedliche Medium die Stabilität der Aggregate variiert und zerfallene, höhere Oligomere wiederum toxisch auf die Zellen wirken. Des Weiteren wäre es möglich, dass sich höhere Oligomere auf dem Gliazellen ablagern und dadurch die Verbindung zu den Primärneuronen unterbunden wird. Stehen diese nicht mehr miteinander in Kontakt, kommt es zum Zelltod der Neuronen.

Die Erkenntnis, dass das Gly33 eine zentrale Rolle in der Toxizität des A β 42 Peptids spielt konnte durch die Resultate der transgenen Fliegen noch weiter hervorgehoben werden. Im Gegensatz zu Fliegen, die heterolog A β 42 wt und A β 42 G29/33A exprimieren, zeigte sich in den Augen von A β 42 G33I transgene Fliegen keinerlei auffälligen Phänotyp. Zusammenfassend können über die A β 42 Toxizität folgende Aussagen getroffen werden:

- i) Aggregate ab einer Größe von 10-meren verhalten sich nicht, oder nur geringfügig, toxisch.
- ii) A β 42 wt, A β 42 G29A, Tetramere verursachen den höchsten Zellverlust.
- iii) eine Substitution an Position Gly33 reduziert in jeder Aggregationsform, auch als Tetramer, die Toxizität auf ein Minimum.
- iv) A β 42 G29/33A zeigte auch in der Toxizität ein intermediäres Verhalten das bereits bei der Aggregation beobachtet werden konnte.

Daraus ist zu schlussfolgern, dass nicht nur der Oligomerisierungszustand selbst die Toxizität auslöst, sondern eher die beschriebenen konformationellen Unterschiede.

A β 42 Peptide können demnach, ähnlich wie die kürzeren A β Spezies, eine nicht toxische Form erreichen. Diese Erkenntnis ermöglicht zum einen durch den Vergleich des toxischen und nicht toxischen A β 42 eine Analyse des Wirkungsmechanismus des Peptides. Zum anderen können therapeutische Ansätze evaluiert werden, indem nach Substanzen gesucht wird, die spezifisch an das Gly33 binden.

Diesbezüglich konnte erst kürzlich von Kukar et al., für die nicht-steroidalen Antinflammatorischen Medikamente (NSAIDs) Fenofibrat und Flurbiprofen gezeigt werden, dass diese das GxxxG-Motiv des A β 42 Peptids binden (Kukar et al., 2008). Darüber hinaus ergaben erste Biacore Untersuchungen, dass auch NSAIDs wie Sulindac Sulfid und Indomethazin an A β 42 binden können (persönliche Anmerkung von Fr. Luise Richter und Prof. Gerd Multhaup). Es scheint demnach möglich, dass NSAIDs, ähnlich wie eine Substitution an Position Gly33, nicht nur die Prozessierung von APP, sondern auch das Aggregationsverhalten von A β 42 und damit die Toxizität beeinflussen.

3.5 LTP Inhibition durch A β 42 wt und GxxxG-Austauschpeptide

Ein wichtiger Aspekt bei der Wirkung von A β 42 auf die Alzheimer Pathologie ist neben der Toxizität der Einfluss auf das Lernen. Es gibt die Möglichkeit in akuten Hirnschnitten das Lernen zu simulieren, in dem die Langzeitpotenzierung der Schnitte gemessen wird. Seit einigen Jahren ist bekannt, dass besonders A β 42 niedere Oligomere LTP inhibieren und besonders die Arbeiten von Prof. D. Walsh setzen die Inhibition mit Synaptotoxizität gleich (Shankar et al., 2007).

Wie bereits aus den Toxizitätstests zu erwarten war, inhibiert frisch gelöstes A β 42 wt Peptid die LTP, während LTP-Messungen mit frisch gelöstem A β 42 G33I Peptid inkubierten Schnitten mit unbehandelten Kontrollmessungen vergleichbar sind. Da jedoch die Toxizitätsanalysen ergeben, dass besonders Tetramere A β 42 Peptide einen toxischen Effekt haben, und bei A β 42 G33A noch hohe Mengen nicht toxischer Tetramere zu finden sind, wurden auch diese in den LTP Messungen untersucht. Es konnte auch hier wieder bestätigt werden, dass eine Substitution an Position Gly33 nicht toxische und nicht LTP inhibierende Tetramere formt.

Es kann damit zum einen der Zusammenhang zwischen Toxizität und LTP Inhibition bestätigt, und zum anderen der Einfluss von Gly33 auf die pathologische A β 42 Funktion herausgearbeitet werden. Die bisher gewonnenen Resultate zur Toxizität konnten somit gefestigt werden.

Als weitere Information aus den LTP Messungen kann ermittelt werden, ob die Effekte prä- oder postsynaptische Ursachen haben. Nachdem die „Paired Pulse Ratio“ von keinem der Peptide beeinflusst ist, sind präsynaptische Einflüsse unwahrscheinlich. Das Peptid wirkt demnach nicht negativ auf die synaptischen Vesikel sondern vielmehr postsynaptisch auf die glutamatergen Rezeptoren.

3.6 Einfluss von A β 42 wt und GxxxG-Austauschpeptide auf die basale synaptische Transmission

Da keines der untersuchten Peptide einen Einfluss auf die Präsynapse hat und auch bereits andere Arbeitsgruppen eine Endozytose von NMDA und/ oder AMPA Rezeptoren als LTP inhibierenden Effekt des A β 42 Peptids postulieren (Hsieh et al., 2006; Shankar et al., 2007; Snyder et al., 2005), wurden NMDA und AMPA vermittelte Feldpotentiale gemessen.

Anders als bei Snyder et al. 2005, kann weder bei A β 42 wt noch bei A β 42 G33I Inkubation eine Veränderung der NMDA vermittelten Potentiale gemessen werden. Dies könnte unter anderem darauf beruhen, dass in der Publikation eine höhere Menge A β 42 eingesetzt und Einzelstromableitungen gemessen wurden. Denn eine höhere Konzentration auf eine Zelle appliziert könnte durchaus zu stärkeren Effekten führen als die in dieser Arbeit gewählten Bedingungen. Es sollte aber auch bemerkt werden, dass Snyder et al. ausschließlich NMDA und nicht zusätzlich noch AMPA Ströme untersucht haben.

Im Gegensatz dazu konnten Hsieh et al. durch A β 42 eine Internalisierung der AMPA Rezeptoren, dendritischen Spine Verlust und daraus resultierend eine synaptische Depression beobachten. Dies ist vergleichbar mit den hier beobachteten Effekten des A β 42 auf AMPA vermittelte Feldpotentiale. AMPA fEPSP werden sowohl von A β 42 wt als auch von A β 42 G33I um bis zu 20% partiell inhibiert. A β 42 G33I hat hier sogar einen größeren Effekt als A β 42 wt. Erstaunlicherweise beginnt die Reduktion der AMPA Ströme bereits einige Minuten nach dem Einwaschen des Peptides und nicht erst nach längerer Einwirkzeit.

Dieses Verhalten wiederum, spiegelt den genauen Verlauf der untetanisierten Pfade während der gesamten LTP Messung wieder. Auch hier findet ein Abfallen der Amplitude durch Inkubation mit A β 42 Peptiden statt, auch hier ist kein Unterschied zwischen dem toxischen A β 42 wt und dem nicht toxischen A β 42 G33I zu erkennen.

Unabhängig von Aggregation und Toxizität gibt es einen unmittelbaren Einfluss der Peptide auf die synaptische Transmission von hippocampalen Neuronen, der jedoch nicht das Lernvermögen beeinträchtigt.

Der Mechanismus, der zur LTP Inhibition und auch zur Neurotoxizität führt, ist demnach nicht durch Rezeptorendozytose bedingt, sondern vielmehr durch einen negativen Effekt in der Signalkaskade, welche LTP auslöst.

Die gewonnenen Daten sollen im Weiteren noch durch AMPA und NMDA Strommessungen aus Einzelzelleitungen gefestigt werden. Darüber hinaus soll untersucht werden, ob die Spine Dichte und Morphologie, die bei Hsieh et al. der AMPAR Endozytose folgt, nicht mit der Toxizität korreliert und auch von A β 42 G33I beeinflusst wird. Diese Veränderungen würden damit auf einen initialen Effekt durch die Rezeptorendozytose hindeuten, die unabhängig von der Toxizität stattfindet.

3.7 Effekte des A β 42 Peptids auf die Genregulation

Da bereits Unterschiede zwischen A β 42 wt und A β 42 G33 Austauschpeptiden im Hinblick auf Aggregation, Struktur und Toxizität beobachtet werden konnten, aber sowohl Austauschpeptid als auch A β 42 wt Peptide Einfluss auf die synaptische Transmission nehmen, ist es wichtig zu untersuchen ob beide Peptide in ähnlicher Form von Zellen aufgenommen werden und dort den gleichen Wirkmechanismus haben.

Bisher konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass nach Inkubation von humanen Neuroblastom-Zellen alle A β 42 wt und GxxxG-Motiv Austauschpeptide von den Zellen konzentrations- und zeitabhängig aufgenommen und in den Kern transportiert werden (Daten nicht gezeigt). Ein Export aus dem Kern findet in großem Maßstab nicht statt, so dass es über die Zeit zu einer Akkumulation des Peptids im Kern kommt (Barucker, 2008). Konfokale Aufnahmen von SH-SY5Y Zellen, die mit Biotin markiertem A β 42 wt Peptid inkubiert wurden, zeigten bereits nach 30 min eine diffuse Lokalisation des Peptids im Kern, welches im Zeitraum von bis zu 3 Std im Kern sichtbar höhere Aggregate ausbildet. Diese Aufnahmen zeigten auch nach 3 Std eine flächige Ablagerung des Peptids an der PM sowie Aggregate unterschiedlicher Größe im Cytosol der Zellen (Daten nicht gezeigt).

Ausgehend von unseren und anderen Erkenntnissen ist die Aufnahme von A β 42 in die Zelle weitestgehend beliebig. So kann eine Endozytose über den LRP-Rezeptor stattfinden (Grimm et al., 2007; Grimm et al., 2008), über AMPA und NMDA Rezeptoren (Hsieh et al., 2006; Snyder et al., 2005), oder Rezeptorunabhängig wie eine

temperaturbedingte Untersuchung zeigte (persönliche Information von Hr. Christian Barucker und Prof. Gerd Multhaup). Der Transport in den Kern hingegen, erfolgt spezifisch und nicht über Diffusion (persönliche Information von Hr. Christian Barucker und Prof. Gerd Multhaup). Ob der Transport in den Nukleus durch Komplexbildung mit z.B. Tip60 und Fe65 wie beim AICD erfolgt, muss noch geklärt werden (Cao and Sudhof, 2001). Derzeit konnten erste Chromatin-Immunpräzipitationen (ChIP) zeigen, dass im Nukleus befindliches A β 42, Fe65 und Tip60 in den Kern rekrutiert, diese aber wieder aus dem Kern diffundieren, während A β weiter im Kern bleibt (Barucker, 2008).

Innerhalb des Zellkerns bindet A β 42 an die Promotoren von LRP und KAI1 und reguliert deren Genprodukte hinunter. Eine Bindung und ein daraus resultierender Einfluss auf die Promotoren p53 und HES-1 konnte nicht gezeigt werden (Barucker, 2008). Die Erkenntnis, dass A β 42 Peptide von der Zelle aufgenommen und im Zellkern spezifisch auf die Genregulation wirken, ermöglicht, im Vergleich zur Wirkung der nicht toxischen A β 42 G33A oder A β 42 G33I Peptide, in weiteren Analysen den Mechanismus des intrazellulären A β zu entschlüsseln.

3.8 Der Wirkungsmechanismus des A β 42

Bereits einleitend wurde darauf eingegangen, dass es verschiedene Annahmen gibt wie A β Peptide toxisch wirken könnten (siehe 1.3). Aufgrund der sowohl intrazellulär als auch extrazellulär vorkommenden A β 42 Peptide ist jedoch davon auszugehen, dass mehrere toxische Wirkmechanismen möglich sind.

Die in dieser Arbeit gezeigten Daten sollen abschließend in einer möglichen Hypothese zur toxischen Wirkungsweise des A β 42 Peptids zusammengefasst werden (Abb. 27). Das durch die Prozessierung von dimerem APP entstandene A β 42 Peptid wird in den Extrazellularraum abgegeben, wo es schnell aggregiert (Abb. 27(1)). Aufgrund seiner C-terminalen Hydrophobizität könnte es jedoch mit der Plasmamembran assoziiert bleiben. Das zu niederen Oligomeren aggregierte, extrazelluläre A β 42 Peptid könnte postsynaptisch an Rezeptoren (AMPA) (Abb. 27(2b)) binden und durch Endozytose des Rezeptors internalisiert werden (Abb. 27(3)). Dieser Effekt löst vermutlich eine partielle Inhibition der synaptischen Transmission aus, wobei die Wirkung auf Lernen und Gedächtnis durch Inhibition der LTP-Signalkaskade auf Protein- oder Transkriptionsebene verursacht werden könnte.

In der Zelle könnte A β 42 aktiv und im Komplex mit noch unbekanntem Transportproteinen in den Kern transportiert werden (Abb. 27(4)) und könnte dort durch Bindung an Promotoren (Abb. 27(5)) deren Genprodukte supprimieren (Abb. 27(6)). Durch die Akkumulation von A β 42 im Kern und die Bindung an Promotoren könnte eine dauerhafte Schädigung der Zelle verursacht werden.

Im Gegensatz zu den niederen Oligomeren hätten Höhere Aggregate durch sterische Hinderung und durch das Abschirmen der hydrophoben Aminosäuren keine Möglichkeit an die Zellen zu binden und aufgenommen zu werden. Zusammen mit extrazellulären Matrixproteinen und Metallionen würden sie sich als Plaques im Gehirn ablagern. Lediglich beim Herauslösen einzelner niederer Oligomere, beispielsweise im Zuge einer Immunantwort, könnten diese Peptide wieder neurotoxische Wirkung erzielen (Abb. 27(2a)).

Im Gegensatz dazu scheint mit der Charakterisierung der A β 42 G33A/I Peptide ein Werkzeug gefunden zu sein, wodurch der toxische Wirkmechanismus des A β 42 Peptids untersucht werden kann. Anders als A β 42 wt bilden diese Peptide keine toxischen Aggregate aus. Jedoch konnte hier gezeigt werden, dass trotz nicht toxischen und nicht LTP inhibierenden Verhaltens eine partielle Inhibition der AMPA-Potentiale und eine Aufnahme in den Zellkern möglich ist. Dies bestätigt die Hypothese, dass A β 42 intrazellulär im Kern toxisch wirkt. Ob jedoch allein die Bindung und Blockade an

Promotoren dafür verantwortlich ist, oder die Regulation der Genprodukte durch A β 42 wt und A β 42 G33I variiert, muss noch überprüft werden.

Jedoch eröffnet ein Aminosäureaustausch an Position Gly33 eine neue Möglichkeit das Rätsel der A β 42 Toxizität zu lösen.

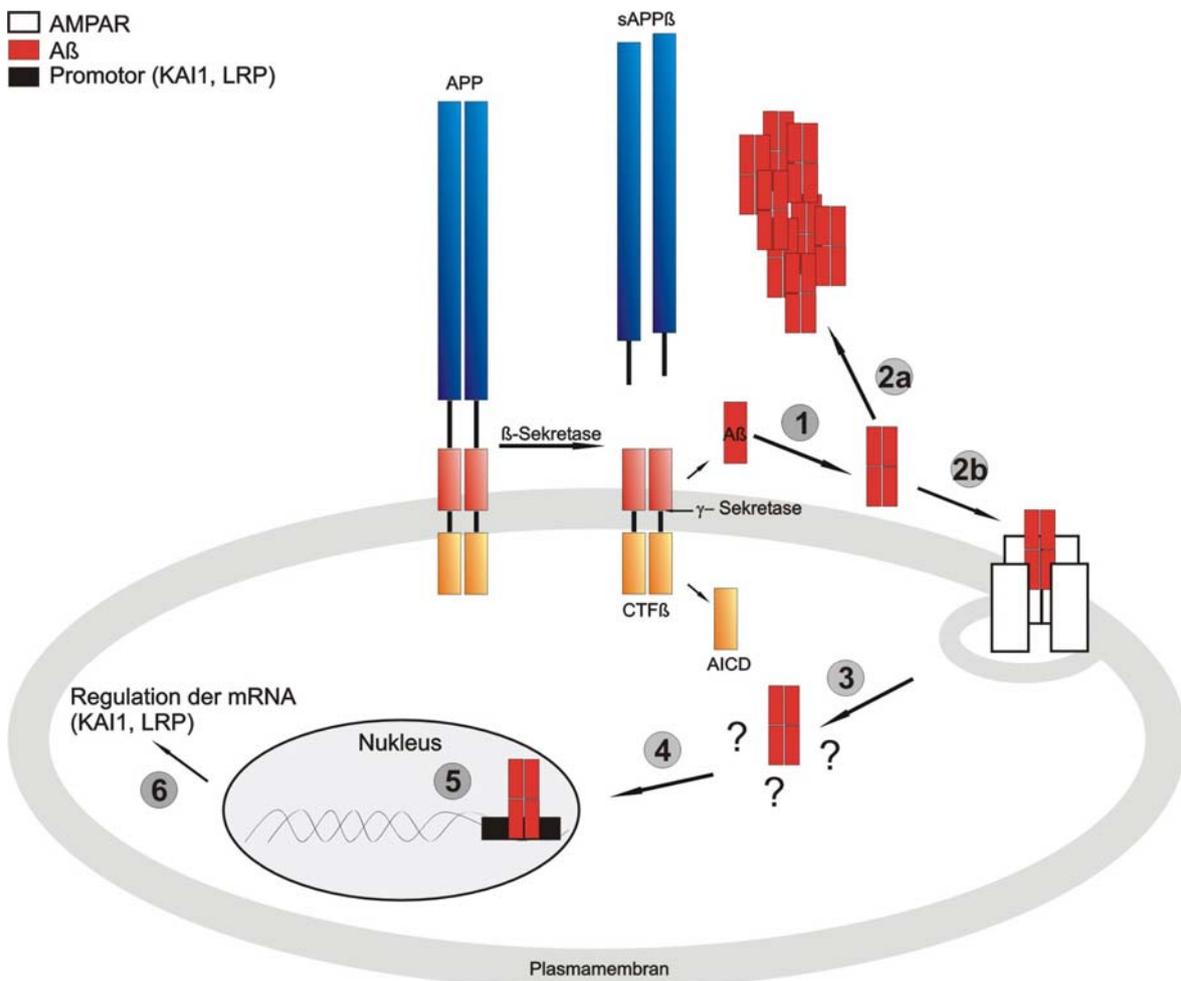


Abb. 27: Schematische Darstellung des möglichen pathologischen Mechanismus von A β 42. Das dimere APP wird amyloidogen prozessiert, wobei sAPP β , AICD und A β entstehen. Das membranassoziierte A β 42 oligomerisiert zu Tetrameren (1) und aggregiert entweder weiter bis zu Fibrillen (2a), oder bindet an postsynaptische Rezeptor (2b) wodurch das Peptid internalisiert wird. In der Zelle bildet A β mit noch unbekanntem Ko-faktoren einen Komplex (3), welcher vermutlich in den Zellkern transportiert wird (4). Dort kann A β 42 an Promotoren (KAI1, LRP) binden (5) und inhibiert deren Genexpression (6).

4 Zusammenfassung

Der Oligomerisierung des A β 42 Peptids wird eine ursächliche Rolle bei der Alzheimer Krankheit zugeschrieben. Bevor die Peptide zu Fibrillen aggregieren, wirken besonders niedere Oligomere in Testsystemen neurotoxisch und könnten für den Verlust der kognitiven Fähigkeiten des Patienten verantwortlich sein.

Da durch eine sequenzielle Prozessierung des APP A β mit variierender Länge entstehen, war ein erster Schwerpunkt dieser Arbeit die Untersuchung der verschiedenen Peptide auf ihr Aggregationsverhalten hin. Dabei konnte gezeigt werden, je kürzer die Peptide sind, desto weniger häufig werden höhere Oligomere ausgebildet. Obwohl alle Peptide vergleichbar hohe Mengen an Tetrameren gebildet hatten und diesen Formen in der Literatur als potentiell toxisch beschrieben sind, konnte nur A β 42 ein toxischer Effekt zugeschrieben werden.

Für das GxxxG-Dimerisierungsmotiv innerhalb der A β Sequenz, dass auch eine entscheidende Rolle in der APP Prozessierung spielt, zeigte sich, dass dieses Motiv auch für die Aggregation und das pathologische Verhalten des A β 42 Peptids kritisch ist.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals der Einfluss eines Aminosäureaustausches innerhalb des A β GxxxG-Motivs auf Aggregation, Struktur und Toxizität beschrieben werden.

Strukturelle Untersuchungen zeigten, dass die Erhöhung der Hydrophobizität an Position Gly33 zum einen den Faltungskern des Peptides stabilisiert und zum anderen die Oligomerisierung des Peptides forciert. Dadurch wird eine Abschirmung der hydrophoben Oberflächen erreicht, was zu einer Krümmung der Aggregate führt und somit vermutlich keine Fibrillenbildung mehr zulässt. Im Gegensatz dazu wird bei der A β 42 G29A Variante die tetramere Untereinheit durch Anlagerung gegenüberliegender Gly29 durch erhöhte Hydrophobizität stabilisiert, was in einer verlängerten Fibrillenbildung resultiert.

Ein doppelter Austausch von Gly29 und Gly33 führt zu einer intermediären Oligomerisierung, wobei auch hier keine reifen Fibrillen gebildet wurden.

Neben der Aggregation und Struktur wurde auch erstmals detailliert die funktionelle Rolle des GxxxG-Motives mittels Toxizitätstest und im Modellsystem für Lernen und Gedächtnis (LTP Messung) untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass eine Substitution an Position Gly33 weder *in vitro* noch *in vivo* toxische Effekte hat, noch LTP inhibiert. Für das A β 42 wt und A β 42 G29A Peptid hingegen konnte gezeigt werden, dass weder Fibrillen, noch höhere Oligomere sondern ausschließlich niedere Oligomere, vor allem Tetramere,

toxisch wirken. Diese Effekte konnten in reduzierter Form auch bei A β 42 G29/33A beobachtet werden, was das intermediäre Verhalten der Variante mit dem zweifachen Austausch weiter unterstreicht.

Dennoch konnte sowohl bei A β 42 wt als auch A β 42 G33I Peptid eine Reduktion der basalen synaptischen Transmission und eine Aufnahme des Peptids in die Zelle und den Zellkern ermittelt werden.

Die Ergebnisse zeigen auf, dass das zentrale GxxxG-Motiv des A β Peptids, und Gly33 im Besonderen, eine essentielle Rolle nicht nur im Aggregationsverhalten des Peptides spielt.

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass vor allem Tetramere toxische Oligomerformen bilden, jedoch der Aggregationszustand nicht grundsätzlich ausschlaggebend für die Toxizität ist. Besonders interessant ist, dass die strukturelle Veränderung des Peptides durch Austausch an Position Gly33 das pathologische Verhalten aufhebt.

Diese Erkenntnisse eröffnen die Möglichkeit, mit dem Werkzeug neuer A β 42 Varianten, die genauen Mechanismen der toxischen Wirkungsweise von oligomeren A β Formen zu erforschen. Daraus wiederum könnten weiterführend neue Therapieansätze entwickelt werden.

Summary

The oligomerization of A β 42 peptides plays a critical role in Alzheimer's disease. Before aggregating to fibrils, low-n oligomers are known to be neurotoxic and cause cognitive deficits.

Based on the model of the sequential cleavage of APP there exist a heterogenous mixture of different A β species of varying length. In the first part of this work, analysis of the oligomerization and toxicity of those shorter peptides were performed.

It could be demonstrated that the shorter the peptide the fewer higher oligomers were generated. Although all peptides formed high amounts of tetramers, which were described in literature to be potentially toxic, only A β 42 cause toxic effects.

Earlier studies could already underline the importance of the GxxxG-motifs within the A β sequence in APP processing. Furthermore these motives were postulated to play a role in aggregation and pathological behavior of A β 42 peptides.

In structural analyses it could be demonstrated that increased hydrophobicity at position Gly33 stabilizes the folding nucleus of the peptide and thereby accelerate the oligomerization. The shielding of the β -sheets from the polar milieu leads to a bending of the peptide and thus a suppression of the fibril formation. In contrast, A β 42 G29A stabilizes the tetrameric subunit resulting in an elongated fibril formation. Even though double substitutions of Gly29 and Gly33 are resulting in an intermediate oligomerization but also do not form fibrils.

Despite the aggregation and structure, a detailed functional role of the GxxxG-motifs was analyzed for the first time using toxicity assays and a system for learning and memory (LTP measurements). It was observed that Gly33 substitution neither *in vitro* nor *in vivo* had any toxic effects, or inhibited LTP. For A β 42 wt and A β 42 G29A peptides it could be demonstrated that neither fibrils nor higher oligomers influenced the cell viability. Only low-n oligomers, mainly tetramers dramatically reduced the number of cells. This effect could also be recorded in a reduced form for A β 42 G29/33A, underlining the intermediate behavior.

Nevertheless, both A β 42 wt and A β 42 G33I peptides reduced the basal synaptic transmission and were taken up by the cells and transported into the nucleus.

In conclusion these results demonstrate that the central GxxxG-Motiv of A β and especially Gly33 plays a critical role in aggregational and toxic behavior of the peptide. Furthermore, the data reveal that even though tetramers are most toxic oligomers, toxicity does not depend on aggregation form, but the structural change.

Interestingly, the structural changes caused by amino acid exchange at position Gly33 completely abolish the pathological behavior.

These findings enable, with the new A β 42 variants as a powerful tool, the detailed analysis of the toxic mechanism of A β 42 oligomers and opens new possibilities for developing new therapeutic approaches.

5 Material

5.1 Zelllinien und Nährmedien

CHO-Zellen: Chinesische Hamster ovarial Zellen

Nährmedium: „Ham's F12 Medium“

10% Fötale Kälberserum (FCS)

2 mM Glutamin

1 mM Natriumpyruvat

Bei Bedarf Zusatz von 10 µg/ml Streptomycin und 100 U/ml Penicillin.

Selektionsmedium enthält zusätzlich 250 µg/ml Hygromycin.

SH-SY5Y-Zellen: humane Neuroblastom-Zelllinie,

ATCC-Nummer: CRL-2266 (ATTC Rockville, USA)

Nährmedium: 50% „Dulbecco's minimal essential medium“

50% „Ham's F12 Medium“

10% Fötale Kälberserum

2 mM Glutamin

1 mM Natriumpyruvat

1 x nicht-essentielle Aminosäuren (aus 100 x Konzentrat)

Bei Bedarf Zusatz von 10 µg/ml Streptomycin und 100 U/ml Penicillin.

Selektionsmedium enthält zusätzlich 250 µg/ml Hygromycin.

Alle Zellkulturmedien, Zusätze, Waschpuffer sowie Trypsinlösungen werden von den Firmen PAA, USA und Biochrom, Berlin bezogen. Zellkulturschalen werden von der Firma TPP, Schweiz verwendet. Antibiotika für Selektionsmedien werden von der Firma Invitrogen bezogen.

5.2 Bakterienstämme und Nährmedien

DH5 α (Invitrogen, Karlsruhe)

BL21 (Invitrogen, Karlsruhe)

Nährmedium, LB-Medium: 1% w/v Trypton

0,5% w/v Hefe-Extrakt

1% w/v Natrium Chlorid

5.3 Plasmid-Vektoren und Konstrukte

Als Vektor zur Proteinexpression in eukaryotischen Zellen wird pCEP4 (Invitrogen, Karlsruhe) mit einer Ampicillin sowie Hygromycin Resistenz verwendet.

Die verwendeten Konstrukte wurden von Dr. Lisa Münter während ihrer Doktorarbeit erstellt.

Der pCEP4 Vektor der die kodierende DNA für APP695 enthält, ist N-terminal Myc und C-terminal Flag markiert. Zusätzlich werden Mutationen an A β Position G29A, G33A, G33I, G29/33A eingeführt oder ohne Mutation dem wild type (wt) entsprechen.

Darüber hinaus werden Konstrukte erstellt, die im folgenden pET28a A β 42 mit den Mutationen G33A und G33I benannt werden.

Verwendete Primer:

G33I F	GCA ATC ATT ATA CTC ATG GTG GGC GG
G33I R	CCG CCC ACC ATG AGT ATA ATG ATT GC

Die Richtigkeit der Sequenzabfolge der einzelnen Konstrukte wird durch Sequenzierung der Firma GATC überprüft.

5.4 Antiseren und Antikörper

Die folgend aufgelisteten Antiseren und Antikörper werden bei unterschiedlichen Methoden angewendet. WB: Western-Blot; IP: Immunpräzipitation.

W0-2:	monoklonaler Maus-Antikörper (The Genetics Company (TGC)); Epitop A β 5–8, humanspezifisch WB: 0,03 mg/ml	IP: 0,5 μ g/ml
22C11:	monoklonaler Maus-Antikörper; Epitop: APP 66–81 WB: 1:10000	
G2-10:	monoklonaler Maus-Antikörper (TGC); Epitop: C-Terminus von A β 40 ELISA nach Angaben TGC	
G2-13:	monoklonaler Maus-Antikörper (TGC); Epitop: C-Terminus von A β 42 ELISA nach Angaben TGC	

-
- Anti-Flag: monoklonaler Maus-Antikörper (Sigma-Aldrich); Epitop: DYKDDDDK
WB: 0,25 mg/ml
- 899: polyklonaler Kaninchen-Antikörper;
Epitop: EMIFNAER VGGLEEERES VGPLREDFSL SSSALIGLLV
WB: 1:1000
- Anti-OC polyklonaler Kaninchen-Antikörper;
Geschenk von der Arbeitsgruppe Prof. C. Glabe
Epitop: A β Oligomer
WB: 1:1000
- Anti-Actin: monoklonaler Maus-Antikörper (Chemikon, MAB1501)
WB: 1:2000
- Anti-Calnexin: monoklonaler Maus-Antikörper (Chemikon, MAB3126)
WB: 1:2000
- Anti-Flotillin: monoklonaler Maus-Antikörper (BD Transduction Laboratories),
Epitop: AS 312-428
WB: 1:2000
- Anti-GAP-DH: monoklonaler Maus-Antikörper (Chemikon, MAB374)
WB: 1:2000
- Anti-Histon: monoklonaler Maus-Antikörper (Chemikon, MAB052)
WB: 1:500
- Anti-Maus-HRP: mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugierter Antikörper zur
Chemilumineszenz-Detektion muriner Erstantikörper im Western-Blot
(Promega, USA).
WB: 1:10000
- Anti-Kaninchen-HRP: mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugierter Antikörper zur
Chemilumineszenz-Detektion von Erstantikörpern aus Kaninchen im
Western-Blot (Promega, USA)
WB: 1:10000

5.5 „Kits“

Die in dieser Arbeit verwendeten „Kits“, die nicht extra aufgeführt sind, werden nach Angaben des Herstellers angewendet und von folgenden Fabrikaten bezogen: Qiagen, Hilden; Machery&Nagel, Düren; The Genetics Company, Schweiz; Stratagene, USA; Invitrogen, Karlsruhe und Sigma Aldrich, Deisenhofen.

5.6 Allgemeine Verbrauchsmaterialien

Die gesamte Plastikware wie Reagiergefäße, Mikrotiterlatten und Petrischalen werden von Sarstedt, Nürnberg oder TPP, Schweiz bezogen. Mikrotiterplatten für ELISA, Kryogefäße für Zelllinien sowie Mikrotiterplatten zur Fraktionssammlung werden von der Firma Nunc, Wiesbaden verwendet.

Pipettenspitzen werden von Steinbrenner, Wiesbaden oder Roth, Karlsruhe; Röntgenfilme „Hyperfilm ECL“ von GE Healthcare, München oder „Konica Minolta Medical Film“ von A. Hartenstein, Würzburg verwendet.

5.7 Pufferlösungen

Pufferlösungen, die nicht gesondert aufgelistet sind, werden nach Sambrook et al. (Sambrook, 1989) hergestellt.

5.8 Geräte

Aufgeführt sind die in der Arbeitsgruppe Multhaup verwendeten Geräte.

Die bei Kooperationspartnern verwendeten Geräte sind gesondert bei den jeweiligen Methoden aufgeführt.

5.8.1 Elektrophorese und Elektrobplot

- Horizontal-Elektrophorese-System für Agarose-Gele (Selbstanfertigung am ZMBH, Universität Heidelberg)
- Strombereitstellungsgeräte: Electrophoresis Power Supply EPS 301 (Amersham, USA), Power Supply 2000/200 (Biorad, München)
- Tankbplot-Apparatur Transbplot-Cell (Biorad, München)
- Vertikal-Elektrophorese-System für Fertiggele XCell SureLock (Invitrogen, Karlsruhe)
- Vertikal-Elektrophorese-System für Minigele (Biorad, München)

5.8.2 Zellkultur

- Begasungsbrutschrank Hera Cell 240 (Heraeus-Kendro, USA)

- Lichtmikroskop Axiovert 135 (Zeiss, Jena)
- Sterile Werkbank Herasafe (Heraeus-Kendro, USA)
- Wasserbad (GFC)
- Zellzähler CASY DT (Innovatis AG, Reutlingen)

5.8.3 Zentrifugen

- Tischzentrifuge 5417R, kühlbar (Eppendorf, Hamburg)
- Tischzentrifuge Biofuge fresco, kühlbar (Heraeus-Kendro, USA)
- Zellzentrifuge Multifuge 3 S-R (Heraeus-Kendro, USA)
- Kühlzentrifuge GS-6KR (Beckman, München)
- Ultrazentrifuge J2-MC (Beckman, München)
- Zellzentrifuge Megafuge 1.0 (Heraeus-Kendro, USA)

5.8.4 Chromatographie

- Größenausschlusssäule Superose 12 ; Superdex 75 (Pharmacia, Freiburg)
- Mini-Leer-Säulen (Biorad, München und Bakerbond, J.T.Baker, USA)
- Mitteldruckchromatographieanlage (FPLC) Äkta Explorer (Pharmacia, Freiburg)

5.8.5 Sonstige Geräte

- Analysenwaage BP 211D (Sartorius, Göttingen)
- Brutschrank für Bakterienkultur (Memmert GmbH, Schwabach)
- Dot-Blot-Apparatur (Schleicher & Schuell, Dassel)
- Entwicklermaschine Cawomat 2000 IR (Cawo, Deutschland)
- Geldokumentation Alphamager 2200 (Biozym, Hamburg)
- Kühlfalle RVT400 Thermo (Savant, Ramsey, Minnesota, USA)
- Massenspektrometer Bruker Reflex, MALDI-TOF-Massenspektrometer Ultraflex II mit Reflektor und kontinuierlicher Extraktion (Bruker Daltonic, Bremen)
- Multiwell Fluoreszenzreader Fluoroskan Ascent (Thermo Labsystems, Dreieich)
- PCR-Maschine Mastercycler (Eppendorf, Hamburg)
- Photometer SmartSpec 3000 (Biorad, München)
- Pipetierhilfe Pipetboy
- Pipetten, 2 µl, 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl (Gilson, USA)
- Schütteltisch CAT ST5 (Neolab, Heidelberg)
- Thermomixer Comfort (Eppendorf, Hamburg)

- Überkopf-Schüttler Reax 2 (Heidolph, Schwabach)
- Vakuumkonzentrator SpeedVac (Savant, Ramsey, Minnesota, USA)
- Vakuumpumpe (Vacuubrand, Wertheim)

5.9 Software

- Datenauswertung: Microsoft Excel 2003, Origin,
IGOR Pro 4.06
EM-Menu 4
- Textverarbeitung, Layout: Microsoft Word 2003, EndNote
- Bildbearbeitung: Corel Graphics Suite 11
Adobe Photoshop
- Internet-Datenbanken: NCBI Blast, PubMed, Expasy
- Sequenzdatenvergleich: SECentral
- GPC Software Unicorn

6 Methoden

6.1 Molekularbiologische Methoden

6.1.1 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Reagenzien für eine PCR-Reaktion mit einem Gesamtvolumen von 50µl werden wie folgt verwendet:

30-50 ng/µl	DNA
1x	Pfu Puffer
5 U/µl	Pfu-Polymerase (Stratagene, USA)
0,3 mM	dNTPs (Bioline, Mannheim)
15 pmol	je synthetisches Oligonucleotid (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
5%	DMSO

Die PCR wird nach der „Hot-start“-PCR Methode gestartet, wobei die Proben auf Eis gehalten werden, bis sie in der auf 95°C vorgeheizten PCR-Maschine positioniert werden.

6.1.2 Zielgerichtete Mutagenese

Zur Einführung der Mutation an Position G33 in die pET28a Aβ42 Sequenz (aus der Arbeitsgruppe Prof. B. Reif) wurde die „site directed Mutagenesis“ Methode gewählt. Dabei werden 30-40 Nukleotid lange Primer-Paare verwendet, die zu einer Mutation von G33 zu Ala oder Ile führten. Die Primer wurden von Dr. Lisa Münter bezogen. In einer PCR wird das vollständige Plasmid amplifiziert, in dem folgendes Programm verwendet wird: 1) 95°C für 2 min, 2) 95°C für 20 sek, 3) 56°C für 20 sek, 4) 72°C für 90 sek. Die Schritte 2-4 werden 17 Mal wiederholt. Abschließend wird das Plasmid bei 72°C für 3 min inkubiert, und bei 4°C gelagert. Die Ausgangs-DNA wird aus Bakterien aufgereinigt und enthält anders als das PCR-Produkt methylierte Basen. Mit dem Verdau der Ausgangs DNA durch *DpnI*, kann ein reines, die Mutation enthaltendes PCR-Produkt gewonnen werden, welches im Anschluss in DH5α transformiert und im großen Maßstab (Midi-Prep) aufgereinigt wird.

6.1.3 Herstellung und Transformation kompetenter Zellen

Um Plasmide zu vervielfältigen bedarf es der Transformation in elektrisch oder chemisch kompetente Bakterien.

Zur Herstellung transformierbarer Bakterien werden Zellen aus einer 1,5 ml Übernachtkultur 1:100 in 240ml LB-Medium angeimpft und nach Erreichen einer optischen Dichte (OD₆₀₀) von 0,5-1 auf 4°C abgekühlt. Die Zellen sollten fortan nur noch auf Eis behandelt werden. Chemisch kompetente Zellen werden 5 min bei 4000 rpm sedimentiert und anschließend in 2/5 des ursprünglichen Volumens TfbI (pH 5,8; 30 mM Kaliumacetat; 100 mM RbCl₂; 10 mM CaCl₂; 50 mM MgCl₂; 15% (v/v) Glycerol) aufgenommen und nach 5 min abermals zentrifugiert. Das Pellet wird zuletzt in 1/25 ursprünglichen Volumens TfbII (pH 6,5; 10 mM MOPS; 75 mM CaCl₂; 10 mM RbCl₂; 15% (v/v) Glycerol) aufgenommen, nach 15 min Inkubation aliquotiert, auf -80°C eingefroren und bis zum Gebrauch gelagert.

Zur Transformation dieser Bakterien werden 50 µl Zellen mit 1-5 µl DNA vorsichtig gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Daraufhin erfolgte ein 45 sek langer Hitzeschock bei 42°C. Nach weiteren 2 min auf Eis werden die Zellen mit 500 µl LB-Medium für 30-60 min bei 37°C inkubiert und letztlich auf Selektionsplatten ausgestrichen.

Zur Herstellung elektrisch kompetenter Zellen werden auch diese im ersten Schritt bei 5000 rpm für 15 min zentrifugiert.

Die sedimentierten Zellen werden hintereinander in 250 ml und 125 ml eiskaltem, sterilen H₂O und 5 ml 10%igem Glycerin gewaschen, um anschließend in 1 ml 10%igem Glycerin aufgenommen, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und auf -80°C gelagert zu werden.

Für die Elektroporation der Zellen mit Plasmid DNA werden 30 µl Zellen auf Eis aufgetaut, mit 10 ng DNA in einer gekühlten Küvette vermengt, um dann einen elektrischen Impuls bei 25 mF, 1,8 kV und 200 Ohm durch einen Elektroporator Gene Pulser II (Biorad, München) zu erfahren. Die Zellen werden nach erfolgter Transformation sofort in 1 ml LB-Medium aufgenommen und für mindestens 60 min bei 37°C inkubiert. 50-300 µl dieser Kultur werden auf Selektionsplatten ausgestrichen oder direkt in 250 ml LB-Selektionsmedium aufgenommen, um am Folgetag eine Plasmidpräparation im großen Maßstab vorzunehmen.

6.1.4 Plasmidpräparationen und Konzentrationsbestimmung von DNA

Geringe Mengen Plasmid-DNA (~ 5 µg) werden aus einer 1,5 ml Übernachtskultur gewonnen.

Dazu werden die Puffer des Machery&Nagel Nucleobond-PC500 Maxi Kit verwendet. Die Zellen werden für 6 min bei 6600 rpm pelletiert, um dann in 100 µl S1-Puffer aufgenommen zu werden. Die Zellen werden für 5 min mit 200 µl S2-Puffer lysiert und anschließend mit 150 µl S3-Puffer neutralisiert. Die dadurch ausgefällten Proteine werden für 10 min bei 14.000 rpm sedimentiert. Die im Überstand enthaltene Plasmid-DNA wird mittels Isopropanol (7/10 des Überstandsvolumen) gefällt und für 10 min bei 14.000 rpm sedimentiert. Das Pellet wird mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 30-50µl H₂O aufgenommen und bei -20°C gelagert.

Zur Aufreinigung größerer Mengen DNA wird eine Bakterienkultur in 200-250 ml LB-Selektionsmedium über Nacht bei 37°C und 160 rpm inkubiert. Die Präparation der Plasmid-DNA erfolgt mit dem NucleoBond-Xtra-Midi Kit von Macherey&Nagel nach Herstellerangaben. Zur Messung der präparierten Plasmid-DNA wird die DNA 1:100 in H₂O verdünnt und die Absorption in einer Quarzküvette bei 260 nm und 280 nm gemessen. Aus den erhaltenen Messwerten wird über den Näherungswert für doppelsträngige DNA:

1 OD 260 nm = 50 mg/ml, die DNA-Konzentration nach der Formel berechnet:

$c = \text{Absorption} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50 \text{ mg/ml}$

Verunreinigungen der DNA-Präparation mit Proteinen werden mittels des Quotienten aus der Absorption bei 260 nm und 280 nm kontrolliert.

6.2 Proteinbiochemische Methoden

6.2.1 Peptidsynthese

Alle verwendeten synthetischen Peptide werden von Dr. R. Pipkorn, DKFZ Heidelberg, Dr. M. Beyermann, FMP Berlin oder von der Firma PSL durch Fmoc Synthese wie bereits beschrieben hergestellt (Kaden et al., 2008a) und mittels MALDI-MS die korrekte Größe und Reinheit verifiziert. Peptide werden mit dem automatischen Syntheser (ABI 433a, Applied Biosystem, Forster City, CA) auf Trt-Tentagel Harz (Rapp-Polymere Tübingen, Germany, 0.25 mmol/g, 0.5 g) unter Verwendung der N-(9-fluorenyl)methoxycarbonyl(Fmoc)-Strategie (doppelte Kopplung mit 9 equi. of Fmoc-aa/

HBTU/ 6 equi. DIPEA) hergestellt. Nach einer letzten Abspaltung durch Trifluoressigsäure/H₂O (9/1), wird das Rohpeptid durch präparative RP-HPLC aufgereinigt um ein Endprodukt mit einer Reinheit von 95% zu erhalten (HPLC Analyse Detektor 220 nm).

Das synthetische Aß Peptid wird stets nach dem einwiegen mit 98% Ameisensäure gelöst um dadurch den Hauptteil des Peptids in monomerer Form zu erhalten. Das Verhältnis von Monomer:Dimer:Trimer stellt sich als 55:30:15 dar (Roher et al., 1996). Die Ameisensäure wird durch mindestens 60 min im Vakuumkonzentrator abgezogen. Das lyophilisierte Peptid wird bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert. Unmittelbar vor der Verwendung wird das Peptid auf RT äquilibriert um dann zu einer Konzentration von 1 mg/ml in H₂O mit 0,12% NH₃ gelöst (Schmechel et al., 2003) und sofort für die unterschiedlichen Untersuchungen weiterverwendet zu werden.

6.2.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen mit dem Bicinchoninsäure (BCA) Protein Test (Pierce, Rockford, USA) beruht darauf, dass Proteine in alkalischer Lösung Cu²⁺-Ionen zu Cu¹⁺-Ionen reduzieren, die mit BCA einen violetten Komplex bilden, der ein Absorptionsmaximum bei 562 nm besitzt. Für die Reaktion wird jeweils BCA mit 4% CuSO₄ 1:40 versetzt.

Auf einer 96-„Loch“-Mikrotiterplatte werden die proteinhaltigen Proben mit dem BCA Reagenz im Verhältnis 1:1 versetzt, das entsprechend der Anleitung des Herstellers frisch angesetzt wird, und für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wird die Absorption im Mikrotiterplattenphotometer bei 562 nm gemessen. Die Proteinkonzentration wird anhand einer Standardkurve mit BSA ermittelt.

Eine weitere verwendete Methode zur Proteinkonzentrationsbestimmung ist der Bradford Test. Bei diesem Test kommt es durch Anlagerung von Coomassie Brilliant Blau G-250 an das Protein zur Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes von 465 nm zu 595 nm.

Dazu wird 6 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 in 100 ml 3%iger Perchlorsäure gelöst und im Verhältnis 1:1 mit der zu bestimmenden Probe gemischt. Eine Messung sollte in einem Zeitraum von 2-30 min erfolgen, um ein Ausfallen der Proteine zu vermeiden.

Die Absorptionzunahme bei 595 nm ist direkt proportional zur Proteinkonzentration und kann durch Abgleich mit einer BSA Standardreihe ermittelt werden.

Im Vergleich zur BCA Methode ist der Bradford Test schneller, einfacher, sensitiver und weniger störanfällig. Jedoch gibt es starke Reaktionen auf Detergenzien wie Triton X-100 und NP-40.

6.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen entsprechend ihrer Größe kann mittels der diskontinuierlichen Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) erfolgen (Laemmli, 1970). Dabei werden Proteine mit Probenpuffer (nicht reduzierend: 8% (w/v) SDS; 40% Glycerin; 0,04% (w/v) Bromphenolblau (4,35×PP); 250 mM Tris/HCl pH 6,8) verdünnt und bei 95°C für 5 min aufgeköcht. Durch die somit erfolgte Denaturierung der Proteine kann sich das negativ geladene Detergens SDS an die Aminosäuren anlagern (etwa 1 SDS-Molekül pro 2 Aminosäuren). Durch Zusatz von β -Mercaptoethanol (20% (v/v)) im Probenpuffer, werden vorliegende Disulfidbrücken aufgebrochen. Die Proteine werden auf 8-15%ige SDS-Polyacrylamidgele aufgetragen und elektrophoretisch bei 25-30 mA aufgetrennt (Laufpuffer: 192 mM Glycin; 20 mM Tris; 0,1% (w/v) SDS).

Für kleinere Proteine wie A β mit 4,5 kDa werden 10-20% Tris-Trizin Gradienten Fertiggele (Anamed, Darmstadt) verwendet, da Tricin als Leitton zu einer besseren Trennung im niederen Molekularbereich führt. Auch diese Proben werden mit nicht reduzierendem SDS-Probenpuffer vermischt, aufgeköcht und mittels Elektrophorese getrennt (Laufpuffer: 100 mM Tricin; 100 mM Tris/HCl; 0,1% (w/v) SDS).

6.2.4 Coomassie Färbung

Die Protein-Färbung mit kolloidalem Coomassie (Coomassie G-250) im SDS-Polyacrylamid-Gel erfolgte durch Inkubation mit einer Färbelösung (20% Methanol; 20% Stainer A; 5% Stainer B; Invitrogen, Deutschland) für 3-12 Std oder Ü/N bei RT auf einem Schütteltisch. Nachdem das Coomassie an die Proteine gebunden hat, kann überschüssiges Färbematerial mit deionisiertem H₂O entfernt werden. Anschließend wird das gefärbte Gel dokumentiert, oder die Proteinbanden zur MALDI-MS Analyse ausgeschnitten, und tryptisch in dem Gelstück verdaut.

6.2.5 Western-Blot

6.2.5.1 Proteintransfer auf Nitrozellulosemembranen

In der SDS-PAGE nach ihrer Größe aufgetrennte Proteine können für weitere Untersuchungen zugänglich gemacht werden, indem diese durch blotten auf Nitrozellulosemembranen übertragen werden. Der Transfer der Proteine auf die Membranen erfolgte im Tankblotverfahren in einer Transblot-Apparatur (Biorad, München) für 3 Std bei 380 mA oder bei 180 mA über Nacht (Blotpuffer: 192 mM Glycin; 10% Methanol in 25 mM Tris). Die transferierten Proteine werden durch reversible Färbung mit Ponceau S auf der Nitrozellulosemembran sichtbar gemacht, indem die Nitrozellulosemembran mit der Ponceau S-Färbelösung (0,2% (w/v) Ponceau S; 1% (v/v) Essigsäure) für 1 min inkubiert wird. Die Proteinbanden werden durch mehrfaches Waschen mit deionisiertem Wasser zur Dokumentation sichtbar und durch Waschen mit PBS wieder vollständig entfärbt.

Sollte auf der Nitrozellulosemembran A β mit dem W02 Antikörper nachgewiesen werden, war es notwendig die Membran nach der Ponceau Färbung für 5 min in PBS aufzukochen.

Dadurch wird das Epitop für den Antikörper besser zugänglich, und die Signale werden verstärkt.

6.2.5.2 Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen

Nach dem Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran werden diese von einem spezifischen Antikörper gebunden. Dazu müssen zuerst freie Proteinbindungsstellen mit 10% (w/v) Magermilchpulver in PBS für 1 Std bei RT blockiert werden. Nach ausgiebigem Waschen kann mit dem gewünschten Primärantikörper in PBS in entsprechender Konzentration für 1 Std bei RT oder bei 4°C Ü/N inkubiert werden, um anschließend sorgfältig unspezifisch gebundene Antikörper durch Waschen mit PBS zu entfernen. Der Primärantikörper wird mit den spezifischen Sekundärantikörpern (Promega, USA) detektiert. Nach erneutem Waschen wird das Protein indirekt durch die gebundenen Antikörper mittels Chemilumineszenz auf Röntgenfilmen (Amersham-Pharmacia, GB; Hartenstein A., Deutschland) sichtbar gemacht. Diese Reaktion des Chemilumineszenz-Reagens ECL wird durch die an dem Sekundärantikörper konjugierte Meerrettich-Peroxidase katalysiert.

Das ECL-Reagenz wird hergestellt, indem

1 ml A (50 mg Luminol in 200 ml 0,1 M TrisHCl (pH 8,6); 4°C)

+ 100 µl B (22 mg p-Hydroxycoumarinsäure in 20 ml DMSO; RT im dunkeln)

+ 0,33 µl H₂O₂

vermischt und für 1 min auf dem Blot inkubiert wird. Die Expositionszeit des Filmes variiert dabei abhängig von Signalintensität zwischen 30 Sek und 1 Std.

6.2.5.3 Proteintransfer auf Nitrozellulosemembran mittels „Dot-Blot“

Eine einfache und schnelle Art des Proteintransfers auf die Nitrozellulose ist das „dot-blotting“. Hierbei wird auf eine Größenauffrennung der Proteine per SDS-PAGE verzichtet, was das Tankblotverfahren unnötig macht.

Zunächst werden ein Whatman-Papier und eine Nitrozellulosemembran der passenden Größe mit PBS befeuchtet und in die Dot-Blot-Apparatur (Minifold, Schleicher&Schuell) eingespannt. Je 50-400 µl der Probe werden in die vorgesehenen Vertiefungen gegeben. Entsteht mit Hilfe einer Vakuumpumpe ein Unterdruck, wird die Lösung durch Membran und Whatman-Papier hindurch in ein großes Auffang-Reservoir gezogen. Die Proteine aus der Lösung werden dabei durch hydrophobe Wechselwirkungen auf der Membran zurückgehalten. Die Membran wird aus der Apparatur genommen und kurz getrocknet. Anschließend wird sie mit 10% Magermilch-Pulver in PBS blockiert und für die immunologische Detektion genutzt (siehe 2.5.2).

6.2.6 Limitierte Proteolyse

Es gibt unterschiedliche Methoden um Aussagen über die Struktur eines Proteins zu treffen.

Eine einfache Methode, um schnell Unterschiede aufzeigen zu können, ist die limitierte Proteolyse. Dabei wird das zu analysierende Peptid mit einem bekannten Enzym gespalten.

In diesem Fall wird A β 42 mit Trypsin gespalten. Trypsin schneidet, durch die negative Ladung des Asp in der katalytisch aktiven Tasche S1, vor allem an der Carboxylseite von positiv geladenen Aminosäuren wie Arg (R) und Lys (K). Dadurch kann bereits im Vorfeld bestimmt werden, welche Fragmente zu erwarten sind. Die Proteolyse wird mit 20 µg/ml synthetischem Peptid in 25 mM Ammoniumhydrogencarbonat durchgeführt. Die Proteolyse wird mit einer Enzym:Substrat-Konzentration von 1:500 gestartet und nach 0, 1, 5, 10, 20, 30, 60, 120 und 180 min bei 37°C mit Trypsininhibitor (Inhibitor:Trypsin; 1:1) abgestoppt. Die entstandenen Fragmente, sowie das ungespaltene Peptid, werden mit MALDI-MS TOF-TOF auf Sinapinsäure (SA) und 4- α -cyano-hydroxymizimtsäure (CCA) Matrix gemessen. Zu Herstellung der gesättigten Matrix wird CCA und SA in 30%

Acetonitril und 0,1% Trifluoressigsäure im Ultraschallbad gelöst, und nicht gelöstes Material abzentrifugiert. Die Proben werden 1:1 mit dem Überstand der Matrixlösung vermischt und sofort auf den Stahl Probensteller aufgetragen. Die Kokristallisation von Matrix und Probe erfolgte durch die Dried-Droplet-Methode. Die Proben werden mit einem Ultraflex II-Massenspektrometer (Bruker Daltonic, Bremen) im Reflektor-Modus mit dem Programm RP-PepMix vermessen.

Eine Auswertung war nur in so fern möglich, als das Verhältnis der Peakflächen des gebildeten Produkts zum ungespaltenen Ausgangsmaterial ermittelt wird.

6.2.7 Größenausschlusschromatographie

Eine einfache und zuverlässige Form Proteine und Peptide nach ihrer Größe aufzutrennen ist die Größenausschlusschromatographie (GPC). Dabei werden als stationäre Phase vernetzte Polymere verwendet, die dreidimensionale Strukturen in Form von Poren ausbilden. Die aufzutrennenden Moleküle werden in einer mobilen Phase (Laufmittel) gelöst und auf die stationäre Phase aufgetragen. Gelöste Moleküle, die größer sind als die Poren der stationären Phase, bewegen sich mit dem Laufmittel an den Poren vorbei. Kleine gelöste Moleküle diffundieren dagegen in die Poren und verlassen die stationäre Phase später als große Moleküle. Durch eine Fraktionierung des austretenden Laufmittels können kleine von großen Molekülen getrennt werden. Hier werden Superose 12 (GE Healthcare, USA) mit vernetzter Agarose als Matrix und/oder Superdex 75 (GE Healthcare, USA) Säulen verwendet, die eine Matrix aus vernetzter Agarose und Dextran enthalten. Diese Säulen haben eine optimale Auftrennungsverteilung von 1×10^3 - 3×10^5 Da (Superose12) bzw. 3×10^3 - 7×10^4 Da (Superdex75) und eine optimale Flußgeschwindigkeit von 0,5 ml/min. Beide können mit 1xPBS pH 7,5 oder 50 mM TrisHCl pH 7,5 als Laufmittel genutzt werden, und können mit 0,05 M NaOH, 70% Ameisensäure und 70% Ethanol gereinigt werden. Zur Ermittlung der Größenverteilung werden Eichläufe vorgenommen. Hierfür werden folgende Peptide verwendet: Blue Dextran (>200 kDa); Bovines Serum Albumin (67 kDa); Ovalbumin (43 kDa); Chymotrypsinogen (25 kDa); RNaseA (13,7 kDa); Aprotinin (6,5 kDa) und Vitamin B12 (1,35 kDa) (Abb. 28).

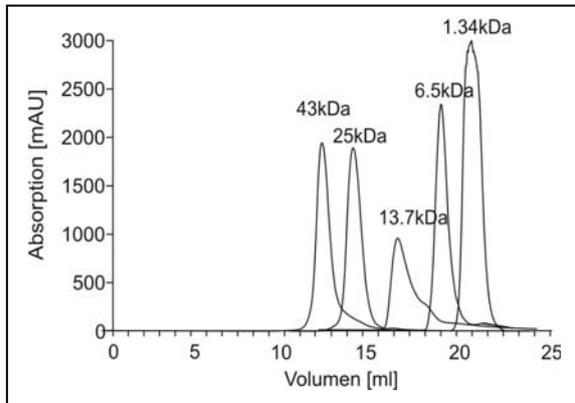


Abb. 28: Säuleneichlauf zur Bestimmung der Proteingrößen mittels Ovalbumin (43 kDa); Chymotrypsinogen (25 kDa); RNaseA (13,7 kDa); Aprotinin (6,5 kDa) und Vitamin B12 (1,35 kDa) als Eichpeptide. Dargestellt ist ein exemplarischer Eichlauf aus mindestens drei unabhängigen Säulenläufen für jede verwendete Säule.

Durch die Ermittlung der Elutionsvolumen der Eichpeptide (Abb. 28) kann die Größe von unbekanntem Peptiden oder -wie in diesem Fall- von Aggregaten bestimmt werden, indem das Elutionsvolumen gegen die Proteingröße aufgetragen und anhand der Steigung die Größe des gesuchten Proteins errechnet wird.

Nach der Trennung von A β Peptiden ist es notwendig nach mindestens jedem zweiten Lauf die Säulen gründlich zu waschen, da sonst das Peptid auf der Säule aggregiert und diese nicht mehr verwendet werden kann. Zum Waschen eignet es sich die Säule erst mit zweifachem Säulenvolumen 50% Ameisensäure, zweifachem Säulenvolumen deionisiertem Wasser, optional zweifachem Säulenvolumen 0,025 M NaOH, wieder zweifachem Säulenvolumen deionisiertem Wasser und abschließend dreifachem Säulenvolumen Puffer zu spülen.

6.2.8 Circular dichroismus

Der Circular dichroismus (CD) analysiert die unterschiedlichen Absorptionen einer optisch aktiven Substanz mit polarisiertem Licht. Durch die Wahl eines Spektralbereichs von 160 nm bis 250 nm kann als wichtigste Anwendung die Proteinsekundärstrukturanalyse angegeben werden. Aufgrund des umfassenden Spektralbereichs spricht man dabei dann auch von UV-CD-Spektroskopie. Durch die Chiralität der Peptidbindungen ($n \rightarrow \pi^*$; $\pi \rightarrow \pi^*$) können Spektren der empfindlichen Sekundärstruktur aufgenommen werden, wobei ein Maximum bei 190 nm und zwei Minima bei 210 und 220 nm auf eine α -helikale Struktur hinweisen, ein Maximum bei 220 nm und ein Minimum bei 190 nm deuteten auf eine zufällige Struktur hin und ein Spektrum mit einem Maximum bei 190 nm mit einem

Minimum bei 220 nm entspricht einer β -Faltblatt Struktur. Durch die Berechnung der Verschiebungen innerhalb der festgelegten Spektren, kann das prozentuale Verhältnis von β -Faltblatt zu α -helikaler zu zufälliger Struktur berechnet werden (Reed and Reed, 1997).

Eine Messung der A β -Proben ist ausschließlich in 0,1xPBS (13,7 mM NaCl; 0,27 mM KCl; 1 mM Na₂HPO₄; 0,2 mM KH₂PO₄) bei einer Konzentration von 200 μ M möglich und werden sofort oder nach 1 Std Inkubation bei RT in einer 0,1 mm Quarz-Küvette (Helma, Jena) durchgeführt. Die Proben werden mit einem Jasco J-810 in der Arbeitsgruppe von Prof. R. Haag (FU-Berlin) unter Standard Bedingungen bei 1 nm Bandbreite, 50 nm/min Geschwindigkeit und 20°C gemessen. Die Messung beginnt bei 190 nm und endet bei 260 nm mit einem Intervall von 0,5 nm. Eine Auswertung und Berechnung der Spektren erfolgt mittels Origin in dem die Elliptizität der Probe berechnet wird.

Elliptizität: $\Theta = [\Delta\varepsilon d c]$

Wobei $\Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R$ die Differenz der Absorptionskoeffizienten des links und rechts zirkular polarisierenden Lichtes sind, d die Schichtdicke der Küvette und c die Konzentration der Probe.

6.2.9 Aufreinigung von A β Peptiden aus *E.coli*

Um Proteine aus *E.coli* aufzureinigen zu können werden elektrokompetente Zellen mit den pET28a Plasmiden transformiert (siehe Abschnitt 1.3). Übernachtskulturen dieser Zellen werden in 250-750 ml LB-Selektionsmedium aufgenommen und bei 37°C inkubiert, bis eine optische Dichte von OD₆₀₀ 0,6-0,8 erreicht wird. Die Expression des Proteins erfolgt durch Induktion mit 1 mM IPTG. Nach 4 Std Expression werden die Zellen bei 4.000 rpm, 4°C für 10 min pelletiert und bei -20°C Ü/N eingefroren. Zur Präparation der „inclusion bodies“ wird das Pellet in 10-20 ml Tris/EDTA (50 mM Tris pH 8; 5 mM EDTA) resuspendiert, und die Zellen mit dem Ultraschallstab 3-mal für 30 sek (5-mal bei 50% Puls/ Intensität) aufgebrochen und für 10 min bei 15000 rpm 4°C abzentrifugiert. Diese Prozedur wird zwei weitere Male wiederholt, bis die verbleibenden „inclusion bodies“ mit einem Tris/EDTA/Harnstoff Puffer (10 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA, 8 M Harnstoff) solubilisiert werden. Alle Proben werden mit MALDI-MS, Western-Blot und Coomassie auf ihre Reinheit überprüft.

6.3 Bildgebende Verfahren: Elektronenmikroskopie und Rasterkraftmikroskopie

Zur Darstellung von aus A β 42 gebildeten Fibrillen werden zwei gängige Methoden verwendet. Zum einen wird in Kooperation mit Dr. R. Lurz (MPI, Berlin) elektronenmikroskopische Aufnahmen (EM) von 24-72 Std gereiften A β Fibrillen aufgenommen. Zum anderen wird in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. J.P. Rabe (HU-Berlin) ein Zeitverlauf der A β Aggregation von 0-24 Std mit einem Rasterkraftmikroskop (AFM) abgebildet. In beiden Fällen wird monomerisiertes A β 42 Peptid in H₂O mit 0,12% NH₃ gelöst und auf eine Endkonzentration von 40 μ M verdünnt. Zur Detektion der Fibrillen im EM wird das Peptid für mindestens 24 Std bei RT inkubiert, um anschließend mit 2%-iger Uranylacetatlösung gefärbt zu werden. Die gefärbten Fibrillen werden auf einem Kohlenstofffilm immobilisiert und mit einem Philips CM100 Elektronenmikroskop bei 100 kV und einer CCD-Kamera (Tietz Video und Image processing Systems GmbH, Gauting) gefilmt. Eine Auswertung der Bilder erfolgte mit Adobe Photoshop, die Kalkulation der Fibrillen mit EM-Menu 4.0 (Tietz Video und Image processing Systems GmbH, Gauting).

Da AFM eine höhere Auflösung hat als EM, ist es möglich, die Fibrillenbildung über einen Zeitraum von bis zu 24 Std zu dokumentieren. Jeweils 5-10 μ l des gelösten Peptids werden auf einer Mica Oberfläche (PLANO W. Plannet GmbH, Wetzlar, Deutschland) durch hydrophobe Wechselwirkungen immobilisiert. Nach einer maximalen Einwirkzeit von 30 sek wird nicht gebundenes Material durch Zentrifugation entfernt. Die Bilder werden mit einem MultiMode scanning probe Mikroskop (Digital Instruments, Inc., Santa Barbara, CA, USA) im Abtastmodus (tapping mode) aufgenommen. Es werden Bilder in einer Abtastrate von 2-4 Linien/sek mit einer Auflösung von 512x512 Pixel aufgenommen. Der benutzte Olympus Cantilever wird mit einer Resonanz-Frequenz von 60-80 kHz und einer Spring Konstante von 2 N/m verwendet. Zur Auswertung der Bilder wird SPIP (The Scanning Probe Image Processor, Image Metrology, Horsholm, Dänemark) verwendet.

6.4 *In vitro* und *in vivo* Toxizitätstest

Um die Toxizität des A β Peptids zu ermitteln werden drei unabhängige Systeme gewählt. Zum einen werden die humanen Neuroblastom-Zellen SH-SY5Y verwendet. Zum Testen der Toxizität werden diese in 96-well Platten in einer Dichte von 1×10^5 Zellen pro well in 100 μ l ausgezählt. Nach 48 Std wird das Medium ersetzt durch A β enthaltendes Medium,

und für 12 Std inkubiert. Die Zellviabilität wird durch Verwendung des 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid oder Tetrazoliumsalz (MTT)-Test festgestellt, indem die MTT Lösung (5 mg/ml) nach der Peptid Inkubation 1:10 im Medium verdünnt wird und die Zellen weitere 1-3 Std bei 37°C und 5%CO₂ inkubiert werden. Das gelblich gefärbte Tetrazoliumsalz wird dabei von lebenden Zellen aufgenommen und in intakten Mitochondrien durch die mitochondriale Dehydrogenase in das blau-violette Formazan umgesetzt. Nach der Lyse der Zellen durch 100% DMSO kann dieser Farbstoff bei 562 nm photometrisch gemessen und daraufhin quantifiziert werden. Zur Kontrolle werden immer unbehandelte Zellen als Negativkontrolle und mit 10% DMSO behandelte Zellen als Positivkontrolle mitgeführt.

Ein weiteres verwendetes System sind die Primärneuronen. Hierfür werden hippokampale Neuronen aus P0-P1 alten Wistar Ratten verwendet. Die Hippocampi werden durch Papain dissoziiert und in neurobasal A Medium (2% B27; 2 mM Glutamax; 0.2% Penicillin/Streptomycin) auf einem Glia-Zellrasen kultiviert. Nach 10 Zellteilungen werden die Zellen, wie bereits die SH-SY5Y Zellen, mit Peptiden behandelt und für 48 Std inkubiert. Die Zellviabilität wird mittels MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assay (Promega) nach Herstellerangaben getestet. Dabei werden sowohl lebende als auch tote Zellen detektiert, indem das zellmembranpermeable Substrat GF-AFC zugegeben wird, welches von einer Protease in der lebenden Zelle gespalten werden kann. Zusätzlich wird das zellimpermeable Substrat AAF-R110 hinzugefügt, welches nur im Zellkulturüberstand von einer aus abgestorbenen Zellen freigesetzten Protease prozessiert werden kann. Werden die jeweiligen Substrate umgesetzt wird ein fluoreszierendes Signal freigesetzt, das bei den Wellenlängen 400 nm und 505 nm (Anregung und Emission lebende Zellen); 485 nm und 520 nm (Anregung und Emission tote Zellen) gemessen wird. Somit können lebende und tote Zellen in ein Verhältnis unabhängig von der Zellzahl gesetzt werden.

Zur *in vivo* Bestimmung der Toxizität von A β 42 wurden transgene *Drosophila melanogaster* in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. W. Schaffner (Universität, Zürich) hergestellt. Es wird ein Modell verwendet bei dem eine toxische Auswirkung des A β Peptids deutlich durch Augen Abberationen sichtbar gemacht werden kann. Dazu wird die codierende Sequenz von A β 42 mit der Signalsequenz des *Drosophila* Hedgehog Proteins ligiert und in den P-element vector pUAST kloniert, was zu dem Konstrukt pUAST-SP-A β 42 WT führt. Mutationen werden durch die zielgerichtete Mutagenese Technik eingefügt und die Plasmide pUAST-SP-A β 42wt, pUAST-SP-A β 42 G29/33A and

pUAST-SP-A β 42 G33I werden verwendet, um transgene Fliegen herzustellen, die mit GMR-Gal4 Fliegen gekreuzt werden um eine augenspezifische Expression zu erhalten. Aufnahmen von fünf Tage alten Fliegenaugen werden mit einem Scanning electron microscopy JEOL JSM-6360LV microscope gemacht. (Basler and Hafen, 1988).

Zur Überprüfung der Expression der Fliegen, werden je 30 Fliegen in 200 μ l Lysepuffer (50 mM TrisHCl pH 8; 0,5% Na-Deoxycholat; 1% Triton-X 100; 150 mM NaCl; 1% SDS) aufgenommen und für exakt 2 min mit einem Stößel zerkleinert. Die Überreste werden für 1 min bei 14.000 rpm sedimentiert und der Überstand in Ultrazentrifugenröhrchen gegeben und für 40 min bei 100.000 g zentrifugiert. Zur Überprüfung der gleichmäßigen Expression werden von den bereinigten Überständen 10 μ l für eine Western-Blot Analyse mit W02 Antikörper und 7 μ l für einen Enzymgekoppelten Immunadsorptionstest („Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay“, ELISA) verwendet (Abb. 29). Der verwendete ELISA wird nach den Angaben des Herstellers (The Genetics Company, Schlieren, Schweiz) durchgeführt.

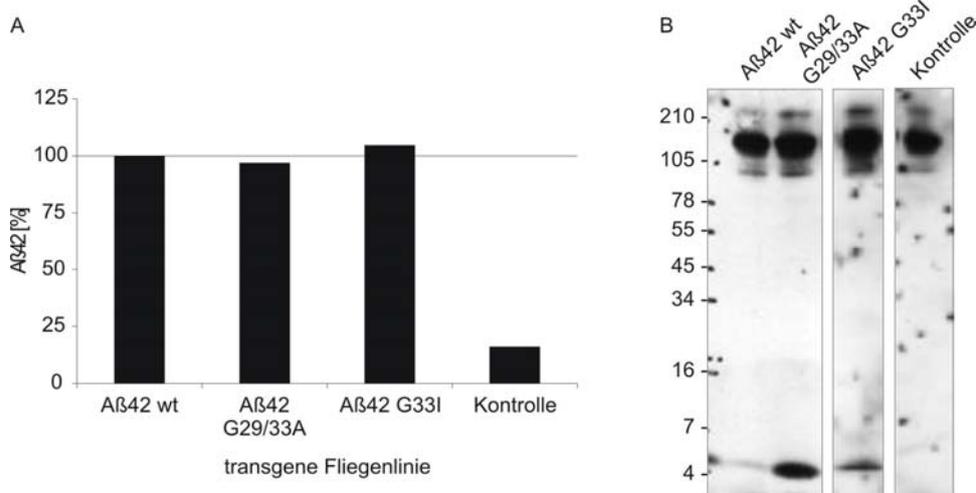


Abb. 29: Expressionskontrolle transgener *Drosophila melanogaster*, welche von links nach rechts A β 42 wt, A β 42 G29/33A, A β 42 G33I im Vergleich zur Kontrolle exprimieren. Messung der A β 42 Konzentration in den Fliegen mittels **A**: ELISA und **B**: Immunpräzipitation und gefolgt von einer Western-Blot Detektion durch W0-2. Im Western-Blot mit nicht denaturierendem Probenpuffer sind bei 150 kDa die Antikörperbanden der W0-2 Immunpräzipitation, und bei 4 kDa die monomeren A β 42 Banden zu erkennen.

6.5 Computer unterstütztes Modell

Zur Unterstützung der Strukturresultate wurde in Kooperation mit Dr. P. Hildebrand (Charite, Berlin) ein Computer gestütztes Modell angefertigt. Dabei wird als Grundlage die A β 42 Fibrillen Struktur (pdb-entry: 2beg) (Luhrs et al., 2005) verwendet (Abb.: 4). Die

Peptide werden energetisch minimiert durch GROMOS 43B1 force field (200 cycles of Steepest Descent) um gestörte Geometrien zu vermeiden (Christensen et al., 1990). Elektrostatische Oberflächenpotentiale werden mit dem APBS Programm (Sanner et al., 1996) errechnet und mit nicht-linearen Poisson-Boltzmann Gleichungen bei $\pm 9kT/e$ umrissen (Baker et al., 2001).

6.6 Elektrophysiologische Methoden

6.6.1 Präparation der akuten Hippocampalen Schnitte

Zur Messung der extrazellulären Feldpotentiale werden hippocampale Schnittpräparate von 21-28 Tage alten Wistar Ratten verwendet.

Dazu wird die Ratte mit Isofluran betäubt und sofort dekapitiert. Nach dem Aufbrechen der Schädeldecke wird die Dura entfernt und der Bulbus olfactorius abgetrennt. Das Vorderhirn und Kleinhirn wird herausgenommen und das Gehirn für 5 min in 4°C kaltem artifiziellem Cerebrospinalfluid (Ringer ACSF: 119 mM NaCl; 1 mM NaH_2PO_4 ; 10 mM Glucose; 2,5 mM KCl; 1,3 mM MgSO_4 ; 2,5 mM CaCl_2 ; 26 mM NaHCO_3) abgekühlt. Vor dem Schneiden des Gehirnes werden die beiden Hemisphären voneinander getrennt und das Cerebellum entfernt.

Mittels Vibratom (Campden Instruments MA752, DSK DTK-1000 oder Leica) werden Schnitte mit einer Dicke von 300-400 μm hergestellt und anschließend erst für 30 min bei 35°C und dann weitere 30 min bei 21°C oder 60 min bei 21°C gelagert bevor sie für die Messungen eingesetzt werden können.

6.6.2 Langzeit Potenzierung der Schaffer-Kollateralen Synapse

Die Langzeit Potenzierung (LTP) stellt ein allgemein anerkanntes Modell für Lernen und Gedächtnis dar (Bliss and Lomo, 1973). Dabei wird der Schnitt in einem Bad, einer sogenannten „submerge chamber“ (Eingetauchte Schnitte in einer Kammer) stetig mit Sauerstoff angereichertem ACSF perfundiert.

Es werden sowohl zur Stimulation als auch zur Ableitung mit ACSF gefüllte Patch Pipetten (Borsilicat Glass Kapillare, Harvard Apparatus, UK) mit niederem Widerstand verwendet. Die Stimulationselektrode wird in der CA1 zum Übergang der CA3, während die Ableitelektrode ebenfalls in der CA1 aber deutlich weiter orthodrom platziert wird (siehe Skizze Abb. 30).

Die exzitatorischen postsynaptischen Feld Potentiale (fEPSP) werden mit Axopatch 700A (Axon Instruments, Foster City, CA, USA) gemessen. Die Daten werden bei 5-10 kHz digitalisiert (National Instruments BNC-2090) und mit der Software IGOR Pro (WaveMetrics Inc., OR, USA) aufgenommen und ausgewertet. Alle Messungen werden bei 21°C Badtemperatur ausgeführt.

Um zu testen ob die verwendeten Peptide einen Einfluss auf die basale synaptische Transmission haben, werden die fEPSP von zwei unabhängigen Signalbahnen (pathway) aufgenommen. Dafür werden zwei stimulierende Elektroden parallel zueinander positioniert und gepaarte Pulse, zeitlich um 0,6 sek voneinander getrennt, von einer Ableitelektrode gemessen (Abb. 30).

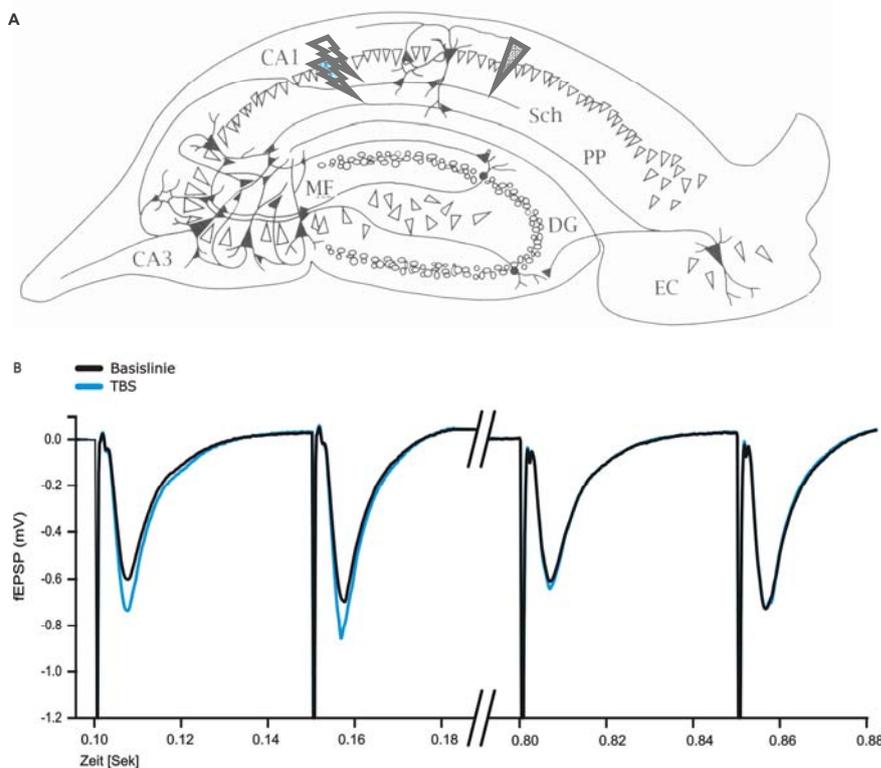


Abb. 30: LTP Messung zweier unabhängiger Pfade. **A**: Orthodrome Platzierung der Elektroden in der CA1 Region eines Ratten Hirnschnittes. Zwei stimulierende Elektroden mit tetanisierender Elektrode in blau und ableitender Elektrode in grau. **B**: Beispiel fEPSP Amplituden (Testpulse, mV) beider Pfade vor (schwarz) und nach Tetanisierung (blau). Differenz des stimulierten ersten Pfades zur Basislinie des ersten Pfades entspricht dem induzierten LTP.

Die Unabhängigkeit der beiden Signalbahnen wird ermittelt, indem die eine stimulierende Elektrode einen Puls abgibt, dem ein weiterer Puls der anderen Elektrode innerhalb von 0,05 Sek folgt. Bei nicht unabhängigen Signalbahnen käme es, durch verbleibende Neurotransmitter im synaptischen Spalt, zu einer Potenzierung der zweiten Amplitude.

Sind die stimulierten Bahnen unabhängig verändern sich die gemessenen Amplituden nicht.

Nach der Überprüfung, dass es sich um unabhängige Signalbahnen handelt, wird für mindestens 10 min von beiden Pfaden eine stabile Basislinie aufgenommen bei einem Testpuls der in seiner Identität ca. 30-40% der maximalen fEPSP Amplitude entspricht. Vor der Tetanisierung, nach der Aufnahme der Basislinie, wird der Schnitt für 20 min mit 500 nM Peptid umspült. Die LTP Induzierung erfolgt durch TBS eines der beiden Signalbahnen indem jeweils 10 Pulse bei 5 Hz abgegeben werden. Jeder Puls besteht aus vier Einzelpulsen von je 100 Hz. Nach der Tetanisierung wird das fEPSP für mindestens weitere 30 min aufgenommen. Eine Analyse der LTP durch das IGOR Programm erfolgt, indem der prozentuale Unterschied der fEPSP Amplitude nach dem Stimulus um den Basislinienwert normalisiert wird, wobei die Basislinie als 100% gesetzt wird. Zur Bereinigung der Ergebnisse werden die normalisierten fEPSP Amplituden der nicht tetanisierten von der tetanisierten Signalbahn abgezogen.

6.6.3 Messung NMDA/AMPA vermittelte Feldpotentiale

Zur Messung der NMDA vermittelten Feldpotentiale werden akute Hirnschnitte mit 10 μM des AMPA Rezeptor Antagonisten 2,3-Dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahydrobenzo[f]quinoxalin - 7-sulfonamid (NBQX; Tocris, USA) und 0,1 M MgCl_2 inkubiert bis sich die Basislinie wieder stabilisiert hat. Zur Messung der AMPA vermittelten Feldpotentiale werden die Schnitte mit 100 μM des NMDA Rezeptor Antagonisten D-(-)-2-Amino-5-phosphonopentanoische Säure (APV; Tocris, USA), aber auch mit 1 μM Gabazin (Tocris, USA) zur Hemmung der GABA A Rezeptoren und 10 μM (2S)-(+)-5,5-Dimethyl-2-morpholin Essigsäure (SCH 50911; Tocris, USA) zur Inhibierung der GABA B Rezeptoren verwendet. Nach Stabilisierung der Basislinie werden die Schnitte mit 500 nM frisch gelösten A β 42 wt oder A β 42 G33I Peptid für 50 min inkubiert um den Zeitraum einer LTP Messung abzudecken. Eine Analyse der Ergebnisse wird durch das IGOR Programm und im Weiteren durch Excel durchgeführt.

6.7 Zellbiologische Methoden

6.7.1 Verwendete Zelllinie

Alle Zellen werden im Brutschrank bei 5% CO₂, 37°C und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Sämtliche Arbeiten erfolgen unter einer sterilen Werkbank. Alle Materialien für die Zellkultur sind entweder steril verpackte Einmalartikel oder werden vor der Benutzung in einem Autoklaven bei 121°C mit Wasserdampf oder wie im Fall der Glaspipetten bei 165°C trocken sterilisiert.

Die humanen Neuroblastom-Zellen (SH-SY5Y) sowie auch die Chinesische Hamster ovarial Zellen (CHO), wachsen adhärent in FCS-haltigem Medium bei einer Zellteilungsdauer von 25-35Std.

Das Umsetzen der Zellen ist je nach ausgesäter Dichte alle 2-4 Tage nötig, was durch einmaliges Waschen mit PBS und anschließender kurzer Inkubation im Brutschrank mit Trypsin/EDTA erfolgt. Die Aktivität des Trypsins wird nach einigen Minuten durch das FCS im Medium gestoppt und die abgelösten Zellen in einer Verdünnung von 1:2 bis 1:5 erneut ausgesät oder mit dem Zellzähler (Innovatis, Reutlingen) oder der Neubauer Zählkammer ausgezählt und auf die gewünschte Zellzahl verdünnt.

6.7.2 Transfektion und Lyse der Zellen

Die Transfektion der CHO und der SH-SY5Y Zellen erfolgt durch TransFectin (Biorad, München), welches allerdings aufgrund seiner zytotoxischen Wirkung auf diese Zelllinien in nicht zu hoher Konzentration eingesetzt werden sollte. Am Tag vor der geplanten Transfektion werden die Zellen in 6-well-Platten so ausgesät, dass man am Folgetag eine Konfluenz von 50-90% erhält (SH-SY5Y: 1×10^6 Zellen/ml). Die zu transfizierende Plasmid-DNA wird jeweils in einer Menge von 1, 2 und 4 µg eingesetzt und mit 5 µl TransFectin pro Ansatz gemäß des Herstellerprotokolls in dem Serumfreien Transfektionsmedium OptiMem (Invitrogen) vorbereitet. Bereits zu Beginn der Transfektion wird der DNA-TransFectin-Komplex in OptiMem durch Serumhaltiges Wildtyp-Medium ergänzt. Nach 24 Std der Inkubation wird das Medium gewechselt. Für eine stabile Transfektion werden die Zellen 48 Std nach der Transfektion mit Antibiotikum enthaltenem Medium selektioniert. Nach dem kompletten Absterben der Kontrolltransfektion ohne Plasmid DNA werden die Zellen in 10 cm Schalen zunächst umgesetzt und bis zur 100%-igen Konfluenz kultiviert.

Die Selektion zur stabil transfizierten Zelllinie dauert etwa 2-3 Wochen.

Zur Kontrolle ob die Zellen das gewünschte Protein exprimieren werden Zellen lysiert. Dabei wird zuerst das Medium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend in 1 ml PBS abgeschabt und für 3 min bei 2000 g und 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wird in einem Detergenz-haltigen Lysepuffer aufgenommen und die Zellen werden für 30 min bei 4°C aufgeschlossen. Um nicht lysierte Zellen und Aufschlußreste zu entfernen, werden die Proben bei 10.000 g für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand kann nun für Immunpräzipitationen oder direkt für die Western-Blot Analyse eingesetzt werden. Verwendete Lysepuffer: Standard Lysepuffer (50 mM Tris HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA pH 8,0, 2% Triton X-100, 2% NP-40, 1x Complete); Lysepuffer „Südhof“ (Cao et al. 2004 JBC) (50 mM Hepes NaOH pH 7,5, 150 mM NaCl, 10% Glycerol, 1% IGEPAL CA-630, 1,5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1x Complete)

6.7.3 Kernpräparation

Die Kernpräparation erfolgte mit dem Nuclei EZ Prep Nuclei Isolation Kit (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) nach einem modifizierten Protokolls des Herstellers. SH-SY5Y Zellen werden in einer Konzentration von $2,5 \times 10^5$ Zellen/ml in 6-Loch Platten unter Standard Bedingungen kultiviert. Nach Behandlung der Zellen mit 25 µg/ml Aβ₄₂ Peptid für bis zu 2 Std wird das Medium abgenommen, die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen und mit 500 µl Trypsin/EDTA von dem Plattenboden gelöst. Alle weiteren Schritte erfolgten stets bei 4°C. Die Zellen werden bei 550 g für 10 min sedimentiert. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet in 400 µl Nuclei Lysis Buffer aufgenommen und 5 min bei 4°C inkubiert. Durch erneute Zentrifugation bei 550 g für 10 min werden die abgedaute Plasmamembran und das Zytoplast von den Kernen getrennt. Durch Wiederholung des Vorgangs werden Reste des endoplasmatischen Retikulums (ER) und Golgi-Apparates entfernt. Die im Pellet befindlichen Kerne werden in 50 µl PBS aufgenommen und für 3 min sonifiziert, um anschließend für 3 min bei 95°C aufgeköcht zu werden. Die Kernmembranen werden bei 20.000 g, 4°C, 5 min sedimentiert, und die Kernlumenproteine mittels Western-Blot Analyse detektiert.

Eine Überprüfung der Reinheit der Zellkerne erfolgte optisch über Mikroskopische Beobachtung der Kerne und durch Western-Blot indem ER- und Kernlumenproteine detektiert werden. Dabei werden Antikörper gegen Aktin, und GAP-DH als Kontrollen für zytosolische Proteine, Flotillin-1 als Protein der Plasmamembran, Calnexin als ER-Protein und Histon als Kernlumenprotein verwendet (Abb. 31).

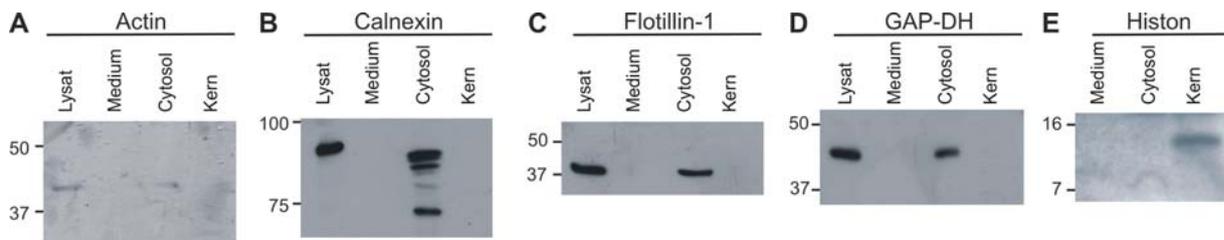


Abb. 31: Kontrolle der Reinheit der Kernpräparation mittels Western-Blot Analyse. Alle getesteten Proteine sind im Zelllysat detektierbar. Im Zytosol zu finden sind **A**: Aktin als Protein des Zytoskeletts **B**: Calnexin als ER Marker **D**: GAP-DH als lösliches, intrazelluläres Protein. und **C**: das Plasmamembran Protein Flotillin-1. **E**: Histone sind lediglich in der Kernfraktion zu detektieren.

6.7.4 Einfrieren der Zellen

Die erfolgreich transfizierten Zellen werden in einer möglichst frühen Passage konserviert, indem diese langsam (ca. 1°C pro Minute) auf -80°C heruntergekühlt und schließlich in flüssigem Stickstoff gelagert werden. Hierzu werden jeweils Zellen aus einer konfluent bewachsenen 10cm-Kulturschale durch Klopfen oder Trypsinierung abgelöst, in 8 ml Wildtyp-Medium aufgenommen und bei 400 rpm in der Zellfuge für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Das lockere Zellpellet wird in 4 ml Einfriermedium (70% Medium, 10% DMSO, 20% FCS) aufgenommen, und schnell in Kryoröhrchen gleichmäßig verteilt. Die verschlossenen Kryo-Röhrchen werden in das spezielle, Isopropanol gefüllte und bei 4°C vorgekühlte Einfriergefäß (StrataCooler von Stratagene, USA) gestellt und in dem -80°C-Gefrierschrank heruntergekühlt. Das Einfriergefäß sorgt für eine konstante und langsame Abkühlung der Zellsuspensionen. Diese waren nach einigen Stunden gefroren und können in einem Flüssigstickstofftank endgelagert werden.

6.8 Statistische Analysen

Statistische Analysen werden durchgeführt, indem der mittlere Standardfehler (SEM) von mindestens drei unabhängigen Messungen berechnet wird. Die Statistische Signifikanz wird über den Student t-Test ermittelt.

7 Abkürzungen

AD:	„Alzheimer's Disease“
AFM:	Rasterkraftmikroskopie („Atomic force microscopy“)
AICD:	„APP intracellular C-terminal domain“
AK:	Antikörper
AMPA:	α Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxalonpropionat
APH-1:	„anterio-pharynx-defective“
APLP1:	Amyloid vorläuferähnliches Protein 1 („amyloid precursor-like protein“)
APLP2 A4h:	Amyloid- β homologes Peptid nach Spaltung des APLP2 durch β - und γ -Sekrestase
APLP2:	Amyloid vorläuferähnliches Protein 2 („amyloid precursor-like protein 2“)
APP:	Amyloide Vorläuferprotein („amyloid precursor protein“)
APV/ AP5:	2-Amino-5-phosphonopentanoat
AS:	Aminosäure/n
A β :	Amyloid- β -Peptid
A β 40/42:	40 bzw. 42 Aminosäuren langes Amyloid β -Peptid
BACE:	β -Sekretase; „ β -site APP cleaving enzyme“
BSA:	Bovines Serum Albumin
CaMKII:	Calmodulin-abhängige Kinase II
CD:	Circulardichroismus
ChIP:	Chromatinimmunpräzipitation
CTF α :	C83; membranständiges Fragment nach α -Sekretase Spaltung
CTF β :	C99; membranständiges Fragment nach β -Sekretase Spaltung
DAPI:	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMSO:	Dimethylsulfoxid
DNA:	Desoxyribonukleinsäure
<i>E.coli</i> :	<i>Escherichia coli</i>
EDTA:	Ethylendiamintetraacetat
EGTA:	Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat
ELISA:	„enzyme-linked immunosorbent assay“
EM:	Elektronenmikroskop
FCS:	fetales Kälberserum
fEPSP:	exzitatorische postsynaptische Feldpotential
GPC:	Größenausschlusschromatographie
HRP:	Meerrettich-Peroxidase

kDa:	kilo Dalton
LRP:	Lipoprotein-Rezeptor
LSM:	konfokale Laser scanning Mikroskopie
LTP:	Lang Zeit Potenzierung
MALDI:	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation
mRNA:	Boten-RNA (messenger RNA)
NBQX:	2,3-Dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo(F) Quinoxalin
NMDA:	N-Methyl-D-Aspartat
NMDAR:	N-Methyl-D-Aspartat Rezeptor
OD:	Optische Dichte
PBS:	Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate-buffered saline)
PCR:	Polymerase-Ketten-Reaktion
PEN-2:	„presenilin enhacer“
PFA:	Paraformaldehyd
PS:	Presenilin
PTP:	Post-tetanischen Potenzierung
RNA:	Ribonucleinsäure
ROS:	Reaktive Sauerstoffspezies
RT:	Raumtemperatur
RT-PCR:	Reverse Transkriptions-PCR
sAPP β :	lösliche APP-Ektodomäne nach β -Sekretase-Spaltung
sAPP α :	lösliche APP-Ektodomäne nach α -Sekretase-Spaltung
SAS:	Solvent-accessible surface
SDS-PAGE:	Natriumdodecyl-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SDS-PA-Gel:	Natriumdodecyl-Polyacrylamid-Gel
SES:	Solvent-excluded surface
SPA4CT:	SP: Signalpeptid, A4CT = β -CTF; Konstrukt, das direkt β -CTF freisetzt
TBE:	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS:	Theta-burst stimulus
TEMED:	N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin
TMS:	Transmembransequenz
U:	Einheiten (units)
v/v:	Volumenprozent
w/v:	Gewichtsprozent
WB:	Western-Blot
wt:	Wildtyp

Aminosäuren:

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin
X	alle AS außer P	

8 Literaturverzeichnis

- Alzheimer, A. (1907). Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und Psychisch-Gerichtliche Medizin* 64, 146-148.
- Andersen, O. M., Reiche, J., Schmidt, V., Gotthardt, M., Spoelgen, R., Behlke, J., von Arnim, C. A., Breiderhoff, T., Jansen, P., Wu, X., et al. (2005). Neuronal sorting protein-related receptor sorLA/LR11 regulates processing of the amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 13461-13466.
- Arelin, K., Kinoshita, A., Whelan, C. M., Irizarry, M. C., Rebeck, G. W., Strickland, D. K., and Hyman, B. T. (2002). LRP and senile plaques in Alzheimer's disease: colocalization with apolipoprotein E and with activated astrocytes. *Brain Res Mol Brain Res* 104, 38-46.
- Arimon, M., Diez-Perez, I., Kogan, M. J., Durany, N., Giralt, E., Sanz, F., and Fernandez-Busquets, X. (2005). Fine structure study of Abeta1-42 fibrillogenesis with atomic force microscopy. *Faseb J* 19, 1344-1346.
- Arispe, N., Rojas, E., and Pollard, H. B. (1993). Alzheimer disease amyloid beta protein forms calcium channels in bilayer membranes: blockade by tromethamine and aluminum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 567-571.
- Baker, N. A., Sept, D., Joseph, S., Holst, M. J., and McCammon, J. A. (2001). Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 10037-10041.
- Barucker, C. (2008) Physiologische und pathophysiologische Funktion von Amyloid beta (A β) in neuronalen Zellen, Diplomarbeit, Freie Universität Berlin, Berlin.
- Basler, K., and Hafen, E. (1988). Sevenless and Drosophila eye development: a tyrosine kinase controls cell fate. *Trends Genet* 4, 74-79.
- Bayer, T. A., Schafer, S., Simons, A., Kemmling, A., Kamer, T., Tepest, R., Eckert, A., Schussel, K., Eikenberg, O., Sturchler-Pierrat, C., et al. (2003). Dietary Cu stabilizes brain superoxide dismutase 1 activity and reduces amyloid Abeta production in APP23 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 14187-14192.
- Behr, D., Hesse, L., Masters, C. L., and Multhaup, G. (1996). Regulation of amyloid protein precursor (APP) binding to collagen and mapping of the binding sites on APP and collagen type I. *J Biol Chem* 271, 1613-1620.
- Bianchi, S. L., Tran, T., Liu, C., Lin, S., Li, Y., Keller, J. M., Eckenhoff, R. G., and Eckenhoff, M. F. (2007). Brain and behavior changes in 12-month-old Tg2576 and nontransgenic mice exposed to anesthetics. *Neurobiol Aging*.

- Bliss, T. V., and Lomo, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 232, 331-356.
- Borchardt, T., Camakaris, J., Cappai, R., Masters, C. L., Beyreuther, K., and Multhaup, G. (1999). Copper inhibits beta-amyloid production and stimulates the non-amyloidogenic pathway of amyloid-precursor-protein secretion. *Biochem J* 344 Pt 2, 461-467.
- Breen, K. C., Bruce, M., and Anderton, B. H. (1991). Beta amyloid precursor protein mediates neuronal cell-cell and cell-surface adhesion. *J Neurosci Res* 28, 90-100.
- Bush, A. I., Multhaup, G., Moir, R. D., Williamson, T. G., Small, D. H., Rumble, B., Pollwein, P., Beyreuther, K., and Masters, C. L. (1993). A novel zinc(II) binding site modulates the function of the beta A4 amyloid protein precursor of Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 268, 16109-16112.
- Buxbaum, J. D., Gandy, S. E., Cicchetti, P., Ehrlich, M. E., Czernik, A. J., Fracasso, R. P., Ramabhadran, T. V., Unterbeck, A. J., and Greengard, P. (1990). Processing of Alzheimer beta/A4 amyloid precursor protein: modulation by agents that regulate protein phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 6003-6006.
- Cao, X., and Sudhof, T. C. (2001). A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science* 293, 115-120.
- Cao, X., and Sudhof, T. C. (2004). Dissection of amyloid-beta precursor protein-dependent transcriptional transactivation. *J Biol Chem* 279, 24601-24611.
- Cervantes, S., Saura, C. A., Pomares, E., Gonzalez-Duarte, R., and Marfany, G. (2004). Functional implications of the presenilin dimerization: reconstitution of gamma-secretase activity by assembly of a catalytic site at the dimer interface of two catalytically inactive presenilins. *J Biol Chem* 279, 36519-36529.
- Chen, M., and Yankner, B. A. (1991). An antibody to beta amyloid and the amyloid precursor protein inhibits cell-substratum adhesion in many mammalian cell types. *Neurosci Lett* 125, 223-226.
- Chen, Y. R., and Glabe, C. G. (2006). Distinct early folding and aggregation properties of Alzheimer amyloid-beta peptides Abeta40 and Abeta42: stable trimer or tetramer formation by Abeta42. *J Biol Chem* 281, 24414-24422.
- Chiti, F., Stefani, M., Taddei, N., Ramponi, G., and Dobson, C. M. (2003). Rationalization of the effects of mutations on peptide and protein aggregation rates. *Nature* 424, 805-808.
- Christensen, K. J., Multhaup, K. S., Nordstrom, S., and Voss, K. (1990). Cognitive test profile analysis for the identification of dementia of the Alzheimer type. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 4, 96-109.

- Citron, M., Oltersdorf, T., Haass, C., McConlogue, L., Hung, A. Y., Seubert, P., Vigo-Pelfrey, C., Lieberburg, I., and Selkoe, D. J. (1992). Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production. *Nature* 360, 672-674.
- Cleary, J. P., Walsh, D. M., Hofmeister, J. J., Shankar, G. M., Kuskowski, M. A., Selkoe, D. J., and Ashe, K. H. (2005). Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function. *Nat Neurosci* 8, 79-84.
- Cole, S. L., and Vassar, R. (2008). The role of APP processing by BACE1, the beta-secretase, in Alzheimer's disease pathophysiology. *J Biol Chem*.
- Coulson, E. J., Paliga, K., Beyreuther, K., and Masters, C. L. (2000). What the evolution of the amyloid protein precursor supergene family tells us about its function. *Neurochem Int* 36, 175-184.
- De Felice, F. G., Velasco, P. T., Lambert, M. P., Viola, K., Fernandez, S. J., Ferreira, S. T., and Klein, W. L. (2007). Abeta oligomers induce neuronal oxidative stress through an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism that is blocked by the Alzheimer drug memantine. *J Biol Chem* 282, 11590-11601.
- Demuro, A., Mina, E., Kaye, R., Milton, S. C., Parker, I., and Glabe, C. G. (2005). Calcium dysregulation and membrane disruption as a ubiquitous neurotoxic mechanism of soluble amyloid oligomers. *J Biol Chem* 280, 17294-17300.
- Dewachter, I., Filipkowski, R. K., Priller, C., Ris, L., Neyton, J., Croes, S., Terwel, D., Gysemans, M., Devijver, H., Borghgraef, P., et al. (2007). Deregulation of NMDA-receptor function and down-stream signaling in APP[V717I] transgenic mice. *Neurobiol Aging*.
- Dovey, H. F., Suomensaaari-Chrysler, S., Lieberburg, I., Sinha, S., and Keim, P. S. (1993). Cells with a familial Alzheimer's disease mutation produce authentic beta-peptide. *Neuroreport* 4, 1039-1042.
- Dyrks, T., Dyrks, E., Masters, C., and Beyreuther, K. (1992). Membrane inserted APP fragments containing the beta A4 sequence of Alzheimer's disease do not aggregate. *FEBS Lett* 309, 20-24.
- Edbauer, D., Winkler, E., Regula, J. T., Pesold, B., Steiner, H., and Haass, C. (2003). Reconstitution of gamma-secretase activity. *Nat Cell Biol* 5, 486-488.
- Eggert, S., Paliga, K., Soba, P., Evin, G., Masters, C. L., Weidemann, A., and Beyreuther, K. (2004). The proteolytic processing of the amyloid precursor protein gene family members APLP-1 and APLP-2 involves alpha-, beta-, gamma-, and epsilon-like cleavages: modulation of APLP-1 processing by n-glycosylation. *J Biol Chem* 279, 18146-18156.

- Esch, F. S., Keim, P. S., Beattie, E. C., Blacher, R. W., Culwell, A. R., Oltersdorf, T., McClure, D., and Ward, P. J. (1990). Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor. *Science* 248, 1122-1124.
- Ferrera, P., and Arias, C. (2005). Differential effects of COX inhibitors against beta-amyloid-induced neurotoxicity in human neuroblastoma cells. *Neurochem Int* 47, 589-596.
- Garzon-Rodriguez, W., Sepulveda-Becerra, M., Milton, S., and Glabe, C. G. (1997). Soluble amyloid Abeta-(1-40) exists as a stable dimer at low concentrations. *J Biol Chem* 272, 21037-21044.
- Gensler, M. (2008) Untersuchung von A β 42 Peptiden mit Rasterkraftmikroskopie, Diplomarbeit, Humboldt Universität, Berlin.
- Georganopoulou, D. G., Chang, L., Nam, J. M., Thaxton, C. S., Mufson, E. J., Klein, W. L., and Mirkin, C. A. (2005). Nanoparticle-based detection in cerebral spinal fluid of a soluble pathogenic biomarker for Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 2273-2276.
- Glennner, G. G., Wong, C. W., Quaranta, V., and Eanes, E. D. (1984). The amyloid deposits in Alzheimer's disease: their nature and pathogenesis. *Appl Pathol* 2, 357-369.
- Gong, Y., Chang, L., Viola, K. L., Lacor, P. N., Lambert, M. P., Finch, C. E., Krafft, G. A., and Klein, W. L. (2003). Alzheimer's disease-affected brain: presence of oligomeric A beta ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 10417-10422.
- Grant, M. A., Lazo, N. D., Lomakin, A., Condron, M. M., Arai, H., Yamin, G., Rigby, A. C., and Teplow, D. B. (2007). Familial Alzheimer's disease mutations alter the stability of the amyloid beta-protein monomer folding nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 16522-16527.
- Grimm, M. O., Grimm, H. S., and Hartmann, T. (2007). Amyloid beta as a regulator of lipid homeostasis. *Trends Mol Med* 13, 337-344.
- Grimm, M. O., Grimm, H. S., Tomic, I., Beyreuther, K., Hartmann, T., and Bergmann, C. (2008). Independent inhibition of Alzheimer disease beta- and gamma-secretase cleavage by lowered cholesterol levels. *J Biol Chem* 283, 11302-11311.
- Haass, C. (2004). Take five--BACE and the gamma-secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid beta-peptide generation. *Embo J* 23, 483-488.
- Haass, C., Hung, A. Y., Schlossmacher, M. G., Teplow, D. B., and Selkoe, D. J. (1993). beta-Amyloid peptide and a 3-kDa fragment are derived by distinct cellular mechanisms. *J Biol Chem* 268, 3021-3024.

- Hardy, J. A., and Higgins, G. A. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256, 184-185.
- Hartmann, T., Kuchenbecker, J., and Grimm, M. O. (2007). Alzheimer's disease: the lipid connection. *J Neurochem* 103 Suppl 1, 159-170.
- Heber, S., Herms, J., Gajic, V., Hainfellner, J., Aguzzi, A., Rulicke, T., von Kretzschmar, H., von Koch, C., Sisodia, S., Tremml, P., et al. (2000). Mice with combined gene knock-outs reveal essential and partially redundant functions of amyloid precursor protein family members. *J Neurosci* 20, 7951-7963.
- Hebert, S. S., Bourdages, V., Godin, C., Ferland, M., Carreau, M., and Levesque, G. (2003). Presenilin-1 interacts directly with the beta-site amyloid protein precursor cleaving enzyme (BACE1). *Neurobiol Dis* 13, 238-245.
- Herms, J., Anliker, B., Heber, S., Ring, S., Fuhrmann, M., Kretzschmar, H., Sisodia, S., and Muller, U. (2004). Cortical dysplasia resembling human type 2 lissencephaly in mice lacking all three APP family members. *Embo J* 23, 4106-4115.
- Hilbich, C., Kisters-Woike, B., Reed, J., Masters, C. L., and Beyreuther, K. (1991). Aggregation and secondary structure of synthetic amyloid beta A4 peptides of Alzheimer's disease. *J Mol Biol* 218, 149-163.
- Hsia, A. Y., Masliah, E., McConlogue, L., Yu, G. Q., Tatsuno, G., Hu, K., Kholodenko, D., Malenka, R. C., Nicoll, R. A., and Mucke, L. (1999). Plaque-independent disruption of neural circuits in Alzheimer's disease mouse models. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 3228-3233.
- Hsieh, H., Boehm, J., Sato, C., Iwatsubo, T., Tomita, T., Sisodia, S., and Malinow, R. (2006). AMPAR removal underlies Abeta-induced synaptic depression and dendritic spine loss. *Neuron* 52, 831-843.
- Hynd, M. R., Scott, H. L., and Dodd, P. R. (2004). Selective loss of NMDA receptor NR1 subunit isoforms in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 89, 240-247.
- Jacobsen, J. S., Wu, C. C., Redwine, J. M., Comery, T. A., Arias, R., Bowlby, M., Martone, R., Morrison, J. H., Pangalos, M. N., Reinhart, P. H., and Bloom, F. E. (2006). Early-onset behavioral and synaptic deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 5161-5166.
- Jang, H., Zheng, J., and Nussinov, R. (2007a). Models of beta-amyloid ion channels in the membrane suggest that channel formation in the bilayer is a dynamic process. *Biophys J* 93, 1938-1949.
- Jang, M. H., Piao, X. L., Kim, H. Y., Cho, E. J., Baek, S. H., Kwon, S. W., and Park, J. H. (2007b). Resveratrol oligomers from *Vitis amurensis* attenuate beta-amyloid-induced oxidative stress in PC12 cells. *Biol Pharm Bull* 30, 1130-1134.

- Jozwiak, K., Krzysko, K. A., Bojarski, L., Gacia, M., and Filipek, S. (2008). Molecular models of the interface between anterior pharynx-defective protein 1 (APH-1) and presenilin involving GxxxG motifs. *ChemMedChem* 3, 627-634.
- Kaden, D., Munter, L. M., Joshi, M., Treiber, C., Weise, C., Bethge, T., Voigt, P., Schaefer, M., Beyermann, M., Reif, B., and Multhaup, G. (2008a). Homophilic interactions of the amyloid precursor protein (APP) ectodomain are regulated by the loop region and affect beta-secretase cleavage of APP. *J Biol Chem* 283, 7271-7279.
- Kaden, D., Voigt, P., Munter, L. M., Bobowski, K., Schaefer, M., and Multhaup, G. (2008b). Subcellular Localization and Dimerization of APLP1 are strikingly different from APP and APLP2. *JCS*.
- Kakuda, N., Funamoto, S., Yagishita, S., Takami, M., Osawa, S., Dohmae, N., and Ihara, Y. (2006). Equimolar production of amyloid beta-protein and amyloid precursor protein intracellular domain from beta-carboxyl-terminal fragment by gamma-secretase. *J Biol Chem* 281, 14776-14786.
- Kessler, H., Bayer, T. A., Bach, D., Schneider-Axmann, T., Supprian, T., Herrmann, W., Haber, M., Multhaup, G., Falkai, P., and Pajonk, F. G. (2008). Intake of copper has no effect on cognition in patients with mild Alzheimer's disease: a pilot phase 2 clinical trial. *J Neural Transm* 115, 1181-1187.
- Khachaturian, Z. S. (1989). Calcium, membranes, aging, and Alzheimer's disease. Introduction and overview. *Ann N Y Acad Sci* 568, 1-4.
- Kim, S., Jeon, T. J., Oberai, A., Yang, D., Schmidt, J. J., and Bowie, J. U. (2005). Transmembrane glycine zippers: physiological and pathological roles in membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 14278-14283.
- Kimberly, W. T., Xia, W., Rahmati, T., Wolfe, M. S., and Selkoe, D. J. (2000). The transmembrane aspartates in presenilin 1 and 2 are obligatory for gamma-secretase activity and amyloid beta-protein generation. *J Biol Chem* 275, 3173-3178.
- Kleiger, G., Grothe, R., Mallick, P., and Eisenberg, D. (2002). GXXXG and AXXXA: common alpha-helical interaction motifs in proteins, particularly in extremophiles. *Biochemistry* 41, 5990-5997.
- Klein, W. L., Krafft, G. A., and Finch, C. E. (2001). Targeting small Abeta oligomers: the solution to an Alzheimer's disease conundrum? *Trends Neurosci* 24, 219-224.
- Klyubin, I., Betts, V., Welzel, A. T., Blennow, K., Zetterberg, H., Wallin, A., Lemere, C. A., Cullen, W. K., Peng, Y., Wisniewski, T., et al. (2008). Amyloid beta protein dimer-containing human CSF disrupts synaptic plasticity: prevention by systemic passive immunization. *J Neurosci* 28, 4231-4237.

- Koo, E. H., Squazzo, S. L., Selkoe, D. J., and Koo, C. H. (1996). Trafficking of cell-surface amyloid beta-protein precursor. I. Secretion, endocytosis and recycling as detected by labeled monoclonal antibody. *J Cell Sci* 109 (Pt 5), 991-998.
- Kukar, T., Prescott, S., Eriksen, J. L., Holloway, V., Murphy, M. P., Koo, E. H., Golde, T. E., and Nicolle, M. M. (2007). Chronic administration of R-flurbiprofen attenuates learning impairments in transgenic amyloid precursor protein mice. *BMC Neurosci* 8, 54.
- Kukar, T. L., Ladd, T. B., Bann, M. A., Fraering, P. C., Narlawar, R., Maharvi, G. M., Healy, B., Chapman, R., Welzel, A. T., Price, R. W., et al. (2008). Substrate-targeting gamma-secretase modulators. *Nature* 453, 925-929.
- Kuo, Y. M., Emmerling, M. R., Vigo-Pelfrey, C., Kasunic, T. C., Kirkpatrick, J. B., Murdoch, G. H., Ball, M. J., and Roher, A. E. (1996). Water-soluble Abeta (N-40, N-42) oligomers in normal and Alzheimer disease brains. *J Biol Chem* 271, 4077-4081.
- Lacor, P. N., Buniel, M. C., Chang, L., Fernandez, S. J., Gong, Y., Viola, K. L., Lambert, M. P., Velasco, P. T., Bigio, E. H., Finch, C. E., et al. (2004). Synaptic targeting by Alzheimer's-related amyloid beta oligomers. *J Neurosci* 24, 10191-10200.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- LaFerla, F. M. (2002). Calcium dyshomeostasis and intracellular signalling in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 3, 862-872.
- Lambert, M. P., Barlow, A. K., Chromy, B. A., Edwards, C., Freed, R., Liosatos, M., Morgan, T. E., Rozovsky, I., Trommer, B., Viola, K. L., et al. (1998). Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 6448-6453.
- Lammich, S., Kojro, E., Postina, R., Gilbert, S., Pfeiffer, R., Jasionowski, M., Haass, C., and Fahrenholz, F. (1999). Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 3922-3927.
- Langosch, D., Brosig, B., Kolmar, H., and Fritz, H. J. (1996). Dimerisation of the glycoporphin A transmembrane segment in membranes probed with the ToxR transcription activator. *J Mol Biol* 263, 525-530.
- Larson, J., Lynch, G., Games, D., and Seubert, P. (1999). Alterations in synaptic transmission and long-term potentiation in hippocampal slices from young and aged PDAPP mice. *Brain Res* 840, 23-35.
- LaVoie, M. J., Fraering, P. C., Ostaszewski, B. L., Ye, W., Kimberly, W. T., Wolfe, M. S., and Selkoe, D. J. (2003). Assembly of the gamma-secretase complex involves early

- formation of an intermediate subcomplex of Aph-1 and nicastrin. *J Biol Chem* 278, 37213-37222.
- Lazo, N. D., Grant, M. A., Condrón, M. C., Rigby, A. C., and Teplow, D. B. (2005). On the nucleation of amyloid beta-protein monomer folding. *Protein Sci* 14, 1581-1596.
- Lee, S. F., Shah, S., Yu, C., Wigley, W. C., Li, H., Lim, M., Pedersen, K., Han, W., Thomas, P., Lundkvist, J., et al. (2004). A conserved GXXXG motif in APH-1 is critical for assembly and activity of the gamma-secretase complex. *J Biol Chem* 279, 4144-4152.
- Lesne, S., Koh, M. T., Kotilinek, L., Kaye, R., Glabe, C. G., Yang, A., Gallagher, M., and Ashe, K. H. (2006). A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature* 440, 352-357.
- Li, Y. M., Lai, M. T., Xu, M., Huang, Q., DiMuzio-Mower, J., Sardana, M. K., Shi, X. P., Yin, K. C., Shafer, J. A., and Gardell, S. J. (2000). Presenilin 1 is linked with gamma-secretase activity in the detergent solubilized state. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 6138-6143.
- Liu, W., Crocker, E., Zhang, W., Elliott, J. I., Luy, B., Li, H., Aimoto, S., and Smith, S. O. (2005). Structural role of glycine in amyloid fibrils formed from transmembrane alpha-helices. *Biochemistry* 44, 3591-3597.
- Lorenzo, A., and Yankner, B. A. (1994). Beta-amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by congo red. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 12243-12247.
- Luhers, T., Ritter, C., Adrian, M., Riek-Loher, D., Bohrmann, B., Dobeli, H., Schubert, D., and Riek, R. (2005). 3D structure of Alzheimer's amyloid-beta(1-42) fibrils. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 17342-17347.
- Ma, B., and Nussinov, R. (2002). Stabilities and conformations of Alzheimer's beta - amyloid peptide oligomers (Abeta 16-22, Abeta 16-35, and Abeta 10-35): Sequence effects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 14126-14131.
- MacKenzie, K. R., Prestegard, J. H., and Engelman, D. M. (1997). A transmembrane helix dimer: structure and implications. *Science* 276, 131-133.
- Mahley, R. W., Weisgraber, K. H., and Huang, Y. (2006). Apolipoprotein E4: a causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 5644-5651.
- Maier, M., Seabrook, T. J., Lazo, N. D., Jiang, L., Das, P., Janus, C., and Lemere, C. A. (2006). Short amyloid-beta (Abeta) immunogens reduce cerebral Abeta load and learning deficits in an Alzheimer's disease mouse model in the absence of an Abeta-specific cellular immune response. *J Neurosci* 26, 4717-4728.
- Maier, M., Seabrook, T. J., and Lemere, C. A. (2005). Developing novel immunogens for an effective, safe Alzheimer's disease vaccine. *Neurodegener Dis* 2, 267-272.

- Marambaud, P., and Robakis, N. K. (2005). Genetic and molecular aspects of Alzheimer's disease shed light on new mechanisms of transcriptional regulation. *Genes Brain Behav* 4, 134-146.
- Marchesi, V. T. (2005). An alternative interpretation of the amyloid Abeta hypothesis with regard to the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 9093-9098.
- Masters, C. L., and Beyreuther, K. T. (1989). The pathology of the amyloid A4 precursor of Alzheimer's disease. *Ann Med* 21, 89-90.
- Mastrangelo, I. A., Ahmed, M., Sato, T., Liu, W., Wang, C., Hough, P., and Smith, S. O. (2006). High-resolution atomic force microscopy of soluble Abeta42 oligomers. *J Mol Biol* 358, 106-119.
- Mattson, M. P. (2004). Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature* 430, 631-639.
- McLaurin, J., Cecal, R., Kierstead, M. E., Tian, X., Phinney, A. L., Manea, M., French, J. E., Lambermon, M. H., Darabie, A. A., Brown, M. E., et al. (2002). Therapeutically effective antibodies against amyloid-beta peptide target amyloid-beta residues 4-10 and inhibit cytotoxicity and fibrillogenesis. *Nat Med* 8, 1263-1269.
- McLaurin, J., Golomb, R., Jurewicz, A., Antel, J. P., and Fraser, P. E. (2000a). Inositol stereoisomers stabilize an oligomeric aggregate of Alzheimer amyloid beta peptide and inhibit abeta -induced toxicity. *J Biol Chem* 275, 18495-18502.
- McLaurin, J., Kierstead, M. E., Brown, M. E., Hawkes, C. A., Lambermon, M. H., Phinney, A. L., Darabie, A. A., Cousins, J. E., French, J. E., Lan, M. F., et al. (2006). Cyclohexanehexol inhibitors of Abeta aggregation prevent and reverse Alzheimer phenotype in a mouse model. *Nat Med* 12, 801-808.
- McLaurin, J., Yang, D., Yip, C. M., and Fraser, P. E. (2000b). Review: modulating factors in amyloid-beta fibril formation. *J Struct Biol* 130, 259-270.
- Moechars, D., Dewachter, I., Lorent, K., Reverse, D., Baekelandt, V., Naidu, A., Tesseur, I., Spittaels, K., Haute, C. V., Checler, F., et al. (1999). Early phenotypic changes in transgenic mice that overexpress different mutants of amyloid precursor protein in brain. *J Biol Chem* 274, 6483-6492.
- Mucke, L., Masliah, E., Yu, G. Q., Mallory, M., Rockenstein, E. M., Tatsuno, G., Hu, K., Kholodenko, D., Johnson-Wood, K., and McConlogue, L. (2000). High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *J Neurosci* 20, 4050-4058.
- Multhaup, G. (1994). Identification and regulation of the high affinity binding site of the Alzheimer's disease amyloid protein precursor (APP) to glycosaminoglycans. *Biochimie* 76, 304-311.

- Multhaup, G., Schlicksupp, A., Hesse, L., Beher, D., Ruppert, T., Masters, C. L., and Beyreuther, K. (1996). The amyloid precursor protein of Alzheimer's disease in the reduction of copper(II) to copper(I). *Science* 271, 1406-1409.
- Munter, L. M., Voigt, P., Harmeier, A., Kaden, D., Gottschalk, K. E., Weise, C., Pipkorn, R., Schaefer, M., Langosch, D., and Multhaup, G. (2007). GxxxG motifs within the amyloid precursor protein transmembrane sequence are critical for the etiology of Abeta42. *Embo J* 26, 1702-1712.
- Oakley, H., Cole, S. L., Logan, S., Maus, E., Shao, P., Craft, J., Guillozet-Bongaarts, A., Ohno, M., Disterhoft, J., Van Eldik, L., et al. (2006). Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *J Neurosci* 26, 10129-10140.
- Ohyagi, Y., Asahara, H., Chui, D. H., Tsuruta, Y., Sakae, N., Miyoshi, K., Yamada, T., Kikuchi, H., Taniwaki, T., Murai, H., et al. (2005). Intracellular Abeta42 activates p53 promoter: a pathway to neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Faseb J* 19, 255-257.
- Parameshwaran, K., Sims, C., Kanju, P., Vaithianathan, T., Shonesy, B. C., Dhanasekaran, M., Bahr, B. A., and Suppiramaniam, V. (2007). Amyloid beta-peptide Abeta(1-42) but not Abeta(1-40) attenuates synaptic AMPA receptor function. *Synapse* 61, 367-374.
- Pellegrini-Giampietro, D. E., Bennett, M. V., and Zukin, R. S. (1994). AMPA/kainate receptor gene expression in normal and Alzheimer's disease hippocampus. *Neuroscience* 61, 41-49.
- Pericak-Vance, M. A., Bebout, J. L., Gaskell, P. C., Jr., Yamaoka, L. H., Hung, W. Y., Alberts, M. J., Walker, A. P., Bartlett, R. J., Haynes, C. A., Welsh, K. A., and et al. (1991). Linkage studies in familial Alzheimer disease: evidence for chromosome 19 linkage. *Am J Hum Genet* 48, 1034-1050.
- Podlisny, M. B., Ostaszewski, B. L., Squazzo, S. L., Koo, E. H., Rydell, R. E., Teplow, D. B., and Selkoe, D. J. (1995). Aggregation of secreted amyloid beta-protein into sodium dodecyl sulfate-stable oligomers in cell culture. *J Biol Chem* 270, 9564-9570.
- Poirier, J., Davignon, J., Bouthillier, D., Kogan, S., Bertrand, P., and Gauthier, S. (1993). Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease. *Lancet* 342, 697-699.
- Pratico, D., and Delanty, N. (2000). Oxidative injury in diseases of the central nervous system: focus on Alzheimer's disease. *Am J Med* 109, 577-585.
- Puzzo, D., and Arancio, O. (2006). Fibrillar beta-amyloid impairs the late phase of long term potentiation. *Curr Alzheimer Res* 3, 179-183.

- Qi-Takahara, Y., Morishima-Kawashima, M., Tanimura, Y., Dolios, G., Hirotsu, N., Horikoshi, Y., Kametani, F., Maeda, M., Saido, T. C., Wang, R., and Ihara, Y. (2005). Longer forms of amyloid beta protein: implications for the mechanism of intramembrane cleavage by gamma-secretase. *J Neurosci* 25, 436-445.
- Reed, J., and Reed, T. A. (1997). A set of constructed type spectra for the practical estimation of peptide secondary structure from circular dichroism. *Anal Biochem* 254, 36-40.
- Robakis, N. K., Wisniewski, H. M., Jenkins, E. C., Devine-Gage, E. A., Houck, G. E., Yao, X. L., Ramakrishna, N., Wolfe, G., Silverman, W. P., and Brown, W. T. (1987). Chromosome 21q21 sublocalisation of gene encoding beta-amyloid peptide in cerebral vessels and neuritic (senile) plaques of people with Alzheimer disease and Down syndrome. *Lancet* 1, 384-385.
- Rogaev, E. I., Sherrington, R., Rogaeva, E. A., Levesque, G., Ikeda, M., Liang, Y., Chi, H., Lin, C., Holman, K., Tsuda, T., and et al. (1995). Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature* 376, 775-778.
- Rogaeva, E., Meng, Y., Lee, J. H., Gu, Y., Kawarai, T., Zou, F., Katayama, T., Baldwin, C. T., Cheng, R., Hasegawa, H., et al. (2007). The neuronal sortilin-related receptor SORL1 is genetically associated with Alzheimer disease. *Nat Genet* 39, 168-177.
- Rohe, M., Carlo, A. S., Breyhan, H., Sporbert, A., Militz, D., Schmidt, V., Wozny, C., Harmeier, A., Erdmann, B., Bales, K. R., et al. (2008). Sortilin-related receptor with A-type repeats (SORLA) affects the amyloid precursor protein-dependent stimulation of ERK signaling and adult neurogenesis. *J Biol Chem* 283, 14826-14834.
- Roher, A. E., Chaney, M. O., Kuo, Y. M., Webster, S. D., Stine, W. B., Haverkamp, L. J., Woods, A. S., Cotter, R. J., Tuohy, J. M., Krafft, G. A., et al. (1996). Morphology and toxicity of Abeta-(1-42) dimer derived from neuritic and vascular amyloid deposits of Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 271, 20631-20635.
- Rossjohn, J., Cappai, R., Feil, S. C., Henry, A., McKinstry, W. J., Galatis, D., Hesse, L., Multhaup, G., Beyreuther, K., Masters, C. L., and Parker, M. W. (1999). Crystal structure of the N-terminal, growth factor-like domain of Alzheimer amyloid precursor protein. *Nat Struct Biol* 6, 327-331.
- Sanner, M. F., Olson, A. J., and Spehner, J. C. (1996). Reduced surface: an efficient way to compute molecular surfaces. *Biopolymers* 38, 305-320.
- Sato, T., Kienlen-Campard, P., Ahmed, M., Liu, W., Li, H., Elliott, J. I., Aimoto, S., Constantinescu, S. N., Octave, J. N., and Smith, S. O. (2006). Inhibitors of amyloid toxicity based on beta-sheet packing of Abeta40 and Abeta42. *Biochemistry* 45, 5503-5516.

- Scheuermann, S., Hamsch, B., Hesse, L., Stumm, J., Schmidt, C., Beher, D., Bayer, T. A., Beyreuther, K., and Multhaup, G. (2001). Homodimerization of amyloid precursor protein and its implication in the amyloidogenic pathway of Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 276, 33923-33929.
- Schmechel, A., Strauss, M., Schlicksupp, A., Pipkorn, R., Haass, C., Bayer, T. A., and Multhaup, G. (2004). Human BACE forms dimers and colocalizes with APP. *J Biol Chem* 279, 39710-39717.
- Schmechel, A., Zentgraf, H., Scheuermann, S., Fritz, G., Pipkorn, R., Reed, J., Beyreuther, K., Bayer, T. A., and Multhaup, G. (2003). Alzheimer beta-amyloid homodimers facilitate A beta fibrillization and the generation of conformational antibodies. *J Biol Chem* 278, 35317-35324.
- Schroeter, E. H., Ilagan, M. X., Brunkan, A. L., Hecimovic, S., Li, Y. M., Xu, M., Lewis, H. D., Saxena, M. T., De Strooper, B., Coonrod, A., et al. (2003). A presenilin dimer at the core of the gamma-secretase enzyme: insights from parallel analysis of Notch 1 and APP proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 13075-13080.
- Seeger, M., Nordstedt, C., Petanceska, S., Kovacs, D. M., Gouras, G. K., Hahne, S., Fraser, P., Levesque, L., Czernik, A. J., George-Hyslop, P. S., et al. (1997). Evidence for phosphorylation and oligomeric assembly of presenilin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 5090-5094.
- Selkoe, D. J. (2004). Alzheimer disease: mechanistic understanding predicts novel therapies. *Ann Intern Med* 140, 627-638.
- Senes, A., Gerstein, M., and Engelman, D. M. (2000). Statistical analysis of amino acid patterns in transmembrane helices: the GxxxG motif occurs frequently and in association with beta-branched residues at neighboring positions. *J Mol Biol* 296, 921-936.
- Shah, S., Lee, S. F., Tabuchi, K., Hao, Y. H., Yu, C., LaPlant, Q., Ball, H., Dann, C. E., 3rd, Sudhof, T., and Yu, G. (2005). Nicastrin functions as a gamma-secretase-substrate receptor. *Cell* 122, 435-447.
- Shankar, G. M., Bloodgood, B. L., Townsend, M., Walsh, D. M., Selkoe, D. J., and Sabatini, B. L. (2007). Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway. *J Neurosci* 27, 2866-2875.
- Shankar, G. M., Li, S., Mehta, T. H., Garcia-Munoz, A., Shepardson, N. E., Smith, I., Brett, F. M., Farrell, M. A., Rowan, M. J., Lemere, C. A., et al. (2008). Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med* 14, 837-842.

- Shaw, K. N., Commins, S., and O'Mara, S. M. (2005). Cyclooxygenase inhibition attenuates endotoxin-induced spatial learning deficits, but not an endotoxin-induced blockade of long-term potentiation. *Brain Res* 1038, 231-237.
- Siemes, C., Quast, T., Kummer, C., Wehner, S., Kirfel, G., Muller, U., and Herzog, V. (2006). Keratinocytes from APP/APLP2-deficient mice are impaired in proliferation, adhesion and migration in vitro. *Exp Cell Res* 312, 1939-1949.
- Simakova, O., and Arispe, N. J. (2006). Early and late cytotoxic effects of external application of the Alzheimer's Abeta result from the initial formation and function of Abeta ion channels. *Biochemistry* 45, 5907-5915.
- Simmons, L. K., May, P. C., Tomaselli, K. J., Rydel, R. E., Fuson, K. S., Brigham, E. F., Wright, S., Lieberburg, I., Becker, G. W., Brems, D. N., and et al. (1994). Secondary structure of amyloid beta peptide correlates with neurotoxic activity in vitro. *Mol Pharmacol* 45, 373-379.
- Sinha, S., Anderson, J. P., Barbour, R., Basi, G. S., Caccavello, R., Davis, D., Doan, M., Dovey, H. F., Frigon, N., Hong, J., et al. (1999). Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. *Nature* 402, 537-540.
- Sisodia, S. S. (1999). Alzheimer's disease: perspectives for the new millennium. *J Clin Invest* 104, 1169-1170.
- Small, D. H., Nurcombe, V., Reed, G., Clarris, H., Moir, R., Beyreuther, K., and Masters, C. L. (1994). A heparin-binding domain in the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease is involved in the regulation of neurite outgrowth. *J Neurosci* 14, 2117-2127.
- Snyder, E. M., Nong, Y., Almeida, C. G., Paul, S., Moran, T., Choi, E. Y., Nairn, A. C., Salter, M. W., Lombroso, P. J., Gouras, G. K., and Greengard, P. (2005). Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta. *Nat Neurosci* 8, 1051-1058.
- Spires, T. L., Meyer-Luehmann, M., Stern, E. A., McLean, P. J., Skoch, J., Nguyen, P. T., Bacskai, B. J., and Hyman, B. T. (2005). Dendritic spine abnormalities in amyloid precursor protein transgenic mice demonstrated by gene transfer and intravital multiphoton microscopy. *J Neurosci* 25, 7278-7287.
- St George-Hyslop, P. H. (2000). Genetic factors in the genesis of Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 924, 1-7.
- Street, A. G., and Mayo, S. L. (1999). Intrinsic beta-sheet propensities result from van der Waals interactions between side chains and the local backbone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 9074-9076.
- Suzuki, N., Cheung, T. T., Cai, X. D., Odaka, A., Otvos, L., Jr., Eckman, C., Golde, T. E., and Younkin, S. G. (1994). An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants. *Science* 264, 1336-1340.

- Tan, E. K., Lee, J., Chen, C. P., Teo, Y. Y., Zhao, Y., and Lee, W. L. (2007). SORL1 haplotypes modulate risk of Alzheimer's disease in Chinese. *Neurobiol Aging*.
- Tang, K., Wang, C., Shen, C., Sheng, S., Ravid, R., and Jing, N. (2003). Identification of a novel alternative splicing isoform of human amyloid precursor protein gene, APP639. *Eur J Neurosci* 18, 102-108.
- Tanzi, R. E., and Bertram, L. (2001). New frontiers in Alzheimer's disease genetics. *Neuron* 32, 181-184.
- Tanzi, R. E., McClatchey, A. I., Lamperti, E. D., Villa-Komaroff, L., Gusella, J. F., and Neve, R. L. (1988). Protease inhibitor domain encoded by an amyloid protein precursor mRNA associated with Alzheimer's disease. *Nature* 331, 528-530.
- Telese, F., Bruni, P., Donizetti, A., Gianni, D., D'Ambrosio, C., Scaloni, A., Zambrano, N., Rosenfeld, M. G., and Russo, T. (2005). Transcription regulation by the adaptor protein Fe65 and the nucleosome assembly factor SET. *EMBO Rep* 6, 77-82.
- Thinakaran, G., Borchelt, D. R., Lee, M. K., Slunt, H. H., Spitzer, L., Kim, G., Ratovitsky, T., Davenport, F., Nordstedt, C., Seeger, M., et al. (1996). Endoproteolysis of presenilin 1 and accumulation of processed derivatives in vivo. *Neuron* 17, 181-190.
- Thinakaran, G., and Koo, E. H. (2008). APP trafficking, processing and function. *J Biol Chem*.
- Treiber, C., Simons, A., Strauss, M., Hafner, M., Cappai, R., Bayer, T. A., and Multhaup, G. (2004). Clioquinol mediates copper uptake and counteracts copper efflux activities of the amyloid precursor protein of Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 279, 51958-51964.
- Ulery, P. G., and Strickland, D. K. (2000). LRP in Alzheimer's disease: friend or foe? *J Clin Invest* 106, 1077-1079.
- Van Broeckhoven, C. L. (1989). Molecular genetic analysis of early onset familial Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 10, 437-438; discussion 446-438.
- Vassar, R. (2005). beta-Secretase, APP and Abeta in Alzheimer's disease. *Subcell Biochem* 38, 79-103.
- Vassar, R., Bennett, B. D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E. A., Denis, P., Teplow, D. B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., et al. (1999). Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286, 735-741.
- Walsh, D. M., Klyubin, I., Fadeeva, J. V., Cullen, W. K., Anwyl, R., Wolfe, M. S., Rowan, M. J., and Selkoe, D. J. (2002). Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* 416, 535-539.

- Walsh, D. M., Lomakin, A., Benedek, G. B., Condron, M. M., and Teplow, D. B. (1997). Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Detection of a protofibrillar intermediate. *J Biol Chem* 272, 22364-22372.
- Walsh, D. M., Tseng, B. P., Rydel, R. E., Podlisny, M. B., and Selkoe, D. J. (2000). The oligomerization of amyloid beta-protein begins intracellularly in cells derived from human brain. *Biochemistry* 39, 10831-10839.
- Walter, J., Capell, A., Hung, A. Y., Langen, H., Schnolzer, M., Thinakaran, G., Sisodia, S. S., Selkoe, D. J., and Haass, C. (1997). Ectodomain phosphorylation of beta-amyloid precursor protein at two distinct cellular locations. *J Biol Chem* 272, 1896-1903.
- Walter, J., Schindzielorz, A., Hartung, B., and Haass, C. (2000). Phosphorylation of the beta-amyloid precursor protein at the cell surface by ectocasein kinases 1 and 2. *J Biol Chem* 275, 23523-23529.
- Wang, P., Yang, G., Mosier, D. R., Chang, P., Zaidi, T., Gong, Y. D., Zhao, N. M., Dominguez, B., Lee, K. F., Gan, W. B., and Zheng, H. (2005). Defective neuromuscular synapses in mice lacking amyloid precursor protein (APP) and APP-Like protein 2. *J Neurosci* 25, 1219-1225.
- Weggen, S., Eriksen, J. L., Das, P., Sagi, S. A., Wang, R., Pietrzik, C. U., Findlay, K. A., Smith, T. E., Murphy, M. P., Bulter, T., et al. (2001). A subset of NSAIDs lower amyloidogenic A β 42 independently of cyclooxygenase activity. *Nature* 414, 212-216.
- Weggen, S., Eriksen, J. L., Sagi, S. A., Pietrzik, C. U., Ozols, V., Fauq, A., Golde, T. E., and Koo, E. H. (2003). Evidence that nonsteroidal anti-inflammatory drugs decrease amyloid beta 42 production by direct modulation of gamma-secretase activity. *J Biol Chem* 278, 31831-31837.
- Weidemann, A., Eggert, S., Reinhard, F. B., Vogel, M., Paliga, K., Baier, G., Masters, C. L., Beyreuther, K., and Evin, G. (2002). A novel epsilon-cleavage within the transmembrane domain of the Alzheimer amyloid precursor protein demonstrates homology with Notch processing. *Biochemistry* 41, 2825-2835.
- Weidemann, A., König, G., Bunke, D., Fischer, P., Salbaum, J. M., Masters, C. L., and Beyreuther, K. (1989). Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein. *Cell* 57, 115-126.
- Wertkin, A. M., Turner, R. S., Pleasure, S. J., Golde, T. E., Younkin, S. G., Trojanowski, J. Q., and Lee, V. M. (1993). Human neurons derived from a teratocarcinoma cell line express solely the 695-amino acid amyloid precursor protein and produce intracellular beta-amyloid or A4 peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 9513-9517.

- Westmeyer, G. G., Willem, M., Lichtenthaler, S. F., Lurman, G., Multhaup, G., Assfalg-Machleidt, I., Reiss, K., Saftig, P., and Haass, C. (2004). Dimerization of beta-site beta-amyloid precursor protein-cleaving enzyme. *J Biol Chem* 279, 53205-53212.
- Wilquet, V., and De Strooper, B. (2004). Amyloid-beta precursor protein processing in neurodegeneration. *Curr Opin Neurobiol* 14, 582-588.
- Wolfe, M. S. (2006). The gamma-secretase complex: membrane-embedded proteolytic ensemble. *Biochemistry* 45, 7931-7939.
- Wolfe, M. S., Xia, W., Ostaszewski, B. L., Diehl, T. S., Kimberly, W. T., and Selkoe, D. J. (1999). Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. *Nature* 398, 513-517.
- Xu, Y., Shen, J., Luo, X., Zhu, W., Chen, K., Ma, J., and Jiang, H. (2005). Conformational transition of amyloid beta-peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 5403-5407.
- Yan, S., Gawlak, G., Makabe, K., Tereshko, V., Koide, A., and Koide, S. (2007). Hydrophobic surface burial is the major stability determinant of a flat, single-layer beta-sheet. *J Mol Biol* 368, 230-243.
- Younkin, S. G. (1998). The role of A beta 42 in Alzheimer's disease. *J Physiol Paris* 92, 289-292.
- Zhao, G., Cui, M. Z., Mao, G., Dong, Y., Tan, J., Sun, L., and Xu, X. (2005). gamma-Cleavage is dependent on zeta-cleavage during the proteolytic processing of amyloid precursor protein within its transmembrane domain. *J Biol Chem* 280, 37689-37697.
- Zhao, G., Mao, G., Tan, J., Dong, Y., Cui, M. Z., Kim, S. H., and Xu, X. (2004). Identification of a new presenilin-dependent zeta-cleavage site within the transmembrane domain of amyloid precursor protein. *J Biol Chem* 279, 50647-50650.
- Zheng, H., Jiang, M., Trumbauer, M. E., Sirinathsinghji, D. J., Hopkins, R., Smith, D. W., Heavens, R. P., Dawson, G. R., Boyce, S., Conner, M. W., et al. (1995). beta-Amyloid precursor protein-deficient mice show reactive gliosis and decreased locomotor activity. *Cell* 81, 525-531.
- Zheng, J., Jang, H., Ma, B., Tsai, C. J., and Nussinov, R. (2007). Modeling the Alzheimer Abeta17-42 fibril architecture: tight intermolecular sheet-sheet association and intramolecular hydrated cavities. *Biophys J* 93, 3046-3057.
- Zhu, X., Lee, H. G., Casadesus, G., Avila, J., Drew, K., Perry, G., and Smith, M. A. (2005). Oxidative imbalance in Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol* 31, 205-217.
- Zhu, X., Perry, G., Moreira, P. I., Aliev, G., Cash, A. D., Hirai, K., and Smith, M. A. (2006). Mitochondrial abnormalities and oxidative imbalance in Alzheimer disease. *J Alzheimers Dis* 9, 147-153.
- Zucker, R. S., and Regehr, W. G. (2002). Short-term synaptic plasticity. *Annu Rev Physiol* 64, 355-405.

9 Anhang

9.1 Veröffentlichungen

Artikel:

Munter L.M., Voigt P., **Harmeier A.**, Kaden D., Gottschalk K., Weise C., Pipkorn R., Schaefer M., Langosch D., Multhaup G. „GxxxG- motifs within the amyloid precursor protein transmembrane sequence are critical for the etiology of A β 42.” *Embo J.*, (2007)

Rohe M., Carlo A.S., Breyhan H., Sporbert A., Militz D., Schmidt V., Wozny C., **Harmeier A.**, Erdmann B., Bales K.R., Wolf, S., Kempermann G., Paul S.M., Schmitz D., Bayer TA., Willnow T.E., Andersen O.M. „Sortilin-related receptor with A-type repeats (SORLA) affects the amyloid precursor protein-dependent stimulation of ERK signaling and adult neurogenesis” *JBC.*, (2008)

Eingereichte Artikel:

Harmeier A., Wozny C., Rost B.R., Munter L.M., Hua H., Georgiev O., Beyermann M., Hildebrand P.W., Weise C., Schaffner W., Schmitz D., Multhaup G. „Amyloid- β Glycine 33 uncouples oligomerization from toxicity and LTP inhibition.”

Artikel in Vorbereitung:

Harmeier A., Gensler M., Zhuang W., Beyermann M., Hildebrand P.W., Lurz R., Rabe J.P., Multhaup G.; “Structural analysis of A β aggregates reveals that toxicity of A β is restricted to dimers and tetramers and does not play a role during fibril formation”.

Konferenzbeiträge:

Harmeier A., Munter L.M., Wozny C., Rost B.R., Zhuang W., Gensler M., Beyermann M., Lurz R., Rabe J.P., Schmitz D., Multhaup G.; "Oligomerization of A β , toxicity and LTP inhibition are not intimately linked."

Neuroscience 2008 SfN 38th Annual Meeting in Washington, USA; 14-20. Nov, 2008;
orale Präsentation

Harmeier A., Munter L.M., Wozny C., Rost B.R., Zhuang W., Gensler M., Beyermann M., Lurz R., Rabe J.P., Schmitz D., Multhaup G.; "The GxxxG- motif of the A β sequence unlinks A β aggregation from toxicity."

11th international Conference on Alzheimer's Disease in Chicago, USA, 27-31. July, 2008;
Poster Präsentation

Harmeier A., Munter L.M., Wozny C., Zhuang W., Beyermann M., Weise C., Rabe J.P., Schmitz D., Multhaup G.; "The Role of GxxxG- Abeta motif in aggregation and LTP."

Neuroscience 2007 SfN 37th Annual Meeting in San Diego, USA; 06. Nov, 2007;
Poster Präsentation

Munter L.M., **Harmeier A.**, Wozny C., Voigt, P., Pipkorn, R., Schmitz D., Schaefer, M., Langosch, D., Multhaup, G. „A GxxxG- motif the amloid precursor protein (APP) transmembrane sequence determines on the A β 42 generation and toxicity."

Neuroscience 2006 SfN 36th Annual Meeting in Atlanta, USA; 16. Okt, 2006;
orale Präsentation

Harmeier A., Munter L., Wozny C., Schmitz D., Pipkorn R., Multhaup G. "Role of single amino acids of the A β sequence on cytotoxicity and inhibition of LTP".

10th international Conference on Alzheimer's Disease in Madrid, Spain, 16. July, 2006;
orale Präsentation

9.2 Lebenslauf

**Der Lebenslauf ist in der Online-Version
aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.**

9.3 Danksagung

Zuerst möchte ich mich ganz herzlich bei Prof. Gerd Multhaup für die Möglichkeit bedanken an diesem spannendem Thema zu arbeiten, für die fruchtbaren Stunden der Diskussion und die wertvolle Unterstützung als Wissenschaftlerin zu wachsen.

Prof. Dietmar Kuhl möchte ich für die Übernahme des Zweitgutachtens und die Unterstützung als Leiter des Graduiertenkollegs 1123 danken.

Meinen Arbeitskollegen, Veit Althoff, Hermann Bayer, Gerhard Buchlow, Christian Barucker, Tobias Bethge, Karolina Bobowski, Anne Botev, Susanne Fehse, Dr. Daniela Kaden, Dr. Kerstin May-Witt, Dr. Lisa Münter, Dr. Henning Otto, Luise Richter, Andrea Senge, Dr. Christoph Weise, Thomas Wons möchte ich für die freundschaftliche, diskussionsreiche und hilfsbereite Arbeitsatmosphäre danken. Auch bei meinen Mitarbeitersstudenten Philipp Consentius und Ben Wellnder möchte mich ich für ihre Hilfe bedanken. Besonders danken möchte ich Christian Barucker, der mich erst als Hiwi, dann Diplomand und schließlich Doktorand tatkräftig unterstützt hat und dessen Daten uns in Zukunft der Lösung der A β vermittelten Toxizität näher bringen. Tobias Bethge, als „Bay-Mitbewohner“ und Blockpraktikumsmiststreiter, möchte ich für sein wissenschaftliches Wissen und seinen Humor herzlich danken. Daniela Kaden und Lisa Münter möchte ich dafür danken, dass sie mir den Einstieg in die Alzheimer Thematik und den Laboralltag erleichtert und mir bei der Korrektur des einen oder anderen Textes geholfen haben.

Einen ganz besonderen Dank möchte ich auch Prof. Dietmar Schmitz aussprechen. Durch ihn konnte ich erste Erfahrungen auf dem Gebiet der Elektrophysiologie sammeln und somit eine neue Sichtweise erfahren. Auch seiner Arbeitsgruppe, insbesondere Dr. Christian Wozny (heute MRC, Cambridge, UK) und Benjamin Rost, möchte ich für die stete Hilfsbereitschaft in Set-up Fragen und die angenehme, produktive Laboratmosphäre bedanken. Es hat mir sehr viel Freude gemacht mit euch zu diskutieren und Neues zu erlernen.

Auch meinen anderen Kooperationspartnern, allen voran Prof. Walter Schaffner und seinem Mitarbeiter Haiqing Hua, Manuel Gensler aus dem Labor von Prof. Jürgen Rabe, Dr. Peter Hildebrand und Dr. Rudi Lurz möchte ich für die fruchtbaren Zusammenarbeiten danken.

Abschließend möchte ich meiner Familie und meinem Partner Christian für selbstlose Unterstützung, gute Ratschläge und unermüdliches Verständnis danken.

9.4 Erklärung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel verfasst habe.

Diese Arbeit wurde bisher an noch keiner anderen Universität vorgelegt.

Berlin, den 11.11.2008

Anja Harmeier